

Nanoparticelle: caratterizzazione e interazioni biologiche



24-26 marzo 2010

NPs e modelli in vitro: l'importanza di conoscere il proprio sistema

Maurizio Gualtieri

Università degli Studi di Milano Bicocca

Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio

maurizio.gualtieri@unimib.it





Outline

Introduzione modelli *in vitro*

Nanoparticelle e modelli *in vitro*

Study case: nanosilice e cellule bronchiali

Sistemi in vitro

***“cellule isolate dal loro ambiente e messe
in condizioni di vivere all'interno di un
sistema definito”***

Coltura primaria

- Le cellule derivano direttamente dal tessuto d'origine, mantenendo molte caratteristiche funzionali riscontrabili *in vivo*.
- Durante la crescita avviene una selezione in base al grado di proliferazione: aumentano cellule attivamente proliferanti, restano stazionarie quelle in grado di sopravvivere ma non di duplicarsi, mentre altri tipi di cellule sono incapaci di resistere.
- Questo comporta un'evoluzione nel tempo delle proporzioni dei diversi tipi cellulari, fino ad un equilibrio notevolmente diverso dalla situazione di partenza.
- Quando la proliferazione ha depauperato il mezzo di coltura, occorre provvedere ad una sub-coltura in un nuovo recipiente con terreno fresco

Trasformazione di una linea cellulare

- Il processo di trasformazione rende **immortale** una linea cellulare.
- Ha inizio con l'acquisizione da parte della linea cellulare della capacità di proliferare indefinitamente (**immortalizzazione**); richiede un certo numero di mutazioni in geni diversi.
- Quando avviene in coltura (anche spontaneamente), si osservano al microscopio dei **foci di trasformazione**, ovvero masserelle di cellule simili a quelle tumorali, che non risentono più della inibizione da contatto.

Linee cellulari

- **Linee cellulari a vita finita** – Resistono in coltura un numero limitato di cicli; crescono in monostrato risentendo della inibizione da contatto; fortemente dipendenti da fattori di crescita presenti nel siero.
- **Linee cellulari continue (trasformate)** – hanno origine da mutazioni (spontanee o indotte con agenti chimici, fisici o biologici) a partire da colture primarie o da linee cellulari a vita finita; possono essere ottenute da tumori. Minore dipendenza da fattori del siero e minore inibizione da contatto.
- **Linee cellulari clonali** – sono linee derivanti da una singola cellula; consentono di ottenere una popolazione il più possibile omogenea

CONDIZIONI DI CRESCITA CELLULARE

Creare un ambiente artificiale il più possibile simile alle condizioni in vivo

SUBSTRATO

cellule in sospensione (cellule del tessuto sanguigno, alcune forme tumorali)

cellule adese (flasks, capsule Petri)

MEZZO DI COLTURA

soluzione salina bilanciata (sali inorganici in grado di mantenere il pH fisiologico e la pressione osmotica); fonte di energia (glucosio); sistemi tampone; amino acidi; vitamine; ormoni; proteine e peptidi; acidi grassi e lipidi; elementi in tracce; (ferro, zinco, rame, selenio); antibiotici; siero (albumina, fattori di crescita, fattori di adesione)

Vantaggi

- Sistemi semplificati altamente riproducibili
- Analisi dei meccanismi cellulari e molecolari della tossicità
- Identificazione di danni precoci
- Riconoscimento di effetti reversibili
- Uso di piccole quantità di sostanze (anche i prodotti intermedi e secondari del metabolismo dei composti originali)
- Tecniche relativamente semplici
- Costi contenuti e risposte rapide rispetto alla sperimentazione in animale
- Possibilità di allestire il numero di repliche necessario per ottenere significatività statistica
- Riduzione dell'uso di animali da esperimento

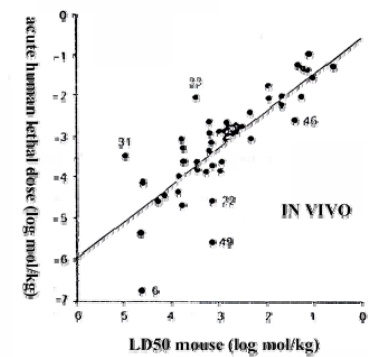
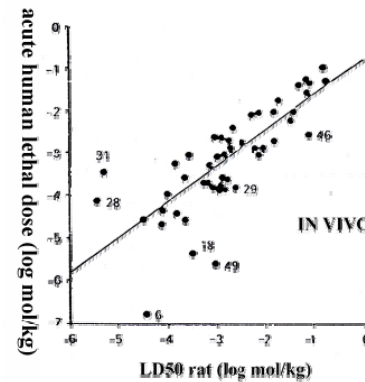
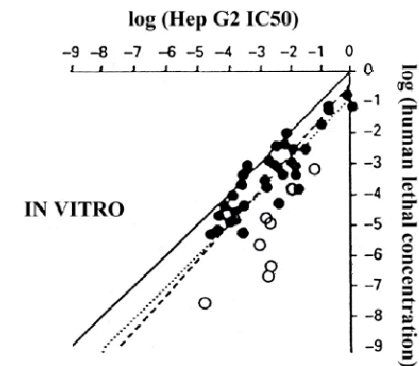
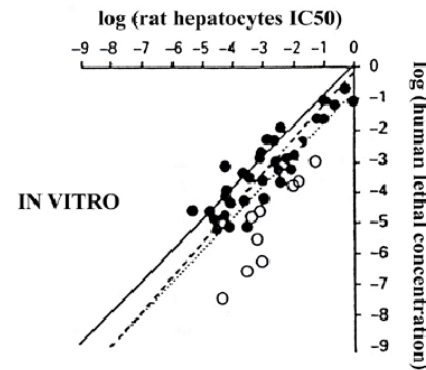
Limiti

- Sistemi semplificati rispetto a un organismo pluricellulare
- Condizioni di esposizione diverse da quelle *in vivo*
- Le sostanze possono interagire con i componenti del mezzo di coltura
- Non permettono di studiare effetti tossici mediati (per esempio, da ormoni o dal sistema nervoso centrale)
- Non tutti i meccanismi di tossicità possono essere rilevati in un unico sistema sperimentale
- Analisi di tossicità acuta più che cronica
- Difficoltà di correlare le concentrazioni attive *in vitro* con quelle *in vivo*
- Caratteristiche delle cellule variabili nel tempo

CORRELAZIONE TRA DATI IN VIVO E IN VITRO (Tossicità acuta) (Da "Ponsoda et al., ATLA 25: 423-436, 1997)

CONCLUSIONI: Dati di tossicità umana possono essere previsti in maniera più accurata con colture di cellule eucariote rispetto a cellule procariote.

I sistemi *in vitro*, nonostante non siano in grado di prevedere in maniera accurata la tossicità acuta dell'uomo, forniscono informazioni attendibili riguardanti i range di tossicità dei composti chimici.



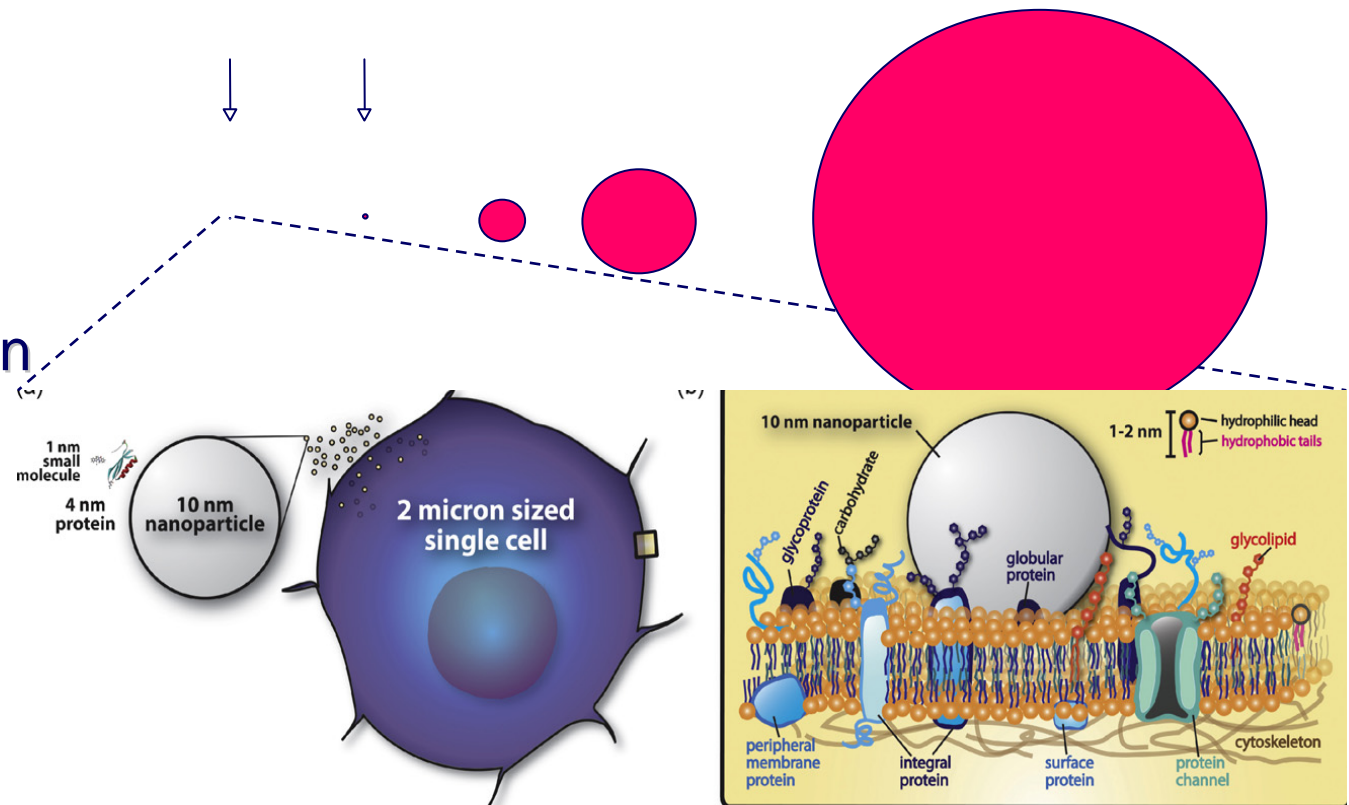
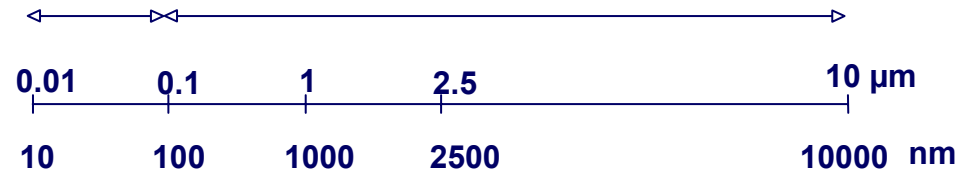
Nanoparticles:
engineered particles
with at least one
dimension lower than
100 nm.

Ultrafine particles:
particles aero-
dispersed with one
dimension lower than
100 nm

Aitken particles:
particles in the air
lower than 100 nm
(physic of the
atmosphere)

Ultrafine particles and
Nanoparticles (NPs)

Particulate matter, PM10 and PM2.5



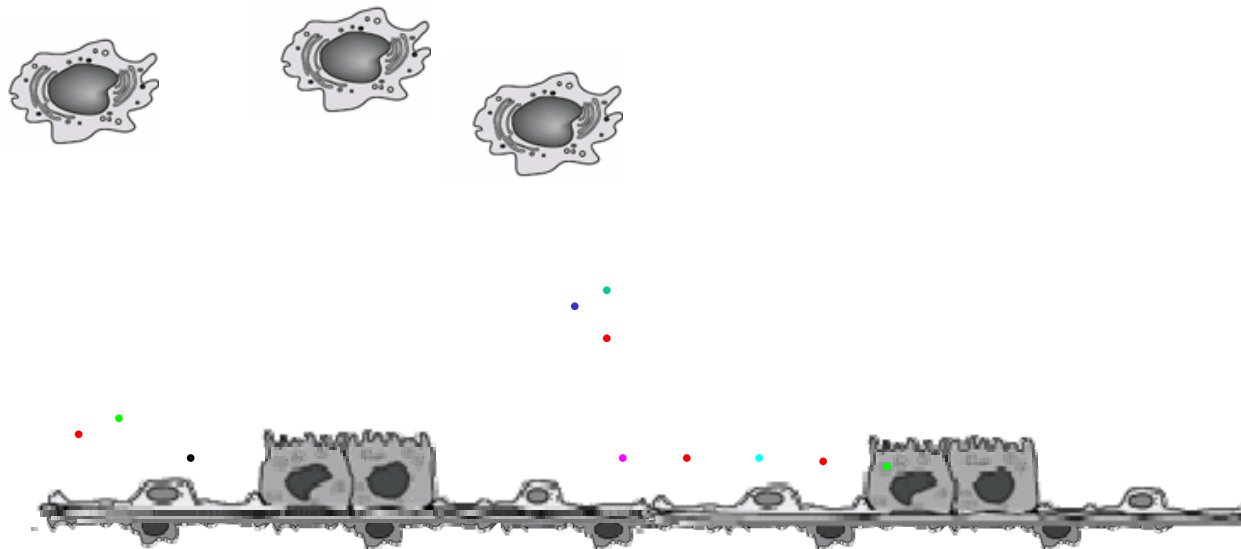
Nanoparticelle e epitelio polmonare

Epithelial cells stress promotes release of cytokines and other mediators recruitment and activation of macrophages (release of cytokines, ROS).

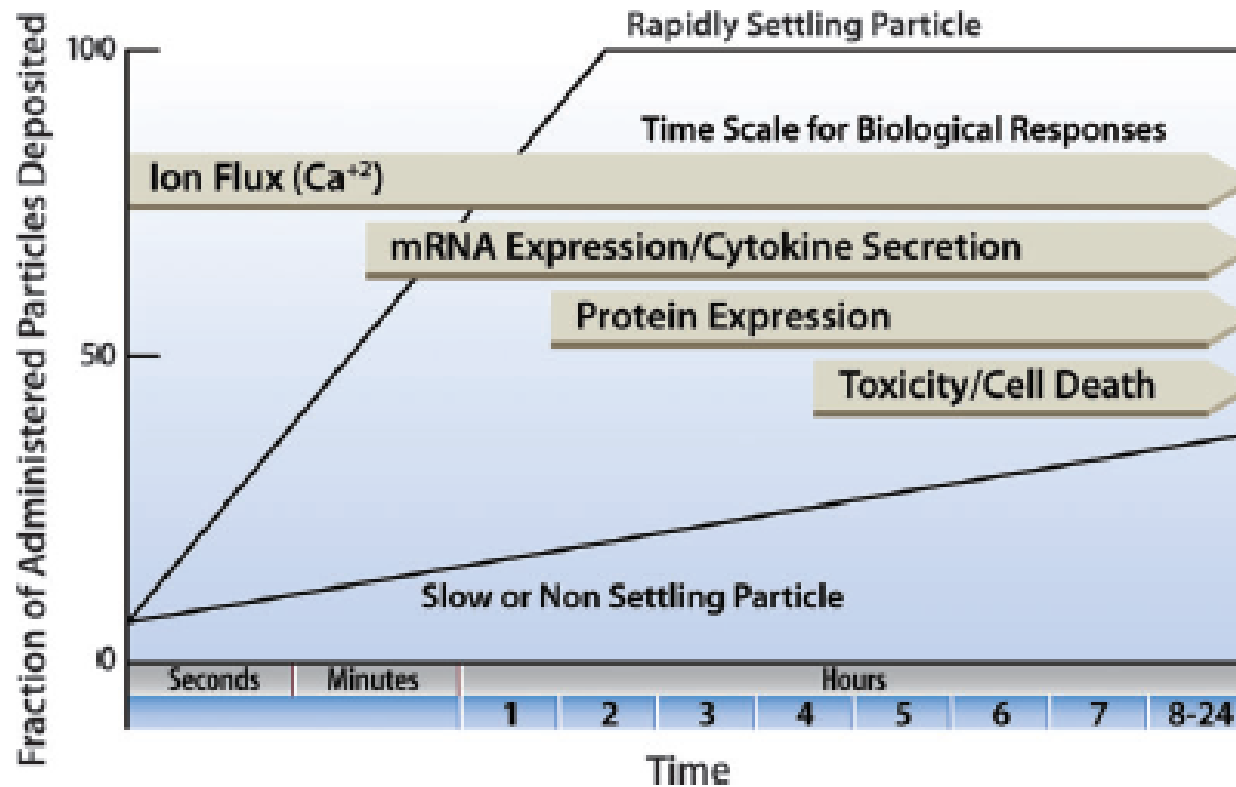
Recruitment of immune cells inflammation epithelial cell stress possible chronic inflammation.

Possible translocation of NPs and inflammation mediators cardiac and other organ diseases

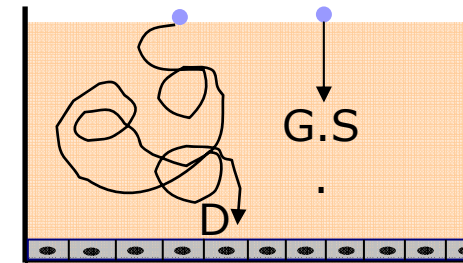
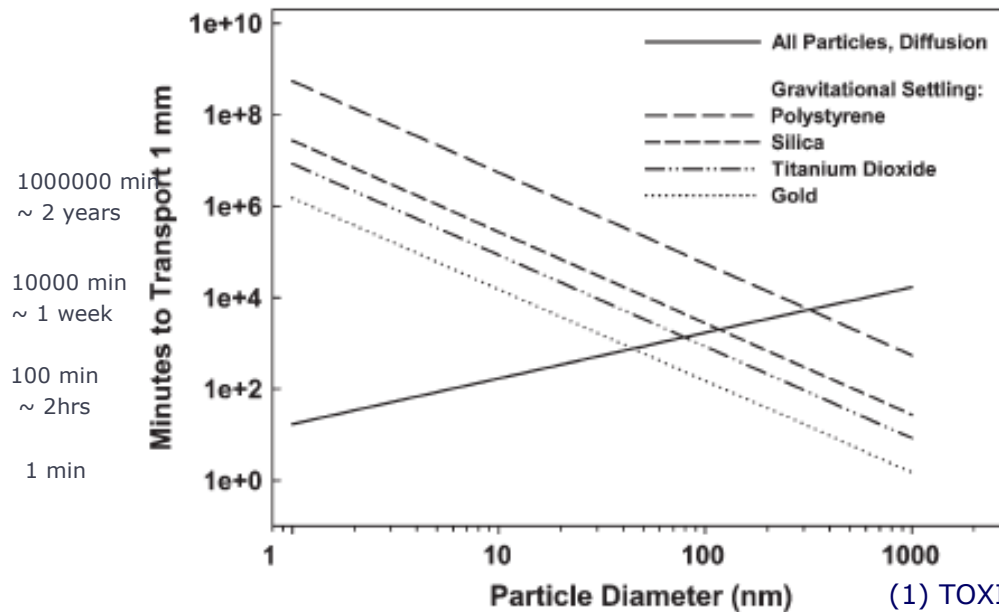
-
-
-
-



Nanoparticelle e sistemi *in vitro*



Nanoparticelle e sistemi *in vitro*: dosimetria



$$D = \frac{RT}{N6\pi\mu d}$$

$$GS = \frac{2g(\rho_p - \rho_m)d^2}{9\mu}$$

Il grafico mostra la relazione teorica tra diametro di una nanoparticella e tempo di diffusione (linee tratteggiate) o di sedimentazione (linea intera) in 1 mm di fluido (acqua).

Lison et al (2008) hanno tuttavia evidenziato sperimentalmente che per Si monodispersa la dose teorica ($\mu\text{g/ml}$) è un parametro valido.

Caratteristiche delle NP e studi tossicologici

(è necessario caratterizzare a fondo il "sistema NP")

- Forma e dimensione (TEM)
- Area superficiale (BET)
- Reattività superficiale
- Stato di aggregazione (DLS)
- Comportamento idrodinamico (DLS)

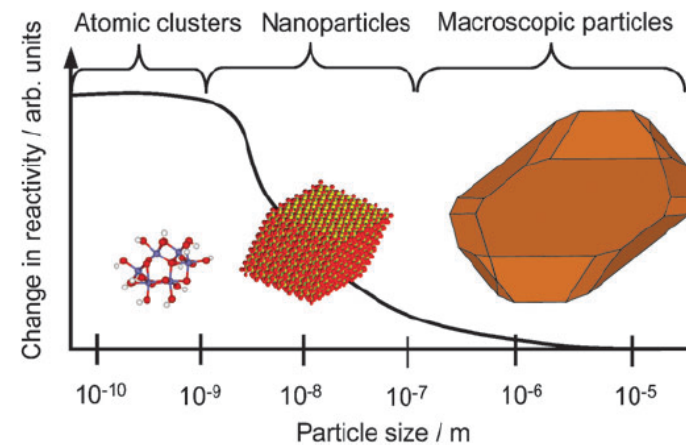


Fig. 1 Generalized trend for size-dependent reactivity change of a material as the particle transitions from macroscopic (bulk-like) to atomic. Reactivity can increase or decrease depending on the material and the chemical reaction involved.

Caratteristiche delle NP e studi tossicologici

(è necessario caratterizzare a fondo il "sistema NP")

- Forma e dimensione (TEM)
- Area superficiale (BET)
- Reattività superficiale
- Stato di aggregazione (DLS)
- Comportamento idrodinamico (DLS)

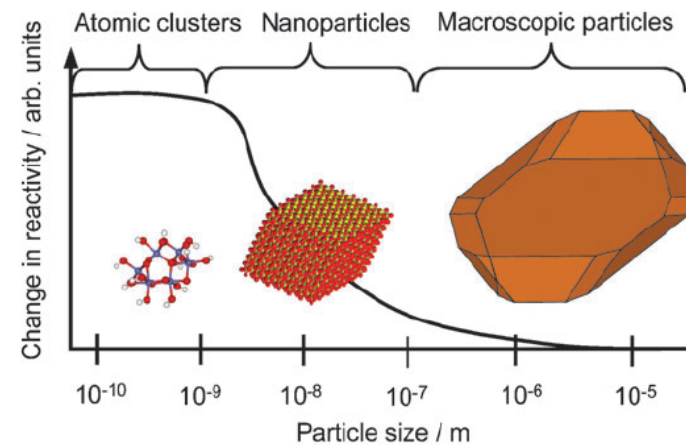


Fig. 1 Generalized trend for size-dependent reactivity change of a material as the particle transitions from macroscopic (bulk-like) to atomic. Reactivity can increase or decrease depending on the material and the chemical reaction involved.

Nanoparticelle come misurare lo stato di aggregazione: dynamic light scattering e Z-potenziale

Dynamic Light scattering: DLS fornisce indicazioni sul diametro idrodinamico delle nanoparticelle in un fluido. NON fornisce il diametro delle nanoparticelle!

(The hydrodynamic diameter is the diameter of an equivalent hard sphere that diffuses at the same rate as the analyte)

Fornisce anche l'indice di polidispersione (aggregazione/agglomerazione)

Nanoparticelle aggregazione e agglomerazione

- **Agglomerate** [from the Latin *agglomerare* (*glomus-meris* ball)]. Gathered into a ball or cluster; collected into a mass.
- **Aggregate** [from the Latin *aggregare* herd together (*grex gregis* flock)]. A mass formed by the union of individual particles; an assemblage, a collection.

The Chambers Science and Technology Dictionary² defines agglomerate and aggregate as follows:

- **Agglomerate** = assemblage of particles rigidly joined together, as by partial fusion (sintering) or by growing together.
- **Aggregate** = assemblage of particles which are loosely coherent.

An aggregate is a cluster of particles held together by strong chemical bonds.

Agglomerates are defined as loose accumulations of particles sticking together by, for example, hydrogen bonds and/or van der Waals forces.

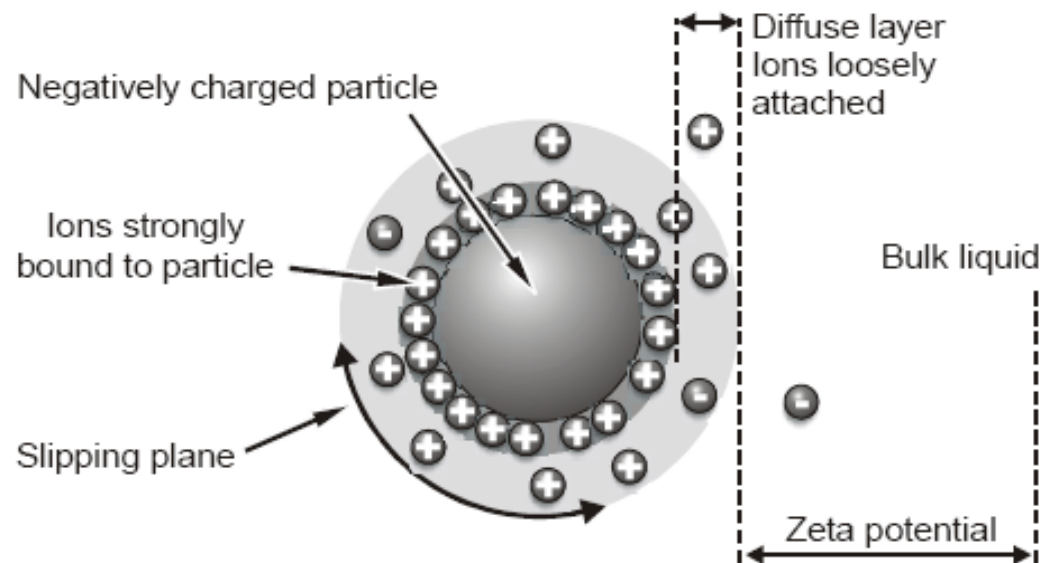
NICHOLS ET AL.

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 91, NO. 10, OCTOBER 2002

Toxicology Letters 186 (2009) 148–151

Nanoparticelle come misurare lo stato di aggregazione: dynamic light scattering e Z-potenziale

If all the particles in suspension have a large negative or positive Zeta potential then they will tend to repel each other and there is no tendency to flocculate. However, if the particles have low Zeta potential values then there is no force to prevent the particles coming together and flocculating. The general dividing line between stable and unstable suspensions is generally taken at either +30mV or -30mV. Particles with Zeta potentials more positive than +30mV or more negative than -30mV are normally considered stable.



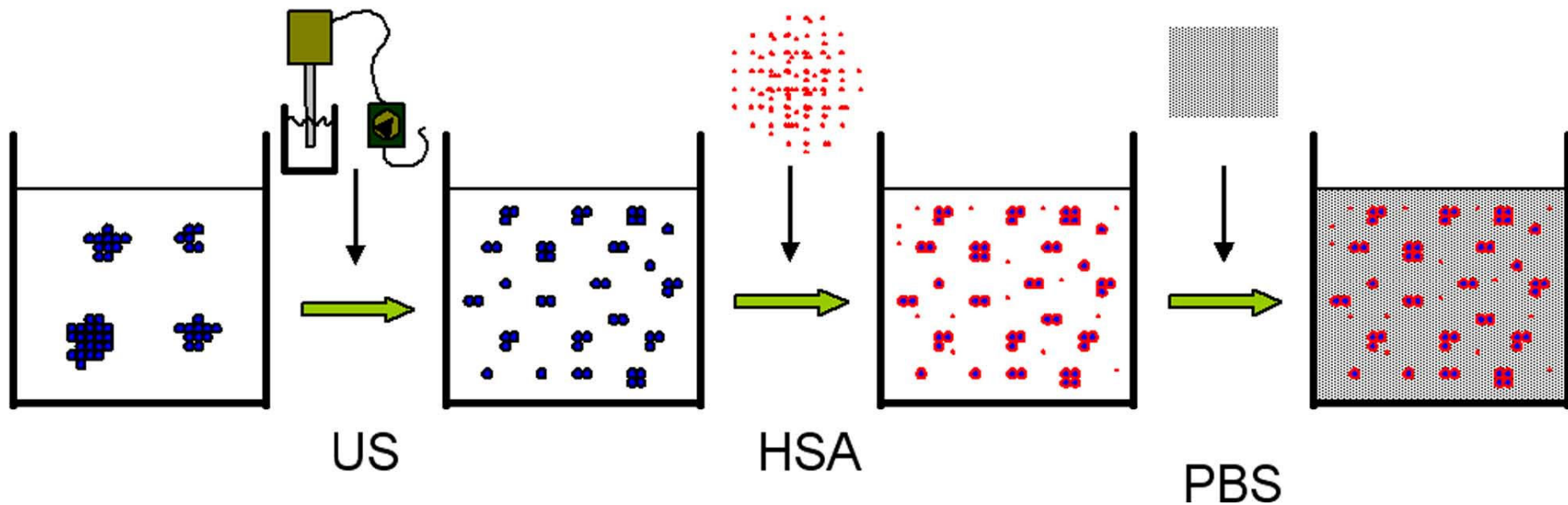
Nanoparticelle aggregazione e agglomerazione

- Preparazione della sospensione di NPs
- Caratterizzazione del comportamento delle NPs nei mezzi di coltura

Nanoparticelle aggregazione e agglomerazione

- Preparazione della sospensione di NPs

Scelta della fase liquida, aggiunta di surfattanti/proteine, sonicazione vs agitazione...



Nanoparticelle aggregazione e agglomerazione

- Preparazione della sospensione di NPs

Scelta della fase liquida, aggiunta di surfattanti/proteine, sonicazione vs agitazione...

Particle	Average diameter (nm)	Pdl	Zeta Potential (mV)
Titanium(IV) oxide nanopowder 99.5% rutile ~ 10 nm × 40 nm			
TiO ₂ rutile – Sigma			
DI H ₂ O no US	502 ± 34	0.434 ± 0.086	-44.2 ± 0.3
DI H ₂ O	160 ± 2	0.166 ± 0.015	-40.9 ± 3
PBS	641 ± 69	0.263 ± 0.022	-19.5 ± 6.3
PBS, HSA	186 ± 10	0.212 ± 0.03	-8.8 ± 0.9
PBS, Tween	578 ± 132	0.248 ± 0.017	-13.3 ± 4.4
PBS, mserum	175 ± 5	0.270 ± 0.046	-10.7 ± 1.5

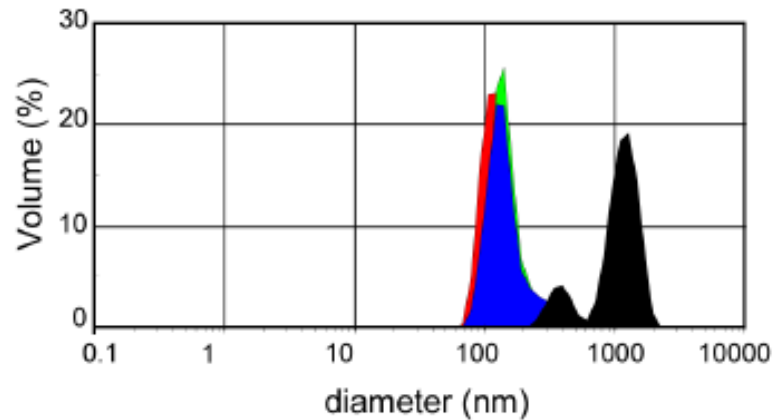
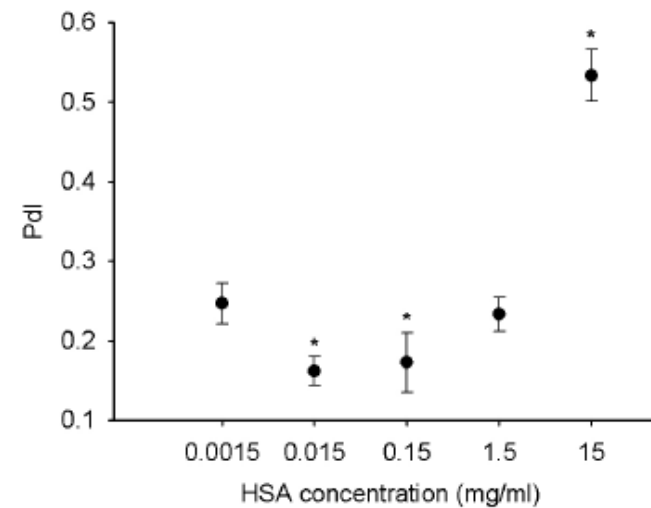
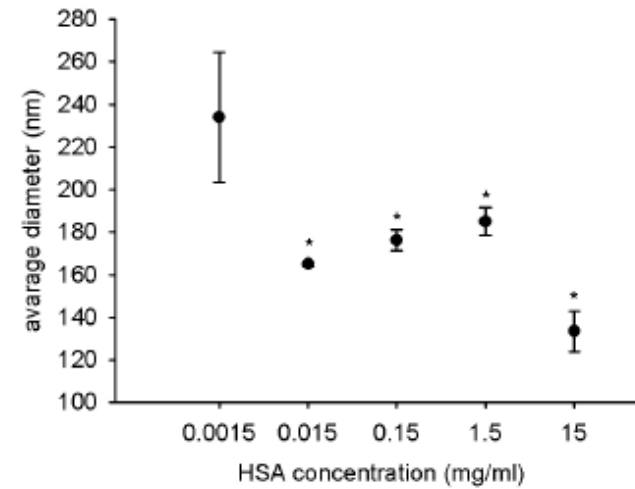


Figure 3
Size distribution by volume of a TiO₂ (rutile) dispersion measured after each preparation step. TiO₂ (rutile) was dispersed in distilled water and sonicated (red), then HSA (blue) and finally concentrated PBS (green) was given to the dispersion. TiO₂ (rutile) was also prepared on the same way but without HSA (black).



Caratterizzazione del comportamento delle NPs nei mezzi di coltura

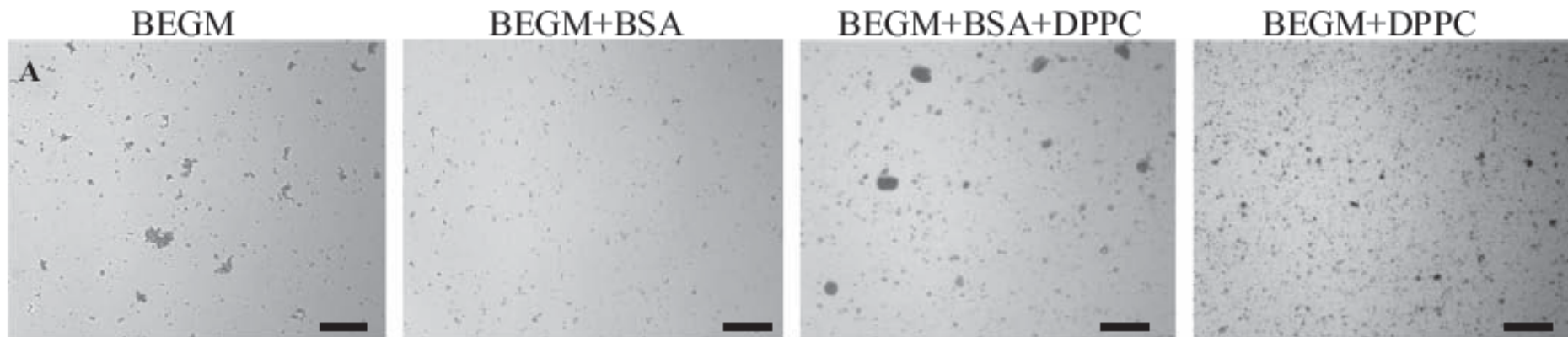
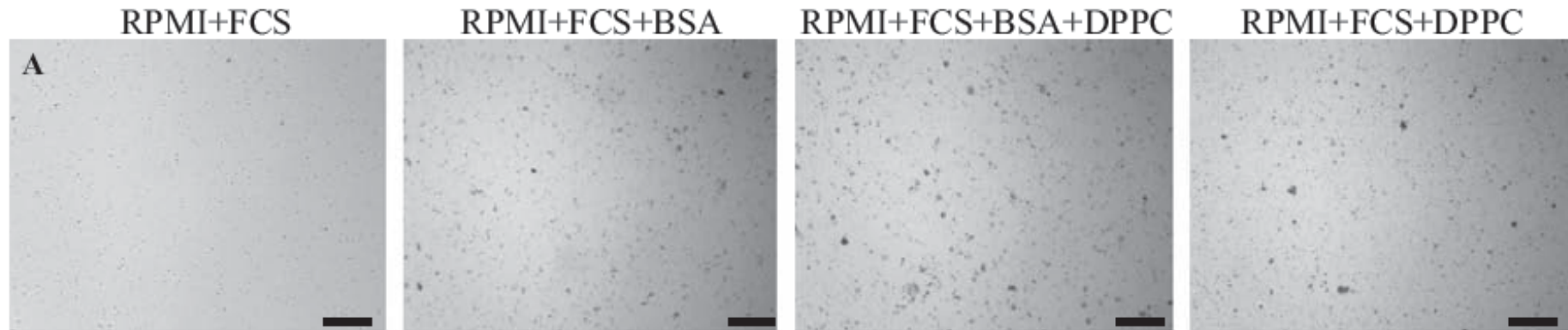


Table 2 Mean particle size (\pm SD) of ENP in BEGM dispersion system derived from optical microscopy images

	<i>BEGM</i>	<i>BEGM + BSA</i>	<i>BEGM + BSA + DPPC</i>	<i>BEGM + DPPC</i>
Nano TiO ₂ rutile	4.48 (5.25) μ m	3.25 (2.34) μ m	5.51 (5.43) μ m	4.33 (3.30) μ m



	<i>RPMI + FCS</i>	<i>RPMI + FCS + BSA</i>	<i>RPMI + FCS + BSA + DPPC</i>	<i>RPMI + FCS + DPPC</i>
Nano TiO ₂ rutile	2.84 (1.97) μm	4.46 (3.75) μm	4.24 (3.50) μm	3.34 (2.69) μm

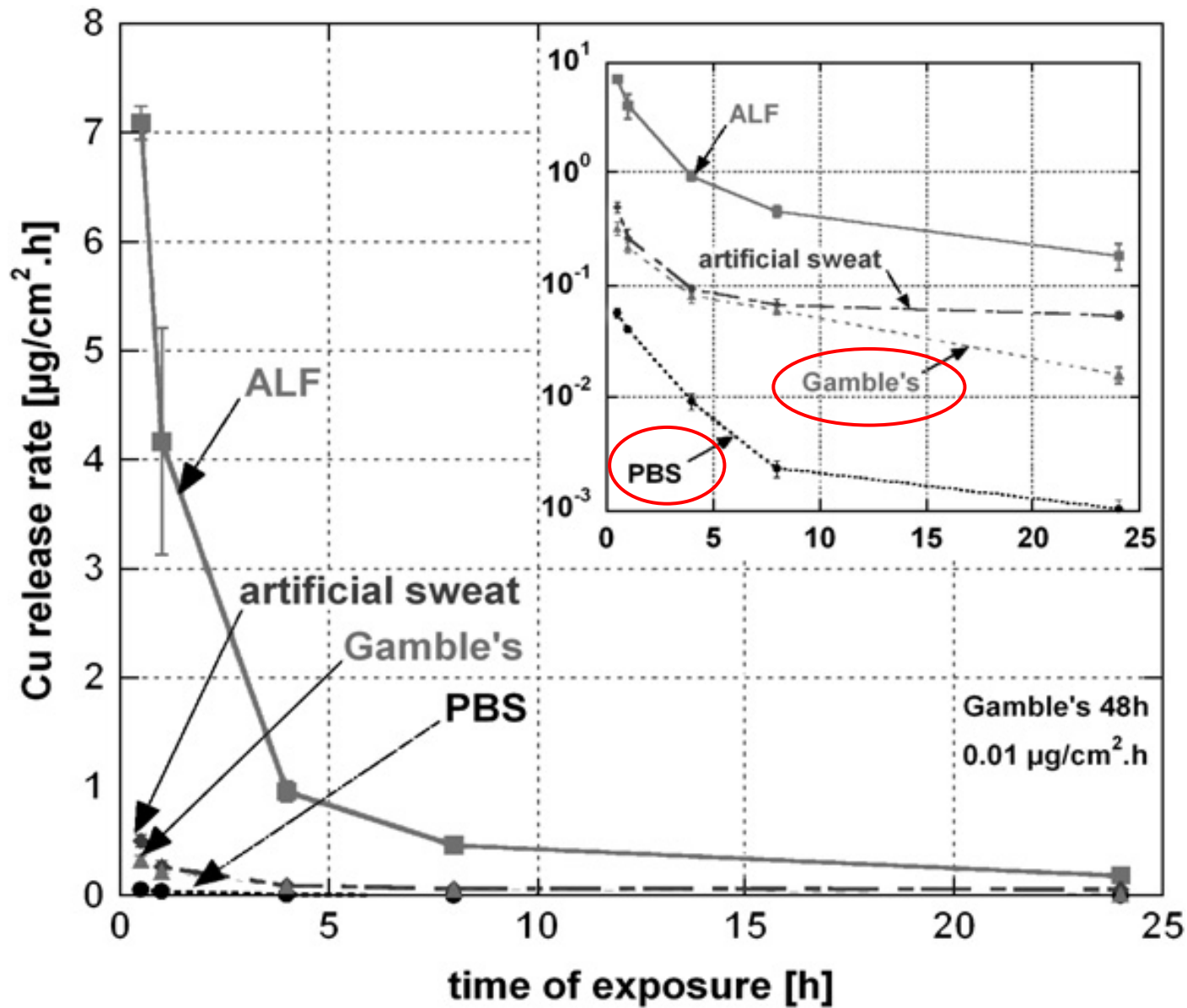
Le condizioni "ottimali" di dispersione dipendono dal medium di coltura.

Proprietà del medium ed effetti sulle NPs

Table 2

Composition (g/L) and pH of PBS and synthetic body fluids; artificial sweat, ALF and Gamble's solution (Bianchi et al., 2000; Kanerva et al., 1994; Moss, 1979; Stopford et al., 2003)

Chemicals	PBS	Artificial sweat	ALF	Gamble's solution
MgCl ₂	—	—	0.050	0.095
NaCl	8.77	5.00	3.21	6.019
KCl	—	—	—	0.298
Na ₂ HPO ₄	1.28	—	0.071	0.126
Na ₂ SO ₄	—	—	0.039	0.063
CaCl ₂ · 2H ₂ O	—	—	0.128	0.368
C ₂ H ₃ O ₂ Na	—	—	—	0.574
NaHCO ₃	—	—	—	2.604
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	—	—	0.077	0.097
KH ₂ PO ₄	1.36	—	—	—
NaOH	—	—	6.00	—
C ₆ H ₈ O ₇	—	—	20.8	—
H ₂ NCH ₂ COOH	—	—	0.059	—
(NH ₂) ₂ CO	—	1.00	—	—
CH ₃ CHOHCO ₂ H	—	1.00	—	—
C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂ · 2H ₂ O	—	—	0.090	—
C ₃ H ₅ NaO ₃	—	—	0.085	—
C ₃ H ₃ O ₃ Na	—	—	0.086	—
pH	7.2–7.4	6.5	4.5	7.4



Gamble's 48h
0.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$

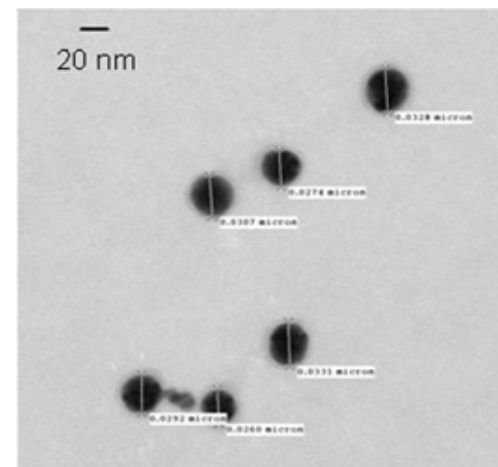
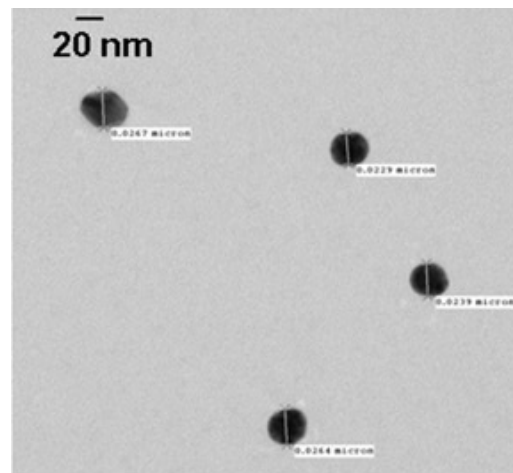
Proprietà del medium ed effetti sulle NPs

Summary of size and surface charge measurements on 30-nm and 50-nm gold colloids

Sample	DLS Z-Average hydrodynamic diameter (nm)	TEM Average diameter (nm)	AFM Average height (nm)	Zeta potential (mV)
30 nm before incubation	33.3	27.2	29.4	-38.2
30 nm after incubation	76.1	28.4	31.2	-16.4
50 nm before incubation	55.0	47.1	50.1	-33.4
50 nm after incubation	100.0	49.5	49.6	-17.6

Gold colloids before and after 30-minute incubation in pooled normal human plasma anticoagulated with sodium citrate at 37°C.

30nm gold particles

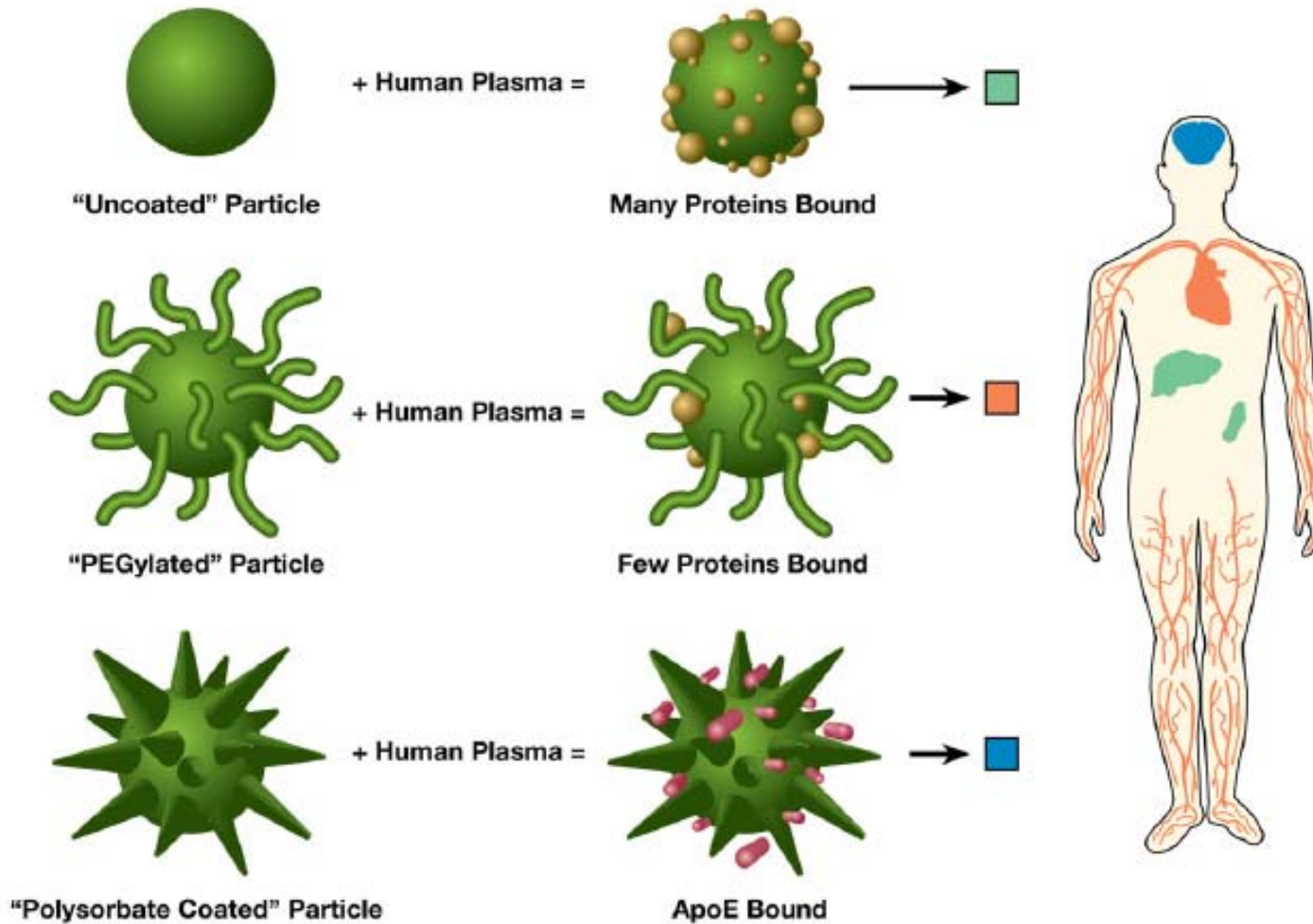


30nm gold particles + incubation in serum

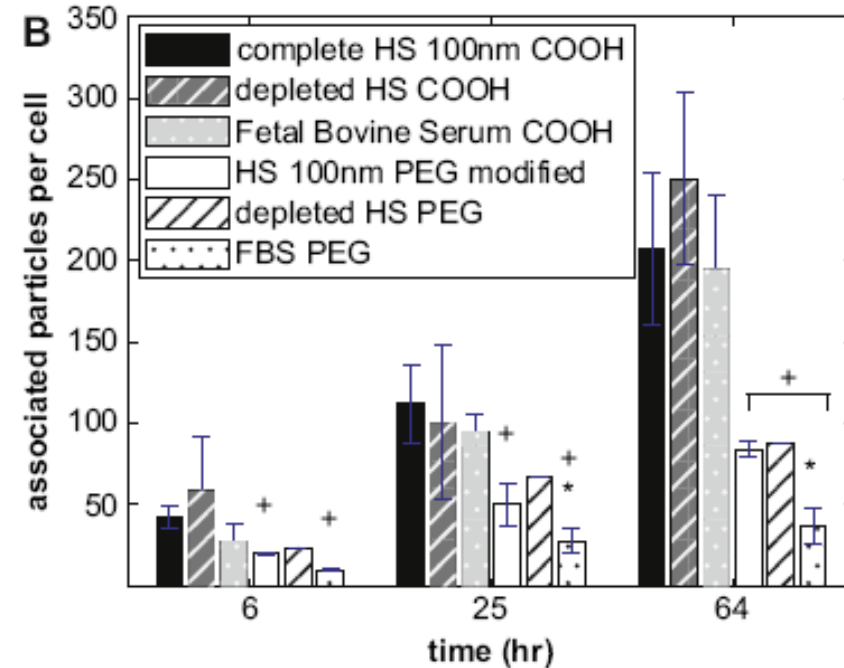
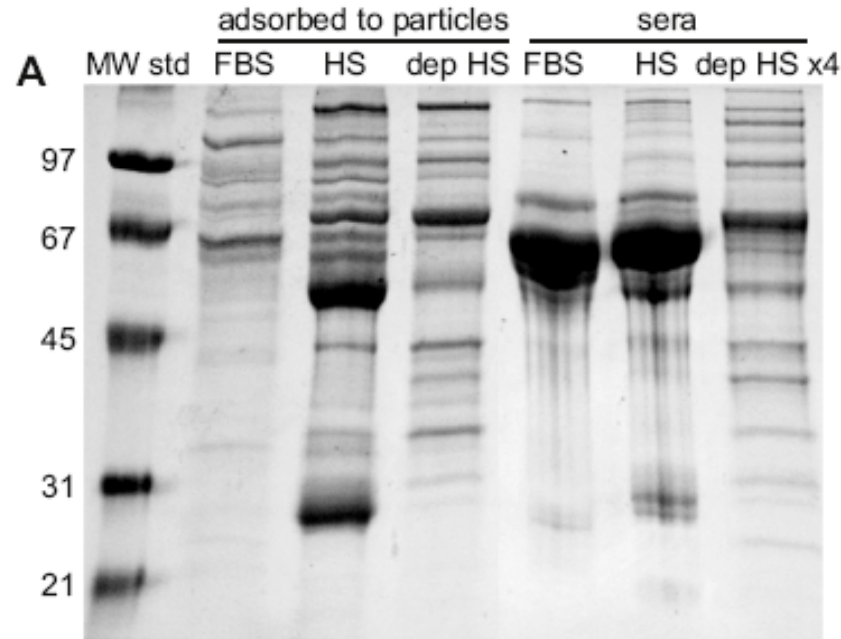
Summary of various nanoparticles and protein binding.

Nanoparticles	Identified proteins	Method of protein isolation	Method of protein separation and identification	Reference
Polystyrene with poloxamer 184, 188, 407	Factor B, transferrin, albumin, fibrinogen, IgG, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[46]
Liposomes	Albumin, fibrinogen, apolipoproteins, IgG, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobulin, IgM	Gel filtration	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[48]
Single-walled carbon nanotubes	Albumin	Centrifugation	Western Blot	[22]
Solid lipid nanoparticles with Tween 80	Fibrinogen, IgG, IgM, apolipoproteins (including ApoE), transthyretin	Centrifugation, gel filtration	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[74]
Solid lipid nanoparticles with poloxamer 188	Fibrinogen, IgG, IgM, apolipoproteins (excluding ApoE), transthyretin, albumin	Centrifugation, gel filtration	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[74]
Poly(lactic acid) nanoparticles with PEG	Albumin, fibrinogen, apolipoproteins, IgG	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma, and N-terminal sequencing	[49]
Polyhexadecylcyanoacrylate nanoparticles	Albumin, apolipoproteins, IgG, transferrin	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of serum and mass spectroscopy	[9,55]
Poly(ϵ -caprolacton) nanoparticles	IgG, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma, and N-terminal sequencing	[50]
Polycyanoacrylate nanoparticles	Albumin, IgG, IgM, fibrinogen, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[52]
Iron oxide nanoparticles	Albumin, IgG, IgM, fibrinogen Albumin, IgM, fibrinogen, C3b, apolipoprotein A-1 Albumin, IgG, IgM, fibrinogen, C3b IgG, IgM, fibrinogen	Centrifugation Gel filtration Static filtration Magnetic separation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[10]
Various polymer/copolymer composition nanoparticles	Albumin, IgG, fibrinogen, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[129]
Poly(D,L-lactic acid) nanoparticles	Albumin, IgG, fibrinogen, IgM, apolipoproteins, antithrombin III	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[130]
Polystyrene with Rhodamine B	Albumin, IgG, fibrinogen, apolipoproteins, PLS:6	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[131]
Various polymer/copolymer composition nanoparticles	Albumin, IgG, fibrinogen, IgM, apolipoproteins, PLS:6, U2	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma, and N-terminal sequencing	[25]
Poly(isobutylcyanoacrylate) with Dextran	Albumin, IgG, fibrinogen, apolipoproteins, serotransferrine, transthyretine	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[75]
Single- and double-walled carbon nanotubes	Albumin, fibrinogen, apolipoproteins, C1q	"Affinity chromatography," centrifugation of beads	SDS-PAGE with N-terminal sequencing, mass spectroscopy, or western blotting	[132]
Polybutylcyanoacrylate nanoparticles with polysorbate 80	Albumin, IgG, fibrinogen, IgM, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[15]
Solid lipid nanoparticles with poloxamer or poloxamine coating	Albumin, fibrinogen, apolipoproteins	Centrifugation	2D-PAGE; comparison to known 2D gel of plasma	[8]

Summary outlining various nanoparticles and the proteins they bind. Included are the methods used to isolate the proteins and the methods used to separate the individual proteins and how these proteins were identified.



Proprietà del medium ed effetti sulle NPs

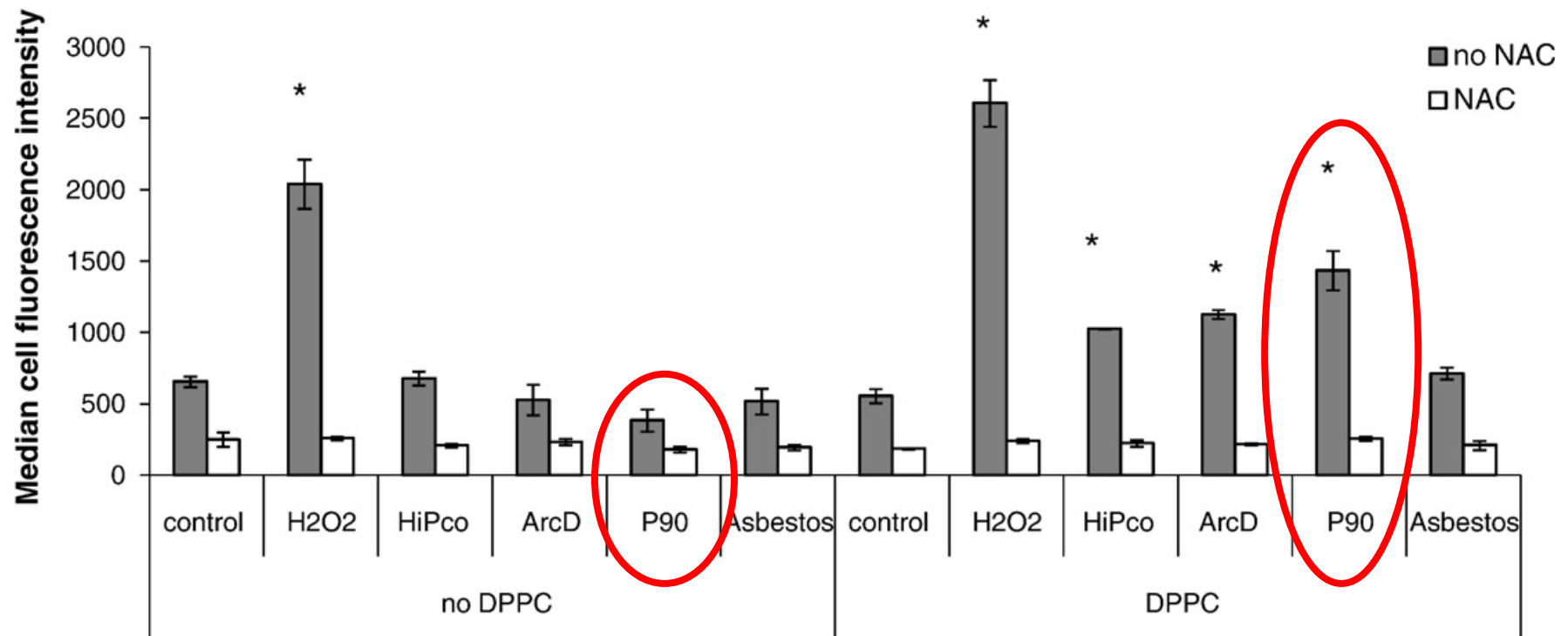


Differenza nelle proteine adsorbite si riflettono in una differenza nell'uptake

Proprietà del medium ed effetti sulle NPs

Formazione di specie reattive dell'ossigeno in cellule primarie (NHBE)

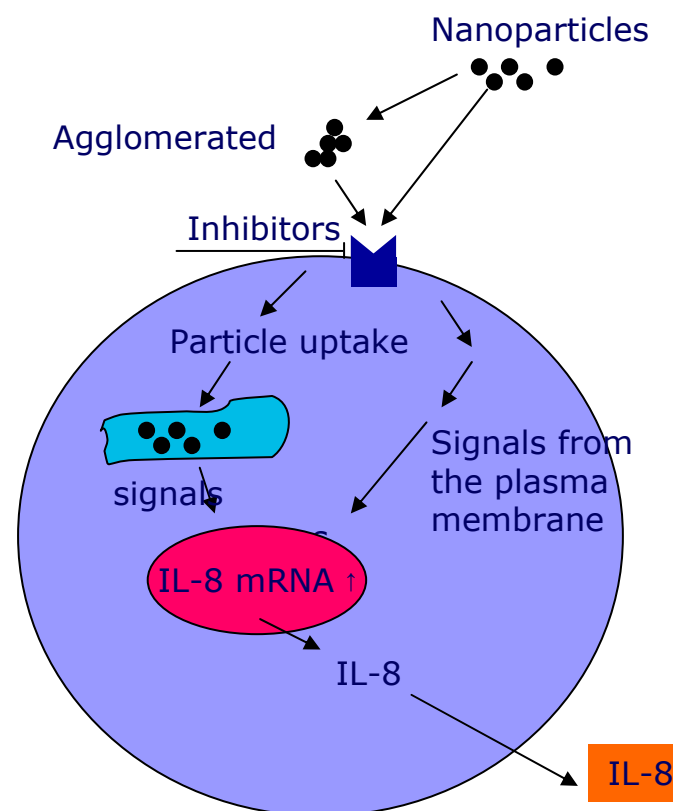
Esposizione 1 h, dose 50 µg/ml in NHBE medium con (grey) o senza (white) pretrattamento con NAC in presenza o assenza di DPPC per favorire la dispersione.



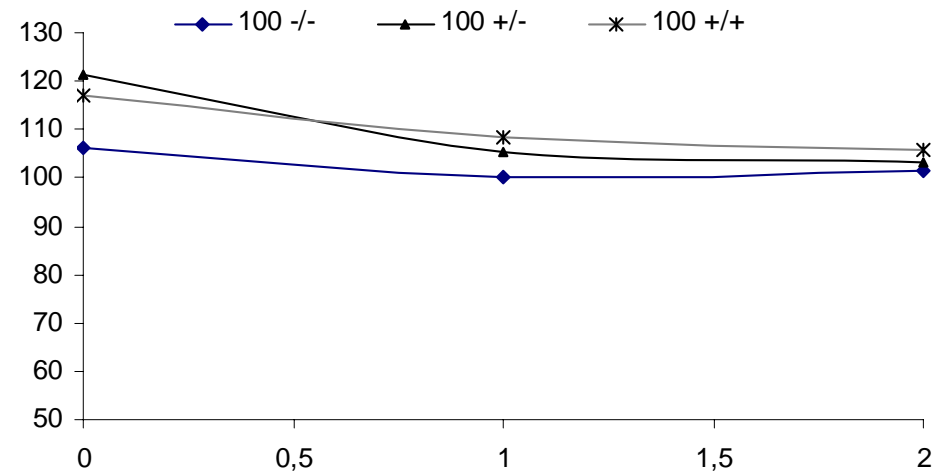
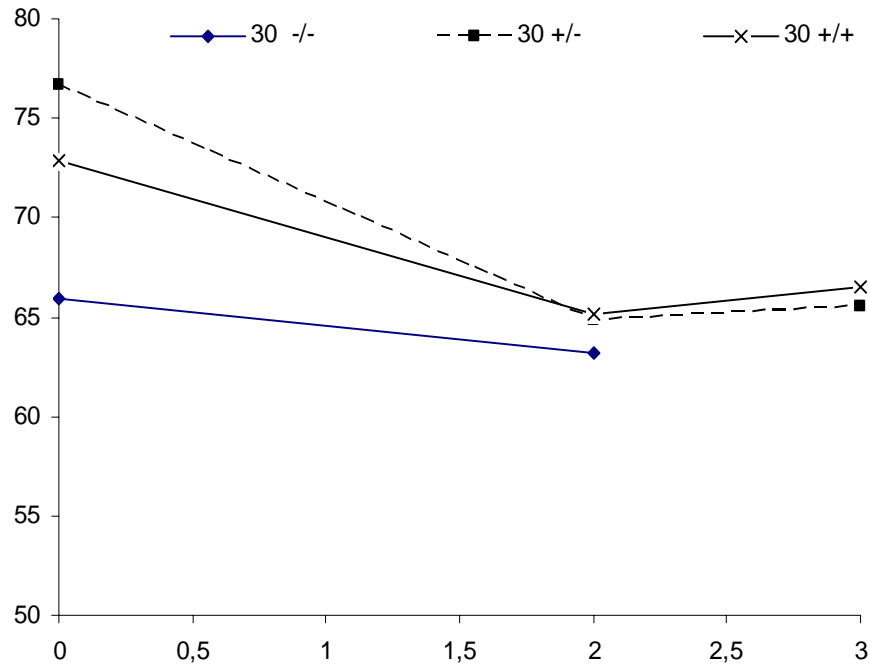
Scopo della ricerca: importanza dell'uptake nel determinare le risposte in cellule esposte a NPs di silice

Important questions:

- How are the uptake patterns in the NP size area and for larger particles?
- Different mechanisms in macrophages versus epithelial cells?
- Is the uptake required for the responses, or are the responses initiated at the plasma membrane?
- Will uptake be required for some responses, not for others?



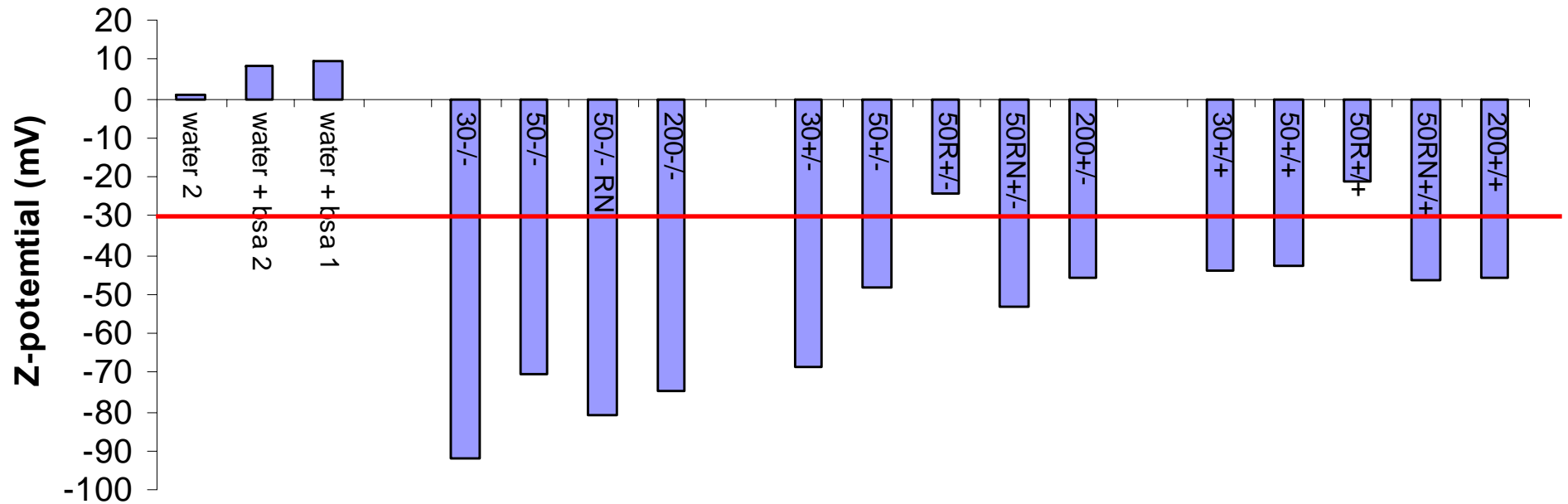
Presenza di BSA e stato di aggregazione/agglomerazione



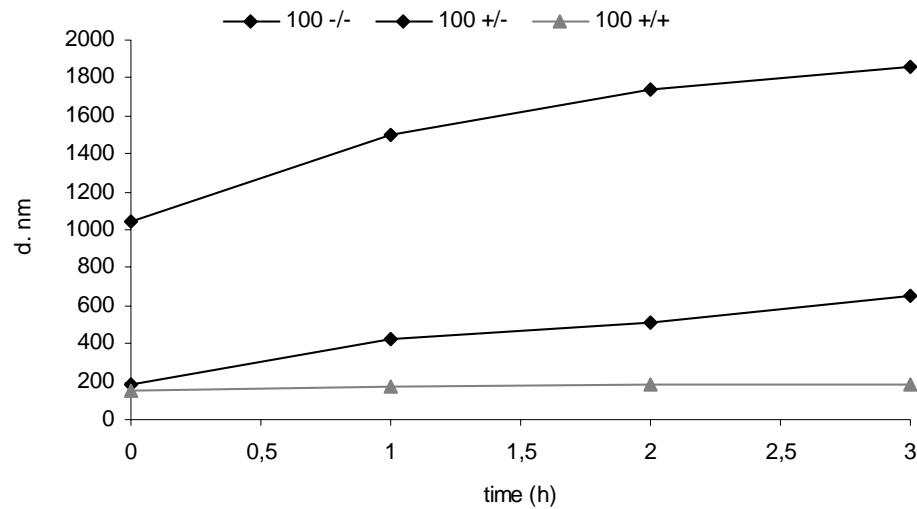
The NPs hydrodynamic diameter in water, with or without BSA, seems to reach an “equilibrium” state

Presenza di BSA e stato di aggregazione/agglomerazione

Z-potential (t 0)

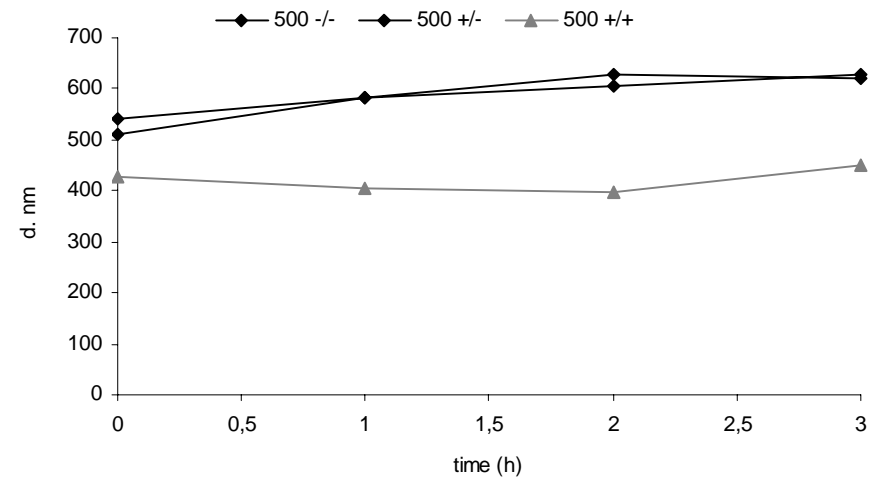


Presenza di BSA e stato di aggregazione/agglomerazione

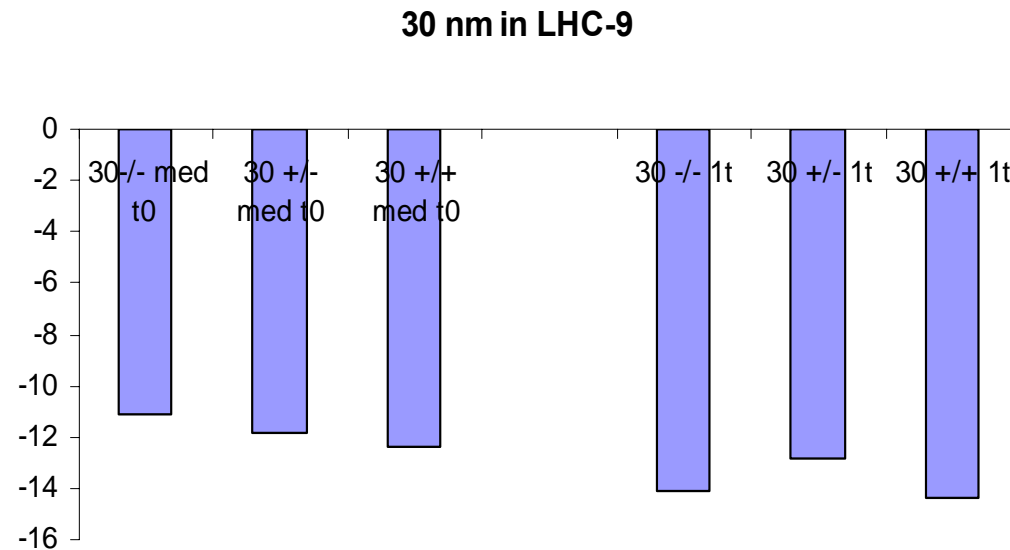


Maggiore è la concentrazione di BSA minore è l'aggregazione delle NPs

Per particelle sub- μm questo non vale

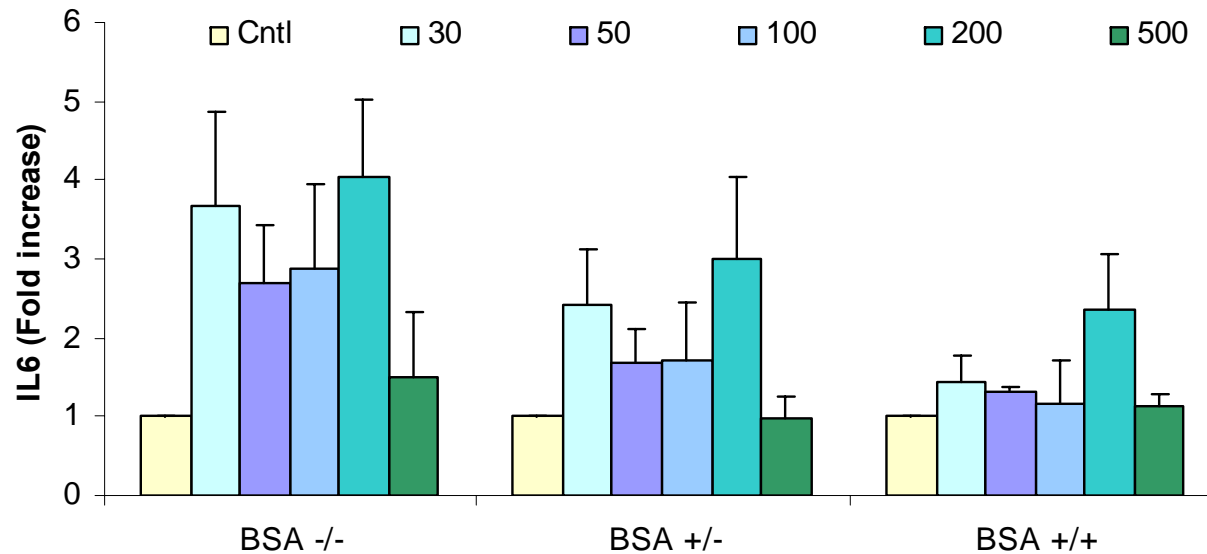


Presenza di BSA e stato di aggregazione/agglomerazione



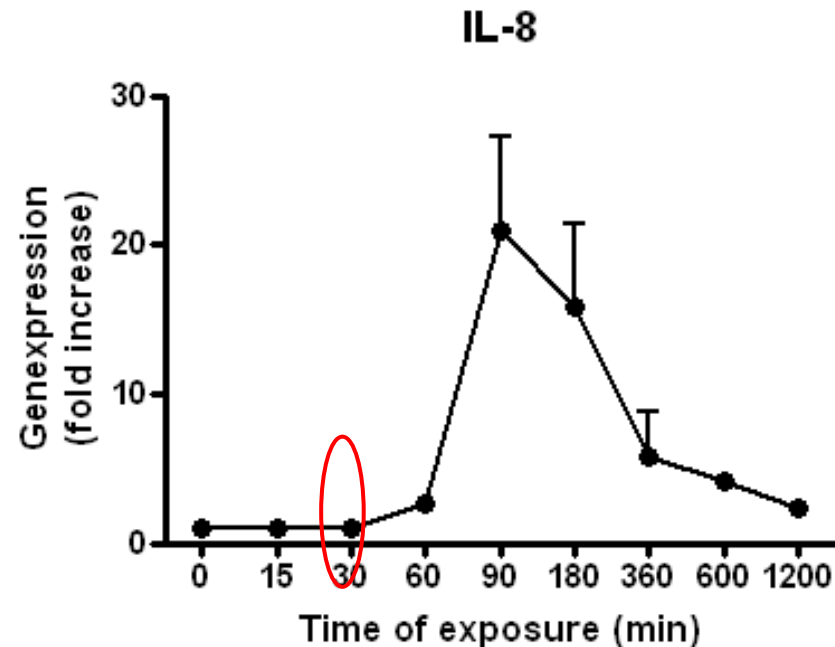
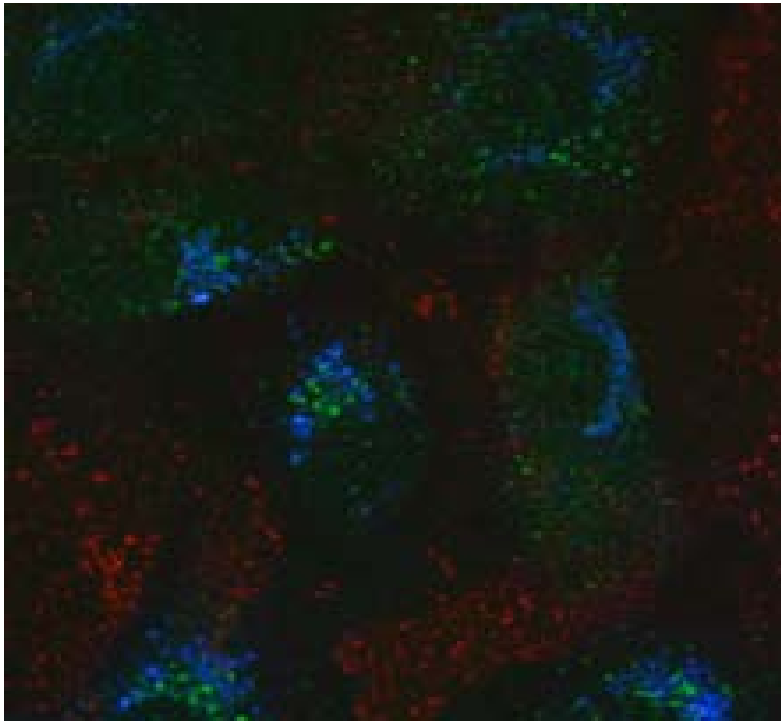
Z-potenziale nel medium perde di significato.

Effetto della composizione del medium sulle risposte infiammatorie



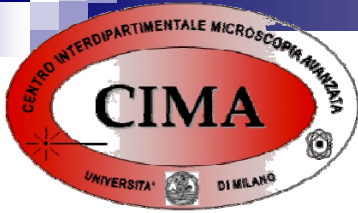
Maggiore è la concentrazione di BSA minore è la risposta infiammatoria

Importance of silica-NP uptake on cytokine release



Red → Rhodamine-Si nanoparticles; Blue → early endosome; Green → late endosome

- No cellular uptake of rhodamine-silica NPs at 45 min and 3 h
- IL-8 mRNA expression increases from 60 to 90 min
- Uptake does not seem to be required for the cytokine (IL-8) expression



Nanoparticelle: caratterizzazione e interazioni biologiche



24-26 marzo 2010

NPs e modelli in vitro: l'importanza di conoscere il proprio sistema

Maurizio Gualtieri

Università degli Studi di Milano Bicocca

Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio

maurizio.gualtieri@unimib.it

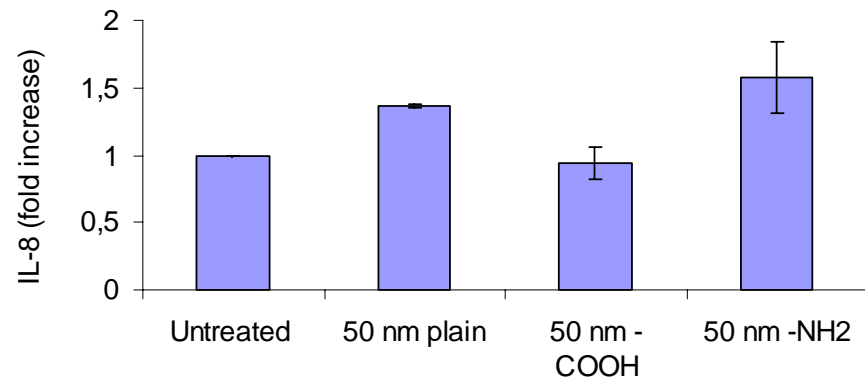
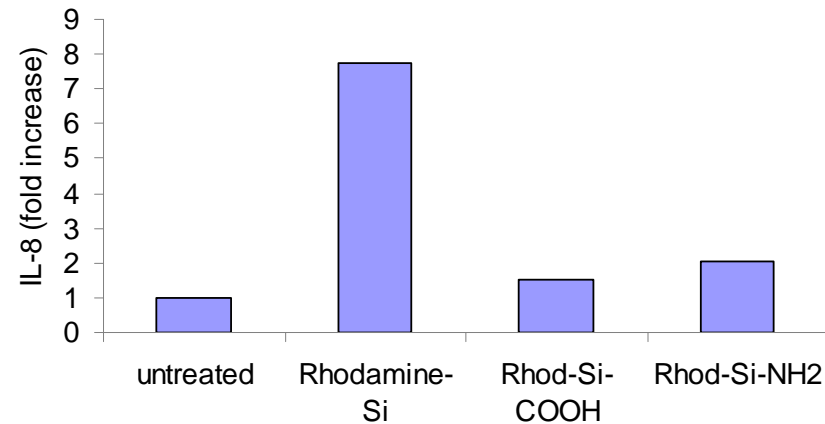


Surface doping of silica NPs and modification of cytokine responses

- Surface-doping modified 50 nm SiNPs pro-inflammatory effects.

-IL-8 release induced by Rhodamine-SiNPs >> Rhod-Si-NH₂ > Rhod-Si-COOH

-plain SiNPs~ plain Si-NH₂ > plain Si-COOH



SiNP

Piastre di coltura



Piastre Petri



Fiasca con tappo ventilato
Superficie: 25-235 cm²



Piastre multi-pozzetto
(*multiwell*) (6-384 pozzetti)




Il mezzo extracellulare

- Fase gassosa, Temperatura, Substrato di adesione e terreno di coltura
- Le cellule di mammifero crescono a 37°C, sature di umidità, in un mezzo tamponato a pH \approx 7.3. Il sistema tampone più comunemente utilizzato è bicarbonato/acido carbonico
- Il pH viene controllato aggiungendo un indicatore come il rosso fenolo (giallo a pH acido, rosso-viola a pH alti).



Terreni di coltura

- La composizione dei mezzi di coltura prevede:
 - Sali inorganici (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- ,...)
 - Glucosio, glutammina
 - Amminoacidi essenziali
 - Vitamine del gruppo B
 - Tracce di Fe, Zn, Cu, Se, Mn, Mo (tracce significa che non occorre aggiungerli in quanto le minime contaminazioni presenti in altri componenti sono sufficienti).
 - Siero fetale bovino, 5-20% o un sostituto



Composizione di un terreno per cellule animali: un esempio

- Amminoacidi
- Vitamine
- Sali
- Glucosio
- Antibiotici
- Indicatore
- Siero



Il siero

L'uso del siero è controverso. Generalmente si preferisce il siero fetale in quanto contiene meno anticorpi.

Vantaggi

- Protegge le membrane grazie al corretto grado di viscosità;
- Introduce fattori di crescita ed ormoni;
- Veicola lipidi, ferro e molecole organiche;
- Favorisce interazioni cellule-substrato;
- Contiene inibitori della tripsina

Svantaggi

- Possibile tossicità di anticorpi;
- Variabilità da lotto a lotto;
- Inibitori metabolici;
- Fattori di crescita che favoriscono i fibroblasti rispetto ad altri tipi cellulari



Terreni definiti

L'uso di terreni privi di siero nasce dal desiderio di avere condizioni controllate, riproducibili e specifiche per il tipo cellulare in esame.

Devono contenere: un inibitore della tripsina, fattori di adesione, ormoni, fattori di crescita, nutrienti e proteine.

Vantaggi

- Maggiore riproducibilità;
- Standardizzazione anche fra laboratori diversi;
- Può favorire subpopolazioni specifiche (non solo fibroblasti);
- Agevola la purificazione di un prodotto.

Svantaggi

- Cellule più sensibili alle condizioni ambientali;
- Crescita più lenta;
- Alcuni additivi sono costosi e/o labili;
- I terreni sono specifici per un tipo cellulare.

La cappa

I filtri HEPA e la tecnologia del flusso laminare hanno reso possibile la realizzazione di "clean rooms", di laboratori microbiologici di massima sicurezza, di cappe sterili e di cabine "Biohazard".

Se la priorità è proteggere dalla contaminazione il prodotto, si opterà per una cabina a flusso laminare orizzontale, mentre se bisogna proteggere anche l'operatore la scelta deve cadere su di una cappa a flusso laminare verticale.

Se invece si manipola materiale patogeno, bisogna garantire la protezione di prodotto,





Filtrazione a flusso laminare

- Il flusso laminare è ottenuto dalla combinazione di un filtro assoluto (HEPA) con una massa d'aria che lo attraversa alla velocità costante di di 0,45 m/sec. (+/- 20%).
- Il flusso laminare è un flusso d'aria unidirezionale formato da filetti d'aria sterili paralleli che si muovono alla medesima velocità in tutti i punti, così da creare una corrente d'aria omogenea senza turbolenze.
- In un ambiente sterile così ottenuto ogni contaminante libero nella zona di lavoro viene trascinato lontano da un fronte di aria sterile.

Nanoparticelle come misurare lo stato di aggregazione: dynamic light scattering e Z-potenziale

NIST - NCL Joint Assay Protocol PCC-1 Version 1.0

Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering

3.3 Effect of Salt Concentration

The hydrodynamic size derived from DLS can depend on the salt concentration of the suspending medium. This effect arises due to the electrical double-layer surrounding charged particles in an aqueous medium. At low salt concentrations