

Разработка нового устройства инициации кристаллизации для криомикроскопических исследований

Р. ШПИНДЛЕР, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Development of a New Seeding Device for Cryomicroscopic Investigations

R. SPINDLER, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universitaet Hannover, Germany

При криоконсервировании клетки длительное время хранятся при криогенных температурах для поддержания их качества после оттаивания. В процессе замораживания ряд параметров влияет на поведение клеток: скорость охлаждения, скорость оттаивания, тип и концентрация криопротекторов (КП), геометрия образца и температура нуклеации. Во время замораживания-оттаивания, особенно при оптимальных параметрах, эти условия могут обеспечить высокую выживаемость клеток [2].

Была использована коммерчески доступная криомикроскопическая установка для визуализации клеток в суспензии, которая включает модуль «FDCS196 Cryostage Linkam». Образец хранили при температуре от 40 до -196°C . Главная проблема этой установки состоит в том, что ручная инициация кристаллизации требует снятия крышки для обеспечения контакта охлажденного медного стержня и переохлажденного образца. После этого пары азота будут затруднять обзор под микроскопом и наблюдение за начальным ростом кристаллов льда и перемещением образцов. В данном исследовании мы разработали новое устройство инициации кристаллизации для криомикроскопических исследований водных растворов. В данном устройстве используется медный стержень, который охлаждается с помощью теплообменника омываемого жидким азотом. USB-камера используется для определения положения медного наконечника при начальной калибровке, используя которую система сможет затем рассчитать расстояние до образца. Температура измеряется с помощью дополнительного термистора (Т-типа) в непосредственной близости от образца. Далее электрический сигнал обрабатывается с помощью оперативной схемы усилителя и карты сбора данных. Система привода с линейным шагом позволяет перемещать медный стержень автоматически к переохлажденному образцу через отверстие в крышке. Программное обеспечение контролирует положение и временные параметры движения медного стержня в процессе охлаждения образца и, следовательно, способно иницировать кристаллизацию в образце при необходимой температуре нуклеации.

Устройство позволяет контролировать температуру нуклеации вплоть до скорости охлаждения 10 К/мин с точностью $0,2^{\circ}\text{C}$. Для визуализации роста кристаллов льда и осмотического поведения клеток при криоконсервировании используется цифровой фотоаппарат (Retiga Exi Fast 1394, QImaging). Система была протестирована с помощью различных растворов на основе диметилсульфоксида и проверена при различных скоростях охлаждения.

Для улучшения качества криоконсервирования клеток и тканей в последующих криомикроскопических исследованиях будет использоваться это новое устройство для инициации кристаллизации.

Это исследование финансируется Немецким научно-исследовательским обществом в рамках кластера передового опыта REBIRTH.

In the field of cryopreservation cells are stored at cryogenic temperatures for long term storage in order to maintain their quality after thawing. Several process parameters affect the behavior of cells during the freezing process. These involve the cooling rate, thawing rate, type and concentration of cryoprotective agents (CPA), sample geometry and the nucleation temperature. Especially under optimal parameter settings the conditions during the freeze-thaw process will lead to high cell survival rates [2].

A commercially available cryomicroscopic setup was used here to visualize cells in suspension which involved a LINKAM cryostage FDCS196. The temperature of the sample was controllable from 40 to -196°C . A general problem of this setup is that a manual seeding process requires the removal of the lid of the cryostage when a cooled copper rod touches the supercooled sample. Then, the nitrogen atmosphere will disturb the field of view under the microscope, initial ice crystal growth are hard to observe and the samples are moved. In this study we developed a new seeding device for cryomicroscopic investigation of aqueous samples. This device uses a copper rod which is cooled via a liquid nitrogen flushed heat exchanger. An USB camera is used to identify the position of the copper rod tip during an initial calibration procedure and thus the system can automatically calculate the distance to the sample. In the vicinity of the sample the temperature is measured by an additional thermistor (T-type). The electrical signal is further processed by an operational amplifier circuit and a data acquisition card. A linear step motor system allows to move the copper rod automatically to the super-cooled sample through an opening in the lid of the cryostage. The software controls the position and timing of the copper rod during the cooling process of the sample and therefore is able to seed the sample at a desired nucleation temperature.

The device allows to control the nucleation temperature up to cooling rates of 10 K/min with an accuracy of $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. A digital camera (Retiga Exi Fast 1394, QImaging) is used to visualize ice crystal growth and osmotic behavior of cells during the cryopreservation process. The system was tested using various test solutions based on dimethyl sulfoxide and was verified for different cooling rates.

In future studies the new seeding device will be used in cryomicroscopic investigations to improve cryopreservation protocols of cells and tissues.

Source of funding: German Research Foundation for the Cluster of Excellence REBIRTH.