

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ НАНОКРИСТАЛЛЫ В МИКРОСКОПИИ И ЦИТОМЕТРИИ

**© И. А. Воробьев,^{1, 2} Е. П. Рафаловская-Орловская,² А. А. Гладких,²
Д. М. Поташникова,² Н. С. Бартенева^{3, 4}**

¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² Российский гематологический научный центр, Москва,

³ Институт иммунных заболеваний и ⁴ Отдел патологии Гарвардской медицинской школы, Бостон, США;
электронный адрес: ivorobjev@mail.ru

Квантовые точки с ядром из селенида кадмия и оболочкой из сульфида цинка представляют собой новый класс флуорохромов, которые обладают значительными преимуществами по сравнению с традиционными органическими флуорохромами и флуоресцентными белками. Квантовые точки обладают большим коэффициентом экстинкции, широким спектром возбуждения, большим сдвигом Стокса, высокой фотостабильностью, узкими и симметричными спектрами эмиссии. Благодаря этим свойствам применение квантовых точек в микроскопии и проточной цитометрии является очень перспективным. Использование коньюгатов квантовых точек с антителами, стрептавидином и зондами ДНК (РНК) позволяет получать высокостабильные многоцветные флуоресцентные препараты, которые могут применяться для научных и диагностических целей. В настоящем обзоре рассматриваются основные достижения в области получения многоцветных препаратов на основе квантовых точек для флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, а также необходимая для работы с ними модернизация микроскопов и проточных цитометров. В то же время практическое применение квантовых точек наталкивается на определенные технические трудности, связанные с их относительно большими размерами и некоторыми химическими особенностями. Эти трудности касаются как коммерческих, так и получаемых в лаборатории коньюгатов квантовых точек.

Ключевые слова: квантовые точки, флуоресцентные нанокристаллы, иммуногистохимия, проточная цитометрия.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ИК — инфракрасный, ТОФО — триоктилфосфиноксид, УФ — ультрафиолетовый, ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат, DAPI — 4,6-диамино-2-фенилиндол-дигидрохлорид, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, GFP — зеленый флуоресцентный белок, РЕ — фикоэритрин;

Флуоресцирующие полупроводниковые нанокристаллы или «квантовые точки» (quantum dots, QD) обладают уникальными оптическими характеристиками, выгодно отличающими их от органических флуорохромов. Обладая достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции (40—50 %), квантовые точки по величинам сечения поглощения возбуждающего света существенно пре-восходят органические флуорохромы, а некоторые квантовые точки превосходят даже наиболее яркий флуоресцентный белок — фикоэритрин (РЕ).

Квантовые точки поглощают свет в широком диапазоне — от ближнего ультрафиолета (УФ) до дальней красной области, тогда как их спектр испускания сравнительно узок и определяется размером частиц. Поэтому различные нанокристаллы (например, частицы селенида кадмия), возбуждаемые волнами одной и той же длины, будут флуоресцировать в диапазоне от голубой до ближней инфракрасной (ИК) области. Кроме того, квантовые точки оказываются намного более фотостабильными, чем низкомолекулярные органические флуорохромы, что создает возможность длительного (в течение дней или даже

недель) отслеживания поведения флуоресцентной метки в живых клетках и тканях.

Эти свойства делают квантовые точки очень привлекательными для использования в различных приложениях флуоресцентных методов. Однако практическое использование квантовых точек сталкивается с определенными трудностями и неудобствами, которые редко рассматриваются в литературе.

Настоящий обзор посвящен описанию современных подходов к использованию квантовых точек в иммуногистохимии, проточной цитометрии и некоторых смежных областях.

Общие свойства квантовых точек

Неорганические флуоресцентные нанокристаллы или квантовые точки представляют собой новое поколение флуорохромов, обладающих определенными преимуществами по сравнению с традиционными органическими флуоресцентными красителями, такими как флуоресцеин,

родамин и их производные FITC и TRITC, и флуоресцентными белками — фикоэритрином (PE), зеленым флуоресцентным белком (GFP) и др.

Первые флуоресцирующие квантовые точки были получены в 1993 г. (Murray et al., 1993), но они имели низкий выход флуоресценции — около 1 %. За счет подбора компонентов и совершенствования технологий производства удалось создать квантовые точки с относительно высоким квантовым выходом флуоресценции (до 90 % при 10 K) и узким спектром эмиссии. Ключевые усовершенствования (создание QD квантовых точек с ядром из селенида кадмия и тонкой оболочкой из сульфида цинка) были проведены в 1996—1997 гг. (Danek et al., 1996; Hines, Guyot-Sionnest, 1996; Dabbousi et al., 1997). Это позволило начать широкое применение квантовых точек в прикладных исследованиях, в частности в биологии.

В настоящее время на рынок выпускаются квантовые точки с эмиссией от зеленого (520 нм) до ближнего ИК-света (800 нм). Современные квантовые точки обладают высокой фотостабильностью, имеют относительно широкий спектр возбуждения, большой сдвиг Стокса и узкие симметричные спектры испускания.

Коммерческие препараты квантовых точек выпускаются в виде самих частиц, наборов, пригодных для конъюгации с биомолекулами, наконец, в виде готовых конъюгатов с различными молекулами (антителами, белком A, стрептавидином). Однако до настоящего времени применение квантовых точек в иммуногистохимии, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH и аналогичные методы) и в проточной цитометрии не получило широкого распространения. Поэтому в настоящем обзоре мы рассмотрим как преимущества квантовых точек, так и проблемы, которые встают перед исследователями, желающими их использовать.

Строение и оптические свойства флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, важные для микроскопии и цитометрии

Наибольшее применение в биологии и медицине нашли полупроводниковые флуоресцентные квантовые точки с кристаллическим ядром из CdSe и CdTe, покрытые оболочкой из сульфида цинка (ZnS), которые обладают (в настоящее время) максимальным эффективным радиусом поглощения и квантовым выходом. Оптические свойства квантовых точек, т. е. максимум флуоресцентного излучения, ширина спектра излучения (bandwidth) и квантовая эффективность (quantum efficiency), зависят от пространственного расположения электронов внутри нанокристалла и характеристик оболочки. Они регулируются в процессе получения нанокристаллов (см. обзор: Олейников и др., 2007). Для квантовых точек из селенида кадмия (CdSe) диапазон размеров, при которых наблюдается эффект флуоресценции, составляет 1.5—12.0 нм (Norris et al., 1994). Увеличение размера ядра нанокристалла от 1.5 до 5.0 нм ведет к смещению спектра излучения из зеленой (500 нм) в красную (650 нм) область. Еще большие по размерам кристаллы излучают в ближней ИК-области (700—800 нм). При этом при переходе от 500 к 650 нм существенно увеличивается яркость флуоресценции за счет роста эффективного сечения (коэффициента молярной экстинкции) квантовой точки. Наиболее эффективные квантовые точки имеют диаметр ядра около 6 нм, что соответ-

ствует радиусу экситона Бора для селенида кадмия (5.6 нм), и максимум испускания около 600 нм (Biju et al., 2008).

Квантовые точки имеют широкий спектр возбуждения, однако максимальный молярный коэффициент экстинкции они демонстрируют при возбуждении УФ-светом (350 нм) (Wu et al., 2007). В силу технических причин, а также того, что УФ-свет возбуждает интенсивную автофлуоресценцию в клетках и тканях, для возбуждения квантовых точек используют фиолетовый (405 нм) или синий (440—488 нм) свет, где коэффициент экстинкции квантовой точки в несколько раз ниже (Wu et al., 2007). Квантовый выход флуоресценции для большинства квантовых точек составляет 0.2—0.4 (в зависимости от длины волны возбуждающего света) (Wu et al., 2007), что является удовлетворительной характеристикой по сравнению с органическими флуорохромами.

Синтезируемые CdSe/ZnS нанокристаллы покрыты слоем оксида триоктилfosфина (ТОФО) и растворимы только в органических растворителях (например, в толуоле). Для придания водорастворимости квантовым точкам на их поверхность дополнительно наносят бифункциональные соединения, замещающие ТОФО и содержащие гидрофильные группы, или формируют полимерный слой, например из модифицированного полиэтиленгликоля, без удаления ТОФО с поверхности (см. обзор: Олейников и др., 2007). Наружная оболочка квантовой точки должна содержать активные группы для конъюгирования с биомолекулами, например антителами, ДНК, РНК, белком A, стрептавидином и т. д. (Buischez et al., 1998; Tholouli et al., 2006; Lidke et al., 2007). Размер квантовой точки, включающей в себя помимо ядра слой сульфида цинка и поверхностный слой, ответственный за ее растворимость и связывание с биомолекулами, сопоставим с размером большого глобулярного белка (250—750 кДа) или несколько превышает его (рис. 1).

Квантовые точки обладают рядом свойств, позволяющих использовать их в микроскопии, проточной цитометрии и в экспериментах *in vivo* (Clapp et al., 2004; Michalet et al., 2005; Howarth et al., 2008). Преимущества квантовых точек особенно видны в экспериментах, требующих длительных экспозиций, где использование традицион-

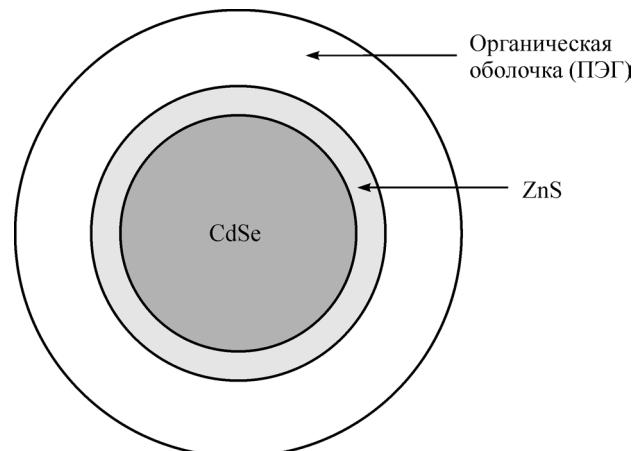


Рис. 1. Схема строения квантовой точки (QD).

Ядро из CdSe окружено слоем ZnS и гидрофильной оболочкой из органических веществ (например, модифицированным полиэтиленгликolem — ПЭГ). Размер кристаллического ядра из CdSe 2—6 нм, толщина оболочки из ZnS определяется толщиной и строением гидрофильной оболочки и часто составляет более 10 нм.

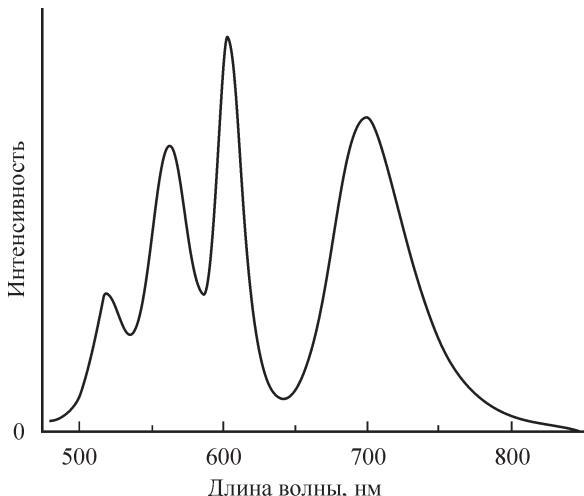


Рис. 2. Суммарный спектр флуоресценции смеси из четырех квантовых точек, сконъюгированных с моноклональными антителами. Четыре пика соответствуют эмиссии QD525, QD565, QD605 и QD705.

Длина волны возбуждения 440 нм. Все квантовые точки были внесены в кювету для измерений в эквимолярном количестве.

ных флуорохромов ограничено их высокой скоростью выцветания, и в экспериментах, требующих одновременной окраски несколькими цветами (Sweeney et al., 2008). Кроме того, квантовые точки отличаются высокой электронной плотностью, и в результате нанокристаллы большого размера (начиная с QD655) непосредственно видны в электронный микроскоп без дополнительной обработки контрастирующими агентами, что дает дополнительные преимущества для применения квантовых точек в микроскопии (Liu et al., 2000; Giepmans et al., 2005). Например, это позволяет быстро оптимизировать условия иммунохимического окрашивания для электронной микроскопии. Однако небольшие нанокристаллы (например, QD525) для их визуализации в электронном микроскопе нуждаются в дополнительном контрастировании серебром (Stierhof, El Kasmi, 2010). Необходимо отметить, что в процессе приготовления препаратов для электронной микроскопии квантовые точки необратимо утрачивают флуоресцентные свойства сразу после обработки четырехокисью озимия (Giepmans et al., 2005).

Для квантовых точек в отличие от органических флуорохромов характерны: 1) высокая фотостабильность; 2) узкий и симметричный спектр испускания (полуширина на полувысоте составляет 25—40 нм, «красные хвосты» в спектре эмиссии полностью отсутствуют); 3) большой сдвиг Стокса, который для всех нанокристаллов превышает 100 нм и может достигать 300—400 нм. Основным физическим недостатком квантовых точек является нестабильность их флуоресценции — мерцание (Nirmal et al., 1996). Мерцание является стохастическим процессом, обусловленным времененным переходом квантовых точек в заряженное состояние, и периоды отсутствия флуоресценции для одиночной квантовой точки могут достигать нескольких секунд (Banin et al., 1999; Kuno et al., 2000; Neuhauser et al., 2000; Lee, Osborne, 2009). При продолжительном наблюдении периоды отсутствия флуоресценции могут в совокупности составлять до 1/4—1/5. Мерцание может быть уменьшено за счет модификации самих квантовых точек — их окружают более толстой оболочкой (He et al., 2006; Chen et al., 2008). Другой

путь — добавление в среду с квантовыми точками β -меркаптоэтанола, дитиотрейтоля или других восстановителей (Hohng, Ha, 2004; Biju et al., 2008). Однако полностью избавиться от мерцания препаратов квантовых точек пока не удается.

Как следует из теоретических выкладок и видно на рис. 2, наилучшими оптическими свойствами (самый узкий спектр эмиссии, максимальная интенсивность) обладают квантовые точки с эмиссией вблизи 625 нм (в частности, QD605 и QD655), поскольку их размер близок к радиусу экситона Бора для селенида кадмия (Biju et al., 2008). Квантовые точки, флуоресцирующие в дальнем красном и ближнем ИК-свете, имеют значительно большую ширину спектра эмиссии, а квантовые точки с максимумом менее 600 нм обладают меньшей интенсивностью флуоресценции.

Использование квантовых точек в иммуногистохимии

Для обсуждения возможностей, которые дает использование квантовых точек в иммуногистохимии, вначале кратко рассмотрим использование других красителей.

Органические красители в иммуногистохимии. В рутинной иммуногистохимии (например, в диагностических исследованиях) стандартом является идентификация одного антигена на срезе. Для этого используется, как правило, непрямая реакция Кунса (первичное антитело против искомого антигена, затем вторичное антитело) с иммуноферментными системами детекции (пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой). Теоретически иммуноферментные методы позволяют проводить одновременное выявление на препарате двух и даже до четырех антигенов, но при условии, что эти антигены локализуются в клетках различных субпопуляций или в различных клеточных компартментах (Krenacs et al., 1989).

Основным подходом для выявления двух антигенов и более на одном препарате является иммунофлуоресцентное окрашивание. Многоцветная окраска в этом случае основана на использовании флуорохромов с различными максимумами эмиссии (Ferri et al., 1997; Panchuk-Voloshina et al., 1999), однако этот подход имеет ряд практических ограничений. Во-первых, из-за относительно большой ширины спектров испускания расстояние между максимумами используемых флуорохромов должно быть не менее 50—60 нм. При меньшем сдвиге возникает за светка в соседних каналах флуоресценции (bleed-through). Во-вторых, для каждого флуорохрома необходимо иметь свой набор светофильтров для возбуждения и эмиссии. При использовании ртутной лампы, имеющей неоднородный (квазилинейный) спектр испускания, использование разных возбуждающих светофильтров приводит к тому, что относительная яркость флуоресценции существенно различается в зависимости от применяемого красителя. Использование комбинированных наборов светофильтров (как в виде кубиков, так и в виде наборов Пинкеля или наборов Седата) приводит к тому, что интенсивность флуоресценции похожих по оптическим свойствам флуорохромов может оказаться существенно различной.

Применение же лазерных источников возбуждения (в частности, в сканирующей конфокальной микроскопии) для работы с несколькими органическими флуорохромами лимитируется тем, что для возбуждения каждого

красителя необходим собственный лазер. Кроме того, из-за небольшого сдвига Стокса (у большинства органических флуорохромов он не превышает 20 нм) приходится использовать фильтры возбуждения и запирающие фильтры с близкими параметрами. Это ведет к уменьшению чувствительности и появлению проблем при разделении флуоресценции от красителя и автофлуоресценции на фиксированных срезах ткани (Baschong et al., 2001). Наконец, невысокая фотостабильность традиционных флуорохромов приводит к быстрому уменьшению соотношения сигнал/шум при длительной экспозиции, в частности при послойном сканировании (получение z-стопок кадров) в конфокальной микроскопии.

Поэтому большинство практически выполняемых многоцветных иммуногистохимических исследований ограничивается окраской ДНК с помощью DAPI или аналогичного красителя и двойной окраской (зеленой и красной) различных антигенов в клетке.

Квантовые точки в иммуногистохимии. Одними из первых квантовых точек для иммуногистохимии использовали Bruchez с коллегами (Bruchez et al., 1998). Авторы пометили ядерные антигены и филаменты F-актина фиксированных мышиных фибробластов антителами, коньюгированными с квантовыми точками с зеленой и красной флуоресценцией. Высокая устойчивость квантовых точек к выцветанию оказалась особенно полезна для 3-мерной реконструкции с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Размер нанокристаллов определяет соотношение между квантовыми точками и антителами — множественные копии (3—15 молекул) иммуноглобулина класса G (IgG) обычно сконьюгированы с одной квантовой точкой. Напротив, в случае органических флуорохромов типа ФИТЦ, родамина и других, каждая молекула антитела связана с несколькими молекулами флуорохрома (рис. 3).

Различные протоколы получения прямых коньюгатов квантовых точек с антителами подробно описаны в работе Xing et al. (2007). Однако авторы подчеркивают, что получаемые по этим протоколам коньюгаты сохраняют стабильность только в течение 4—6 нед, после чего качество окрашивания значительно ухудшается. Коммерческие коньюгаты антител (Invitrogen Inc., США) стабильны в течение не менее 6 мес.

Хотя сами квантовые точки исключительно фотостабильны, в иммунохимическом препарате (со свободными аминогруппами, коньюгаты со стрептавидином или с антителами) они весьма чувствительны к составу раствора, и при pH 7.4 для их стабилизации в препарате необходимо добавление в буфер не менее 0.1 % БСА (Zhu et al., 2010).

Для медицинской диагностики критическим условием является развитие методов, позволяющих окрашивать фиксированные формалином и заключенные в парафин образцы (со сроком хранения до нескольких лет). Несколько групп исследователей, работая с клиническими образцами, успешно проводили многоцветное мечение (до пяти цветов) с помощью квантовых точек для идентификации отдельных опухолевых клеток на срезах ткани при раке предстательной железы (Wu et al., 2003) или молочной железы (Xing et al., 2006). При этом возбуждение всех флуорохромов производилось с помощью одной и той же длины волны. Высокая стабильность квантовых точек дала возможность авторам проводить и спектроскопическое исследование отдельных клеток, что позволило количественно оценить уровень экспрессии каждого ан-

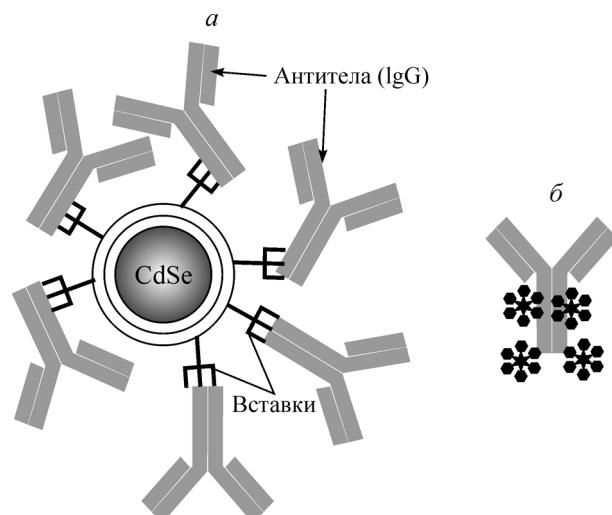


Рис. 3. Схема коньюгата антител с квантовой точкой (а) и коньюгата антител с органическим флуорохромом (б).

тигена (N-кадгерина, фактора элонгации-альфа, Е-кадгерины и виментина). Эти задачи не могут быть выполнены с использованием органических красителей из-за их быстрого выцветания и значительного перекрывания спектров флуоресценции. Кроме того, фотостабильность квантовых точек позволяет в случае высокой автофлуоресценции ткани добиться «выжигания» автофлуоресценции в препарате с помощью длительного (несколько минут) облучения препарата, после чего проводится его фотографирование (Xing et al., 2006). Аналогичные результаты были получены и в отношении лимфомы Ходжкина (Liu et al., 2010a, 2010b).

Колдуэлл с соавторами (Caldwell et al., 2008) использовали QD605 и QD705 для количественной оценки уровня экспрессии MDM-2 и β-актина в блоках образцов из карциномы почки. При исследовании карциномы легких сравнивали коньюгаты QD605 и QD545 с традиционными флуорохромами (Chen et al., 2009). Используя в качестве антигенов кальвеолин-1 и ядерный белок PCNA, авторы пришли к заключению о более высоком уровне чувствительности и специфичности коньюгатов квантовых точек по сравнению с традиционной иммуногистохимией. Аналогичные результаты — примерно 10-кратное повышение чувствительности — были отмечены и другими авторами (Sukhanova et al., 2002, 2006).

Протокол окрашивания квантовыми точками гистологических препаратов для непрямой реакции Кунса подробно описан (Akhtar et al., 2007). Данный метод позволяет практически выявлять только два антигена, применивая в качестве первичных антител антитела от мыши и кролика. В качестве вторых антител используются коньюгированные с квантовыми точками антитела козы или ослины против иммуноглобулинов мыши и кролика соответственно. Для выявления большего числа антигенов необходимо использовать последовательные окрашивания, которые включают в себя окраску первичными биотинилизованными антителами, инкубацию с коньюгатами стрептавидина с квантовыми точками, затем отмыкание несвязавшихся реагентов и повторное окрашивание по той же схеме с использованием других антител и квантовых точек. Применяя такую схему, можно одновременно идентифицировать до 5 антигенов (Fountaine et al., 2006).

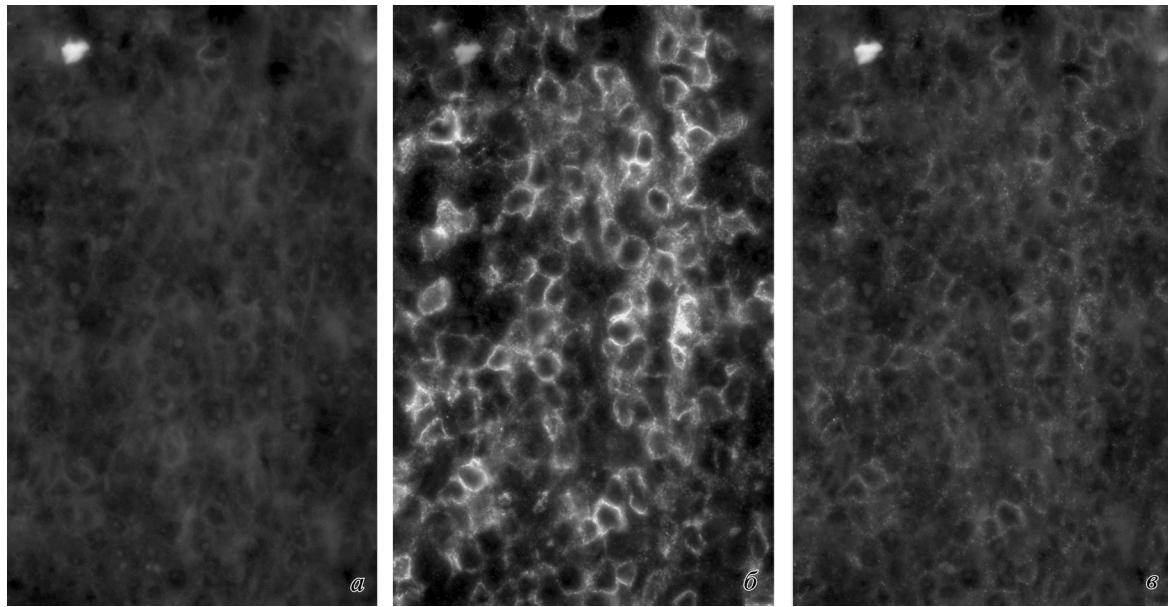


Рис. 4. Эффект «затекания» сигнала QD и автофлуоресценция.

Окрашивание среза лимфоузла пациента с хроническим В-клеточным лимфолейкозом конъюгатом QD565—CD45. Об. 40/0.75×; запирающие светофильтры: 525 (а), 565 (б) и 605 (в) нм. Все фотографии сделаны с одинаковой экспозицией и 14-битные изображения отсканированы в автоматическом режиме (min/max) в программе Metamorph. На фото а преобладает сигнал автофлуоресценции, и контуры клеток часто не совпадают с фото б; на фото в автофлуоресценция слабая, преобладает «затекание» сигнала от QD; контуры клеток совпадают с контурами на б. Неспецифическая флуоресценция частицы, занесенной в препарат (в левом верхнем углу), выглядит значительно ярче на фото а и в, чем на фото б.

Таким образом, в настоящее время в большинстве флуоресцентных исследований с помощью квантовых точек используют либо двухслойный сэндвич — биотинилированное первичное антитело и квантовые точки, коньюгированные со стрептавидином (Wu et al., 2003; Fountaine et al., 2006; Sweeney et al., 2008, и др.), непрямой метод Кунса (Sukhanova et al., 2002; Wu et al., 2003; Олейников и др., 2007; Akhtar et al., 2007) или даже трехслойный сэндвич — первичное антитело, биотинилированное вторичное антитело, затем коньюгированные со стрептавидином квантовые точки (Chan et al., 2005; Xiao et al., 2008; Bodo et al., 2009). Однако процедура окрашивания более чем двух антигенов с помощью квантовых точек, коньюгированных со стрептавидином, является многоступенчатой (Fountaine et al., 2006) и может быть успешной только при полном блокировании избытков как первичных, так и вторичных антител, а также при тщательной отмыке стрептавидиновых конъюгатов квантовых точек. Кроме того, использование трехслойного сэндвича может вести к образованию агрегатов молекул и перекрестной сшивке белков-мишеней (Tokomatsu, Dvorak, 2003). Для того чтобы сделать процедуру менее трудоемкой, некоторые авторы одновременное окрашивание нескольких антигенов проводили, смешивая квантовые точки со стрептавидином и биотинилированные первичные антитела в пробирке непосредственно перед иммунохимической реакцией (Sweeney et al., 2008).

Для амплификации сигнала, получаемого с помощью квантовых точек, коньюгированных со стрептавидином, можно использовать дополнительное усиление тирамидом (Ness et al., 2003; Akhtar et al., 2007). Несмотря на то что в первой работе авторы использовали заведомо неоптимальный для квантовых точек возбуждающий светофильтр — 545/30 нм, чувствительность метода оказалась выше, чем с использованием органических флуоресцентных красителей Alexa 546 или Cy3 (Ness et al., 2003). Рабочая концентра-

ция конъюгатов квантовых точек со стрептавидином составляет 10—20 нМ, и дальнейшее ее увеличение приводит лишь к возрастанию фона; учитывая низкую растворимость квантовых точек в водной среде, промывки в PBS должны быть сведены к минимуму (Ness et al., 2003; Chan et al., 2005).

Наибольшее количество антигенов можно детектировать, сочетая квантовые точки и органические красители. Модифицировав лазерный сканирующий конфокальный микроскоп, Kingeter и Schaefer смогли одновременно детектировать флуоресценцию в 6 каналах, что позволило им одновременно использовать органические флуоресцентные красители (DAPI, Alexa 555 и GFP) и квантовые точки, флуоресцирующие в дальней красной и ближней инфракрасной областях, — QD655, QD705 и QD800 (Kingeter, Schaefer, 2009).

Квантовые точки также могут использоваться для сочетанного электронно-микроскопического и флуоресцентного исследования (Nisman et al., 2004; Alivasatos et al., 2005; Giepmans et al., 2005; Deerinck et al., 2007; Deerink, 2008). Однако необходимо отметить, что контраст даже крупных квантовых точек заметно меньше, чем соединений тяжелых металлов (осмий, уран, свинец), используемых при контрастировании электронно-микроскопических препаратов.

Таким образом, большинство применяемых в настоящее время подходов к использованию квантовых точек требует достаточно трудоемких методов окраски препаратов. Поэтому с точки зрения рутинных иммуногистохимических исследований наибольший интерес представляют использование прямых конъюгатов квантовых точек с антителами и возможности использования существующих флуоресцентных микроскопов с минимальными дополнениями и переделками. Возможность прямого иммуногистохимического окрашивания конъюгатами квантовых точек с антителами была показана при исследовании

рака шейки матки — опухолевые клетки были визуализированы с помощью мечения эпидермального фактора роста (Nida et al., 2005), однако данный метод пока не получил широкого распространения.

Для визуализации различных квантовых точек можно использовать сменные флуоресцентные кубики, но для одновременной детекции трех и более сигналов от квантовых точек лучше произвести модернизацию флуоресцентного микроскопа. К сожалению, во многих работах с использованием квантовых точек параметры микроскопов, которыми пользовались авторы, не описываются, поэтому мы приводим один из вариантов малобюджетной модернизации стандартного флуоресцентного микроскопа, который позволяет регистрировать раздельно сигналы от большинства типов квантовых точек (QD525—QD800).

В наших экспериментах для возбуждения всех квантовых точек использовали один и тот же куб светофильтров (Semrock Inc., США), который монтировался во флуоресцентный микроскоп (Eclipse E-600; Nikon, Япония): возбуждающий светофильтр BP435/40, полоса пропускания которого соответствует яркой линии ртутной лампы, светофильтровое зеркало 510 нм и запирающий светофильтр LP500. Эта комбинация фильтров позволяет регистрировать флуоресценцию от различных квантовых точек. Сигнал записывали с помощью охлаждаемой ПЗС-камеры с 14-битной оцифровкой сигнала (Coolsnap HQ2; Rooper Scientific, США), поскольку оптимальные экспозиции при использовании неиммерсионных объективов составляют 2—3 с и более (для антигенов с низким уровнем экспрессии). Чтобы записывать индивидуальный сигнал, непосредственно перед ПЗС-камерой установили колесо (filter wheel) с набором узкополосных интерференционных светофильтров для каждого типа квантовых точек. Полученные на данной микроскопической системе фотографии иммуногистохимических препаратов представлены на рис. 4. Использование запирающих светофильтров с максимумами пропускания, отстоящими всего на 40 нм, позволяет надежно регистрировать специфическую окраску с помощью квантовых точек и дифференцировать ее от сигнала автофлуоресценции.

Использование квантовых точек в проточной цитометрии

Коньюгаты квантовых точек могут использоваться в цитометрии в комбинации с флуоресцентными белками или органическими флуорохромами. Поскольку фотостабильность квантовых точек в проточной цитометрии неактуальна, целесообразность их применения объясняется другими причинами. Это, во-первых, отсутствие достаточного количества доступных органических красителей (включая tandemные) для исследования гетерогенности сложных популяций, например иммунных Т-клеток (Perfetto et al., 2004; Chattopadhyay et al., 2006). Во-вторых, относительная яркость квантовых точек и их спектральные свойства делают их применение более предпочтительным органическим красителям, которые возбуждаются с помощью фиолетового лазера (Abrams, Dubrovsky, 2007). В-третьих, симметричные спектры эмиссии квантовых точек позволяют уменьшить величину спектральной компенсации по сравнению с аналогичными (по максимуму эмиссии) органическими красителями (Abrams, Dubrovsky, 2007; Chattopadhyay et al., 2010).

Таким образом, проблема использования квантовых точек в проточной цитометрии может быть разделена на две: 1) замена отдельных красителей квантовыми точками для увеличения индекса окраски (staining index) и чувствительности прибора и 2) создание многоцветных панелей с максимальным числом детектируемых каналов.

В проточной цитометрии для возбуждения квантовых точек, как правило, используется фиолетовый диодный лазер (405—408 нм), поскольку уровень автофлуоресценции при возбуждении УФ-светом слишком высок. Лазер, излучающий в синем диапазоне (488 нм), тоже возбуждает квантовые точки, хотя и с меньшей эффективностью. Даже красный (633 нм) лазер способен возбуждать квантовые точки, которые имеют максимум эмиссии при длине волны больше 640 нм (QD655, QD705 и QD800).

Для решения первой задачи больше всего подходят квантовые точки QD605 и QD655 (Abrams, Dubrovsky, 2007; Chattopadhyay et al., 2007; Ibanez-Peral et al., 2008; Zhang et al., 2009; Zahavy et al., 2010). Они имеют наибольшую относительную яркость и индекс окраски. Квантовые точки с максимумом эмиссии при длине волны менее 600 нм флуоресцируют слабее за счет меньшего коэффициента экстинкции, а длинноволновые (QD705 и QD800) высовечиваются в области, где квантовый выход фотоэлектронного умножителя проточного флуориметра существенно снижен (Kingeter, Schaefer, 2009). При окраске поверхностных антигенов насыщающая концентрация для коньюгатов с квантовыми точками такая же, как и для органических флуорохромов — 1—2 нМ (Chattopadhyay et al., 2006; Abrams, Dubrovsky, 2007).

Мы успешно использовали 3-лазерные цитометры стандартной конфигурации (FACSCanto и FACSaria; BD Biosciences, San Jose, CA) для анализа и сортировки клеток крови от пациентов с хроническим В-клеточным лимфолейкозом, окрашенных 8-цветной комбинацией антител, включающей в себя QD655, коньюгированный с антителом к CD38. В то же время коньюгаты CD38 с QD525, QD565 или QD585 при совместном использовании со стандартными флуорохромами в многоцветной панели (6—8 цветов) не позволяли отличать положительную популяцию В-лимфоцитов ($CD38^+$) от негативной (Barteneva, Vorobjev, 2009).

Квантовые точки можно использовать на проточных цитометрах со стандартным набором светофильтров и зеркал, но для лучшей детекции сигналов набор необходимо изменить. Оптимизация прибора для многоцветной панели включает в себя замену дихроичных зеркал и запирающих фильтров и для органических флуорохромов, с тем чтобы предотвратить «затекание» сигнала от органического флуорохрома в каналы для квантовых точек. Чтобы увеличить количество каналов, доступных для записи сигналов от квантовых точек, в ряде цитометров применяется октагональная система фотоумножителей для флуоресценции, возбуждаемой фиолетовым лазером («фиолетовый октагон»). В результате инструмент способен детектировать одновременно до 7 разных квантовых точек (цитометр FACSaria; BD Biosciences, San Jose, CA, США, или аналогичные приборы; см. рис. 5).

Возможности комбинирования в одной цитометрической панели большого количества органических и tandemных красителей обычно лимитированы 10—11 цветами ввиду широкого спектра эмиссии большинства органических красок и эффекта «затекания» флуоресцентного сигнала в соседние каналы. Сотрудники лаборатории Рёдерера (Perfetto et al., 2004) впервые описали возмож-

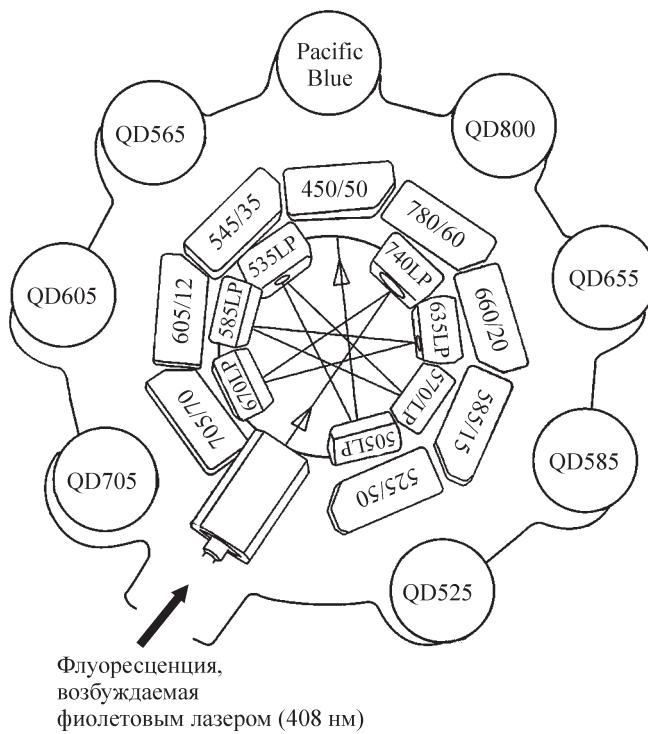


Рис. 5. Конфигурация октагональной системы fotoумножителей на модифицированном 20-канальном приборе FACS Aria2 в лаборатории авторов.

Из 8 фотоумножителей на схеме «фиолетового» октагона 6 предназначены для QD525—QD705. Пустая ячейка может быть заполнена специальным фотоумножителем для QD800.

ность применения в цитометрии квантовых точек в составе многоцветных панелей. Панель включала в себя 6 квантовых точек в дополнение к 11 органическим и tandemным красителям для модифицированного в лаборатории проточного цитометра. Все конъюгаты квантовых точек с зондами были приготовлены в лаборатории (Chattopadhyay et al., 2006, 2007). Следует отметить, что из 17 указанных в работе красителей многие дают значительное «затекание» сигнала в соседние каналы (из органических красителей отметим PE-Cy5, PE-Cy5.5 и PE-Texas Red, а для квантовых точек — QD545, QD565, QD585 и QD605), что делает их совместное применение крайне неудобным, однако авторы утверждают, что спектральная компенсация может быть оптимизирована и позволяет идентифицировать положительные субпопуляции клеток (Chattopadhyay et al., 2007).

Хотя количество коммерческих конъюгатов антител с квантовыми точками значительно увеличилось за последние несколько лет, во время написания статьи практически отсутствовали коммерческие конъюгаты антител с квантовыми точками для внутриклеточных проб в проточной цитометрии. Это объясняется необходимостью значительной модернизации протокола для фиксации и пермеабилизации клеток при использовании квантовых точек в составе панели для внутриклеточного окрашивания. В результате при решении задачи создания многоцветной панели с квантовыми точками исследователю часто необходимо наладить в своей лаборатории конъюгацию антител с квантовыми точками. Методика конъюгации квантовых точек с антителами для проточной цитометрии была описана (Chattopadhyay et al., 2007). Коммерческие наборы для конъюгации доступны для

основных вариантов квантовых точек (сайт компании Invitrogen, США: www.invitrogen.com). Так же как и в иммуногистохимии, в проточной цитометрии можно использовать конъюгаты квантовых точек со стрептавидином и биотинилированными антителами, однако это может привести к трудностям при использовании нескольких сэндвичей.

В своих экспериментах мы использовали моноклональные антитела к Zap-70, сконъюгированные с QD655 для многоцветной панели с 4 другими прямыми конъюгатами с традиционными флуорохромами (антитела к CD3, CD19, CD5 и CD38) (Sotnikov et al., 2010). Мы оптимизировали окрашивание для цитоплазматического (Zap-70) и ядерного (Ki-67) маркеров, используя коммерческие наборы, включавшие в себя сапонин или параформальдегид.

Оптические свойства квантовых точек позволяют применять их в комбинации друг с другом, что резко увеличивает число детектируемых популяций (Hadrup et al., 2009). В отличие от стандартной проточной цитометрии, в которой сигналы с одиночных флуоресцентных каналов используются для характеристики антиген-специфических субпопуляций, комбинаторный метод предполагает применение комбинации флуорохромов, для того чтобы охарактеризовать конкретную субпопуляцию. В результате для каждого маркера получается уникальное сочетание двух меток на поверхности (например, QD605 + QD655, QD605 + QD705 и т. д.), которое позволяет разделить клетки по популяциям на двумерных графиках. Так, одновременное использование двухцветного кода и 8 различных флуорохромов позволяет с помощью 10-канального цитометра (2 канала светорассеяния и 8 флуоресцентных каналов) одновременно охарактеризовать в одном эксперименте до 28 уникальных клеточных субпопуляций (Hadrup, Shumacher, 2010). Комбинаторный метод (6 вариантов квантовых точек и два белка-флуорохрома — РЕ и аллофлюоресценция, — сконьюгированные с пептидами-мультимерами главного комплекса гистосовместимости I класса) позволил обнаружить специфические субпопуляции Т-клеток с частотой экспрессии $\geq 0.02\%$ (Hadrop et al., 2009). Хотя авторы наблюдали снижение величины флуоресцентного сигнала (что типично при увеличении числа скомбинированных в панели флуорохромов), тем не менее, им удалось зарегистрировать 25 из 28 возможных двухмерных комбинаций красителей. Эта же методика была успешно применена для оценки эпитоп-специфичного ответа CD8⁺ Т-клеток к шести различным антигенам главного комплекса гистосовместимости бета-клеток островков Лангерганса при пересадке их пациентам с диабетом (Velthius, et al., 2010).

Квантовые точки во флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)

Детектирование ДНК. Одно из первых исследований с применением квантовых точек для FISH было выполнено Pathak et al. (2001), однако в своей публикации авторы отмечали высокий фон. Улучшение методов получения и конъюгации квантовых точек позволило успешно использовать их для FISH-анализа хромосом мыши и человека. Применение биотинилированных проб ДНК и коньюгата QD605 со стрептавидином позволило получить более высокую стабильность и интенсивность сигнала по сравнению с традиционными флуорохромами FITC

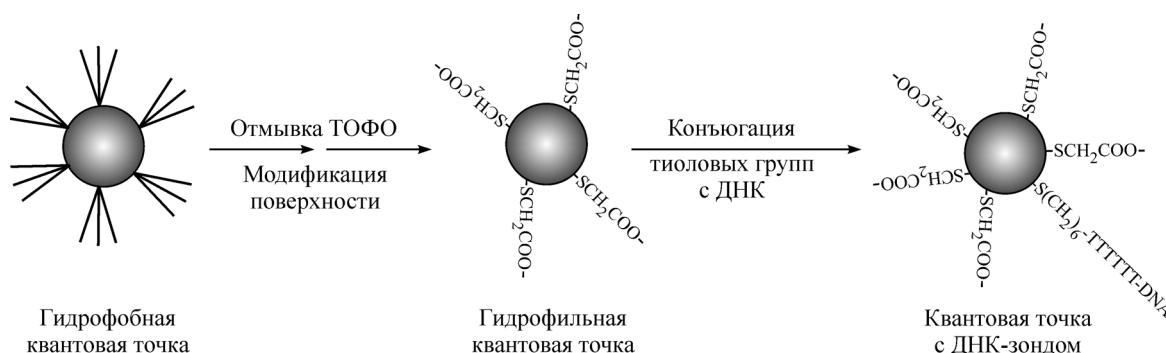


Рис. 6. Схема модификации квантовых точек для гибридизации с ДНК (РНК).

Поверхность квантовой точки полностью отмывается от ТОФО, затем на нее наносятся сульфидные группы, к которым присоединяются зонды. По данным: Ma et al., 2008.

и Texas Red при использовании ДНК-зондов на локусы 1q12 и HER2 (Xiao, Barker, 2004). В то же время авторы наблюдали эффект мерцания (blinking) квантовых точек, что затрудняло их использование для количественного анализа сигнала (оценки уровня амплификации гена).

Детальный протокол проведения гибридизации для анализа последовательностей ДНК опубликован Нолл (Knoll, 2007). Автор использовала относительно короткие зонды (150—600 нуклеотидов), меченные дигоксигенином. Метка выявлялась квантовыми точками (QD655), конъюгированными с антителами против дигоксигенина. Метод пригоден для работы как с хромосомными препаратами, так и с гистологическими срезами. К сожалению, данный метод не позволяет идентифицировать более одного локуса ДНК.

Поскольку квантовые точки обладают более высокой температурной стабильностью по сравнению с органическими флуорохромами, они хорошо выдерживают высокую температуру гибридизации, необходимую, например, для мечения теломер (Karoog et al., 2009). Практически все традиционные флуорохромы, включая фикобилипротеины, в этих условиях повреждаются и теряют флуоресценцию. Авторы использовали для мечения коньюгаты с QD605, QD655 и QD705 и получили данные, близкие к результатам традиционного FISH и блотинга по Саузерну (Southern blotting). Преимущество использования квантовых точек заключалось в возможности совместного иммunoфенотипирования и измерения длины теломер.

Несмотря на упомянутые преимущества квантовых точек по сравнению с органическими флуорохромами, флуоресцентная гибридизация с их использованием все еще не стала рутинным лабораторным протоколом. Ряд технических проблем, включающих в себя высокий фон, неравномерность окрашивания при использовании зондов против целых хромосом, и трудно воспроизводимые результаты осложняют разработку протоколов выполнения FISH с помощью коммерчески доступных квантовых точек (Ioannou et al., 2009). Многие успешные группы исследователей использовали не коммерческие, а синтезированные в собственной лаборатории квантовые точки со специфическими характеристиками, к примеру меньшего размера (за счет удаления ТОФО с их поверхности), и со специально синтезированной гидрофильной оболочкой, отличной от коммерчески доступных квантовых точек (Xiao, Barker, 2004; Bentolila, Weiss, 2006; Ma et al., 2008). Кроме того, для хорошего связывания зонда с нуклеиновой кислотой необходимо использовать вставку между поверхностью квантовой точки и последовательностью

ДНК, которая гибридизуется (Chan et al., 2005; Ma et al., 2008) (рис. 6).

Важно отметить, что в связи с более интенсивным сигналом от квантовых точек их можно использовать для выявления отдельных генов с более короткими (в 100 раз меньше обычных) ДНК-пробами (Knoll, 2007).

Детектирование мРНК. Были разработаны специальные зонды на основе квантовых точек, конъюгированных со стрептавидином, и модифицированных олигонуклеотидов, позволяющие детектировать мРНК на срезах ткани (Chan et al., 2005; Tholouli et al., 2006). Более того, авторы показали, что детектирование мРНК можно проводить одновременно с детектированием белков в этих же клетках иммуногистохимическим методом. Метод пригоден как для свежих срезов ткани (Chan et al., 2005), так и для парафиновых срезов (Tholouli et al., 2006; Byers et al., 2007). Однако следует отметить, что концентрации детектируемых тканеспецифических или специфических для опухоли мРНК и белков во всех указанных работах были весьма значительны, и поэтому вопрос о чувствительности метода остается открытым.

Практические советы по мечению препаратов квантовыми точками

При использовании квантовых точек пригодны основные методы фиксации, которые используются в иммуногистохимии, — фиксация формалином и смесями на его основе (за исключением смесей, содержащих спирт). Для внутриклеточного окрашивания желательно после фиксации проводить пермеабилизацию клеток раствором неионного детергента (Tween 20 или Triton-X-100). Все растворы, используемые совместно с квантовыми точками, должны иметь в качестве стабилизатора БСА.

Многоцветное иммуногистохимическое окрашивание с помощью квантовых точек, так же как и использование квантовых точек для многоцветных панелей в цитометрии, требует умения конъюгировать их с антителами для получения первичных коньюгатов. Конъюгирование квантовых точек основано на реакциях между амино- и карбоксильной группами, между амино- и сульфогидрильной группами, между альдегидной и гидразидной группами. Сравнительная характеристика методов и получаемых коньюгатов приводится в таблице.

Методика конъюгации. Для коммерческих препаратов квантовых точек компания Invitrogen предлагает готовые наборы и протоколы. Однако для успешной

Характеристика методов конъюгации квантовых точек (QD) для иммуногистохимии

Характеристика	Метод			
	сульфидрильный (ковалентный)	амид (ковалентный)	His-Tag (нековалентный)	биотин-авидин (нековалентный)
Конъюгированный лиганд	Фрагменты антител	Антитело (AT)	ScFv или пептид	AT
Специфичность	Средняя	Низкая	Высокая	Высокая
Яркость окрашивания конъюгата	Низкая	Высокая	»	Средняя
Соотношение QD/AT	3—4	10—15	3—25	<3
Пригодность для работы	Хорошая	Плохая	Очень хорошая	Хорошая

конъюгации необходимо проводить дополнительную очистку антител от других белков методом аффинной хроматографии (например, с протеином G). Для обеспечения большей стабильности получаемых конъюгатов их целесообразно сразу же концентрировать на концентрирующих колонках с отсечкой 50 кДа и разводить в буфере TBE (рН 8.3). Конъюгированные с квантовыми точками антитела хранятся при 4 °C, их нельзя замораживать. Хранить конъюгаты квантовых точек необходимо в стеклянных ампулах, так как в пластиковых они быстро агрегируют. Даже коммерческие конъюгаты имеют ограниченное время хранения (не более 6—8 мес). Более подробно некоторые варианты конъюгации квантовых точек с антителами описаны в методической статье (Xing et al., 2007).

Методика мечения конъюгированными антителами. Выбор процедуры фиксации и пермеабилизации оказывает существенное влияние на уровень флуоресценции квантовых точек. Параформальдегид (ПФА) в концентрации от 1 до 4 % является одним из лучших фиксаторов при использовании квантовых точек (Jaiswal et al., 2004; Kampani et al., 2007; Sotnikov et al., 2010). Более высокие концентрации ПФА и наличие в фиксирующей смеси метанола снижают флуоресценцию квантовых точек (Williams et al., 2008; Sotnikov et al., 2010). Иммунохимическая окраска прямыми конъюгатами или квантовыми точками, конъюгированными со стрептавидином, может проводиться так же, как и органическими флуорохромами (Akhtar et al., 2007). Однако, по нашим данным, для получения лучших результатов методика окраски должна различаться. Конъюгаты антител и квантовых точек следует наносить на срез только последовательно, перед нанесением каждого нового конъюгата необходимо отмывать срезы в 2%-ном растворе БСА на фосфатно-солевом буфере (PBS). При нанесении на срез коктейля конъюгатов специфическая окраска часто не получается, вероятно из-за взаимодействия их между собой.

Благодаря исключительной фотостабильности квантовых точек нет необходимости использовать защищающие от выцветания реагенты (antifade reagents) во время записи стопок оптических срезов на конфокальном микроскопе. Препараты можно заключать просто в нейтрализованный глицерин.

Запись изображения. Стандартные светофильтры, используемые во флуоресцентной микроскопии для FITC или родамина, могут быть использованы для квантовых точек QD525 и QD605 соответственно (Deerinck, 2008). Однако для возбуждения квантовой точки оптимальным фильтром является 425/40 или 435/40 нм, а эмиссионный фильтр должен соответствовать пику эмис-

сии квантовой точки с шириной полосы не более 20 нм для QD525—QD655 и 20—40 нм для QD705 и более. Процедура записи изображения при использовании квантовых точек отличается от обычной. Препарат следует сначала экспонировать не менее 2—3 мин при возбуждающем свете, а только затем начинать фотографирование. Это позволяет уменьшить автофлуоресценцию, а также в некоторых случаях увеличить сигнал от квантовых точек.

Заключение

Применение квантовых точек в иммуногистохимии и проточной цитометрии обусловлено их существенными преимуществами по сравнению с органическими флуорохромами: 1) широким спектром возбуждения и узким спектром испускания, который делает возможным совместное изучение нескольких субпопуляций клеток или биомолекул; 2) резистентностью к выцветанию (фотостабильностью); 3) большим (100 нм) сдвигом Стокса, а также 4) высокой стабильностью окрашенных препаратов, которые могут храниться в течение не менее нескольких недель, а вероятно, и нескольких месяцев. Однако, несмотря на высокую устойчивость к выцветанию, реальная нестабильность флуоресценции, проявляющаяся в эффектах фотоактивации, усиления флуоресценции и мерцания выпускаемых в настоящее время квантовых точек, делает их малопригодными для количественных измерений (Lee, Osborne, 2009).

Основные проблемы практического использования конъюгатов квантовых точек связаны со следующими обстоятельствами. 1. Отсутствие стандарта для этих частиц — значительная вариабельность размера, состава и характеристик квантовых точек от разных производителей; авторам неизвестны попытки сравнить квантовый выход флуоресценции квантовых точек, полученных из разных источников (компаний или исследовательских лабораторий), и даже оценить вариабельность частиц различных партий (batch-to-batch variation) от одного и того же производителя. 2. Сравнительно небольшая панель коммерчески доступных конъюгатов квантовых точек для проточной цитометрии. 3. Недостаточная стабильность конъюгатов в водных растворах (их преципитация). 4. Относительно высокая стоимость по сравнению с органическими флуорохромами.

Перспективы развития квантовых точек связаны с разработкой новых поколений этих частиц, которые будут иметь сходные размеры при различных оптических характеристиках (в настоящее время подобные квантовые

точки выпускаются фирмой Crystalplex: <http://www.crystalplex.com>). Это особенно важно для частиц с длинноволновым спектром испускания, большие размеры которых затрудняют их применение для внутриклеточного окрашивания. Комерчески доступные квантовые точки и их производные (конъюгаты со стрептавидином) в настоящее время, по-видимому, малопригодны для проведения исследований по гибридизации нуклеиновых кислот.

Ограниченнная стабильность коммерческих препаратов квантовых точек (не более 2—6 мес) обусловлена собственными химическими свойствами квантовых точек, в частности тонкой оболочкой из сульфида цинка, которая постепенно окисляется при хранении. Поэтому для повышения стабильности водорастворимых квантовых точек также необходимы новые разработки в области химического синтеза.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01350 и 08-04-01379), Министерства науки и образования РФ (проект 02.512.11.2296), правительства Москвы (для И. А. Воробьева) и гранта CRC (от Invitrogen, США, для Н. С. Бартеневой).

Список литературы

- Oleinikov V. A., Sukanova A. B., Nabiev I. P. 2007. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. Российские нанотехнологии. 2 (2) : 160—173.
- Abrams B., Dubrovsky T. 2007. Quantum dots in flow cytometry. In: Methods in molecular biology. New York: Humana Press. 374 : 185—203.
- Akhtar R. S., Latham C. B., Siniscalco D., Fuccio C., Roth K. A. 2007. Immunohistochemical detection with quantum dots. In: Methods in molecular biology. New York: Humana Press. 374 : 11—28.
- Alivisatos A. P., Gu W., Larabell C. 2005. Quantum dots as cellular probes. Ann. Rev. Biomed. Eng. 7 : 55—76.
- Banin U., Bruchez M., Alivisatos A. P., Ha T., Weiss S., Chella D.S. 1999. Evidence for a thermal contribution to emission intermittency in single CdSe/CdS core/shell nanocrystals. J. Chem. Phys. 110 : 1195—1201.
- Barteneva N., Vorobjev I. 2009. The development of multicolor panels with quantum dots-conjugated antibodies for diagnostics of chronic lymphoid leukemia (CLL) by conventional flow cytometer. Nanotechnology (Nanotech-NSTI Proceedings). 2 : 26—28.
- Baschong W., Suetterlin R., Laeng R. H. 2001. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy. J. Histochem. Cytochem. 49 : 1565—1572.
- Bentolila L. A., Weiss S. 2006. Single-step multicolor fluorescence *in situ* hybridization using semiconductor quantum dot-DNA conjugates. Cell Biochem. Biophys. 45 : 59—70.
- Biju V., Itoh T., Anas A., Sujith A., Ishikawa M. 2008. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. Anal. Bioanal. Chem. 391 : 2469—2495.
- Bodo J., Durkin L., Hsi E.D. 2009. Quantitative *in situ* detection of phosphoproteins in fixed tissues using quantum dot technology. J. Histochem. Cytochem. 57 : 701—708.
- Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science. 281 : 2013—2016.
- Byers R. J., Di Vizio D., O'Connell F., Thoulouli E., Levenson R. M., Gossard K., Twomey D., Yang Y., Benedettini E., Rose J., Ligon K. L., Finn S. P., Golub T. R., Loda M. 2007. Semiautomated multiplexed quantum-dot based *in situ* hybridization and spectral deconvolution. J. Mol. Diagn. 9 : 20—29.
- Caldwell M. L., Moffitt R. A., Liu J., Parry M., Sharma Y., Wang M. D. 2008. Simple quantification of multiplexed quantum dot staining in clinical tissue samples. Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. 2008 : 1907—1910.
- Chan P., Yen T., Frederique R., Gonzalez-Maeso J., Sealfon S. C. 2005. Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescence *in situ* hybridization. Nucl. Acid Res. 33 : e161—e166.
- Chattopadhyay P., Perfetto S.P., Yu J., Roederer M. 2010. The use of quantum dot nanocrystals in multicolor flow cytometry. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2 : 334—348.
- Chattopadhyay P. K., Price D. A., Harper T. F., Betts M. R., Yu J., Gostick E., Perfetto S. P., Goepfert P., Koup R. A., De Rosa S. C., Bruchez M. P., Roederer M. 2006. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. Nature Med. 12 : 972—977.
- Chattopadhyay P. K., Yu J., Roederer M. 2007. Application of quantum dots to multicolor flow cytometry. In: Methods in molecular biology. New York: Humana Press. 374 : 175—184.
- Chen H., Xue J., Zhang Y., Zhu X., Gao J., Yu B. 2009. Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray. J. Mol. Hist. 40 : 261—268.
- Chen Y., Vela J., Htoo H., Casson J.L., Werder D. J., Bussian D. A., Klimov V. I., Hollingsworth J. A. 2008. «Giant» multi-shell CdSe nanocrystal quantum dots with suppressed blinking. J. Amer. Chem. Soc. 130 : 5026—5027.
- Clapp A. R., Medintz I. L., Mauro J. M., Fisher B. R., Bawendi M. G., Mattoucci H. 2004. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dots donors and dye-labeled protein acceptors. J. Am. Chem. Soc. 126 : 301—310.
- Dabbousi B.O., Rodriguez Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoucci H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. 1997. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and optical and structural characterization of a size series of highly luminescent materials. J. Phys. Chem. B. 101 : 9463—9475.
- Danek M., Jensen K.F., Murray C.B., Bawendi M.G. 1996. Synthesis of luminescent thin-film CdSe/ZnSe quantum dot composites using CdSe quantum dots passivated with an overlayer of ZnSe. Chem. Mater. 8 : 173—180.
- Deerinck T. J. 2008. The application of fluorescent quantum dots to confocal, multiphoton, and electron microscopic imaging. Toxicol. Pathol. 36 : 112—116.
- Deerinck T. J., Giepmans B. N. G., Smarr B. L., Martone M. E., Ellisman M. H. 2007. Light and electron microscopic localization of multiple proteins using Quantum dots. In: Methods in molecular biology. New York: Humana Press. 374 : 43—53.
- Ferri G. L., Gaudio R. M., Castello I. F., Berger P., Giro G. 1997. Quadruple immunofluorescence: a direct visualization method. J. Histochem. Cytochem. 45 : 155—158.
- Fountaine T. J., Wincoffitch S. M., Geho D. H., Garfield S. H., Pittaluga S. 2006. Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots. Modern Pathology. 19 : 1181—1191.
- Giepmans B. N., Deerinck T. J., Smarr B. L., Jones Y. Z., Ellisman M. H. 2005. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using quantum dots. Nature Methods. 10 : 743—749.
- Hadrup S. R., Bakker A. H., Shu C. J., Andersen R. S., van Veluw J., Hombrink P., Castermans E., Thor Straten P., Blank C., Hakanen J.B., Heemskerk M.H., Schumacher T.N. 2009. Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. Nature Methods. 6 : 520—526.
- Hadrup S. R., Schumacher T. N. 2010. MHC-based detection of antigen-specific CD8+ T cell responses. Cancer Immunol. Immunother. 59 : 1425—1433.
- He H., Qian H. F., Dong C. Q., Wang K. L., Ren J. C. 2006. Single nonblinking CdTe quantum dots synthesized in aqueous thiopropionic acid. Angew. Chem. 118 : 7750—7753.
- Hines M. A., Guyot-Sionnest P. 1996. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. J. Phys. Chem. 100 : 468—471.

- Hohng S., Ha T. 2004. Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *J. Amer. Chem. Soc.* 126 : 1324—1325.
- Howarth M., Liu W., Puthenveetil S., Zheng Y., Marshall L. F., Schmidt M. M., Wittrup K. D., Bawendi M. G., Ting A. Y. 2008. Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nature Methods.* 5 : 397—399.
- Ibanez-Peral R., Bergquist P. L., Walter M. R., Gibbs M., Gol dys E. M., Ferrari B. 2008. Potential use of quantum dots in flow cytometry. *Int. J. Mol. Sci.* 9 : 2622—2638.
- Ioannou D., Tempest H. C., Skinner B. M., Thornhill A. R., Ellis M., Griffin D. K. 2009. Quantum dots as new-generation fluorochromes for FISH: an appraisal. *Chromosome Research.* 17 : 519—530.
- Jaiswal J. K., Goldman E. R., Mattoucci H., Simon S. M. 2004. Use of quantum dots for live cell imaging. *Nature Methods.* 1 : 73—78.
- Kampani K., Quann K., Ahuja J., Wigdahl B., Khan Z. K., Jain P. 2007. A novel high throughput quantum dot-based fluorescence assay for quantitation of virus binding and attachment. *J. Virol. Methods.* 141 : 125—132.
- Kapoor V., Hakim F. T., Rehman N., Gress R. E., Telford W. G. 2009. Quantum dots thermal stability improves simultaneous phenotype-specific telomere length measurement by FISH-flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 344 : 6—14.
- Kingeter L. M., Schaefer B. C. 2009. Expanding the multicolor capabilities of basic confocal microscopes by employing red and near-infrared quantum dot conjugates. *BMC Biotechnology.* 9 : 49.
- Knoll J. H. M. 2007. Human metaphase chromosome FISH using quantum dot conjugates. In: *Methods in molecular biology.* New York: Humana Press. 374 : 55—66.
- Krenacs T., Laszik Z., Dobo E. 1989. Application of immunogold-silver staining and immunoenzymatic methods and multiple labeling of human pancreatic Langerhans islet cells. *Acta histochim.* 85 : 79—85.
- Kuno M., Fromm D. P., Hamann H. F., Gallagher A., Ne sbitt D. J. 2000. Nonexponential «blinking» kinetics of single CdSe quantum dots: a universal power law behavior. *J. Chem. Phys.* 112 : 3117—3120.
- Lee S. F., Osborne M. A. 2009. Brightening, blinking, bluing and bleaching in the life of quantum dot: friend or foe? *Chem. Phys. Chem.* 10 : 2174—2191.
- Lidke D. S., Nagy P., Jovin T. M., Arndt-Jovin D. J. 2007. Biotin-ligand complexes with streptavidin quantum dots for *in vivo* cell labeling of membrane receptors. In: *Methods in molecular biology.* New York: Humana Press. 374 : 69—79.
- Liu C., Miller P. D., Henstrom W. L., Gibson J. M. 2000. Transmission electron microscopy of semiconductor quantum dots. *J. Microscopy.* 199 : 130—140.
- Liu J., Lau S. K., Varma V. A., Moffitt R. A., Caldwell M., Liu T., Young A. N., Petros J. A., Osunkoya O. O., Krogstad T., Leyland-Jones B., Wang M. D., Nie S. 2010a. Molecular mapping of tumor heterogeneity on clinical tissue specimens with multiplexed quantum dots. *ACS Nano.* 4 : 2755—2765.
- Liu J., Lau S. K., Varma V. A., Kairdolf B. A., Nie S. 2010b. Multiplexed detection and characterization of rare tumor cells in Hodgkin's lymphoma with multicolor quantum dots. *Anal. Chem.* 82 : 6237—6243.
- Ma L., Wu S. M., Huang J., Ding Y., Pang D. W., Li L. 2008. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on mouse metaphase chromosomes with quantum dot-labeled DNA conjugates. *Chromosoma.* 117 : 181—187.
- Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doo se S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., Weiss S. 2005. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science.* 307 : 538—544.
- Murray C. B., Norris D. J., Bawendi M. G. 1993. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=sulphur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Amer. Chem. Soc.* 115 : 8706—8715.
- Ness J. M., Akhtar R. S., Latham C. B., Roth K. A. 2003. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. *J. Histochem. Cytochem.* 51 : 981—987.
- Neuhäuser R. G., Shimizu K. T., Woo W. K., Empedocles S. A., Bawendi M. G. 2000. Correlation between fluorescence intermittency and spectral diffusion in single semiconductor quantum dots. *Phys. Rev. Lett.* 85 : 3301—3304.
- Nida D. L., Rahman M. S., Carlson K. D., Richards-Kortum R., Follen M. 2005. Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection. *Gynecol. Oncol.* 99 : S89—S94.
- Nirmal M., Dabbousi B. O., Bawendi M. G., Macklin J. J., Trautman J. K., Harris T. D., Brus L. E. 1996. Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature.* 383 : 802—804.
- Nisman R., Dellaire G., Ren Y., Li R., Bazett-Jones D. P. 2004. Application of quantum dots as probes for correlative fluorescence, conventional, and energy-filtered transmission electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 52 : 13—18.
- Norris D. J., Sacra A., Murray C. B., Bawendi M. G. 1994. Measurement of the size dependent hole spectrum in CdSe quantum dots. *Phys. Rev. Lett.* 72 : 2612—2615.
- Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P., Bishop-Stuart J., Bhagat M. K., Millard P. J., Mao F., Leung W.-J., Haugland R. P. 1999. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 47 : 1179—1188.
- Pathak S., Choi S. K., Arnheim N., Thompson M. E. 2001. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for *in situ* hybridization. *J. Amer. Chem. Soc.* 123 : 4103—4104.
- Perfetto S. P., Chattopadhyay P., Roederer M. 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4 : 648—655.
- Sotnikov I., Jaron S., Konopleva M., O'Brien S., Andreeff M., Hillibrant J., Manis J., Brown J., Vorobjev I., Barteneva N. 2010. QDot nanocrystals in intracellular flow: Zap-70, Ki-67 and five-colors fluorophores panel. *Nanotechnology (Nanotech-NSTI Proceedings).* 3 : 424—427.
- Stierhof Y. D., El Kasmi F. 2010. Strategies to improve the antigenicity, ultrastructure preservation, and visibility of trafficking compartments in *Arabidopsis* tissue. *Eur. J. Cell Biol.* 89 : 285—297.
- Sukhanova A., Venteo L., Cohen J. H. M., Pluot M., Nabiev I. 2006. Nano-biocaptures for research and diagnostics in inflammation diseases and cancer. *Ann. Pharm. Franc.* 64 : 125—134.
- Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I. 2002. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections. *Lab. Invest.* 82 : 1259—1261.
- Sweeney E., Ward T. H., Gray N., Womack C., Jayson G., Hughes A., Dive C., Byers R. 2008. Quantitative multiplexed quantum dot immunochemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 : 181—186.
- Tholouli E., Hoyland J. A., Di Vizio D., O'Connell F., Macdermott S. A., Twomey D., Levenson R., Yin J. A., Golub T. R., Loda M. K., Byers R. 2006. Imaging of multiple mRNA targets using quantum dot based *in situ* hybridization and spectral deconvolution in clinical biopsies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 : 628—636.
- Tokomasu F., Dvorak J. 2003. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J. Microscopy.* 211 : 256—261.
- Veltthuis J. H., Unger W. W., Abreu J. R., Duinkerken G., Franken K., Peakman M., Bakker A. H., Reker-Hadrup S., Keymeulen B., Drijfhout J. W., Schumacher T. N., Roep B. O. 2010. Simultaneous detection of circulating autoreactive CD8+ T-cells specific for different islet cell-associated epitopes using combinatorial MHC multimers. *Diabetes.* 59 : 1721—1730.
- Williams Y., Byrne S., Bashier M., Davies A., Whelan A., Gun'ko Y., Kelleher D., Volkov Y. 2008. Comparison of three cell fixation methods for high content analysis assays utilizing quantum dots. *J. Microscopy.* 232 : 91—98.
- Wu X., Liu H., Liu K. N., Haley J. A., Treadway J. A., Larson J. P., Ge N., Peale F., Bruchez M. P. 2003. Immunofluorescent

labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnol.* 21 : 41—46.

Wu Y., Campos S. K., Lopez G. P., Ozburn M. A., Sklar L. A., Buranda T. 2007. The development of quantum dot calibration beads and quantitative multicolor bioassays in flow cytometry and microscopy. *Anal. Biochem.* 364 : 180—192.

Xiao Y., Barker P. E. 2004. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucl. Acids Res.* 32 : e28.

Xiao Y., Gao X., Gannot G., Emmert-Buck M. R., Srivastava S., Wagner P. D., Amos M. D., Barker P. E. 2008. Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection. *Int. J. Cancer.* 122 : 2178—2186.

Xing Y., Chaudry Q., Shen C., Kong K. Y., Zhou H. E., Chung L. W., Petros J. A., O'Regan R. M., Yezhelyev M. V., Simons J. W., Wang M. D., Nie S. 2007. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature Protocols.* 2 : 1152—1165.

Xing Y., Smith A. M., Agrawal A., Ruan G., Nie S. 2006. Molecular profiling of single cancer cells and clinical tissue specimens with semiconductor quantum dots. *Inter. J. Nanomedicine.* 1 : 473—481.

Zahavy E., Heleb-Shabtai V., Zafrani Y., Marciano D., Yitzhaki S. 2010. Application of fluorescent nanocrystals (q-dots) for the detection of pathogenic bacteria by flow cytometry. *J. Fluoresc.* 20 : 389—399.

Zhang H., Sachdev D., Wang C., Hubel A., Gaillard-Kelly M., Yee D. 2009. Detection and downregulation of type I IGF receptor expression by antibody-conjugated quantum dots in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 114 : 277—285.

Zhu X., Duan D., Madsen S., Publicover N. G. 2010. Compatibility of quantum dots with immunobuffers, and its effect on signal/background of quantum dot-based immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (3) : 1345—1353.

Поступила 6 XII 2010

APPLICATIONS OF FLUORESCENT SEMICONDUCTOR NANOCRYSTALS IN MICROSCOPY AND CYTOMETRY

I. A. Vorobjev,^{1, 2} E. P. Rafalovskaya-Orlovskaya,² A. A. Gladkih,² D. M. Potashnikova,² N. S. Barteneva^{3, 4}

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,

² Russian Hematology Scientific Center, Moscow,

³ Immune Disease Institute and Program in Cellular and Molecular Medicine at Children's Hospital and

⁴ Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

e-mail: ivorobjev@mail.ru

Quantum dots (QD) nanocrystals consisting of CdSe core with ZnS shell are a novel class of fluorophores with tremendous potential in microscopy and cytometry techniques. The unique optical features of Qdots, namely, high photostability and extinction coefficient, wide absorption and narrow emission spectra, and large Stokes shift make them desirable fluorescent tags for diverse biomedical applications. Applications of this novel technology in microscopy and cytometry produce reliable multicolor specimens due to increased photostability, ability for multiplexing and narrow emission spectra of nanocrystals. QD conjugates are available on the market and could be prepared in the laboratory. This paper describes the application of QD-conjugates for immunophenotyping and FISH assessment of cells and tissues, and the requirements for microscope and flow cytometer re-engineering for successful use of QD in multiplex fluorescent format. Despite the considerable progress, important methodological issues still need to be solved in terms of QD nanocrystals' size, heterogeneity, functionalization and stability of their conjugates. We discuss practical approaches and challenges that need to be addressed to make QD immunostaining a standard method in biology.

Key words: quantum dots, fluorescent nanocrystals, immunohistochemistry, flow cytometry.