

Д.Э. Коржевский, О.В. Кирик, Е.Г. Сухорукова и А.В. Гиляров

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ (КВАНТОВЫХ ТОЧЕК) В ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Полупроводниковые нанокристаллы quantum dots (QD) являются новым и многообещающим (в плане применения в биологии и медицине) классом неорганических флуоресцирующих объектов. Цель исследования состояла в определении преимуществ и недостатков квантовых точек при использовании их в иммуноцитохимических исследованиях. Показано, что конъюгаты стрептавидин–QD обладают рядом преимуществ перед конъюгатами стрептавидина с органическими флуорохромами (высокая интенсивность флуоресценции, фотостабильность, расширенный диапазон возбуждения, узкий и симметричный пик эмиссии), что позволяет рекомендовать их для использования в иммуноцитохимических исследованиях. Однако выявлены и ряд недостатков (меньшая устойчивость при длительном хранении в сравнении с конъюгатами органических флуорохромов, плохая сохранность аликвот реагентов, невозможность длительного сохранения флуоресценции окрашенных препаратов при хранении, несовместимость с рядом коммерческих сред, предназначенных для заключения препаратов), препятствующих широкому использованию нанокристаллов в иммуноцитохимии.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, квантовые точки, флуоресценция, конфокальная микроскопия.

Полупроводниковые нанокристаллы, называемые квантовыми точками [6], или quantum dots (QD) [9], являются новым и многообещающим (в плане применения в биологии и медицине) классом неорганических флуоресцирующих объектов [10, 11]. Они могут применяться как флуорохромы при создании конъюгатов с антителами и стрептавидином для иммуноцитохимии и проточной цитометрии [11, 12]. QD фагоцитируются макрофагами и лейкоцитами *in vivo* и *in vitro* и могут быть использованы для изучения внутриклеточного транспорта и функциональной активности клеток [6, 10]. Предполагается, что их скоро можно будет эффективно применять не только в диагностических [7], но и в лечебных целях (наномедицина) [9].

Поскольку QD обладают необычными спектральными характеристиками и гидрофобностью [9], которая преодолевается при нанесении особых гидрофильных покрытий, их применение в иммунофлуоресцентных исследованиях и иммуноморфологической диагностике пока не обрело систематического характера. Остается непонятным, в каких случаях применение QD позволяет получить лучшие результаты, чем при использовании общеизвестных флуорохромов, и как следует оптимизировать протоколы обработки препаратов.

Цель настоящего исследования состояла в определении преимуществ и недостатков QD при

использовании их в качестве флуоресцентных меток в иммуноцитохимических исследованиях.

В исследовании были использованы конъюгаты квантовых точек со стрептавидином — QD525, QD565, QD605 [Chemicon (Millipore), США]. Для сравнения с перечисленными конъюгатами использовали конъюгат стрептавидин–FITC (флуоресцеинизотиоцианат) производства фирмы Dako, Дания.

Материалом для исследования служили головной мозг и почка крыс линии Вистар ($n=8$) и фрагменты головного мозга человека ($n=3$), полученные при аутопсии для проведения планового гистологического исследования в соответствии с законодательством РФ и разрешением этического комитета НИИЭМ СЗО РАМН. При содержании и умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Фиксацию материала проводили в 2% растворе формалина на 80° этаноле [3] и в цинк-этанол-формальдегиде [2]. Обезвоженные объекты заливали в парафин по общепринятой методике. Для проведения иммуноцитохимических реакций использовали поликлональные кроличьи антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) [4], моноклональные мышинные антитела к виментину (клон V-9, Dako, Дания) [3], нейрональному белку NeuN (Chemicon, США) [1] и кальбин-

дину (AbCam, Великобритания). Обработку препаратов первичными антителами и вторичными биотинилированными антителами (Dako, Дания) проводили с учетом рекомендаций производителей реагентов в соответствии с опубликованными ранее протоколами [1, 3–5]. Для разведения концентрированных растворов конъюгатов QD–стрептавидин использовали раствор для разведения антител (Antibody diluent, Dako, Дания) и стерильную дистиллированную воду. Инкубацию в растворах QD–стрептавидин (1:50) проводили при комнатной температуре и в термостате при 27 °C в течение 30–40 мин. Ядра клеток в части препаратов подкрашивали флюоресцентными красителями Hoechst 33342 (Invitrogen, США) и йодидом пропидия (BD Pharmingen, США). Контрольные процедуры при постановке иммуноцитохимических реакций проводили с учетом рекомендаций производителей реагентов.

Полученные препараты исследовали при помощи флюоресцентных микроскопов Leica DM 2500 (Leica, Германия), Axioplan 2 (Zeiss, Германия) и конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 510-meta (Zeiss, Германия). Фотографирование флюоресцирующих объектов производили на микроскопе Axioplan 2 на обратимую фотопленку Fujichrome Provia 100F (Fujifilm Corporation, Япония) при наборе фильтров Zeiss N5 (возбуждение флюоресценции светом длиной волны 395–440 нм; пропускание эмитируемого света длиной волны от 470 нм).

Опыт использования QD в качестве флюоресцентных меток свидетельствует о следующем. Использованные реагенты в соответствии с требованиями производителя следует хранить при 4 °C, но их не желательно аликвотировать, поскольку при этом нередко происходит испарение растворителя и наблюдается агрегация QD. Добавление растворителя при этом не восстанавливает качества реагента, и он становится не способным к специфической реакции с биотином и не может быть использован для иммунофлюоресцентного исследования.

Рекомендуемый срок хранения реактивов, даже при оптимальных условиях хранения и транспортировки, не может быть существенно продлен без опасности значительного снижения флюоресценции конъюгатов (что не характерно для конъюгата стрептавидин–FITC).

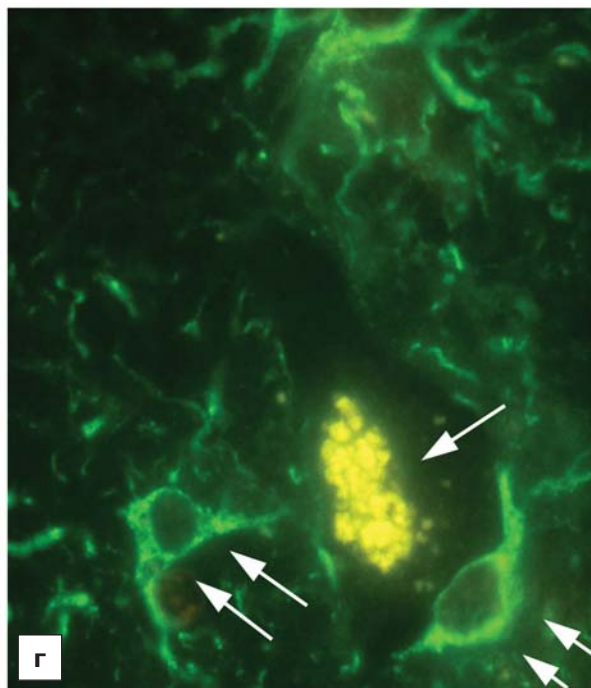
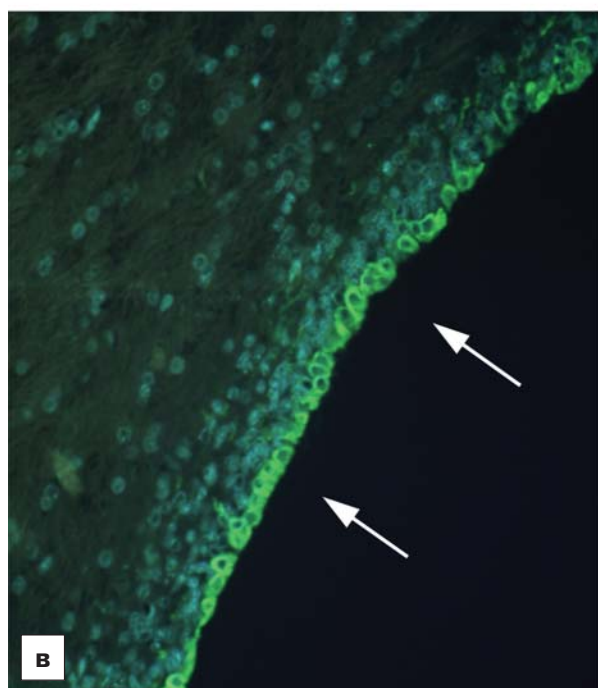
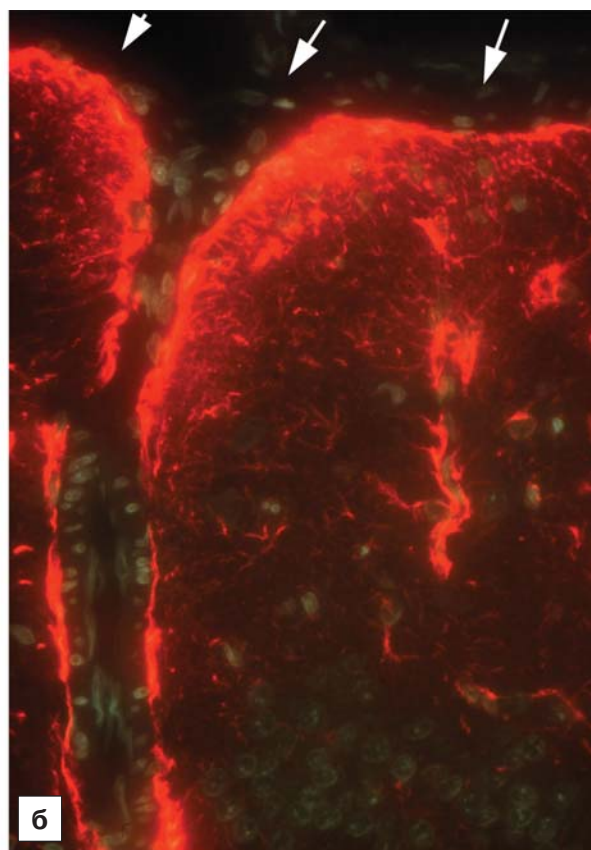
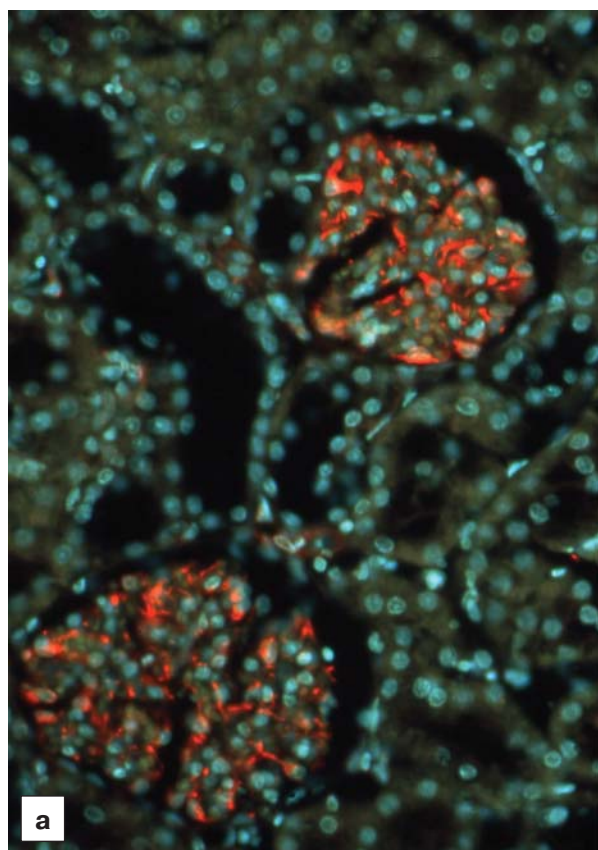
Для успешного применения конъюгатов QD–стрептавидин могут быть использованы протоколы, адаптированные для конъюгатов стрептавидин–FITC. При этом подкрашивать ядра клеток флюоресцентными красителями следует на этапе обработки препаратов вторичными биотинилиро-

ванными антителами, добавляя их в инкубационный раствор. Подкраску не рекомендуется производить после обработки препаратов реагентом, содержащим QD, в связи с не вполне прогнозируемой зависимостью флюоресценции QD от состава среды, в которую помещен препарат.

Использование различных сред для заключения препаратов после иммуноцитохимических реакций показало, что относительно длительного сохранения флюоресценции можно добиться, используя глицерин и глицерин–желатин (от 1 до 3 нед). Тем не менее, учитывая возможность постепенного ослабления флюоресценции, препараты желательно исследовать и фотографировать в течение первых 3 сут после их изготовления. Специальные среды (такие как Dako Fluorescent mounting medium и т.п.), включающие добавки, препятствующие «выгоранию» флюорохромов, использовать при работе с QD не следует, поскольку полное угасание специфического свечения, даже при исходно очень интенсивной реакции, может происходить в течение 24 ч. Для сравнения флюоресценция конъюгата стрептавидин–FITC при использовании для заключения препаратов Fluorescent mounting medium (Dako, Дания) может быть сохранена (при правильном хранении препаратов) в течение 1 года. Флюоресценция конъюгатов QD неустойчива при обработке препаратов этанолом и ксилолом. Поэтому QD нельзя использовать для постановки реакций на толстых срезах с последующим их просветлением в органических растворителях и маслах [5], что справедливо и для конъюгатов стрептавидин–FITC.

Неустойчивость флюоресценции препаратов, обработанных конъюгатами QD, не связана с неустойчивостью нанокристаллов к свету или «выгоранием». Напротив, QD обладают высокой фотостабильностью (одно из наиболее важных свойств этих нанокристаллов), что обеспечивает им преимущество перед FITC и другими органическими флюорохромами.

При обработке препаратов по сопоставимым протоколам использование QD позволяет получить более интенсивное свечение метки, чем использование конъюгата стрептавидин–FITC. Этот факт заставляет отдать предпочтение QD перед обычными флюорохромами в следующих случаях: использование только авидин–биотиновой амплификации; тогда, когда выявляемый антиген локализован на небольшой площади препарата; при необходимости отчетливой визуализации места расположения метки во время фотосъемки при малых увеличениях (рисунок, а). В то же время, высокая интенсивность свечения больших участков препарата при соответствующем расположе-



Результаты использования различных конъюгатов квантовых точек (QD) со стрептавидином для визуализации продуктов иммуноцитохимических реакций.

а — виментин-иммунопозитивные клетки почечных телец крысы (иммуноцитохимическая реакция на виментин, конъюгат QD605–стрептавидин, подкраска ядер клеток — Hoechst 33342); б — иммунопозитивные астроциты конечного мозга крысы (иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок — GFAP, конъюгат QD605–стрептавидин, подкраска ядер клеток — Hoechst 33342); стрелки — область мозговых оболочек; в — виментин-иммунопозитивные эпендимоциты (стрелки) стенки бокового желудочка головного мозга крысы (иммуноцитохимическая реакция на виментин, конъюгат QD565–стрептавидин, подкраска ядер клеток — Hoechst 33342); г — GFAP-иммунопозитивные астроциты (две стрелки) конечного мозга человека (иммуноцитохимическая реакция на GFAP, конъюгат QD525–стрептавидин); стрелка — скопление гранул липофусцина в перинуклеарной цитоплазме пирамидного нейрона (желтая автофлуоресценция). а, в — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10; г — об. 100, ок. 10.

нии антигена уменьшает различимость подкраски в случае использования широкополосных фильтров (см. рисунок, б). Высокая интенсивность свечения объекта ухудшает различимость деталей и при больших увеличениях микроскопа. Этот недостаток устраняется использованием конфокальной микроскопии.

Флюоресценция использованных в работе конъюгатов QD соответствует различным областям видимого спектра (см. рисунок) — зеленому (QD525), желто-зеленому (QD565) и оранжево-красному (QD605). Максимумы флюоресценции соответствуют длине волн 525, 565 и 605 нм, что подтверждается проверкой спектров эмиссии при конфокальной микроскопии в λ -режиме. Изученные реагенты обладают характерной и для других QD [10] остротой и симметричностью пиков флюоресценции без так называемых «красных хвостов», типичных для органических флюорохромов.

Сравнение различных по эмитируемому свету QD показывает, что наиболее контрастную окраску выявленных антигенов и подкрашенных ядер клеток можно получить с QD605 и красителем Hoechst 33342. Подобную картину (см. рисунок, а) можно наблюдать при использовании для возбуждения флюоресценции ртутной лампы и дихроических зеркал, пропускающих свет в диапазоне 395–440 нм в сочетании с широкополосными фильтрами, пропускающими эмитируемый свет с длиной волны более 470 нм.

Для возбуждения флюоресценции красителя Hoechst 33342 и любого из трех исследованных QD при проведении конфокальной микроскопии достаточно одного диодного лазера, излучающего свет с длиной волны 405 нм. Это обусловлено известной особенностью спектров возбуждения QD, которые несопоставимо шире спектров возбуждения органических флюорохромов [8, 9, 11] и захватывают ультрафиолетовую часть диапазона.

Таким образом, настоящее исследование подтверждает, что конъюгаты стрептавидин–QD обладают рядом преимуществ перед конъюгатами стрептавидина с органическими флюорохромами (высокая интенсивность флюоресценции, фотостабильность, расширенный диапазон возбуждения, узкий и симметричный пик эмиссии), что позволяет рекомендовать их для использования в иммуноцитохимических исследованиях. Однако выявлены и ряд недостатков (меньшая устойчивость при длительном хранении в сравнении с конъюгатами органических флюорохромов, плохая сохранность аликвот реагентов, невозможность длительного сохранения флюоресценции окрашенных препаратов при хранении,

несовместимость с рядом коммерческих сред, предназначенных для заключения препаратов), препятствующих широкому использованию нанокристаллов в иммуноцитохимии. Эти недостатки, по-видимому, связаны с несовершенством органических покрытий, а не со свойствами самих нанокристаллов, что позволяет надеяться на их устранение по мере разработки новых вариантов конъюгатов квантовых точек.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 10-04-0080а и 10-04-00676а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
2. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
3. Коржевский Д.Э. и Кирик О.В. Белки промежуточных филаментов нестин и виментин в клетках почки крысы. Морфология, 2008, т. 134, вып. 6, с. 50–54.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 76–79.
5. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
6. Плескова С.Н., Балалаева И.В., Гущина Ю.Ю. и др. Различия в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов человека при их взаимодействии с полупроводниковыми квантовыми точками. Морфология, 2009, т. 135, вып. 3, с. 47–49.
7. Bodo J., Durkin L. and Hsi E. Quantitative in situ detection of phosphoproteins in fixed tissues using quantum dot technology. J. Histochem. Cytochem., 2009, v. 57, № 7, p. 701–708.
8. Chen H., Xue J., Zhang Y. et al. 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. Histol., 2009, v. 40, № 4, p. 261–268.
9. Drbohlavova J., Adam V., Kizek R. and Hubalek J. Quantum dots — characterization, preparation and usage in biological systems. Int. J. Mol. Sci., 2009, v. 10, p. 656–673.
10. Jayagopal A., Yan R.S., Blakemore J.L. et al. Quantum dot mediated imaging of atherosclerosis. Nanotechnology, 2009, v. 20, № 16, 165102, p. 1–11.
11. Wu Y., Lopez G.P., Sklar L.A. and Buranda T. Spectroscopic characterization of streptavidin functionalized quantum dots. Anal. Biochem., 2007, v. 364, № 2, p. 193–203.
12. Xing Y., Chaudry Q., Shen C. et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. Nat. Prot., 2007, v. 2, № 5, p. 1152–1165.

Поступила в редакцию 16.12.09

APPLICATION OF SEMI-CONDUCTING NANOCRYSTALS (QUANTUM DOTS) IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY

D.E. Korzhevskiy, Kirik O.V., Ye.G. Sukhorukova and A.V. Giliarov

Semi-conducting nanocrystals represent a new class of fluorescent inorganic objects which have a promising perspective for the application in biology and medicine. The aim of the current work was a determination of advantages and shortcomings of quantum dots (QD) application in immunocytochemistry. It was shown that streptavidin–QD conjugates have more advantages (i.e. high intensity of fluorescence, photostability, wide excitation range, short and symmetric emission range) as compared to

streptavidin conjugates with organic fluorochromes. This allows to recommend the use of QD in immunocytochemical studies. However, there are several disadvantages (like lower stability during long-term storage as compared to that one of organic fluorochrome conjugates, poor safety of aliquots, impossibility of long-term preservation of fluorescence of stained sections during their storage, incompatibility with several commercial mounting media) that limit the widespread application of nanocrystals in immunocytochemical studies

Key words: *immunocytochemistry, quantum dots, fluorescence, confocal microscopy*

Laboratory of the Functional Neuromorphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg