

**ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ НАНОКРИСТАЛЛЫ
(КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ) В БЕЛКОВЫХ БИОЧИПАХ**© 2011 г. В. А. Олейников[#]*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 11.08.2010 г. Принята к печати 23.08.2010 г.

Понимание биологических процессов в клетках, тканях и организмах требует идентификации и анализа множества биологических объектов, механизмов их действия и регуляции. Технология биологических чипов (биочипов) является одним из наиболее эффективных инструментов, способных решить эту проблему. Биочипы обладают высокой производительностью и способны одновременно количественно регистрировать в мультиплексных тестах присутствие сразу многих молекул, содержащихся в микрообъемах. Биочипы позволяют проводить параллельный геномный или протеомный анализ здоровых или измененных болезнью тканей и клеток, выполнять сравнительный анализ, выявляя изменения, связанные с заболеванием. Для считывания сигнала с биочипов обычно используют органические красители, недостатком которых являются низкие фотостабильность и яркость и, кроме того, наличие флуоресцентного фона. Недавно показано, что использование полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек) позволяет снять эти ограничения. Благодаря высокой яркости квантовые точки в форме коллоидных нанокристаллов (КТ) легко регистрируются как индивидуальные объекты с помощью обычного микроскопического оборудования; они чрезвычайно устойчивы к фототушению; обладают уникальными возможностями для мультиплексирования. КТ – идеальные флуорофоры для создания систем считывания информации с биочипов, позволяющие достичь чувствительности обнаружения на уровне единичных молекул.

Настоящая работа направлена на развитие подходов к применению КТ в детектирующих системах на основе биочипов. Продемонстрированы возможности применения КТ как в планарных (плоских или матричных) биочипах, так и в интенсивно развивающейся технике суспензионных (или жидких) биочипов. Последние получают все большее применение в аналитических системах для одновременной идентификации множества объектов протеомики, геномики, в оценке возможностей лекарственных соединений и в клинической диагностике. Основой этих систем являются спектрально кодированные элементы (обычно полимерные микросферы). Преимущества жидких биочипов (по сравнению с матричными плоскими твердотельными биочипами) определяются их свободой перемещения по всем трем координатам. Использование органических флуорофоров позволяет реализовать лишь ограниченное число кодов, т.е. одновременно анализируемых объектов (мультиплексность). Применение полупроводниковых КТ дает возможность не только существенно увеличить мультиплексность биочипов, но и улучшить их фотостабильность и чувствительность. Кроме того, использование в жидких биочипах эффекта FRET (Ферстеровский резонансный перенос энергии) позволяет повысить специфичность детекции. Отсутствие фонового сигнала от несвязанных с микрочастицами флуоресцентных меток увеличивает чувствительность анализа, что также повышает возможности мультиплексного анализа и диагностики.

Таким образом, комбинация техники биочипов и полупроводниковых КТ позволяет увеличить чувствительность метода и существенно повысить число детектируемых объектов (степень мультиплексности). Такая комбинация должна обеспечить существенный прорыв в решении задач протеомики, в частности при разработке новых лекарственных препаратов, в клинической диагностике, при идентификации молекулярных маркеров, понимании внутриклеточных механизмов.

Ключевые слова: протеомика; микрочипы; биочипы; квантовые точки; флуоресценция; проточная цитометрия; микроспектроскопия; диагностика.

Сокращения: КТ – квантовые точки в форме коллоидных нанокристаллов; FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии.

[#]Автор для связи (тел.: (495) 330-59-74; эл. почта: voleinik@mail.ru).

Введение

Одним из значительных событий девяностых годов прошлого века стало создание нового класса флуорофоров, основанных на использовании квантовых точек в форме коллоидных нанокристаллов (КТ). Благодаря своим уникальным характеристикам они сразу привлекли внимание специалистов самых разных областей. Прогнозы развития приложений КТ предрекали их быстрое внедрение в электронику (элементы памяти, оптоэлектронные переключатели, дисплеи), оптику (преобразователи световой энергии, лазеры), биологию и медицину (флуоресцентные метки, пробы, сенсоры, инструменты для диагностики).

Принципиальным свойством КТ является возможность получения флуоресценции любого наперед выбранного цвета (длины волны эмиссии) при возбуждении КТ всех цветов единым источником возбуждения. Эти возможности легли в основу разработок систем одновременной детекции сразу множества параметров исследуемого образца. В биологических приложениях это вылилось в развитие мультиплексных методов детекции, предназначенных для многопараметрического анализа состава и/или функциональных свойств биологических объектов. В частности, при создании белковых биочипов для решения задач протеомики.

Благодаря высокой производительности белковые биочипы находят все более широкое применение в протеомике [1–4]. Использование биочипов позволяет одновременно получать информацию о множестве белков и пептидов. Эта способность позволяет проводить очень быстрое определение профиля белков и пептидов и сравнительный анализ сразу нескольких физиологических состояний, например здоровых, больных и находящихся в процессе лечения [5].

Развитие технологий микрочипов было феноменально за прошлые несколько лет. К настоящему времени они стали стандартными инструментами научных исследований и ряда клинических приложений. Причина этой популярности состоит в том, что биочипы революционизировали подход к биологическому исследованию благодаря своему мультиплексному потенциалу. Биочипы позволяют получить количественные данные, требуя минимального потребления пробы и реактивов из-за своих миниатюрных размеров.

Кроме прямого определения белково-пептидного состава, белковые биочипы обеспечивают информацию о посттрансляционной модификации белков и уровне активности белков, связанной, например, с их фосфорилированием. Они позволяют идентифицировать белки, специфически взаимодействующие друг с другом, даже если один компонент неизвестен. Для этих случаев разработаны методы идентификации связывающихся с чипом молекул с помощью масс-спектрометрии. На белковых биочипах, содержащих

иммобилизованные ферменты, проводят кинетический анализ их субстратов и ингибиторов [6].

Функциональные белковые микрочипы используются для идентификации мишеней различных лекарственных агентов [7], для оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях, для изучения взаимодействий белков [8, 9] и сигнальных путей [10, 11], биохимической активности и иммунного ответа [12, 13]. Биочипы открывают огромные возможности в диагностике [14–19]. В частности, созданы и производятся белковые биочипы для одновременного определения нескольких маркеров онкологических заболеваний [20, 21]. В наиболее масштабных проектах охватываются все протеомные белки, характерные для данного организма, и изучается их связывание с другими белками, лигандами, липидами, ДНК [2, 3, 22]. Кроме того, разрабатываются биочипы для гликобиологии [23].

В основе принципа действия биочипов лежит способность биологических молекул к молекулярному узнаванию (высокоспецифичному избирательному связыванию с другими молекулами). Исходно технология биочипов развивалась для анализа нуклеиновых кислот. Молекулярное узнавание в них обуславливалось комплементарным связыванием. Но, если молекулы ДНК или РНК представляют собой сравнительно однородные цепи, состоящие из нуклеотидов четырех типов, а правила специфического распознавания комплементарных цепей относительно просты, то полипептидные цепи строятся из 20 разных аминокислот (не считая многочисленные посттрансляционные модификации аминокислот), а правила пространственного молекулярного узнавания весьма сложны [4, 22].

Высокой селективностью к связыванию белков обладают антитела, поэтому в белковых биочипах, в основном, используется взаимодействие антител с антигенами. Анализ белков обычно проводится в формате сэндвич-метода (рис. 1). Сначала детектируемый объект (например, антиген) специфично связывается с зондом (антителом), локализованным на поверхности биочипа. Затем, образующийся комплекс «проявляется» с помощью других антител, сконъюгированных с метками (обычно флуоресцентными) – сигнальными флуорофорами [15].

К настоящему времени в решении задач протеомики для детекции, визуализации и количественной характеристики биологических проб наиболее популярны два подхода: основанные на использовании матричных (планарных или плоских) биочипов [4, 24–26] или суспензионных или жидких микрочипов (микросфер с иммобилизованными зондами) [27–43]. Хотя матричные биочипы уже показали свои возможности и продолжают быть фактически главными при выполнении высокоинформативного скрининга, обе категории чипов демонстрируют свои преимущества в разных приложениях.

Матричные (плоские) микрочипы

Принцип действия матричных биочипов основан на параллельном селективном связывании детектируемых объектов, находящихся в растворе, с множеством различных зондов, иммобилизованных в разных элементах (ячейках) биочипа. При этом все объекты могут быть идентифицированы в одном эксперименте. В матричных биочипах идентификации проводятся, главным образом, по пространственному расположению зондов, обычно организованных в двумерные сетки (матрицы), но все большее распространение получают комбинированные подходы, в которых, наряду с пространственным положением, применяются также методы индивидуального мечения, например флуоресцентными метками разных цветов.

В настоящее время широко применяются белковые биочипы двух типов: аналитические и функциональные. Аналитические биочипы используются, чтобы профилировать сложную смесь белков для определения количества (уровня экспрессии) определенного белка в смеси. Каждый элемент биочипа содержит определенный зонд (обычно антитело), связывающий целевой объект (белок или полипептид) из пробы. Акт взаимодействия выявляется последующей обработкой поверхности микрочипа маркированными антителами, специфичными для того же самого белка. Этот тип анализа особенно подходит для сравнения белковых профилей (например, содержание определенных белков и их фосфорилированных форм) здоровых и больных доноров в пораженных клетках и тканях [44].

Функциональные биочипы отличаются от аналитических тем, что их распознающие элементы формируются из полноразмерных функциональных белков или белковых доменов. Биочипы этого типа используются для изучения биохимической активности протеома, включая белок-белковые взаимодействия, взаимодействия белков с ДНК, РНК, небольшими молекулами (например, лекарственными агентами) или фосфолипидами [45, 46].

Хотя первые эксперименты по применению белковых биочипов на основе антител были сделаны в области диагностики, их главная прикладная цель – протеомные исследования. Центральная задача протеомных исследований – обнаружение и идентификация белков и пептидов в протеоме, функциональный анализ белков и профили экспрессии белков в клетках, определение уровня фосфорилирования, поскольку оно регулирует многие процессы в клетках.

Сравнение результатов анализов, выполненных с использованием белковых биочипов, с данными иммунофлуоресцентного анализа, или методики «Элиспот» (от англ. “ELISA” – enzyme-linked immunosorbent assay), показывает, что чувствительность современных белковых биочипов примерно на два порядка выше [3].

В отличие от ДНК-биочипов, содержащих огромное число зондов (например, микрочипы Affimetrix содержат 400000 типов зондовых олигонуклеотидов на 1.6 см^2 [47], а NimbleGen, – 2.1 миллиона зондов на чипе), число элементов в белковых биочипах существенно меньше (например, биочипы Maguarray® содержат 624 антитела, 208 различных антител в трех экземплярах).

Изготавливаемые в настоящее время белковые биочипы имеют размер меньше 1 см^2 и содержат порядка 1000 белковых зондов. В некоторых случаях количество зондов достигает 10000. Однако известно, что число белков и пептидов в протеоме > 100000 . Это определяет потребность в биочипах с большей плотностью упаковки элементов (> 10000 на чип) [48]. С этой целью развиваются нанотехнологические подходы, например на основе нанопроточных устройств [49], нанолитографии [50] и микроконтактной печати. Выбор подхода зависит от нескольких факторов: свойства подложки и пробы, метода формирования микроэлементов биочипа и метода детекции. В настоящее время для детекции применяют, в основном, флуоресцентный метод. В качестве флуоресцентных маркеров широко используются органические красители, однако все большее внимание привлекают неорганические флуорофоры: частицы металлического золота, магнитные или кварцевые наночастицы [51] и квантовые точки в форме коллоидных нанокристаллов (КТ) [52–55].

Использование флуоресцентных меток разных цветов (спектральное кодирование) позволяет детектировать на одном элементе биочипа сразу несколько объектов. Такие биочипы со спектральным кодированием за счет увеличения плотности зондов способны анализировать большее количество объектов при том же размере биочипа. Развитию этого подхода препятствуют два момента: (1) ограничения, вызываемые несовершенством органических флуорофоров, и (2) отсутствие подходящих регистрирующих систем.

До недавнего времени в системах регистрации многоцветных изображений использовались RGB-камеры (красный/зеленый/синий) [56], которые не позволяют отличить чистый желтый цвет от желтого, образованного в результате смешивания зеленого и красного, удалить автофлуоресценцию подложки, разрешить спектрально перекрывающиеся компоненты, обеспечить цифровое считывание информации [56].

Принципиально изменило ситуацию появление так называемых гиперспектральных систем или систем визуализации с разрешением по длинам волн, в которых от каждой локальной области образца записывается спектр флуоресценции. По существу, гиперспектральные системы записывают сразу множество изображений, соответствующих разным длинам волн. Это позволяет выявлять разницу между двумя изображениями, записанными при близких длинах волн испускания. Например, желтая эмиссия может быть дифференцирована на зеленую и красную составляющие. Возможность спектрального

анализа сигнала от каждой точки изображения делает такие системы многообещающими для мультиплексного анализа при их применении в системах считывания информации с матричных микрочипов [56]. Такая система для анализа сигналов от белковых микрочипов была описана в работе [57].

Второе ограничение преодолевается использованием нового класса флуорофоров – полупроводниковых флуоресцентных коллоидных нанокристаллов (квантовых точек) [58].

Квантовые точки – новый класс флуорофоров. Оптические и физико-химические свойства. Преимущества и ограничения

Квантовые точки – это физические объекты, в которых благодаря эффекту пространственного ограничения носителей зарядов проявляются квантовые свойства [54, 55, 59, 60] (рис. 2). Наиболее существенным является формирование флуоресцентных уровней, длина волны эмиссии флуоресценции определяется размером области пространственного ограничения, а следовательно, размером квантовой точки. Принципиальной в плане развития множества различных приложений квантовых точек стала разработка методов синтеза квантовых точек в виде коллоидных нанокристаллов (КТ), гомогенных по форме и размерам [52, 53, 61, 62].

Полупроводниковые КТ обычно синтезируют из элементов групп II–VI или III–V периодической таблицы, например: CdSe, CdTe или InAs. Для повышения эффективности флуоресценции обычно применяют КТ-структуры ядро/оболочка, в которых флуоресцирующее полупроводниковое ядро (например, из CdSe) покрывают оболочкой из другого полупроводника с более широкой запрещенной зоной (например, CdS или ZnS). Введение оболочки значительно улучшает флуоресцентные свойства КТ и их химическую устойчивость. Наиболее часто используемые сегодня нанокристаллы состоят из CdSe-ядра, покрытого ZnS-оболочкой, что определяется их высокой яркостью и высокими фото- и химической стабильностью.

Варьируя размер ядра КТ, можно «настроить» нанокристаллы на эмиссию флуоресценции любого цвета оптического диапазона. Важно, что КТ любого цвета поглощают свет в широкой области спектра, включая УФ, преобразуя его во флуоресцентное излучение строго заданной длины волны [63]. Спектральные линии эмиссии КТ симметричны, их ширина на полувысоте составляет обычно 25–30 нм [64]. Возможность возбуждать КТ различных диаметров (различных цветов флуоресценции) светом одной длины волны открывает уникальные возможности для мультиплексирования. Кроме того, поверхностная химия нанокристаллов развита и позволяет формировать покрытия, содержащие функционализированные

поверхностные слои для присоединения к ним биологических молекул и обеспечивающие биосовместимость нанокристаллов. В целом, это определяет потенциал применения КТ в биологии и медицине [54, 55, 65–68].

По сравнению с органическими красителями, традиционно используемыми для маркировки биологических молекул [69], полупроводниковые КТ обладают рядом принципиальных преимуществ [70] (таблица).

Ключевой параметр в плане чувствительности метода – яркость метки, определяется квантовым выходом флуорофора и коэффициентом экстинкции (молярного поглощения). Поскольку КТ имеют примерно тот же квантовый выход, что и органические красители (50–70%), но намного большие коэффициенты экстинкции, их яркость в 20–40 раз выше. Это дает возможность создавать системы с чувствительностью, позволяющей регистрировать единичные объекты (молекулы) и гарантировать их детекцию на фоне автофлуоресценции клеток, тканей и подложек биочипов. Высокая яркость КТ позволяет снизить количество флуоресцентных меток и, тем самым, ограничить неспецифичное связывание, вероятность которого возрастает с ростом концентрации конъюгатов КТ с флуорофорами, используемыми при регистрации на биочипах [71]. Кроме того, принципиально важным параметром является высочайшая фотоустойчивость КТ (они более чем в 400 раз устойчивее лучших из органических красителей) [72]. Это свойство позволяет увеличить интенсивность возбуждения для повышения чувствительности метода, использовать методики накопления сигнала, выжигать автофлуоресценцию обработкой биочипов светом высокой интенсивности.

Недостатком органических красителей является наличие в их спектрах эмиссии длинноволнового хвоста, который простирается далеко в красную область, обуславливая наложение сигналов от разных флуорофоров. Это ограничивает число цветов меток для мультиплексной детекции (обычно не более четырех). Кроме того, возбуждение разных красителей требует применения разных источников света, настроенных на возбуждение каждого из красителей, что усложняет систему детекции и не позволяет разработать недорогие варианты оборудования.

В противоположность органическим красителям, КТ идеальны для мультиплексного анализа. Как уже было отмечено, КТ всех цветов можно возбудить одним источником света. Пики эмиссии КТ узкие и симметричные, что до минимума снижает вероятность наложения сигналов от КТ разных цветов и не требует компенсационных поправок, связанных с паразитным засвечиванием соседних каналов регистрации. Кроме того, большой Стоксов сдвиг (разность между длинами волн излучения и возбуждения) позволяет возбуждать КТ далеко от положения пика эмиссии, например в УФ-области, снижая тем самым фон от

автофлуоресценции (известно, что автофлуоресценция не возбуждается при облучении УФ-светом).

Тем не менее, наряду с перечисленными достоинствами, определяющими перспективность применения КТ в многоцветном мечении, ряд особенностей КТ требуют их дальнейшего усовершенствования. Размер и стабильность КТ сильно зависят от выбора компонентов ядра/оболочки и стратегии их функционализации. "Идеальные" КТ должны быть полностью устойчивы в органической жидкости в широком диапазоне pH и настолько малы, насколько это возможно. Однако существующие стратегии получения КТ требуют формирования вокруг полупроводникового ядра дополнительной органической оболочки, обеспечивающей повышение стабильности КТ, что увеличивает их размер до 20 нм или даже больше.

Дальнейшее развитие методов изготовления КТ должно оптимизировать компромисс между стабильностью КТ и их размером, чтобы формировать флуоресцентные нанокристаллы минимального размера, но достаточно устойчивые в биологических жидкостях и тканях. Кроме того, интенсивность флуоресценции единичной КТ беспорядочно изменяется (эффект blinking – мигание). Такое «мигание» связано с тем, что электроны или дырки периодически удерживаются на поверхностных дефектах в кристаллической структуре КТ, что препятствует их излучающей рекомбинации и, следовательно, эмиссии флуоресценции КТ. Поверхностным пассивированием КТ или внедрением КТ в полимерную матрицу удастся существенно уменьшить эффект мигания. Такой подход делает единичные КТ уникальным источником излучения молекулярного размера (2–10 нм) [73].

Квантовые точки в матричных биочипах

Использование квантовых точек в качестве меток в биочипах относительно ново. Тем не менее в ряде исследований уже продемонстрированы их преимущества и проанализированы ключевые проблемы применения КТ, сформулированы основные требования к свойствам КТ, необходимые для их корректного использования в биочипах.

Для белковых биочипов выбор метода флуоресцентного мечения полупроводниковыми нанокристаллами является нетривиальной задачей. Поскольку оптические свойства КТ зависят от характера и числа лигандов, связанных с поверхностью нанокристаллов, эти параметры должны тщательно контролироваться на этапах конъюгации и солубилизации в процессе приготовления КТ. Кроме того, должны тщательно подбираться функциональные свойства поверхностных лигандов, определяющих поведение нанокристаллов в растворе.

Так, авторы работы [57] для того, чтобы снизить влияние окружения на свойства КТ и уменьшить вероятность их неспецифичного связывания с зондами в белковых биочипах, солюбилизировали и функционализировали КТ полимерами на основе полиэтиленгликоля.

В работе [74] продемонстрировано, что число функционально активных антител, способных связываться с целевым белком, намного меньше количества антител, локализующихся на поверхности нанокристаллов. Было проведено сравнение числа функционально активных антител в двух распространенных моделях маркировки белка нанокристаллами: непосредственное присоединение антител к нанокристаллам или присоединение через пару стрептавидин/биотин. Показано, что лишь немногие антитела остаются функционально активными при использовании коммерческого метода непосредственного связывания, в то время как покрытые стрептавидином нанокристаллы, инкубируемые с биотинилированными антителами, позволяют присоединить существенно большее количество антител (в 10–20 раз), при сохранении их функциональных свойств [74].

Хотя использование системы стрептавидин/биотин вовлекает дополнительный шаг при подготовке метки, а также дополнительно увеличивает размер комплекса, что предполагает потенциальное уменьшение способности связывать исследуемые белки за счет стерических ограничений, они хорошо обнаруживаются на белковых биочипах [15]. Показано, что при использовании системы стрептавидин/биотин интенсивность флуоресценции почти в 30 раз выше.

Один из важнейших моментов применения КТ в матричных биочипах для мультиплексного анализа – получение специфичного, количественного сигнала. Недавнее исследование демонстрирует, что белковые микрочипы с регистрацией на основе КТ способны специфично детектировать один цитокин среди шести подобных при концентрациях на уровне 10^{-9} М с использованием нанокристаллов, покрытых стрептавидином [15]. В работе [75] реализована схема, в которой использование КТ позволило выполнить точное, воспроизводимое, количественное измерение концентрации белка в необработанном клеточном лизате с чувствительностью 1 пМ.

Кроме того, авторы работы [57] продемонстрировали долговременную устойчивость проб на основе КТ. Показано, что пробы могут быть использованы по крайней мере после 6 месяцев их хранения. Тем не менее отмечены некоторые изменения оптических свойств КТ во времени, в частности, смещение пика эмиссии в синюю область, что, по-видимому, связано с изменениями геометрии КТ.

Системы на основе суспензий кодированных микрочастиц (жидкие микрочипы)

Как уже было сказано, плоские матричные биочипы представляют собой двухмерные сетки из зондов, позволяющие идентифицировать детектируемые объекты в соответствии с пространственным положением зондов. Хотя матричные биочипы и определили главный прорыв в высокоэффективном мультиплексном анализе, качество результатов и скорость, с которыми эти результаты могут быть получены, строго ограничены свойствами плоской поверхности. Большинство проблем, связанных с матричными биочипами, являются следствием того факта, что все молекулы должны быть присоединены к поверхности чипа при одних и тех же условиях, используя одинаковую поверхностную химию, которая не может быть подходящей для них всех. Поскольку планарные чипы производятся по технологии «сверху-вниз»: фотолитографией или автоматизированным (робототехническим) формированием элементов (ячеек), количество одновременно формируемых чипов весьма ограничено. Распознающие молекулы должны присоединяться к каждому элементу матричного биочипа индивидуально. Кроме того, такие биочипы являются негибкими, что налагает определенные ограничения для пользователя.

На основе матричных биочипов хорошо реализовано главное достоинство биочипов – возможность выполнить параллельно тысячи индивидуальных тестов. Однако недавно появилась альтернативная возможность использования нового класса биочипов на основе суспензий кодируемых микроносителей (суспензионных микрочастиц или жидких биочипов) [76–80]. Этот подход основывается на использовании спектрально кодируемых микросфер (например, полимерных) с локализованными на их поверхности зондами (рис. 3). По существу, каждая микросфера является элементом биочипа, распознаваемым по спектральному коду и несущим на своей поверхности зондовую молекулу в соответствии со своим кодом.

Жидкие биочипы имеют существенные преимущества перед матричными как по способу их изготовления, так и по особенностям использования.

Распознающие молекулы (зонды) могут быть присоединены к миллионам микросфер. Но при этом каждый тип молекул может связываться с поверхностью микрочастицы по индивидуальному, оптимальному протоколу. Поскольку каждая микросфера несет в себе индивидуальный код, это позволяет идентифицировать зонд, присоединенный к ее поверхности и, следовательно, регистрировать тот детектируемый объект, на идентификацию которого направлен данный элемент чипа [81].

В отличие от элемента матричного биочипа, кодированная микрочастица может двигаться в растворе в любом направлении, что снимает диффузионные ограничения, присущие плоским системам, улучшает кинетические свойства и дает возможность сепарации микрочастиц [81].

В то время как матричные биочипы используют позиционное кодирование, схема которого не может быть изменена в ходе исследования, для жидких биочипов характерны гибкие схемы. Формируя тестовые растворы из различных микросфер, можно легко оптимизировать систему под условия конкретного эксперимента или схемы диагностики [82].

Метод позволяет использовать для определенного зонда сразу несколько микрочастиц с различными кодами, что позволяет улучшить условия статистической обработки и повысить достоверность анализа.

Для кодирования жидких биочипов используют ряд методов: спектрометрический [27–34]; графический [35–39]; электронный [40, 41, 83]; физические методы [42, 43]; комбинации нескольких методов, подобно очень эффективному непрерывному проточному литографическому подходу [84].

При этом под термином «спектрометрический» понимают целую серию методов, основанных на введении в микрочастицы флуорофоров [27–30], хромофоров [31], специфичных фотонных структур [32], или меток, дающих интенсивный спектр комбинационного рассеяния [33, 34].

Большинство жидких биочипов, описанных в литературе, формировали из полимерных микросфер с включением в них одного или двух флуоресцентных красителей. Полистирольные микросферы помещали в органический растворитель для создания в них пор и путем диффузии вводили в них молекулы красителя. Перенос микросфер в водный раствор приводил к сжатию полимера и фиксации молекул красителя в микросферах. Внедрение красителей разных цветов флуоресценции и с различными концентрациями (различными уровнями интенсивности флуоресценции) позволило формировать микросферы с уникальными спектральными кодами. Теоретически доступное число кодов определяется числом включенных в полимерные микросферы разных красителей и уровней интенсивностей флуоресценции согласно уравнению

$$C = N^{m-1}, \quad (1)$$

где C – число теоретически обнаружимых кодов, N – число уровней интенсивности и m – число цветов флуоресценции.

Так называемая xMAP-технология жидких чипов, развитая корпорацией Luminex, основана на использовании полимерных микросфер диаметром 5.6 мкм, кодируемых двумя органическими красителями (длины волн эмиссии 658 и 712 нм) при десяти различных уровнях интенсивности флуоресценции, что дает до 100 теоретически доступных кодов [85, 86]. К микросфере с каждым индивидуальным кодом присоединяются определенные распознающие молекулы (зонды), определяющие специфичность каждого элемента биочипа в мультиплексном тесте. В растворе, содержащем пробу, присутствует конъюгат с сигнальной молекулой красителя (фикоэритрин). Только в случае появления в пробе детектируемого объекта образуется комплекс: кодированная микросфера/детектируемый объект/конъюгат с фикоэритрином. Последний дает сигнал об образовании комплекса и, следовательно, о наличии в растворе детектируемого объекта.

Система требует использования двух источников возбуждения: одного для возбуждения кодирующих красителей и второго для сигнального флуорофора. Несмотря на то что на практике уровень мультиплексности, достигнутый при таком подходе, значительно ниже теоретически предсказанного, эта система успешно использовалась в широком диапазоне исследований, включая детекцию цитокинов [87], вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита В [88], точечных нуклеотидных полиморфизмов [89], тесты на киназу [90], тесты на аллергию [91], диагностику инфекционных заболеваний [92], обнаружение агентов биологического оружия [93].

Фирма «Becton Dickinson Biosciences» представила на рынок систему с одним красителем (BD Cytometric Array), основанную на использовании полимерных микросфер диаметром 7.5 мкм [94, 95]. Система включает большое количество мультиплексных иммунологических тестов, но максимальный уровень мультиплексирования не достигает 10.

В действительности теоретическое число спектрально различимых кодов ограничено многими экспериментальными факторами, включая совместимость красителей с растворителями, обеспечивающими формирование пор в полимерных частицах, воспроизводимость процесса введения флуорофора в полимерные матрицы и т.д., требующими строгого контроля большого числа экспериментальных параметров.

Подготовка микросфер, оптически кодируемых флуоресцентными красителями, становится все более трудной задачей с ростом числа красителей и градаций их концентраций. Небольшие вариации в диаметре и составе микросфер искажают процесс введения флуорофора в полимер. Введение нескольких красителей с различными длинами волн возбуждения требует использования нескольких лазеров, что увеличивает стоимость инструмента. Наложение спектров эмиссии и возбуждения провоцирует безызлучательный

перенос энергии между молекулами красителей, примененных для кодирования, что усложняет кодировку.

Перечисленные проблемы свойственны системам, основанным на использовании органических красителей. Полимерные микросферы, кодированные органическими флуорофорами, дают ограниченное число уникальных кодов [96].

Ситуация изменяется принципиально при использовании в качестве флуорофоров полупроводниковых КТ. Как уже указывалось, флуоресцентные КТ обеспечивают уникальные преимущества перед органическими красителями в скрининге высокой производительности, включая по крайней мере в 20–40 раз более высокую яркость и на порядки более высокую фотостабильность [55, 62, 72]. Принципиальным является то, что КТ имеют широкие спектры поглощения, что позволяет возбуждать разные КТ одним общим источником возбуждения с длиной волны, далеко отстоящей от длины волны эмиссии КТ, что улучшает условия мультиплексирования. В настоящее время наиболее часто используемыми для формирования оптически кодированных микросфер являются нанокристаллы из CdTe или нанокристаллы структуры ядро/оболочка с ядром из CdSe и оболочкой из ZnS.

Приготовление жидких микрочипов. Оптическое кодирование

Введение КТ в микрочастицы для их кодирования является критическим шагом при подготовке ярких, гомогенных и биологически совместимых частиц, подходящих для высокопроизводительной детекции и диагностики. Введение КТ может быть выполнено по трем основным технологиям: (1) введением в готовые полимерные микрочастицы после увеличения пор в полимере за счет его набухания в органическом растворителе [30, 97–99]; (2) внедрением КТ в полимерную матрицу микрочастицы в процессе ее синтеза [100, 101]; (3) формированием концентрических оболочек, содержащих КТ [102–105].

Хотя эти методологии известны и использовались для кодирования микросфер органическими красителями, существенные отличия в размерах и химических свойствах поверхности КТ превращают эту процедуру в нетривиальную задачу.

Введение КТ в предварительно сформированные микрочастицы

Работа [30] была первой, в которой готовые полистирольные микросферы кодировались прямым внедрением в них КТ. Для этого микросферы выдерживали в смеси хлороформ/спирт, что вызывало увеличение объема полимера (набухание) и появление в нем пор. Гидрофобные CdSe/ZnS-КТ проникали в поры и, после перевода суспензии в водную

фазу, фиксировались в них. На примере внедрения КТ одного цвета было продемонстрировано, что флуоресценция единичной микросферы пропорциональна числу введенных КТ. Внедрение КТ трех цветов позволило получить спектр флуоресценции микросфер, в котором длины волн эмиссии каждого из цветов были идентичны значениям, полученным от тех же КТ в несвязанной форме в неполярном растворителе.

Используя модифицированную процедуру, авторы работы [97] вводили гидрофильные CdSe/ZnS-КТ в обработанные изопропанолом полистирольные латексные микросферы с карбоксильными поверхностными группами. Предложенный метод позволил получить гомогенные, ярко флуоресцирующие микросферы с разбросом размеров <5% даже в тех случаях, когда использовались полимерные микрочастицы субмикронного размера. Яркость единичных микросфер, содержащих КТ, по крайней мере в 100 раз выше яркости индивидуальных КТ. Трехмерная конфокальная микроскопия с реконструкцией флуоресцентного изображения полистирольных микросфер показала фактически гомогенное распределение интенсивности флуоресценции, что доказывает высокое качество внедрения и отсутствие заметных (> 200 нм) областей, не содержащих КТ.

Аналогичные процедуры были использованы в работах [98, 99] для приготовления спектрально кодированных микросфер из этилцеллюлозы и полиакролеина. Последние привлекательны тем, что несут на поверхности альдегидные группы, позволяющие проводить конъюгацию с биологическими молекулами в мягких условиях, что несомненно важно в биологических приложениях метода.

Введение КТ в процессе формирования микрочастиц

Непосредственное внедрение КТ в микрочастицы в процессе полимеризации может быть выполнено с использованием, по крайней мере, двух методологий. Согласно первой, микрочастицы формируются из ядер, диспергированных в среде, содержащей мономер, инициатор и КТ, с поверхностью, модифицированной так, чтобы придать им способность диспергировать в этой среде и связываться с полимером. Исследование сформированных по этой методике микросфер показало [100], что КТ распределяются по полимеру однородно, но размер микросфер получается меньше, а распределение по размерам шире, чем у микросфер, сформированных без КТ.

Другой путь, основанный на мини-эмульсионной полимеризации коллоидных частиц с внедрением в полимерную матрицу КТ, предложен в работе [101]. Процесс включал диспергирование мономеров стирола с гидрофобным КТ в водной среде в присутствии ПАВ. Полученные микросферы содержали КТ, распределенные по всему объему микрочастиц,

однако в них явно выражена тенденция КТ к формированию агрегатов, что было приписано разделению фаз смеси в процессе полимеризации.

Результаты работ [100, 101] позволяют заключить, что эти пути проблематичны для кодирования.

Формирование оболочек, содержащих КТ

Способ создания флуоресцентных микросфер путем формирования концентрических оболочек, содержащих одноцветные КТ, был использован в работах [102–105]. В основу подхода была положена техника послойного осаждения полиэлектролитов чередующихся зарядов и водорастворимых CdTe-КТ, испускающих в видимом диапазоне. Слои последовательно осаждались на поверхность полимерных микрочастиц и фиксировались на ней за счет электростатических взаимодействий. В тех случаях, когда исходную микрочастицу удаляли, таким образом формировались флуоресцентные полые полимерные капсулы [105].

В работах [105, 106] техника послойного осаждения полиэлектролитов использовалась для внедрения КТ двух разных цветов, с разными соотношениями интенсивности флуоресценции. Использование КТ, испускающих в инфракрасной области, для флуоресцентной маркировки микрокапсул демонстрировалось в работе [107]. Позднее [108] было показано, что микросферы, приготовленные по технике послойного осаждения с внедрением CdSe/ZnS-КТ в многослойную оболочку, весьма перспективны для применения в клинической протеомике, например при определении профиля аутоантител в клинических образцах при диагностике раковых заболеваний.

Считывание данных с жидких биочипов

Принцип действия жидких биочипов предполагает, что каждый элемент (каждая кодированная микрочастица) должен анализироваться индивидуально. Практически лишь два подхода позволяют считывать и расшифровывать флуоресцентные коды жидких биочипов: (1) проточная цитометрия; (2) оптическая микроспектроскопия.

Проточная цитометрия

Проточные цитометры измеряют флуоресценцию и определяют число флуоресцентно-маркированных объектов, проходящих в потоке жидкости через анализируемый объем. Для возбуждения используется один или несколько лазеров. Для снижения фонового сигнала лазеры фокусируются на очень маленький объем. Датчики – обычно фотоумножители, способны обнаружить до 100 флуоресцентных молекул на

частицу. По интенсивностям сигналов прямого и бокового упругого рассеяния света от каждой частицы определяют их размер и форму. Сигнал флуоресценции разделяется по спектральным составляющим на несколько каналов и анализируется. В целом, данные о рассеянии и флуоресценции каждой частицы, запоминаются регистрирующей системой и могут быть классифицированы и проанализированы по всем доступным параметрам. Лучшие инструменты оборудованы несколькими лазерами возбуждения и датчиками, которые могут обнаружить сигналы рассеяния и флуоресценции до 18 цветов от тысяч частиц в секунду.

В работе [109] показано, что в стандартном проточном цитометре микрочастицы, кодированные полупроводниковыми нанокристаллами, можно идентифицировать со скоростью 1000 частиц/с и эта скорость считывания сопоставима с достигнутой в быстросканирующей проточной цитометрии, использующей органические красители.

При типичной скорости потока 3 м/с время прохождения микрочастицей области облучения лазером (примерно 20 мкм) составляет около 7 мкс. Согласно оценке [109], за это время единичный КТ может испустить в максимуме 100–150 фотонов флуоресценции при квантовом выходе 30–50%. При полном сборе фотонов и эффективности обнаружения 1–2% за время прохождения через лазерный луч, каждая КТ дает 1–2 регистрируемых импульса. Так как для точной кодовой идентификации требуется примерно 4000–5000 импульсов, минимальное число КТ каждого цвета, внедренных в микрочастицу, должно быть не меньше 1000.

Оптическая микроспектроскопия

Информацию о каждой кодированной микросфере можно получить методами сканирующей лазерной микроспектроскопии, используя соответствующие условия возбуждения флуоресценции и анализаторы спектра эмиссии. Для этого спектрально кодированные микрочастицы осаждаются на специально подготовленную поверхность так, что каждая из них может быть проанализирована отдельно. В отличие от проточной цитометрии, где время анализа определяется временем прохождения микрочастицы в потоке через анализируемый (экспонируемый) объем, время накопления информации при использовании микроскопического метода ограничено только стабильностью флуорофоров. А поскольку основой флуоресцентных микрочастиц являются полупроводниковые КТ, стабильность которых в сотни и тысячи раз больше фотостабильности лучших органических флуорофоров, время накопления спектральной информации практически неограниченно. По существу, микроскопический способ регистрации позволяет в гораздо более полной мере использовать потенциал КТ.

В работе [97] лазерная сканирующая микроскопия и уникальные параметры флуоресцентных микрочастиц, содержащих КТ (яркость и фотостабильность), использованы

для иммунодетекции и определения количества р-гликопротеина (pGP) в мембранах клеток аденокарциномы MCF-7г с множественной лекарственной устойчивостью. Клетки были обработаны первичными анти-рGP-антителами, а затем вторичными, сконъюгированными с микрочастицами диаметром 0.3 мкм, содержащими CdSe/ZnS-нанокристаллы. На изображениях, полученных с помощью рутинного эпифлуоресцентного микроскопа наблюдались единичные микросферы (рис. 4). Это показывает, что комбинация яркости микросфер и высокой селективности связывания с мишенью дает возможность снижения предела обнаружения до уровня единичных молекул антигена. Кроме того, превосходная фотостабильность микросфер на основе КТ позволяет реконструировать трехмерное распределение антигена в мембране клетки, записывая необходимое число сканов, что требует значительного времени. Развита методология приготовления флуоресцентных микросфер на основе КТ может быть легко распространена на микрочастицы с различными функциональными группами на поверхности, включая аминокислотные группы, сульфатные группы и т.д.

Жидкие микрочипы в определении профиля аутоантител

В отличие от геномики, где жидкие микрочипы получили уже довольно широкое распространение и признание [29, 30, 110], исследования по применению жидких микрочипов в протеомике находятся в начальной стадии.

Первым применением метода в клинической протеомике можно считать работу [108], в которой оптически кодированные микросферы использовали для определения профиля аутоантител в клинических образцах по диагностике системного склероза (склеродермы). На поверхность кодированных микросфер пассивной адсорбцией наносили антигены к аутоантителам, продуцируемым при склеродерме: ДНК-топоизомеразу I человека (Scl-70), рибонуклеопротеид (pRNP) или Sm-антиген. Анализ выполняли методом проточной цитометрии. Данные по светорассеянию и по флуоресценции показали, что разброс геометрических параметров микросфер и вариации интенсивности флуоресценции малы и не зависят от наличия антигена на поверхности. Показано, что никакой компенсации по флуоресцентным сигналам не требовалось. Для функциональных клинических испытаний использовались образцы сыворотки от пациентов с увеличенным уровнем аутоантител и контрольные – от здоровых доноров. Полученные по регистрации аутоантител данные были обработаны статистически на основе анализе положительных и отрицательных событий и показали практически полную корреляцию с контролем.

Биочипы с детекцией в формате FRET (Ферстеровский резонансный перенос энергии)

Уникальные свойства полупроводниковых КТ открывают еще одну возможность селективной детекции объектов в биочипах, основанную на использовании эффекта Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET – Ferster Resonance Energy Transfer) (рис. 5). В таких системах сигнальный флуорофор подбирается таким образом, чтобы излучение, возбуждающее кодирующие КТ в элементе биочипа, не возбуждало бы его эмиссии. В отсутствие детектируемого объекта, сигнальный флуорофор не связан с элементом микрочипа и не флуоресцирует. При появлении детектируемого объекта, формируется комплекс и сигнальный флуорофор локализуется вблизи элемента микрочипа. КТ в составе элемента микрочипа выступает в роли донора энергии, которая, за счет резонансного переноса, возбуждает сигнальный флуорофор. Появление линии эмиссии сигнального флуорофора в спектре является сигналом присутствия детектируемого объекта в смеси. Благодаря очень сильной зависимости эффекта от расстояния между донором и акцептором (обратно пропорционально 6-й степени расстояния), даже небольшое удаление акцептора от донора приводит к полному отсутствию флуоресценции сигнального флуорофора. Данный подход позволяет существенно снизить фоновый сигнал за счет исключения случайных совпадений и снизить вклад неспецифических взаимодействий.

Ряд свойств делает КТ практически идеальными донорами: 1. Широкий спектр поглощения КТ дает большую свободу в выборе длины волны возбуждения донора. Ее выбирают такой, чтобы непосредственное возбуждение акцептора было минимальным и наложение флуоресценции донора и акцептора было бы минимальным. 2. Возможность использовать максимальное смещение пика эмиссии акцептора от длины волны возбуждения донора (до 200 нм). Потенциально, это повышает чувствительность детекции в сложных смесях, например при анализе крови или тканей. Основной фон в таких смесях появляется из-за рассеяния или автофлуоресценции около длины волны возбуждения. Выделяя флуоресценцию только акцептора, можно ожидать большей чувствительности и простоты новых систем детекции связывания лиганд–рецептор в однородных системах по сравнению с теми, что обычно используются в анализе. 3. Спектры эмиссии КТ уже, чем у органических флуорофоров, и в них нет "хвоста", простирающегося в красную область. Таким образом, отсутствует наложение сигналов эмиссии донора и акцептора. 4. Положение полосы эмиссии КТ легко изменяется. Таким образом, легко подстроить длину волны эмиссии донора в резонанс с длиной волны возбуждения акцептора, увеличив, таким образом, эффективность передачи энергии и оптимизировав спектральное разрешение эмиссии донора и эмиттера.

В ряде исследований продемонстрирован потенциал КТ в FRET-подходе к измерению изменений в расстоянии между фрагментами, содержащими донорные и акцепторные флуорофоры [111], конформационных перестроек белка [112] и в анализе белковых взаимодействий [113, 114].

Использование системы КТ–FRET в решении задач протеомики развито в работе [108], в которой показана возможность идентификации детектируемой белковой молекулы на единичной оптически кодированной микросфере. Спектральная схема переноса энергии показана на рис. 5. Микросферы с локализованными на их поверхности молекулами антигена (ДНК-топоизомераза I человека) были кодированы CdSe/ZnS-нанокристаллами с длиной волны эмиссии 580 нм. В качестве сигнального флуорофора использован органический краситель AlexaFluor 633. Благодаря хорошему перекрытию спектров эмиссии КТ (донор) и поглощения красителя (акцептор) энергия возбуждения КТ эффективно передается на краситель при условии, что расстояние между ними не превышает 50 нм [115–118]. А поскольку в качестве селективного линкера, связывающего сигнальный флуорофор на поверхности микросферы, выступает детектируемый объект, появление пика эмиссии сигнального флуорофора свидетельствует о присутствии в пробе детектируемого объекта.

Особенностью данного подхода является то, что авторы использовали микроспектральную технику регистрации для идентификации детектируемых молекул на единичной микросфере. Показано, что для регистрации сигнала достаточно всего 30 специфично связанных с микросферой детектируемых молекул. Отсутствие флуоресцентного фона от невзаимодействующих с микросферами красителей дополнительно увеличивает чувствительность детекции и облегчает возможности мультиплексирования.

Таким образом, использование КТ в системах с FRET обеспечивает ряд существенных преимуществ перед органическими флуорофорами. Комбинация КТ и FRET открывает широкие перспективы их использования в белковых микрочипах для протеомики.

Заключение

В течение последних десятилетий возможности биочипов достигли уровня, позволяющего получать экспрессные многопараметрические данные, являющиеся основой молекулярной диагностики.

Используемые в настоящее время органические красители не вполне подходят для реализации потенциальных возможностей многопараметрического (мультиплексного) подхода. Перспективным шагом на пути развития биочипов является применение полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек) [52, 54, 55]. Этот метод флуоресцентного мечения повышает чувствительность биочипов, снижает пределы

обнаружения. Уникальные оптические свойства КТ облегчают адаптацию таких биочипов для мультиплексного анализа. Все это дает возможность не только повысить точность и сократить время анализа, но и снизить его стоимость [55, 58].

Наряду с завоевавшими общее признание матричными биочипами [4, 14], все большую популярность получают суспензионные системы для мультиплексного анализа – жидкие биочипы. Количество одновременно анализируемых объектов (уровень мультиплексирования), которое бы могло удовлетворить многие из задач, решаемых с помощью жидких биочипов, на сегодня – несколько сотен [114]. Можно полагать, что за счет применения в них КТ, эта цель будет достигнута в самое ближайшее время. По-видимому, применения КТ *in vivo* будут пока ограничены из-за остающейся нерешенной проблемы цитотоксичности КТ. Вместе с тем можно предсказать, что наиболее быстро развивающейся областью среди медико-биологических приложений КТ станут их применения в *in vitro*-диагностике, геномике и протеомике [119, 120].

Хотя развитие диагностических жидких биочипов, основанных на технологии микрочастиц, содержащих полупроводниковые КТ, находится еще на начальной стадии, недавние результаты их клинического применения к обнаружению точечных нуклеотидных полиморфизмов (SNPs) [29], профиля экспрессии генов [110] и идентификации профиля аутоантител в клинической протеомике [108] открывают пути к основанным на КТ клиническим тестовым системам с ранее недостижимыми чувствительностью и мультиплексной способностью. Существенного увеличения чувствительности биочипов на основе КТ можно ожидать при использовании FRET-формата обнаружения [115, 117–119], где неспецифичный фон может быть фактически устранен благодаря переносу энергии от КТ к единственной расположенной рядом флуоресцентной метке.

Благодарности

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты РФФИ/CNRS (№ 07-04-92164/PICS3868) и РФФИ № 09-04-00650, Министерства образования РФ (гос. контракт №), NATO, проект SfP-983207 и ООО «ЦНТБ».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stoll D., Templin M.F., Schrenk M., Traub P.C., Vöhringer C.F., Joos T.O. // *Front Biosci.* 2002. V. 7. P. 13–32.
2. Stoll D., Bachmann J., Templin M.F., Joos T.O. // *Targets.* 2004. V. 3. P. 24.
3. Chen C.-S., Zhu H. // *BioTechniques.* 2006. V. 40. P. 423.
4. Чечеткин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. // *Росс. нанотехнологии.* 2006. Т. 1. С. 13–27.
5. Gracey A.Y., Cossins A.R. // *Annu. Rev. Physiol.* 2003. V. 65. P. 231–259.
6. Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A., Voloshchuk S., Chupeeva V., Mirzabekov A. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 278. P. 123–131.
7. Tao S.C., Chen C.S., Zhu H. // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2007. V. 10. P. 706–718.
8. Lee Y., Lee E.K., Cho Y.W., Matsui T., Kang I.C., Kim T.S., Han M.H. // *Proteomics.* 2003. V. 3. P. 2289–2304.
9. Sasakura Y., Kanda K., Yoshimura-Suzuki T., Matsui T., Fukuzono S., Shimizu T. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 9598–9605.
10. Zha H., Raffeld M., Charboneau L., Pittaluga S., Kwak L.W., Petricoin E. 3rd, Liotta L.A., Jaffe E.S. // *Lab. Invest.* 2004. V. 84. P. 235–244.
11. Chan S.M., Weng A.P., Tibshirani R., Aster J.C., Utz P.J. // *Blood.* 2007. V. 110. P. 278–286.
12. Li B., Zhou D., Wang Z., Song Z., Wang H., Li M., Dong X., Wu M., Guo Z., Yang R. // *Microbes. Infect.* 2008. V. 10. P. 45–51.
13. Xu R., Gan X., Fang Y., Zheng S., Dong Q. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 362. P. 69–75.
14. Мирзабеков А.Д. // *Вестник РАН.* 2003. Т. 73. С. 412.
15. Zajac A., Song D., Qian W., Zhukov T. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2007 V. 58. P. 309–314.
16. Yuk C.S., Lee H.K., Kim H.T., Choi Y.K., Lee B.C., Chun B.H., Chung N. // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. P. 1563–1568.
17. Zhu H., Hu S., Jona G., Zhu X., Kreiswirth N., Willey B.M., Mazzulli T., Liu G., Song Q., Chen P., Cameron M., Tyler A., Wang J., Wen J., Chen W., Compton S., Snyder M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 4011–4016.
18. Smith A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X. // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2006. V. 6. P. 231–244.
19. Колчинский А.М., Барский В.Е., Заседателев А.С. // *Молекулярная биология.* 2007. Т. 41. С. 757–764.
20. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Дементьева Е.И., Рубина А.Ю., Дарий Е.И., Барышников А.Ю., Заседателев А.С., Мирзабеков А.Д. // *Росс. биотерапевтич. журн.* 2004. Т. 3. С. 30–31.
21. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М., Наседкина Т.В., Дементьева Е.И., Рубина А.Ю., Паньков С.В., Барский В.Е., Заседателев А.С. // *Медицинский алфавит. Лаб.* 2009. Т. 3. С. 10–14.
22. Protein Microarray Technology / Ed. Kambhampati D. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2004. 265 p.
23. Dyukova V.I., Shilova N.V., Galanina O.E., Rubina A.Yu., Bovin N.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1760. P. 603.
24. Gershon D. // *Nature.* 2002. V. 416. P. 885–891.

25. Fodor S.P., Rava R.P., Huang X.C., Pease A.C., Holmes C.P., Adams C.L. // *Nature*. 1993. V. 364. P. 555–556.
26. MacBeath G., Schreiber S.L. // *Science*. 2000. V. 289. P. 1760–1763.
27. Fulton R.J., McDade R.L., Smith P.L., Kienker L.J., Kettman J.R., Jr. // *Clin. Chem*. 1997. V. 43. P. 1749–1756.
28. Battersby B.J., Bryant D., Meutermans W., Matthews D., Smythe M.L., Trau M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 2138–2139.
29. Xu H., Sha M.Y., Wong E.Y., Uphoff J., Xu Y., Treadway J.A., Truong A., O'Brien E., Asquith S., Stubbins M., Spurr N.K., Lai E.H., Mahoney W. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. e43.
30. Han M., Gao X., Su J.Z., Nie S. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 631–635.
31. Zhao X.W., Liu Z.B., Yang H., Nagai K., Zhao Y.H., Gu Z.Z. // *Chem. Mater.* 2006. V. 18. P. 2443–2449.
32. Cunin F., Schmedake T.A., Link J.R., Li Y.Y., Koh J., Bhatia S.N., Sailor M.J. // *Nat. Mater.* 2002. V. 1. P. 39–41.
33. Su X., Zhang J., Sun L., Koo T.W., Chan S., Sundararajan N., Yamakawa M., Berlin A.A. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 49–54.
34. Fenniri H., Chun S., Ding L., Zyrianov Y., Hallenga K. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 10546–10560.
35. Nicewarner-Pena S.R., Freeman R.G., Reiss B.D., He L., Pena D.J., Walton I.D., Cromer R., Keating C.D., Natan M.J. // *Science*. 2001. V. 294. P. 137–141.
36. Sha M.Y., Walton I.D., Norton S.M., Taylor M., Yamanaka M., Natan M.J., Xu C., Drmanac S., Huang S., Borchertding A., Drmanac R., Penn S.G. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 384. P. 658–666.
37. Evans M., Sewter C., Hill E. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2003. V. 1. P. 199–207.
38. Zhi Z.L., Morita Y., Hasan Q., Tamiya E. // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 4125–4131.
39. Braeckmans K., De Smedt S.C., Roelant C., Leblans M., Pauwels R., Demeester J. // *Nat. Mater.* 2003. V. 2. P. 169–173.
40. Moran E.J., Sarshar S., Cargill J.F., Shahbaz M.M., Lio A., Mjalli A.M.M., Armstrong R.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 10787–10788.
41. Nicolaou K.C., Xiao X.Y., Parandoosh Z., Senyei A., Nova M.P. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995. V. 34. P. 2289–2291.
42. McHugh T.M., Miner R.C., Logan R.H., Stites D.P. // *J. Clin. Microbiol.* 1988. V. 26. P. 1957–1961.
43. Vaino A.R., Janda K.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 7692–7696.
44. Kader H.A., Tchernev V.T., Satyaraj E., Lejnine S., Kotler G., Kingsmore S.F., Patel D.D. // *Am. J. Gastroenterol.* 2005. V. 100. P. 414–423.
45. Hall D.A., Ptacek J., Snyder M. // *Mech. Ageing. Dev.* 2007. V. 128. P. 161–167.
46. Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bidlingmaier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean R.A., Gerstein M., Snyder M. // *Science*. 2001. V. 293. P. 2101–2105.
47. McGall G., Labadie J., Brock P., Wallraff G., Nguyen T., Hinsberg W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 13555–13560.
48. Ramachandran N., Raphael J.V., Hainsworth E., Demirkan G., Fuentes M.G., Rolfs A., Hu Y., LaBaer J. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. P. 535–538.
49. Situma C., Hashimoto M., Soper S.A. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. P. 213–231.
50. Lee K.B., Park S.J., Mirkin C.A., Smith J.C., Mrksich M. // *Science*. 2002. V. 295. P. 1702–1705.

51. Yan J., Estévez M.J., Smith J.E., Wang K., He X., Wang L., Tan W. // *Nanotoday*. 2007. V. 2(3). P. 44–50.
52. Bruchez M.Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. // *Science*. 1998. V. 281. P. 2013–2016.
53. Chan W.C., Nie S. // *Science*. 1998. V. 281. P. 2016–2018.
54. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // *Росс. нанотехнологии*. 2007. Т. 2(1–2). С. 160–173.
55. Nabiev I., Sukhanova A., Artemyev M., Oleinikov V. // *Colloidal nanoparticles in biotechnology*/ Ed. Elissari A. London/Singapore: Wiley & Sons Inc., 2008. P. 133–168.
56. True L.D., Gao X. // *J. Mol. Diagn.* 2007. V. 9. P. 7–11.
57. Geho D., Lahar N., Gurnani P., Huebschman M., Herrmann P., Espina V., Shi A., Wulfschuhle J., Garner H., Petricoin E., 3-rd, Liotta L.A., Rosenblatt K.P. // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. P. 559–566.
58. Rousserie G., Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Fleury F., Chames P., Baty D., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I. // *Crit. Rev. Oncology/Hematol.* 2010. V. 74. P. 1–15.
59. Alivisatos A.P. // *Science*. 1996. V. 271. P. 933–937.
60. Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. P. 9463–9475.
61. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 8706–8715.
62. Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I. // *Lab. Invest./Brief Meth.* 2002. V. 82(9). P. 1259–1261.
63. Leatherdale C.A., Woo W.K., Mikulec F.V., Bawendi M.G. // *J. Phys. Chem. B*. 2002. V. 106. P. 7619–7622.
64. Zhong X., Feng Y., Knoll W., Han M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 13559–13563.
65. Azzazy H.M.E., Mansour M.M.H., Kazmierczak S.C. // *Clin. Biochem.* 2007. V. 40. P. 917–927.
66. Williams Y., Sukhanova A., Nowostawska M., Davies A.M., Mitchel S., Oleinikov V., Gun'ko Y., Nabiev I., Kelleher D., Volkov Y. // *Small*. 2009. V. 5(22). P. 2581–2588.
67. Mahmoud W., Sukhanova A., Oleinikov V., Rakovich Y., Donegan J.F., Pluot M., Cohen J.H.M., Volkov Y., Nabiev I. // *Proteomics*. 2010. V. 10. P. 700–716.
68. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S. // *Science*. 2005. V. 307(5709). P. 538–544.
69. Haugland R.P. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. San Diego: Invitrogen Corporation, 2005.
70. Tavares A.J., Chong L., Petryayeva E., Algar R., Krull U.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. DOI 10.1007/s00216-010-4010-3, Published online: 25 July 2010
71. Karlin-Neumann G., Sedova M., Falkowski M., Wang Z., Lin S., Jain M. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 239–251.
72. Sukhanova A., Devy J., Venteo L., Kaplan H., Artemyev M., Oleinikov V., Klinov D., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 324(1). P. 60–67.
73. Hohng S., Ha T. // *Chemphyschem*. 2005. V. 6. P. 956–960.
74. Pathak S., Davidson M.C., Silva G.A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1839–1845.
75. Shingyoji M., Gerion D., Pinkel D., Gray J.W., Chen F. // *Talanta*. 2005. V. 67. P. 472–478.
76. Finkel N.H., Lou X.H., Wang C.Y., He L. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 352a–359a.
77. Braeckmans K., De Smedt S.C., Leblans M., Pauwels R., Demeester J. // *Nat. Rev. Drug. Discovery*. 2002. V. 1. P. 447–456.

78. Fortina P., Kricka L.J., Surrey S., Grodzinski P. // Trends Biotechnol. 2005. V. 23. P. 168–173.
79. Braeckmans K., De Smedt S.C., Roelant C., Leblans M., Pauwels R., Demeester J. // Mod. Drug Discovery. 2003. V. 6. P. 28–32.
80. Fan J.B., Chee M.S., Gunderson K.L. // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 632–644.
81. Meza M.B. // Drug Discovery Today. 2000. V. 5 (Suppl. 1). P. 38–41.
82. Nolan J.P., Sklar L.A. // Trends Biotechnol. 2002. V. 20. P. 9–12.
83. Service R.F. // Science. 1995. V. 270. P. 577.
84. Pregibon D.C., Toner M., Doyle P.S. // Science. 2007. V. 315. P. 1393–1396.
85. Vignali D.A. // J. Immunol. Methods. 2000. V. 243. P. 243–255.
86. Kellar K.L., Iannone M.A. // Exp. Hematol. 2002. V. 30. P. 1227–1237.
87. Kellar K.L., Douglass J.P. // J. Immunol. Methods. 2003. V. 279. P. 277–285.
88. Lukacs Z., Dietrich A., Ganschow R., Kohlschutter A., Kruithof R. // Clin. Chem. Lab. Med. 2005. V. 43. P. 141–145.
89. Hurley J.D., Engle L.J., Davis J.T., Welsh A.M., Landers J.E. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. e186.
90. Luo Y. // Curr. Opin. Mol. Ther. 2005. V. 7. P. 251–255.
91. Whitehead G.S., Walker J.K.L., Berman K.G., Foster W.M., Schwartz D.A. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2003. V. 285. P. L32–L42.
92. Yan X., Zhong W., Tang A., Schielke E.G., Hang W., Nolan J.P. // Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 7673–7678.
93. McBride M.T., Gammon S., Pitesky M., O'Brien T.W., Smith T., Aldrich J., Langlois R.G., Colston B., Venkateswaran K.S. // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 1924–1930.
94. Morgan E., Varro R., Sepulveda H., Ember J.A., Apgar J., Wilson J., Lowe L., Chen R., Shivraj L., Agadir A., Campos R., Ernst D., Gaur A. // Clin. Immunol. 2004. V. 110. P. 252–266.
95. Tarnok A., Hambsch J., Chen R., Varro R. // Clin. Chem. 2003. V. 49. P. 1000–1002.
96. Robinson W.H., DiGennaro C., Hueber W., Haab B.B., Kamachi M., Dean E.J., Fournel S., Fong D., Genovese M.C., de Vegvar H.E., Skriner K., Hirschberg D.L., Morris R.I., Muller S., Pruijn G.J., van Venrooij W.J., Smolen J.S., Drown P.O., Steinman L., Utz P.J. // Nat. Med. 2002. V. 8. P. 295–301.
97. Stsiapura V., Sukhanova A., Artemyev M., Pluot M., Cohen J.H.M., Baranov A., Oleinikov V., Nabiev I. // Anal. Biochem. 2004. V. 342(2). P. 257–265.
98. Генералова А.Н., Сизова С.В., Гонцова М.С., Баранов А.В., Маслов В.Г., Артемьев М.В., Клинов Д.В., Мочалов К.Е., Зубов В.П., Олейников В.А. // Росс. нанотехнологии. 2007. Т. 2(7–8). С. 144–154.
99. Generalova A.N., Sizova S.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Artemyev M., Spornath L., Kamyshny A., Magdassi S. // Colloids and Surfaces A. Physicochem. Engineer. Asp. 2009. V. 342. P. 59–64.
100. Sheng W., Kim S., Lee J., Kim S.W., Jensen K., Bawendi M.G. // Langmuir. 2006. V. 22. P. 3782–3790.
101. Joumaa N., Lansalot M., Thretz A., Elaissari A., Sukhanova A., Artemyev M., Nabiev I., Cohen J.H.M. // Langmuir. 2006. V. 22. P. 1810–1816.
102. Susa A.S., Caruso F., Rogach A.L., Sukhorukov G.B., Kornowski A., Mohwald H., Giersig M., Eychemuller A., Weller H. // Colloids Surfaces A. Physicochem. Engineer. Asp. 2000. V. 163. P. 39–44.

103. Rogach A., Susha A., Caruso F., Sukhorukov G., Kornowski A., Kershaw S., Mohwald H., Eychmuller A., Weller H. // *Adv. Mater.* 2000. V. 12(5). P. 333–337.
104. Wang D., Rogach A.L., Caruso F. // *Nano Lett.* 2002. V. 2. P. 857–861.
105. Gaponik N., Radtchenko I.L., Sukhorukov G.B., Weller H., Rogach A.L. // *Adv. Mater.* 2002. V. 14. P. 879–882.
106. Ma Q., Wang X., Li Y., Shi Y., Su X. // *Talanta.* 2007. V. 72. P. 1446–1452.
107. Gaponik N., Radtchenko I.L., Gerstenberger M.R., Fedutik Y.A., Sukhorukov G.B., Rogach A.L. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 369–372.
108. Sukhanova A., Susha A.S., Bek A., Mayilo S., Rogach A.L., Feldmann J., Oleinikov V., Reveil B., Donvito B., Cohen J.H.M., Nabiev I. // *Nano Lett.* 2007. V. 7(8). P. 2322–2327.
109. Gao X.H., Nie S.M. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 2406–2410.
110. Eastman P.S., Ruan W., Doctolero M., Nuttall R., de Feo G., Park J.S., Chu J.S., Cooke P., Gray J.W., Li S., Chen F.F. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 1059–1064.
111. Schwartz D.E., Gong P., Shepard K.L. // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 383–390.
112. Schuler B., Eaton W.A. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. P. 16–26.
113. Gertler A., Biener E., Ramanujan K.V., Djiane J., Herman B. // *J. Dairy Res.* 2005. V. 72. P. 9.
114. Hallworth R., Currall B., Nichols M.G., Wu X., Zuo J. // *Brain Res.* 2006. V. 1091. P. 122–131.
115. Medintz I.L., Clapp A.R., Mattoussi H., Goldman E.R., Fisher B., Mauro J.M. // *Nat. Mater.* 2003. V. 2. P. 630–638.
116. Wagnier R., Baranov A., Maslov V., Stsiapura V., Sukhanova A., Pluot M., Nabiev I. // *Nano Lett.* 2004. V. 4. P. 451–457.
117. Sukhanova A., Baranov A.V., Perova T., Cohen J.H.M., Nabiev I. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. V. 45. P. 2048–2052.
118. Sukhanova A., Venteo L., Cohen J.H.M., Pluot M., Nabiev I. // *Ann. Acad. Pharm. Franc.* 2006. V. 64. P. 125–134.
119. Sukhanova A., Nabiev I. // *Expert. Opin. Med. Diagn.* 2008. V. 2. P. 429–447.
120. Nabiev I., Mitchell S., Davies A., Willyams Y., Kelleher D., Moore R., Gin'ko Y.K., Byrne S., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Sukhanova A., Conroy J., Cottell D., Gaponik N., Rogach A., Volkov Y. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 3452–3461.

Таблица. Сопоставление свойств полупроводниковых квантовых точек и органических красителей*

	Квантовые точки	Органические флуорофоры
Возбуждение	Полоса возбуждения очень широкая. КТ всех размеров можно возбуждать одним источником света (синий или УФ)	Полоса возбуждения узкая. Положение определяется конкретным флуорофором
Пик эмиссии	Узкий, симметричный, ширина на полувысоте ~ 20–40 нм. Цвет эмиссии (от УФ до ИК) варьируется размером и материалом КТ	Широкий, асимметричный, ширина ~ 50–100 нм, не варьируемый длинноволновый «хвост»
Время жизни флуоресценции	Более 10 нс	Менее 5 нс
Фотостабильность	В 50–10000 раз стабильнее органических флуорофоров	Варьируется в широких пределах в зависимости от типа флуорофора
Экстинкция	$\sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\sim 10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. В 10–100 меньше экстинкции CdSe-квантовых точек
Квантовый выход	Более 20%. Зависит от оболочки, присоединенных лигандов, окружающей среды	Определяется конкретным флуорофором: 5–100%
Мультиплексинг	Идеальны: узкие пики эмиссии, единый источник возбуждения, простота деконволюции	Проблемы: перекрывающиеся спектры эмиссии, трудности деконволюции, потребность в нескольких источниках возбуждения
Мерцание (blinking)	Значительное. Снижается подбором органической оболочки	Минимальное
Характерные размеры	Зависят от материала КТ: диаметр ядра от 1.5 до 10 нм	Молекулярные: меньше 0.5 нм (за исключением флуоресцентных белков: GFP 4.6 x 2.4 нм)
Гидродинамический радиус	В зависимости от оболочки и поверхностных лигандов: 1.5–40 нм	Меньше 0.6 нм (за исключением флуоресцентных белков)
Конъюгация	Как правило поливалентная	Моновалентная, поливалентная
Химические свойства	Устойчивы. В зависимости от покрытия, чувствительны к pH	Химическая устойчивость, в основном, слабая. Флуоресценция может зависеть от pH

*По данным [54, 55, 58–60, 63, 68–70].

РИСУНКИ

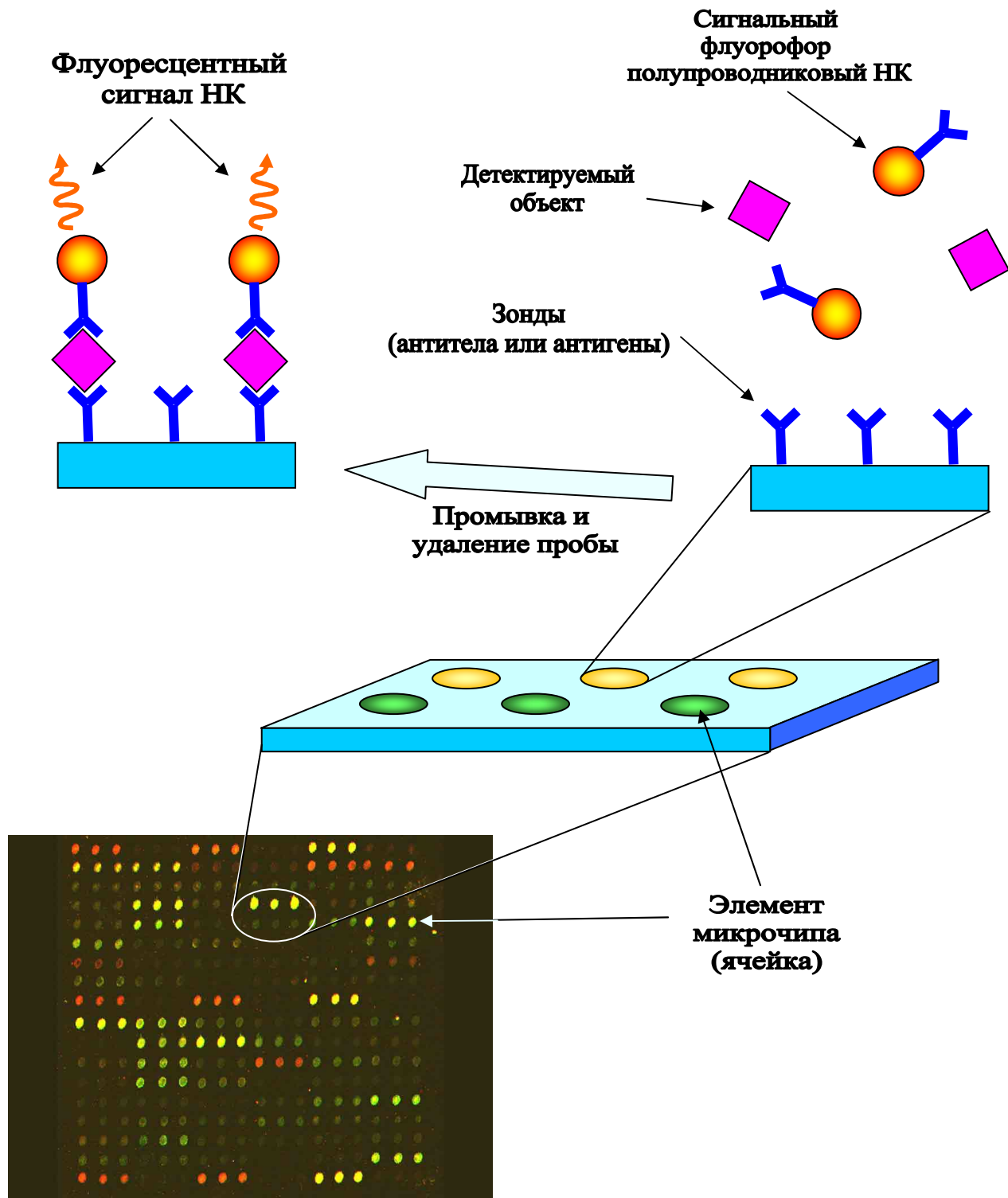


Рис. 1. Принцип действия матричного биочипа с детекцией, основанной на использовании полупроводниковых КТ. Каждый элемент биочипа содержит распознающие молекулы (зонды), селективно связывающие детектируемый объект. Появление в пробе детектируемого объекта приводит к формированию комплекса, содержащего сигнальный флуорофор (КТ). После удаления пробы, биочип облучают источником света. Факт присутствия детектируемого объекта регистрируется по флуоресценции КТ, локализованных в соответствующих ячейках биочипа. Идентификацию детектируемого объекта проводят по положению соответствующего элемента: каждый элемент содержит определенную распознающую молекулу или, в случае спектрального кодирования, группу таких молекул. Использование в качестве флуорофоров полупроводниковых КТ позволяет возбуждать все флуорофоры одним источником излучения.

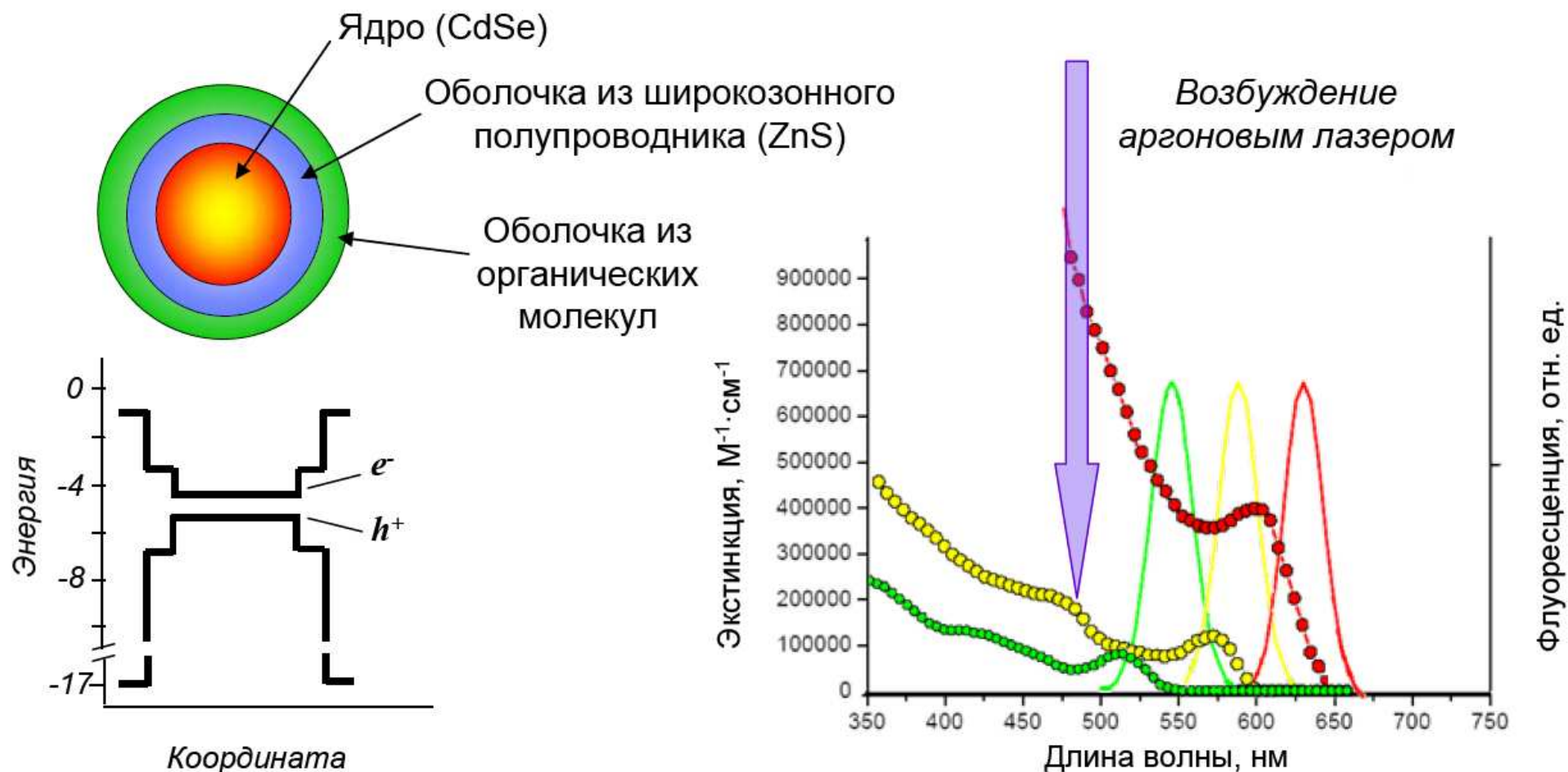


Рис. 2. Свойства квантовых точек в форме коллоидных нанокристаллов: (а) – структура и энергетическая диаграмма полупроводникового CdSe/ZnS-нанокристалла структуры ядро/оболочка. В CdSe-ядре формируются квантовые уровни, определяющие его флуоресценцию; оболочка из широкозонного полупроводника (ZnS) препятствует безызлучательной диссипации энергии; слой органических молекул обеспечивает стабильность нанокристаллов в растворе; (б) – спектры поглощения и эмиссии КТ разного размера. КТ всех цветов флуоресценции могут быть возбуждены излучением одного источника, например аргоновым лазером (стрелка соответствует линии 488 нм).

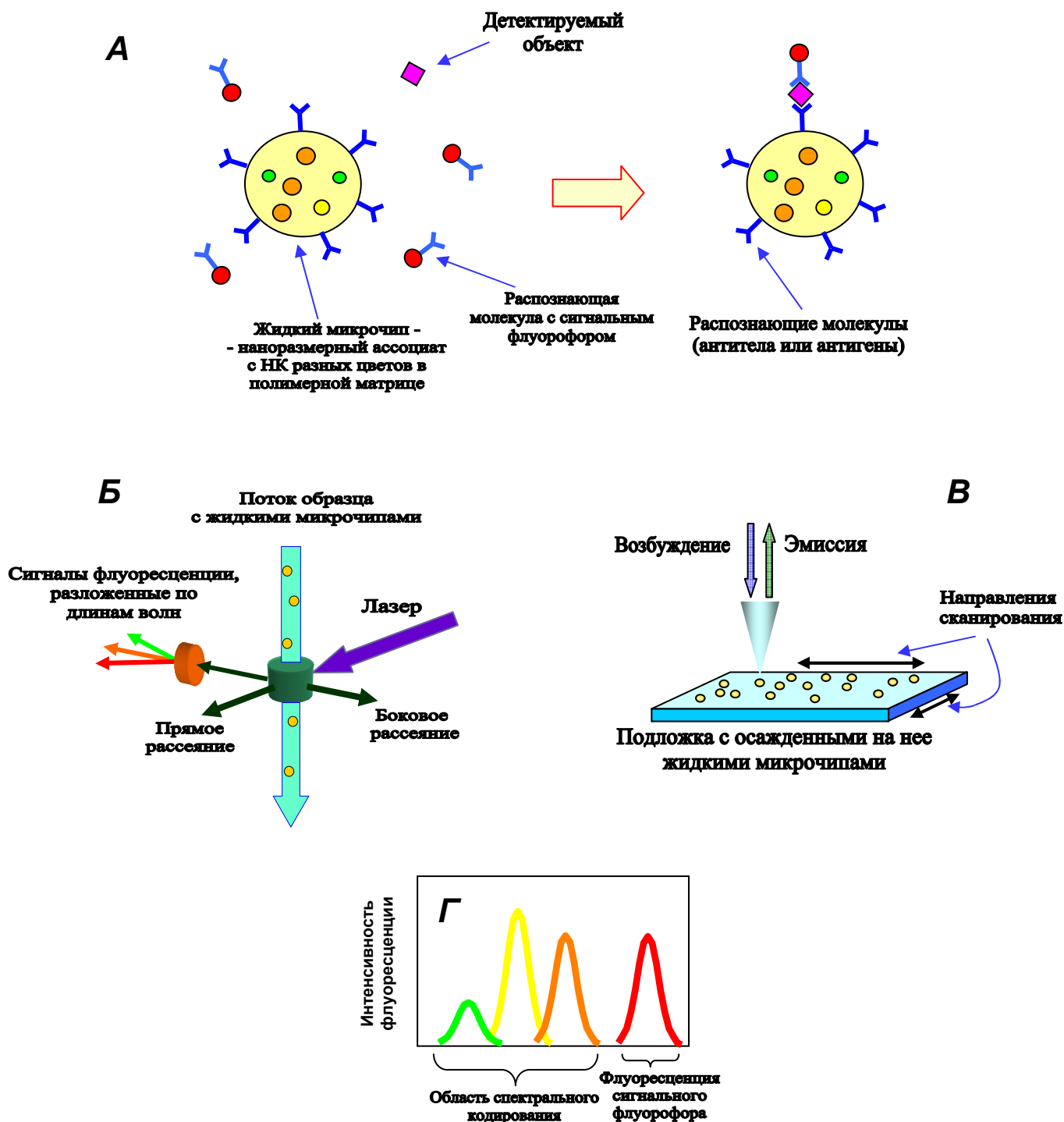


Рис. 3. Схема детекции с помощью спектрально кодированных жидких биочипов. (а) Появление в пробе детектируемого объекта обуславливает образование комплекса: спектрально кодированная микрочастица/детектируемый объект/сигнальный флуорофор; (б) анализ микрочастиц с помощью проточного цитометра; (в) анализ микрочастиц с помощью лазерного сканирующего микроспектрометра; (г) анализ области спектрального кодирования обеспечивает идентификацию каждой микрочастицы. Флуоресцентный пик сигнального флуорофора свидетельствует о наличии в пробе детектируемого объекта.

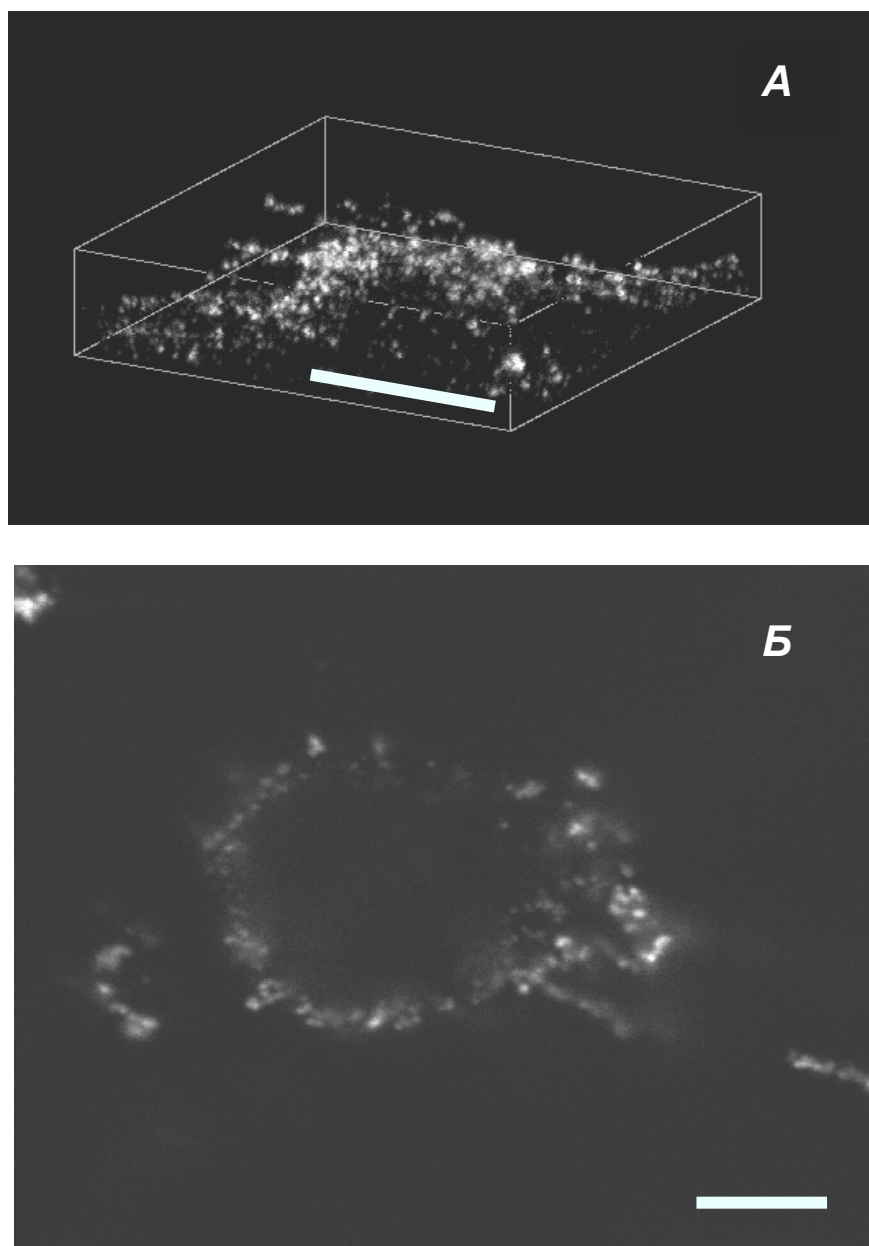


Рис. 4. Конфокальное изображение клеток MCF-7г аденокарциномы молочной железы (резистентные, с высоким содержанием р-гликопротеина) обработаны антителами против р-гликопротеина, а затем конъюгатами: вторичные антитела/КТ (CdSe/ZnS, диаметр 4 нм). (а) – Реконструкция трехмерных изображений. Использованы 135 плоских «срезов»; (б) – «срез» изображения в одной плоскости, масштабная метка – 5 мкм.

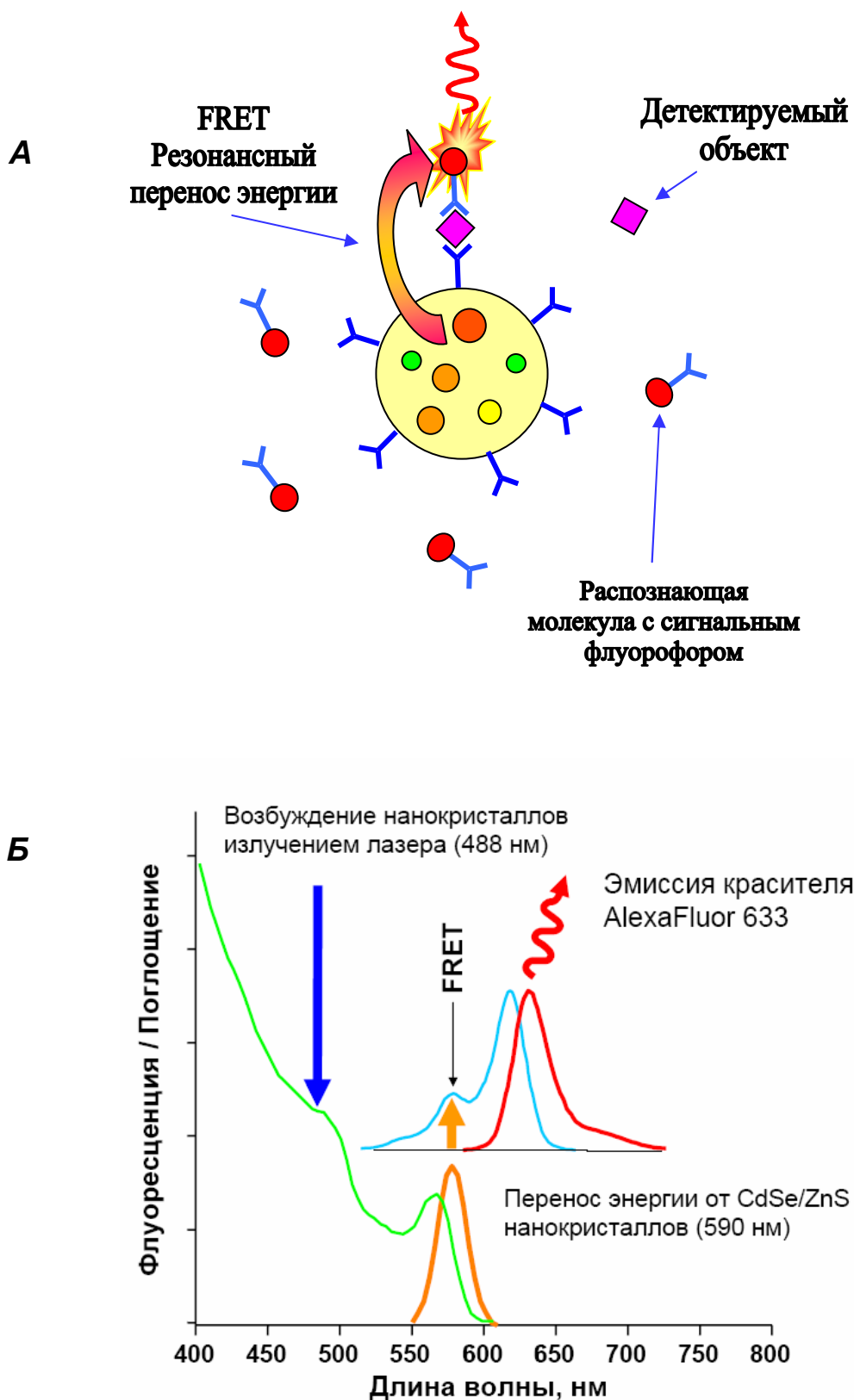


Рис. 5. Принцип детекции с использованием FRET-формата. Формирование конъюгата (жидкий микрочип)/(детектируемый объект)/(сигнальный флуорофор) приводит к сближению донора (КТ) с акцептором (сигнальный флуорофор – краситель AlexaFluor). Само по себе лазерное излучение не возбуждает флуоресценцию красителя. Флуоресцентный сигнал появляется только за счет резонансного переноса энергии от КТ (CdSe/ZnS-нанокристаллы). (а) – структура конъюгата с переносом энергии; (б) – спектральная схема возбуждения красителя.

Semiconductor fluorescent nanocrystals (quantum dots) in biological biochips

V. A. Oleinikov[#]

[#]Phone: (495) 330-59-74; e-mail: voleinik@mail.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul.
Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

Comprehension of biological processes in cells, tissues and organisms requires identification and analysis of numerous biological objects, mechanisms of their action and regulation. Microarray (biochips) technology is a rare tool to solve this problem. It is based on high-throughput recognition of a target to the probe and has the potential to measure simultaneously the presence of numerous molecules in multiplexed testes, all contained in a small drop of test fluid. Biochips allow the parallel analysis of genomic or proteomic content in healthy versus disease-affected or altered tissues or cells. The signals read-out from the biochips is done with organic dyes which often suffer from photobleaching, low brightness and background fluorescence. Recent data show that the use of fluorescent nanocrystals “quantum dots” (QDs) allows push away these restrictions. The QDs are sufficiently bright to be detected as individual particles, extremely resistant to photobleaching and provide unique possibilities for multiplexing thus supplying the microarray technology with the novel read-out option enabling the sensitivity of detection reaching the single molecule level.

This paper is aimed at the development of the approaches to the QDs application in microarray-based detection. Possibilities of QDs application both in solid state (planar) biochips as well as intensively developing technique of suspension biochips (bead-based assays or liquid biochips) are demonstrated. The latter are more and more applied for simultaneous identification of very large numbers of molecules in proteomics, genomics, drug screening and clinical diagnostics. This assays base on spectral encoded elements (as a rule polymer microbeads). The benefits of using optically encoded microbeads (instead of the solid-state two-dimensional arrays) are derived from the freedom of bead to move in three dimensions. Polymeric beads optically encoded with organic dyes allow for a limited number of unique codes, whereas the use of semiconductor nanocrystals as fluorescent tags improves the beads multiplexed imaging capabilities, photostability and sensitivity of the biological objects detection. Additionally, an employment in suspension biochips of Förster resonance energy transfer (FRET) allows improving detection specificity. The absence of fluorescent background from non-interacting with the beads dye-labelled antibodies additionally increases the sensitivity of detection and further facilitates the multiplexing capabilities of nanocrystals-based detection and diagnostics.

So the combination of the biochips and QDs techniques allow increasing detection sensitivity and significantly raising the number of detected objects (multiplexing capacities). Such combination should provide the breakthrough in proteomics, particularly in new drugs development, clinical diagnostics, new disease markers identification, better understanding of intracellular mechanisms.

Key words: *proteomics, microarray (biochips), quantum dots, fluorescence, clinical diagnostics, flow citometric, microspectroscopy.*