



**HAL**  
open science

**Разработка суспензионных микрочипов на основе  
микросфер, кодированных флуоресцентными  
нанокристаллами, и принципы их использования для  
многопараметрической диагностики онкологических  
заболеваний**

Brazhnik K.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A., Bilan R.S., Nabiev I.R.,  
Sukhanova A.V.

► **To cite this version:**

Brazhnik K.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A., Bilan R.S., Nabiev I.R., et al.. Разработка суспензионных микрочипов на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, и принципы их использования для многопараметрической диагностики онкологических заболеваний. Russian Journal of Biotherapy, 2014, 13 (4), pp.3-10. <hal-03159922>

**HAL Id: hal-03159922**

**<https://hal.science/hal-03159922>**

Submitted on 4 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 535.371.2:546-022.53+616.65-006.6-097.1+576.3.08

*К.И. Бражник<sup>1</sup>, З.А. Соколова<sup>1,2</sup>, М.А. Барышникова<sup>1,2</sup>, Р.С. Билан<sup>1</sup>, И.Р. Набиев<sup>1,3</sup>, А.В. Суханова<sup>1,3</sup>***РАЗРАБОТКА СУСПЕНЗИОННЫХ МИКРОЧИПОВ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР, КОДИРОВАННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ НАНОКРИСТАЛЛАМИ, И ПРИНЦИПЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**<sup>1</sup>Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва<sup>2</sup>ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва<sup>3</sup>Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденны, Франция**Контактная информация:***Суханова Алена Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нано-биоинженерии***адрес:** 115409 Москва, Каширское шоссе, д. 31; тел. +7(967)129-47-87**e-mail:** [nanomedicine.mephi@gmail.com](mailto:nanomedicine.mephi@gmail.com)

Статья поступила 08.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

**Резюме**

Комплексный многопараметрический анализ профиля специфических онкомаркеров в биологических жидкостях организма способен существенно повысить эффективность ранней диагностики онкологических заболеваний. В последнее время в клинико-лабораторной практике большие надежды связывают с многопараметрическими суспензионными микрочипами на основе микрочастиц, оптически кодированных флуорофорами. Кодированные флуорофорами микросферы с высокой точностью могут быть дифференцированы в суспензионном образце по индивидуальным оптическим кодам с помощью классической проточной цитофлуориметрии. В настоящем исследовании разработана универсальная многопараметрическая суспензионная система нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами. Система адаптирована для детекции двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека. Выявление маркеров с помощью сенсоров типа «лаборатория на микрочастице» основано на формировании и визуализации иммунного комплекса онкомаркера с распознающими АТ, высокоориентированного на поверхности флуоресцентных микросфер с помощью адаптерных молекул белка А. Введение в состав микрочипа молекул-адаптеров обеспечивает высокую эффективность детекции онкомаркеров и универсальность системы для определения различных профилей онкомаркеров.

**Ключевые слова:** флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, квантовые точки, онкомаркеры, простатический специфический антиген, микросферы, суспензионные микрочипы, многопараметрический анализ, проточная цитометрия.

*K.I. Brazhnik<sup>1</sup>, Z.A. Sokolova<sup>1,2</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1,2</sup>, R.S. Bilan<sup>1</sup>, I.R. Nabiev<sup>1,3</sup>, A.V. Sukhanova<sup>1,3</sup>***DEVELOPMENT OF SUSPENSION BEAD-BASED MICROARRAYS ENCODED WITH FLUORESCENT NANOCRYSTALS AND PRINCIPLES OF THEIR APPLICATION FOR MULTIPLEXED CANCER DIAGNOSTICS**<sup>1</sup>Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPHI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow<sup>2</sup>FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow<sup>3</sup>Laboratory of Research in Nanosciences - EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France**Abstract**

Multiplexed analysis of the specific cancer marker profile of biological fluids can substantially improve early diagnosis of cancer. In modern clinical laboratory practice, much hope is put on multiplexed suspension microarrays based on microbeads optically encoded with fluorophores. Individual optical codes make it possible to differentiate fluorophore-encoded microbeads in a suspension sample with high accuracy by means of classical flow cytometry. In this study, a versatile multiplexed suspension system of a new generation based on microbeads encoded with fluorescent nanocrystals has been developed. The system has been adapted for detecting two forms of PSA, serum marker of human prostate cancer. Lab-on-a-bead detection of the markers is based on the formation and imaging of an immune complex of the cancer marker with capture antibody, which is attached to the surface of the fluorescent microbeads in a highly oriented manner through the adapter molecule (protein A). The use of the adapter molecules ensures highly effective detection of cancer markers and the versatility of the microarray intended for determining different biomarker profiles.

**Key words:** fluorescent semiconductor nanocrystals, quantum dots, cancer markers, prostate-specific antigen, microbeads, suspension microarrays, multiplexed analysis, flow cytometry.

## Введение

В настоящее время в лабораторной клинической диагностике онкологических заболеваний применяется две стратегии для количественной детекции специфических сывороточных онкомаркеров: традиционный твердофазный ИФА на планарных носителях [6; 15] и диагностика нового поколения с помощью суспензионных систем на основе кодированных микрочастиц [16; 22].

Твердофазный ИФА с использованием планшета или микрочипа остается наиболее распространенным методом определения специфических растворимых маркеров и активно используется в клинической практике [2; 3]. Тем не менее, многопараметрические суспензионные системы на основе оптически кодированных микрочастиц имеют ряд преимуществ перед системами на планарном носителе, расширяя возможности анализа специфических растворимых маркеров [14]. Для таких систем характерны высокая чувствительность, точность и скорость определения с помощью проточной цитометрии; кроме того, их использование дает возможность выявить одновременно несколько АГ в одном биологическом образце, причем количество выявляемых биомаркеров может быть достаточно велико [1; 8; 22].

Принцип работы многопараметрической суспензионной системы заключается в специфической визуализации и количественном определении каждого из анализируемых маркеров в составе иммунного комплекса, образовавшегося на поверхности оптически кодированных микрочастиц, с помощью проточной цитометрии. Каждому анализируемому маркеру присваивается индивидуальный оптический код популяции микросфер, который помогает количественно дифференцировать данный маркер в тестируемом биологическом образце. При смешивании нескольких популяций флуоресцентных микросфер, оптические коды которых присвоены разным биомолекулам, реализуется возможность многопараметрического количественного определения профиля специфических маркеров в одном образце [11; 22].

Для многоцветного оптического кодирования микросфер могут быть использованы классические органические флуорофоры или флуорофоры нового поколения – флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, или КТ [7; 10; 11].

По сравнению с классическими органическими флуорофорами, КТ обладают уникальными оптическими свойствами [17]. Важнейшие из них – это высокие коэффициенты экстинкции и, как следствие, яркость излучения; узкий симметричный пик флуоресценции; прямая зависимость значения длины волны максимума флуоресценции от размера нанокристаллов, позволяющая задавать оптические свойства нанокристалла в процессе синтеза; широкие спектры поглощения, позволяющие использовать один источник излучения для возбуждения КТ с разными оптическими свойствами; высокая фотостабильность и т.д. [12; 13]. Использование КТ для оптического кодирования микрочастиц позволяет одновременно выявлять несколько биомаркеров, повысить фотостабильность и чувствительность диагностической системы, использовать более простое декодирующее оборудование (стандартная комплектация проточного цитометра) и значительно сократить время и стоимость анализа [4; 22]. Кроме того, благодаря своим уникальным спектральным свойствам, КТ могут использоваться как

эффективные доноры энергии при Ферстеровском резонансном переносе энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) на подходящий акцептор [12; 18]. Такая возможность позволяет значительно повысить качество выявления маркеров, а также чувствительность и специфичность диагностической системы.

В настоящее время технологии с использованием КТ и микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, находятся на этапе интенсивной разработки для дальнейшей интеграции в клинико-диагностическую практику [1]. Получены первые интересные результаты применения таких суспензионных систем в протеомике для идентификации аутоантител (ауто-АТ) в сыворотке крови [23], что открывает широкие перспективы применения разработанных суспензионных микрочипов для одновременного выявления целого спектра биологических маркеров с высокой точностью и чувствительностью.

Применение в лабораторной клинической диагностике суспензионных микрочипов имеет важное медицинское значение, т.к. подобные системы для многопараметрического анализа образцов биологических жидкостей являются экономичной и эффективной альтернативой традиционным ИФА-системам [8; 14]. Диагностические суспензионные системы на основе микросфер, кодированных КТ, способны во многом превзойти возможности существующих клинико-лабораторных методов как для количественной детекции отдельных растворимых онкомаркеров, так и для сравнительного анализа их профиля и, в конечном счете, для эффективной диагностики онкологических заболеваний.

**Целью исследования** было разработать универсальную многопараметрическую суспензионную систему нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, адаптируемую для анализа профилей различных онкомаркеров, и продемонстрировать принципы ее применения на примере выявления двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека.

## Материалы и методы

### **Синтез и солубилизация флуоресцентных нанокристаллов**

Нанокристаллы, или КТ, состава CdSe/ZnS, покрытые гидрофобной оболочкой триоктилфосфиноксида (trioctylphosphine oxide, TOPO), были синтезированы в соответствии с описанными ранее протоколами [20] и имели максимумы флуоресценции на 515 и 581 нм и квантовые выходы 55 % и 70 %, соответственно. Стабильные водорастворимые отрицательно заряженные нанокристаллы были получены путем модификации поверхности КТ низкомолекулярным производным полиэтиленгликоля, содержащим функциональные концевые тиольную и карбоксильную группы (Thermo Fisher Scientific) [21].

### **Синтез микросфер, оптически кодированных флуоресцентными нанокристаллами**

В качестве матрицы для синтеза оптически кодированных микрочастиц использовались карбоксилированные латексные микросферы с диаметром 4,08 мкм (меламин-формальдегидные микрочастицы (MF 4.08 μm), microParticles GmbH, Германия) с отрицательно заряженной поверхностью.

Органические полиэлектролиты противоположного заряда – полиаллиламин гидрохлорид (poly(allylamine hydrochloride), ПАН; Mw ≈ 15000 Да; Sigma-Aldrich) и полистиролсульфонат натрия (poly(sodium 4-styrenesulfonate), PSS; Mw ≈ 70000 Да; Sigma-Aldrich) – попеременно адсорбировались на поверхности стандартных карбоксилированных микросфер, формируя плотную многослойную полимерную оболочку [24]. Индивидуальные одноцветные оптические коды микросфер были получены путем включения в состав формирующейся оболочки водорастворимых КТ с отрицательно заряженной поверхностью [25].

Непосредственно перед процедурой химической конъюгации с биомолекулами флуоресцентные микросферы покрывали дополнительным полимерным слоем полиакрилата натрия (poly(acrylic acid sodium salt), PAA; Mw ≈ 15000; Sigma-Aldrich) для получения микросфер с экспонированными на поверхности карбоксильными группами.

#### **Конъюгация адаптерных молекул с поверхностью флуоресцентных микросфер**

Ковалентное связывание функциональных адаптерных молекул белка А (Sigma-Aldrich) с поверхностью кодированных микросфер (из расчета 10–50 мкг на 10<sup>6</sup> микросфер) осуществлялось с помощью карбодимидного метода химической конъюгации по механизму образования ковалентных связей между карбоксильными группами поверхности полиакрилатного слоя микросфер и экспонированными аминогруппами белка.

После конъюгации с адаптерными молекулами свободную поверхность микросферы блокировали от неспецифического связывания с другими компонентами диагностической системы с помощью инкубации с 1–5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или казеина коровьего молока (Sigma-Aldrich).

#### **Иммунодиагностический анализ онкомаркеров с помощью микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами**

Опухолевые АГ – маркеры РПЖ выявляли путем классического иммуноанализа с помощью технологии «лаборатория-на-микрочастице». Для этого распознающие АТ к свободному или общему ПСА (Fujirebio Diagnostics) связывались с адаптерными молекулами белка А (Thermo Fisher Scientific) на поверхности микросфер, кодированных КТ с максимумами флуоресценции на 515 или 581 нм, соответственно.

Таким образом, микросферы, ковалентно связанные с адаптерными молекулами, последовательно инкубировались с компонентами диагностической системы: распознающим АГ-специфическим моноклональным АТ; выявляемым АГ (одна из форм ПСА); детекторным моноклональным АТ; вторичным биотинилированным поликлональным АТ; конъюгатом стрептавидина с флуорофором, визуализирующим диагностическую систему. Поверхностные детекторные АТ (Fujirebio Diagnostics) были общими для обеих форм ПСА. В качестве вторичных АТ были использованы биотинилированные F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты поликлональных АТ к Fc-фрагментам мышинных иммуноглобулинов (Sigma-Aldrich).

Полученные комплексы визуализировались с помощью конъюгата стрептавидина с флуоресцентным красителем Tri-COLOR (Invitrogen).

АГ-специфические микросферы были откалиброваны с помощью стандартных растворов, содержащих известные количества рекомбинантного АГ (ПСА) (Abcam) в диапазоне концентраций 0–100 нг/мл для свободного и 0–2000 нг/мл для общего ПСА.

Для анализа клинических образцов АГ-специфические микросферы смешивались в эквивалентных количествах (по 20000 микросфер каждого типа в суспензии объемом 50 мкл для анализа одного образца) и инкубировались с сывороткой крови (50 мкл) здоровых доноров и онкологических пациентов с высоким уровнем ПСА. Точные сывороточные концентрации двух форм ПСА были предварительно определены с помощью стандартного ИФА с использованием диагностических наборов производства Fujirebio Diagnostics. Образцы сыворотки крови здоровых доноров и больных РПЖ были предоставлены Отделением урологии и Отделом клинической иммунологии ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина».

При анализе разработанной суспензионной системы с помощью проточной цитометрии возбуждение флуоресценции КТ и вторичной флуоресцентной метки, визуализирующей иммунные комплексы, осуществлялось с помощью аргонового лазера с длиной волны излучения 488 нм (FACSCantoII, Becton Dickinson). Оптические коды популяций микросфер и флуоресценция вторичной визуализирующей метки регистрировались в стандартных каналах проточного цитометра: FITC (fluorescein) (микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 515 нм); PE (phycoerythrin) (микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм) и PE-Cy5 (phycoerythrin-cyanine 5) (Tri-COLOR, 670 нм). Результаты анализа системы записывались до значения 5000–10000 детектируемых событий на образец и обрабатывались с помощью пакета программ FACSDiva (Becton Dickinson).

#### **Результаты и обсуждение**

##### **Синтез микросфер, оптически кодированных флуоресцентными нанокристаллами**

С помощью адаптированной процедуры формирования многослойной полимерной оболочки с включением в ее состав флуоресцентных нанокристаллов одного типа были синтезированы популяции одноцветных микросфер диаметром 4,08 мкм с максимумами флуоресценции на 515 или 581 нм, предназначенные для одновременного выявления нескольких онкомаркеров. Анализ микросфер, кодированных КТ, с помощью проточной цитометрии показал, что полученные образцы гомогенны и обладают интенсивной флуоресценцией (рис. 1, А и Б). Оптические коды индивидуальных популяций микросфер, кодированных КТ с различными оптическими свойствами, были визуально различимы в смеси образцов.

##### **Конъюгация адаптерных молекул с поверхностью флуоресцентных микросфер**

Для формирования функциональных микросфер и эффективной количественной детекции растворимых онкомаркеров флуоресцентные микросферы были конъюгированы с адаптерными белками (белок А). Бактериальные белки А и G содержат в своей структуре специфические участки, обладающие высоким сродством к Fc-концевым

фрагментам иммуноглобулинов класса G млекопитающих [5]. Рекомбинантные белки A и G широко используются в аффинной хроматографии в качестве аффинного носителя-сорбента, с которым специфически связываются иммуноглобулины G (АГ), для высокоизбирательного выделения моноклональных АГ из разного рода биологических образцов, таких, как культуральная среда, асцитная жидкость и т.д.

Преимущества такого подхода в разработанной диагностической системе заключаются в правильной ориентации АГ-специфических участков молекулы распознающего АГ на поверхности микросферы за счет связывания его Fc-фрагментов с белком-адаптером, что гарантирует формирование полноценных функциональных иммунодиагностических микрочипов для количественного определения маркеров. Использование поверхностных адаптерных белков также обеспечивает принципиальную возможность создания универсальных наборов популяций флуоресцентных микрочастиц, которые можно эффективно комбинировать и адаптировать для анализа различных профилей маркеров.

В качестве вторичных агентов для визуализации детекторных комплексов на поверхности микросфер использовали биотинилированные F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты поликлональных АГ, специфичные к Fc-фрагментам мышинных иммуноглобулинов, и конъюгат стрептавидина с флуоресцентным красителем Tris-COLOR. Такие АГ лишены своих Fc-фрагментов и не способны связываться непосредственно с адаптерными молекулами белка A, что позволяет значительно снизить ложноположительный неспецифический сигнал. Кроме того, при таком методе анализа оба АГ-специфических АГ из пары оставались интактными, что гарантировало сохранение высокой аффинности и специфичности моноклональных АГ.

Чтобы оценить эффективность конъюгации молекул-адаптеров, микросферы инкубировали с полноразмерными поликлональными АГ, мечеными флуоресцеином (Invitrogen). По интенсивности флуоресценции вторичной метки (флуоресцеина) можно было оценить количество белка A, связывающего Fc-фрагменты меченых полноразмерных АГ, на поверхности микросфер (рис. 1, В). В альтернативном контрольном эксперименте с инкубацией микросфер с F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами иммуноглобулинов, мечеными флуоресцеином (Sigma-Aldrich), флуоресценция вторичной метки не выявлялась (рис. 1, Г). Это свидетельствует о том, что разработанная система позволяет значительно снизить и даже практически ликвидировать ложноположительный флуоресцентный сигнал неспецифического связывания компонентов иммунодиагностической системы с белком A при использовании вторичного агента на основе F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов.

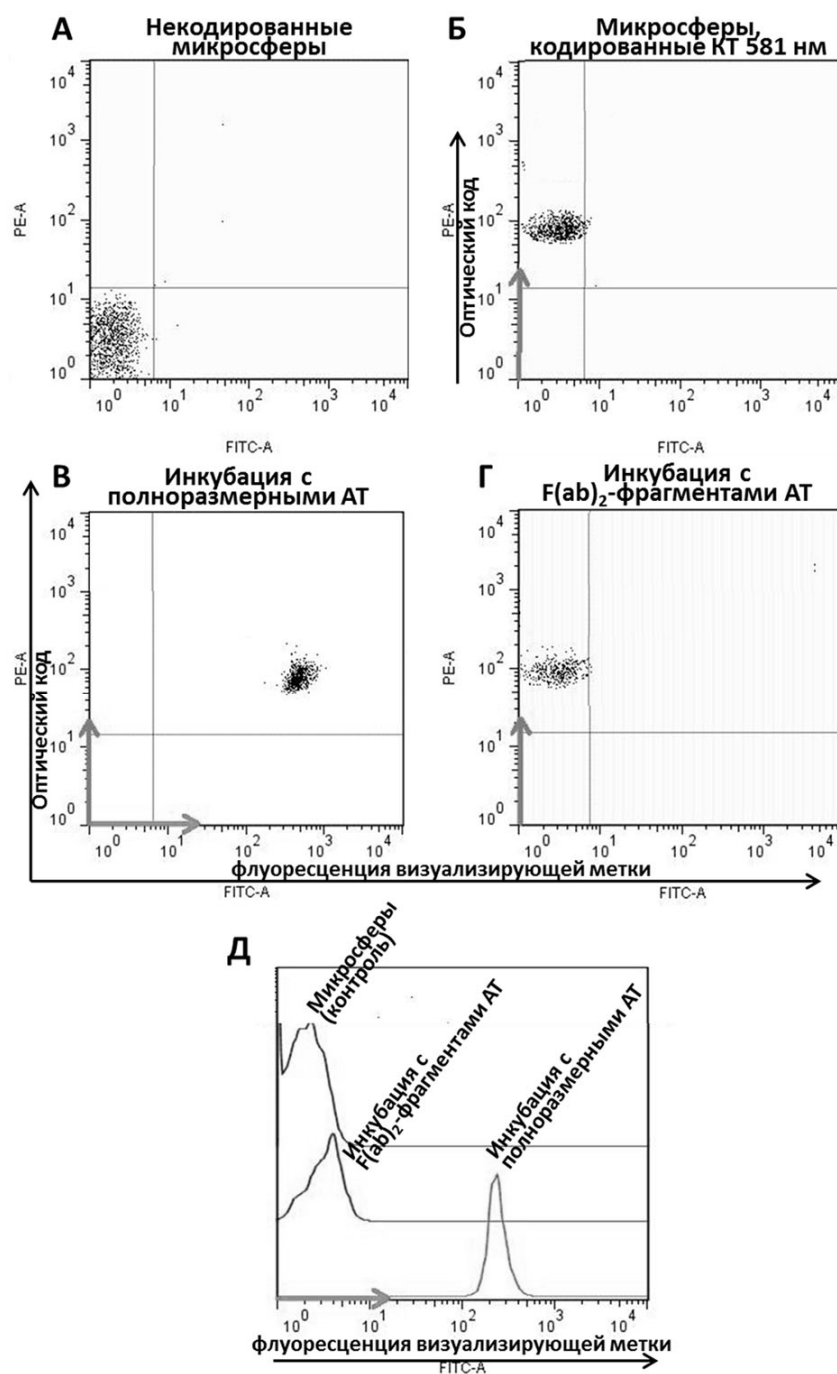
По результатам анализа стандартных растворов рекомбинантного АГ были построены калибровочные графики для количественного определения двух форм ПСА в образцах сыворотки крови (рис. 2). Стандартные диагностические системы для выявления ПСА, используемые в клинической лабораторной практике, позволяют определять истинные концентрации маркеров только в узких диапазонах, где интенсивность флуоресценции линейно зависит от их концентрации (0–10 нг/мл для свободного и 0–60 нг/мл для общего ПСА). Для анализа образцов с более высокими уровнями онкомаркеров необходима предварительная подготовка об-

разца с его разведением до концентрации, попадающей в диапазон линейной зависимости. Как видно из рис. 2, в этом отношении разработанная нами суспензионная система микросфер выгодно отличается от ныне существующих: калибровочные графики содержат дискретные линейные участки на всем диапазоне концентраций АГ в калибровочных пробах (0–100 нг/мл для свободного и 0–2000 нг/мл для общего ПСА). Другими словами, разработанная система позволяет определять как низкие, так и очень высокие концентрации онкомаркеров без предварительного разведения образца и избежать появления ложных результатов при возникновении так называемого хук-эффекта, характерного для стандартного твердофазного иммуноанализа на планарных носителях [9].

Для проверки применимости предлагаемой нами диагностической системы в клинических условиях мы проанализировали несколько образцов сыворотки крови больных РПЖ и здоровых доноров женского пола с помощью разработанных суспензионных микрочипов (рис. 3) и сравнили результаты с данными, полученными ранее с помощью стандартного клинико-лабораторного метода ИФА (Fujirebio Diagnostics). При анализе образцов сыворотки здоровых доноров женского пола сигнал связывания вторичной флуоресцентной метки на поверхности АГ-специфических микросфер оставался низким (рис. 3, В) и соответствовал неспецифическому сигналу (PE-Cy5-отрицательная популяция) (рис. 3, Б). После инкубации с сывороткой крови больного РПЖ с установленными высокими уровнями двух форм ПСА эффективность связывания в составе иммунодиагностических микрочипов и интенсивность флуоресценции визуализирующей метки были значительно выше (PE-Cy5-положительная популяция) (рис. 3, Г). Эти результаты свидетельствуют о том, что разработанная суспензионная система на основе микросфер, кодированных КТ, позволяет оценить содержание двух форм ПСА и качественно дифференцировать сыворотки здоровых доноров и больных РПЖ.

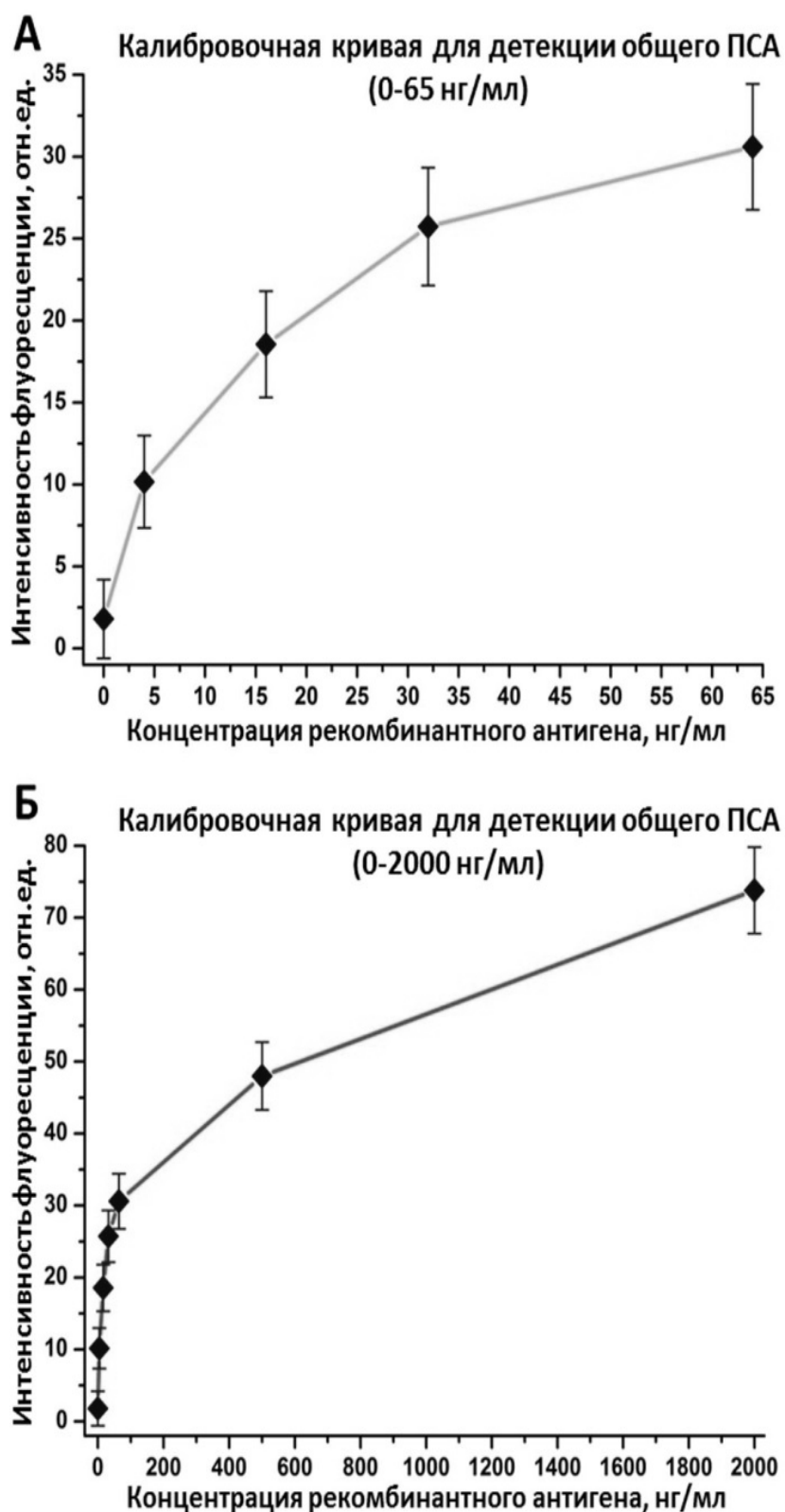
### Заключение

Современные клинико-лабораторные методы ранней диагностики онкологических заболеваний и выбора стратегии их лечения основаны на определении профиля и количественного содержания известных онкомаркеров в клинических образцах [19]. В большинстве случаев для установления точного диагноза требуется количественное определение целого набора онкомаркеров в одном образце. Традиционные методы твердофазного иммуноанализа на планарных носителях по-прежнему остаются наиболее распространенным диагностическим методом в клинической практике [2]. К сожалению, свойства неподвижной планарной матрицы во многом ограничивают возможности оперативной модификации профиля анализируемых параметров, чувствительность, точность, качество и скорость детекции. Многопараметрические суспензионные микрочипы на основе оптически кодированных микросфер имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими планарными биочипами [14]. Для таких систем характерны лучшие кинетика связывания, более широкие диапазоны определяемых концентраций в режиме многопараметрического анализа, принципиальная возможность оперативно увеличения количества выявляемых биомаркеров [1; 8; 22].



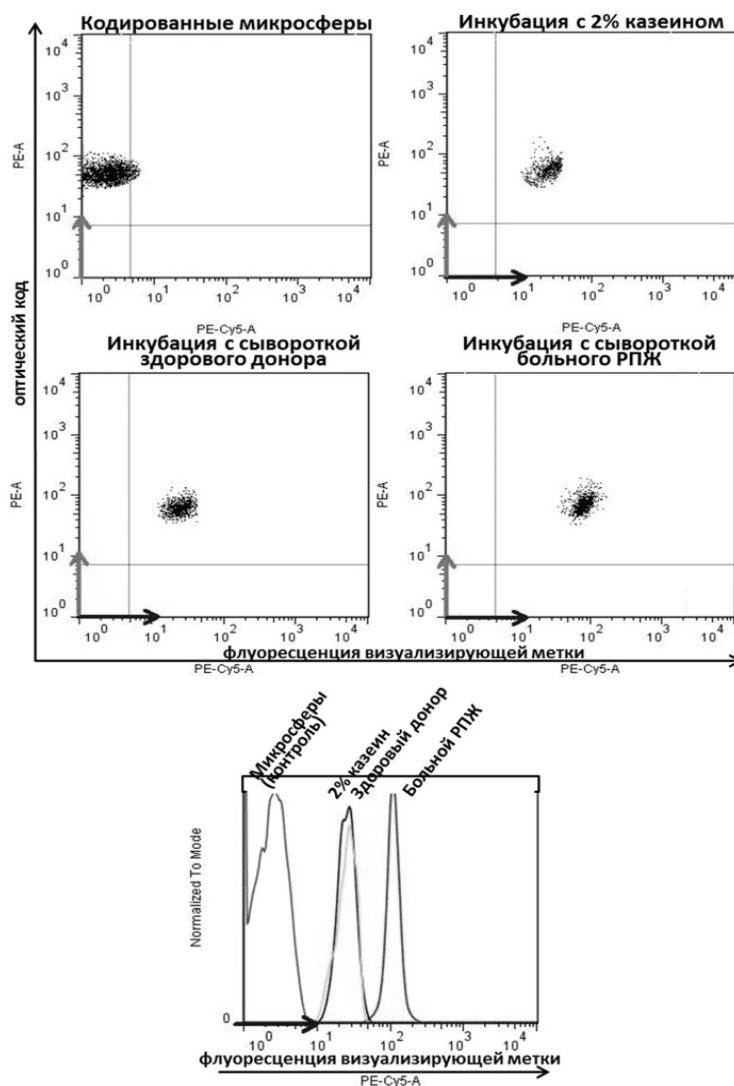
**Рис. 1.** Контроль эффективности конъюгации адаптерных молекул белка А на поверхности микросфер диаметром 4,08 мкм, кодированных КТ, с помощью проточной цитометрии. Возбуждение флуоресценции КТ и вторичной флуоресцентной метки осуществлялось с помощью аргонового лазера с длиной волны излучения 488 нм:

- карбоксилированные латексные микрочастицы, использованные в качестве матрицы для синтеза микросфер, оптически кодированных КТ (РЕ-отрицательная, FITC-отрицательная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм (РЕ-положительная, FITC-отрицательная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм и конъюгированные с адаптерными молекулами белка А: связывание полноразмерных поликлональных АТ, меченных флуоресцеином (РЕ-положительная, FITC-положительная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм и конъюгированные с адаптерными молекулами белка А: отсутствие связывания F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов, меченных флуоресцеином (РЕ-положительная, FITC-отрицательная популяция);
- гистограммы распределения интенсивности флуоресценции вторичной метки (флуоресцеин, FITC) в случае связывания меченых полноразмерных антител или отсутствия связывания меченых F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов с адаптерными молекулами белка А, конъюгированными с поверхностью кодированных микросфер.



**Рис. 2.** Калибровочные кривые для количественного определения общего ПСА в образцах сыворотки крови с помощью суспензионной системы флуоресцентных микросфер, построенные по результатам цитометрического анализа калибровочных растворов рекомбинантного АГ. Представлены результаты трех независимых экспериментов:

- калибровочная кривая для количественного определения оПСА в диапазоне 0–65 нг/мл;
- калибровочная кривая для количественного определения оПСА в диапазоне 0–2000 нг/мл.



**Рис. 3.** Выявление оПСА в образцах сыворотки крови с помощью иммунодиагностических микрочипов на основе микросфер, кодированных КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм, методом ПЦ:

- флуоресцентные микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм (РЕ-положительная, РЕ-Су5-отрицательная популяция, отрицательный контроль);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с 2%-ным раствором казеина и остальными компонентами микрочипа: минимальное неспецифическое связывание визуализирующего конъюгата стрептавидин–Тгi-COLOR (РЕ-положительная, РЕ-Су5-отрицательная популяция);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с сывороткой крови здорового донора женского пола и остальными компонентами микрочипа: флуоресценция визуализирующей метки на уровне неспецифического сигнала связывания (РЕ-положительная, РЕ-Су5-отрицательная популяция);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с сывороткой больного РПЖ и остальными компонентами микрочипа: интенсивная флуоресценция визуализирующей метки при связывании онкомаркера (РЕ-положительная, РЕ-Су5-положительная популяция);
- гистограммы распределения интенсивности флуоресценции вторичной метки, визуализирующей специфические иммунные комплексы выявляемого онкомаркера с антителами после инкубации микросфер, кодированных КТ, с образцами сыворотки крови.

В настоящем исследовании мы разработали универсальную многопараметрическую суспензионную систему нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, адаптируемую для анализа различных профилей онкомаркеров, и продемонстрировали принципы ее применения на примере выявления двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека. Принцип работы суспензионной системы основан на одновременном выявлении нескольких онкомаркеров, связывающихся с поверхностью АГ-специфических популяций микросфер, обладаю-

щих индивидуальными оптическими кодами, с последующей оценкой интенсивности флуоресценции вторичной метки, визуализирующей диагностические комплексы каждой популяции микросфер методом классической проточной цитометрии. Благодаря адаптерным молекулам белка А, конъюгированным с поверхностью микрочастиц, обеспечивается правильная ориентация и эффективное формирование функциональных диагностических микрочипов, а система может быть легко адаптирована для анализа выбранного профиля специфических онкомаркеров, что свидетельствует о ее универ-



сальности. Разработанная система флуоресцентных микросфер позволяет оценить уровень содержания специфических онкомаркеров и качественно дифференцировать образцы сыворотки здоровых доноров и онкологических пациентов с повышенным содержанием опухолевых АГ.

Суспензионные микрочипы нового поколе-

ния на основе микросфер, кодированных КТ, позволяют проанализировать профиль растворимых онкомаркеров с высокой эффективностью, чувствительностью и скоростью, что, несомненно, будет способствовать своевременной ранней диагностике онкологических заболеваний.

#### Благодарности

Данная работа финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Руфаилович Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.inbe.mephi.ru).

#### Литература

1. Бражник К.И., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 11–24.
2. Осипова Т.В., Рябых Т.П., Барышников А.Ю. Диагностические микрочипы: применение в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 72–81.
3. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Деметьева Е.И. и др. Тест-система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простат-специфического антигена в сыворотке крови // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 49–57.
4. Akinfiyeva O., Nabiev I., Sukhanova A. New directions in quantum dot-based cytometry detection of cancer serum markers and tumor cells // Crit Rev Oncol Hematol. – 2012. – 86(1). – P. 1–14.
5. Bjorck L., Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent // J Immunol. – 1984. – 133. – P. 969–74.
6. Cretich M., Damin F., Pirri G. et al. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions // Biomol Eng. – 2006. – 23. – P. 77–88.
7. Czarnik A.W. Encoding methods for combinatorial chemistry // Curr Opin Chem Biol. – 1997. – 1. – P. 60–6.
8. Elshal M.F., McCoy J.P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA // Methods. – 2006. – 38. – P. 317–23.
9. Fuzery A.K., Levin J., Chan M.M. et al. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges // Clin Proteomics. – 2013. – 10. – P. 13–27.
10. Han M., Gao X., Su J.Z. et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules // Nat Biotechnol. – 2001. – 19. – P. 631–5.
11. Kellar K.L., Iannone M.A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays // Exp Hematol. – 2002. – 30. – P. 1227–37.
12. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // Nat Mater. – 2005. – 4. – P. 435–46.
13. Nabiev I., Sukhanova A., Artemyev M. et al. Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems / In: Colloidal nanoparticles in Biotechnology (Elissari A ed.). Wiley, London-Singapore-NY, 2006. – P. 133–68.
14. Nolan J.P., Sklar L.A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm // Trends Biotechnol. – 2002. – 20. – P. 9–12.
15. Petrik J. Diagnostic applications of microarrays // Transfus Med. – 2006. – 16. – P. 233–47.
16. Pregibon D.C., Toner M., Doyle P.S. Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis // Science. – 2007. – 315. – P. 1393–6.
17. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // Nat Methods. – 2008. – 5. – P. 763–75.
18. Shi L., Rosenzweig N., Rosenzweig Z. Luminescent quantum dots fluorescence resonance energy transfer-based probes for enzymatic activity and enzyme inhibitors // Anal Chem. – 2007. – 79. – P. 208–14.
19. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic // Clin Chem. – 2002. – 48. – P. 1151–9.
20. Sukhanova A., Devy J., Venteo L. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Anal Biochem. – 2004. – 324. – P. 60–7.
21. Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Kisserli A. et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe // Nanomedicine. – 2012. – 8. – P. 516–25.
22. Sukhanova A., Nabiev I. Fluorescent nanocrystal-encoded microbeads for multiplexed cancer imaging and diagnosis // Crit Rev Oncol Hematol. – 2008. – 68. – P. 39–59.
23. Sukhanova A., Susha A.S., Bek A. et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases // Nano Lett. – 2007. – 7. – P. 2322–7.
24. Sukhorukov G.B., Donath E., Moya S. et al. Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes // J Microencapsul. – 2000. – 17. – P. 177–85.
25. Susha A.S., Caruso F., Rogach A.L. et al. Formation of luminescent spherical core-shell particles by the consecutive adsorption of polyelectrolyte and CdTe (S) nanocrystals on latex colloids // Colloids Surf. – 2000. – 163(A). – P. 39–44.

#### СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
АТ	антитело
ИФА	иммуноферментный анализ
КТ	квантовая точка
ПСА	простатический специфический антиген
oПСА	общий простатический специфический антиген
ПЦ	проточная цитометрия
РПЖ	рак предстательной железы
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	Förster resonance energy transfer
MF	melamine formaldehyde
РАА	poly(acrylic acid, sodium salt)
РАН	poly(allylamine hydrochloride)
PE	phycoerythrin
PE-Cy5	phycoerythrin-cyanine 5
PSA	prostate-specific antigen
PSS	poly(sodium 4-styrenesulfonate)
ТОПО	trioctylphosphine oxide