

DOI: 10.7868/S0869813918060084

## ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В ЭНДОСОМАХ

© В. В. Кошеверова,<sup>1</sup> И. К. Литвинов,<sup>1,4</sup> М. В. Харченко,<sup>1</sup>  
Р. С. Каменцева,<sup>1</sup> Е. С. Корнилова<sup>1–4</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: kosheverova\_vera@incras.ru;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики,  
Санкт-Петербург, Россия

Исследовано влияние трех различных неионных детергентов (дигитонин, Brij56, Triton X-100) на фотостабильность квантовых точек (QDs) в эндосомах фиксированных клеток. QDs использовали в качестве флуоресцентной метки для эпидермального фактора роста (ЭФР), который в комплексе со своим рецептором интернализуется в клетки в составе эндосом. Оказалось, что пермеабилзация таких клеток, фиксированных раствором формальдегида через 15 мин после стимуляции эндоцитоза, 0.5%-ным раствором Triton X-100 приводила к исчезновению флуоресцентного сигнала QDs уже на 3-и сутки после приготовления препаратов. Добавление к отмывочному раствору 0.1 % Tween 20 также подавляло флуоресценцию QDs. При этом применение более мягких детергентов дигитонина и Brij56 не оказывало видимого влияния на флуоресценцию квантовых точек даже на 14-е сутки эксперимента. Полученные результаты указывают на необходимость учитывать этот эффект детергентов Triton X-100 и Tween 20 при использовании квантовых точек в иммунофлуоресцентных методах исследования.

*Ключевые слова:* квантовые точки, иммунофлуоресценция, детергенты, эндосомы.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 665—669. 2018

V. V. Kosheverova,<sup>1</sup> I. K. Litvinov,<sup>1,4</sup> M. V. Kharchenko,<sup>1</sup> R. S. Kamentseva,<sup>1</sup> E. S. Kornilova.<sup>1–4</sup> INFLUENCE OF DETERGENTS ON FLUORESCENT PROPERTIES OF QUANTUM DOTS LOCALIZED IN ENDOSOMES. <sup>1</sup> Institute of Cytology of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: kosheverova\_vera@incras.ru; <sup>2</sup> Saint Petersburg University, St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup> ITMO University, St. Petersburg, Russia.

Influence of three nonionic detergents (digitonin, Brij56, Triton X100) on the photostability of quantum dots (QDs), localized in the endosomes of fixed cells was instigated. QDs were used as the fluorescent label for the epidermal growth factor (EGF), which is internalized within endosomes into the cells in the EGF receptor-bound form. We have shown that the permeabilization of cells, preliminarily fixed by the formaldehyde solution 15 min after endocytosis stimulation, by 0.5 % Triton X100, lead to the extinction of the Qds' fluorescent signal on the 3<sup>rd</sup> day after cell

labelling. The addition of 0.1 % Tween 20 to washing solution also decreased Qds' fluorescence. At the same time, application of more mild detergents digitonin and Brij56 did not influence Qds' fluorescence even on the 14th day of the experiment. Obtained results point to the necessity of accounting this effect of the detergents Triton X100 and Tween 20 on the Qds' fluorescence when using Qds in the methods of fluorescent antibody staining.

*Key words:* quantum dots, immunofluorescence, detergents, endosomes.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 665—669. 2018

В настоящее время одной из основных методик, применяемых для анализа различных внутриклеточных процессов, является метод иммунофлуоресцентного мечения. Этот метод предполагает использование антител, способных специфично связываться с антигеном, расположенным внутри или на поверхности клетки. Также метод включает в себя применение флуоресцентной метки, конъюгированной с антителом, что позволяет визуализировать в клетке с помощью оптической микроскопии распределение антигена интереса. Флуоресцентные метки (флуорофоры) различны по своей природе и обладают определенными характеристиками, такими как ширина спектра поглощения (возбуждения) и испускания, скорость выгорания, квантовый выход, что определяет возможное время анализа препарата под микроскопом, возможность комбинации данного флуорофора с другими и др.

Флуорофорами нового поколения, которые недавно нашли свое применение при анализе биологических объектов, являются полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы, так называемые квантовые точки (QDs). От других флуорофоров их отличает высокая фотостабильность (на несколько порядков превышающая фотостабильность органических флуорофоров), высокий квантовый выход и узкий спектр испускания [7]. Все они возбуждаются в УФ-области, а длина волны испускания зависит от размера ядра. Они характеризуются большим сдвигом Стокса, т. е. большой разницей между длинами волн поглощения и испускания, что дает возможность их совместного использования с несколькими различными флуорофорами на одном препарате. При всех описанных преимуществах, однако, следует учитывать, что QDs являются сложными физическими объектами, оптические свойства которых могут изменяться в зависимости от химического состава микроокружения.

Мы используем квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином, что позволяет применять их в качестве флуоресцентной метки для биотинилированного эпидермального фактора роста (ЭФР). ЭФР — лиганд, специфически связывающийся на поверхности клетки с трансмембранным рецептором-тирозинкиназой. Связывание ЭФР с его рецептором индуцирует интернализацию лиганд-рецепторных комплексов внутрь клетки клатрин-зависимым путем, что приводит к поступлению комплексов в ранние и затем в поздние эндосомы и ведет к их деградации в лизосомах [2].

Ранее мы установили, что фиксация клеток формалином не изменяет характеристики флуоресценции QDs в эндосомах по сравнению с живыми клетками. Однако в ходе исследований с совместным применением квантовых точек и иммунофлуоресцентным мечением внутриклеточных антигенов другими флуорофорами на фиксированных клетках мы обнаружили, что пермеабиллизация мембраны клеток, применяемая для обеспечения проникновения в клетку антител, с помощью неионного детергента Triton X-100 (0.5 %) приводит к исчезновению флуоресценции квантовых точек уже на 2—3-и сутки после приготовления препарата. При этом свечение флуорофоров Alexa 488, 568, Cy3 и других сохраняется на этих препаратах в течение по крайней мере 2 месяцев. В связи с этим целью настоящей работы являлась оптимизация методики иммунофлуоресцентного мечения клеток путем подбора детергентов в экспериментах с использованием квантовых точек в качестве флуоресцентной метки.

## МЕТОДИКА

Работу проводили на клетках линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде DMEM с глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки, при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub>. В работе использовали квантовые точки на основе CdSe/ZnS диаметром 10—15 нм с максимумом испускания при 655 нм, покрытые гидрофильной оболочкой, состоящей из молекул полиэтиленгликоля (Invitrogen). Эндоцитоз рецептора ЭФР запускали по методике импульсной загрузки лиганда. Для этого ЭФР-биотин (2 нМ) предварительно инкубировали с конъюгированными со стептавидином квантовыми точками (2 нМ), после чего полученные комплексы ЭФР-QDs добавляли к клеткам на 5 мин при 37 °С, а затем отмывали от несвязавшегося лиганда и оставляли еще на 10 мин в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С для стимуляции эндоцитоза. После этого клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом, приготовленным на PBS в течение 15 мин при t<sub>комн</sub> с последующей 5-кратной отмывкой PBS. На этапе пермеабилзации клеток препараты инкубировали либо в растворе 0.5%-ного Triton X-100 на PBS (15 мин, t<sub>комн</sub>), либо в растворе мягкого неионного детергента Brij56 на PBS (0.05 %, 15 мин, t<sub>комн</sub>), либо в растворе дигитонина (45 мкг/мл, 10 мин, 4°С, при постоянном покачивании), либо в отсутствие детергентов (контроль). После этого клетки отмывали PBS или PBS с добавлением неионного детергента Tween 20 (0.1 %). Для визуализации ядра клеток препараты окрашивали красителем DAPI. Наличие флуоресценции квантовых точек в клетках исследовали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) в день эксперимента (1-е сутки), а также на 3-й и 14-й день после приготовления препаратов. Для этой флуоресценцию QDs возбуждали лазером (405 нм) и детектировали в диапазоне 640—670 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех случаях непосредственно после фиксации детектировали точечное распределение флуоресценции квантовых точек, характерное для эндосомной локализации ЭФР на ранних стадиях эндоцитоза (Kosheverova\_01).

Такое распределение квантовых точек, конъюгированных с ЭФР, было описано нами ранее и соответствует распределению интернализированных в клетки ЭФР-рецепторных комплексов [5]. При этом показано, что свободные неконъюгированные с лигандом квантовые точки не проникают в клетки при использованных условиях инкубации [1]. Ранее мы также продемонстрировали, что поступление в клетки ЭФР, связанного с квантовыми точками, существенно не изменяет динамики эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов [5, 6]. В ходе проведенного исследования мы обнаружили, что применение наиболее распространенного детергента Triton X-100 приводило к исчезновению флуоресцентного сигнала от квантовых точек на 3-й день после приготовления препаратов (рис. 1). Напротив, использование мягких детергентов Brij56 или дигитонина не влияло на флуоресценцию QDs и позволяло детектировать в клетках сигнал от квантовых точек на 14-е сутки после приготовления препарата. Поскольку в стандартных методиках подготовки иммунофлуоресцентных препаратов на этапе отмывки к раствору PBS часто добавляют 0.1 % Tween 20, мы также проверили, влияет ли этот детергент на стабильность флуоресценции квантовых точек. Оказалось, что добавление к отмывочному раствору этого детергента также приводило к полному исчезновению флуоресценции QDs в контрольных клетках, не подвергавшихся обработке другими детергентами, на 14-е сутки эксперимента (Kosheverova\_02) (рис. 2).

Таким образом, при использовании квантовых точек в иммуноцитохимических исследованиях важно учитывать влияние детергентов на их свойства.

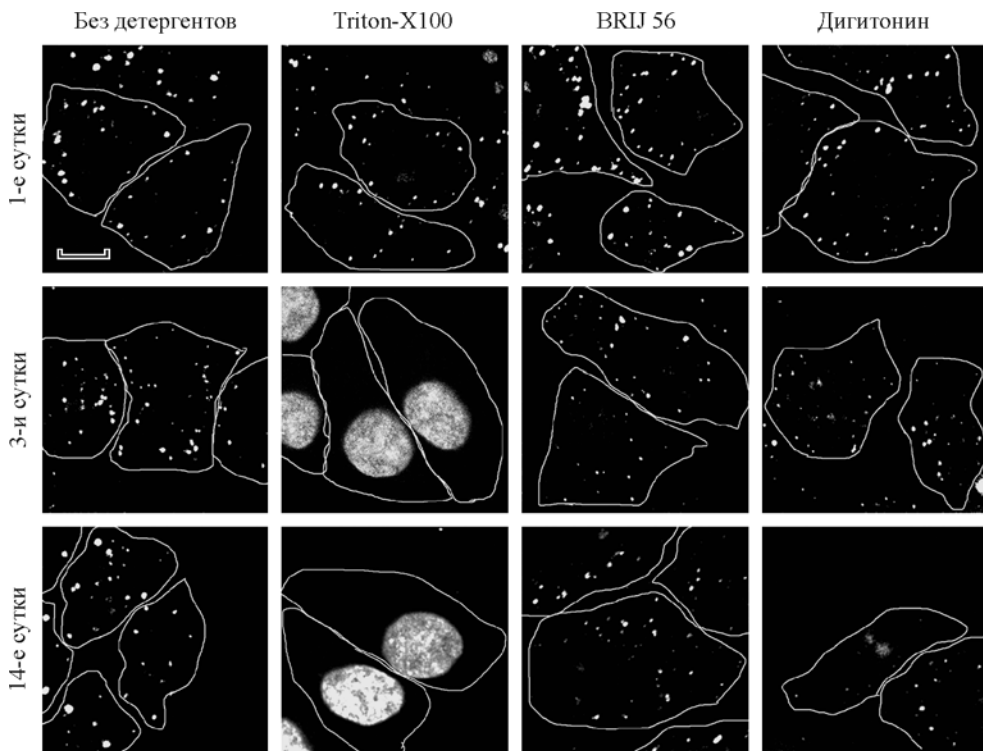


Рис. 1. Выявление флуоресценции квантовых точек (QDs) в клетках, обработанных различными детергентами.

Выявление флуоресценции квантовых точек производили в клетках на 1-е сутки (верхний ряд), 3-и сутки (средний ряд), 14-е сутки (нижний ряд) после приготовления препаратов. Препараты либо не обрабатывали детергентами (левый столбец), либо обрабатывали растворами Triton X-100, Brij56, дигитонина (слева направо). Обозначены контуры клеток. Флуоресценцию QDs регистрировали в канале 640—670 нм. В случае, если квантовые точки не выявлялись в клетках (обработка Triton X-100 3-и, 14-е сутки), на рисунках также показан канал детекции DAPI (ядро клетки). Масштабный отрезок — 10 нм.

Можно предположить, что гашение флуоресценции квантовых точек связано с тем, что достаточно жесткие детергенты Triton X-100 и Tween 20, нарушая целостность не только плазматической, но и эндосомной мембраны, способны напрямую взаимодействовать с поверхностью QDs, изменяя оптические свойства нанокристаллов. Оптимальными детергентами в этом случае оказываются более мягкие детергенты Brij56 и дигитонин. Известно, что в отличие от Triton X-100 и Tween 20 эти детергенты разрушают плазматическую мембрану, но слабо повреждают эндогенные мембраны. Среди проверенных нами детергентов особое место по механизму своего действия на клеточные мембраны занимает дигитонин. Известно, что дигитонин специфически экстрагирует из мембран холестерин [3]. Учитывая тот факт, что холестерин в значительных количествах обнаруживается в составе плазматических мембран и мало представлен во внутренних мембранах [4], в том числе в мембране эндосом, можно предположить, что дигитонин слабо пермеабилзирует мембрану эндосом. Относительное сохранение целостности эндосомальной мембраны в свою очередь позволяет минимизировать непосредственный контакт квантовой точки с детергентом.

Таким образом, можно заключить, что использование лигандов, меченных QDs, наиболее эффективно в случаях анализа поведения меченых молекул в интактных клетках и/или эндосомах. Однако, если в ходе эксперимента существует

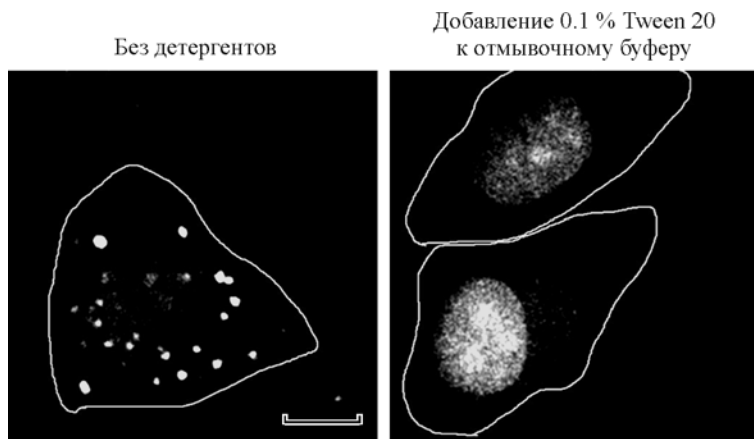


Рис. 2. Оценка действия детергента Tween 20 (при добавлении к отмывочному буферу) на флуоресценцию QDs в клетках.

Выявление флуоресценции квантовых точек производили в клетках на 14-е сутки после приготовления препаратов. Приготовление препаратов не включало этапа пермеабилзации клеток. Препараты отмывали либо раствором PBS (левый столбец), либо раствором 0.1 % Tween 20 на PBS. Обозначены контуры клеток. Флуоресценцию QDs регистрировали в канале 640—670 нм. В случае, если квантовые точки не выявлялись в клетках, на рисунках также показан канал детекции DAPI (ядро клетки). Масштабный отрезок — 10 нм.

необходимость в одновременном выявлении лигандов и антигенов, локализованных внутри эндосом, что, как правило, связано с обработкой клеток Triton X-100, следует учитывать описанный в нашей работе эффект гашения флуоресценции квантовых точек.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) № 14-50-0068, ФАНО России и госзадаанием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Беляева Т. Н., Салова А. В., Леонтьева Е. А., Моженок Т. М., Корнилова Е. С., Кроленко С. А. Нецелевые квантовые точки в прижизненных конфокально-микроскопических исследованиях клеток. *Цитология*. 51 (10): 830—836. 2009.
- [2] Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem. Soc. Trans.* 31(6): 1178—1181. 2003.
- [3] Linke D. Detergents: an overview. *Methods Enzymology*. 463. 603—617. 2009.
- [4] Lippincott-Schwartz J., Phair R. D. Lipids and cholesterol as regulators of traffic in the endomembrane system. *Annu. Rev. Biophys.* 39: 559—578. 2010.
- [5] Salova A. V., Belyaeva T. N., Leontieva E. A., Zlobina M. V., Kharchenko M. V., Kornilova E. S. Quantum dots implementation as a label for analysis of early stages of EGF receptor endocytosis: a comparative study on cultured cells. *Oncotarget*. 7(5): 6029—6047. 2016.
- [6] Salova A. V., Belyaeva T. N., Leontieva E. A., Kornilova E. S. EGF receptor lysosomal degradation is delayed in the cells stimulated with EGF-Quantum dot bioconjugate but earlier key events of endocytic degradative pathway are similar to that of native EGF. *Oncotarget*. 8(27): 44 335—44 350. 2017.
- [7] Yoffe A. D. Semiconductor quantum dots and related systems: electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems. *Adv. Phys.* 50(1): 1—208. 2001.

Поступила 23 IV 2018