

**Разработка протоколов пробоподготовки и анализа ооцитов млекопитающих для
времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов**

А.А. Гулин^{1,3}, В.А. Надточенко^{1,2,3}, А.Г. Погорелов⁴

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Исследования биологических объектов при помощи времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) приобретают все большую популярность, благодаря возможности одновременной регистрации большого числа соединений (липиды, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и т. д.) и их локализации с пространственным разрешением до 100 нм [1]. Более того, TOF-SIMS позволяет исследовать изменения в локализации химического состава при различных физико-химических воздействиях на образец. Одним из перспективных примеров такого применения метода может быть исследования изменений, происходящих в эмбрионах млекопитающих на ранних стадиях развития, вызванных воздействием лазерного излучения (при манипуляциях на основе нано- и микрохирургии). Однако, столь амбициозная цель требует тщательной разработки протокола приготовления и анализа образца.

Для разработки протокола использовались ооциты мыши на стадии GV. Для подготовки образца к анализу в условиях вакуума производилась криофиксация при помощи жидкого пропана с последующей лиофилизацией (freeze-drying). Высушенные ооциты помещались в заливочную среду. Поскольку TOF-SIMS анализ носит поверхностный характер (разрешение по глубине не превышает 20 нм), для исследования состава в области ядра требуется приготовление срезов на микротоме. Нужные срезы и области для анализа выбиралась при помощи оптической и сканирующей электронной микроскопии. Срезы помещались на токопроводящую подложку (для стока статического заряда, вызванного бомбардировкой ионов). Идентификация выбранной области для анализа в масс-спектрометре производилась без использования меток при помощи встроенной микрокамеры по характерным топографическим особенностям. Анализ производился сначала в спектроскопическом режиме с высоким разрешением по массе, без исследования локализации ионов. По полученным масс-спектрам были

идентифицированы основные компоненты. Визуализация распределения выбранных ионов производилась в режиме имиджинга с высоким пространственным разрешением (200 нм). Полученные ионные изображения были совмещены с оптическими для установления связи между морфологией ооцита и его составом.

Работа была выполнена при поддержке гранта Министерства Образования и Науки РФ «Разработка высокоэффективной и минимально инвазивной технологии манипуляций с ранними эмбрионами млекопитающих на основе нано- и микрохирургии с использованием фемтосекундных и непрерывных лазеров с излучением в окне прозрачности биологической ткани» №. 14.604.21.0058 (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0058).

Литература

[1] Surface Analysis and Techniques in Biology /ed. by V.S. Smentkowski – New York: Springer, 2014. – 326 p.