

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ToF-SIMS ДЛЯ АНАЛИЗА БИООРГАНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

© 2018 г. А.Г. Погорелов*, А.А. Гулин** ***, В.Н. Погорелова*, А.И. Панаит*,
М.А. Погорелова*, В.А. Надточенко** *** ****

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

***Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

****Институт проблем химической физики РАН,
142432, Черноголовка Московской области, просп. академика Семенова, 1

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.01.18 г.

Методика подготовки среза биологической ткани, отработанная для электронно-зондового микроанализа элементов, адаптирована к ToF-SIMS-анализу ооцитов мыши на GV-стадии развития. Последовательность пробоподготовки GV-ооцитов включает следующие этапы: криофиксация, низкотемпературная дегидратация, заключение в заливочную среду, получение срезов. С использованием описанной методики и ToF-SIMS-анализа получены карты распределения ряда молекул в отдельном ооците. Данные ToF-SIMS-анализа показывают, что эффективное латеральное разрешение для молекулярного картирования соответствует значению около 1 мкм. В этом случае ToF-SIMS-анализ позволяет изучать распределение химических веществ, которое соотносится с результатами наблюдения морфологии методами сканирующей электронной микроскопии или обычной световой микроскопии.

Ключевые слова: ToF-SIMS, молекулярное картирование, сканирующая электронная микроскопия (SEM), пространственное разрешение, GV ооцит мыши.

Возрастающий интерес к ToF-SIMS (time-of-flight secondary ion mass spectroscopy, времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов) обусловлен возможностью решения широкого спектра фундаментальных и прикладных задач в области биологии и медицины, что обсуждают в нескольких обзорах [1–3]. В области анализа биологических образцов данный метод прежде всего может быть привлечен для определения молекулярного состава поверхности [4]. Использование ToF-SIMS применительно к мягким биологическим тканям и отдельным клеткам ограничено их составом и физическими свойствами, которые не характерны для типичных объектов, традиционно анализируемых данным методом – твердых неорганических тел (сплавов, полупроводников и т.д.). Одним из лимитирующих факторов является высокое содержание (~80%) воды в клетке, что делает невозможным непосредственный

анализ такого образца в камере высоковакуумного прибора. Чтобы преодолеть данное техническое ограничение, разрабатывают различные подходы [5]. Однако до сих пор нет однозначного понимания того, какие условия следует соблюдать при пробоподготовке препарата с тем, чтобы результаты ToF-SIMS были адекватны поставленной биологической задаче [6–8]. Цель данной работы заключается в том, чтобы предложить унифицированный подход для ToF-SIMS клетки и ее органелл, систематизируя собственный опыт и данные, опубликованные в литературе.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В основе метода ToF-SIMS лежит бомбардировка поверхности образца пучком ускоренных первичных ионов. Выбитые вторичные ионы (ионы образца) разделяются по соотношению m/z при помощи времяпролетного масс-анализатора. Современные масс-спектрометры по сути могут функционировать в двух режи-

Сокращение: ToF-SIMS – времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов.

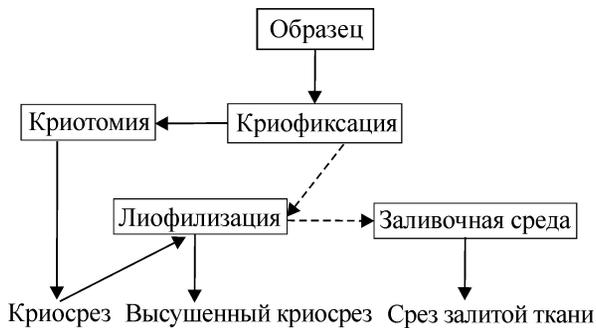


Рис. 1. Схема последовательности событий в различных протоколах подготовки препарата для ToF-SIMS-анализа молекулярного состава клетки.

мах – спектроскопическом и в виде сканирующего ионного микроскопа с режимом молекулярного картирования поверхности. В наших исследованиях молекулярные карты получали на времяпролетном масс-спектрометре вторичных ионов TOF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия). Препарат ионизировали сфокусированным пучком первичных кластерных ионов Bi^{3+} с энергией 30 кэВ. Для компенсации статического заряда использовали электронную пушку. Позиционирование на исследуемую область образца осуществляли с помощью микровидеокамеры, встроенной в масс-спектрометр. При молекулярном картировании зрелого ооцита мыши участок поверхности размером 110×110 мкм сканировали в импульсном режиме. Пучок первичных ионов, сфокусированный в диаметре ~ 200 нм, после импульса длительностью ~ 70 нс и регистрации вторичных ионов (~ 80 мкс) перемещали в следующую точку (пиксель) так, что размерность исследуемого участка соответствовала 512×512 пикселям. Плотность дозы облучения первичными ионами не превышала $\cong 5 \cdot 10^{12}$ ионов/см².

В качестве тест-объекта использовали 2 мкм срезы заливочной среды на основе эпоксидной смолы Епон-812. Указанный композит после полимеризации устойчив в вакууме к воздействию ускоренными электронами и поэтому применяется в электронной микроскопии в качестве заливочной среды для биологических тканей [9,10]. Помимо изучения ультраструктуры клетки Епон использовали при подготовке срезов для электронно-зондового микроанализа и световой микроскопии [11,12], лазерной сканирующей микроскопии [13], а также ToF-SIMS-анализа и атомно-силовой микроскопии [14]. Отметим, что по своим физико-химическим характеристикам матрица заливочной среды Епон моделирует органическую пленку.

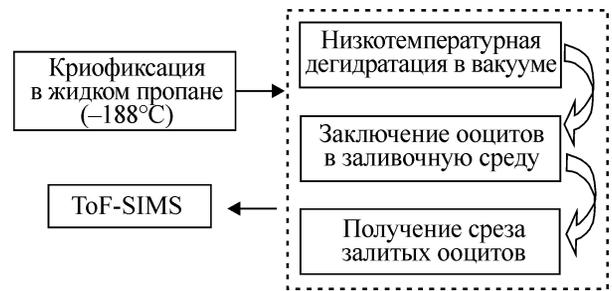


Рис. 2. Последовательность этапов подготовки препарата изолированного зрелого ооцита мыши для ToF-SIMS-анализа молекулярного состава клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принципы подготовки препарата клеток для ToF-SIMS. Принципиальное условие при выборе методики состоит в том, чтобы в течение всей процедуры подготовки препарата исключить модификацию молекулярного состава и сохранить его внутриклеточное распределение на субмикронном уровне. Поэтому следует избегать химическую обработку биологического образца, в особенности его дегидратацию в органических растворителях, приводящую к вымыванию липидных компонент [8]. Указанные требования обеспечивает криофиксация и сопутствующие методы подготовки биологических объектов [1,3]. Схема, приведенная на рис. 1, суммирует комплекс криогенных подходов, основанных на быстрой низкотемпературной фиксации ткани.

Схема подготовки препарата (рис. 1) может быть применена также для суспензии клеток или клеточных органелл после их осаждения в центрифуге. Полученный в результате осадок позволяет в полной мере использовать весь комплекс криогенных подходов. Последовательность манипуляций после криофиксации зависит от оснащения лаборатории соответствующей приборной базой. Часто выбор методики обусловлен требованиями эксперимента или свойствами объекта исследования. Отметим особый случай, когда анализируют клетки в штучном варианте, например изолированные ооциты млекопитающих. В рамках общей концепции, основанной на криофиксации, учитывая небольшой размер яйцеклетки (~ 80 мкм) и ограниченное количество клеток, для ооцита мыши разработана методика, в результате которой получали препарат в виде среза клетки [14]. Этапы данной методики представлены на схеме (рис. 2).

Недостатком используемой ToF-SIMS-установки является существенное ограничение визуализации изучаемого участка (ввиду малого

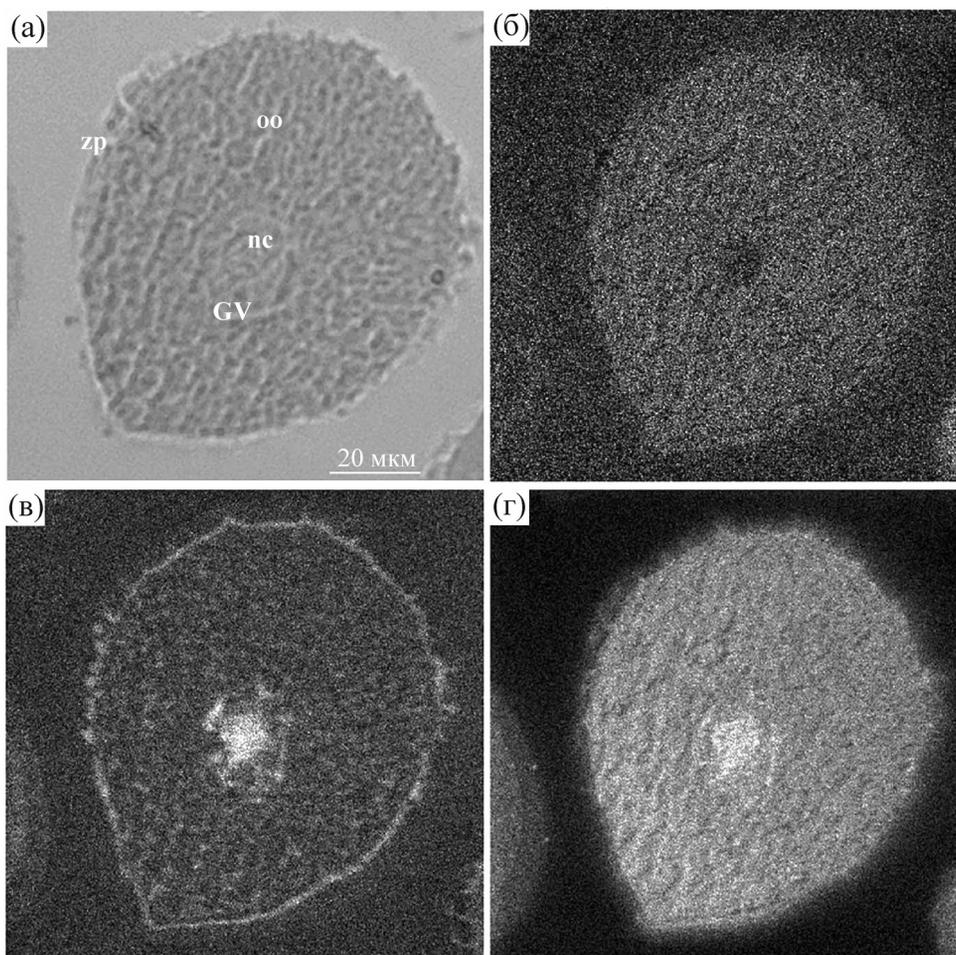


Рис. 3. ToF-SIMS-анализ зрелого ооцита мыши на стадии развития GV: (а) – микрофотография яйцеклетки, полученная в оптическом микроскопе на срезе, параллельном анализируемому; (б–г) – молекулярные карты поверхности среза яйцеклетки ((б) – HS^- , (в) – $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$, (г) – PO_3^-). Обозначения: oo – ооцит, GV – ядро, nc – ядрышко, zp – оболочка ооцита.

увеличения встроенной микрокамеры), что важно для неоднородных по составу микрообъектов. С целью соотнесения морфологии клетки и молекулярных карт использовали изображение, полученное для параллельного среза в оптическом микроскопе (рис. 3а). Результат комбинированной микроскопии иллюстрирует рис. 3.

Завершая данный раздел следует отметить, что наиболее адекватным подходом подготовки препарата для ToF-SIMS-анализа является комплекс криогенных методов получения срезов, основанный на низкотемпературной фиксации биологического образца. Для примера, криосрезы успешно использовали как для ToF-SIMS-, так и MALDI-MS-анализа образцов мягких биологических тканей [1,15–20]. К сожалению, в силу ряда методических сложностей данный подход пока неприменим для получения криосрезов микрообъекта размером с изолированный ооцит млекопитающих.

Пространственное разрешение ToF-SIMS.

ToF-SIMS рассматривается в качестве метода молекулярного картирования с высоким пространственным распределением, включающим два параметра: латеральное разрешение (в плоскости поверхности) и разрешение по глубине. В первом случае отмечают субмикронное морфологическое разрешение для молекулярных карт биологического образца. Рис. 4 иллюстрирует латеральное разрешение ToF-SIMS, полученное на поверхности среза зрелого ооцита мыши в GV-фазе развития.

В отличие от предыдущего рисунка, визуализацию и ToF-SIMS-картирование проводили на одном срезе. Для сравнительного изучения морфологии изолированного ооцита мыши использовали сканирующую электронную микроскопию (рис. 4а). Контрастное изображение распределения фрагментов аминокислот (рис. 4б) на анализируемом участке позволяет оценить

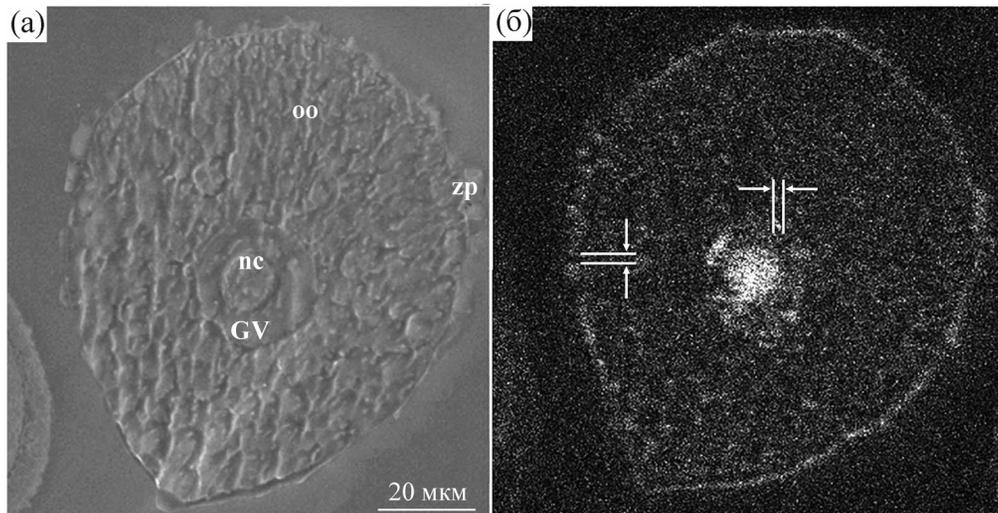


Рис. 4. ToF-SIMS-анализ зрелого ооцита мыши на стадии развития GV: (а) – микрофотография яйцеклетки, полученная в сканирующем электронном микроскопе, (б) – молекулярная карта поверхности того же среза для ионов CH_4N^+ . Обозначения: oo – ооцит, GV – ядро, nc – ядрышко, zp – оболочка ооцита.

эффективное латеральное разрешение ToF-SIMS. Данный параметр можно характеризовать двумя показателями – минимальным линейным размером визуализируемой частицы и минимальным визуально определяемым расстоянием между двумя частицами. На рис. 4б эти показатели отмечены цифрами 1 и 2 соответственно. Видно, что эффективное пространственное разрешение ToF-SIMS составляет менее 1 мкм. В случае использования пучка первичных ионов Vi^{3+} указанное латеральное разрешение сопоставимо с тем, что получено для органических материалов другими авторами [1, 21].

Уникальные возможности ToF-SIMS обусловлены также разрешением метода по глубине препарата, которое составляет несколько молекулярных слоев, что предъявляет особое требование к чистоте поверхности. Другими словами, наличие над анализируемой поверхностью привнесенного слоя толщиной несколько десятков нанометров качественно изменит данные молекулярного картирования. Экранирующий эффект оказывает не только поверхностное загрязнение, но и цитоплазма для органелл, расположенных внутри клетки. Таким образом, ToF-SIMS-анализ внутриклеточной структуры возможен только, если исследуемый компартимент находится в поверхностных слоях препарата.

Чтобы выполнить данное условие, используют прием «freeze-fracture», когда образец после криофиксации раскалывают в вакууме при низких температурах. Однако при этом разлом проходит произвольным образом, т.е. его по-

верхность не всегда будет соответствовать нужному для анализа сечению. Альтернативный метод – микротомия – позволяет контролируемо получить срез в любой плоскости сечения клетки [22,23]. Если оценивать метод по критерию сохранности молекулярного состава, отсутствию загрязнения и эффективности методики, то криомикротомия замороженного образца является наиболее адекватным подходом подготовки препарата для ToF-SIMS-анализа.

Молекулярное картирование (2D imaging) ToF-SIMS. Интенсивность масс-спектра драматически зависит от угла падения первичных ионов к поверхности [24]. Профиль сложной геометрии может порождать ошибочный результат, имитируя, например, наличие градиента концентрации молекулярного состава. Для используемого нами прибора ToF-SIMS 5 данную зависимость изучали, изменяя при помощи встроенного гониометра угол наклона образца по отношению к пушке (рис. 5).

Видно (рис. 5), что уже при изменении угла наклона в 5° интенсивность вторичных ионов CH_2 уменьшается до уровня менее 20% от исходного значения, а ионы CH_3 практически полностью перестают регистрироваться. Показано, что эффект рельефа на молекулярный спектр отсутствует в случае, если неровности на поверхности не превышают 1 мкм по высоте [25]. Поэтому при интерпретации ToF-SIMS-карт, полученных после применения «freeze-fracture», следует учитывать грубую топографию поверхности скола [26]. Этот фактор служит еще одной причиной, почему исследования проводят на образцах с относительно

ровной поверхностью [21,27]. Таким образом, чтобы избежать артефактов, обусловленных кривизной поверхности препарата, следует проводить ToF-SIMS-картирование на срезах, которые могут быть подготовлены в виде криосреза, лиофилизированного криосреза или среза лиофилизированной ткани, предварительно заключенной в заливочную среду, устойчивую к действию ускоренных частиц в вакууме.

Sputtering – ионное травление поверхности препарата. Термин «sputtering» применительно к ToF-SIMS-анализу означает удаление под воздействием ускоренных ионов поверхностного слоя, например, чтобы очистить образец от загрязнения [21,26,28]. Продолжительное ионное травление приводит к удалению поверхностного слоя, толщина которого зависит от длительности обработки, тока и энергии ионов. Часто данный режим используют для того, чтобы нужную внутреннюю структуру клетки вывести в плоскость анализируемой поверхности. При этом трудоемкий процесс микротопии заменяется послойным ионным травлением препарата. В используемом нами приборе режим травления обеспечивает дополнительный источник, эмитирующий ионы цезия (Cs-sputtering). Эффект длительного ионного травления на качество анализируемой поверхности мы исследовали в модельном эксперименте, используя срез толщиной 2 мкм, приготовленный из заливочной среды Epon (рис. 6).

На микрофотографии представлена топография поверхности среза в области Cs-sputtering. На обзорном снимке (рис. 6а) видно дно кратера травления (область 1) и поверхность среза рядом с кратером (область 2). Изображение поверхности среза рядом с областью травления при большем увеличении показано во врезке на рис. 6а. Изображение рельефа в зоне Cs-sputtering приведено на рис. 6б. Отметим, что глубина травления образца варьирует по поверхности от точки к точке, что обусловлено разной скоростью эрозии в зависимости от локальных свойств микрообъекта [26]. Такая неравномерность проявляется даже для однородной композиции Epon, когда при длительном травлении матрица удаляется до алюминиевой подложки только на части дна кратера (рис. 6а). Таким образом, рельеф поверхности, сформированный в процессе ионного травления, может быть артефактом для молекулярного картирования.

В кратере Cs-sputtering и рядом на поверхности среза присутствуют частицы цезия, что подтверждено посредством электронно-зондового микроанализа [29]. Образование цезиевых частиц обусловлено миграцией ионов Cs [30–33]

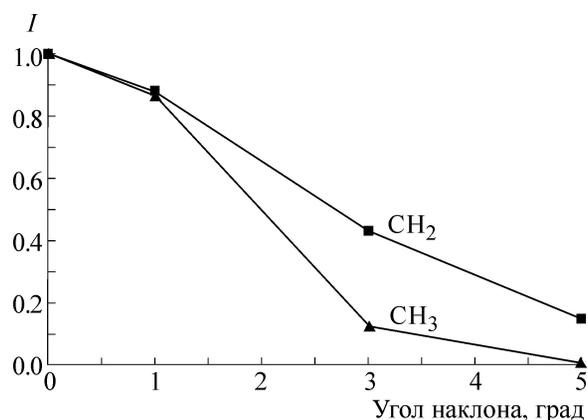


Рис. 5. Изменение интенсивности различных вторичных ионов, эмитируемых с поверхности среза из Epon толщиной 2 мкм, в зависимости от изменения угла наклона образца по отношению к пушке в TOF-SIMS 5.

и, возможно, их обратным рассеянием. Наличие частиц металла на поверхности вызывает изменение масс-спектра, а крупные капли цезия способны экранировать анализируемый образец, препятствуя проникновению первичных ионов висмута.

Наряду с образованием рельефа и накоплением частиц цезия дополнительным источником искажений при травлении является эффект накопления повреждений. В результате разрыва связей в исходных молекулах при бомбардировке на поверхности накапливаются их фрагменты и производные, что трансформирует молекулярный состав в области анализа. В нашей работе данный эффект изучали в модельном эксперименте на срезе однородной по составу композиции Epon (рис. 6в). Характер полученных кривых соответствует распределению интенсивности вторичных ионов по глубине для тонкого органического образца в случае не полного удаления продуктов ионизации (растет сигнал неспецифичных фрагментов, таких как CH₂ и CH₃) [4,34]. Следует остановиться на эффекте изменения отношения ³⁵Cl/³⁷Cl (рис. 3г). Если в начале анализа значение параметра близко к природному распределению (~2,7), то в течение Cs-sputtering оно уменьшается более чем в два раза. Нет причин предполагать, что травление ионами цезия действительно приводит к выборочному образованию изотопов хлора. По-видимому, в рассматриваемом случае, речь идет об образовании пика органического фрагмента с *m/z* близким к *m/z* ³⁷Cl, который в данном случае в силу недостаточного спектрального разрешения ToF-SIMS-анализа неотделим от истинного пика.

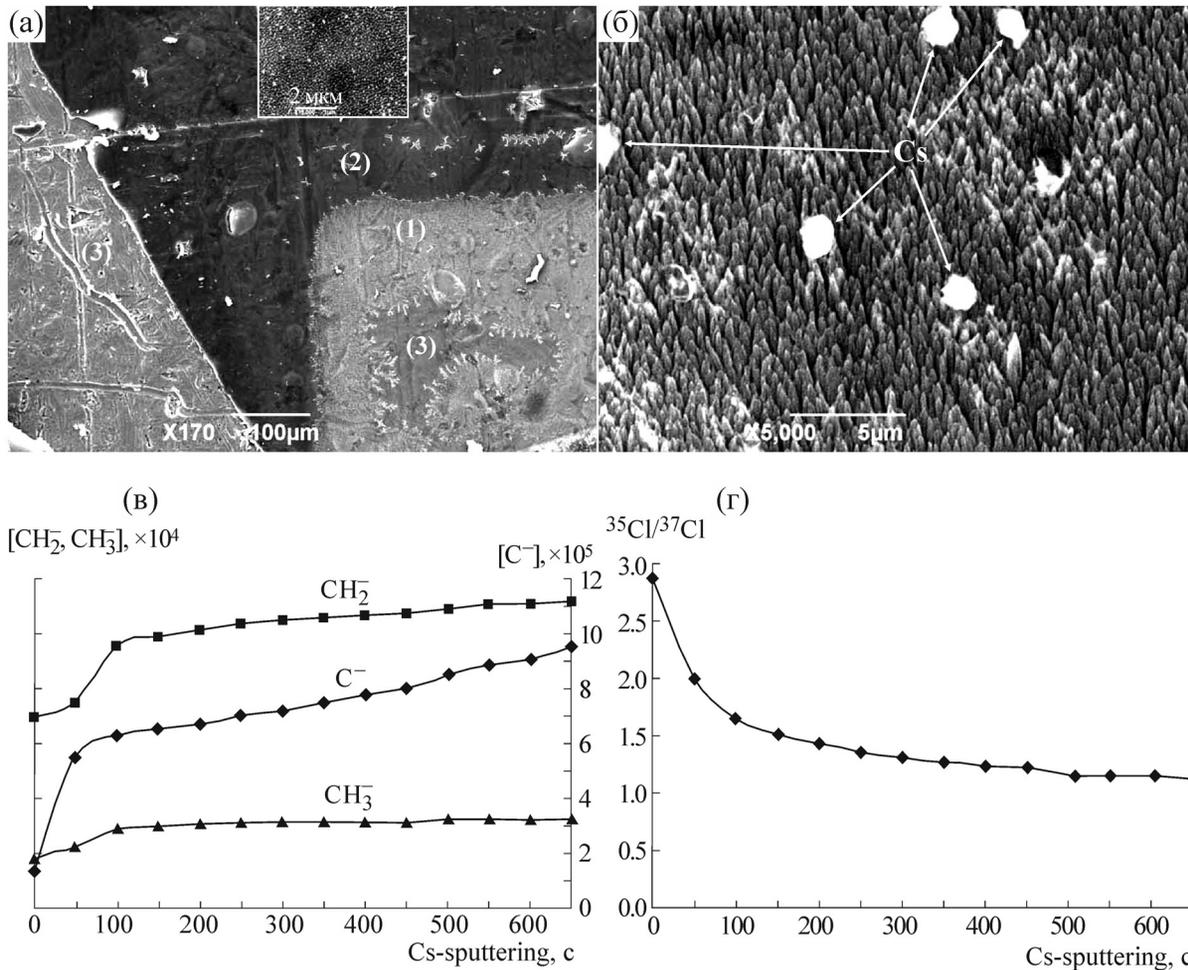


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия и ToF-SIMS-анализ поверхности среза толщиной 2 мкм, приготовленного из композиции Epon: (а) – область 1 – дно кратера, сформированного в результате ионного травления; область 2 и врезка – поверхность среза рядом с кратером, область 3 – поверхность подложки из алюминия; (б) – изображение дна кратера при большом увеличении с указанием частиц цезия, Cs; (в) – изменение при проведении Cs-sputtering интенсивности вторичных ионов, эмитируемых с поверхности среза; (г) – изменение при проведении Cs-sputtering отношения интенсивности изотопов хлора, эмитируемых с поверхности среза.

Суммируя вышесказанное, можно прийти к заключению, что Cs-sputtering обладает рядом особенностей, которые значительно ограничивают его использование для ToF-SIMS-анализа биологических препаратов. В их ряду: формирование рельефа поверхности при ионном травлении, загрязнение поверхности цезием, модификация масс-спектра в результате эффекта накопления повреждений. Указанные недостатки отсутствуют при анализе среза. Современные микротомы позволяют получать срез микрообъекта с высоким качеством поверхности, что исключает необходимость ионного травления. При этом препарат не подвергается необратимому разрушению и, следовательно, может быть исследован другими методами.

Однако в случае использования вместо Epon легкоплавкой заливочной среды (полиэтиленгликоль, парафин) такой подход не исключает проблему загрязнения анализируемой поверхности. Следует учитывать эффект плавления на кромке лезвия ножа, который приводит к «размазыванию» (smearing), например, парафина в процессе резания срезов и является причиной загрязнения поверхности [20]. Показано, что такой поверхностный слой удаляется посредством ионного травления [35], однако это может привести к проявлению артефактов, описанных выше. Метод срезов, основанный на криофиксации изолированных ооцитов, адаптирован нами для молекулярного картирования ToF-SIMS изолированной клетки [14]. Об отсутствии загрязняющего слоя на поверхности среза в ци-

тируемой, а также данной работе свидетельствует наличие резких контуров на молекулярных картах (рис. 3, 4).

В завершение обсуждения результатов следует отметить следующее. При выборе методики пробоподготовки препарата для ToF-SIMS-анализа важно обеспечить: (1) сохранение молекулярного состава и его распределения близкими к прижизненному состоянию клетки, (2) наличие исследуемой структуры на анализируемой поверхности, (3) отсутствие слоя загрязнения на анализируемой поверхности, (4) отсутствие рельефа у анализируемой поверхности. В полном объеме перечисленные условия выполняются посредством комплекса криогенных методов получения срезов ткани после ее криофиксации. При этом ToF-SIMS позволяет проводить молекулярное картирование, которое дополнит данные традиционных методов исследования строения клетки, например световой или электронной микроскопии, а также электронно-зондового микроанализа.

В части масс-спектропии вторичных ионов (ToF-SIMS) исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Анализ химических, биологических систем и природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектропия» (ИХФ РАН, Москва).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-76-20014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1608 (2005).
2. J. Vickerman, N. Winograd, in *Cluster Secondary Ion Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Ed. by C. M. Mahoney (John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2013), pp. 269–310.
3. D. Breitenstein, B. Hagenhoff, and A. Schnieders, in *Surface Analysis and Techniques in Biology*, Ed. by V. S. Smentkowski (Springer Int. Publishing, Switzerland, 2014), pp. 37–70.
4. C. M. Mahoney, *Mass Spectrometry Rev.* **29**, 247 (2010).
5. *Mass Spectrometry Imaging: Principles and Protocols*, Ed. by S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler (Humana Press, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010).
6. J. Bobrowska, J. Pabijan, J. Wiltowska-Zuber, et al., *Anal. Biochem.* **511**, 52 (2016).
7. M. Robinson and D. G. Castner, *Biointerphases* **8**, 15 (2013).
8. K. Schaeppe, J. Kokesch-Himmelreich, M. Rohnke, et al., *Biointerphases* **10**, 1 (2015).
9. M. D. Luft, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409 (1961).
10. *Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. Practical Methods in Electron Microscopy*, Ed. by A. M. Glauret and P. R. Lewis (University Press, Princeton, New Jersey).
11. M. J. Ingram and C. A. M. Hogben, *Develop. Appl. Microsc.* **5**, 43 (1968);
12. A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, E. I. Smolyaninova, and D. V. Goldshtein, *CryoLetters* **27**, 87 (2006).
13. A. G. Pogorelov and V. N. Pogorelova, *J. Microscopy* **232**, 36 (2008).
14. A. Gulín, V. Nadtochenko, A. Astafiev, et al., *Analyst* **141**, 4121 (2016).
15. P. J. Todd, T. G. Schaaff, P. Chaurand, and R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* **36**, 355 (2001).
16. A. Brunelle, D. Touboul, and O. Laprevote, *J. Mass Spectrom.* **40**, 985 (2005).
17. L. A. McDonnell, G. L. Corthals, S. M. Willems, et al., *J. Proteomics* **73**, 1921 (2010).
18. E. R. A. Van Hove, D. F. Smith, and R. M. A. Heeren, *J. Chromatography A* **1217**, 3946 (2010).
19. D. Touboul, A. Brunelle, and O. Laprevote, *Biochimie* **93**, 113 (2011).
20. L. J. Gamble, D. J. Graham, B. Bluestein, et al., *Biointerphases* **10**, 019008-1 (2015).
21. J. Brison, M. A. Robinson, D. S. W. Benoit, et al., *Anal. Chem.* **85**, 10869 (2013).
22. S. A. Schwartz and R. M. Caprioli, in *Mass spectrometry imaging. Principles and Protocols*, Eds. by S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler (Humana Press, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010), pp. 3–19.
23. A. S. Woods, S. N. Jackson, in *Mass spectrometry imaging. Principles and Protocols*, Ed. by S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler (Humana Press, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010), pp. 99–111.
24. S. Rangarajan and B. J. Tyler, *J. Vac. Sci. Technol.* **24**, 1730 (2006).
25. N. T. Kita, T. Ushikubo, B. Fu, and J. W. Valley, *Chem. Geology* **264**, 43 (2009).
26. A. Wucher, J. Cheng, and N. Winograd, *Anal. Chem.* **79**, 5529 (2007).
27. E. S. F. Berman, S. L. Fortson, and K. S. Kulp, in *Mass spectrometry imaging. Principles and Protocols*, Ed. by S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler (Humana Press, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010), pp. 253–265.
28. H. Nygren, B. Hagenhoff, P. Malmberg, et al., *Microsc. Res. Technique* **70**, 969 (2007).
29. K. Ngo, P. Philipp, J. Kieffer, and T. Wirtz, *Surf. Sci.* **606**, 1244 (2012).
30. N. Menzel, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res.* **191**, 235 (1981).
31. W. H. Gries, *J. Vac. Sci. Technol.* **5**, 1740 (1987).
32. K. Miethé, W. H. Gries, and A. Pocker, *SIMS VIII*, 347 (1992).
33. K. Wittmaack, *Surf. Sci. Rep.* **68**, 108 (2013).
34. C. M. Mahoney and A. Wucher, in *Cluster secondary ion mass spectrometry: Principles and Applications*, Ed.

by C. M. Mahoney (John Wiley & Sons, Inc., Singapore, 2013), pp. 117–206.

35. A. Wucher, S. Sun, C. Szakal, and N. Winograd, *Anal. Chem.* **86**, 7234 (2004).

Extending the Use of ToF-SIMS as the Method for Analysis of Bioorganic Samples

A.G. Pogorelov*, A.A. Gulin ***, V.N. Pogorelova*, A.I. Panait*,
M.A. Pogorelova*, and V.A. Nadtochenko** *** ******

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

****Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

*****Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

A technique for preparation of a biological tissue section previously used for Electron Probe Microanalysis has been applied to ToF-SIMS analysis of mouse germinal vesicle stage oocytes. Sample preparation involves the following steps: plunge freezing, freeze-drying, infiltration by embedding media, section cutting. With an application of the described method for ToF-SIMS analysis, we created molecule-specific images on distribution of a set of molecules in the individual oocyte. Analysis of ToF-SIMS data shows that the efficient lateral image resolution is about 1 μm . Hence, ToF-SIMS is able to explore distribution of chemical substances and gathered information is correlated with the morphological data obtained by scanning electron microscopy (SEM) and traditional light microscopy.

Keywords: ToF-SIMS, molecule-specific imaging, scanning electron microscopy, spatial resolution, GV mice oocyte