

Метод расширительной микроскопии для *Trichoplax adhaerens*: улучшение разрешения и сохранность хрупких образцов в морских экспедициях

Научный руководитель – Романова Дарья Юрьевна

Франк Яна Андреевна

Студент (магистр)

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Институт химии и проблем устойчивого развития (ИПУР), Москва, Россия

E-mail: yana.f.2000@mail.ru

Одной из особенностей архитектуры клеток пластинчатых является их относительно небольшой размер (~4-7 мкм), вследствие чего методы флюоресцентной микроскопии ограничены разрешением камеры микроскопа и объективами. Мы предлагаем решение данной проблемы с помощью метода расширительной микроскопии, который позволяет увеличить размеры изучаемого объекта от 2х до 20х.

Методы расширительной микроскопии включают шесть последовательных этапов: 1) окрашивание; 2) фиксация животных; 3) помещение образцов в раствор мономера с инициатором и катализатором; 4) полимеризация; 5) обработка полимера энзимным буфером; 6) диализ гидрогеля деионизированной водой.

Окрашивание животных проводили с помощью DAPI и акридинового оранжевого в течение 1 ч инкубации. Затем фиксировали животных 0,25%-ным глутаровым альдегидом в течение 10 минут при комнатной температуре. Аккуратно промывали 0,1 М PBS три раза по 5 минут. Смесь раствора мономера с 0,5% персульфата аммония и 0,5% TEMED помещали при +4°C для предотвращения начала полимеризации (Romanova, Frank, Moroz, 2025). После монтажа образцов: мы 1) помещали половину объема мономерного раствора на покровное стекло, затем 2) переносили особи (отдельно) в минимальном объеме PBS, и 3) добавляли остаток мономерного раствора (MP). Аккуратно перемешивали MP на охлажденном хладагенте (+4°C); затем помещали чашку Петри при +4°C на 5 мин для пропитки образца MC. Далее чашку Петри переносили в термостат при +37° C на 1 час для полимеризации. После полимеризации мы получили затвердевший полимер, который инкубировали в 3 мл энзимном буфере с 16 мкл протеиназы К при +37°C в течение 2 часов. При замене деионизированной водой: добавили 1 мл деионизированной воды, далее через 20 минут (3 раза), затем повторили в течение 2–3 часов, постепенно сокращая временные интервалы. Хранили гидрогель при температуре +4°C в холодильнике. Так же, мы проверили возможность длительного хранения образцов в гидрогеле в течение 1–2 недель при температуре +4°C в холодильнике. Этот метод может использоваться в длительных морских экспедициях.

Результат: новый метод значительно расширяет возможности для детальных микроскопических исследований в сочетании с физиологическими исследованиями за счет увеличения размеров тела объекта без морфологических, цитологических или структурных повреждений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00050, <https://rscf.ru/project/23-14-00050/>

Источники и литература

- 1) Sun, D. E., Fan, X., Shi, Y., Zhang, H., Huang, Z., Cheng, B., et al. (2021). Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. Nat. Methods 18, 107–113. doi: 10.1038/s41592-020-01005-2

- 2) Romanova D. Y., Frank Y. A., Moroz L. L. Expansion microscopy in Placozoa: improving resolution and preservation of fragile samples during marine expedition //Frontiers in Marine Science. – T. 12. – С. 1531729.