



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ.В.Л.КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДЕНО
на заседании Ученого совета БИН РАН
протокол № от «08» 14 апреля 2025 г.

Директор БИН РАН



РАБОЧАЯ ПРОГРАММА

УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

**Пробоподготовка биологического материала для световой и
трансмиссионной микроскопии: изготовление срезов и работа на ТЭМ**

по направлению
дополнительное профессиональное образование программы повышения
квалификации

Санкт-Петербург
2025

ДИСЦИПЛИНА «Пробоподготовка биологического материала для световой и трансмиссионной электронной микроскопии: изготовление срезов и работа на ТЭМ»

Профиль: 06.06.01 – «Биологические науки»

Цикл дисциплин (по учебному плану):

Курс: повышение квалификации научных сотрудников

Трудоёмкость в ЗЕТ — 1,5

Трудоёмкость в часах — 54

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИЗУЧЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ.

Цели и задачи изучения дисциплины «Пробоподготовка биологического материала для световой и трансмиссионной электронной микроскопии: изготовление срезов и работа на ТЭМ»:

– Получение знаний о классических и современных методах пробоподготовки для световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Приобретение практических навыков изготовления полутонких и ультратонких срезов и их съёмки с использованием светового и трансмиссионного электронного микроскопа.

Задачи дисциплины:

- Получить современные представления о методе трансмиссионной электронной микроскопии при изучении биологических объектов;
 - Получить практические навыки работы на приборе для изготовления стеклянных ножей Leica EM KMR2;
 - Получить практические навыки работы на ультрамикротоме EM UC6;
 - Получить практические навыки окраски световых срезов и контрастирования ультратонких срезов с контролем качества на световом микроскопе AxioImager A1 и трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120.

Курс предназначен для научных сотрудников в рамках повышения квалификации и аспирантов, обучающихся по направлению 06.06.01 Биологические науки.

Требования к подготовленности обучающегося к освоению содержания учебных занятий:

Наличие высшего образования, знание основ общей биологии (без документального подтверждения).

2. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

2.1. Универсальные компетенции:

Способность осуществлять поиск и анализ информации, а также осуществлять системный подход для решения поставленных задач.

2.2. Общепрофессиональные компетенции:

Способность самостоятельно осуществлять поиск и оптимизацию методов пробоподготовки в научно-исследовательской деятельности в соответствующей профессиональной области с использованием современных информационно-коммуникационных технологий.

2.3. Профессиональные компетенции:

Способность применять практические навыки по пробоподготовке материала для микроскопии. Способность адаптировать знания о протоколах пробоподготовки и работе на специализированных приборах в узкопрофессиональной и междисциплинарной деятельности, а также готовность к их применению в своей научной деятельности современных методов исследований.

По окончании изучения дисциплины обучающиеся должны

знать:

- основные принципы световой и трансмиссионной электронной микроскопии;
- особенности пробоподготовки разнообразного биологического материала;
- биологические особенности разных тканей растений, влияющие на качество пробоподготовки;
- особенности использования разных протоколов фиксации и заключения в смолы;
- основную приборную базу, используемую при пробоподготовке;
- основные принципы подготовки реактивов (контрастирующие агенты) и их использования.

уметь:

- уметь работать на приборе для изготовления стеклянных ножей Leica EM KMR2 и на ультрамикротоме EM UC6;
- уметь изготавливать стеклянные ножи;
- уметь изготавливать пленку-подложку на электронно-микроскопических сетках;
- уметь изготавливать, окрашивать и контрастировать световые и ультратонкие срезы;

владеть:

- специфической терминологией;
- навыками работы на приборе для изготовления стеклянных ножей и ультрамикротоме;
- навыками подготовки срезов для микроскопирования

3. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

3.1. Разделы дисциплины и виды занятий

Приводимая ниже таблица показывает распределение бюджета учебного времени, отводимого на освоение основных разделов курса согласно учебному плану

Вид учебной работы	Объем часов / зачетных единиц
Трудоемкость изучения дисциплины	54/1,5
Обязательная аудиторная учебная нагрузка (всего)	33
в том числе:	
-лекции	5
-практические занятия	28
Самостоятельная работа обучающегося (всего)	19
в том числе:	
-подготовка к практическим занятиям	4
-отработка полученных навыков	13
-изучение тем, вынесенных на самостоятельную проработку	2
Итоговая аттестация	2

Объем дисциплины и виды учебной работы (в часах и зачетных единицах).

№ п/п	Название раздела дисциплины	Объем часов / зачетных единиц	
		Лекции и практические занятия	
1	Основные принципы строения клеток и тканей растений и животных.	Лекция	1
2	Классические анатомические методы. Световая и флуоресцентная микроскопия, гистохимия, морфометрия	Лекция	1
		Практические занятия	2
3	Продвинутые методы анатомии растений. Сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, методы объемной реконструкции (SBEM, SBF SEM, FIB SEM, AT, ET), CLEM и др. Иммуноцитохимия.	Лекция	1
4	Принципы работы трансмиссионного электронного микроскопа. Этапы пробоподготовки биологического	Лекция	2

	материала (фиксация, заливка, изготовление полутонких и ультратонких срезов).	Самостоятельная работа	2
5	Изготовление стеклянных ножей	Практическое занятие	2
		Самостоятельная работа	2
6	Изготовление полутонких срезов, окраска, изготовление постоянных препаратов	Практическое занятие	6
		Самостоятельная работа	4
7	Изготовление пленки-подложки для сеточек	Практическое занятие	2
		Самостоятельная работа	2
8	Изготовление ультратонких срезов	Практическое занятие	8
		Самостоятельная работа	5
9	Контрастирование ультратонких срезов	Практическое занятие	4
10	Съемка на световом микроскопе, основы морфометрии	Практическое занятие	2
		Самостоятельная работа	2
11	Съемка на трансмиссионном электронном микроскопе	Практическое занятие	2
		Самостоятельная работа	2
12	Итоговый зачет в форме опроса и теста, оценка качества полученных образцов	итоговая аттестация	2
	Итого:		54/1,5

3.2. Перечень активных и интерактивных форм учебных занятий

- Лекции с использованием презентаций Microsoft PowerPoint;
- Демонстрационные сессии с использованием приборов ЦКП БИН РАН;
- Практические занятия проходят в лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН с использованием оборудования и реактивов лаборатории.

Раздел 4. Обеспечение учебных занятий

4.1. Методическое обеспечение

4.1.1 Методические указания по освоению дисциплины

- Рабочая программа учебной дисциплины
- Презентации Microsoft PowerPoint

- Учебно-методическая литература
- Научная литература.

4.1.2 Методическое обеспечение самостоятельной работы

- Учебно-методическая литература
- Научная литература

4.1.3 Методика проведения текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации и критерии оценивания

Контроль успеваемости и качества усвоения учебного материала включает проведение итоговой аттестации в форме зачета в виде опроса по рассматриваемой дисциплине по окончании обучения. Проводится оценка качества образцов, изготавливаемых обучающимся в процессе наработки навыков.

4.1.4 Методические материалы для проведения текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации (контрольно-измерительные материалы, оценочные средства)

Методические материалы для итоговой аттестации включают перечень вопросов (тем) для итоговой аттестации.

4.2. Кадровое обеспечение

4.2.1 Образование и (или) квалификация преподавателей и иных лиц, допущенных к проведению учебных занятий

Наличие ученой степени, звания или опыт практической работы по соответствующему направлению/дисциплинам.

4.2.2 Обеспечение учебно-вспомогательным и (или) иным персоналом

Подготовка аудиторий, лабораторных и практических работ, а также анкетирование и раздача учебно-методических материалов осуществляется сотрудниками лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН.

4.3. Материально-техническое обеспечение

4.3.1 Характеристики аудиторий (помещений, мест) для проведения занятий

- Для проведения лекций и итогового зачета требуется стандартно оборудованная лекционная аудитория (со стандартным аудиторным оборудованием, неспециализированным компьютерным оборудованием и программным обеспечением общего пользования).
- Для проведения практических занятий требуется лабораторное помещение, оборудованное вытяжным шкафом.

4.3.2 Характеристики аудиторного оборудования, в том числе неспециализированного компьютерного оборудования и программного обеспечения общего пользования

- Стандартное аудиторное оборудование: рабочие места для слушателей

- Неспециализированное компьютерное оборудование: компьютерный блок, монитор, клавиатура, мышь, проектор, экран, пульт управления, камера/
- Программное обеспечение общего пользования (в том числе Microsoft Office, Adobe Reader, программы просмотра изображений JPEG, TIFF, др. и программы просмотра видео-файлов)

4.3.3 Характеристики специализированного оборудования

В рамках лабораторных работ будет использоваться следующее оборудование лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН:

- Вытяжной шкаф
- Микроскопы световые прямые, с объективами x10, x40, x100;
- Стереомикроскоп;
- Флуоресцентный прямой микроскоп;
- Нагревательный столик до 90°C;
- центрифуга;
- Прибор для изготовления стеклянных ножей Leica EM KMR2
- Световой микроскоп AxioImager A1
- Ультрамикротом EM UC6
- Трансмиссионный электронный микроскоп Libra 120

4.3.4 Характеристики специализированного программного обеспечения

Не используется

4.3.5 Перечень и объёмы требуемых расходных материалов и реактивов:

В рамках лабораторных работ будут использоваться следующие расходные материалы и реактивы лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН:

	Наименование	Кол-во
1	Предметные стекла	50
2	Покровные стекла 18 x 18 мм	50
3	Препаровальные иглы	10
4	Пипетки Пастера	10
5	Лезвия для заточки	100
6	Электронно-микроскопические сеточки	100
7	Фальконы 15 мл	10 шт
8	Фальконы 50 мл	10 шт
9	Реактивы: толуидиновый синий на буре, нитрат свинца, цитрат свинца, гидроксид натрия, спирт, формвар	
10	Прочие расходные материалы: одноразовые лабораторные халаты; бахилы; перчатки;	

канцелярские расходные материалы для печати программы и тестов итоговой аттестации.	
---	--

Разработчики программы: Сотрудники лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН, кбн Котеева Н.К., Иванова А.Н.

Контроль успеваемости и качества усвоения учебного материала курса ДОП

Контроль успеваемости и качества усвоения учебного материала включает проведение итоговой аттестации в форме зачета в виде теста по рассматриваемой дисциплине по окончании обучения.

Вопросы к итоговой аттестации

1. Устройство и принцип работы найфмейкера. Изготовление стеклянных ножей.
 2. Устройство и принцип работы ультратома.
 3. Устройство и принцип работы трансмиссионного электронного микроскопа.
 4. Особенности заточки и резки разных типов типов заливочных сред, их свойства и применение для различных задач.
 5. Выбор контрастера для ультратонких срезов и негативное контрастирование
 6. Особенности пробоподготовки для иммунолокализации
 7. Артефакты фиксации, резки и контрастирования
8. Из каких металлов изготавливают электронно-микроскопические сеточки?
- золото
 - серебро
 - платина
 - медь
 - никель
9. Какой оптимальный угол наклона при установке стеклянного (1) и алмазного (2) ножей?
- 10°
 - 3-4°
 - 6°
 - 45°
 - 60°
10. Какие самые распространённые красители используются для окраски цитоплазмы полутонких срезов (заливочная среда – эпоксидные смолы)?
- сафранин
 - толуидиновый синий
 - флороглюцинол
 - метиленовый синий
 - алциановый синий
11. какие приспособления используются для переноса срезов из ванночки ножа на стекло или сеточку?

- препаровальная игла
- ресничка
- петля
- пинцет

12. Какие вещества используют для контрастирования электронно-микроскопических срезов?

- Соли свинца
- Формальдегид
- Тетраоксид осмия
- Ацетат уранила
- Марганцевокислый калий

13. Какие химические фиксаторы являются одновременно контрастёрами?

- Глутаровый альдегид
- Формальдегид
- Тетраоксид осмия
- Ацетат уранила
- Марганцевокислый калий

14. Какие вещества используются для заключения полутонких срезов при изготовления постоянных препаратов

- Глутаровый альдегид
- Иммерсионное масло
- Глицерин
- Канадский бальзам
- Эупарол

15. Для просвечивающей электронной микроскопии обычно используют срезы толщиной

- 1 мкм
- 15 мкм
- 70 нм
- 500 нм
- 750 нм

16. Оптимальная толщина полутонких срезов

- 1 мкм
- 1000 нм
- 70 нм
- 10 мкм

17. Какие контрастёры используются для контрастирования срезов на сетках (поставить 1), а какие для негативного контрастирования (поставить 2), а какие для обоих методов (поставить 3)

- Ацетат уранила
- Марганцевокислый калий
- Цитрат свинца
- Фосфорно-вольфрамовая кислота

18. Какие факторы приводят к порче контрастеров? Найдите соответствие, запишите в форме буква-цифра

- а) ацетат уранила
- б) цитрат свинца

- 1) хранение при температуре выше комнатной
- 2) хранение при температуре ниже комнатной
- 3) облучение ярким светом
- 4) CO₂ в окружающем воздухе
- 5) перегрузки выше 3g

19. Найдите пару проблема резки – её возможная причина, запишите в форме буква-цифра (и8)

- | | |
|---|--|
| а) лента срезов заворачивается в кольцо | 1) дефекты верхней границы площадки |
| б) лента срезов распадается | 2) плохо закреплён нож или образец |
| в) срезы уползают за край ножа | 3) неправильная форма площадки |
| г) срезы неравномерной толщины | 4) нож повреждён |
| д) срез разделяется полосы при резке | 5) материал плохо пропитан смолой, выкрашивается или содержит пузыри воздуха |
| е) на площадке (фронтальной поверхности блока) образуется капля воды, водяной мостик не убирается | 6) образец неправильно установлен |

20. Найдите пару артефакт – его возможная причина, запишите в форме буква-цифра (и8)

- | | |
|--|--|
| а) нерезкое изображение | 1) слишком мягкая смола |
| б) бесформенные черные пятна | 2) дрейф образца (толстый срез, неправильные настройки микроскопа) |
| в) неравномерная толщина срезов (чаттер) | 3) выпал цитрат свинца |
| г) деформация срезов (компрессия) | 4) нож повреждён |
| д) полосы на срезе | 5) материал плохо пропитан смолой |
| е) утрата части материала из среза | 6) образец неправильно установлен |

Рекомендуемые источники

Интернет-источники

Сайт Научного парка СПбГУ статья «Методы пробоподготовки к электронной микроскопии».
 URL: <https://researchpark.spbu.ru/methods-biomed-rus/1913-bio-metod-07-rus> (дата обращения: 30.01.2026).

Атлас ультраструктуры растительных клеток. Под ред. Козубова Г.М. и Даниловой М.Ф. Петрозаводск: Карелия, 1972 г., 296 с.

Атлас ультраструктуры растительных клеток. Под ред. Козубова Г.М. и Даниловой М.Ф. Петрозаводск: Карелия, 1980 г., 456 с.

Васильев А.Е. и др. Ботаника: Анатомия и морфология растений. Учеб. пособие. М.: Просвещение, 1988 г., 480 с.

Виноградова Г.Н., Захаров В.В. Основы микроскопии. Санкт-Петербург, 2020. 410 с.

Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с.

Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука, 1994. - 400 с.

Руска Э. Развитие электронного микроскопа и электронной микроскопии. Успехи физических наук. – 1988. – Т. 154. – Вып. 2. – С. 243–259.

Сальникова М. М., Малютина Л. В., Сайтов В. Р., Голубев А. И.. Трансмиссионная электронная микроскопия в биологии и медицине. Казань: Издательство Казанского университета, 2016. 125 с. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49465272>

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 328 с.

Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. М. Наука. 1979. 168 с.

Ellis, E.A. (2014). Staining Sectioned Biological Specimens for Transmission Electron Microscopy: Conventional and *En Bloc* Stains. In: Kuo, J. (eds) Electron Microscopy. Methods in Molecular Biology, vol 1117. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1_4

Kuo, J. (2014). Processing Plant Tissues for Ultrastructural Study. In: Kuo, J. (eds) Electron Microscopy. Methods in Molecular Biology, vol 1117. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1_3

Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208-212.

Sabatini D.D. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J Cell Biol. 1963. V. 17. N 1. P. 19-58.

Spurr A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 1969. V. 26. P. 31-43.