

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук**

Утверждаю.
Директор ИПЭЭ РАН

_____ Найденко С.В.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

**«Электронная микроскопия и рентгеноспектральный анализ
для биологов»**

(наименование дисциплины)

**Группа специальностей:
1.5 Биологические науки**

Специальности:

«Зоология», «Энтомология», «Ихтиология», «Экология», «Гидробиология», «Паразитология»

Квалификация: **Исследователь. Преподаватель-исследователь.**

Москва, 2025 г.

Аннотация

Дисциплина «Электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ для биологов» реализуется в рамках основной профессиональной образовательной программы высшего образования - программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН) по группе специальностей «Биологические науки».

Основным источником материалов для формирования содержания программы являются: учебники, монографические издания, публикации, материалы конференций, симпозиумов, семинаров, интернет-ресурсы. Общая трудоемкость дисциплины по учебному плану составляет 72 академических часа (2 зачетных единицы). Дисциплина реализуется на 1 году обучения. Текущая аттестация проводится не менее 2 раз в соответствии с заданиями и формами контроля, предусмотренными настоящей программой. Промежуточная оценка знания осуществляется в форме зачета.

Цель дисциплины: обучение теоретическим основам электронной микроскопии и конфокальной микроскопии, а также практическим навыкам работы на современных электронных и конфокальных микроскопах.

В результате изучения дисциплины «Электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ для биологов» аспирант должен достичь следующих результатов:

Знать:

- основы физики свечения флюорофоров, формирования светового и электронного пучков;
- устройство флюорисцентных, конфокальных и электронных микроскопов;
- процессы, протекающие в твердом теле при взаимодействии с электронным пучком;
- методы подготовки биологических объектов к изучению в электронном и конфокальном микроскопах;
- возможности и ограничения приборов.

Уметь:

- получать и анализировать стандартные электронно-микроскопические изображения;
- получать, реконструировать и анализировать объемные изображения полученные с помощью конфокального микроскопа;
- определять химический состав исследуемых биологических объектов.

Владеть:

- навыками подготовки биологических объектов к изучению в электронном микроскопе;
- навыками работы на растровых электронных микроскопах CamScan MV 2300 и MIRA 3 LMH, на конфокальном микроскопе Nexcope NCF950;
- навыками работы в программе микроанализа AZtec;
- принципами обработки результатов микроанализа.

Структура дисциплины:

Вид занятий	Количество часов
Лекции	16
Лабораторно-практические занятия	36
Самостоятельная работа	16
Зачет	4
ИТОГО	72

Содержание дисциплины:

№	Наименование темы (раздела)	Краткое содержание темы (раздела)	Объем темы (раздела), ак.ч.
1	Переход от первых оптических систем к современному флюоресцентному микроскопу.	Введение понятия разрешающей способности микроскопа. Типы оптических aberrаций и необходимость их компенсации в различных оптических системах.. Принципы флюоресцентной микроскопии: устройство микроскопа, основы флуоресценции, использование флуорофоров и методов иммуноокрашивания.	2
2	Устройство конфокального микроскопа, пробоподготовка, разбор интерфейса конфокального микроскопа Zeiss LSM880	Преимущества и недостатки конфокальной микроскопии. Разбор общих для конфокальных микроскопов оптических узлов и их функции. Особенности пробоподготовки биологических образцов для объемных исследований. Структура и принципы работы интерфейса управления микроскопом Zeiss LSM 880. Практическое занятие на конфокальном микроскопе Nexscope NCF950: настройка параметров сканирования, сбор данных, анализ изображений.	4
3	Общая информация по электронной микроскопии и комплементарным методам.	Введение электронную микроскопию. История развития. Краткий обзор приборов и методов, используемых в современной электронной микроскопии, их возможностей и ограничений по отношению к биологическим объектам.	4
4	Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) и принципы его работы. Подготовка биологических объектов к изучению в сканирующем электронном микроскопе. Двухлучевые системы, метод ионного травления. Корреляционная микроскопия.	Разбирается схема устройства СЭМ и принципы его работы. Формирование электронного пучка, типы катодов и их характеристики. Устройство электронно-оптической колонны. Вакуумная система. Камера образцов. Детекторы: детектор вторичных электронов Эверхарда-Торнли, твердотельный детектор отраженных электронов, детектор «на просвет». Формирование изображения: фокусировка и	14

		сканирование. Выбор оптимальных параметров работы СЭМ в зависимости от особенностей образца и поставленной задачи. Приемы работы для получения изображений при больших увеличениях. Приемы работы для получения изображений с большой глубиной резкости. Приемы работы для получения изображений с широким полем обзора без искажений. Приемы работы с деликатными образцами и образцами, не проводящими электрический ток. Выбор оптимального тока зонда. Получение стереоизображений. Фотографирование изображений. Автоматизированная обработка изображений, включающая оценку дисперсности среднего размера, протяженности границ, формы и других параметров структуры. Обзор основных этапов подготовки биологических объектов к изучению в СЭМ (фиксация, обезвоживание, высушивание, подготовка столика для СЭМ, создание поверхностной электропроводности). Подготовка к сеансу СЭМ. Обработка и хранение первичной информации. Архивирование данных, подготовка данных к публикации. Особенности длительного хранения препаратов биологических объектов для СЭМ. Перспективы использования методов ионного травления и корреляционной микроскопии в биологии.	
5	Рентгеноспектральный микроанализ в сканирующей электронной микроскопии.	Основные физические принципы рентгеноспектрального микроанализа с помощью волнового и энергодисперсионного спектрометров. Рекомендации по настройке СЭМ для энергодисперсионного микроанализа. Рентгеноспектральный микроанализ на качественном и количественном уровне. Требования, которым должен соответствовать образец для корректного количественного микроанализа. Локальность рентгеноспектрального микроанализа и способы ее улучшения. Мертвое время. Погрешность микроанализа. Программное обеспечение рентгеноспектрального микроанализа. Работа с системой энергодисперсионного микроанализа AZtecOne X-act. Анализ химического состава в точке, по линии, картирование, количественная оптимизация.	12
6	Трансмиссионный электронный микроскоп	Разбирается схема устройства ТЭМ и	16

	(ТЭМ) и принципы его работы. Подготовка биологических объектов к изучению в трансмиссионном электронном микроскопе. ТЭМ-томография.	принципы его работы. Выбор оптимальных параметров работы ТЭМ в зависимости от особенностей образца и поставленной задачи. Дается обзор основных этапов подготовки биологических объектов к изучению в трансмиссионном электронном микроскопе (фиксация, обезвоживание, заливка в смеси смол, получение полутонких и ультратонких срезов, контрастирование). Подготовка к сеансу ТЭМ. Работа на трансмиссионном электронном микроскопе. Особенности формирования изображения в ТЭМ. Проверка осветительной системы ТЭМ. Загрузка образцов в объектодержатель. Шлюзование и введение образцов в колонну. Работа с изображением, фотографирование. Обработка и хранение первичной информации. Архивирование данных, подготовка данных к публикации. Особенности длительного хранения препаратов биологических объектов для ТЭМ. Перспективы использования ТЭМ-томографии для изучения ультраструктуры различных биологических объектов.	
7	Организация работы в лаборатории электронной микроскопии. Планирование и проведение электронно-микроскопических исследований.	Рассматриваются особенности организации работы в лаборатории электронной микроскопии. Дается краткий обзор основных профилактических и регламентных работ по уходу и обслуживанию электронных микроскопов. Обсуждаются особенности планирования и проведения электронно-микроскопических исследований на базе современных лабораторий и центров коллективного пользования. Дается обзор некоторых источников финансирования для проведения электронно-микроскопических исследований, рассматриваются особенности подготовки заявок на гранты российских и зарубежных фондов для молодых ученых.	16
	Зачет		4
	ИТОГО		72

Образовательные технологии

Лекции, практические занятия, подготовка презентаций и выступлений.

Текущая и промежуточная аттестация.

Текущая аттестация по дисциплине проводится в форме решения практических задач на приборах. Объектами оценивания выступают: активность на занятиях, своевременность выполнения различных видов заданий, посещаемость занятий; степень усвоения теоретических знаний и уровень овладения практическими навыками по всем видам учебной работы, проводимым в рамках практических занятий и самостоятельной работы.

Промежуточная аттестация аспирантов по дисциплине проводится в форме зачета. Аспирант допускается к зачету в случае выполнения всех учебных заданий и мероприятий, предусмотренных настоящей программой. В случае наличия учебной задолженности (пропущенных занятий и (или) невыполненных заданий) аспирант отрабатывает пропущенные занятия и выполняет задания.

Оценивание обучающегося на промежуточной аттестации осуществляется по система зачтено/не зачтено.

На зачете предлагается ответить на два вопроса из нижеприведенного списка.

Вопросы для зачета:

1. Эволюция основных оптических узлов: от световых и флюоресцентных микроскопов к конфокальным и сканирующим электронным. Основные принципы их работы.
2. Принципы расчета разрешающей способности светового микроскопа при использовании объективов с различными числовыми апертурами и для объектов различной природы.
3. Основные принципы пробоподготовки биологических образцов для конфокальной микроскопии с применением методов иммуноокрашивания.
4. Основные требования к биологическим образцам для изучения методами СЭМ и ТЭМ, а также с помощью конфокальной микроскопии.
5. Способы создания поверхностной электропроводимости у биологических образцов для изучения методами СЭМ. Обзор основных материалов для напыления и их предназначение.
6. Подготовка необходимых реактивов и лабораторной посуды для проведения электронно-микроскопических исследований. Приготовление растворов нужной концентрации, особенности их использования и хранения.
7. Основные этапы подготовки биологических объектов для изучения методами СЭМ: фиксация, обезвоживание, высушивание, подготовка столика для СЭМ.
8. Основные этапы подготовки биологических объектов для изучения методами ТЭМ: фиксация, обезвоживание, заливка в смесь смол, получение полутонких и ультратонких срезов, контрастирование, загрузка образцов в объектодержатель.
9. Основные артефакты, возникающие при нарушении протоколов пробоподготовки для СЭМ и ТЭМ.
10. Основные физические принципы работы СЭМ, ТЭМ и конфокального микроскопа.
11. Выбор режимов работы СЭМ и ТЭМ в зависимости от особенностей образца и поставленной задачи.
12. Получение изображения биологических объектов в СЭМ и ТЭМ при малых увеличениях.
13. Получение изображения биологических объектов в СЭМ и ТЭМ при максимально возможных увеличениях.
14. Автоматизированная обработка изображений, полученных на СЭМ и ТЭМ.
15. Основные физические принципы рентгеноспектрального микроанализа.
16. Качественный и количественный микроанализ. Требования, которым должен соответствовать образец для корректного количественного микроанализа.
17. Работа с системой энергодисперсионного микроанализа AZtecOne X-act.

Оценивание аспиранта на промежуточной аттестации в форме экзамена

Оценка	Требования к знаниям и критерии выставления оценок
Не зачтено	Аспирант при ответе демонстрирует плохое знание теоретических основ электронной и конфокальной микроскопии. Не информирован

	или слабо разбирается в проблемах пробоподготовки биологических объектов и/или не в состоянии получить изображение исследуемого объекта, не может провести энергодисперсионный микроанализ.
	Аспирант при ответе демонстрирует знания только основного материала по теории электронной и конфокальной микроскопии, фрагментарно понимает назначение основных методов электронной микроскопии, их возможности и ограничения. Не всегда может подобрать корректный метод пробоподготовки и условия получения изображения, а также интерпретировать результаты и изложить их в соответствии с общепринятыми стандартами.
Зачтено	Аспирант при ответе демонстрирует хорошие знания в области теоретических основ электронной и конфокальной микроскопии, владеет основными принципами пробоподготовки биологических объектов, понимает возможности и ограничения используемых методов. Может подобрать корректный режим получения изображения и выбрать оптимальные параметры микроскопа для проведения энергодисперсионного микроанализа в заданной ситуации, провести соответствующий анализ с использованием специализированного программного обеспечения, но не всегда в состоянии интерпретировать результаты и изложить их в соответствии с общепринятыми стандартами.
	Аспирант при ответе демонстрирует хорошие знания в области теоретических основ электронной и конфокальной микроскопии, владеет основными принципами пробоподготовки биологических объектов, понимает возможности и ограничения используемых методов. Может подобрать корректный режим получения изображения и выбрать оптимальные параметры микроскопа для проведения энергодисперсионного микроанализа в заданной ситуации, провести соответствующий анализ с использованием специализированного программного обеспечения, самостоятельно интерпретировать результаты и изложить их в соответствии с общепринятыми стандартами.

Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины:

Основная литература

1. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. и др. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ / Пер. с англ. под ред. В.И. Петрова. – М.: Мир, 1984. – Ч. 1. – 296 с.; Ч. 2. – 348 с.
2. Исследование палинологических объектов методами электронной микроскопии / Н.Е. Завьялова, М.В. Теклева, С.В. Полева, А.Г. Богданов. – М.: РИПОЛ классик, 2018. – 334 с.
3. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методическое руководство. – СПб. Наука, 1994. – 400 с.
4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Пер. с англ. И.В. Викторова, под ред. В.Ю. Полякова. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
5. Виноградова Г.Н., Захаров В.В. Основы микроскопии. Часть 1: Учебное пособие. - Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2018. - 133 с. - экз.

Дополнительная литература

1. Боровский И.Б., Рыдник В.И. Локальность рентгеноспектрального микроанализа // Аппаратура и методы рентгеновского анализа: Сб. – Л., 1969. – Вып. 5. – С. 141–153.
2. Криштал М.М., Ясников И.С., Полуниин В.И. и др. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ в примерах практического применения. Москва: Техносфера, 2009. – 206 с.
3. Лосева Л.Е., Ильин Н.П. Некоторые источники систематических ошибок в рентгеновском микроанализе // Зав. лаб. – 1969. – Т. 24, № 9. – С. 1056–1060.
4. Рид С. Электроннозондовый микроанализ. / Пер. с англ. под. ред. А.И. Козленкова. – М.: Мир, 1979. – 424 с.
5. Электронная микроскопия / Под ред. А.А. Лебедева. – М.: Гос. изд-во технико-теорет. лит., 1954. – 636 с.

Базовые журналы:

- Biomaterial Science Journal (<https://www.rsc.org/journals-books-databases/about-journals/biomaterials-science/>)
- Journal of Morphology (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/10974687>)
- Microscopy (<https://academic.oup.com/jmicro>)
- Microscopy and Analysis (<https://analyticalscience.wiley.com/publication/microscopy-and-analysis>)
- Nature (https://www.nature.com/subjects/electron-microscopy?error=cookies_not_supported&code=6b4950f4-7fd4-487f-8b03-91dc11be9a9f)

Библиотечные и Интернет-ресурсы

№	Ссылка на информационный ресурс	Наименование разработки в электронной форме	Доступность (количество точек доступа)
1	https://www.crys.ras.ru/sovet-po-elektronnoj-mikroskopii	Научный совет РАН по электронной микроскопии	64
2	https://www.eurmicsoc.org/en/organisation/membership/	European Microscopy Society	64
3	http://www.microscopist.ru/forum/	Microscopist.ru Портал микроскопистов	64
4	https://vk.com/tescanru	Микроскопы TESCAN, полезная информация для начинающих и продвинутых микроскопистов	64
5	https://cmm.centre.uq.edu.au/	The Center for Microscopy and Microanalysis	64
6	http://www.mwrn.com	Microscopedia. Информация по световой и электронной микроскопии	64
7	https://www.ou.edu/microscopy	Samuel Roberts No-	64

		ble Microscopy Laboratory	
8	http://www.nature.com/nature	Nature	64
9	http://www.nature.com/methods	Nature Methods	64
10	http://www.webofknowledge.com	Web of Science. Библиографическая база данных	64
11	http://www.sciencedirect.com/science	ScienceDirect. База журналов издательства Elsevier	64
12	http://www.elsevier.com	Elsevier Поисковая система публикаций	64
13	http://www.springerlink.com	SpringerLink. База журналов издательства Springer	64
14	http://www.springer.com	Springer Поисковая система публикаций	64
15	http://onlinelibrary.wiley.com/	Wiley Электронная библиотека	64
16	http://www.sciencemag.org/journals	Science/AAAS	64

Материально-техническое обеспечение дисциплины.

Для проведения лекций и семинаров будет использована стандартно оборудованная лекционная аудитория ИПЭЭ РАН (компьютеры со специализированным программным обеспечением; проектор, сеть WiFi, ноутбуки).

Для проведения практических занятий будет использовано оборудование ЦКП ИПЭЭ РАН «Инструментальные методы в экологии»: конфокальный микроскоп Nexcore NCF950, растровые электронные микроскопы CamScan MV 2300 и MIRA 3 LMN (TESCAN, Чехия), настольные установки для высушивания в критической точке Hitachi Critical Point Dryer HCP-1 (Hitachi Ltd., Япония) и Leica EM CPD300 (Leica Microsystems, Германия), напылительные установки S150A Sputter Coater (Edwards, Великобритания) и Q150R ES Plus (Quorum Technologies Ltd, Великобритания).

Учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы.

Библиотечные и Интернет-ресурсы, консультации с ведущими российскими и зарубежными специалистами в области электронной микроскопии.

Язык преподавания: русский.

Преподаватель: к.б.н. Неретина Анна Николаевна, Панкин Марк Сергеевич