

ПРИЛОЖЕНИЕ №3
к Положению о Региональном центре
коллективного пользования
научным оборудованием
«Объединенный Пущинский центр
Электронной Микроскопии»



УТВЕРЖДАЮ

врио директора ИБК РАН
Д.б.н. О.С. Моренков
08 2017 г.

Перечень типовых и комплексных работ и услуг
Регионального Пущинского центра коллективного пользования научным оборудованием
«Объединенный Пущинский центр Электронной Микроскопии»

Объекты исследования

ЦКП обеспечивает заинтересованным пользователям доступ к материально-технической и информационной базе центра для проведения исследований, а также оказывает непосредственную помощь в проведении исследований, структуры и ультраструктуры биологических объектов от биомакромолекул и их комплексов (ДНК, РНК, ДНК- и РНК-белковые комплексы, макромолекулярные комплексы) до морфологии и структуры клеток и тканей человека и животных (включая культуры клеток, тканей, биопсийный материал), тканей и клеток растений, микроорганизмов и их сообществ, вирусов, бактериофагов, искусственных носителей фармпрепаратов и др. широким спектром аналитических методов разработанных в области преимущественно просвечивающей электронной микроскопии.

Определение Типовых и Комплексных услуг

Приоритетом ЦКП является обеспечение междисциплинарных научных исследований включающих полный цикл работ (комплексных услуг), от консультаций по выбору оптимальных подходов для решения конкретной задачи до получения результатов электронно-микроскопического исследования и их интерпретации. Наряду с оказанием комплексных услуг ЦКП обеспечивает выполнение, или оказывает непосредственную помощь в осуществлении, отдельных этапов электронно-микроскопического исследования – оказывает типовые услуги.

К типовым услугам относятся услуги или работы включающие использование одной единицы оборудования, обеспечение реализации пользователем (или непосредственно сотрудником ЦКП) отдельных этапов комплексного электронно-микроскопического исследования.

К нетиповым (комплексным) услугам относятся: работы, включающие использование более одной единицы дорогостоящего и/или уникального оборудования (в т.ч. образовательные услуги); применение совокупности двух и более типовых услуг; аналитические услуги, связанные с планированием работ, которые включают поиск и/или изучение профильной литературы; аналитические услуги, связанные с цифровой обработкой и количественным анализом объекта исследования; работы с применением уникальных и приоритетных методов исследований ЦКП (а также их отдельных этапов); работы с образцами/объектами, физические и функциональные свойства которых

значительно затрудняют получение качественного результата анализа; выполнение работ с заранее неизвестным, неопределенным объемом временных затрат.

Перечень типовых и комплексных услуг ЦКП

I. Аналитические услуги.

- консультации по планированию исследования предполагающего электронно-микроскопический анализ с учетом специфики последнего;
- консультации по подготовке объекта к исследованию с учетом специфики исследуемого объекта;
- аналитические услуги по разработке и/или освоению нетиповых, новых для ЦКП, методов подготовки образца для анализа, включая поиск и изучение профильной литературы;
- оценка соответствия качества материала, подготовленного для анализа пользователем самостоятельно, целям исследования проводимого пользователем;
- пилотные исследования структуры и ультраструктуры отдельных органелл, типов клеток, тканей;
- комплексный качественный анализ ультраструктуры образца, оценка общего функционального состояния клеток, тканей.

II. Аналитические услуги связанные с компьютерной обработкой и количественным анализом данных.

- оцифровка фотоматериалов (фотопластинок, фотопленок, фотографий);
- нивелирование дисторсии электронно-микроскопических изображений;
- калибровка конечного фактического увеличения изображения на основе калибровочных стандартов (объект-микрометра; реплики дифракционной решетки);
- бесшовная сшивка мозаичных изображений, создание монтажей, панорам большой площади;
- эластичное выравнивание изображений серийных срезов в стеке по Z-оси (ряд методов, в т.ч. выравнивание, элайнмент, на основе автоматизированных алгоритмов поиска масштабно-инвариантных соответствий);
- определение степени поперечной компрессии полутонких и ультратонких срезов (является необходимым условием количественного анализа);
- определение толщины ультратонких срезов (включает ряд методов, в т.ч. «метод диаметров» на серийных срезах);
- трехмерная 3D-реконструкция тканей, клеток, их органелл и искусственных носителей фармпрепаратов (напр., липосом);
- трехмерная 3D-реконструкция нейронных и глиальных сетей мозга;
- подготовка иллюстраций для публикации, презентаций, докладов, отчетов;
- оценка симметрии и улучшение изображений анизотропных структур на основе метода вращения Маркхама и его модификаций;
- анализ отдельных частиц (singly particle), 3D реконструкция на основе изображений полученных методами негативного контрастирования и оттенения молекул напылением;
- морфометрия:
 - простые линейные измерения на одиночных изображениях (площадь сечения объекта, длина структуры, контура, подсчет объектов на единице площади изображения, на единице длины другого объекта);

- стереология (получение объемных характеристик на основе одиночных изображений);
- метод физического дисектора (определение объемных характеристик: число структур в единичном объеме, на парах изображений смежных срезов в серии);
- волюметрический анализ на основе 3D реконструкции объектов (определение объемных характеристик объектов: объем, площадь поверхности объекта, распределение и плотность объектов в объеме сложной или произвольно заданной формы, Гауссова кривизна, кратчайшие расстояния по поверхности объекта сложной формы и др.);
- денситометрический анализ (анализ электронной плотности исследуемых структур);
- определение размеров частиц, исследуемых методами реплик и оттенения.
- статистическая обработка результатов морфометрии, количественного анализа.

III. Образовательные услуги.

Сотрудники ЦКП и члены научно-технического экспертного совета ЦКП являются преподавателями научно-образовательных центров «Биология клетки» (ИБК РАН), «Учебный центр молекулярной биологии» (ИБ РАН), «Микробиология и биотехнология» (ИБФМ РАН) и читают студентам и аспирантам курсы лекций «Современные методы электронной микроскопии в биологии клетки», «Методы электронной микроскопии в клеточной биологии и медицине», «Структурно-функциональная адаптация микроорганизмов», участвуют в переподготовке и повышении квалификации специалистов в микроскопии и осуществляют обучение пользователей:

- специфике электронной микроскопии в биомедицинских исследованиях;
- принципам и условиям работы электронной оптики;
- юстировке электронного микроскопа;
- работе с электронным микроскопом в различных режимах;
- методам пробоподготовки;
- работе со световым микроскопом и настройке его системы освещения;
- работе со специальным программным обеспечением;

(!) Подавляющее большинство химических веществ используемых в процессе подготовки биологического материала к электронно-микроскопическому исследованию является опасным для здоровья, не меньшую опасность может представлять и исследуемый биологический материал. Работы на оборудовании лаборатории электронной микроскопии связаны с рентгеновским излучением, с применением сильных окислителей и летучих органических растворителей, высокой пожароопасностью, повышенными давлениями, высоким вакуумом, сжиженными газами и низкими температурами, большими электрическими напряжениями и токами.

Сотрудники центра осуществляют обучение пользователей мерам предосторожности и условиям безопасного проведения электронно-микроскопических исследований.

По окончании обучения сотрудники ЦКП проводят тестирование знаний пользователей об условиях безопасности при проведении работ, о правилах эксплуатации оборудования. Положительные результаты тестов являются необходимым, но не достаточным, основанием для допуска пользователей к самостоятельной эксплуатации оборудования.

IV. Услуги по препарированию и пробоподготовке.

1. Хирургические и препаративные процедуры.

- анестезия;
- диссекция, биопсия, аутопсия;

- приготовление толстых срезов (слайсов);
- методы концентрации клеток и органелл;
- центрифугирование и ультра центрифугирование;
- подсчет концентрации клеток.

2. Фиксация биологического материала.

Для проведения фиксации используется широкий спектр модификаций физиологических и фиксирующих растворов и условий их применения, каждый из которых нацелен на минимизацию артефактов ультраструктуры и выявление конкретных интересующих структур в исследуемой ткани.

2.1. приготовление фиксирующих растворов:

- приготовление носителей;
- буферных растворов;
- физиологических сред;
- растворов для хранения частично фиксированного материала (storage solutions);
- приготовление растворов тетроксидом осмия:
- в воде;
- в ацетоне;
- приготовление растворов альдегидов:
- приготовление растворов параформальдегида;
- приготовление растворов глутарового альдегида;
- приготовление фиксирующих растворов сложно-составной рецептуры на основе буферов и/или физиологических сред.

2.2. химическая фиксация

- иммерсия
- перфузия
- постфиксация тетроксидом осмия
- перфузия тетроксидом осмия
- активация диффузии фиксатора в объект (включает специально отработанные методы пропитки для трудно проницаемых барьеров в структуре объекта)

2.3. замещение воды на органические растворители (обезвоживание);

2.4. Физическая фиксация.

Используется главным образом для применения методов реплик, замораживания-скалывания, замораживания-скалывания-травления, и замораживания-замещения в сочетании с предварительной или последующей химической фиксацией или без нее в зависимости от дизайна/плана эксперимента.

- замораживание в жидком азоте;
- быстрая витрификация в жидком пропане;
- химическая фиксация в замороженном состоянии;
- комбинированные (комплексные) методы криофиксации.

3. Заключение в полимеры.

В зависимости от специфики материала, целей и задач конкретного исследования используются разные составы заливочных сред и протоколы их полимеризации.

- приготовление заливочных сред (смол, мономеров);
- заключение в заливочные среды (embedding) ;
- пропитка образца мономерами заливочных сред;

- активация диффузии фиксатора в объект (включает специально отработанные методы пропитки для трудно проницаемых барьеров в структуре объекта);
- специфическая ориентация образца;
- заключение с выравниванием образца в плоскости (напр., слайсов – flat embedding);
- заключение в заливочные среды культуры клеток и/или тканей;
- полимеризация при повышенной температуре:
- стандартная;
- экспресс методы;
- полимеризация метакрилатов (катализаторы и/или ультрафиолетовое облучение).

4. Приготовление сеточек и тонких пленок-подложек.

- мойка/чистка сеточек/бленд (ультразвуковая, микроволновая);
- приготовление полимерных пленок-подложек (формвар, бутвар, коллодий, парлодий, пиолоформ);
- укрепление полимерных пленок углеродом;
- приготовление углеродных пленок;
- гидратация углеродных и укрепленных углеродом пленок;
- обработка в тлеющем разряде (glow discharge);
- химическая гидратация;
- восстановление «провисших» пленок подложек.

5. Микротомия и ультрамикротомия.

- приготовление стеклянных ножей для ультратомии при комнатной температуре;
- приготовление стеклянных ножей для крио-ультратомии по методу Токуясу, с задержкой разлома;
- приготовление «зеркальных» стеклянных ножей для получения стабильных серий ультратонких срезов;
- чистка алмазных ножей:
- со слабыми загрязнениями;
- с сильными загрязнениями;
- получение полутонких срезов:
- специфическая ориентация образца с анизотропной структурой;
- прицельная микротомия конкретного участка ткани или его части (точная «заточка пирамидки»);
- получение одиночных полутонких срезов;
- получение серийных полутонких срезов (до 20);
- получение больших серий полутонких срезов (более 20);
- получение ультратонких срезов:
- специфическая ориентация образца с анизотропной структурой;
- прицельная ультратомия конкретной клетки или ее части (прецизионная «заточка пирамидки»);
- получение одиночных ультратонких срезов;
- получение серийных ультратонких срезов (до 50);
- получение больших серий ультратонких срезов (более 50);
- получение ультратонких срезов с метакрилатных блоков;
- криоультратомия

6. Монтирование образца для исследования в ЭМ.

- монтирование одиночных ультратонких срезов;
- монтирование серийных ультратонких срезов (до 50);
- монтирование больших серий ультратонких срезов (более 50);
- нанесение образцов макромолекул на полимерные пленки;

- нанесение образцов макромолекул на углеродные пленки;
- заключение образца между тонкими пленками (создание «сэндвичей»).

7. Окраска и контрастирование.

- окраска полутонких срезов;
- дифференциальная окраска полутонких срезов;
- дифференциальная окраска полутонких срезов со сниженным прокрашиванием фона;
- контрастирование негативное (в т.ч. макромолекул);
- контрастирование ультратонких срезов тяжелыми металлами:
 - солями урана;
 - комплексом лантаноидов;
 - солями свинца:
 - по Рейнольдсу;
 - тройное окрашивание по методу Sato;
 - танинами;
- комплексное контрастирование (в т.ч. для выявления специфических структур);
- иммуномечение;
- быстрая окраска нейронов по Гольджи с тонировкой золотом
- методы трейсинга.

8. Методы реплик и оттенивание.

- замораживание-скалывание (тканей, суспензий клеток, липосом и др.);
- замораживание-скалывание-травление;
- замораживание-высушивание;
- оттенивание платиной с углеродом;
- оттенивание под заданными углами;
- круговое оттенивание;
- оттенивание макромолекул, вирусов, фагов;
- очистка реплик.

V. Микроскопия.

1. Световая микроскопия.

- самостоятельная работа пользователя на микроскопе;
- работа на микроскопе AxioImager M1 в сопровождении (при помощи) сотрудника ЦКП;
- настройка системы освещения микроскопа сотрудником ЦКП;
- получение отдельных изображений;
- получение отдельных изображений серийных срезов;
- настройка работы микроскопа в полуавтоматическом режиме;
- получение изображений большой площади;
- получение изображений большой площади серийных срезов;
- калибровка и простые измерения.

2. Электронная просвечивающая микроскопия.

- самостоятельная работа пользователя на микроскопе;
- работа на микроскопе в сопровождении сотрудника ЦКП:
 - анализ ультраструктуры и/или функционального состояния объекта исследования;
- проявка фотоматериалов/фотопечать сотрудником ЦКП.

VI. Обслуживание, наладка, ремонт электронно-микроскопического оборудования.

- замена катода электронной пушки;
- юстировка микроскопа;

- калибровка фактических увеличений микроскопа на основе калибровочных стандартов;
- комплексные работы по тестированию, ремонту и наладке электронно-микроскопического оборудования.

VII. Порядок определения стоимости услуг

1. Стоимость (F) типовых услуг определяется себестоимостью одного часа работы на задействованной единице оборудования ЦКП и складывается из:

А - амортизационных отчислений по оборудованию, задействованному в выполнении работ, руб. в час;

В - затрат на содержание и обслуживание основного и вспомогательного оборудования, задействованного в выполнении работ, руб. в час;

С - затраты на коммунальные услуги (электроэнергия, вода), руб. в час;

Д - затраты на расходные материалы, руб. в час;

Е – заработная плата сотрудника ЦКП проводящего, или сопровождающего проводимые пользователем, работы на единице оборудования, руб. в час.

2. Стоимость комплексных (нетиповых) услуг определяется из расчета себестоимости одного часа работы комплекса оборудования (G) по следующей формуле:

$G = (F_1 + F_2 + F_3) \times K$, где

F_1, F_2, F_3 – себестоимости одного часа работы на 1-й, 2-й и 3-й единицах оборудования, задействованного в выполнении работ (см. пп. VII.1.);

K - коэффициент качества, равный 1, в случае рутинного анализа адекватно подготовленного материала, или более 1, в зависимости от: качества исходного материала подготовленного для анализа, наличия/отсутствия в ЦКП методических наработок для решения задачи, от необходимой степени проработки результатов исследований (измерений), от важности и актуальности полученных в итоге результатов и знаний – что в дальнейшем определяет уровень публикаций и заранее должно быть закреплено в Договоре.