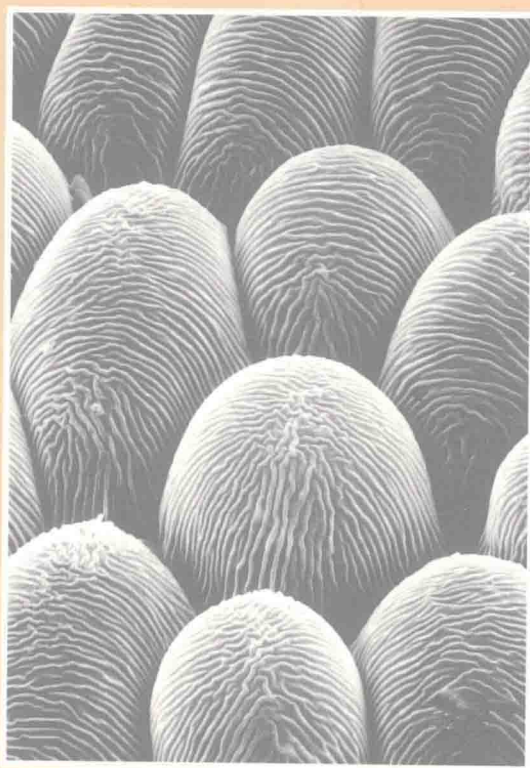


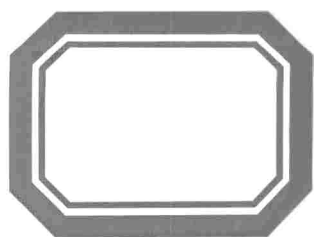
科儀叢書 4

生物電子顯微鏡學

陳家全 李家維 楊瑞森 著



行政院國家科學委員會
精密儀器發展中心編印



生物電子顯微鏡學

行政院國科會精密儀器發展中心編印

生物電子顯微鏡學

初 版 / 中華民國八十年七月
初版七刷 / 中華民國九十三年四月
作 者 / 陳家全・李家維・楊瑞森

發行人 / 陳建人
發行所 / 行政院國家科學委員會精密儀器發展中心
新竹市科學工業園區研發六路 20 號
電話：03-5779911 轉 303・304
傳真：03-5780003
網址：<http://www.pidc.gov.tw>
行政院新聞局出版事業登記證局版臺業字第 2661 號

定 價 / 精裝本 新台幣 400 元
平裝本 新台幣 300 元
郵撥戶號 / 00173431 國科會精密儀器發展中心

打字暨印刷 / 彩言商業設計社 03-5247320

ISBN 957-00-0152-6 (精裝)

ISBN 957-00-0153-4 (平裝)

===== 作者 =====

陳家全 國立台灣大學動物學學士
美國喬治亞大學動物研究所進修
現任國立台灣大學動物學研究所副教授。
(第一章至第六章)

李家維 國立中興大學植物學學士
國立台灣大學海洋研究所碩士
美國加州大學聖地牙哥海洋研究所博士
現任國立清華大學生命科學研究所教授
(第七章至第九章)

楊瑞森 國立中興大學植物學學士及碩士
美國康乃爾大學農學博士
現任新竹食品工業發展研究所研究員
(第十章至第十二章)

———— 編者的話 ————

科儀叢書 3—「材料電子顯微鏡學」在七十九年六月出版後，各方的掌聲及鼓勵不斷，所有的作者及編輯小組同仁欣慰萬分。

這一本「生物電子顯微鏡學」的出版是在接力賽的鬥志下積極完成的，希望藉著本書的出版及流傳，更能拓展電子顯微鏡應用的領域。

在此非常感謝三位作者：陳家全副教授、李家維教授及楊瑞森博士把多年使用電子顯微鏡的寶貴經驗及研究成果分享給讀者，更要謝謝三位作者在編校本書過程中不斷給予我們的指導。最後我們更懇切的希望各位讀者給我們指正。

郭 懿 純

八十年五月

於國科會精儀中心

—— 序言 ——

在科學研究的領域中，精密的儀器設備與熟練的實驗技巧一直是擴展新知的不二法門，而電子顯微鏡技術可說是融合二者最典型的例子之一，尤其是在生命科學的研究上。從電子顯微鏡發明至今，短短的五十年中，不僅僅是儀器本身的改良突飛猛進，在實際應用上更是快速而廣泛地深入各個相關科系中，不但在形態解剖上提供了超顯微結構的直接證據，更結合了細胞化學、分子遺傳、免疫生化、冷凍生物、放射顯像等技術，使其對生命科學的貢獻遠凌駕於傳統光學顯微鏡之上。

然而，電子顯微鏡的構造複雜，涉及許多物理原理，而且操作校正困難，對一般生物出身的學者實在是一大限制；加上生物樣品種類繁多，處理方法各異，非有專業之技術人員實難兼顧。承蒙國科會精密儀器發展中心有心協助提昇各類貴重儀器在國內應用之水準，邀請筆者等編纂生物方面之電子顯微鏡專書，遂將多年來在研究與教學上的實際經驗累積整理成冊，提供參考。本書內容著重於電子顯微鏡在生命科學上的應用，全書共分為十二章，分別由李家維博士、楊瑞森博士與本人共同執筆，其中包括穿透式電子顯微鏡及掃描式電子顯微鏡之構造與基本原理、操作及校正技巧、生物樣品處理的各種相關技術以及結果的分析、研判等。為使讀者易於瞭解，書中儘可能條列各種方法步驟，並以圖繪及照片詳加說明，期能對需要利用電子顯微鏡作為研究工具的研究人員或有志加入此行列的新進者有所助益。當然，熟練的電顯技術並不易只靠研讀本書而精通，必須配合實際的操作與不斷的練習、改進，方能得心應手。

本書前六章中所有電顯照片均由國科會台北貴重分析儀器使用中心設於國立台灣大學理學院電子顯微鏡室技術員任曉旭小姐協助完成，由衷感激。撰寫期間又蒙精密儀器發展中心編輯小組的耐心催稿及精心編校，方得以順利完成，特在此一併誌謝。

陳 家 全 謹識

中華民國八十年四月於新店

—— 目錄 ——

編者的話	vii
序言	ix
第一章 電子顯微鏡簡介	1
一、光學的基本原理	3
二、電子顯微鏡的發展與種類	5
三、穿透式電子顯微鏡之構造	6
四、穿透式電子顯微鏡之操作與校正	11
• 參考文獻	21
第二章 固定與包埋	23
一、固定的目的與條件	25
二、固定液	28
三、脫水	31
四、包埋劑	32
五、滲透與包埋	34
六、穿透式電子顯微鏡樣品前處理程序	35
• 參考文獻	37
第三章 超薄切片技術	39
一、樣品塊的修整	41
二、銅網與支持膜	41
三、超薄切片機與玻璃刀	45
四、切片	49

五、切片時的困擾	51
六、染色	52
• 參考文獻	59
 第四章 負染色，金屬投影與鑄模	61
一、負染色	63
二、金屬投影	71
三、表面鑄模	76
• 參考文獻	81
 第五章 冷凍斷裂與冷凍蝕刻技術	83
一、冷凍原理與方法	85
二、冰蝕儀	93
三、斷裂與蝕刻	96
四、複製模片之製作與清洗	98
五、影像之判定	99
• 參考文獻	105
 第六章 掃描式電子顯微鏡技術	109
一、掃描式電子顯微鏡之構造與原理	111
二、樣品之製作	114
三、臨界點乾燥	120
四、儀器的使用	123
• 參考文獻	128
 第七章 細胞化學法	133
一、前言	135
二、染核酸的方法	136
三、染蛋白質的方法	138
四、染多醣類的方法	140

• 參考文獻	142
第八章 免疫電子顯微鏡術	143
一、前言	145
二、製備膠體金	146
三、結合膠體金與蛋白質	149
四、樣品的製備與標定過程	154
• 參考文獻	157
第九章 自動放射顯像術	159
一、前言	161
二、成像原理與放射性源、感光乳劑之選擇	163
三、製備樣品	165
四、暗房設備	165
五、覆蓋感光乳劑	166
六、顯影及定影	167
第十章 生物試樣冷凍製片技術	169
一、前言	171
二、一般原理	172
三、冷凍置換法	174
四、冷凍乾燥法	181
五、冷凍切片	182
• 參考文獻	185
第十一章 生物立體顯微技術	189
一、前言	191
二、試樣製備	194
三、試樣選取	195
四、胞器體積測量	195

五、胞器表面積測量	200
六、胞器大小測量	201
七、胞器出現頻度測定	202
八、細胞及胞器形狀	205
九、立體觀察鏡 (Stereo Viewer)	206
• 參考文獻	207

第十二章 分析型電子顯微鏡 209

一、前言	211
二、電子束對試樣效應	211
三、X 光的偵測	215
四、能量光譜儀的定性分析	221
五、能量光譜儀的定量分析	223
六、結論	231
• 參考文獻	231

附錄

「科儀新知」相關文獻一覽表(第一卷至第十二卷)	237
-------------------------------	-----

索引

I. 英文名詞索引	239
II. 中文名詞索引	253

第一章

電子顯微鏡簡介

陳家全

臺灣大學動物學研究所副教授

一、光學的基本原理	3
二、電子顯微鏡的發展與種類	5
三、穿透式電子顯微鏡之構造	6
(一)照明系統	7
(二)呈像系統	8
(三)影像轉換系統	9
(四)真空系統	10
四、穿透式電子顯微鏡之操作與校正	11
(一)開機	13
(二)電子槍的操作與校正	14
(三)聚光鏡與可動孔徑之校正	14
(四)標本之置換與物鏡之校正	15
(五)對焦與照像	17
• 參考文獻	21

自古以來，人類對於無限大與無限小的世界，就一直存有相當的崇敬與好奇心，到底宇宙有多大？物質有多小？而有趣的是，不管是探究浩瀚宇宙的邊際或是鑽研顯微的世界，所使用的工具卻都是光與透鏡。光學顯微鏡的發明，幾百年來已帶領人類遊歷了肉眼所無法見到的世界，然而，光學顯微鏡有其物理學上的極限，仍無法滿足人類永無止境的探索，因而才有了電子顯微鏡的產生。電子顯微鏡的發明可以說是二十世紀最偉大的貢獻之一，不論是在材料科學、電子電機、地質、農業、生物與醫學上均已成為不可缺少的重要研究工具，尤其是在生命科學的研究上，它引領我們進入了超顯微結構 (ultrastructure) 世界的殿堂。

與光學顯微鏡比較起來，電子顯微鏡是一種價錢昂貴、體積龐大而且構造複雜的儀器，它利用電子取代了可見光作為照明光源，以電磁透鏡代替玻璃透鏡來偏折電子，必須有強大而穩定的電壓與電流以及極高的真空度方能正常運作，樣品的處理更是要求嚴格。除此之外，精確的校正與妥善的維護保養也都是使用電子顯微鏡必備的條件。如此精密的儀器在使用操作上當然不如光學顯微鏡來得簡單方便，但其所依據之原理基本上與光學顯微鏡非常相似，因此，在深入瞭解電子顯微鏡之前，必須先從光學的基本原理談起。

一、光學的基本原理

由於人的眼睛在構造上的限制，一般而言，當兩個物體相距超過 0.2 mm 時，肉眼方能區分得出來。因此，要觀察一個微小物體的構造，通常必須靠顯微鏡來協助，而其中有三個重要的因素會直接影響我們所看到影像的清晰度，分別是放大倍率 (magnification)、對比度 (contrast) 與解像力 (resolving power 或 resolution)。放大倍率乃指透過顯微鏡後物體所呈現之影像與實物大小的比值，

很顯然的，物體必須能夠放大至超過 0.2 mm 以上，方可為肉眼所見。而對比度則為主體與背景明暗差別的程度，通常較高對比度的影像較為清楚。至於解像力則為一光學系統中所能區分兩點間最小距離的能力，比如說，人的眼睛為一光學系統，當二個小點接近至小於 0.2 mm 時，肉眼即無法加以分辨，因此 0.2 mm 稱為肉眼的最高解像力。一般所使用的光學顯微鏡其最高解像力為 0.2μ ，比肉眼小一千倍，因此一千倍即稱為光學顯微鏡的最大有效放大倍率 (maximum useful magnification)。雖然我們在使用光學顯微鏡時，放大倍率常可超過一千倍，但其實在這倍數以上，我們所看到的只是一個模糊的放大影像，並未觀察到更微小的構造，所以超過一千倍以上的倍數稱為無效放大倍率 (empty magnification)。

光學顯微鏡的最高解像力之所以只有 0.2μ ，與光的特性有關。我們曉得，光是一種波動 (wave motion)，當兩個光波相遇時會有干涉 (interference) 的現象產生，換句話說，光波的波峰 (crest) 與波谷 (trough) 相遇時的位置會造成累加或相互抵消的狀況。另外，當光波遇到障礙物時，尤其是在穿過小孔洞的時候，會有繞射 (diffraction) 的現象發生。由於干涉與繞射的作用，使得光線在經過一小孔徑 (aperture) 而呈像時，我們所見到的不是一個光點，而是一個個同心的圓環，稱之為埃氏光環 (Airy disk)，埃氏光環之大小與孔徑大小、波長長短均有關聯，此即影響解像力的主要原因。理論上，根據數學公式的推算，光學顯微鏡的解像力只能達到所使用光線波長的一半。

$$RP = \frac{0.612\lambda}{n \sin\alpha} = \frac{0.6 \times 0.5}{1.5} = 0.2 (\mu)$$

RP：解像力 (resolving power)

λ ：波長 (wavelength)

n：折射率 (refractive index)

α ：角孔徑 (angular aperture)

可見光之波長由紅至紫約為 0.4μ 至 0.7μ ，因此，光學顯微鏡的最高解像力僅為 0.2μ 。而利用較短波長的光線來作為顯微鏡的照明系統，成為提昇解像力最有效的途徑。

二、電子顯微鏡的發展與種類

光學顯微鏡技術從十六世紀開始，經過數百年來不斷的革新與改進，到了十九世紀時已達到其解像力的極限，要突破此一限制，必須選用波長更短的光線作為照明光源，因而紫外光顯微鏡、X 光顯微鏡相繼產生，但由於彼等所提昇的效率有限，並無重大成就。好在當時物理學家發現，一個高速運動的微小粒子可產生波的形式，此即所謂物質波 (matter wave)。當電子被強大電場加速時，其電子波 (electron wave) 之波長可短至 $\text{\AA}$ (埃) 以下，而且在磁場的作用下，電子會因受力而偏折，利用纏繞的線圈通入電流所產生的強力磁場可使穿過其中的電子產生偏轉，與光經過玻璃透鏡時被偏折的情形相似，因此利用電子作為照明光源，便可突破光學顯微鏡解像力的極限。第一台真正的電子顯微鏡是在 1933 年由 Ruska 所發明的，當時雖然只能達到 $400 \text{ \AA}$ 的解像力 (比光學顯微鏡提高 5 倍)，卻是一項重大的突破，不但使科學研究的領域提昇至超顯微的世界，也使他終於在 1986 年得到諾貝爾物理獎。

根據電子照射在標本上的方式以及接收呈像的訊息種類，電子顯微鏡可分為穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM)，掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM)，掃描穿透式電子顯微鏡 (Scanning Transmission Electron Microscope, STEM)，以及電子微探分析儀 (Electron Probe Microanalyzer, EPMA) 等。當電子照射在標本上時，如果標本夠薄，電子可能直接穿過標本而未碰到任何障礙，即所謂穿透電子 (transmitted electron)，若撞擊到標本上成分原子之原子核，由於電子與原子核二者之質量差別很大，電子會產生相當大角度的偏折或反彈，偏折的電子稱為散射電子 (scattered electron)，反彈回來的電子則稱為背向散射電子 (backscattered electron)。若撞擊到標本成分原子外圍環繞的電子時，除了本身會產生偏折外，也可能將其他電子撞離其原本的電子軌域，此種因被撞擊而脫離原子的電子則稱為二次電子 (secondary electron)。由於電子被撞離電子軌域後，其他能階之電子會過來補充，這種電子在能階上跳動的現象常伴隨著能量的釋出，而此能量之大小視電子能階高低常以特定波長或能量之 X 射線釋出 (圖 1.1)。上述種種訊息均可作為電子顯微鏡呈像之依據，譬如穿透式電子顯微鏡是利用穿透的電子呈像，掃描式電子顯微鏡則以二次電子或背向散射電子來呈像，而 X 射線則可作為電子微探

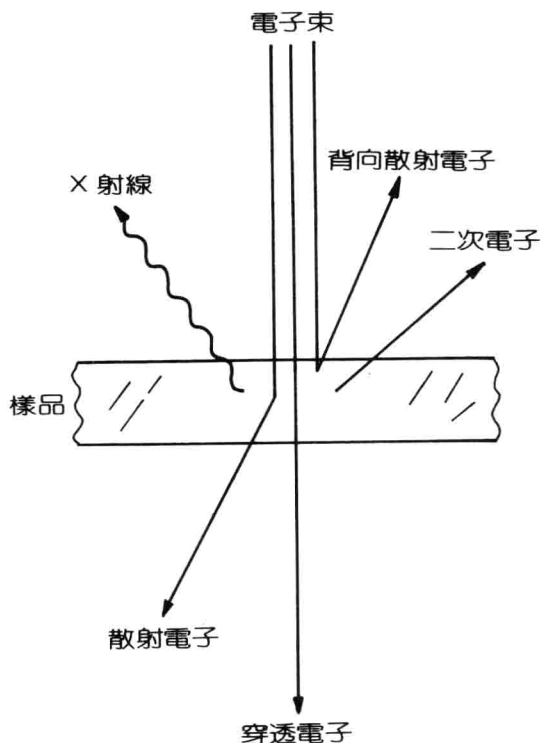


圖1.1

高速運動之電子撞擊在樣品上時所產生的各種可能狀況。

分析儀分析樣品成分元素之依據。

三、穿透式電子顯微鏡之構造

穿透式電子顯微鏡 (圖 1.2) 主要由主體 (main body)、真空系統 (vacuum system) 及電路系統 (electronic system) 所組成，主體又包含鏡柱 (column) 及一些控制鍵鈕，其中鏡柱為電子顯微鏡中最重要的部分，由上而下分別為照明系統 (illuminating system)、呈像系統 (image forming system) 及影像轉換系統 (image translating system)；真空系統則包括真空唧筒 (vacuum pump) 與冷卻系統 (cooling system)。至於電路系統，除了負責提供電子顯微鏡強大之加速電壓 (accelerating voltage) 及電流用以加速和偏轉電子外，並控制顯微鏡之操作與校正等，分別詳述於下。

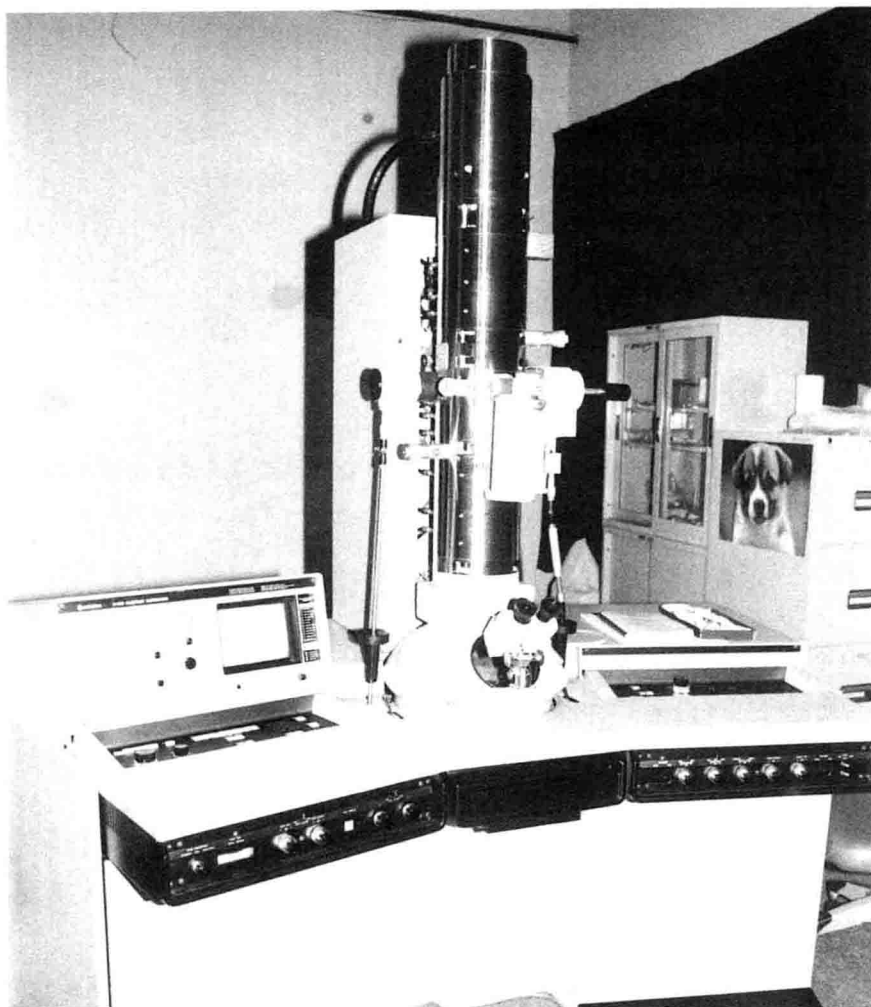


圖1.2 穿透式電子顯微鏡外形構造圖。

(一)照明系統

照明系統是由電子槍 (electron gun) 與聚光鏡 (condenser lens) 所組成，其最大之作用在產生電子並將之聚集成電子束 (electron beam) 照射於標本上。電子槍之構造如圖 1.3，陰極為一 V 字形鎢絲稱為燈絲 (filament)，外圍有一威氏罩 (Wehnelt cap)，燈絲在加熱至 2600°C 左右時即會有大量的電子自尖端釋出