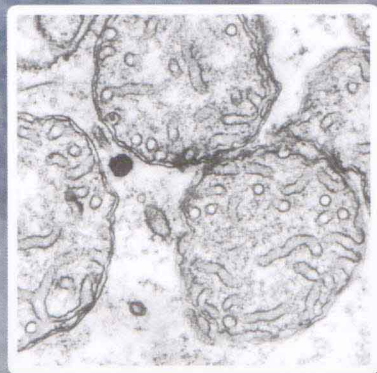
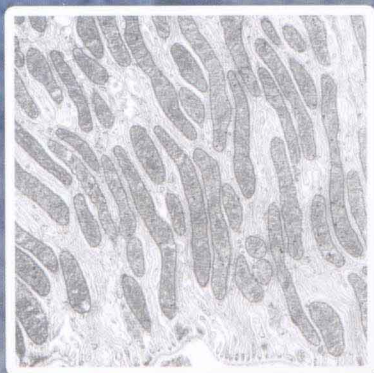
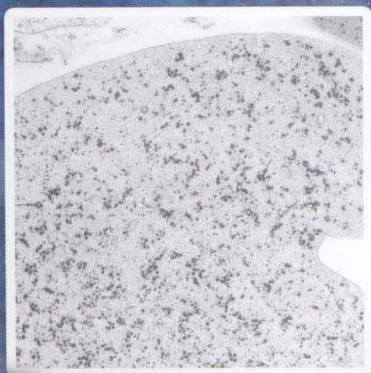


主编◎汪克建

医学电镜技术及应用

YIXUE DIANJING JISHU JI YINGYONG



本书由重庆市自然科学基金(项目编号 cstc2011jjA0139)资助出版

医学电镜技术及应用

主 编 汪克建

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书总结了作者多年开展电镜技术所获得的经验,并在此基础上融合了国内外多种先进技术和理念。全书分为3篇,共23章,介绍了电镜及电镜技术、细胞的超微结构和超微病理、组织超微结构和超微病理等相关内容。第一篇为电镜及电镜技术,介绍了常用电镜的类型、简单的成像原理和观察方法,以及常用的电镜样品制备技术等内容;第二篇为细胞超微结构和超微病理,阐述了细胞膜、细胞核、线粒体、内质网、高尔基复合体、溶酶体、微体、细胞骨架等超微结构和超微病理变化;第三篇为组织超微结构和超微病理,介绍了造血系统、心血管系统、消化系统、呼吸系统、肾、内分泌系统和神经系统的超微结构和超微病理。

本书可供生物医学相关工作者特别是医学研究人员参考,也可供临床医务工作者和病理工作者阅读。

图书在版编目(CIP)数据

医学电镜技术及应用 / 汪克建主编. —北京:科学出版社,2013. 8
ISBN 978-7-03-038282-5

I. 医… II. 汪… III. 电子显微镜-基本知识 IV. TN16

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第181960号

责任编辑:戚东桂 / 责任校对:刘亚琦

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

张立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年8月第一次印刷 印张:11 1/4

字数:262 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



前 言

本书编委主要为重庆医科大学生命科学研究院电镜组(原基础医学院电镜室)成员。20世纪80年代,在李维信教授的领导下,我们为研究生开设了“电镜技术与细胞超微结构和超微病理学基础”课程,后来又增加了组织超微结构和超微病理学内容。该课程的讲义在20世纪90年代和21世纪初进行了多次修订。

在对研究生教学和对生物医学科研工作者服务过程中,明显感觉到相关科研人员和研究生对微观世界的认识有着非常浓厚的兴趣,特别是与生物医学有关的细胞超微结构、组织超微结构及相关超微病理变化,以及结构和功能之间关系等方面。考虑到相关科研人员的需求和本团队多年的积累,我们在原有的讲义基础上,对内容进行了大量的补充和修改,最终形成了这本专著,为生物医学相关科研人员提供参考。

在本专著编写过程中,编者注重生物医学相关研究,特别是医学相关研究的内容,去掉了大量有关仪器复杂的原理和技术方面的介绍,从而使本书对医学相关研究者而言,具有更强的实用性。本专著的内容主要分为3篇:第一篇,电镜及电镜技术,介绍了常用电镜的类型、简单的成像原理和观察方法,以及常用的电镜样品制备技术等内容。第二篇,细胞超微结构和超微病理,对细胞膜、细胞核、线粒体、内质网、高尔基复合体、溶酶体、微体、细胞骨架等的超微结构和超微病理变化进行了介绍。第三篇,组织的超微结构和超微病理,对造血系统、心血管系统、消化系统、呼吸系统、肾、内分泌系统和神经系统等常见的超微结构和超微病理进行了介绍。在本书编写过程中,全体编委总结了本实验室多年电镜技术服务过程中所获得的经验,也学习了国内外的多种先进技术和理念,期望能够对相关科研人员提供相关的信息。

本书的编写得到了重庆医科大学生命科学研究院、基础医学院和其他相关管理部门的大力支持,特别是李维信教授给予大量指导和提供宝贵建议,在此表示衷心感谢。

本专著可供生物医学,特别是医学相关研究者作为参考书使用,也可供临床医务工作者和病理工作者参考阅读。由于编写组成员的视野和能力有限,书中难免有不妥之处,望读者能够给予指正,以便再版时进一步完善。

汪克建
2013年6月

《医学电镜技术及应用》编写人员

主 编 汪克建
副主编 廖晓岗 罗子国 李 巍
编 者 (按姓氏汉语拼音排序)
程基焱 泸州医学院
范京川 重庆医科大学
贺桂琼 重庆医科大学
李 巍 重庆医科大学
廖晓岗 重庆医科大学
罗子国 重庆医科大学
汪克建 重庆医科大学
王 红 重庆医科大学
徐 晨 重庆医科大学
许 舸 重庆医科大学
杨杰顺 重庆医科大学
赵德璋 重庆医科大学

目 录

第一篇 电镜及电镜技术	(1)
第一章 绪论	(1)
第二章 电镜的类型、基本构造及原理	(7)
第三章 常规透射电镜样品制备技术	(14)
第四章 透射电镜特殊样品制备技术	(25)
第五章 扫描电镜的生物样品制备技术	(38)
第二篇 细胞超微结构和超微病理	(48)
第六章 质膜及其特化物的超微结构与超微病变	(48)
第七章 细胞核的超微结构与超微病理	(59)
第八章 核糖体的超微结构与功能	(68)
第九章 内质网的超微结构与超微病理	(71)
第十章 高尔基复合体的超微结构与功能	(77)
第十一章 线粒体的超微结构与超微病变	(82)
第十二章 溶酶体的超微结构及病理学意义	(89)
第十三章 微体的超微结构与功能	(95)
第十四章 细胞骨架的超微结构与功能意义	(97)
第十五章 中心粒、纤毛、鞭毛的超微结构与超微病变	(103)
第十六章 包含物	(106)
第三篇 组织超微结构和超微病理	(109)
第十七章 血液生成及发生的超微结构基础	(109)
第十八章 心血管系统超微结构与超微病理	(119)
第十九章 肝、胃、肠、胰的超微结构及超微病变	(125)
第二十章 呼吸道的超微结构与超微病理变化	(135)
第二十一章 肾的超微结构与超微病理	(140)
第二十二章 内分泌系统的超微结构	(146)
第二十三章 神经组织的超微结构和超微病理	(153)
参考文献	(158)
附录 1 专业名词英汉对照表	(159)
附录 2 常用试剂配方	(170)

第一篇 电镜及电镜技术

第一章 绪 论

电子显微镜(microscope, EM)是研究细胞核组织超微结构及其功能的一种重要工具,在生物医学领域有广泛的使用范围。超微结构一般是指光学显微镜不能分辨的组织、细胞内细微形态结构(亚显微结构)和一些生物大分子的结构。对于解剖学、组织学、胚胎学、细胞学、病理学、法医学、病原生物学等基础医学形态学学科,电镜是常使用的形态学研究工具。在技能学科,如分子生物学、生理学、生物化学、病理生理学、药理学等学科,也可利用电镜这种形态学工具探讨结构和功能之间的关系。

人类是从宏观到微观不断深入完善对机体的认识的。人眼的分辨率大约是 0.2mm,如果两点太靠近,成像在视网膜上就连成一个点而无法分辨。因此,人眼分辨不出只有几微米大小的细胞。18 世纪光学显微镜的发明,让人类认识了细胞,并认识和推测出部分细胞器,但受光学波动性限制,光学显微镜的分辨率不能超过 0.2 μ m。细胞学说是 19 世纪最重大的自然科学发现之一。

电子显微镜的发明,突破了光学显微镜由于光波的衍射效应所限制的分辨极限,使许多在光学显微镜下争论不休的问题得到了明确的回答,更使人们对微观结构的认识又产生了一次新的飞跃。目前透射电子显微镜的分辨率已经达到 1.5~2 $\text{\AA}$,几乎能分辨所有的原子;并在常规电镜的基础上,研究出各种各样的方法,对细胞及其内部结构的形态和功能不断进行研究。随着科学技术手段和研究方法的不断进步,电子显微镜具有高分辨率且直观的特点,是其他手段和方法不能替代的,仍将是现代科学技术不可缺少的工具。

一、电镜技术发展简史

1932 年,德国人 Knoll 和 Ruska 在电子光学理论发展的基础上,发明了世界上第一台透射式电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),虽然放大倍数仅 12 倍,但却证明了以电子束和电子透镜组成的电子光学系统可以像光学显微镜一样将物体放大成像。到 1934 年,他们把电子显微镜的分辨率提高到 50nm,放大倍数达到 1 万倍。这就是电子显微镜的初型设计阶段。1939 年,德国西门子公司生产了世界上第一批作为商品的透射式电子显微镜,分辨率优于 10nm,放大倍数达到 10 万倍。以后,透射式电子显微镜逐渐改进设计,提高仪器分辨率。

20 世纪 60 年代,透射式电子显微镜的分辨率达到了 0.5nm。70 年代末,电子显微镜的点分辨率已优于 0.3nm,晶格条纹分辨率达到 0.14nm,实现了人们早就向往的对原子像和晶格像的观察。20 世纪 80 年代,电子显微镜已发展成为一种综合分析仪器,在高分辨率的

透射式电子显微镜的主体上,安装具有景深长、便于制备样品、分辨率优于 5nm 的扫描透射型附件,还可以安装配有计算机系统的能量分析谱仪,能对样品进行元素的成分分析,使透射式电子显微镜既能观察样品的形态、又能分析样品的成分。

1942 年,剑桥大学的 D. M. Mullan 在 C. Wcatly 的指导下,首次制成世界上第一台扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)。由于当时电子技术的落后,分辨率只能达到 1 μm ,比光学显微镜还要低。拍摄一幅图像的曝光时间要长达几小时。所以,第一台扫描电子显微镜未引起普遍重视,致使扫描电子显微镜发展受到了极大影响,直到 1965 年才基本定型。但由于扫描电子显微镜具有使用范围广、分辨率高、图像立体感强、放大倍率选择范围广、制品制备方便等优点,所以后期发展速度比透射式电子显微镜还要快得多。目前,扫描电子显微镜还可装 X 线光谱仪、电视及用微机控制的图像处理仪附件。

我国电子显微镜的研制在 1958 年以前还是空白。1959 年由中国科学院光学精密机械研究所、上海精密医疗器械厂、中国科学院电子学研究所等单位共同研制了我国第一台透射式电子显微镜,型号 DX-100,其分辨率、放大倍数都比较低。经过多年的努力,1977 年由上海设计制造出了高分辨率的透射式电子显微镜,点分辨率达到 0.3nm,晶格条纹分辨率达到 2nm,放大倍数可达到 80 万倍。

20 世纪 60 年代初,我国就有一些大学、研究所进行了扫描式电子显微镜的理论研究和仪器试制工作。经过努力,由中国科学院仪器厂试制成功了我国第一台 DX-3 型扫描电子显微镜。目前我国已能够生产高分辨率、多功能的扫描电子显微镜。

二、电子显微镜与光学显微镜的比较

为了便于理解电子显微镜的构成和成像过程,将电子显微镜与光学显微镜作一比较:电子显微镜的总体结构、成像原理、操作方式等均与光学显微镜有着本质上的区别,但它们的显微放大过程基本相似,都是由光学系统、成像系统和放大系统完成显微放大过程(表 1-1)。

表 1-1 电镜与光镜光路图的比较

	电子显微镜	光学显微镜
照射	电子束	光束
波长	0.859nm(20kV) 0.37nm(100kV)	750nm(可见光) 200nm(紫外光)
介质	真空	空气
透镜	电磁透镜	玻璃透镜
聚焦	电聚焦	机械
反差	散射吸收、衍射、相位	吸收、反射
显像方式	荧光屏	直接观察

光学显微镜一般采用可见光作为光源,玻璃透镜作为成像、放大透镜。其成像过程是:可见光通过空气和玻璃透镜这两种不同的物质界面时,光的运动速度改变,从而改变运动方向,使之会聚一点(焦点),然后再发散,这样就可以把物体的细节加以放大成像,使人们观

察到物体的结构。

电子显微镜采用电子束作为光源,电磁透镜作为成像、放大透镜,其基本成像过程是:电子束通过电子磁透镜时,由于电磁场的作用使电子改变其运动方向而会聚在一点(焦点),然后发散,从而把物体的微细结构放大成像。不过此时所成的像,人眼不能直接观察到,还须通过一个荧光屏才能看到。此外,电磁透镜有一个基本的不同于光学玻璃透镜的特点是,电子束离开它原来的运动轨迹弯曲或者折射是由于外力对电子的作用,在磁场中始终有一个分力作用在电子上,所以折射是连续的,并且在折射介质(磁场)和浸入介质(真空)之间没有明显的界面,而光学显微镜光线的折射是产生在透镜与其浸入介质之间的分界面上。

三、分辨率与形态研究的关系

人类总是希望能更加深入地了解周围世界的物体,特别是对微小的细节非常感兴趣,随着放大镜的使用,人类可以将物体进行放大,可以观察物体的细节,例如用 10 倍的放大镜可以将两点间的距离放大 10 倍,肉眼就可以分辨出 0.02mm 之间的两点,因此物体可以看得更清晰,但单个放大镜的倍数毕竟有限,不能达到更高的分辨率。

随着社会的发展,人类学会了使用多个放大镜进行组合,就成了光学显微镜。光学显微镜一般包括物镜和目镜,放大倍数为物镜的放大倍数和目镜放大倍数的乘积,光学显微镜的发明是自然科学史上的重大事件之一,极大地推动了生物学和医学的发展。光学显微镜发明和使用后,相继诞生了组织学、细胞学、病理学等相关学科,促使人类对自然界的认识也由宏观世界进入了微观世界。

自 17 世纪光学显微镜问世以来,对生物科学、医学的发展有很大的推进作用。但由于受到光波特性的限制,光学显微镜的分辨率有一定限度,相对较低,即只能观察到大于 0.1 μm 的结构,对细胞内和细胞间许多细微结构的观察则无能为力。

遗憾的是,由于受到光波特性的限制,光学显微镜的分辨率也有一定限度,相对较低,即只能观察到大于 0.1 μm 的结构,对细胞内和细胞间许多细微结构的观察则无能为力。

分辨率(resolution)或称分辨本领(resolving power),代表能将邻近两点清晰区分辨认的能力,用能被辨认的邻近两点的距离表示。能被辨认的两点距离越小,表示分辨本领越大。人眼的分辨本领与观察物体时的环境照明有关,也与物体和背景间黑白对比度有关,这就引入另一重要概念“反差”。反差高时,能从背景上容易辨认物体,如果反差低,就不易把物体从背景上分辨出来。物体在人眼视网膜上成像的大小和物体与眼之间距离的关系是:物体与眼的距离缩小,视网膜上的物像就增大,眼的分辨率就提高。但由于眼屈光能力的限制,物体移近眼睛的距离是有限度的,一般将眼睛正常的工作距离定为 25mm,并称之为“明视距离”。当物体离眼 25mm,眼睛可分辨出相距 0.25mm 的两个点,因此将 0.25mm 定为人眼的分辨率。

为提高人眼的分辨能力,可设法将物体放大。光学显微镜放大物体时,由于可见光波的平均波长约为 500nm,当物体两点间距离小于光波的半个波长(250nm)时,光波产生衍射现象,使两点不能被辨认。因此,光学显微镜辨认的两点间最小距离是 250nm。这就是光学显微镜的极限分辨率,比人眼分辨率(0.25mm)提高了 1000 倍。为了进一步提高分辨率,人们选择了波长较短的电子射线作“光源”,制造了电子显微镜。电子射线的波长可随加速电压

的增加而进一步变短。但由于电子显微镜存在球差,限制了分辨率,不能真正达到其波长之半的程度。目前较好的电子显微镜的分辨率为 0.2nm 左右,比一般光学显微镜的极限分辨率(250nm)提高了 1000 倍,比人眼分辨率(0.25mm)高 100 万倍。

电镜本身的分辨率虽可达 0.2nm 左右,但观察的实际分辨率还受到诸多因素如切片厚度等的影响。当超薄切片较薄时,分辨率可达 1~2.5nm,切片较厚时,实际分辨率为 5~10nm。在生物科学和医学研究中,采用肉眼、光学显微镜和电子显微镜观察方法,它们的分辨率不同,适用范围也不同。一般小于 0.1mm、大于 1 μ m 的结构,包括细胞、细胞核和其他一些大的细胞器,主要在光镜下观察;小于 1 μ m、大于数纳米的结构,包括亚细胞成分、细菌、病毒和大分子等,主要用电子显微镜观察。

目前对介于细胞水平和大分子水平之间的结构,称为亚显微镜结构(submicroscopic structure,简称“亚微结构”)或亚细胞结构(subcellular structure),也称细微结构(fine structure)。“超微结构”(ultrastructure)一词,严格地讲是指分子水平的结构。但目前一般所称的亚微结构、亚细胞结构、细微结构和超微结构,并无严格的界限,往往将普通光镜分辨界限以下的结构统称为超微结构。

四、细胞超微结构研究的展望

随着观察方法和手段的不断提高,人类对超微结构的研究和认识也在不断发展,主要体现在以下几个方面。

1. 从二维结构向三维结构发展 也就是说从研究平面结构向研究立体结构方向发展;其中包括超高压电镜以及倾斜标本台的应用;连续超薄切片的制备及三维重建技术的应用;冷冻蚀刻技术和扫描电镜技术的应用等。这样使细胞核和染色体结构的研究、细胞内管道系统的立体研究、细胞膜(包括细胞内膜)表面结构的研究和细胞邻界面上连接结构的研究等,都获得很多新的进展。

2. 从单纯形态观察深入到对其功能、代谢、化学组成、分子结构及元素分布的研究 包括冷冻超薄切片、电镜免疫标记、电镜酶细胞化学、电镜放射自显影、电子探针 X 线显微分析以及扫描隧道-原子力显微术等技术的应用。

3. 从定性描述向定量测定的方向发展 由于自动计数装置和电子计算机技术的应用,使电镜形态测量技术(morphometry)和电子探针 X 线显微分析技术也都获得了相应的发展,使研究结果进行量化并更为精确。

4. 从经过化学固定的结构向活细胞整体方向发展 超高压电镜、超真空技术进一步发展,特殊样品室设计和改进,扫描隧道显微术的应用等,为在显微镜下直接观察处于生理条件下的样品创造了可能的条件。

5. 仪器设备向小型化、计算机控制的数字化方向发展

五、电镜技术在生物医学中的应用

电镜问世为人类探索微观世界的奥秘开辟了新纪元。半个多世纪以来,电镜技术的飞跃发展,制样技术的不断创新,使其应用范围越来越广泛,涉及工业、国防、航空、地质、农业、

医学、生物学等各个领域。

1. 基础研究 在病毒学、细胞生物学、组织学、病理学、分子生物学及分子病理学等领域上均做出了卓有成效的贡献,如核蛋白体超微结构的研究、核蛋白体与 mRNA 关系的阐明、核小体的发现、DNA 复制及 RNA 转录的分子形态观察、线粒体内膜 ATP 合成酶颗粒的发现等。迄今电镜是直接观察病毒的唯一工具。

2. 临床医学 近 30 多年来,由于内镜的应用和穿刺技术的发展,使得临床上获得如心脏、肝、肾、胃等脏器的标本变得较容易,电镜在医学上的应用已从基础医学理论性研究逐渐扩大到临床医学的实际应用方面。对疾病的病情、病因的鉴定,在肿瘤、血液病及肾脏病等的分型诊断上都取得显著成效。

3. 正确评价电镜的使用 电镜是一种先进的科学仪器,其主要特点是分辨率高,能观察细微结构。但正是由于其高放大,使得观察范围较小,容易出现以点带面的结果,且制样复杂。而光镜则有制样简单,观察面大,能动态观察活细胞等优点。因此电镜不能取代光镜,二者应配合使用,取长补短。

4. 在科学研究中电镜所起的作用

(1) 探查作用:细胞或细胞器很早期的改变或功能活动变化,用光镜往往看不见,电镜观察可以提示某些改变,如对病毒学、病因学、免疫损伤等病因的探讨,亦有很大帮助。

(2) 依据作用:表现为“眼见为实”的重要性,电镜观察的结果从形态学上证实了许多理论假说。

(3) 辅助作用:电镜结果的判断尚需注意与光镜的关系,与宏观的关系,因其本身有较大的局限性,如取材小,观察范围亦小,特别是在病理诊断上应与其他方法结合进行研究。

六、电镜观察要领及人工损伤的识别

电镜观察时,要根据需要,采用适当的观察方式,一般来说,具体的实验和诊断观察时,首先要做好文献资料的准备,在具体取材和样品制备、观察过程中,要和电镜专业人员密切配合和协作,才能取得最好的结果。

1. 电镜观察要领

(1) 正确判断和应用放大倍率:原则应从低倍到高倍,以利于判断细胞、组织的种类和进行全貌的观察,医学、生物学范围内多用 1 万 ~ 2 万倍,多数问题在 5 万倍以下就能解决。

电子放大、光学放大和总放大是电镜观察中常用的几个关于放大倍数的概念,电镜下的放大倍率即为电子放大,冲印照片时的放大即为光学放大,总放大应为电子放大和光学放大的乘积。

(2) 全局的观点:应重视宏观提示,特别是光镜和其他检查结果,防止片面性;电镜观察时要注意连续追踪,仔细全面,一定要有严格的正常对照;提倡 2 人以上同时观察。

(3) 及时做好拍片记录和观察小结。

(4) 重视基础理论指导:良好的认识水平来自于坚实的专业理论知识和丰富的实践经验。电镜观察如果缺少必要的认识基础,其结果是视而不见,或见而不知其义。因此必须做好文献准备和科研设计,只有具有一定的超微结构理论知识,才能解释图像,提高观察分析水平。

(5) 电镜的结果应和光镜观察相结合:目前对组织细胞结构的认识和诊断,特别是诊断标准,大部分还是建立在光镜观察的基础之上,电镜观察的视野有限,因此,电镜观察的结果和光镜观察应该相互弥补、相互完善,才能取得更为可靠和完美的结果。

(6) 电镜观察要和临床相结合。

2. 人工损伤的识别 人工损伤又称人工假象,可接受的人工假象是能够重复出现的,并在长期的实践中被人们所认可,在技术上要不断追求和改进,以求更完善,如电子染色、喷镀等。

不可接受的人工假象是不恒定、不能够重复出现的,是由于技术上的失误所造成,应尽量避免。

常见的人工假象有固定不佳、刀痕、震颤、铅污染、过染等。

不可接受的假象(人工损伤)可在制样的全过程中出现,尤以固定损伤为重,此种损伤改变与病理学上的改变不易区别。由于在标本制备和切片过程中所产生的问题常常不是肉眼所能察觉,只有在电镜观察时才会发现,故有人称生物样品处理过程为“时间、精力和心血”的堆积。只有自始至终贯彻“精细”二字,制备出高质量的样品,才能获得良好的正确的观察结果。

特殊情况下,对有诊断价值的病理组织,尽管已知有人工损伤,但仍可考虑再处理后进行电镜观察,以明确诊断,例如石蜡包埋后转制作电镜样品后观察。

(廖晓岗)

第二章 电镜的类型、基本构造及原理

一、电镜的类型

目前电子显微镜可大致分为三大类,即透射电子显微镜、扫描电子显微镜和分析电子显微镜。透射电子显微镜可细分为超高压电子显微镜、高压电子显微镜、高分辨率电子显微镜、普及型电子显微镜、简易型电子显微镜五类(表 2-1)。

表 2-1 透射电子显微镜的分类及其基本参数

类型	基本参数		
	加速电压	分辨率	放大率
超高压电镜	$\geq 500\text{kV}$	晶格优于 0.343nm	>30 万倍
高压电镜	$\geq 200\text{kV}$	晶格优于 0.343nm 点优于 0.450nm	>30 万倍
高分辨率电镜	$\geq 100\text{kV}$	晶格优于 0.204nm 点优于 0.450nm	>30 万倍
普及型电镜	$\geq 75\text{kV}$	晶格优于 0.699nm 点优于 1nm	>10 万倍
简易型电镜	$\geq 50\text{kV}$	点优于 5nm	>2 万倍

1. 透射式电子显微镜 透射式电子显微镜(简称透射电镜)(transmission electron microscope,TEM)是以波长极短的电子束作为照明源,用电磁透镜聚焦成像的一种高分辨率、高放大倍数的电子光学仪器。简单地讲,就是用聚得很细的电子束照射在样品上,接收透过样品并带有样品内部信息的电子,经过物镜聚焦放大成像。这种接收透射电子成像的显微镜称之为透射电镜(图 2-1)。

透射电镜是使用最广泛的一类电镜,也是最早在医学领域中应用的一种电镜。

2. 扫描式电子显微镜 扫描式电子显微镜(简称扫描电镜)(scanning electron microscope,SEM)是继透射电子显微镜之后发展起来的另一种研究样品表面形貌的工具。扫描电镜是用极细的电子束在样品表面扫描,将

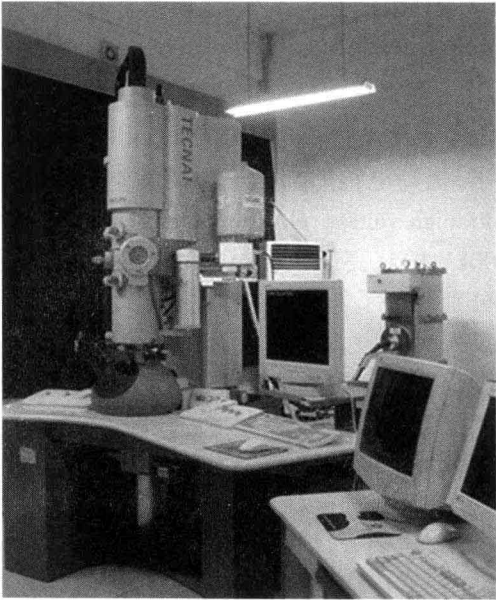


图 2-1 透射电镜

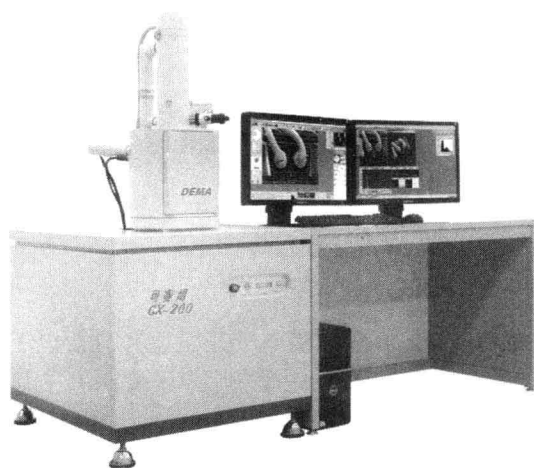


图 2-2 扫描电镜

产生的二次电子用特制的探测器收集,形成电信号运送到显像管,在荧光屏上显示物体表面的立体构象,也可摄制成照片(图 2-2)。

扫描电镜与透射电镜相比较,主要有以下特点:

(1) 观察表面形貌:透射电镜利用穿透标本的电子进行成像,扫描电镜则用电子束冲击样品,再利用从样品表面发射的二次电子成像,这样所观察的就不是样品的内部结构,而是表面特征。

(2) 景深长,立体感强:“景深”不是一种固定的数值,而是与放大倍数和分辨率有关的,用以表达纵深方向层次细节程

度的度量方式。扫描电镜景深大,图像立体感强。扫描电镜的景深比光学显微镜大几百倍,比透射电镜大 10 倍左右。

(3) 放大范围广,分辨率高:扫描电镜的放大倍数可从数十倍,直到 10 万倍,它的有效放大范围广,使用方便。如在低倍时既可观察一个蚊子的全貌,又能逐步放大后不同程度地观察其局部的细微结构,分辨率可达几纳米。

(4) 可观察较大标本:由于扫描电镜是收集样品的二次电子进行成像,样品放在物镜强磁场以外,因此可有足够的空间来放置大块标本,标本体积一般可为 $0.5 \sim 10\text{mm}^3$ 。

(5) 制样简单:样品制备中不需包埋、切片,有些样品含水量较少,干燥过程不易变形时,可不经任何处理或简单喷镀金属后即可放于扫描电镜下进行观察。

(6) 可结合元素分析:扫描电镜结合能谱仪或波谱仪可进行 X 线显微分析,这样可在观察形貌的同时逐点进行细胞结构的元素分析,便于进行综合研究。

3. 超高压电镜 由于电镜的分辨率与电子束的波长有关,波长越短,分辨率越高;而产生电子束的电子枪电压越高,所得电子束的波长越短。为了满足人们观察更为细小物体的要求,提高电镜的加速电压能够不断提高对物体的分辨率,于是人们设计出了超高压电镜 (ultrahigh voltage electron microscope, UTEM)。1962 年,法国首先制成了加速电压突破 1000kV 的超高压电镜;1970 年,法国和日本分别研制了 3000kV 的超高压电镜。人们投入大量的人力、物力研制超高压电镜,是因为提高加速电压能获得更多被观察样品的信息。一般的 TEM 加速电压在 $20 \sim 120\text{kV}$,加速电压在几百千伏的称为高压电镜,而超高压电镜的加速电压达到上千千伏(图 2-3)。

(1) 超高压电镜与常规的透射电镜相比较,具有以下几方面的优点。

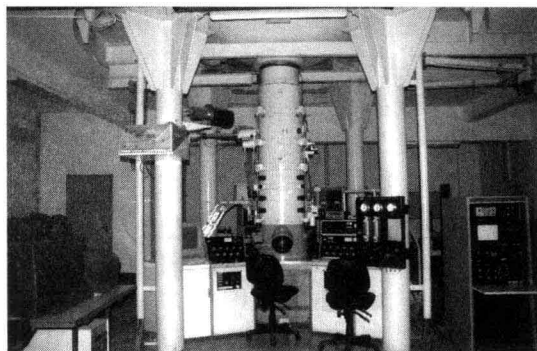


图 2-3 超高压电子显微镜

1) 观察厚切片:提高加速电压,亦即增加了电子的穿透能力,可以在观察厚标本时也能达到较高的分辨率。对于常规电镜,一般要求超薄切片厚度为 $50 \sim 80\text{nm}$ 。为了获得立体信息,不得不把标本制成连续薄切片,分别在电镜中观察、照相,然后找出对应区,重建三维像。这样不仅效率低,而且过程复杂。用超高压电镜观察厚 $0.5 \sim 3\mu\text{m}$ 的厚切片,并拍摄一组立体照片,就能得到容易理解的三维信息。

2) 提高分辨率:根据电子波长公式可知加速电压越高,电子的波长越短;又根据电镜分辨率公式可知波长越短,可分辨的两点间的距离越小,即分辨率越高。因此提高加速电压可增加电镜分辨率。用 500kV 的超高压电镜拍摄得到铜酞菁蓝染料分子结构照片,已能识别其中的铜、氯、氮原子。这些原子的直径约为 0.19nm ($1.9\text{\AA}$),原子与原子间的距离为 $0.15 \sim 0.19\text{nm}$ ($1.5 \sim 1.9\text{\AA}$)。

3) 提高图像的质量:根据球差公式可知减小孔径角 α 可减少球差。但根据衍射对分辨率的影响公式,可知减小孔径角会使衍射的影响增大,从而分辨率降低。由于超高压电镜中电子束的波长相对较短,因此可以在衍射半径不变的情况下减小 α 值,进而减少球差,提高图像质量。

4) 减少辐射损伤范围:由于超高电压下的电子束的散射截面较小,可以减少标本与电子束间的相互作用,因而降低了辐射电离损伤的范围。但是这种减少损伤的程度很有限,电压从 100kV 提高到 1000kV 时,辐射损伤只减少 3 倍左右。

(2) 超高压电镜的不足:由于常规电镜样品的制备要经过固定、脱水、包埋等步骤,再切成超薄切片进行观察,实际上是一种损伤性的观察方法,观察到的形态结果可能与实际的生命形态有所不同。而超高压电镜有很大的电子穿透力,观察超薄切片已绰绰有余,因此人们设想将新鲜的含水生物样品放在一个密闭的易透电子的小室里,再拿到超高压电镜下观察,希望以此解决普通电镜只能观察“死”样品的问题。但是高能电子束的辐射剂量较大,新鲜组织经照射后,即使不致命,至少已发生了严重的结构变化,所以前途似乎并不乐观。

4. 分析电子显微镜 分析电子显微镜是将 X 射线显微分析仪与透射电子显微镜或扫描显微镜相组合。目前多用的 X 射线显微分析仪有波谱仪和能谱仪。

5. 扫描探针显微镜 扫描探针显微镜(scanning probe microscope, SPM)是一大类仪器的总称。其中最主要的是原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)和扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)。其他 SPM 还有磁力显微镜(magnetic force microscope, MFM)、电力显微镜(electric force microscope, EFM)、侧向力显微镜(lateral force microscope, LFM)等。

各类扫描探针显微镜名称虽然不同,用途也不相同,但都有一个共同的特点:它们是一类观察测量物体表面性状的工具。事实上,SPM 最先纯粹是用于对物体表面几何形貌进行测量的,而且至今这仍然是 SPM 最基本的用途。当然 SPM 现在还可以观测物体表面多种多样的性状。目前在 $100\mu\text{m}$ 以下直至原子间距这样一个范围内,对物体表面形貌的观测,SPM 还是最有用的研究工具。

此外,仪器的构造和工作过程也有共同的地方:各类 SPM 工作时,都有一个尖端十分锐利的探针紧紧贴近待测样品的表面(在 AFM 探针可直接接触及样品表面,在 STM 探针与样品表面间保持一个微小的间距)并沿表面作扫描运动。由此 SPM 可将成像焦点会聚在接近单个原子直径大小的纵深范围以内。因此 SPM 能做到仅对样品表面最上一层原子的排列进行观测,其空间分辨率极高。

二、电镜的基本构造及原理

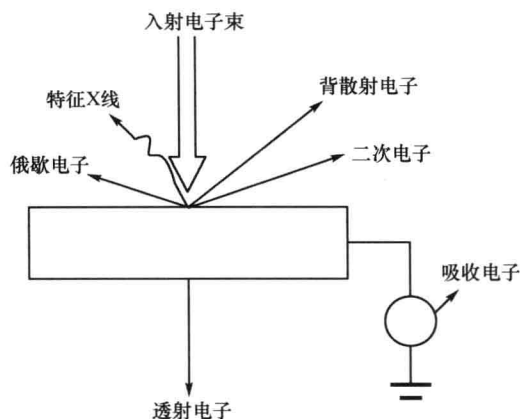


图 2-4 电子样品相互作用产生的各种物理信号

1. 电子束的特点 电镜和光镜采用的光源不同,电镜采用的是电子束为光源,电子束具有以下特点:①由电子组成,真空中直线前进,具波动特性,也即所谓的“波粒二重性”;②电子束受电力和磁力作用;③电子束照射样品时,能透过极薄样品,得到透射电子,或产生二次电子、特征X线、背散射电子等,再通过相关的设备,接收产生的物理信号,从而获得样品的结构信息(图 2-4)。

1924 年,法国科学家德·布罗意证明了任何一种快速运动离子都具有波动性;1926 年德国科学家布许发现,高速运动的电子在电场或磁场的作用下会发生折射,并且能被聚焦,就如普通的可见光通过光学透镜被折射聚焦一样。高速运动的电子流,具有波动性和可折射性就是电子显微镜的理论基础。

2. 透射电镜的基本构造 透射电镜主要由电子光学系统、真空系统、电子学系统、冷却系统四部分构成。它们的构成如下(图 2-5,图 2-6):

现对透射电镜的基本结构和功能简单介绍(图 2-6)。

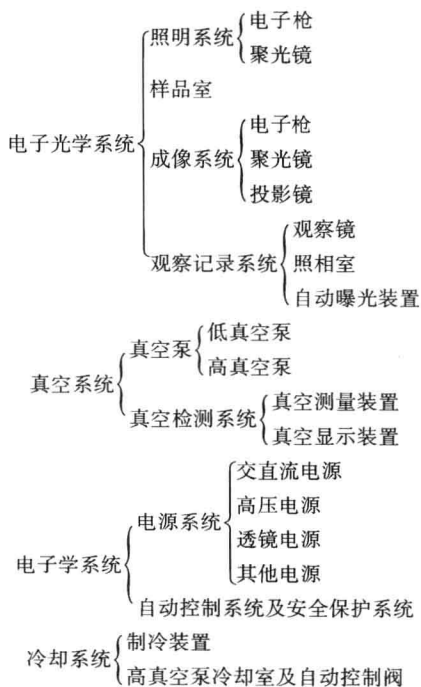


图 2-5 透射电镜的基本组成

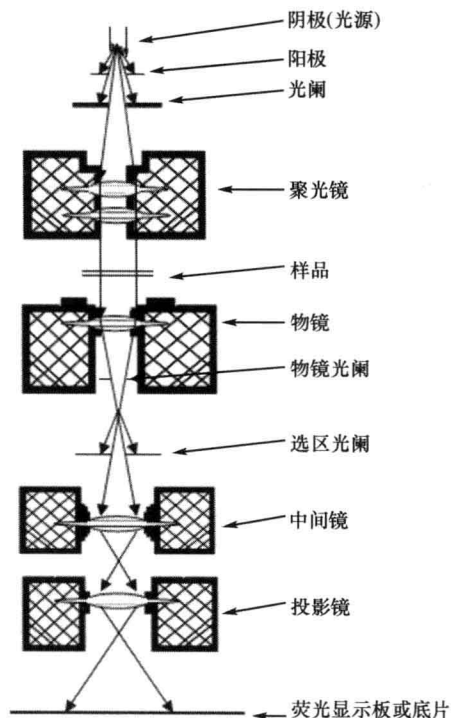


图 2-6 透射电镜光路示意图

(1) 电子枪:电子枪发射电子,用来作为电镜的照明光源。电子枪由阴极、栅极和阳极组成,目前电镜中常用的阴极是发叉形钨丝。钨丝有高熔点、蒸气压低及机械强度高等优点。当电流通过灯丝时,灯丝温度升高,发射出热电子,形成电子束。

除了常用的钨丝阴极外,目前在电镜中还采用几种新颖的阴极:六硼化镧和场发射钨单晶阴极。六硼化镧阴极的亮度比钨丝阴极高一个数量级,寿命也长好几倍,其缺点是制造工艺复杂,价格较贵。场发射阴极的亮度比六硼化镧更高,但是场发射对真空要求很高。目前除了特别高级的电镜外,一般还是使用钨丝阴极。

(2) 聚光镜系统:电子显微镜的照明系统一般包括电子枪和聚光镜系统两部分。电子枪发射电子,形成一个交叉点,聚光镜的作用是以这交叉点作为初光源,将它进一步会聚到样品上,并且通过聚光镜光阑来调节样品上照明束斑的大小和改变照明亮度。

(3) 成像系统:电子束穿过样品就进入成像系统。成像系统是电镜具有高分辨率、高放大倍数的关键部分。大型电镜的成像系统一般由四个透镜组成(有的更多):物镜、第一中间镜、第二中间镜和投影镜。成像系统的总放大倍数是四个透镜放大倍数的乘积。

总放大倍数:物镜倍数 $\times$ 第一中间镜倍数 $\times$ 第二中间镜倍数 $\times$ 投影镜倍数

成像系统是借助于改变各个透镜的工作电流,以获得不同的放大倍数。

物镜是成像系统的第一级成像透镜。它是所有成像系统中最主要的透镜。一台电镜的好坏,很大程度取决于物镜的质量。

物镜有自身的固有像散,一般物镜的固有像散为 $0.5 \sim 1\mu\text{m}$ 。在物镜中装有消像散器,用来矫正物镜的像散。消像散器实质上是一组线圈,能产生不对称的磁场,用这个不对称来抵消原来物镜中的不对称,最后产生一个对称的磁场。

在物镜中还备有可动光阑,其孔径常有 20 、 30 、 50 、 $70\mu\text{m}$ 等,一般来说物镜光阑孔径小,图像对比良好。要获得高分辨率时以用 $50\mu\text{m}$ 左右为宜。

物镜光阑早先都用铂制成,近来都采用很薄的钼片制成,其优点为不易污染,容易清洗。

(4) 观察和记录系统:在投影镜下面是观察室,观察室中有一个荧光屏以显示图像。使用者通过荧光屏选择图像区域,在照相前进行聚焦。目前,几乎所有电镜都在观察窗前附加一个大口径的光学放大镜。放大镜的放大倍数一般采用 $7 \sim 10$ 倍,这样观察者可以更进一步地观察到荧光屏上图像的细节。

为了对图像作永久性的保存,最好的办法是进行摄影。由于荧光屏的颗粒较粗,限制了图像的分辨率,因此对荧光屏上的图像进行摄影不可取。以前电镜大部分都采用将电子图像直接投影到照相底片上的办法,同光线一样,电子打在底片上也能使底片感光。对光线感光速度差别很大的胶片,对电子来说,其感光速度都差不多。目前已经能将图像信息直接通过图像采集卡进行采集,转变成数码信息,存为电子信息,大大提高了电镜的使用效率。

3. 透射电子显微镜使用的简单指南 不同透射电镜的使用方法稍有不同,使用应在专业人员指导下进行,必要时应该详细阅读说明书,但不管什么型号的透射电镜,以下几个方面都是其使用过程中的要点。

(1) 加速电压的选择:加速电压对电镜的性能有以下影响。①电压越高,电子穿透能力越强;②对于某些生物样品,电压越高,图像反差越小;③电压升高,电子枪亮度增加,荧光屏亮度也增加;④电压升高对提高分辨率有利。

因此,一般原则是:在特别要求高分辨率及样品比较厚时采用 100kV 的电压。样品比