



上海科技专著出版资金资助(2012年)

医学生物

电子显微镜技术

杨勇骥 汤莹 主编
叶煦亭 雷长海



第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

上海科技专著出版资金资助(2012 年)

医学生物电子显微镜技术

主 编 杨勇骥 汤 莹
叶煦亭 雷长海

编 委 (以姓氏笔画为序)

叶煦亭	汤 莹	刘 红
沈亚峰	范晓燕	林方兴
杨勇骥	邵晓良	金 婵
晋若冰	彭 骏	雷长海



第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

内 容 简 介

本书讲述电子显微镜技术在生物医学领域的应用,电镜技术对基础医学和临床医学有切实的帮助作用,并对科研工作有极大的推动作用。全书内容系作者所在研究室 48 年(作者从事此工作 25 年)工作体会、经验积累和成果总结,此外,还涵盖了对近年电镜领域进展和热点问题。

本书适合从事电镜工作的人员以及对电镜技术感兴趣的科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物电子显微镜技术/杨勇骥,汤莹,叶煦亭,
雷长海主编. —上海:第二军医大学出版社,2012.8
ISBN 978-7-5481-0458-2

I. ①医… II. ①杨… ②汤… ③叶… ④雷…
III. ①医学—生物学—电子显微镜分析 IV. ①K318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 166992 号

出 版 人 陆小新
责任编辑 陆小新 高 标 刘 向

医学生物电子显微镜技术

主 编 杨勇骥 汤 莹 叶煦亭 雷长海

第二军医大学出版社出版发行

上海市翔殷路 800 号 邮政编码:200433

发行科电话/传真:021-65493093

<http://www.smmup.cn>

全国各地新华书店经销

江苏天源印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:16 字数:389 千字

2012 年 8 月第 1 版 2012 年 8 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5481-0458-2/R·1248

定价:80.00 元

作者简介



杨勇骥,男,研究员。1982年毕业于上海交通大学电子工程系,获学士学位。现任中国人民解放军第二军医大学基础部生物物理学教研室主任、电镜中心主任、博士生导师。兼任全国微束分析标准化技术委员会副主任委员,上海市显微学学会理事长,中国电子显微镜学会常务理事,全国纳米技术标准化技术委员会委员等职。

从事生物医学电镜研究近三十年,在国内率先开展超低温快速冷冻、膜片钳与共聚焦显微镜实时同步分析等研究,为国内知名的生物电子显微镜专家。研究方向:① Ca^{2+} 通道的功能与心衰机制研究;②纳米材料生物效应及安全性研究;③先进的电镜分析测试技术及电镜三维重构研究。近年来以第一申请人获1项国家重大科学研究计划项目课题资助、4项国家自然科学基金资助、1项上海市重大纳米专项资助及2项军队科研项目资助。曾获3项军队科技进步二等奖、1项军队科技进步三等奖、1项中国分析测试协会科学技术奖(CAIA奖)一等奖。在国内外发表论文150余篇,主编上海市研究生教材1部。主持制定国家级标准4项。

前言

电子显微镜技术是现代科学研究领域内不可缺少的工具,在生命科学研究领域中的重要性 and 不可或缺地位更加突出,它是这个领域内最常用的实验技术之一,是科研工作者进军未知世界,探求科学真相活动中最为重要的利器之一。

曾几何时,分子生物学技术异军突起,抢占了电镜技术的“风头”,整个电镜低潮期持续了将近十年。十年时间转瞬即逝,但情景已是沧海桑田。今天,电镜领域发生了翻天覆地的变化,一改十年前几乎被“淡出”科研领域的局面,电镜成为如今教学科研必备的、最为重要的利器。如今与电镜相关的科研项目源源不断,而且电镜服务也使我们工作人员忙得应接不暇,大批先进的高端电镜在大江南北生根开花,我们电镜工作者期盼的第二个春天已经来临!

本书为有志于从事医学生物电子显微镜工作的专业人员提供详细、丰富的技术参考资料和相关知识现阶段的研究进展。全书分上、中、下三篇。上篇着重阐述各种类型的电子显微镜及其原理,对 20 世纪 80 年代之后出现的新型显微镜,如扫描隧道显微镜、原子力显微镜等也做了详尽地介绍。同时还介绍了电子显微镜室的基本设计原则及电子显微镜的工作调试、操作技巧,有助于读者实际操作水平的提高。中篇除介绍常规生物制样技术外,着重阐述了较难处理的生物样品的制备方法及一些实用技术的改进,如免疫胶体金标记技术等,此处有别于其他同类书籍。另外,还详细介绍了激光扫描共聚焦显微镜和多光子显微镜的原理以及激光扫描共聚焦显微镜实验技术。下篇对医学电子显微镜中的物理制样技术,如低温冷冻生物制样技术、EDX 微区分析技术等,做了详尽地叙述。全书的资料均来自于我们多年的工作经验及近年的研究成果,尤其是下篇中许多内容在目前国内出版的有关生物电子显微镜著作中未见阐述,而这些内容又是目前生物电子显微镜技术发展的重点之一,本书属首次批露。

感谢第二军医大学出版社的编辑们,是他们促使、“监督”我完成了全书撰写工作,并出版发行呈献给广大读者朋友。

感谢我的挚友:浙江大学洪健教授及同济大学祝建教授,无偿地与我分享他们高品质的电镜图片,为本书添彩。

感谢与我一起工作了 26 年的同事、好友叶煦亭教授,撰写了免疫电镜的有关章节及其他相关技术章节,为此他几乎放弃了一年的节假日休息。感谢汤莹老师,多年默默耕耘,不计名利,为本书的出

版付出了许多。也感谢与我一起工作的我室其他工作人员,他们辛勤工作的成果成就了本书。

还要感谢众多的电镜界同行们,他们中的许多是我的多年好友,每次交流他们都毫无保留,均能让我受益匪浅,给我以启迪,促使我在电镜领域内不断进步。

最后还要感谢众多与电镜有关的公司,是他们制作了品质优良的设备,并一直能够保障其顺利运行。

再次感谢所有为电镜事业做出贡献的人们!



2012年1月30日于中国人民解放军第二军医大学

目 录

前言	(1)
----------	-------

绪论	(1)
----------	-------

上篇 电子显微镜原理及其在生物医学中的应用

第一章 电子显微镜基本原理	(5)
---------------------	-------

第一节 引言	(5)
--------------	-------

第二节 分辨能力和放大倍数	(5)
---------------------	-------

一、分辨能力	(5)
--------------	-------

二、放大倍数	(7)
--------------	-------

第三节 电子束的主要特征	(7)
--------------------	-------

一、电子束的定义	(7)
----------------	-------

二、电子束在磁场或电场中的性质	(8)
-----------------------	-------

三、电子束的穿透力	(8)
-----------------	-------

四、电子束激发荧光	(8)
-----------------	-------

五、电子束的放射性	(8)
-----------------	-------

第四节 电子透镜	(8)
----------------	-------

第五节 电磁透镜的特性	(10)
-------------------	--------

一、球面像差及畸变	(10)
-----------------	--------

二、衍射像差	(11)
--------------	--------

三、色差	(11)
------------	--------

四、象散	(12)
------------	--------

五、景深	(13)
------------	--------

六、焦深	(13)
------------	--------

七、磁滞	(14)
------------	--------

八、反差与成像	(14)
---------------	--------

第二章 电子显微镜的类型、结构及其原理	(18)
---------------------------	--------

第一节 引言	(18)
--------------	--------

第二节 透射电子显微镜	(19)
-------------------	--------

一、电子光学系统	(19)
二、真空系统	(20)
三、电器系统	(21)
第三节 扫描电子显微镜	(21)
一、工作原理	(22)
二、扫描电镜的特点和应用	(22)
第四节 高分辨率的扫描透射电镜	(23)
一、超高真空的场发射式电镜	(23)
二、附加在透射电镜或扫描电镜上的 STEM	(23)
第五节 高压电子显微镜	(23)
第六节 低压电子显微镜	(24)
第七节 环境扫描电子显微镜	(25)
第三章 扫描探针显微镜	(27)
第一节 扫描探针显微镜简介	(27)
第二节 扫描隧道显微镜	(28)
一、扫描隧道显微镜的物理原理	(28)
二、扫描隧道显微镜的工作原理	(28)
三、扫描隧道显微镜在生物学中的应用	(29)
第三节 原子力显微镜	(30)
一、原子力显微镜的物理原理	(30)
二、原子力显微镜的工作原理	(31)
三、原子力显微镜在生物学中的应用	(31)
第四章 分析电子显微镜、X 射线能量色散谱分析系统及其在生物学中的应用	(34)
第一节 引言	(34)
第二节 分析电镜	(34)
第三节 能谱分析仪简论	(36)
一、X 射线能谱分析基本原理	(36)
二、能谱分析仪的工作原理	(37)
三、能谱分析在生物学中的应用	(37)
四、应用能谱分析时应注意的要点	(39)
第四节 电子显微镜的特点	(40)
第五章 用于电子显微镜的图像分析、图像处理技术及计算机网络数据交流	(43)
第一节 引言	(43)
第二节 图像分析与识别技术	(43)

一、图像分析	(43)
二、图像识别	(44)
第三节 图像处理技术	(44)
一、图像处理技术的发展	(45)
二、图像处理种类	(45)
三、图像存储格式	(46)
四、图像压缩	(48)
五、图像处理软件	(50)
第四节 图像数据的计算机网络交流	(50)
一、电子邮件方式	(50)
二、FTP 文件传输	(51)
三、Internet 网站发布	(51)
第六章 电子显微镜室的设计	(53)
第一节 电子显微镜工作环境的指标要求及设计	(53)
一、防震指标及要求	(53)
二、防磁要求	(53)
三、防尘要求	(53)
四、电力、供水要求	(54)
五、电镜室的恒温、恒湿要求	(54)
六、防火、防水、防毒要求	(54)
第二节 电子显微镜室的布局及设计	(55)
第七章 电子显微镜常用工作点调试、操作技巧及常用维护	(56)
第一节 透射电子显微镜的常用工作点调试	(56)
一、灯丝像的调试	(56)
二、聚光镜光阑对中	(57)
三、光斑对中	(57)
四、物镜光阑对中	(57)
五、电压中心和电流中心的调整	(57)
六、消像散	(58)
第二节 扫描电子显微镜的常用工作点调试	(58)
一、电子束对中	(58)
二、消像散	(58)
三、调整工作距离	(58)
第三节 电子显微镜的操作技巧	(58)
一、电子显微镜观察前的准备工作	(58)

二、电子显微镜观察过程中的注意事项	(59)
三、电子显微镜观察完成后的注意事项	(59)
第四节 电子显微镜的日常维护及检修	(60)
一、电子光学系统的日常维护及检修	(60)
二、真空系统的日常维护及检修	(60)
三、机械系统的日常维护	(60)
四、电子控制系统的日常维护	(60)

第八章 电子显微镜样品拍摄和暗室技术

(61)

第一节 电子显微镜样品拍摄	(61)
一、拍摄前的准备	(61)
二、透射电子显微镜样品拍摄	(61)
三、扫描电子显微镜样品拍摄	(62)
第二节 电子显微镜暗室技术及基本设备	(62)
一、电子显微镜暗室技术内容	(62)
二、暗室的基本设备	(63)
第三节 电子显微镜底片的冲洗	(63)
一、显影	(63)
二、停显	(65)
三、定影	(65)
四、水冲洗	(65)
五、干燥	(65)
六、底片及照片的修整	(65)
第四节 电子显微镜照片的放大	(66)
一、电子显微镜用相纸的性能和种类	(66)
二、放大技术	(66)
三、显影	(67)
四、停显	(67)
五、上光	(67)
第五节 翻拍技术与幻灯片的制作	(67)
一、翻拍技术	(67)
二、黑白幻灯片的制作	(68)
三、彩色幻灯片的制作	(69)
第六节 CCD 相机成像及使用技巧	(69)
一、CCD 原理	(69)
二、CCD 相机的优缺点	(69)
三、电子显微镜用 CCD 相机的耦合方式	(70)

四、CCD 相机的安装位置	(70)
五、CCD 相机使用注意事项	(70)

中篇 电子显微镜生物样品制备技术

第九章 常规透射电子显微镜样品制备技术	(73)
---------------------------	--------

第一节 引言	(73)
--------------	--------

第二节 透射电子显微镜制样前的准备	(73)
-------------------------	--------

一、实验设计的准备	(73)
-----------------	--------

二、实验动物的准备	(74)
-----------------	--------

三、实验器具和实验试剂的准备	(74)
----------------------	--------

第三节 取材	(74)
--------------	--------

一、取材的基本要求	(74)
-----------------	--------

二、取材的具体操作	(75)
-----------------	--------

第四节 固定	(75)
--------------	--------

一、固定的定义和目的	(75)
------------------	--------

二、常用缓冲液及其配制	(75)
-------------------	--------

三、常用的固定剂及其配制方法	(77)
----------------------	--------

四、固定方法	(80)
--------------	--------

五、影响固定效果的因素	(82)
-------------------	--------

第五节 漂洗与脱水	(84)
-----------------	--------

第六节 浸透与包埋	(84)
-----------------	--------

一、理想的包埋介质应具备的条件	(85)
-----------------------	--------

二、几种常用的包埋剂及其配方	(85)
----------------------	--------

三、浸透与包埋的具体操作	(87)
--------------------	--------

第七节 修块与定位	(87)
-----------------	--------

一、修块	(87)
------------	--------

二、定位	(87)
------------	--------

三、半薄切片染色	(88)
----------------	--------

第八节 超薄切片	(88)
----------------	--------

一、超薄切片机的简单原理	(88)
--------------------	--------

二、载网	(89)
------------	--------

三、支持膜的制备	(89)
----------------	--------

四、玻璃刀的制备及使用	(90)
-------------------	--------

五、喷钨刀的制备及使用	(90)
-------------------	--------

六、钻石刀的使用	(91)
----------------	--------

七、超薄切片过程	(94)
----------------	--------

第九节 超薄切片染色	(95)
一、染色原理及染色液	(95)
二、染色方法	(96)
第十节 电子显微镜微波技术	(96)
一、电子显微镜样品制备微波应用操作流程	(97)
二、电子显微镜微波技术应用的注意事项	(97)
第十章 免疫电子显微镜技术	(99)
第一节 免疫电子显微镜样品制备及试剂准备	(100)
一、样品制备的主要流程	(100)
二、胶体金的制备	(101)
第二节 透射电子显微镜胶体金标记技术	(104)
一、包埋前胶体金标记技术	(104)
二、包埋后胶体金标记技术	(105)
第三节 冷冻超薄切片胶体金标记技术	(109)
一、冷冻超薄切片技术	(109)
二、冷冻胶体金免疫标记操作流程	(110)
第四节 植物样品的免疫胶体金标记技术	(111)
第五节 铁蛋白免疫电子显微镜技术	(111)
一、铁蛋白的提取及纯化	(111)
二、铁蛋白的鉴定	(112)
第六节 扫描免疫电子显微镜技术	(112)
一、抗体的制备	(113)
二、具体操作步骤	(113)
第十一章 原位核酸分子杂交技术	(115)
第一节 原位杂交的原理及操作	(115)
一、原位杂交的原理	(115)
二、原位杂交的基本操作方法	(116)
第二节 探针的种类及探针标记技术	(117)
一、探针的种类	(117)
二、探针的标记	(118)
第三节 电子显微镜原位杂交	(119)
一、原位杂交试剂的准备	(120)
二、电子显微镜原位杂交的种类	(120)
三、有关电子显微镜原位杂交的注意点	(120)

第十二章 电子显微镜酶细胞化学技术	(123)
第一节 电子显微镜酶细胞化学基本原理	(123)
第二节 电子显微镜酶细胞化学样品制备流程	(123)
第三节 常用酶细胞化学孵育液配方及操作流程	(124)
一、分类	(124)
二、酶细胞化学技术应用的注意事项	(126)
第十三章 其他常用电子显微镜细胞化学技术	(128)
第一节 离子细胞化学技术	(128)
一、钙离子细胞化学法流程	(128)
二、实验须知	(128)
第二节 电子显微镜氧自由基显示技术	(128)
一、 H_2O_2 细胞化学技术操作流程	(129)
二、 O_2^- 细胞化学技术操作流程	(129)
三、实验须知	(129)
第三节 金属镧示踪细胞化学技术	(129)
一、示踪细胞化学流程	(129)
二、实验须知	(130)
第四节 电子显微镜钉红染色法	(130)
第十四章 负染色和放射自显影技术	(131)
第一节 负染色技术	(131)
一、染液配制及 Formvar 膜的制备	(131)
二、标本制备及操作方法	(131)
三、负染色标本制备及分析时应注意的问题	(132)
第二节 放射自显影术	(132)
一、放射自显影术的原理	(133)
二、放射自显影的方法	(133)
三、放射自显影的分类	(135)
第十五章 激光扫描共聚焦显微镜技术	(137)
第一节 引言	(137)
第二节 激光扫描共聚焦显微镜的基本工作原理	(137)
一、激光扫描共聚焦显微镜的组成	(137)
二、激光扫描共聚焦显微镜的工作原理	(139)
三、激光扫描共聚焦显微镜的特点	(140)

四、激光扫描共聚焦显微镜在生物医学中的应用	(140)
第三节 多光子显微镜	(143)
一、双光子显微镜的原理	(144)
二、双光子显微镜的特点及应用	(144)
第四节 激光扫描共聚焦显微镜实验技术	(145)
一、实验前的准备工作	(145)
二、荧光探针的选择	(146)
三、荧光样品的制备	(147)
第五节 钙离子的测定	(149)
一、激光扫描共聚焦显微镜实时定量测定细胞内 Ca^{2+} 的变化	(149)
二、记录心肌细胞钙火花的技术	(150)
第十六章 扫描电子显微镜生物样品制备技术	(154)
第一节 常规生物样品扫描电子显微镜制样方法	(154)
一、SEM 生物样品制备的基本要求	(154)
二、SEM 生物样品制备的基本操作程序	(154)
第二节 生药样品的制备	(159)
第三节 组织割断及管道铸型技术	(159)
一、组织、细胞割断法	(159)
二、管道铸型样品制备法	(160)
下篇 生物样品冷冻制备技术及 EDX 能谱微区分析技术	
第十七章 生物样品的超低温快速冷冻固定技术	(163)
第一节 引言	(163)
第二节 快速冷冻固定的物理原理	(164)
一、生物组织的低温热传导	(164)
二、生物组织中冰晶的产生及对组织的损伤	(169)
第三节 快速冷冻固定方法	(170)
一、插入式超低温快速冷冻固定	(170)
二、镜面式超低温快速冷冻固定	(171)
三、其他冷冻固定方法	(171)
四、冷冻保护剂	(173)
五、不使用冷冻保护剂的超低温快速冷冻	(173)
第十八章 超低温快速冷冻固定后的生物样品处理	(177)
第一节 冷冻超薄切片	(177)

一、冷冻超薄切片原理	(177)
二、冷冻超薄切片方法	(177)
三、冷冻超薄切片的技术关键	(179)
第二节 快速冷冻置换	(179)
一、冷冻置换原理	(179)
二、冷冻置换方法	(180)
三、冷冻置换的技术关键	(181)
第三节 冷冻干燥	(181)
一、冷冻干燥原理	(182)
二、冷冻干燥的方法	(182)
三、冷冻干燥技术的关键点	(183)
第四节 冷冻断裂	(184)
一、冷冻断裂原理	(184)
二、冷冻断裂方法	(184)
三、冷冻断裂在生物医学中的应用	(185)
第五节 低温包埋技术	(185)
一、低温包埋树脂	(186)
二、固定、脱水、浸透和包埋	(186)
三、聚合	(188)
四、切片与染色	(189)
五、低温包埋过程中需注意的问题	(189)
第十九章 生物样品的 EDX 微区分析技术	(194)
第一节 生物样品微区分析方法	(194)
一、定性分析	(194)
二、半定量分析原理	(194)
三、定量分析原理	(195)
第二节 生物薄标样及生物薄标样的制备技术	(195)
一、理想的生物薄标样应具备的条件	(195)
二、生物薄标样的制备	(197)
三、生物薄标样的测试	(197)
四、国内外常用的生物薄标样简介	(198)
第三节 生物样品的微区定量分析测试	(201)
一、测试前的仪器准备工作	(201)
二、仪器测量条件的选择	(202)
三、定量测试步骤	(202)
附录 1 中英对照专业词汇表	(附 1-1)

附录 2 电镜图片	(附 2-1-1)
附录 2-1 常规电镜图片	(附 2-1-1)
附录 2-2 免疫标记电镜图片	(附 2-2-1)
附录 2-3 细胞化学电镜图片	(附 2-3-1)
附录 2-4 快速冷冻电镜图片	(附 2-4-1)
附录 3 激光扫描共聚焦显微镜图片	(附 3-1)

绪 论

人类认识客观世界的过程,总是先由人的感官感受客观世界的各种现象,然后反映到自己的头脑之中。为了更深入地观察、研究微观世界,人们研制、发展了从简单到复杂的各种仪器。首先,16 世纪光学显微镜的出现,将人眼的分辨能力提高了 1 000 倍,使人们第一次直观地看到了人的肉眼看不见的细胞、细菌。随着观察、研究的深入,人们已不能满足仅仅观察细胞、细菌本身,而光学显微镜则由于分辨率的限制,不可能达到人们更高的要求。20 世纪 30 年代开始,人们利用发展的工业技术,研制成功了电子显微镜。电子显微镜的出现,使人们能在原子的尺度上观察研究物质的结构,人们的观察由宏观世界进入了原子级的微观世界。

与许多伟大的发明一样,电子显微镜的发明,经历了艰难困苦的历程,许多科学家为此奋斗终生。光学显微镜发明之后长达 300 年的时间内,由于光源波长的限制,光镜的分辨率难以提高,因而放大倍数始终难以突破 1 000 倍,限制了显微镜的进一步发展。因此,寻找新的短波长的光源,是提高显微镜分辨率的关键所在。但是由于理论与技术的限制,直到 20 世纪初,人们在提高显微镜分辨率的漫长努力中,得到的始终是失望。1924 年,法国物理学家 L. de Broglie 提出假说:电子与光一样,具有波动性。他证明了:任何一种粒子,当它们快速运动时,必定伴有电磁辐射,辐射的波长与粒子的运动速度成反比,并计算出了电子的波长约为 0.005 纳米(nm)。1926 年,德国科学家 H. Busch 发表了关于带电粒子在轴对称的电场和磁场中有聚焦作用的论文。H. Busch 指出:带电粒子在电场或磁场中偏转聚焦的现象,类似于光线通过透镜可被聚焦一样。L. de Broglie 和 H. Busch 的理论为电镜的发展奠定了理论基础。1928 年到 1931 年,德国年轻的大学生 Ernst Ruska 在研究高压阴极射线示波器的电子光学部分时,仔细测量了磁透镜的聚焦特性,并开展了电子放大成像的研究。1931 年 4 月,Ernst Ruska 研制的具有二级磁透镜放大的电子成像设备获得了 16 倍的放大倍率,这是电子显微镜的雏形。然而,Ernst Ruska 的发明并未得到社会及学术界的认可,并且有许多人对电子显微镜持极度怀疑的态度。经 Ernst Ruska 多方奔走,努力筹措,忘我工作,终于在 1938 年底,Ernst Ruska 在柏林研制成功了第一台真正的电子显微镜,当时这台电镜的放大倍数为 1 200 倍,分辨本领与当时最好的光学显微镜相当。由于 Ernst Ruska 在电子显微镜发明中所作出的巨大贡献,他被誉为电子显微镜之父,并在 1986 年获得诺贝尔奖。电子显微镜的发明被誉为 20 世纪最重要的科学发明之一。

1939 年,德国 Siemens 公司生产了第一台作为商品用的透射电镜,分辨率优于 10 nm。其后,由于第二次世界大战的影响,电镜的发展暂停。

二战以后,商品化的电子显微镜开始得到广泛应用。20 世纪 50 年代初到 60 年代末期,电镜发展很快,从性能到构造都有很大的改进,特别是分辨本领大幅度提高,达到 1 nm 左右,电镜技术开始应用于各个学科领域。我国在 20 世纪 50 年代末期开始研制电镜,成为少数几个生产国之一。

20 世纪 60~80 年代初,电镜性能不断完善,特别是在分辨率及超高压方面发展极快。