

DIANZI  
XIANWEIJING  
JISHUYU  
YINGYONG

DIANZI  
XIANWEIJING  
JISHUYUYINGYONG

郭素枝 编著

# 电子显微镜 技术与应用



厦门大学出版社  
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

# 电子显微镜技术与应用

郭素枝 编著

厦门大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

电子显微镜技术与应用/郭素枝编著. —厦门:厦门大学出版社, 2008. 10  
ISBN 978-7-5615-3105-1

I. 电… II. 郭… III. 电子显微镜 IV. TN16

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 153069 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门大学 邮编:361005)

<http://www.xmupress.com>

[xmup @ public. xm. fj. cn](mailto:xmup@public.xm.fj.cn)

沙县方园印刷有限公司印刷

2008 年 10 月第 1 版 2008 年 10 月第 1 次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:14.25 字数:353 千字

定价:20.00 元

本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换

## 序

电子显微镜是利用电子束对样品放大成像的一种大型精密显微镜,包括扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscopy, SEM)和透射电子显微镜(Transmission Electron Microscopy, TEM)两大类型。电子显微镜技术为微观世界的探测提供了一种新的重要研究手段,不仅应用于植物学、动物学、微生物学、医学、农学、古生物学等生物科学领域,而且还广泛应用于化学、物理学、电子学、食品学、半导体工业、陶瓷工业、化学工业等其他科学领域。随着电子显微镜技术的普及和发展,电子显微镜技术的应用已经从高层次的研究发展成为应用广泛的检测手段,并在基础研究和应用研究上都取得显著成果。

电子显微镜作为研究分析仪器,其所涉及的学科领域范围广、研究材料种类多、检测方法差异大。获得一张优质的电子图像,除了具备分辨率高、性能良好的仪器外,与使用者熟练的操作技能、样品制备技术、丰富的实践经验有着密切的关系。郭素枝先生多年来从事电子显微镜技术工作,具备丰富的专业知识与实践经验,于2006年出版的《扫描电镜技术及其应用》一书,深受读者的喜爱和好评。最近作者根据读者的需求和教学、科研及实验操作的需要,对原书内容作了适当调整、修订和增删,新增了透射电子显微镜技术与应用的内容,并将书名改为《电子显微镜技术与应用》,使其更臻完善和实用。

相信该书的出版将对广大电镜工作者和相关的科研人员及高校师生会有重要参考价值。为此,乐予为序。

郭素枝  
2008-08-28

## 前 言

自从 1932 年第一台透射电子显微镜和 1965 年第一台商品扫描电子显微镜问世以来,日本、荷兰、德国、美国和中国等相继研制出各种类型的电镜。经过 70 多年的不断改进和发展,电镜的分辨率已从第一台的 25 nm(扫描电镜)、100 nm(透射电镜)提高到现在的 0.01~0.1 nm,而且大多数电镜都能同 X 射线波谱仪、X 射线能谱仪、扫描探针、环境样品室和自动图像分析仪等组合,成为一种能够对研究样品微观世界进行全面分析的多功能电子显微仪器。

电镜观察结果是以电子图像或照片的形式给予,所获得的图像能否如实地反映出实际被研究样品表面的微细形态结构,与诸多因素有关。除仪器功能上的原因以及观察条件的设置外,更重要的因素在于样品的制备技术。因此,作者在编著过程中对于样品制备方法(根据不同材料)、测试条件以及为解释分析结果所需要的基本原理、方法和观察条件的设置给予必要的介绍,并融入了许多自己的实践经验与心得体会,以期读者能够正确地运用这些技术去解决研究中遇到的各种问题。

本人于 2006 年 2 月出版《扫描电镜技术及其应用》一书,得到广大读者的喜爱,至今已销售一空。许多读者对该书提供了宝贵意见,并建议在再版时增加透射电镜的相关内容,以进一步完善与充实电镜知识。为此,在《扫描电镜技术及其应用》一书的基础上,删除暗室技术章节(因为新型电镜普遍采用计算机储存技术,而 20 世纪 80—90 年代的电镜产品大多数已安装 CCD 照相机及相关的附件,可直接保存图像),并对一些章节进行修改补充完善,同时增加透射电镜技术与应用的内容(第四章、第七章、第九章)和(第一章、第二章、第十章部分内容),编著成《电子显微镜技术与应用》一书。书中插图除少数部分引用已发表的文献,大多数是本人长期的研究结果。本书的出版为应用电镜技术的科研人员与相关学科的教学提供了具有实用价值的参考资料,也可作为研究生、本科生的教材与参考书。

本书完稿后,承蒙福建中医学院电镜实验中心陈文列研究员、福建医科大学电镜室钟秀蓉高级实验师全稿审阅;福建农林大学张育松高级农艺师、李冬梅老师和张明辉老师,以及硕士研究生高华娟、那海燕、张健、张涛等同学为本书作了图片扫描、制图和查找与本书相关的文献等部分工作;同时还得到校领导及同事的关心与支持,在此一并表示衷心的感谢。

本书在编著过程中,参阅了国内外有关方面的专著和文献资料,在此向原作者表示诚挚的谢意。

最后衷心感谢我的老师、中国科学院院士谢联辉教授对本人的研究和写作给予许多支持和鼓励,并从百忙中抽出宝贵时间为本书作序。

限于学识水平,书中错误和纰漏难免,恳请相关方面的专家和读者不吝赐教。

郭素枝

2008 年 8 月

# 目 录

## 序

## 前 言

|                           |      |
|---------------------------|------|
| <b>第一章 电子显微镜概述</b> .....  | (1)  |
| 第一节 电镜发展简史.....           | (1)  |
| 一、光学显微镜的极限分辨率 .....       | (1)  |
| 二、电镜的研制历程 .....           | (3)  |
| 第二节 电镜的类型及其展望.....        | (5)  |
| 一、电镜类型介绍 .....            | (5)  |
| 二、展望.....                 | (11) |
| <b>第二章 电子显微镜的用途</b> ..... | (12) |
| 第一节 透射电镜在生命科学中的应用 .....   | (12) |
| 一、细胞学.....                | (12) |
| 二、发现和识别病毒.....            | (13) |
| 三、临床病理诊断.....             | (14) |
| 四、微生物学.....               | (14) |
| 五、免疫学.....                | (15) |
| 六、细胞化学.....               | (16) |
| 第二节 透射电镜在材料科学中的应用 .....   | (16) |
| 一、纳米材料的分析鉴定.....          | (17) |
| 二、半导体材料的观察分析.....         | (18) |
| 第三节 扫描电镜在生命学科中的应用 .....   | (18) |
| 一、植物学.....                | (18) |
| 二、动物学.....                | (21) |
| 三、医学.....                 | (23) |
| 四、微生物学.....               | (24) |
| 五、古生物学.....               | (26) |
| 六、考古学.....                | (26) |
| 第四节 扫描电镜在基础学科中的应用 .....   | (27) |
| 一、材料学.....                | (27) |
| 二、物理学.....                | (29) |
| 三、化学.....                 | (29) |
| 第五节 扫描电镜在工业中的应用 .....     | (30) |
| 一、半导体工业.....              | (30) |

|                         |      |
|-------------------------|------|
| 二、陶瓷工业                  | (31) |
| 三、化学工业                  | (31) |
| 四、地质矿物学                 | (32) |
| 五、食品科学                  | (33) |
| 第六节 X 射线微区成分分析技术的应用     | (33) |
| 一、在生物学领域中应用             | (34) |
| 二、在材料科学中的应用             | (34) |
| 三、特殊试样的应用               | (35) |
| 第七节 电镜成分分析技术的发展前景       | (36) |
| <b>第三章 扫描电镜的工作原理和结构</b> | (38) |
| 第一节 工作原理和主要结构           | (38) |
| 一、工作原理                  | (38) |
| 二、主要结构                  | (38) |
| 第二节 扫描电镜成像原理和成像过程       | (42) |
| 一、成像原理                  | (42) |
| 二、成像过程                  | (42) |
| 三、扫描电镜的特点               | (45) |
| 第三节 影响扫描电镜图像形成和图像质量的因素  | (46) |
| 一、影响图像形成的因素             | (46) |
| 二、影响图像细节清晰的因素           | (48) |
| 三、影响图像反差的因素             | (50) |
| <b>第四章 透射电镜的工作原理和结构</b> | (51) |
| 第一节 透射电镜的工作原理和主要结构      | (51) |
| 一、透射电镜的工作原理             | (51) |
| 二、透射电镜的结构               | (51) |
| 第二节 透射电镜的成像原理           | (55) |
| 一、透射电镜的成像原理可分为三种情况      | (56) |
| 二、透射电镜图像反差的形成原理         | (56) |
| 三、提高生物样品图像反差的方法         | (58) |
| 四、透射电镜的特点               | (59) |
| 第三节 电子显微镜与光学显微镜的主要区别    | (60) |
| 一、成像原理和反差来源             | (60) |
| 二、分辨本领和放大倍数             | (60) |
| 三、视野、景深和焦深              | (61) |
| 四、样品制备                  | (61) |
| 五、样品的损伤和污染              | (61) |
| <b>第五章 扫描电镜样品制备技术</b>   | (63) |
| 第一节 对样品处理的要求            | (65) |
| 一、研究样品表面要处理干净           | (65) |
| 二、研究样品必须彻底干燥            | (65) |

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| 三、非导体样品的导电处理·····          | (66)        |
| 四、保护样品研究面·····             | (66)        |
| 五、要求标记物要有形态·····           | (66)        |
| 第二节 取样、清洗、固定·····          | (67)        |
| 一、取样·····                  | (67)        |
| 二、粗样清洗·····                | (67)        |
| 三、样品固定·····                | (68)        |
| 第三节 脱水·····                | (74)        |
| 一、脱水剂·····                 | (74)        |
| 二、脱水的原理与要求·····            | (74)        |
| 三、脱水方法·····                | (75)        |
| 第四节 干燥·····                | (75)        |
| 一、干燥要求·····                | (75)        |
| 二、干燥方法·····                | (75)        |
| 第五节 粘样·····                | (82)        |
| 一、粘样的目的·····               | (82)        |
| 二、粘贴样品的材料·····             | (82)        |
| 三、注意事项·····                | (82)        |
| 第六节 样品的导电处理·····           | (82)        |
| 一、金属镀膜法·····               | (83)        |
| 二、导电染色法·····               | (85)        |
| <b>第六章 透射电镜样品制备技术·····</b> | <b>(86)</b> |
| 第一节 概述·····                | (86)        |
| 一、电镜样品取材的基本要求·····         | (86)        |
| 二、样品超薄切片的基本要求·····         | (86)        |
| 三、主要制样技术·····              | (86)        |
| 第二节 样品取材与固定·····           | (88)        |
| 一、取材方法·····                | (88)        |
| 二、固定·····                  | (89)        |
| 第三节 样品的清洗与脱水·····          | (91)        |
| 一、清洗·····                  | (91)        |
| 二、脱水·····                  | (91)        |
| 第四节 样品的渗透、包埋与聚合·····       | (92)        |
| 一、渗透·····                  | (92)        |
| 二、包埋·····                  | (92)        |
| 三、渗透与包埋的操作步骤·····          | (93)        |
| 四、渗透与包埋中的注意事项·····         | (93)        |
| 五、聚合·····                  | (93)        |
| 第五节 载网和支持膜的制作·····         | (94)        |
| 一、载网的类型和选择·····            | (94)        |

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 二、支持膜的制作·····              | (95)  |
| 第六节 样品的超薄切片技术·····         | (97)  |
| 一、切片刀制作·····               | (97)  |
| 二、修块·····                  | (98)  |
| 三、切片·····                  | (99)  |
| 第七节 切片的染色·····             | (102) |
| 一、染色剂的种类·····              | (102) |
| 二、常用染色剂的特性·····            | (103) |
| 三、常用染色剂的配制·····            | (103) |
| 四、染色方法·····                | (103) |
| 五、切片染色常出现效果欠佳的原因及克服方法····· | (104) |
| 第八节 负染色技术·····             | (104) |
| 一、负染色的原理·····              | (104) |
| 二、负染色剂的种类及其特性·····         | (105) |
| 三、负染样品悬浮液的制备·····          | (106) |
| 四、负染的方法与操作步骤·····          | (107) |
| 五、影响负染色效果的主要因素及克服方法·····   | (108) |
| 六、正染与负染的区别·····            | (108) |
| 第九节 电镜细胞化学技术·····          | (109) |
| 一、电镜细胞化学技术种类·····          | (109) |
| 二、电镜酶细胞化学技术·····           | (109) |
| 三、其他生物物质的细胞化学技术·····       | (113) |
| 第十节 免疫电子显微技术·····          | (116) |
| 一、抗体的标记技术·····             | (116) |
| 二、胶体金制备·····               | (116) |
| 三、胶体金的鉴定·····              | (117) |
| 四、胶体金探针制备方法·····           | (117) |
| 五、胶体金免疫电镜样品的制备·····        | (119) |
| 六、对照实验·····                | (121) |
| 七、胶体金探针的优点·····            | (122) |
| 第十一节 实验废液处理·····           | (122) |
| 一、废液的收集·····               | (122) |
| 二、废液的处理·····               | (123) |
| 三、废液处理的注意事项·····           | (125) |
| 第七章 扫描电镜的使用·····           | (126) |
| 第一节 扫描电镜的操作·····           | (126) |
| 一、电镜启动·····                | (126) |
| 二、样品的安装·····               | (126) |
| 三、观察条件的选择·····             | (126) |
| 四、观察图像的操作方法·····           | (127) |

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| 五、关机 .....               | (130) |
| 第二节 扫描电镜图像常出现的质量问题 ..... | (130) |
| 一、产生的原因 .....            | (130) |
| 二、损伤 .....               | (132) |
| 三、污染 .....               | (133) |
| 四、放电 .....               | (133) |
| 第八章 透射电镜的操作 .....        | (134) |
| 第一节 透射电镜的一般操作步骤 .....    | (134) |
| 一、TEM 的开机 .....          | (134) |
| 二、TEM 的对中和调整 .....       | (134) |
| 三、装样及注意事项 .....          | (139) |
| 四、图像的观察和记录 .....         | (139) |
| 五、关机 .....               | (140) |
| 第二节 电镜日常使用期间的检查与保养 ..... | (140) |
| 一、技术指标的调整 .....          | (140) |
| 二、日常保养工作 .....           | (141) |
| 第九章 电子图像储存技术和计算机处理 ..... | (142) |
| 第一节 计算机储存电子图像 .....      | (142) |
| 一、计算机储存图像的特点 .....       | (142) |
| 二、全自动图像处理技术 .....        | (142) |
| 第二节 计算机图像处理实例 .....      | (143) |
| 一、电子图像的计算机处理过程 .....     | (143) |
| 二、实空间图像的处理 .....         | (144) |
| 三、傅里叶空间图像的处理 .....       | (144) |
| 四、二维晶体图像的处理 .....        | (145) |
| 五、螺旋对称颗粒图像的处理 .....      | (147) |
| 六、单颗粒图像的处理 .....         | (148) |
| 七、二十面体对称的病毒颗粒图像的处理 ..... | (150) |
| 第十章 电镜样品制备实例 .....       | (152) |
| 第一节 生物样品扫描电镜制备方法 .....   | (152) |
| 一、孢子常规的固定方法 .....        | (152) |
| 二、酵母的固定 .....            | (152) |
| 三、原生动物固定 .....           | (153) |
| 四、植物组织的特殊固定方法 .....      | (153) |
| 五、单固定快速脱水法 .....         | (154) |
| 六、鱼类细胞单固定半程序微波辐射法 .....  | (155) |
| 七、贴壁培养细胞的单固定氯化金染色法 ..... | (155) |
| 八、血细胞制样方法 .....          | (155) |
| 九、血细胞 E 花环样品制备 .....     | (156) |
| 十、明胶膜收集游离细胞制样方法 .....    | (157) |

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 十一、单细胞藻类的制样方法 .....       | (157) |
| 十二、菌落制样方法 .....           | (158) |
| 十三、细菌液体培养物制样方法 .....      | (158) |
| 十四、真菌熏蒸制样方法 .....         | (159) |
| 十五、微小样品的制样方法 .....        | (159) |
| 十六、原生质体的制样方法 .....        | (159) |
| 十七、染色体的制样方法 .....         | (160) |
| 十八、植物花粉粒的制备技术 .....       | (161) |
| 十九、叶表皮制样方法 .....          | (163) |
| 二十、木材立方体扫描样品制备技术 .....    | (164) |
| 二十一、植物材料的冷冻割断制备技术 .....   | (165) |
| 二十二、动物细胞内部结构冷冻割断法 .....   | (166) |
| 二十三、动物器官的制样方法 .....       | (166) |
| 二十四、细胞盐酸化学消化法 .....       | (167) |
| 二十五、线虫扫描电镜样品的制备 .....     | (168) |
| 二十六、针插或乙醇浸泡标本的样品制作 .....  | (171) |
| 二十七、扫描电镜样品的导电法 .....      | (172) |
| 二十八、非包埋与包埋切片的样品处理方法 ..... | (173) |
| 二十九、免疫扫描电镜方法 .....        | (176) |
| 三十、微区成分分析的生物样品制备方法 .....  | (180) |
| 第二节 非生物样品扫描电镜制备技术 .....   | (180) |
| 一、块状导电样品制备 .....          | (180) |
| 二、粉末样品制备 .....            | (180) |
| 三、土壤试样的制备 .....           | (182) |
| 第三节 生物样品透射电镜制备方法 .....    | (182) |
| 一、蛋白质样品的负染色 .....         | (182) |
| 二、核酸样品的负染色 .....          | (183) |
| 三、水稻条纹病毒(RSV)的提纯 .....    | (185) |
| 四、免疫电镜技术包埋前染色方法 .....     | (185) |
| 五、免疫电镜技术包埋后染色方法 .....     | (186) |
| 六、免疫铁蛋白标记技术 .....         | (186) |
| 七、免疫酶标记技术 .....           | (187) |
| 八、悬浮态抗原的免疫标记技术 .....      | (187) |
| 九、藻类透射电镜制样方法 .....        | (188) |
| 十、散在细胞的透射电镜制样方法 .....     | (189) |
| 十一、血小板透射电镜样品制备方法 .....    | (190) |
| 十二、孢粉包埋切片法 .....          | (190) |
| 十三、花药包埋切片法 .....          | (190) |
| 十四、整花包埋切片法 .....          | (191) |
| 十五、静脉乳液样品的制备 .....        | (191) |

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 十六、纳米材料乳液制备 .....         | (191) |
| 十七、细胞钙离子定位的锇酸盐沉淀技术 .....  | (192) |
| 十八、三磷酸腺苷酶的定位 .....        | (192) |
| 十九、组胞色素氧化酶的定位 .....       | (193) |
| 二十、过氧化物酶的定位 .....         | (193) |
| 二十一、过氧化氢酶的定位 .....        | (193) |
| 二十二、葡萄糖-6-磷酸酶的定位 .....    | (194) |
| 二十三、显示 DNA 的染色法 .....     | (194) |
| 二十四、提高超薄切片反差的双铅染色法 .....  | (194) |
| 二十五、超薄切片的选择性染色法 .....     | (195) |
| 二十六、显示蛋白的氨银反应 .....       | (195) |
| 二十七、细胞质多角体病毒的分离与纯化 .....  | (195) |
| 二十八、染色质核小体的透射电镜样品制备 ..... | (196) |
| 二十九、植物花叶病毒的免疫电镜观察 .....   | (196) |
| 三十、造纸胶料的制备 .....          | (197) |
| 第四节 非生物样品透射电镜制备技术 .....   | (197) |
| 一、粉末样品的制备 .....           | (197) |
| 二、薄膜样品的制备 .....           | (198) |
| 三、复型 .....                | (200) |
| 四、界面试样的制备 .....           | (202) |
| 五、聚焦离子束方法 .....           | (202) |
| 六、真空蒸涂方法 .....            | (202) |
| 七、试样的保存和观察时的注意事项 .....    | (203) |
| 参考文献 .....                | (204) |

## 第一章 电子显微镜概述

电子显微镜技术是显微技术的一个重要分支,是一门现代化的显微科学。显微技术的核心问题是显示肉眼不能直接观察到的物质的手段问题,准确地讲就是显微仪器。光学显微仪器种类较多,如生物显微镜、体视显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜、万能显微镜、紫外线显微镜、偏光显微镜等等。借助这些仪器我们能直接观察到各种细菌、动植物的细胞及其内部结构。光学显微镜的分辨率最高只能达到 200 nm,有效放大倍率为 1 000~2 000 倍。如果研究比 200 nm 更小的超微结构,如物质的分子、原子以及纳米级的材料等,光学显微镜显得无能为力。于是科学家就发明了电子显微镜,简称电镜(Electron Microscopy, EM),它是利用电子束对样品放大成像的一种显微镜,包括扫描电镜(Scanning Electron Microscopy, SEM)和透射电镜(Transmission Electron Microscopy, TEM)两大类型,其分辨率最高达到 0.01 nm,放大倍率高达 1 500 000 倍,借助这种电镜我们能直接观察到物质的超微结构。从第一台电子显微镜问世至今,电镜技术在各学科的应用研究取得了可喜的成就。

### 第一节 电镜发展简史

#### 一、光学显微镜的极限分辨率

1665 年 Robert Hooke(罗伯特·虎克)发明了第一台光学显微镜,并用这台光镜第一次观察到软木塞的细胞。后来 Leewenheek(李文赫克)改进了这台仪器,用它观察到单细胞如藻类细胞、鱼的血红细胞,从此揭开了显微技术的序幕。

到 1898 年,光学显微镜经历了 230 多年的改进,已经达到非常完善的程度。从分辨率来讲,它已经达到了极限分辨率,已接近它的理论极限,即 200 nm。但是,自然界有些物质的微观结构非常小,其大小只能用微米或纳米来表示,如病毒、物质的分子、原子等。为了提高光学显微镜的分辨率,科学家们作了大量的研究,但是再也无法提高光镜的分辨本领。

所谓分辨率是指在特定的情况下拍摄的图像上测量两亮区之间的暗间隙宽度,然后除以总放大倍数,其最小值即为分辨率,也就是人们以肉眼借助显微仪器能区别开两个微体的最小距离。如果指的是两个点间的最小距离为点分辨率,如果指的是两条线(或者两个晶体面)间的距离为线分辨率(或晶格分辨率)。正常人眼的分辨率是指人眼在距离物体 25 cm 处(人眼最佳分辨距离)能分辨的两点间的最小距离。人眼的分辨率为 0.10~0.25 mm。如果观察比 0.1 mm 更小的物体,就必须借助显微镜了。

例如,要把 200 nm 的微体放大到人眼所能观察到的尺寸,最低放大倍数应该是:

$$M = \frac{R}{\delta} = \frac{0.1 \times 10^6 (\text{nm})}{200 (\text{nm})} = 500 (\text{倍}) \quad (1-1)$$

式中:  $M$ ——放大倍率;

$R$ ——人眼分辨率;

$\delta$ ——仪器分辨率。

这就是说,要把 200 nm 的物体放大 500 倍,我们才能看到它,而且要求我们的眼睛分辨率是 0.1 mm,这个最低放大倍率( $M$ )为有效放大倍率。如果借助显微镜放大 1 000 倍,物体就有 0.2 mm,看起来就舒适多了,再放大并不增加新的信息,称为空放大。

作为放大倍率这个参数,光学显微镜也可以达到 5 万~10 万倍,但是并不能增加新的信息,也就是说并不能提高其分辨率。问题的关键不在显微镜本身,而是在光线上。光学显微镜是依靠可见光来观察物体的。可是人眼能观察到的只是波长为 400~760 nm 的光波。光在传播中碰到的物体如果大于这段波长,就会被物体挡住,发生反射,就可以看到它的像;如果物体小于 200 nm,光波就会经过它旁边继续向前传播,就看不见图像。德国理论光学家 E Abbe 经过了长期的艰苦探索,于 1918 年终于揭示了这个奥秘。他指出:作为光镜照明源的光波波长是限制光镜分辨率的基本因素。从理论上讲,光镜无论怎样完善也无法看到比光波波长更小的物体。他进一步指出限制光镜分辨率的原理是光的衍射行为。光的衍射效应对分辨率具有量的限制性,可以用公式表示如下:

$$\delta = \frac{h\lambda}{N \sin \alpha} \quad (1-2)$$

式中:  $\delta$ ——恰能分辨两个物点的距离;

$h=0.61$ ;

$\lambda$ ——波长;

$N$ ——物间介质的折射系数;

$\alpha$ ——入射光束孔径角的一半;

$N \sin \alpha$ ——数值孔径。

光学显微镜的照明光源在可见光(390~760 nm)的波长范围内,取 500 nm,入射光束的孔径角最大为  $180^\circ$ ,其半角为  $90^\circ$ , $\sin \alpha = \sin 90^\circ = 1$ 。以香柏油作为浸没油,它的折射系数  $N=1.51$ ,代入公式(1-2)得:

$$\begin{aligned} \delta &= (0.61 \times 500) / (1.51 \times 1) \\ &= 305 / 1.51 \\ &= 201.99 (\text{nm}) \end{aligned} \quad (1-3)$$

由(1-3)式得知,光学显微镜的极限分辨率为 200 nm,其极限放大倍数为 2 000 倍。

由光学显微镜的极限分辨率得知:要提高显微仪器的分辨率,就必须减小波长或增加数值孔径。于是,科学家们致力于研究可以作为照明源的各种电磁波的波长,见表 1-1。

表 1-1 各种电磁波的波长

| 电磁波      | 电波                  | 红外线                         | 可见光     | 紫外线    | X 射线    | $\gamma$ 射线 |
|----------|---------------------|-----------------------------|---------|--------|---------|-------------|
| 波长范围(nm) | $10^{12} \sim 10^6$ | $5 \times (10^5 \sim 10^3)$ | 760~390 | 390~13 | 10~0.05 | 0.1~0.005   |

表中紫外线的波长比可见光小,但不易透过玻璃,容易被空气中的氧吸收。短波紫外光显微镜必须用曲面镜成像并在真空中操作,其分辨率只能提高 5 倍,所以采用短波紫外光不是提

高分辨率的有效途径。X 射线波长比紫外线短,但 X 射线通过物体时不能折射成像,只能通过投影方式成像,因而像的清晰度、放大倍数和分辨率都受到限制,达不到研究目的。高速运动的电子在电场和磁场中可以被折射和聚焦,波长为 0.005 nm 的电磁波要比绿色可见光的波长小  $10^5$ ,可见采用短的电磁波波长是提高显微镜分辨率的极为有效的途径。

## 二、电镜的研制历程

1924 年,法国科学家 De Broglie 证明任何粒子在高速运动的时候都会发射一定波长的电磁辐射,其辐射波的波长与粒子的质量和运动速度成反比,用公式表示如下:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (1-4)$$

式中: $\lambda$ ——波长;

$h$ ——普朗克常数;

$m$ ——粒子的质量;

$v$ ——粒子运动的速度。

如果高速运动的粒子是电子,那么电子在真空中运动的速度与加速电压有关,根据能量守恒定律,可以得到:

$$\frac{1}{2}mv^2 = eV \quad (1-5)$$

式中: $e$ ——电子的电荷绝对值;

$V$ ——加速电压。

化公式(1-5)为电子的速度:

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}} \quad (1-6)$$

将公式(1-6)代入公式(1-4),得辐射波波长与加速电压  $V$  关系:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2emV}} \quad (1-7)$$

把已知的物理常数:

$$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s},$$

$$e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C},$$

$$m = 9.1 \times 10^{-31} \text{ kg},$$

代入公式(1-7),得

$$\lambda = \frac{1.225}{\sqrt{V}} (\text{nm}) \quad (1-8)$$

电子显微镜所用加速电压都较高,电子运动的速度与光速相比已不可忽略,须考虑相对论效应。经相对论修正后,(1-8)式为

$$\lambda = \frac{1.225}{\sqrt{V_r}} (\text{nm}) \quad (1-9)$$

式中  $V_r$  为相对论效应,其与加速电压  $V$  有如下关系:

$$V_r = V(1 + 0.978 \times 10^{-6} V) \quad (1-10)$$

将公式(1-10)代入公式(1-9),得

$$\lambda = \frac{1.225}{V^{\frac{1}{2}}} (1 + 0.978 \times 10^{-6} V)^{\frac{1}{2}} (\text{nm}) \quad (1-11)$$

由(1-11)得知,电子波长 $\lambda$ 是由加速电压 $V$ 决定的(见表1-2)。

表 1-2 不同加速电压的电子波长

| 加速电压<br>(kV)            | 50      | 75      | 100     | 200     | 300   | 400     | 500     | 1 000   |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|
| 波长 $\lambda(\text{nm})$ | 0.005 5 | 0.004 5 | 0.003 9 | 0.002 5 | 0.002 | 0.001 7 | 0.001 2 | 0.000 7 |

这种随加速电压改变的电子波长叫做德布罗利波,这为电镜的研制打下了基础,但仅有电子流辐射波还不行,因为并没有解决电子流聚焦成像的问题。

1926年德国科学家 Garbor 和 Busch 发现用铁壳封闭的铜线圈对电子流能折射聚焦,即可以作为电子束的透镜。

上述两个重大发现为电镜的研制提供了重要的理论基础。德国科学家 Ruska 和 Knoll 在前面两个发现的基础上,经过了几年的努力,终于在 1932 年制造出第一台电子显微镜(为 TEM)。尽管它十分粗糙,分辨率也很低,但它却证实了上述两个理论的实用价值。经过改造,在 1933 年研制的电镜分辨率为 50 nm,放大倍率为 1.2 万倍,到 1938 年分辨率为 10 nm,放大倍率为 20 万倍。1939 年这一成果被正式交付德国西门子公司批量生产,当时生产了 40 台投入国际市场。

1954 年西门子公司生产 Elmiskop I 型 TEM,分辨率为 1 nm;日本 TEM 始于 1941 年,分辨率为 3 nm;荷兰 Philips 公司于 1944 年研制第一台 TEM,后来又生产系列电镜;1946 年美国开始生产电镜;我国电镜研制起步较迟,1958 年在长春中国科学院光学精密机械研究所生产了第一台中型电镜,到 1977 年生产的 TEM 分辨率为 0.3 nm,放大倍率为 80 万倍。

1932 年 Knoll 提出了 SEM 可成像放大的概念,并在 1935 年制成了极其原始模型。1938 年德国的阿登纳制成了第一台采用缩小透镜用于透射样品的 SEM。由于不能获得高分辨率的样品表面电子像,SEM 一直得不到发展,只能在电子探针 X 射线微分析仪中作为一种辅助的成像装置。此后,在许多科学家的努力下,解决了 SEM 从理论到仪器结构等方面的一系列问题。最早期作为商品出现的是 1965 年英国剑桥仪器公司生产的第一台 SEM,它用二次电子成像,分辨率达 25 nm,使 SEM 进入了实用阶段。

1968 年在美国芝加哥大学,Knoll 成功研制了场发射电子枪,并将它应用于 SEM,可获得较高分辨率的透射电子像。1970 年他发表了用扫描透射电镜拍摄的铀和钍中的铀原子和钍原子像,这使 SEM 又进展到一个新的领域。

1982 年德国物理学家 Gerd Binnig 与瑞士物理学家 Heinrich Rohrer 在瑞士苏黎世研究所工作时发明了扫描隧道显微镜(STM),并因此共同获得了当年的诺贝尔物理奖。同年,第一台电子显微镜的发明者 Ruska 也获此殊荣。

1986 年 Binnig 等发明了原子力显微镜,可以在任何环境(如液体、空气)中成像,在纳米级、分子级水平上作研究。商用产品出现在 1989 年。

1975 年在中国科学院北京科学仪器厂成功试制了第一台 DX-3 型 SEM,分辨率为 10 nm,填补了我国 SEM 的空白。

## 第二节 电镜的类型及其展望

### 一、电镜类型介绍

20 世纪 70 年代以来,电镜的发展主要体现在以下几个方面:①不断提高分辨率,以求观察更精细的物质结构及微小的实体以至分子、原子;②研制超高压电镜和特殊环境的样品室,以研究物体在自然状态下的形貌及动态性质;③研制能对样品进行综合分析(包括形态、结构和化学成分等)的电镜。

截至目前,科学界已成功研制出的设备有典型的扫描电镜(SEM)、扫描透射电镜(STEM)、场发射扫描电镜(FESEM)、冷冻扫描电镜(Cryo-SEM)、低压扫描电镜(LVSEM)、环境扫描电镜(ESEM)、扫描隧道显微镜(STM)、原子力显微镜(AFM)等。透射电镜有典型的透射电镜(TEM)、超高压透射电镜(HVTEM)、场发射透射电镜(FETEM)、低能电子显微镜(LEEM)等。多功能的分析电镜即电镜带上能谱仪、波谱仪、荧光谱仪、二次离子质谱仪和电子能量损失谱仪等,既能作超微结构研究,也能作微区的组分分析,即作定性、定量、定位分析。由电镜衍生出电子探针和离子探针。以下介绍几种最常用的电镜类型。

#### 1. 场发射扫描电镜

FESEM 是一种高分辨率扫描电镜,能观察各种固态样品表面形貌的二次电子像、反射电子像及图像处理;配有高性能 X 射线能谱仪,能同时进行样品表层的微区成分的定性、半定量和定量分析,获得元素的分布图。最高成像分辨率 1.5 nm,加速电压 0~30 kV,放大倍数 0~80 万倍,工作距离 1~50 mm,倾斜角度 7°~45°,X 射线能谱分辨率 130 eV,元素分析范围为 B~U。在材料分析中得到广泛应用。尤其是良好的低压高空间分辨性能和低压下良好的扫描电子像相互结合使用,使扫描电镜应用范围得到扩展。

JSM-6000F 型场发射扫描电镜的分辨本领在加速电压 30 kV 时达 0.6 nm,已接近透射电镜的水平,但试样必须浸没于物镜的强磁场中以减少球差的影响,所以尺寸受到限制,最大为 23 mm×6 mm×3 mm。试样半浸没在物镜磁场中的场发射 JSM-6340F 型可以观察大试样,加速电压 15 kV 时分辨本领为 1.2 nm,低压 1 kV 时为 2.5 nm。这两种 SEM 由于试样要处在磁场中,所以不能观察磁性材料。使用 CF 校正场小型物镜可观察大试样的场发射 JSM-6600F 型分辨本领为 2.5 nm(1 kV 时为 8 nm)。

利用 FESEM 低压性能好的优点进行表面微细节观察与研究,可以得到原子序数衬度像;可以利用二次电子成分像观察与分析;可以对小于 0.1  $\mu\text{m}$  的细节进行成分的点、线和面分析;可以对试样在常规钨丝枪不能分辨开的区域进行分析;可以替代 TEM 的部分工作。也可以利用 FESEM 在半导体方面的研究,如半导体材料中晶体缺陷应变场的形状和尺寸、缺陷的走向、表面层内的密度、单个缺陷的显微形态、缺陷间的相对取向以及相互作用等等,检验抛光硅表面氧、碳的沾污,直接观测集成电路中用电子束曝光蚀刻的二氧化硅、氮化硅的亚微米光栅的间距、蚀刻深度及边缘角度。

#### 2. 扫描隧道显微镜

STM 之所以能够发明并且迅速发展,是由于微电子学以极快的速度发展的缘故。作为电子计算机核心部分的硅集成块的集成板要求愈来愈高,其尺寸愈来愈小,所带来的问题是集成