

生物电子显微技术

张景强 朴英杰 蔡福筹 孔宪扬等 编著

36

中山大学出版社

内 容 简 介

本书主要介绍电子显微技术在生物学上的应用方法与技术。包括：透射和扫描电镜的原理与操作；超薄切片；负染色；金属投影与复型；生物大分子电镜样品制备；冷冻制样；细胞化学；免疫电镜；电镜放射自显影和扫描电镜生物样品制备技术以及电镜下的细胞结构等。

本书作为综合大学和师范院校生物系、医药、农林等院校有关专业的电子显微技术课程的教学用书，也可供上述专业的教师和研究工作者从事电子显微镜应用研究时参考。

生物电子显微技术

张景强 朴英杰 等编著
蔡福筹 孔宪扬

※

中山大学出版社出版发行
广州红旗印刷厂印刷
广东省新华书店经销

※

787×1092毫米 16开本 10.375印张 6插页 235千字

1987年12月第1版 1987年12月第1次印刷

印数：1—5000册

ISBN 7-306-00048-9/Q·2
统一书号：13339·27 定价：2.20元

前 言

Ruska和knoll在1931年研制成功第一台电子显微镜。经过半个多世纪的发展，已广泛应用到自然科学的许多学科中，并且极大推动了这些学科的发展。在七十年代电子显微镜终于实现了人们直接观察原子的长期愿望，电镜成了“科学之眼”。一门新兴的电子显微学因此而诞生。而Ruska也因此而获得1986年诺贝尔物理奖。在生命科学，由于电子显微镜技术的迅速发展和应用，改变了细胞学、组织学、病毒学、分类学和分子生物学等的面貌，促使生物学从细胞水平进入到分子水平；它也成为生物学、医学、农林等学科研究工作中极为重要的手段。

近年来，我国拥有越来越多的电子显微镜，应用也越广泛，不少高等院校都相继开设有关的课程，都希望有合适的参考书。考虑到这种情况，我们总结了中山大学、中山医科大学、人民解放军第一军医大学和华南农业大学的教学和科研工作实践，参考国内外一些新资料编写了这本书。书中比较系统地介绍了各种基本的技术和近十年来发展起来的新技术，并介绍了电镜下的细胞结构。本书第1，2，4，5，6章由中山大学张景强编写；第3，11章由中山医科大学蔡福筹编写；第7，8，9章由第一军医大学朴英杰、罗深秋、肖焕才、刘连璞等编写；第10章由华南农业大学孔宪扬编写；全稿最后由张景强整理和作了一些修改。第11章曾请中山大学生物系林月婵副教授审阅，并提出了不少建议，在此深表谢意。

书中所有图版均为作者拍摄。

作者 1987年1月

目 录

第 1 章 透射电子显微镜的原理与操作

1-1 概述	(1)
1-1-1 光学显微镜分辨本领的限制	(1)
1-1-2 电子显微镜的产生	(2)
1-2 磁透镜的光学性质	(3)
1-2-1 磁透镜的聚焦原理	(3)
1-2-2 磁透镜的像差	(7)
1-2-3 磁透镜的分辨本领、场深和焦深	(10)
1-3 像的反差形成原理	(11)
1-3-1 散射反差的形成	(12)
1-3-2 提高散射反差的方法	(13)
1-4 透射电子显微镜的结构	(15)
1-4-1 电子光学系统	(15)
1-4-2 真空系统和电子学系统	(20)
1-5 电子显微镜的操作	(21)
1-5-1 合轴操作	(21)
1-5-2 消像散	(23)
1-5-3 聚焦	(25)

第 2 章 扫描电子显微镜的原理与操作

2-1 扫描电子显微镜的结构和原理	(27)
2-1-1 结构	(27)
2-1-2 成像原理	(29)
2-1-3 电子与样品的相互作用	(30)
2-1-4 扫描电子显微镜的特点	(32)
2-2 扫描电子显微镜的实践	(33)
2-2-1 扫描电子显微镜的一般操作	(33)
2-2-2 扫描电子显微镜图像的缺陷	(35)
2-2-3 观察条件的确定	(38)

第 3 章 超薄切片技术

3-1 取材	(40)
--------	--------

3-2 固定	(41)
3-2-1 固定目的及良好固定的标准	(41)
3-2-2 几种常用的固定剂	(42)
3-2-3 几种常用的缓冲液	(44)
3-2-4 几种常用的固定液及配方	(45)
3-2-5 固定方法	(47)
3-2-6 固定时注意事项	(49)
3-3 脱水	(50)
3-3-1 脱水的目的及其过程	(50)
3-3-2 脱水过程中的注意事项	(50)
3-4 渗透与包埋	(51)
3-4-1 常用的包埋剂及配方	(51)
3-4-2 渗透与包埋步骤	(53)
3-4-3 渗透与包埋过程中的注意事项	(53)
3-5 超薄切片	(53)
3-5-1 超薄切片的准备工作	(54)
3-5-2 切片	(56)
3-6 切片染色	(58)
3-6-1 染色的作用	(58)
3-6-2 染色的方式	(59)

第4章 负染色技术

4-1 负染色液的制备	(60)
4-2 染色方法	(60)
4-3 操作中的注意事项	(61)

第5章 生物大分子观察技术

5-1 蛋白质分子的电子显微镜观察方法	(63)
5-1-1 低噪音支持膜的制备	(64)
5-1-2 对蛋白质溶液的要求	(64)
5-1-3 蛋白质大分子样品的负染色	(64)
5-1-4 电镜观察与拍照	(65)
5-2 核酸大分子的电子显微镜样品制备	(66)
5-2-1 基本原理	(66)
5-2-2 溶液的制备	(66)
5-2-3 单分子膜的展开过程	(67)
5-2-4 染色与金属投影	(67)

第6章 冰冻制样技术

6-1 概述	(69)
6-2 冰冻超薄切片技术	(70)
6-2-1 仪器准备	(70)
6-2-2 醛类固定	(70)
6-2-3 包封	(70)
6-2-4 冷冻保护处理	(71)
6-2-5 快速冷冻	(71)
6-2-6 切片	(72)
6-2-7 染色	(72)
6-3 冷冻刻蚀技术	(72)
6-3-1 仪器的准备	(73)
6-3-2 样品预处理	(73)
6-3-3 样品的冷冻	(74)
6-3-4 断裂	(74)
6-3-5 刻蚀	(74)
6-3-6 喷镀复型	(75)
6-3-7 复型膜的剥离和捞取	(75)
6-4 冷冻刻蚀复型图像的理解	(75)

第7章 电子显微镜细胞化学

7-1 概述	(77)
7-2 电镜酶细胞化学	(77)
7-2-1 电镜酶细胞化学的方法	(77)
7-2-2 原理	(78)
7-2-3 实验步骤及其操作注意事项	(81)
7-3 细胞器的电镜酶细胞化学	(95)
7-3-1 溶酶体	(95)
7-3-2 线粒体	(96)
7-3-3 内质网	(97)
7-3-4 高尔基体(高尔基装置)	(98)
7-3-5 微体	(100)
7-3-6 细胞膜	(101)
7-3-7 小结	(102)

第8章 免疫电子显微技术

8-1 铁蛋白标记法	(103)
8-1-1 铁蛋白的分布和性质	(103)
8-1-2 铁蛋白的获得	(103)
8-1-3 铁蛋白和抗体的结合	(104)
8-1-4 铁蛋白标记抗体的纯化	(104)
8-1-5 铁蛋白标记抗体的应用	(104)
8-2 酶标记抗体技术	(105)
8-2-1 酶标记抗体的戊二醛方法	(105)
8-2-2 酶标记抗体的过碘酸钠法	(106)
8-2-3 酶标记抗体用于免疫电镜技术实例	(107)
8-3 金属标记抗体法	(107)
8-3-1 胶体金的制作	(108)
8-3-2 A蛋白与胶体金的结合	(108)
8-3-3 A蛋白-胶体金-抗体复合物	(108)
8-3-4 染色	(108)
8-4 免疫复合物电子显微技术	(108)
8-4-1 超速离心法	(108)
8-4-2 乙型肝炎病毒颗粒快速免疫电镜检查法	(109)

第9章 电子显微镜放射自显影技术

9-1 标本的制备	(110)
9-2 同位素的选择、给予途径和剂量	(110)
9-3 生物材料的处理	(111)
9-4 核子乳胶膜的制备	(111)
9-5 自显过程和显影过程	(112)
9-6 标本的最后处理	(112)

第10章 扫描电子显微镜生物样品制备技术

10-1 概述	(113)
10-2 样品的初步处理	(114)
10-3 样品的干燥	(115)
10-3-1 空气干燥法	(115)
10-3-2 临界点干燥法	(115)
10-3-3 冰冻干燥法	(119)
10-3-4 苧烯干燥法	(120)
10-4 样品的装台粘胶	(121)

10-5	样品的表面导电处理	(122)
10-5-1	金属镀膜法	(122)
10-5-2	组织导电法	(125)
10-5-3	其它导电处理法	(126)
10-6	特殊的样品制备技术	(127)
10-6-1	样品的割断	(127)
10-6-2	蚀刻法	(131)
10-6-3	剥离法	(131)

第11章 电子显微镜下的细胞

11-1	细胞膜	(134)
11-1-1	细胞膜的分子结构	(135)
11-1-2	细胞被	(136)
11-1-3	细胞表面分化	(136)
11-2	线粒体	(140)
11-3	质体	(141)
11-4	溶酶体	(142)
11-5	内质网	(144)
11-6	高尔基复合体	(145)
11-7	微体	(145)
11-8	核蛋白体	(146)
11-9	中心粒	(147)
11-10	细胞骨架	(148)
11-10-1	微管	(148)
11-10-2	微丝	(149)
11-10-3	中等纤维	(149)
11-10-4	微樑系统	(149)
11-11	细胞质的包含物	(149)
11-11-1	脂肪	(150)
11-11-2	碳水化合物	(150)
11-11-3	蛋白质	(150)
11-12	细胞核	(150)
11-12-1	核膜	(151)
11-12-2	染色质	(152)
11-12-3	核仁	(153)
11-12-4	核液	(153)
	参考文献	(154)

图 版

第 1 章

透射电子显微镜的原理与操作

1 — 1 概 述

1-1-1 光学显微镜分辨本领的限制

在正常的情况下，人的眼睛能够辨认的最小细节约为 $0.1\sim 0.2$ 毫米，例如两个很接近的小点，当其中中心距离 $\delta > 0.1\sim 0.2$ 毫米时，肉眼能辨认出这两个点来。但当 $\delta < 0.1\sim 0.2$ 毫米时，肉眼就不能分清。肉眼能分辨清楚的最小的两点中心距离称为肉眼的分辨本领，即 $\delta = 0.1\sim 0.2$ 毫米，它表示了人的眼睛能分辨细节的能力。如果想观察更微小的细节，则必须将其放大到 $0.1\sim 0.2$ 毫米的距离。光学显微镜实际上就是一个能够把欲观察的细节放大的仪器。由于光学显微镜的放大倍数是无限制的，所以能随意增大。按理来说，无论多小的细节，只要选择一个足够大的放大倍数，使放大的像超过 $0.1\sim 0.2$ 毫米，就能为眼所观察到。可是，实际并非如此。光的波动性给光学显微镜规定了一个分辨本领的限制。我们采用最简单的光学系统来说明，图1-1表示一个理想的点光源 O ，经

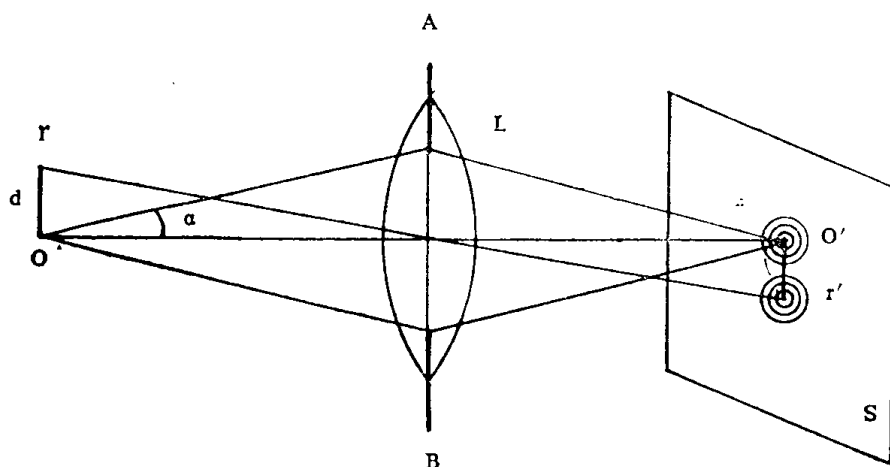


图1-1 两个点光源像的叠加

过会聚透镜 L ，在位于象平面 S 的屏上形成的像 O' 。 AB 是光栏，由于光栏限制了光束，在其边缘产生了衍射。像 O' 并不是一个点像，而是一个有一定直径的亮斑。其周围是明暗相间的衍射环包围着。这个通常称为 Airy 盘或衍射斑。入射能量的84%集中在中央亮斑，其余将依次分别地分布于一级、二级、三级……等衍射环中。其强度分布如图1-2(a)所示。

假设在 O 点之上有另一点光源 r 。同样在屏上也成像于 r' 。如果把点光源 r 向点光源 O 移动，在屏上的像 r' 也向像 O' 移动。逐渐接近以至两个衍射环互相重叠。当两个亮斑的中心距离等于第一级暗环的半径时〔如图1-2(b)〕，两个亮峰之间的光强度小于峰

值的19%，通常认为，这两个亮斑尚能分辨开。我们用 δ 表示此时两个点光源 O 和 r 的距离。当 O 和 r 距离小于 δ 时，两个点的像进一步迭加，我们就分辨不出屏上是两个点光源的像了。也就是说我们不能通过透镜放大来看清点 O 和 r 了。因此，我们把 δ 称为透镜 L 的分辨本领。光学显微镜是透镜的组合，它的分辨本领一般是决定于物镜的分辨本领。因此，光学显微镜的分辨本领可用物镜的分辨本领来表示。计算结果表明： δ 随三个变量而变化。由阿贝公式决定：

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{n\sin\alpha}$$

式中： λ ——是光波在真空中的波长

α ——孔径角的一半

n ——透镜和物体间介质的折射系数

目前技术上 $n\sin\alpha$ 最大可达1.5，则分辨本领 δ 约为：

$$\delta^* \approx 0.4\lambda$$

由此可见，光学显微镜的分辨本领受到衍射效应的限制，最终只能达到照明波长的0.4倍。

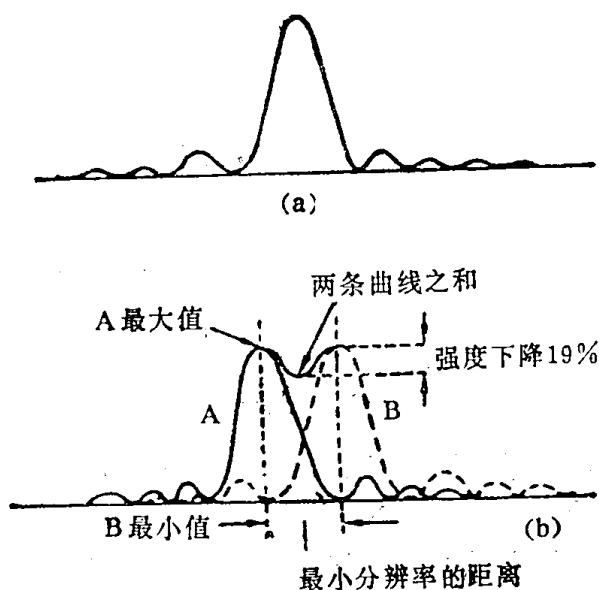


图1-2 透镜的分辨本领

1-1-2 电子显微镜的产生

为了提高显微镜的分辨本领，就需要寻找波长更短的光波作照明。开始使用紫外线，但其分辨本领只有很少的提高。X射线的波长虽可达 $1 \text{ \AA}$ ，但还未找到能使X射线产生有意义折射的物质，以至无法成像。有两个发现促进了电镜的发明：1924年德·布罗依 (De, Broglie) 等人创立了波动力学。提出了物质波的概念。指出高速运动的粒子不仅具有粒子性，而且具有波动性。这个假设不久就为电子衍射实验所证实。衍射是波动的特性，高速运动的电子能发生衍射，证明它是一种波。它具有波动所具有的共同特征量——波长、频率、振幅、相位等，并且服从于波动的规律。电子衍射实验表明，物质波的波长极短，与它的质量和速度有关：

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

式中 $h = 6.62 \times 10^{-27}$ 尔格·秒，称为普朗克常数； m 为运动电子质量； v 为电子的运动速度。

• 对于分辨本领有些书称分辨率，本书把两者定为相同意义，可以互用的。

如果电子是被一个正电压 V 所吸引而加速的，那么上式可变成：

$$\lambda = \frac{12.25}{\sqrt{V}} \text{Å} = \sqrt{150/V} \text{Å}$$

如果考虑相对论效应，则公式变为：

$$\lambda = \frac{12.25}{\sqrt{V + (1 + 0.979 \times 10^{-6})V}} \text{Å}$$

可见，物质波的波长随加速电压的增加而减少。如果 $V = 100\text{kV}$ 时， $\lambda = 0.037 \text{Å}$ ，比可见光光波短了10万倍。如果用电子波作显微镜的照明，则按阿贝公式其分辨本领可达 0.02Å 。

另一个发现是1926年布许 (H. Busch) 发表了关于运动电子在轴对称磁场中的运动轨迹的实验结果。实验表明，轴对称磁场可会聚电子束。并指出这种电子光学系统服从于几何光学定律。例如，通以直流电的螺线管所产生的轴对称磁场可以使通过它的电子束会聚，与玻璃透镜使光束会聚相似。实际上轴对称的静电场对运动电子束的作用与磁场相似。分别称为静电透镜和磁透镜。通称电磁透镜或电子透镜。

在这基础上卢斯卡 (Ruska) 等人根据电子光学与光学的相似性和光学显微镜的结构研制出世界第一台电子显微镜。直到现在透射电子显微镜与光学显微镜在结构上仍有不少相似的地方，许多名称也引自光学显微镜 (简称电镜)。其主要区别是：用电子束代替光束；用电磁透镜代替玻璃透镜。由于使用了极短的电子波，所以能获得极高的分辨本领。半个世纪以来，电镜在生物学、医学、金属和其他学科的广泛应用，给于科学发展以巨大的推动，因而使其发明者 Ruska 教授获得1986年诺贝尔物理奖。

1 — 2 磁透镜的光学性质

电镜实质上是电子透镜的组合。电子透镜是电镜的核心部件，它有二种：静电透镜和磁透镜。静电透镜虽有其优点，但强的静电透镜需要很强的静电场，往往在镜体内引起击穿和弧光放电。所以静电透镜不能做成焦距很短的强透镜，而只有强透镜才能很好地矫正球差。因此，在电镜中除在电子枪中使用静电透镜形成电子束外，一般不使用静电透镜而使用磁透镜。为此，下面简单介绍磁透镜的一些光学性质。

1-2-1 磁透镜的聚焦原理

能够产生轴对称磁场的通以直流电的线圈或永磁铁就是磁透镜。磁场作用范围比焦距小得多的轴对称磁场叫做短磁透镜。例如，短线圈产生的磁场就是这种透镜。为简单起见，只讨论短磁透镜。

在磁场中，以速度 $\vec{v}$ 运动的电子受到的作用力为：

$$\vec{F}_{\text{磁}} = -e [\vec{v} \times \vec{H}]$$

$F_{\text{磁}}$ 称为洛伦兹力， e 为电子电荷， $\vec{H}$ 为磁场强度。从上式可见，磁场作用在运动电子上的力既垂直于速度矢量 $\vec{v}$ ，也垂直于磁场强度矢量 $\vec{H}$ 。如果 $\vec{v}$ 与 $\vec{H}$ 之间的夹角为 α 时，则 $F_{\text{磁}}$ 的数值：

$$F_{\text{磁}} = e v H \sin \alpha$$

可见，磁场对运动电子的作用力的大小与运动速度和磁场强度成正比并与它们之间夹角有关。在特殊的情况下如： $v = 0$ ，则磁场对电子没有作用力。如 $\vec{v}$ 的方向与 $\vec{H}$ 重合时，即 $\alpha = 0$ ，磁场对电子也不起任何作用。当 $\vec{v}$ 与 $\vec{H}$ 之间的夹角 $\alpha = 90^\circ$ 时，磁场对电子的作用力达到极大值：

$$F_{\text{磁}} = e v H$$

由于磁场对运动电子的作用力总是垂直于电子运动方向，很明显，这个力不会改变电子运动速度的大小，只改变它运动的方向。

图1-3所示是磁透镜和它的磁力线分布。磁力线上每一点的切线方向代表了这点的磁场强度 H 的方向。 Z 为对称轴。因为是轴对称的，所以可用任一通过 Z 轴的平面来讨论。而且可以把每一点的磁场强度分为轴向分量 H_z 和径向分量 H_r 。如图1-3所示。设有运动方向平行于 Z 轴，速度为 v 的电子束，在进入磁场作用区前是作直线运动的。在进入磁场后受到磁场作用，使电子束产生两种运动——旋转和折射。旋转：由于电子束运动方向平行于 Z 轴，与轴向分量 H_z 夹角为零，故轴向分量 H_z 对电子束无作用。而径向分量 H_r 正好与 $\vec{v}$ 的夹角为 90° ， $\vec{F}_Q = -e(\vec{v} \times \vec{H}_r)$ 。 $\vec{F}_Q$ 垂直于 $\vec{v}$ 和 $\vec{H}_r$ ，即垂直于纸面作用在电子束上。如果 A 、 B 点上各有一个电子， A 、 B 是对称于 Z 轴，则 A 、 B 两点上磁场的径向分量 H_r 是方向相反，大小相等的。因而磁场作用在 A 、 B 点上电子的力是大小相等，方向相反，一个垂直向上，一个垂直向下。这样磁场作用使电子以某速度 v_Q 绕 Z 轴作圆周运动，从而使整个电子束绕 Z 轴作旋转运动。

折射：折射是因旋转而产生的。因为旋转速度 v_Q 垂直于 Z 轴，与轴向分量 H_z 夹角为 90° ，轴向分量 H_z 对电子产生了一个作用力 $\vec{F}_r = -e(\vec{v}_Q \times \vec{H}_z)$ 。这个力 $\vec{F}_r$ 垂直于

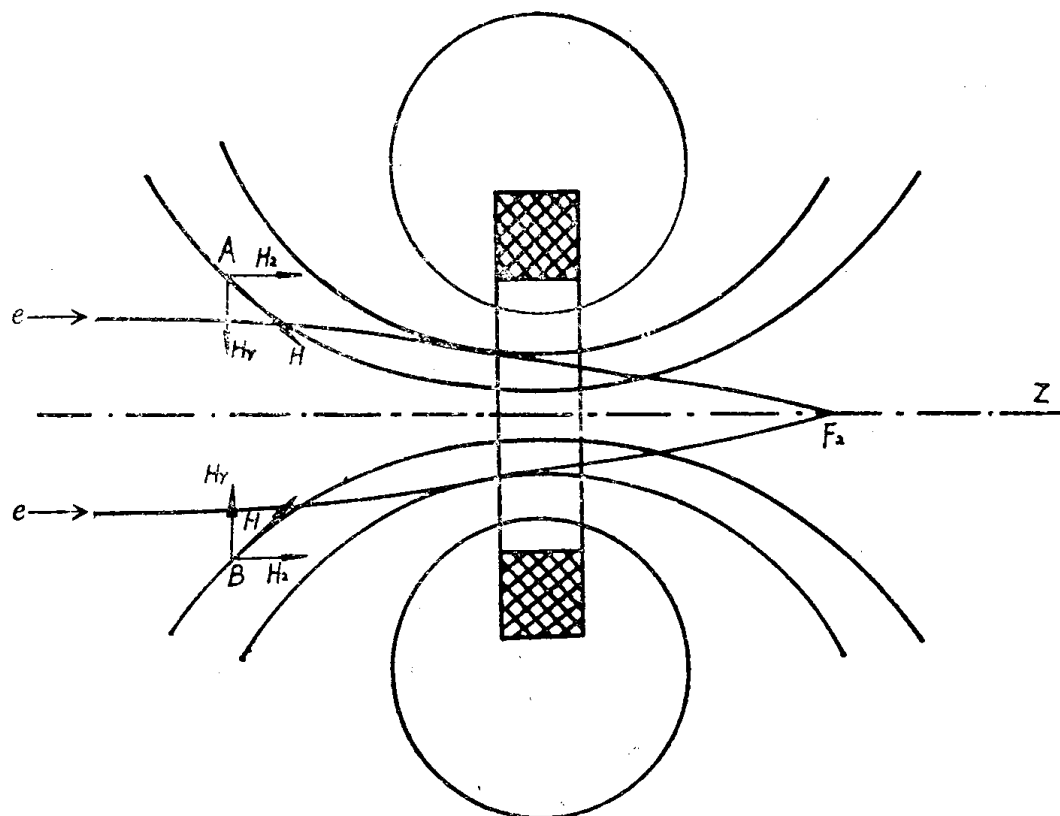


图1-3 磁透镜会聚作用示意图

$\vec{v}_0$ ，而指向 Z 轴，就是说 F_r 使电子折向 Z 轴——使电子向轴会聚。计算表明：会聚力 F_r 与电子到 Z 轴的距离 r 成正比，并且方向总是指向 Z 轴的。这样会聚力 F_r 使电子束的所有电子都与 Z 轴相交于 F_z ——焦点。实际的电子运动轨迹如图 1-4 所示。

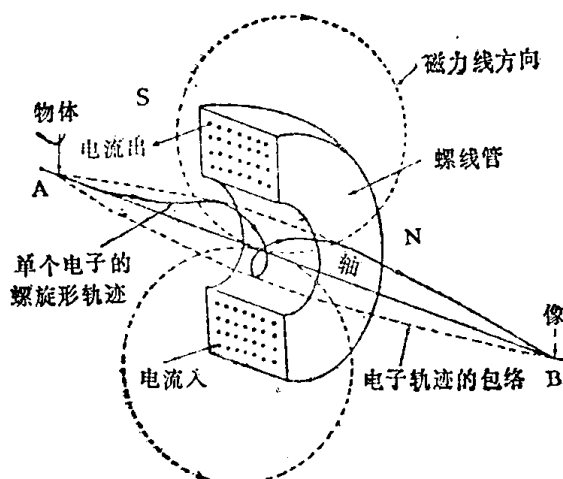


图1-4 电子通过磁透镜的轨迹

电子在磁场中的旋转与折射是各自进行的，因此，在讨论磁透镜的聚焦作用时，就可以暂不考虑电子的旋转。这样，电子在磁透镜的折射与光通过玻璃凸透镜的聚焦作用相似了。正如玻璃凸透镜可用于放大成像一样，磁透镜也能用于放大成像，而且还可以借用几何光学中的光线作图法与术语，如用焦点、焦距、物距、像距等概念来描述电子在磁透镜的运动轨迹。

在理想的情况下，电镜中的物镜、中间镜和投射镜可以利用光学中透镜成像公式：

$$\frac{1}{u} + \frac{1}{v} = \frac{1}{f}$$

和光学的简单作图法：

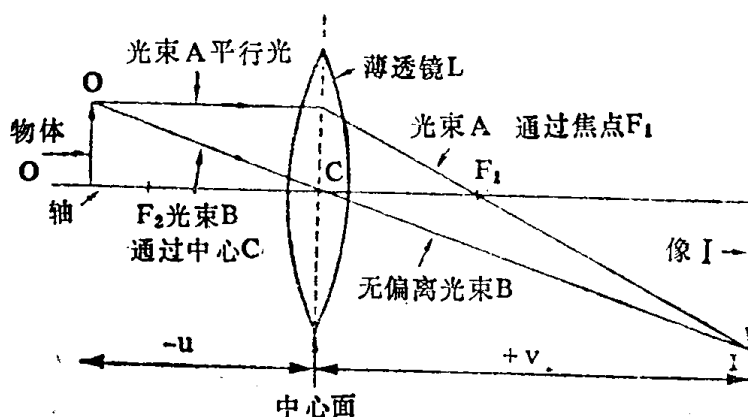


图1-5 几何光学作图法

图1-5 中 u 是物距， v 是像距， f 是焦距， F 为焦点， r 为物长， $I = Mr$ 为像长。

其中放大率 $M = v/u$

短磁透镜的焦距和旋转角公式如下：

$$f = \frac{1}{\frac{e}{8mV} \int_{\text{物}}^{\text{像}} H_z^2 dZ} = \frac{1}{\frac{0.022}{V} \int_{\text{物}}^{\text{像}} H_z^2 dZ}$$

$$\theta = \left(\frac{e}{8mV} \right)^{1/2} \int_{\text{物}}^{\text{像}} H_z dZ = \frac{0.15}{\sqrt{V}} \int_{\text{物}}^{\text{像}} H_z dZ$$

式中 e 为电子电荷； m 为电子质量； V 为电子加速电压； H_z 为透镜轴向磁场强度分量。

综合上述讨论，可得以下结论：

(1) 不论磁场方向（或线圈中电流方向）如何，磁透镜总是使电子向 Z 轴偏转，即磁透镜总是会聚透镜。

(2) 磁场的轴向分量 H_z 越大，对电子的折射越大，则焦距 f 越短，并且 $1/f$ 与 H_z 的平方成正比，所以场强（或透镜电流）稍有变化透镜焦距 f 就发生较大的变化。因此，我们可以借助于调节流过线圈的激励电流来改变场强，从而改变焦距。

(3) 电子的加速电压越高，电子的速度越快越不易折射，因此，焦距也就较长。

在电镜中，为了提高总的放大倍数，需要放大率高的短焦距的透镜，而且强透镜产生的像差也较小，可以获得较高的分辨本领，因此希望获得强透镜。单线圈的透镜在线圈外部的磁场被浪费掉，难以获得强透镜。如果用高导磁率的软铁把线圈封闭起来，就能提高磁透镜的效率，使通过同样的激励电流的磁透镜更强，焦距更短。此称包壳透镜。如果沿透镜轴再包上一层软铁壳，并加上一顶端呈锥状的圆柱形的极靴如图 1-6 所示，就能使有效磁场尽可能地接近轴，使整个外磁场都集中到透镜轴上的一个很短的距离内，磁场的高度集中使透镜极强，焦距可达 1 毫米，放大倍数可达 100~200 倍。此称极靴透镜。

图 1-7 是磁场强度在简单线圈、包壳透镜和极靴透镜的轴向分布图。从图可见，极靴透镜的强度在相同的激励电流下，大于另两种透镜。故通常电镜中都是使用极靴透镜。

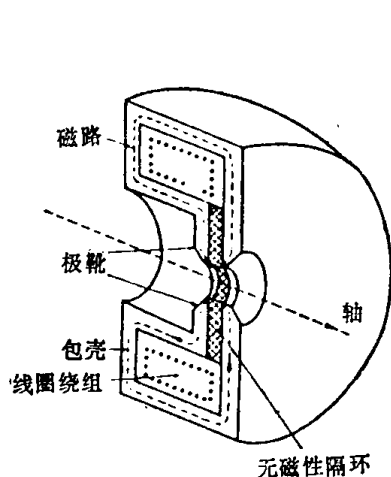


图1-6 带极靴的磁透镜的结构无磁性，隔环通常用铜制成。

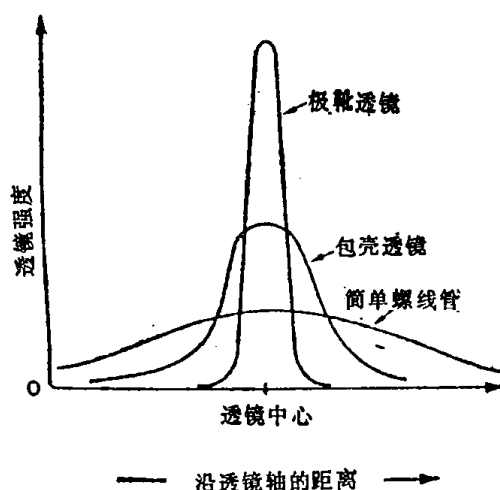


图1-7 磁场沿简单螺线管、包壳透镜和极靴透镜的轴向分布图（经过螺线管的电流都相同）

1-2-2 磁透镜的像差

上述对磁透镜的讨论只适合于近轴电子束。和玻璃透镜相似，磁透镜如果不满足于近轴的要求就会产生像差。玻璃透镜经过几百年的改进，采用把正负透镜组合起来，使透镜组的像差由于各透镜的像差相互抵消而得到消除。现在光学显微镜中，由于像差引起的分辨本领损失小于衍射引起的分辨本领损失，故分辨本领只受衍射所限制。如果磁透镜也能矫正到同样程度，则电镜的分辨本领可达到 $0.02 \text{ \AA}$ 。目前电镜所能达到的最佳分辨本领约 $2 \text{ \AA}$ ，大了100倍。这是因为磁透镜在消除像差方面受到的限制。这里只有一种折射介质——磁场，并且只有正透镜。消除像差的最有效方法是减少孔径角，但这样做又会带来衍射。目前电镜的分辨本领主要受衍射和像差的限制。磁透镜的像差可分为两类：几何像差——这是由于近轴条件不被满足而产生的。其中包括球差、畸变、像散等。另一类是色差——是由于电子光学折射介质的折射率随电子速度不同而变化所产生。

1. **球差** 球差是由于远轴电子通过透镜时，被折射的程度大于近轴电子而造成的，如图1-8所示。一束平行束通过透镜后，将不会聚在轴上某一点，而是展开在一定的轴

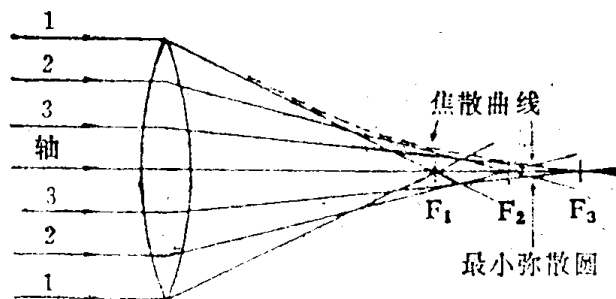


图1-8 球差的出现是因为外围射线的聚焦点比旁轴射线的聚焦点更接近于透镜

向距离上。（同样一个点光源的像也将展开在一定的轴向距离上）。成像射线的包络称为“焦散曲线”。射线将不会聚到一点，而是会聚在轴上某处成一个最小直径的圆盘，称为“最小弥散圆”或“散焦盘”。它在轴上的位置为透镜的实际焦点，它的半径为： $R = C_s \alpha^3$ ， C_s 为球差系数， α 为孔径角。

在像平面产生的球差（径向球差）为：

$$\delta_s = M C_s \alpha^3$$

由此可见，减少球差的最有效方法是缩小孔径角 α ，因为 δ_s 正比于 α 的三次方，故电镜通常使用的孔径角很小，约为 10^{-3} 弧度。孔径角太小，像的亮度太弱，而且衍射影响增大。因此，所有电镜都受球差的影响，这是电镜分辨本领进一步提高的主要障碍。

球差系数 C_s 随焦距变化而变化，焦距缩短则 C_s 迅速下降，在透镜很强时， C_s 数值很小而且接近一常数，见图1-9。因此，电镜中要求最高的物镜，为了减少球差多采用 C_s 小的强透镜。

2. **畸变** 球差引起的另一种缺陷就是“畸变”。存在球差的透镜实际上是以比中心

射线更强（或更弱）的透镜来使边缘射线成像，所以，边缘射线的像平面与中心射线的像平面不同，放大倍数也不同。于是像的放大倍数将随离轴距离增加而增加或减少。在

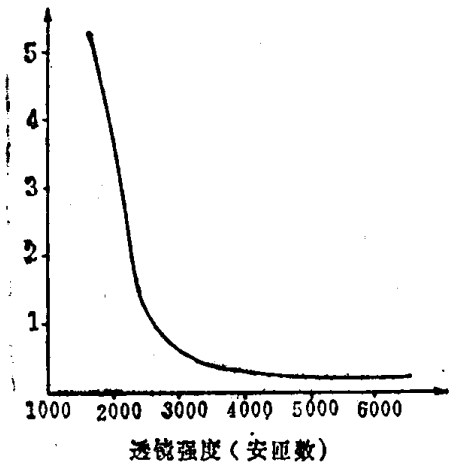


图1-9 磁透镜中C。随透镜强度的增加而减小

磁透镜中，由于场深很大，所有的像都是清晰的，于是放大倍数随离轴距离而变化。一个正方形物体的像将不是正方形，而是“枕形”或“桶形”。称为“枕形”或“桶形”畸变(c,b)，如图 1-10 所示。此外，磁透镜会使电子束旋转，由于存在球差也会使电子束旋转角度也随离轴距离而变化，这称为旋转畸变。当上述两种畸变结合起来就会产生 S 型畸变(d)，使一直线的物产生一 S 形的像。

畸变在电镜的最后的投射镜中特别重要，在低倍放大时，在中间镜也是很重要的。在低倍时获得一幅无畸变的像是电镜性能的一个重要指标。

3. 像散 在实际的磁透镜中，由于种种原因，磁场并非绝对轴对称的，多呈椭圆

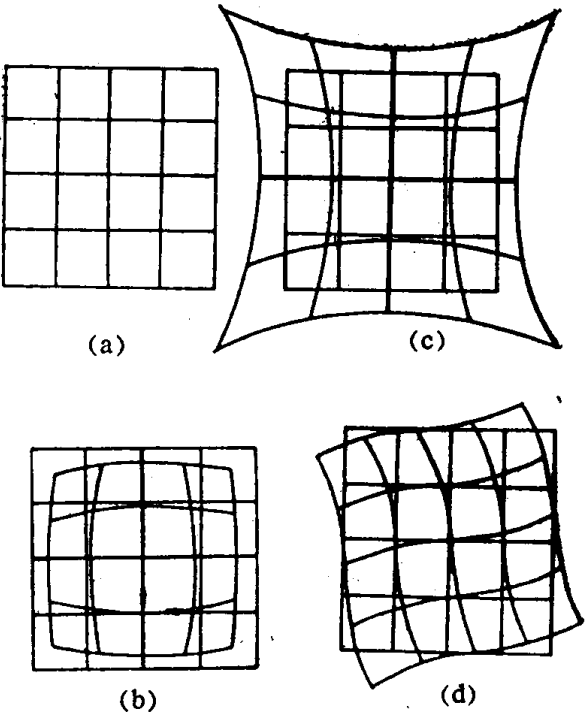


图1-10 透镜产生的畸变示意图

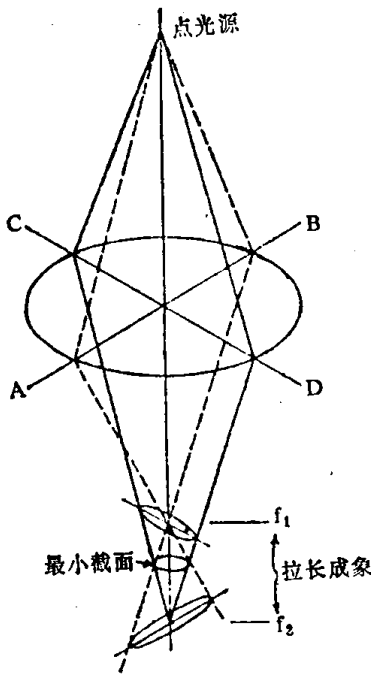


图1-11 透镜像散的示意图

的。于是就造成磁透镜的焦距在一个方向与另一个方向不同，则电子分别聚焦在两个不同的平面上。如图1-11所示。通过A B面的电子束在 f_1 聚焦，而通过C D面的电子束在 f_2 聚焦。 $f_2 > f_1$ 。在A B方向正焦时，在C D方向是欠焦。反之，在C D方向是正焦时，在A B方向是过焦的。在 f_1 和 f_2 之间成像时，在A B方向总是过焦，在C D方向总是欠焦的。就是不论如何改变聚焦情况，总得不到一个完全聚焦的像。这种现象称为像散。由于存在像散，一个点的像，在 f_1 时A B方向正焦而C D方向欠焦，像是在C D面上一条线。反之在 f_2 时C D方向正焦而A B方向过焦，像是在A B面上的一条线。在 f_1 到 f_2 成的像则是这两种极端状态的过渡状态。这是判断是否存在像散的方法之一。当像散是由于磁透镜制造过程中存在小量轴不对称产生的，称为残余像散。如果是由于光栏或极靴被非导体污染，当这些污物接受了电子而被充电后，就产生了一个静电场，它会使电子束偏转，从而使透镜产生像散，这称二次像散。像散对电镜的分辨本领影响最严重。因此，要设法清除。对于二次像散除了用清洗方法除去污物别无他法。对于残余像散，在电镜中通常用“消散器”来消除。它的原理是：在透镜的磁场中，利用消散器产生一个弱的柱面透镜（磁场），并调节它使与要校正的像散大小相等而方向相反，于是就能抵消透镜的残余像散从而达到消像散的目的。

4. 色差 对一玻璃透镜，使用不同波长（即颜色）的光波，由于各自折射系数不同，其焦距也不同。当使用多色光来成像时，由于对应于不同波长的光波焦距不同，因此，成像时总有一些光波是失焦的，使像变模糊。此称色差。磁透镜的色差也是指由于波长变化而引起的像差。在我们以前的讨论中都假设电子束中所有电子速度都是相同的，即电子波的波长是单一且恒定的，但实际情况并非这样，首先电子波的波长与加速电压有关：

$$\lambda = \frac{12.25}{\sqrt{V}} \text{ \AA}$$

电子的加速电压越高，波长越短，电子速度越高，则磁透镜对电子的作用就减少，从而使透镜的焦距越长。于是加速电压的变化会引起透镜焦距的变化，从而就产生了色差。此外，电镜激励电流的变化同样会引起焦距的变化，因此，也会产生色差。虽然这并不是由于波长变化引起的，但其效果与电压变化产生的色差相同。所以，通常把两者作为色差一起讨论。图1-12是色差产生的示意图。由于电子束中有两种速度（ V_1 及 V_2 ）的电子，分别聚焦在 F_1 及 F_2 ，于是产生色差。色差的大小通常用焦距差 $\Delta f = f_1 - f_2$ 表示。计算表明，焦距差在电压改变量为 ΔV ，电流改变量为 ΔI 时为：

$$\Delta f = C_c \left(\frac{\Delta V}{V} - \frac{2\Delta I}{I} \right)$$

式中 C_c 为色差系数。 C_c 越小在同样的电压和电流变化情况下色差越小。实验表明，越强的磁透镜色差系数较小。

为了获得高分辨本领的透镜，这就要求稳定加速电压和激励电流以减少色差。故此，电镜中对加速电压和各透镜电流的稳定度要求很高，常达 10^{-6} 的数量级。

色差产生的另一主要原因是电子与样品的交互作用。入射电子遭到样品的非弹性散射而损失能量，从而波长也发生变化而产生色差，损失的能量可高达10~20 V。样品越