

生物学基础知识丛书

扫描电子显微镜入门



马金鑫 朱国凯 编著

科学出版社

10448

扫描电子显微镜入门

马金鑫 朱国凯 编著

科学出版社

1985

Q11-10448

内 容 简 介

本书介绍了扫描电子显微镜的历史、原理，生物扫描样品的制备技术，以及扫描电子显微镜的操作技术等内容。全书文字深入浅出、通俗易懂。

本书为中级科普读物，可作为从事扫描电子显微工作者的入门读物，或作为生物学新技术的教学参考书，也可供生物学、医学有关专业的教师、学生阅读。

扫描电子显微镜入门

马金鑫 朱国凯 编著

责任编辑 高小琪

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1985年5月第 一 版 开本：787×1092/32

1985年5月第一次印刷 印张：8 插页：2

印数：0001-6,350 字数：181,000

统一书号：13031·2906

本社书号：4123·13-10

定价：1.65元

编 著 者 的 话

随着科学技术的发展，扫描电子显微镜已成为一种新的技术手段，广泛地被用来观察各种固态物质的表面超微结构形态及组成。为了普及这方面的知识，将这一新技术应用于各个研究技术部门，以便对生物学科科研工作的发展和扫描电子显微术本身的发展起一点促进作用，因此我们编写了这本小册子。

在本书的编写过程中，我们综合了国内外的一些情况，注重结合实际操作经验和研究成果，深入浅出地综述扫描电镜的一般原理、生物扫描样品的制备技术和电镜操作技术。为了使内容直观易懂，全书中我们用了300多张插图和照片。本书可作为高中以上文化水平、初搞生物扫描电子显微工作者的入门读物，也可作为生物专业新技术课的教学参考书，对生物学研究工作者在应用扫描电镜时，起一点抛砖引玉的作用。

在本书编著过程中，施履吉先生认真审阅了全稿，提出了不少宝贵意见，为此深表感谢。曹明、杨根生、彭辛午和钟文怡诸同志对本书编写也给予了大力协助，在此向他们致谢。限于作者水平，书中难免仍有不足之处，恳请读者批评指正。

1983年10月

目 录

第一章 扫描电子显微镜及其简史.....	1
第一节 迈向微观世界.....	1
第二节 显微镜的祖先.....	2
第三节 电子显微镜的产生和发展.....	4
第四节 扫描电子显微镜的曲折经历.....	7
第五节 我国扫描电子显微镜的发展简况.....	11
第二章 扫描电子显微镜的基本原理.....	20
第一节 扫描电子显微术中常用的一些基本概念.....	20
第二节 扫描电子显微镜的基本结构.....	49
第三节 二次电子怎么变成图象.....	65
第四节 其他几种扫描图象的获得.....	73
第五节 扫描电子显微镜的特点.....	86
第三章 生物样品怎样达到扫描观察的要求.....	97
第一节 取样和清洗——为“微小客人”打扮.....	99
第二节 固定——留下原貌和驱除水分.....	106
第三节 “干燥”难关怎么过.....	112
第四节 样品的粘胶和表面金属化.....	125
第五节 冷冻制样技术.....	140
第六节 非镀金处理行吗.....	144
第七节 新鲜和动态样品的扫描技术.....	154
第八节 标记和其他扫描技术.....	157
第四章 如何获得最佳扫描图象.....	159
第一节 最佳状态的主要校正工作.....	159
第二节 扫描电子显微镜的性能检查.....	165
第三节 获得好图象的操作技巧.....	175

第四节	特殊操作技术·····	190
第五节	怎样分析图象·····	201
第五章	扫描电子显微镜的选择和维护·····	213
第一节	怎样选择合适的性能指标和附件·····	213
第二节	附属设备的配备·····	217
第三节	重要的是维护设备必须制度化·····	218
第四节	常见故障的分析和排除·····	220
第六章	扫描电子显微镜在医学、生物学领域中的 一些应用·····	232
第一节	在医学方面的应用·····	233
第二节	在农林方面的应用·····	244
第三节	在微生物方面的应用·····	245
第四节	在昆虫学方面的应用·····	246



第一章 扫描电子显微镜及其简史

第一节 迈向微观世界

人类的眼睛是一件奇妙的光学仪器，它扩展了我们对周围物质世界的观感，也是我们认识世界的主要感官。然而客观世界中五花八门的景象却远远满足不了我们深入认识世界的好奇心理。例如，眺望夏晚满天的星斗，你将是多么想洞察这无边无际的宇宙奥秘呀！对于物体的碎屑，你又多么想看到它到底可以“碎”到什么程度呀！人类对于自然界的奥秘总是那么的好奇，又那么的渴望知道它、了解它、操纵它，使它更好地按我们的意志造福于人类。

随着人类科学文化的进步和技术的提高，我们已经配备了望远镜，使我们的眼界远伸到遥远的星球……。现在有的已不只是古代人们向往的“千里眼”，而是已达到了“万里眼”、“亿里眼”、“光年眼”……。人们借助于显微镜，胜过了孙悟空的“火眼金睛”，已经钻入到物质内部的微观世界中去了。我们了解了微观世界各种物体内部“五脏六腑”的数量及相互间的组合关系，同时要深入了解这些“微小百姓”容貌的“美丑”、“胖瘦”和“住处”……。人们认识的每一步深化，都伴随着实验手段和技术装备的创新及突破。近十几年来，在研究微观世界的先进设备的行列中，出现了“扫描电子显微镜”(scanning electron microscope)这一新技术装备之后，在物理学、冶金学、材料科学、半导体技术、石油地

质、化工、轻纺工业等等各种技术专业部门，在医疗、药理学、病理学、临床诊断等医学部门，特别在研究农牧副渔密切相关的动物、昆虫、植物等的工作中，甚至外贸系统、公安侦察部门都竞相使用和配备了“扫描电子显微镜”，来解决各方面提出的理论研究课题和进行大量的实际检验。它配合其他工具使我们更深入地了解各种物质微细结构的形态、大小和分布情况。

为什么扫描电子显微镜能如此广泛地引起各种专业科技人员的重视和得到应用？它到底是一种什么样的仪器呢？扫描电子显微镜顾名思义它具有“扫描”、“电子”、“显微镜”这三重意思，也就是它是显微镜家庭中的一个新成员，因此问题得从显微镜谈起。

第二节 显微镜的祖先

在显微镜发明以前，人们对客观事物的认识受到眼睛视力的局限性，观察结果往往离客观实际较远。例如，当人们还未充分认识到细菌等这类“小冤家”是致病因素，无法圆满地解释致病原因时，就很容易接受疾病是“神”和“上帝”的惩罚等唯心主义的思想。只有在显微镜发明之后，这个谜才被揭开了。

十七世纪荷兰某市政厅的管门人——列文虎克(A. V. Leeuwenhook)空闲时热衷于磨玻璃透镜，长期的实践使他成为一个很熟练而精巧的磨玻璃透镜的专家，经他磨出来的透镜，能把物体放得又大又精确，这就是放大镜。后来，他想方设法地将好几块不同的透镜组合起来，可把物体放大到150倍，当时人们把列文虎克的这种透镜称为“魔镜”。通过“魔镜”的放大，跳蚤形同满身披甲的武士俑，毛虫身上的细毛

毛还粗，最引人入胜的是蝌蚪的尾巴，列文虎克在
发现了血管及血管里行进的血球，在污水内和人的唾液
内，他又看到了各种各样的活细菌，这些致人生病的“小冤
家”第一次在人们眼前露出了它们的“庐山真面目”……。经过
200年后，人们慢慢知道了列文虎克的“魔镜”不仅仅好玩，而
且是科学家深入探索微小世界的相当有用的工具，从而设计
出了显微镜，从1800年开始有了商品供应，列文虎克也被人
们称为“显微镜之父”。

科学家们借助于显微镜，深入研究了细菌及微生物的生
活规律，弄清了它们哪些是闯祸作孽的“小冤家”，哪些是有
益于人类的“好朋友”。跳蚤身上的鼠疫菌，则是造成人们死
亡的原因，决不是什么“上苍降灾”。人们认识了它，也就研
究出了预防和制服它们的方法，增强了人们对疾病斗争的力
量，救活了千百万人的生命。有了显微镜之后，科学家发现
了细胞，并发现世界上一切有生命的东西，动物、植物和人，
都是由细胞组成的，从而细菌学、细胞学、显微形态学等新
学科都相继产生了。目前发展起来的显微外科，也都是借助
于显微镜才能产生和发展的。显微镜发展到1900年，分辨率
已经达到了极限，并且已成为各行各业观察研究细微结构和
形态的常规工具。

显微镜解决了不少疑难问题。可是还有许许多多传染
病，如天花、麻疹等却一直看不到其病源的真面目，这些传
染病难道不是病源体造成的？事实却证明确实存在着比细菌
更微小的滤过性病毒。那么是不是显微镜的放大倍数还不够
呢？科学家们经过反复设计透镜的几何形状和组合来提高放
大倍率，可是却都无济于事。这究竟是什么原因呢？

原来这是显微镜分辨本领的限度所决定的。上述显微镜
是靠光的媒介作用来成象的，因此也叫它光学显微镜(LM)，

光根据物体的形貌而产生不同的散射，经过一系列透射、反射、折射、干涉、衍射、散射、吸收、放大与会聚，使人们的眼睛产生感觉，从而出现明暗相间的各种现象。光是电磁波，与声波、水波等一样也是一种波动。从光的波动性就可以解释，为什么尽管加大显微镜的放大倍率，却仍旧无法看到应该在这倍率范围内呈现的那些“小东西”真面貌了。如图1-1，河流中间放有一块石头，水流撞

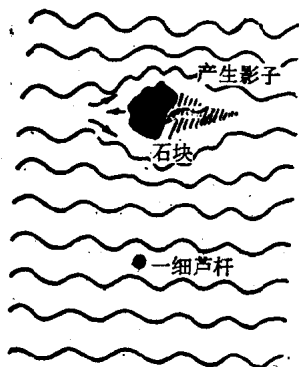


图1-1 波的反射

上石块即被反射回去，边缘处的水流则向石块的两边绕了过去，水流形成曲折，这样在石块后面的水就不起波浪，而是平的，石块对水波引起一个“影子”。如河流中插一支细芦杆，它不会反射流水，水流不发生曲折地流过，好象根本不存在这根细芦杆似的，所以不产生细杆子的“影子”。这是因为它太细了，细到直径比水波

波长的一半还细，它就不会阻碍水流而产生“影子”，也就是“看不见”。光线也是这样，只有比照明光线半波长还大的物体，才会产生反射光而被放大看到。用最好的光学显微镜，也只能看到光波长的一半。例如，可见光的波长为 $0.7-0.4$ 微米，可分辨的细节为 $0.35-0.2$ 微米（依照明光波长而定），再小则也爱莫能助，只能另请“高明”了。

第三节 电子显微镜的产生和发展

“另请高明”的关键也就是要找比光的波长短得多的照明光源才能使显微镜看到更小的物体，即显微镜的分辨率方有

提的可能。

物理学家们找到了一种比光的波长短几万倍的波——电子波，其波长大约只有0.05埃(\AA)，也就是0.000005微米。象这样渺小的电子波，即使是最细小的滤过性病毒也显得硕大无比了。两年后的1932年，在电磁理论的基础上设计出用电子波作照明光源来放大物象的电子显微镜实验装置。

第一台电子显微镜虽然只有12倍的放大倍率，相当于一块普通放大镜的能力，但是它却是电子显微镜的祖先。第二年就设计制造出能放大一万倍的电子显微镜，分辨率为500埃，比光学显微镜高四、五倍。电子显微镜的发明，是古老的光学显微镜漫长发展史中的巨大突破，立即引起了各国科学家的重视，相继进行研制和使用，目前已普遍达到放大一百万倍，可以看到1埃的超微细节和原子的图象。1埃相当于千万分之一毫米，比注射针的针尖还细十万倍，其“目光”真是名副其实的“锐利无比”，它展现在人们眼前是一个多么微小的世界呀！它帮助人们把眼光射入到自然界物质的基本结构中去，原子世界已不仅是人们推想的一个模型，而是能见其实貌了。这种崭新的“科学之眼”，能使人们看到物质深处隐藏着的“极微之美”，这是多么的诱人啊！现在，电子显微镜已经成了观察“埃的世界”的必不可少的工具，它使生物学又产生了一次飞跃。

上述的电子显微镜，基本上象一只倒置的光学显微镜，其照明源——极细的电子束通过聚焦后从上方射入超薄切片(被检样品)，并透过样品后再被电磁透镜放大，投影在荧光屏上成象，因此称它为透射电子显微镜(TEM，以下简称透射电镜)，平时所说的电子显微镜就是指的这一种。

可是人们对客观物质的认识既从其内部的结构组合上去研究，也必须同时从它外表的立体形态、大小和分布上去观

察研究，才能得到一个全面完整的认识。透射电镜对物体剖面的超薄切片进行观察时，外表形态的信息只能反映出其中的一个局部，虽用立体照象在薄片中观察其中的立体象，但一般情况是缺乏立体感，仅能显示很薄物体的立体象，较大物体的立体形态要通过大量的连续切片进行综合观察，同时加上人们抽象的归纳才能粗略地得到。如果样品形态复杂，这就很困难了。因此需要设计一种能观察较大物体外表的立体微结构形态的电子显微镜。这种电子显微镜是什么样的呢？这就是本书要说的扫描电子显微镜(SEM，以下简称“扫描电镜”)，它用于对物体外表形态的观察，它虽比透射电镜的分辨率低，但可以给出比光学显微镜高得多的分辨率和放大倍率。即使在与光学显微镜相同的倍率上，它也可以给出更丰富的细节信息，使人们看到更为逼真、更为直观的立体形貌。扫描电镜还可以直接分析物体的成分、元素的含量、活动形态等等，为人们提供出更多的信息资料。

在扫描电镜荧光屏前，当你目不转睛地看着这瑰丽无比的微小世界时，你似乎是走进了另一种的美术展览馆或风景区，这里有微小的“假山”、微小的“森林”和微小的“花朵”；有着花布店里新的美丽的花布图案，也有比现代任何一种无线电天线还复杂的“生物天线”；有着“阳朔风景甲桂林，微小风景甲阳朔”的奇景；也有比当代任何一种仪器还灵敏的生物感觉器……仿生学家在这儿大有可为，在扫描图象上，他们将会大受启发；工农业各部门也可以从扫描电镜上解决许多实际问题，并可为新的产品设计提供极丰富的资料，狡猾的罪犯留下的蛛丝马迹也难逃遁。因此扫描电镜已成了各行各业急需配备和应用的常规工具，各方面的科技人员都竞相了解、学习和掌握这一新的操作技术，并促使扫描电镜不仅在应用的广泛性上，而且在数量上、设备性能上都发展很快。

它与透射电镜一起，成为探索超微世界奥秘的姊妹，随着它们的进一步发展，使我们更易于弄清自然界中许多秘密。

第四节 扫描电子显微镜的曲折经历

十七世纪发明了显微镜之后，人类进入了微观世界的大门，许多新学科也应运而生。电子显微镜的实验和理论研究，又使科学技术跨进了亚显微世界，至今已从分子领域而开始进入原子世界，人们的眼界越来越开阔了，尤其在细菌学、病毒学等方面电子显微镜为人类作出了杰出贡献，成了向自然界作斗争的强有力的工具。显微镜技术发展史列于表 1-1。1932年，卡诺尔(M. Knoll)和拉斯卡(E. Ruska)等发表了电子显微镜理论，发明了第一台透射电镜。拉斯卡又与博雷司(J. Borries)等发展了电磁透镜，为基本电子光学结构打下了基础，创建了电子显微镜理论和实验性装置。就在1934年，马顿(Marton)发表了世界上第一张生物电子显微照片——用钼浸过的植物叶子。1935年，德赖斯特(Driest)发表了苍蝇的翅膀和腿的电子显微照片，开始了在昆虫学上的应用。在应用部门的推动下，仪器性能开始较快地得到发展。1940年，美国无线电公司的西里亚(Sileajar)在制成美国第一台透射电镜 RCA-EMB-1 型后，于1946年，第一个生产了消除轴对称偏差的消象散装置，使电镜分辨率一下提高到10埃，至今消象散装置仍是保证图象质量、获得高分辨率的必不可少的部件。在世界各国的发展中，日本的发展令人注目，1941年，东升制造的日本第一台透射电镜，是使用蜡来进行真空密封，并且使用庞大的蓄电池组作电源。正是在这套老古董电镜的基础上不断创新，到1973年，全日本已有透射电镜1000台，出口量达350台，从而发展成为世界

上电镜产量最多、品种最多的国家，势头一直保持至今。

目前，许多国家制造的透射电镜的性能都已达到能放大近百万倍和分辨率小于1.4埃。虽然不少人认为，这已经达到了技术上的极限，但是它离开理论极限分辨率还差100倍呢！近年来，美国正在研究又一种新的显微镜，其分辨率将达到比目前透射电镜高100多倍的水平，科学家们正拭目以待。

扫描电镜虽然是显微镜世家中的一位后起之秀，它可还是透射电镜的姊妹，这不论从最始提出的时间，还是从它的功能来说，都是如此。

扫描电镜的出现还有一段曲折的经历。1935年，世界上第一台定型的透射电镜产生后，法国卡诺尔就提出了扫描电镜的设计思想和工作原理，其实验是把示波器用的示波管经过改装，作为镜筒，把硅铁片样品放在中间，用光电池接收电子，并在与它同步扫描的另一显象管上得到图象。因为电子束直径达0.1—1毫米，加速电压仅4千伏，所以图象很粗糙。1938年，德国阿登纳(Von·Ardenne)研究成用有规律地机械移动相片的扫描方式，取得切片样品透射扫描图象，他使用了两个磁透镜，电子束直径为100埃。这些原始装置正是后来美国克鲁(A. V. Crewe)等发展扫描透射电镜的先驱，此后发展成扫描透射电镜(STEM)。另一方面克鲁提出设想，即在厚而不透明样品表面的顶部，装一接收器，收集样品上发射的二次电子，加以放大后去调制显象管的栅极成象。到1942年，剑桥大学的马伦(D. M. Mullar)在奥特雷(C. W. Oatley)的指导下，首次制成世界上第一台扫描电镜(严格来说，应称为扫描反射电子显微镜)的实验装置。当时电子技术还很落后，其成象分辨率为1微米，比光学显微镜还低，信号又很弱，为了达到建立一定反差的照相要求，那么照一幅扫描图象的曝光时间要长达几个小时之久，这是多

么的不方便又使人多么的心焦呀！与大家在公园内“咔嚓”一下——几十分之一秒钟就照一张照片相比，这样长的时间简直不可思议。更主要的是在这几个小时的曝光时间内，仪器的透镜电源、高压和灯丝电源等电气线路、机械部件、以及被检查的样品本身都要几个小时地保持稳定不变，油蒸气的污染又要小，才能摄到一张完整而清晰的照片，否则将在照片上有亮有暗，有聚焦清晰的、有逐步变模糊的、或有扭曲和缺手少腿的，甚至于半个身体在东、半个在西，象被用了分身术一样面目全非。就是在目前的技术水平上，达到这样高的要求也是一件很困难的事。所以这第一台扫描电镜没有引起普遍的重视，人们认为扫描电镜的发展前途不大，有的人改了行，不少人则把主要精力都致力于透射电镜的发展，而它的妹妹——扫描电镜似乎进入了“冬眠”。

但是技术上的难度并不等于原理上的错误，科学的道路本身就是不平坦的。第一台扫描电镜虽比光学显微镜还不如，但根据理论分析，扫描电镜具有高的分辨率是肯定无疑的，而且扫描电镜还有许多优越性，单是放大倍率可以很广泛地连续调节，就比光学显微镜优越得多。因此那些坚韧不拔，持之以恒的人继续不断地进行研究。1945年，法国布雷切特(C. Brachet)与美国兹沃里金(V. K. Zworykin)等提出用低噪音电子倍增器来提高接收效率，可得到100埃的分辨率。奥特雷在1948年完成了重要的基础理论研究。特别是第二次世界大战后，电子工业获得了飞跃的发展，从而加快了扫描电镜的研制步伐。相继出现了X射线分析，以及各种性能优良的电子部件。1955年英国史密斯(K. C. A. Smith)和奥特雷又改进增加了 γ 调制、定型的消象散器、微调节台、以及闪烁体-导光管-光电倍增管检测器系统，拍得了大景深的照片，为仪器的标准形式和商品化打下基础，而且特殊材料和精

密机械加工精度等逐步有了保障，“众星拱月”，扫描电镜终于在时隔三十年的“冬眠”之后，于1965年由英国剑桥大学仪器公司(Cambridge Instr·Co)生产了世界上第一台商品扫描电镜(Stereoscan)，其分辨率为500—1,000埃(Å)，比光学显微镜高，放大倍率从几十倍到一万倍，其最大的特点是它的图象已不再象透射电镜和光学显微镜那样景深很小，而是具有很大的景深(由于有大焦深)，显示出了物体的三维立体结构，也就是平常所说的有立体感。那些危害人们生命的细菌真面貌丝毫不差地、清清楚楚地被刻划了出来，它原来的立体形态直接展现于眼前，使光学显微镜大为逊色，人们不再需要象使用透射电镜那样制作成百上千的连续切片，化大量的时间去进行观察和摄片，由此立即引起了各个专业部门的兴趣和重视。自此以后，扫描电镜象雨后春笋一样，大踏步地得到提高和改进，附件也不断增多，许多国家都大力发展扫描电镜的研制工作，其中也以日本发展最快。扫描电镜的发展大致分为四大阶段：第一阶段主要是完善理论研究。在1970年左右，全世界大约有500台扫描电镜，分辨率普遍达200埃，100埃分辨率的仪器已属于高分辨率的了。第二阶段则着重于电子枪这一首当其冲的主要部件的研制，1967年博雷思发明六硼化镧电子枪，1968年，克鲁发明场致发射电子枪，为高亮度、高分辨率闯开了道路。第三阶段则是给扫描电镜增添“三头六臂”，研制了X光谱分析附件、背散射附件、透射附件、半导体附件等等，使扫描电镜可适应于各方面的使用需要。发展的第四阶段则是为扫描电镜“虎生双翼”，增加了大量的功能附件，如光栅旋转，反差增强等等。特别是ISI公司又制造出不必变更光栏，不必重新校正聚焦、象散、位移等的自动电子束系统，其束流可以从 6×10^{-12} — 10^{-6} 安培调节，并自动饱和。英国剑桥S30及非利浦PSEM505

已能对图象的双倍显示、双重显示、文字打印显示、各种图象处理等随意调节，十分灵活，那些制作不良和信号很弱的样品，也可以被修正成较高质量的图象。目前一般简易小型扫描电镜，如日立S450、日本电子JSM-25等的分辨率也具有优于60埃的高水平。实验室内研制的扫描透射电镜即将接近透射电镜的分辨率水平，利用透射扫描电镜已观察到了原子图象。

扫描电镜的使用范围很快普及到各行各业，凡是用光学显微镜的地方，凡是需要进行亚显微结构、超微结构的形态研究和成份分析的地方，都用得上扫描电镜。近几年来连它的姊妹——透射电镜也加添了反射扫描附件，以供对样品同时作外形的观察了。扫描电镜的发展有这样快的速度是很突出的，就是其他类型的精密仪器，能有如此快的发展速度也为数不多。如果说光学显微镜处于“老年”、透射电镜处于“壮年”时代的话，那么扫描电镜是刚进入“青少年”的时代。现在全世界约已有近万台扫描电镜，许多国家已在工业流水线上、海洋地质考察上、医院化验诊断上把它作为常规检验工具。扫描电镜经过了较大的曲折、停滞，经历了艰难的道路，而从1965年起得到了突飞猛进的发展，足见扫描电镜具有很强的生命力、迷人的性能特点，以及有很大的使用价值。

第五节 我国扫描电子显微镜的发展简况

我国地广人多，科技部门林立，行业众多，农业科技部门更是范围广阔，对配备和应用扫描电镜的需求量将是很大的。

我国在扫描电镜的理论研究和仪器试制工作，早在六十