

G-336
5601

电子显微镜在医学及 生物学上的应用

武忠弼 龐其方 孙紀申 編著

徐海超 审閱

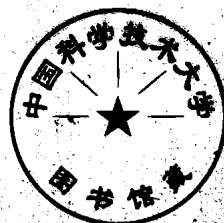
人民卫生出版社

79.844.1 040-63

电子显微镜在医学及 生物学上的应用

武忠弼 雁其方 孙纪申 编著

徐海超 审阅



人民卫生出版社

一九六一年·北京

內 容 提 要

本书对于电子显微镜的基本构造、实际操作、维护检修等作了扼要的介紹。除电子显微镜本身外，对于标本的制作，如支持膜、超薄切片和微生物标本等也作了簡明的介紹。本书还描述了細胞、病毒等的超微結構。它为电子显微镜工作提供了一些基础知識，可作为电子显微镜从业人員、医学、生物学、微生物学工作者和研究人員的参考用书。

电子显微镜在医学及生物学上的应用

开本: 787×1092/32 印張: 4 插頁: 5 字数: 86千字

武忠弼 厉其方 孙紀申 編著

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京書刊出版業營業許可證出字第〇四六號)

·北京崇文區錢子胡同三十六號·

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行·各地新华书店經售

統一書号: 14048·2506

1961年12月第1版—第1次印刷

定 价: 0.65元

印数: 1—4,500

前 言

在党的社会主义建設总路綫的光輝照耀下，随着工农业生产的大跃进，我国的科学文化事业经历了和正在繼續经历着突飞猛进的发展。由于在医学和生物学的科学研究工作中日益需用电子显微镜；这一尖端技术工具将广泛地应用到各个有关部门中，一个蓬勃发展的时期即将到来。因此，迫切需要一本有关电子显微镜在医学及生物学上应用的技术参考书。目前，鉴于这方面的书籍尚付缺如，我們在党的鼓励和支持下，本着敢想敢干的精神，本着尽其所能爭取为祖国的偉大社会主义事业贡献一分力量的愿望，进行了本书的編写工作。如果它能在我国的医学及生物学的科学研究工作中起到一些作用，我們將是十分高兴的。

我們在編写本书以前，曾为“电子显微镜在医学上的应用学习班”編写了一些简单的教材；經過一度教学实践之后，我們又进行了一些修改和增补，本书就是在这个基础上产生的。

本书的内容共包括两部分。第一部分是关于电子显微镜的簡要介紹，这里我們扼要叙述了电子显微镜的基本构造和原理，及其操纵和維護的簡單要点，主要是针对医学和生物学工作者的需要写的，沒有涉及純物理学方面的問題。第二部分是有关电子显微镜在医学及生物学上应用的基本技术和方法，这里我們着重介紹了生物組織超薄切片和电子显微镜用微生物标本的一套基本制作方法及其基本原理；也簡略地介紹了細胞及微生物超微結構的研究現况和有关的基本概念。

最后并附录若干比較常用的文献資料,提供讀者参考,补充本书的不足。

应当說明,我們对于这方面的理論知識和實踐經驗都是十分貧乏的,又是在极短的时间內赶写而成,因而书中一定会存在一些缺点。为了便于我們将来作进一步的修訂,使它能够比較完善一些,我們热誠地盼望讀者及时提出批評与指正,編者在这里謹致以衷心的謝意。

編 者 1960年3月于北京

目 录

前言

第一章 电子显微镜的基本构造和原理	1
一、概述	1
二、电子显微镜的物理学基础	3
(一) 光学显微镜的分辨限度	3
(二) 静电透镜	5
(三) 电磁透镜	8
(四) 静电透镜和电磁透镜的比较	9
(五) 电子显微镜的成象原理	10
三、电子显微镜的结构	11
四、电子显微镜的操作	15
五、维护与检修	18
(一) 真空方面	18
(二) 清洁工作	20
(三) 电子枪	21
(四) 电气系统	22
(五) 荧光屏	23
六、电子显微镜实验室的布置和人员设备	24
第二章 电子显微镜在医学及生物学上的应用	28
一、概述	28
二、医学及生物学电子显微镜标本的制备	48
(一) 有关技术	48
1. 电子显微镜标本支持膜的制作	48
2. 真空喷涂	60

3. 复型(Replica)	63
(二) 組織超薄切片的制备	66
1. 超薄切片机	67
2. 切片刀	73
3. 組織标本的制备	78
(三) 微生物标本的制备	93
1. 細菌标本制作法	93
2. 病毒标本制作法	96
(四) 其他	107
1. 工业尘烟	107
2. 血小板标本制作法	109
参考文献	110

第一章 电子显微镜的 基本构造和原理

一、概述 由于电子光学的成就，各式各样的电子仪器得到很大的发展，电子显微镜就是其中的一种。电子在电场和磁场中运动，显示出普通光线的性质。如果选择了合适的电场或磁场，电子行程的轨迹就有固定的形状。电子射束在电场或磁场的作用下，可以象普通光线通过透镜和稜镜一样发生会聚、发散、反射、折射和偏转。通过精密的工艺过程，制成电子透镜，用以装配电子显微镜。

还早在100年以前，Plücker 就曾在盖斯勒 (Geissler) 管的阴极近旁管壁上发现过一种黄绿色的光辉，但是他当时对于这一现象并无认识，因此未予重视。一直到1926年，H. Busch 才第一次提出，高速飞行的电子 (电子射线) 能受电场或磁场的影响，发生聚焦而造象。有如普通可见光线之通过玻璃透镜而聚焦造象一样，从而就打开了电子光学的大门。经过六年之后，到1932年，M. Knoll 及 E. Ruska 等人才第一次发表了他们关于电子显微镜的实验和理论研究，因此，人们通常便将这一年作为电子显微镜的诞生年。

苏联科学家对电子光学的发展有着卓越的贡献。1897年俄国就创造出电子束管，1911年 П. А. 罗柴斯基制成合乎实用的电子束管。在电子光学研究中，苏联科学院院士 Г. А. 格林别尔格、А. А. 列别捷夫的贡献都是闻名于世的。

列別捷夫院士于1931年在研究电子衍射现象时，将磁聚焦利用到电子束上，开电子聚焦利用的先鋒。苏联在卫国战争以前即开始电子显微镜的制造，在战争结束时已制成第一台电子显微镜；现在生产各种新型电子显微镜，并已广泛在研究所、高等院校及工厂使用。在矿物学、冶金学、地质学、范性材料学、生物学、医学及物理学等方面，都起了重要的作用。

自从1932年 Knoll 与 Ruska 在德国试制成功了第一台电磁式电子显微镜以后，为了获得較大的放大能力，人們又研究制造了短焦聚的电磁透镜，并且除了会聚透镜以外再利用二个透镜以作連續二次的造象。于是在1934年 Ruska 和 Marton 就都分別制成了这一新型的复式电磁式电子显微镜。这二台电子显微镜都是透射式的。Ruska 所制成的这一台复式电子显微镜，直到今天还仍然是一般电磁式电子显微镜的基本典型，虽則近代的电磁式电子显微镜在具体結構上已經作了大量的改进。

苏联制造的电子显微镜有 $\Theta M-3$ 型、 $\Psi M-100$ 型和 $\Psi M-5100$ 型等几种。都是多用电子显微镜，除利用电子透射观察标本外还有电子反射以及标本加热和冷却的设备装置。

德意志民主共和国制造的电子显微镜有著名的卡尔蔡斯 (Carl Zeiss, Jena) 厂制造的 Zeiss C 型和現在繼續制造的 Zeiss D 型。

此外，德意志民主共和国电訊器材厂 (WF) 制造的有大型 SEM I 及 SEM II 和小型的台式 KEM I。

捷克斯洛伐克社会主义共和国 Tesla 厂制造的 BS242 型台型电子显微镜型式最为小巧。

在資本主义国家方面,美国的 RCA,英国的 Philips 及西德的 Siemens 等厂所制造的使用較广,其中以 Siemens 的 Elmiskop I 的分辨率較高。此外,瑞士的 Trüb-Tauber 厂制造的 KM 4 型是比較特殊的一型,采用冷阴极、电磁式和靜电式混合的透鏡系統,利用分子泵作为高真空泵。

目前,世界上应用的电子显微鏡的絕大部分(約 95%)都是电磁式的,仅 5% 左右为靜电式的,至于混合式的則是个别的情况。

为了使讀者对电子显微鏡及其操作等有一个概括的了解,下面将就其物理基础、基本結構和原理以及操纵、維修等方面作一簡略的介紹。

二、电子显微鏡的物理学基础

(一) 光学显微鏡的分辨限度: 自从有了光学显微鏡,人类的知識大为寬广了,可用它观察許多肉眼所不能直接观察的事物,它是人类向自然进軍的有力武器。但在微觀世界中尚有成千上万的事物未被发现,或未被清楚地認識,因而对显微鏡的要求也日益增高。例如,已知的危害人类和生物的病毒是非常微小的顆粒,光学显微鏡在这样微小的事物面前就无能为力了。究其主要原因并非放大倍数問題,而实系分辨率不够,不足以分辨如此細微的顆粒。

分辨率是一架显微鏡或人眼在 25 厘米的明視距离的地方观察两个质点的影象的能力,如能分辨时,两质点的圓心距离即为其分辨率。人眼的分辨率約为 $\frac{1}{30}$ 毫米。

光学显微鏡分辨率之不能提高的主要原因乃在于光綫的衍射作用。固然光学显微鏡是受到其它一些象差(如球面差、色差等)影响的,但这些象差尙可在仪器設計时設法消除,而消除衍射作用的影响就无能为力了。

衍射作用是当一个质点成像时，不是形成一个边缘整齐
 的影象，而是边缘有明暗相间环状阴影的影象。如此就影响
 了照相的清晰度，以至分辨不清。

根据阿贝公式，可以计算分辨率。

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

d = 分辨率

λ = 光线的波长

n = 物体所在介质的折射率

α = 物与物镜所成夹角的一半(图 1)

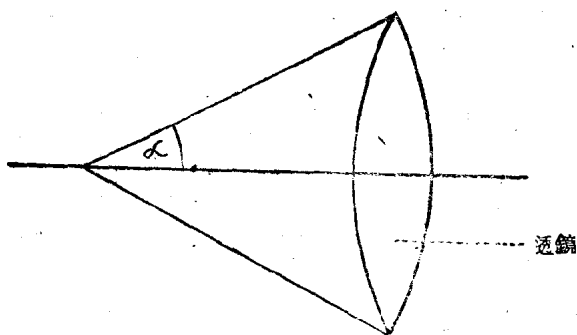


图 1 α 角示意图

$n \sin \alpha$ = 透镜的孔径数值

在下列假设情况下，可以看出普通光学显微镜分辨率的
 极限。 α 角最大值是 90° ，这时 $\sin \alpha = 1$ 。油浸镜头的 n 等
 于 1.6。设可见光波长平均为 5000 \AA ，则

$$d = \frac{0.61 \times 5000 \text{ \AA}}{1.6 \times 1} = 2000 \text{ \AA} = 2000 \times 10^{-8} \text{ 厘米}$$

d 差不多等于光波波长的半数。在使用紫外綫光源、石英透鏡时,用特殊的底片照象,分辨率 d 可达到 800 \AA , 所以增加分辨率只有一条道路,就是减短光源的波长。

(二) 靜电透鏡: 电子具有双重性質,即粒子性質与波动性質。实验中証明,电子有衍射、干涉等現象,电子的波动性質与普通光綫相同,以直綫方向傳播,与物体相遇时,可以产生衍射現象。它的波长与电子速度成反比。电子在电场作用下才获得速度;电场电压与波长的关系如下:

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

λ — 波长

V — 电场电压的伏特数值

如电压为 15 千伏,則 $\lambda = 0.1 \text{ \AA}$, 与可見光相比差几万倍。所以利用高电压产生电子束,它的波长是很短的,因而使用这样的电子源来制造显微鏡,其分辨率就可以大大提高。

二个距离很近的平行极板,电极間的电场是均匀的,若在电极間放进一个中間有圓孔的极板,它的电位和左右两边的电极一样,这样在圓孔的附近的电场就不均匀了。如图 2 所示电场的电位綫就发生弯曲(向左或向右弯曲)。这样弯曲的电位曲綫起透鏡的作用;而使电子聚焦。

图 2 表示电位沿着透鏡軸 Z 变化的情况。左图具有会集透鏡的作用,右图具有发散透鏡的作用。左图电子沿 AB 方向发射,与等位綫相遇时,电场作用力 E , 垂直于等位綫,分成二个分力 E_n 与 E_r 。 E_n 作用力使电子向近軸方向偏轉。电子射綫离軸的距离愈远, E_r 作用力愈大。因此,通过圓孔的电子射綫,平行的或从一点出发的电子射綫,都将会聚于一点。右图,电场的作用力, E_r 分力指向离开軸的方向,电子射

綫沿着离开軸的方向偏轉，这种透鏡具有发散的能力。以上即电子透鏡的会集与发散的基本原理。

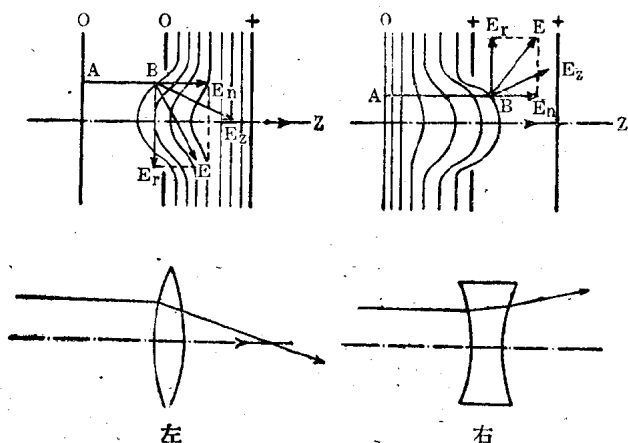


图2

用三个中間有圓孔的极板就构成了简单的靜电透鏡，叫做靜电单透鏡。外面两极板的电位相同，中間极板的电位比外边的电位或高或低。不論中間的电极是正电位或是負电位，这样的裝置都是会集透鏡。由以下两图可以較清楚地看出：左图中間电极是負的；右图中間电极是正的。按前节的分析方法，可以了解左图中間为会集透鏡；外面是二个发散透鏡。右图中間为发散透鏡，外面是二个会聚透鏡(图3)。

左图，中間电极是負的，电子通过中間电极时因为受到电极的推斥作用，速度减低，因此在中間部分電場的作用要比两端来得大。所以向軸偏轉占优势，透鏡是会集的。右图，中間电极是正的，在透鏡的两旁电子速度較小，这是因为受負极推斥的緣故。電場作用比透鏡中間部分作用大，所以向軸的偏轉最終仍超过离軸偏轉，因此也是会集透鏡。

图4表示一种新式静电透镜。这种透镜在电子显微镜中常常应用。1、2是电极，中间电极与外面电极的距离很近，为的是增加电场强度。透镜的电极是用铬镍钢制成的。一般的焦距等于3—5毫米。

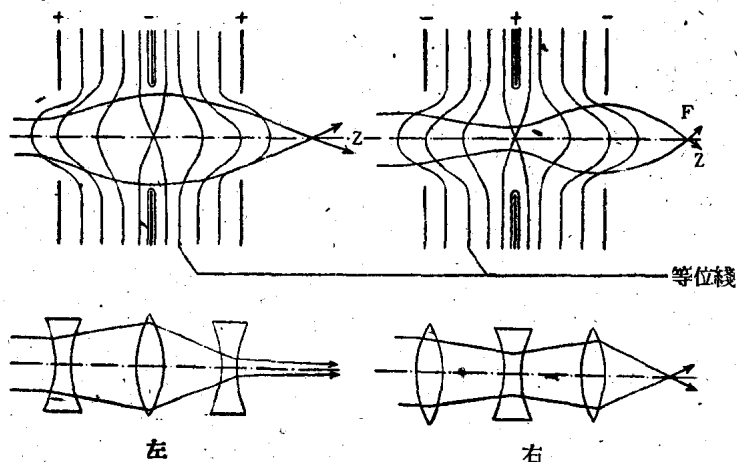


图3

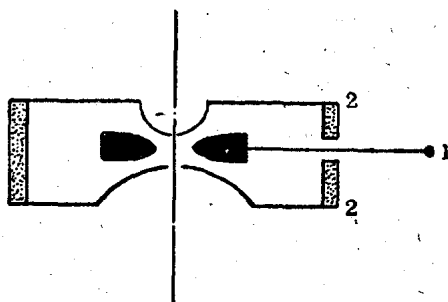


图4 静电透镜示意图
1—中间电极。2—外面电极。

(三) 电磁透镜：除了静电透镜外尚有电磁透镜，它利用电子在磁场中运动，近轴或离轴偏转，而使电子会聚或发散。

磁场对运动电子的作用和电场对运动电子的作用不同。磁场只能直接对另外一个磁场发生作用。运动的电子是带有磁场的，所以当电子进入电磁场中，两者的磁性互相拒斥或吸引，运动电子本身的磁力大小决定于它本身运动的速度。电子在均匀磁场中的运动轨迹呈螺旋形。以不同角度射入磁场中的电子，由于磁力线的相互作用，电子旋转一个周期后会聚在一点，磁场起了会聚作用。如果把均匀磁场缩短到很窄的范围内，使电子通过磁场，这样不均匀的磁场也有会聚的作用。它与静电透镜相似，聚焦作用很强，可用下图表示它的会聚作用(图5)。

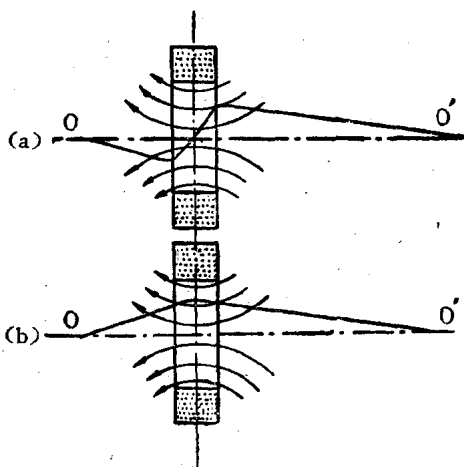


图5 电子在聚焦线圈中的运动过程示意图
(a)为上视图；(b)为侧视图。

电子从O点奔向电磁透镜线圈，由于磁场及电子本身磁场的相互作用，在磁场内旋转，而最后会聚在轴上O'点。

为了提高电磁透镜的放大率，必须使磁场集中在镜轴上的一小部分。故将电磁线圈装在具有环形狭缝的铁壳中(如图6上)，在狭缝处磁场很强。这样的电磁透镜应用在电磁式电子显微镜中。最早，此类电磁透镜的构造是由650圈漆包线绕成2毫米厚的线圈，并直接接在220伏的直流电源上，铁壳由4毫米厚铁皮制成，内径等于10厘米，缝隙的宽度等于4毫米。

如果在线圈狭缝处装上特种钢制的尖端(极靴)，则可增加磁场的强度(图6)。

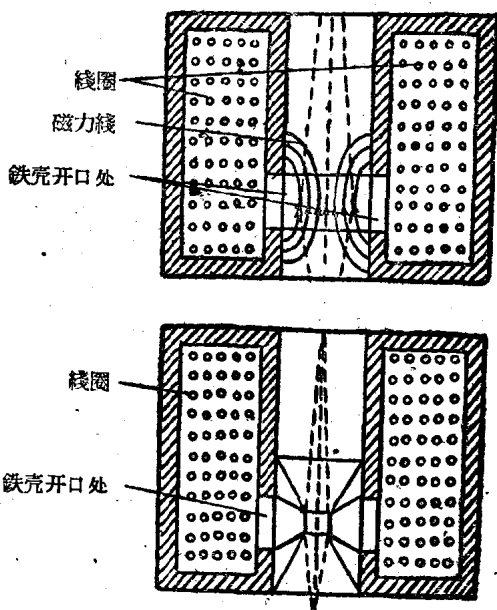


图6 电磁透镜示意图

(四) 静电透镜和电磁透镜的比较：改变电磁透镜线圈中的电流，就能很方便地改变电磁透镜的放大率。静电透镜

則必須有很大量电压的改变才能改变其放大率。靜电透鏡电极間的距离很短，容易被击穿，击碎的标本碎片容易沾污电极。电磁透鏡的綫圈供电电源的稳定度要求高。靜电透鏡的电压与电子束的电压使用同一电源，电压波动时，电子的速度改变，同时透鏡的电压也改变，两者可以互相补偿，所以对电源稳定度的要求就不太严格。靜电透鏡的色差較小，电压的稳定度約在1/1000級。靜电透鏡的球面差較大。靜电透鏡的焦点距离一般是固定的，不易改变。

(五) 电子显微镜的成象原理：下图表示光学显微镜和

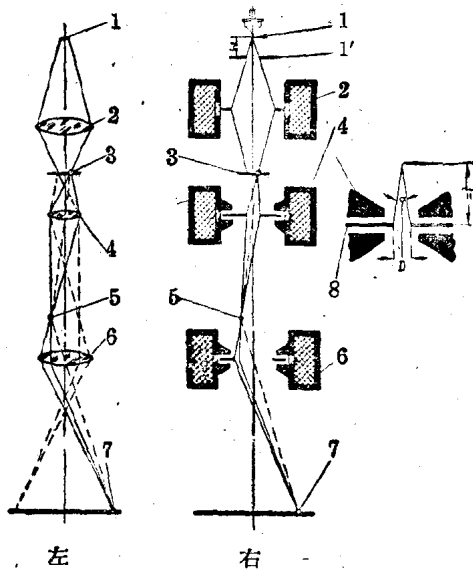


图7 光学显微镜与电子显微镜成象原理比較图

- 左图：1.光源；2.聚光器；3.标本；4.接物鏡；
5.中間象；6.目鏡；7.終象。
右图：1.电子源；1'.阳极；2.会聚透鏡；3.标本；4.接物透鏡；5.中間象；6.投射透鏡；7.終象；8.物鏡光闕。