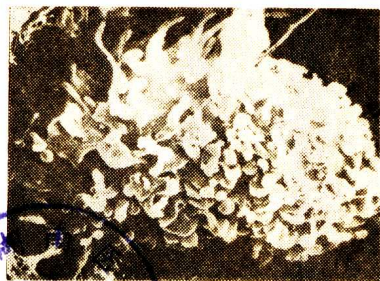


288516

医用电子镜术



空军总医院

空军总医院医学图书馆
借书资料室

医用电子显微术

马复先编

一九八三年十月

内 容 提 要

本书对医用电子显微技术、理论和临床应用作了简要介绍。全书共分十一章，分别介绍了电子显微镜的基本结构、原理和操作，制样技术，细胞的基本超微结构和功能，医用微生物的超微结构，血细胞、肿瘤和各种活检组织的超微结构特点，免疫电镜和细胞化学技术的基本原理与应用，电子探针X射线显微分析技术在医学方面应用等。

本书对临床医学实验工作者，临床医生和医学院校教学等，都有实用参考价值。

目 录

第一章 电子显微镜的结构和原理.....	1
第一节 电子显微镜的原理.....	2
一、电子束及电镜	
二、分辨率	
三、电子透镜	
四、成像原理	
第二节 电子显微镜的结构.....	11
一、镜体	
二、真空系统	
三、供电系统	
第二章 电子显微镜的操作和维护.....	21
第一节 基本操作步骤.....	21
一、真空系统操作法	
二、供电系统操作法	
三、图像调整步骤	
第二节 电子显微镜的维护.....	28
一、镜筒的清洗	
二、透镜光阑	
三、透镜极靴	
四、高压瓷瓶	
五、真空系统	
第三章 超薄切片技术.....	36

第一节 取材和固定.....	36
一、取材	
二、固定的目的和要求	
三、常用固定剂特点和配方	
四、电镜标本的固定方法	
第二节 脱水和包埋.....	51
一、脱水	
二、包埋	
第三节 切片.....	57
一、超薄切片机	
二、铜网和支持膜	
三、修块	
四、切片刀	
五、切片	
六、染色	
第四章 其它电镜样品制备技术.....	64
第一节 其它切片技术.....	64
一、半薄切片的制作及染色	
二、冰冻超薄切片	
三、临床标本的快速处理	
第二节 负染色和真空喷镀技术.....	67
一、负染色技术	
二、真空喷镀技术	
第三节 复型和冷冻蚀刻技术.....	72
一、复型技术	
二、冷冻蚀刻技术	

第五章 细胞超微结构和功能	75
第一节 细胞核的超微结构和超微病变	75
一、细胞核的大小、形状和化学组成	
二、核膜与核孔	
三、核仁的超微结构和功能	
四、染色质	
五、细胞核的超微病理变化	
第二节 细胞膜及其特化物超微结构	83
一、膜的超微结构	
二、膜的主要功能	
三、细胞外被	
四、细胞表面的分化	
五、细胞连接	
六、膜的运动	
七、细胞膜的超微病变	
第三节 细胞质超微结构	98
一、线粒体	
二、内质网	
三、高尔基复合体	
四、溶酶体	
五、中心体	
六、微管	
第六章 医用微生物的超微结构	116
第一节 病毒的结构	116
一、病毒的形态、基本结构和化学组成。	
二、常见人类致病病毒的构形	

第二节 细菌的超微结构.....	126
一、细菌的基本超微结构	
二、细菌的特殊结构	
第三节 病原性真菌超微结构.....	137
一、细胞壁	
二、细胞质膜	
三、细胞核	
四、细胞质	
第四节 其它病原微生物超微结构.....	140
一、衣原体	
二、立克次氏体	
三、支原体	
四、病原性螺旋体	
第七章 血细胞超微结构.....	145
第一节 血细胞样品的制作方法.....	145
一、骨髓穿刺液	
二、末稍血	
第二节 正常骨髓和周围血细胞的超微结构.....	147
一、原血细胞	
二、嗜中性粒细胞系统	
三、嗜酸性粒细胞系统	
四、嗜碱性粒细胞系统	
五、单核细胞系统	
六、淋巴细胞	
七、红细胞系统	
八、巨核细胞和血小板系统	

九、其它细胞	
第三节 血细胞超微变化.....	167
一、白细胞的超微变化	
二、红细胞的超微变化	
三、血小板的超微和功能变化	
第八章 肿瘤细胞的超微结构.....	178
第一节 肿瘤细胞质超微结构特点.....	178
一、细胞器超微结构特点	
二、特征性分泌颗粒超微结构特点	
第二节 瘤细胞核超微结构特点.....	182
一、核畸形	
二、核仁超微改变	
三、肿瘤细胞核的核旦白颗粒	
第三节 临床上常见肿瘤的电镜研究.....	191
一、宫颈癌	
二、乳腺癌	
三、胃肠癌	
四、食管癌	
五、肝癌	
六、肺癌	
七、鼻咽癌	
八、恶性淋巴瘤	
第九章 活检组织超微结构.....	198
第一节 肝穿活检组织超微结构.....	198
一、正常肝细胞超微结构	
二、正常胆小管超微结构	

三、正常肝血窦超微结构	
四、病毒性肝炎有关超微改变	
正、慢性肝炎和肝硬化主要超微结构改变	
六、原发性肝癌超微结构改变	
第二节 肾穿活检组织超微结构.....	211
一、正常肾小球的超微结构	
二、肾小球超微结构改变	
第三节 胃肠道粘膜活检组织超微结构.....	219
一、胃肠道粘膜上皮的超微结构	
二、胃肠道粘膜的超微改变	
第四节 其它活检组织超微结构.....	227
一、表皮组织超微结构研究	
二、肌肉活检组织超微结构研究	
三、淋巴结活检组织超微结构研究	
第十章 免疫电子显微镜和细胞化学技术基本原	
理与应用.....	230
第一节 免疫电镜技术基本原理与应用.....	230
一、抗原-抗体免疫复合物的电镜观察。	
二、免疫酶标技术及应用	
三、免疫铁蛋白技术及应用	
第二节 电子显微镜细胞化学技术的基本原	
理与应用.....	240
一、电镜细胞化学基本原理	
二、方法	
三、细胞化学的意义	
第十一章 扫描电镜和电子探针X射线显微分析技术	

的基本原理及其在医学方面应用.....	252
第一节 扫描电镜.....	252
一、扫描电镜的基本原理	
二、扫描电镜在医学方面应用	
第二节 电子探针X射线显微分析.....	262
一、基本原理	
二、在医学方面应用	

第一章 电子显微镜的结构及原理

光学显微镜虽可观察到组成细胞的基本结构，如细胞质、细胞核、细胞膜和少部份细胞器等，但只能看到它们的大致情况。这是因为光学显微镜的分辨本领受到了作为成象媒介的光线的限制，最高约为所用光线波长的一半。可见光的波长约为0.4—0.7微米，即 $4000-7000\text{Å}$ 。所以，光学显微镜的最高分辨本领约 2000Å 。与此相应的最高放大倍数是1500倍左右。使用波长稍短紫外线——紫外线显微镜，其极限约为 1000Å 。而要研究更小的微观世界，研究细胞内的超微结构，光学显微镜就无能为力了。只有寻找波长更短的射线。

1932年Knoll、RuSka、BORrieS等成功地完成了电子衍射现象等一系列电子波动性的实验，并首先试制了一台电磁式电子显微镜。1950年以后电子显微镜得到了广泛应用。其性能和结构不断地改进。到1960年制成了分辨本领约 4Å 的电子显微镜。目前电子显微镜的分辨本领已达到 $1-2\text{Å}$ ，并已广泛运用于物理学、化学、生物学，医药、卫生、冶金、矿物、地质、农业等科学领域。

五十年代，我国科学工作者设计和制造了第一台电子显微镜。此后，又设计制造了二十万倍、四十万倍的透射式电子显微镜和扫描电子显微镜。1977年，我国又成功地设计和制造了八十万倍电子显微镜，其晶格分辨率为 1.414Å 。为我国科学工作者探索和研究超微结构提供有力的武器。

第一节 电子显微镜的原理

一、电子束及电镜

二十世纪20年代，人们认识到快速运动的电子束也具有波动的性质，是一种电磁波，波长 λ 可用下式表示：

$$\lambda = h/mv = 12.26\sqrt{V} \text{ 埃}$$

式中 h ——普朗克常数， m ——电子的质量， v ——电子的速度
 V ——以伏特表示的电子束加速电压。当加速电压 v 为60千伏时，波长 $\lambda = 0.05$ 埃，比光波约短十万倍。因此，人们会自然想到，如能制造成一台用电子束来成象的电镜，分辨本领便可大大提高，世界第一台电子显微镜的诞生就是根据此原理。

为了便于理解，先对电子束作一简单的介绍。

电子束与电视机中显象管（阴极射线管）内的阴极射线性质相同。在保持高真空（约 10^{-6} 托）的玻璃管内装一由灯丝阴极、栅极、阳极组成的电子枪和一个荧光屏。当灯丝中通以热电流，钨丝阴极呈白炽热状态时，便发射出电子。在阳极加速电压作用下，电子穿过阳极小孔的荧光屏而出现一亮点。栅极上加一电压便可控制电子束流的大小，从而改变荧光屏上的亮度。

电子束的主要特性大致可归纳为下列几点：

- 1、电子束由许多电子组成。电子是一种带负电的粒子重量约为质子的 $1/1840$ 。它在电场内会受到力的作用，经过一电位差 v 后，将加速到速度 v ， x 在高真空中以直线前进。取电子速度为零处的电位为零，根据能量守恒定律可得：

$$eV = \frac{1}{2} mV^2$$

$$\text{或 } V = \sqrt{\frac{2e}{m}} V = 5.93 \times 10^5 \sqrt{V} \text{ 米/秒}$$

这里 e 为电子电荷的绝对值； V 以伏特计。

2、电子束也具有波动性，其波长 λ 可由上式 $n = h/m = 12.26\sqrt{V}$ 埃表示。

3、电子束在磁场中也会受到力的作用，服从左手定则；使拇指、食指及中指互相垂直，如以食指代表磁场方面，中指指电流方向（注意，电子带负电，其运动方向与此相反），则拇指就指示力的方向。因而，电子束在磁场作用下，象光线通过玻璃透镜一样，会改变运动方向，发生弯曲。调节螺旋线圈中电流大小，便可改变磁场的强弱，使从一点发动的电子束重新会聚（聚焦）。

4 电子束照射于标本上时，能穿过极薄的标本而得到透射电子，并产生二次电子、反射电子、吸收电子以及特征 λ 射线等。电子束照射于荧光体上时还能激发出可见光。

5、当电子束能量很大，即加速电压很高时，激发出的X射线会损害人体健康，应采取适当的防护措施。

二、分辨率

分辨率表示能够分辨两个质点的园心距离的本领，如人眼在25厘米的明视距离处能分辨两个质点的园心距离约为十分之一毫米，光学显微镜最佳分辨率约为2000 Å。

普通光学显微镜分辨率不能提高的原因，主要是由于光线有衍射作用和相差（如球面象差、色差等）的影响。

衍射作用的表现是一个质点被透镜成像时，成像为中心。

圆斑明暗相间环状阴影的衍射图。

影响普通光学显微镜分辨率的象差，在设计时可以利凹透镜（发散透镜）和凸透镜（会聚透镜）的组合以及折射表面形状来校正。但是，电子显微镜在设计时消除衍射作用的影响就不可能。

普通光学显微镜的分辨率可以根据Abbe公式计算：

$$d = \frac{0.612\lambda}{n \sin a}$$

d 为分辨率； λ 为度射光波长； n 是透镜和物体间介质的折射系数； a 为物体与物镜所成夹角（孔径角）的一半；0.612为常数。

例如：普通光学显微镜 a 的最大值是 90° ，则 $\sin a=1$ ，油浸镜头的 $n=1.4—1.6$ ，用可见光作其照明源，平均波长 $\lambda=5000\text{Å}$ 。

$$d = \frac{0.612 \times 5000\text{Å}}{1.6 \times 1} = 2000\text{Å}$$

若用紫外光作照明源，使用石英透镜并用特殊的底片照像，此显微镜的分辨率约为 800Å 。紫外光的波长为 2500Å ，因此，提高分辨率最有效方法是缩短照明光波的波长。电子束波长约为 0.05Å ，是绿光波长的 $\frac{1}{10000}$ ，用合适的电场或磁场又能使其聚焦，一台用电子束作照明源的电子显微镜分辨率比普通光学显微镜高十万倍。

电子显微镜就是以电子束作光源，利用电磁透镜成像，结合特定的机械装置和高真空技术而构成的一种精密的综合性电子光学仪器。其最大的优点是分辨率极高，而放大倍数

可达几十万倍以上。

电子是带负电的粒子，是原子的组成部份之一。它与光的粒子性和波动性相似。电子的波动称电子波。

对于低能电子束可用下式计算其波长：

$$\lambda = \frac{h}{2m_0 Ue \left(1 + \frac{Ue}{2m_0 C^2}\right)} \quad \text{或} \quad \lambda = \frac{12.26}{\sqrt{U}}$$

$\left(1 + \frac{Ue}{2m_0 C^2}\right)$ 是相对论校正因子， m_0 是电子静止时的质量， C 是光速、 U 是加速电压、 e 是电子电荷， h 是普郎克常数
现将由上述公式计算得出的电子波波长值列表如下：

加速电压与波长的关系表

加速电压 (KV)	电子波长 (Å)
1.0	0.3873
5.0	0.1732
10.0	0.1225
25.0	0.0775
50.0	0.0548
75.0	0.0447
100.0	0.0387
300.0	0.0224
500.0	0.0173
1000.0	0.0122
3000.0	0.0071

从上表可看到，电子束波长比固体中原子间距（ $2 \sim 5 \text{ \AA}$ ）还要小得多，而为可见光波波长的十万分之一，因此，电子显微镜的分辨率比最好的普通光学显微镜的分辨率高得多。

应当指出的是：如果一台电子显微镜的分辨本领为 2 \AA ，并不是说所有大于 2 \AA 的细节都能看得很清楚。这不仅和仪器本身的分辨本领有关，而且还决定于电子束照明状态、标本的性质、细节的形状和位置以及反差条件等。在许多情况下，大于 2 \AA 的细节也可能看不清楚。因此，拍摄照片上有没 2 \AA 的细节，并不一定仪器本身不能达到 2 \AA 的分辨本领。因为制造厂家一般用最理想条件来测定该仪器的分辨本领。常规操作时往往做不到。

三、电子透镜

沿一光轴呈旋转对称的电磁场，可以使从轴上一点发出的电子，重新会聚在中心轴的另一点上。对于电子说来，电磁场显示出透镜的作用，所以称为“电子透镜”，电子透镜是电子显微镜的基本部件。一般分为静电透镜及磁透镜两种。静电透镜的像差大。现代电镜中除电子枪外应用得很少，因此，在这里就不叙述了。

对于载流导体或在运动电荷的周围空间会产生一种具有磁力作用的磁场，磁场只能直接对另外一个磁场发生作用，因为运动的电子是带有磁场的，因此磁场对载流导体或运动电荷有力的作用。在磁场中运动着的电子是受磁场力的作用力，根据洛仑兹力作用原理：

$$F = eV_0 B \sin(\theta)$$

e 是电子电荷， V_0 电子运动速度， B 是磁场强度， $\sin(\theta)$ 是电子运动方向与磁场方向夹角的正弦。

BuSCh用数学方法证明了轴对称弯曲磁场对电子束有聚焦作用，可以得到正确的电子光学像。我们称这类具有轴对称弯曲磁场装置构成的电子透镜为电磁透镜

磁场范围比焦距小得多的轴对称磁场称为短磁透镜。短磁透镜焦距与电子加速电压成正比，与透镜磁场强度平方成反比。透镜磁场强度愈强，放大倍就愈大。

短磁透镜磁场强度与透镜激磁线圈的安匝数（ NI ）成正比。一般线圈的匝数 N 是固定的，因此，透镜激磁电流愈大、焦距愈短，透镜放大倍率就愈大。为了要得到高放大率的像，必需使磁场集中在镜轴上的一小部份，因此，必须利用由铁壳式高导磁材料组成的短磁透镜，在这种透镜中，磁场强度很大，范围很窄，因而能得到很短的焦距。铁壳透镜环形间隙两侧装上由高导磁材料（如纯铁或铁钴合金）制成的极靴，就能在不增加线圈激磁电流的情况下，使透镜磁场更集中，强度更高，这种短透镜通常焦距等于极靴间隙宽度。为了减少透镜的固有像散，要注意透镜磁场轴对称，特别是物镜极靴。透镜安匝数一定，极靴内孔愈小，上下极靴间隙愈小，透镜放大率就愈大。短磁透镜只要改变透镜线圈的电流，就能相应地改变透镜焦距，并且可以连续改变放大倍率。

与光学透镜相似，电磁透镜也有各种像差。一类是由于透镜在几何上的缺陷不能把所有的入射光都聚向共同的焦点，这就引起像差、球差、像散、像畸变等；另一类则是因为光束或电子束都不是由单一波长的射线组成，由于波长的