

实用电子显微镜技术

主 编 邵淑娟 杨佩满 许广沅 郝立宏

吉林人民出版社

本书由大连市政府资助出版

**The published book is sponsored by the
Dalian Municipal Government**

编 委 会

主编 邵淑娟 杨佩满 许广沅 郝立宏

编者（以姓氏笔画为序）

丁艳芳
车启芬
吕广艳
宋 阳
胡 军

于丽君
许广沅
杨佩满
金 伟
赵瑾瑶

马海英
刘 渤
邵淑娟
郝立宏
宫琳琳

前 言

电子显微镜技术作为研究微观世界的工具，其应用日益广泛，在生命科学领域为医学、生物学研究开拓了崭新的视野。尤其在医学领域，在病毒学、细胞生物学、组织学、病理学、分子生物学及分子病理学上均作出了卓有成效的贡献。近年来，电镜在临床医学的实际应用中，对疾病的病情、病因的鉴定，对肿瘤、肾病、血液病等的分型诊断中都起着重要作用。目前，广大的医学生、科研人员、医务工作者都迫切需要这方面的知识。因此，我们结合多年的工作积累，编写了本书。

本书共 8 章，主要包括 4 部分：第一部分介绍透射电子显微镜和扫描电子显微镜的结构原理以及操作要领；第二部分介绍透射电子显微镜样品制备、超薄切片、负染色，并简介扫描电子显微镜样品制备方法、冷冻复型、冷冻割断、铸型技术以及细胞化学电镜技术、免疫电子显微技术；第三部分介绍体视学在电镜图像中的应用；第四部分为正常和病理细胞超微结构，肿瘤的超微病理。另有附录列出了常见组织细胞、病毒的超微结构大小。书中有 40 多幅电子显微图片。本书是一本电镜技术的实用性手册，既可作为高年级本科生和研究生科研参考书，也适合从事电子显微技术研究的科研人员参考。

本书的编写凝集了大连医科大学电镜技术的奠基人许广沅教授的许多心血，许广沅教授、杨佩满教授对本书的编写和审定均给予

了全面的指导，对此我们深表谢意。

本书得到了大连市人民政府和大连医科大学的资助出版，同时也得到了吉林人民出版社的大力支持与帮助，在此一并表示衷心的感谢。

由于编写水平有限，特别是对一些新型电镜及某些特殊制样技术缺乏实践机会，书中难免有疏漏与错误，恳请读者批评指正，以不断完善本书。

邵淑娟

2007 年 10 月

目 录

前 言.....	(1)
绪 论.....	(1)
一、发展简史.....	(2)
二、电镜种类.....	(4)
三、电镜应用.....	(5)
第一章 透射电子显微镜.....	(9)
一、透射电镜的基本原理及其结构.....	(9)
(一)分辨本领.....	(9)
(二)放大倍率.....	(10)
(三)电子枪.....	(12)
(四)电子束的特性.....	(13)
(五)透射电镜的结构.....	(14)
二、透射电镜与光镜在性能和操作方面的若干差别.....	(16)
(一)合轴对中.....	(16)
(二)放大倍率和聚焦.....	(17)
(三)反差和成像.....	(17)
(四)场深(景深)与焦深.....	(18)

2 实用电子显微镜技术

(五) 像差·····	(19)
(六) 仪器对样品的影响·····	(24)
(七) 摄片与光学放大·····	(25)
(八) 产生射线·····	(25)
(九) 电镜的局限性·····	(25)
三、观察透射电镜图像和照片应注意的几个问题·····	(26)
(一) 了解样品制备的条件·····	(26)
(二) 放大倍率的判断和选择·····	(26)
(三) 人工损伤的识别·····	(27)
(四) 反差的调节·····	(28)
(五) 正聚焦的判断·····	(29)
(六) 图像资料的后期处理·····	(30)
 第二章 其他类型电镜简介·····	(31)
一、扫描电子显微镜·····	(31)
二、高压及超高压电镜·····	(34)
三、专用分析电镜·····	(35)
四、扫描透射电镜·····	(37)
 第三章 透射电子显微镜生物样品制备技术·····	(39)
一、超薄切片技术·····	(39)
(一) 超薄切片和石蜡切片制备方法比较·····	(41)
(二) 超薄切片制备程序·····	(42)
二、负染色技术·····	(57)
三、半薄切片染色·····	(59)
(一) 半薄切片染色程序·····	(59)
(二) 半薄切片染液配制·····	(59)
四、石蜡包埋组织块转制透射电镜样品制备程序·····	(60)

五、血液有形成分透射电镜样品制备程序·····	(60)
六、游离细胞透射电镜样品制备程序·····	(61)
七、冷冻复型技术·····	(61)
八、电镜细胞化学技术·····	(64)
(一)一般原理·····	(65)
(二)制样的基本要求·····	(65)
(三)制样程序·····	(66)
(四)方法对照·····	(69)
九、电子显微镜放射自显影术·····	(69)
(一)基本原理·····	(70)
(二)放射自显影样品制备·····	(70)
十、免疫电子显微镜技术·····	(72)
(一)非标记直接观察法·····	(73)
(二)标记抗体法·····	(74)
(三)对照实验·····	(77)
 第四章 扫描电子显微镜样品制备技术·····	 (79)
一、常规扫描电子显微镜样品制备技术·····	(79)
(一)取材·····	(80)
(二)样品的清洗·····	(80)
(三)样品的固定·····	(81)
(四)样品的脱水·····	(82)
(五)样品的干燥处理·····	(82)
(六)样品导电处理·····	(85)
二、常规扫描电子显微镜样品制备程序·····	(89)
三、扫描电镜游离细胞样品的制备程序·····	(90)
四、冷冻断裂技术·····	(90)
五、铸型技术·····	(92)

第五章 体视学在电镜图像中的应用	(94)
一、体视学测量的基本程序	(95)
二、测量方法	(95)
三、取样方法	(97)
四、测量板的选择	(97)
五、放大倍率的选择	(98)
六、细胞体密度特征参数的测算	(98)
七、细胞器数密度的计量	(101)
八、表面积密度的计量	(102)
九、表面积与体积之比的计量	(103)
十、粒子的形状	(103)
十一、每测量点的面积值计算	(104)
十二、单位体积内某种成分长度的测量	(104)
十三、测量误差	(105)
 第六章 细胞的基本结构	 (107)
一、细胞膜	(107)
(一)细胞膜的结构和化学组成	(107)
(二)细胞膜的主要功能	(108)
(三)细胞膜表面和膜的特化结构	(108)
二、细胞质	(113)
(一)内膜系统	(113)
(二)细胞骨架	(116)
(三)中心体	(117)
(四)包涵物	(117)
三、细胞核	(118)

第七章 细胞超微结构的病理改变	(127)
一、细胞核的改变.....	(127)
二、线粒体的改变.....	(130)
三、内质网的改变.....	(131)
四、高尔基复合体的改变.....	(132)
五、溶酶体.....	(133)
六、微体.....	(134)
七、微丝与微管.....	(135)
八、胞质内包涵物.....	(135)
 第八章 肿瘤细胞超微结构的病理改变	(144)
一、肿瘤电镜诊断中应注意的问题.....	(144)
二、肿瘤细胞电镜结构的一般表现.....	(145)
三、肿瘤细胞表面结构及其细胞间相邻关系.....	(147)
四、肿瘤细胞胞质的一般超微结构.....	(148)
五、肿瘤细胞核的一般超微结构.....	(150)
六、肿瘤细胞外基质的一般超微结构.....	(152)
 附 录	(154)
一、常用测量单位.....	(154)
二、细胞和分子的大小与光镜和电镜的分辨极限.....	(154)
三、常见组织细胞超微结构的大小.....	(155)
四、常见病毒大小.....	(157)
五、英汉电镜常用术语对照.....	(158)

绪 论

电子显微镜是根据电子光学原理,用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜,使物质的细微结构在非常高的倍数下成像的仪器。

从本质上讲,电镜是一种“协助视仪器”。

人类认识自然界大部分信息来自眼睛,用眼睛在宏观水平上研究观察世界。但是,正常人眼在 25cm 明视距离时,只能分辨相距 0.1mm 的物体,也就是说,小于 0.1mm 的两个质点,人眼分辨不清。为了能够看到物质结构更小的细节,科学家发明了各种助视仪器,不断提高人眼的分辨率,比如,放大镜、望远镜、显微镜等。

显微镜的发明,使人类对微观世界的认识前进了一大步。1665 年 Rorert Hooke 发明了第一台光学显微镜。经过 300 年的不断发展,光学显微镜已经制造出许多种类,如紫外显微镜、红外显微镜、相差显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜及暗视野显微镜等。借助这些显微镜,人眼看到了细胞、细菌,随着对这些领域的研究,出现了细胞学、微生物学、遗传学、血液学、病理学等重要学科。

这些光学显微镜所用的光源基本上是在可见光范围内,它们已经能够分辨大于 $0.2\mu\text{m}$ 的物体的细节,优于人眼 500 倍,放大倍率最高能达到 2 000 倍。但是,小于 $0.2\mu\text{m}$ 的细小结构就分不清了。

随着科学的进步,人类对微观世界探索的深入,人们必然要寻求更高分辨率和放大倍率的仪器,由此诞生了电子显微镜。

电子显微镜发明以来,其应用对自然科学,特别是对生命科学的发展起着极其重大的推动作用。可以说,在生命科学领域中,没有一个学科不需要电子显微镜的配合。例如,在 20 世纪 60 年代前后出现的细胞生物学、分子生物学、分子遗传学、分子病理学、分子药理学、病毒学和电子显微镜诊断学等新兴科学,都是以电子显微镜技术为基础和前提而发展起来的。电子显微镜的出现,使人们能在原子的尺度上观察研究物质的结构,人们的观察由宏观世界进入到了原子级的微观世界。

一、发展简史

我们想进行微观世界的探索、研究,必然要寻求高的分辨率及放大倍率的仪器,而光学显微镜的最高放大倍率为 2 000 倍,其分辨率在理论上不能小于 $0.2\mu\text{m}$ 。这是由于受到光波波长的局限,因为可见光的波长不能小于 $4\,000\text{\AA}$ 。为此,促使人们去寻找更短波长的照明物质。

1873 年 Abbe 和 Helmholtz 分别提出分辨本领与照射光的波长成反比的理论。这一物理发现奠定了电子显微镜的理论基础。

1924 年 Louis de Broglie (1929 年诺贝尔物理奖得主) 提出电子本身具有波动的物理特性。根据波动学说,运动着的电子可以看作是一种电子波,电子运动的速度越高,电子波的波长越短。如受 100KV 高压加速的电子,其波长为 $0.0375\text{\AA}$; 受 200KV 高压加速的电子,其波长仅为 $0.025\text{\AA}$ 。即波长与加速电压成反比。

为解决放大倍率问题,科学家进行了一系列工作。

1926 年德国物理学家 H.Busch 发现电子可以像经过玻璃透镜偏折一般,由电磁场的改变而偏折。证实了轴对称分布的电磁场具有能使电子束偏转、聚焦的作用,与光线通过玻璃透镜时能够折射、聚焦的原理一致,即具有轴对称的磁场对电子束来说起着透镜作用。

从而找到了相当于光学显微镜中的透镜——电子透镜。电子束代替可见光，电子透镜代替光学透镜，这就是具有高分辨率的电子显微镜产生的基础。

1931 年 Knoll 和 E.Ruska 用冷阴极放电电子源和三个电子透镜改装了一台高压示波器，获得了放大十几倍的图像，证实了电子显微镜放大成像的可能性。1932 年，经过 Ruska 的改进，制成世界第一台电子显微镜。加速电压为 70KV，分辨能力达到了 50nm，放大倍率 12 倍。成功得到了用电子束拍摄的铜网像。尽管当时的放大倍率仅有 12 倍，但它有力地证明了使用电子束和电磁透镜可以形成与光镜影像相似的电子影像，为以后电镜的发展和应用奠定了基础。

1933 年 E.Ruska 用电镜获得了金铂和纤维的 1 万倍的放大倍率的像。至此电镜的放大倍率已经超过了光镜，但是这时其分辨率刚刚达到光镜水平。1937 年，柏林大学 Klaus 和 Mill 延续了 E.Ruska 的工作，拍出了第一张细菌和胶体的照片，获得了 25nm 的分辨率，从而使电镜完成了超越光镜性能的功绩。

1937 年应西门子公司邀请，Ruska 建立了超显微镜学实验室。1939 年德国西门子公司制造出分辨本领达到 $30 \text{ \AA}$ 的世界上最早的实用电子显微镜，并投入批量生产。世界第一批商品化透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM $d=10\text{nm}$, $M=10$ 万）被誉为“本世纪最重要的发现之一”而荣获 1986 年诺贝尔物理奖。

除 Knoll 和 E.Ruska 以外，同时其他一些实验室和公司也在研制电镜。如荷兰的飞利浦（Philip）公司，美国的无限公司（RCA），日本的日立公司等。1944 年 Philip 公司设计了 150KV 的透射电镜，并首次引入中间镜。1947 年法国设计出 400KV 的高压电镜。20 世纪 60 年代初，法国制造出 1 500KV 的超高压电镜。1970 年法国、日本又分别制成了 3 000KV 的超高压电镜。进入 60 年代以来，随着电子技术的发展，特别是计算机科学的发展，透射电镜的性能和自动化程度有了很大提高。现代透射电镜（如日立公司的 H-900 型）

的晶格分辨率最高已达 0.1nm, 放大倍率达 150 万倍。

扫描电镜作为商品出现较晚。早在 1935 年, Knoll 在设计 TEM 的同时就提出了扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)的原理及设计思想。1940 年英国剑桥大学首次试制成功 SEM。但由于分辨率很差, 照相时间过长, 因此没有立即进入实用阶段。至 1965 年英国剑桥科学仪器有限公司开始生产商品 SEM。80 年代后 SEM 的制造技术和成像性能提高很快, 目前高分辨型 SEM(如日立公司的 S-500 型)使用冷场发射电子枪, 分辨率已达 0.6nm, 放大倍率达 80 万倍。

我国从 20 世纪 50 年代初开始研制 TEM, 1959 年我国研制成功第一台 TEM, 分辨率为 3nm, 诞生于上海新跃仪表厂。以后中型 TEM 开始批量生产。1977 年上海建成高分辨率 TEM($d=0.3\text{nm}$, $M=80$ 万)的大型电子显微镜。SEM 也于 70 年代开始生产。

目前世界生产电子显微镜的总数已达数万台。经过不断改进, 电镜分辨本领已越来越强, 最高达到 1.4Å , 放大倍率超过 300 万倍。这意味着人眼观察研究物体细节的本领比光学显微镜提高 1 000 倍。在电子显微镜下不但可以看到细胞的细胞器、病毒, 甚至可以看到核酸和蛋白质等生物大分子, 以及组成物体的基本单位——分子和原子。

电镜应用技术也在发展, 在常规超薄切片技术的基础上, 又出现了冷冻复型、电镜组化、电镜放射自显影等新技术。由于电镜的出现, 电镜性能的改进, 应用技术的发展, 推动了医学生物学的发展。目前电镜已不仅是形态学探索微观世界的有力工具, 并已日益成为其他兄弟学科的一种研究手段。

二、电镜种类

电子显微镜主要分为透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、超

高压电镜 (ultrahigh-voltage electron microscope, UVEM)、分析电镜等 (analytic electron microscope, AEM) 等。TEM 主要观察组织细胞内部的微细结构, SEM 主要用于观察物体、组织器官等表面的形貌。20 世纪 70 年代以来, 电镜的发展主要表现在: ① 不断提高分辨率, 以求观察更精细的物质结构, 微小的实体以至单个原子; 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, 由此发展出环境电镜; ③ 研制能对样品包括形态、结构、化学成分等进行综合分析的设备——附件, 即分析电镜。特别是 20 世纪 90 年代之后的电镜, 已经不仅用于形态结构分析, 而是结合了各种元素分析、离子定位、元素浓度定量分析等附件。在生物医学研究中, 功能变化与超微结构形态变化的统一研究, 即功能—形态的实时研究, 一直是困惑生物界的难题。因为许多生物体的功能变化多为生物体内元素、离子的浓度变化与位点变化所引起, 要了解其功能变化, 就必须知道与功能变化有关的元素、离子的浓度及位点变化。目前, 惟有结合了各种定位、定量分析附件的电镜 (分析电镜) 才能完成这种独特的研究。

电子显微镜术目前已发展成为电子显微镜科学。这门科学主要包括三大方面的内容:

1. 各种电镜的设计与制造
2. 电镜样品制备以及相关的各种设备
3. 电镜图像的分析和处理

三、电镜应用

电子显微镜术广泛应用于医学生物学、材料学及地质学等领域。在此, 我们简要叙述电子显微镜在医学生物学领域的应用。

目前可以把医学超微结构的研究工作分为三类。一是涉及医学前沿的工作, 如生物大分子高分辨成像、蛋白质分子三维重构及 DNA

复制过程的观察等,其样品制备技术、电镜使用技术、图像处理及阐释等均处于领先地位,也是新兴研究领域“纳米生物学”的重要组成部分。二是普通超微结构观察研究,使用常规技术对未知的或处于资料积累阶段的结构进行观察,以期得到规律性、特征性的研究结果;目前大多数超微结构观察工作均属于这一类。三是将已形成共识的亚细胞特异形态直接用于临床诊断,即所谓“诊断电镜”(diagnostic electron microscopy)或称超微结构病理学(ultra-structural pathology),如肾小球肾病的鉴别诊断、病毒病因诊断及肿瘤诊断等。

1. 生物学

病毒 电镜发明前,人类所能见到的最小物体是细菌。病毒的微细结构无从知晓。现在许多病毒,尤其是肿瘤病毒就是用电镜发现的。病毒性疾病的诊断离不开电镜,电镜是确定各种病毒形态结构最有用的工具。传统的超薄切片可供观察感染细胞内病毒的大小、形态、排列及其复制组装、成熟的过程以及某些有包膜病毒的芽生的成熟的部位和病毒包涵体的形态特征。依据电镜下病毒形态结构特征,包括衣壳的对称性、壳微粒数和排列方式、核衣壳在细胞内复制组装的部位、病毒的形态和大小以及螺旋对称核衣壳的直径等,再结合病毒的核酸和蛋白分子生物学特性,可以对致病病毒进行鉴定和分类。如肆虐全球的 SARS 病毒就是首先在电镜下观察到,并确认是病毒而不是支原体。

细胞学 由于超薄切片技术的出现和发展,人类利用电镜对细胞进行了深入的研究,观察到了过去无法看清的细胞超微结构。如,用电镜观察到了生物膜的三层结构以及细胞内各种细胞器的形态学结构等。

采用超低温快速冷冻固定技术,红外探测与计算机控制的毫秒级实时处理技术,并用 TEM、STEM 及电子探针 X-射线能谱微区分析技术,获得生物组织、细胞功能变化时的超微结构形态变化,离子浓度及位点变化,能在生理、病理条件下,生物组织瞬时功能

变化（毫秒级）的同时，获得实时的超微结构形态像，使功能与形态学研究能在毫秒级的水平上同步进行。

2. 病理学

应用电子显微镜使我们看到了生物细胞的超微结构，包括细胞膜、细胞器、细胞核，进而发展成亚细胞病理学。对于细胞超微结构的病理学研究包括实验病理和临床病理的研究。综合运用电镜技术、电镜细胞化学、免疫电镜技术等观察细胞在病理状态下其形态结构变化，细胞器的改变，酶在细胞内分布以及基因产物的表达与定位等，由此可确定在病理状态下，细胞超微结构的特异性变化，对临床疾病诊断特别是一些疑难疾病的诊断提供有力证据。

20 世纪 60 年代以前，电镜在病理学中主要用于实验病理学。60 年代初期人们开始将电镜应用于人体病理标本检验，通过对这些人体病理标本的超微结构分析，人们进一步了解了疾病的病理变化及其发生机制，同时也认识到电镜作为一个新的诊断工具可直接为临床服务，为某些疾病的诊断提供重要的形态依据。20 世纪六七十年代是国际上诊断电镜发展的黄金时代，许多疾病通过电镜检查而确诊，越来越多的病理学家认识到了电镜的诊断价值，电镜逐渐成为病理诊断的一个基本工具，特别是在肾活检诊断、疑难肿瘤的病理诊断、感染性疾病等诊断中的重要作用已达成共识。

电镜在病理学中的广泛使用，一方面不断完善和丰富了病理学的内容，另一方面也为疾病的诊断提供了更可靠的依据。

3. 临床诊断与鉴别诊断

电镜可用于多种疾病亚细胞结构病变的观察和诊断，以及一些疑难肿瘤的组织来源和细胞属性判定。电镜技术与临床各科均有密切的关系，临床科室可利用电镜进行病理、病因、病原学及机理探讨，也可对在光镜下难以作出明确结论的病理变化作出进一步诊断，特别是在肿瘤、肾病、血液病等特殊病理检查中，电镜常作为重要的辅助诊断手段。