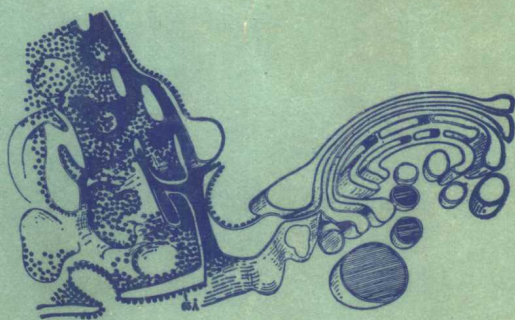


浅谈

电子显微镜和 亚细胞技术

傅 湘 琦 编著



科学普及出版社

浅谈电子显微镜 和亚细胞技术

傅 湘 琦 编著

科学普及出版社

内 容 提 要

本书对电子显微镜、扫描电子显微镜和超速离心技术的发展简史、亚细胞基本原理和样品制作及观察测定等技术作了简明介绍,并对电子显微镜的图像以细胞为代表作了分析。书中着重谈电子显微镜、扫描电子显微镜和超速离心技术的应用。它为电镜、扫描电镜和超速离心工作提供了基础知识。本书可作为从事电镜、扫描电镜和超速离心的专业人员、医学、生物学工作者、研究人员、大专院校生物系教师和学生以及有志于生物科学研究的中学师生等的参考用书。

浅谈电子显微镜和亚细胞技术

傅 湘 琦 编著

科学普及出版社出版 (北京白石桥紫竹院公园内)
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
朝阳六六七厂印刷

开本: 787×1092毫米 $1/32$ 印张: 4 字数: 84千字

1980年8月第1版 1980年8月第1次印刷

印数: 1—78,000册 定价: 0.36元

统一书号: 13051·1020 本社书号: 0027

前 言

当前医学、生物学进入分子和原子的时代，应用先进科学技术对细胞和亚细胞结构进行研究是必然趋势。利用电子显微镜可直接观察原子和分子；利用扫描电子显微镜不但可以直接观察亚细胞的形态结构，还可以对所观察的细胞器进行逐点扫描作定量、定性和定位的分析工作；利用超速离心技术可以将细胞的匀浆根据亚细胞结构和分子的大小以及它们在重力和离心力作用下，按照分子在溶剂中运动的不同情况加以分离测定。这些技术对研究亚细胞结构都是有用途的。

本书深入浅出地扼要介绍了这三方面的技术，目的是为了初学者能充分利用这些技术进行亚细胞结构的探索。对于在电子显微镜下如何分析亚细胞结构的问题，书中以细胞为代表，充分分析了它的形态图像，这对于分析动物和植物的组织、器官有一定帮助。本书如能在介绍亚细胞技术方面对读者有所补益的话，也就达到了编写目的。为了便于将来进一步修订，编者热诚希望读者及时提出批评与指正。

编 者

1978年9月

目 录

前言

1 章 引言	1
1.1 电子显微镜的发展简史	1
1.2 电子显微镜的基本原理	3
1.3 电子显微镜的发展现状	6
1.4 为什么说电镜是生物学、医学工作中不可缺少的工具	9
2 章 生物样品制备的常规技术	11
2.1 固定和包埋	11
2.1.1 固定、浸洗及脱水用试剂	11
2.1.2 环氧树脂包埋剂	13
2.1.3 包埋用器材准备	15
2.1.4 操作步骤	16
2.1.5 注意事项	21
2.2 超薄切片法	21
2.2.1 准备	21
2.2.2 切片	24
2.3 染色	26
2.3.1 醋酸铀染色法	26
2.3.2 铅染色法	26
3 章 电子显微镜的图像分析	27
3.1 电子显微镜像的判断	27
3.1.1 电镜照片像与切片的关系	28

3.1.2	立体观察	28
3.1.3	细胞和细胞小器官内的结晶物质	29
3.1.4	生物样品超微结构像回转投影法	29
4	电子显微镜下的细胞学	31
4.1	细胞内的膜结构	31
4.1.1	细胞膜(质膜)	31
4.1.2	核膜	34
4.1.3	内质网	35
4.1.4	线粒体	38
4.1.5	高尔基体	39
4.2	细胞间结合部位的结构	40
4.2.1	愈着斑、接着斑、隔壁桥小带	40
4.2.2	细胞膜的有窗结构、陷入	44
4.3	细胞内颗粒	47
4.3.1	核脱粒	47
4.3.2	溶酶体	48
4.3.3	糖原颗粒	50
4.3.4	脂肪小滴	50
4.3.5	分泌颗粒	50
4.4	细胞内的特殊纤维	50
5	扫描电子显微镜	53
5.1	扫描电子显微镜的发展简史	53
5.2	扫描电子显微镜的基本原理	55
5.3	扫描电子显微镜的特点	57
5.3.1	观察大尺寸的样品表面	57
5.3.2	样品可动的自由度大	58
5.3.3	观察样品的视场大	58
5.3.4	图像富有立体感	58
5.3.5	放大倍数可变范围宽	59

5.3.6	对厚块样品的分辨率高	59
5.3.7	对样品的损伤、污染少	59
5.3.8	便于动态观察	60
5.3.9	从样品表面获得的资料多	60
5.3.10	可作微区成分分析	60
5.4	主要国家扫描电子显微镜的一般性能	61
5.5	扫描电子显微镜样品的制备方法	65
5.5.1	有机体、器官或组织等样品的一般制备法	66
5.5.2	生物的活体观察法	67
5.5.3	生物切片观察法	67
5.5.4	癌细胞观察法	68
5.5.5	子宫颈癌观察法	68
5.5.6	食道癌、胃癌、肠癌观察法	68
5.5.7	结缔组织观察法	69
5.5.8	血液有形成分观察法	69
5.5.9	巨噬细胞观察法	69
5.5.10	结石观察法	70
5.5.11	精子观察法	70
5.5.12	卵子、卵细胞观察法	71
5.5.13	寄生虫观察法	71
5.5.14	蚊、蝇体表观察法	72
5.5.15	细菌观察法	72
5.5.16	多角病毒观察法	72
5.5.17	植物组织表面结构观察法	73
5.5.18	病植物或病原菌表面观察法	73
5.5.19	低温条件观察法	73
5.5.20	炭烯观察法	74
5.5.21	组织导电法	74
5.5.22	临界点干燥法	76
5.5.23	干冰临界点干燥法	81
5.5.24	树脂包埋割断法	83

5.5.25 离子蚀刻法	84
5.5.26 免疫扫描电子显微镜法	85
5.5.27 其它观察法	85
5.6 扫描电子显微镜在农业上的应用	87
5.7 扫描电子显微镜在医学上的应用	88
5.8 扫描电子显微镜在生物学上的应用	91
5.9 扫描电子显微镜在医学、生物学方面应用的展望	93
6 章 超速离心技术	96
6.1 什么叫超速离心	96
6.1.1 差速离心法	98
6.1.2 密度梯度离心法	101
6.1.3 密度梯度平衡离心法	102
6.1.4 分离失败的原因	104
6.1.5 超速离心分离的例子	104
6.2 超速离心分析的概况	106
6.3 超速离心分析的基本原理	107
6.3.1 溶液中颗粒的沉降现象	107
6.3.2 离心力场中溶液颗粒的沉降	109
6.3.3 超速分析离心机的特点	109
6.3.4 计算沉降常数的方法	113
6.3.5 超速离心分析中的紫外光分析	116
6.4 超速离心分析的方法	116

1 章 引 言

电子显微镜问世已有五十年左右，但其应用于医学、生物学，尤其是细胞学的研究方面才只有二十余年的历史。我国学者在六十年代初期开始这方面的工作。随着它在国际国内的发展，今天研究的内容繁多，本书只就一般的、基础的、共同的问题作概略介绍。

1.1 电子显微镜的发展简史

人类对于生物微观世界的认识过程，有着一段漫长的历史。荷兰人列文虎克 (Leeuwenhoek) 在300年前创制成功世界上第一架显微镜，发现了当时人们还不知道的微生物世界。这是显微镜第一次显示其巨大作用。

为什么人们的眼睛看不见微小的东西呢？主要是由于视角太小的缘故。我们观察一个物体时，两条光线从物体的两端射到眼睛里来，形成“视角”。各种东西的视角，随着体积的大小和距离的远近而异，视角愈大，看得愈清楚。人们眼睛视力的最小限度是只能看到视角为一分的物体，即一度的六十分之一的东西。视角小于一分的东西就看成一个小点子。因此，要想详细观察一个物体，必须设法放大视角。我们观察昆虫的外部形态，有时要借助于放大镜。放大镜能使光线发生屈折，放大物体的视角，因而使我们能看见肉眼所看不出的细小结构。

一个放大镜只能把物体放大十几倍，如果把几个或几组放大镜联合起来，经过连续放大，就可以得到更好的放大效果。显微镜就是利用这种原理制作成功的。在显微镜里装有三组透镜：第一组叫“会聚镜”，第二组叫“接物镜”，第三组叫“接目镜”。通过它们的联系把微小物体放大，使人能看见。近代光学显微镜可放大到一千倍、两千倍，最高达三千多倍。我们知道，一般来说人的眼睛看不清长度小于十分之一毫米的东西，利用放大镜可以看到百分之一毫米的东西，而利用光学显微镜则使人们可以看到五千分之一毫米的小东西。

放大十分之一毫米到五千分之一毫米，可以看到微小昆虫的外部形态及内部结构，细胞、病原菌、立克次氏体这都是光学显微镜能够看见的范围，生物体的细微结构，其大小与此相应的也可以观察到。但是，细胞内的亚显微结构以及这些结构的分子排列，光学显微镜就无能为力了。

看不见并不是由于光学显微镜的放大能力不够。通过增加显微镜里透镜数目，可把放大能力提高到一万倍，甚至十万倍，但还是看不清小于五千分之一毫米的各种生物结构，这是由于光源本质所限制。眼睛能看见的光线即可见光，是由许多不同波长的光线合成的，波长大约在 4×10^{-4} — 8×10^{-4} 毫米之间，只能照明长度大于其波长一半的物体，要想看见小于五千分之一毫米的生物结构，必须用波长更短的“看不见的光线”去“照明”。紫外线、X射线等的波长都比可见光的波长更短。当然，它们除了能“照明”微细的生物结构，还必须用某种方法使之发生屈折，产生放大的像，才能达到眼睛可以看见的目的。现在已有利用紫外线的显微镜，但因紫外线波长和可见光相差无几，还不能把显微镜的分辨能力

提高许多。目前虽有X射线显微摄影术，但还未能广泛用来制造显微镜。

电子光学的成就，使各式各样的电子仪器得到很大发展，电子显微镜就是其中之一。电子在电场或磁场中运动，显示出普通光线的性质。如果选择合适的电场或磁场，电子行程的轨迹就有固定形状。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棱镜一样发生会聚、发射、反射、折射和偏转。通过精密工艺过程，制成的电子透镜，可用以装配电子显微镜。

早在一百年以前，朴率克(Plücker)就曾在盖斯雷管的阴极近管壁上发现过一种黄绿色的光辉，但他当时对这一现象并无认识，未予重视。直到1926年毕修(Busch)才第一次提出高速飞行的电子(即电子射线)能受电场或磁场的影响，发生聚焦而造像。象普遍可见光通过玻璃透镜而聚焦造像一样，这就打开了电子光学的大门。经六年后，到1932年克诺露(Knoll)及露斯卡(Ruska)等人首次发表了关于电子显微镜的实验和理论研究，并试制成功第一台电磁式电子显微镜。为了获得较大的放大能力，人们又研究制造了短焦聚的电磁透镜，它除了会聚透镜外，再利用两个透镜作连续两次的造像。到1934年露斯卡和马顿(Marton)分别制成了新型复式电子显微镜。近代的电磁式电子显微镜在具体结构上已经有了很大改进。

1.2 电子显微镜的基本原理

电子显微镜是用电子射线来“照明”物体的。发生电子射线的仪器叫“电子射线管”，其外形是一个漏斗状的玻璃

真空管，在柄上装着一副能够发射电子的装置。当发射装置中有电流通过时，就有电子不断地产生出来，形成电子流。电子流由于阳极的吸引，以很快的速度射向底部的荧光屏上，而留下电子击中的痕迹即光点（图1）。

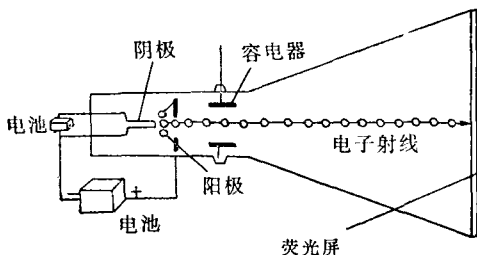


图1 电子射线管

电子是比十万亿分之一厘米还小的小粒子，当其向外发射时，好象光线一样可给物体造成影像。如果在电子射线管中，在电子流经过的道路上放上一个障碍物，当电子发射出来在中途碰到这障碍物而被阻拦不能继续前进时，便会在物体后面的荧光屏上留下一个物体的影像。因此，电子虽然是小粒子，也可以象光线一样用来“照明”物体。

同时，运动着的电子还并不单纯是微小的粒子，它们还是一种波。如果推动电子运动的电压是五万、十万甚至最大为三百万伏特，所产生的电子波波长大约是两亿分之一毫米，则这种电子波的波长相当于可见光中最短波长的八万分之一。因此利用电子射线，可以使我们看见比普通光学显微镜所能看见的小几百倍、几千倍、甚至几万倍的微小生物结构和非生物的原子构成。

要想利用电子射线得到物体的放大像，还必须使它在行进的途中能够发生屈折，好象用透镜使可见光线发生屈折一

样。这点是不难办到的。由于电子是带电的粒子，电场和磁场都能使它运动的方向发生屈折（图2）。利用电场和磁场就可以制成能使电子射线发生屈折的透镜即电子透镜。

利用电场作用制成简单的电子透镜是两块平行的金属板构成的电容器，在一个板上接正电压，在另一个板上接负电压。当一股电子射线从两块板之间穿过时，由于电场的作用，射线便向正极的方向偏

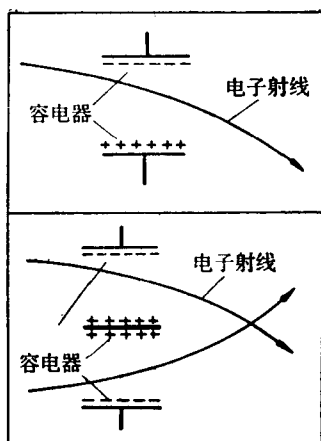


图2 利用电场作用的电子透镜

移。如果把一个电容器的一块金属板同另一个电容器的一块金属板叠合起来，并使叠合的两块板接上正电，还可以使两股电子射线向相反的方向屈折，然后汇集在一点（图2），好象透镜使两条从物体两端发出的光线汇集在一点一样。

另一种利用磁场作用制成的电子显微镜，是用线圈做成的，当线圈里有电流通过时，就在它周围造成磁场，这时如果电子射线从磁场中通过，也同样能发生屈折。

近代电子显微镜，就是用这种电子透镜构成的。同光学显微镜一样，在电子显微镜里也有几组电子透镜：第一组透镜叫“会聚镜”，其作用是把从电子发射装置里射出来的电子流集中起来，瞄准在要观察的物体上；第二组电子透镜叫“接物镜”，使经过观察物的电子射线发生屈折而产生物体的初步放大像；为了达到更高的倍数，可以再经过第一、二中间镜和投影镜三次放大，最后由电子射线构成的物体放大

像，投在荧光屏上，把电子图像转化为可见光图像，而被我们看见（图3）。为了记录结果，荧光屏下装有照相机，用电子感光板或胶片拍摄观察的图像。

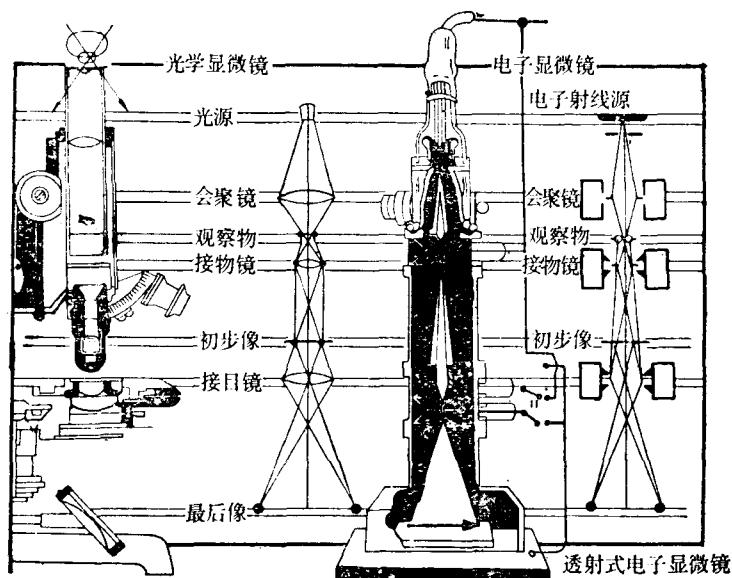


图3 电子显微镜和光学显微镜的比较

电子显微镜放大倍数的调节是靠改变成像系统的几个透镜的激磁电流来实现。当电流不同时，极靴内的磁场强度不同，使电子束屈折程度不同，因而放大倍数也不同。

1.3 电子显微镜的发展现状

目前世界上最大的电子显微镜为超高压大型电子显微镜，它的最大输出为三百万伏特，直接倍率约为十万倍，可

用它观察 2 埃^① 的极微小的世界。一般电镜观察金属时，必须切成 2 至 3 微米厚的薄片，但是不能观察不能通过电子束的金属，如金和钨等重金属样品。而超高压电镜可以观察 10 微米厚的重金属样品。尤其是可以观察封入胶囊的活微生物。

另外，有的电子显微镜可以专门用于化学鉴定和结构的测定，也可以作 X 线微区分析，可以逐点分析样品上的化学成分。

我国试制成功的 80 万倍电子显微镜，加速电压为 120 千伏，放大倍数为 80 万倍，分辨本领可以达到 1.44—2 埃，达到了同类产品七十年代的国际先进水平。

在电镜的制作工艺上也不断改进，譬如电子枪的部分独立可以抽真空，换样品部位一次可以放入六个样品杯，在不破坏真空的情况下，可以逐个进行观察（图 4 a、4 b）。

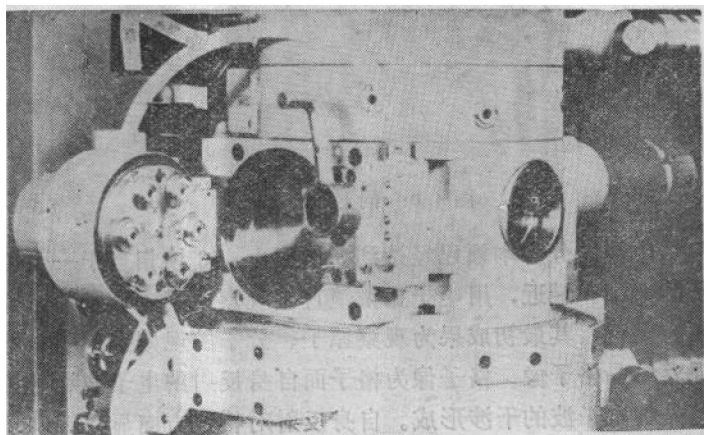


图 4 a 样品室中样品杯转换台

① 量度单位，参阅书后附表 I、I。

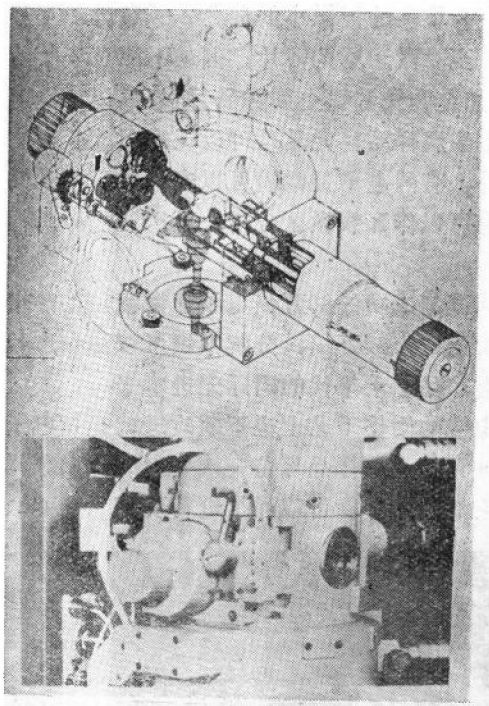


图 4 b 同上的剖面图

电镜的分辨本领已经达到 3 埃以上，3 埃相当于一个原子的大小。最近，用电子显微镜直接观察原子、分子的研究颇为盛行，其最初成果为观察原子、分子的规则排列像，即观察结晶格子像。格子像为格子面自身反射的电子波和透过结晶的电子波的干涉形成。自身反射对特定方向显得锐利，透镜的收差影响小。因此，用分辨本领为 3 埃的电子显微镜，可以观察到 1 埃以下间隔的格子像。最近创制了场发射型电子枪干涉性高的电源，使观察微观结构的可能性更大

了。有的透射电镜带有扫描附件，可以对样品表面进行扫描，观察其立体像。

总之，电子显微镜的工艺还在不断改进。随着生产发展的需要，其应用范围也逐渐扩大到各个领域。先进国家大学生物化学教室也设有电子显微镜室，他们用酶的细胞化学方法研究植物细胞的微粒体、叶绿素的光合成及在组织分化过程中和光合成有关的细胞器的亚显微结构，以及研究植物激素对细胞分化和细胞微细结构的影响，这些研究都是与别的单位合作，共同研究动、植物不同生物化学过程的形态结构，这个例子说明生物化学只有和形态学合作才能在细胞内解决定位问题。

1·4 为什么说电镜是生物学、医学 工作中不可缺少的工具

我们对生物学和医学进行研究时，首先对研究的对象进行肉眼观察，这就是解剖学水平上的观察；如用光学显微镜就能看到细胞或由细胞构成的各种组织，称之为细胞学或组织学水平上的观察；用光学显微镜虽然可以看到细胞和细菌，但只能达到0.2微米的分辨率，而现代科学则要求更加细致，要求解决高分子、分子或原子的排列、构成以及它们和细胞机能的关系。因此，需要高分辨率的电镜。现在有能达到近似1埃的分辨本领的电镜。1埃左右相当于氢原子的大小，也就是说人们的眼睛借助仪器可以延伸到分子、原子的世界中去。

为了便于比较，我们把它归纳成表1。

由于电镜深入到了前所未有的细胞大分子结构中，使形态学根本不同于光学显微镜阶段的形态学了。用电镜研究细