

解 扫描电子显微镜

——生物样品制备

〔日〕田中敬一 永谷 隆 编辑

科学出版社

图解扫描电子显微镜

——生物样品制备

[日] 田中敬一 永谷 隆 编辑

李文镇 应国华 等 译

张允吉 校

科学出版社

1984

内 容 简 介

扫描电子显微镜技术弥补了透射电镜之不足,因此,近年来发展非常迅速。本书不仅介绍了扫描电镜的基本原理、结构、种类及保养方法,而且着重详细介绍了各种生物样品的制备方法、观察方法及扫描电镜的应用实例,其中包括细胞、细胞器,正常的及病态的实例。书中附有大量精美并给人以启示的扫描电镜的图片。可以说,该书是电镜工作者的一本很好的手册及工具书。

本书可供生物学、医学界电镜工作者及有关大专院校师生参考。

田中敬一 永谷 隆 编集

図説走査電子顕微鏡

——生物試料作製法——

朝倉書店 1980

图解扫描电子显微镜

——生物样品制备

[日] 田中敬一 永谷 隆 编辑

李文镇 应国华 等译

张允吉 校

责任编辑 马素卿

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

*

1984年5月第一版 开本:787×1092 1/16

1984年5月第一次印刷 印张:17 3/4 插页:1

印数:0001—4,000 字数:402,000

统一书号:13031·2576

本社书号:3542·13—10

定价:3.50元



小肠的割断面(兔)。六甲四胺镀银染色。 ×2700

用银染色后的杯状细胞为黄色,表面形态呈蓝色。

C0072076



中文版 序 言

做为一个科技人员,读外文书籍或许不觉困难.但是,用本国语言写的书,读起来必然会更为便当,且能理解得透.我很高兴的是,这次本书被译成中文,有机会为广大中国读者服务.

1980年3月,我有机会到石家庄和南京讲学,介绍了扫描电镜的应用技术并进行了实习指导.然而,当时有幸接触到的中国同道,只是中国扫描电镜研究人员中的极少数.今天,有了本书中译本的出版,已可使更多同道很方便地获得有关扫描电镜的充分而广泛的知识.

当前,扫描电镜和透射电镜,已成为形态学研究的必需仪器了.特别是近一、二年向高分辨力方面发展所获得的进步十分显著,电镜的应用范围无限扩展,前途无量.

正当此时,本书能译成中文,甚得其时.它必将对中国的科学发展,做出有价值的贡献.

最后,向把本书译成中文的当代中国最优秀的电镜学者之一的李文镇教授、应国华讲师以及精通日语、协助审校的张允吉副教授、还有承担印刷出版的科学出版社,表示由衷感谢.

田中敬一
1981年12月

原 序

对于生活在三维世界的我们来说,若能观察到微观世界的立体形象,那是多么富有魅力啊!的确,透射电子显微镜已经以其出色的分辨力,把我们引向超微结构的世界。然而,其图像只能是二维的。与此相比,扫描电子显微镜的图像却是三维的,把微观世界生动逼真地展现到观察者的眼前。

这种出色的扫描电镜被应用到医学生物学方面,已经过了十年时光。其间变化委实不小。扫描电镜问世之初,其分辨力不过是 250 \AA (25nm),而现在已提高到近 10 倍的 30 \AA (3nm)。样品制备当年只能用空气干燥法制作,看到的纤毛好象乌贼鱼干,与那个时代相比,已有隔世之感了。

尽管如此,却几乎没有具体细致的扫描电镜操作法或样品制备方面的参考书可看。其原因之一,或许是由于扫描电镜技术发展太快,样品制备法日新月异,致使有心者也不得时机编写。当然,还不能说,扫描电镜的样品制备技术已经完善。然而,当今从事扫描电镜工作的人员,不论在基础医学,还是在临床医学,其人数均已超过了透射电镜。这样,就有必要把迄今所研制创立的各种方法整理出来,以供研究人员实际使用。

幸而,日本在镜体方面研制高分辨力的场发射型扫描电镜,是国际上首先着手的,而且在样品制备方面又完成了许多新的方法技术,在世界上也占有领先地位。于是,在具有超越技术的各有关学者的支援帮助下,编成此书,以飨于世。

本书的意图在于,不论基础医学、临床医学还是生物学,凡是广泛使用扫描电镜者均可直接应用,编写力求通俗易懂,并用多幅图片说明,以求图文并茂。特别是生物样品的制备技术方面,特约请亲自担任研制该项技术的各位专家执笔,将有关样品制备技术中的关键要点,力求说得清晰、透彻。我们确信,读者通过本书,可以做出十分出色的标本。本书还随处可以见到这些样品制备技术开拓者的努力痕迹。读者由此将可看到扫描电镜在生物学中应用的今后发展方向,以及为此还需要如何努力。如果本书能在这些方面起点作用,实为编者望外之喜。

最早立意编写本书,是在 1971 年日本电子显微镜学会秋季讨论会上编者初次相聚一堂之时。那时,田中首次发表了树脂割断法,永谷则进入日立制作所从事扫描电镜的研制。自那以后,二人意气相投,密切合作,致力于提高扫描电镜的性能和研制新的样品制备技术,在研究扫描电镜的道路上奔跑,一晃便是十年。此间,他们兼顾着手于集迄今工作之大成的本书编写,直至今日,总算问世。然而,尽管编者做了努力,或许还有日本研制的优秀扫描电镜技术之一部分不慎遗漏。而且对于本书内容,也难免有不同高见。这些遗漏和不同高见,若蒙读者直言赐教,则不胜感激之至。

最后,借此机会,向百忙当中承蒙执笔担任各章编写的诸位先生,以及惠赠扫描电镜宝贵照片于应用篇的各位先生,谨致衷心谢意。

特别是藤田恒夫教授、安达一男先生(立体观察部分)、德永纯一副教授(冷冻扫描电镜法部分)、天儿和畅教授、梅田昭子先生(免疫扫描电镜部分)、飯野晃啓教授(染色体部

分)、村上宅郎副教授、大谷修博士(铸型观察、导申染色部分)、赤堀宏博士(溅射镀膜)等各位先生,均是为日本扫描电镜之发展作出重大贡献的人士。编者荣幸地获得上述各位先生慨允惠稿,从而提高了本书的价值。借此,深表感谢之意。

还要向每年都参加鸟取大学医学院青蓝会主办的“医学·生物学扫描电镜讨论会”例会、经常承蒙指教的下列各位先生:日比忠俊博士(东北大学名誉教授)、丸势进教授(名古屋大学)、市之川竹男教授(早稻田大学)、志水隆一副教授(大阪大学),也要借本书之一角,表示深切谢意。

还要对帮助编者进行实验、研究以及仪器、技术研制方面的鸟取大学医学院解剖学教研室全体成员、日立制作所中心研究所以及该公司那珂工厂的扫描电镜有关技术人员,深表谢意。

最后,向编写过程中始终给予细致入微的协助和大力支持的朝仓书店编辑部致谢。

田中敬一 永谷 隆
1980年1月

目 录

1. 扫描电子显微镜的基础[永谷 隆]	1
1.1 概论	1
1.2 各种显微方式的比较	2
1.3 扫描电镜的原理	3
a. 电子束的聚集	4
b. 扫描和扫描电镜的放大倍数	4
1.4 扫描电镜的结构	5
a. 镜体	5
b. 样品室	5
c. 真空系统	6
d. 二次电子检测器	6
e. 显示部分(图像显示和摄影)	7
1.5 扫描电镜的分辨力	7
a. 扫描探针的形成	8
b. 图像的反差和噪音	9
c. 电子束和样品的相互关系	10
d. 在扫描电镜样品上电流的出入关系	12
1.6 扫描电镜图像的形成	13
a. 倾斜角效应和反差	14
b. 边缘效应	15
c. 原子序数效应-组分效应.....	15
d. 由二次电子形成的组分反差	16
e. 样品的凹凸不平和扫描电镜的反差	16
f. 焦点深度	17
g. 物镜光阑的选择	18
h. 加速电压效应	19
i. 反射电子图像	21
j. 阴极荧光图像	22
参考文献	23
2. 高分辨扫描电子显微镜[永谷 隆]	26
2.1 场发射型扫描电子显微镜	26
2.2 以二次电子和反射电子之差做为信号的方式	27
2.3 低损失 (low-loss) 反射电子方式	29
2.4 工作距离 $WD = 0$ 方式	30
2.5 使用强磁物镜的方式(透射/扫描方式等)	32
参考文献	33

3. 扫描电子显微镜的实践[永谷 隆]	34
3.1 扫描电子显微镜的操作法	34
a. 电镜的启动	34
b. 样品的安装(以及更换)	35
c. 观察图像的操作方法	35
d. 反差和亮度的调整	38
e. 放大倍数和扫描速度	40
f. 摄影	43
g. 小结——怎样摄好扫描电镜图片	45
3.2 扫描电子显微镜图像的毛病	45
a. 扫描电镜图像毛病的原因和内容	46
b. 损伤	48
c. 污染	50
d. 放电	52
3.3 保养时的注意事项	53
a. 镜体的保养	53
b. 闪烁体的保养	54
c. 显示器部分的保养	54
d. 真空系统的保养	55
3.4 扫描电子显微镜的安装条件	55
3.5 小结	56
参考文献	56
4. 生物样品制作法	57
4.1 概论	[田中敬一] 57
4.2 观察面的剖出法	[田中敬一] 60
a. 表面观察法	60
b. 割断法	61
(1) 树脂割断法	62
(2) 有机溶媒割断法	66
(3) 水溶性包埋剂割断法	69
(4) 其他割断法	70
c. 剥离法	73
(1) Vial 的方法	73
(2) Boyde 的方法	74
(3) 田中等的方法	74
d. 其它方法	75
(1) 游离细胞及其割断法	75
(2) 和光镜、透射电镜图像的对比	78
(3) 使用胶原酶的剖出法	80
参考文献	81
4.3 样品干燥法	[田中敬一] 82
a. 临界点干燥法	83
(1) 临界点干燥法的步骤和方法	83

(2) 临界点干燥法的理论	90
(3) 临界点干燥法使用的装置	93
(4) 临界点干燥时样品的收缩	94
(5) 中间液	94
(6) 失败的原因	95
b. 冷冻干燥法	97
(1) 弗立昂 TF 冷冻干燥法	97
(2) 酒精冷冻干燥法	97
(3) 乙腈真空干燥法	99
c. 对位二氯苯 (paradichlorbenzene) 干燥法	100
参考文献	100
4.4 导电法	100
a. 金属镀膜法	[永谷 隆] 101
(1) 真空喷镀法	103
(2) 溅射镀膜法	[永谷 隆、赤堀 宏] 106
(3) 其他金属镀膜法	[永谷 隆] 113
参考文献	114
b. 导电染色法	[村上宅郎] 114
(1) 概论	114
(2) 单宁鞣酸法	114
(3) 鞣酸·珠叉二胂法	119
(4) 铂·水合胂法以及其他方法	120
(5) 用于导电染色的微形样品载物台	120
(6) 用玻璃纸或滤纸做的微小样品载物台	122
(7) 附记	122
参考文献	123
c. 其它方法	[永谷 隆] 123
(1) 放电防止液	123
(2) 湿性化学法	123
(3) 电子透过法	123
参考文献	124
4.5 离子蚀刻法	[永谷 隆] 124
参考文献	126
5. 铸型观察法	[村上宅郎、大谷 修] 127
(1) 概论	127
(2) 甲基丙烯酸酯注入剂的配制	127
(3) 注入剂的粘度检查	128
(4) Mercox 注入剂	130
(5) 向注入的树脂中添加硬化剂	130
(6) 注入脏器和灌流	130
(7) 树脂的注入和硬化	130
(8) 腐蚀和清洗	131
(9) 铸型的细切和导电处理	131
(10) 扫描电镜观察和显微解剖	131

(11) 向血管以外的管道中注入树脂	132
(12) 印在铸型表面上的结构	132
(13) 胶乳注入	133
(14) 胶乳法和丙烯酸酯法的比较	133
参考文献	133
6. 免疫扫描电子显微镜法 [天兕和畅、梅田昭子]	134
a. 免疫扫描电镜法	134
b. 免疫扫描电镜法的标记物	134
(1) 与透射电镜的区别	134
(2) 扫描电镜标记物的条件	134
(3) 目前应用的标记物	135
c. 免疫扫描电镜法的实际操作	139
(1) 标记物的精制	139
(2) 抗体 γ -球蛋白的精制	140
(3) 抗体和标记物的结合	140
(4) 其它抗体与标记物结合法	141
(5) 用标记抗体对样品进行处理	143
参考文献	143
7. 冷冻扫描电子显微镜法 [德永纯一]	144
a. 冷冻扫描电镜法的基本步骤	144
(1) 样品冷冻法	144
(2) 向扫描电镜镜筒中送入冷冻样品	147
b. 用冷冻扫描电镜对双重剖断面的观察法	147
c. 冷冻扫描电镜在生物学上的应用	148
(1) 在霉菌类孢子形态学上的应用	148
(2) 在动物组织学上的应用	153
d. 冷冻样品表面的金属镀膜	157
e. 冷冻扫描电镜的图像质量及其分辨本领,特别是和过去的扫描电镜比较	161
f. 冷冻扫描电镜法的将来发展	164
参考文献	165
补遗	[永谷 隆] 166
8. 扫描电子显微镜图像的立体观察 [藤田恒夫、安達一男]	167
a. 立体观察及其在扫描电镜上的应用价值	167
b. 扫描电镜立体图片的摄制方法	168
c. 立体观察的方法	170
参考文献	171
9. 扫描电子显微镜图像的电影化 [藤田恒夫、安達一男]	172
a. 扫描电镜图像电影化的意义	172
b. 摄制电影的方法	172
c. 使图像活动的方法和技术	178
(1) 倾斜	178
(2) 连续放大和缩小(急速变焦)	178
(3) 水平移动	178

(4) 其他	178
参考文献	179
10. 微区分析法	[永谷 隆] 180
a. 原子的激发和缓解	180
b. 特征 X 射线的特性	182
c. 波长散射型 X 射线微区分析法 (WDX)	182
d. 能量散射型 X 射线微区分析法 (EDX)	188
e. EDX 和 WDX 的比较	191
f. 分析电镜法	192
g. 扫描透射电镜 (STEM)	193
h. 电子能量损失的分析法 (ELS)	194
i. 扫描俄歇电子分光法 (SAM)	194
参考文献	196
11. 染色体观察法	[饭野晃启] 197
参考文献	200
12. 显微解剖	[村上宅郎] 201
参考文献	202
13. 彩色扫描电子显微镜法	[田中敬一] 203
参考文献	205
14. 扫描电子显微镜的应用	206
(1) 细胞的割断面 I	[名黑知德] 206
(2) 细胞的割断面 II	[松本行雄] 208
(3) 核与内质网	[田中敬一、饭野晃启、名黑知德] 210
(4) 人的染色体	[饭野晃启] 212
(5) 粗面内质网	[田中敬一、古沢正治] 214
(6) 线粒体 I	[益永恭光、长武 均] 216
(7) 线粒体 II	[益永恭光、长武 均] 218
(8) 高尔基复合体	[本瀬照康、鹿岛 讓] 220
(9) 分泌颗粒	[田中敬一、名黑知德] 222
(10) 骨骼肌纤维	[沢田 元] 224
(11) 枯否氏星形细胞	[长武 均] 226
(12) 肥大细胞	[福留初子] 228
(13) 培养细胞	[大西礼子、金関 惠] 230
(14) 单层圆柱状上皮细胞	[沢田 元] 232
(15) 喉头粘膜上皮	[大山 勝] 234
(16) 周皮细胞	[岛田達生、杉田 新] 236
(17) 肌上皮	[村上正浩] 238
(18) 嗅上皮	[大山 勝] 240
(19) 晶状体纤维	[田中敬一、福留初子] 242
(20) 末梢神经	[阿藤孝二郎] 244
(21) 血块中的纤维蛋白网	[板倉 幸] 246
(22) 癌性胰腺症患者的肠系膜浆膜细胞	[喜安佳人] 248
(23) 胃癌的腹膜播散性转移病灶	[喜安佳人] 250
(24) 遗传性球形红细胞症的脾脏	[有马荣德] 252

(25) 蛔虫	[宇仁茂彦]	254
(26) 酵母细胞	[大隅正子]	256
(27) 莲丝	[大隅正子、山田直子]	258
(28) 免疫扫描电镜法的应用 I	[公文裕巳]	260
(29) 免疫扫描电镜法的应用 II	[公文裕巳]	262
(30) X射线微区分析法的应用	[牧田登之]	264

索引		266
----------	--	-----

1. 扫描电子显微镜的基础

1.1 概 论

自从扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 进入显微镜行列以来, 大约已有 15 年。最初的扫描电镜是很大的, 有透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM) 那么大。但是这些年已经可以按较低价格提供简易小型的扫描电镜。它不仅用于生物学和医学研究, 而且还广泛地应用于半导体工业、陶瓷工业、化学工业等所有的生产部门。扫描电镜实际应用的放大倍数范围界于光学显微镜 (optical light microscope, OLM) 和透射电镜之间, 使用最多的是从 500 倍到 5,000 倍。但是由于它有优越的焦点深度, 所以甚至在光镜起作用的 10—200 倍范围内, 扫描电镜也能充分发挥其利用价值。

扫描电镜显示的图像 (图片) 有立体感, 使人似如亲临微观世界的现场 (图 1-1)。以扫描电镜图像为媒介的交流和讨论发展迅速而且很时髦。目前不但出现于学会杂志、专门杂志等学术刊物上, 甚至出现于一般的广告杂志, 以期取得读者的了解。这就证明扫描电镜的应用范围是多么广泛。

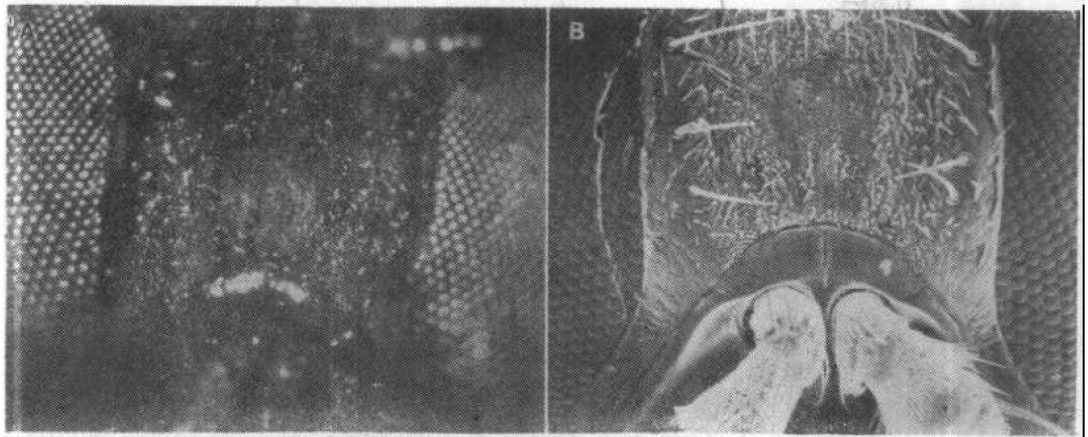


图 1-1 光镜图像 (A) 和扫描电镜图像 (B) 的比较
(样品: 小蜂的头部——加藤藤氏提供)

扫描电镜的设想是和透射电镜一起在 1930 年代出现的 (参照表 1-1)。但是它的发展主要还是在战后, 以电视为中心的电子学兴起之后。然而在 1965 年扫描电镜最早期的商品一出现, 其改良和普及就非常迅速。现在世界上使用的台数已远远超过一万台, 超过了透射电镜的普及率。

本书第一章主要说明扫描电镜仪器的结构和原理, 并涉及正确解释图像的形象论问题。在第二章介绍高分辨扫描电镜的各种技巧。在第三章扫描电镜的实际应用中, 说明

扫描电镜的操作要点,以及各种原因造成的图像障碍。

表 1-1 和扫描电镜发展有关的年表

年代	提出人	内容	年代	提出人	内容
1934	Borries 和 Ruska	研制透射电镜	1967	Broers	研制 LaB ₆ 电子枪
1935	Knoll	提出扫描电镜的可能性 ^[1,2]	1967	Coates	电子通道衍射法
1938	von Ardenne	试制透射扫描电镜 ^[31]	1968	Crewe	研制场发射透射扫描电镜 ^[32]
1942	Zworykin	试制扫描电镜 (500 Å) ^[37]	1968	Johari 等	开办美国扫描电镜座谈会(年会)
1948	Oatley	扫描电镜的创制研究(剑桥大学)	1968	Wells	用低损失扫描电镜制成高分辨扫描电镜
1949	Castaing 和 Guinier	开拓 X 射线微区分析法	1972	田中, 藤田德永等	开办生物医学扫描电镜座谈会(年会)
1952	McMullen	试制扫描电镜, 使用光电倍增管	1972	Coates 和 Welter 公司, 日立制作所, 日本电子公司	研制 30 Å 高分辨扫描电镜
1956	Cosslett 和 Daucomb	试制扫描型微区分析器			
1960	Everhart 和 Thornley	采用闪烁体、光电倍增管方式 ^[4]			
1963	Pease	证实 50 Å 的扫描电镜			
1965	剑桥仪器公司	最早提供商品扫描电镜			

1.2 各种显微方式的比较

图 1-2 从原理上比较了光学显微镜、透射电子显微镜和扫描电子显微镜的成像方式, 表 2 说明它们的性能和特征。

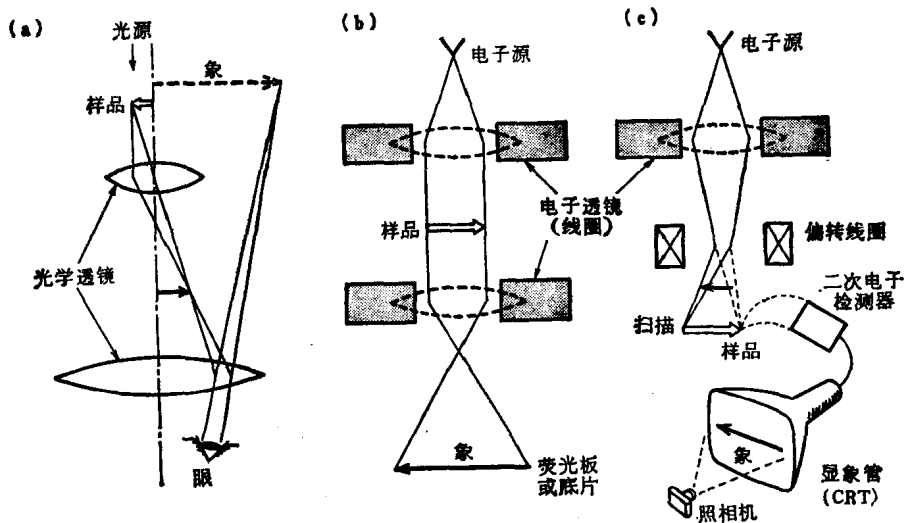


图 1-2 各种显微镜的原理比较

(a) 光学显微镜 (OLM) (b) 透射电子显微镜 (TEM) (c) 扫描电子显微镜 (SEM)

扫描电镜图像和电视一样,反映在显象管[阴极射线管 (CRT, cathode ray tube)]上,再把它照相记录下来。其原理和电视方式或传真方式类似。

一般所说的扫描电镜主要是指以样品的二次电子多少为信息,为研究样品的表面形态而进行观察的装置。但是,利用微型电子探针的扫描电镜系统,也能检测样品发出的反射电子、X射线、阴极荧光、透射电子、俄歇电子等(详见后述,图 1-15),把扫描电镜扩大到各种显微的或微区分析方式,显示出扫描电镜的多种性能。

表 1-2 各种显微镜特征的比较

性能特征	种类	种类		
		光学显微镜 (OLM)	透射电子显微镜(TEM)	扫描电子显微镜 (SEM)
分辨力	简易型	5 微米*	100 Å (10 nm)†	0.2 微米
	普及型	0.2 微米*	10 Å (1 nm)†	100 Å (10 毫微米)
	高级特殊型	0.1 微米*	2 Å (0.2 nm)†	30 Å (3 毫微米)
焦点深度		浅* (500 倍时为 2 μm)	中等(500 倍时为 500 μm)	深 (500 倍时为 1000 μm)†
观察方式	透射	可能	可能	可能
	反射	可能	不充分*	可能
	衍射	可能	可能	可能
	其他	有些	少	多
样品	制作技术	容易	复杂,需要熟练*	非生物样品容易†,生物样品复杂*
	种类	多(表面和透射)	薄膜或复型膜	多(只限表面)
	可能通过的厚度	厚†	极薄*	薄
	大小	大	小*	大†
状态	大气中†	真空之下	真空之下	
视野		大	小*	大†
图象信号处理		后处理	不能(后处理)	可能†
色彩		有†	无	无

† 比较优越之点, *比较劣势之点.

1.3 扫描电镜的原理

扫描电镜的原理与光镜和透射电镜不同。在光镜和透射电镜下,全部图像一次显出,是“静态”的。扫描电镜则是把来自二次电子电流的图像信号做为时相信号,将一点一点的画面“动态”地形成二维的图像(扫描)。在真空的镜体中将聚集得很细的电子束射入样品表面,就可以发生二次电子,二次电子的多少随入射点的凹凸状态而变化,利用这种现象就可以得到样品表面的凹凸信息^[8](图 1-3)。严格地说来,二次电子发生量的多少,不一定就能真实地反映出样品表面的凹凸不平状态。影响图像反差的还有其他因素,关于

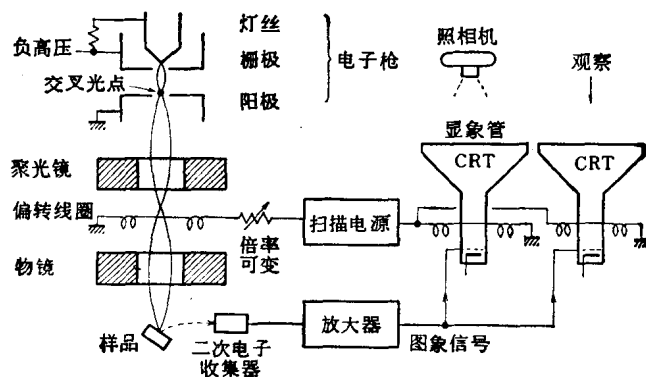


图 1-3 扫描电镜原理图

这一方面,后面再做详细叙述.

从图像形成的方式来看,扫描电镜可大体分为镜体部分(形成扫描电子束并检测样品表面的凹凸信号)和显示部分(放大信号并在显象管上把图像显示、记录下来)(图 1-4). 这相当于电视的摄像部分和受像部分的关系.

根据图 1-3 的原理简单叙述各部分的要点如下.

a. 电子束的聚集

和透射电镜一样,用负偏压做的控制电极(栅极)把阴极(通常是加热的钨制灯丝,其他方法参照 1.7)放出的电子束缩成直径 30—50 μm 的交叉光点. 电子束被阳极加速,再连续被 2—3 级电子透镜缩小,在样品上形成聚集得很细的电子束(微形探针). 扫描电镜的电子束直径必须为 3—10nm. 其中含有的电流大小为 10^{-12} — 10^{-14} A 左右. 加速电压通常是 1—30kV,但一般常用的是 10—20kV 左右.

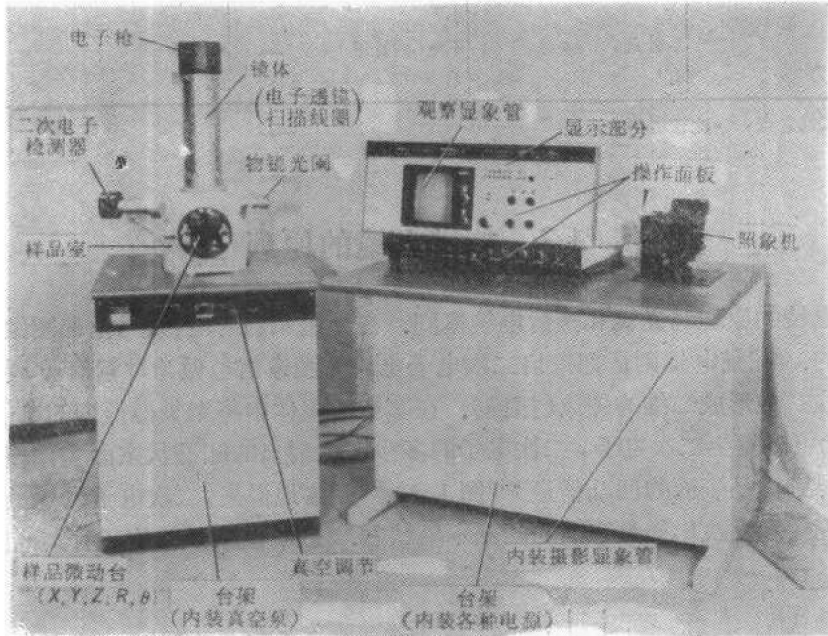


图 1-4 一般的扫描电镜外观(日立 S-450 型)

b. 扫描和扫描电镜的放大倍数

在镜体内的电子束通路上有偏转线圈(或扫描线圈),在显示部分的显象管上也有偏转线圈,这些偏转线圈接受来自扫描电源 X·Y 轴(或水平·垂直轴)的锯齿波电流. 显象管画面上的样品图像在显象管内有相应的电子束定位点,它和样品表面上电子探针的定位点一直保持完全准确的相应关系(同步扫描). 显象管的画面幅度和样品上扫描幅度之比,决定扫描电镜的放大倍数. 显象管上画面的幅度是固定的,所以如果把供应镜体内偏转