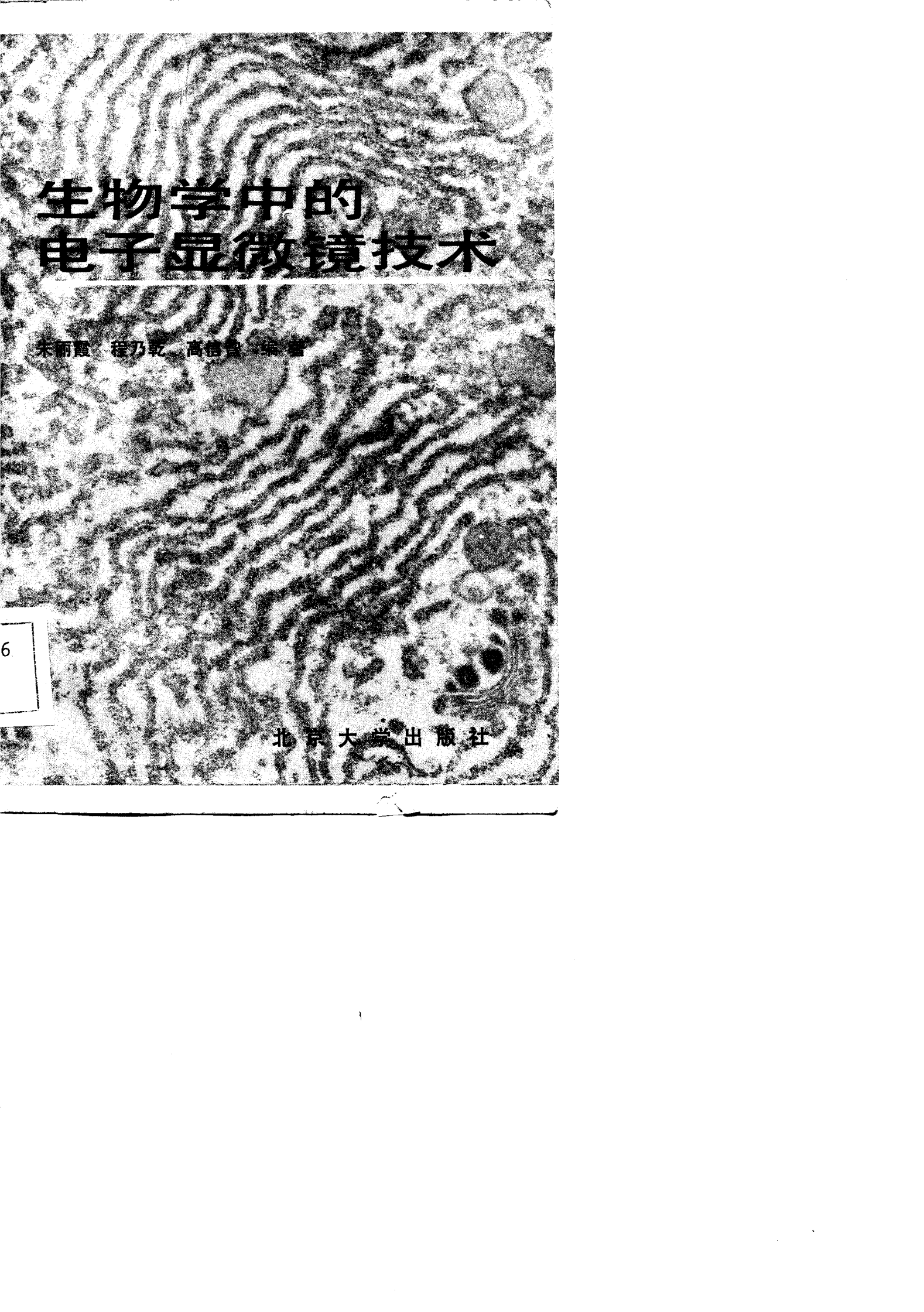


The background of the entire cover is a high-magnification electron micrograph showing various cellular structures, including what appears to be a nucleus with a nucleolus in the lower right quadrant.

生物学中的 电子显微镜技术

朱丽霞 程乃乾 高倍曾 编著

6

北京大学出版社

内 容 简 介

本书主要介绍电子显微镜应用研究中生物样品的制备技术, 其中包括: 超薄切片技术、负染色技术、金属投影与复型技术、样品的冷冻(冰冻)制备技术、电镜细胞化学技术、免疫电镜技术、电镜放射自显影技术、生物大分子电镜样品的制备技术、扫描电镜及生物样品制备技术, 此外还扼要介绍了透射电子显微镜的基本原理及其结构。

本书可供从事电镜应用研究的各种专业人员参考, 同时可作为综合性大学生物系与医学、师范、农、林院校有关专业电镜技术课程的教学参考书。

生物学中的电子显微镜技术

北京大学出版社出版
(北京大学校内)

新华书店北京发行所发行
八九九二〇部队印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 9.5印张 180千字
1983年10月第一版 1983年10月第一次印刷
印数1—11,000册

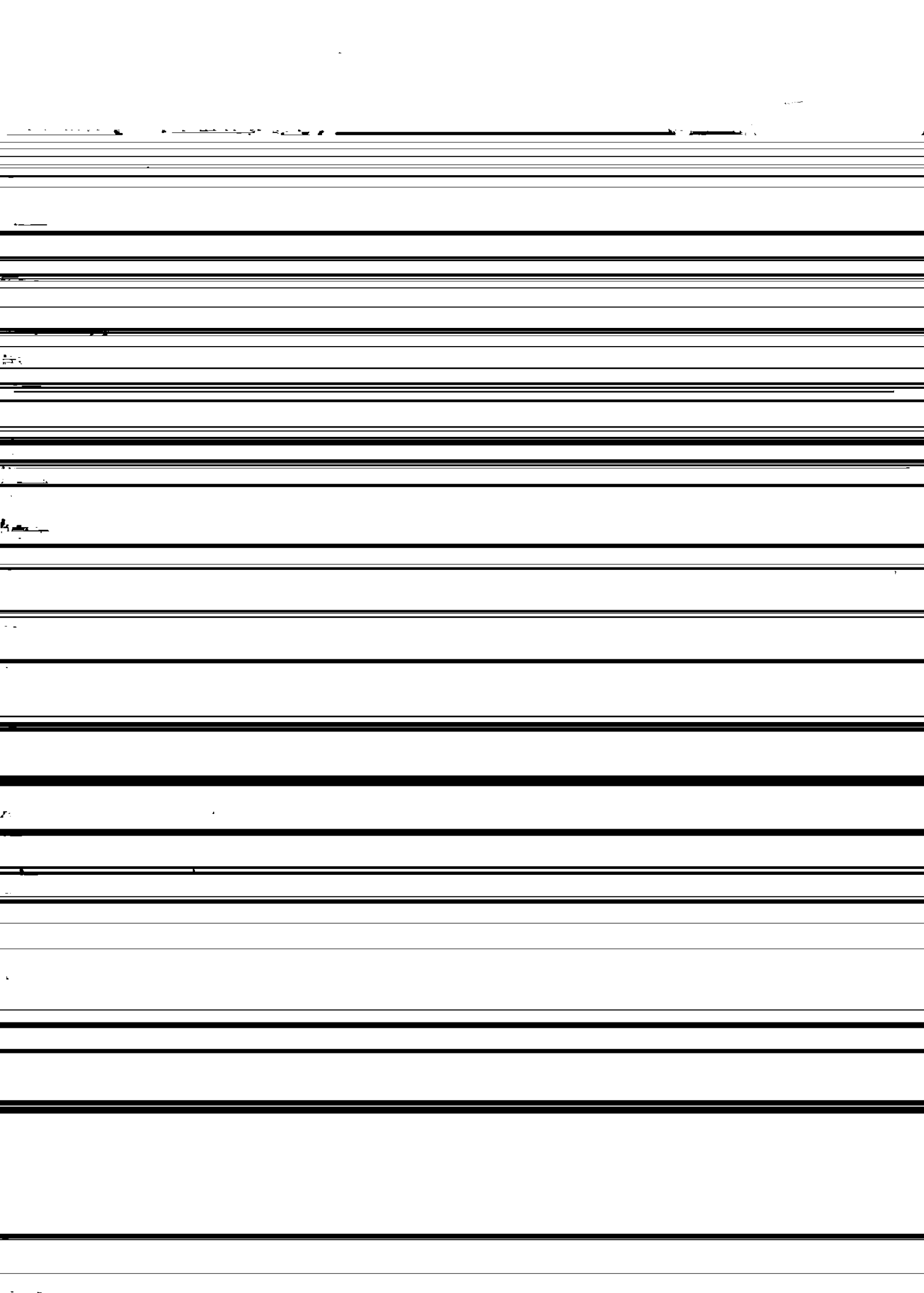
统一书号:13209·69 定价:1.00元

前 言

几年前，我们就想编写一本有关生物电镜样品制备技术的书。因为在从事生物超微结构的研究中，我们深感样品制备技术的重要。谁要想进入生物超微结构研究领域，谁就首先要学会制作样品，只有有了好的样品，才可望获得好的实验结果；一旦进入这一领域后，谁要想扩大自己的研究成果，谁就得继续在样品制备上下功夫，只有不断地采用各种新的样品制备技术，才能不断开拓新的研究领域。

我国目前已拥有相当数量的电子显微镜，今后，将有越来越多的单位会装备这种先进的仪器，电镜应用研究的科技队伍也在日益壮大。因此，对这方面的技术参考书的需求是无可置疑的。此外，不少大专院校，近年来相继开设了有关电镜技术或生物超微结构方面的课程，广大师生正渴望有合适的教材和参考书。考虑到上述情况，我们总结了我系许多同志长期的电镜工作的实践经验，并参考了许多国内外的新资料，编写了《生物学中的电子显微镜技术》一书，以期对电镜技术的教学和科研工作有所裨益。

本书的重点是介绍电镜应用研究中生物样品的制备方法，但为了帮助生物、医学工作者更好地使用电镜，书的最后一章扼要介绍了透射电镜的原理与结构。书中详细介绍了超薄切片技术，因为这是一种最基本、最常用的生物样品制备技术。除此之外，本书还比较全面、系统地介绍了近十几



目 录

第一章 超薄切片技术	(1)
1.1 概述	(1)
1.2 取材	(3)
1. 取材的基本要求	(3)
2. 取材方法	(4)
1.3 固定	(5)
1. 固定的概念	(5)
2. 常用固定剂的性质	(5)
3. 常用缓冲液的配制	(10)
4. 常用固定液的配制	(15)
5. 固定方法	(18)
6. 影响固定效果的因素	(21)
7. 良好固定的标准	(23)
1.4 清洗与脱水	(24)
1.5 浸透与包埋	(25)
1. 目的与要求	(25)
2. 常用包埋剂的性质与配方	(26)
3. 浸透与包埋的操作	(33)
4. 包埋损伤	(36)
5. 包埋操作中的注意事项	(37)
1.6 超薄切片	(38)
1. 支持膜的制备	(38)

2. 包埋块的修整	(45)
3. 玻璃刀的制作	(46)
4. 超薄切片	(51)
1.7 超薄切片的染色	(60)
1. 电镜图象反差形成的原理	(60)
2. 染色的必要性	(61)
3. 染色方法	(62)
参考文献	(71)
第二章 负染色技术	(73)
2.1 负染色的原理	(73)
2.2 悬液样品的制备	(74)
1. 直接取样	(74)
2. 样品提纯的方法	(74)
3. 病毒样品的浓缩方法	(75)
2.3 染色液的配制	(76)
2.4 染色方法	(77)
1. 滴染法	(77)
2. 喷雾法	(77)
3. 漂浮法	(77)
2.5 影响染色效果的主要因素	(78)
1. 样品的纯度	(78)
2. 样品的浓度	(78)
3. 样品与染液的均匀分散性	(78)
4. 悬液与染液的酸碱度	(79)
5. 染色时机	(79)
2.6 对照样品的染色	(79)
参考文献	(79)

第三章 金属投影与复型技术	(81)
3.1 金属投影技术	(81)
1. 真空喷镀仪简介	(81)
2. 蒸发材料的性质	(82)
3. 投影方法	(84)
4. 颗粒大小的测量	(87)
5. 影响投影效果的因素	(88)
3.2 复型技术	(89)
1. 一级复型	(89)
2. 二级复型	(90)
参考文献	(91)
第四章 样品的冷冻(冰冻)制备技术	(92)
4.1 概述	(92)
1. 生物样品中水分的存在方式	(92)
2. 冰晶的形成及其对细胞活性的影响	(93)
3. 冷冻剂与保护剂	(94)
4.2 冷冻干燥技术	(95)
4.3 冷冻取代技术	(97)
4.4 冷冻切片技术	(98)
1. 仪器的准备	(98)
2. 样品的预处理	(101)
3. 样品的冷冻	(102)
4. 切片操作	(103)
5. 切片的收集与染色	(103)
4.5 冷冻断裂(刻蚀)复型技术	(104)
1. 冷冻断裂及刻蚀装置	(105)
2. 冷冻断裂(刻蚀)复型的制作	(109)

3. 冷冻复型电镜图象的辨认	(118)
参考文献	(121)

第五章 电镜细胞化学技术

(123)

5.1 蛋白质的细胞化学技术	(123)
1. 酶的细胞化学技术	(123)
2. 蛋白质的细胞化学技术	(136)
5.2 核酸的细胞化学技术	(138)
1. 醋酸铀染色法	(138)
2. DNA的Feulgen-六亚甲四胺银特异染色法	(139)
3. RNA 的选择性染色	(139)
5.3 碳水化合物的细胞化学技术	(140)
1. 过碘酸-六亚甲四胺银法	(140)
2. 氨基硫脲蛋白银法	(141)
3. 酸性粘基质的定位	(142)
5.4 脂肪的细胞化学方法	(143)
1. 保存脂肪的脱水方法	(143)
2. 用洋地黄皂苷保存胆固醇的方法	(143)
3. 磷脂的保存方法	(144)
5.5 某些无机离子的细胞化学定位	(144)
1. 钙离子的定位	(144)
2. 磷酸盐的定位	(145)
3. 某些重金属离子的定位	(145)
5.6 提取定位法	(147)
1. 核酸的提取定位法	(147)
2. 蛋白水解酶的应用	(149)
3. 多糖的提取定位法	(149)
参考文献	(150)

第六章 免疫电子显微镜技术	(152)
6.1 抗原的选择	(152)
6.2 抗体的分离与提纯	(153)
1. 抗体的一般特性	(153)
2. 特异性抗体的分离与提纯	(155)
3. 抗体片段的制备	(159)
6.3 抗体的标记技术	(160)
1. 铁蛋白标记技术	(160)
2. 酶标记技术	(168)
3. 杂种抗体标记技术	(171)
4. 免疫酶搭桥法	(174)
6.4 电镜样品的制备	(175)
1. 铁蛋白标记抗体 (Fer-Ab) 的电镜染色	(175)
2. 酶标记抗体的电镜染色	(180)
6.5 对照实验	(181)
1. 特异抗体的封闭对照	(182)
2. 特异抗原的吸收对照	(182)
3. 非特异性对照	(182)
参考文献	(182)
第七章 电镜放射自显影技术	(185)
7.1 原理	(185)
7.2 放射自显影用的同位素	(186)
1. 能量特征	(186)
2. 半衰期	(187)
3. 剂量与毒性	(188)
7.3 电镜自显影样品的制备	(189)
1. 标本的标记	(189)

2. 厚切片及超薄切片的制备	(190)
3. 乳胶的选择、稀释与敷膜	(191)
4. 曝光	(198)
5. 显影与定影	(199)
6. 样品的后处理	(201)
7.4 对照观察	(202)
1. 本底颗粒的测量	(202)
2. 排除假阳性的对照实验	(204)
3. 排除假阴性的对照实验	(204)
4. 排除标记产物扩散的可能性	(204)
5. 抑制剂的应用	(205)
7.5 放射自显影照片的分析	(205)
1. 误差与分辨率	(205)
2. 定量分析方法	(211)
参考文献	(214)
第八章 生物大分子电镜样品的制备技术	(216)
8.1 概述	(216)
8.2 蛋白质分子电镜样品的制备技术	(218)
1. 对蛋白质溶液的要求	(218)
2. 低噪声支持膜的制备	(219)
3. 蛋白质大分子的负染色技术	(220)
4. 电镜观察时应注意的问题	(222)
5. 蛋白质大分子电镜研究的进展	(223)
8.3 核酸大分子电镜样品的制备技术	(225)
1. 电镜观察核酸的基本原理	(225)
2. 实验方法与步骤	(226)
3. 电镜观察时应注意的问题	(234)
参考文献	(235)

第九章 扫描电子显微镜及生物样品制备技术	(236)
9.1 扫描电子显微镜的特点	(236)
9.2 扫描电镜的结构及工作原理	(237)
1. 结构	(237)
2. 工作原理	(242)
9.3 生物样品制备方法	(242)
1. 新鲜材料直接观察	(243)
2. 化学的方法	(243)
3. 物理的方法	(243)
4. 临界点干燥法	(244)
5. 特殊的样品制备方法	(248)
9.4 各类样品制备的一般程序	(253)
1. 动物的软组织	(253)
2. 游离细胞	(254)
3. 昆虫	(254)
4. 植物	(255)
参考文献	(257)
主要参考书	(258)
第十章 透射电子显微镜的基本原理及其结构	(259)
10.1 电子光学的基本知识	(260)
1. 光学显微镜的局限性	(260)
2. 电子成象的基本原理	(264)
10.2 透射电镜的结构及工作原理	(268)
1. 结构概貌	(268)
2. 主要部件的结构及功能	(271)
主要参考书	(279)

第一章 超薄切片技术

1.1 概 述

在透射电镜的生物样品制备方法中，超薄切片技术是最基本、最常用的制备技术，其它一些样品制备技术，如细胞化学技术、免疫电镜技术及电镜放射自显影技术都离不开超薄切片的制作。利用透射电镜观察超薄切片，可以了解细胞的精细结构。为了获得清晰的电子显微镜照片，用以观察的超薄切片应达到以下的基本要求：①细胞的精细结构保存良好，没有产生明显的物质的凝聚、丢失或添加等人工效应。②切片的厚度应为 $500\text{ \AA}$ 左右，最多不超过 $1000\text{ \AA}$ 。较薄的切片可以获得较高的分辨率，但反差较差；较厚的切片反差较好，但结构层次重叠，分辨率较低；太厚的切片则不能为普通电镜的加速电子所穿透。③切片应能耐受电子束的强烈照射，观察过程中，包埋介质不发生变形或升华。④切片应具有良好的反差。⑤切片均匀，并且没有皱褶、刀痕、震颤（Chatter）及染色剂沉淀等缺陷。

超薄切片的制作过程比较复杂，需要经过取材、固定、清洗、脱水、浸透、包埋、切片及染色等步骤，见图 1-1。为了获得理想的超薄切片，操作者必须十分认真地对待每一操作步骤，任何环节的疏忽都有可能使制片失败。

制片操作的步骤与时间安排如下：

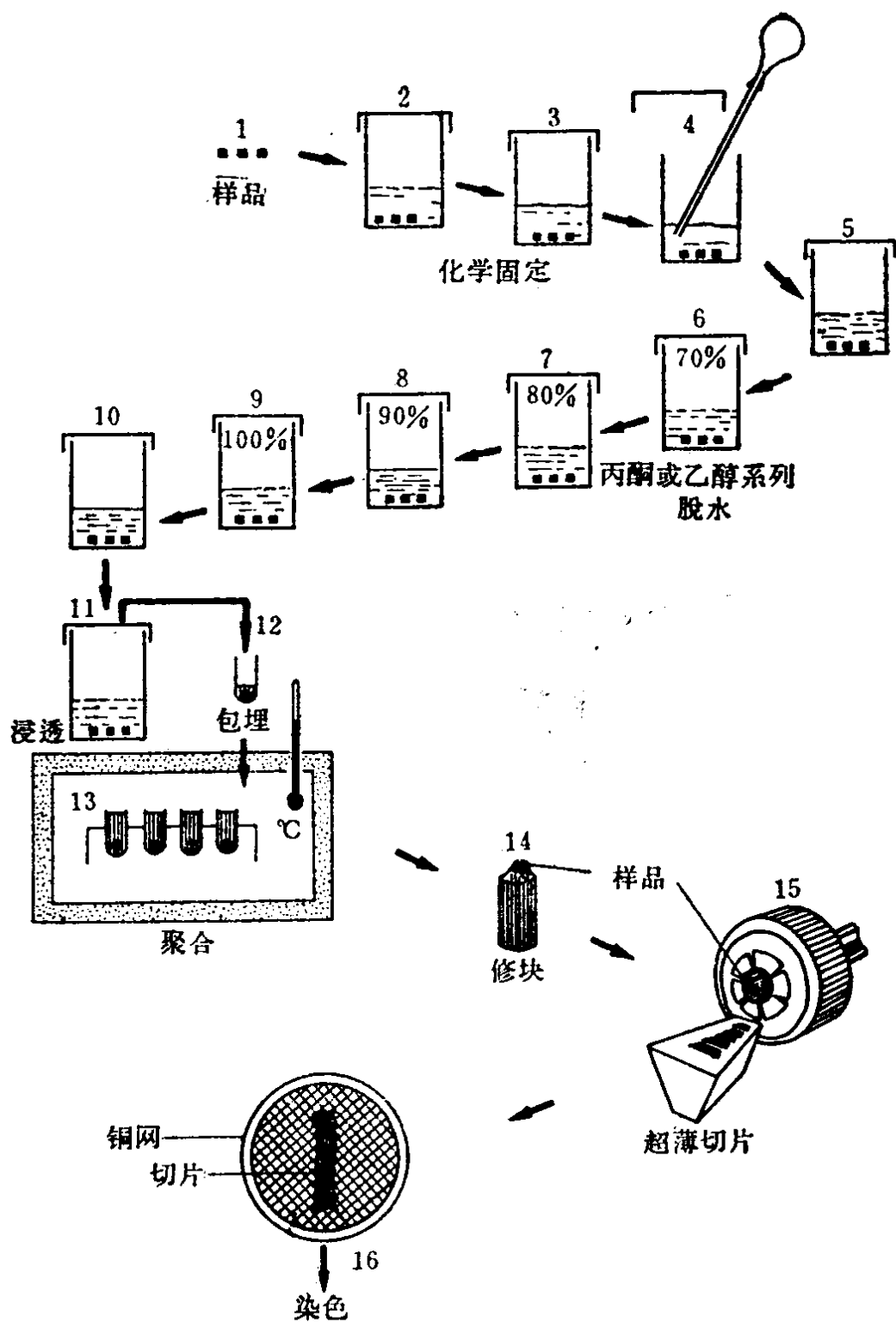


图1-1 超薄切片的制备过程

- 1.取材 2.醛类固定 3.缓冲液清洗 4.钨酸固定
 5.缓冲液清洗 6—9.脱水 10.环氧丙烷浸透
 11.包埋剂浸透 12.包埋 13.聚合 14.修块
 15.超薄切片 16.染色 (参考 Hall, J. L., 1978^[1])

- ①醛类预固定几小时或更长的时间。
- ②缓冲液清洗几小时或过夜，中间更换几次溶液。
- ③锇酸后固定一般不超过 2 小时。
- ④缓冲液清洗半小时以上。
- ⑤丙酮或乙醇脱水，其顺序为70%，80%，90%各一次，每次5—15分钟，100% 3 次，每次 5—15 分钟。
- ⑥环氧丙烷浸透 15—30 分钟（也可省略）。
- ⑦包埋剂浸透几小时或过夜。
- ⑧聚合，60℃下加温 24—36 小时，或先经 37℃ 与45℃各加温12小时，然后再在60℃下加温24小时。
- ⑨醋酸双氧铀染色 30—45 分钟。
- ⑩柠檬酸铅染色30分钟。

1.2 取 材

从动植物机体上或从细胞及微生物的培养物中取得所需材料的操作过程叫取材。

1. 取材的基本要求

由于生物材料在离开机体或正常的生长环境之后，将不可避免地发生各种“死后”变化，如溶酶体会释放出各种水解酶而引起细胞自溶。因此，为了尽可能使生物材料保持生活状态，取材操作应注意以下要求：①动作迅速，材料离体后在一分钟之内进入固定液；②材料的体积要小，一般不超过 1 毫米³，因为固定剂的渗透能力较弱，组织块如果太大，块的内部将不能得到良好的固定；③机械损伤要小，解剖器械应锋利，取材动作要轻巧，避免牵拉与挤压；④取材部位要准确，例如：肾上腺的髓质与皮质，脑下垂体的前叶与后

叶有截然不同的结构，对于这些复杂器官的取材应有光学显微镜的解剖学知识，否则就有可能失误；⑤操作应在低温下进行($0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$)，以降低酶的活性。

2. 取材方法

(1) 动物及人体组织的取材 动物组织的取材一般是先将动物麻醉或急性处死，解剖出所需要的器官，用锋利的解剖剪刀剪取一小块组织，放在预先冷却的戊二醛固定液中，然后取出放在洁净的卡片纸上，滴一滴冷却的固定液，用新的、锋利的、无油污的刀片将材料切成大约 1 毫米宽，2—3 毫米长的小条，从中挑选损伤较小的小条，再将其切成约 1 毫米³ 的小块，最后用牙签将组织块逐一放入盛有冷的固定液的小瓶中。

对于比较复杂的器官及对缺氧比较敏感的脑组织的取材，应先进行原位固定或灌流固定，待组织适度硬化后再行取出。

四氧化锇固定剂很不容易穿透致密结缔组织，因此，对于有被膜、外膜鞘或真皮包裹的组织，若先用浓的透明质酸酶处理片刻，将有助于固定剂的渗透。

人体组织的取材通常是为了进行病理活检，这种组织往往带有较多的血液和组织液，取材时应先用醛类固定剂多洗几遍，然后再切成小块固定。

(2) 体外培养细胞的取材 生长在培养瓶中的体外培养细胞取材时，先倒去培养液，接着倒入适量的戊二醛固定液，在冰浴上放置 3—5 分钟，然后用刮刀轻轻刮下瓶壁上的细胞，将含有细胞的固定液转移到离心管中，用普通离心机低速离心 (2000 转/分) 15 分钟，使细胞聚成团块，弃去

上清液，换上新鲜的固定液继续固定。

(3)植物组织的取材 植物组织的取材比较容易，它的细胞离体后变化不象动物细胞那样迅速，但植物细胞的细胞壁阻碍着固定液的迅速渗透。因此，植物材料的取材宜先切成薄片状，经适当固定后再切成小方块。

1.3 固 定

1. 固定的概念

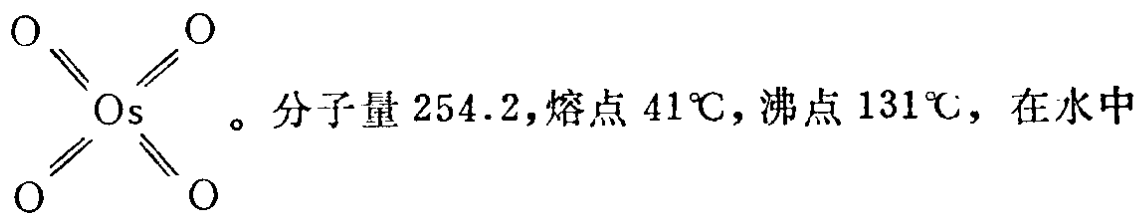
用化学固定剂或冰冻、干燥及高温等物理方法迅速杀死细胞的过程叫做固定。固定的目的是尽可能使细胞中的各种细胞器以及大分子保持生活状态的结构，并且牢固地固定在它们原来所在的位置上。经过良好固定的细胞器和大分子，不会由于一系列后继的处理而发生移位或丢失。因此，良好的固定是获得精致的形态学图象的关键。固定方法有化学固定法及物理固定法两大类，其中常用的是化学固定法。物理固定法只用于某些特殊的目的。

2. 常用固定剂的性质

根据固定剂与蛋白质作用方式的不同，化学固定剂可分为凝聚固定剂和非凝聚固定剂两大类。凝聚固定剂能使蛋白质发生不可逆的、永久性的变性，凝聚成大块的沉淀。这类固定剂包括乙醇、丙酮、醋酸、苦味酸及某些重金属，它们只适用于光学显微镜样品的固定而不适用于电镜样品的固定。非凝聚固定剂使蛋白质交联成稳定的凝胶，而蛋白质分子结构不发生明显的变化与凝聚。这类固定剂包括：四氧化锇、醛类、高锰酸钾及重铬酸钾等。理想的固定剂应使细胞中各种成分都能得到良好的固定，但实际上，各种固定剂对

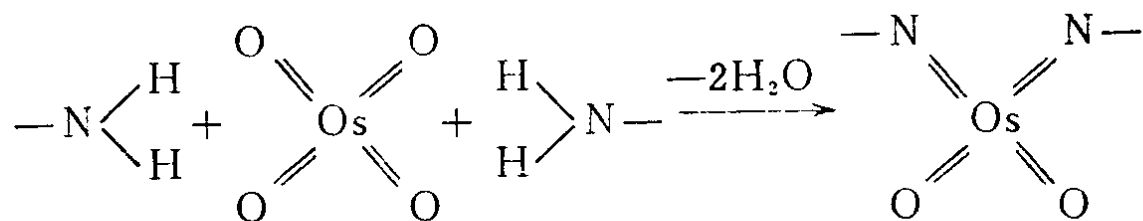
细胞成分的固定是有选择性的。因此,应该根据实验的目的选择合适的固定剂。现将电镜中常用固定剂的性质介绍如下:

(1)四氧化锇 四氧化锇又名锇酸,它是一种淡黄色、具有强烈刺激味的晶体。其分子式为 OsO_4 , 结构式为



的溶解度为 7.24% ($25^{\circ}C$), 其水溶液是中性的 (故锇酸实为一种误称)。

四氧化锇是一种非电解质强氧化剂, 它与氮原子有较强的亲和力, 因此它能与各种氨基酸、肽及蛋白质反应, 在蛋白质分子之间形成交联, 使蛋白质分子固定。 OsO_4 与含氮基团和氨基成分结合方式如下:



这种反应可能是 OsO_4 固定蛋白质的基础。

四氧化锇还能与不饱和脂肪酸反应使脂肪得以固定。据推测反应方式可能如下:

