

■ 上海研究生教学用书



实用

生物医学

电子显微镜技术

◆ 杨勇骥 主编

33



第二军医大学出版社

■ 上海市研究生教育专项经费资助出版

实用生物医学电子显微镜技术

主 编 杨勇骥

副主编 沙继宏 颜永碧

编 委 (以姓氏笔画为序)

叶煦亭	朱海英	汤 莹	苏金莲
杨勇骥	李卫萍	吴 越	沙继宏
宋田斌	张琰敏	陆月良	邵晓良
姜永良	彭 骏	夏愿耀	谢志芳
颜永碧			

第二军医大学出版社

内 容 简 介

电子显微镜技术已成为科学研究领域内不可缺少的研究手段及工具,对科学研究起着重要作用。在生命科学研究领域,电子显微镜技术也是最重要、最常用的技术之一。本书精炼地阐述了电子显微镜的原理,并对20世纪80到90年代出现的新型显微镜,如扫描隧道显微镜、原子力显微镜及激光扫描共聚焦显微镜等作了详细介绍。本书着重阐述了较难处理的电镜生物样品制备方法以及一些实用技术的改进,并对目前生物电子显微镜的特殊技术,如低温冷冻生物制样技术、EDX微区分析技术等作了详尽的叙述。

本书可供从事生物医学、农学的电子显微镜科技工作者及有关院校的师生参考,也是一本实用的研究生教材。

图书在版编目(CIP)数据

实用生物医学电子显微镜技术/杨勇骥主编. —上海:第二军医大学出版社,2003.1
ISBN 7-81060-267-5

I.实... II.①杨... III.生物学②医药学:电子显微镜—技术 IV.Q6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 071643 号

实用生物医学电子显微镜技术

主 编 杨勇骥

副主编 沙继宏 颜永碧

第二军医大学出版社出版发行

(上海翔殷路818号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

上海第二教育学院印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:14.5 字数:354千字

2003年1月第1版 2003年1月第1次印刷

印数:1~2500

ISBN 7-81060-267-5/Q·009

定价: 29.00 元

前 言

就当今的科学发展而言,生物电子显微镜技术是一门年轻的、全新的领域,是理工、农医完美结合的技术。电子显微镜从其诞生之日起就受到世人瞩目,经过半个多世纪的发展,电子显微镜技术已成为科研人员不可缺少的研究手段及工具,对科学研究起着重要作用。在生命科学领域内,电子显微镜技术已成为最重要的研究方法学之一,并对生命科学的发展作出了极为重要的贡献。随着现代医学,细胞超微结构及分子生物学等学科的迅速发展,电子显微镜技术也正向超高分辨率、生物分子及原子水平发展。电子显微镜的种类、型号迅速更新。出现了更适合生物医学用的新型显微镜,随之而来的是电子显微镜技术的完善与提高,可以毫不夸张地说,几乎在生命科学的所有学科研究领域内,都已应用或将要应用到电子显微镜技术。为此,我们撰写了《实用生物医学电子显微镜技术》一书,从生物医学工作者的角度,对电子显微镜及生物电子显微镜制样技术作了详细、透彻的叙述。

本书分为上、中、下三篇共 18 章。上篇着重介绍了各种类型的电子显微镜,精炼地阐述了电子显微镜的原理,使生物医学工作者能够了解其工作原理而又不被繁琐的物理知识所迷惑。并对 20 世纪 80 年代到 90 年代出现的新型显微镜,如扫描隧道显微镜、原子力显微镜及激光扫描共聚焦显微镜等作了详细介绍。上篇的第六、七两章,是有关电子显微镜室基本设计原则及电子显微镜的工作调试、操作技巧的介绍,有助于生物电子显微镜工作者实际操作水平的提高。中篇除了介绍常规生物制样的方法外,着重阐述了较难处理的生物样品制备方法以及一些实用技术的改进,如免疫胶体金标记技术、石蜡包埋组织的电子显微镜样品制备及切片染色技巧等,因而本书有别于其他同类的书籍。下

篇是本书的精华之所在,作者对生物电子显微镜中特殊的物理制样技术:如对低温冷冻生物制样技术、EDX 微区分析技术等作了详尽的叙述,其中有许多内容包含着我们近年来的工作经验及研究成果。这一篇的许多内容在目前国内出版的有关生物电子显微镜著作中均未见阐述,而这些内容又是目前生物电子显微镜技术发展的重点之一。

本书旨在为有志于从事生物医学电子显微镜工作的专业人员提供详细、丰富的技术参考,也可作为生物医学大专院校硕士生、博士生的教材,为他们提供生物电子显微镜的实用方法与知识。

限于作者的水平 and 经验,书中有不足之处,敬请读者不吝斧正。

在本书的出版过程中,得到了上海市教委“上海市研究生教育专项经费”资助,第二军医大学出版社为本书的顺利出版付出了大量心血和劳动,在此一并表示衷心的感谢!

谨将此书奉献给从事生物电子显微镜工作的前辈们及同行们。

第二军医大学电镜室

杨勇骥

2002 年 9 月

目 录

绪论	(1)
----------	-----

上篇 电子显微镜原理及其在生物学中的应用

第一章 电子显微镜基本原理	(5)
第一节 引言	(5)
第二节 分辨本领和放大倍数	(5)
一、分辨本领	(5)
二、放大倍数	(7)
第三节 电子束的主要特征	(7)
一、电子束的定义	(7)
二、电子束在磁场或电场中的性质	(8)
三、电子束的穿透力	(8)
四、电子束的激发荧光	(8)
五、电子束的放射性	(8)
第四节 电子透镜	(8)
第五节 电磁透镜的特性	(10)
一、球面象差及畸变	(10)
二、衍射象差	(11)
三、色差	(11)
四、象散	(12)
五、景深	(12)
六、焦深	(13)
七、磁滞	(14)
八、反差与成像	(14)
第二章 电子显微镜的类型、结构及其原理	(17)
第一节 引言	(17)
第二节 透射电子显微镜	(17)
一、电子光学系统	(18)
二、真空系统	(19)
三、电子系统	(19)
第三节 扫描电子显微镜	(20)
一、工作原理	(20)
二、扫描电镜的特点和应用	(21)
第四节 高分辨率的扫描透射电镜	(21)
一、超高真空的场发射式电镜	(21)
二、附加在透射电镜或扫描电镜上的 STEM	(21)

第五节 高压电子显微镜	(22)
第六节 低压电子显微镜	(23)
第七节 环境扫描电子显微镜	(23)
第三章 新型的电子显微镜	(25)
第一节 扫描探针显微镜简介	(25)
第二节 扫描隧道显微镜	(26)
一、扫描隧道显微镜的物理原理	(26)
二、扫描隧道显微镜的工作原理	(26)
三、扫描隧道显微镜在生物学中的应用	(27)
第四节 原子力显微镜	(28)
一、原子力显微镜的物理原理	(28)
二、原子力显微镜的工作原理	(28)
三、原子力显微镜在生物学中的应用	(29)
第五节 激光扫描共聚焦显微镜	(30)
一、激光扫描共聚焦显微镜的基本工作原理	(30)
二、激光扫描共聚焦显微镜的特点	(30)
三、激光扫描共聚焦显微镜在生物学中的应用	(31)
第四章 分析电子显微镜、X 射线能量色散谱分析系统及其在生物学中的应用	(36)
第一节 引言	(36)
第二节 分析电镜	(36)
第三节 能谱分析仪简论	(38)
一、X 射线能谱分析基本原理	(38)
二、能谱分析仪的工作原理	(39)
三、能谱分析在生物学中的应用	(39)
四、应用能谱分析时应注意的要点	(41)
第四节 电子显微镜的特点	(42)
第五章 用于电子显微镜的图像分析、图像处理技术及计算机网络数据交流	(45)
第一节 引言	(45)
第二节 图像分析与识别技术	(45)
一、图像分析	(45)
二、图像识别	(46)
第三节 图像处理技术	(46)
一、图像处理技术的发展	(46)
二、图像处理种类	(47)
三、图像存储格式	(48)
四、图像压缩	(50)
五、图像处理软件	(51)
第四节 图像数据的计算机网络交流	(52)
一、电子邮件(E-mail)方式	(52)

二、FTP 文件传输	(52)
三、Internet 网站发布	(53)
第六章 电子显微镜室的设计	(55)
第一节 电子显微镜工作环境的指标要求及设计	(55)
一、防震指标及要求	(55)
二、防磁要求	(55)
三、防尘要求	(55)
四、电力、供水要求	(55)
五、电镜室的恒温、恒湿要求	(56)
六、防火、防水、防毒要求	(56)
第二节 电子显微镜室的布局及设计	(56)
第七章 电镜常用工作点调试、操作技巧及常用维护	(58)
第一节 透射电子显微镜的常用工作点调试	(58)
一、灯丝像的调试	(58)
二、聚光镜光阑对中	(59)
三、光斑对中	(59)
四、物镜光阑对中	(59)
五、电压中心和电流中心的调整	(59)
六、消象散	(59)
第二节 扫描电镜的常用工作点调试	(60)
一、电子束对中	(60)
二、消象散	(60)
三、调整工作距离	(60)
第三节 电镜的操作技巧	(60)
一、电镜观察前的准备工作	(60)
二、电镜观察过程中的注意事项	(60)
三、电镜观察完成后的注意事项	(61)
第四节 电子显微镜的日常维护及检修	(61)
一、电子光学系统的日常维护及检修	(61)
二、真空系统的日常维护及检修	(61)
三、机械系统的日常维护	(62)
四、电子控制系统的日常维护	(62)
第八章 电镜样品拍摄和暗室技术	(63)
第一节 电镜样品拍摄	(63)
一、拍摄前的准备	(63)
二、透射电镜样品拍摄	(63)
三、扫描电镜样品拍摄	(64)
第二节 电镜暗室技术及基本设备	(64)
一、电镜暗室技术	(64)

二、暗室的基本设备·····	(65)
第三节 电镜底片的冲洗·····	(65)
一、显影·····	(65)
二、停显·····	(66)
三、定影·····	(67)
四、水冲洗·····	(67)
五、干燥·····	(67)
六、底片及照片的修整·····	(67)
第四节 电镜照片的放大·····	(67)
一、电镜用相纸的性能和种类·····	(67)
二、放大技术·····	(67)
三、显影·····	(68)
四、停显·····	(69)
五、上光·····	(69)
第五节 翻拍技术与幻灯片的制作·····	(69)
一、翻拍技术·····	(69)
二、黑白幻灯片的制作·····	(70)
三、彩色幻灯片的制作·····	(70)

中篇 电子显微镜生物样品制备技术

第九章 常规透射电镜样品制备技术·····	(73)
第一节 引言·····	(73)
第二节 制样前的准备工作·····	(74)
一、实验设计的准备·····	(75)
二、实验器具和实验试剂的准备·····	(75)
三、实验动物的准备·····	(75)
第三节 取材·····	(75)
一、取材的基本要求·····	(76)
二、取材的具体方法·····	(76)
第四节 固定·····	(76)
一、固定的定义和目的·····	(76)
二、固定方法·····	(77)
三、电镜制样中常用的缓冲液及其配制·····	(78)
四、电镜制样中常用的固定剂及其配制·····	(80)
五、影响固定效果的因素·····	(83)
第五节 漂洗与脱水·····	(84)
第六节 浸透与包埋·····	(85)
一、理想的包埋介质应具备的条件·····	(85)
二、几种常用的包埋剂及其配方·····	(85)

三、浸透与包埋的具体操作·····	(87)
第七节 修块与定位·····	(88)
一、修块·····	(88)
二、定位·····	(88)
三、半薄切片染色·····	(88)
第八节 超薄切片·····	(88)
一、超薄切片机的简单原理·····	(88)
二、载网·····	(89)
三、支持膜的制备·····	(89)
四、玻璃刀的制备及使用·····	(90)
五、喷钨刀的制备及使用·····	(90)
六、钻石刀的使用·····	(91)
七、超薄切片过程·····	(94)
第九节 超薄切片染色·····	(94)
一、染色原理及染色液·····	(94)
二、染色方法·····	(95)
第十节 微波技术在电镜样品制备中的应用·····	(96)
一、电镜样品制备各程序中微波的应用·····	(96)
二、微波使用的注意事项·····	(97)
第十一节 生物样品的快速制备技术·····	(97)
一、常规诊断快速制样法·····	(97)
二、乙腈快速脱水与浸透法·····	(97)
第十二节 一些特殊样品的制备技术·····	(98)
一、血液样品的电镜样品制备·····	(98)
二、培养细胞、细菌的电镜样品制备·····	(99)
三、石蜡组织块的电镜样品制备·····	(100)
四、耳蜗、眼球电镜样品制备·····	(100)
五、薄样品的电镜样品制备·····	(101)
六、不易渗透或难定位样品的电镜样品制备·····	(101)
第十章 电镜酶细胞化学技术·····	(103)
第一节 酶细胞化学反应的基本原理·····	(103)
一、水解酶·····	(103)
二、氧化还原酶·····	(103)
第二节 酶细胞化学的常规操作步骤·····	(104)
一、取材·····	(104)
二、固定·····	(104)
三、置换缓冲液·····	(105)
四、孵育·····	(105)
五、漂洗组织·····	(105)

六、后固定	(105)
七、脱水包埋	(105)
八、超薄切片与染色	(105)
九、对照实验	(105)
第三节 常用的孵育液配方及操作注意事项	(106)
一、常用的孵育液	(106)
二、酶细胞化学的操作注意事项	(107)
第十一章 免疫电镜技术	(110)
第一节 引言	(110)
第二节 免疫电镜技术的基本方法	(111)
一、标本处理	(111)
二、基本技术方法	(112)
第三节 胶体金探针的制备技术	(114)
一、胶体金的制备	(114)
二、蛋白质-胶体金的制备	(115)
第四节 胶体金标记免疫电镜技术	(119)
一、包埋前胶体金标记免疫电镜技术	(119)
二、包埋后免疫电镜技术	(121)
第五节 铁蛋白标记免疫电镜技术	(125)
一、铁蛋白的提取和纯化	(125)
二、铁蛋白的鉴定	(125)
三、抗体-铁蛋白的交联方法	(126)
四、用抗体-铁蛋白标记细胞表面抗原	(126)
第十二章 原位核酸分子杂交技术	(128)
第一节 原位杂交的原理及操作	(128)
一、原位杂交的原理	(128)
二、原位杂交的基本操作方法	(129)
第二节 探针的种类及探针标记技术	(130)
一、探针的种类	(130)
二、探针的标记	(131)
第三节 电镜原位杂交	(132)
一、电镜原位杂交的准备	(133)
二、电镜原位杂交的种类	(133)
三、有关电镜原位杂交的注意点	(133)
第十三章 其他常用的细胞化学技术	(136)
第一节 离子细胞化学技术	(136)
一、钙离子细胞化学具体操作	(136)
二、钙离子细胞化学具体操作中的注意事项	(136)
第二节 阴离子位点显示技术	(137)

一、阳离子化铁蛋白染色法具体操作	(137)
二、聚乙烯亚胺染色法具体操作	(137)
三、注意事项	(137)
第三节 氧自由基显示技术	(138)
一、 H_2O_2 细胞化学具体操作	(138)
二、 O_2^- 细胞化学具体操作	(138)
三、操作注意事项	(138)
第四节 示踪细胞化学	(138)
一、镧细胞化学具体方法	(138)
二、注意事项	(139)
第五节 凝集素显示糖类细胞化学	(139)
一、凝集素显示糖类细胞化学具体方法	(139)
二、注意事项	(139)
第六节 乙酰胆碱受体显示细胞化学	(139)
一、乙酰胆碱受体显示细胞化学具体方法	(139)
二、注意事项	(140)
第七节 细胞膜复合糖类电镜显示法	(140)
一、钉红染色法	(140)
二、胶体铁染色法	(140)
三、标记生物毒素染色法	(140)
四、注意事项	(141)
第十四章 负染色和放射自显影	(142)
第一节 负染色技术	(142)
一、染液配制及弗姆瓦膜的制备	(142)
二、标本制备及操作方法	(142)
三、负染色标本制备及分析时应注意的问题	(143)
第二节 放射自显影术	(143)
一、放射自显影术的原理	(143)
二、放射自显影的方法	(144)
三、放射自显影的分类	(146)
第十五章 扫描电子显微镜生物样品制备技术	(148)
第一节 常规生物样品扫描电镜制样方法	(148)
一、SEM 生物样品制备的基本要求	(148)
二、SEM 生物样品制备的基本操作程序	(148)
第二节 免疫扫描电镜标本制备方法	(153)
一、抗体的制备	(153)
二、具体操作步骤	(153)
第三节 生药样品的制备	(153)
第四节 组织割断及管道铸型技术	(153)

一、组织、细胞割断法·····	(153)
二、管道铸型样品制备法·····	(154)

下篇 生物样品冷冻制备技术及 EDX 能谱微区分析技术

第十六章 生物样品的超低温快速冷冻固定技术 ·····	(159)
第一节 引言·····	(159)
第二节 快速冷冻固定的物理原理·····	(160)
一、生物组织的低温热传导·····	(160)
二、生物组织中冰晶的产生及对组织的损伤·····	(164)
第三节 快速冷冻固定方法·····	(165)
一、插入式超低温快速冷冻固定·····	(165)
二、镜面式超低温快速冷冻固定·····	(166)
三、其他冷冻固定方法·····	(167)
四、冷冻保护剂·····	(168)
五、不使用冷冻保护剂的超低温快速冷冻·····	(168)
第十七章 超低温快速冷冻固定后的生物样品处理 ·····	(172)
第一节 冷冻超薄切片·····	(172)
一、冷冻超薄切片原理·····	(172)
二、冷冻超薄切片方法·····	(172)
三、冷冻超薄切片的技术关键·····	(173)
第二节 快速冷冻置换·····	(174)
一、冷冻置换原理·····	(174)
二、冷冻置换方法·····	(174)
三、冷冻置换的技术关键·····	(175)
第三节 冷冻干燥·····	(176)
一、冷冻干燥原理·····	(176)
二、冷冻干燥方法·····	(176)
三、冷冻干燥的技术关键·····	(178)
第四节 冷冻断裂·····	(178)
一、冷冻断裂原理·····	(178)
二、冷冻断裂方法·····	(178)
三、冷冻断裂在生物学中的应用·····	(180)
第五节 低温包埋技术·····	(180)
一、低温包埋树脂·····	(180)
二、固定、脱水、浸透和包埋·····	(180)
三、聚合·····	(182)
四、切片与染色·····	(183)
五、低温包埋过程中需注意的问题·····	(183)
第十八章 生物样品的 EDX 微区分析技术 ·····	(188)

第一节 生物样品微区分析方法.....	(188)
一、定性分析	(188)
二、半定量分析	(188)
三、定量分析	(189)
第二节 生物薄标样及生物薄标样的制备技术.....	(189)
一、理想的生物薄标样应具备的条件	(189)
二、生物薄标样的制备	(190)
三、生物薄标样的测试	(191)
四、国内外常用的生物薄标样简介	(192)
第三节 生物样品的微区定量分析测试.....	(194)
一、测试前的仪器准备工作	(195)
二、仪器测量条件的选择	(195)
三、定量测试步骤	(196)
附录一 电子显微镜常用尺度的换算方法.....	(198)
附录二 中华人民共和国国家标准:电子显微镜 X 射线能谱分析 生物薄标样通用技术条件(GB/T 17507-1998)	(199)
附录三 超微结构图谱.....	(203)

绪 论

人类在认识客观世界的过程中,总是先由人的感官感受客观世界的各种现象,然后再反映到自己的头脑之中。为了更深入地观察和研究微观世界,人们研制、发展了从简单到复杂的各种仪器。首先,17世纪光学显微镜的出现,将人类裸眼的分辨能力提高了1 000倍,使人们第1次直接看到了人的肉眼看不见的细胞、细菌。随着观察与研究的不断深入,人们已不再仅仅满足观察细胞、细菌本身,而光学显微镜则由于分辨率的限制,不可能达到更高的要求。从20世纪30年代开始,人们利用工业技术的发展,成功地研制了电子显微镜。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了原子级的微观世界。

与许多伟大的发明一样,电子显微镜的发明,经历了那个时代艰难困苦的历程,许多科学家曾为此奋斗终身。在光学显微镜发明之后长达300年的时间内,由于光源波长的限制,光镜的分辨率难以提高,进而使放大倍数始终难以突破1 000倍,限制了显微镜的进一步发展。因此,寻找新的短波长的光源,是提高显微镜分辨率的关键所在。但是由于理论与技术的限制,直到20世纪初,人们在提高显微镜分辨率的漫长努力中,得到的结果总是令人失望。1924年,法国物理学家Broglie提出了:“电子与光一样,具有波动性”的假说。他证明了任何一种粒子,当它们快速运动时,必定都伴有电磁辐射,辐射的波长与粒子的运动速度成反比,并计算出了电子的波长约为0.005 nm。1926年,德国科学家Busch发表了关于带电粒子在轴对称的电场和磁场中具有聚焦作用的论文,他指出:带电粒子在电场或磁场中偏转聚焦的现象,类似于光线通过透镜可被聚焦一样。Broglie和Busch的理论为电子显微镜的发展奠定了理论基础。1928~1931年,德国年轻的大学生Ruska在研究高压阴极射线示波器的电子光学部分时,仔细测量了磁透镜的聚焦特性,并开展了电子放大成像的研究。1931年4月,Ruska研制的具有二级磁透镜放大的电子成像设备获得了16倍的放大倍率,这是电子显微镜的雏形。然而,Ruska的发明并未得到社会及学术界的承认,并且有许多人对电子显微镜持极度怀疑的态度。经Ruska多方奔走,忘我工作,终于在1938年底,Ruska在柏林研制成功了第一台真正的电子显微镜,当时这台电镜的放大倍数为1 200倍,分辨本领与当时最好的光学显微镜相当。由于Ruska在电子显微镜发明中所作出的巨大贡献,他被誉为电子显微镜之父,并在1986年获得诺贝尔奖。电子显微镜的发明被誉为20世纪最重要的科学发明之一。

1939年,德国Siemens公司生产了第一台作为商品用的透射电镜,分辨率优于10 nm。其后,由于第二次世界大战的影响,电镜的发展处于暂停阶段。

第二次世界大战以后,商品化的电子显微镜开始得到广泛应用。20世纪50年代初到60年代末期,电镜发展很快,从性能到构造都得到很大的改进,特别是分辨本领得到大幅度提高,达到1 nm左右,电镜技术开始在各个学科领域内得到广泛应用。我国在50年代末期开始研制电镜,成为少数几个生产国之一。

60~80年代初期,电镜性能已达到了完善的程度,特别是在分辨率及超高压方面发展极快。现在,一台高性能透射电镜的点分辨率已接近0.1 nm,最新推出的产品分辨率已达到

0.07 nm。电镜技术的飞速发展,给形态学研究提供了新的、可靠的手段,美国科学家首先利用高分辨率电镜拍摄到原子像,实现了人们早就向往的对原子像和晶格像的观察。

80 年代中期,由于压电传感器的发展,使得机械探针的定位性增强,促成了扫描探针显微镜(scanning probe microscope,简称 SPM)的发明。SPM 是利用探针在样本表面扫描、观察物质结构的一类显微技术的总称,其基本原理是建立在量子力学和压电材料技术基础之上的。应用 SPM 观察物体,其分辨率可达 0.005 nm 的水平,而且可以直接对样本进行观察,使原子、小分子的结构一目了然,其结果几乎超出人们的想象,应用范围之广也出乎人们的意料。

电子显微镜从其诞生之日起就受到世人注目,经过半个多世纪的发展,电子显微镜技术已成为科学领域内不可缺少的研究手段及工具,对科学研究起着重要作用。就当今的科学发展而言,生物电子显微镜又是一门年轻的、全新的学科,是理工农医完美结合的边缘学科之一。在生命科学领域内,电子显微镜技术已成为最重要的研究方法之一,并对生命科学的发展作出了极为重要的贡献。随着现代医学、细胞超微结构及分子生物学等学科的迅速发展,电子显微镜技术也正向更微细结构、生物分子及原子水平发展。电镜的种类和型号迅速更新,出现了更适合生物医学研究用的新型电镜,随之而来的是电镜技术的完善与提高,可以毫不夸张地说,几乎在生命科学的所有学科研究领域内,都已应用或将要应用到电子显微镜技术。90 年代初发展起来的纳米学科,2000 年风靡全球的纳米热,均是电子显微镜技术的再创辉煌。

上 篇

电子显微镜原理及其 在生物学中的应用