

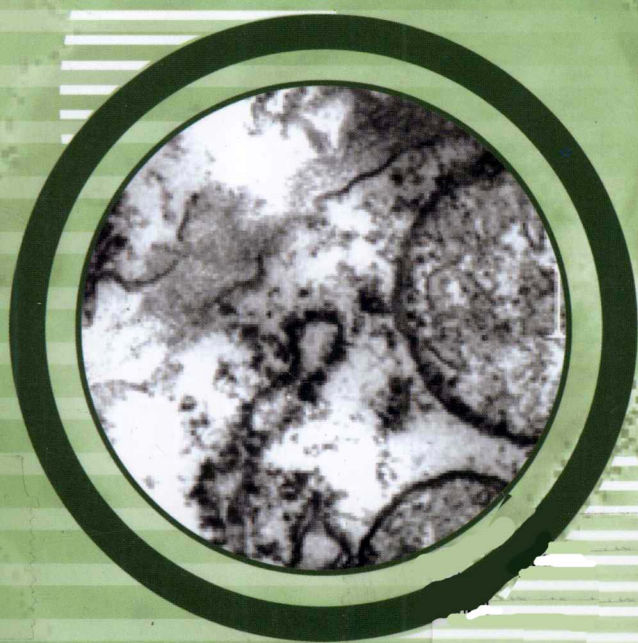
全国高等农林院校研究生教材

超微细胞化学的原理与技术

CHAOWEIXIBAO

HUAXUEDEYUANLIYUJISHU

周竹青 编著



科学出版社

全国高等农林院校研究生教材

超微细胞化学的原理与技术

周竹青 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是在华中农业大学研究生课程“生物电镜技术与超微细胞化学”和生物学国家理科基地班课程“细胞化学”讲义的基础上编写而成的。全书分为上、下两篇,共10章。上篇系统介绍了超微细胞化学的常用仪器和样品制备技术,包括透射电子显微镜、扫描电子显微镜、扫描隧道显微镜、原子力显微镜和激光共聚焦显微镜等的工作原理和样品制备技术;另外,还对分析电镜技术、冷冻电镜技术、冷冻电镜三维重构技术等作了简单说明。下篇详细介绍了超微细胞化学的原理和技术,同时举例说明了相应技术在农业和生命科学研究中的应用,主要包括生物大分子及离子的常规定位技术、免疫电镜细胞化学技术、电镜放射自显影技术、显微细胞化学概述、超微和显微细胞化学在分子生物学中的应用等内容。

本书既可作为农林院校、医学院校和综合性大学研究生生物技术相关课程的教材,也可作为相关专业本科生细胞生物学等课程的参考书,同时还可作为农学、生物学科教师、科研人员及研究生的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

超微细胞化学的原理与技术/周竹青编著. —北京:科学出版社,2011.3
(全国高等农林院校研究生教材)
ISBN 978-7-03-030307-3

I. ①超… II. ①周… III. ①细胞学:生物化学-研究生-教材
IV. ①Q26

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 023099 号

责任编辑:丛楠 刘晶 / 责任校对:李影
责任印制:张克忠 / 封面设计:北极光视界

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年3月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011年3月第一次印刷 印张:16

印数:1—2 500

字数:370 000

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

随着细胞生物学和分子生物学等学科的迅速发展及相互渗透,细胞生物学研究的新技术、新方法不断涌现,推动着生命科学研究的迅速发展。超微细胞化学作为细胞生物学的重要技术,能把细胞超微结构及其原位发生的生化反应有机地结合起来进行研究,以揭示细胞超微结构及其功能之间的内在联系,是一门生物学、化学和物理学的交叉学科。掌握超微细胞化学的原理和技术,对于从事生命科学基础和应用研究是十分必要的。随着后基因组时代的来临,对生物大分子的精细结构和相关功能进行系统研究成为必然趋势。利用超微细胞化学的一系列新技术、新方法,能使研究者借助生物电子显微技术原位显示生物大分子分布情况,从而进行定性、定位和定量的分析,还能进一步分析其超微结构和功能,进而解释生命现象的本质。

自 20 世纪 80 年代以来,华中农业大学一直面向全校研究生开设“生物电镜技术”课程,重点介绍电子显微镜原理、操作和维护及细胞的超微结构。因其内容较全面、技术实用性较强,受到一致好评。为了适应生命科学的迅速发展,满足研究生教学和科研需要,我们对讲义进行了不断的修改,在延续原来教学内容的基础上,把重心放在生物电镜在生命科学中的应用方面,编撰成书。希望本书能成为一本完整介绍超微细胞化学原理与技术的教材。

全书共分为两篇。上篇系统介绍超微细胞化学的常用仪器和样品制备技术,包括透射电子显微镜和扫描电子显微镜的结构原理及样品制备,新兴的电子显微技术,扫描隧道显微镜、原子力显微镜、激光共聚焦显微镜的结构原理和在生命科学中的应用等。下篇重点介绍生物大分子(蛋白质、核酸、复合糖、脂类)及离子(阳离子、阴离子等)的常规细胞化学定位技术、超微免疫电镜细胞化学技术、电镜放射自显影技术和超微细胞化学在分子生物学中的应用等内容。另外,对显微细胞化学的原理和技术也作了简单介绍。本书的特色在于将理论教学与科研实际结合,有可操作性;介绍了最新的技术和方法,有前瞻性;直接服务于研究生的教学和科学研究,有适用性。书中附有大量图表和照片,使本书图文并茂,能加深读者的感性认识。附录中主要归纳了一些常用的试剂配方,以便于查阅。

本书编写过程中得到“华中农业大学研究生公共基础课程教学用书项目”和“华中农业大学研究生教育创新工程项目”资助,同时得到华中农业大学研究生处和生命科学技术学院相关领导及同仁的鼎力支持,在此致以真诚谢意。本书在编写过程中参考了国

内外一些生物电子显微镜技术方面的书籍和文献，并引用了部分文献和照片，在此对原作者表示衷心感谢。本实验室毕业研究生王利凯、宋学芳、邓祥宜和李继伟提供了部分科研照片；研究生徐永向、刘阳、郭月静、杨文丽、徐秋涛为本书的编撰做了部分工作。同时感谢科学出版社编辑对此书出版所付出的辛勤劳动。

由于本书首次出版，加上编者水平有限，难免存在许多不足，敬请同行专家批评指正，我们将在今后的教学和科研中不断补充和完善。

编 者

华中农业大学生命科学技术学院

2010年10月8日于武昌南湖

目 录

前言

上篇 超微细胞化学的常用仪器和样品制备技术

第一章 绪论	3
第一节 细胞化学的定义和发展	3
一、细胞化学的定义	3
二、细胞化学的发展	3
第二节 超微细胞化学的研究内容	4
一、生物超微结构的定义	4
二、超微细胞化学的定义	5
三、超微细胞化学的研究内容	5
第三节 超微细胞化学在生命科学研究中的应用	6
一、生物学	6
二、农林科学	6
三、医学科学	6
第二章 透射电子显微镜的结构原理和样品制备技术	7
第一节 透射电子显微镜的发展过程	7
一、从光学显微术到电子显微术	7
二、电子显微镜发展简史	8
三、电子显微镜的分类	10
四、电镜技术发展概况	11
第二节 透射电子显微镜的结构原理	12
一、透射电子显微镜的成像原理	12
二、提高生物样品反差的方法	17
三、透射电子显微镜的结构	18
第三节 透射电子显微镜样品制备与观察	23
一、取样	23
二、固定	24
三、脱水	27
四、渗透	28
五、包埋	28
六、切片	33
七、电子染色	40
八、透射电镜观察	43

第三章 扫描电子显微镜的结构原理和样品制备技术	44
第一节 扫描电子显微镜的结构原理	44
一、扫描电子显微镜的原理	44
二、扫描电子显微镜的结构	45
第二节 扫描电子显微镜样品的制备	48
一、常规制样方法	48
二、直接观察样品的制备方法	53
第三节 环境扫描电镜技术简介	55
一、环境扫描电镜概述	55
二、环境扫描电镜结构特点	55
三、环境扫描电镜在生命科学中的应用	56
第四章 新型的电子显微技术	58
第一节 分析电子显微镜技术	58
一、分析电子显微镜概述	58
二、分析电子显微镜 X 射线显微化学原理	60
三、分析电子显微镜样品制备步骤	61
四、分析电子显微镜的应用	62
第二节 冷冻电子显微镜技术	62
一、生物样品的快速冷冻	63
二、冷冻固定方法简介	63
三、冷冻置换	65
四、冷冻超薄切片技术	67
五、冷冻断裂和蚀刻技术	71
第三节 冷冻电子显微镜三维重构技术	73
一、冷冻电子显微镜三维重构技术发展过程	73
二、冷冻电子显微镜三维重构原理	75
三、几种常用的电子显微镜三维重构技术及其应用	76
第五章 其他相关仪器的结构原理和应用	81
第一节 扫描隧道显微镜	81
一、扫描隧道显微镜结构原理	81
二、扫描隧道显微镜的生物样品制备	82
三、扫描隧道显微镜在生命科学中的应用	83
第二节 原子力显微镜	85
一、原子力显微镜工作原理	85
二、原子力显微镜样品的制备	87
三、原子力显微镜在生命科学中的应用	88
第三节 激光共聚焦显微镜	91
一、激光共聚焦显微镜成像原理	91
二、激光共聚焦显微镜基本特征	92

三、激光扫描共聚焦显微镜图像模式	92
四、标本制备和图像采集	94
五、激光共聚焦显微镜在生命科学中的应用	96

下篇 超微细胞化学的原理和技术

第六章 生物大分子及离子的常规超微细胞化学技术	105
第一节 蛋白质超微细胞化学定位	105
一、结构蛋白的定位技术	105
二、功能蛋白——生物酶的定位原理和方法	106
第二节 主要生物酶的超微细胞化学定位	112
一、水解酶	112
二、氧化还原酶	116
三、其他酶类	119
四、细胞中一些重要细胞器的标志酶定位	121
第三节 核酸的超微细胞化学技术	123
一、乙酸双氧铀染色法	123
二、孚尔根-六亚甲四胺银染色法	123
三、孚尔根-席夫-乙醇铀染色法	124
四、乙酸双氧铀-EDTA 染色法	124
五、核酸酶抽提定位法	125
第四节 糖类的超微细胞化学技术	126
一、过碘酸氧化法	126
二、静电结合法	127
三、凝集素显示细胞中糖类	129
四、淀粉酶消化法检测糖原	130
第五节 脂类的电镜细胞化学技术	130
一、保存脂类的包埋剂	130
二、保存胆固醇的毛地黄皂苷法	130
三、保存磷脂的铁氰化钾法	131
第六节 细胞中相关离子定位技术	131
一、阳离子的超微细胞化学定位	131
二、阴离子的超微细胞化学定位	133
三、自由基的超微细胞化学定位	133
第七章 免疫电镜细胞化学技术	136
第一节 免疫电镜细胞化学原理	136
一、免疫电镜细胞化学发展过程	136
二、免疫电镜细胞化学相关概念	136
三、免疫电镜细胞化学原理	139
第二节 免疫电镜细胞化学制样方法	142

一、样品的前期处理	142
二、样品包埋	143
第三节 胶体金标记免疫电镜技术	145
一、胶体金的性质	145
二、胶体金的制备	146
三、蛋白质-胶体金的制备	148
四、胶体金标记免疫电镜制样	151
第四节 酶标记免疫电镜技术	155
一、酶标记抗体方法	155
二、酶标记免疫电镜技术制样举例	157
第五节 铁蛋白标记免疫电镜技术	157
一、铁蛋白制备	157
二、铁蛋白和抗体的结合	158
三、铁蛋白标记抗体的纯化	159
四、铁蛋白标记抗体的应用	159
第六节 其他免疫电镜技术和发展	160
一、冷冻超薄切片免疫电镜技术	160
二、冷冻蚀刻免疫电镜技术	162
三、扫描免疫电镜技术	163
四、免疫细胞化学与图像分析简介	165
第八章 电镜放射自显影技术	167
第一节 电镜放射自显影技术的原理	167
一、放射性同位素	167
二、核射线	167
三、核乳胶	168
四、有关参数	168
五、电镜放射自显影基本原理	169
第二节 电镜放射自显影的样品制备	170
一、放射自显影样品制备过程和电镜观察	170
二、图像的分析	176
三、放射性防护	177
第三节 电镜放射自显影技术在生命科学中的应用	178
第九章 显微细胞化学概述	180
第一节 常规细胞化学技术	180
一、核酸的细胞定位	181
二、蛋白质的细胞定位	182
三、碳水化合物的细胞定位	183
四、脂类的细胞定位	184
五、无机物质的细胞定位	185

第二节 酶细胞化学	187
一、过氧化物酶	187
二、细胞色素氧化酶	188
三、琥珀酸脱氢酶	188
四、碱性磷酸酶	189
五、酸性磷酸酶	189
六、三磷酸腺苷酶	190
第三节 免疫细胞化学技术	190
一、免疫胶体金细胞化学	190
二、免疫胶体铁细胞化学	193
三、免疫酶细胞化学	193
四、免疫荧光细胞化学	195
第十章 超微和显微细胞化学在分子生物学中的应用	198
第一节 生物大分子展层技术	198
一、蛋白质大分子展层和电镜观察	198
二、核酸大分子展层和电镜观察	200
第二节 DNA 及 DNA 结合蛋白的电子显微术	202
一、扫描电镜和扫描透射电镜下的 DNA 及 DNA 结合蛋白成像	202
二、透射电镜下的 DNA 及 DNA 结合蛋白成像	203
第三节 核酸和核蛋白复合物的快速印迹法	203
一、电镜载网的制备	203
二、样品制备及电泳	203
三、核蛋白复合物转移固定到载网上	204
四、载网旋转金属投影及电镜成像	204
第四节 电镜原位核酸分子杂交的原理与技术	205
一、电镜原位杂交的种类	206
二、电镜原位核酸分子杂交制样步骤概述	206
第五节 电镜原位核酸分子杂交技术的应用	209
一、应用生物素标记 DNA 探针电镜原位杂交技术	209
二、应用地高辛标记 rRNA 探针的电镜原位杂交技术	211
第六节 显微细胞化学在分子生物学中的应用	212
一、光镜水平的核酸分子原位杂交	212
二、原位 PCR 方法	218
参考文献	220
附录 I 常用试剂的配制	225
附录 II 缩略语对应表	232
图版	

上篇 超微细胞化学的常用 仪器和样品制备技术

第一章 绪论

第二章 透射电子显微镜的结构原理和样品制备技术

第三章 扫描电子显微镜的结构原理和样品制备技术

第四章 新型的电子显微技术

第五章 其他相关仪器的结构原理和应用

第一章 绪 论

第一节 细胞化学的定义和发展

一、细胞化学的定义

细胞化学 (cytochemistry) 是研究细胞的化学成分及其在细胞活动中的变化和定位的科学。它在不破坏细胞形态结构的情况下, 用生化和物理技术对各种组分做定性和定量分析, 研究其动态变化, 了解细胞代谢过程中各种细胞组分的作用。而组织化学 (histochemistry) 是指以常用的组织化学技术对细胞内主要化学成分和活性的一般性的研究。细胞化学和组织化学的发展是密不可分的, 它们都建立在细胞学、组织学及生物化学的基础上。对细胞中的不同组分进行区别着色是细胞化学中最基础的工作。

二、细胞化学的发展

19 世纪初, 法国植物学家拉斯帕伊在研究禾本科植物受精作用时, 首次发现了淀粉的碘反应。此后他还建立了蛋白质的黄色反应、硫酸对于糖醛及蛋白质醛基的反应等鉴定方法, 因此被认为是组织化学的创始人。

1867 年, 珀尔斯用普鲁士蓝显示细胞中的铁质。1868 年, 克文克用黄色硫化胺溶液与细胞中的铁质反应生成黑色的硫化亚铁, 进行显色反应鉴定细胞中的铁质。1844 年, 米利翁叙述了蛋白质反应中一种测定酪氨酸的方法。1862 年, 本克首次将苯胺作为组织化学染料应用于生物组织结构的研究, 这是组织学方法上的一次革命。在 1868 年和 1872 年, 克莱布斯和施特鲁韦分别通过实验显示出组织中酶的存在。1895 年, 埃利希用“纳笛”反应首次显示细胞色素氧化酶。

20 世纪 40 年代, 随着细胞形态学和生物化学的发展, 组织化学、细胞化学迅速发展。1936 年, 比利时组织化学家利松的《动物组织化学》一书总结了组织化学的优缺点及发展方向, 把组织化学推向高潮。

当前, 发展比较快的是定量细胞化学, 其目的是对细胞、细胞组分和细胞产物在其原位上和生活情况下进行定量化学分析, 主要包括细胞光度学和原位定量测量两个方面。细胞光度学是对细胞内某些化学物质在光学上的数量进行分析, 最常用的方法有吸收量度法、荧光测定法、干涉量度法、反射量度法等。原位定量测量包括对切片厚度的测定、对一个特定细胞化学反应区域的定量测量, 以及对放射自显影颗粒的计数和自动影像分析。定量细胞化学虽是细胞化学发展的主要方向, 但仍有不少困难。有关仪器方面的问题已逐渐得到解决, 但在固定细胞、反应的化学计算方法和反应产物的弥散等方面仍存在不少困难。

原位细胞化学所用的方法多是把单层的培养细胞或冰冻切片放在一定溶液内温育,使待测的物质与染料或试剂发生专一性的反应,在原位上直接形成不溶解的产物,用光学显微镜观察产物颜色,或用荧光显微镜观察产物荧光,分析其在细胞内的分布规律和功能。细胞化学对酶的研究一般是将薄的冰冻切片用适宜的底物温育,来测定酶在细胞内的位置。

免疫细胞化学是用标记的抗体测定细胞内的抗原,在光学显微镜水平下找出抗原的位置,研究其分布特征和功能的方法。直接显示法的主要步骤是先将组织骤冷,制成薄的切片,然后用偶联的抗血清染色。常用的是间接显示法,其原理是用荧光染料或一种酶标记的第二抗体来加强第一抗原-抗体反应。免疫细胞化学方法在细胞生物学中日益显示出重要性,许多细胞骨架蛋白,如微管蛋白、肌动蛋白、调钙蛋白等均可用免疫细胞化学原理找到它们在细胞内的位置。随着生化提纯的蛋白质的增多,免疫细胞化学还会得到更广泛的应用。

显微细胞化学样品的观察是在光学显微镜下进行的,由于受到光学显微镜放大倍数和分辨率的影响,使显微细胞化学的应用受到一定程度的限制。20 世纪 40 年代随着电子显微镜的出现及人们对细胞超微结构的认识,建立在细胞超微结构基础上的超微细胞化学技术得到了迅速发展,并且广泛地应用到对细胞结构和功能的研究中。

第二节 超微细胞化学的研究内容

一、生物超微结构的定义

人们对生物结构的认识经历了器官、组织、细胞和分子 4 个水平,其中各种仪器和设备,如光学显微镜、电子显微镜、X 射线衍射仪等发挥了重要作用。目前,人们借助各种设备能够从 0.1 mm 的解剖学水平到 1 nm 的原子和分子水平对生物体结构进行全面研究(表 1-1)。

表 1-1 生物结构的不同层次水平

量 度	范 畴	结 构	方 法
0.1 mm (100 μm) 以上	解剖学	器官	肉眼和简单放大显微镜
10~100 μm	组织学	组织	各种光学显微镜
0.2~10 μm (200 nm)	细胞学	细胞、细菌	X 射线显微镜
1~200 nm	亚显微形态学	细胞成分	偏光显微镜、电子显微镜
	超微结构	病毒	
< 1 nm	分子和原子结构	原子的排列	X 射线衍射仪; 扫描隧道显微镜、原子力显微镜等

自从 1932 年德国的鲁斯卡 (Ruska) 和诺尔 (Knoll) 设计并建造了第一台电子显微镜以来,人们在电子显微镜下能清楚地观察到细胞的超微结构,甚至一些分子结构。超微结构 (ultrastructure) 一般指在普通光学显微镜下观察不能分辨清楚的细胞内各种微细结构。“超微结构”一词,严格地讲是指分子水平的结构。目前对介于细胞水平和大分子水平之间的结构,一般称为亚显微结构 (submicroscopic structure) 或亚细胞结

构 (subcyto-structure)。但目前一般书刊上所称的亚显微结构、亚细胞结构和超微结构, 并无严格的界限。人们往往将普通光镜分辨界限以下的结构笼统地称为超微结构。超微结构常用的单位是微米 (μm) 和纳米 (nm)。

生物结构的不同层次水平和选择的观察方法见表 1-1。

知识点 1-1 微观度量衡尺度换算

$$10^{-1} = \text{d}(\text{deci-}) = \text{分}$$

$$10^{-3} = \text{m}(\text{milli-}) = \text{毫}$$

$$10^{-9} = \text{n}(\text{nano-}) = \text{毫微} = \text{纳}$$

$$10^{-15} = \text{f}(\text{femto-}) = \text{毫微微} = \text{飞}$$

$$10^{-2} = \text{C}(\text{centi-}) = \text{厘}$$

$$10^{-6} = \mu(\text{micro-}) = \text{微}$$

$$10^{-12} = \text{p}(\text{pico-}) = \text{微微} = \text{皮}$$

$$10^{-18} = \text{a}(\text{atto-}) = \text{微微微} = \text{阿}$$

二、超微细胞化学的定义

超微细胞化学 (ultramicro-cytochemistry) 又称电镜细胞化学 (electron microscopic cytochemistry), 它是在显微细胞化学基础上发展起来的、在超微结构水平上的细胞化学。它利用细胞中被研究物质能够选择性地与某些化学试剂发生特异的反应, 形成特征性的、不溶的电子致密物的原理, 通过电镜观察、识别和定位该物质在细胞超微结构中的分布, 从而研究该物质在细胞生命活动中的作用。超微细胞化学能把细胞超微结构及其原位发生的生化反应有机地结合起来进行研究, 能揭示细胞的超微结构及其功能之间的内在联系。超微细胞化学内容涉及生物学、化学和物理学等学科, 是一门生物学、化学和物理学的交叉学科。

三、超微细胞化学的研究内容

超微细胞化学涉及的内容很多, 包括: 细胞中无机物定性、定量及定位的原理和方法; 细胞有机物质的定性、定量及定位的原理和方法; 生物大分子的结构与功能关系研究等。具体技术有: ①电镜酶细胞化学技术; ②细胞各成分的检出技术; ③示踪细胞化学技术; ④特殊染色法; ⑤放射自显影技术; ⑥免疫细胞化学技术; ⑦X 射线微区分析技术; ⑧其他细胞化学技术, 包括扫描电镜细胞化学技术、超高压电镜细胞化学技术等。

超微细胞化学技术从原理上可以分为如下几种。

(1) 沉淀法。当细胞内的物质与适当的试剂 (如酶与底物) 作用, 或者某些金属离子 (如焦锑酸和钙离子) 彼此间存在化学亲和性时, 能形成不溶性的产物, 可以用电镜检出。根据观察到的显色电子致密物, 能够判断这种物质 (如酶) 的存在及其在细胞中的确切定位。

(2) 免疫电镜细胞化学法。组织和细胞内的各种大分子多数具有抗原性, 抗原可以借助于电子不透明的标记物 (如铁蛋白、酶和胶体金等) 标记的抗体而鉴别出来。

(3) 酶学法。细胞内某些物质本来就是电子致密物, 用某种专一酶 (或特异的溶剂) 能将其分解掉, 原有的电子致密物从细胞电镜图像中消失。用这种方法能够反推细胞物质的存在。例如, 在组织固定之前先用 RNA 酶、DNA 酶或蛋白酶消化, 然后特异染色, 在电镜下相应的空白区, 就反证了 RNA、DNA 或蛋白质在细胞中的存在和定位。

超微细胞化学反应应该满足下列基本要求。

- (1) 反应试剂与细胞内被测物质发生的反应具有特异性。
- (2) 反应不损坏或破坏细胞本身的微细结构。
- (3) 反应的最终产物为电镜能观察到的电子致密物,一般为细小的、稳定的、颜色很深的沉淀物,在细胞原位沉淀;在制样过程中不会改变自己的位置。
- (4) 反应具有可重复性。

第三节 超微细胞化学在生命科学研究中的应用

一、生物学

超微细胞化学可用于动物和植物细胞超微结构研究及功能分析。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更深入的研究,观察到了过去无法看清楚的组织超微结构。在细胞生物学中,超微细胞化学能用于研究细胞内各种细胞器的超微结构、细胞骨架系统和生物膜的超微结构;促进了人们对细胞的结构及其功能(如细胞通讯与运输、细胞分裂与分化、细胞增殖与调控等)的研究。

超微细胞化学和电镜技术还可以应用到病毒、细菌和支原体等的超微结构与功能分析,以及病毒发现和识别方面。许多新病毒和类病毒等就是利用电镜发现的。电镜也为病毒的分类提供了最直观的依据。

在分子生物学中,超微细胞化学能用于核酸和蛋白质大分子的超微结构研究,并对其亚显微测量,还能用于染色体超微结构、DNA 转录为 mRNA 的过程、核酸分子杂交过程等研究。电镜技术与免疫学技术相结合产生的免疫电镜细胞化学技术,可以对细胞表面及细胞内部的抗原进行定位,用于研究免疫球蛋白的分布和功能、蛋白质在细胞中的时空分布变化等。

二、农林科学

超微细胞化学还可应用于植物保护、土壤改良和成分分析、品种的分类与鉴定和动物疾病的诊断与防治等方面。

三、医学科学

超微细胞化学可用于超微病理学研究,如病变细胞超微结构变化、病理学的分子基础等。在临床医学中,可用于疑难病症的诊断与治疗,以及对病毒性肝炎、肾病、血液病和肿瘤的分类及诊断。

总之,超微细胞化学与生物学、医学和农林科学关系密切,是生物学、医学和农学类研究生与本科生的一门重要技术课程。学习该课程,对拓宽科研视野、多途径解决课题主攻点具有重要意义。

第二章 透射电子显微镜的结构原理和样品制备技术

电子显微镜 (electron microscope, EM) 简称电镜, 1932 年由 Ernst Ruska 设计, 被誉为“20 世纪最重要的发明之一”。目前透射电子显微镜的分辨本领已达到 0.14 nm, 比光学显微镜提高了 1000 倍, 甚至可以看到核酸和蛋白质等生物大分子及其组成基本单位——分子和原子。本章重点介绍透射电子显微镜结构原理和常规电镜样品制备技术。

第一节 透射电子显微镜的发展过程

一、从光学显微术到电子显微术

1665 年 Robert Hooke 发明了第一台光学显微镜。经过 300 年的不断地发展, 人们已制造出许多类型的光学显微镜, 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。这些光学显微镜所用的光源基本上是在可见光范围之内, 能够分辨大于 0.2 μm 的物体细节, 优于人眼 500 倍。光学显微镜的问世, 对生物科学、农学和医学的研究起到了巨大的推进作用。但由于受到光波特性的限制, 光学显微镜的分辨率比较低, 对细胞精细结构的观察受到限制。

分辨率 (resolution) 或称“分辨本领”, 是显微镜分辨细微结构的本领, 通常用被辨认的邻近两质点的距离表示。能被辨认的两点距离越小, 表示分辨本领越大。一般将眼睛正常的工作距离定为 25 cm, 并称之为“明视距离”。当物体离眼 25 cm, 即与眼明视距离相等时, 眼睛可分辨出相距 0.2 mm 的两个点, 因此将 0.2 mm 定为人眼的分辨率。

知识点 2-1

肉眼的分辨率: 0.2 mm (距离 25 cm, 明视)

光镜的分辨率: 0.2 μm

电镜的分辨率: 0.2 nm

分辨率公式为

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \times A}$$

式中, D 为分辨率; λ 为光波的波长; N 为介质折射率; $N \times A$ 为物镜孔径数。

为了提高人眼的分辨能力, 可设法将物体放大。当用光学显微镜放大物体时, 由于可见光的平均波长约为 500 nm, 当物体两点间距离小于光波的半波长 (250 nm) 时, 光波产生衍射现象, 使两点不能被辨认。因此, 用光学显微镜所辨认的两点的最小距离是 0.2 μm , 也就是光学显微镜的极限分辨率。为了进一步提高分辨率, 人们选择了波