

生物医学 电子显微镜技术

主编 程 时 彭学敏

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

生物医学电子显微镜技术

主编 程 时 彭学敏

编写人员（依姓氏笔划）

朱 宜（北京大学）

程 时（北京医科大学）

彭学敏（北京医科大学）

樊景禹（北京医科大学）

北京医科大学
中国协和医科大学

联合出版社

(京)新登字 147 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物医学电子显微镜技术/程时, 彭学敏主编. —北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 7

ISBN 7-81034-661-X

I. 生… II. ①程… ②彭… III. 生物检验-电子显微镜-应用 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (96) 第 15920 号

责任编辑: 慕海燕

责任印制: 郭桂兰

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

北京怀柔东晓印刷厂印刷 新华书店经销

※ ※ ※

开本: 850×1168 1/32 印张: 8.25 字数: 214 千字

1997 年 7 月第 1 版 1997 年 7 月北京第 1 次印刷 印数: 1-2000 册

定价: 12.60 元

本书由
北京医科大学科学出版
基金资助出版

内容提要

本书是在我校开设“生物医学电镜技术”研究生课程二十余年及郑富盛教授所写相应教材的基础上编写的。包括电镜原理、透射及扫描标本制备与电镜进展，既有基本操作技术又有技术的进展；既有国内外先进技术又有本单位廿余年的实践经验。理论部分深入浅出，技术操作具体可行。可作为生物医学专业本科及研究生教材及细胞生物学、电镜工作者参考用书。

目 录

第一篇 电子显微镜方法

第 1 章 电子显微镜的基础知识.....	(1)
1.1 电子显微镜的发展过程	(1)
1.1.1 光学显微镜的局限	(2)
1.1.2 电子显微镜的产生基础	(3)
1.1.3 电镜中的信号物质	(8)
1.1.4 电镜的发展概况	(8)
1.2 电子透镜的光学参量和基本公式.....	(10)
1.3 电子透镜的聚焦性能.....	(12)
1.3.1 静电透镜.....	(12)
1.3.2 磁透镜.....	(15)
1.4 电子透镜的像差.....	(19)
1.5 景深和焦深.....	(25)
第 2 章 透射电子显微镜	(29)
2.1 透射电镜的基本原理.....	(29)
2.2 透射电镜的组成结构.....	(30)
2.2.1 照明系统.....	(30)
2.2.2 样品室.....	(36)
2.2.3 成像系统.....	(37)
2.2.4 观察和记录系统.....	(40)
2.2.5 真空系统.....	(41)
2.2.6 其他.....	(45)
2.3 透射电子像的衬度.....	(45)

2.3.1	振幅衬度——散射“吸收”衬度	(45)
2.3.2	明场和暗场成像方法	(47)
2.3.3	相位衬度	(49)
2.4	电镜中的电子衍射	(50)
2.5	透射电子像的分辨率	(53)
2.6	透射电镜的使用	(56)
第3章	扫描电子显微镜	(60)
3.1	扫描电镜的基本原理	(60)
3.2	扫描电镜的组成结构	(62)
3.2.1	照明系统	(62)
3.2.2	扫描系统	(67)
3.2.3	聚焦系统	(68)
3.2.4	探测系统	(70)
3.2.5	显示系统	(72)
3.2.6	其他	(73)
3.3	扫描电镜中的主要像衬度	(73)
3.3.1	二次电子像的衬度	(74)
3.3.2	背散射电子像的衬度	(78)
3.3.3	像衬度的模拟量处理	(82)
3.4	扫描电子像的分辨率	(82)
3.4.1	电子探针的直径	(83)
3.4.2	样品的衬度特性	(83)
3.4.3	信号电子的取样区	(84)
3.5	扫描电镜的使用	(85)

第二篇 标本制备方法

第4章	透射电镜样品制备技术	(88)
4.1	超薄切片法	(88)
4.1.1	取材	(89)

4.1.2	固定	(90)
4.1.3	清洗与脱水	(97)
4.1.4	浸透与包埋	(98)
4.1.5	超薄切片前的准备工作	(109)
4.1.6	超薄切片	(111)
4.1.7	超薄切片染色	(115)
4.1.8	和切片染色有关的几个方法介绍	(116)
4.2	负染色法	(119)
4.2.1	负染色剂	(120)
第5章	电镜细胞化学	(126)
5.1	电镜细胞化学原理	(126)
5.2	电镜细胞化学样品制备的一般过程	(126)
5.3	氧化还原酶	(127)
5.3.1	琥珀酸脱氢酶	(127)
5.3.2	细胞色素氧化酶	(129)
5.3.3	过氧化物酶	(130)
5.3.4	过氧化氢酶	(131)
5.3.5	单胺氧化酶	(132)
5.4	转移酶	(134)
5.4.1	胆碱乙酰转移酶	(134)
5.4.2	糖基转移酶	(135)
5.5	水解酶	(136)
5.5.1	乙酰胆碱酯酶	(137)
5.5.2	碱性磷酸酶	(137)
5.5.3	酸性磷酸酶	(138)
5.5.4	葡萄糖-6-磷酸酶	(140)
5.5.5	5'-核苷酸酶	(141)
5.5.6	硫胺素焦磷酸酶	(141)
5.5.7	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶	(142)

5.6	裂解酶—碳酸酐酶	(144)
第6章	免疫电镜方法	(146)
6.1	固定与包埋	(147)
6.1.1	固定	(147)
6.1.2	包埋 (环氧树脂)	(149)
6.2	免疫电镜标记物	(152)
6.2.1	胶体金 (胶体金制备, 蛋白质—胶体金 复合物制备)	(152)
6.2.2	铁蛋白	(156)
6.2.3	HRP	(157)
6.3	免疫电镜中的分子桥技术	(158)
6.3.1	种属特异抗体	(159)
6.3.2	蛋白 A	(159)
6.3.3	生物素与抗生物素蛋白	(159)
6.3.4	不标记抗体	(161)
6.4	免疫标记过程	(161)
6.4.1	包埋前法	(162)
6.4.2	包埋后法	(163)
6.5	非特异性与对照实验	(164)
6.5.1	非特异结合及其阻断方法	(164)
6.5.2	对照实验	(165)
6.6	扫描电镜免疫细胞化学	(166)
6.6.1	标记物及成像原理	(166)
6.6.2	样品制备	(168)
6.7	电镜原位杂交	(169)
6.7.1	原理	(170)
6.7.2	核酸探针	(170)
6.7.3	探针的标记	(170)
6.7.4	探针的显示	(171)

6.7.5	样品制备	(171)
6.7.6	杂交前的预处理	(173)
6.7.7	杂交	(173)
第7章 电镜方法中的冷冻技术		(176)
7.1	冷冻断裂与冷冻蚀剂	(176)
7.1.1	样品预处理	(177)
7.1.2	冷冻	(178)
7.1.3	断裂	(179)
7.1.4	蚀刻	(180)
7.1.5	喷镀	(181)
7.1.6	复型膜的分离与捞取	(182)
7.1.7	复型膜上裂面的命名	(182)
7.2	冷冻超薄切片	(183)
7.2.1	固定	(182)
7.2.2	包裹	(182)
7.2.3	冷冻保护	(183)
7.2.4	冷冻	(183)
7.2.5	切片	(183)
7.2.6	染色	(187)
7.2.7	制备冷冻超薄切片的干法	(187)
7.3	冷冻置换	(188)
7.3.1	冷冻	(188)
7.3.2	置换	(189)
7.3.3	包埋	(189)
7.3.4	切片和染色	(189)
第8章 电镜放射自显影		(190)
8.1	原理	(190)
8.2	样品的标记	(191)
8.3	乳胶涂布, 曝光与显影	(192)

8.4 分辨率 (194)

第9章 扫描电镜标本制备方法..... (196)

9.1 暴露 (196)

9.2 干燥 (197)

9.2.1 临界点干燥法 (197)

9.2.2 冷冻干燥法 (202)

9.3 表面导电层的复盖 (204)

9.3.1 金属真空喷镀法 (205)

9.3.2 金属离子溅射镀膜法 (207)

9.4 扫描电镜特殊标本制备方法 (209)

9.4.1 血管铸型法 (209)

9.4.2 分散细胞的扫描电镜标本制备方法 (212)

9.4.3 对组织切面的观察—割断法 (216)

9.4.4 表面标记技术 (免疫扫描电镜方法) (218)

第三篇 电子显微镜进展

第10章 电子探针 X 射线微区分析 (222)

10.1 特征 X 射线及连续 X-射线 (223)

10.2 仪器结构特点..... (225)

10.2.1 电子光学系统..... (225)

10.2.2 样品室..... (225)

10.2.3 谱仪..... (225)

10.3 标本制备方法..... (227)

10.4 超薄切片的定量 X-射线微区分析 (231)

10.5 X 射线微区分析在生物学中的应用 (234)

10.6 X 射线微区分析方法的优缺点 (235)

第11章 其它类型电子显微镜 (238)

11.1 能量损失谱仪..... (238)

11.2 俄歇电子谱仪..... (239)

11.3	扫描透射电子显微镜.....	(240)
11.4	超高压电子显微镜.....	(240)
附、第 12 章	扫描探针显微镜	(242)
12.1	扫描隧道显微镜.....	(243)
12.2	扫描力显微镜.....	(245)

第一篇 电子显微镜方法

“电子显微镜方法”(Electron Microscopy)是指利用电子与固体样品作用时所发出的信息,对样品进行微区观察和分析的一种方法学。本书将以透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope—简称 TEM)、扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope—简称 SEM)的基本原理和使用方法为主要对象,并适当介绍一些其他有关问题。

第 1 章 电子显微镜的基本知识

1.1 电子显微镜的发展过程^{[1][2]}

电子显微镜是生物医学工作者深入研究机体的超微结构及其功能的有力手段之一。所谓超微结构是指一般用光学显微镜不能分辨的细微形态结构(亚显微结构),直至生物大分子的结构。

人类对于机体的认识是从宏观到微观不断深化的。三个世纪以前,Hook 和 Van Leeuwenhock 发明的显微学延伸了我们的视觉。依靠光学显微镜,人们发现了机体的基本组成单位——细胞以及许多微生物。但是从那时起,在两个世纪内,光学显微镜并没有很大发展。直至 1878 年,Abbe 及其后的 Zernike 阐明了近代

光学的成像原理，指出了由于光波波长的局限，光学显微镜的分辨率在理论上不能优于 $0.2\mu\text{m}$ 。以后显微镜才有了变革，终于创立发明了电子显微镜。

1.1.1 光学显微镜的局限

显微镜的工作目标是对样品得到一个放大像，使原来肉眼看不见的细节能变得清晰可见。这里有两个基本的性能指标：一是分辨率极限，二是最高有效放大倍数。分辨率是分辨物体细节的最小极限。仪器可分辨的最小细节经适当放大后，变成人眼所能看清者。显然，如果超越了仪器分辨率的能力，即使进一步提高放大倍数，也不能让人清晰看到更小的细节。这种现象必须借助于光的波动学说来解释。

光学显微镜中所用的可见光源是波长为 $400\sim 800\text{nm}$ 的电磁波。波传播的特性之一是衍射。衍射就是波遇到障碍物时能偏离直线传播的性质。根据基础物理知识可知，由于实际光学仪器都有限制光束的“窗口”（光学显微镜中的“窗口”就是物镜边缘所限制的透光范围），它造成的衍射效应会使每个物点形成的像都是有所扩展的衍射光斑。靠得太近的像点彼此重叠起来，会使画面中的细节变得模糊不清。光学显微镜中还有一些像差（如球差和色差等）也会使像点展宽，但它们大多可以被矫正。所以衍射差就成了限制光学显微镜分辨率的唯一重要因素。

根据 Huygens-Fresnel 原理可以得出：一个物点所形成的衍射像斑是一种强度大部分（约 84%）集中在中心圆斑，而周围伴有强度逐渐减弱的若干离散同心环的衍射花样。中心圆斑（也称 Airy 圆斑）的半径 r_i 约为：

$$r_i \approx 0.61 \frac{\lambda_i}{\sin\theta_i}$$

式中 λ_i —显微镜像方所用介质中的光波长；

θ_i —物镜光阑（即物镜“窗口”）对像点所张的半角，亦称

像方物镜孔径角或电子束半张角。光学仪器中通常采用 Rayleigh 判据作为分辨率的标准，即当一个圆斑像的中心刚好落在另一相邻圆斑像的边缘上时，这两个像恰好能被分辨（图 1—1）。因此图像上可分辨的最小距离 δ_i 就是 Airy 圆斑的半径 r_i 。利用介质中的可见光波长 λ_i 与真空中可见光波长 λ 的关系 $\lambda_i = \lambda/n_i$ (n_i 是物镜像方所用介质的折射率)，以及显微镜物镜两侧有关参数的公式 $n_i \sin \theta_i = (n_0 \sin \theta_0) / M$ (n_0 是物镜与物之间介质的折射率， θ_0 是物镜光阑对物点所张的半角， M 是显微镜物镜所决定的图像放大倍数)，便可以把像上的分辨率 δ_i 转换成对物方样品的分辨率 δ_0 ：

$$\delta_0 = \frac{\delta_i}{M} = \frac{r_i}{M} = 0.61 \frac{\lambda}{n_0 \sin \theta_0} \quad (1-1)$$

$n_0 \sin \theta_0$ 通常被称为显微镜的数值孔径 (numerical aperture)。由 (1-1) 式得知，因可见光的波长局限在 400nm 到 800nm 之间，故若要缩小可分辨距离 δ_0 ，就必须增大数值孔径。但是 $\sin \theta_0 \leq 1$ ，为此只能靠提高 n_0 的值，具体做法可以是在载物片与物镜之间加油滴等。但 n_0 的最大值约为 1.5，最大张角 θ_0 约为 70° 。这样光学显微镜的最小分辨率极限接近 $0.2\mu\text{m}$ (即 200nm)。由于人眼的分辨率约为 0.2mm，因此要求光学显微镜的最高放大倍数也只是 1000 倍左右。以这个性能来衡量，便可得知用光学显微镜看不清真正的细胞膜、细胞器的微结构，也看不见病毒和大分子。

1.1.2 电子显微镜的产生基础

为了开发具有更高分辨能力的仪器，必须寻找更短波长的照明物质以及能对它实现聚焦、控制的“透镜”。以电子光学为作用原理的电子显微镜就是这样一种仪器。所谓电子光学是指研究和利用电子流的偏转、聚焦和成象规律的一门学科。它的基础是下列三项发现：（一）. J. J. Thomson (1872) 证明了电子的存在；（二）. L. de Broglie (1923) 关于物质的微粒、波动二象性的推论；

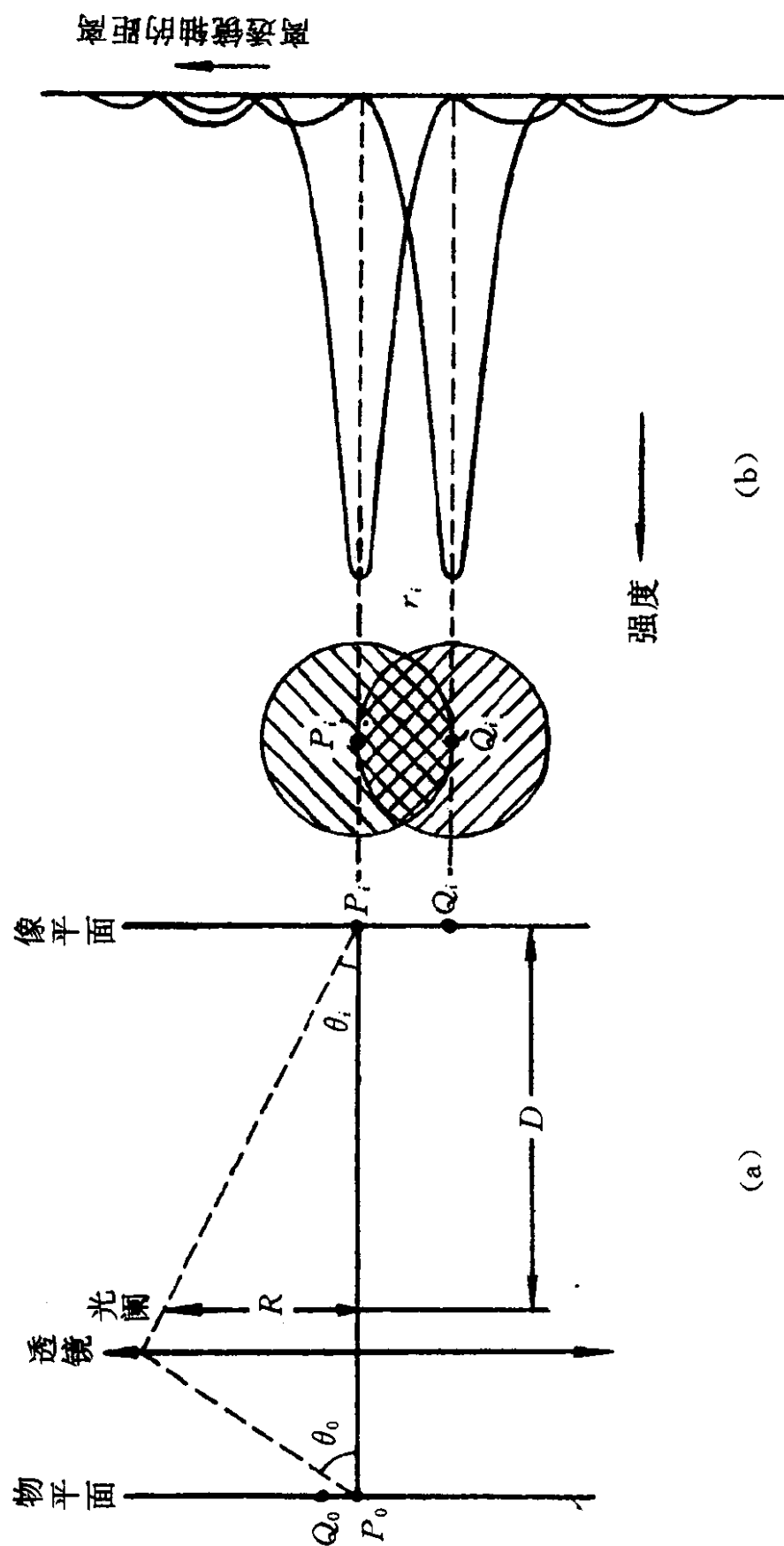


图 1—1 显微镜成像时的分辨率限制

(P_0 , Q_0 —相邻两物点, P_i , Q_i ——相邻两像斑, R —物镜光阑的半径。)

(三)、H. Busch (1926) 发现了轴对称分布的电、磁场对带电粒子的透镜作用。

首先来讨论电子显微镜中的照明物质—电子流。根据上述(一)(二)两项,我们可以把运动着的电子流看作一个电子波,它向电子运动的方向以匀速并随时间作正弦变化的方式前进。1927年 Davisson 和 Germer 发现的电子衍射现象更确定无疑地用实验证实了电子的波动性,并进而测定验证了 de Broglie 关系式:

$$P = h/\lambda \quad (1-2)$$

式中 h —Planck 常数;

P —电子动量;

λ —电子波长。

为了推算电子波长,我们假设质量为 m 、电荷为 $(-e)$ 的电子所具有的初速为零。当其通过一个电势从 0 变到 V_0 的区域后,速度便变为 v 。因此电子的动量 P 和动能 E 分别为: $P = mv$ 及 $E = \frac{1}{2}mv^2$ 。最后可以得出电子波长的表达式为:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meV_0}} \approx \frac{1.226}{\sqrt{V_0}} \quad (1-3)$$

式中 λ —电子波长, nm;

V_0 —电子的加速电压, V (伏特)。

应该指出,对于高速运动的电子,其质量将随速度的增加而增加。例如加速电压 $V_0 = 100\text{kV}$ 时,电子质量将发生 5% 的改变。为此必须考虑电子质量的相对论修正。修正后的公式为:

$$m = \frac{m_0}{\sqrt{1 - (\frac{v}{c})^2}} \quad (1-4)$$

式中 m_0 —电子的静止质量;

c —光速

$$\text{至此 (1-3) 可改写为 } \lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0eV_r}} \quad (1-3a)$$