

扫描电子显微镜技术及其在动物学上的应用

傅 湘 琦

(中国科学院动物研究所)

一、扫描电子显微镜的发展简史

扫描电子显微镜简称为扫描电镜 (SEM), 是近十年来迅速发展的一种大型精密电子光学

分析仪器。它的工作原理早在 1935 年就提出来了, 1940 年左右扫描电镜的分辨本领已略优于光学显微镜, 但离实用还有一段距离。因为

当时全部电镜工作几乎都集中在提高分辨本领和放大倍数方面,而扫描电镜工作则被延误了。但是,仅就分辨本领和放大倍数而言,光学显微镜和透射电子显微镜在1960年左右,基本上已能满足一般研究微观世界的要求。可是,在使用上却受到了严重的限制,光学显微镜的物象景的深度较浅;一般透射电镜只限于观察极薄的样品,实际上大多数电镜工作并不需要最高的分辨本领,据统计,透射电镜60%的工作用在4万倍以下。在直接观察自然的状态下,特别是凹凸不平的样品和金属的断面,农作物的生长情况、催化剂等,重要的是景深要长,观察范围要大,样品制作过程要简单,有时甚至需要立刻放入电子显微镜中进行观察,使电镜直接为现代科学技术及工农业生产服务。在透射电镜和电子探针的发展基础上,扫描电镜分辨本领有了很大的提高,同时又开展了大量应用的研究,于是得到了较快的发展,开辟了新的远景。1955年全世界只有2、3台扫描电镜,1965年第一批商品扫描电镜出现时,共约10台左右,到1970年已超过500台,1973年就达到2,500台以上,目前的数目则更多。分辨本领达100埃,目前在英、日、美、荷、德、法等国家均有商品生产,并已研制成X光成份分析等附件。我国1973年开始试制,1975年已有产品出厂。扫描电镜已成为冶金、矿物、半导体材料、物理、化学、电子学、医学、生物学、轻工业等各个现代科学技术领域及工农业生产中有力的分析工具。例如可以检查钢铁的质量、寻找大型钢件断裂的原因;确定矿石结构,判断矿藏的开采价值,检查制造半导体集成电路的各个工艺流程,以提高成品率;直接观察各种催化剂的微观形象,计算其比表面,以增加催化作用;观察癌细胞与正常细胞的差异,为分析致癌原因提供线索;确定钻井取得的各地层岩芯中的古生物种类,为寻找石油提供可靠依据;以及检查粮食、羊毛纤维、纸张的质量等等。此外,随着大规模集成电路的迅速发展和微波器件的需要,在并导体上刻制宽度为1,000埃或更细的线条图形,一般的光刻技术已无法解决。近年来扫描电镜工作颇

受重视,我国于1977年10月召开了第三次全国扫描电镜会,到会有93个单位163名代表参加,共提出报告和论文80余篇。随着我国医学、生物学的发展,扫描电镜将来的发展也是大有前途的。近年来国外发展了超高真空扫描透射电镜,分辨本领在实验室中已达到了3埃,相当于一透射电镜的水平,但这种仪器必须在超高真空(10^{-10} 托)下工作,使用范围、操作性能等远不如一般扫描电镜。

扫描电镜的另一发展方向是用电子计算机来处理信息,提高图象质量及分析速度、精度,以及提高仪器的自动化程度。

二、扫描电镜的基本原理及特点

1. 扫描电镜的工作原理

扫描电镜的工作原理如图1所示:

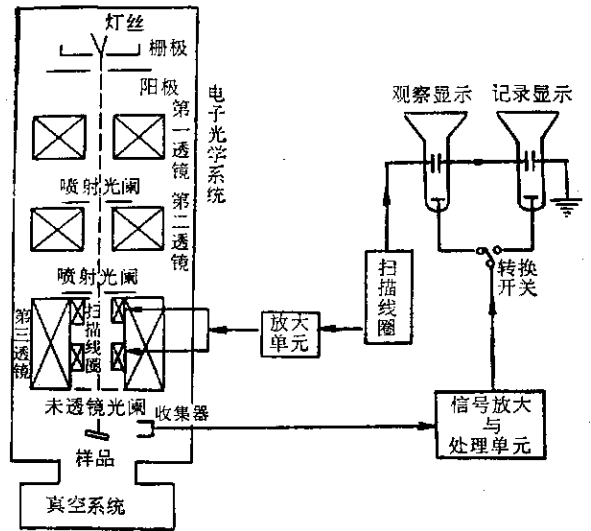


图1 扫描电镜的工作原理

从阴极发出的电子,经栅极调制,受1—30千伏高压加速,经过三个磁透镜三级缩小,形成一个直径小于100埃的高能电子束。电子束由二组扫描线圈调制,高速地打在样品的表面,在样品表面激发出二次电子、背散射电子、俄歇电子(Auger electron)、透射电子、吸收电子、内部电动势、X射线、阴极发光等一系列信息(图2、图3)。

各种电子信息经各种探测器接收,再经过几级放大和处理,随样品表面形貌、材料等因素

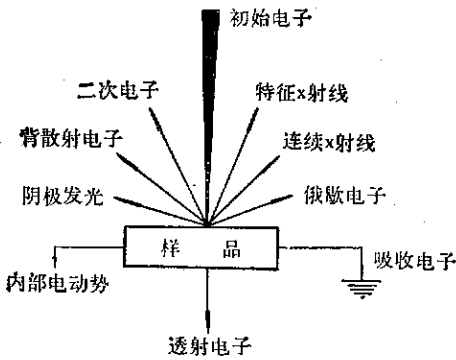


图2 电子束打在样品上产生的信息

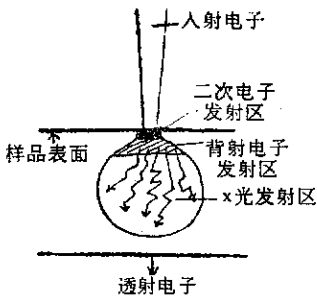


图3 样品对电子的散射作用

而变。电子信息经视频放大器进一步放大，调制显象管萤光屏的亮度。由于显象管偏转线圈和镜筒中扫描线圈中的扫描电流是严格同步的，所以由探测器逐点检取由样品表面各个部位的几何形状、化学成分和电位分布存在的差异，使电子束从样品表面扫描范围内各部位激发出来的电信号不同，而产生信息反差，于是在显象管萤光屏上形成反映样品表面形貌或元素分布的扫描电子图象。

两个显象管，一个是长余辉的，用以观察。一个是短余辉的，用以记录拍照，由一个转换开关加以选择。

扫描电镜通常是由电子光学系统、真空系统、电子信号收集、处理和显示系统、电源系统等几部分组成。为了对样品进行不同的测试，还可以配合有X射线谱仪（包括光谱仪和能谱仪），阴极发光系统，电子能量损失谱仪等各种不同用途的附件。

2. 扫描电镜的特点：

扫描电镜与光学显微镜和普通透射电子显

微镜比较，有下列主要特点。

(1) 电子束打在样品上产生的信息种类多，与多种附件配合使用，可选择接收各种信息，使其在观察样品形貌的同时进行微区成分分析和晶体学分析。也可以在萤光屏上显示样品所含元素的分布图象。

(2) 直接观察厚样品时，放大倍数在很宽的范围连续可调（一般在20倍到20万倍内）而且分辨率高。

3. 样品的活动自由度大，可在三维空间内作自由移动，故既能迅速地观察样品的全貌，又能观察样品微小区域的细节。在萤光屏上可以高低倍同时显示加以对比观察。

4. 景深大（也称为焦深），比光学显微镜的景深大几百倍，比电子显微镜的景深大几十倍。可以获得清晰的立体图象，具有明显的真实感。

5. 可以直接观察较大尺寸的样品表面，并且观察样品的视野也大。

6. 电子照射对样品的污染和损伤小，不象透射电镜电子束一直打在一点上，它是反复移动的，因此，对研究活体组织和细胞最为方便。

7. 扫描电镜与电子计算机联用可使打在样品表面上的电子束，激发产生的信息贮存起来，然后再连续使之复现，便可对样品的全部进行动态观察。

8. 扫描电镜因产生的信息种类较多，对样品可以获得多种性质的形貌象。也可以获得成分象和电子通道图。

9. 样品制备较为简单，一般来说不损坏样品，这对只有极少量的样品来说极为可贵。对大尺寸的样品的原始表面也可以直接进行观察。

三 生物样品的制备

在1962年 Boyde 和 Stewart 首先将生物组织用扫描电镜观察，先是看生物硬组织，之后用透射电镜样品制备法，固定、脱水，将各种生物组织在扫描电镜下进行观察，随扫描电镜性能的提高，样品制作也年年有进步。用于扫描电镜研究的样品，一般制备过程比较简单，通常只要在不导电的样品上，真空喷镀一层导电物质，

如金、金钯合金、铂、铬、铝、铜、银等，平时多采用金或金钯合金，因为这种材料性能稳定，镀层不易氧化，以保持样品表面处于一种恒定的电势。金属膜的最适厚度，取决于样品的性质及分辨率等。

1. 生物有机体、器官或组织等样品的一般制备法

当它们是比较完整而不用切片时，即放在仪器真空室内，小心除去水分，通常可用快速冰冻法除去样品中水分。或经普通石蜡切片法加以固定后酒精脱水。若生物组织本身较为坚硬，失水后能抗变形的，则用空气干燥法（电吹风、红外灯、干燥箱均可），样品干燥后，放在镀膜机的真空罩内，真空喷镀一层金属膜。

2. 生物切片观察法

用于普通光学显微镜的制片技术和透射电子显微镜所用的超薄切片技术等，所获得的生物制片，镀膜后，均可在扫描电子显微镜下观察。此点在方法学上还应进一步加以研究。

3. 生物的活体观察

由于活体样品在低流电子的冲击下可作为导体，因此可不用金属喷镀或其他处理。但是这种活的有机体必须具备既能在高度真空下保持水分，又能够经过脱水或水合作用后仍然保持生活能力，这才适于在扫描电镜下进行活体观察。

4. 血液有形成分观察法

采新鲜血液，用大于血球样品 10 倍以上的 1% 戊二醛 (0.1 M 磷酸缓冲液, pH 7.4) 液，放于室温固定 2—3 小时，再用磷酸缓冲液洗后，用丙酮系脱水。或用纯水洗数次，使血球在纯丙酮或水中再悬浮。取 1—2 滴放在 5—8 毫米方形的小玻璃片上，用温风或自然干燥，喷碳和金，喷至呈蔚蓝色至绿竹色的程度即可用于扫描电镜观察。

5. 精子观察法

取哺乳动物精液，生理盐水稀释后，放入 1% 戊二醛液内固定 1 小时，再移入 1% 锶酸溶液内固定 1 小时，双重固定后，用二甲胂酸 (Cacodylic acid) 缓冲液洗，再用丙酮脱水，自然

干燥或临界点干燥后即可观察。

6. 低温条件下进行观察

将样品放在液氮或氟利昂溶液中，骤冷冰冻后，即可迅速转移到扫描电子显微镜中，在低温真空下进行观察。

7. 临界点干燥法

用于扫描电镜的生物样品也和透射电镜所用样品一样，制作过程中尽量保持生物的自然状态。因此，透射电镜采用了冰冻蚀刻法，而扫描电镜所用样品，在干燥时液面因表面张力使细微结构发生变形。据 Anderson 计算对某细菌的纤毛所波及的力每平方厘米有 46,000 千克，为除去此现象，采用临界点干燥法较好。

(1) 临界点干燥法原理：样品脱水后的溶剂和样品表面残存的水分干燥时，由于表面张力而使其结构产生物理的改变，为了防止此种变化，Anderson 1951 年开创了临界点干燥法。此法比其他干燥法优点多，所用仪器也较为简单，可以节省时间。根据波依耳定律，在一定温度下，当气体压力增加时，体积则减少，某个温度 T_c 以下气体被压缩而成液体；温度如在 T_c 以上，虽经压缩已不能成为液体，指此现象为临界现象。此温度 T_c 为临界温度，在此等温线上水平变动之点为临界点。在此点上气体和液体不易区别。以图 4 为例，二氧化碳的临界温度为

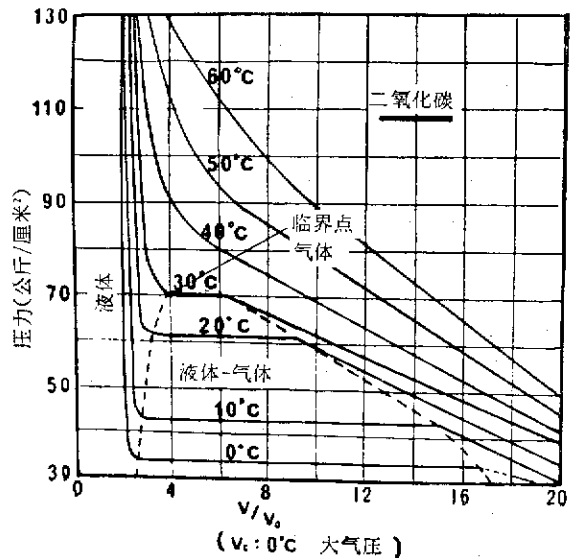


图 4 二氧化碳的状态图

31°C, 临界压力为 72.80 个大气压。所谓临界点干燥法即利用以上现象在样品干燥时表面不形成气相、液相, 是防止由于表面张力产生的物理结构改变的一种方法。此法所使用的置换剂(表 1)是最适于生物样品的临界温度、压力的液体, 二氧化碳和氟利昂或一氧化二氮等, 尤其氟利昂比液体二氧化碳临界压低, 结构简单, 美国多用它, 日本多用二氧化碳。我国也是采用后者。

表 1 临界点干燥法所用的置换剂

置换剂	临界压力	临界温度	分子量	中间液
二氧化碳	72.8 (大气压)	31.0(C)	44	乙醇或醋酸乙酯
氟利昂 13	38.1	28.9	104.5	乙醇
氟利昂 23	47.7	25.9	70	乙醇
氟利昂 116	29.3	19.7	138	乙醇
一氧化二氮	71.2	36.5	44	不需要

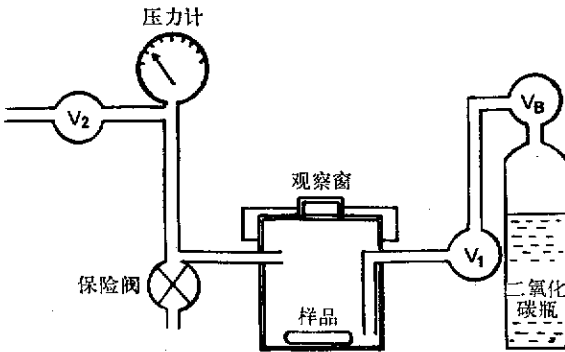


图 5 临界点干燥器的结构图

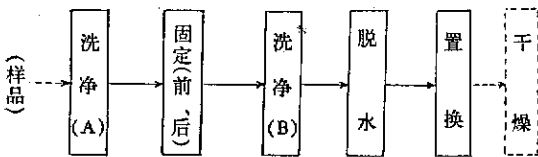


图 6 样品处理顺序图

(2) 临界点干燥器和生物样品干燥操作方法。

临界点干燥器各国都有成品出售, 我国已试制成功, 不论是那种成品, 原理基本上是相同的, 如图 5 所示。

用不锈钢制成的高压样品干燥器, 其上盖有一观察窗, 干燥器上附有压力计, 安全阀, 入口阀 V_1 , 出口阀 V_2 , 不锈钢制成的样品盒, 盒内可容纳大的样品和小的样品。所用气体为液体二氧化碳, 氟利昂, 一氧化二氮等均可。下面仅就使用液体二氧化碳干燥法加以介绍。

1) 样品处理方法

所取得的生物样品在放入临界点干燥器之前, 应采取一些必要的处理, 其方法如图 6 所示。

2) 洗净 (A)

所取得的生物样品用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 或生理盐水洗净。

3) 固定 (前固定与后固定)

前固定用 0.1 M 磷酸缓冲液配成 1% 戊二醛固定液, pH 7.4; 固定 12—24 小时。固定时间稍稍延长一些也无妨。但移入后固定剂之前, 必须用磷酸缓冲液充分洗净, 在洗净液内可置 1—24 小时。后固定用 0.1 M 磷酸缓冲液配成 1% 锇酸固定液, pH 7.4; 或用蒸馏水配成 1% 锇酸固定液, 固定 1—2 小时。含脂类成分较少的样品也可以节省一点固定液。固定时间不能过长, 否则样品变脆而易于损坏。

4) 洗净 (B)

样品固定后, 用磷酸缓冲液或蒸馏水充分洗净。洗净液要换 2—3 次。

5) 脱水

用蒸馏水配制 50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇液, 逐级上升进行脱水。每步脱水时间根据样品大小。约为 5—10 分钟。如果样品大小为 5 立方毫米, 每步脱水 10 分钟即可。

6) 置换

样品中 100% 的乙醇, 用醋酸戊酯或醋酸异戊酯进行置换。先用 1:1 的浓度置换后, 再放入 100% 的醋酸戊酯或醋酸异戊酯中, 10—15 分钟。此过程使样品中所含液体和液化气易于置换甚为必要。

7) 样品放入样品盒

样品放入样品盒。如果样品极小时, 可用

针在胶囊上扎直径 1.0—1.5 毫米的小洞数个作为样品盒用亦可。

8) 样品盒放入样品干燥器

在预冷的样品干燥器中放入样品盒, 此时使样品干燥器致冷时, 样品干燥器在放入样品之前, 先输入液体二氧化碳, 迅速打开出口阀 V_2 致冷。

9) 输入液体二氧化碳

拧开高压气体阀 V_B , 同时将进口阀 V_1 打开, 出口阀 V_2 关闭, 使样品干燥器中充满二氧化碳, 醋酸戊酯与二氧化碳置换。图 6 是在常温下此时的压力每平方厘米为 57—65 千克。由观察窗观察样品上充满液体二氧化碳为度。

10) 加热

用大约 70℃ 的热水, 使样品干燥器加热 5—10 分钟, 压力计为 95—105 千克/厘米²。

11) 排气

打开出口阀 V_2 , 尽可能慢慢排气, 至压力计的刻度为零时, 再打开样品干燥器。作好的样品注意湿气, 保存在干燥器中。

(2) 临界点干燥法的观察: 临界点干燥法最近发展较快, 在扫描电镜的样品制作上较为多用。Sybers 和 Ashraf 关于心肌的结构曾用氟里昂 113 作临界点干燥法进行扫描电镜样品的 2、3 种方法比较研究。De Bault 用培养细胞, Golomb 等人的淋巴细胞染色体, Tayler 等用哺乳动物的肠绒毛, Humphreys 等用冰刻 (Freze-fracture) 组织进行研究, 田中用临界点干燥法进行了细胞内结构的研究, 获得了满意的结果。Gray 等用酵酶的核组蛋白纤维, 经铀染色后, 临界点干燥之后用透射电子显微镜进行观察。这方面的工作很多, 不一一列举。图 7 和图 8 是家兔鼻中隔粘膜的照片, 图 7 是用临界点干燥法, 图 8 是自然干燥。

图 7 与图 8 比较, 可以看出临界点干燥法能使组织接近于自然状态。

四、扫描电镜在动物学上的应用

扫描电子显微镜如前所述, 它是一种近代化的科学研究工具, 应用十分广泛。在动物学方面也广为应用, 尤其近十年来国际国内都召开

了扫描电子显微镜的学术会议, 在这方面的报告和论文也越来越多。有关动物学方面的, 如用扫描电镜观察变温动物色素细胞的形态和色素, 看到脊椎动物鲟鱼的色素细胞, 中心部膨隆呈丘状, 树状突起非常细。看到蟾蜍小肠粘膜面, 上皮细胞及腺体开口部及所分泌的粘液状态以及与细胞界一致的微绒毛密集排成不整的块状区。猴子肾脏肾小球在去掉球囊后, 毛细血管卷曲呈球形, 继续提高放大倍数时, 看到毛细血管外壁足细胞的复杂齿状细胞突起。脾脏内静脉窦和窦的内腔及窦壁上的孔隙, 虽然在以往的组织学上也曾描述过, 但在扫描电镜下这些结构的立体图象十分清晰, 这一工作也是在常用的实验动物家兔的脾脏上进行的。它的气管上皮在扫描电镜下, 纤毛呈细杆状 (图 7、8)。大鼠淋巴结的淋巴窦确似洞状, 内有细胞突起呈丝状悬垂, 其中淋巴细胞呈立体的球形

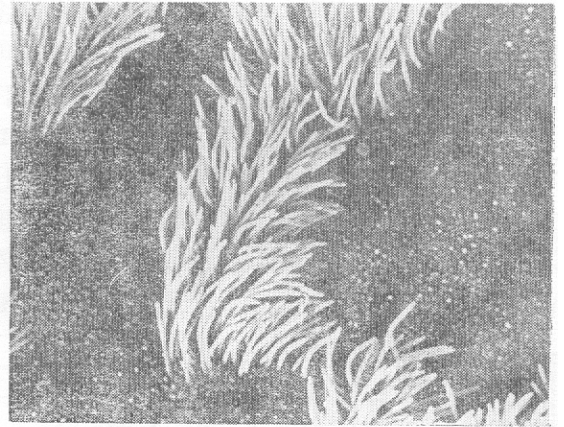


图 7 家兔鼻中隔粘膜 (临界点干燥法)

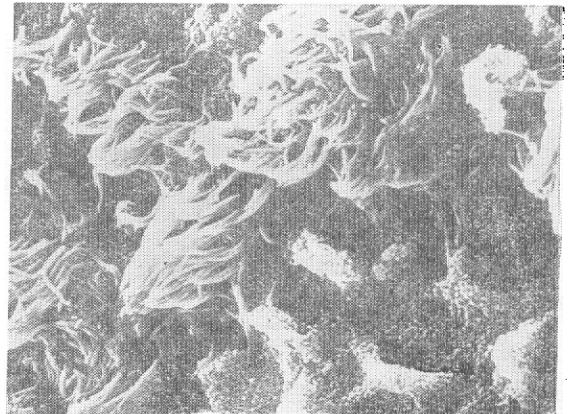


图 8 家兔鼻中隔粘膜 (自然干燥)

填满网眼。在眼组织方面用扫描电镜研究了猫眼的组织和视网膜的立体结构。胰腺外分泌部的腺泡细胞，在光学显微镜下看不到核表面上有许多核孔，而在扫描电镜下看得十分清楚。在方法学上用大鼠肝分离的肝细胞，其线粒体，如经 0.25 M 蔗糖液分离后，一般来说在扫描电镜下呈球形；用 0.32 M 蔗糖液分离后，不单纯呈球形，其表面有一个很深的凹陷，类似梨状，一部分呈杆状；在 0.44 M 蔗糖液分离后则线粒体呈 U 字形，看来线粒体的形态与分离时所用蔗糖溶液的浓度有关。在研究生殖生理方面，对哺乳类精子的形态学研究发生了兴趣，曾用牛、猪、兔、小鼠、豚鼠、猴和鲸鱼的精子在扫描电镜下分别加以观察，看到了每种动物精子的立体像。尤其鲸目在哺乳类中可为非常特殊的一群，其精子也是极特殊的，其头在偶蹄类前半部是膨大的，而在鲸鱼类的精子则成了它的后半部，颈部也变细而且长，尾部粗而短，与其他哺乳类的精子形态呈鲜明的对比。在卵子方面对家兔卵子进行体外受精处理，卵从排卵后数小时，有数层的粒膜细胞包着，在细胞表面用扫描电镜看到了无数的精子，有的附着，有的已侵入卵的内部。在大鼠受精后约 2—4 小时的卵子，用酶处理后，粒膜细胞及透明层被除掉，露出细

胞质，也可以看到第一极体，细胞表面有微绒毛。大鼠卵子在细胞期，透明层同样用酶处理后，可见细胞表面之微绒毛。扫描电镜也进入了研究癌症的领域，对人的子宫颈癌，从异型上皮细胞至上皮内癌的移行过程用光学显微镜和扫描电镜作了一系列的对比观察，看到了正常扁平上皮，圆柱上皮和异型上皮，上皮内癌与扩散癌的表面立体像，并说明每种像是有差异的，尤其正常扁平上皮和扁平上皮癌，其细胞大小，形状不整及互相重叠等是可以使两者加以区别的。有的工作也提到对动物毛进行一些有趣的研究。由于扫描电镜焦点深，因此，对各种问题的处理也是一个有用的工具之一。譬如毛料制品或毛料衣类突然出了一些小洞洞，是由于机械损伤还是因为化学药品使用不当，还是虫咬的小洞，三者扫描电镜下所造成的痕迹不同，在纺织工业上也可以鉴定其破损的原因。对毛皮兽毛的质量鉴定也更为有利。扫描电子显微镜用于动物学的研究方面日益广泛，发展十分迅速，在研究动物的种系发生，动物形态学和探索生命的奥秘必将起到重要的作用，这方面的工作还很年轻，需要发展的东西很多，它必将随着我国科学事业的迅速发展而大踏步的前进。