

# 高压电镜与它在生物学上的应用

管 汀 鹭

(中国科学院生物物理研究所)

生物学工作者对于普通的、加速电压为 50—100 千伏(kV)的透射式电镜及一般扫描电镜都已很熟悉,他们应用这类仪器来进行研究可以说已经达到了得心应手的程度。然而,大多数工作者对于在六十年代才在电镜家族中出现的新成员——高压电镜(指加速电压在 500kV 以上的电镜)的性能及它们在生物学中的潜力还不大了解。因而本文将把高压电镜的发展状况及在生物学上的应用作一扼要的介绍,供有兴趣的同志参考。

## 一、发展简史与目前概况

设计高压电镜的思想实际上在紧接着第一批商品透射电镜问世之后就提出来了。那时,

不仅是仪器本身的发展远不完善,而且各种制样技术十分短缺。例如,当时没有超薄切片机,因而样品切不成 1 微米( $\mu\text{m}$ , 1 微米是 1 厘米的万分之一)以下的薄片;而这一厚度的样品是低能电子束难以穿透的。为了克服这个困难,显然需要增加电子束的穿透能力,也就是生产出加速电压较高的电镜——高压电镜。经过努力,于 40 年代中期曾经试制成功了一台加速电压为 400 kV 的高压电镜,并在 1947 年由范道尔斯特(Van Dorsten)等人首次发表了用高压电镜拍摄的生物样品(细菌)的电子显微照片。

然而,在 1948 年以后,出现了超薄切片机,超薄切片技术建立起来并且得到了迅速推广。多数生物学工作者使用超薄切片机可以相当容

易地切出  $0.1\mu\text{m}$  以下的超薄切片,这一厚度完全适于用常压(100 kV 以下)电镜进行观察。这样一来,研究人员对于高压电镜要求的迫切性立刻减低下来,而那台在 40 年代中研制成功的高压电镜的样机也就没有能发展成商品便束之高阁了。

又过了不到 20 年的光景,这期间电镜技术有了很大的提高,同时在冶金学、材料学加上生物学日益深入发展的形势需要之下,对高压电镜的呼声重又逐渐增高。因而于 1960 年在法国土鲁斯(Toulouse)由杜波依(Dupouy)等人研制成功世界上第一台加速电压为一百万伏(MeV)的超高压电镜。随后,又有不少国家也建成了高压电镜,并且积极开展这方面的研究工作。

高压电镜的构造与常规透射电镜的构造类似,实际上可以把它看成是按比例增加的常规电镜;它的操作与控制方式基本上与普通电镜相仿。因为高压电镜镜体内常有多个透镜,镜体本身一般都很高(大约为 6—7 米),有些调节做成活动形式;又因为高压加速器和发生器要装在充气的箱内,而箱子放在镜体上,所以常常要用两层楼的建筑来安置高压电镜。由于高压电镜构造复杂、体积庞大,要求加工精度高、费用大,目前只有几个先进国家如法、日、英、美、荷兰、西德有生产。在 1978 年,全世界的高压电镜(指加速电压在 500 千伏以上)大约有 50 台。最高电压为 3.5 MeV,最好的分辨率可达 1 埃[( $\text{\AA}$ ,  $1\text{\AA} = 10^{-10}\mu\text{m}$ )指晶格条纹]。我国目前只有一台从日本进口的 1 MeV 超高压电镜<sup>[1]</sup>

## 二、高压电镜的特点

高压电镜具有如下几个显著的优点: 1. 电子穿透能力强; 2. 分辨率高; 3. 射线的辐射损伤及热效应小; 4. 亮度增加; 5. 使用环境小室(见下文)便利等等。下面将分别介绍。

### (一) 电子穿透能力强

加速电压的高低与电子穿透能力有直接关系。对于常规的 100kV 电镜来说,电子最多只

能透过厚度为  $1000\text{\AA}$  ( $0.1\mu\text{m}$ ) 的样品。当电子的加速电压从 100kV 提高到 1000kV (1MeV) 时,电子的穿透能力会大大增加,这时可以观察  $10\mu\text{m}$  厚的样品。这就是说,加速电压增加 10 倍时,可观察的样品的厚度增加了 100 倍。因为能够观察厚样品,这就不但简化了制样步骤,而且样品本身更接近天然状态,也即更加符合真实的情况。同时,由于厚样品更能保持原材料的性质,所以可以进行动态研究:如观察加热、冷却和拉伸等变化,这个优点在材料科学应用中尤其突出。

### (二) 分辨率提高、亮度增加

众所周知,显微镜的极限分辨率主要受所使用的照明光束的波长的限制。已知当加速电压增加时,电子的有效波长将减小,因此极限分辨率可以提高。据有人计算,在 100kV 时电子波长为  $0.037\text{\AA}$ ,而在 1 MeV 时,电子波长为  $0.0087\text{\AA}$ ,相应的理论分辨率也从  $2\text{\AA}$  提高到  $1\text{\AA}$ 。

另一方面,分辨率还受许多其它因素如色差的影响。有人曾经计算了在厚样品的情况下,当电压从 100 kV 增加到 1000 kV 时,色差减少为它的  $1/20$ ;因而从减少色差的角度来说,高压电镜也能提高分辨率。此外,因为高压电镜的电子能量大,因而亮度显然会增加,这也便于采用暗视野(暗场)方式进行观察。

### (三) 辐射损伤和热效应小

在加速电压很高的情况下,由于电子的穿透能力大大增强,散射截面显著减小,样品和电子束间相互发生作用的机会减少,从而降低了射线照射所造成的电离损伤。

当电子照射在有机(或生物)样品上时,这些共价键结构中便会出现电离,引起电子的重新排列并导致结构发生永久的改变。理论上单个电子激化的概率(电离损伤)与入射电子速度的平方成反比。有人曾计算当电压从 100kV 增加到 1000kV 时,电离损伤大约减少了三倍。这个优点在生物学上有着很大的潜在意义,为进一步观察生物活材料提供了更多的机会。

### (四) 易于利用环境小室

利用电镜观察生物样品的一个极大的局限性是样品必须要经过脱水,这个步骤无疑会改变样品本身的结构。然而,如果采用特制的环境小室,便可以直接观察含水的样品。由于环境小室本身具有一定的厚度,所以用低压穿透有一定的困难,而高压电镜有很大的穿透能力,所以很便于使用环境小室。下面将会看到环境小室在生物学上有很多的用处。

### (五) 高压电镜的缺点

高压电镜虽然具有上述几个明显的优点,但也存在几个不利之处。例如由于电子的穿透能力增大,因而生物材料的反差便降低;又由于电子的能量极高,容易增加原子的位移损伤,(铜原子在 490kV 时发生位移,碳原子在 27kV 时发生位移),位移损伤将会影响定量定位的观察结果;再有,高压电镜体积庞大,结构相对复杂,价格昂贵,因而不利于普及推广。

## 三、高压电镜在生物学上的应用

高压电镜具有上述几个突出的优点,因而在生物学的应用中有着很大的潜力。尽管高压电镜目前在生物学上的应用还开始不久,但是涉及的范围以及应用的材料都相当广泛<sup>[2,3]</sup>。归纳起来可以分如下几方面来介绍:

### (一) 生物切片

1. 薄切片 原则上讲,对于任意给定的样品厚度,电压越高,分辨率越好;或者对于给定的电压,切片越薄,分辨率越高。因而在需要分辨最细的细节时最好采用高压来观察薄切片。有人报道用 800 kV 观察染色的薄切片上的膜比用 75kV 观察时要清楚得多。此外,用高压观察薄切片的一个极大优点是辐射损伤明显降低,同时还可采用暗场技术来观察不染色的样品。如杜波尤(Dupouy)用暗场技术观察到不染色的细菌鞭毛是由成双排列的小单位(小点)组成的,一些细菌的胞壁中存在规则的周期性结构,并证明铁蛋白分子中确实存在富铁核心。还有人用高压电镜在蛙的横纹肌粗丝的横切面中看到亚单位。由于暗场技术能够直接研究不染色的样品,因而给生物学者研究活组织提供

了一个十分有希望的途径。还曾有人报道过目前许多高分辨率工作的课题大都是在 250—600 kV 的高压电镜上完成的。

2. 厚切片 如上所述,在 100kV 的常压电镜上可观察切片的厚度最多不超过 1000 Å,通常采用的厚度是 500 Å,而在 1 MeV 电镜上,样品的厚度可为 1—10 μm,而且分辨率相当高。使用厚切片不但在切片和处理时都方便,而且样品更稳定、更能保存结构间的空间关系,因而用厚切片研究复杂的细胞内外结构时远比用许多张薄的连续切片得到的结果更精确。不但如此,用厚切片还可以观察到薄切片中不能观察到的结构或者纠正薄切片中一些被误解的结构。

目前结合采用选染技术在高压电镜上已研究过多种材料的厚切片。例如采用锍浸透选染技术研究了高尔基复合体形成面的结构<sup>[4]</sup>,证明高尔基复合体形成面上分离的小囊实际上是连续回旋状结构的一部分,是由管状多折网络组成的,称为原网络。当切片增厚到 2—7 μm 时,原网络比较模糊,而高尔基复合体中的嗜锍部分延伸至细胞质的广大区域,形成了大片连续结构,称为二级网络,这种网络因细胞种类而异。这些观察纠正了薄切片观察的结果,并且对高尔基复合体的功能给出新的说明。又如有人用银浸透选染技术观察了神经元内神经纤维的构造,得到了神经纤维网络的三维信息,并且见到构成核周网络的神经纤维束内的最小单位是直径约 50 毫微米 (nm, 1nm = 10 Å) 的细丝,这些信息只有用高压电镜才可以得到。有人在研究 1 μm 厚的骨骼肌纤维时,看到管状的网形分支是如何包围着肌纤维,这在二维的薄切片中是看不到的,因为那儿无法把小泡与小管的横切面区别开来。还有人用高压电镜研究了横纹肌内 T 系统的三维构造以及细胞与底层接触的关系。除此而外,观察厚切片有时还能弥补用薄切片研究的局限性,如在证明病毒致癌学说时,由于病毒颗粒数量稀少,用薄切片找到病毒的机会也相应减少,然而用厚切片研究时则方便得多。

3. 完整细胞和细胞器 用高压电镜可以直接观察分散的小细胞或细胞器而不必经过切片。如有人观察染色体,说明基本结构单位(200 Å 细丝)在有丝分裂期间是如何绕入 500 Å 的细丝中的。还有人观察了人的双倍体细胞内的核、线粒体、微管微丝、内质网和糖元等。

## (二) 立体术

由于高压电镜的电子束具有很高的穿透能力,因而可以观察厚切片。另一方面,因为电镜的焦深很大,所以在不同深度上的结构都能清楚的成象在同一平面;换句话说,在高压电镜内观察的厚切片的象实质上是样品在不同深度上的叠加象,因而图象往往不易解释。为了能够分辨出样品在不同深度上的特征,可以采用立体学技术,那时生物结构的三维构造可以鲜明地显示出来。

所谓立体术在这里指的是用立体镜观察两张立体对照片所得到的立体效果。拍摄立体对照片的方法是对同一视野在不同的倾斜角度上拍两张照片;在拍照期间,除了倾斜样品之外,照片的其余参数如放大倍率、照明状况均不得改变,这样的两张照片之间除了视差外,细节上能互相吻合。两张照片之间的倾斜角度随样品的厚度、显微镜的倍率以及需要产生立体效应的程度而定。一般说,对于 1 μm 厚的样品在一万倍情况下,总倾斜角为 12° 较宜。若样品较薄,倍率又低,则倾斜角也应增加。因此用厚样品制取立体对照片比较方便。

目前已用这种技术研究了结缔组织、高尔基复合体、染色体、植物细胞成分分布以及小鼠胚胎细胞上病毒颗粒的分布等等。用这种方法得到三维信息是一种相对简单和迅速的方法,它在生物学研究中能起一定的作用。

## (三) 环境小室的应用与活样品观察

前面已经讲过常规电子显微术的一个大缺点是被观察样品必须经过脱水,由之而来的是样品结构发生改变。从 X-射线衍射或电子衍射的资料得知:许多有序的生物结构一旦脱水就不会产生点衍射图形,这就说明它们的结构实际上已经起了变化。为了能够观察含水样品

和进一步观察活体样品,首先要设计出特殊的环境小室,这种小室既不影响镜体的高真空又能让样品区保持低真空。实际上,早在电镜的发展最初阶段即卅年代中期,为了克服脱水和炭化造成的样品损伤,就有人打算构造环境小室,而且多年来这种努力从来没有间断过,至今已设计出多种环境小室<sup>5)</sup>。

目前在高压电镜上采用的环境小室大致可分成两种类型。一种是小窗型,又称为静态型或膜型,这种类型的小室是由两层薄膜组成,薄膜之间充以液体或气体,小室与镜体其它部位完全密封隔绝,因而小室内的环境可以任意给定。但是这种小室要能经受住足够高的压力差并和周围气体有不同的渗透性,另外窗材料本身会引起电子散射,所以分辨率比较低。另一种小室是小孔型,又称为动态型。这种小室上有一个小孔,电子束可以直接穿过小孔,同时小室自身暴露到镜体的真空中,因而小室中的气体通过小孔慢慢扩散出去。扩散到镜体内的气体由一个特殊的辅助泵系统抽出去,这样整个镜体的真空并不下降,而且分辨率较高。目前似乎倾向于采用第二种类型的小室。

环境小室用处很多,而且能用环境小室开展的研究工作的范围也极广。光是在生物学上的应用就包括细胞学、分子生物学、放射生物学、肿瘤学等许多方面。现简单说明如下:

### 活细胞

普通生物学—

- 改进活细胞的可见度
- 移动性研究(细胞质流、胞饮、吞噬、心肌搏动)
- 显微化学试剂对细胞器作用(如 ATP 对线粒体作用)
- 冰冻细胞

癌—

- 检查整个细胞转移的早期阶段(细胞接触类型、细胞质流)
- 用与铁蛋白偶联的抗体灵敏性检出肿瘤特异性抗原

放射生物学—

- 微量辐射对特异器官的影响
- 细胞功能的辐射灵敏度

生态学—污染气对细胞的毒性(对细胞质流的影响)

宇宙生物学—

- 火星环境中的细胞
- 细胞和血浆中的气泡

## 分子生物学

晶体电子衍射	— 湿蛋白小晶体(结构决定,并在氧、二氧化碳存在时的形态变化)
	— 湿(含水)的定向的核酸与染色体
	— 湿的天然膜与人工膜
单个湿分子	— 定向的多聚糖
	— 大分子的相互作用(肌球蛋白分子+肌动蛋白分子)
	— 表面电荷分布(如肌球蛋白)
	— 观察蛋白质合成

此外,环境小室在非生物学(如大气学、化学等)上也有多种应用。

目前有人用环境小室得到了蛋白质结晶(如过氧化氢酶)的高分辨率电子衍射图,对含水细胞膜以及一些活样品进行了初步观察<sup>[5]</sup>(尽管对“活”样品还有争议)。如有人研究在不同的电子束能情况下孢子的存活率,也有人观察了含水红血细胞在不同条件下的变化及细菌分裂情况。总之,随着现代科学发展的步步深入,研究者越来越迫切要求观察活体组织的动态变化,并且了解生物样品的三维立体结构,而高压电镜在所有这些方面都存在很大的潜力有待挖掘。我们可以大胆的期望在未来的年代

里,高压电镜技术将在生物学的研究中打开一个新的领域,并且作出重要的贡献!

## 参 考 文 献

- [1] 刘安生 李永洪 1978 超高压电子显微镜及其特点。物理 7(6):365—370。
- [2] Glauret, A. M. 1974 The high voltage electron microscope in biology *Journal of Cell Biology* 63(3): 717—748.
- [3] Glauret, A. M. 1979 Recent advances of high voltage electron microscopy in biology *Journal of Microscopy* (Oxf.) 117(1): 93—101.
- [4] Rambourg, A., et al., 1973 Tri-dimensional structure of the forming face the Golgi apparatus as seen in the high voltage electron microscope after osmium impregnation of the small nerve cells in the semilunar ganglion of the trigeminal nerve *Journal of Microscopy* (Oxf.) 97(1): 49—57.
- [5] Flower, H. M., et al., 1974 Environmental gas reaction cells pp. 383—395 In: HVEM Academic Press, Lond and New York.
- [6] Humphreys, C., 1978 High voltage electron microscopy pp. 1—39 In: Principles and techniques of electron microscopy: Biological application Vol. 6 (Hayat, M. A. ed) Van Nostrand Reinhold Company, New York and London.