

# 电子显微镜在生物学中的应用

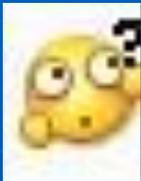
大型仪器中心

梁静南

- 什么是电子显微镜
- 电子显微镜如何工作的（透射电镜和扫描电镜）
- 如何利用电子显微镜来观察生物样品（样品制备）
- 近期相关的工作

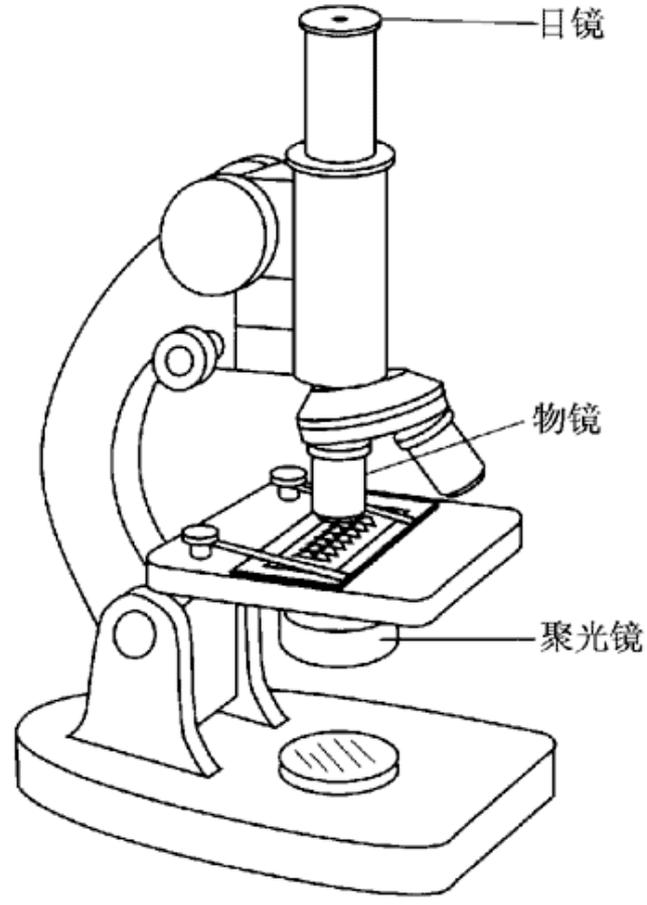
■  
光学

显微镜



■  
电子

显微镜



- 分辨率——能分辨开来的物面上的两点的距离（最小分辨距离），它是与放大倍数无关的。

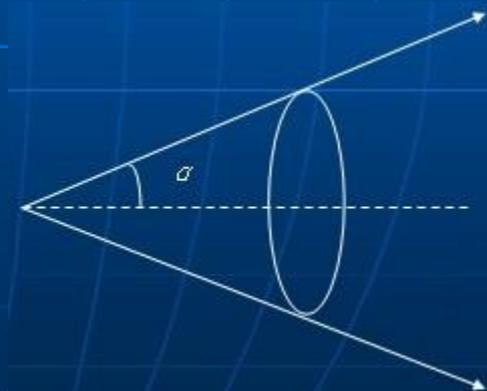
$$d = 0.61 \times \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

$d$ : 分辨距离, mm;

$\lambda$ : 入射波长, mm;

$n$ : 介质折射率;

$\alpha$ : 物镜对物点的张角的一半。

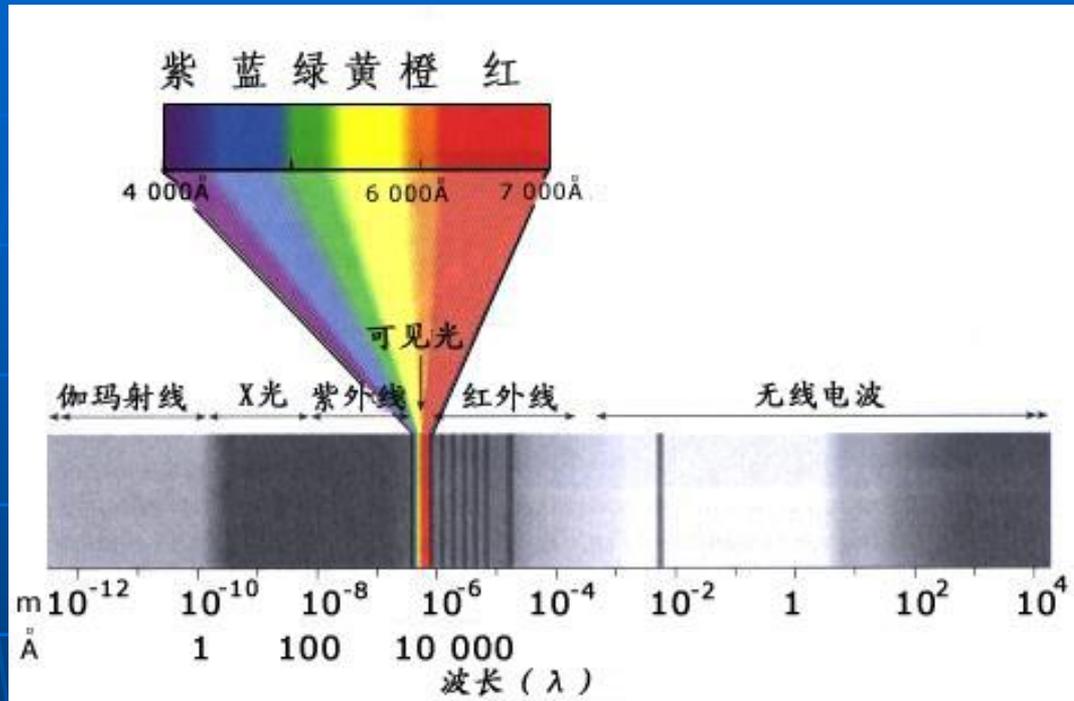


# 有效放大倍数

- 光学显微镜分辨率：200nm
- 肉眼分辨率：0.2mm
- 有效倍率1000倍。
- 光学显微镜的放大倍数可以做的更高，但是，高出的部分对提高分辨率没有贡献，仅仅是让人眼观察更舒服而已。

# 如何提高显微镜的分辨率

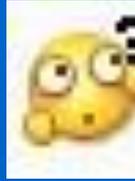
- 要想提高显微镜的分辨率，关键是降低照明光源的波长



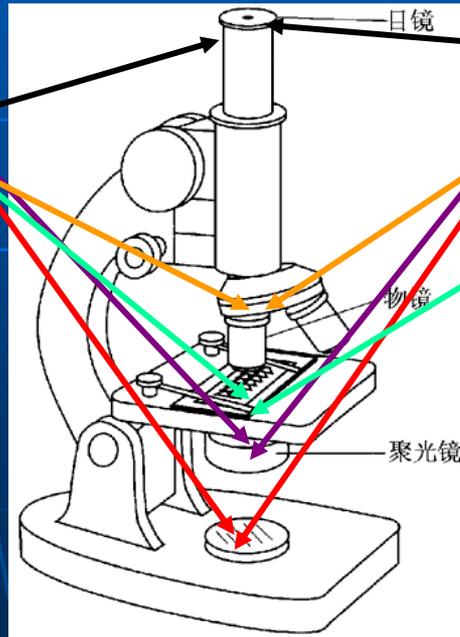
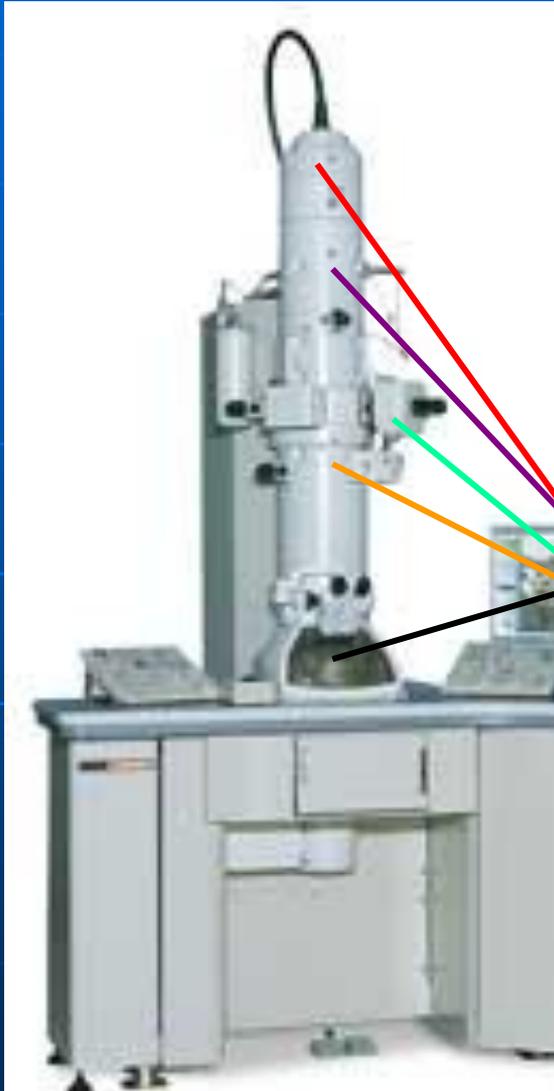
物质	波长
紫外光	<380nm
X Ray	10~0.001nm
电子束	0.01nm~0.001nm

- 什么是电子显微镜
- 电子显微镜如何工作的（透射电镜和扫描电镜）
- 如何利用电子显微镜来观察生物样品（样品制备）
- 近期相关的工作

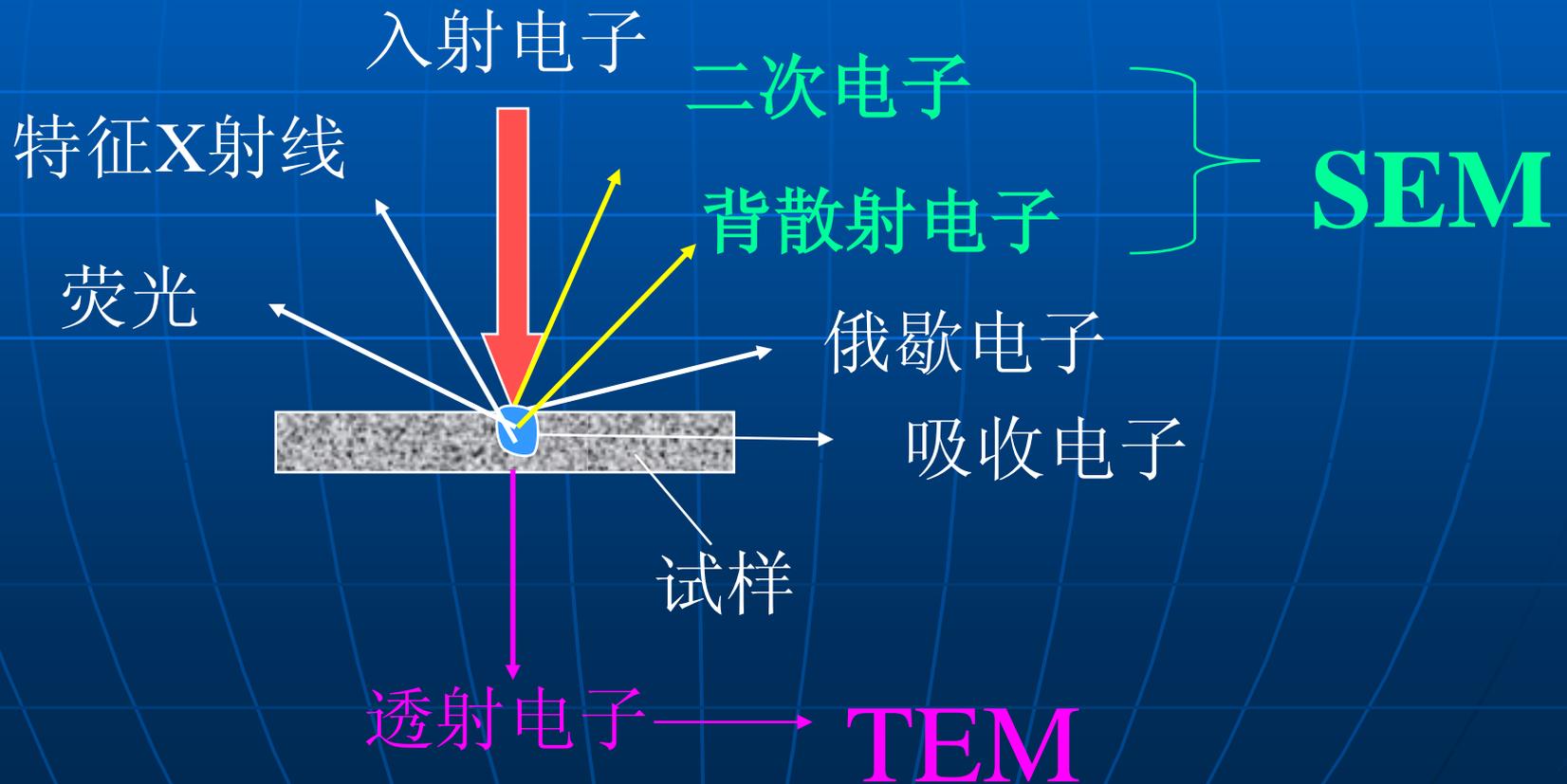
# 透射 电子显微镜

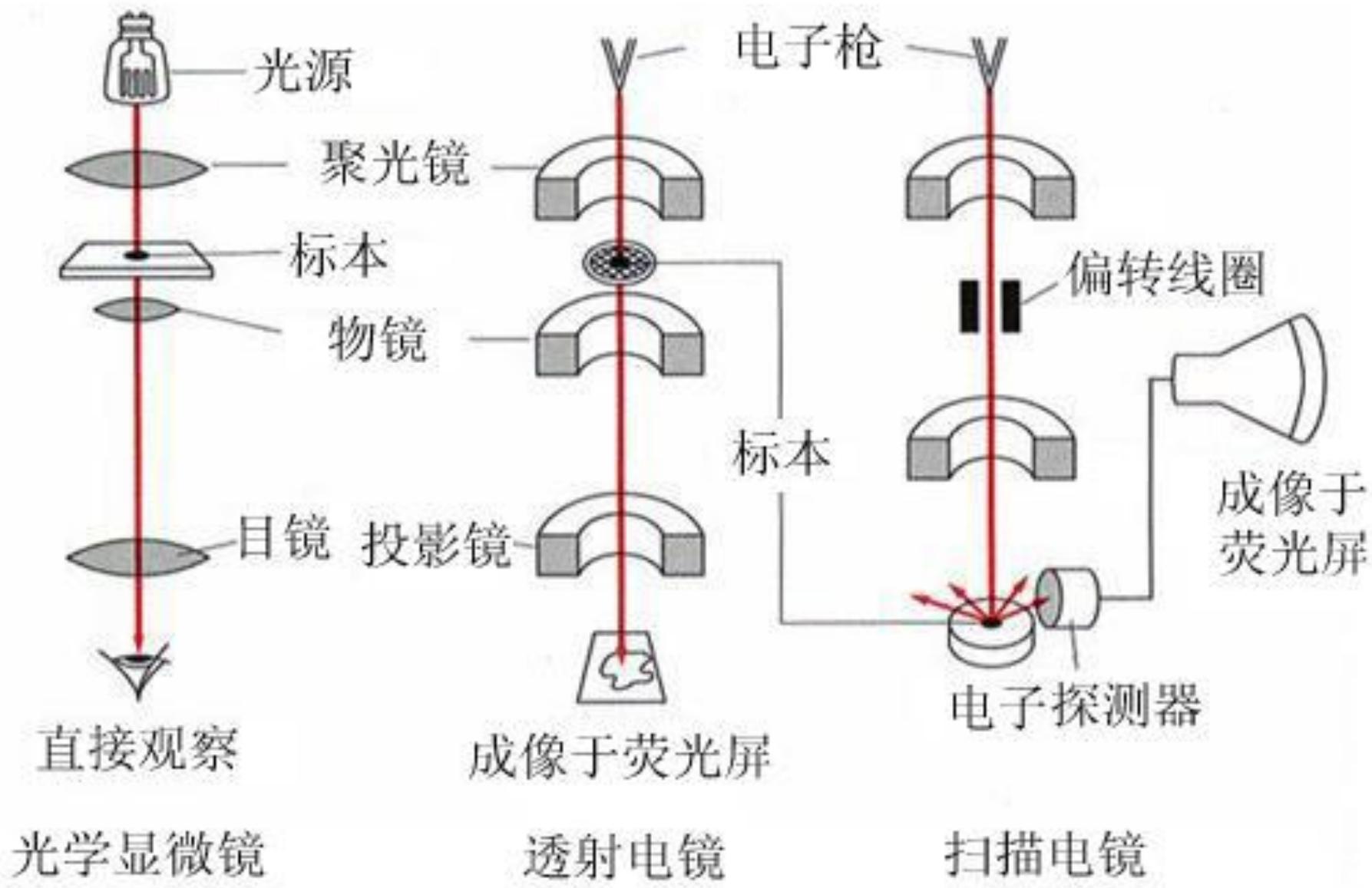


# 扫描 电子显微镜



# 电子与物质的作用





直接观察

光学显微镜

成像于荧光屏

透射电镜

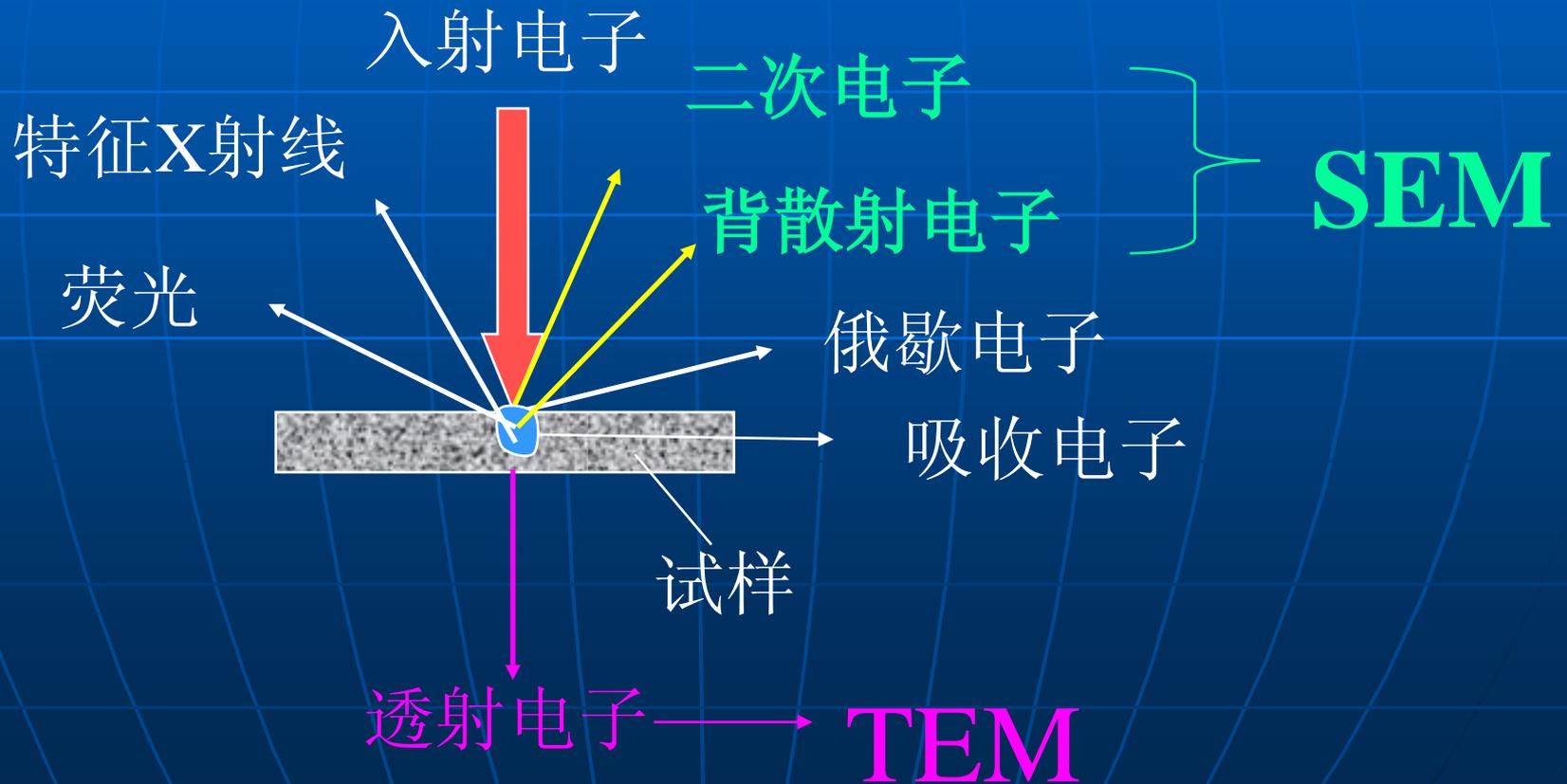
电子探测器

扫描电镜

成像于  
荧光屏

- 什么是电子显微镜
- 电子显微镜能做什么（扫描电镜和透射电镜）
- 如何利用电子显微镜来观察生物样品（样品制备）
- 近期相关的工作

# 电子与物质的作用



# 以电子束作为光源的样品制备的基本原则

保留细胞生命状态下的细节，细胞需要固定——双固定



电镜镜筒处于高真空，只能观察脱水后的细胞——梯度脱水

TEM



样品要很薄，一般**50nm**，对高速电子有一定的耐受力——包埋，切片



生物样品需要重金属染色，增强电子散射能力——染色



负染色

SEM



防止脱水剂在大气中的急剧气化，降低样品表面张力——临界点干燥



干燥的生物样品不导电，为避免热损伤，提高图像质量，产生更多的二次电子——喷金

# 细胞的固定

## 固定的目的

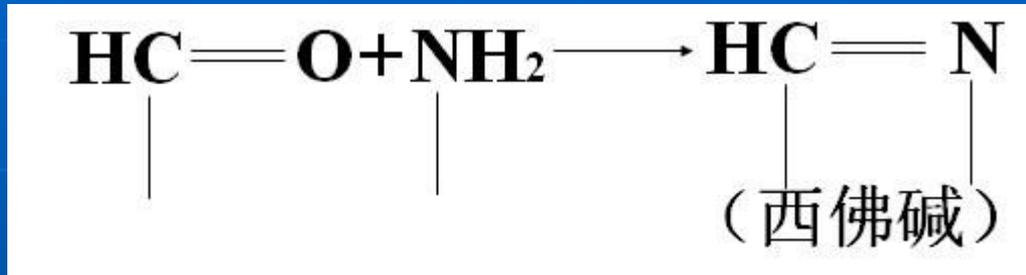
终止生化过程,抑制分解酶活性,避免组织溶解腐败,使细胞内蛋白质,脂肪,糖,酶等不自溶,凝固在原位不弥散.以保持组织和细胞形态结构与正常生活时相似。(化学,冷冻,化学冷冻相结合等不同固定方法。)

## 取材的基本要求

- (1)动作迅速,取材后快速放入固定液中,或者固定中取材。
- (2)体积要小,一般 $1\text{mm}^3$ ,如果来不及,例如野外取材,也可将组织修成 $(1\times 1\times 2)$ mm大小长条形,之后再行分割(微生物样品不低于 $25\mu\text{l}$ )。
- (3)减小损伤,切割器械锋利,操作轻,避免牵拉、挫伤与挤压组织。
- (4)低温操作,最好在低温( $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ )下进行,降低酶的活性。所用器具和固定液都应预冷。
- (5)取材部位要准确。

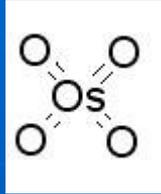
# 常用固定剂

## (1) 戊二醛 (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)—glutaraldehyde



- 适合保存：蛋白质，核酸，多糖；有效保存组织细微结构如微管、内质网和细胞基质、有丝分裂的纺锤丝及胞饮小泡等，并且可以保存某些酶的活力，较好保存抗原，适于细胞化学研究；
- 不适合保存：脂类，磷脂固定效果差，对细胞膜的显示较差，没有电子染色作用。
  - 分子量较小，渗透较快，均匀固定深度：**0.5~1mm**，
  - **0—4℃**可长时间固定(几周甚至**1~2个月**)不会使组织变脆，可用于远离实验室的取材

## (2)四氧化锇 (OsO<sub>4</sub>)-- OSMIUM TETRAOXIDE



与双键反应

- ◆ 强氧化剂，与氮原子有较强的亲和力，可较好的固定脂肪、蛋白质、磷酸脂蛋白；
- ◆ 固定变性DNA及核蛋白，不能固定天然DNA、RNA及糖原；
- ◆ 具有固定和电子染色双重作用，样品图象反差较好；
- ▼ 酶的钝化剂，不适合细胞化学的固定；
- ▼ 与乙醇/醛类反应生产沉淀——漂洗
- 分子较大,渗透速度缓慢,但反应迅速,均匀固定深度**0.25mm**；
- 固定时间一般为**1-2**小时,时间太长易使组织变脆,切片困难；
- 锇酸固定液常用浓度：**1%—2%**；

**极易挥发，对粘膜、角膜毒性极大,操作要十分小心!**



### (3) 甲醛-Formaldehyde

- ◆ 渗透组织的能力比戊二醛强，对于致密组织（种子）固定作用好；
- ◆ 细胞精细结构保存质量不如戊二醛，但酶活性的保存优于戊二醛；
- ▼ 缺点：不能较好的固定细胞基质，脱水后大部分细胞基质将丢失；

\* 常用多聚甲醛—戊二醛的混合固定液。

### (4) 高锰酸钾

- ◆ 强氧化剂，较好固定脂蛋白；
- ◆ 对神经髓鞘、叶绿体及其他各种膜结构的研究均可作为固定剂；
- ◆ 只用于某些常用固定剂难以固定的植物和酵母样品，且一般不需要用锇酸后固定。

# 固定中要注意的问题

- **pH值:**

固定液与组织液的**pH** 应接近,以保持原生质,膜的选择性以及酶的活性,避免蛋白质变性;生物组织**pH 7.2~7.4**; 富水动物组织(原生动物,胚胎)**pH8.0~8.4**

- **固定液渗透压与离子组成:**

低渗肿胀,高渗收缩.

**调整方法:**固定液中加**K,Na,Ca**盐,葡萄糖,蔗糖等可调节固定液与组织的渗透**Ca<sup>++</sup>,Mg<sup>++</sup>**等二价阳离子可减少细胞内物质的抽提,但浓度大易沉淀; (**文献的重要**);

# 漂洗

## 漂洗的目的:

- ◆ 双重固定中,在锇酸固定前的漂洗:  
避免锇酸与戊二醛反应生成细小而致密的锇沉淀,破坏细胞结构.
- ◆ 组织固定后脱水前的漂洗:  
清除残留固定剂,减小固定剂和脱水剂之间的反应,避免沉淀物干扰超微结构的观察.

常用缓冲液	优点	缺点	pH
磷酸盐缓冲液	对细胞无毒性作用,缓冲能力强	固定时易产生沉淀,易长细菌	生物材料一般 <b>6.8</b> ~ <b>7.4</b>
二甲砷酸盐缓冲液	不易长细菌,与低浓度钙质 <b>1-3mM</b> 不发生沉淀反应	<b>有毒(通风橱)</b>	
醋酸-巴比妥缓冲液	固定时不产生沉淀	易长细菌,只适于配锇酸固定液,不适合配醛类(缓冲失效)	

# 脱水

## ■ 目的

将组织内的游离水彻底清除,保证包埋介质**完全**渗入组织内部。

## ■ 方法

用一种和水及包埋剂均能相混溶的液体来取代水,常用的脱水剂是**乙醇**和**丙酮**。

## 注意事项

- ◆ **脱水梯度逐级进行**,急剧脱水会引起细胞收缩。  
(**50%→70%→80%→95%→100%→100%**) ;
- ◆ **更换溶液动作要快**。长时间暴露空气中会在组织内外产生微小气泡,影响渗透;
- ◆ 脱水过程中可在**70%**脱水剂中**4℃**停留或过夜,过度脱水不仅引起更多物质的抽提,而且会使样品发脆,造成切片困难;

# 以电子束作为光源的样品制备的基本原则

保留细胞生命状态下的细节，细胞需要固定——双固定



电镜镜筒处于高真空，只能观察脱水后的细胞——梯度脱水

TEM



样品要很薄，一般**50nm**，对高速电子有一定的耐受力——包埋，切片



生物样品需要重金属染色，增强电子散射能力——染色



负染色

SEM



防止脱水剂在大气中的急剧气化，降低样品表面张力——临界点干燥



干燥的生物样品不导电，为避免热损伤，提高图像质量，产生更多的二次电子——喷金

# 渗透和包埋、聚合

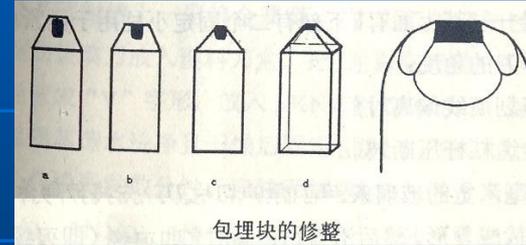
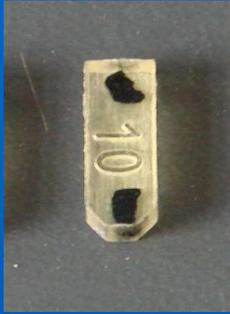
- 渗透就是利用**包埋剂**渗入到组织内部**取代脱水剂**的过程。
- 包埋剂在单体状态时**(聚合前)**为液体，能够渗入组织内，当加入某些**催化剂**，经加温或其他条件，能聚合成固体，以便进行超薄切片。

## ◆ 水溶性树脂—丙烯酸类树脂

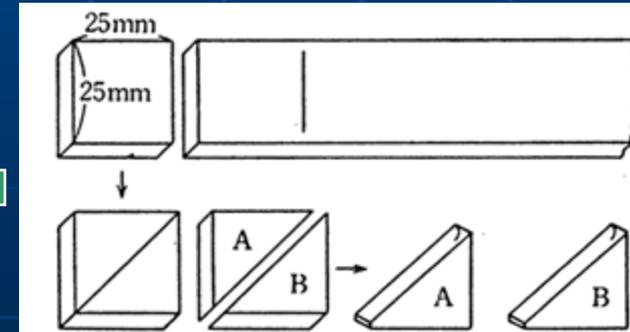
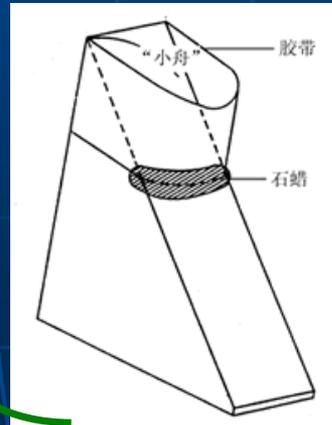
- **LR White**，毒性小，粘度低，容易渗透。



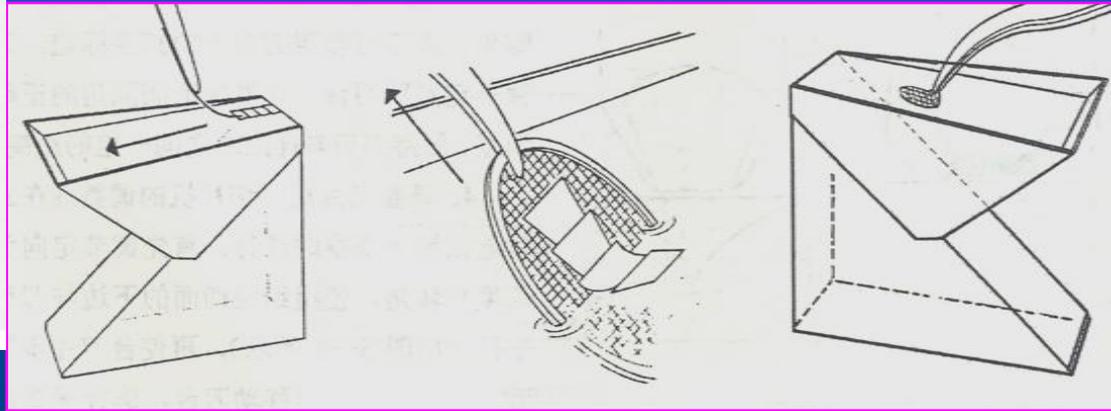
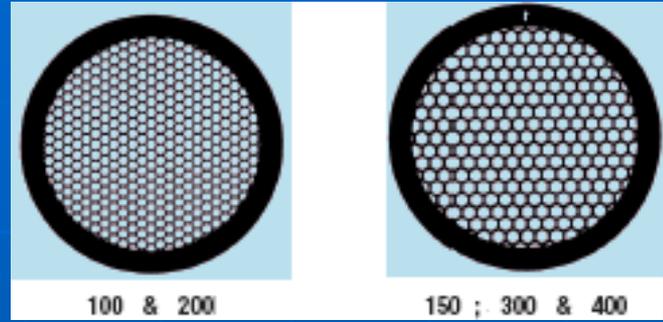
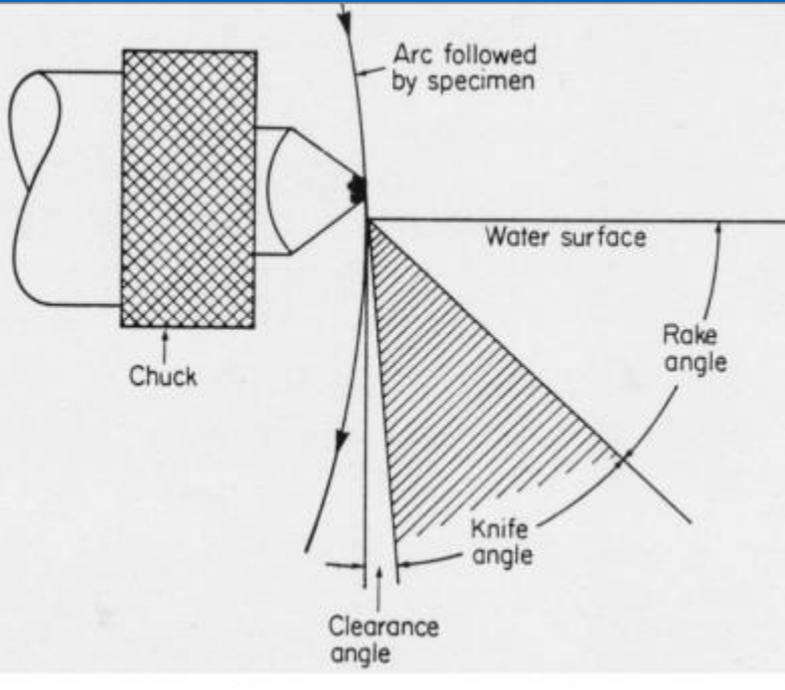
# 包埋 修块 制刀



包埋块的修整



# 切片



< 500 A	600- 900A	900- 1500A	1500- 1900A	1900- 2400	2400- 2800A
灰色	银灰色	金黄色	紫色	蓝色	绿色

# 染色

[目的]将重金属原子结合到细胞结构上使造成图像反

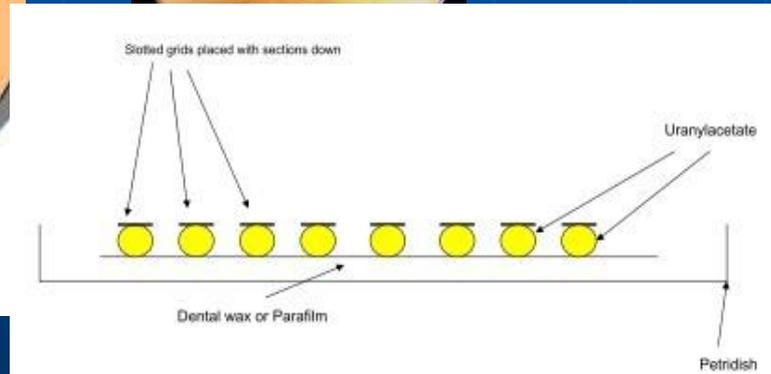
差

重金属：铅盐（Pb,82）蛋白质，糖元，脂类（细胞质及膜看得清楚）

铀盐（U,92）蛋白，核酸，特易于核酸

## • 铅-铀双染

- 1. 铀染液滴在蜡盘上
- 2. 将铜网切片面漂在染液滴上
- 3. 避光染色15'~30'
- 4. 蒸馏水洗3次
- 5. 滤纸吸水，晾干

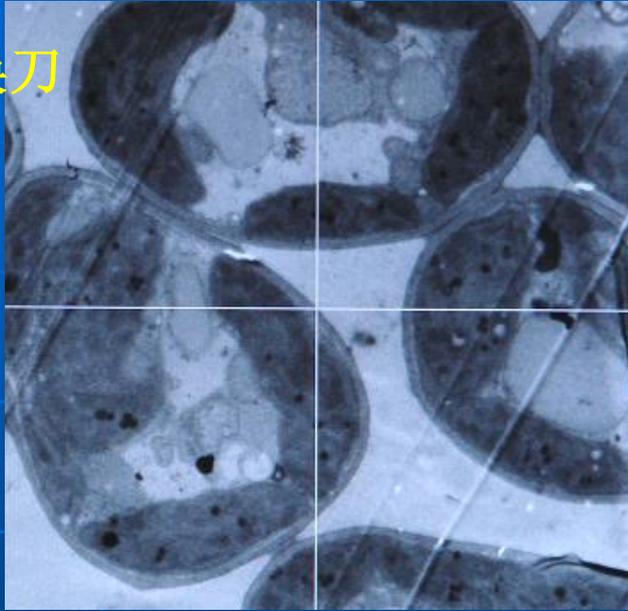


## • 铅染

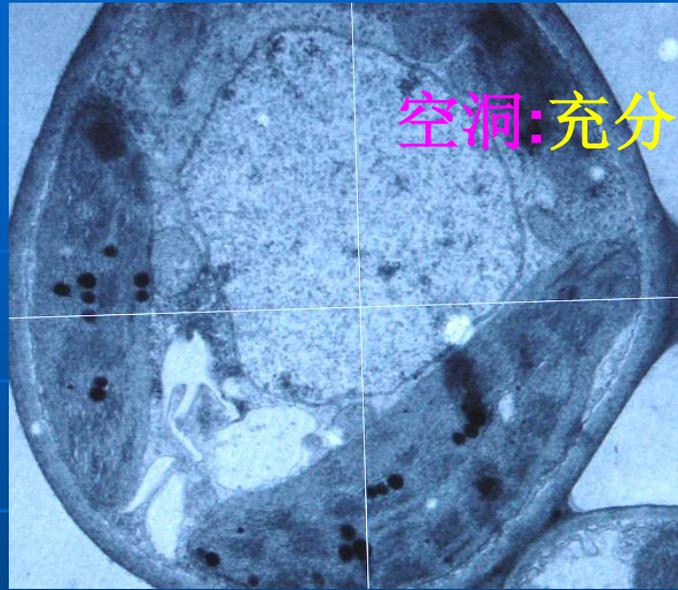
与铀染过程近似. 蜡盘上放固体NaOH  
消除空气中CO<sub>2</sub>,以免与柠檬酸铅生成  
碳酸铅沉淀污染切片,清洗晾干

# 包埋与切片时常见问题与对策

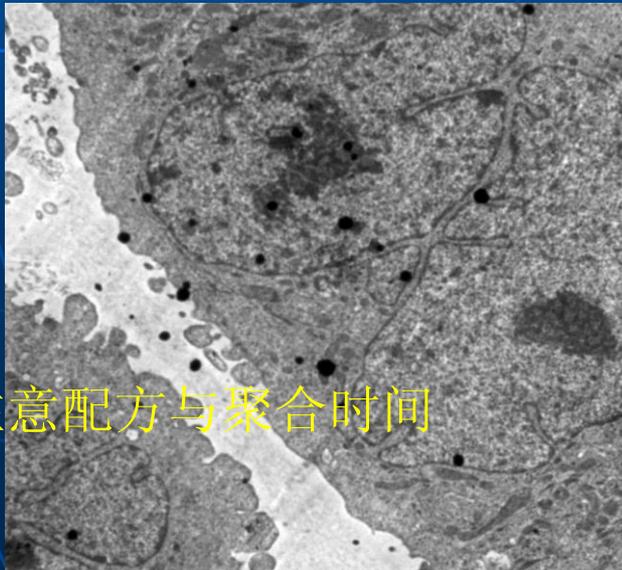
刀痕:换刀



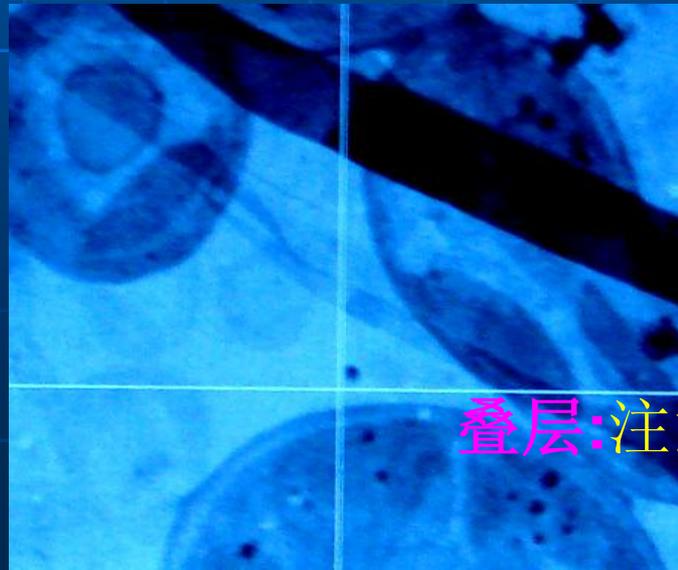
空洞:充分脱水



碎裂:注意配方与聚合时间



叠层:注意捞片



# 以电子束作为光源的样品制备的基本原则

保留细胞生命状态下的细节，细胞需要固定——双固定



电镜镜筒处于高真空，只能观察脱水后的细胞——梯度脱水

TEM



样品要很薄，一般**50nm**，对高速电子有一定的耐受力——包埋，切片



生物样品需要重金属染色，增强电子散射能力——染色



负染色

SEM



防止脱水剂在大气中的急剧气化，降低样品表面张力——临界点干燥



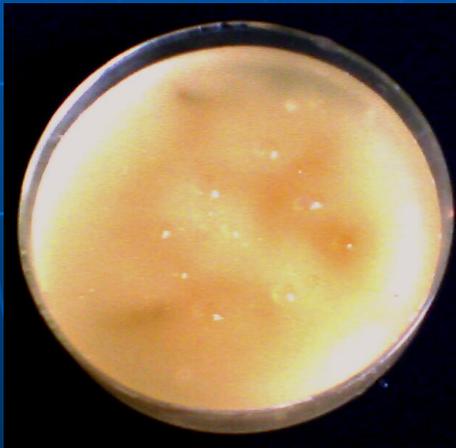
干燥的生物样品不导电，为避免热损伤，提高图像质量，产生更多的二次电子——喷金

# 负染技术适用样品范围

- 游离细胞亚单位
- 细菌, 噬菌体, 病毒与病毒亚单位
- 生物大分子(核酸, 蛋白质)等

## ◆ 样品浓度:

低浓度找不到样品, 太浓凝集成团, 看不见单体结构. 参考浓度: 细胞或细胞器  $10^5/\text{ml}$ , 蛋白质  $5\sim 10\text{mg}/\text{ml}$



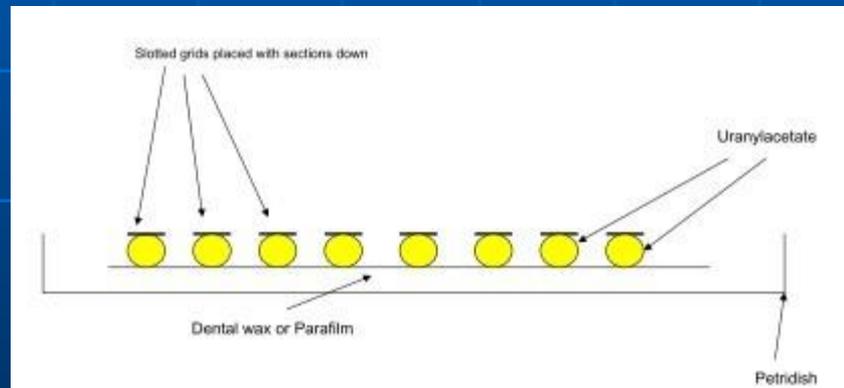
滴样  
30s/1mim



水洗  
30s/1mim

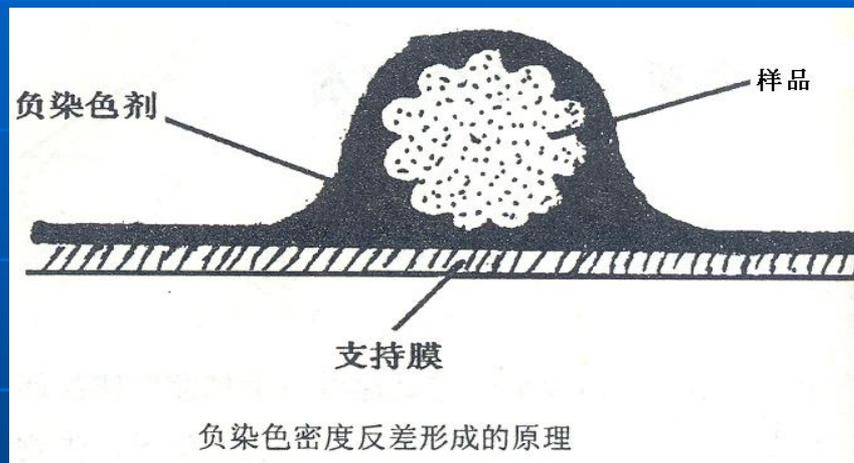


染色  
30s/1mim



# 负染色技术原理

■ 用重金属盐堆积在样品周围,提高外周电子密度反衬样品。



• 电镜下可看到样品部分透亮,周围暗。

# 以电子束作为光源的样品制备的基本原则

保留细胞生命状态下的细节，细胞需要固定——双固定



电镜镜筒处于高真空，只能观察脱水后的细胞——梯度脱水

TEM



样品要很薄，一般**50nm**，对高速电子有一定的耐受力——包埋，切片



生物样品需要重金属染色，增强电子散射能力——染色



负染色

SEM

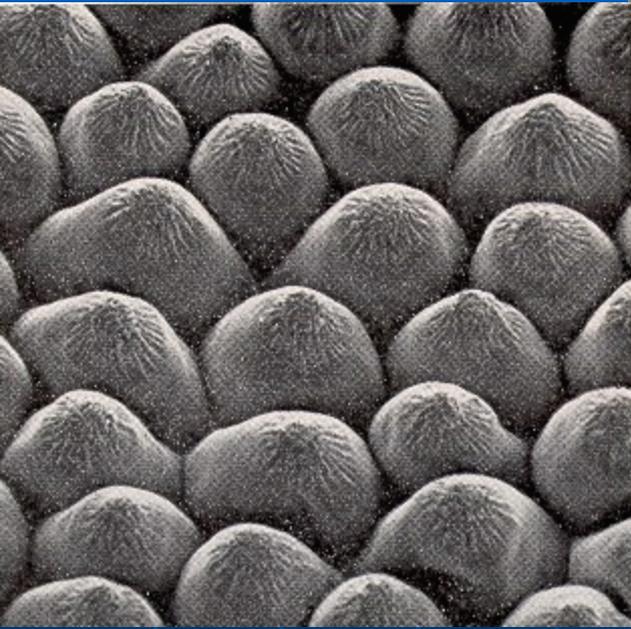


防止脱水剂在大气中的急剧气化，降低样品表面张力——临界点干燥



干燥的生物样品不导电，为避免热损伤，提高图像质量，产生更多的二次电子——喷金

玫瑰花瓣表面的SEM  
照片(850X), CPD (critical  
point dryer)干燥



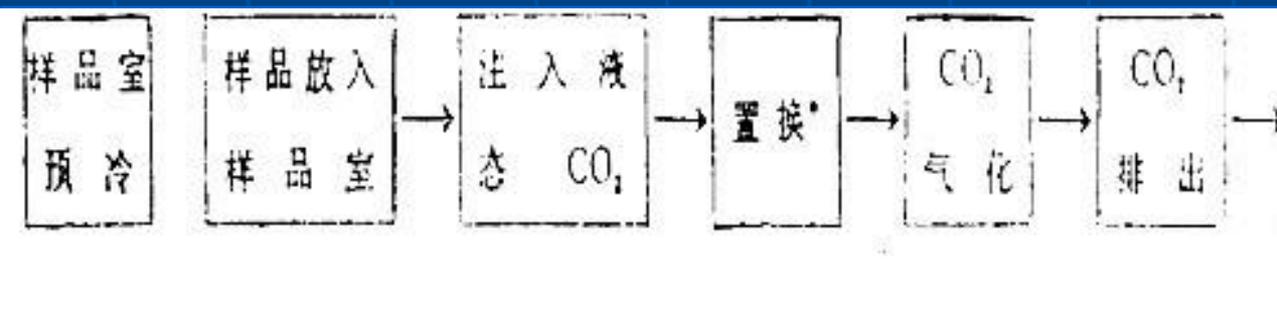
玫瑰花瓣表面的SEM照片  
(850X), 风干干燥



# 临界点干燥法(CPD: critical point dryer)

- **临界点:** 大多数液体在室温下存在明显的气液两相界面，随着温度增高，饱和蒸汽压也增高。由于蒸汽速度加快，液相密度下降，气相密度增加，当温度增加的到某一特定值时，气液两相密度相等，此时界相消失，表面张力等于零。这种状态称为临界点状态。
- **临界点干燥法:** 是利用物质在临界状态时，其表面张力等于零的特性，使样品的液体完全汽化，并以气体方式排掉，来达到完全干燥的目的。

干燥剂	临界压力	临界温度
CO <sub>2</sub>	72.8公斤/(厘米) <sup>2</sup>	31.5℃



# 离子溅射镀膜法 (ion sputtering device)

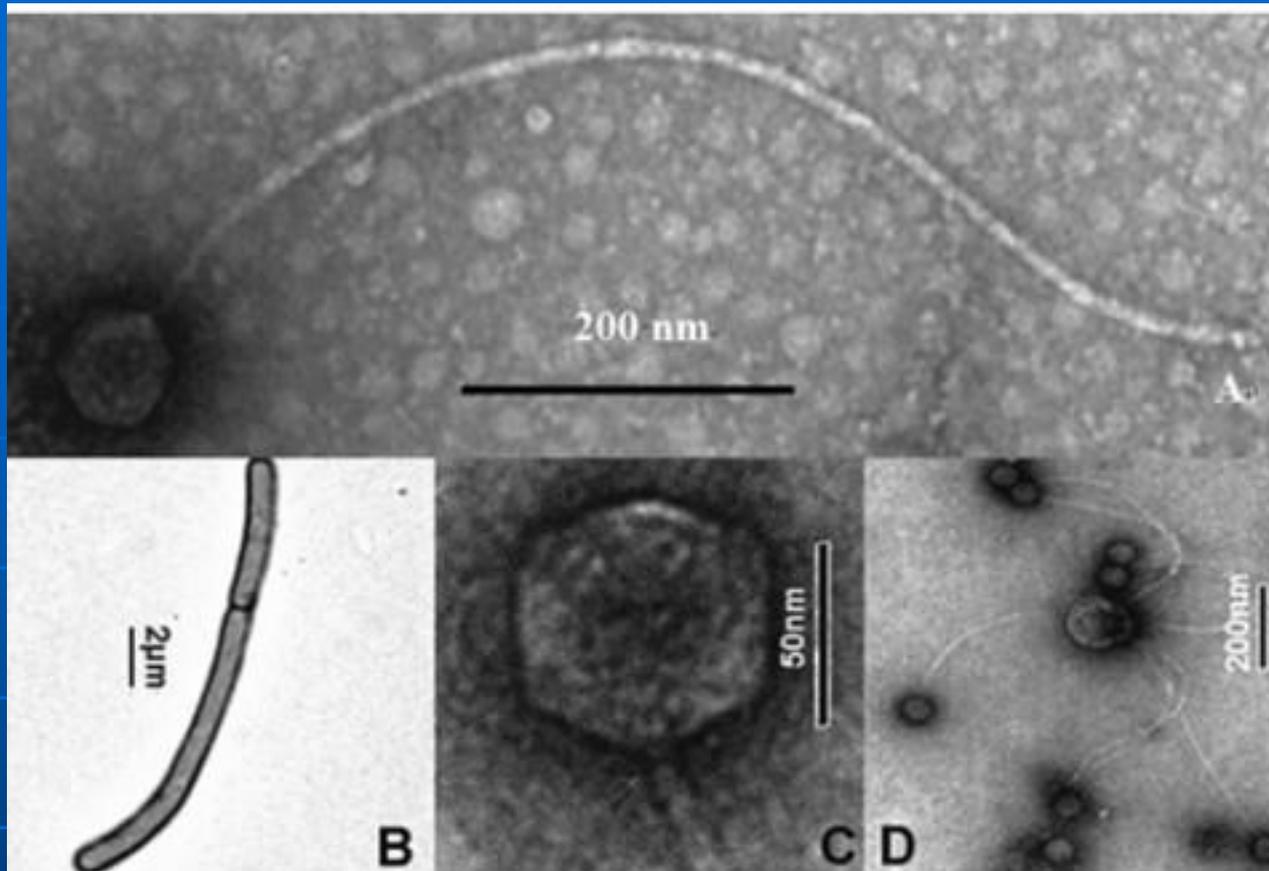


- **原理:** 在低气压系统中, 气体分子在相隔一定距离的阳极和阴极之间的强电场作用下电离成正离子和电子, 正离子飞向阴极, 电子飞向阳极, 二电极间形成辉光放电, 在辉光放电过程中, 具有一定动量的正离子撞击阴极, 使阴极表面的原子被逐出, 称为溅射, 如果阴极表面为用来镀膜的材料 (靶材), 需要镀膜的样品放在作为阳极的样品台上, 则被正离子轰击而溅射出来的靶材原子沉积在试样上, 形成一定厚度的镀膜层。

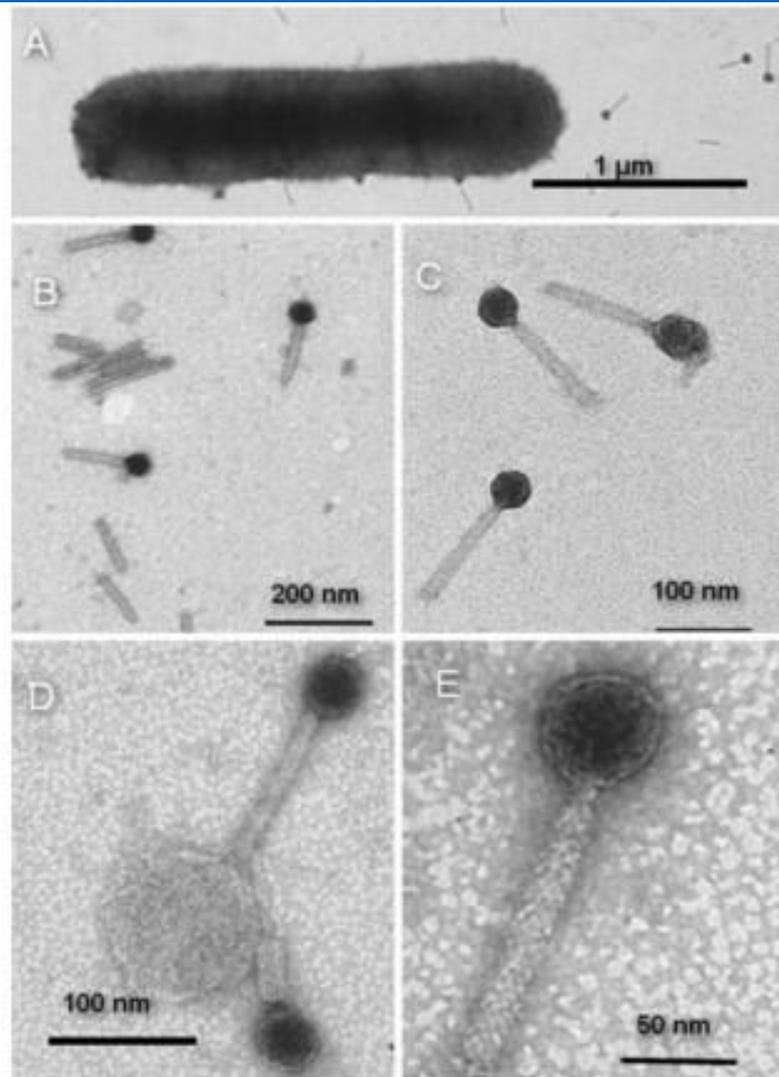
# 微生物样品

## 应用扫描和透射负染观察的区别

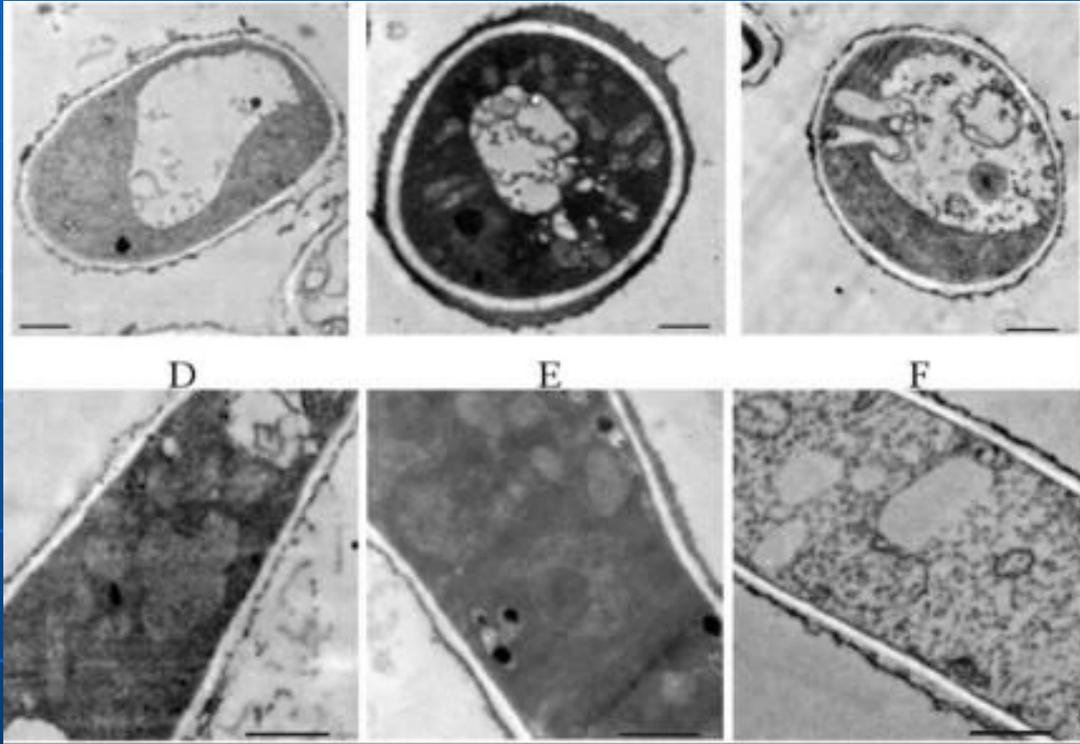
- 立体的外貌体征与边缘表观
- 外部结构稳定性的需要（鞭毛）
- 分辨率的需要（病毒）

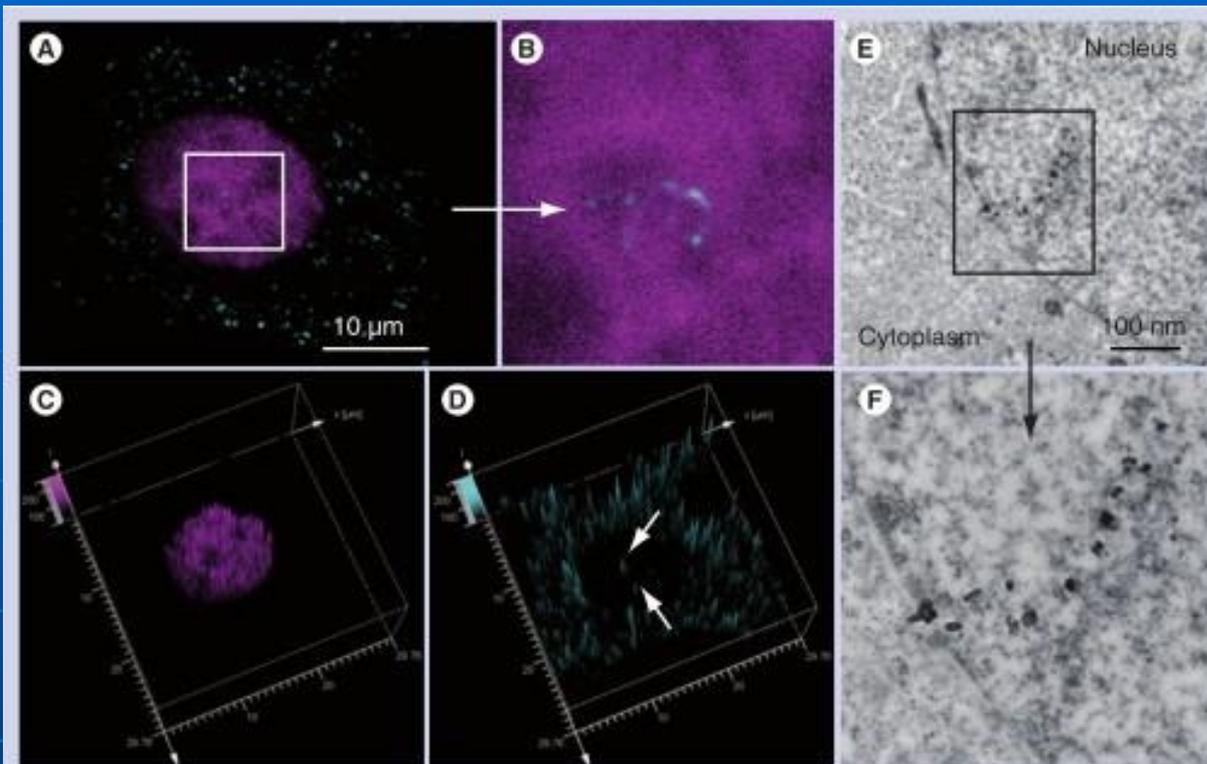


**Figure 1.** Transmission electron micrographs of TSP4 and its host cells. A: The complete phage TSP4 with extremely long flexible tail and hexagonal head. B: Cells *Thermus* TC4. C: Close view of the hexagonal head of TSP4. D: Adsorption of TSP4 on cell debris.

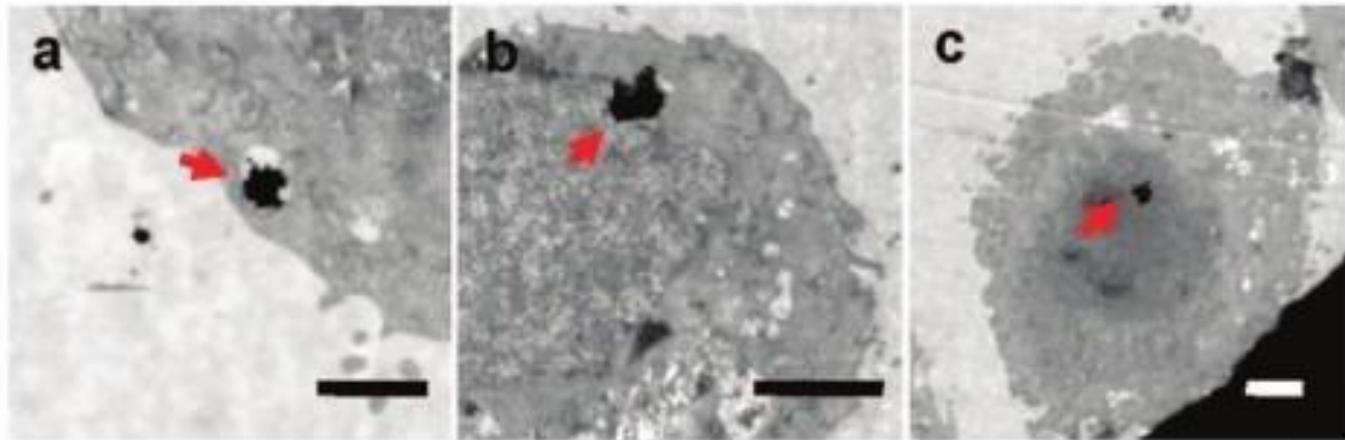


**Fig. 1** Transmission electron micrographs of MMP17 and its host cell *A: a* *Meiothermus* TG17 Cell and MMP17 particles. *b* MMP17 particles and separate tails. *c, e* Close view of MMP17. *d* Adsorption of MMP17 on cell debris

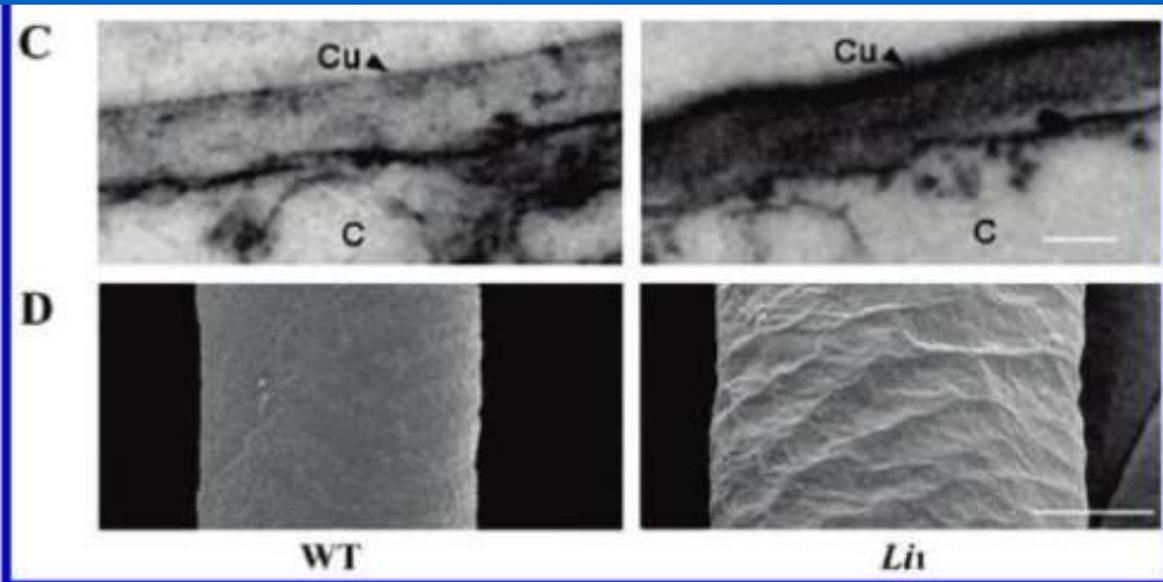




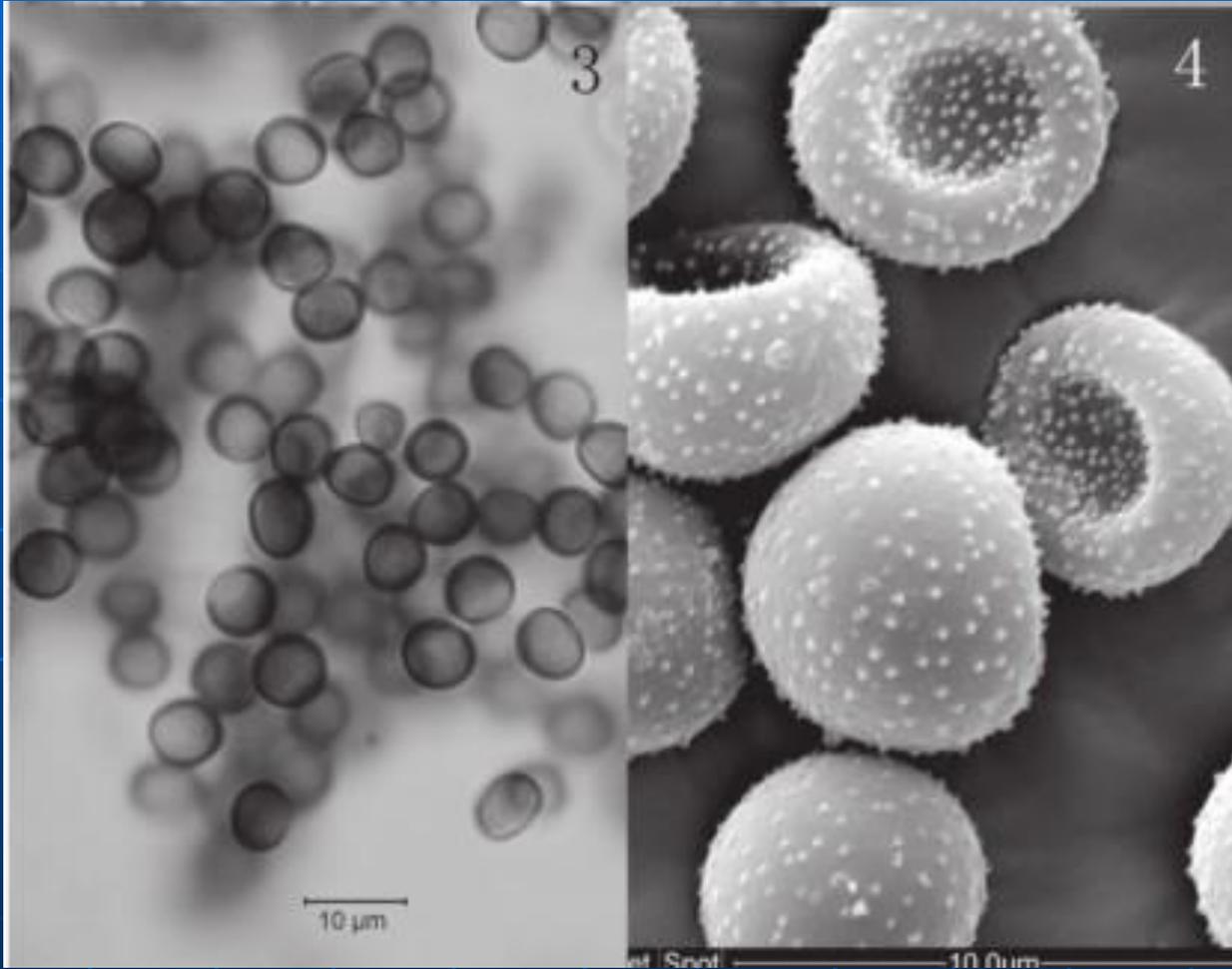
**Figure 4.** Confocal laser scanning microscopy images (A–D) and transmission electron microscope scans (E & F) of HepG2 cells treated with 10-hydroxycamptothecin nanocrystallites.

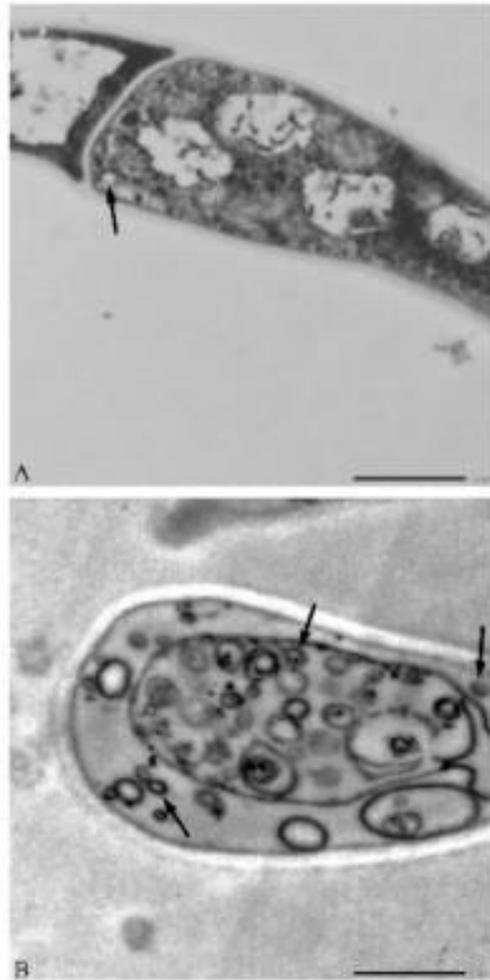


**Figure 6.** TEM images of HP-a (indicated by red arrow) uptake by HepG2 cells. The HP-a was first phagocytosed into vesicle (a), localized around nucleus afterwards (b), and finally intruded into the nucleus (c) (scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ).



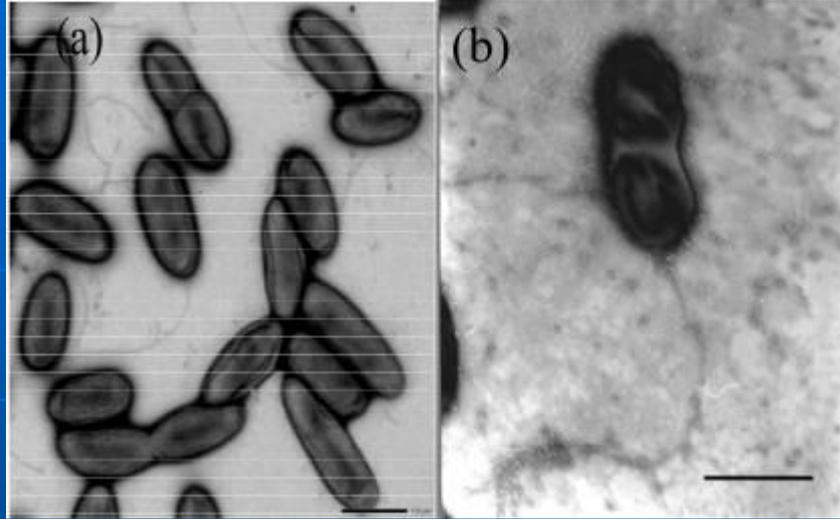
**Figure 1.** Morphology of wild-type (WT, left) and *Li<sub>1</sub>* mutant (*Li<sub>1</sub>*, right) cotton. (A) Adult cotton plants of wild-type and *Li<sub>1</sub>* mutant. Bar = 10 cm. (B) Ovules attached with fibers. Upper panel: mature fibers, Bar = 1.5 cm; lower panel: 12 DPA fibers, Bar = 1 cm. (C) TEM images of cell wall of wild-type and *Li<sub>1</sub>* fibers at 12 DPA (c, cytoplasm; cu, cuticle,). Bar = 0.1  $\mu$ m (D) SEM images of cell wall surface of wild-type and *Li<sub>1</sub>* fibers at 12 DPA, Bar = 10  $\mu$ m.





#### 4 野生型菌株与 tz4 电镜下细胞结构

Fig.4 Electron micrographs of peroxisomes in *P. aurantiigriseum* cells.  
A: wild type cell; B: tz4 cell. Peroxisomes are indicated by arrows. The bar represents 1  $\mu\text{m}$ .



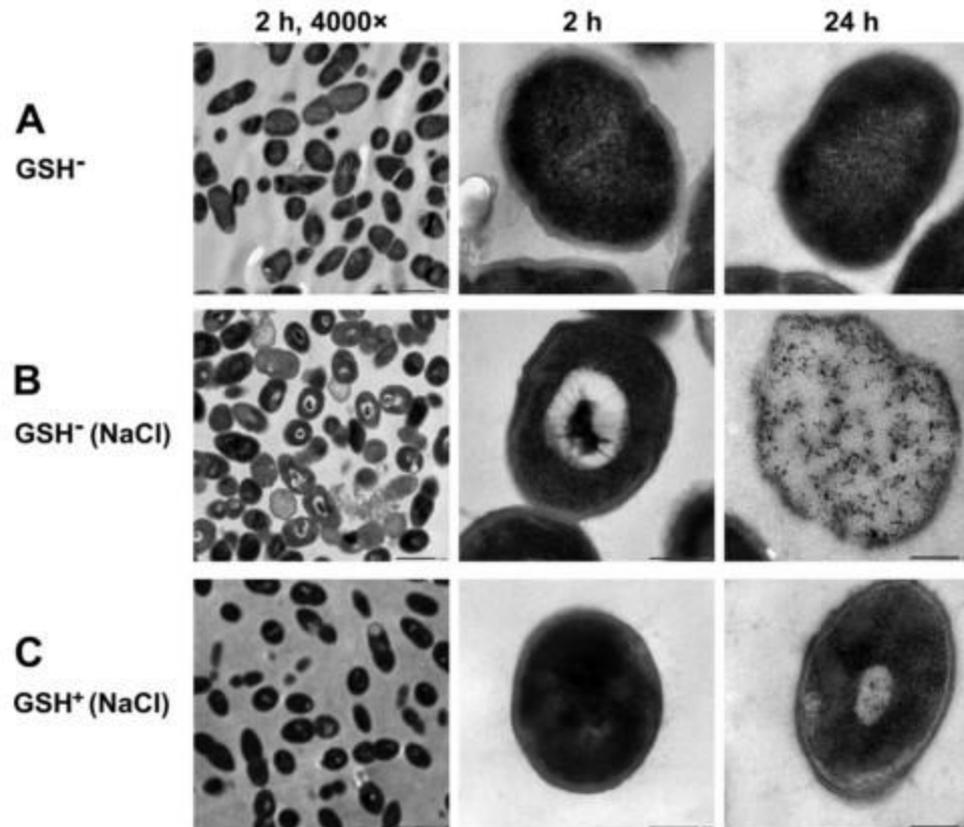


FIG. 2. Effect of GSH on morphological changes in SK11 cells after exposure to osmotic stress. (A) Control, unstressed GSH<sup>-</sup> cells. In the 25,000× images, the dark particles are ribosomes and the ribosome-free spaces contain chromatin (28). (B) GSH<sup>-</sup> cells exposed to 5 M NaCl for 2 h and 24 h. Electrolucent cavities, the so-called "nuclear vacuoles" (12), were present in stressed GSH<sup>-</sup> cells, and coarse aggregates of chromatin appeared in these electrolucent cavities. (C) GSH<sup>+</sup> cells exposed to 5 M NaCl for 2 h and 24 h. Scale bars for 4,000× panels, 1.0 μm; scale bars for 25,000× panels, 200 nm.

谢谢大家.



梁静南

[liangjn@im.ac.cn](mailto:liangjn@im.ac.cn)

办公室: A116/114D

电话: 64807407/64807416