

获取高质量生物样品图象的电镜技术浅析*

章潜才 伦璇 李济和

(中心实验室)

提 要

获取高分辨率和高反差的生物样品电镜图象受许多因素的影响,它包括切片厚度的选择,电镜的校直合轴、加速电压的选择、以及聚焦方法和曝光时间等。除生物样品制备技术这一重要因素外,必须考虑到上述各因素间的相互关系及其综合选择、然后才有可能获得高质量的生物样品的超微结构图象。

关键词 分辨率; 反差; 校直合轴

前 言

生物学电镜工作者的研究对象绝大多数是动植物,昆虫,微生物及病毒等,这些标本(包括细胞和组织)的主要成份是由C、H、O、N等轻元素组成,对于依靠振幅反差成像的电子显微镜(TEM)来说,它们的电子散射能力是很微弱的,尽管在样本制备过程中采取了用重金属盐染色的技术来增强对电子的散射能力,提高图象的反差,但其结果仍不能令人满意。在多年的电镜工作实践中,我们发现,对于一生物标本,要获得一幅反差好,分辨率又高的电镜图象,在电镜操作技术上,充分发挥仪器的性能和特长,并综合考虑它们的效应是很值得重视的,而且是行之有效的。

材 料 和 方 法

(一) 材料

小白鼠肝脏组织、鸡盲肠组织、玉米叶肉组织。

(二) 制样方法

采用常规的双固定技术,即4%戊二醛和1%四氧化锇双重固定,0.2M磷酸缓冲

* 本文承梁福仁教授、孔宪杨高级实验师审阅,特此致谢!
1987年11月27日收稿

液漂洗、乙醇系列脱水、环氧树脂EPON 812包埋、钻石刀切片、醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色。

(三) 仪器及其主要性能

本室 PHILIPS EM400 高分辨率型透射电镜。倍数范围: 50~800000倍; 最佳分辨率: 点一点 3 Å、线一线 1.44 Å; 最佳真空度: 10^{-7} 托; 加速电压选择: 20、40、60、80、100、120KV; 可调物镜光阑: 20 μ、40 μ、70 μ。

获得高质量图象的影响因素和技术

(一) 厚度适当的超薄切片

从“质量厚度”这一理论出发, 我们知道, 要获得高分辨率的图象, 就需要极薄的切片, 相反地, 要获得反差好的图象则要求切片厚一些。早期的电镜工作者认为^[2], 要获得分辨率高(15~25 Å) 反差亦好的图象, 要求超薄切片厚度为500~600 Å左右, 并且认为超过1000 Å(0.1微米) 厚的切片无法在电镜下成像。这在当时来说无疑是正确的。因为仅就加速电压这一因素而言, 当时的电镜远不如现代的电镜。在六十年代和七十年代初, 具有80 KV 以上加速电压的电镜极为罕见, 即使有也必须在仪器处于最佳状态下才能达到。这就大大地限制了用作照明的电子束流对样品的穿透能力, 如果采用1000 Å厚的切片, 不要说分辨率, 就连图像也分辨不清。然而, 现代的电镜具有较高的加速电压可供选择, 获取80 KV、100 KV甚至更高的加速电压用作照明是轻而易举的事情, 因此增强了电子束对样品的穿透能力, 达到了较为理想的照明。根据仪器的这一特点, 在实际工作中, 我们常采用800 Å左右厚度的切片(干涉颜色为淡黄色至金黄色) 来进行分析, 而不是追求薄于600 Å(干涉色为白色至灰白色) 左右的切片。采用这种厚度的切片有二点较为突出的优点: 1. 能获得较好的反差(图1、2)。在这一厚度范围内, 分辨生物样品中的大多数超微结构如叶绿体片层结构、线粒体、高尔基体、多聚核糖体、内质网、细胞核膜及其它膜系统等是毫无问题的。由于“质量厚度”的增加, 电子散射量增大了, 反差也获得了一定的提高。2. 容易获得完整的较大面积的超薄切片。对于植物样品来说, 这是很重要的, 植物标本中纤维素、半纤维素较多, 液泡化的细胞也多, 有些标本还具有较硬的硅质细胞, 要获得薄于600 Å, 面积为0.5平方毫米的大块切片是相当困难的(用玻璃刀切片, 矛盾更加突出), 切片很容易破碎。而获得800 Å左右的切片就相对容易得多, 这就为超薄切片和科研工作带来便利。

(二) 电镜的校直合轴

要获得高质量的电镜照片, 首要的仪器条件是使透镜的轴线和光轴一致, 达到这一要求的操作过程便是校直合轴^[3]。现代电镜的许多合轴调整是相当稳定的, 可以在较长的时间内不必再校正, 有时只是在拆开镜筒作维修或清洗后才需要重新合轴。然而,

照明系统则是要经常调整的。当更换灯丝后，照明系统的合轴一定要进行，同时，由于热变形的影响会引起光束的变化，所以，往往经过几小时，就应再一次检查灯丝的对中情况。在日常的操作过程中，也应每天检查2~3次灯丝的饱和状况，观察其是否达到饱和点。如果没有饱和，虽然灯丝寿命会长一些，但是在最终成像荧光屏上会出现明暗不均的照明（图3），低倍状况下更是如此。如果过饱和，则将严重影响灯丝的寿命。

物镜光栏的合轴是否也直接影响成像质量。由于生物样品反差普遍较弱。通常要使用30微米或20微米直径的光栏。如果它们没有很好地和光轴合轴的话，就很容易引起像散，特别是当光栏污染了的时候（图4、5）。现代电镜中，物镜光栏在低倍和高倍情况下是自动地退出和引进的。当光栏退出后再引进时，如果复位不好的话，就需要重新对中。对中的方法很简单，在EM 400电镜上，只要当光栏引入后，调整适当的倍数（>3000倍），按下衍射模式钮（D），调整第二聚光镜的强度开关和衍射聚焦旋钮，便能清晰地看到光栏的图象，然后用光栏对中旋钮调整光栏对中。

高倍摄影时，会碰到像散干扰图象质量的问题，这是由于光栏污染、不对中，误转动了消像散旋钮等引起的。在较高倍数情况下（大于十万倍）很容易发现。这时，首先检查物镜光栏对中情况，然后用消像散器消除像散。操作时可把倍数开关提高到比拍摄倍数更高的倍数挡级上（如30万或50万倍）进行调整，像散消除后再回到要拍摄的倍数挡级上。这样便能获得一张质量极高的电镜照片（图6、7）。

电流中心或电压中心的调整，在电镜的合轴中也是非常重要的一环，现代电镜中都备有这种合轴装置。所谓电压中心，即是在加速电压上加上周期性的电压波动，使微栅孔的像扩大或缩小。良好合轴后，微栅孔的像便同心地扩张或缩小。如果在物镜电流上加以周期性的电流变化，则像点会旋转。合轴良好时，像点不动，这就是电流中心。当聚焦样品图像时，如果发现改变焦点图像出现移动，则说明这种合轴不良，就需要进行电流中心或电压中心的合轴。不同型号的电镜合轴操作会有所不同。从目前电镜的发展看，合轴操作逐渐用电磁自动合轴所取代，操作简便而精度高。

检查合轴是否良好的最终标准是：1.改变放大倍数时，视场中心不变；2.改变物上照明时，光的均匀性和光心不变；3.从一种成像的方式到另一种成像方式时，照明状况不变；4.对图像聚焦时，图像不移动。

（三）加速电压的选择

正确地选择加速电压能够有效地提高反差和分辨率。在操作过程中，应根据自己的研究目的适当地进行选择。对于高分辨率的研究来说，要选择较高的加速电压，如100 KV或120 KV甚至更高；对于高反差的研究来说，要选择较低的加速电压，如80 KV或60 KV甚至更低。由于电子的散射强度与电子束加速电压的平方成反比，因此，当物镜光栏大小相同时，降低加速电压可以很有效地提高反差。据计算，当加速电压从40 KV降至20 KV时，增加的反差相当于将常规的物镜光栏缩小33倍^[4]。我们在实践中发现，当加速电压从80 KV降至60 KV时，反差的提高相当于把物镜光栏从40微米变换为20微米。

米的效应,即是说,80 KV,20微米物镜光栏的反差效应,相当于60 KV,40微米物镜光栏的反差效应(图8、9)。

值得指出的是,加速电压低时,由于电子波长较长,速度低,易受杂散电磁场的干扰,对污染特别敏感,色差增大,因而分辨本领大大降低。一般地,低加速电压只用于低放大倍数。

(四) 物镜光栏的选择

增加生物样品反差的方法是多方面的,如上述降低加速电压法、增大切片厚度和离焦反差法等,而最富戏剧性变化的莫过于物镜光栏法。在电镜操作过程中,加入适当大小的物镜光栏,并把它放在接近透镜的中心,用它来限定物镜的接受角和数值孔径。散射角大于物镜接受角的电子打在光栏表面上,因光栏接地而被除去,而散射角小的电子则被接收,从而大大改进了图象的反差。对于厚切片(800 Å左右)低电压(60 KV),我们一般采用40微米直径光栏,高电压时(80~100 KV)可采用30微米直径的光栏。对于薄切片(600 Å左右),则一般采用30微米光栏甚至更小。要注意的是,太小的光栏,在低倍时会限制视场,出现这种情况,可采用低电压,大光栏(如3所述),在改变振幅反差方面,可达到异曲同工之妙。

在没有防污染装置的情况下,光栏越小越容易污染。光栏一旦污染,这些污染物便将形成一个小的静电场,干扰主光束,增大像散,使图象质量大大降低。出现这种情况,唯一的办法是更换清洁的光栏。

(五) 聚焦

关于电镜的聚焦方法,在许多著作中都有详细的论述^{[1][5]},综合起来主要有如下几种:1.电子束摇摆法,适用于高倍、低倍;2.最小反差法,用于低倍(<10,000)精确聚焦或高分辨率聚焦;3.最大反差法,适用于高放大倍数;4.费涅尔衍射环法,适用于高倍。

这些方法,在实践中经常使用。容易使人忽视的是,使用小荧光屏聚焦时,所用的双筒观察目镜的屈光度校正。由于操作者的视力差异,必须首先作双筒观察目镜屈光度的补偿调整,否则,正确的聚焦便不可能获得。

(六) 正确曝光

拍摄照片是用电镜对样本进行研究的重要步骤。荧光屏上的像是短暂的,无论是为了对细节进行研究或测量,都需要拍摄照片,同时,因为底片的分辨率比荧光屏的分辨率高得多,所以,利用照片进行超微结构的分析,往往可以获得更多的信息,也便于长期保存和比较。现代电镜都备有曝光测量装置,根据不同的电子曝光量(束流与曝光时间的乘积),仪器将自动地给出一个正确的曝光,并通过显示系统告诉操作者。获得一帧正确曝光的照片对于操作者来说并不用太操心。但是,尽管如此,从我们的实践中发现,获得正确曝光仍有几点问题不可忽视。

1.底片的敏感性测定,即是底片的感光度与仪器的敏感性相互适应问题(类似于照相机上的感光度选择)。由于底片来源不同,甚至同一厂家不同批号的底片它们的感光度都有差别,所以,在开始使用新一批的底片之前,要作敏感性的测定。测定的方法是:选择一个感兴趣的视野,在同一加速电压下选定一个照明强度,把仪器上敏感性选择开关由低至高或由高至低地逐级拍摄一张底片,冲洗底片后进行比较,确定一张曝光最佳的挡级作为选择,把敏感性选择开关拨至相应的位置上即可。

2.大屏测量与小屏测量的选择。现代电镜中一般都配备有这两种荧光屏供观察和测量曝光时间。大屏测量给出的曝光是整个视野的照度的均值,如果拍摄范围的照度和整个视野的照度范围没有很大差别时,它所给出的曝光是正确的,例如拍摄细胞或组织结构时常使用大屏测量。但是,当拍摄范围内的照度与视野的照度有较大差别时(给出的曝光时间差为0.3秒以上),如病毒或其它微生物的摄影时,往往会遇到这个问题,这时就需要利用小荧光屏来作正确的曝光测量了。用小屏测量时要注意把拍摄主体置于小屏的视野内。

3.虽然现代电镜中不管荧光屏上的亮度如何都能给出一个曝光时间,但事实上在曝光时,往往需要把亮度调整到较舒适观察更暗一些的亮度下去确定曝光时间。日本厂家生产的电镜考虑了这一因素,在曝光时只要调整第二聚光镜的“强度”开关使曝光指示绿灯出现即为达到条件。但是荷兰飞利浦生产的电镜没有这一设置,这就需要在拍摄时,在舒适观察情况下把亮度调暗一些。如果我们通过双目镜进行仔细观察的话,会发现在这种情况下,样品的许多细节便显现出来。我们一般把曝光时间调整到2~3秒。

(七) 底片的选择

电镜用底片因来源不同而各异,多采用富士、公元、保定、印刷用SO软片和红旗牌电子感光片等。有人曾对前四种底片的成像效果作过比较(张建平,“电镜照片处理”中南地区电镜技术交流会)成像完好率分别为98.7%、96%、95%和94.3%,差距并不很大,在实际应用中各有长处。富士的电镜专用底片无论在分辨率、反差、灰雾度各方面都比国产的一些底片要优越一些,但是价格昂贵,来源受到限制。我室长期采用汕头感光厂生产的印刷用SO软片作为电镜用底片。这种软片乳胶颗粒细,反差好,对于生物学工作的要求基本能够达到,且价格便宜、来源丰富。缺点是片基较薄,有效期短(半年至一年),需要裁剪等。在使用过程中要注意不要一次购买太多,一旦过期,灰雾增大,甚至不能使用,造成浪费。红旗牌电子感光片颗粒细、反差好,是早期国内电镜室常用的底片,但由于片基是玻璃的,在冲印等后处理中很容易造成药膜脱落、划伤,在保存方面也不方便。

由于国内在最近一段时间里电镜得到了极大的发展,数量越来越多,因而促使了国内一些感光材料厂对电镜用底片着手进行研究和生产,主要有公元和保定牌电镜用底片。据使用效果看,各有优缺点。公元牌的底片颗粒细、层次丰富、反差好,但灰雾略嫌大一些,而保定的底片颗粒粗一些,反差强,透明度高,但层次略嫌不足。

以上几种底片都可用作电镜底片,只要在使用过程中注意掌握它们各自的特点,扬长避短,都能为获得高质量的电镜照片作出贡献。

结果和讨论

获得高质量电镜图象的影响因素是多方面的,综合性的。在每一处理或操作过程中都必须十分细微认真和谨慎。电镜工作者的责任不限于熟悉仪器的操作,还要善于随时发现工作中的问题,找出相应的对策,以求获得一帧高质量的电镜图象供研究和分析。

对于生物学工作者来说,采用 600Å — 800Å 厚的超薄切片对于大多数研究目的都能获得令人满意的结果。如果研究目的追求的是分辨率则切片要求薄一些,如果要求的是反差则切片要求厚一些。

电镜的校直合轴工作无论对哪种型号的电镜都需要。没有良好的合轴,仪器不能处最佳工作状态,要获取一帧好的电镜照片是徒劳的。校直合轴工作并非天天要做,但要随时发现合轴不好带来的不良效应,随时进行相应的合轴调整。

不同的加速电压形成的电子束流能量不同,是影响成像的直接因素,对于生物学工作者来说,60—80 KV 的加速电压最为常用。

“离焦反差”法在生物学电镜技术中最常应用,它有利于勾画出结构的轮廓,增强反差。生物薄切片的电镜照片没有几张是在精确聚焦时获得的。

物镜光栏、曝光时间、照相底片等因素对成像质量都构成影响,常用的物镜光栏为20微米~40微米,曝光时间为2~3秒。

引用文献

- 〔1〕 G.A. 米克著 (中国科学院生物物理研究所电镜组部份同志译). 生物学工作者实用电子显微技术. 科学出版社, 1976, 292—299
- 〔2〕 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 科学出版社, 1984, 29
- 〔3〕 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 科学出版社, 1984, 49~62
- 〔4〕 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 科学出版社, 1984, 27
- 〔5〕 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 科学出版社, 1984, 56—59

**FACTORS AFFECTING THE ELECTRON MICROSCOPY IMAGE QUALITY
OF BIOLOGICAL SPECIMEN**

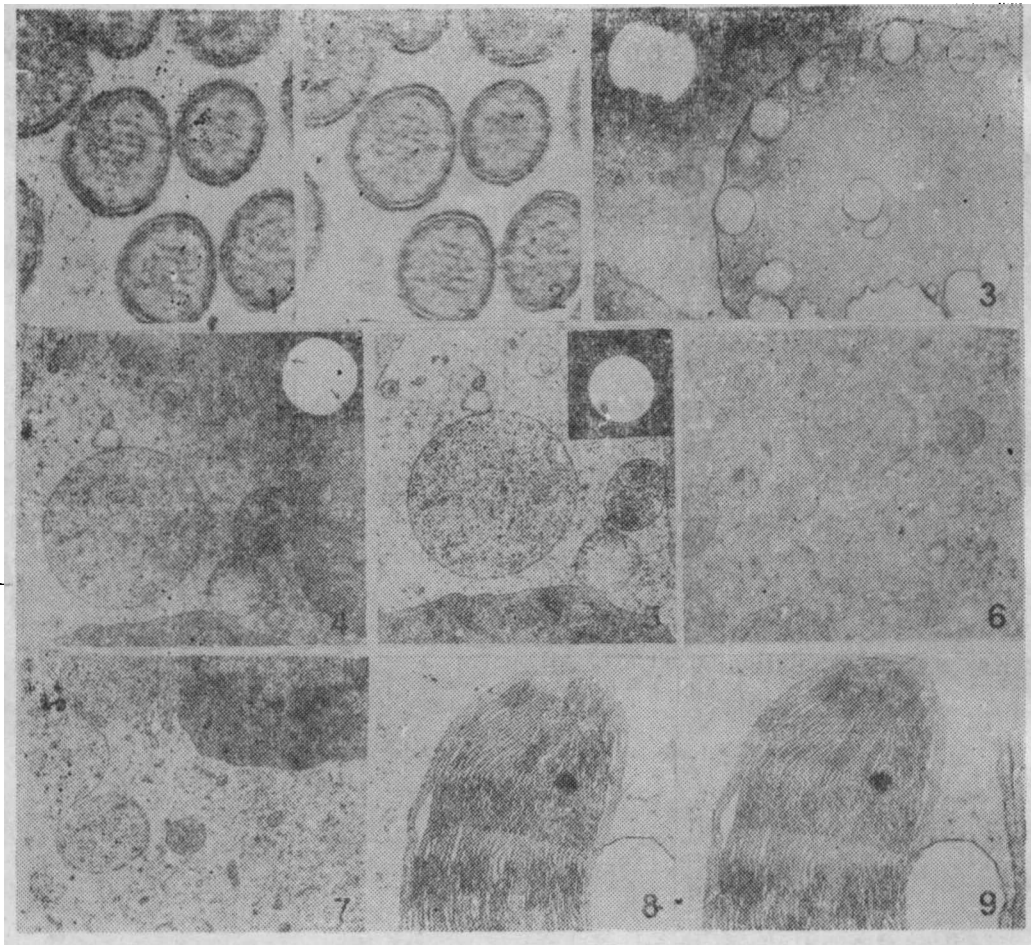
Zhang Qiancai Lun Xuan Li Jihe

(Central Laboratory)

ABSTRACT

To get an electron microscopy image of biological specimen with high resolution and contrast, in addition that the specimen should be well prepared, some factors are also important, such as the thickness of section, the alignment of electron microscope, accelerating voltage, focusing and exposure time etc. The relationship of these factors and their influence on the image quality are discussed in this paper.

Key words, Resolution, Contrast, Alignment



图版 生物样品高质量图象获取的电镜技术浅析

1. 鸡盲肠组织微绒毛, 金色切片; 2. 鸡盲肠组织微绒毛, 灰色切片; 3. 灯丝未饱和, 终象上照明不均; 4. 光栏不对中并有污染→所示, 终象聚焦不清 (小白鼠肝细胞); 5. 光栏对正好, 终象高质量 (小白鼠肝细胞); 6. 像散未消除, 图象不清析 (小白鼠肝细胞); 7. 像散消除后, 图象清晰, 分辨率高 (小白鼠肝细胞); 8. 80 KV 加速电压, 20 μ 物镜光栏的图象反差效应, (玉米叶肉组织—叶绿体); 9. 60 KV 加速电压, 40 μ 物镜光栏的图象反差效应 (同图 8)。