



陕西师范大学
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

研究生教育教学改革研究项目
(研究生优质课程项目)

生物实验室安全及大型仪器应用

电子显微镜技术

主讲教师 任耀辉 郭玲

生命科学学院实验教学中心



1 绪论 电子显微镜技术发展简史

2 透射电子显微镜

3 扫描电子显微镜

4 电子显微镜的其他技术



第一章 绪论 电子显微镜技术发展简史

第一节 电子显微镜发展简史

第二节 电子显微镜技术的发展与应用

第三节 电子显微镜的基本概念



第一节 电子显微镜发展简史

电子显微镜（**electron microscope**，简称电镜）隶属于电子显微术（**electron microscopy**）。根据电子光学原理，用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜，使物质的超微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。

显微镜的发展简史

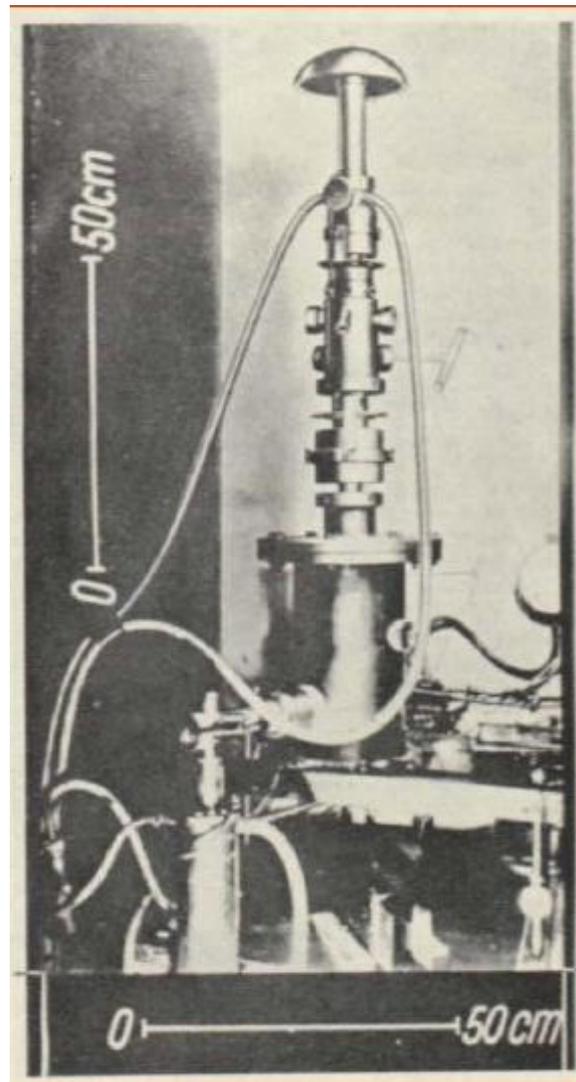
年代	制造者	显微镜
1590	荷兰眼镜制造商Janssen	发明了放大20-30倍的复式光学显微镜
1665	英国科学家和发明家罗伯特·胡克	自制复式显微镜，观察软木薄片，第一次描述植物细胞结构
1665	荷兰业余科学家列文·虎克	利用小型高倍透射制成简单显微镜，放大倍数达300倍，观察动植物活细胞与原生动物，第一次看到许多单细胞生物。
1931	德国物理学家Knoll和Ruska	研制成功第一台透射电子显微镜
1938	Ardenne	研制成功第一台扫描电子显微镜
1939	德国Siemens公司	生产出第一台商用的透射电子显微镜
1965	英国剑桥科学仪器有限公司	扫描电子显微镜作为商品问世
1959	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所	我国研制成功第一台透射电子显微镜
1975	中国科学院北京科学仪器厂	我国研制成功第一台扫描电子显微镜
1981	瑞士科学家Binnig、Rohrer、Gerber和Weible	发明扫描隧道显微镜
1990	中国科学院白春礼	主持研制成功我国首台原子力显微镜



Ernst Ruska
(1906-1988)

恩斯特·奥古斯特·弗里德里希·鲁斯卡

电子显微镜之父



世界上第一台电子显微镜

一、国外电子显微镜生产状况

1931年德国物理学家**Knoll**和**Ruska**研制成功第一台透射电子显微镜。

20世纪80年代末，商品透射电子显微镜普遍进入市场。

- 日本日立公司（Hitachi）
- 日本电子光学实验室（JEOL）
- 荷兰飞利浦公司（Philips）
- 德国蔡司公司（Zeiss）





二、国内电子显微镜生产状况

1959年中国科学院长春光学精密机械与物理研究所研制成功第一台透射电子显微镜。放大倍数10万倍，电压100Kv，重大科学技术成果。

1975年中国科学院北京科学仪器厂研制成功第一台扫描电子显微镜。

中国科学院北京科学仪器厂研制中心、上海电子光学技术研究所、南京光学仪器厂。



三、电子显微镜的发展

1、仪器性能的进步和完善

分辨率的提高：点分辨率优于 0.3nm ，晶格分辨率 $0.1-0.2\text{nm}$

放大倍数的增大：从十几倍提高到几十万倍甚至百万倍

功能的多样化：种类不断增加，功能不断扩展

计算机技术开始用于电子显微镜



2、样品制备技术的协同发展：

- 表现样品的二维超微结构、应用广泛的**超薄切片术**
 - 显示表面超微结构、立体感较强的**扫描电镜样品制备技术**
 - 呈现生物膜的断裂面超微结构的**冷冻蚀刻技术**
 - 用于细胞内化学成分的定性和定位研究的**电镜细胞化学技术**
 - 进行细胞内抗原（抗体）的定性和定位研究的**免疫电镜技术**
 - 探测细胞内大分子合成、运输动态过程的**电镜放射自显影技术**
 - 研究病毒和生物大分子等悬浮材料的**负染术**
-



第二节 电子显微镜技术的发展与应用

一、电子显微镜技术的发展

第一台电子显微镜问世后，面临的首要问题是如何将电子显微镜技术应用于生物学及其学科研究。

电子显微镜结构的改进和功能的改善，样品制备技术的改进，使电子显微镜技术在生命科学研究中发挥了重要作用。



年代	研究者	电子显微镜技术
1934	Marotn	发表了第一张生物组织茅膏菜属植物叶切片的电子显微图
1946	Williams和Wyckoff	将金属投影用于增加电镜图象反差
1947	Claude	开始使用铀固定剂
1949		甲基丙烯酸酯被用作包埋介质
1950	Latta和Hartmann	用玻璃刀进行组织切片
1952	Palade	将缓冲液与锇酸混合，作为组织固定液
1956	Palade和Siekvitz	用电子显微镜分析细胞碎片
1953	Porter和Blum	介绍切片机和切片技术
	Moran	使用钻石刀进行超薄切片，并创立冷冻超薄切片术
1955	Hall和Huxley	以磷钨酸为负染色剂观察了灌木病毒及烟草花叶病毒的超微结构
1956	Luft	高锰酸钾作为固定剂
1956	Glauert	环氧树脂作为包埋介质
1958	Watson	介绍用重金属铅和铀对组织切片进行染色
1959	Moran	采用冷冻置换技术制备生物样品
1961	Luff	介绍Epon包埋介质
1957	Steere	开始研究冷冻断裂技术
1963	Sabatini及同事	用戊二醛作预固定液保存细胞超微结构及活性，进行细胞化学方面研究
1939	Kauschehe和Ruska	对蛋白质吸附于胶体金进行探讨
1939	Horisberger	将蛋白质吸附于胶体金方法用于扫描电子显微镜
1962	Feldherr和Marshal	胶体金颗粒作为一种示踪物用于电子显微技术研究
1971	Faulk和Taylor	胶体金作为抗血清特异标记物用于透射电子显微镜
1974	Romano及同事	首次制备蛋白质A-金复合物
1977	Horisberger及同事	建立了制备免疫球蛋白-金颗粒基本方法
1978	Rpth及Bendayan	提出包埋后免疫金标记技术



二、电子显微镜技术的应用

1、生命科学方面：

细胞生物学

用电镜技术发现并揭示了细胞内各种细胞器的超微结构，特别是细胞骨架系统和生物膜的超微结构；促进了对细胞的结构及其功能的研究，如：细胞生理和生化、细胞通讯与运输、细胞分裂与分化、细胞增殖与调控等。

动物学和植物学：

用电镜技术进行了广泛的细胞超微结构的研究，特别对动植物的分类学研究作出了贡献。



分子生物学:

用电镜技术揭示了核酸和蛋白质大分子的超微结构，并对其进行了亚显微测量；还研究了染色体的超微结构，拍摄了DNA转录mRNA的过程，观察到了灯刷染色体、巨大多线染色体和在染色质纤维上间隔排列的球形核小体，并研究了核小体的化学组成和分子结构。另外，还进行了核酸分子杂交和编接基因缺失的观察与研究，以及核糖体和蛋白质合成机制的研究等。

微生物学:

用电镜技术揭示了病毒、细菌和支原体等的超微结构，促进了微生物发育史的研究，并发现了新的细菌、病毒和类病毒等。



2、医学科学方面：

基础医学：

电镜技术为超微病理学的研究提供了先进的手段，如：对病变细胞超微结构的研究，有助于探索病因和治疗的机理。特别是高分辨力的电镜更促进了分子病理学的产生与发展；在中医基础理论的研究方面也获得了广泛的应用，如：针刺机理和中草药药理的研究等。

临床医学：

免疫电镜技术为研究疑难病症的诊断与治疗开辟了道路，如：对天花等病症，用免疫电镜技术可以在数分钟内作出明确的诊断；另外对病毒性肝炎、肾病、血液病和肿瘤的分类和诊断也显示出了优势。



3、农林科学方面：

电镜技术在植物保护、良种繁育、土壤改良、成分分析、品种的分类与鉴定和动植物各种疾病的病因、诊断与防治方面的研究都获得了快速进展。

4、材料科学：

可用电镜对各种非金属和金属材料的超微结构进行鉴定和检测，以及进行新型材料的研制等。



三、电子显微镜技术的未来

多技术、方法的相互协作：

仪器装置的不断完善

计算机技术的不断渗入

电镜样品制备技术的不断创新



第三节 电子显微镜的基本概念

一、分辨能力和放大倍数

1、分辨能力

分辨能力 (resolution)：又称分辨率，指显微镜能将近邻的两个质点分辨清楚的能力，通常是用相邻两点间的距离(D)来表示。

$$D = \frac{0.612\lambda}{N \cdot A \cdot}$$

其中 λ 为光源的波长

N. A为镜口率

D越小，能分清的物体细节越细，分辨能力就越高。分辨率与光的性质，即衍射、干涉及透镜色差、球差有关。



波长：可见光波长为400-700nm（平均550nm）

镜口率（N.A.）的大小：取决于镜口角和物镜与标本间介质的折射率。

$$N \cdot A = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

镜口角

物镜与标本之间介质的折射率

光学显微镜的极限分辨率为200nm。要想提高分辨率，只有采用短波长的光源。



2、放大倍数

一台电子显微镜具有最佳分辨率外，还应具有合理的放大倍数。放大倍数与分辨率之间存在一定的关系：

$$M = D_{\text{眼}} / D_{\text{镜}}$$

M：放大倍数； **D_眼**：人眼的分辨率； **D_镜**：电镜的分辨率

人眼分辨率0.1-0.2mm的两点；光镜分辨率为200nm，则放大倍数为 10^3 。
分辨率为0.1nm的电镜至少具有 2×10^6 的放大倍数。



二、电子束

1、电子束的定义

真空中相对集中而高速运动的电子流称为电子束。实际上是一种阴极射线，是带负电荷的粒子，具有与光波类似的特性：**波动性与粒子性**。

1924年，De Broglie证明粒子在高速运动的时候会发射出一定波长的电磁辐射，它的波长用公式表示为：

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

λ 是代表波长；

h 是Planck（普郎克）常数， 6.626×10^{-34} ；

m 是粒子的质量；

v 是粒子运动的速度。



如果高速运动的粒子是电子，那么，电子在真空中运动的速度与加速电压有关，根据能量守恒定律：

$$eV = \frac{1}{2}mv^2 \quad e \text{ 是电子的电荷绝对值,}$$

V 是加速电压(kV)

表明了电子运动的速度与电压有关。从上述式中可以算出电子的速度：

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}}$$

把电子的质量 $m=9.11 \times 10^{-31} \text{Kg}$ 、电子的电荷量 $e=1.602 \times 10^{-19}$ 都代入公式

得 $\lambda = \frac{1.226}{\sqrt{V}}$ (单位: nm)

当 $V=50 \text{kV}$ 的时候, $\lambda=0.0055 \text{nm}$, 当 $V=100 \text{kV}$ 的时候, $\lambda=0.0039 \text{nm}$ 。



2、电子束在磁场或电场中的性质

电子束在磁场或电场中的受力方向服从左手定则，能够发生弯曲而改变运动的方向，这与光线通过折射率不同的两个界面时的情况一样。因此，改变磁场强度，是电磁场满足轴对称条件，电子就具有可被聚焦的特性。

3、电子束的穿透力

由于电子的穿透力很弱，唯有在高真空条件下才可能达到一定的自由行程。故电镜镜筒必须保持高真空，样品必须很薄，一般在100kV加速电压时，样品厚度不应超过100nm。



4、电子束激发荧光

电子束对人眼不能引起视觉反应，但可激发荧光物质产生荧光，故电镜的观察部分设有荧光屏。

5、电子束的放射性

高能电子束可激发出X射线，对人体有较大的损害，所以电镜具有相应的防X射线的措施。



三、电子透镜

可分为电场作用的**静电透镜**和磁场作用的**磁透镜**。

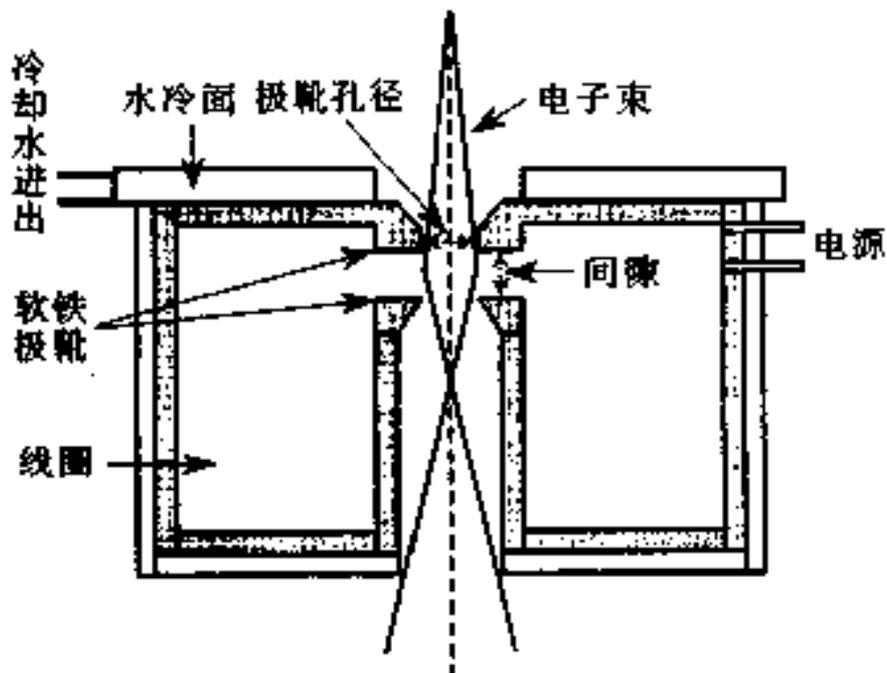
静电透镜因像差大，易在镜体内发生电击穿和弧光放电，所以现代电镜除了电子枪中用静电场提供高能电子束外，已不在成像和放大系统中使用静电透镜。

1、什么是电磁透镜？

电子是带负电荷的粒子，其运动方式不同于光，电子的运动主要受所处磁场和电场强度的影响，而改变其行进方向。德国物理学家Busch早在1926年即已指出：“具有轴对称性的磁场对电子束说来起着透镜的作用”。他从理论上奠定了可利用磁场作为电子透镜的基础。



使电子束聚焦的装置称为电磁透镜，电磁透镜是一种焦距(或放大倍数)可调的会聚透镜。改变激磁电流，电磁透镜可使电子束会聚。



电磁透镜结构示意图



现代电子显微镜中常用的带有极靴的强磁透镜由三部分组成：

A：极靴

电镜的电磁透镜在线圈外包有软铁的屏蔽外壳，线圈内侧多数装有高精度加工的铁钴合金极靴，**极靴的作用是使形成的高强度磁场尽可能集中在沿轴的一个很窄的范围内。**

极靴的形状直接影响成像质量，所以，极靴(特别是物镜成像极靴)是电子显微镜中最重要的部件。



B: 线圈

线圈位于极靴的外部，绕有许多匝导线，通上电流可以产生磁场，改变电流的大小可以改变磁场强度。

C: 屏蔽外壳

为了防止外部磁场的干扰即增加透镜的聚焦能力，在线圈面需包上一层熟铁等材料制成的屏蔽罩。

电子在轴对称磁场作用下的行为与光学透镜一样，也服从几何光学定律，磁透镜的焦距可以用光学透镜的公式计算出。

透镜焦距和所采用的磁场强度有关，磁场越强（电流越大），焦距越短，放大倍数也就越高。现代电子显微镜的成像物镜大多数采用短焦距的强磁透镜。



2、电磁透镜的特性

- ◆ 球面象差及畸变
 - ◆ 衍射象差
 - ◆ 色差
 - ◆ 象散
 - ◆ 景深
 - ◆ 焦深
 - ◆ 磁滞
 - ◆ 反差与成像
-

2-1、球面像差及畸变

2-1-1、球面像差

属于几何像差。

球差随着透镜的磁场强度增加而迅速减小，然后达到一平坦的极小值，透镜的强度越低，及放大倍数越低，球差越明显。选择小孔径角可以达到减少球差的目的，但是小孔径角又会增加衍射像差。

现在所使用的电子透镜不能完全消除球差，只能减小，这是目前影响电镜分辨率的一个主要因素。

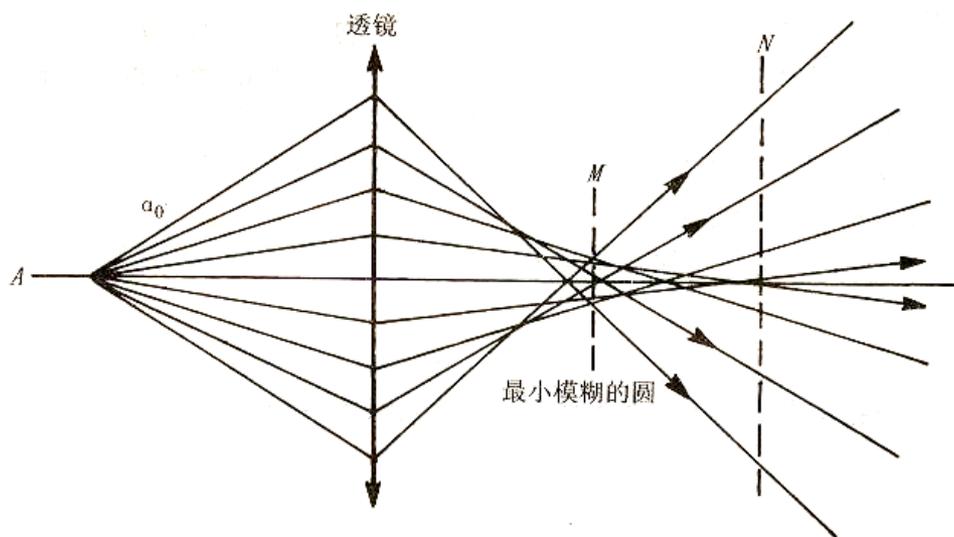


图 1-5 球差

球差是由于磁透镜中焦距短,边缘部分聚焦能力强,使场中心区与边缘区对电子折射率不同而从物点出发通过透镜不同部分的各种射线不能会聚于一点,而形成一个模糊的圆

2-1-2、畸变

畸变是由于离轴较远的径向磁场作用强，使放大倍数随物点离轴的距离而变，进而使图像发生畸变。

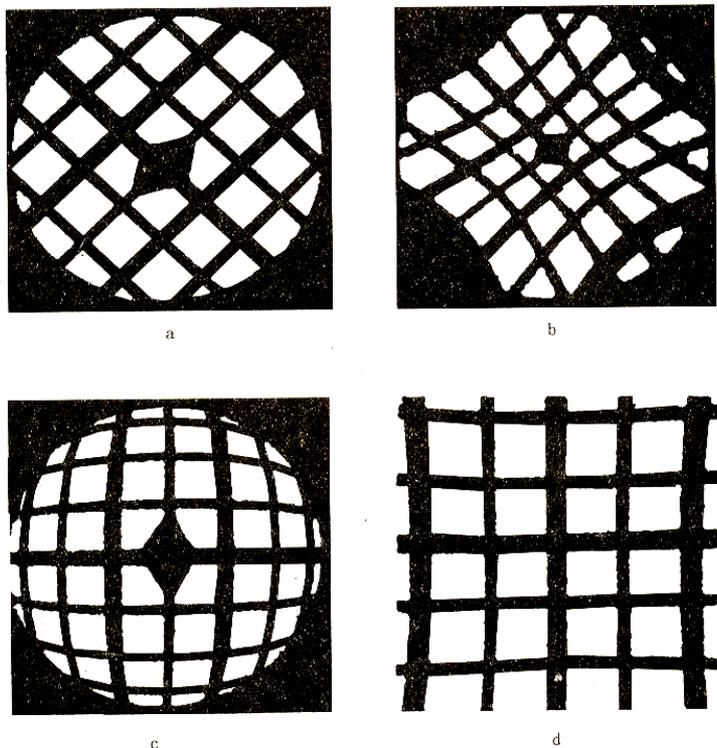


图 1-6 畸变

a. 正方形；b. 枕形畸变；c. 桶形畸变；d. S形畸变

a 假设物体是一正方形。

b 当物点离轴越远，放大倍数越大，出现畸变图像称枕形畸变。

c 当物点离轴较远，放大倍数越小，畸变图像称为桶形畸变。

d 电子在磁场中运动时是沿螺旋轨迹前进的，其螺旋角随物点到轴的距离而变，图像呈S形畸变。



2-2、衍射象差

小孔径角可以有效地减少球差，但在采用小孔径角时，衍射像差又会增加。光线在空间是直线传播的，当遇到一个近似于光波波长大小的障碍物时，一部分光就会绕过其边缘，改变前进方向，这种现象称为衍射。

电子束在光阑的边缘发生衍射时，就引起衍射像差。一眼光阑孔径越小，衍射现象就越明显。

一般高分辨率电镜中，分辨率在0.2nm左右时，最佳孔径角为 10^{-2} - 10^{-3} ，因此使用聚光镜光阑时一定要注意。



2-3、色差

不同波长的光通过光学系统时，将在不同的点上聚焦，因而物点在高斯平面上的像是一个半径为 r 的多色模糊圆斑，这种现象称为色差。在电子透镜中，由于电子初速度不同，形成各种波长的电子束（即不同速度的电子），当这些电子束通过透镜时不再聚焦成一点，而是形成弥散圆斑，即形成色差。

2-3-1、轴上色差（中心色差）

是由于加速电压或透镜激励电流改变，引起磁透镜聚焦变化而产生的。当物点在轴上时，由于电子速度不同，同一物点发出的电子经透镜后不在轴上同一点会聚，得到一模糊圆。

在操作上，可以使曝光时间尽可能短，以获得高分辨率的照片。



2-3-2、放大色差

磁透镜中，当物点不在轴上时，由于焦距的变化，而引起放大倍数的不同，这种像差叫做放大色差。一般表现为中心部位清晰，边缘处模糊，这种现象在低倍率及观察厚样品时尤其明显。放大色差是由于电子束在穿过标本时，损失的能量不同，导致穿透样品后的电子速度不同而产生的。

2-3-3、旋转色差

磁透镜中，由于磁场的影响，象转角随高压和透镜电流的波动而波动，引起旋转色差。象的旋转方向与磁场方向有关，故电镜中物镜及投影镜的磁场方向应该相反，便可适当地补偿旋转色差，若在观察中发现旋转色差严重，应检查物镜电流方向是否正常。

2-4、象散

由于透镜中极靴的机械不对称或极靴材料导磁率不均匀而引起透镜磁场不对称所致，结果造成物点的像产生两条焦线，形成模糊像。

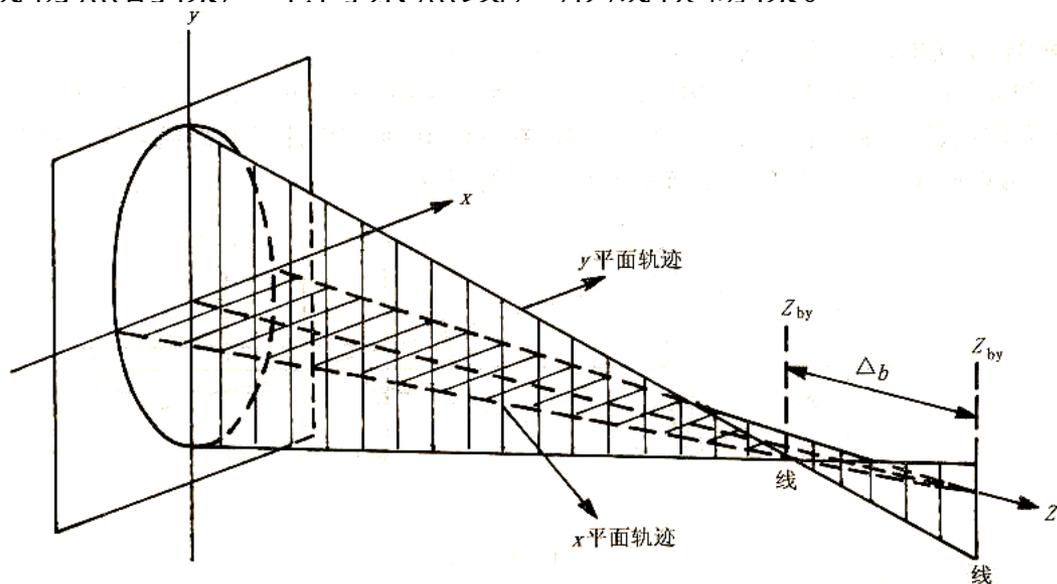


图 1-7 象散

极靴的精密加工产生的机械不对称(成椭圆)或极靴材料导磁率不够均匀而引起的透镜磁场不均匀对称所引起两条聚焦线不能聚焦在一点,反映为图像模糊,成斜线偏平状

2-5、景深

电磁透镜的孔径角一般小于 10^{-3} 弧度，因而是小角成像，不论是光镜还是电磁透镜都只能把点状物体成像为一个圆盘，其半径就是透镜的分辨率。距离 $P=2Z$ 称为透镜的景深。

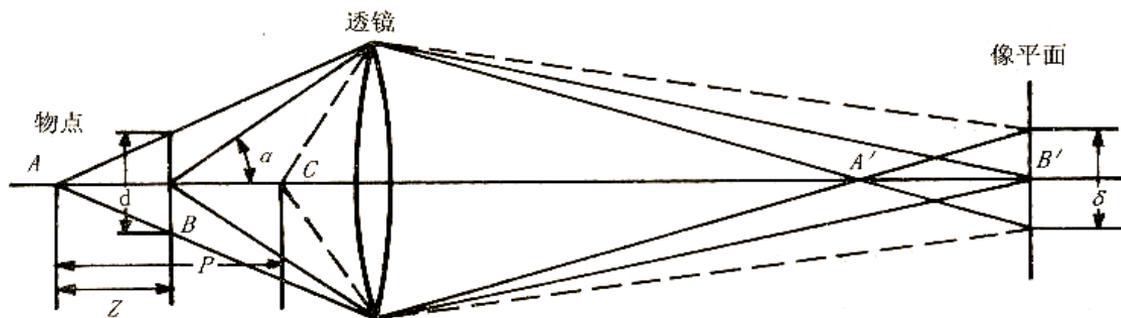


图 1-8 景深

景深长的有优点：
容易聚焦；
可以拍摄立体照片，得到样品的立体信息；
电镜的景深大大超过切片的厚度，因此可以清晰地显示样品的全部结构。

2-6、焦深

由于电镜是小角度成像，所以焦深也很长，图中I、II两平面间的距离称为焦深，在这段距离中，像是同样清晰的。

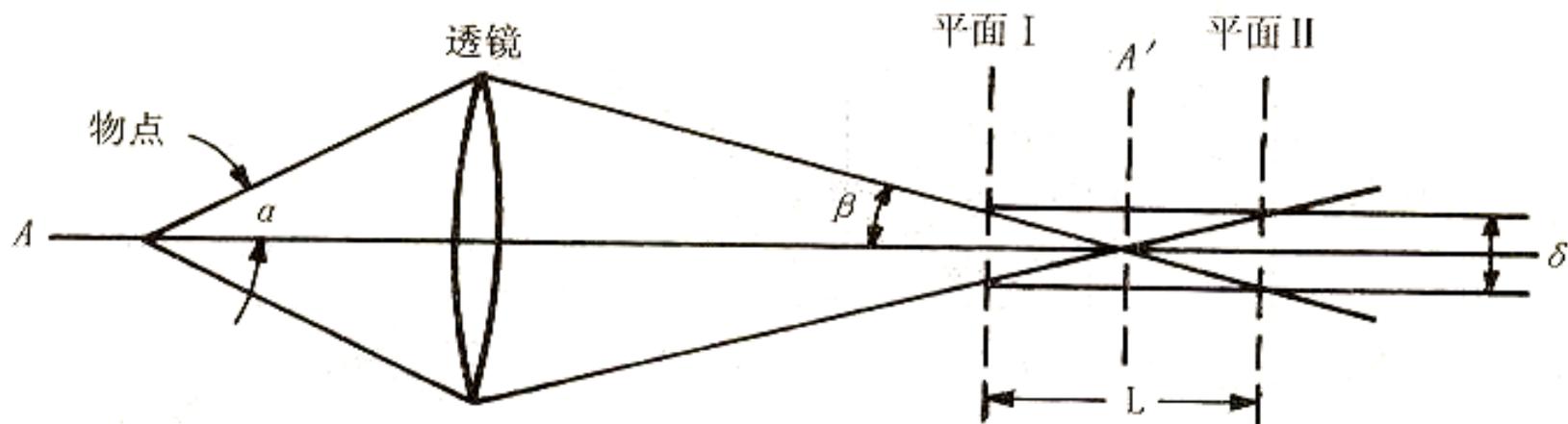


图 1-9 焦深



2-7、反差与成像

光强度的差别造成了明暗之分，波长的差别造成了颜色的不同。人眼区分物体时，主要就是根据物体不同部位或物体之间的光强度与波长的差别，这些差别构成了物体的反衬度，又称为反差。

当一束光照射到标本时，便于标本中的原子互相作用，产生4种基本物理过程：吸收、干涉、衍射和散射。

2-7-1、吸收

可引起振幅反差，但在透射电镜中，样品必须极薄，使吸收电子很少。

2-7-2、干涉

可引起相位效应，可是肉眼对此完全不敏感，只有把相位差转变成振幅差，肉眼才能鉴别，这种效应就是“相位反差”。



2-7-3、衍射效应

一般在像上形成条纹，这是由于样品稍有弯曲，在弯曲的不同部位，晶面满足布拉格衍射的条件不同而引起的。这种条纹称为等倾纹。这一效应使分辨率降低，有时还会引起假象，但衍射也可以用来加强反差，要以牺牲分辨率为代价。最常见的是Fresnel圆环，这种圆环是电镜中检查象散最灵敏的方式。

2-7-4、散射

在光镜中几乎不起作用，电镜中却是成像的主要因素。

电镜样品上不同部分的物质结构不同，疏密度不同，它们散射电子的能力也各不相同，结果是透过样品的电子束发生疏密差别。散射电子能力强的地方，透过电子数目少，荧光屏上所激发的光就弱，显现为暗区；散射电子能力弱的地方，透过电子数目多，荧光屏上所激发的光就强，显现为亮区。这样最终图像产生了明暗差别，出现反差，得以识别图像。

生物样品大多是原子序数低的轻元素，对入射电子的散射能力较弱，样品的反差很差，必须利用重金属铅和铀染色剂提高反差。



第二章 透射电子显微镜

第一节 透射电子显微镜的结构

第二节 透射电子显微镜的成像原理

第三节 透射电镜样品制备方法



第一节 透射电子显微镜的结构

透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM)

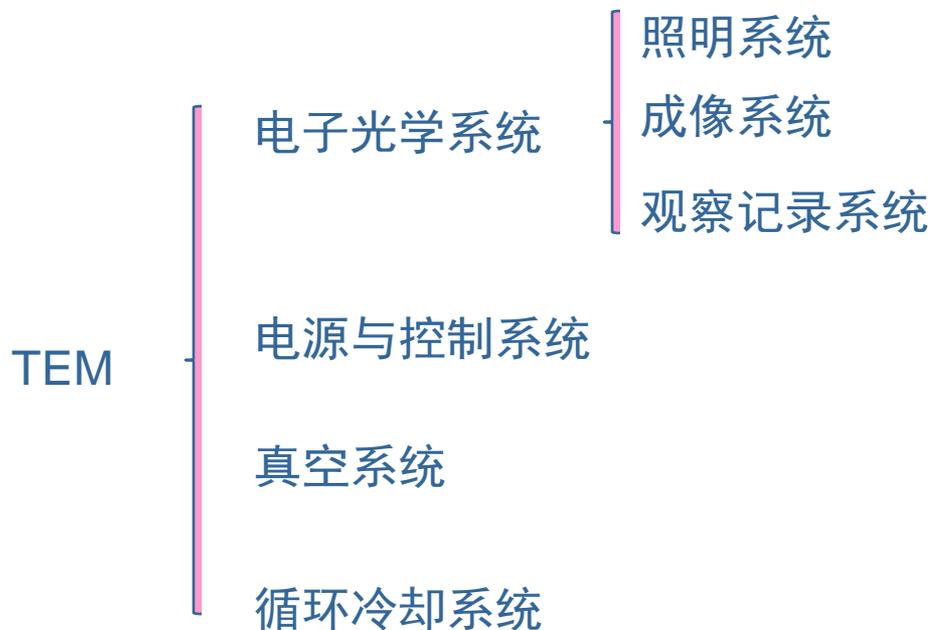
透射电镜是利用电子射线穿透样品后放大而成像的一种电镜。

主要优点是分辨率高，可用来观察组织和细胞内部的超微结构以及微生物和生物大分子的全貌，在生物医学上的应用最为广泛。

加速电压：一般透射电镜（加速电压小于120KV），高压透射电镜（加速电压在120KV与500KV之间），超高压透射电镜（加速电压大于500KV）。



一般由电子光学系统、电源与控制系统、真空系统和循环冷却系统组成，其中电子光学系统是最主要组成部分。



一、电子光学系统

透射电镜的光学系统全部包括在镜筒中，主要有照明系统、成像放大系统和观察系统三部分组成。

照明系统：

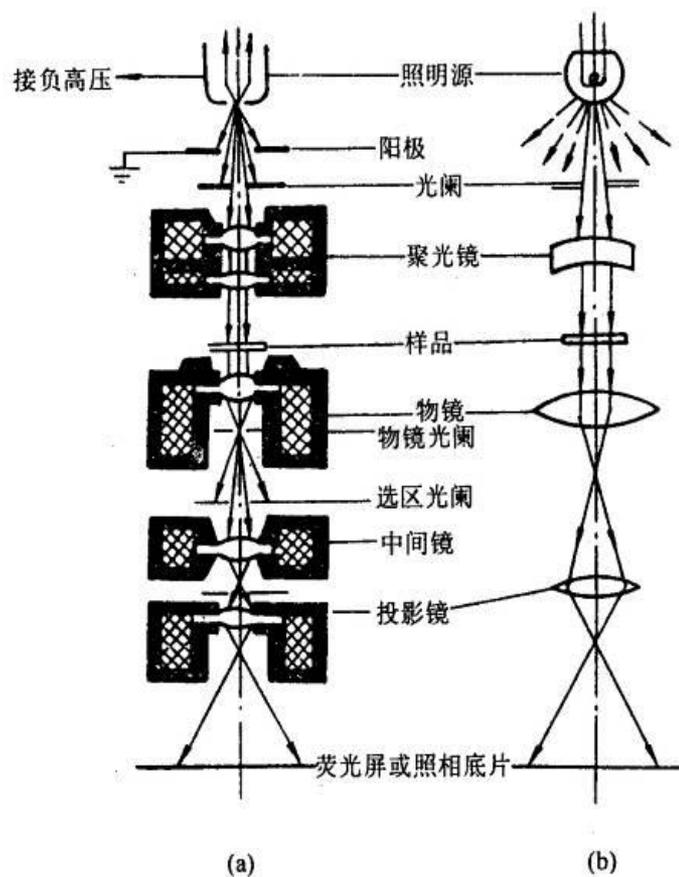
电子枪 + 聚光镜

成像系统：

物镜 + 中间镜 + 投影镜

观察记录系统：

荧光屏 + 照相底片



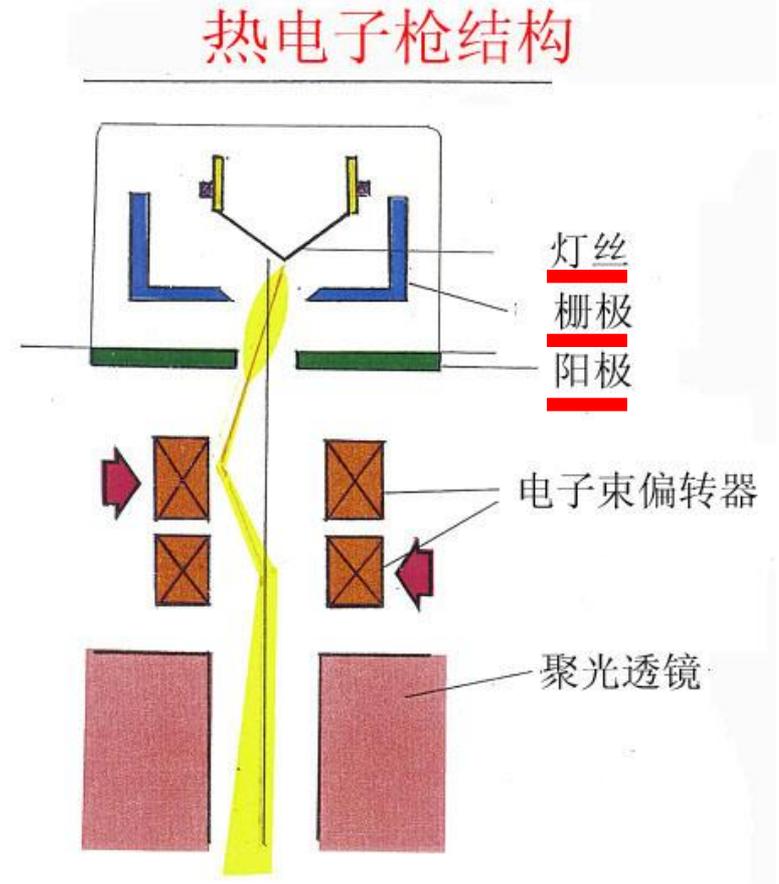


1、照明系统

1-1、电子枪

照明系统主要组成：**电子枪+平移对中、倾斜调节装置+聚光镜**

照明系统的作用：提供一束**亮度高、照明孔径角小、平行度好、束流稳定**的照明源。





灯丝



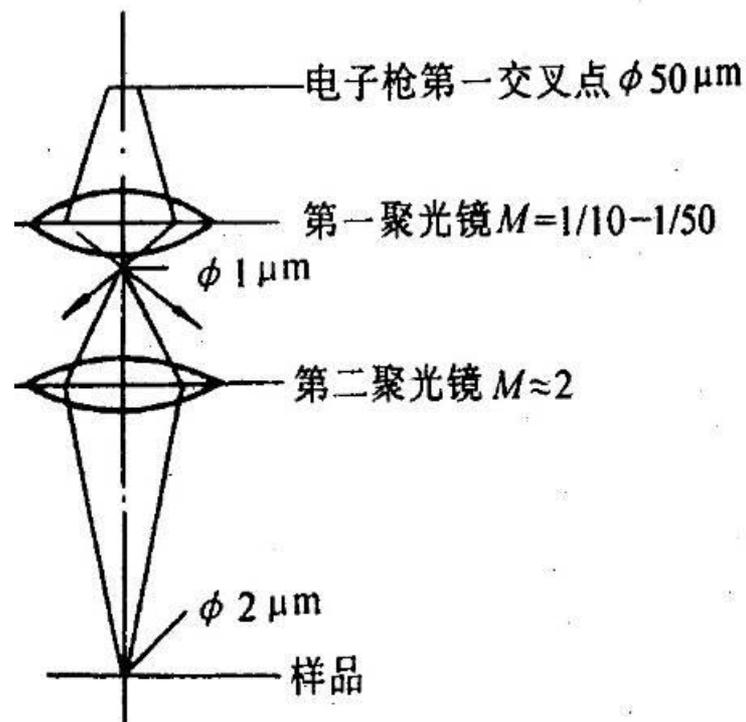
电子枪有热发射、冷发射和场发射三种。最普通的是热发射，即一根发夹形钨丝，通过电流加热后，发射出电子束，成为电源的光源。

1-2、聚光镜

将电子枪发出的电子束会聚在样品平面上，改变聚光镜电流密度可调节照明束斑的大小及光密度，并通过调节聚光镜光阑的大小来调节照明孔径角。

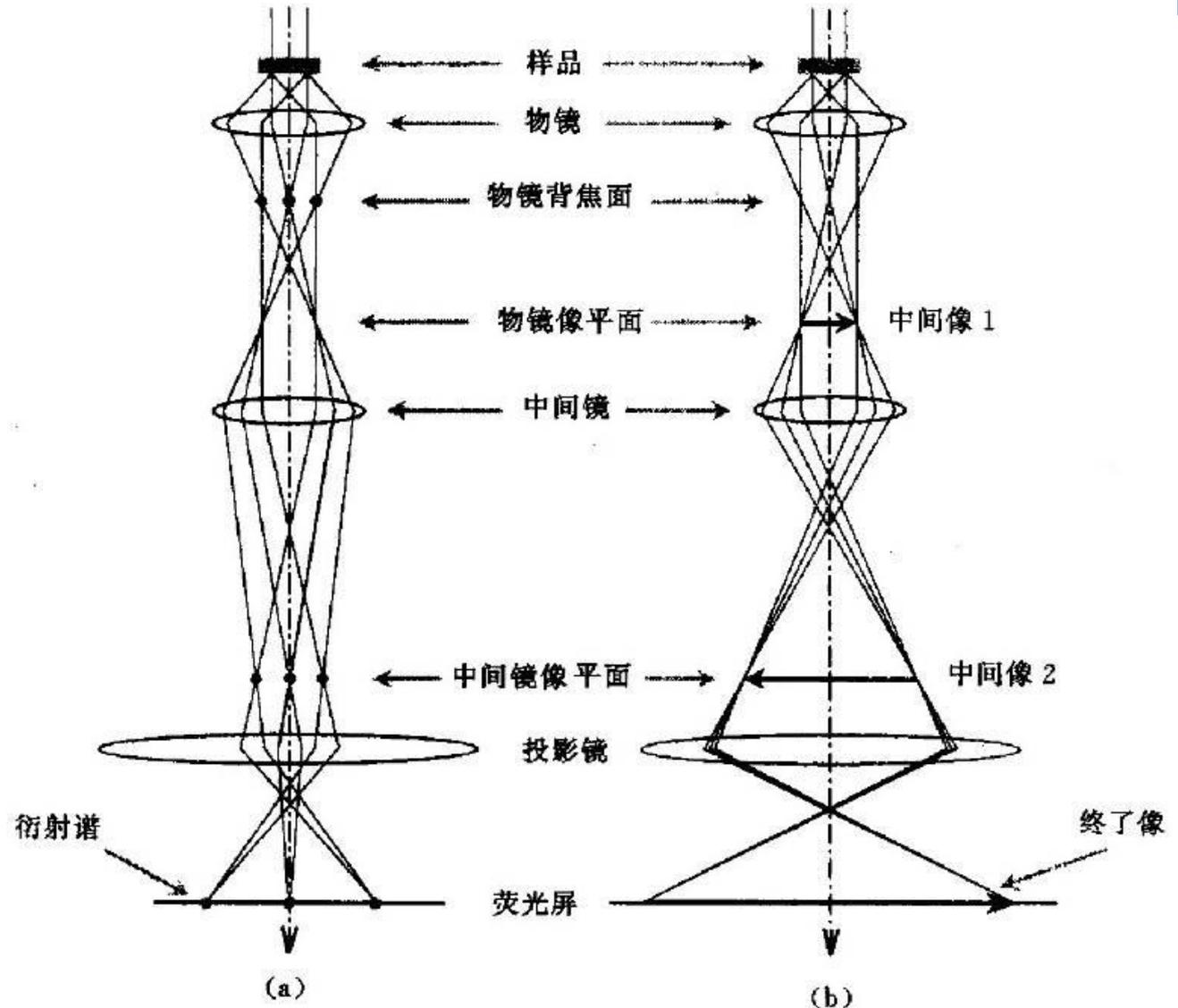
□ **聚光镜：**会聚电子枪射出的电子束，以最小的损失照射样品，调节照明强度、孔径角和束斑大小

□ **双聚光镜系统：**第一聚光镜是强激磁透镜；第二聚光镜是弱激磁透镜



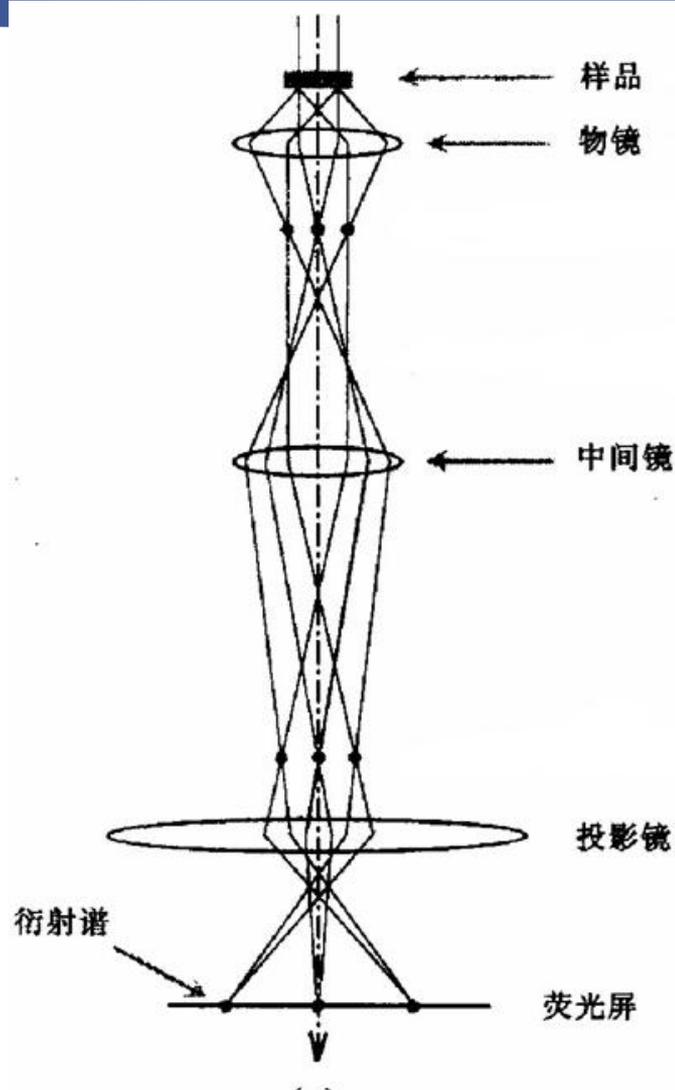
2、成像系统

是电子显微镜最核心的部件之一，高放大倍数、高分辨率就是通过成像系统获得的。



2-1、物镜

- ❖ **物镜作用**：成像系统的第一级放大透镜，形成第一幅高分辨率电子显微图像和电子衍射花样。
- ❖ **物镜特点**：强激磁、短焦距（1-3mm），高放大倍数，高分辨率。
- ❖ **物镜决定透射电子显微镜分辨本领**





提高物镜分辨率的措施:

- ❖ 物镜的分辨率主要取决于极靴的**形状**和**加工精度**。一般来说，极靴的内孔和上下极之间的距离越小，物镜的分辨率越高。
 - ❖ 在物镜的后焦面上安放一个物镜光阑。物镜光阑不仅具有**减少球差，像散和色差**的作用，而且可以**提高图像的衬度**。
 - ❖ 光学透镜的焦距是固定的。电磁透镜的焦距是可以通过调节电流大小来改变。
 - ❖ 在用透射电子显微镜进行图像分析时，物镜和样品之间和距离固定不变的，（即**物距 L_1 不变**）。因此改变物理学电镜放大倍数进行成像时，主要是**改变物镜的焦距和像距**（即 f 和 L_2 ）来满足成像条件。
-



2-2、中间镜

作用：在电镜操作过程中，主要是利用中间镜的可变倍率来控制电镜的放大倍数。

特点：弱激磁，长焦距，可变倍透镜，放大倍数0-20倍。

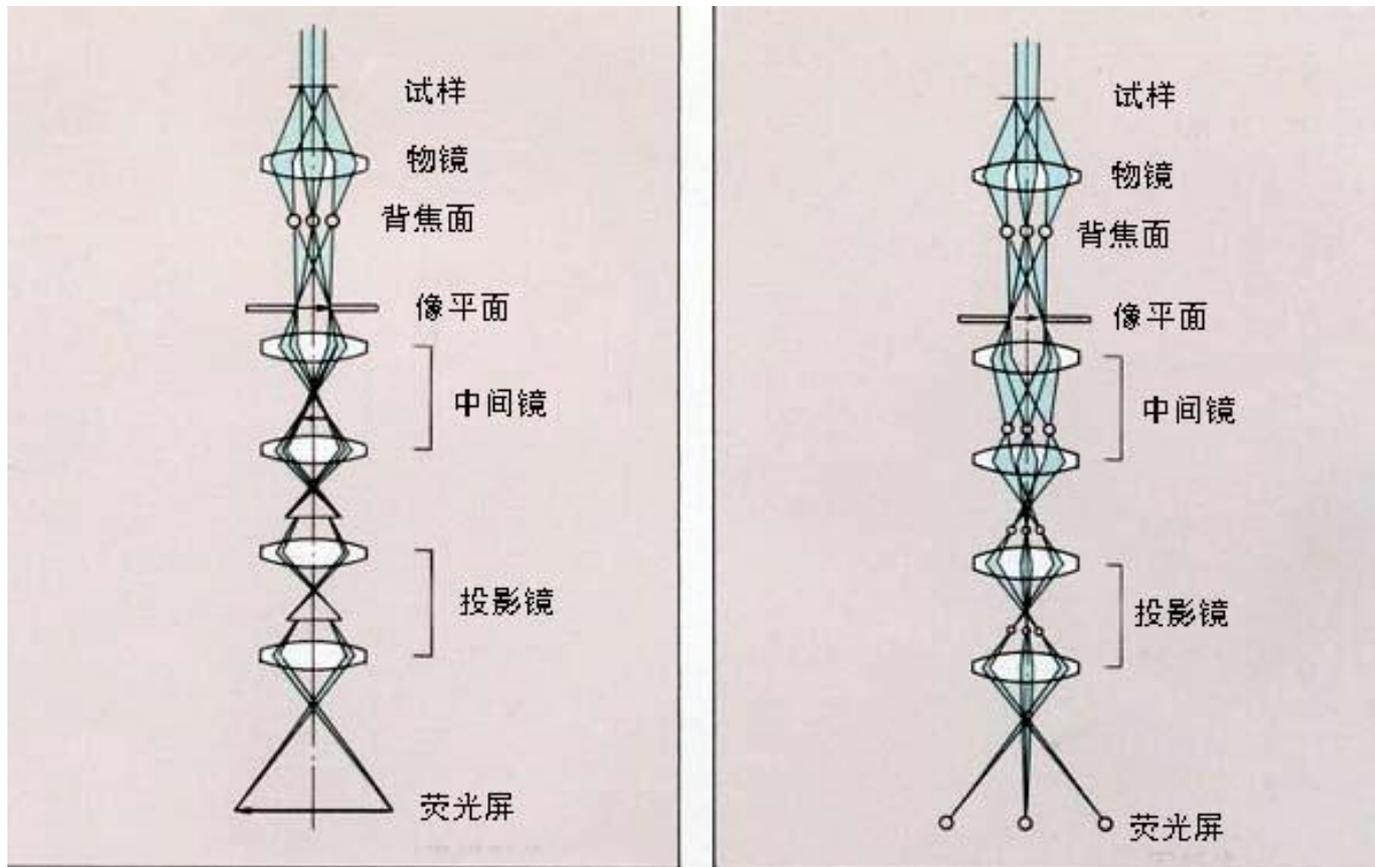
2-3、投影镜

作用：是把经中间镜放大（或缩小）的像（电子衍射花样）进一步放大，并投影到荧光屏上。

特点：物镜一样，是一个短焦距的强磁透镜。投影镜的激磁电流是固定的。

二者用于控制总放大倍率，调节范围比较大100-几十万倍。

高性能的透射电镜大都采用5级透镜放大，即中间镜和投影镜有两级，分第一中间镜和第二中间镜，第一投影镜和第二投影镜。





3、观察记录系统

- ◆ 通过荧光屏观察透射电子放大的超微图像，
 - ◆ 然后把图像记录在感光胶片上，
 - ◆ 直接把放大的图像传输到电脑上，
 - ◆ 然后把图像记录在电脑硬盘上。
-



二、真空系统

电子束的穿透力很弱，只有在高真空的情况下，才能达到一定的行程。

2-1、抽真空的意义

- 防止灯丝的氧化损伤；
 - 确保电子束在运行过程中的运动轨迹不受空气分子干扰；
 - 去除空气分子对样品的污染。
-



2-2、真空系统的组成部件

真空系统

机械泵： $1 \text{ Pa} \rightarrow 1.3 \times 10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ Pa}$;

油扩散泵： $1.3 \times 10^{-6} \text{ Pa} \rightarrow 1.3 \times 10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ Pa}$

冷阱： $1.3 \times 10^{-9} \text{ Pa} \rightarrow 1.3 \times 10^{-10} \text{ Pa}$

真空管道、阀门、储气罐等

离子泵： $1.3 \times 10^{-12} \text{ Pa}$ 超高压电镜

真空涡流泵



三、电源控制系统

一般电镜均有两个电源：

电压低电流的高压电源：产生高速电子

低电压高电流的透镜电源：控制高速电子束的运动轨迹

稳压和稳流装置：保证电压和电流的高度稳定

保护与控制系统：一旦电镜的某一部分发生故障，电镜的保护系统会让其自动紧急关机和断电，以免损伤电镜



第二节 透射电子显微镜的成像原理

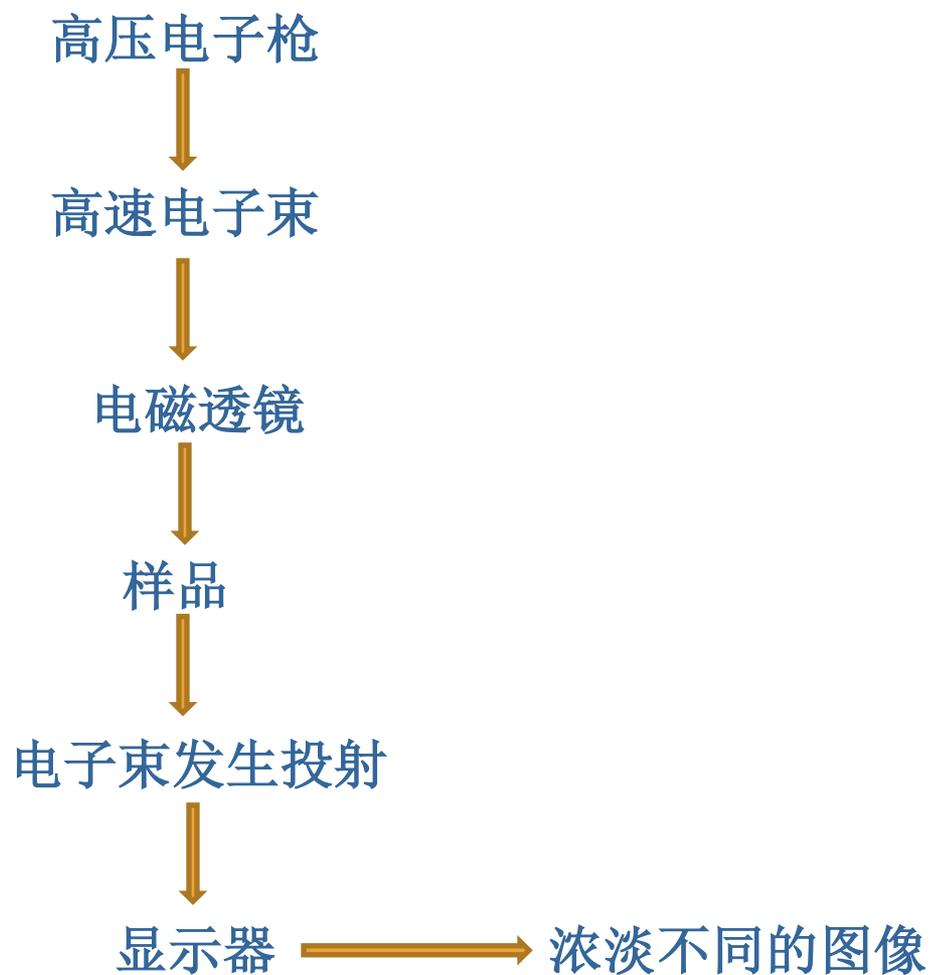
高速电子束  透射样品

获得高分辨的图像：数百万倍

使用电子枪发射出了波长极短的电子波

利用电磁透镜可对电子速进行聚焦、放大和成像

成像原理



图像各处浓淡的不同真实反映了样品不同部位的物质结构

一、取材及固定

固定的目的是尽可能使细胞中的各种细胞器以及大分子结构保持生活状态，并且牢固地固定在它们原来所在的位置上。一般来说固定有以下作用：

- 破坏细胞的酶系统，阻止细胞的自溶；
 - 稳定细胞物质成分，如核酸、核蛋白，糖类和脂类，使之发生交联，减少或避免抽提作用，以保存组织成分；
 - 在一些细胞组分之间以化学反应和物理反应建立交联，以提供一个骨架来稳定各种细胞器的空间构型；
 - 能提供一定的电子反差。
-



1、动物及人体组织的取材

固定组织样品最重要的问题是速度，固定太慢会导致超微结构的改变。

1-1、灌注固定

有条件尽可能活体灌注固定。先腹腔注射巴比妥酸盐麻醉实验动物（如巴比妥钠，20-30 mg/kg），打开腹腔，由腹主动脉插入针管，在肝脏附近切开一处静脉，启动蠕动泵开始灌注。先灌注 PBS 冲洗血液（37° C，体积约 1.5 倍血液体积，200g 大鼠约需要 10ml），可以在 PBS 内加入抗凝血剂防止血液凝固，然后灌注固定液（先 37° C，再 4° C），持续 5-10 分钟。另一种灌注方法通过左心室，这种方法需要打开胸腔，动物呼吸停止，针管由左心室插入升主动脉，剪开右心耳，随后的步骤与上述灌注一样。这种方法在胸腔打开后呼吸会立即停止，要求操作者尽快进行后续操作，另外，向心脏插针管比向腹主动脉插针管要简单些，特别是对于一些很小的实验动物。灌注后取出组织，切成 1mm 见方小块，再后用相同固定液固定 30 - 60 分钟左右。



1-2、活检或直接取样固定

血管不发达的组织，快速活体取材后立即投入固定液，同样，活检样品也要立即投入固定液，然后再尽快切成小块。方法如下：

- ◆ 麻醉或断头急性处死，解剖出所需器官，用解剖剪刀剪取一小块组织，放在干净的纸板上，滴一滴冷却的固定液，用新的、无油污锋利的（双面）刀片将材料切成大约 1mm 宽，2-3mm 长的小块，再将其切成 1 mm³ 的小块，取材要尽量快速准确。
 - ◆ 如果有方向要求，如一些空腔器官、皮肤、角膜等，要注意方向性，保证需要观察的部位准确取到。最后用牙签将这些小块逐一放入盛有冷的新鲜固定液的有盖青霉素小瓶里，放入冰箱冷藏室低温固定（4 °C）过夜。尽快送中心实验室进行处理。
-



2、培养细胞的取材

生长在培养瓶和培养板中的培养细胞取材时：

悬浮细胞可直接离心，

贴壁细胞应先倒出培养液，采用胰蛋白酶消化或用细胞刮刮下。

带培养液进行低速离心（1000-1500rpm）10 min 左右。离心完毕倒出培养液，管底的细胞团不要打散，沿管壁缓慢倒入适量的（一般为材料体积的 5~10 倍）2.5~3%戊二醛固定液，固定约 1h，也可在 4 ° C 冰箱固定过夜。尽快送实验中心电镜室。



3、植物组织的取材

植物组织的取材比较容易，植物细胞离体后变化不象动物细胞那样迅速，但植物细胞的细胞壁阻碍着固定液的迅速渗透。因此，植物材料的取材宜切成薄片状，经适当固定后再切成小方块。如组织含有较多空气，不易下沉浸入固定液，可以使用真空泵抽气方式使之下沉。

4、细菌的取材

带培养液的细菌进行离心（5000-12000rpm）15min 左右。离心完毕倒出培养液，管底的细菌团不要打散，沿管壁缓慢倒入适量的（一般为材料体积的5~10 倍）2.5~3%戊二醛固定液，固定约 1h，也可在 4 ° C 冰箱固定过夜。尽快送实验中心电镜室。



取材与固定注意事项

快：取材的动作要迅速，最好在材料离体后 1 min 内就进入固定液，最好不要超过 10 min；解剖器械要锋利(可使用新的双面刀片)，避免牵拉和挤压，尽量减少取材中的机械损伤。

准：取材要准确。器官要准确，部位要准确：如胃肠道、皮肤和角膜、视网膜、耳蜗等一定要注意方向性，确保要观察的部位在切面方向。组织块的包埋方向与切面方向要十分清楚，尽量自己在包埋前进行定位。

冷：取材过程应尽量在低温下进行（0-4° C），以降低酶的活性，减少细胞内结构的损伤。

小：所取材料体积要小，一般不超过 1 mm³，可以取成条状，但截面约 1 mm × 1 mm。因为固定剂的渗透力较弱，若组织块太大，块的内部将得不到良好的固定。



5、固定的温度和时间

大部分组织通常是在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下固定 1-4h。

6、固定方式

在体内条件下，固定速度较快、深度较深。例如，大鼠肾脏用 1% 锇酸灌注固定时渗透速率是 $20\mu\text{m}/\text{min}$ ，固定深度为 $100-200\mu\text{m}$ ；而体外固定的速度是 $8\mu\text{m}/\text{min}$ ，固定深度为 $30-40\mu\text{m}$ 。

7、组织块大小

组织块的大小最好在 0.5mm^3 左右。



二、漂洗及脱水

常规电镜样品所用的漂洗液一般是 0.1mol/L 磷酸缓冲液，其温度与固定液温度一致，为4° C，但时间不宜过长。

脱水一般常采用先酒精后丙酮（环氧丙烷）的脱水方法，浓度梯度依次为 30%、50%、70%、90%乙醇、无水乙醇3 次、丙酮（环氧丙烷） 2次，每次 10-15min。



三、树脂渗透

浸透就是利用包埋剂渗入到组织内部取代脱水剂，这种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，并经加温后，能聚合成固体，以便进行超薄切片。树脂渗透通常也需要梯度进行。

环氧树脂（Epon812、Spurr's）、丙烯酸树脂（伦敦白胶、Lowicryl）



四、包埋聚合

包埋：是指将渗透完的组织块放在包埋模具内。

聚合：是指将包埋模具放在烘箱内加热使树脂聚合硬化的过程。

Epon812 一般按照如下程序进行：35° C 16 小时，45° C 8 小时，55° C 12小时，60° C 48 小时固化。

Spurr's 树脂，70° C，8-24 小时即可



五、修块

修块是成功切处理理想连续切片的关键。（四面椎体形， $0.5*0.3\text{nm}$ ）

六、切片

灰色：40-50nm、银白色：50-70nm、金黄色：70-90nm、
紫色：90nm以上。

灰色和银白色切片较薄，可在一般透射电镜下观察，分辨率高，但反差小；金黄色切片较厚，分辨率低，但反差好，也可用于电镜观察；紫色切片后，不能用于电镜观察。



七、染色

生物样品本身的反差较低，需要经过染色增强样品中各种结构图像之间的反差或选择性地西安市某些结构和成分、

电镜图像的反差实质上是电子密度的差异，是有样品不同部分对电子束的散射能力不同而形成的。散射的电子越多，图像越暗，反之，散射的电子越少，图像越亮。利用重金属离子对不同细胞结构的结合能力不同，使细胞内各结构对电子产生强散射能力，从而增加反差。

染色一般是用乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染色。

透射电镜超薄制样系统



组织处理
化学固定 / 脱水 / 包埋 / 聚合

(EM AMW 或 EM TP)



修块

将样品树脂包埋块修成金字塔形，便于超薄切片

(EM TRIM2)



(EM KMR3)



超薄切片机

(EM UC7)



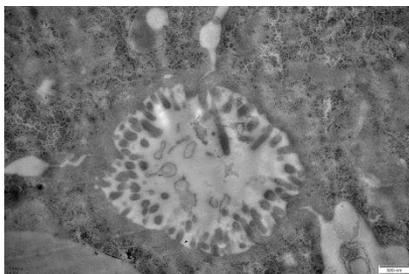
染色机

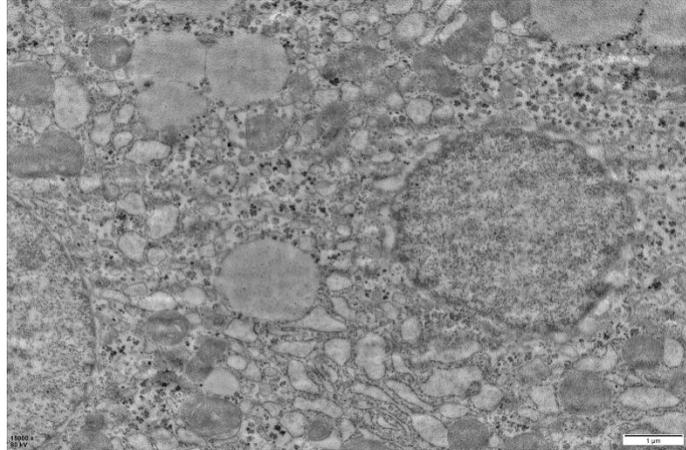
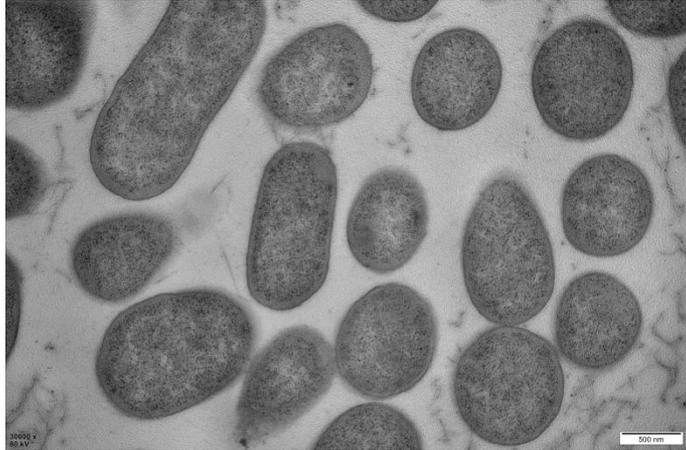
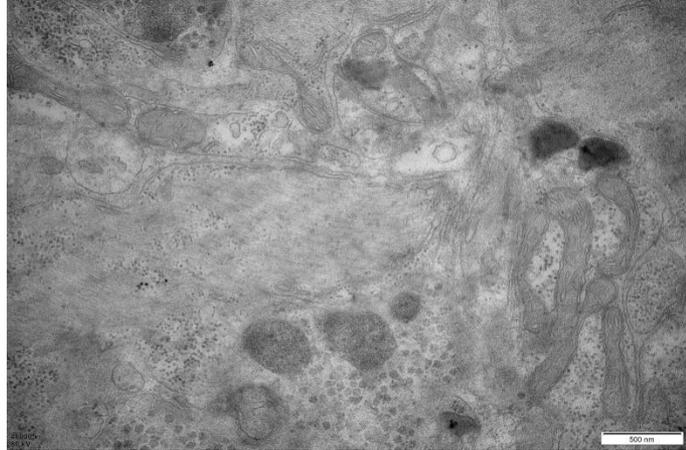
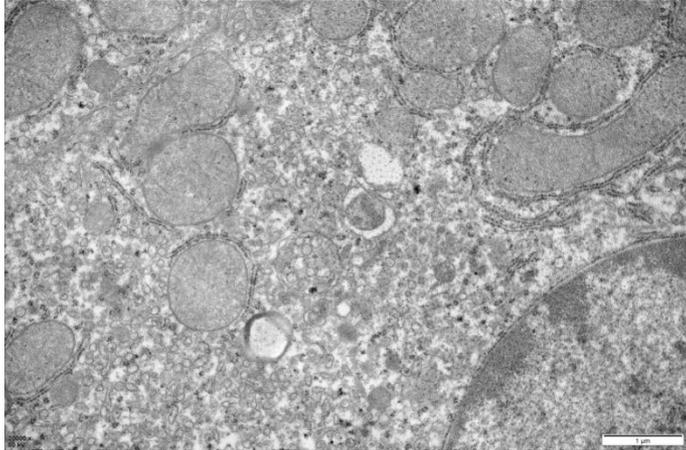
(EM AC20)



透射电子显微镜

TEM图像分析







第三章 扫描电子显微镜

第一节 扫描电子显微镜的结构

第二节 扫描电子显微镜的成像原理

第三节 扫描电镜样品制备方法



第一节 扫描电子显微镜的结构

扫描电子显微镜（Scanning Electron Microscope, SEM）

扫描电镜是利用电子射线轰击样品表面,引起二次电子等信号的发射,经检测装置接收后成像的一种电镜。

特点是景深长,所获得的图象立体感强,可用来观察生物样品的各种形貌特征。

在生物医学中,采用不同的样品制备技术可观察不同的结构,如用临界点干燥方法可观察样品的表面形貌;

用冷冻割裂方法可观察样品割裂面的结构,用铸型方法可观察管腔内表面的结构等。



扫描电镜

电子枪

电磁透镜

扫描线圈

样品室

信号的收集处理及显示系统

真空系统

供电保护系统等

电子光学系统



一、电子光学系统

由电子枪、电磁透镜、两部分组成，主要用于产生一束能量分布极窄的、电子能量确定的电子束用以扫描成象。

1、电子枪

构造、原理和用途与透射电镜相似，也是由阴极、栅极和阳极组成。阴极是V型钨丝，直径只有0.12mm，当通电加热到一定温度时，尖端即发射出电子束流。在阴极与阳极之间产生的1~40kV的加速电压的作用下，形成直径约30~50 μm 的高速电子束流，我们又常把它称为交叉光点或电子光源。



2、电磁透镜：

又称聚光镜，位于电子枪的下方。一般装有2~3级电磁透镜，有汇聚电子束流的作用，能使它的直径缩小到只有3~10nm，这种极细的电子束又被称为电子探针。

3、扫描线圈

即偏转线圈，由两组电磁线圈组成，可以控制电子探针在X / Y两个方向作光栅状的扫描。一般扫描电镜中装备三个偏转线圈，一个用于电子探针在样品的表面扫描，另外两个可以控制用作观察和摄影的显像管，使显像管中的电子束在荧光屏上同步扫描。



4、样品室

位于镜筒与真空系统之间，设有空气闭锁装置。这是为了在换样品时不破坏镜筒的真空，同时又保护灼热的灯丝，防止氧化，延长使用寿命。扫描电镜样品室最突出的特点是大，它可以放下直径约10cm的样品台（而透射电镜样品载网的直径只有3mm）。另外还装有样品微动装置，使样品可以上下左右（约4cm以内）移动，并可以倾斜（约-15~+90度）和旋转（360°）。这样就大大扩展了观察面。有的扫描电镜还设有冷冻样品台，能观察冷冻割断的样品。



二、信号的收集处理及显示系统

扫描电镜装有特定的检测器，如：二次电子检测器、背散射电子检测器等，它们可以分别检测电子探针与样品相互作用之后产生的有关信号。

- 电子经过一系列电磁透镜成束后，打到样品上与样品相互作用，会产生二次电子、背散射电子、俄偕电子以及特征X射线等一系列信号。所以需要不同的探测器。
 - 如二次电子吸收探测器、背散射电子吸收探测器、X射线能谱分析仪等来区分这些信号以获得所需要的信息。虽然X射线信号不能用于成象，但可用于测定材料的化学组成。
 - 有些探测器造价昂贵，这时，可以使用次级电子探测器代替，但需要设定一个偏压电场以筛除次级电子。
-

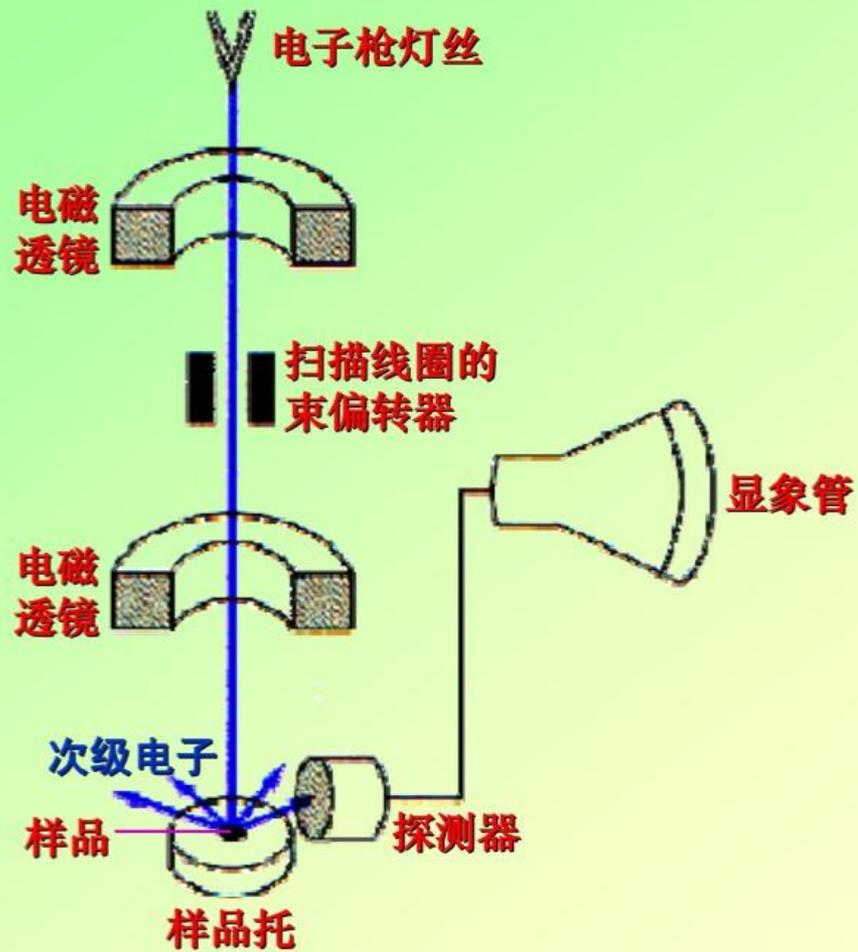


三、真空系统和供电系统

扫描电镜的真空系统也是由机械泵和扩散泵组成的，使镜筒内达 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 托的真空度。供电系统可给扫描电镜的各部件提供特定的电源。

第二节 扫描电子显微镜的成像原理





扫描电镜成像原理的简单图示



一、扫描电子显微镜工作原理

1、电子束与样品的相互作用

1-1、信号的种类

电子探针与样品相互作用之后产生多种信号，如：二次电子、X射线、背散射电子、吸收电子、俄歇电子、电子-空穴对，以及透射电子等。



1-2、与扫描电镜成像有关的信号

二次电子：它在扫描电镜成像过程中担任主角。它是样品本身的原子中的外层电子，被入射电子激发出来后，形成带有样品的形貌和成分等信息的电子束。二次电子主要反映样品浅表层（约5~50nm）的信息。

X射线：又称伦琴射线，波长约0.001~10nm。电子探针轰击样品时，可产生特征X射线和连续X射线。其中特征X射线的波长和能量随样品中各种元素的不同而各异。根据这一性质可以对样品中的某些元素进行定性和定量的分析。X射线主要反映样品深层（约50~500nm）的某些信息。

背散射电子：又称背反射电子，是被样品大角度反射回来的入射电子。它主要反映样品内部较深层（约50~100nm）原子的质量信息。另外晶体样品的特征也是利用背散射电子的衍射图反映出来的。



二、扫描电镜的成像原理

1、二次电子的成像

二次电子成像在扫描电镜成像过程中起主导作用。当电子探针与样品相互作用时，由于样品浅表层的形貌、成分和结构等的不一致，在多种效应的综合作用下，从样品的不同区域所激发出的二次电子的数量是不同的，那么先后转换的电信号和电压信号也相应的有差异，最终导致在荧光屏上的图像中与其相对应的位置上的明暗也有差异。这种在荧光屏上可反映样品信息的图像被称为二次电子图像。



2、扫描电镜成像的过程

首先，扫描电镜的电子枪发射的电子束经 $1\sim 40\text{kV}$ 的高压形成加压电子束，在聚光镜的汇聚作用下，又形成直径约 $3\sim 10\text{nm}$ 的电子探针。接着，电子探针在扫描线圈的控制下对样品的表面进行光栅状扫描（犹如一行行地读横版的书），并激发出多种带有样品信息的电信号，其中二次电子、特征X射线和背散射电子与扫描电镜的成像关系密切。

样品中凸出的部位会产生较多的二次电子，而二次电子的数量越多，转换成的电压信号也越强，图像中相应的部位就越亮。特征X射线可以反映样品中元素的种类和数量的信息。而背散射电子的散射方向是不规则的，主要受原子质量和密度的影响，也可以反映样品表面元素组成上的差异，尤其适宜观察样品表面凹洼的区域，这一特点正好与二次电子的成像互补。

这些电信号经不同的检测器收集后，被转换成带有样品信息的电压信号，这种电压信号被送入显像管的栅极，并能控制显像管的图像的亮度等。



三、扫描电镜在结构和工作原理上的特点

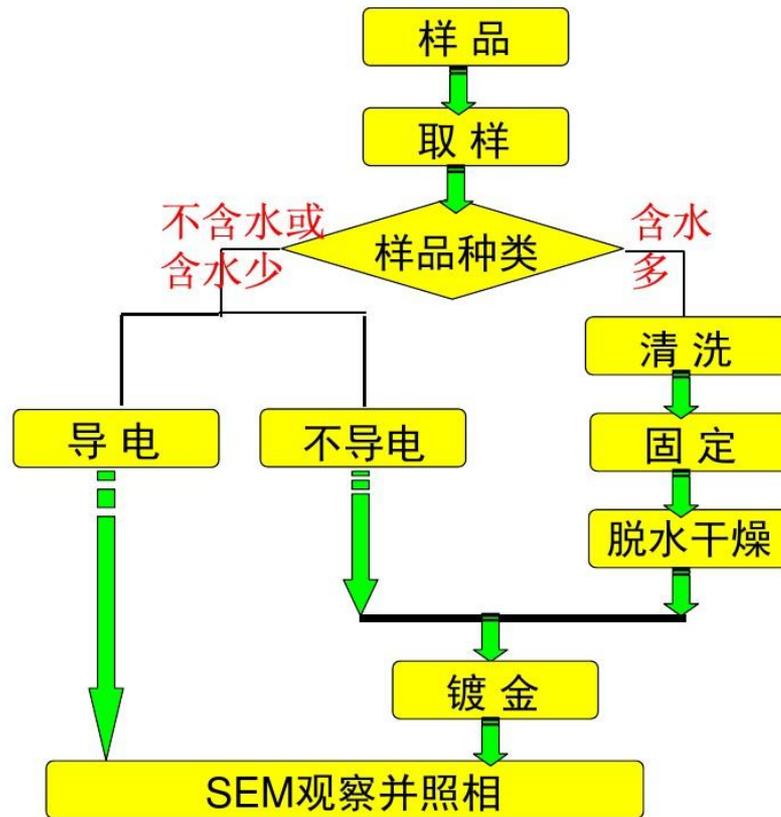
- 1、扫描电镜所用样品的制备方法简便(固定、干燥和喷金)，不需经过超薄切片；
- 2、扫描电镜采用的是次级电子成像；
- 3、扫描电镜所观察到图像景深长，图像富有立体感；
- 4、图像的放大倍率在很大范围内连续可变($10^1-10^5\times$)；
- 5、样品的辐射损伤及污染程度小等。在结构和工作原理上的特点

局限性：分辨率还不够高(1-10nm)； (2)只能显示样品的表面形貌，无法显示内部详细结构。



四、扫描电镜样品的制备方法

SEM制样技术





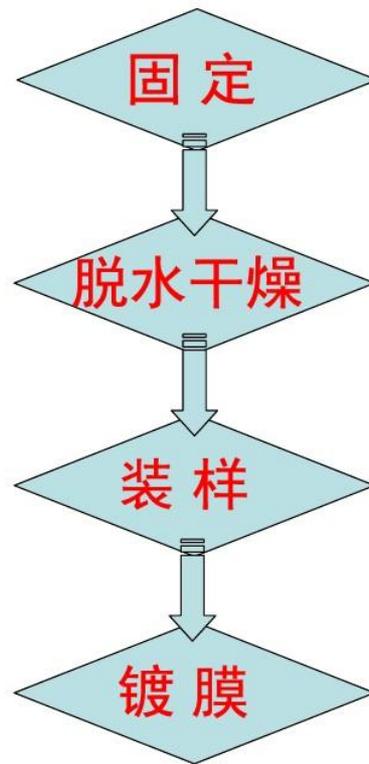
1、SEM的制样准则

- ❑ 尽可能保持样品本来的形貌和结构
 - ❑ 样品表面要处理干净
 - ❑ 样品必须干燥，在此过程中尽可能减少样品变形
 - ❑ 非导电样品要进行导电处理
 - ❑ 必须保护样品的观察面，应具有良好导电性能和二次电子发射率
 - ❑ 标注样品的安放顺序
-



2、生物样品制备

生物样品制备





取材

- ◆取材前做好试剂、器材的准备。
 - ◆取材部位要准确。一般直径最大不超过10mm，高度在3-5mm。
 - ◆取材的标本应新鲜、刀片应锋利、操作要轻巧，防止对样品的挤压。
-



样品清洗

清洗液的选择

- 一般动物组织表面的血液、黏液和其他分泌物，选用等渗的生理盐水或漂洗液清洗。
 - 游离细胞（如血、培养细胞）、悬浮液中的微生物、寄生虫等微小的样品，选用缓冲液进行清洗。
 - 表面覆盖有着大量黏液的胃、肠粘膜等样品，在固定前选用不同的低浓度蛋白水解酶（胰蛋白酶、糜蛋白酶等）或其他具有水解作用的溶液。
 - 特殊样品则需要针对性选用一些特殊的漂洗液，如生药样品表面的蜡质需要用1%-2%的Triton X-100（去垢剂）清洗。
-



清洗的方法

- ◆ 一般比较干净的生物组织可在固定前稍作清洗。将样品放入干燥的玻璃小瓶内，加入足够量的清洗液（样本体积的10-20倍），轻轻摇动小瓶，至少更换三次清洗液。
 - ◆ 游离细胞、细菌等样品放入离心管内，加入与固定液相应的缓冲液摇匀后，3000-8000rpm，离心3-10min，弃上清。重复三次。
 - ◆ 以组织、细胞内部结构为观察对象时，经常采用灌注清洗后再取材的方法。
-



固定

固定剂 { 甲醛
戊二醛：2-3%
四氧化锇：0.5-1%

固定温度：0-37度

固定时间：10分钟-几小时



脱水干燥

脱水：用不同浓度的乙醇或丙酮，采用“梯度脱水法”逐步替代样品中的水分。

30%、50%、70%、80%、90%、100%（两次），各15-20min

干燥：自然干燥法、真空干燥、临界点干燥



临界点干燥

1. 工作原理

根据物质存在的临界状态的物理特性而设计。

2. 过渡液的选择

选用液体 CO_2 作为干燥过渡液时，一般以乙酸异戊酯作为置换剂，样品与其作用15min即可。

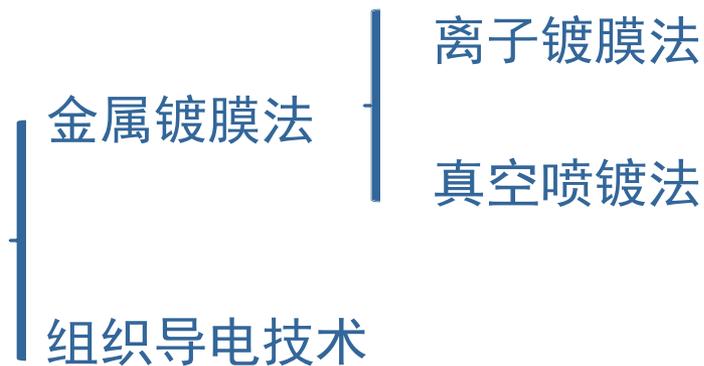
3. 操作过程



装 样

用特制导电胶或双面胶将样品粘贴在金属样品台上。

镀 膜







第四章 电子显微镜的其他技术

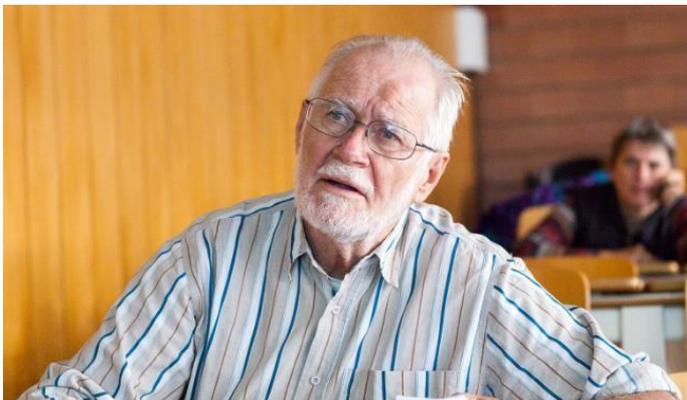
第一节 高压冷冻电镜技术

第二节 冷冻蚀刻电镜技术

第三节 场发射扫描电镜

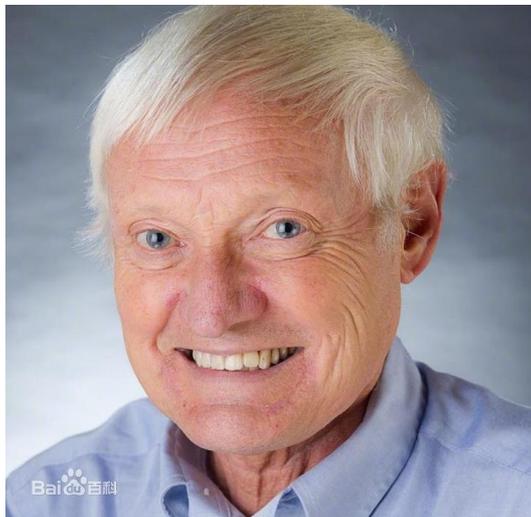
第一节 高压冷冻电镜技术

2017年诺贝尔化学奖获得者



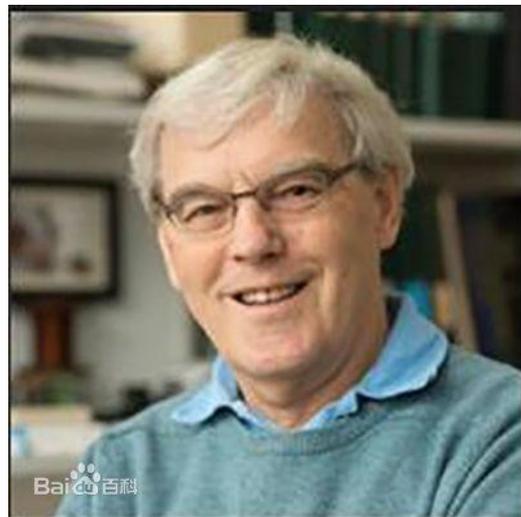
雅克·杜波切特（瑞士）

成功实现了“水的玻璃化”



阿希姆·弗兰克（德国）

开发了一套图像处理方法



理查德·亨德森（英国）

成功使用电子显微镜
得到原子层面分辨率的蛋白质三维结构
图像



一、什么是固定？什么是化学固定，什么是冷冻固定？

1、**固定目的**：最大程度保存样品生活状态的原始信息，供后续研究

2、**化学固定**：利用醛类等化学物质与蛋白等的交联作用。

速度比较慢：数分钟至数十分钟；

引起蛋白质变性，抗原活性下降或丧失；

脱水造成组织皱缩和三维结构参数改变。



3、**冷冻固定**：瞬间冰冻，毫秒级终止一切细胞内生命活动

高压快速冷冻固定的优点：

- 组织在50毫秒内瞬间固定，反应细胞和细胞器的真实活性状态；
 - 不使用化学固定剂，提高电镜免疫胶体金的灵敏度；
 - 不使用酒精脱水，而是用丙酮低温替代，避免组织皱缩。
-



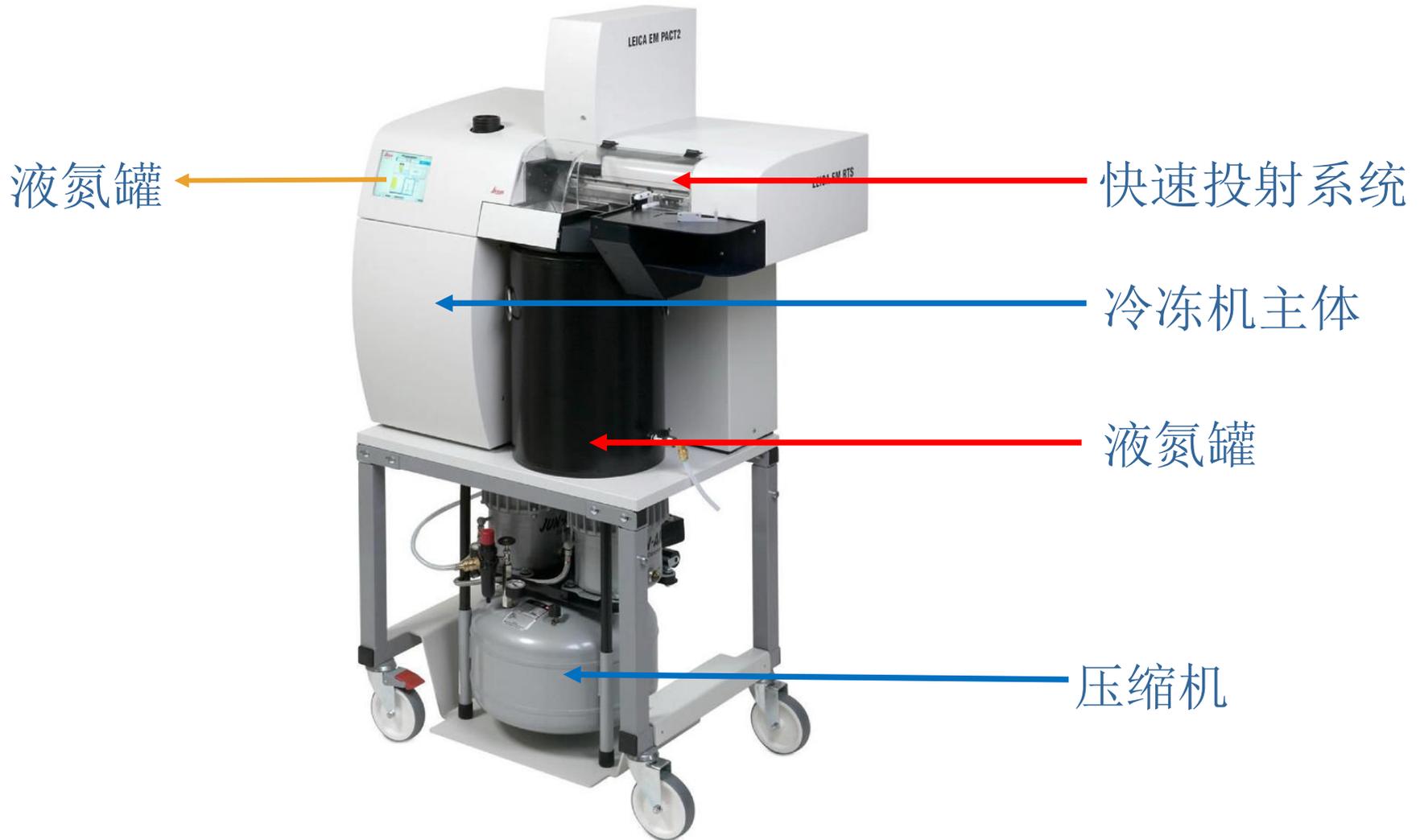
EM HPM100



EM PACT2 / RTS

200 μ m深度玻璃化冷冻!

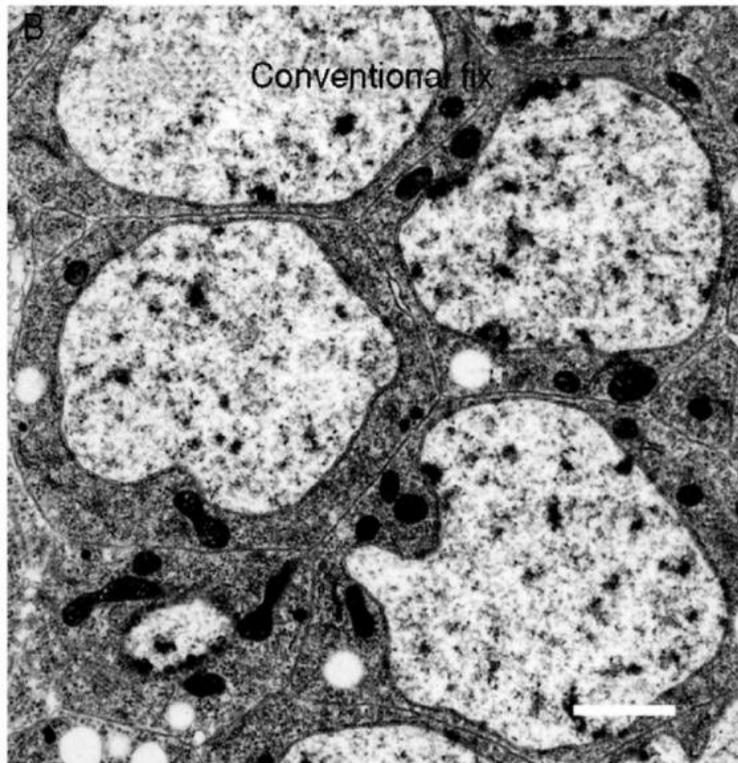
高压冷冻机的构造



化学固定与高压冷冻固定对比

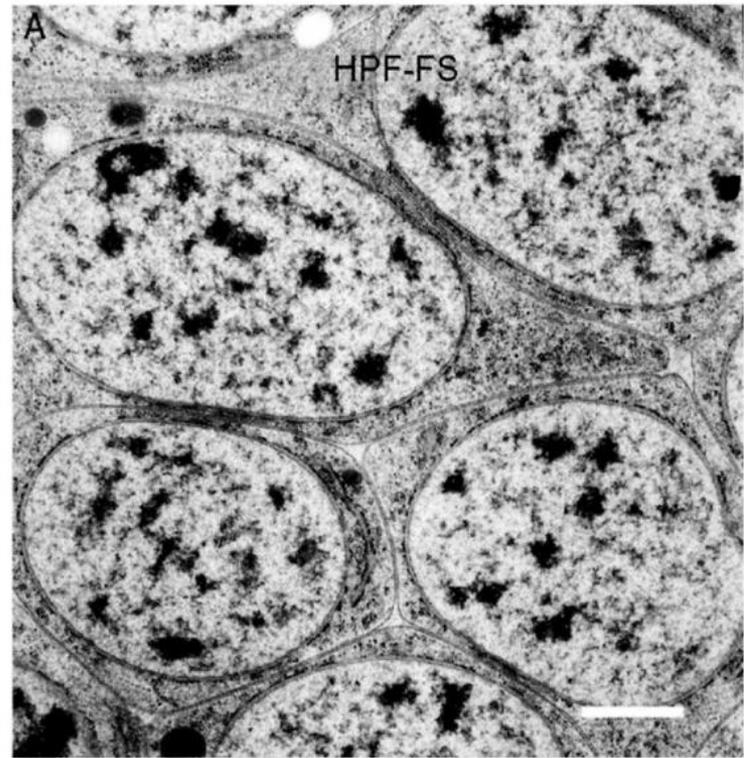
果蝇胚胎细胞

传统的化学固定方法



果蝇胚胎细胞

高压冷冻固定方法



高压冷冻固定的图像，细胞更饱满，线条更光滑；但是衬度不如化学固定好，因细胞质没有被抽提，细胞质浓度更高。

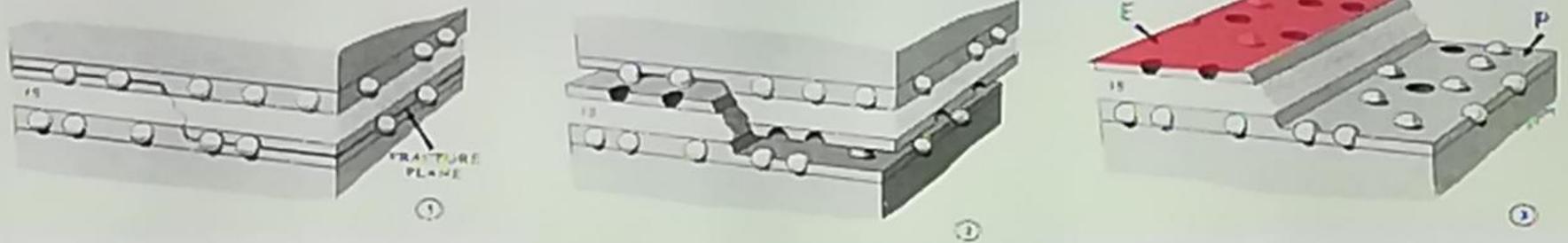


二、高压冷冻的主要应用

- | | |
|--------------|----------|
| 高压冷冻+冷冻替代 | (常温TEM) |
| 高压冷冻+冷冻切片 | (冷冻TEM) |
| 高压冷冻+冷冻断裂 | (冷冻SEM) |
| 高压冷冻+冷冻断裂+复型 | (常温TEM) |
| 高压冷冻+激光共聚焦 | (光电联用) |
| 高压冷冻+光源 | (光遗传学研究) |
-

第二节 冷冻蚀刻电镜技术

在极低的温度下将生物样品断裂，暴露出生物材料内部的表面结构，进而在高真空下使断裂面上一部分冰加热升华，然后再向断裂面上喷碳和铂金，形成一层复型膜，最后在透射电镜下进行观察。





优点：

组织冷冻固定代替了化学固定，不经过脱水、包埋，使生物样品更接近生活状态。

能够更好的揭示生物膜内部和细胞内的三维结构图像，在电镜下具有明显的立体感。



第三节 场发射扫描电镜

场发射扫描电镜是上世纪70年代逐步发展起来的新型扫描电镜。场发射扫描电镜具有亮度高、相干性好等特点，在高、低加速电压下，均可获得较高的图像分辨率，特别适合于半导体和绝缘材料样品的结构表征和测量等。场发射扫描电镜是目前材料科学研究的基本工具之一。就场发射电子显微镜而言，目前市场上有**热场发射**和**冷场发射**两大类。

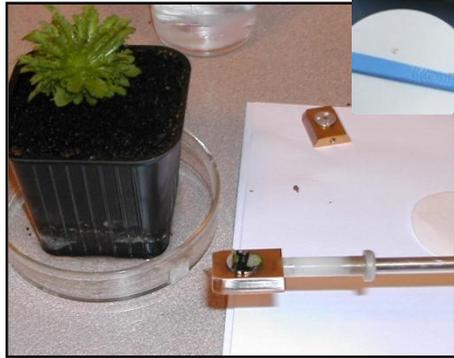


项目	冷场	热场	说明
电子枪工作温度	室温	1800度	冷场和热场的主要区别在于电子枪。热场还要在灯丝上镀一层氧化锆，还要加热到1800度。而冷场只要在环境温度下工作。
能量分散	小于0.2eV	小于0.8eV	理论上来说，电镜的分辨率是取决于色差和加速电压。如果色差小，分辨率好。但是要色差小，就要求发射电子的能量分散小，这样才能得到好的分辨率。冷场发射的发射电子的能量分散只有0.2eV，所以冷场发射电镜会得到较高的分辨率。
亮度	$2 \times 10^9 \text{ A/cm}^2\text{sr}$	$5 \times 10^8 \text{ A/cm}^2\text{sr}$	冷场灯丝亮度高可以保证微弱照明下的图像质量，对于电子辐照敏感，不耐电子辐照的样品有保护作用。在低加速电压下亮度对图像质量的影响更大。高亮度可以得到更好的分辨率。
寿命	五年以上	10-12个月	冷场灯丝一般能使用5年以上
灯丝发射状态	仅在工作时	一直持续	对于使用者而言，不使用时灯丝也会损耗，造成很大的浪费
电子束流	小，做EDS、CL、EBSD没有问题；做WDX分析不够理想	大，能支持做EBSD，CL，WDX等比较好	
维护成本	低	高	热场换次灯丝的价格大约为1~2万美金，冷场灯丝价格约2000美元。
样品要求	可观察不导电样品，损伤小	要求导电性好，对样品损伤大	热场由于对样品的导电性要求较高，所以观察样品时就要镀金。如果掌握不好，就会对样品造成一定的损伤。
安装条件	接地电阻为100欧姆	接地电阻小于1欧姆	热场安装要求苛刻，接地1欧姆实现难度大，成本高。

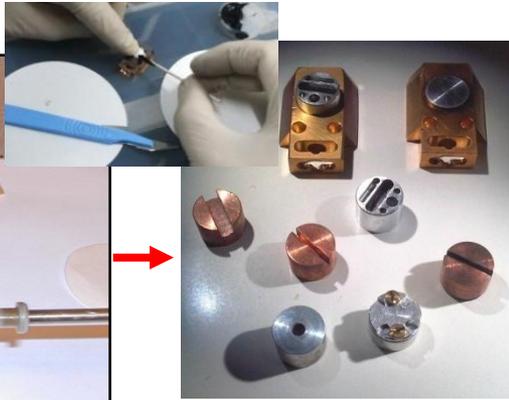


冷场电镜对于生物样品、纳米材料，聚丙烯等高分子材料和导电较差的无机材料领域应用意义非常突出，因为冷场的高亮度可以使我们用尽可能小的束流获取高倍图像，而不会损伤样品。低加速电压的应用优势越来越体现在材料研究中，使得冷场电镜可以不喷镀而直接对不导电样品进行高倍观察的原因就是，在低加速电压下，冷场发射的色差更小，优势更突出，有力地保证了低加速电压下图像的分辨率。

Cryo-SEM技术原理及操作步骤



含水（液体）样品取样



载样(各种样品座)



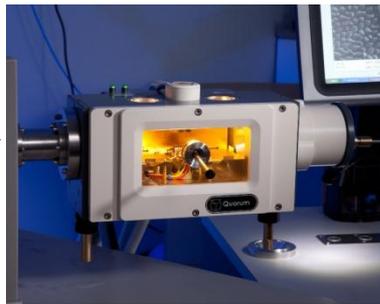
样品座装载到传输装置



样品预冷(插入液氮泥)



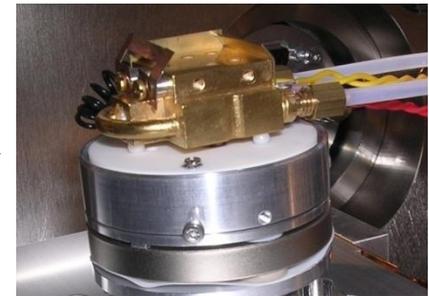
真空下转移



与制备腔室气锁对接



断裂、升华刻蚀和镀膜



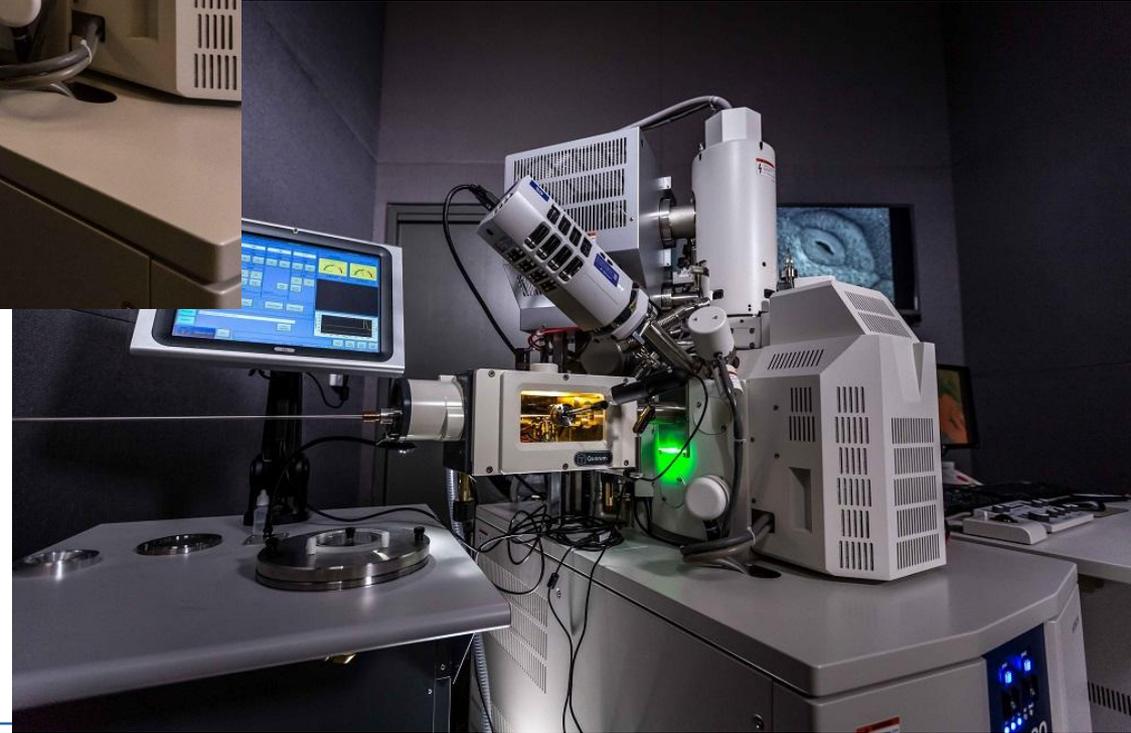
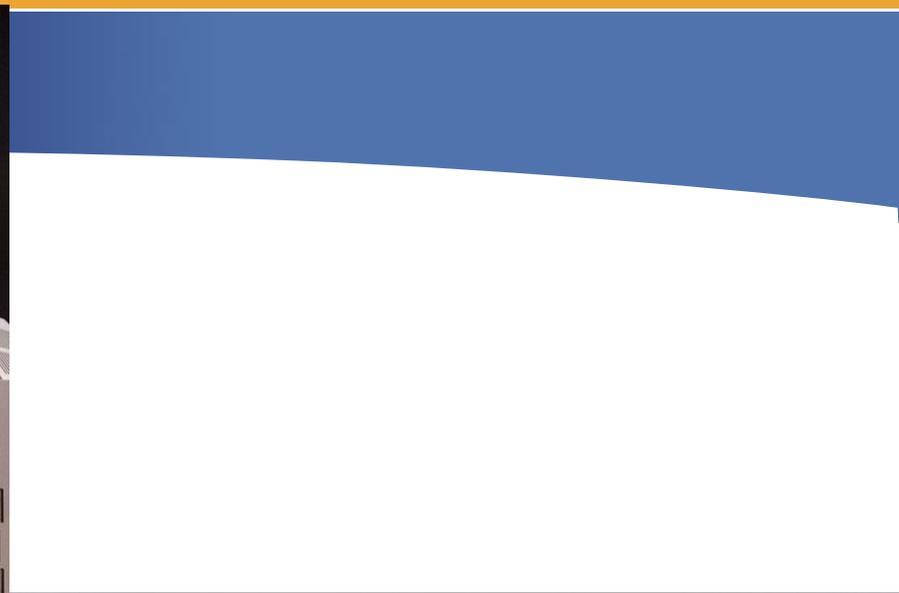
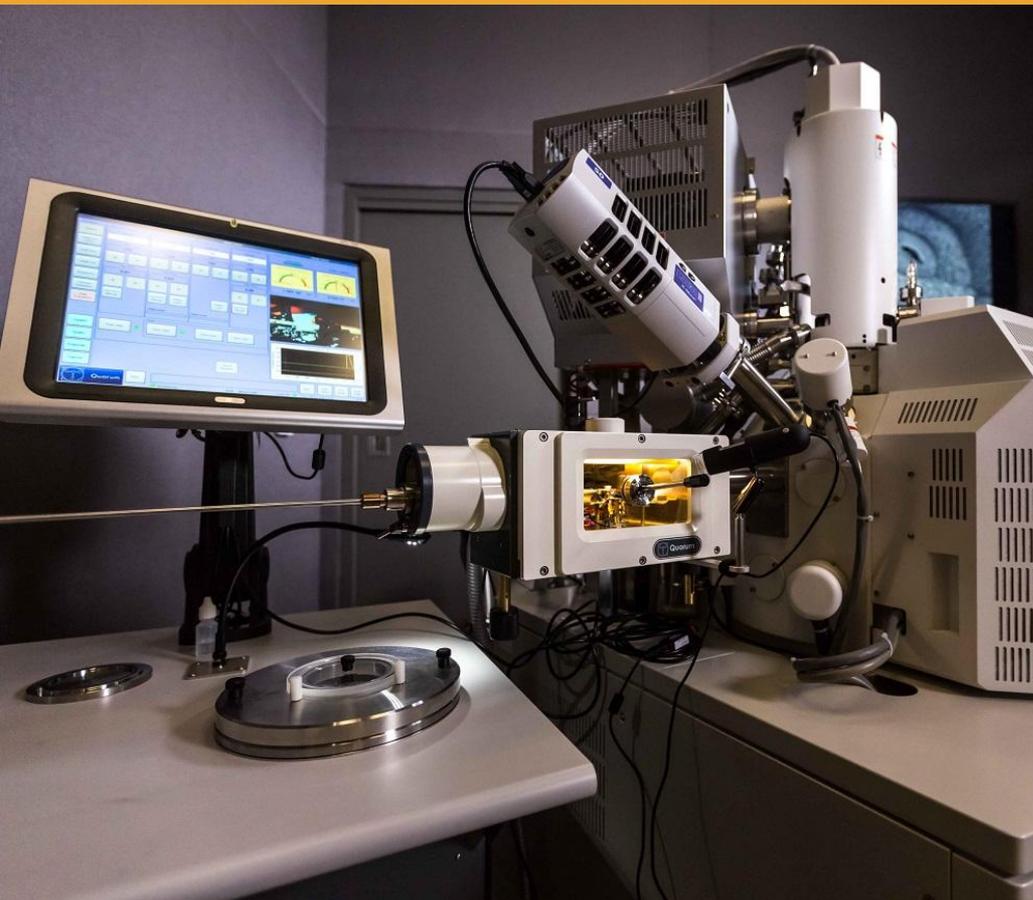
传输至电镜腔室
(SEM观察和拍照)

整个CryoSEM操作过程均在“低温冷冻”和“真空状态”两个前提下进行



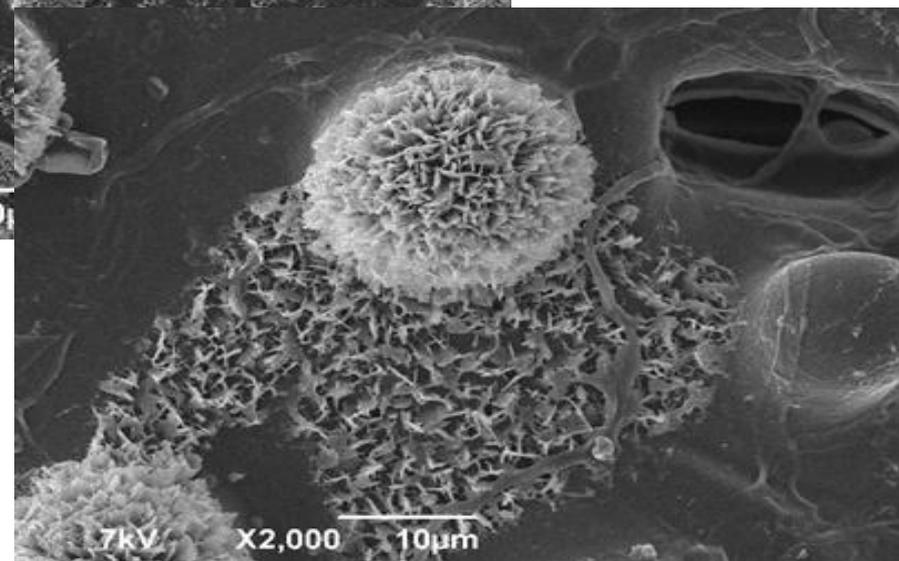
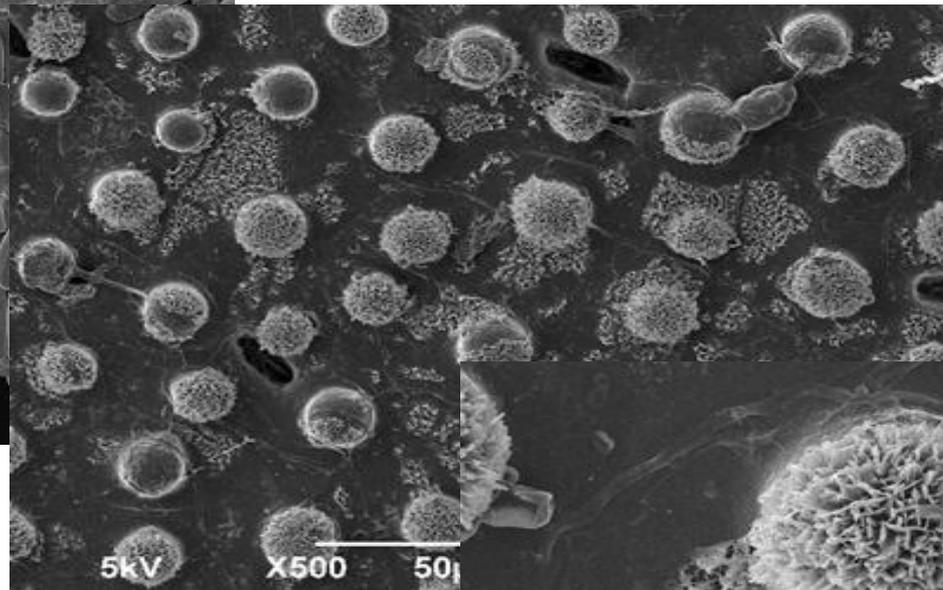
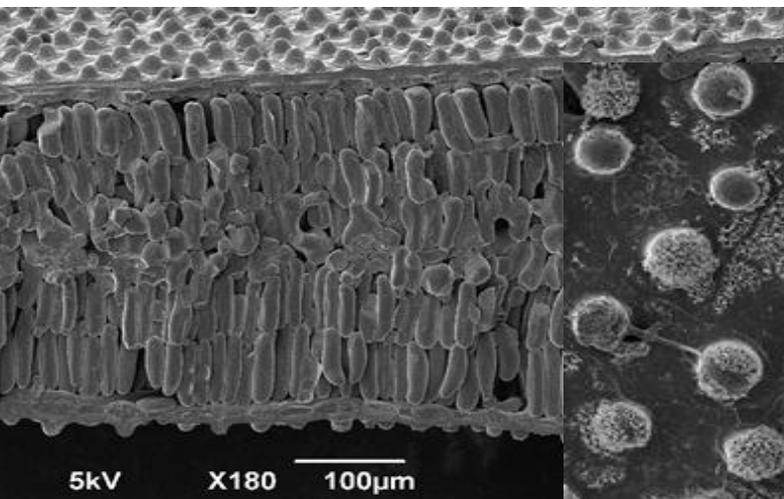
Cryo-SEM与常规干燥处理比较优势

- ❖ 样品可直接在**完全含水**状态下观察，适合**液体、半液体，泡沫及电子束敏感**样品的直接观察，是一个**快速**高效的方法；
 - ❖ 不失真观察：**可溶性成分**被保留，没有或很少发生组织成分**再分布**，无皱缩变形及机械损伤；
 - ❖ 通常无需（暴露到）**有毒试剂**；
 - ❖ 对样品进行**动态实验**的最佳方法；
 - ❖ **高分辨率**能力（与电镜低真空模式比）；
 - ❖ 通过**低温断裂**获得额外信息；通过**升华刻蚀**显示内在信息；
 - ❖ 具有“**重做**”样品的能力（例如：重新断裂及镀膜）；
-

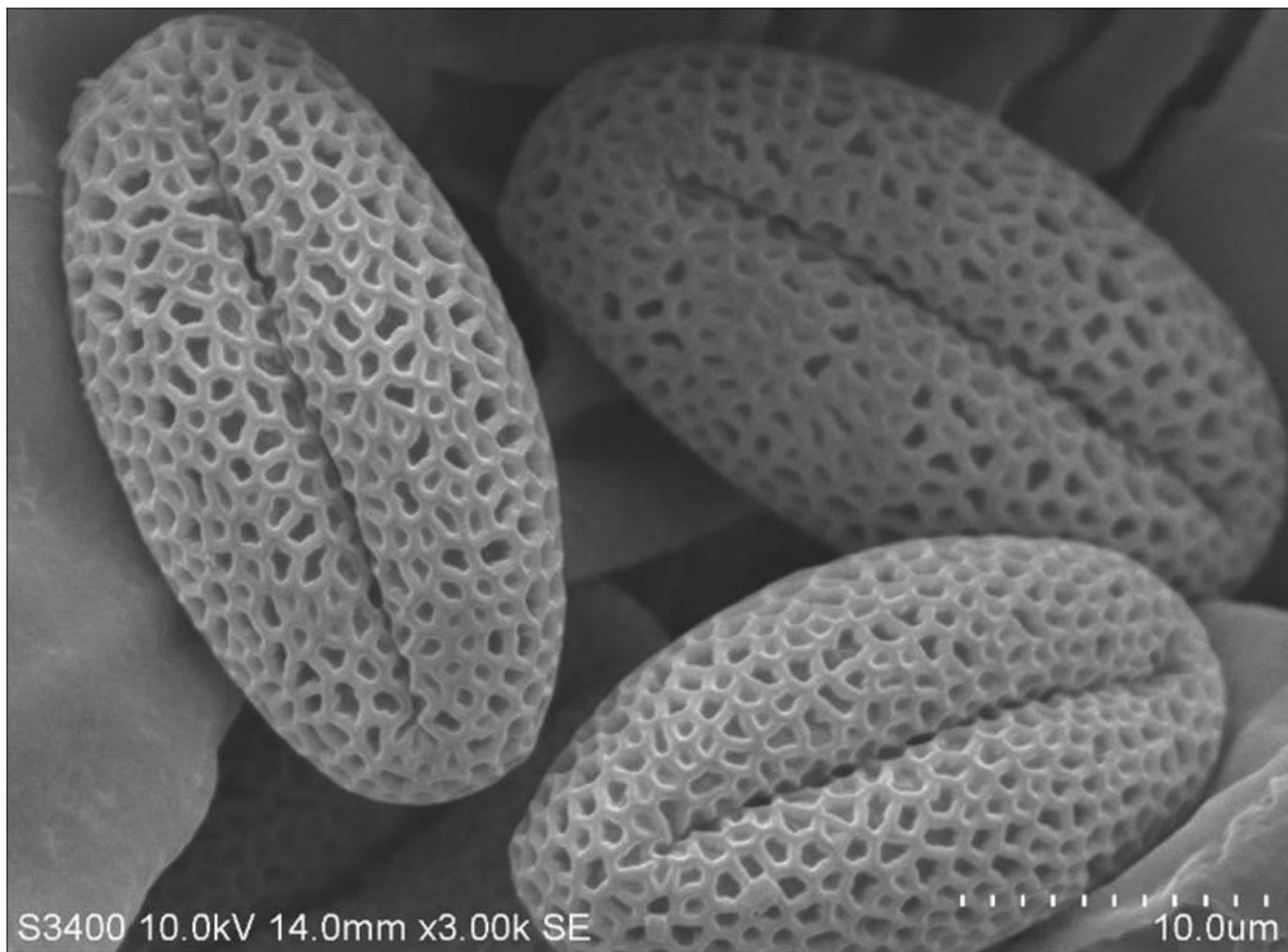


Cryo with Hitachi SU-5000

Botanical - plant leaf with surface wax 帶有蜡质纹饰的叶子



花粉 Cryo-SEM图像



A photograph of a woman in profile, looking at a computer monitor. She is wearing a dark blazer over a light-colored top. The background is blurred, showing other people in a professional environment. The image is framed by a blue banner at the top and an orange banner at the bottom.

Thank You !