

电子显微镜： 洞察生命微观世界 奥秘的强大助手

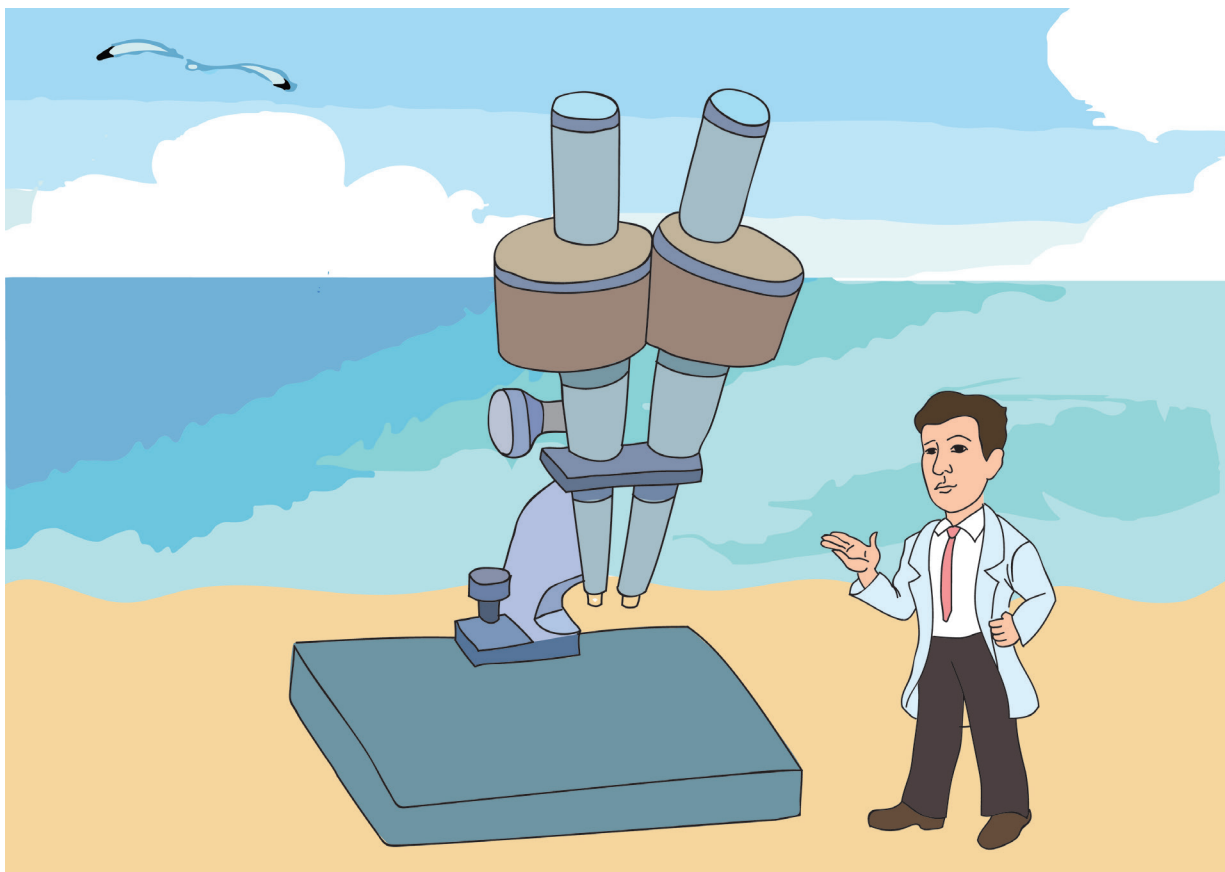
撰文
郭晓强

探索未知世界是科学发展的重要动力，为了洞悉遥远宇宙的奥秘而发明了望远镜，为了理解微观世界的神奇而发明了显微镜。

光学显微镜的发明和应用

伴随着意大利文艺复兴的起始，现代科学发展进入了一个快车道。人们开始对光有了更深入的理解和认识，并加速了对光的研究和利用。关于光学显微镜的发明目前还存在诸多争论，但一般认为荷兰科学家詹森父子于16世纪末首先发明，而后众多科学家对其进行了完善和发展，其中荷兰科学家安东尼·范·列文虎克（Antonie van Leeuwenhoek）贡献最为突出。列文虎克曾制备出放大倍数近300倍的显微镜，有力推动了显微镜的普及应用。

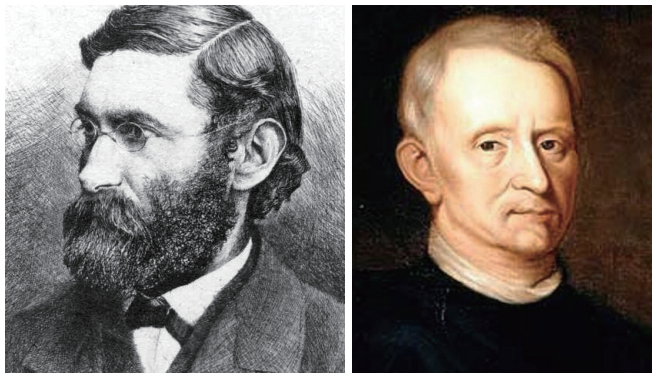
1665年，英国科学家罗伯特·胡克（Robert Hooke）首次借助光学显微镜观察到植物组织存在诸多小室一样的结构，将其命名为细胞（Cell），从



绘图 / Tianyi

而开启了细胞生物学研究。19世纪上半叶,科学家进一步提出细胞学说,又先后发现细胞基本结构,包括细胞膜、细胞质、细胞核以及高尔基体和线粒体等细胞器。细胞学说的提出在促进细胞生物学的诞生的同时,也极大地推动了整个生命科学的快速发展。然而,当科学家期望借助光学显微镜进一步观察更精细的细胞结构时,却遇到一个巨大挑战。

德国物理学家和光学家恩斯特·卡尔·阿贝(Ernst Karl Abbe)在蔡司公司多次尝试提升光学显微镜分辨率无果,最后得出一个著名的阿贝公式,即光学显微镜分辨率极限约为可见光波长一半。考虑到可见光波长最短的紫光波



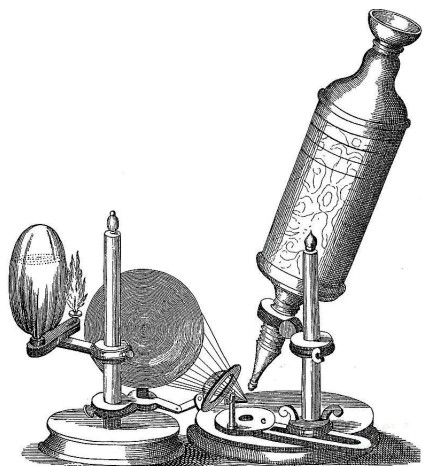
左: 德国物理学家和光学家恩斯特·卡尔·阿贝
右: 英国科学家罗伯特·胡克

长为400纳米,因此传统光学显微镜的最大区分间距为200纳米。阿贝公式在指出光学显微镜不足的同时,也为显微镜发展提出一个新方向,那就是寻找波长更短的发射源。

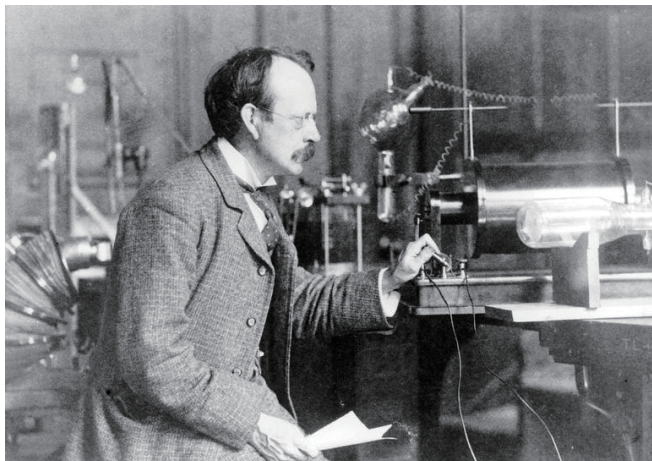
电子的发现

1896年,英国物理学家约瑟夫·约翰·汤姆逊(Sir Joseph John Thomson)和同事开始研究阴极射线。所谓阴极射线是指在一个密闭真空管内装置两个电极,随后在两个电极上给予高压处理,结果从阴极(负极)发出一束射向阳极(正极)的离子束,将其称为阴极射线。这种射线还可照射到阳极远端涂有荧光粉的表面,通过产生光反应而被探知。

为研究阴极射线本质,汤姆逊将阴极管周围放置两个带相反电荷的电板,结果发现原本直线传播的阴极射线从负电板向正电板弯曲,预示该射线带有负电。汤姆逊还在阴极管周围放置磁铁,结果也引起射线偏转。据此汤姆逊计算出这种带负电粒子的荷质比,对比发现其质量只有氢原子质量的 $1/2000$ 。汤姆逊还对不同阴极材料进行了测试,结果发现它们均含有这种粒子,并且质量相同。结合这一系列结果,汤姆逊得出结论,阴极射线是一种由负电粒子组成的离子束,后来这种负电粒子被命名为电子。电子是第一个发现的亚原子粒子,从而掀开近代物理的新篇章,汤姆逊也因这一重大发现而荣获1906年的诺贝尔物理学奖。



上: 早期的显微镜
下: 荷兰科学家安东尼·范·列文虎克



英国物理学家约瑟夫·约翰·汤姆逊

电子波的提出和证实

电子最初被认为是一种实体粒子，自然具有粒子性。然而1924年，法国物理学家路易斯·德布罗意 (Louis de Broglie) 借鉴光的波粒二象性现象

提出假说，认为包括电子在内的物质粒子与光类似，也具有波粒二象性特征。由于电子粒子性已得到科学界公认，电子波理论就成为一个重要的新观念。1927年，汤姆逊的儿子乔治·帕杰·汤姆逊 (George Paget Thomson) 和美国物理学家克林顿·戴维森 (Clinton Davisson) 用实验证实电子也可发生衍射现象 (波动性的一个重要特征)，从而证实电子波理论，二人也因此分享了1937年诺贝尔物理学奖，而德布罗意则于1929年独享了诺贝尔物理学奖。

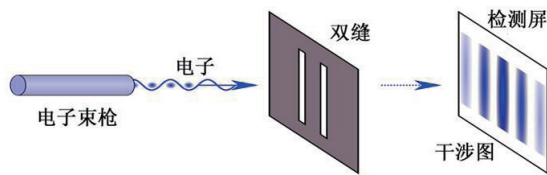
电子波理论的证实预示着电子和光在多个方面具有类似性，因此也可作为发射源用于显微镜。相比光波，电子波的波长可短至0.1~0.2纳米，根据阿贝公式，其分辨率将远远优于光学显微镜，从而意味着电子在显微镜领域将大有作为。

电子显微镜的发明

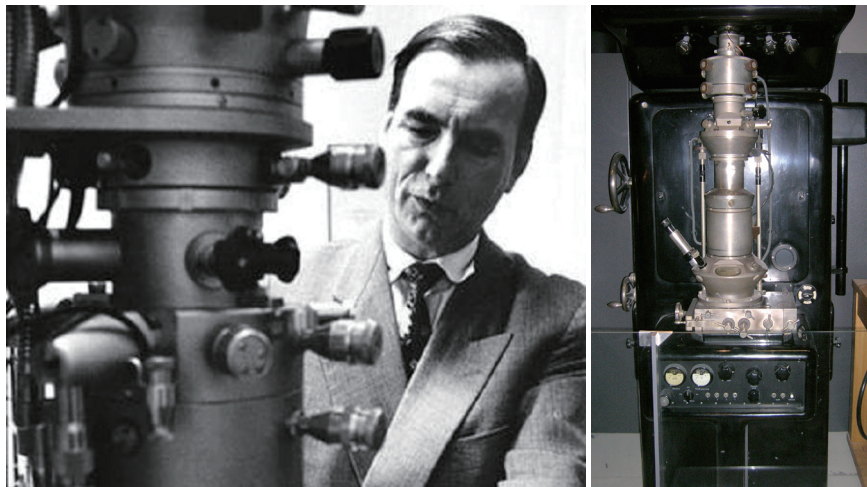
德布罗意的思想激发了多位科学家的灵感，德国物理学家恩斯特·鲁斯卡 (Ernst Ruska) 就



上：英国物理学家乔治·帕杰·汤姆逊
下：法国物理学家路易斯·德布罗意



上：美国物理学家克林顿·戴维森
下：电子波理论图析



左：德国物理学家恩斯特·鲁斯卡
右：电子显微镜原型

是其中之一。最初，鲁斯卡考虑可用电子作为显微镜的发射源，仍担心的是电子波长不够短而优势有限。然而，当他采用德布罗意方程计算后发现，电子的波长与光的波长可相差两到三个数量级，意味着电子显微镜将具有极大优势。

其实，早在1926年，另一位德国物理学家汉斯·布施(Hans Busch)就发明了第一个电磁透镜，为电子显微镜的发明奠定了基础，遗憾的是他最终并未发明电子显微镜。1931年，在柏林大学工作的鲁斯卡和电子工程师马克斯·克诺尔(Max Knoll)制造出世界上第一台电子显微镜的雏形，这台电子显微镜可实现400倍放大倍数，首次证实电子显微镜的可行性。1933年，鲁斯卡进一步开发出远超光学显微镜分辨率的电子显微镜。1938年，第一台电子显微镜走出实验室，进入科研院所，开始在实际研究中展现强大的能力。1986年，鲁斯卡由于电子显微镜的发明而分享诺贝尔物理学奖。

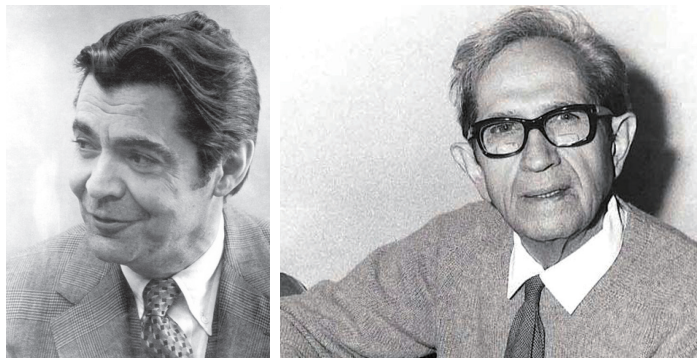
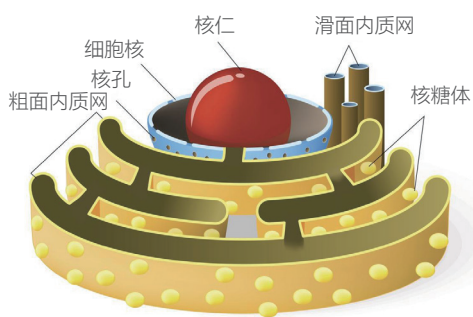
电子显微镜在细胞生物学领域的应用

光学显微镜尽管已展现细胞基本结构——细胞膜、细胞质和细胞核以及借助其他方法鉴定出线粒体和高尔基体等亚细胞结构，但无法获得更精细的结构，电子显微镜的发明和应用为此提供了一扇大门。

20世纪30年代，比利时细胞生物学家阿尔伯

特·克劳德(Albert Claude)在洛克菲勒医学研究所(后来的洛克菲勒大学医学院)利用细胞组分分离和高分辨率光学显微镜相结合的方法发现细胞内存在众多未知的亚细胞组分，特别是一种富含RNA的聚集体，克劳德将其命名为微粒体(microsomes)。尽管克劳德知道微粒体的重要性，然而限于技术瓶颈(微粒体太小、光学显微镜分辨率太低)而无法进一步探究其细节。1943年，当克劳德发表发现微粒体的论文后，著名的显微镜专家厄内斯特·富拉姆(Ernest Fullam)立刻对此产生浓厚的兴趣。当时美国国内电子显微镜数量非常有限，富拉姆管理洛克菲勒研究所唯一的一台电子显微镜，他的上级迫切想知道这一强大的新设备在生物学领域的应用潜力。因此，当富拉姆知道克劳德的问题后，立刻取得联系，并快速达成合作计划。

当时，电子显微镜分辨率可达最好光学显微镜的40~50倍，但电子束损伤作用及弱的穿透力使它在标本制备方面比光学显微镜要求更高。克劳德找到自己的同事基思·罗伯茨·波特(Keith Roberts Porter)来帮助解决这一难题。波特经过近一年半时间摸索出一种样品制备方法，首先将鸡胚成纤维细胞在薄聚乙烯膜上培养，用醋酸蒸汽固定45分钟后蒸馏水洗涤30分钟，最后在空气中干燥。1944年7月，他们获得第一张培养细胞的电子显微镜照片，分辨率达



左：核糖体 中：罗马尼亚裔美国细胞生物学家乔治·埃米尔·帕拉德 右：比利时细胞生物学家阿尔伯特·克劳德

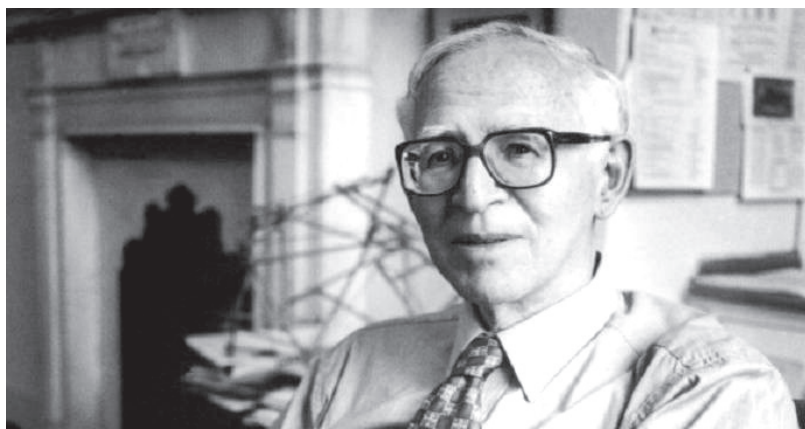
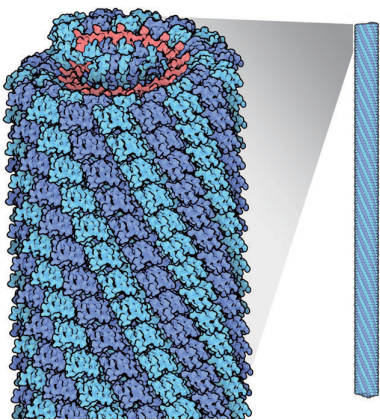
到2纳米，清晰显示细胞内更为精细的结构，包括致密细胞核、不同长度的线粒体、靠近细胞核的高尔基体及充满细胞质的花纹状结构（后命名为内质网）等。这次重大突破开启了现代细胞生物学的一扇大门，为全面深入研究细胞精细结构及生物学功能奠定了坚实的基础，电子显微镜亦很快成为细胞生物学研究的重要工具。

乔治·埃米尔·帕拉德 (George Emil Palade) 是一位罗马尼亚裔美国细胞生物学家，1946年在听到克劳德关于电子显微镜工作进展的学术报告后也开始从事这方面研究。20世纪50年代，帕拉德积极改进电子显微镜技术，最重要的就是细胞固定。当时锇酸已被广泛作为固定剂，然而却只适合培养细胞，无法应用于生物组织。帕拉德认为这是源于锇酸酸性难以控制的原因，为此引入缓冲液保证相对稳定的

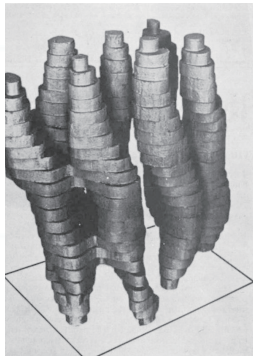
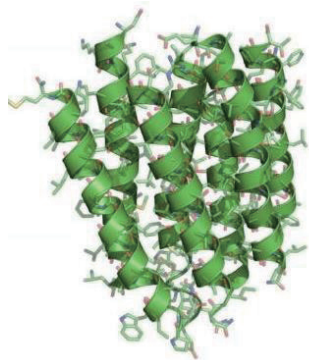
pH，这一改进拓展了电子显微镜的适用范围。帕拉德还革新和完善了材料包埋与超薄切片技术，极大提升了电子显微镜的分辨率，从而能够对细胞精细结构有更深入的理解。

1952年，帕拉德借助改进的电子显微镜发现线粒体内存在诸多褶皱并延伸到线粒体基质，将其称为嵴，并正确推测这是由于线粒体内膜内折造成的，具有增加内表面功能。1955年，帕拉德开始研究微粒体，利用细胞组分分离技术、生物化学方法和电子显微镜发现微粒体总附着于内质网膜，据此将内质网分为粗面内质网（附着微粒体）和滑面内质网（不附着微粒体）。帕拉德进一步发现微粒体由蛋白质和RNA两部分构成，由于RNA携带遗传信息，推测微粒体可能参与蛋白质合成，后将其命名为核糖体 (ribosome)。

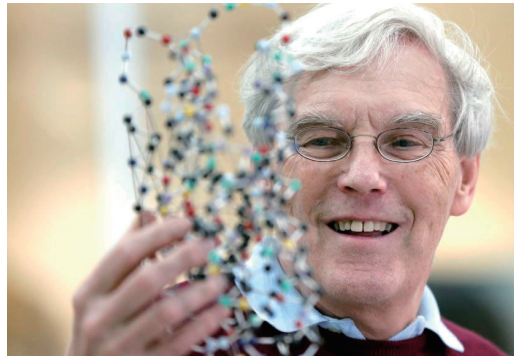
1974年，克劳德、帕拉德和德迪夫



左：烟草花叶病毒模型图 右：立陶宛裔英国结构生物学家艾伦·克卢格



视紫红质（左为1990年电镜图，右为1975年电镜图）



英国结构生物学家理查德·亨德森

（Christian Rene de Duve, 发现溶酶体和过氧化物酶体）“由于细胞结构和功能组织的发现”而分享诺贝尔生理学或医学奖，他们的发现为现代细胞生物学的诞生奠定了坚实的基础。

电子显微镜在大分子复合物研究中的应用

电子显微镜在众多细胞器及其他亚细胞结构研究中发挥了重要作用，下一个问题在于能否进一步研究比细胞器小但非常重要的生物大分子聚集体，如细胞核、肌纤维、染色体等结构呢？立陶宛裔英国结构生物学家艾伦·克卢格（Aaron Klug）在此方面取得重大突破。

电子显微镜在研究细胞器结构时更多获得的是二维结构。由于生物分子主要由碳、氢和氧等轻原子构成，对比度差。为解决这一难题，或者采用重金属掺入（亚细胞结构研究），然而这一处理对生物结构具有严重的破坏作用；或者增加曝光时间，而这种操作由于辐射缘故而造成结构损伤。克卢格发现在不损伤样品结构的前提下，进行适当剂量照射可获得对比度并不高的一系列图片，它们也含有感兴趣的结构信息，进一步借助数学方法对这些原始照片进行处理可获得高质量的结果。克卢格进一步通过多方向电子束照射物体而获得多角度二维照片，通过三维重建而获得立体结构。

这一改进取得极为理想的效果。克卢格借助这种方法研究两种最重要的生物大分子——核酸和蛋白质组成的聚集体结构，既包括简单的烟

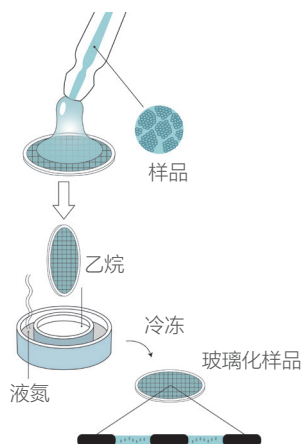
草花叶病毒（tobacco mosaic virus, TMV），也包含真核生物染色质基本单位核小体。这些研究一方面在静态水平理解这些聚集体生物单分子的详细结构，对深入理解生物学功能具有重要益处；另一方面在动态水平洞悉RNA和蛋白质形成聚集体的过程。1982年，克卢格由于“晶体电子显微镜技术的发展及其阐明核酸-蛋白质复合物结构”的贡献而独享诺贝尔化学奖。

克卢格在电子显微镜应用方面又往前迈出一大步，激发更多科学家加入电子显微镜研究领域，以期取得更大突破，他的同事理查德·亨德森（Richard Henderson）就是其中之一。

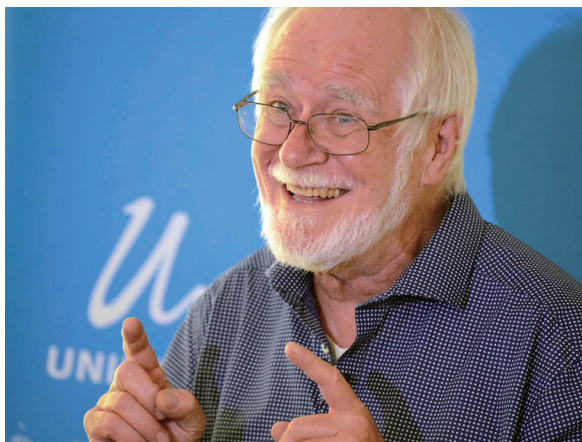
电子显微镜在蛋白质结构研究中的应用

尽管克卢格借助电子显微镜在大分子聚集体结构解析方面取得巨大成功，但是再进一步研究更小的分子如蛋白质的结构时，由于分辨率缘故仍然困难重重。20世纪50年代，以DNA双螺旋和肌红蛋白（血红蛋白）为代表的结构研究主要借助X-射线晶体衍射方法，这一方法的最大瓶颈在于制备出高质量蛋白质晶体。然而在实际研究中，这一目标并不容易实现。

20世纪70年代，英国剑桥分子生物学实验室的亨德森决定采用X-射线晶体衍射方法研究一种膜蛋白——视紫红质的结构，但是经过多次蛋白结晶处理后，最终无功而返，不得不另想良策。克卢格的成功为亨德森提供了一种全新选择，那就是利用电子显微镜。



左：样品冷冻过程图 绘图 / Tianyi 右：瑞士科学家雅克·杜本内



亨德森和同事奈吉尔·昂温 (Nigel Unwin) 开发了一种新的样品制备方法, 为了避免低温下水结晶对蛋白质结构的损伤, 他们将视紫红质放入葡萄糖溶液中, 随后用尽可能低的电子强度照射样品。亨德森首先获得视紫红质的二维结构, 随后通过多角度照射而获得多方向的二维结构, 借鉴克卢格的经验, 使用复杂数学模型最终获得三维结构, 是一种典型的七跨膜结构。视紫红质是第一个被解析结构的膜蛋白, 考虑到细胞膜蛋白在细胞各种生理功能中的重要性, 这一发现的科学价值显而易见。遗憾的是分辨率不高, 与传统的X射线晶体衍射技术无法比拟。此外, 用葡萄糖溶液代替水溶液的方法不具有普适性, 因此这种方法需要完善和发展。

样品冷冻技术

电子显微镜对样品的要求极高, 一方面要保证电子穿透, 另一方面还要避免电子束对样本结构的损害。1974年, 加州大学伯克利分校科学家罗伯特·格莱泽 (Robert Glaeser) 和同事发现, 当将样品冷冻到液氮温度后可极大降低致密电子束对样品的损害, 意味着可进一步提升电子强度从而增加分辨率。遗憾的是格莱泽当时设想的方法较为繁琐, 并且效果有限, 因此并未得到广泛应用。然而, 这一想法为样品制备提供了方向。

瑞士科学家雅克·杜本内 (Jacques

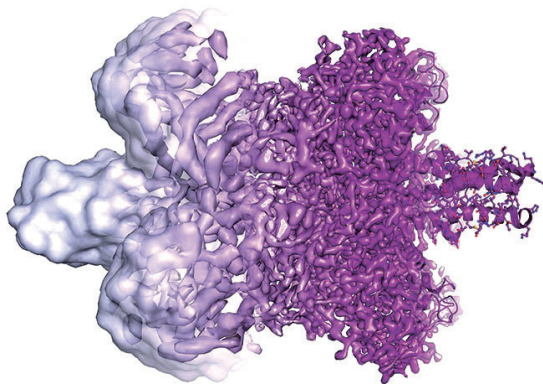
Dubochet) 在20世纪70年代末准备解决这一难题, 如何避免冰晶形成是一大重要挑战。1982年, 杜本内和同事发现当用乙烷代替液氮可使水在快速低温后形成玻璃样结构而非晶体, 这一发现说明作为纯净物的水也可形成非晶体结构。当杜本内投稿后, 许多同行都对此持怀疑态度, 最终只能在一个小杂志发表。

然而, 杜本内对自己的发现坚信不疑, 随后将这一方法应用于电子显微镜样品的制备。首先将样品样本溶入水中, 随后将溶液置于细金属网表面形成薄膜, 与乙烷混合后放于液氮中快速冷冻, 最终形成超薄玻璃样结构的样品。1984年, 杜本内使用这种方法获得了病毒的清晰结构。杜本内的方法极大简化了电子显微镜样品的制备, 提升了分辨效率, 目前仍是样品制备的标准方法。亨德森采用这种策略于1990年获得视紫红质的高清晰结构, 达到可与X-射线晶体衍射媲美的程度。

图像分析技术

电子显微镜应用还面临的一大难题是如何从对比度差、背景噪音多的信息中提取有用信息。20世纪70年代中期, 美国哥伦比亚大学科学家乔基姆·弗兰克 (Joachim Frank) 开始决定迎接这一挑战。经过十余年探索, 弗兰克和同事最终开发了一套通用图像信息处理方法。

弗兰克基于数学方法而开发出计算机软件



左：左为2012年前的电镜图，右为2013年后的电镜图 右：美国哥伦比亚大学科学家乔基姆·弗兰克

系统，从而鉴定出图像中反复出现的信息，进一步将相似的信息综合后形成完整信息，最终获得均一化、清晰度高的图像。采用这种方法，弗兰克获得大量高分辨率的二维图像。弗兰克小组随后还进一步开发程序，将这些二维图像根据它们的关联性最终创建出三维立体结构，从而能够更好地理解生物大分子的作用机制。弗兰克开发的电子显微镜图像分析技术目前仍在广泛应用，成为该领域的常规技术。弗兰克也积极采用电子显微镜技术研究蛋白质结构，特别是核糖体结构，并取得一系列重大突破。

电子检测设备

亨德森在电子显微镜领域的持续改进、杜本内的样品冷冻技术和弗兰克的信息分析方法为电子显微镜研究奠定了坚实基础，然而在2012年之前其获得图像的分辨率依然无法媲美主流的X射线衍射技术。

传统电子检测方法是首先将电子信号转化为光信号，利用电荷耦合元件 (charge-coupled device, CCD) 进行检测，2013年改用直接电子检测器 (Direct Electron Detector, DED) 后极大提升了分辨率，从而达到真正意义上的原子分辨率，从传统被讥笑的“轮廓图”演变为清晰的“原子图”。

这一系列进展极大地推动了电子显微镜的普及和应用，自2014年以来出现了井喷式发展。

由于它在样品制备方面的简易性，许多传统方法难以解析的重要生物大分子结构也被冷冻电子显微镜轻而易举地搞定，如寨卡病毒被快速破解三维结构为疫苗开发提供巨大便利。因此，电子显微镜在结构生物学领域的广泛应用一方面为理解诸多生命奥秘提供了详尽的资料，另一方面也为药物的研发和改进指明了方向。冷冻电镜是近几年生命科学领域热点之一，也被看作2017年科学领域的重大突破，而三位做出奠基性贡献的科学家亨德森、杜本内和弗兰克则因此分享了2017年的诺贝尔化学奖。

工欲善其事，必先利其器。电子显微镜的发明、改进和完善无疑为生命科学研究提供一个强有力的利器，从早期普通电镜帮助细胞生物学进入亚细胞阶段，到今天改进的冷冻电镜为革新结构生物学研究，都做出了卓越贡献。在科技变化日新月异的今天，科学发展依然依赖于技术的进步，因此加大全新技术的发明和传统技术的改进具有重要意义。

作者简介

郭晓强，北京大学深圳医院博士后，副教授。主要研究代谢异常、组蛋白修饰调控与肾癌发生，此外还从事生命科学史、肿瘤学科普和医学伦理学等研究。贝志健康公众号负责人，担任中国细胞生物学会科普分会委员。

(责编 桑新华)