

УДК 537.533.35

## О КОНТРАСТИРОВАНИИ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПОЛИМЕРОВ

*Е. М. Белавцева и К. З. Гумаргалиева*

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	712
II. Контраст в электронном микроскопе и способы повышения контраста	713
III. Структурные исследования полимеров с применением методик контрастирования. Влияние контрастирующих материалов	722

### I. ВВЕДЕНИЕ

Практика последних лет показала, что свойства высокомолекулярных материалов фундаментальным образом зависят от их надмолекулярного строения. Поэтому интересными являются сведения о форме и размерах областей агрегирования молекулярных цепей в пачечные образования различных типов. Исследования этих особенностей структуры полимерных материалов возможны, главным образом, методом электронной микроскопии.

За последнее десятилетие этим методом получено значительное число экспериментальных данных, проливших свет на корреляцию свойств и структуры полимеров. Это позволяет сознательно подойти к улучшению технологических процессов, однако проблему нельзя считать исчерпанной. До сих пор не ясен вопрос о сопряжении аморфных и кристаллических областей в полимерах. Не прослежен еще механизм различных превращений в полимерных материалах: рекристаллизационных процессов, полиморфных переходов и т. д. Успехи в раскрытии этих неясных мест науки о полимерах главным образом зависят от достижений электронной микроскопии высокого разрешения.

В настоящее время имеются электронные микроскопы с разрешением 4,5 Å. На этих микроскопах удастся также получать снимки решеток кристаллических объектов с межплоскостным расстоянием ~2 Å. Однако высокое разрешение электронного микроскопа не всегда может быть реализовано вследствие недостаточного контраста изображения.

В электронном микроскопе контраст изображения возникает главным образом в результате рассеяния электронов на атомах объекта. Поэтому на контраст\* электронномикроскопического изображения влияют такие свойства самого объекта, как плотность, толщина, атомный номер. При фиксированных параметрах электронного микроскопа (апертурный угол объективной линзы, ускоряющее напряжение) контраст изображения растет пропорционально этим характеристикам объекта.

Органические вещества находятся в неблагоприятных условиях с точки зрения требований контраста, так как их молекулы построены главным образом из легких атомов, а плотность объектов колеблется в интервале 1—2 г/см<sup>3</sup>.

\* Имеется в виду амплитудный контраст изображения.

Для повышения контраста электронномикроскопического изображения объектов органической химии используются различные методики контрастирования, основанные на обработке объекта веществами, содержащими тяжелые атомы с большой рассеивающей способностью. Наибольшее развитие эти методики получили при исследовании биологических объектов. В электронной микроскопии синтетических полимеров методики контрастирования недостаточно хорошо разработаны и используются в слабой степени.

Поэтому в данной статье мы попытались дать краткое описание методик контрастирования, используемых в настоящее время как для синтетических полимеров, так и для биологических объектов. Далее приводится обзор работ по исследованию морфологической структуры полимеров с использованием обработки контрастирующими материалами.

Поскольку контрастирующие материалы могут не только выявлять структуру, но и изменять ее, обсуждается вопрос о влиянии контрастирующих материалов на структуру объекта, исследуемого в электронном микроскопе. Предварительно дается краткая характеристика зависимости контраста изображения от параметров электронного микроскопа и от свойств исследуемых объектов.

## II. Контраст в электронном микроскопе и способы повышения контраста

В электронном микроскопе контраст может быть разделен на амплитудный и фазовый в зависимости от механизма формирования изображения<sup>1-3</sup>. При обычной работе электронного микроскопа без специальных приспособлений фазовый контраст возникает вследствие сдвига фаз по следующим причинам: 1) дефокусировка, 2) сферическая абберация. Кроме того, при изучении кристаллических объектов в результате сдвига фаз может иметь место дифракционный контраст, обусловленный упорядоченным расположением атомов<sup>4-10</sup>.

Несмотря на то, что фазовые сдвиги позволяют в какой-то степени повысить контраст, они затрудняют работу при количественной оценке контраста изображения ввиду своей неоднозначности.

В настоящее время наиболее важную роль в электронной микроскопии играет амплитудный контраст; благодаря ему получают основную информацию о морфологической структуре объекта. Амплитудный контраст в электронном микроскопе возникает главным образом в результате рассеяния электронов на атомах объекта. Поглощение электронов играет очень незначительную роль и практически не учитывается<sup>11-15</sup>.

Электроны, рассеянные на углы, большие апертурного, поглощаются диафрагмой объектива и не принимают участия в формировании изображения. В формировании изображения участвуют лишь электроны, прошедшие через объект без рассеяния и рассеянные на малые углы. В результате этого интенсивность электронного пучка после прохождения через объект уменьшается. Интенсивность на изображении объекта\* может быть записана в следующем виде:

$$I = I_0 e^{-\frac{N_A}{A} \sigma_a \gamma x}, \quad (1)$$

где  $N_A$  — число Авогадро,  $A$  — атомный вес,  $\gamma$  — удельный вес объекта,  $x$  — толщина,  $I_0$  — интенсивность падающего пучка,  $\sigma_a$  — эффективное сечение атома. Контраст электронномикроскопического изображения  $K$  определяется

\* Рассматривается случай аморфного вещества.

соотношением интенсивностей электронного пучка  $I_1$  и  $I_2$ , прошедших через соседние участки:

$$K = \frac{I_1 - I_2}{I_1} = 1 - \frac{I_2}{I_1}. \quad (2)$$

Подставляя (1) в (2), получим выражение контраста  $K$  через характеристики объекта в следующем виде:

$$K \approx N_A \left( \frac{\sigma_{a_2}}{A_2} \gamma_2 x_2 - \frac{\sigma_{a_1}}{A_1} \gamma_1 x_1 \right). \quad (3)$$

Это уравнение показывает, что контраст изображения возникает за счет различия в 1) рассеивающей способности атомов объекта; 2) толщине объекта; 3) плотности объекта.

Характеристикой рассеивающей способности атома служит эффективное сечение рассеяния атома  $\sigma$ . В электронной микроскопии представляет интерес эффективное сечение  $\sigma_a$ , которое определяет вероятность рассеяния электронов на атоме на углы, большие апертурного угла  $\alpha_0^{13,16-19}$ . Это вызвано тем, что изображение формируется лишь теми электронами, которые рассеялись в пределе апертурного угла объективной линзы  $\alpha_0$ .

$\sigma_a$  является функцией атомного номера  $Z$ , апертурного угла  $\alpha$  и ускоряющего напряжения  $U$ . Поскольку  $\sigma_a$  входит в уравнение, определяющее контраст, и зависит, помимо  $\gamma x$ , от  $Z$ ,  $\alpha$ ,  $U$ , т. е. как от условий наблюдения в электронном микроскопе, так и от атомного номера исследуемого объекта.

Следует отметить, что в уравнение контраста входит суммарное сечение  $\sigma_a = \sigma_{ea} + \sigma_{ua}$ , которое является суммой эффективных сечений упруго рассеянных электронов  $\sigma_{ea}$  и неупруго рассеянных электронов  $\sigma_{ua}^{20,21,22}$ .

### 1. Зависимость контраста от ускоряющего напряжения

В электронном микроскопе общей закономерностью является уменьшение контраста изображения с увеличением ускоряющего напряжения.

В работах <sup>23,24</sup> указывается, что контраст можно считать обратно пропорциональным ускоряющему напряжению или прямо пропорциональным квадрату длины волны  $\lambda$ , поскольку

$$\lambda = \frac{12,225}{\sqrt{U}} \text{ \AA}.$$

Однако линейная зависимость контраста от ускоряющего напряжения является лишь частным случаем и реализуется лишь при определенных условиях наблюдения объекта. В более общем случае контраст имеет степенную зависимость от  $U$ , и, следовательно, от  $\lambda^{2,24}$ . Эффективное сечение рассеяния, характеризующее контраст, выражается в следующем виде:  $\sigma_a = A(\lambda^2)^l$ , где  $A$  — коэффициент,  $l$  — показатель, зависящий от аппаратуры,  $\lambda$  — длина волны.

Следовательно, для повышения контраста целесообразно уменьшать ускоряющее напряжение. Этот вопрос обсуждается в ряде работ. Так, Валентайн указывает, что на микроскопах с ускоряющим напряжением 5—6 kV контраст возрастает в 10 раз по сравнению с микроскопами на 50—60 kV <sup>25</sup>.

В настоящее время уже разработаны низковольтные электронные микроскопы. В работе Никсона сообщается, что при использовании ускоряющего напряжения 6 kV удается сильно повысить контраст изображения <sup>26</sup>. Однако сильный выигрыш в контрасте на низковольтных мик-

роскопах достаточно хорошо не реализуется при регистрации изображения на обычных фотоматериалах. Это объясняется тем, что электроны с энергией 6 кэВ не проникают в глубь эмульсии, что приводит к снижению контраста на фотопластинке.

Не исключено, что применение электрофотографии в низковольтной электронной микроскопии позволит реализовать ее возможности более полно. Первые работы в этой области электрофотографии пучков электронов средних энергий показали, что чувствительность этого метода не уступает обычному методу регистрации электронномикроскопического изображения<sup>27,28</sup>. Тем не менее уже в настоящее время низковольтные микроскопы позволяют получить выигрыш в контрасте, который можно достичь, используя различные приспособления к электронному микроскопу. В частности, усилитель яркости позволяет не только расширить диапазон интенсивностей облучения объекта, но и повлиять на контраст изображения. Возможно, что существующие методы повышения контраста в электрофотографии могут быть использованы и в электронной микроскопии с применением специальных фоторегистрирующих материалов.

При исследовании органических объектов с помощью низковольтного электронного микроскопа следует также учитывать, что с уменьшением ускоряющего напряжения увеличивается термическое и радиационное действие электронного пучка<sup>29-34</sup>. Поэтому считают, что для органических веществ наиболее целесообразно использовать микроскопы с ускоряющим напряжением 30—40, 30—60 кВ<sup>23, 35</sup>.

## 2. Зависимость контраста от апертурного угла объективной линзы

Общей закономерностью в этом случае является увеличение контраста с уменьшением апертурного угла объективной линзы. На ход зависимости контраста от  $\alpha_0$  сильно влияет атомный номер исследуемого объекта  $Z$ <sup>36, 37, 38</sup>. В частности, в этих работах отмечается, что при малых  $Z$  имеет место быстрый спад эффективного сечения рассеяния  $\sigma_a$  и, следовательно, контраста от апертурного угла  $\alpha_0$ . Для больших  $Z$  наблюдается более медленный спад  $\sigma_a$  от  $\alpha_0$ .

Для тонких слоев в интервале апертурных углов  $3 \cdot 10^{-4} < \alpha_0 < 1,7 \cdot 10^{-2}$  относительное изменение контраста выражается в следующем виде:

$$\frac{K(\alpha)}{K(0)} = \frac{n_e}{n_e + n_u} \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\alpha_0^2}{\chi_0} \right)} + \frac{n_u}{n_e} \left( 0,89 - 0,5 \ln \frac{\alpha_0}{3 \cdot 10^{-4}} \right) \right],$$

где  $K(0)$  — оптимальный контраст, который имеет место при  $\alpha_0 > 0$ ;  $n_e$  и  $n_u$  — число упругих и неупругих соударений электронов с атомами объекта.

$$\chi_0 = 0,84 Z^{1/3} \frac{\sqrt{1 - \beta^2}}{\beta} \cdot 10^{-2}.$$

На рис. 1 представлена зависимость относительного контраста  $\frac{K(\alpha)}{K(0)}$  изображения тонких угольных пленок ( $Z=6$ ) от апертуры объектива  $\alpha_0$  для двух значений ускоряющего напряжения  $U=40$  кВ,  $U=100$  кВ<sup>17</sup>.

Как известно, апертура объектива  $\alpha_0$  определяется диаметром апертурной диафрагмы объективной линзы, фокусным расстоянием объектива, а также постоянной сферической аберрации. В работе Валентайна указывается, что при изменении диаметра диафрагмы с 50 до 10  $\mu$  кон-

траст удваивается. Однако при сильном уменьшении отверстия диафрагмы она быстро загрязняется и появляется астигматизм. Поэтому автор рекомендует использовать диафрагму с отверстием  $25 \mu^{23}$ .

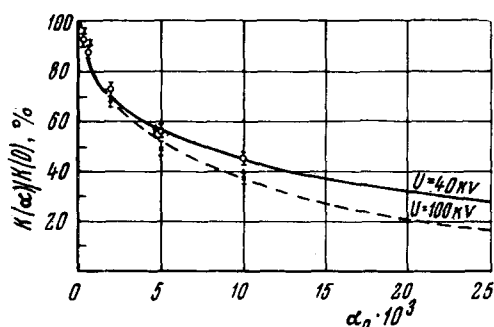


Рис. 1. Зависимость относительного контраста  $K(\alpha)/K(0)$  изображения тонких угольных пленок от апертуры объектива  $\alpha_0$  для двух значений ускоряющего напряжения<sup>17</sup>

В работе Лейзеганга сравниваются результаты по повышению контраста в зависимости от изменения ускоряющего напряжения и апертуры объектива<sup>17</sup>. Автор считает, что для повышения контраста выгоднее снижать ускоряющее напряжение, чем апертурный угол (для одного и того же объекта им показано, что одинаковый контраст получается при: 1)  $U = 100 \text{ kV}$ ,  $\alpha_0 = 3 \cdot 10^{-4}$  и 2)  $U = 40 \text{ kV}$ ,  $\alpha_0 = 10^{-2}$ ). Однако в первом случае наблюдается более сильная потеря в разрешении электронного микроскопа, чем во втором.

Таким образом, контраст изображения в сильной степени зависит от условий наблюдения объекта. Для получения наиболее полной информации о структуре объекта с помощью электронного микроскопа целесообразно исследовать его в оптимальных условиях.

В работе Пилянкевича приводится номограмма, которая позволяет выбрать оптимальные условия исследования<sup>42</sup>.

### 3. Зависимость контраста от атомного номера

Общей закономерностью является увеличение контраста с увеличением атомного номера  $Z$ <sup>39-42</sup>.

Зависимость эффективного сечения рассеяния  $\sigma_a$  от  $Z$  может быть представлена в следующем виде:

$$\sigma_a = AZ^k, \quad (5)$$

где  $A$ ,  $k$  — постоянные, зависящие от  $\alpha_0$  и  $U$ . При увеличении апертурного угла  $\alpha$  зависимость  $\sigma$  от  $Z$  приближается к квадратичной<sup>3</sup>. Линейная зависимость  $\sigma$  от  $Z$  является частным случаем и выполняется лишь при определенных значениях параметров микроскопа<sup>17</sup>.

Кроме того, имеет место периодический характер зависимости эффективного сечения рассеяния от атомного номера  $Z$ , которая уменьшается с ростом апертурного угла объектива<sup>16, 17</sup>. На рис. 2 представлена периодическая зависимость  $\sigma$  от  $Z$ , приведенная в работе Пелянкевича<sup>13</sup>.

Поэтому при определении контраста необходимо учитывать не только атомный номер  $Z$ , но и положение этого элемента на периодической кривой зави-

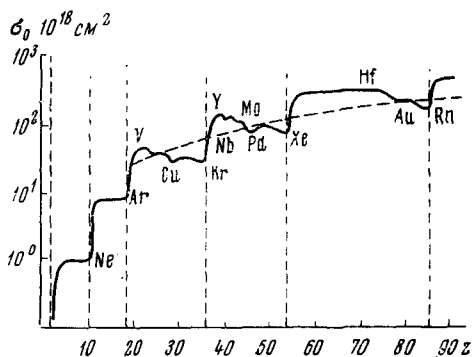


Рис. 2. Зависимость эффективного сечения рассеяния  $\sigma_0$  от атомного номера элемента<sup>13</sup>  $Z$

симости  $\sigma_a$  от  $Z$ . Из рис. 2 следует, что наибольший контраст будут иметь такие вещества, как иридий, осмий, рений, платина, вольфрам, золото, тантал, хром, уран, палладий, т. е. те элементы, у которых эффективное сечение рассеяния находится на пиках кривой.

Для обеспечения одинакового контраста, учитывая атомный номер, необходимо брать разное количество вещества. Например, одинаковый контраст достигается, если толщина слоя хрома составляет 50—70 Å, золота 8—10 Å, а платины и палладия 3—7 Å<sup>18</sup>.

#### 4. Зависимость контраста от плотности и толщины объекта

Если объект состоит из атомов, обладающих одинаковой рассеивающей способностью, то контраст изображения может возникать лишь за счет различия в массовой толщине (произведении толщины на плотность) двух соседних участков<sup>43—48</sup>:

$$K = \frac{N_a \sigma_a}{A} (\gamma_2 x_2 - \gamma_1 x_1).$$

Молекулы большинства синтетических полимеров и биологических объектов состоят главным образом из легких атомов. Поскольку атомы N, C, O обладают почти одинаковой рассеивающей способностью, контраст изображения органических объектов обуславливается разницей либо в толщине, либо в плотности исследуемого объекта.

Какова должна быть разница в толщине или плотности органического объекта, чтобы обеспечить на изображении минимальный контраст, надежно регистрируемый фотоматериалами? (Минимальный контраст фотоматериалов  $K_{\min} = 0,1$ ). Валентайн и Хорн считают, что когда произведение толщины объекта в Å на его плотность в г/см<sup>3</sup> больше 400, то этот объект будет виден вполне отчетливо, хотя для первого обнаружения объекта на снимке достаточно, чтобы это произведение было больше 100<sup>49</sup>. В этой работе авторы показывают, что фотопластинка не регистрирует разницы в контрасте для двух материалов с плотностями 1,05 г/см и 1,5 г/см<sup>3</sup>, т. е. разница в плотностях в 30% недостаточна для обеспечения заметного контраста на изображении.

Поскольку синтетические полимеры и биологические объекты, как правило, имеют значительно меньшую разницу в плотности различных участков объектов, на контраст изображения прежде всего влияет толщина объекта.

Вопрос о минимальной толщине органического объекта, надежно регистрируемой фотографическим методом, обсуждается в ряде работ<sup>46, 47, 50</sup>. В этих работах указано, что для надежной регистрации органического объекта на фотопластинке необходимо, чтобы его толщина превышала 50 Å. В отдельных случаях называют цифру 100 Å. Эти данные относятся к электронным микроскопам со средними энергиями электронов.

В работе Пилянкевича и Стояновой<sup>24</sup> исследовалась зависимость величины минимальной толщины  $\Delta d$ , обеспечивающей минимальный контраст от ускоряющего напряжения электронного микроскопа. Ими показано, что при  $U = 50$  kV минимальная толщина составляет  $\Delta d = 50$  Å (при  $\rho = 1$  г/см<sup>3</sup>), а при 200 kV  $\Delta d$  достигает 500 Å. Это означает, что чем выше ускоряющее напряжение, тем большую толщину должны иметь органические объекты для их обнаружения в электронном микроскопе. Однако эти данные относятся к режимам работы электронного микроскопа, обычно используемым в практике при условии формирования изображения в светлом поле. Для темнопольного изображения зависимость контраста

от  $\gamma_x$  носит другой характер. В работе Пилянкевича и Стояновой приводится эта зависимость. Оказывается, что темное поле позволяет повысить контраст по сравнению со светлопольным методом либо для очень тонких, либо для толстых образцов<sup>51-54</sup>.

Таким образом, при исследовании органических объектов контраст накладывает сильные ограничения на возможности электронных микроскопов. Незначительные изменения в плотности синтетических полимеров и биологических объектов не улавливаются электронным микроскопом. Поэтому контраст органических объектов отображает, главным образом, лишь изменения в толщине исследуемого материала.

$$K = \frac{N_A \sigma_a}{A_T} (x_2 - x_1).$$

Следовательно, наиболее доступными для электронномикроскопического исследования являются такие объекты, препараты которых представляют собой мелкодисперсные частицы с толщиной более 50 Å при условии наблюдения органического объекта без контрастирования.

При исследовании ультратонких срезов, имеющих одинаковую толщину, контраст изображения в различных участках срезов синтетических полимеров и биологических объектов практически одинаков и не позволяет получить информацию о морфологической структуре этих объектов без специальной их обработки. Лишь в отдельных случаях удается наблюдать разницу в контрасте срезов благодаря незначительным изменениям в толщине среза, возникшим по той или иной причине в результате специфики методики препарирования (например, отмывка от заливочного материала и др.).

Подобные трудности, связанные с недостаточным контрастом, возникают не только при использовании методики ультратонких срезов, но и других методик препарирования органических объектов.

Для повышения контраста изображения органических объектов применяют различные способы обработки объекта веществами, содержащими тяжелые атомы с большой рассеивающей способностью. Наиболее старым и хорошо разработанным способом повышения контраста является метод оттенения, который сводится к нанесению на объект тонкого слоя металла, испаренного в вакууме под малым углом к объекту. Метод оттенения появился одним из первых среди методик повышения контраста, используемых в настоящее время. Впервые он был предложен Вильямсом и Уайковым в 1944 году<sup>55</sup> и сейчас достаточно часто применяется в практике электронной микроскопии. Однако этот метод позволяет лишь выявить форму объекта и отобразить структуру его поверхности. Кроме того, при работе с высоким разрешением проявляется собственная структура напыленного слоя. Размер зерна испаренного материала колеблется в зависимости от металла, выбранного для этой цели, и метода оттенения. В настоящее время имеется обширная литература, посвященная как самой методике оттенения, так и применению этой методики к органическим объектам, в том числе к биологическим и синтетическим полимерам. Подробно этот метод изложен в книгах, посвященных электронной микроскопии<sup>56,57</sup>.

Главное направление методических работ — это поиски материала и способов оттенения, позволяющих уменьшить размер зерна при сохранении высокого контраста. Для ряда материалов в методике оттенения электронномикроскопических объектов показана зависимость величины зерна от испаряемого вещества<sup>58,59</sup>. Авторами указывается, что платина позволяет получить наименьший размер зерна — до 15 Å. Размеры

зерна можно также уменьшить, если, например, применять специальные капилляры, через которые можно пропускать испаренный металл на объект<sup>60</sup>. Среди этих работ заслуживает внимание работа Гальянова, который предложил способ оттенения с помощью распыления металла в газовом разряде, позволяющем существенно уменьшить размеры зерна<sup>61</sup>. Оттенение используется также и при исследовании объекта методом реплик. Метод реплик обычно применяют при исследовании толстых образцов, непрозрачных для электронов. В качестве материала для реплик наиболее часто используются кварц, углерод. Оба материала обладают слабой рассеивающей способностью. Поэтому для повышения контраста реплики дополнительно оттеняются металлами. В этом методе качество реплик определяется главным образом их разрешением. Бредли указывает, что реплики высокого разрешения можно получить при одновременном испарении углерода и платины<sup>62</sup>. Марихиным были получены хорошие результаты при одновременном испарении кварца и платины<sup>63</sup>. Подробно метод реплик описан как в специальных статьях, так и в книгах, посвященных электронной микроскопии.

Однако в настоящей статье эти работы подробно не рассматриваются, поскольку мы касаемся лишь вопросов контрастирования при прямом методе исследования, т. е. при исследовании самого объекта, а не его отпечатка.

Кроме того, в настоящей статье уделяется внимание прежде всего тем методам контрастирования, которые сводятся к пропитке исследуемого объекта веществами, содержащими тяжелые атомы с большой рассеивающей способностью. Эти методики получили наибольшее развитие при исследовании биологических объектов и позволили получить более значительные сведения об их морфологической структуре, чем метод оттенения. При исследовании синтетических полимеров методики контрастирования, основанные на пропитке контрастирующими веществами, менее развиты и слабо используются. Поэтому в этой статье наибольшее внимание уделяется этим методикам. Кратко указываются способы контрастирования, нашедшие применение лишь к биологическим объектам.

Методики контрастирования, основанные на пропитке объекта веществами, содержащими тяжелые атомы, первоначально получили название электронного окрашивания или просто «окрашивания», по-видимому, по аналогии со световой микроскопией.

В настоящее время термин «окрашивание» чаще применяется в зарубежной литературе, контрастирование — в отечественной.

При исследовании органических объектов в электронном микроскопе известны следующие методики контрастирования или окрашивания: 1) позитивное контрастирование; 2) негативное контрастирование; 3) иммунохимическое контрастирование; 4) метод автордиографии; 5) метод выявления упорядоченных областей; 6) метод восстановления ионов серебра и 7) декорирование.

*Позитивное контрастирование или позитивное окрашивание* появилось одним из первых среди различных способов контрастирования объектов<sup>64, 65</sup>. Первоначально оно называлось просто окрашивание, но с появлением нового метода контрастирования, получившего название «негативное контрастирование», стало называться позитивным контрастированием или окрашиванием. Этот метод основан на пропитке объекта солями тяжелых металлов и применяется к биологическим объектам. Контраст многокомпонентных структур создается за счет различного количества металла, проникшего избирательно в элементы структуры объекта. Например, осмий хорошо контрастирует липоидные структуры, уранил-ацетат — нуклеиновые кислоты.



*Метод негативного контрастирования* (negative staining<sup>69</sup>) появился лишь в конце пятидесятих годов и очень быстро завоевал популярность<sup>66-70</sup>. Этот метод использует принцип окружения или «заливки» (embedding)<sup>62</sup> изучаемых частиц внутри материала, сильно рассеивающего электроны, в результате чего получается контраст, обратный тому, который имеет место при позитивном окрашивании. Метод негативного контрастирования применяется как к синтетическим полимерам, так и к биополимерам.

*Метод иммунохимического контрастирования* (immunochemical staining) применяется исключительно к биологическим объектам<sup>71</sup>. Этот метод основан на связывании антител с антигенами. Антигены, например вирусные антигены, становятся видимыми в электронном микроскопе благодаря тому, что специфические антитела к вирусным частицам предварительно химически связываются с протеинами, содержащими тяжелые атомы. Таким протеином часто служит ферритин, содержащий атом железа. При связывании антител с антигенами контраст последних увеличивается, что позволяет установить их местоположение в клетке. Чувствительность этого метода очень высока.

*Метод автордиографии* основан на обработке объекта радиоактивными веществами, откладывающимися в определенных местах изучаемого объекта<sup>72, 73</sup>. Затем на ультратонкий срез этого объекта наносится фоточувствительный слой, аналогичный фотографической эмульсии, который содержит атомы серебра. После экспозиции и обработки объекта по методу фотографического проявления частицы серебра откладываются на участках клеточных элементов, где находятся радиоактивные вещества. Контраст определенных клеточных структур повышается, и они становятся видимыми в электронном микроскопе. Этот метод также применяется к биологическим объектам.

*Метод выявления упорядоченных областей* применяется к ориентировочным синтетическим волокнам. Этот метод заключается в пропитке объекта солями тяжелых металлов, которые, концентрируясь в неупорядоченных участках волокон<sup>74, 75</sup>. Предварительно объект обрабатывается реагентами, разрыхляющими аморфные неупорядоченные участки, благодаря чему облегчается проникновение контрастирующего вещества, которое не затрагивает упорядоченных областей.

*Метод контрастирования путем восстановления ионов серебра* появился совсем недавно. Этот метод использован и изучен пока лишь на примере привитых полимеров, гуанина, полиакриловой кислоты<sup>76</sup> и ДНК. Сущность этого метода сводится к тому, что после обработки объекта солями тяжелых металлов (например, серебро) на активных группах полимерной цепи происходит выделение кристаллического серебра, которое напоминает выделение кристаллического серебра в процессе физического проявления. Благодаря тому, что зародыши кристалликов имеют размеры  $\sim 50$  Å, появляется возможность увидеть в электронном микроскопе местоположение определенных групп полимера, в которых произошло замещение иона водорода на ион серебра, хотя сам атом серебра не обеспечивает минимальный контраст и, следовательно, неразличим.

*Метод декорирования* хорошо разработан для неограниченных кристаллов и позволяет выявить неоднородности поверхности кристаллических объектов<sup>99, 100</sup>. Метод сравнительно прост и заключается в том, что на поверхность исследуемого объекта в определенных условиях испаряется в высоком вакууме металл (например, золото), частицы которого «отмечают» неоднородности поверхности. Однако при изучении органических объектов этот метод практически не применялся. Лишь в последнее время появилось предварительное сообщение Бассета, Блинделла и

Келлера о работе, в которой сделана попытка выявить неоднородности складчатой структуры поверхности монокристаллов полиэтилена, выращенного из раствора.

Из всех вышеописанных методик в электронной микроскопии биологических объектов и синтетических полимеров наибольшее внимание в последние годы уделяется методу негативного контрастирования. В настоящее время имеется большое количество работ, в особенности в области биологии, с применением этой методики. Ряд авторов изучал эту методику и вопросы ее дальнейшей разработки. Интересны работы Валентайна и Хорна<sup>49</sup>, Бредли<sup>77</sup>, посвященные изучению метода негативного контрастирования, материалов, используемых для этого метода, а также вопросу разрешения, обеспечиваемого этим методом.

По вопросу разрешения метода негативного контрастирования имеются в литературе различные мнения. Бреннер и Хорн считают, что разрешение метода негативного контрастирования составляет 15 Å<sup>69</sup>. Бредли указывает, что по последним данным микрофотографии показывают разрешение 30 Å и лишь в особых случаях удается получить 15 Å<sup>77</sup>. Валентайн и Хорн<sup>49</sup> называют цифры 20—30 Å. В книге Кея<sup>57</sup> указано, что детали менее 20 Å не могут быть надежно изучены методом негативного контрастирования.

В ряде работ делается попытка выяснить сам процесс негативного контрастирования; однако ясного представления о механизме взаимодействия контрастирующего агента и объекта пока еще нет. Интересны работы, сделанные в этом направлении Бреннером, Валентайном; Хорном, Холлом, Бредли<sup>43, 49, 50, 69</sup>. В работе Мюллера и Мейерхофа<sup>78</sup> описан «аномальный» контраст, наблюдаемый при негативном контрастировании объектов. Авторы заметили, что кристаллики MgO, нанесенные на слой фосфорно-вольфрамовой кислоты, на изображении выглядят более светлыми, чем слой контрастирующего материала. Такой необычный эффект они объяснили влиянием зарядов самого объекта. Позже Липперт исследовал это явление более подробно с измерением количества рассеянных электронов от объекта и фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) при негативном контрастировании<sup>79</sup>. Его опыты опровергают предположение Мюллера и Мейерхофа. Липперт считает, что «аномальный» контраст объясняется не зарядами объекта, а взаимным расположением объекта и ФВК. Кристаллик MgO при нанесении на слой ФВК втягивается в него, вследствие чего он рассеивает меньше электронов, чем окружающий его слой ФВК. Следовательно, «аномальный» контраст отсутствует, так как количество рассеянных электронов на изображении находится в соответствии с массовой толщиной объекта.

При исследовании органических объектов в электронном микроскопе также необходимо учитывать явления, приводящие к снижению контраста образца. В частности, серьезным препятствием при исследовании малоконтрастных образцов является загрязнение образца, которое возникает вследствие осаждения на объект паров углеводородов из колонны микроскопа, приводящее к образованию на нем тонкой пленки под действием электронного пучка. Этому вопросу посвящено большое количество работ<sup>80—84</sup>. В настоящей статье мы не обсуждаем работы, касающиеся загрязнения объекта под пучком, поскольку они требуют специального рассмотрения. В современных моделях микроскопов уже созданы специальные устройства, которые позволяют в сильной степени замедлить процесс загрязнения образца, благодаря чему легко избежать этого нежелательного явления.

Таким образом, повышение контраста изображения органического объекта может быть достигнуто либо за счет возможностей самого элект-

ронного микроскопа, либо с помощью обработки объекта веществами с большой рассеивающей способностью. Поскольку в практике электронной микроскопии используются оптимальные условия работы микроскопов, которые проводятся, как правило, при фиксированных параметрах прибора, то в литературе основное внимание уделяется вопросам контрастирования при исследовании синтетических и биологических полимеров.

Работы по исследованию биологических объектов и синтетических полимеров с применением контрастирования показывают, что основной интерес сосредоточен на возможностях выявления тонкой структуры образцов. В меньшей степени отражается вопрос о влиянии на объект контрастирующего агента, в особенности при исследовании биополимеров. Однако в ряде работ обсуждается взаимодействие контрастирующего материала и объекта. Поэтому в настоящей статье подробно рассматриваются не только структурные данные по полимерам, исследуемым с помощью электронного микроскопа, но и влияние контрастирующего вещества на изучаемые объекты.

### III. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМЕРОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДИК КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ВЛИЯНИЕ КОНТРАСТИРУЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ

*Синтетические полимеры.* Первые работы по электронномикроскопическому исследованию синтетических волокон с применением контрастирования объекта принадлежат Гессу и его сотрудникам<sup>74, 75, 85-89</sup>, которые попытались наблюдать большие периоды с помощью электронного микроскопа. Большие периоды были ранее обнаружены у большинства волокон синтетических полимеров методом малоугловой рентгеновской дифракции. Поскольку величины большого периода, равные 70—200 Å, не соответствовали длинам каких-либо химических группировок полимеров, было высказано предположение о наличии в них сверхрешетки, появляющейся в результате периодического чередования упорядоченных и неупорядоченных участков в полимере. Сумма длин этих участков принималась за величину большого периода. Большой период был обнаружен у волокон полиэтилена, поливинилового спирта и у полиамидных волокон<sup>89, 90</sup>. Поэтому эти объекты явились предметом исследования в электронном микроскопе с целью выявления большого периода непосредственно на электронномикроскопическом снимке.

Как известно, разница в плотности аморфных и кристаллических областей полимеров составляет в большинстве случаев не более 10%, что недостаточно для обеспечения минимального контраста на электронномикроскопическом изображении при работе со средними энергиями электронов, т. е. в обычных условиях исследования. Поэтому при электронномикроскопическом исследовании полимеров для повышения контраста объекты обрабатывали веществами, содержащими тяжелые атомы с большой рассеивающей способностью.

Основная идея контрастирования в этих работах сводилась к различной способности аморфных и кристаллических областей полимеров сорбировать вещества, содержащие тяжелые атомы, что должно привести к росту контраста отдельных участков образца.

При электронномикроскопическом исследовании волокон поливинилового спирта, объекты, пропитанные в формалине, обрабатывались иодом<sup>74</sup>. На снимках были обнаружены большие периоды величиной 150 Å. Наряду с ними наблюдались также сверхпериоды величиной

700 Å. Рентгеновские исследования этих волокон показали периодичность, равную 160 Å; сверхпериод 700 Å на рентгенограмме не был обнаружен.

При исследовании волокон капрона Гессом и сотр. в качестве контрастирующего материала была выбрана фосфорно-вольфрамовая кислота<sup>87</sup>. Объекты при этом предварительно обрабатывали раствором HCl, что способствовало разрыхлению волокна и облегчало проникновение контрастирующего вещества внутрь объекта. Авторы сравнивали условия сорбции ФВК в синтетических полимерах и коллагеновых волокнах. В коллагеновых волокнах выявление тонкой структуры происходило благодаря тому, что функциональная группа белковой молекулы связывалась с ФВК, которая не удалялась при отмывании. В волокне капрона ФВК сорбировалась при определенных условиях — после набухания в 9–10%-ном растворе HCl.

Авторы также изучали влияние HCl на величину большого периода капрона. Ими было показано, что в результате подобной обработки волокна сокращаются по длине до 30% от первоначальной длины. У набухших волокон увеличивалась интенсивность рентгеновских рефлексов, большой период возрастал от 70 до 100 Å. После предварительной обработки раствором HCl высушенные и отмытые волокна обрабатывали в 2%-ном растворе ФВК в течение 48 часов, при этом происходила сорбция ФВК — проникновение контрастирующего агента внутрь волокна. Количество поглощенного ФВК зависело от концентрации HCl, т. е. от степени набухания волокна.

Рентгенографические исследования контрастированных волокон в больших углах показали, что ФВК поглощалась только неупорядоченными областями волокон, при этом не затрагивались кристаллиты; рефлексы также усиливались, что связано, очевидно, с уменьшением дефектных мест в кристаллической решетке и увеличением степени упорядоченности. Из малоугловых рентгеновских исследований обработанных волокон видно, что интенсивность меридианальных рефлексов увеличивалась в зависимости от концентрации HCl. С увеличением поглощения ФВК появились новые рефлексы, соответствующие 40–45 Å, 20–25 Å (при 9% поглощенного ФВК период 70–90 Å, при 18% ФВК 40–50 Å).

Электронномикроскопические картины диспергированных волокон после обработки HCl и ФВК показали, что волокно состоит из тонких фибрилл шириной 50–100 Å (рис. 3). Вдоль фибрилл видны периоды величиной 70–90 Å (чередование светлых и темных полос). Авторы отмечают, что периодичность вдоль волокна появлялась только после обработки волокон HCl. Величина большого периода из рентгенограмм совпадает с величиной большого периода из электронномикроскопических снимков.

Сравнивая результаты электронной микроскопии синтетических и природных волокон, Гесс предположил, что капрон является более близкой моделью к белковым волокнам, чем поливиниловый спирт и целлюлоза. Это вызвано присутствием в нем ε-аминокапроновой кислоты, которая может связываться с контрастирующим материалом — ФВК, что приводит к выявлению ее при электронномикроскопических исследованиях подобно коллагенам.

В 1958 г. в электронной микроскопии появился новый метод контрастирования, названный методом негативного контрастирования, который нашел широкое применение при исследовании биологических объектов. Этот метод был применен авторами данной статьи при исследовании синтетических полимеров<sup>91–93</sup>. В отличие от работ Гесса препараты обрабатывались не ФВК, а калиевой солью ФВК по методике, предло-

женной Бреннером и Хорном<sup>69</sup> для биологических объектов. Синтетические волокна предварительно ничем не обрабатывались. Констатировались как диспергированные, так и ультратонкие срезы волокон капрона, лавсана, полиэтилена.

Авторы предварительно исследовали влияние ФВК и калиевой соли ФВК на структуру ряда синтетических волокон. Влияние контрастирующего вещества определяли по результатам рентгеновской дифракции в больших и малых углах, а также по данным электронной микроскопии и взвешивания. Обычные рентгенограммы в больших углах показали, что структура и ориентация кристаллитов в волокнах, обработанных ФВК и калиевой солью ФВК, остается неизменной во всех случаях. Некоторые

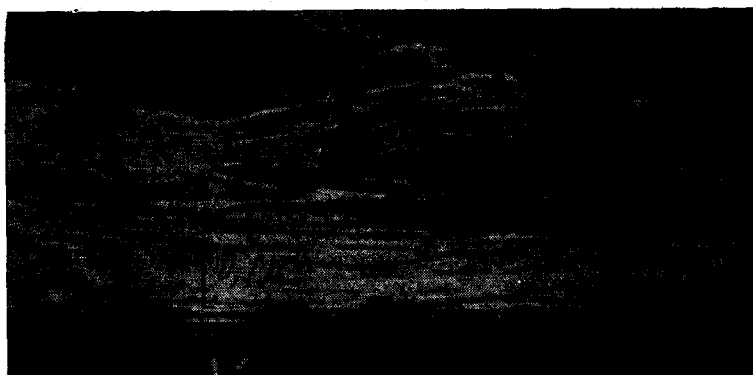


Рис. 3. Волокно капрон, контрастированное ФВК<sup>87</sup>

изменения наблюдаются в малоугловой дифракции. Из кривых распределения интенсивности, полученных на ионизационной установке, для обработанных и необработанных волокон капрона были рассчитаны величина большого периода, размеры кристаллитов и аморфных областей<sup>94</sup>. Большой период при обработке 2 и 20% ФВК увеличивался от 92 до 99 Å, при этом увеличение шло в основном за счет увеличения величины кристаллитов. Рентгенограмма волокна в больших углах, обработанного 20% раствором ФВК, не менялась. Взвешивание волокон после обработки 20% ФВК показало привес не более 5% за счет поглощения ФВК во время длительной обработки.

Электронномикроскопические микрофотографии показали, что обработанные ФВК и неотмытые волокна вбирали в себя большое количество ФВК, что приводило только к увеличению общего контраста, причем элементы структуры были неразличимы.

Элементы тонкой структуры волокон обнаруживались лишь при обработке диспергированных волокон калиевой солью ФВК. На микрофотографии волокна полиэтилена (рис. 4), обработанного данным способом, видна система параллельных фибрилл, наблюдаемая, по-видимому, вследствие проникновения соли ФВК в межфибриллярные промежутки. Ширина фибрилл являлась величиной постоянной для разных волокон и составляла 70—80 Å. Подобная же фибриллярная картина наблюдалась для среза волокна лавсан, обработанного калиевой солью ФВК. Следует отметить, что фибриллярная картина продольного среза дает представление о структуре компактного материала целого волокна, не

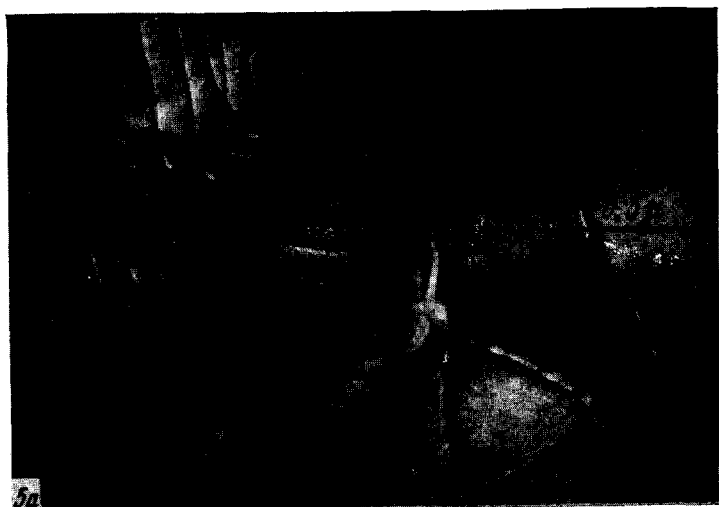
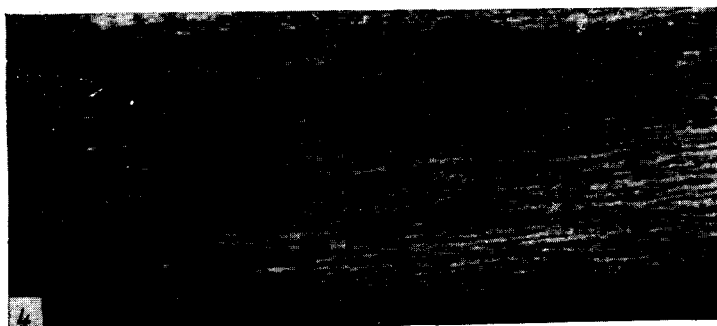


Рис. 4. Диспергированное волокно полиэтилена, контрастированное калиевой солью ФВК<sup>94</sup>

Рис. 5. Негативно контрастированные препараты полиэфира<sup>93</sup>: а — монокристаллы, б — сферолит

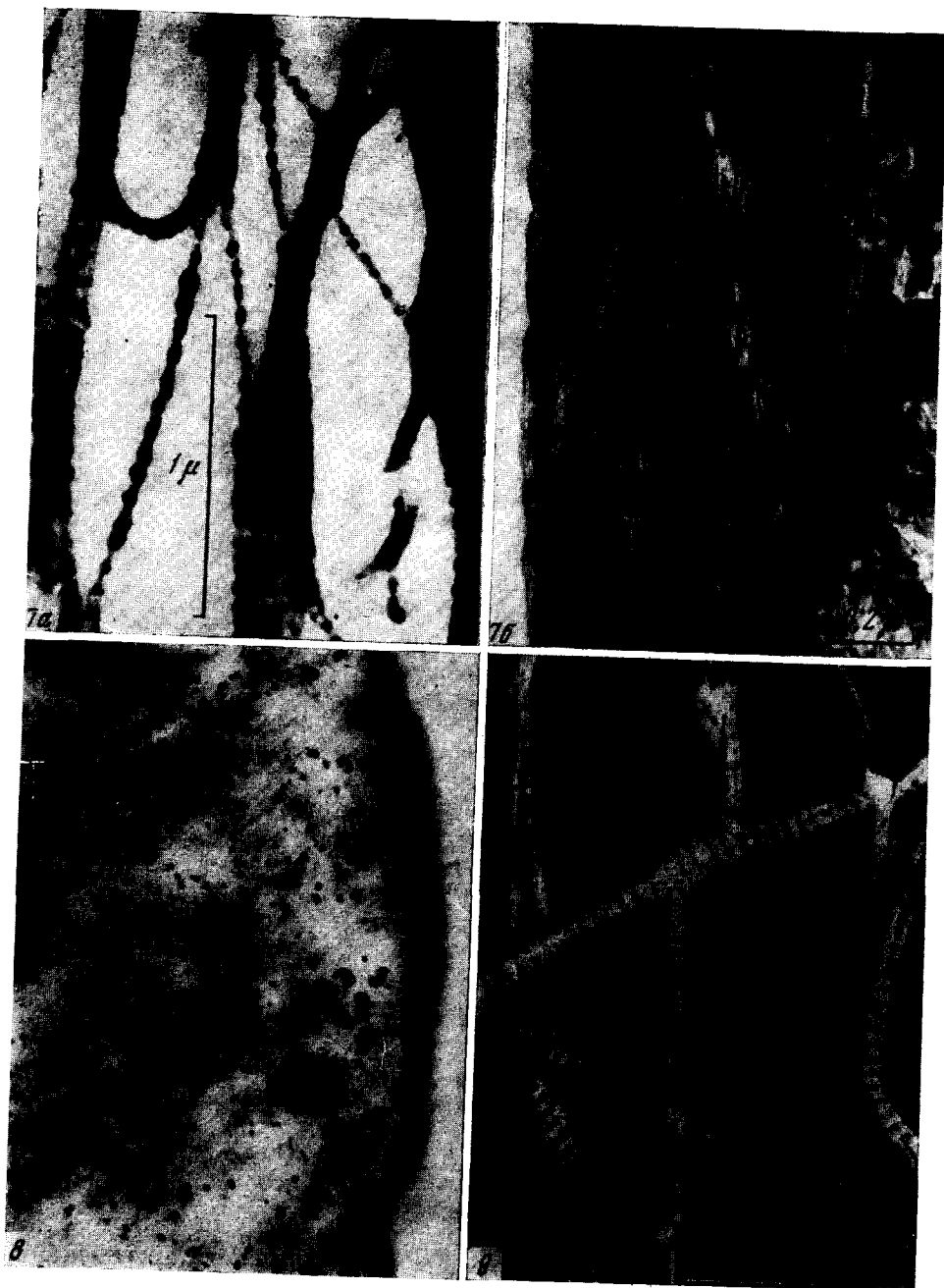


Рис. 7. Диспергированные волокна целлюлозы: а — контрастирование иодом <sup>74</sup>,  
 б — негативное контрастирование калиевой солью ФВК <sup>113</sup>

Рис. 8. Ультратонкий срез целлюлозы, обработанной гидрозолью серебра <sup>118</sup>

Рис. 9. Коллаген, обработанный ФВК <sup>124</sup>

расщепленного ультразвуком. Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что калиевая соль ФВК не влияет на величину большого периода, не затрагивает кристаллиты, а проникает лишь в межфибриллярные промежутки и аморфные участки в очень незначительных количествах. Однако эти количества ФВК достаточны для выявления тонкой структуры полимеров на электронномикроскопических снимках. В работе отмечается, что ФВК, в отличие от калиевой соли ФВК, меняет величину большого периода, хотя и незначительно. Кроме того, ФВК пропитывает волокно интенсивно, что приводит к сильному росту контраста, при этом тонкая структура затемняется.

Поэтому для выявления большого периода у синтетических полимеров авторы использовали в качестве контрастирующего материала калиевую соль ФВК. Однако при этом возникали трудности, вызванные тем, что аморфные участки сорбируют незначительное количество контрастирующего материала, который не всегда обеспечивал минимальный контраст на электронномикроскопическом изображении. Поэтому авторам удалось наблюдать большие периоды не на всех участках препарата, а на тех, где калиевой соли ФВК было достаточно много, но не настолько, чтобы затемнить структуру. На снимках был обнаружен большой период у следующих диспергированных синтетических волокон: капрона, лавсана, полиэтилена, отожженного полиэтилена. Результаты электронной микроскопии хорошо согласовывались с результатами рентгеновской съемки. ФВК оказалась очень хорошим контрастирующим агентом и для монокристаллов полиэфиров. В работе<sup>93</sup> приводятся результаты по контрастированию полиэфирных монокристаллов и сферолитов. Последние четко обнаруживают фибриллярную структуру при контрастировании ФВК (рис. 5, а, б).

ФВК в качестве контрастирующего материала также была использована в работе Слит<sup>95</sup> для контрастирования тонких пленок из нейлона, состоящих из сферолитных структур с выраженными при контрастировании темными и светлыми полосами, причем ширина этих полос была равна величине большого периода исследуемого полимера.

В электронной микроскопии биологических объектов часто используется контрастирующее вещество — осмиевая кислота ( $\text{OsO}_4$ ), поскольку она обладает как фиксирующими, так и контрастирующими свойствами. В этой связи представляет интерес работа Марихина и сотр.<sup>96</sup>, где методом рентгеновской малоугловой дифракции изучалось влияние  $\text{OsO}_4$  на контрастированные полимеры. Авторы показали, что интенсивность малоугловых рефлексов изменяется немонотонно с увеличением концентрации сорбентов (иод и  $\text{OsO}_4$ ). Из дифракционных картин рентгеновых лучей под большими углами следует, что эти сорбенты сосредоточиваются в аморфных областях полимеров.

При исследовании в электронном микроскопе многокомпонентных полимерных систем возникают трудности по выявлению на снимке каждой компоненты в отдельности вследствие того, что полимеры состоят из легких атомов, обладающих практически одинаковой рассеивающей способностью. Особенно большие затруднения из-за недостаточности контраста встречаются при работе с ультратонкими срезами многокомпонентных структур, таких, например, как привитые полимеры. Для распознавания различных сортов полимеров в привитом волокне был предложен способ контрастирования, который авторами данной статьи назван контрастированием путем восстановления ионов серебра<sup>76, 97, 98</sup>.

Возможности контрастирования полимеров были показаны авторами на примере волокон капрона, модифицированных полиакриловой кисло-



той. Эти волокна обрабатывали растворами солей тяжелых металлов. В результате обработки волокон (кипячение в течение 3 часов в насыщенных растворах  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{HgNO}_3$ ) происходило частичное замещение ионов карбоксильных групп ионами тяжелых металлов. Это позволяет проследить месторасположение привитого материала вследствие сильного рассеяния электронов атомами Ag и Hg. Электронная микрофотография поперечного среза волокна капрона представлена на рис. 6. На

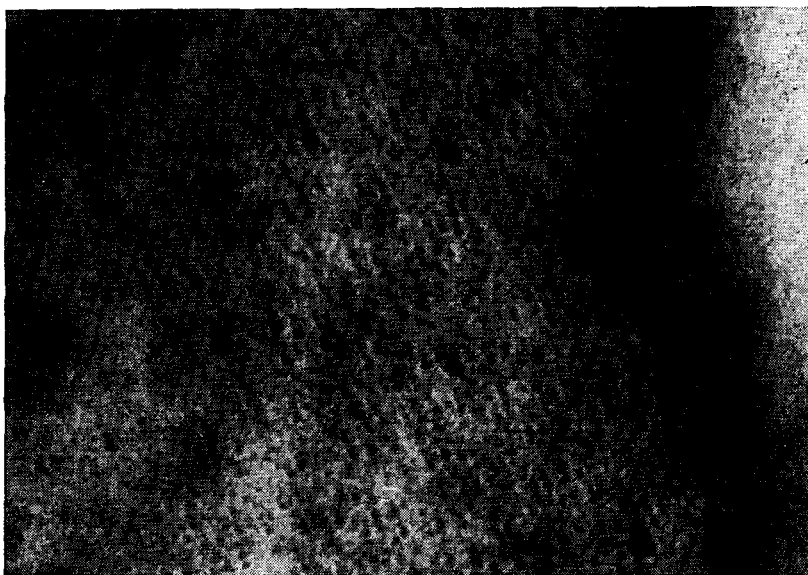


Рис. 6. Поперечный срез волокна капрон, обработанный  $\text{AgNO}_3^{98}$

микрофотографии видны контрастные частицы размерами 50—70 Å. Число контрастных частиц коррелирует с процентным содержанием привитого материала, убывая по мере проникновения прививаемого полимера в глубь основного полимера. У полипропиленового волокна с 5%-ным содержанием привитого материала число частиц весьма мало. Как показали исследования этих частиц в темном поле, они являлись кристаллическими<sup>98</sup>. Авторы показали, что выделение кристаллического серебра на активных группах полимерной цепи напоминает процесс выделения кристаллического серебра в процессе физического проявления. Очевидно, первоначальные зародыши кристалликов серебра появлялись на местах нахождения полиакриловой кислоты, что давало возможность видеть на электронномикроскопическом снимке местоположение привитых молекул полимера. Из работы следует, что механизм данного способа контрастирования аналогичен механизму окислительно-восстановительных реакций.

Таким образом, контрастирование ультратонких срезов позволяет выявить морфологическую структуру объекта, что не представляется возможным без дополнительной обработки образца. Однако в отдельных случаях удается наблюдать фибриллярную структуру среза волокон без контрастирования за счет разницы в толщине отдельных участков объекта, которые могут наблюдаться как следствие специфики препарирования<sup>101</sup>.

### Целлюлоза

Ранние работы по электронномикроскопическому исследованию целлюлозы относятся к сороковым годам, когда методика препарирования и контрастирования не была еще хорошо разработана. Приготовление объектов осуществляли путем грубого механического измельчения<sup>102, 103</sup>, что затрудняло получение хороших препаратов, прозрачных для электронного пучка. Образцы ничем не контрастировались, контраст изображения определялся разницей в толщине объекта. Низкий уровень препаративной техники позволял получать по данным электронной микроскопии лишь незначительную информацию о структуре целлюлозы. Первые работы по электронной микроскопии целлюлозы, выполненные Руска<sup>102</sup>, позволили автору наблюдать на срезах волокна два слоя: один компактный внешний слой, состоящий из фибрилл, другой — пористый внутренний. В последующих работах авторы пытались определить структурные единицы, на которые распадаются волокна при измельчении<sup>103</sup>. Часто в этих работах наряду с электронной микроскопией применяли рентгеновскую съемку<sup>104, 105</sup>, а иногда метод дифракции электронов<sup>106–108</sup>. Все исследования целлюлозы в электронном микроскопе, независимо от метода приготовления объекта, позволяют обнаружить прежде всего фибриллярные структуры. Ширина микрофибрилл, определенная из электронномикроскопических картин, во всех случаях колеблется от 60 до 200 Å, в зависимости от объекта и метода препарирования. Нити целлюлозы в 60 Å были названы мицеллярными<sup>109</sup>. С появлением метода оттенения объекта путем испарения в вакууме тяжелых металлов появилось большое количество работ по электронномикроскопическому исследованию целлюлозы. В этих работах более четко выявляется фибриллярная структура волокон<sup>75, 110</sup>. Рентгенографические исследования позволили построить модель целлюлозного волокна.

Модель, предложенная Гессом и Киссигом, предполагает в волокне чередование упорядоченных и аморфных областей. Наличие микрофибрилл в целлюлозе, обнаруженное электронной микроскопией, не было увязано с этой моделью. Поэтому задачей электронномикроскопического исследования явилось выяснение структуры микрофибрилл — первой структурной единицы целлюлозных волокон.

При изучении структуры отдельной микрофибриллы толщиной 60—20 Å сразу же возникали методические трудности, обусловленные контрастом. Поскольку толщина микрофибриллы целлюлозы имеет величину, находящуюся на пределе требования минимального контраста, начались поиски путей повышения контраста объекта. Оттенение не могло решить эту проблему, так как оно позволяет выявлять лишь форму объекта и рельеф поверхности, затемняя его внутреннюю структуру. Кроме того, размер зерна оттеняющего материала колеблется от 15 до 50 Å, что также затрудняет выявление мелких деталей объекта. Первые работы, посвященные изучению целлюлозы в электронном микроскопе с применением контрастирования, принадлежат Гессу и его сотрудникам<sup>74, 111, 112</sup>. Его работы по поливиниловому спирту позволяли выявить возможность пропитки иодом ориентированных полимеров. Обработка иодом была применена Гессом также и для целлюлозы. Вытянутые целлюлозные волокна обрабатывали раствором иодистого калия. Затем обработанные волокна диспергировали и просматривали в электронном микроскопе. Идея этого метода контрастирования заключалась в неравномерном поглощении контрастирующего агента различными участками волокна. Контрастирование осуществляли с помощью пропитки объекта

иодом и таллием. Прежде всего была изучена возможность применения этого метода к целлюлозным волокнам, т. е. условия сорбции иода. Иод сорбировался волокном в количестве 12% от веса исходного волокна. При таком количестве поглощения рентгенограмма иодированного волокна имела неизменную дифракционную картину целлюлозы. Авторы установили, что при контрастировании атомами таллия поглощение не должно быть выше 6—8% от веса волокна для того, чтобы не разрушить структуру. Таким образом, в работах Гесса, посвященных изучению структуры целлюлозы, обработанной иодом, ставится одновременно вопрос и о влиянии контрастирующего материала на исследуемый объект.

На электронномикроскопических картинах волокон целлюлозы, обработанных вышеуказанным способом, вдоль микрофибрилл видны отчетливо чередующиеся темные и светлые поперечные полосы, периодичность повторения которых составляет 60—200 Å (малые периоды) и 500—800 Å (большие периоды) (рис. 7а). Авторы изучали различные сорта целлюлозы (рами, фортизан); для всех целлюлозных волокон наблюдались идентичные картины. Во всех случаях сорбцию иода производили таким образом, чтобы иод не затрагивал упорядоченные области. Это контролировали по дифракции рентгеновских лучей в больших углах.

На основании электронномикроскопических и рентгенографических данных Гесс предложил схему элементарной микрофибриллы целлюлозы. Этими работами было показано периодическое чередование упорядоченных и неупорядоченных областей вдоль микрофибриллы целлюлозы, а также существование четких границ между ними, причем упорядоченные и неупорядоченные участки у всех фибрилл располагались на одном уровне. Толщина микрофибриллы составляла 200—300 Å, а ширина мицеллярных нитей (тончайшая фибрилла) — 60 Å. Последняя величина соответствовала диаметру тончайшей микрофибриллы, наблюдаемой при ультразвуковом диспергировании волокон.

Фибриллярность целлюлозы четко выявляется на электронномикроскопических снимках при обработке препарата калиевой солью фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). Изучению структуры целлюлозы, обработанной ФВК и калиевой солью ФВК, посвящена работа Белавцевой и Цванкина<sup>113</sup>. В этой работе наряду с электронномикроскопическим методом применяли рентгеновскую съемку в больших и малых углах. Большое внимание в работе уделено изучению вопроса о влиянии ФВК и соли ФВК на структуру целлюлозы. Электронномикроскопические исследования диспергированных волокон целлюлозы позволили авторам установить, что при обработке препаратов 2%-ным раствором ФВК сильно повышается контраст волокна, однако отдельные микрофибриллы не удается различить. Обработка образца калиевой солью ФВК по методике негативного контрастирования позволяла увидеть отдельные микрофибриллы шириной 70 Å, длиной от 500 до 2000 Å (рис. 7б). На снимке между фибриллами видны темные участки, что соответствует калиевой соли ФВК, которая располагается в виде цепочки, состоящей из глобул. Ширина и длина цепочки контрастирующего материала имели те же размеры, что и микрофибриллы.

Результаты рентгеновской съемки позволили объяснить различие в электронномикроскопических картинах, наблюдаемых при обработке образца ФВК и калиевой солью ФВК, а также выяснить влияние этих веществ на структуру целлюлозы.

Рентгенограмма образцов в больших углах при обработке калиевой солью ФВК не менялась, а для образца, обработанного самой ФВК, на рентгенограмме появлялся сильный фон газового типа. Положение

рефлексов и текстура оставались без изменения. Эти факты говорят о том, что молекулы ФВК проникали в поры, а не в упорядоченные области.

Как ранее было установлено, малоугловое рассеяние у необработанных волокон целлюлозы получается в результате дифракции на удлиненных порах, вытянутых вдоль оси текстуры<sup>114</sup>. Длина этих пор значительно больше их поперечника, поэтому рассеяние сосредоточивается на экваторе рентгенограммы. При обработке ФВК и калиевой солью ФВК происходило изменение картины малоугловой дифракции. Для волокон, обработанных ФВК, появляется сильное экваториальное рассеяние. При обработке калиевой солью ФВК наблюдается почти изотропное рассеяние. Вычислено, что сильное рассеяние на малоугловой рентгенограмме после обработки ФВК появляется за счет дифракции на частицах со средними поперечными размерами от 30 до 50 Å, которые располагаются в виде вытянутых цилиндров длиной 400 Å, т. е. ФВК в этом случае находится в порах в виде цилиндров. Из результатов малоугловой дифракции от волокон, обработанных калиевой солью ФВК, следовало, что ФВК в волокне располагается в виде глобул, которые имеют форму эллипсоидов с размерами осей, равными 60 и 80 Å. Итак, если в исходном волокне малоугловое рассеяние происходило за счет разности плотностей волокна и пор, которые незначительны, то при обработке ФВК поры его заполнялись ФВК, поэтому получалось столь сильное рассеяние. Авторы показали, что при обработке образцов ФВК, в отличие от калиевой соли ФВК, контрастирующее вещество — ФВК — впитывается в большом количестве. Это вытекало из электронномикроскопических и рентгеновских данных и результатов взвешивания. Большое количество ФВК, заполнившее поры волокна, и приводило к сильному повышению контраста электронномикроскопического изображения волокна, что не давало возможности выявить микрофибриллы, обладающие значительно меньшей рассеивающей способностью, чем контрастирующий материал. Следовательно, ФВК «прокрашивало» все волокно, не выявляя его тонкой структуры. Результаты электронной микроскопии и рентгеновские данные показывают, что после отмывания волокна дистиллированной водой восстанавливается картина исходного волокна до обработки. Лишь в отдельных случаях кристаллики ФВК застревают в порах, несмотря на отмывку образца, что хорошо обнаруживается на электронномикроскопических картинах, полученных в темном поле.

В последние годы при изучении целлюлозных волокон наряду с диспергированием стали применять метод ультратонких срезов. В этих работах контраст изображения срезов осуществлялся за счет разницы в толщине отдельных участков объекта, что иногда позволяло выявлять фибриллярность волокон<sup>115–117</sup>. По контрастированию ультратонких срезов целлюлозы имеется незначительное число работ. В работе<sup>117</sup> автор применял метод обработки волокон целлюлозы растворами  $\text{OsO}_4$  и  $\text{AgNO}_3$  и показал, что темные частицы на срезах волокон целлюлозы располагаются во вторичной стенке волокна.

В работе Саляева<sup>118</sup> изучались срезы корней растения, обработанных гидрозоллями Ag и Pt. На электронномикроскопической картине срезов корней хорошо видны в толще клеточной стенки частички серебра, заполнившие субмикроскопические промежутки, тем самым контрастируя межфибриллярные промежутки клеточных стенок (рис. 8).

В данной статье мы рассматривали только работы, связанные с контрастированием целлюлозы, и не касались вопросов строения, а также других электронномикроскопических исследований. В частности, эти сведения можно найти в монографии, посвященной электронной микроскопии целлюлозы и в ряде других работ<sup>119</sup>.

### Коллаген

Периодическая исчерченность волокна, подобная целлюлозе и синтетическим волокнам, наблюдалась и у ряда биополимеров, например, у коллагена. В настоящей статье уделяется внимание, главным образом, синтетическим полимерам; поэтому мы кратко остановимся лишь на работах по коллагену, для которого данные электронной микроскопии хорошо согласуются с результатами рентгеновской съемки, а картины электронной микроскопии имеют большое сходство с картинами ориентированных синтетических полимеров.

Первые работы рентгеновских исследований коллагеновых волокон<sup>122, 123</sup> показали наличие периодичности величиной 830, 432, 838 Å. В этих работах также уделялось внимание вопросу о влиянии переосаждения на кристаллическую структуру волокон<sup>121</sup>. Бир<sup>122</sup> обнаружил на малоугловой рентгенограмме высушенной на воздухе коллагеновой ткани период 640 Å. При исследовании этих тканей после механического диспергирования в электронном микроскопе без всякого дополнительного контрастирования на микрофотографиях была обнаружена поперечная периодическая исчерченность, равная 500—900 Å. Очевидно, контраст достигался в результате разницы толщин отдельных участков волокон. У коллагеновых волокон хорошо выявляется периодическая исчерченность также после оттенения, что не удавалось наблюдать у оттененных металлом синтетических волокон.

Дифракция рентгеновских лучей показала, что величину периода, равную 640 Å, имеют все коллагеновые волокна, независимо от их природы.

Применение контрастирования к волокнам коллагена позволило увидеть на электронномикроскопической картине периодическую исчерченность более четко. Кроме того, контрастирование позволило обнаружить в волокнах коллагена не только большие (рис. 9) периоды, но и подпериоды, находящиеся внутри большого периода. Как для синтетических и целлюлозных волокон в качестве контрастирующего материала для коллагеновых волокон использовались также часто OsO<sub>4</sub> и ФВК<sup>124, 125</sup>. В этих работах диспергированные коллагеновые волокна, обработанные OsO<sub>4</sub> или раствором 2% ФВК, обнаруживали на электронномикроскопических микрофотографиях густую сетку фибрилл с ясно выраженной полосатой исчерченностью. Период повторяемости равен примерно 700—1000 Å, большой период, в свою очередь, складывается из множества полосок, ширина которых равнялась 30 Å. Коллагеновые волокна очень хорошо «прокрашиваются» контрастирующими веществами, вплоть до выявления малых подпериодов, в отличие от синтетических волокон, где выявление большого периода представляет трудную задачу.

В работах<sup>126—129</sup> сделана попытка объяснить химическую природу действия ФВК на коллагеновые волокна. Авторы предположили, что ответственными за периодическую исчерченность волокон являются полипептидные цепи: ФВК связывается с аминокислотными остатками; в результате этого ФВК не удаляется при отмывании водой. В подтверждение этого предположения в работе приводятся результаты фотометрирования кривых почернения после контрастирования коллагеновых волокон хромом и ФВК, которые показали, что полоски-подпериоды имеют место только на картинах препаратов, обработанных ФВК, но не хромом. Авторы объяснили появление малых подпериодов для коллагеновых волокон наличием химического периода идентичности вдоль волокна, в частности регулярным чередованием атомов или групп, в то время как природа сверхпериодов оставалась для них неясной.

\*   \*  
\*   \*

Тенденция современной электронной микроскопии, направленная на количественные исследования, позволяет более полно использовать возможности электронномикроскопического метода. В частности, контраст изображения является одним из определяющих факторов в количественной электронной микроскопии. О возможности и перспективах этого направления свидетельствуют работы, представленные на симпозиуме «Количественные исследования в электронной микроскопии»<sup>130</sup>.

Поэтому в работах, появляющихся в последние годы, уделяют внимание вопросам контраста и контрастирования. Например, использование дифракционного метода позволило в ряде случаев решать морфологические и структурные задачи для кристаллических полимеров<sup>131</sup>.

Однако полимерные образцы, обладающие слабой рассеивающей способностью, требуют, как правило, дополнительной обработки с целью увеличения контраста. Обзор работ по применению контрастирования к синтетическим полимерам показывает, что этот вопрос в настоящее время еще недостаточно хорошо разработан. Для повышения контраста полимерного образца известны лишь следующие методики: отенение, метод выявления упорядоченных областей, негативное контрастирование, декорирование, контрастирование путем восстановления ионов серебра. Однако и эти методики, за исключением отенения, применяются к полимерам в слабой степени, в отличие от интенсивного использования разнообразных контрастирующих методик в биологии. По-видимому, такое состояние дела объясняется тем, что в настоящее время среди различных областей наук электронная микроскопия нашла наибольшее применение в биологии. Кроме того, специфика биологических объектов позволяет более полно использовать возможности контрастирования. Для синтетических полимеров контрастирование представляет определенные трудности, а выбор контрастирующего агента требует в большинстве случаев индивидуального подхода.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. F. Lenz, III Intern. Kongr. für Elektron Mikroskopie, B. 306, 1958.
2. F. Lenz, W. Scheffels, Naturforsch., **13a**, 226 (1958).
3. H. Boersch, Там же, **29**, 615 (1947).
4. A. Howie, M. I. Whelan, Proceed. Roy. Soc., **267A**, 206 (1962).
5. A. Keller, Polymer, **3**, 3 (1962).
6. N. Kato, J. Soc. Japan, **7**, 397 (1952).
7. H. Niehrs, Optik, **13**, 9 (1956).
8. L. T. Chadderton, Proc. of third European region. Confer. on Electron Microscopy, Prague, **1**, 183 (1964).
9. O. Rang, Optik, **10**, 90 (1953).
10. L. Reimer, Lab. Invest., Quantitative Electron Microscopy, **14**, 201 (1965).
11. W. Lippert, Optik, **11**, 412 (1954).
12. F. Lenz, Naturforsch., **9a**, 185 (1954).
13. А. Н. Пилянкевич, Радиотехника и электроника, **6**, 1374 (1961).
14. R. E. Burge, G. H. Smith, Proc. Phys. Soc., **79**, 673 (1962).
15. P. Sadhukhan, Indian J. Phys., **32**, 249 (1958).
16. А. Н. Пилянкевич, Кристаллогр., **6**, 341 (1961).
17. З. Лейзерганг, Электронная микроскопия, ИЛ, М., 1960.
18. А. Н. Пилянкевич, Практика электронной микроскопии, Машгиз, М., 1961.
19. V. K. Zworikin, Electron Optics and Electron Microscopy, N. Y., 1945.
20. L. Reimer, J. angew. Phys., **13**, 432 (1961).
21. U. E. Haine, Scient. Instrum., **34**, 9 (1957).
22. W. Lippert, IV Intern. Congr. on Elektron Mikroskopy, Berlin, 1958, стр. 288.
23. R. C. Valentine, Adv. in Virus Res., **8**, 287 (1961).
24. А. Н. Пилянкевич, И. Г. Стоянова, Биофизика, **8**, 1 (1961).
25. R. C. Valentine, Nature, **183**, 761 (1959).

26. W. C. Nixon, см.<sup>22</sup>, стр. 302.
27. Е. М. Белавцева, В. М. Фридкин, ДАН, **142**, 67 (1962).
28. Е. М. Belavtseva, V. M. Fridkin, см.<sup>8</sup>, стр. 133.
29. M. Ardenne, H. Friedrich-Frekka, Naturwiss., **29**, 523 (1941).
30. B. Borries, W. Glaser, Koll. Ztschr., **106**, 123 (1944).
31. W. Scheffels, B. Borries, Proc. Third Intern. Conf. on Electron Microscopy, London, 1954.
32. S. Leisegang, Там же.
33. W. Lippert, Optik, **15**, 293 (1958).
34. Е. М. Белавцева, Кристаллогр., **4**, 421 (1959).
35. И. Г. Стоянова, А. Н. Пилянкевич, ДАН, **141**, 973 (1961).
36. J. H. Coupland, Proc. Phys. Soc., **B 69**, 642 (1956).
37. Р. Хейденрайх, Основы просвечивающей электронной микроскопии, «Мир», 1966.
38. А. Н. Пилянкевич, ЖТФ, **30**, 226 (1960).
39. F. Lenz, см.<sup>22</sup>.
40. W. Lippert, Naturwiss., **48**, 475 (1961).
41. M. L. De, Naturwiss., **49**, 228 (1962).
42. А. Н. Пилянкевич, Кандид. диссерт., МЭИ, М., 1962.
43. C. E. Hall, J. Biophys., Biochem. Cytol., **1**, 1 (1955).
44. W. Lippert, Optik, **19**, 3, 145 (1962).
45. W. Lippert, W. Friess, V Internat. Congress Electron Microscopy, Philad., 1962.
46. B. Borries, Naturforsch., **4a**, 51 (1949).
47. N. R. Silvester, R. E. Burge, Nature, **188**, 641 (1960).
48. E. Zeitler, G. F. Bahr, Lab. Invest. Quantitative Electron Microscopy, **14**, 201 (1965).
49. R. C. Valentine, R. W. Horne, Symp. Int. Soc. Cell Biol., **1**, 263, N. Y. L., 1962.
50. R. C. Valentine, Adv. in Virus Res., **8**, 187 (1961).
51. Л. М. Биберман, Изв. АН СССР, сер. физ., **15**, 424 (1951).
52. И. Г. Стоянова, Биофизика, **1**, 362 (1956).
53. C. E. Hall, J. Appl. Phys., **19**, 198, 271 (1948).
54. И. Г. Стоянова, А. И. Фример, Зав. лаб., **18**, 1472 (1952).
55. R. Williams, R. Wickoff, J. Appl. Phys., **15**, 712 (1944); **17**, 23 (1946).
56. В. М. Лукьянович, Электронная микроскопия в физико-химических исследованиях, Изд-во АН СССР, М., 1960.
57. Д. Кей, Техника электронной микроскопии, «Мир», 1965.
58. S. W. Chatterjee, Naturwiss., **45**, 106 (1958).
59. U. K. Devinstein, J. Appl. Phys., **20**, 306 (1949).
60. T. Hibi, Там же, **23**, 957 (1952).
61. В. М. Галянов, сб. Исследования объектов, изменяющихся в процессе препарирования и наблюдения в электронном микроскопе, М., 1966, стр. 50, 81.
62. D. E. Bradley, Brit. J. Appl. Phys., **10**, 198 (1959).
63. В. А. Марихин, Зав. лаб., **29**, 973 (1963).
64. C. E. Hall, M. A. Jakus, F. O. Schmitt, J. Appl. Phys., **16**, 459 (1945).
65. M. L. Watson, J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 727 (1958).
66. H. Huxley, J. Mol. Biol., **2**, 10 (1960).
67. G. A. Anderson, Proceed. Europ. Reg. Confer. Electron Microscopy, Delft, **2**, 1008 (1960).
68. H. E. Huxley, Proceed. I Europ. Confer. Electron Microscopy, 1957.
69. S. Brenner, R. W. Horne, Biochem. Biophys. Acta, **34**, 103 (1959).
70. В. П. Гилев, Ж. общей биол., **25**, 101 (1964).
71. C. Morgan, Canadian Medical Association, **88**, 472 (1963).
72. E. D. Hay, J. P. Revel, Developmental Biology, **7**, 152 (1963); J. Cell. Biology, **16**, 29 (1963).
73. Б. В. Гушин, С. М. Клименко, Вопросы вирусологии, **1965**, 387.
74. K. Hess, H. Mahl, Naturwiss., **41**, 86 (1954).
75. K. Hess, S. Steinmann, H. Kiessig, Koll. Ztschr., **153**, 128 (1957).
76. Е. М. Белавцева, К. З. Гумаргалиева, Л. В. Возвышаева, Ю. Ш. Мошковский, см.<sup>61</sup>, стр. 87.
77. D. E. Bradley, J. Gener. Microbiology, **29**, 503 (1962).
78. G. Müller, K. Meyerhoff, Nature, **201**, 590 (1964).
79. W. Lippert, Naturwiss., **51**, 408 (1964).
80. Э. Руска, Радиотехника и электроника, **11**, 409 (1966).
81. J. Hillier, J. Appl. Phys., **19**, 226 (1948).
82. S. Leisegang, Handbuch der Physik, **33**, 396 (1956).
83. S. Leisegang, O. Schott, Proc. Conf. Electron Microscopy. Stockholm, 1956, стр. 20.

84. K. H. Mirgel, см.<sup>22</sup>, стр. 157.
85. K. Hess, E. Gütter, H. Mahl, Koll. Ztschr., **168**, 37 (1960).
86. K. Hess, H. Kiessig, Там же, **130**, 11 (1953).
87. K. Hess, E. Gütter, Naturwiss., **46**, 70 (1959).
88. К. Гесс, Химия и технол. полимеров, **1**, 5 (1960).
89. K. Hess, H. Kiessig, Naturwiss., **31**, 171 (1943).
90. L. M. Arnett, P. H. Meibohm, J. Polymer Sci., **5**, 737 (1950).
91. Е. М. Белавцева, К. З. Гумаргалиева, А. И. Китайгородский, ДАН, **151**, 1356 (1963).
92. Е. М. Белавцева, К. З. Гумаргалиева, Зав. лаб., **29**, 966 (1963).
93. Е. М. Белавцева, Высокомолекулярное соединение, **5**, 1 (1963).
94. Е. М. Белавцева, К. З. Гумаргалиева, см.<sup>61</sup>, стр. 67.
95. B. I. Spit, Electron Microscopy, **1**, N.-Y.—L., 1962.
96. В. А. Марихин, А. И. Слуцкер, А. А. Ястребинский, Физ. тела, **7**, 441 (1965).
97. Е. М. Belavtseva, K. Z. Gumargaliev, A. I. Kitaigorodsky, A. W. Vlasov, см.<sup>8</sup>, стр. 419.
98. Е. М. Белавцева, К. З. Гумаргалиева, А. И. Китайгородский, ДАН, **153**, 631 (1963).
99. G. A. Basset, Phil. Mag., **3**, 1042 (1958).
100. G. A. Basset, см.<sup>22</sup>, стр. 512.
101. К. Х. Разигов, Г. С. Маркова, В. А. Каргин, ДАН, **141**, 157 (1961).
102. H. Ruska, Koll. Ztschr., **92**, 276 (1940).
103. H. Mahl, Там же, **96**, 7 (1941).
104. W. Wergin, Там же, **98**, 131 (1942).
105. N. Wührmann, A. Heuberger, Experientia, **2**, 105 (1946).
106. А. Л. Зайдес, И. Г. Стоянова-Синицкая, ДАН, **80**, 213 (1951).
107. R. D. Preston, G. W. Ripley, Nature, **174**, 76 (1954).
108. G. Honjo, M. Watanabe, Nature, **181**, 326 (1958); J. Electronenmicroscopy, Japan, **5**, 59 (1957).
109. A. Frey-Wissling, Science, **119**, 80 (1954).
110. К. Гесс, К. Мааль, Г. Гюттер, Химия и технол. полимеров, **96** (1958).
111. K. Hess, Proceed. Stockholm Conference Electron Microscopy, 1956, стр. 294.
112. K. Hess, E. Gütter, H. Mahl, Koll. Ztschr., **158**, 115 (1958).
113. Е. М. Белавцева, Ю. М. Петров, Д. Я. Цванкин, Высокомолекулярное соединение, **6**, 684 (1964).
114. А. И. Китайгородский, Д. Я. Цванкин, Там же, **1**, 269 (1959).
115. Г. О. Багдыкьянц, Л. С. Крупышева, Зав. лаб., **28**, 1351 (1962).
116. K. Razikov, см.<sup>8</sup>, стр. 409.
117. C. Maertens, G. Raes, G. Vandermeersche, см.<sup>83</sup>.
118. Р. К. Салаяев, ДАН, **158**, 737 (1964).
119. Х. У. Усманов, Г. В. Никонович, Электронная микроскопия целлюлозы, Ташкент, 1962.
120. W. G. Ralph, G. Wyckoff, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **34**, 285 (1936).
121. C. E. Hall, A. Jakys, O. Schmitt, J. Am. Chem. Soc., **64**, 1234 (1942).
122. R. S. Bear, Там же, **64**, 727 (1942).
123. А. Л. Зайдес, Биофизика, **1**, 279 (1956).
124. W. Grassmann, H. Hoffmann, T. Nemetschek, Naturwiss., **39**, 215 (1952).
125. S. C. Walpers, Klin. Wschr., **22**, 624 (1943); Macrom. Chem., **2**, 37 (1948).
126. K. Kühn, H. Hoffmann, Naturforsch., **13b**, 154 (1958).
127. H. Hoffmann, W. Grassman, Там же, **10b**, 61 (1955).
128. K. Kühn, H. Hoffmann, W. Grassmann, Naturwiss., **45**, 520 (1958).
129. H. Kühn, W. Grassman, Naturwiss., **44**, 538 (1957).
130. Laboratory Investigation Quantative Electron Microscopy, **14**, p. II, 6, 1965.
131. D. N. Reneker, P. H. Geil, J. Appl. Phys., **31**, 1916 (1960).