

电子显微镜的诞生

曹 弥 白

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

Ernst Ruska, 电子显微镜的首创者, 1986年获得了诺贝尔物理学奖金, 得该项奖金的半数, 时年79岁。1931年他创建了第一台透射式电子显微镜, 在此后的半个多世纪中, 电子显微镜使人们的视野进入一个全新的境界。在金属、病毒、蛋白质和许多生物结构的测绘中发挥了极其重要的作用, 诺贝尔奖状誉之为“本世纪最主要发明之一”。从1931年到1986年经历了漫长的55年, 他的贡献终于

被公认而记入科学史册。

最近“超微结构和分子结构的研究杂志”以特邀稿件的形式发表了E. Ruska的文章^[1], 读后使人了解到, 电子显微镜从原理的研究到投入生产和使用, 其间还包含了未被世人所共知的错综复杂的情节。本文据此写成, 供读者参阅。

电子显微镜的优越性, 是由于通过迅速运动的电子的穿透使显微样品所成现的像具有比

简报

三例人骨髓瘤细胞株的建立

张和君 郭仁等

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明)

建立人骨髓瘤细胞株对于体液免疫发生机制、抗体的生物学特性研究和培育人-人杂交瘤等方面都有重要的意义。国内尚未见到建立人骨髓瘤细胞株的报告, 我们于1984年6月开始, 历时三年半, 共建立三例人骨髓瘤细胞株。现将有关资料重点报告如下。

一、三例人骨髓瘤细胞的生物学特性

人骨髓细胞株KM₁来自一男性病人, 临床诊断为多发性骨髓瘤, 分泌IgG球蛋白, 尿中有Bence Jones蛋白, 骨髓中有多数幼浆细胞和浆细胞, 共24%。标本采自骨髓, 在体外用RPMI₁₆₄₀完全培养液中经82天原代培养后传代成功。目前已传代288次。经8-氮杂鸟嘌呤耐药培养成次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转位酶(HGPRTase)缺损株, 在HAT选择培养液中于5-7天内即可完全被杀灭。该细胞株的染色体为43条, 属亚二倍体。与人扁桃体细胞和外周白细胞或人脾细胞的融合率为25%-80%。

另一株KM₂来自一广东籍女病人, 诊断为IgG分泌型多发性骨髓瘤。骨髓标本经原代培养92天后传代成功。经6-硫代鸟嘌呤耐药培养成为胸苷激酶(TK)缺损株, 染色体46条为整二倍体, 电镜见粗面内质网丰富, 高尔基体发达, 目前已传代110次。该细胞生长迅速、形态良好。

KM₃来自一男性多发性骨髓瘤病人, 伴发浆细胞性白血病, 患者血中IgG及IgM均升高, 以外周血原代培养230天后传代成功。该细胞株的特点是细胞全部是圆形或椭圆形, 较大, 为一般淋巴细胞的2-3倍。目前经6-硫代鸟嘌呤和乌本苷(Ouabain)耐药培养已成为胸苷激酶缺损株, 在HAT选择培养液中3-5天, 即全部死亡。造成双耐药株的目的是为了今后能采用EB病毒转化技术制备人-人杂交瘤^[1,2], 该细胞株染色体呈异倍体, 已传代86次, 生长十分活跃。

以上三例人骨髓瘤细胞株经检测均无支原体污染。

二、建立人骨髓瘤细胞株的经过

我们共采集15份标本, 其中骨髓液14份, 外周血1份, 在15份中总成功率为20%。1份外周血一经培养即获成功, 主要是该例伴发浆细胞性白血病。根据Kozbor, D.和J. C. Roder所综合的材料^[1], 10株人骨髓瘤细胞中外周血成功的达50%, 因此今后对有浆细胞性白血病例宜用外周血培养。

参 考 文 献

[1] D.Kozbor and J.C.Roder. 1983, *Immunology Today*, 4(3):72-79.

[2] 龚春梅, 张和君, 1987, 医学生物学研究, (3-4):42-46.

光学显微镜强得多的分辨能力。这种性能主要的物理条件,一方面是具有旋转对称的磁场和电场对电子束的透镜效应,另一方面是高能电子的波长很短。具有旋转对称的磁场的聚焦效应早在1869年就有明确的记载,随后又有人把从示波器阴极散射出来的电子束用一个和电子束同心的短圆筒形线圈在萤光屏上聚焦成为细小的一点。

本世纪30年代由于对电能分布经济效益的兴趣,在德国组成了一些研究队伍,以研究接通程序和高压电厂电击损失的问题。这些队伍企图使Braum管发展为可以用于发电厂的阴极射线示波器,应用这些仪器可以研究有关的非常迅速的电现象。1928年柏林工业大学高压实验室的负责人Adolf Mathias教授(1882—1962)组织了这样一个研究队伍,由他的助教Max Knoll博士(1899—1969)领导。从1928年末,Ernst Ruska作为这一队伍的一个成员参加了示波器的计算,发现要得到细小的一点,短圆筒形线圈的成像特点还需要进行深入的研究。这就成为E. Ruska的毕业论文,论文中共有94张图片。这些图片显示了电子辐射的阳极孔径为0.3 mm时,在阳极孔和萤光屏之间改变圆筒形线圈的位置,可以得到不同的放大倍数。1929年头几个月得到的图影是电子辐射物体的最早图片。它们是用单一电子透镜得到的一步成像。

这一研究的电子光学结果直到两年以后,当E. Ruska完成了他的毕业考试才发表(Ruska和Knoll 1931)^[2],94张图片中只发表了2张透射阳极孔用“磁电透镜”放大的图片。

后来,联系他的博士论文,他尝试利用圆筒形线圈,使电辐射的物体在放大一次以后成像。Knoll和Ruska把他们的实验用仪器以及所得到的结果,介绍给许多大学同事以及大学以外对此有兴趣的物理学家。其中有Max Steenbeck博士(1904—1981),当时他是Reinhold Rüdénberg教授(1883—1961)的私人助手,后者是西门子公司(Siemens-Schuckert

Werke)科研部负责人,同时是柏林工业大学的名誉教授。

1931年6月4日Knoll在柏林工业大学所谓Cranz学术讨论会的范围内发表了题为“设计的原理以及建造阴极射线示波器的新途径”的公开演讲,在他的演讲中他首次应用了电子光学的观察结果。

Rüdénberg参加了这次演讲会,但是在后来的讨论中未发一言。E. Ruska认识Rüdénberg本人,因为在柏林工业大学时他听过Rüdénberg“电子传运波”的演讲,并且1930年末在这方面经过他的考试。

1931年6月4日Knoll演讲中谈到的E. Ruska的研究以及进一步共同得到的结果,于1931年9月10日发表(Knoll and Ruska, 1932)^[3]。这一详细的工作在“物理学年刊”(Annalen der Physik)中发表后,Rüdénberg 1932年6月7日投交“自然杂志”(Die Naturwissenschaften)以下简报:

电子显微镜

因为近来关于建造电子显微镜各方面的倡议已经发表,请允许我自己,在这里宣布,西门子集团也正在进行这方面的工作,要在显微镜或望远镜中为了电子或质子束使用磁场或电场。我们的主要目标是使静止的或运动的物体多次放大后在亚显微水平成像。假如,不允许将它们充分暴露于高真空可以通过透明的窗口观察它们,而且荧光成像可以通过光学显微镜进一步放大。虽然我们基本的专利的登记日期是1931年5月,但是在实用的设计有所发展的时候我们才准备发表细节。

R. Rüdénberg

柏林—西门子城,1932年6月7日

1936年Rüdénberg被迫移民。他到英国,1939年又去美国。假如Rüdénberg在他的简报中写了申请专利的具体日期——1931年5月30日——而不是“1931年5月”,那么Knoll和Ruska当时就会明白,提到的专利申请是在Rüdénberg的助手,Steenbeck访问他们之后才

递交的。不了解确切的日期,有可能申请是在五月初提出,也就是在他访问我们之前已经递交。

在知道了专利的情况后, Ruska 给 Rüdénberg 写了以下一信:

“教授先生:

由于偶然的机会我知道了关于电子显微镜的奥地利专利 137611 和法国专利 737716, 我没有注意到在维也纳和巴黎的这两项申请, 从德国专利局我了解到, 相应的德国申请还没有提出。

我认为你应该知道, 在你第一次德国申请的日期之前, 我在柏林工业大学高压实验室, 已经建造了电子显微镜而且用此进行过研究。自从那时以后我一直在这方面进行工作, 而且现在也还对这一仪器的将来的发表具有兴趣。由于上述两项专利文件所代表的保护性权利, 会在以后使我受到束缚, 是很自然的。

我相信在这种具体事件可能发生之前, 应该理解我具有共同享有专利的权利。另一问题是, 你无疑是知道的——在这方面有很实质性的资料, 而在审批国外专利时并没有被考虑。最后我想知道如果西门子公司不准备进一步发展电子显微镜, 你是否愿意和我进行交易性的谈判。

假如你有时间和我商讨全部问题我将十分感激。我愿意为了这一目的到西门子城。

E. Ruska”

Rüdénberg 的回信只表示了推托和拖延。1931年5月30日最早的三项以 Rüdénberg 为发明者的德国专利申请, 直到1953年才获批准。在1931年6月27日和1932年8月13日之间, Rüdénberg 又申请了五项专利, 在1932年6月18日他的助手 R. Swinne 申请了两项, 都是关于电子显微镜的。所有这些专利申请都到1954年才获得批准。

在第二次世界大战期间美国无线电公司 (RCA, Radio Corporation of America) 开始为透射电镜提供电磁透镜。1948年 Donald C.

Paines, 这一企业的经理, 企图澄清 Rüdénberg 专利的基础, 找了西门子专利局并在柏林找了 Ruska。但是, 当时还不可能提供事实以说明 Knoll 和 Ruska 研究的结果是通过 Steenbeck 传给 Rüdénberg 的。

直到1956年 Steenbeck 回到了东德(耶那大学), Knoll 也在1956年返回西德(慕尼黑工业大学)。1960年10月17日, Knoll 写信给 Steenbeck 询问他关于1931年访问 Knoll 和 Ruska 的情况。

“Steenbeck 先生:

遗憾的是我还没有向你庆贺你愉快的归来, 也还没有机会比较我们在不同国家的一些经验。……

我将十分感激如果你可能回答一个‘电子显微镜的使人不愉快的事件’的问题。我收到了来自不同地区的一些信, 都说 Rüdénberg 依据1931年5月31日的专利申请在美国俨然以电子显微镜的发明者自居。你知道我几天以后, 即6月4日, 在 Cranz 学术讨论会上曾作过一次关于电子显微镜的演讲(在这次演讲时 Rüdénberg 坐在第一排, 在讨论时未发一言, 而且我们的电子显微镜一直在工作, 已有1½—2年之久*。如果我没有记错, 你在1931年4—5月间访问过我们, 在 Rüdénberg 的唆使下, 为了获得我们仪器的细节, 关于这些你以后向他汇报了。你难道对 Rüdénberg 不感到奇怪, 他就在这种情况下, 总是混充电子显微镜的唯一发明者? 这些情况是一般都已熟知的, 而且我的博士生可以作证。

最近, Rüdénberg 先生又向这一方向迈进了一步, 这使我不得不提出反驳。化学百科全书的主编来信说:

“Rüdénberg 教授寄来了一份冗长的稿件, 他宣称他是唯一的发明者。你的名字只提到了一下。你固然对电子束的聚焦条件进行过研究, 但是从未想到成像。他是唯一而且是第一个这样做的, 并在1932年发表在法国专利上, 优先权从1931年起……”

所以,我将非常感激你,如果你能帮助我了解 Rüdberg 怎样能说这些话。许多年来关于这事我什么也没说过,因为优先权之事对于双方都是不愉快的,但是对如此曲扭真像我不能长期忍耐下去了。Ruska 先生有同样意见。

.....

* 后来, Ruska 纠正了这一说法,当时 Ruska 的一次放大的仪器已工作了两年而两级成像仪器最早建成是 1931 年 3 月。M. Knoll”

1960 年 11 月 8 日, Steenbeck 的回信带来了期待的答复。在信中他首先谈到第二次世界大战造成的巨大灾难使他们流浪在全球各地长达 20 年之久,为了重返德国而感到无比欣慰。随后就“令人不愉快的电子显微镜事件”证实了他参观 Knoll 和 Ruska 的实验室是在 Rüdberg 申请专利之前,在参观中他看到了他们成功地利用电磁场透镜的作用使电子穿透的物体成像并放大。给他留下深刻印象的是他们严谨而井井有条的工作方法而且不说任何缺乏证据的结论。

对于 Knoll 和 Ruska 已经是十分清楚的情况,真正澄清还是很久以后的事。这是可以理解的,因为 Steenbeck 当时是西门子公司的雇员,而且战后他和 Knoll 又都是在国外。

电子显微镜的诞生除经历了专利的纠纷外,还由于样品制备未能及时解决而拖延了时间。1932 年当 Knoll 和 Ruska 提出电子显微镜的分辨能力有可能达到比光学显微镜高出许多倍时,几乎没有人认为这一设想会实现。后来,1935—1937 年之间分辨能力已经得到提高,但是,对于电子显微是否能成为一个成功的方法还是疑虑重重,因为不可能找到能耐受吸收电子所引起的热度而又结构不发生改变的任何样品。最早的生物样品 (Krause,

1936^[4]; Marton, 1934^[5]) 的发表并没有改变这种看法。因此,想从科研或者工业机构得到足够的资金建造一台分辨能力优于光学显微镜的商品电子显微镜都没有成功 (Ruska, 1979),直到 1936 年 10 月 2 日 Richard Siebeck 教授 (1883—1965) 肯定了它的分辨能力优于光学显微镜,才引起了柏林的西门子 (Siemens Halske) 和耶那的蔡司 (Carl Zeiss) 公司的兴趣, Siebeck 教授当时是 Berlin Charite 第一医院的院长,也是 Helmut Ruska (1908—1973)* 的临床老师。

Ruska 等建议两家公司联合承担,但是西门子和蔡司都拒绝。然后 Ruska 等决定了西门子,主要因为他们认为建造中的最大困难是电工方面,当然,西门子具有 Rüdberg 专利申请的所有权也是一个理由。

1937 年 2 月到 1945 年 5 月 Von Borries 和 Ruska 在西门子公司一起建造了商品电子显微镜。1939 年末最早电子显微镜成批生产,今天它们陈列在慕尼黑德国博物馆。Ruska 在 1931—1933 年在工业大学高压实验室建造的电子显微镜在战后 1945 年已找不到。前几年又重新建造,现在也陈列在德国博物馆中。它们将是电子显微镜诞生过程的历史见证。

参 考 文 献

- [1] Ruska, E. 1936, *J. Ult. & Mol. St. Re.*, 95: 3-28.
- [2] Ruska, E. and Knoll, M. 1931 *Z. Techn. Physik.*, 12: 380—400.
- [3] Knoll, M. and Ruska, E. 1932, *Ann. Phys.*, 12: 607—640, 641—661.
- [4] Krause, F. 1936, *Z. Phys.*, 102: 417—422.
- [5] Marton, L. 1934, *Phy. Rev.*, 46: 527—528.

* H. Ruska 是 E. Ruska 的弟弟,曾利用电子显微镜进行过医学生物学的工作。