

扫描电镜中半导体制冷冷台使用条件优化 及在高含水量样品中的应用

Optimization of semiconductor refrigeration cold stage usage conditions and its application in high moisture content samples in scanning electron microscopy

陈惜燕 魏兰兰 康靖全 段慧 范宁娟

CHEN Xiyan WEI Lanlan KANG Jingquan DUAN Hui FAN Ningjuan

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 咸阳 712100)

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Xianyan, Shaanxi 712100, China)

摘要:目的:有效解决高含水量样品电子显微结构观察的难点。**方法:**通过常规扫描电子显微镜搭配半导体制冷冷台的新仪器组合模式,对一系列高含水量样品进行显微结构观察。**结果:**高含水量样品在以导电胶带为基质,电压5 kV,电子束斑值为50/60,冷台温度为4℃的条件下,无需对样品进行固定和脱水处理,可以在扫描电子显微镜下直接成像观察其显微结构,样品微观结构没有皱缩、拉伸、扭曲等变形现象,能够更真实地反映样品的原貌。**结论:**常规扫描电子显微镜搭配半导体制冷冷台的仪器自由组合模式是解决高含水量样品显微结构观察的有效手段。

关键词:扫描电镜;冷冻扫描电镜;环境扫描电镜;半导体制冷冷台;束斑;高含水生物样品

Abstract: Objective: To effectively solve the difficulty of observing the electron microstructure of samples with high water content. **Methods:** A series of samples with high water content were observed by conventional scanning electron microscope with a new mode instrument combination of semiconductor cold cooling table. **Results:** Under the conditions of conductive tape as matrix, voltage 5 kV, electron beam spot of 50 or 60, and cold table temperature of 4℃, the sample with high water content did not need to be fixed and dehydrated, and its microstructure could be directly imaged under the scanning electron microscope to observe its microstructure. The microstructure of the sample

hadd no deformation phenomena such as shrinkage, stretching and distortion, which could reflect the original appearance of the sample more realistically. **Conclusion:** The new mode of free combination of conventional scanning electron microscope with semiconductor cold cooling table is an effective means to solve the microstructure observation of high water content samples, and is an economical, cost-effective and widely adaptable mode.

Keywords: scanning electron microscopy; cryo-scanning electron microscopy; environmental scanning electron microscopy; semiconductor cold cooling table; spot; wet specimens

扫描电子显微镜(SEM)是现代生物学用于观察微观形貌结构的精密仪器,具有景深大、成像立体感强、观察区域较大等优点^[1-3]。然而,由于技术限制,常规的扫描电镜(SEM)对样品含水量要求苛刻,需要对样品进行脱水、固定等一系列前处理才能在扫描电镜下观察,但高含水量样品经过脱水固定后,往往导致样品扭曲变形、失真等^[4-5],因此,在扫描电镜下所观察到的显微结构与样品原来的形貌相差甚远,很难观察到样品真实的结构特征。近年来随着科学技术的不断发展,扫描电镜技术有较大的突破。新技术冷冻扫描电镜(cryo-scanning electron microscope, Cryo-SEM)和环境扫描电镜(environmental scanning electron microscopy, ESEM)克服了传统 SEM无法直接观察高含水量样品的技术瓶颈,无需对样品进行前处理,可以直接观察高含水量、导电性差的样品的显微结构^[6-8]。但这两种新型扫描电镜由于价格极其昂贵且专用性强,极大地限制了其应用范围。

近年来,主流的电镜生产厂家同第三方配件生产厂家(指冷台、能谱等)合作,能够按照客户的要求订制最适合用户需求的高性价比扫描电镜,这种仪器搭配灵活组合,造价成本低,广大用户单位容易实现。然而,对于这

基金项目:西北农林科技大学实验技术研究与实验室管理创新项目(编号:SY20210211)

作者简介:陈惜燕,女,西北农林科技大学实验师,硕士。

通信作者:段慧(1968—),女,西农农林科技大学实验师,学士。
E-mail:623528863@qq.com

范宁娟(1980—),女,西北农林科技大学高级实验师,博士。E-mail:583578987@qq.com

收稿日期:2023-02-09 **改回日期:**2023-10-24

种第三方配置的配件使用效果等方面的研究报道甚少。Inoue 等^[9]曾在低真空度下采用湿盖法包埋湿样并在帕尔贴冷台上成像,但仅论述了借助冷台在扫描电镜中观看湿样的可能性,并未对该技术作详细介绍,而且未对不同含水量的样品进行微观成像验证。研究拟将常规日立扫描电镜(FlexSEM1000)与英国 Deben 公司生产的半导体制冷冷台(温度范围 $-25\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)搭配,对样品基质、电压、电子束斑及冷台温度进行优化探索,并验证其在高含水量样品微观结构观察中应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

扫描电子显微镜:FlexSEM1000 型,株式会社日立制作所;

半导体制冷冷台:LT4234 型,温度范围: $-25\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$,英国 Deben 公司;

临界点干燥仪:EM CPD300 型,德国 Leica 公司。

1.2 材料

玉米淀粉:西安滋品源食品有限公司;

鸭舌草、蒸面皮、玉米淀粉乳液、水凝胶:西北农林科技大学;

尼龙膜:有机尼龙,天津市津腾实验设备有限公司;

聚偏二氟乙烯膜:德国 Merck Millipore 公司;

琼脂糖:强度 $\geq 1\ 200\ \text{g}/\text{cm}^2$ (1%),北京擎科生物科技股份有限公司。

1.3 制片方法

1.3.1 常温台扫描电镜的制样与观察

(1) 鸭舌草叶片:自然风干后,用 2.5%戊二醛固定液固定样品($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 8 h 以上,然后用生理盐水清洗 3 次(每次 10 min),再用乙醇对鸭舌草叶片进行梯度脱水处理(30%乙醇 15 min \rightarrow 50%乙醇 15 min \rightarrow 70%乙醇 15 min \rightarrow 80%乙醇 15 min \rightarrow 95%乙醇 15 min \rightarrow 100%乙醇 30 min)。放入临界点干燥仪进行样品干燥(干燥气源 CO_2 , 样品温度 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 气压 $10^5\ \text{Pa}$, 循环数 24)。取导电胶带 $0.8\ \text{cm}\times 1.0\ \text{cm}$ 粘贴到常温样品台中间,再取干燥后叶片剪裁切取叶片靠叶尖部位 $0.5\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$, 粘贴在导电胶带上^[10]。电镜参数:电压 5 kV,束斑值 60。

(2) 蒸面皮:前处理方法同鸭舌草,剪裁导电胶带 $0.8\ \text{cm}\times 1.0\ \text{cm}$ 到常温样品台中间,再用刀片纵向切取蒸面皮 $0.1\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 小片,粘贴在导电胶带上。电镜参数:电压 5 kV,束斑值 50。

(3) 水凝胶:取水凝胶在冷阱温度 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 真空度 $< 10\ \text{Pa}$ 条件下真空冷冻干燥 12 h,用刀片纵向切取样品 $0.5\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 粘贴在贴有 $0.8\ \text{cm}\times 1.0\ \text{cm}$ 导电胶带的常温台。

1.3.2 半导体制冷冷台扫描电镜的制样与观察

(1) 鸭舌草叶片:剪裁导电胶带 $0.2\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 粘贴到冷台中间,再用刀片切取叶片靠叶尖部位 $0.2\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$, 粘贴在导电胶带上。电镜参数:电压 5 kV,束斑值 60,冷台温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 蒸面皮:剪裁导电胶带 $0.2\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 粘贴到冷台中间,再用刀片纵向切取蒸面皮 $0.1\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 小片,粘贴在导电胶带上。电镜参数:电压 5 kV,束斑值 50,冷台温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 玉米淀粉乳液:剪裁导电胶带 $0.2\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 粘贴到冷台中间,用 $10\ \mu\text{L}$ 移液枪吸取玉米淀粉乳液,滴加到导电胶带上,用牙签引流摊开,再用滤纸适当吸取多余的液体,电镜参数:电压 5 kV,束斑值 50,冷台温度分别取 4, -1 , -5 , $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 水凝胶:样品合成充分溶胀后,用刀片纵向切取样品 $0.1\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 粘贴在贴有 $0.2\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 导电胶带的半导体制冷冷台。电镜参数:电压 5 kV,束斑值 60,冷台温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 数据处理

图片通过 windows 画图 3D 软件以及 PowerPoint 软件进行编辑处理。

2 结果与分析

2.1 样品基质的选择

分别选用醋酸纤维膜、尼龙膜、滤纸、琼脂糖凝胶和导电胶带在扫描电镜下成像。如图 1 所示,聚偏二氟乙烯膜和尼龙膜在电子显微镜下的显微结构有清晰的小孔分布,而滤纸的显微结构有明显且粗糙的纤维分布,由于这 3 种材料的显微结构过于复杂,容易对观察样品的显

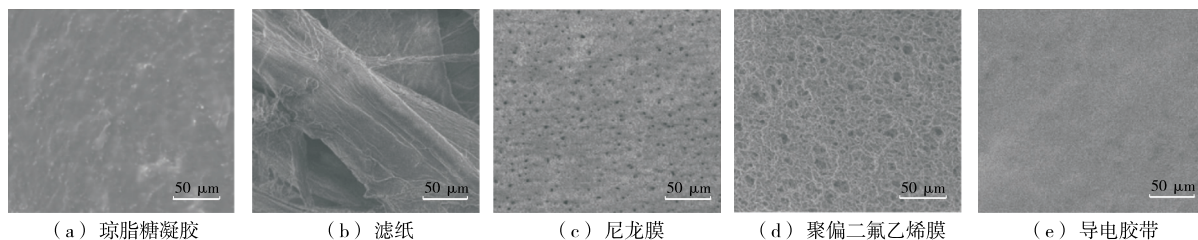


图 1 不同样品基质的电镜微观结构图

Figure 1 Electron microscopic microstructure of different sample matrices

微图像产生干扰,因此不作为最佳基质选用;琼脂糖凝胶和导电胶带的显微结构简洁、干净,但由于琼脂糖凝胶的导电性不佳,因此选用导电胶带作为最佳的样品基质。

2.2 扫描电镜的电压和束斑值的选择

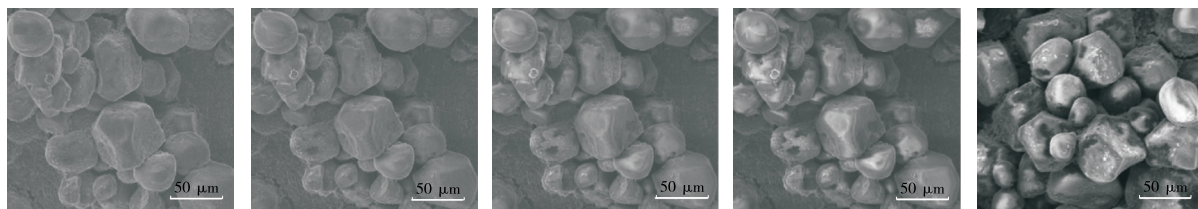
根据使用扫描电子显微镜的经验,对于含水量高的生物样品选用低电压比较合适。试验选用了 3,5 kV 作为观察电压。此外,在电子扫描电镜(SEM)观察中,成像的效果除了样品的物理距离、电压外,影响最大的是束斑值,为了更直观地展示出束斑值对成像效果的影响,试验中束斑值分别取 20,30,40,50,60。结果发现,低电压值(3,5 kV)在合适的束斑值下均可以获得满意的图像,而束斑值的变化则对图像的影响极其明显。如图 2 所示,束斑值为 20 和 30 时均能获得清晰满意的图像,而束斑值超过 40 后图像中的荷电堆积现象明显,因此,束斑值宜取 20 或 30。这是由于淀粉导电性强且有一定的硬度,当束斑值 >40 时,电子束轰击到样品表面的电子来不及导走,产生堆积,从而导致画面花白。然而,含水量高的样品一般偏软且导电性不好,因此束斑值宜偏大,如图 3 所示,对于植物叶片,束斑值为 20 时背景太暗观察效果不佳,当束斑值为 40 时能够获得清晰图像,束斑值为 50 以上时观察效果较佳,可以清晰地观看到叶片表皮毛。

2.3 冷台温度的选择

分别设计了一10,-5,-1,0,4 ℃ 5 个冷台温度。在扫描电镜电压 3 kV,束斑值 30 的条件下观察样品在不同的冷台温度下的微观结构。选择具有吸水特性的淀粉作为观察对象,如图 4 所示,冷台温度为 4 ℃ 或 0 ℃ 时可以看到淀粉颗粒外观表面纹理(图中实心三角形标识区),且 4 ℃ 时的表面纹理更为清晰;冷台温度为-1 ℃ 时淀粉颗粒外观表面纹理少部分尚隐约可见,但-5,-10 ℃ 时完全不能看清淀粉颗粒表面纹理,而且冷台冰霜从-1 ℃ 开始出现(图中空心三角形标识区),随着温度的降低,冷台冰层密度增加。因此,观察冷台的最适温度为 4 ℃。

2.4 扫描电镜中半导体制冷冷台在高含水量样品中的应用

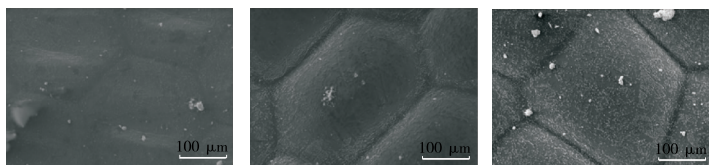
2.4.1 鸭舌草在常温台和半导体制冷冷台中的电子微观结构对比 取鸭舌草叶片分别在常温台和 4 ℃ 冷台观察,电镜观察参数为电压 5 kV,束斑值 60,观察倍数分别为 50,250,500 倍。如图 5 所示,在常温台中观察的鸭舌草叶片细胞边缘部分有不同程度的皱缩、塌陷,图中空心三角形标识的为叶片细胞皱缩的地方,实心三角形标识的为塌陷的叶片细胞。而在 4 ℃ 半制冷冷台中所观察的鸭舌草叶片细胞舒张,饱满,没有皱缩或塌陷的现象。此



(a) 电压 3 kV, 束斑值 20 (b) 电压 3 kV, 束斑值 30 (c) 电压 3 kV, 束斑值 40 (d) 电压 3 kV, 束斑值 50 (e) 电压 3 kV, 束斑值 60

图 2 淀粉颗粒在不同扫描电镜束斑值下的成像效果

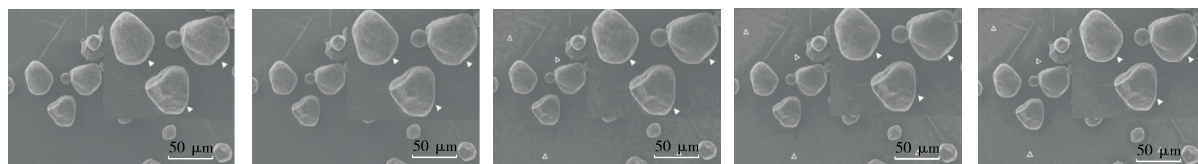
Figure 2 Imaging effects of different scanning electron microscopy voltages and beam spot values



(a) 电压 5 kV, 束斑值 20 (b) 电压 5 kV, 束斑值 40 (c) 电压 5 kV, 束斑值 60

图 3 鸭舌草叶片在不同扫描电镜束斑值下的成像效果

Figure 3 Imaging effects of *Monochoria vaginalis* leaves in different scanning electron microscopy beam spot values



(a) 冷台温度 4 ℃ (b) 冷台温度 0 ℃ (c) 冷台温度-1 ℃ (d) 冷台温度-5 ℃ (e) 冷台温度为-10 ℃

图 4 相同样品在不同冷台温度下的成像效果

Figure 4 Imaging effects of the same sample at different cold cooling table temperatures

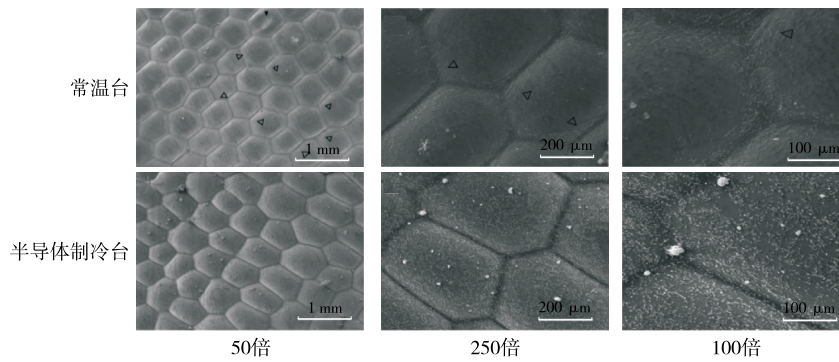


图5 鸭舌草在常温台和半导体制冷冷台中的微观结构对比图

Figure 5 Comparison of the microstructure of *Monochoria vaginalis* in the normal temperature table and the semiconductor cold table

外,叶片的表面刚毛也较多且清晰可见,而在常温台下,鸭舌草叶片细胞表面的刚毛大部分脱落,在放大倍数250倍和500倍下基本观察不到叶片细胞表面的刚毛。结果表明,4℃是对植物细胞比较友好的条件,在4℃下植物细胞中的水分维持了一个平衡状态,细胞鲜活饱满。而在常温台下,植物叶片在扫描电镜的真空腔中,覆盖在叶片细胞表层的刚毛脱落,细胞壁皱缩,叶片细胞塌陷变形,该结果与肖媛等^[11]的一致。

2.4.2 蒸面皮在常温台和半导体制冷台中微观结构的对比 如图6所示,在常温台下,面筋中蛋白有干瘪、塌陷、变形的现象,而在冷台下,面筋蛋白颗粒圆润饱满,此外还可以观察到蛋白表面有类似凹坑的纹理,清晰可辨;而这些纹理在常温台观察到的图像中未被发现,可能是面筋蛋白收缩变形所致。图中三角图标标识的为干瘪、塌陷或收缩的面筋蛋白,这也进一步证实了传统常温电镜的缺陷,传统电镜模式会让样品皱缩、塌陷、干瘪,所观察到的样品形貌与其原貌相差甚远;而半导体制冷冷台对样品更加友好,能够保持样品的原貌。

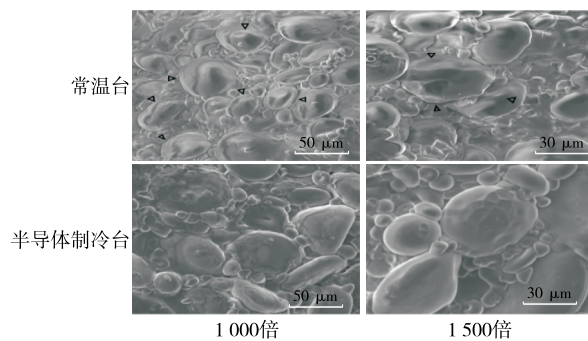


图6 蒸面皮在常温台和半导体制冷冷台中的微观结构对比图

Figure 6 Comparison of the microstructure of mianpi in the normal temperature table and the semiconductor cold cooling table

2.4.3 玉米淀粉乳液在不同温度半导体制冷台微观结构对比 由于乳液非常脆弱敏感,无法在常温台条件下观察,只能在半制冷冷台中观察。如图7所示,在-1,-5,-10℃下乳液滴无法聚焦清晰,-1℃时呈类似冰渣的灰白色球状,随着温度的降低黑色区域面积越来越大且中间出现灰白色小球。根据影像结果推测,该乳液滴在温度低于0℃下,水分子为三相共存(气态、液态和固态)^[12],且随着温度的降低,转变为固态水分子越多,从而导致出现破乳现象;而乳液都是水相和油相两相同时存在的,随着温度的降低,加速了破乳现象的产生,释放出油相中所包裹的物质就越多,而水相部分冻结成冰,即图中的灰白色部分,而黑色部分则为油相部分。在4℃条件下,能够较好地拍摄到完整的乳液滴球,见图7(d)。

2.4.4 水凝胶在常温台和半导体制冷冷台中微观结构对比 对于高含水量样品,水凝胶样品比较特殊,样品具有强的溶胀性和水吸附能力。图8(a)为水凝胶样品进行充分溶胀并进行真空冷冻干燥后制样,在常温台中观看的

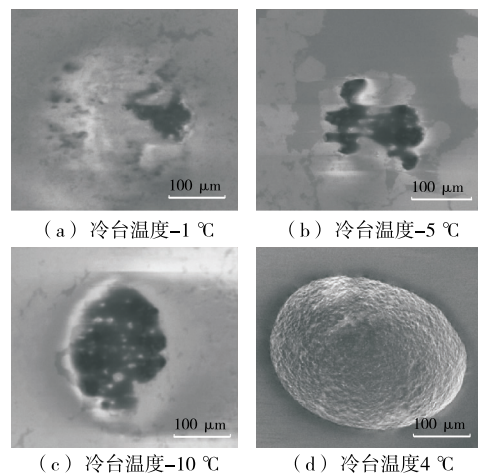
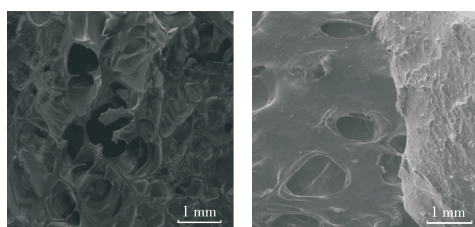


图7 淀粉乳液在不同冷台温度中的微观结构图

Figure 7 Microstructure diagram of starch emulsion at different cold cooling table temperatures (×300)



(a) 常温台 (b) 冷台温度4 °C

图 8 水凝胶在常温台和冷台中微观结构图

Figure 8 Microstructure of the hydrogel in the room temperature table and the cold cooling table ($\times 50$)

微观结构图, 图像可以充分体现样品三维空隙结构。图 8(b) 为溶胀未经干燥的水凝胶在 4 °C 冷台中观察的微观结构, 图像能够体现样品具有粘连性特征。水凝胶由于材料的特殊性, 在常规的扫描电镜中, 只能通过样品脱水、干燥观察其三维空隙结构, 无法观察其新鲜样品的结构, 但在冷台中却轻易实现了其含水状态显微结构的观察。

3 结论

经过大量试验证实, 冷台搭配常规扫描电镜同冷冻扫描电镜和环境扫描电镜一样, 能够满足高含水量样品在扫描电镜中显微结构的观察需求, 样品可直接成像无需干燥处理, 更能反映样品的真实形貌。研究在前人推荐的滤纸和纤维素微孔滤膜基础上又扩展出了导电胶带粘台法, 成像效果更清晰、背景更干净。但冷台搭配常规扫描电镜的使用存在观看倍数受限问题, 无法用于细菌或细胞器结构的观察。该问题在冷冻扫描电镜中也同样存在^[13]。

通过对一系列高含水量样品在冷台下的微观结构观察发现, 半导体制冷冷台搭配常规扫描电镜仪器的自由组合模式, 能够满足大多数客户的需求, 特别是农业院校, 样品多数含盖着植物叶片、水果、动物组织、面团等, 样品所需观察放大倍数要求不高, 能够获得满意的效果, 因此可根据单位研究样品特性, 自由订制扫描电镜配套的配件, 是一种经济实惠、高性价比、行之有效的模式。此外, 随着半导体技术不断的成熟、迭代更新, 相信在不久的将来半导体冷台制冷范围更加宽广, 观看的倍数能进一步突破, 此类技术的应用将更广泛。

参考文献

[1] WILL M. An operations guide to safety and environmental management systems (SEMS) [M]. [S. l.]: Gulf Professional Publishing, 2019: 5-9.
 [2] DUDKIEWCZ A, TIEDE K, LOESCHNER K, et al. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30(1): 28-43.
 [3] 周莹, 王虎, 吴伟, 等. 二次电子探测器选择对 FESEM 图像的

影响[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(7): 246-248, 269.

ZHOU Y, WANG H, WU W, et al. Impact of different secondary electron detectors on FESEM images[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2012, 31(7): 246-248, 269.
 [4] BRAET F, DE ZANGER R, WISSE E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: A study on hepatic endothelial cells[J]. Journal of Microscopy, 1997, 186(1): 84-87.
 [5] BRAY D F, BAGU J, KOEGLER P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens [J]. Microscopy Research and Technique, 1993, 26(6): 489-495.
 [6] ENGEL A. Biogological applications of the scanning transmission electron microscope [J]. Journal of Structural Biology, 2022, 214(2): 107843.
 [7] MUSCARIELLO L, ROSSO F, MARINO G, et al. A critical overview of ESEM applications in the biological field[J]. Journal of Cellular Physiology, 2005, 205(3): 328-334.
 [8] 莫家媚, 张少鸿, 苏秋成, 等. 一种新型冷冻扫描电镜专用样品的研制及其在小球藻微观形貌表征中应用[J]. 电子显微学报, 2021, 40(3): 294-300.
 MO J M, ZHANG S H, SU Q C, et al. A new cryo-scanning electron microscopy sample stage and its application in morphology characterization of chlorella [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2021, 40(3): 294-300.
 [9] INOUE N, TAKASHIMA Y, SUGA M, et al. Observation of wet specimens sensitive to evaporation using scanning electron microscopy[J]. Microscopy (Oxf), 2018, 67(6): 356-366.
 [10] 杨梅花, 郑新开, 刘升学, 等. 4 种睡莲花粉形态的扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2022, 41(1): 61-65.
 YANG M H, ZHENG X K, LIU S X, et al. Observation on pollen morphology of four Nymphaea species by scanning electron microscope[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2022, 41(1): 61-65.
 [11] 肖媛, 邢振飞, 周芳, 等. 水生植物冷冻扫描电镜和常规扫描电镜成像效果比较[J]. 电子显微学报, 2017, 36(2): 173-176.
 XIAO Y, XING Z F, ZHOU F, et al. Comparison of the imaging effects of Cryo-scanning electron microscopy and conventional scanning electron microscopy on aquatic plants [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2017, 36(2): 173-176.
 [12] 朱怀江, 赵常青, 罗健辉, 等. 聚合物水化分子的微观结构研究[J]. 电子显微学报, 2005, 24(3): 205-210.
 ZHU H J, ZHAO C Q, LUO J H, et al. Study on the microstructure of polymer molecule hydrate [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(3): 205-210.
 [13] 肖媛, 邢振飞, 李婷婷, 等. 水生红球藻的冷冻扫描电镜制样条件初探[J]. 电子显微学报, 2016, 35(4): 361-364.
 XIAO Y, XING Z F, LI T T, et al. Preliminary study on the sample preparation conditions of Cryo-scanning electron microscopy for Haematococcus pluvialis [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2016, 35(4): 361-364.