

# 冷冻扫描电镜技术应用案例

►岳纪玲 于润波 梁丽荣 关波

((分析测试中心电镜组 Email: yuejiling@iccas.ac.cn, guanbo@iccas.ac.cn))

## 一、概述

常规扫描电子电镜 (Scanning electron microscopy, SEM) 无法观察含水样品, 部分样品在干燥过程中易发生结构变化, 导致无法获得样品的真实结构。环境扫描电子显微镜 (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM) 可观察含水样品, 但受其真空度限制, 难以获得高分辨率图像。相较于传统 SEM 和 ESEM, 冷冻扫描电镜 (Cryo-SEM) 结合了冷冻制样技术与 SEM 的高分辨成像能力, 能够对含水或其他溶剂的样品进行高分辨成像和成分分析。

利用 Cryo-SEM 技术, 样品在制样、传输和观察整个过程中都保持在低温状态, 最大程度保留样品在液相中的原始结构。Cryo-SEM 技术在表征液相样品 (如乳液、水凝胶、有机组装体等) 及电子束敏感样品中具有独特的优势: (1) 快速冷冻技术 (如液氮泥冷冻、高压冷冻) 将样品固定在溶剂玻璃态的冰层中, 避免了水或溶剂结晶对样品内部结构的损坏, 以及样品干燥过程引起的结构变化。

(2) 快速冷冻后的样品在转移及观察过程保持在低温状态 ( $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下), 低温条件能够尽可能保持液相样品的微观结构, 并显著减少电子束对样品的损伤。同时配合二次电子探测器及能谱仪, 可同时获得样品表面的高分辨率形貌图像及成分信息。

分析测试中心电镜组的聚焦离子束-电子束双束电子显微镜 (型号: Helios G3 CX, Thermo Fisher Scientific) 配备了冷冻传输系统 (型号: PP3010T, Quorum) 和能谱仪 EDS (型号: UltimMax 40, Oxford), 实现了对液相和不耐辐照样品在低温冷冻条件下高分辨 SEM 观察、成分分析及离子束刻蚀。本文介绍该 Cryo-SEM 系统运行以来开展的典型应用实例。

## 二、仪器与系统组成

仪器装置组成与实验操作流程在第 11 期分析测试中心通讯<sup>[1]</sup>中已详细介绍, 本文仅作简要概述。

### 2.1 仪器装置

如图 1 所示, 冷冻传输系统主要包括: aQuilo 冷冻制备腔室、Prepdek™ 工作站、传输装置、电镜镜筒冷阱和冷台、涡轮分子泵抽气系统、自增压液氮罐等。



图 1、 双束电镜及冷冻传输系统装置图

## 2.2 实验操作方法

实验前需对扫描电镜样品室和制备腔室(转换仓)降温, 降温完成后制备液氮泥, 然后快速冷冻液相样品, 迅速将预冷的样品转移到冷冻制备腔室之内, 在冷冻状态下进行冷冻断裂、升华, 镀膜溅射三个步骤, 处理结束后将样品传入至双束电镜中的低温样品台上进行观察。

## 三、典型应用实例

该台 Cryo-SEM 系统已用于化学、生物、材料领域等多种液相、不耐电子束样品的研究, 开展了黏稠样品、溶液、固液界面样品、电子束/空气敏感型固态样品、生物样品五大类样品的测试。以下分别介绍这五大类样品的典型应用实例。

### 3.1 黏稠样品

此类样品主要包括水凝胶、液晶、复合功能材料等典型粘稠样品。以水凝胶为例, 水凝胶由于其较强的锁水能力, 通过 Cryo-SEM 技术控制升华条件(如  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min), 可有效去除凝胶网络中的游离水, 清晰揭示其三维多孔网状结构。化学所电镜室利用 Cryo-SEM 技术已表征聚稀乙醇水凝胶<sup>[2]</sup>(图 2(a)所示)、牛血清白蛋白水凝胶<sup>[3]</sup>(图 2(b)所示)、磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯水凝胶<sup>[4]</sup>(图 2(c)所示)等多种类型水凝胶, 从而为研究凝胶化机理及结一性能关系提供关键证据。

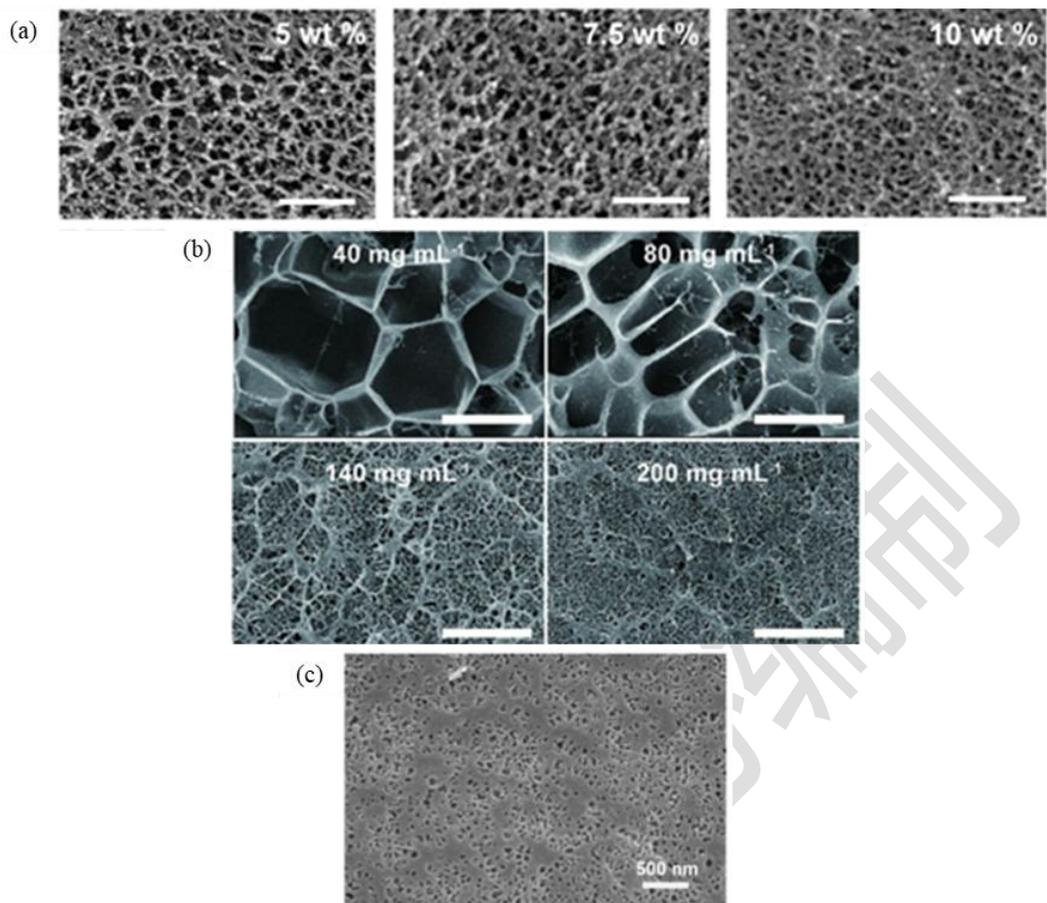


图 2、(a) 不同浓度的聚乙烯醇水凝胶的 Cryo-SEM 图像<sup>[2]</sup> (b)牛血清白蛋白水凝胶 Cryo-SEM 下图像<sup>[3]</sup> (c)不同浓度的磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯水凝胶的 Cryo-SEM 图像<sup>[4]</sup>。图(a)和图 (b)的比例尺为 3 $\mu$ m。

### 3.2 溶液样品

此类溶液样品主要包括液相中的组装结构，乳液样品中的微球、纳米颗粒等，Cryo-SEM 能获取其在溶液中原始状态。

#### 3.2.1 新型环状胶体颗粒 Pickering 溶液

Li 等<sup>[5]</sup>通过使用环状二氧化硅胶体颗粒作为乳化剂，制备了具有低界面覆盖率但稳定性增强的新型 Pickering 乳液体系，该乳液体系在界面催化和表面增强拉曼散射检测中具有优越的性能。

在该研究中，Cryo-SEM 用于直接观察和验证功能化的纳米二氧化硅颗粒在 Pickering 乳液界面的精确位置和分布形态。通过 Cryo-SEM 可证明该环状胶体颗粒在乳液液滴表面形成了六方密堆积的单层结构（图 3 (a)），这与图 3 (b)

所示光学显微镜的结果一致，这种有序的结构是该乳液具有高稳定性的基础。同时，Cryo-SEM 也观察到该环状胶体颗粒具有明显的空腔结构，其空腔结构使每个乳液液滴具有超过 80% 的自由油水界面。此外，Cryo-SEM 图像还清晰显示催化用的钯纳米颗粒 (Pd NPs) 主要分布在环状胶体颗粒的空腔以及环与环之间的空隙中，如图 3 (c-e) 所示，Pd NPs 能够占据环状胶体颗粒留下的自由界面，以此从结构上揭示了环状胶体颗粒能够提供更大的接触界面用于催化反应的机理。

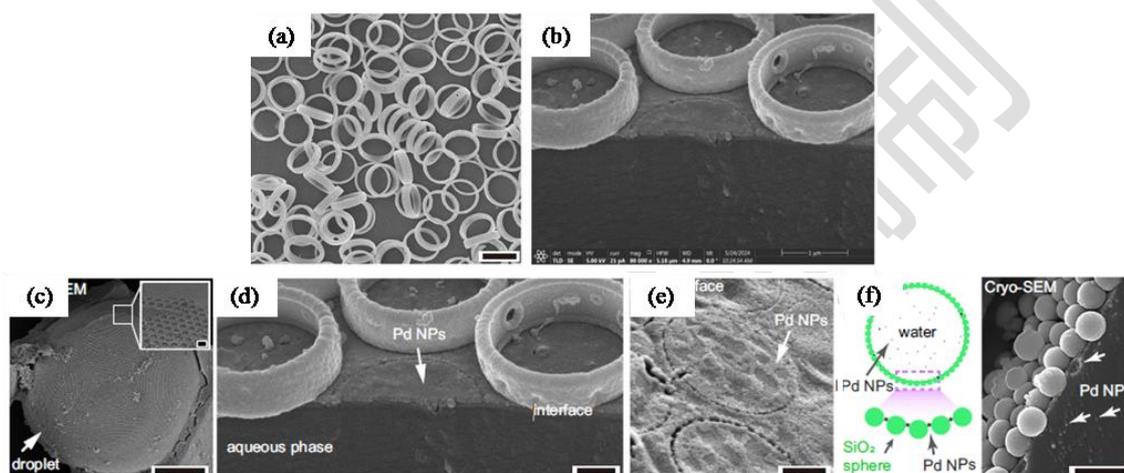


图 3、(a) Cryo-SEM 下乳液液滴表面图像(b) 光学显微镜下乳液液滴单层环状纳米颗粒覆盖图像(c-e) Cryo-SEM 下负载的 Pd NPs 在环状胶体颗粒的位置。比例尺：50  $\mu\text{m}$ (a)，2  $\mu\text{m}$  (a 中插图)，20  $\mu\text{m}$ (b)，500 nm(c, d, e)。

### 3.2.2 多级组装体结构的新型表面活性剂

Wang 等<sup>[6]</sup>设计并构建了一系列由 2-甲酰基苯磺酸钠 (FBSS) 和直链胺 ( $\text{C}_n\text{NH}_2$ ,  $n=6, 7, 8, 10, 12$ ) 通过动态亚胺键 ( $-\text{CH}=\text{N}-$ ) 反应形成的表面活性剂。其中，FBSS- $\text{C}_8\text{NH}_2$  在清洗效率、适用范围、循环使用中表现出优异性能。研究人员通过使用 Cryo-SEM 揭示了 FBSS- $\text{C}_8\text{NH}_2$  组装体的形貌，如图 4 (a) 所示，其为直径 100 nm 到 1.5  $\mu\text{m}$  不等的球形聚集体，并阐明了该表面活性剂的多级组装路径：由直径 20 nm 左右的小囊泡进一步聚集形成网络结构，网络结构卷曲闭合后最终形成中空的网状壳层球。这种独特的多级组装结构能够富集在油污周围并包覆油滴，促进了乳化过程。Cryo-SEM 的观察数据为阐释该多级组装体结构的工作机理提供了直接证据。

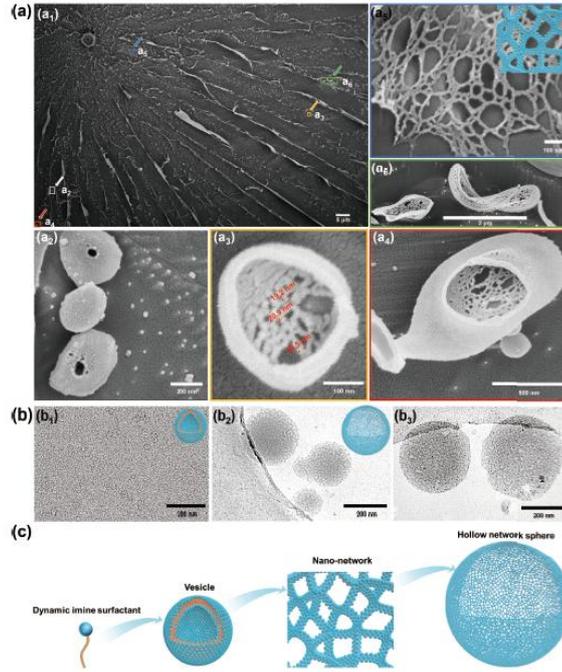


图 4、FBSS-  $C_8NH_2$  形成聚集体的组装机制：(a) FBSS-  $C_8NH_2$  溶液 (15.0 mM) 中形成聚集体的 Cryo-SEM 图像 (a<sub>1</sub>-a<sub>6</sub>) (b) 冷冻透射电镜图像 (b<sub>1</sub>-b<sub>4</sub>) (c) 囊泡、网络及空心网状球的形成过程示意图

### 3.2.3 受限气泡群中两亲性分子的手性分级组装

Gao 等<sup>[7]</sup>系统地研究了微柱模板稳定的受限气泡阵列与其他几种受限条件（如无气泡、平板、液滴）下手性两亲分子的蒸发诱导组装行为。研究发现，气泡场景下的组装能产生独特的分形形态，并展现出最高水平的手性程度、有序性和取向一致性。这种独特的促进作用归因于两个关键因素：界面效应和受限空间形成动力学。研究人员通过 Cryo-SEM 技术证实了在气泡边界处存在与最终分形组装体中相似的纳米粒子，而体相中则缺乏这些特征纳米粒子，如图 5 (b) 所示，这一观察结果直接证明了组装开始于气/水界面，纳米粒子是在界面处形成的，此结果是支撑该研究界面组装机理的关键数据。此外，通过对比气泡场景（界面机制主导）和无气泡场景（体相预组装主导）的 Cryo-SEM 结果以及其他表征，研究人员将界面组装和体相组装机制区分开来，如图 5 (c) - (e) 所示。

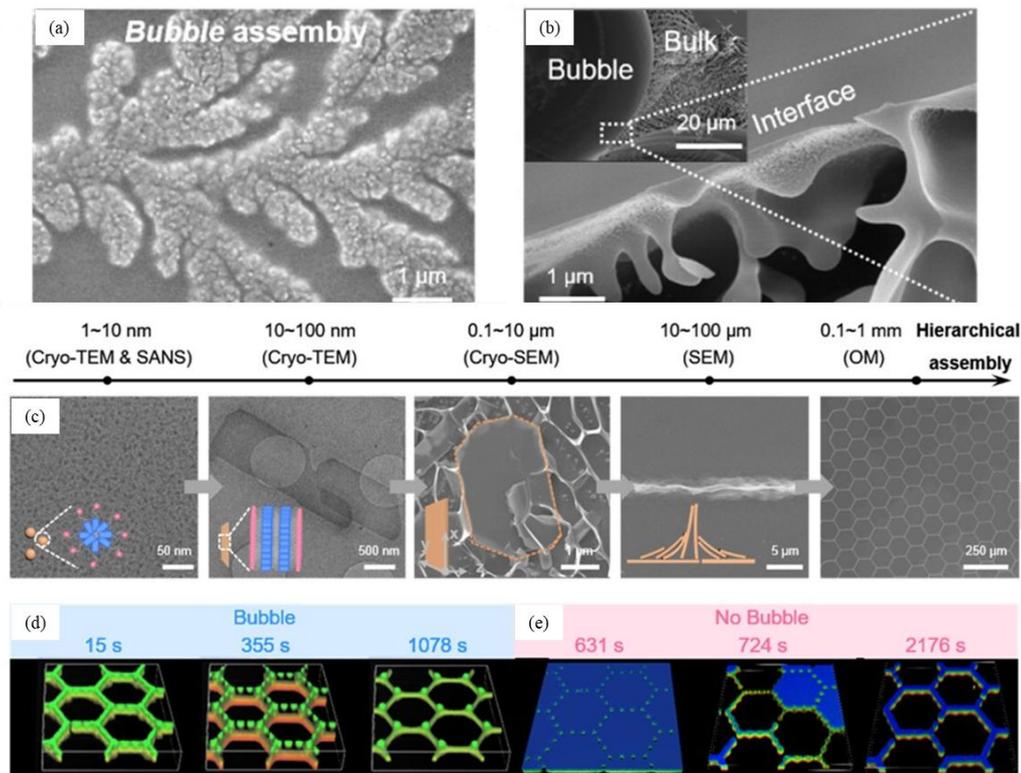


图 5、(a) 气泡组装体的 SEM 图像 (b) 含有气泡的手性两亲分子组装墨水的 Cryo-SEM 图像 (c) 在第三种调控条件下气泡组装的分级组装过程，包括中间聚集体和最终形貌的 Cryo-TEM、Cryo-SEM、SEM 和光学显微镜图像 (d) 气泡场景和(e)无气泡场景中液桥实时演化的共聚焦荧光显微镜图像

### 3.3 固液界面样品

固液界面样品主要包括固液界面的表面活性剂液滴、高分子溶液、电解质溶液等，Cryo-SEM 能够原位固定界面结构，避免液体干燥造成的界面塌陷或重组，从而获取固液界面处的微观结构、元素分布、反应过程等信息。

#### 3.3.1 用于植物叶片抗菌的全生物基凝聚层

Wang 等<sup>[8]</sup>开发了一种基于表面活性素 (Surfactin, SFT) 和木质素 (sodium lignosulfonate, SL) 的全生物基凝聚层，该凝聚层是兼具高效载药能力和广谱抗真菌活性的环保型农药，用于防治植物叶片病原菌。此外，该农药高速冲击到植物叶片后可稳定沉积在叶片表面，减少农药飘移损失。Cryo-SEM 在此研究中发挥了关键作用，直观观察到 SFT/SL/氯化钠凝聚液滴的微观形貌，液滴内部具有纳米尺度的网络状结构，如图 6 (a) 所示，该数据直接证实了凝聚层并非均相

溶液，而是具有海绵状或网络状的复杂内部结构。这种结构为其高效包封不同极性农药分子提供了丰富的微环境（亲水界面和疏水微区），是解释其高包封效率的重要结构基础。此外，研究人员还借助 Cryo-SEM 观察了凝聚液滴沉积在植物叶片后的界面精细结构。结果显示凝聚液的网络状结构能够与叶片表面的鞭毛状微观结构发生缠绕和结合，并在叶片表面形成一层薄薄的液体覆盖层(图 6(b))，该结果为阐释该凝聚层优异沉积能力的机理提供了不可或缺的证据。

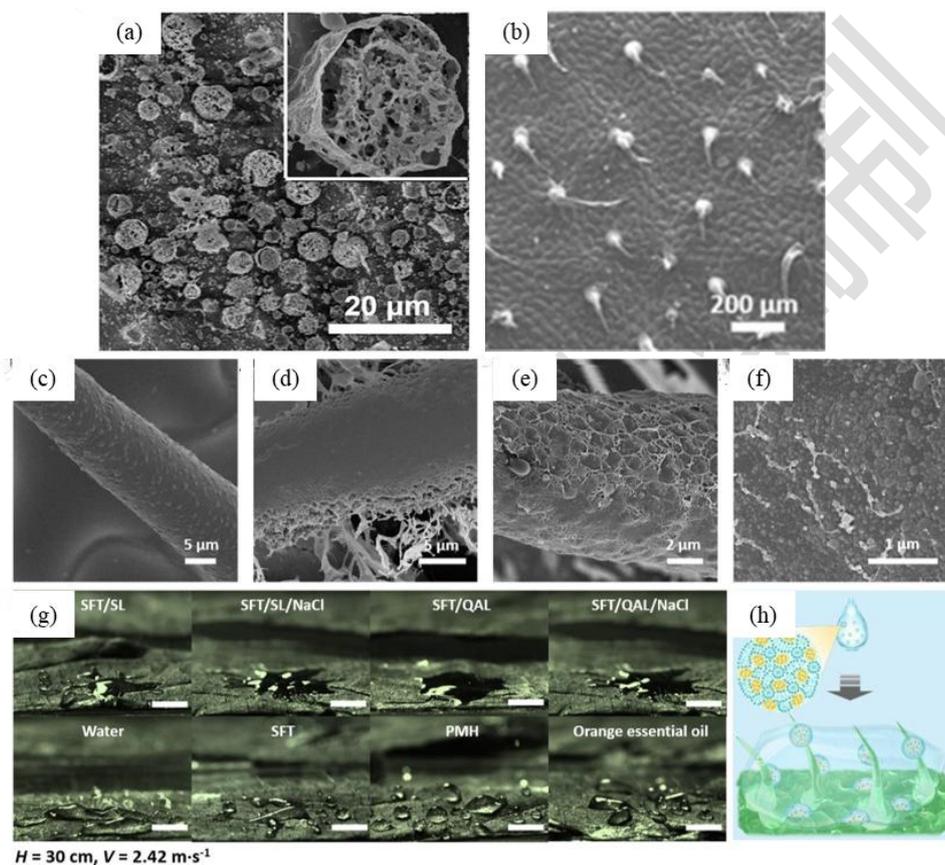


图 6、(a) SFT/木质素/NaCl 凝聚层液滴的 Cryo-SEM 图像；SFT/SL 和 SFT/SL/NaCl 凝聚层液滴在番茄叶片上的沉积行为 (b) 疏水番茄叶片表面形态的 SEM 图像 (c) 番茄叶片鞭毛状结构的 Cryo-SEM 图像 (d-e) SFT/SL 凝聚层结合并缠绕鞭毛状结构 Cryo-SEM 图像 (f) SFT/SL 凝聚层的薄液层覆盖在番茄叶片表面的 Cryo-SEM 图像 (g) 凝聚层液滴从 30 cm 高处滴落到番茄叶片上的沉积状态；比例尺为 2 mm (h) 凝聚层网络与番茄叶片微/纳米结构相互缠绕的示意图

### 3.3.2 高效包覆农药的三聚表面活性剂凝聚相体系

Liu 等<sup>[9]</sup> 通过合成具有亚胺动态共价键的三聚表面活性剂,使其在水溶液中自组装形成具有纳米网络结构的凝聚相。该凝聚层用于精准控制农药应用的高效封装、完全沉积、牢固持留、可控释放的全过程,从而提高了农药利用率并促进可持续农业发展。研究人员利用 Cryo-SEM 技术确定了无论是否包封农药,凝聚相内部均存在随机缠绕的纳米纤维网络结构,(图 7 (d-e)),这一结果直接证实了凝聚相具有复杂的多孔微观结构,为其同时高效包封不同极性农药分子提供了结构基础。同时,研究人员通过 Cryo-SEM 观察了液滴冲击后与叶片表面的界面情况,发现凝聚相的纳米网络与叶片表皮蜡质的纳米柱状结构发生了深刻的相互缠绕和钉扎(图 7 (f)),从而阐明了凝聚相在超疏水植物表面的沉积与钉扎机制。

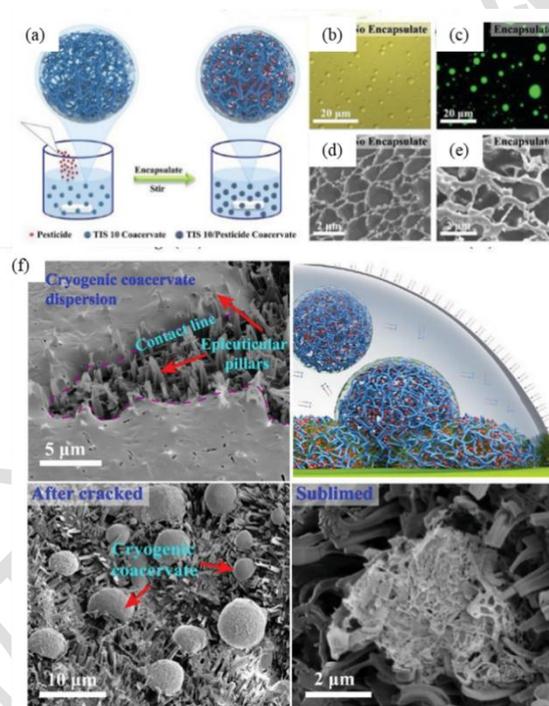


图 7、(a) TIS10 凝聚相溶液封装农药的示意图 (b) 光学显微镜图像 (c) 共聚焦激光扫描显微镜图像显示大量凝聚层微滴 (d-e) 5.0 mM TIS10 凝聚相 (无论是否封装农药) 具有纳米尺度的网络结构的 Cryo-SEM 图像 (f) Cryo-SEM 图像展示了凝聚相液滴与卷心菜叶片表面的微/纳分级结构相互缠绕的状态; 底部的两张图像是左上角图像的冷冻断裂状态; 右上角的图像展示了其模型

### 3.4 不耐电子束损伤/空气敏感型固态样品

扫描电镜表征电池材料、钙钛矿等对电子束辐照敏感或空气敏感型样品时,

为减轻电子束损伤，通常采用低加速电压与低束流的操作模式，然而该模式仍会造成样品部分损伤，同时此操作模式会降低分辨率。化学所电镜室利用 Cryo-FIB-SEM 技术，通过低温制样，低温条件下对不耐电子束损伤/空气敏感型固态样品进行精确截面切割，同时在低温条件下对切割的截面进行高分辨成像，有效减少了电子束损伤及荷电效应，从而实现了此类材料的表面形貌观察。

Zhang 等<sup>[10]</sup>通过真空紫外光诱导的液相聚合物衍生法，在商业聚乙烯隔膜表面构建超薄（仅 20 nm 厚）、Si-C 共价键锚定的 SiO<sub>x</sub> 涂层，从而使涂层与隔膜基底强效结合，以解决锂金属电池中锂枝晶生长问题，并提升了电池的安全性和循环寿命。然而由于电池隔膜材料不耐电子束，常规方法很难获取隔膜内部微观孔隙结构。研究人员应用 Cryo-FIB-SEM 技术，在低温下（<-140℃）使用镱离子束对该电池隔膜进行的截面切割，暴露出其内部的孔隙结构，利用 SEM 成像对切割出的新鲜截面进行成像（观察条件：电压 5kV 束流 86pA），如图 8（a-h）所示。Cryo-FIB-SEM 技术在该锂金属电池隔膜的改性研究中发挥了关键作用，揭示了不同制备条件下超薄 SiO<sub>x</sub> 涂层对隔膜内部微观孔隙结构的影响，从而为优化工艺参数提供了数据支撑。

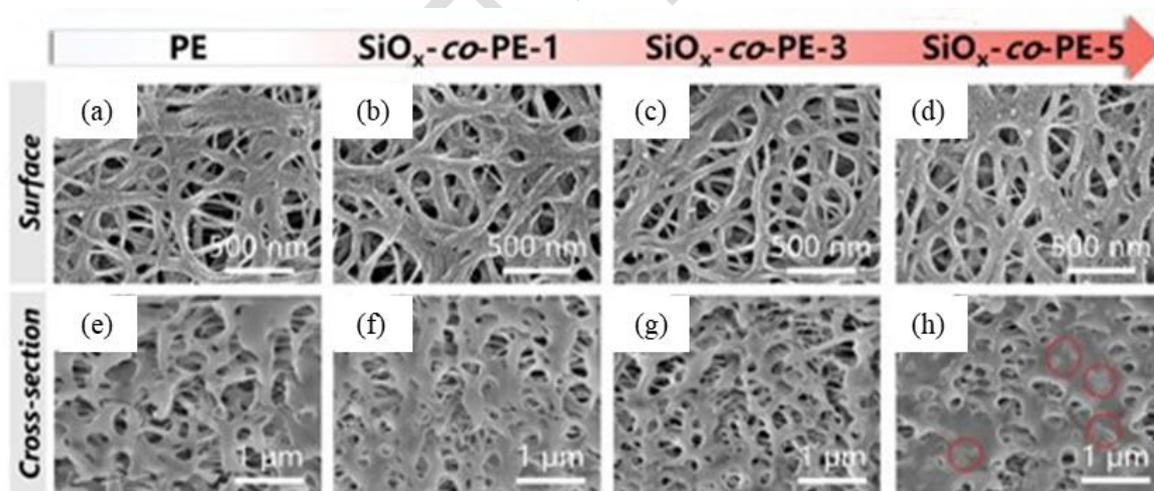


图 8、(a-d) Cryo-SEM 表面形貌图像 (e-h) Cryo-FIB-SEM 切割出的截面图像（堵塞的孔隙已用红圈标出）

### 3.5 生物样品

Cryo-SEM 在生命科学研究中具有重要作用，可用于观察细胞、细菌、酵母、动植物组织等。Cryo-SEM 可最大限度保存生物样品的原始微观结构，实现生物

样品近天然的结构观察。

### 3.5.1 仿生自组装纳米结构

Li 等<sup>[11]</sup>设计了一对磷脂仿生的谷氨酸衍生物对映体 (L/D-UG)，通过动力学与热力学控制，使其分别自组装形成高曲率的囊泡和低曲率的二维纳米晶两种结构。研究发现，由 L-氨基酸构成的纤连蛋白在 L-UG 二维晶表面以半有序模式特异性吸附，该模式有效地促进了间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的整合素 $\beta_1$  簇集，从而激活成骨分化信号通路。动物实验进一步证实，L-UG 二维晶是促进大鼠颅骨缺损修复的最有效材料。该工作首次在自组装体系中实现了手性与曲率的同步调控，并阐明了其在骨再生中的关键作用。在该研究中，冷冻电镜技术 (Cryo-SEM 和 Cryo-TEM) 作为重要表征手段，为上述研究提供了直接的形貌与结构证据，Cryo-TEM 揭示了 L/D-UG 分子由囊泡到二维晶的两步自组装机制 (图 9 (a-d))，并获得囊泡的直径与壁厚及二维晶的厚度及双层结构，直接观察到了纤连蛋白在 L-UG 二维晶表面的半有序吸附图案 (图 9 (c))。Cryo-SEM 进一步确认了二维纳米晶的形貌 (图 9 (e))，还验证了 L/D-UG 组装体与水凝胶基质复合后仍保持原有形貌 (图 9 (f))，同时进一步表征了 L-UG 组装体 (囊泡与二维晶) 能够紧密结合在细胞膜表面 (图 9 (g))，为理解材料与细胞相互作用提供了界面信息。

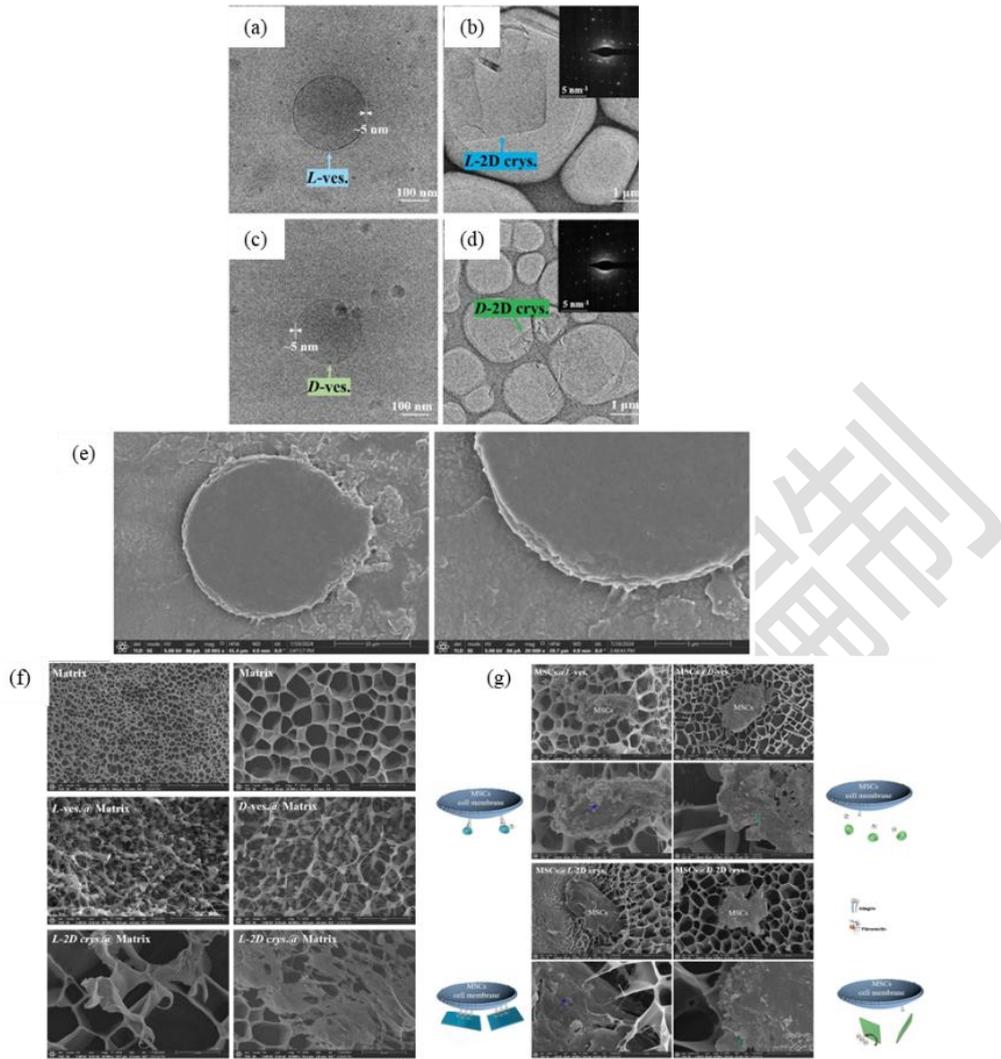


图 9、(a) 和 (c) 分别为第一天自组装的 L-UG 和 D-UG 囊泡的 Cryo-TEM 图像 (b) 和 (d) 分别为第三天自组装的 L-UG 和 D-UG 二维晶体的 Cryo-TEM 图像 (e) MSCs 的 Cryo-SEM 图像显示细胞表面光滑 (f) Cryo-SEM 图像显示，掺杂于水凝胶基质中的 UG 组装体在与水凝胶混合后，囊泡和二维晶体的形貌均得以保持；由于 UG 带负电荷，研究人员选用了带负电荷的水凝胶基质以避免 UG 组装体在水凝胶上吸附，通过 Cryo-SEM 得到了验证 (g) 水凝胶基质中 MSCs 与 UG 组装体共培养的 Cryo-SEM 图像；样品制备过程中，研究人员将间充质干细胞与 UG 组装体混合，以实现其在细胞膜表面的最大化附着；结果显示 UG 组装体在细胞膜上的吸附情况。

### 3.5.2 耐热型冻干巧克力

Li<sup>[12]</sup>等通过创新性地结合乳化技术和冷冻干燥技术，开发出一种具有优异耐热性的冻干巧克力，不改变巧克力的基本配方，通过工艺流程改变其微观结构来

实现耐热性。Cryo-SEM 技术在揭示和验证冻干巧克力微观结构的形成机理中起到了关键作用，如图 10（a）所示，Cryo-SEM 图像清晰地显示了冻干巧克力内部的多孔网络结构以及嵌入其中的球形脂肪颗粒（直径约 100  $\mu\text{m}$ ）。同时，Cryo-SEM 技术还对冻干巧克力的关键加工步骤进行了追踪，通过对冷冻后的巧克力乳液进行 Cryo-SEM 观察，研究发现乳化后形成的球形脂肪结构在冷冻阶段得到了完好保持，这证明了乳化步骤是形成油/水结构的关键（图 10（d））。

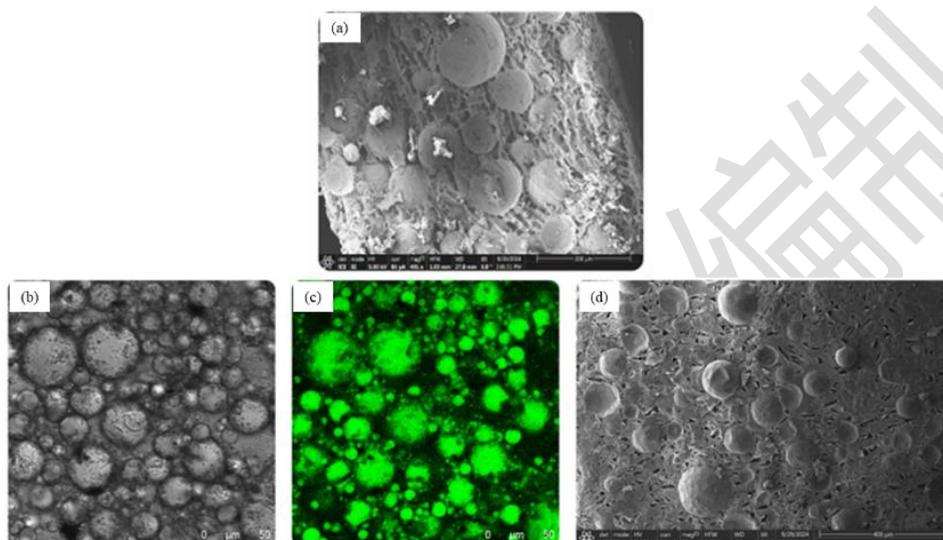


图 10、（a）冻干巧克力的 Cryo-SEM 微观结构图像（b）常规巧克力与水乳化后的光学显微图像（c）常规巧克力乳化后的激光共聚焦显微图像（d）冷冻状态下巧克力液体的 Cryo-SEM 图像

#### 四、结论

Cryo-SEM 通过快速冷冻制样技术，使含水、溶剂或电子束敏感样品在低温条件下保持原始微观结构，避免了干燥过程引起的结构破坏或电子束损伤。本文系统介绍了化学所电镜室应用 Cryo-SEM 技术在表征五类样品的应用案例，涵盖黏稠样品、溶液样品、固液界面样品、不耐辐照/空气敏感型固态样品以及生物样品。这些应用案例表明，应用 Cryo-SEM 技术能够得到高分辨形貌和成分信息，为化学、材料和生物领域的研究提供了直接的数据支撑。

## 参考文献:

1. 刘力瑶, 关波, 聚焦离子束-电子束双束电镜冷冻传输系统应用案例. *分析测试中心通讯*, **2021**, *11*, 15。
2. Pan, Y.F., et al., An Implantable Robust Micro-thermometer Uncovers the Dynamic Change of Brain Temperature. *CCS Chem.*, doi: 10.31635/ccschem.025.202506041.
3. Guo, G.G., et al., Hydrogel-filled Micropipette Enables Antifouling in Vivo Iontronic Sensing. *Sci. Bull.*, **2025**, *70*, 469.
4. Zhao, Y.R., et al., Ultrasensitive and Selective Iontronic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Nanosensor Reveals the Biphasic Redox Dynamics Invoked by l-DOPA at a Single-cell Level. *ACS Sens.*, **2025**, *10*, 8947.
5. Li, M.K., et al., Pickering Emulsions with Low Interface Coverage But Enhanced Stability for Emulsion. *Nat. Commun.*, **2025**, *16*, 2490.
6. Wang, T.D., et al., Detachable and Hierarchical Assemblies for Recyclable and Highly Efficient Oil-fouling Removal. *Nano. Res.*, **2022**, *16*, 2551.
7. Gao, J., et al., Spatiotemporal-dependent Confinement Effect of Bubble Swarms Enables a Fractal Hierarchical Assembly with Promoted Chirality. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*, 18104.
8. Wang, J., et al., Lignin/Surfactin Coacervate as an Eco-friendly Pesticide Carrier and Antifungal Agent against Phytopathogen. *ACS Nano*, **2024**, *18*, 22415.
9. Liu, B., et al., Control the Entire Journey of Pesticide Application on Superhydrophobic Plant Surface by Dynamic Covalent Trimeric Surfactant Coacervation. *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, *31*, 2006606.
10. Zhang, Y.L., et al., Covalently Anchoring an Ultrathin Conformal SiO<sub>x</sub> Coating on Polyolefin Separator for Enhanced Lithium Metal Battery Performance. *Adv. Funct. Mater.*, **2025**, *35*, 2417160.
11. Li, M.J., et al., Chirality and Curvature on Protein Adsorption and Osteogenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, *63*, e202411733.
12. Li, Q.Q., et al., Innovative Emulsification and Freeze-drying Techniques for Developing Heat-resistant Chocolates with Tunable Textures and Sensory Attributes.

*Food Chemistry*, 2025, 493, 145822.

**致谢:**

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工!

分析测试中心编制

分析测试中心编制