

扫描电镜冷冻制样及传输系统(Cryo-SEM)的应用

常规扫描电镜的样品室为高真空(10^{-3} Pa)环境,要求观察的样品干燥无挥发,而一些样品在干燥过程中会发生结构变化(如囊泡等自组装结构、凝胶、生物样品等),致使无法观察其真实结构,扫描电镜的低温冷冻制样及传输技术(Cryo-SEM)可实现对液体、半液体及对电子束敏感样品的观察。

1. 扫描电镜冷冻制样及传输系统简介

冷冻扫描电镜的制样过程分为冷冻固定、冷冻断裂、升华及导电性喷涂,首先是将样品进行冷冻固定,冷冻固定过程尽量保持样品的结构,使水在固化的过程中不结晶而成为玻璃态的水,这样水的体积不会膨胀从而不会破坏样品的原始结构,通常采用高压冷冻的方法和液氮泥快速冷冻方法。高压冷冻方法是在 2100 个大气压的压力下用液氮将样品冷冻,在此条件下水呈玻璃态。液氮泥是将液氮置于真空环境(约 0.1Pa),此时液氮为“泥”状,不沸腾,可快速冷冻样品,减少样品中水结晶的可能。冷冻固定后的液态样品,经特殊的装置在真空且低温(-100℃)的环境下将样品断裂,露出新鲜的断面,然后在真空且温度为-90℃的条件下,水进行升华,将包裹样品的水升华后,进行导电性喷涂(一般喷 Pt)。至此,冷冻制样工作完成,即可将样品通过冷冻传输系统置于扫描电镜的冷台上(温度可低至-160℃)进行观察。

图 1 是分析测试中心电镜室配置的扫描电镜冷冻制样及扫描电镜的冷台(配置于扫描电镜 S-4300),包括高压冷冻仪(及我们自行研制的液氮泥冷冻装置)、冷冻断裂及喷涂仪、真空冷冻传输装置及扫描电镜中的冷台。

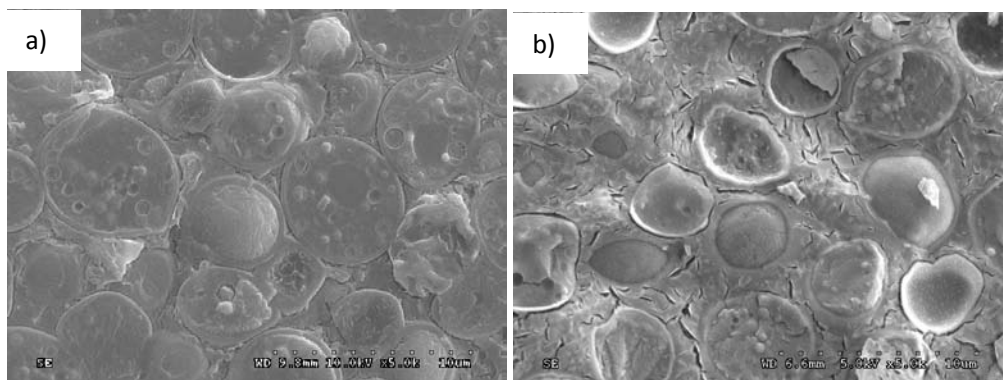
高压冷冻 ⇔ 冷冻断裂/喷涂 ⇔ 真空冷冻传输 ⇔ Cryo-SEM



● 图 1. 扫描电镜冷冻制样及传输系统的组成

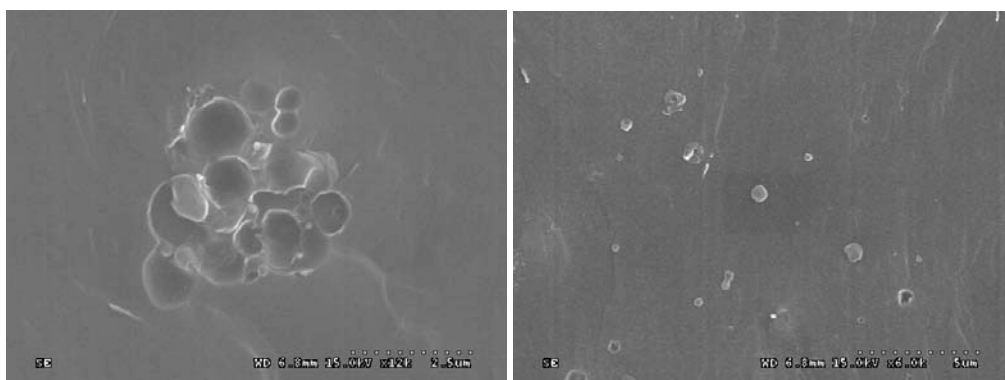
2. 冷冻扫描电镜(cryo-SEM)的应用实例

图 2 为酵母细胞(由酵母粉加水发酵制得)分别经高压冷冻和直接液氮冷冻制样, 然后冷冻断裂并进行导电性喷涂后置于扫描电镜中观察到的结构, 可以看出两种制样方法都可观察到不同截面断裂的酵母细胞, 高压冷冻的制样方法较完整的保持了酵母细胞的结构, 而直接投入液氮冷冻的方法使得酵母细胞的结构受挤压发生变形。



● 图 2. 应用 a) 高压冷冻制样和 b) 直接投入液氮冷冻制样并由冷冻扫描电镜观察得到的电镜图

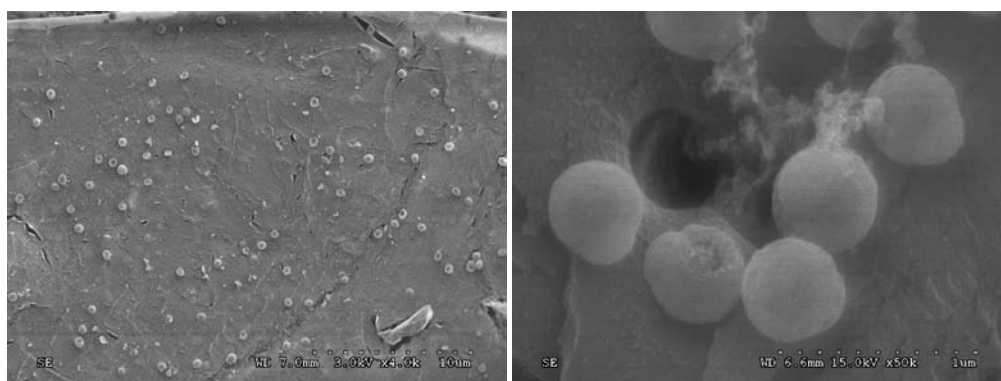
图 3 为表面活性剂形成的囊泡样品(胶体界面与热力学实验室样品)通过高压冷冻制样, 经冷冻断裂并导电性喷涂后, 置于冷冻扫描电镜中观察得到的表面形貌, 可以看出经冷冻断裂, 有些囊泡保持了完整的球型结构, 有些则从中间断裂, 从而可以看到空囊的结构。若以常温的扫描电镜观察, 样品需要先干燥, 而在干燥过程中囊泡会塌陷, 无法保持其结构。



● 图 3. 应用扫描电镜冷冻制样及传输系统观察囊泡样品得到的扫描电镜图

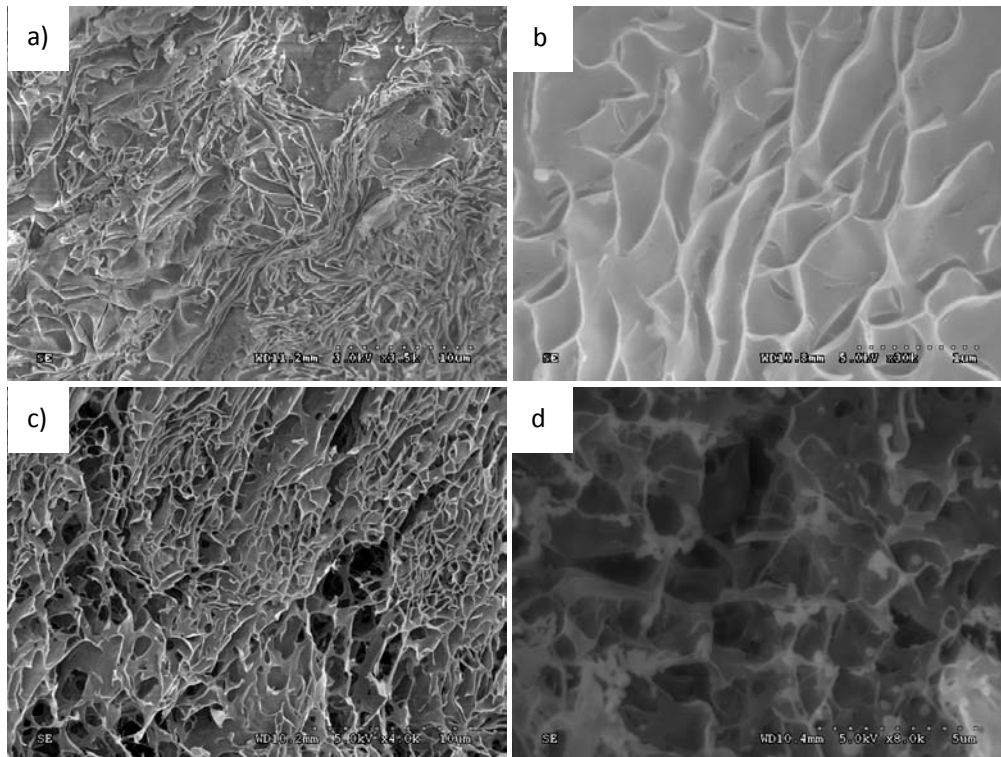
图 4 为高分子/SiO₂ 复合微球样品(高分子物理与化学实验室样品)经高压冷

冻制样，冷冻断裂并导电性喷涂后，置于冷冻扫描电镜中观察得到的表面形貌，可以看出此微球是由一个 SiO_2 球 (直径约 200nm) 和一个高分子球(直径约 400nm) 组成，由裂开的球看出高分子球为空心结构， SiO_2 球内嵌在其中，整个微球表面是比较光滑的，在溶液中还散落些小颗粒的物质，这些散落的颗粒物质并没有包覆在球上，这证明在溶液中微球的表面并没有小颗粒物质吸附。而若应用常温扫描电镜观察，在样品干燥的过程中，小颗粒会沉积在样品表面，无法判断小颗粒在溶液中是否吸附在微球表面。



● 图 4. 应用扫描电镜冷冻制样及传输系统观察高分子/ SiO_2 复合微球得到的扫描电镜图

图 5 为水凝胶样品(胶体与界面实验室样品)经冷冻固定、冷冻断裂并导电性喷涂后，置于冷冻扫描电镜中观察得到的表面形貌，可以看出此水凝胶为网状结构，相比于水升华 6min. 得到的形貌，升华 30min. 可以将网状结构中的水充分升华，从而能够显现水凝胶的三维网状结构。因此，在实际样品制备中，需要根据样品摸索合适的水升华时间。



● 图 5. 应用扫描电镜冷冻制样及传输系统观察水凝胶得到的扫描电镜图, a) 和 b) 升华时间为 6min., c) 和 d) 升华时间为 30min.

总之, 扫描电镜冷冻制样及传输系统可实现溶液样品及含水样品的冷冻扫描电镜观察, 避免了干燥过程样品结构的改变, 预计将在胶体、有机高分子、生物等样品的微观结构表征中发挥重要作用。但是冷冻扫描电镜只适用于浓度较高的溶液或悬浊液样品, 对于浓度很稀的样品, 由于扫描电镜只能看到表面一层的结构, 所以很难找到样品, 需要用冷冻透射电镜进行观察。