

冷冻扫描电镜技术的应用

▶ 刘扬 关波

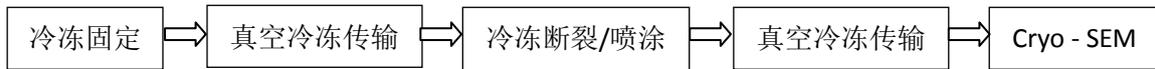
(分析测试中心电镜组 TEL: 010-62588935 Email: guanbo@iccas.ac.cn)

1. 冷冻扫描电镜概述

常规扫描电镜要求所观察的样品无水,而一些样品在干燥过程中会发生结构变化,致使无法观察其真实结构。冷冻扫描电镜技术能够对含水(溶剂)样品进行成像和分析,实现对于液态样品(如乳液、囊泡等)及不耐电子束损伤样品的微观形貌的观察。在冷冻扫描电镜观察前,液态样品经过低温冷冻固定、断裂、镀膜(喷金/喷碳)等制样处理后,再通过冷冻传输系统将其置于电镜内的冷台(温度可至-185℃)即可进行观察。其中,快速冷冻技术可使水在低温状态下呈玻璃态,减少冰晶的产生,从而不影响样品本身结构,冷冻传输系统保证样品传输过程中保持低温状态,整个系统从制样到观察都在低温下进行,尽可能保持样品在液相中的原位结构。

2. 系统组成及流程

冷冻扫描电镜系统包括冷冻固定、冷冻断裂、升华及导电性喷涂等制样设备,冷冻传输装置及扫描电镜的冷台,样品首先经过高压冷冻或液氮泥方法进行冷冻固定,然后在冷冻条件下传输到真空溅射仪中进行断裂,露出样品新鲜的断裂面,并根据样品情况进行升华防止表面被冰包覆,之后进行导电性喷涂,至此制样完成,通过冷冻传输系统将样品置于扫描电镜的冷台进行观察。分析测试中心电镜组现有的冷冻扫描电镜系统包括高压冷冻仪 Leica EM HPM100、冷冻传输样品杆 Leica EM VCT100、离子溅射仪 Leica EM ACE600、自制的液氮泥冷冻装置、冷冻扫描电镜用的冷台。



高压冷冻仪

Leica EM HPM100
液氮泥冷冻装置
Nitrogen slush freezer

冷冻传输样品杆
Leica EM VCT100

离子溅射仪
Leica EM ACE600

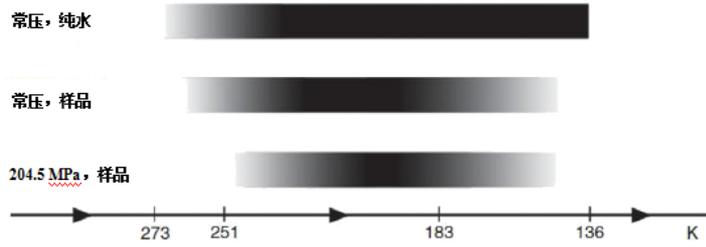
冷冻扫描电镜冷台

2.1 冷冻固定

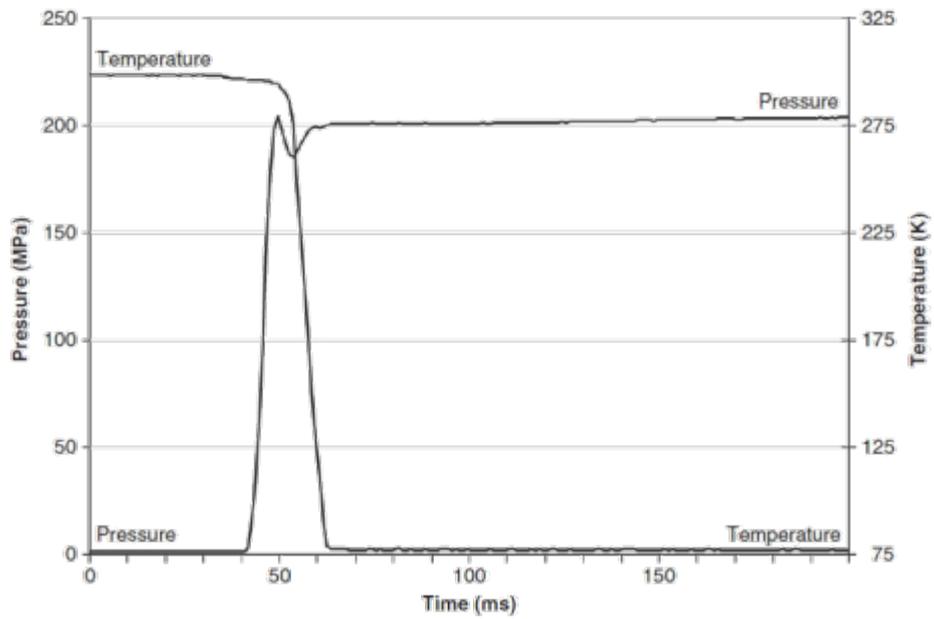
2.1.1 高压冷冻固定

冷冻固定的目标是在低温下使液态样品中的水不结晶而呈玻璃态，这样既能将样品在液相的状态固定，又避免了水结晶引起样品结构的破坏。因此，冷冻固定的关键是要阻止冰晶形成，冷冻固定是否成功，取决于冷冻过程迅速通过一个温度范围，即水开始结晶的温度到开始重结晶的温度区间，此区间受环境压力、样品浓度等因素的影响。如图 1^[1]所示，第一行是常压下的纯水，从 273 K 开始结晶，因考虑到过冷水的作用，所以从 231 K 开始结晶，当温度低于重结晶温度 136 K 时，结晶过程停止。第二行是常压下的样品，通常样品包含溶质会降低样品的熔点（与溶质浓度有关系），同时提高重结晶温度，使得结晶的温度区间减小。第三行是施加 204.5 MPa 压力的样品，可以看出，施加高压会进一步降低样品的熔点且提高重结晶的，所以结晶的温度区间进一步减小。

因此，可用高压冷冻的方式将液态样品进行快速冷冻固定，具体如图 2^[1]所示，在 10ms 内，压力由常压瞬间升高至约 200 MPa，同时用液氮使样品温度迅速下降，当通过水的结晶区间，直到温度低于约 136 K 后，即形成玻璃态的水。对于 200 μm^[3]厚的样品，样品中心区域通过这一温度区间大约需要 30 ms。



● 图 1. 冷冻固定时，溶质浓度和压力对水结晶温度区间的影响示意图



● 图 2. 高压冷冻仪冷冻曲线

具体操作流程如下，用移液枪将待测样品滴入冷冻样品夹片的下片，下片中有凹槽，可储存一定量的液体样品，然后盖上夹片上片，组成一个三明治结构，上下两片的材质均为铜镀金，之后将载有样品的整个夹片置于绿色的固定片上，推入高压冷冻仪中即可进行高压冷冻固定（图 3），每次进行一次高压冷冻，仪器会生成一条冷冻曲线，根据曲线中达到目标压力和温度的时间可初步判断冷冻固定的效果。



● 图 3. 高压冷冻仪样品装载图

2.1.2 液氮泥冷冻固定

高压冷冻固定的方法虽然能较好的使水固定在玻璃态，但是高压会影响某些样品的微观结构，而且高压冷冻仪价格昂贵。还可应用液氮方式进行冷冻固定，即将液氮置于真空中，在一定的负压下（通常约 200Pa）^[3]，液氮由液态逐渐变为固态，形成液氮泥。由于莱顿弗罗斯特效应（指液体不会润湿炙热的表面，而仅仅在其上形成一个蒸汽层的现象），当直接将样品放入液氮中时，样品周围的液氮会立即沸腾，将样品包裹在绝缘的氮气中，从而使样品不能立即降温，水成为结晶态。而将样品置于液氮泥中，由于液氮泥不存在沸腾现象，所以样品不会收到莱顿弗罗斯特效应的影 响，可迅速降温通，使得水分子来不及重排成晶体，从而形成玻璃态的水。如果是液体样品，可用夹片装载样品直接投入到液氮泥中进行冷冻固定，固体样品则可直接用低温胶粘在样品台上投入液氮泥中进行固定。

2.2 冷冻断裂/喷涂

将应用高压冷冻或液氮泥冷冻固定的样品在液氮中转移至冷冻样品台装载装置中，在其中将冷冻好的样品装载于冷冻传输样品杆上。然后通过冷冻传输样品杆将载有样品的样品台转移至 EM ACE600 溅射仪中（图 4）。应用溅射仪中的刀对样品进行冷冻断裂，露出样品新鲜的断面，对于有些样品，在 173K 下进行升华，避免样品被水包裹覆盖，之后进行导电性喷涂，避免在扫描电镜观察过程中放电现象的发生。（图 5）。



● 图 4. 冷冻样品传输至溅射仪



● 图 5. 冷冻断裂及喷涂

2.3 冷冻扫描电镜观察

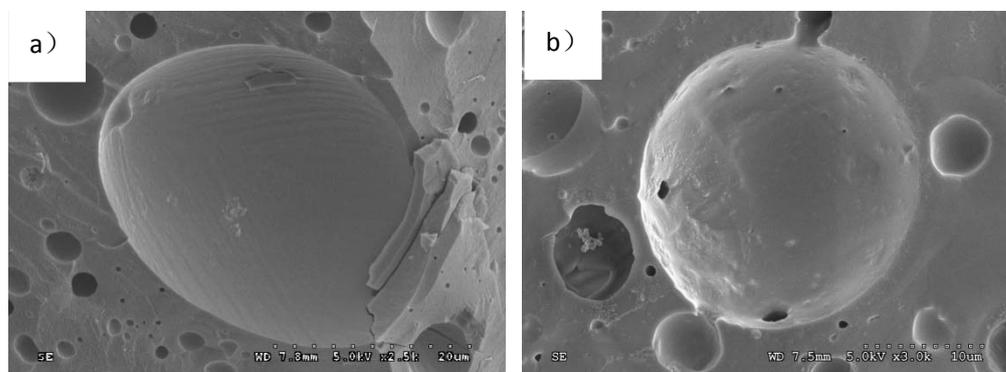
通过冷冻传输样品杆将断裂、喷涂好的样品转移至扫描电镜的冷台，冷台是由液氮降温经铜带导温来控制温度（123K），在扫描电镜观察时，通常应用较低的加速电压和较小的束流，以减弱放电现象和电子束对样品的损伤。由于整个传输及观察过程都保持在低温状态，所以尽可能的保持了样品在液相的原位结构。

3. 冷冻扫描电镜的应用实例

3.1 微乳液

图 6 为微乳液样品分别经高压冷冻和液氮泥冷冻固定，并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出冷冻方法能够保持乳液中液滴

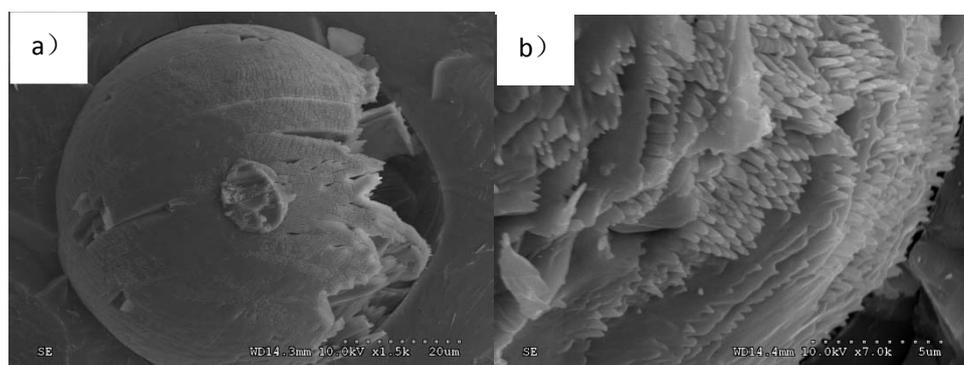
的结构，液滴大小不一， $2\ \mu\text{m}$ 至 $20\ \mu\text{m}$ 。但是应用高压冷冻方法制得的样品，液滴呈椭球型，可能是由于液滴受高压挤压而变形所致，而应用液氮泥制样得到的样品液滴呈球形，保持了其本来的形貌。



● 图 6. 微乳液样品经 a) 高压冷冻固定 b) 液氮泥冷冻固定得到的冷冻扫描电镜图

3.2 纳米片稳定的水包油体系

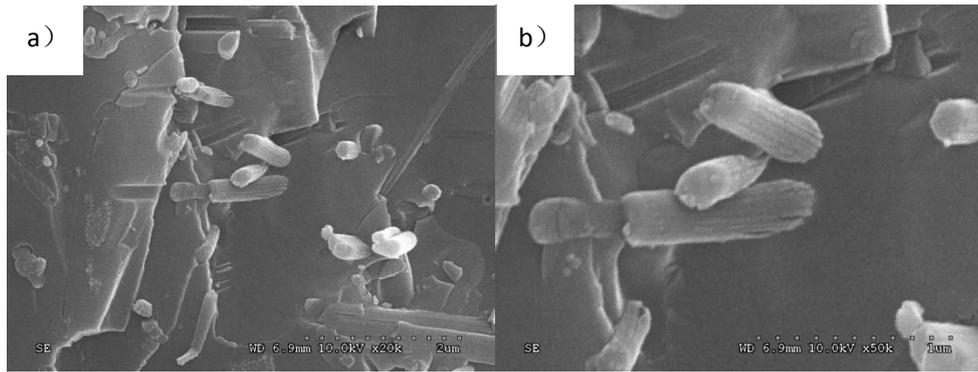
图 7 为用纳米片稳定的微乳液经液氮泥冷冻固定、并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出纳米片包覆在油滴表面，并且沿一定的方向排列，据此可以得出纳米片在水包油稳定体系中的存在状态，从而推断稳定机理。



● 图 7. 纳米片稳定的水包油体系的冷冻扫描电镜图 a) 放大倍数 1.5K b) 放大倍数 7k

3.3 磷脂、二肽分子自组装体

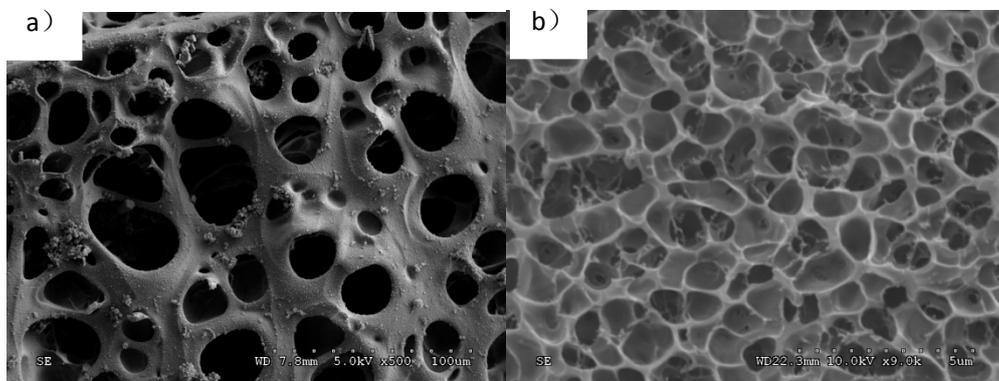
图 8 是磷脂、二肽分子自组装体经液氮泥冷冻固定并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图，可以看出分子组装成棒状结构，棒的粗细在 500nm ，每根棒又是由多根纤维组成。



● 图 8. 磷脂、二肽分子自组装体的冷冻扫描电镜图

3.4 水凝胶

图 9 是水凝胶分别经过冷冻干燥之后在常温扫描电镜上观察到的形貌图和经液氮泥冷冻固定并经冷冻断裂/喷涂后，传输到冷冻扫描电镜得到的形貌图。可以看出冷冻干燥的水凝胶孔径较大且稀疏，可能是由于水分在真空中挥发后样品因为没有水分的填充导致孔塌陷。而未经过可以看出孔径很小且密集，因为真空干燥的水凝胶在冷冻固定的时候有水分填充，不会导致样品塌陷，因此冷冻扫描电镜的方法保持了水凝胶本身的结构。



● 图 9. a) 经过真空干燥过后的水凝胶常规电镜图 b) 液氮泥冷冻固定的水凝胶冷冻扫描电镜图

参考文献

- [1] Dimitri, Vanhecke.; Werner, Graber.; Daniel Studer. *Methods in cell biology*. **2008**, 88.151
- [2] Pederson, R. C.; Miller, C. D.; Arvidson, J. M.; Blount, K.; Schulze, M. *Advances*

in Cryogenic Engineering Materials. New York: Springer US, 1998.

[3] Kanno,H.; Speedy, R.J. and Angell, C.A. *Science*,**1975**,*189*, 880.

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！

感谢分析测试中心袁震老师在冷冻扫描电镜实验过程中对于排除仪器故障的帮助！