

SAOMIAO
DIANJING
JISHU

SAOMIAO
DIANJING
JISHU
JIQI YINGYONG

JIQI YINGYONG

郭素枝 编著

扫描电镜技术 及其应用



厦门大学出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

扫描电镜技术及其应用

郭素枝 编著

厦门大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

扫描电镜技术及其应用/郭素枝编著. —厦门:厦门大学出版社,2006.2
ISBN 7-5615-2519-2

I. 扫… II. 郭… III. 扫描电子显微镜 IV. TN16

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 004101 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门大学 邮编:361005)

<http://www.xmupress.com>

xmup@public.xm.fj.cn

沙县方圆印刷有限公司印刷

2006年2月第1版 2006年2月第1次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:11.5

字数:286千字 印数:000 1—2 000册

定价:18.00元

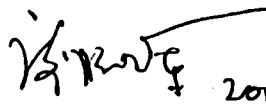
本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换

序

扫描电镜是一种大型的精密仪器,为微观世界的探测提供了一种新的研究手段,不仅用于植物学、动物学、医学、微生物学、古生物学、考古学、材料学、化学、物理学、电子学、地质矿物学、食品科学等领域的研究,而且还广泛地应用于半导体工业、陶瓷工业、化学工业、石油工业等生产部门。随着扫描电镜技术的普及和发展,扫描电镜已经从高层次的研究发展成为应用广泛的测试手段,并且在基础研究和应用研究上都取得了显著成果。

扫描电镜作为研究测试手段,较一般的分析仪器测试来得复杂,加上所涉及的范围极为广泛、研究材料种类繁多、测试方法差异较大,要获得满意的观察结果,拍出一张优质的扫描电子像,除了仪器要有高的分辨率以及良好的性能,使用者要熟练掌握仪器操作技术外,更重要的是必须根据样品的性质和特点,科学地选择或探索样品的制备技术。因此,为了各学科能够更好地应用扫描电镜技术做各种材料的研究,出版一本较为全面、系统的著作显得非常必要。有鉴于此,郭素枝高级实验师根据多年来从事扫描电镜技术工作及制样技术的实践经验,结合相关的研究工作以及扫描电镜技术的最新进展,编著了《扫描电镜技术及其应用》一书。此书图文并茂,其中大部分图片为作者自己所摄制,许多图解为作者的实践经验总结,有利于读者理解与阅读。

相信此书的出版不仅可供有关高校作为本科生、研究生教材之用,而且对应用扫描电镜技术的科研人员及相关各个学科的教学、科研工作者也具有重要的参考价值。为此,乐于为序。

 2005-06-06

前 言

自从 1965 年第一台商品扫描电镜问世以来,日本、荷兰、德国、美国和中国等相继制造出各种类型的扫描电镜。经过 40 年的不断改进,扫描电镜的分辨率从第一台的 25 nm 提高到现在的 0.01 nm,而且大多数扫描电镜都能同 X 射线波谱仪、X 射线能谱仪、扫描探针、环境样品室和自动图像分析仪等组合,成为一种对表面微观世界能够进行全面分析的多功能电子显微仪器。

扫描电镜观察结果是以二次电子图像或照片的形式给予的,所获得的图像能否如实地反映出实际被研究样品表面的微细形态结构与诸多因素有关,除仪器功能上的原因以及观察条件的设置外,更重要的因素在于样品的制备技术。样品制备方法不合适,常使研究结果不理想,有时甚至无法继续开展工作。因此,作者在编写过程中对于样品制备方法(根据不同材料)、测试条件以及解释分析结果所需要的基本原理、方法和观察条件的设置给予必要的介绍,以期读者能够正确地选择和运用这些技术去解决研究中遇到的各种问题。

目前有关扫描电镜技术及其应用的系统书籍极少。本书是作者根据多年来从事扫描电镜技术工作及制样技术的实践经验,并结合扫描电镜技术的最新进展和一些典型的应用实例,以及为研究生讲授《生物电子显微技术》和《仪器分析》课程中“扫描电镜技术及其应用”所用讲义的基础上编写而成的。作者认为,本书的出版可为应用扫描电镜技术研究的科研人员提供具有实用价值的参考资料,也可为各个学科的教学、科研人员参考使用。此外,本书还可作为研究生、本科生的教材。

本书初稿完成后,承蒙福建农林大学周宝焜教授、蒋元霖编审、福建省农科院电镜室黄进华高级工程师审阅;修改稿得到福建农林大学邱栋梁教授审阅;福建农林大学邓传远博士、李冬梅老师、杨攀同学、洪晓婷同学为本书作了部分文字录入、图片扫描、制图和插图等工作;此外还得到学校领导及同事的关心与支持,在此一并表示衷心的感谢。

最后衷心感谢我的老师、中国科学院院士谢联辉教授对我的研究和写作给予许多支持和鼓励,并从百忙中抽出宝贵时间为本书作序。

本书在编著过程中,参阅了国内外有关方面的专著和文献资料,在此向原作者表示诚挚的谢意。

限于编著者的学识水平,书中错误和纰漏难免,恳请相关方面的专家和读者不吝赐教。

编著者

2005 年 6 月

目 录

第一章 扫描电镜概述	(1)
第一节 发展背景	(1)
一、光学显微镜的极限分辨率	(1)
二、扫描电镜的研制历程	(3)
第二节 扫描电镜的类型及其展望	(5)
一、扫描电镜类型介绍	(5)
二、展望.....	(13)
第二章 扫描电镜的用途	(15)
第一节 在生命学科中的应用	(15)
一、植物学.....	(15)
二、动物学.....	(17)
三、医学.....	(18)
四、古生物学.....	(18)
五、考古学.....	(19)
第二节 在其他基础学科中的应用	(20)
一、材料学.....	(20)
二、物理学.....	(21)
三、化学.....	(22)
第三节 在工业中的应用	(22)
一、半导体工业.....	(22)
二、陶瓷工业.....	(24)
三、化学工业.....	(25)
四、石油工业.....	(25)
五、食品科学.....	(28)
第三章 扫描电镜的工作原理和结构	(30)
第一节 工作原理和主要结构	(30)
一、工作原理.....	(30)
二、主要结构.....	(30)
第二节 扫描电镜成像原理和成像过程	(34)
一、成像原理.....	(34)
二、成像过程.....	(35)

三、扫描电镜的特点	(38)
第三节 影响扫描电镜图像形成和图像质量的因素	(39)
一、影响图像形成的因素	(40)
二、影响图像细节清晰的因素	(42)
三、影响图像反差的因素	(44)
第四章 扫描电镜的使用	(45)
第一节 扫描电镜的操作	(45)
一、电镜启动	(45)
二、样品的安装	(45)
三、观察条件的选择	(45)
四、观察图像的操作方法	(47)
第二节 扫描电镜图像常出现的质量问题	(51)
一、产生的原因	(51)
二、损伤	(53)
三、污染	(54)
四、放电	(54)
第五章 扫描电镜微区成分分析技术	(56)
第一节 概述	(56)
第二节 X 射线波谱分析	(57)
一、波谱仪的基本原理和分析特点	(57)
二、波谱仪的结构和工作原理	(58)
三、检测中常见的问题	(58)
四、X 射线波谱的注释	(60)
五、分析方法	(60)
第三节 X 射线能谱分析	(62)
一、能谱仪的基本原理和分析特点	(62)
二、能谱仪的结构和工作原理	(62)
三、能谱仪的操作要点	(63)
四、能谱仪伪峰的识别	(64)
五、能谱 MCS 分析模式	(65)
六、能谱仪和波谱仪的比较	(67)
第四节 X 射线荧光谱分析	(68)
一、分析原理和分析特点	(68)
二、在样品室中 X 射线源的结构	(68)
三、分析条件的选择	(69)
第五节 X 射线成分分析技术的应用	(69)
一、在生物学领域中的应用	(69)
二、在材料科学中的应用	(70)

三、特殊试样的应用.....	(70)
第六节 扫描电镜成分分析技术的发展前景	(71)
第六章 样品的常规制备方法	(74)
第一节 对样品处理的要求	(76)
一、研究样品表面要处理干净.....	(76)
二、研究样品必须彻底干燥.....	(76)
三、非导体样品的导电处理.....	(77)
四、保护样品研究面.....	(77)
五、要求标记物要有形态.....	(78)
第二节 取样、清洗、固定	(78)
一、取样.....	(78)
二、粗样清洗.....	(78)
三、样品固定.....	(79)
第三节 脱 水	(84)
一、脱水剂.....	(84)
二、脱水的原理与要求.....	(84)
三、脱水方法.....	(84)
第四节 干 燥	(85)
一、干燥要求.....	(85)
二、干燥方法.....	(85)
第五节 粘 样	(93)
一、粘样的目的.....	(93)
二、粘贴样品的材料.....	(93)
三、注意事项	(93)
第六节 样品的导电处理	(93)
一、金属镀膜法.....	(94)
二、导电染色法.....	(96)
第七章 扫描电镜的暗室技术	(97)
第一节 暗室概况	(97)
一、暗室设计与设备要求.....	(97)
二、暗室的工作内容.....	(98)
三、暗室技能.....	(98)
四、暗室常用的药品及其性能、作用	(98)
五、安全灯的选用和控制	(100)
第二节 底片的冲洗工艺.....	(101)
一、D-76 和 D-72 显影液配方	(101)
二、定影液配方	(102)
三、显影与定影的原理	(102)

四、胶卷的冲洗程序	(102)
五、胶卷冲洗中常出现的问题	(103)
六、冲洗胶卷时应注意的事项	(104)
七、底片的保存及注意事项	(104)
第三节 照片的冲洗工艺	(105)
一、照片的冲洗程序	(105)
二、正确曝光是保证照片质量的关键	(106)
三、影响印放的正确曝光的因素	(107)
四、影响显影效果的主要因素	(108)
第四节 底片和照片缺陷的处理技术	(108)
一、提高底片和照片的反差	(108)
二、底片减薄	(109)
三、底片加厚	(109)
第五节 实验废液处理	(110)
一、废液的收集	(111)
二、废液的处理	(111)
三、废液处理的注意事项	(113)
第八章 扫描电镜图像计算机处理和储存技术	(114)
第一节 计算机处理图像	(114)
一、二次电子图像的计算机处理过程	(114)
二、二维图像的计算机处理	(115)
三、计算机进行图像的三维重构	(116)
四、图像识别技术	(117)
五、计算机的图像处理语言	(118)
第二节 计算机储存图像	(120)
一、计算机储存图像的特点	(120)
二、全自动图像处理技术	(120)
第九章 不同试样的制备方法介绍	(122)
第一节 生物样品制备技术	(122)
一、孢子的固定	(122)
二、酵母的固定	(122)
三、原生动物的固定	(123)
四、植物组织的特殊固定方法	(124)
五、单固定快速脱水法	(125)
六、鱼类细胞单固定半程序微波辐射法	(125)
七、贴壁培养细胞的单固定氯化金染色法	(125)
八、血细胞制样方法	(126)
九、血细胞 E 花环样品制备	(127)

十、明胶膜收集游离细胞的制样方法	(127)
十一、单细胞藻类的制样方法	(128)
十二、菌落制样方法	(128)
十三、细菌液体培养物制样方法	(129)
十四、真菌熏蒸制样方法	(129)
十五、酵母菌苯乙烯割断扫描电镜观察	(130)
十六、原生质体的制样方法	(130)
十七、染色体的制样方法	(131)
十八、植物花粉粒的制备技术	(131)
十九、叶表皮制样方法	(133)
二十、木材立方体扫描样品制备技术	(134)
二十一、植物材料的冷冻割断制备技术	(135)
二十二、动物器官的制样技术	(136)
二十三、线虫扫描电镜样品的制备	(140)
二十四、池塘底泥中轮虫冬卵的扫描电镜观察	(143)
二十五、鱼类耳石日轮超微结构的扫描电镜观察	(143)
二十六、肾结石的扫描电镜观察	(144)
二十七、扫描电镜连续观察长毛发的方法	(144)
二十八、针插或乙醇浸泡标本的样品制作	(144)
二十九、扫描电镜样品的导电法	(145)
三十、包埋与非包埋切片的样品处理方法	(147)
三十一、免疫扫描电镜方法	(150)
第二节 非生物样品制备技术	(154)
一、块状导电样品制备	(154)
二、粉末样品制备	(154)
三、土壤试样的制备	(156)
四、显示三维物理结构的制样技术	(157)
五、斜剖金相面技术	(160)
六、蚀坑技术	(161)
主要参考文献	(165)

第一章 扫描电镜概述

电子显微镜技术是显微技术的一个重要分支,是一门现代化的显微科学。显微技术的核心是显示肉眼所不能直接看到的物质的手段问题,准确地说就是显微仪器。光学显微仪器种类较多,如生物显微镜、体视显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜、万能显微镜、紫外线显微镜、偏光显微镜等等。借助这些仪器我们能直接看到各种细菌、动植物的细胞及其内部更细微的结构。光学显微镜的分辨率最高只能达到 200 nm,有效放大倍率为 1 000~2 000 倍。如果研究比 200 nm 更小的结构,如物质的分子、原子等,光学显微镜便无能为力了。于是,科学家就发明了电子显微镜,简称电镜(electron microscopy, EM),它是利用电子束对样品放大成像的一种显微镜,包括扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电镜(transmission electron microscope, TEM)两大类型,其分辨率最高达到 0.01 nm,放大倍率高达 80 万~100 万倍。借助这种电镜我们能直接看到物质的超微结构。从第一台电镜问世至今,电镜技术在各学科的应用研究取得了可喜的成就。

第一节 发展背景

一、光学显微镜的极限分辨率

1665 年 Robert Hooke(罗伯特·虎克)发明了第一台光学显微镜,并用这台光镜第一次看到软木塞的细胞。后来 Leewenheek(李文赫克)改进了这台仪器,用它看到了单细胞如藻类细胞、鱼的红细胞,从此揭开了显微技术的序幕。

到 1898 年,光学显微镜经历了 230 多年的改进,已经达到非常完善的程度。从分辨率来讲,它已经达到了极限分辨率,已接近它的理论极限,即 200 nm。但是,世界上有些物质的微观结构非常小,其大小只能用微米或纳米来表示,如病毒、物质的分子、原子等。为了提高光学显微镜的分辨率,科学家们作了大量的研究,但是再也无法提高光镜的分辨率了。

所谓分辨率是指在特定的情况下拍摄的图像上测量两亮区之间的暗间隙宽度,然后以之除以总放大倍数,其最小值即为分辨率,也就是人们以肉眼借助显微仪器能区别开两个微体的最小距离。如果指的是两个点间的最小距离为点分辨率,如果指的是两条线(或者两个晶体面)间的距离为线分辨率(或晶格分辨率)。正常人眼的分辨率是指人眼在距离物体 25 cm 处(人眼最佳分辨距离)能分辨的两点间的最小距离。人眼的分辨率为 0.1

~0.25 mm。如果用肉眼观察比 0.1 mm 更小的物体,就必须借助显微镜了。

例如,要把 200 nm 的微体放大到人眼所能观察到的尺寸,最低放大倍数应该是:

$$M = \frac{R}{\delta} = \frac{0.1 \times 10^6 (\text{nm})}{200 (\text{nm})} = 500 (\text{倍}) \quad (1-1)$$

式中 M 为放大倍率, R 为人眼分辨率, δ 为仪器分辨率。

这就是说,要把 200 nm 的物体放大 500 倍,我们才能看到它,而且要求我们的眼睛分辨率是 0.1 mm。这个最低放大倍率 (M) 为有效放大倍率。如果借助显微镜放大 1 000 倍,物体就有 0.2 mm,看起来就舒适多了,再放大就不必要了,称为空放大,因为它并不增加新的信息。

作为放大倍率这个参数,光学显微镜也可以达到 5 万~10 万倍,但是并不能增加新的信息,也就是说并不能提高其分辨率。问题的关键不在显微镜本身,而是在光线上。光学显微镜是依靠可见光来看东西的,可是人眼能看到的只是波长为 400~760 nm 的光波:光在传播中碰到的物体如果大于这段波长,就会被物体挡住,发生反射,就可以看到它的像;如果物体小于 200 nm,光波就会经过它旁边继续向前传播,就看不见图像。德国理论光学家 E Abbe 经过长期的艰苦探索,于 1918 年终于揭示了这个奥秘。他指出:作为光镜照明源的光波波长是限制光镜分辨率的基本因素。从理论上讲,光镜无论怎样完善也无法看到比光波波长更小的物体。他进一步指出限制光镜分辨率的具体原理是光的衍射行为。光的衍射效应对分辨率具有量的限制性,可以用公式表示如下:

$$\delta = \frac{h\lambda}{N \sin\alpha} \quad (1-2)$$

式中: δ 为恰能分辨两个物点的距离, $h=0.61$, λ 为波长, N 为物间介质的折射系数, α 为入射光束孔径角的一半, $N \sin\alpha$ 为数值孔径。

光学显微镜的照明光源在可见光(390~760 nm)的波长范围,取 500 nm,入射光束的孔径角最大为 180° ,其半角为 90° , $\sin\alpha = \sin 90^\circ = 1$ 。以香柏油作为浸没油,它的折射系数 $N=1.51$,代入上述公式得:

$$\begin{aligned} \delta &= (0.61 \times 500) / (1.51 \times 1) \\ &= 305 / 1.51 \\ &= 201.99 (\text{nm}) \end{aligned} \quad (1-3)$$

由(1-3)式得知,光学显微镜的极限分辨率为 200 nm,其极限放大倍数为 2 000 倍。

由光学显微镜的极限分辨率得知:要提高显微仪器的分辨率,就必须减小波长或增加数值孔径。于是,科学家们致力于研究可以作为照明源的各种电磁波的波长,见表 1-1。

表 1-1 各种电磁波的波长

电磁波	电波	红外线	可见光	紫外线	X 射线	γ 射线
波长范围(nm)	$10^{12} \sim 10^6$	$5 \times (10^5 \sim 10^3)$	760~390	390~13	10~0.05	0.1~0.005

表中紫外线的波长比可见光小,但不易透过玻璃,容易被空气中的氧吸收。短波紫外光显微镜必须用曲面镜成像并在真空中操作,其分辨率只能提高 5 倍,所以采用短波紫外光不是提高分辨率的有效途径。X 射线波长比紫外线短,但 X 射线通过物体时不能折射

成像,只能通过投影方式成像,因而像的清晰度、放大倍数和分辨率都受到限制,达不到研究目的。高速运动的电子在电场和磁场中可以被折射和聚焦,波长为 0.005 nm 的电磁波要比绿色可见光的波长小 10^5 ,可见采用短的电磁波波长是提高显微镜分辨率的极为有效的途径。

二、扫描电镜的研制历程

1924年,法国科学家 De Broglie 证明任何粒子在高速运动的时候都会发射一定波长的电磁辐射,其辐射波的波长与粒子的质量和运动速度成反比,用公式表示如下:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (1-4)$$

式中 λ 代表波长, h 为普朗克常数, m 为粒子的质量, v 为粒子运动的速度。

如果高速运动的粒子是电子,那么,电子在真空中运动的速度与加速电压有关,根据能量守恒定律,可以得到:

$$\frac{1}{2}mv^2 = eV \quad (1-5)$$

式中, e 为电子的电荷绝对值, V 为加速电压。

化公式(1-5)为电子的速度:

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}} \quad (1-6)$$

将公式(1-6)代入公式(1-4),得辐射波波长与加速电压 V 有如下关系:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2emV}} \quad (1-7)$$

把已知的物理常数

$$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{S},$$

$$e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C},$$

$$m = 9.1 \times 10^{-31} \text{ kg},$$

代入公式(1-7),得

$$\lambda = \frac{1.225}{\sqrt{V}} (\text{nm}) \quad (1-8)$$

电镜中所用加速电压都较高,电子运动的速度与光速相比已不可忽略,须考虑相对论效应。经相对论修正后,(1-8)式为

$$\lambda = \frac{1.225}{\sqrt{V_r}} (\text{nm}) \quad (1-9)$$

式中 V_r 为相对论效应,其与加速电压 V 有如下关系:

$$V_r = V(1 + 0.978 \times 10^{-6}) \quad (1-10)$$

将公式(1-10)代入公式(1-9),得

$$\lambda = \frac{1.225}{V^{\frac{1}{2}}} (1 + 0.978 \times 10^{-6})^{\frac{1}{2}} (\text{nm}) \quad (1-11)$$

由(1-11)得知,电子波长 λ 是由加速电压 V 决定的(见表 1-2)。

表 1-2 不同加速电压的电子波长

加速电压 (kV)	50	75	100	200	300	400	500	1 000
波长 λ (nm)	0.005 5	0.004 5	0.003 9	0.002 5	0.002	0.001 7	0.001 2	0.000 7

这种随加速电压改变的电子波长叫做德布罗利波,这为电镜的研制打下了基础,但仅有电子流辐射波还不行,因为并没有解决电子流聚焦成像的问题。

1926年,德国科学家 Garbor 和 Busch 发现用铁壳封闭的铜线圈对电子流能折射聚焦,即可以作为电子束的透镜。

上述两个重大发现为电镜的研制提供了重要的理论基础。德国科学家 Ruska 和 Knoll 在前面两个发现的基础上,经过了几年的努力,终于在 1932 年制造出第一台电子显微镜。尽管它十分粗糙,分辨率也很低,但它却证实了上述两个理论的实用价值。经过改造,在 1933 年研制的电镜分辨率为 50 nm,放大倍率为 1.2 万倍,到 1938 年分辨率为 10 nm,放大倍率为 20 万倍。1939 年这一成果被正式交付德国西门子公司批量生产,当时生产了 40 台投入国际市场。

1932 年 Knoll 提出了扫描电镜可成像放大的概念,并在 1935 年制成了极其原始的模型。1938 年德国的阿登纳制成了第一台采用缩小透镜用于透射样品的扫描电镜。由于不能获得高分辨率的样品表面电子像,扫描电镜一直得不到发展,只能在电子探针 X 射线微分析仪中作为一种辅助的成像装置。此后,在许多科学家的努力下,解决了扫描电镜从理论到仪器结构等方面的一系列问题。最早期作为商品出现的是 1965 年英国剑桥仪器公司生产的第一台扫描电镜,它用二次电子成像,分辨率达 25 nm,使扫描电镜进入了实用阶段。

1968 年在美国芝加哥大学,Knoll 成功研制了场发射电子枪,并将它应用于扫描电镜,可获得较高分辨率的透射电子像。1970 年他发表了用扫描透射电镜拍摄的铀和钍 BICA 中的铀原子和钍原子像,这使扫描电镜又进展到一个新的领域。

1982 年德国物理学家 Gerd Binnig 与瑞士物理学家 Heinrich Rohrer 在瑞士苏黎世研究所工作时发明了扫描隧道显微镜 (STM),并因此共同获得了当年的诺贝尔物理奖。

1986 年 Binnig 等发明了原子力显微镜,可以在任何环境(如液体、空气)中成像,在纳米级、分子级水平上作研究。商用产品出现在 1989 年。

我国电镜研制起步较迟,1958 年在长春中国科学院光学精密机械研究所生产了第一台中型电镜。1975 年在中国科学院北京科学仪器厂成功试制了第一台 DX-3 型扫描电镜,分辨率为 10 nm,填补了我国扫描电镜的空白。

第二节 扫描电镜的类型及其展望

一、扫描电镜类型介绍

20世纪70年代以来,扫描电镜的发展主要在:①不断提高分辨率,以求观察更精细的物质结构及微小的实体以至分子、原子;②研制超高压电镜和特殊环境的样品室,以研究物体在自然状态下的形貌及动态性质;③研制能对样品进行综合分析(包括形态、结构和化学成分等)的设备。

截止到目前,科学界已成功研制出的设备有典型的扫描电镜、扫描透射电镜(STEM)、场发射扫描电镜(FESEM)、冷冻扫描电镜(Cryo-SEM)、低压扫描电镜(LVSEM)、环境扫描电镜(ESEM)、扫描隧道显微镜(STM)、扫描探针显微镜(SPM)、原子力显微镜(AFM)等,以及多功能的分析扫描电镜(即电镜带上能谱仪、波谱仪、荧光谱仪、二次离子质谱仪和电子能量损失谱仪等,既能作超微结构研究,也能作微区的组分分析,即作定性、定量、定位分析,见第五章)。由电镜衍生出电子探针和离子探针。以下介绍几种近代生产的扫描电镜以及最常用的扫描电镜类型。

1. 扫描隧道显微镜

STM之所以得到发明并且迅速发展,是由于微电子学以极快的速度发展的缘故。作为电子计算机核心部分的硅集成块的集成板要求愈来愈高,其尺寸愈来愈小,所带来的问题是集成块表面积与体积之比的急剧增大,此时在集成块的工作状态中以及它与其他逻辑元件的相互作用中,表面状态变得愈来愈重要。

扫描隧道显微镜的原理是巧妙地利用了物理学上的隧道效应及隧道电流。金属体内存在大量“自由”电子,这些“自由”电子在金属体内的能量分布集中于费米能级附近,而在金属边界上则存在一个能量比费米能级高的势垒。因此,从经典物理学来看,在金属内的“自由”电子,只有能量高于边界势垒的才有可能从金属内部逸出到外部。但根据量子力学原理,金属中的自由电子还具有波动性,这种电子波在向金属边界传播而遇到表面势垒时会有一部分透射。也就是说,会有部分能量低于表面势垒的电子能够穿透金属表面势垒,形成金属表面上的“电子云”。这种效应称为隧道效应。所以,当两种金属靠得很近时(几纳米以下),两种金属的电子云将互相渗透。当加上适当的电压时,即使两种金属并未真正接触,也会有电流由一种金属流向另一种金属,这种电流称为隧道电流。

STM采用了全新的工作原理,它利用电子隧道现象,将样品本身作为一个电极,另一个电极是一根非常尖锐的探针。把探针移近样品,并在两者之间加上电压,当探针和样品表面相距只有数十埃时,由于隧道效应在探针与样品表面之间就会产生隧道电流并保持不变;若表面有微小起伏,哪怕只有原子大小的起伏,也将使穿透电流发生成千上万倍的变化。这种携带原子结构的信息输入电子计算机,经过处理即可在荧光屏上显示出一幅物体的三维图像。其分辨率达到了原子水平,放大倍数可达3亿倍,最小可分辨的两点距离为原子直径的1/10,也就是说它的分辨率高达0.01 nm。

STM 提供了一种具有极高分辨率的检测技术,可以观察单个原子在物质表面的排列状态和与表面电子行为有关的物理、化学性质,在表面科学、材料科学、生命科学、药学、电化学、纳米技术等研究领域有广阔的应用前景。但 STM 要求样品表面与针尖具有导电性,这也是 STM 在应用方面最大的局限所在。

2. 扫描电镜+扫描探针显微镜

SEM+SPM 是微观分析技术的新一代组合。应用 SEM 可以对样品进行放大(从 10 倍到几十万倍)观察,它的极限分辨率是 1 nm 左右(仅对特殊的含金颗粒标样),但是无法观察到原子尺寸的特征图像。而 SPM 可对样品进行原子尺寸的观察,它需要一台能够将 SPM 的悬臂和针尖移到特定位置的专用机械手。因此,Nanotechnik 成功开发出一种纳米机械手,能像人的手一样灵巧,操作自如地拨动这些碳管,移动纳米颗粒,而且能安装在 SEM 内的 SPM,在 SEM 上可以通过二次电子成像,观察样品特定区域的形貌特征,锁定目标,并用 SPM 进行原子尺度观察,在磁畴形态的研究、表面原子的移动、电化学反应机理研究等方面具有独特的优势。它还可以进行一些材料的物理特性的测量,如杨氏膜量测定、IV 曲线测定等。

有些半导体晶片上如果存在两个电极,需要引出,作特殊的电化学性能测量。在扫描电镜上装上 Nanotechnik 制造的 MM3,装上专用测量针(超微探针/纳米镊子),就可以从晶片上直接引出,进行测量,可以快速诊断出器件在生产过程中的质量问题,提高产品合格率。在环境扫描电镜上装上超微注射器,就可以在感兴趣的区域注入特殊的液体,在原位观察反应生成物,充分发挥环境扫描电镜的特殊功能,获得更深入的研究结果。借助于超微注射器精确的定位功能,可以提高区域捕捉的准确性。

3. 原子力显微镜

AFM(新一代扫描探针显微镜)不要求样品具有导电性,待测样品不需要特殊处理就可直接进行纳米尺度的观测。AFM 在任何环境(包括液体)中都能成像,而且针尖对样品表面的作用力较小,能避免对样品造成损伤,所以 AFM 已成为生物学研究领域中进行纳米尺度的实时观测的一种重要工具。例如,在体外可对细胞进行长达数小时甚至数天的实时观测,从而为在纳米尺度实时监测自然状态下细胞的运动、分裂、聚集、转化、凋亡等过程提供了可能。

一般认为 AFM 是扫描隧道显微镜技术的进一步发展,所不同的是扫描隧道显微镜有一个装在扫描头压电陶瓷上的电子探针,而 AFM 上则是一个固定于微悬臂上的针尖。通过光栅式的扫描,微悬臂在样品表面 x 方向采集一系列点的数据,在 y 方向上进行相同数量的扫描,就可以获得相应的计算图像。通过对位置敏感的光学检测器检测微悬臂背面反射激光束的位置变化,就可获得样品高度的信息。当微悬臂在样品表面移动感受样品高度变化时,通过一个反馈系统将一个相应的补偿电压加到压电陶瓷上,使其在 z 轴方向上下移动,从而使激光束打到光学检测器上的位置固定不变,从这个补偿电压的变化就可获得样品高度的信息。AFM 是利用对微弱力极其敏感、顶端带有针尖的微悬臂对样品表面进行逐行扫描,针尖最外层原子与样品表面原子之间的相互作用力使微悬臂发生形变或改变运动状态,通过检测微悬臂的偏转获得样品形貌和作用力等相关信息供计算机成像。原子力显微镜成像有两种模式。

(1) 接触模式

AFM 是通过微悬臂上的针尖在样品表面扫描来工作的。第一个 AFM 图像是用接触模式,即针尖与样品表面接触的方式来获得的(Binnig et al,1986)。在接触模式下,针尖与样品的相互作用会产生很大的横向力,因此需要将生物大分子固定在一个表面上。例如,用二价阳离子(镁、钴、镍)将负电性 DNA 固定在云母片上(Bustamante et al,1992);也有用带有阳电荷头部的矽烷化合物(如 APTES)与云母表面反应,可使 DNA 分子吸附在云母表面以便进行 AFM 成像(Lyubchenko et al,1992)。

(2) 间歇接触模式

a. 声学驱动模式。在声学驱动模式中,针尖与样品的接触是间歇性的,微悬臂的振动是由扫描头之压电陶瓷产生的高频声波来驱动的,使微悬臂达到共振。当针尖靠近样品时,范得瓦尔力和其他表面力与振动的微悬臂互相作用,导致振幅衰减。振幅衰减可被仪器检测,用于样品形貌成像(Hansma et al,1994)。

b. 磁力驱动 AC 模式(MAC)。在这种模式中,微悬臂上涂有一种磁性物质,通过装在微悬臂附近的一个磁线圈产生的交流磁场来驱动磁性的微悬臂。当微悬臂靠近样品表面时,针尖与样品之间的吸引力会降低微悬臂的共振频率,导致振幅衰减,从而产生样品形貌图像(Lantz,1994; Han et al,1996)。在磁力驱动成像模式中,样品不会变形,图像反差很好。特别在液体中成像时,声学驱动模式的声波会搅动液体而造成背景噪音;而在磁力驱动模式中,由于仅仅是微悬臂(而不是整个悬臂装置)振动,不会引起背景噪音。磁力驱动模式的这一优点,使得 AFM 可以获得高质量的图像,从而可满足当代动态生物图像研究的需要。

AFM 已迅速普及和应用到了各门学科,如生物学领域中蛋白质、DNA、活细胞和细胞骨架等结构的研究。随着 AFM 仪器和样品制备技术的不断成熟,目前对各种大分子和活细胞的 AFM 成像已成为常规工作了。用磁力驱动 AC 模式在空气或液体中获得诸如细胞 S-layer 蛋白的高分辨率,AFM 成像(见图 1-1A)已经是很平常的事了。对哺乳动物细胞的 AFM 成像不需要专门技术将细胞固定于表面,一些实验室已成功地获得了在液体中的活细胞 AFM 图像。但是,细菌的成像需要将细菌固定于表面的技术,如在云母表面涂以明胶以便在液体中对活细胞成像(见图 1-1B)。AFM 可以对绝缘材料成像,而且结果容易获得。AFM 还可用于在纳米级、分子级水平上研究有机功能材料的结构及相关分子识别。

用 AFM 成像作出 DNA 限制性酶切图已经实现(Allison et al,1996,1997),将一种突变的内切酶(EcoR1)结合到 DNA 上,它能以特异的位置结合于 DNA 分子上,但不切断 DNA,如图 1-2。这种技术能在空气中有效地对粘粒(cosmid)大小(30~50 kb)的 DNA 分子成像。在液体环境中对成像已有不少动态研究(Hansma et al,1996;Thompson et al,1996),如通过限制核苷三磷酸(NTP)的浓度,可在双链 DNA 移过 RNA 聚合酶分子时观察转录过程,一旦 RNA 结合到云母片上,就可对转录产物 RNA 成像(Kasas et al,1997)。Lindsay 实验室用带有流动溶液池的 AFM 观察盐浓度改变时核小体复合体的形态变化(Wang et al,2002);将多聚核小体结合在用戊二醛活化过的 APTES 处理后的云母片上,在磁力驱动模式下观察,在低盐浓度时可以看到不同大小片段的核小体,而在高盐浓度时,DNA 从核小体中被去除(见图 1-3)。动态研究并不局限于生物大分子,同样适用于哺乳动物细胞,如用 AFM 观察细胞松弛素 B 处理成纤维细胞后微丝网络