



扫描电镜与能谱分析及 样品制备技术

主讲人：李潼

中国科学院沈阳应用生态研究所

分子生物学实验室

微生物资源与生态组

所级公共技术中心

2024-12-04



目录

扫描电镜与能谱分析 样品制备技术



扫描电镜 能谱分析

SEM



扫描电镜（Scanning Electron Microscope, SEM）是介于透射电镜和光学显微镜之间的一种观察样品表面微观形貌设备，可直接利用样品表面材料的物质性能进行微观成像。



SEM



■ 观察纳米材料;

■ 三维形貌的观察和分析;

■ 在观察形貌的同时, 进行微区的成分分析;

■ 景深大, 图像具有立体感, 进行材料断口分析;

■ 观察大试样、厚试样的原始表面和最真实的形貌;

■ 试样在样品室中可动的范围非常大, 可观察试样的各个区域细节。

SEM发展历史



1935年，在透射电镜的基础上，1935年德国学者诺尔首次提出了扫描电镜的概念；

1938年，第一台扫描电子显微镜由Von Ardenne设计成功。

1953年，英国剑桥大学的麦哲、马伦等人成功研制第一台实用型扫描电镜，分辨率达到50nm；

1965年，英国剑桥科学仪器公司研制成功第一台商用扫描电镜 Mark I，其分辨率为10nm，从此揭开了扫描电镜研发、制造和应用的开端；

1975年，美国将微型计算机引入到扫描电镜中，用于程序协调控制加速电压，放大倍数和磁透镜焦距的关系，二次电子图像分辨率可达6nm；

2005年，美国发布全球第一台具有超高分辨率的带有低真空的场发射电镜，其分辨率为1.0nm；

2010年，冷场扫描电镜的上市将分辨率提升到了0.4nm。



台式扫描电镜 SEM

扫描电镜（Scanning Electron Microscope, SEM）具有超高分辨率，能做各种固态样品表面形貌的二次电子像、反射电子象观察及图像处理。该仪器利用二次电子成像原理，在低电压下通过在纳米尺度上观察生物样品如组织、细胞、微生物以及生物大分子等，获得忠实原貌的立体感极强的样品表面超微形貌结构信息。



台式扫描电镜 SEM



光学放大20-135 \times ，电学放大15,000 \times ，且连续可调；

视野大，景深大，成像立体（BSD+SED），可直接观察各种试样凹凸不平的表面细微结构；

试样制备简单；

配有X射线能谱仪装置，可以同时进行显微组织形貌的观察和微区成分分析；

抽真空时间短，不超过15秒；

显像时间短，约30秒；

可移动样品台，三级导航系统，快速、精确的视野调整。

场发射扫描电子显微镜 FESEM



场发射扫描电子显微镜（FESEM）是电子显微镜的一种，具有低电压高分辨的热场发射扫描电镜，使用了高压隧道技术（Super-Tunnel）、无交叉电子光路、静电电磁复合物镜设计，减少了空间电荷效应，降低系统像差，实现了 $1.2\text{nm}@1\text{kV}$ 的分辨能力。低压下的成像分辨能力提升，可对不导电样品或半导体样品进行直接观察，有效降低了样品辐照损伤。



场发射扫描电子显微镜 FESEM



- 分辨率高，低加速电压下实现高分辨成像；
- 电磁复合物镜，减小像差，显著提高低电压下的分辨率，而且可观察磁性样品；
- 高压隧道技术(SuperTunnel)，在隧道中的电子能保持高能量，减少了空间电荷效应，低电压分辨率得到保证；
- 电子光路无交叉，有效的降低系统像差，提升分辨能力；
- 最高电学放大倍数250,0000倍，且连续可调；
- 磁偏转六孔可调光阑，自动切换光阑孔，无需机械调节，实现高分辨率观察或大束流分析模式快速切换。
- 一次可同时放入多个样品，减少频繁换样操作。

SEM 相关应用领域范围:

扫描电子显微镜已广泛用于材料科学、冶金、农业科学、生物学、医学、半导体材料与器件、地质勘探、病虫害的防治、刑事侦察、宝石鉴定、工业生产中的产品质量鉴定及生产工艺控制等。

SEM的技术限制:

- 很难对潮湿或液体样品成像;
- 高加速电压下成像需要镀导电膜;
- 不能形成彩色图像;
- 很难精确测量高度;
- 很难对表层以下的结构成像;
- 无法原子成像, 无法成像带电分子。

SEM 基本组成



真空系统：降低灯丝氧化，延长寿命；空气中的微粒会使电子束中的电子轨迹发生偏转，会影响最终图像的质量，降低分辨率和信噪比。

电子光学系统：包括电子枪、镜筒、电磁偏转线圈、消像散器；

电子枪：发射并加速电子，肖特基热场发射电子枪、六硼化铈；

镜筒：电磁透镜组，产生的焦距可以通过改变线圈的电流而变化；

扫描系统：由扫描发生器和扫描线圈组成，控制图像放大倍数；

样品室：位于镜筒下方的移动样品台，把目标拍摄点移动到电子束焦点上；

信号检测与处理系统：二次电子检测器（SED）、背散射电子检测器（BSD）、能谱（EDS）；

图像显示与记录系统、电控与操控系统。

真空系统

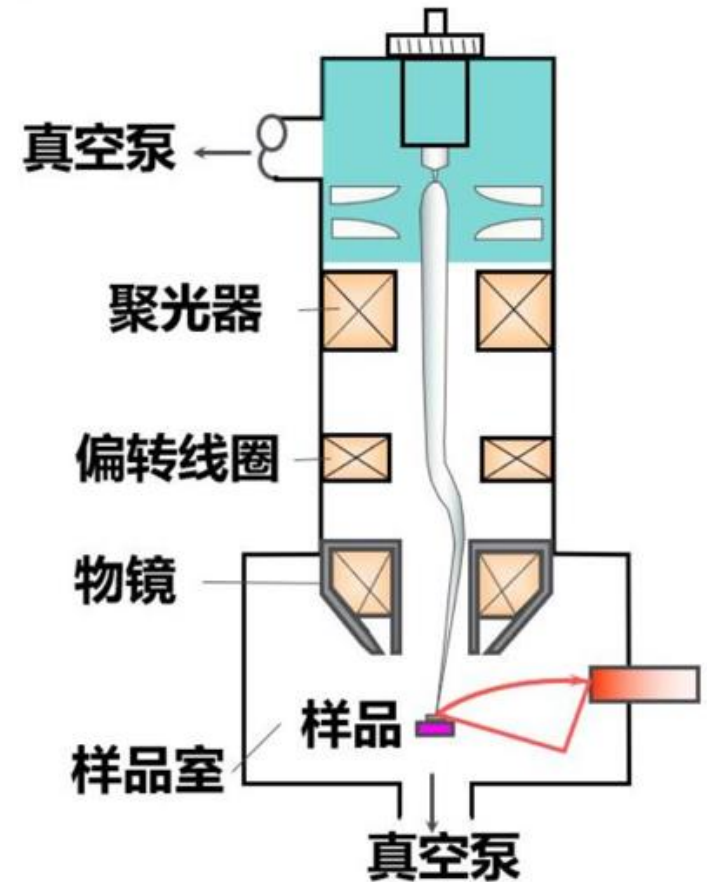


为保证扫描电镜的电子光学部件正常稳定工作，电子枪和镜筒内部需要有很高的真空度。

- 减少入射电子和出射信号的散射；

- 延长电子枪阴极寿命；

- 降低高压电极间的放电及对电子通量的污染。



信号检测与处理系统

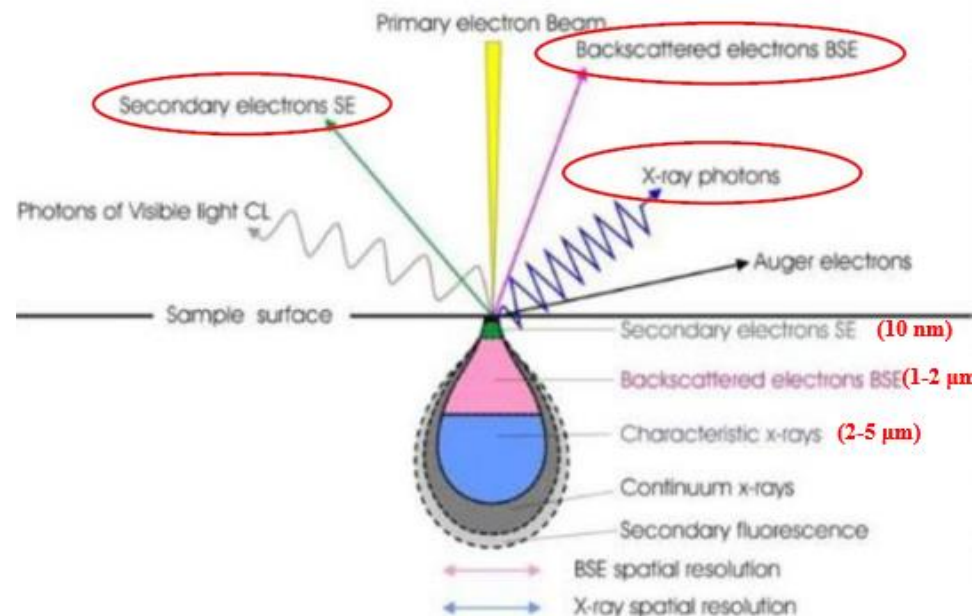


发射电子经过加速，聚焦等操作后，轰击到样品表面，会激发出很多信息，探头系统用于接收这些信息。

二次电子 (SED)：在入射电子束作用下被轰击出来并离开样品表面的样品原子的核外电子叫做二次电子。

背散射电子 (BSD)：入射电子经样品原子核反射，再次离开样品的电子。

能谱 (EDS)：当电子束与样品相互作用时，会发射出特征X射线。这些特征X射线的能量取决于样品中存在的元素。



背散射 (BSD) 与二次电子 (SED) 的选择



二次电子 (SED) :
突出样品表面形貌, 使其更具有景深感, 层次感, 背景虚化。

背散射电子 (BSD) :
更突出样品背景细节, 更清晰。

加速电压的选择



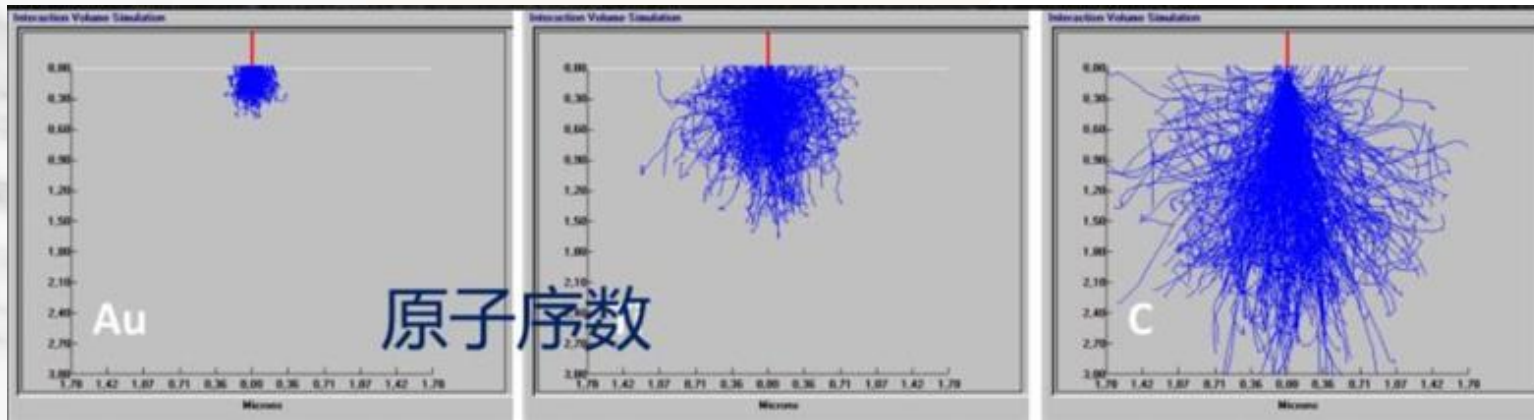
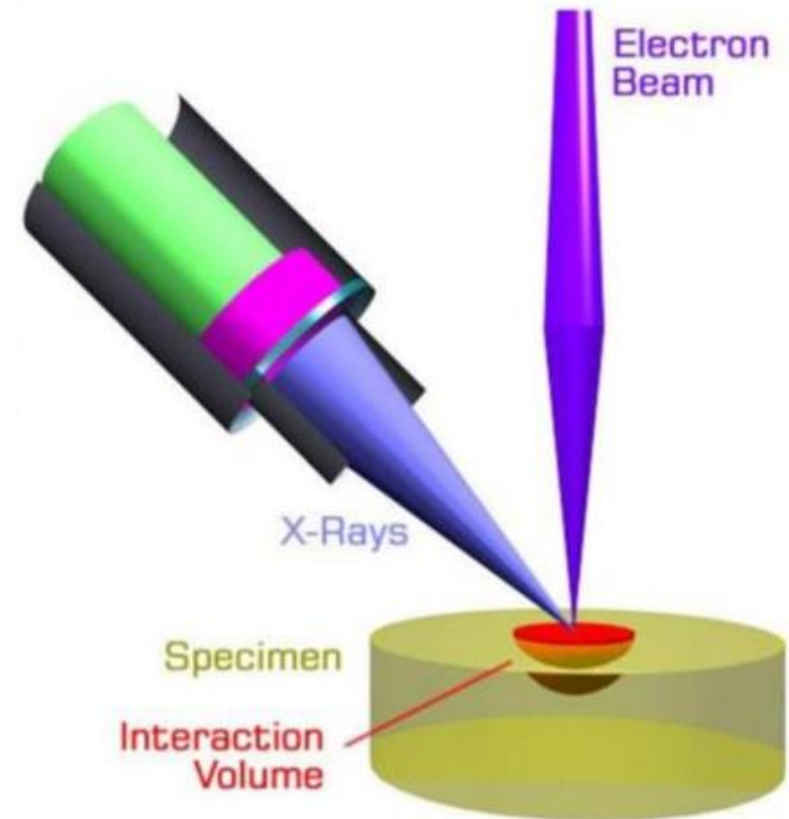
- 加速电压：5 kV 穿透深度浅，对样品损伤较小，表面细节丰富
- 10 kV 穿透深度较深，成像质量较高
- 15 kV 穿透深度最深，信号充足，适合做能谱分析

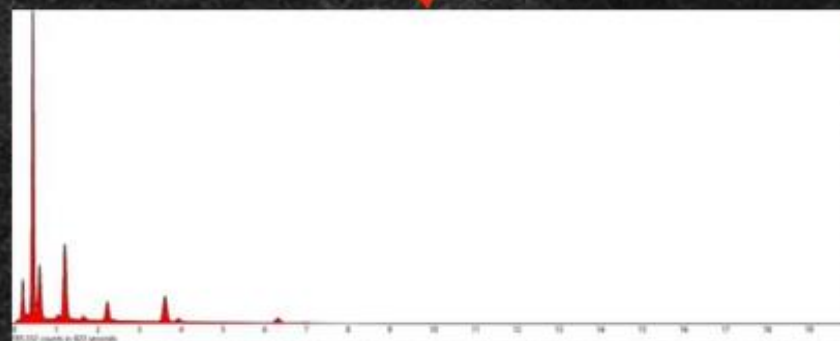
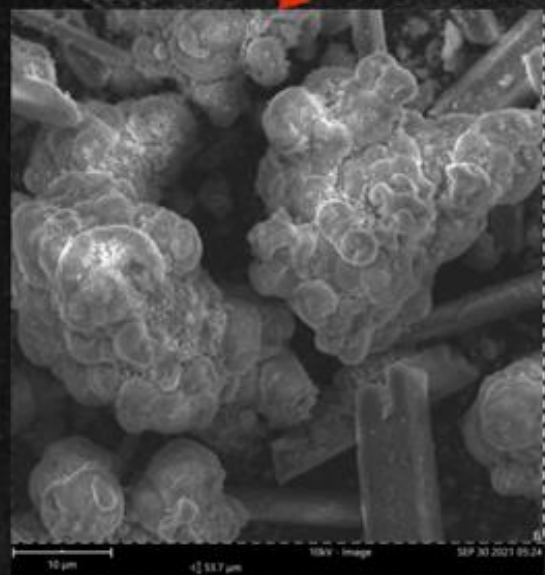
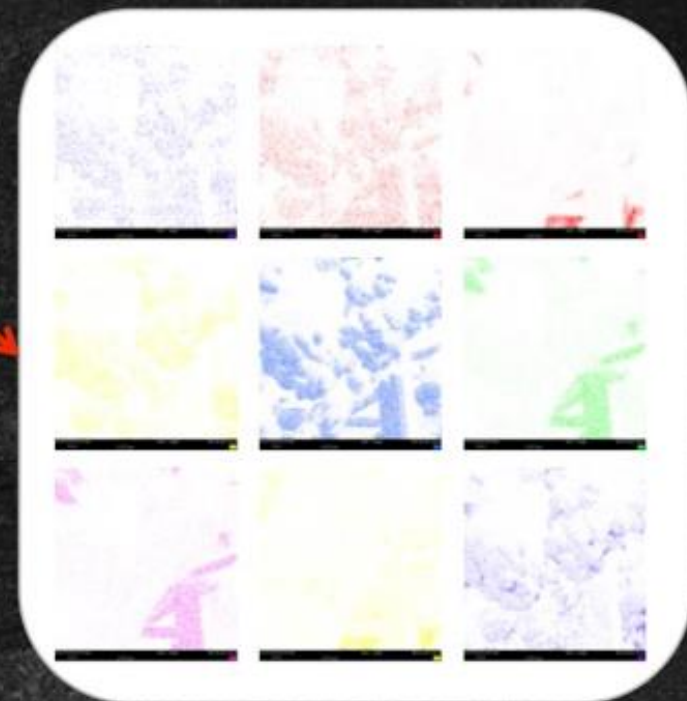
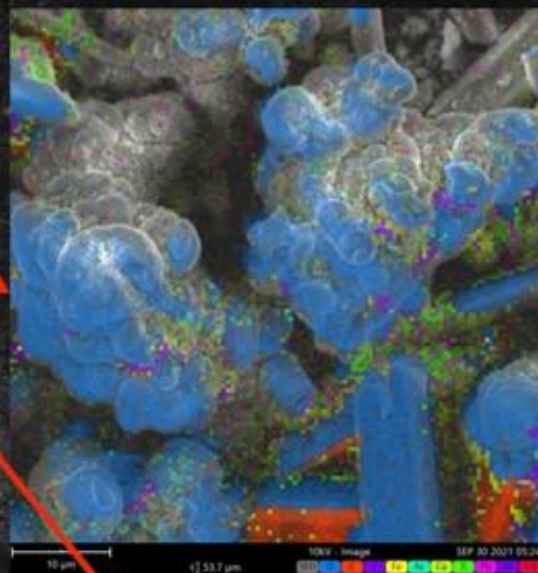
EDS



能量色散谱仪 (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, EDS)

当电子枪发射的高能电子束进入样品后，与样品原子相互作用，原子内壳层电子被电离后，由较外层电子向内壳层跃迁产生具有特定能量的电磁辐射光子，即特征X射线。X射线能谱仪就是利用元素特征X射线波长和强度，来分析材料成分元素种类与含量，并对其进行相应的定性、定量分析，波长确定元素种类，强度测定相对含量。

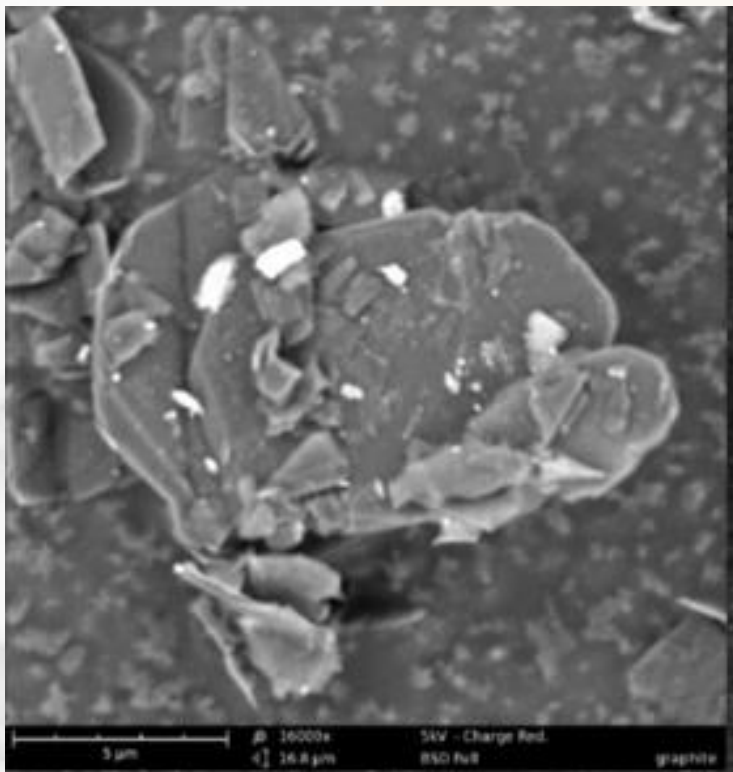




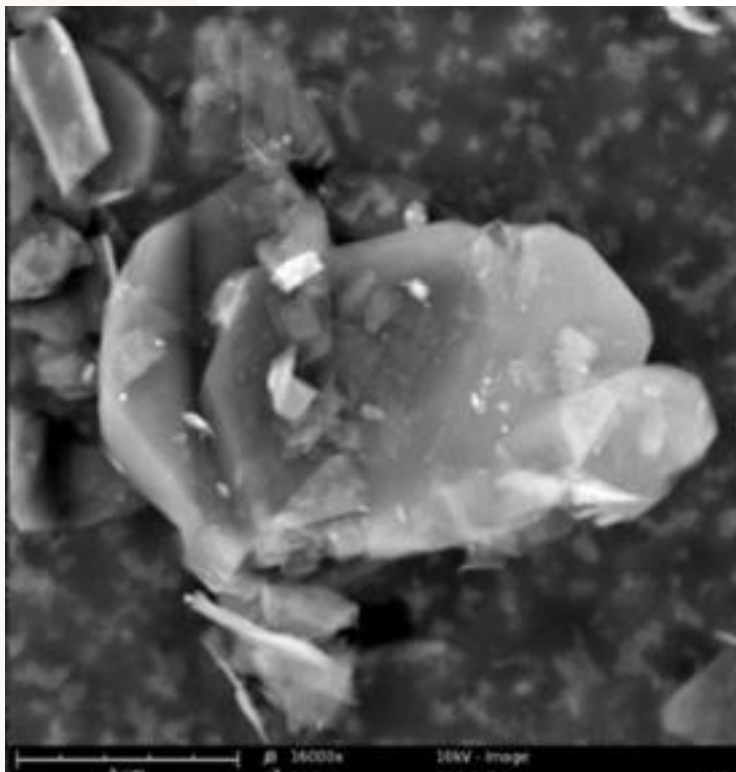
Weight percentage	
O	37.11 %
As	18.58 %
Fe	14.17 %
C	8.98 %
Ca	8.79 %
F	7.84 %
S	2.95 %
Pb	1.45 %
Zn	0.12 %
Cd	0.00 %
Cu	0.00 %

Atomic percentage	
O	53.92 %
C	17.38 %
F	9.59 %
Fe	5.90 %
As	5.77 %
Ca	5.10 %
S	2.14 %
Pb	0.16 %
Zn	0.04 %
Cd	0.00 %
Cu	0.00 %

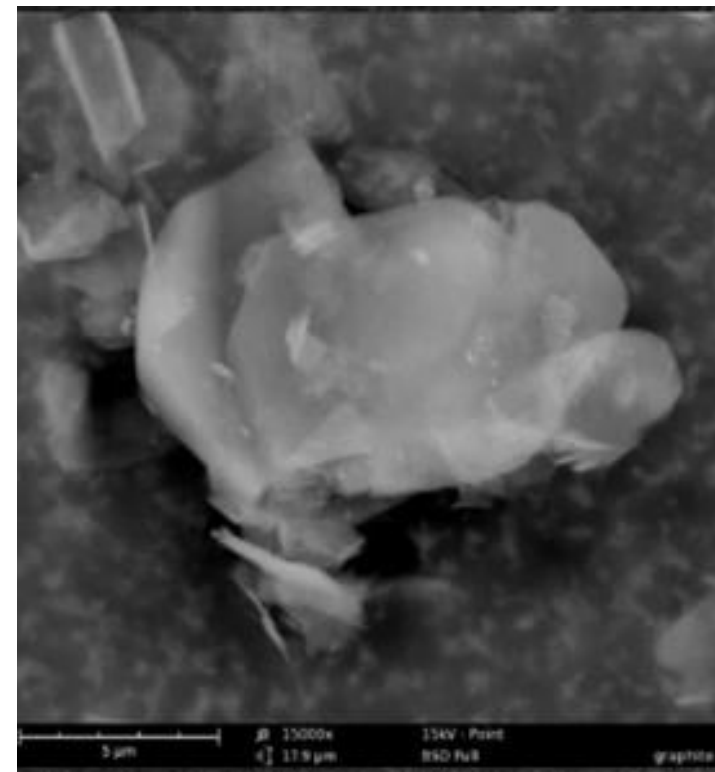
加速电压与样品表面细节



5 kV



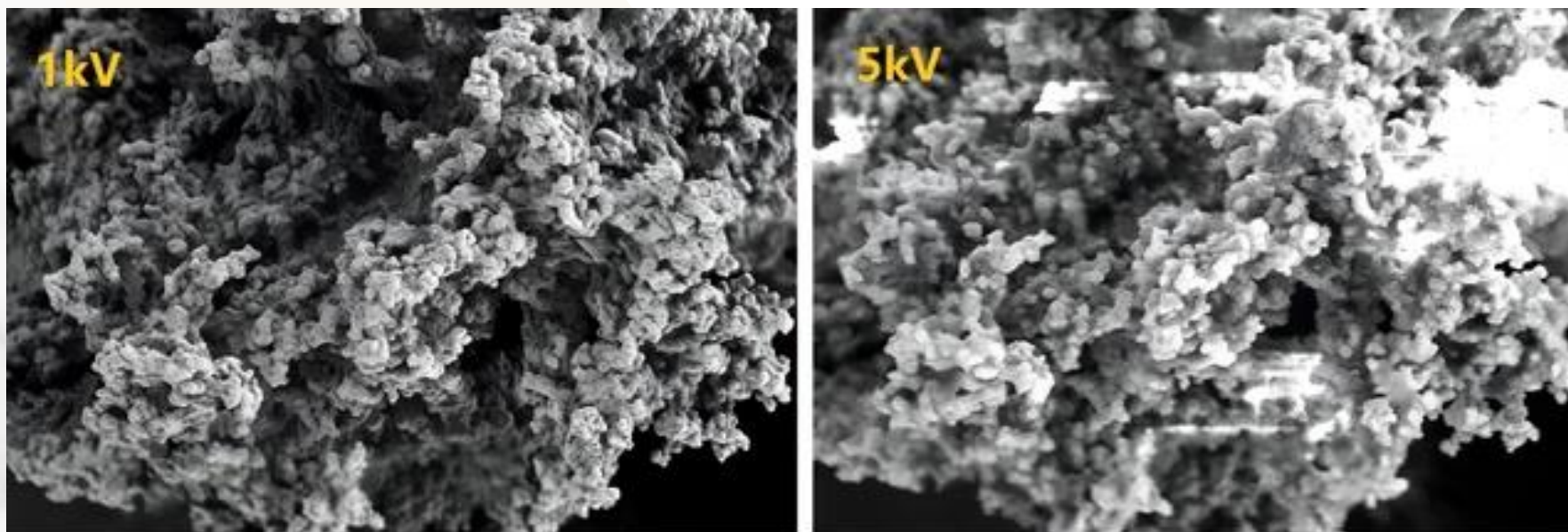
10 kV



15 kV

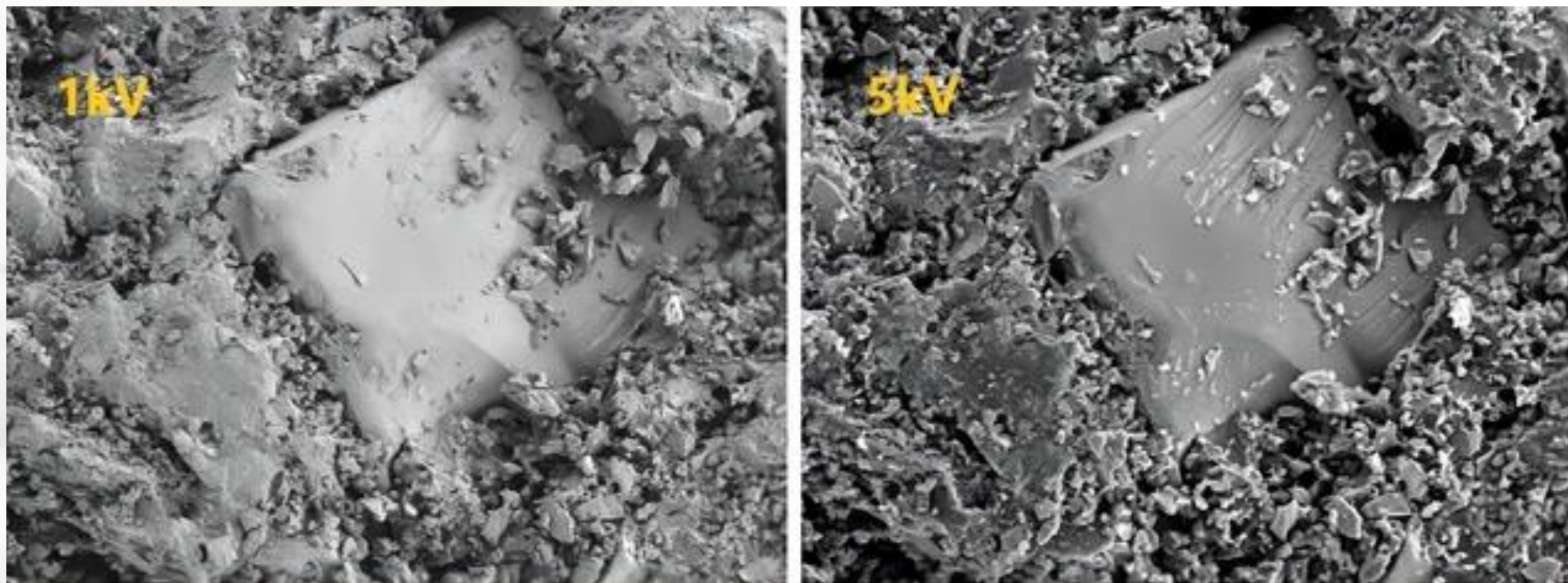
以上是同一石墨颗粒在不同加速电压下的三张照片：5kV时的束流穿透是最弱的，展示了最多的表面信息。建议在观察轻元素如石墨样品时采用5kV。

加速电压与样品表面细节



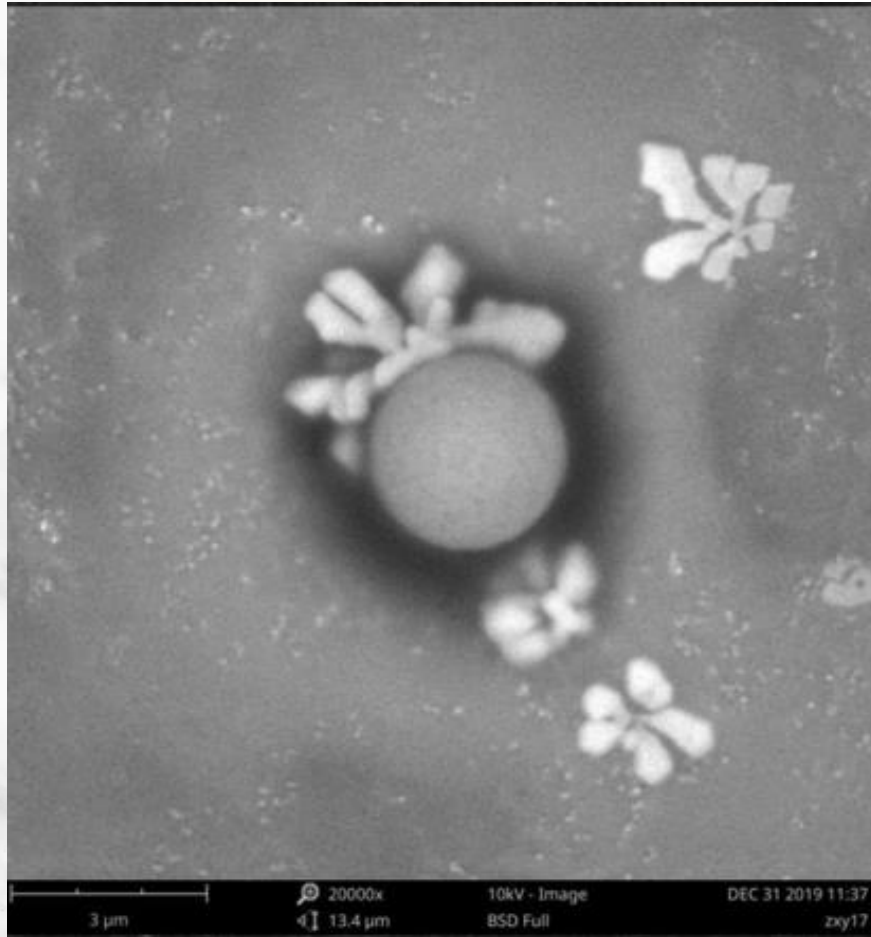
为避免**非导电样品**出现荷电影响成像效果，对于此类样品一般会在表面溅射一层几纳米厚的导电薄膜，如Au等，但对于有的样品效果也有限。出现荷电的直接体现为成像时明暗度明显失调或者出现条纹，根本原因在于电子输入和逸出的数量不平衡。如上图所示，在1kV时图像明暗度较均匀，在5kV时存在明显异常亮的荷电影响区域。

加速电压与成像信噪比

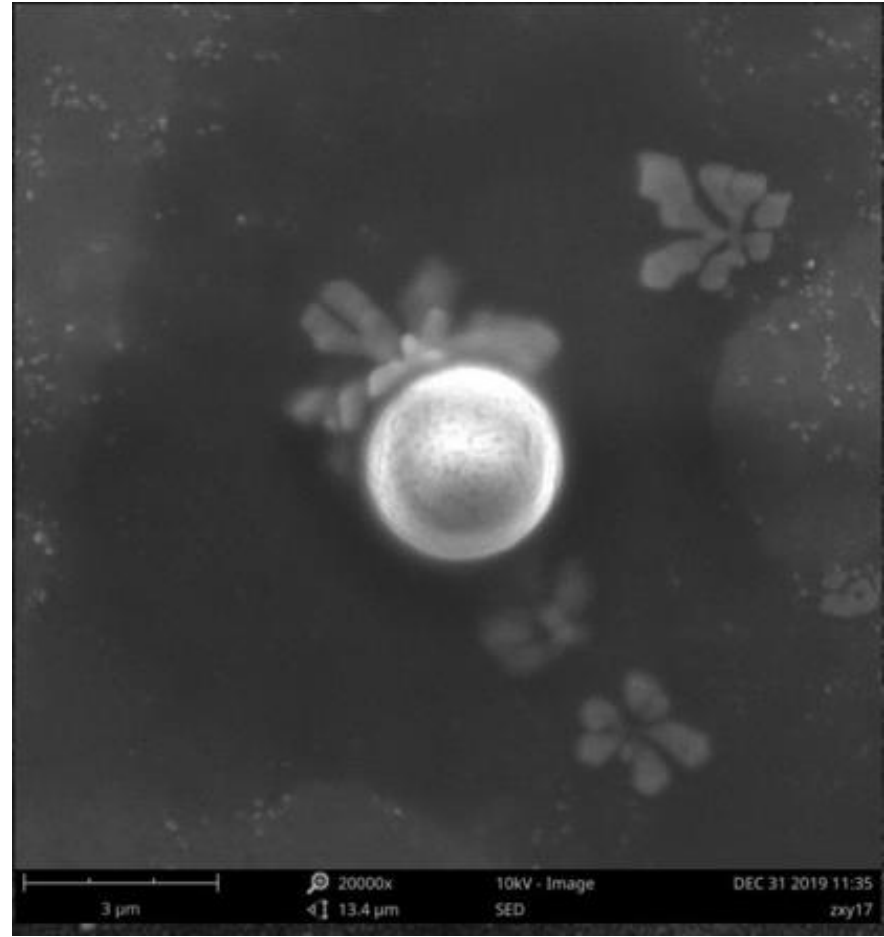


加速电压越高，入射电子携带的能量越高，因此轰击到样品产生的二次电子越多，信号越强，信噪比得到提高，成像直观感觉图像更清晰。如上图，5kV加速电压相对1kV成像视觉效果更为清楚。对于微米级的较大颗粒，在不追求表面细节时，提高加速电压有利于提高信噪比，获得成像效果更为清楚图片。

SEM

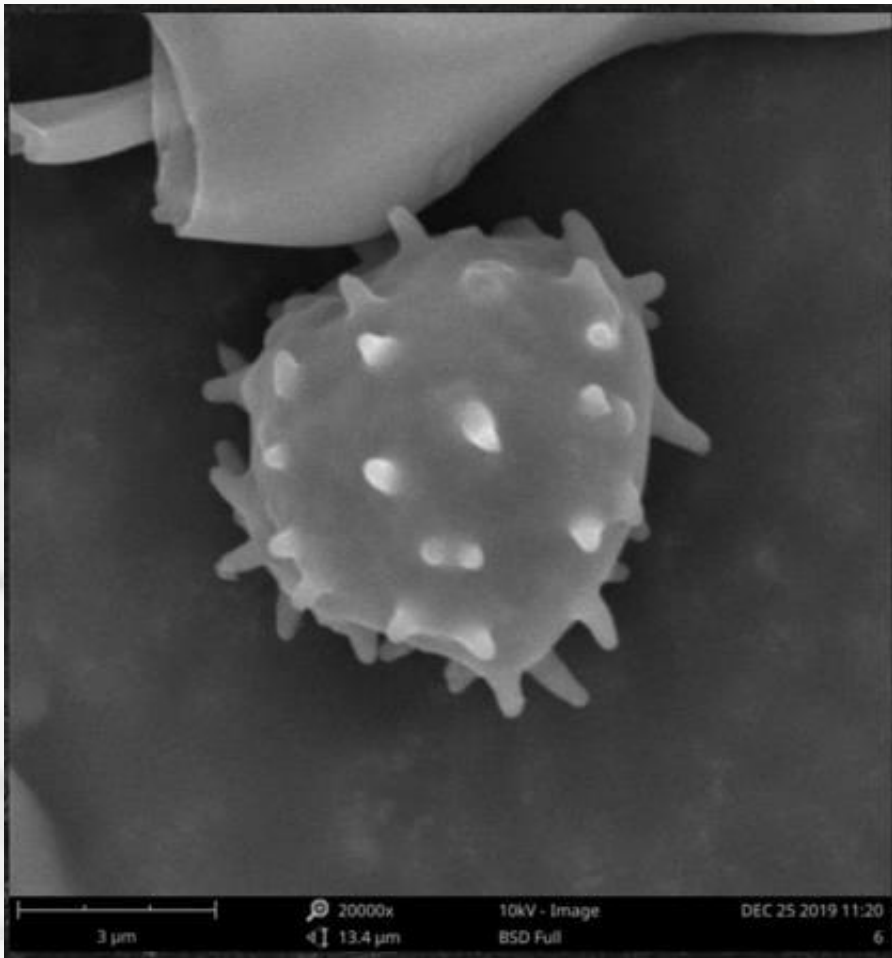


BSD 20,000×

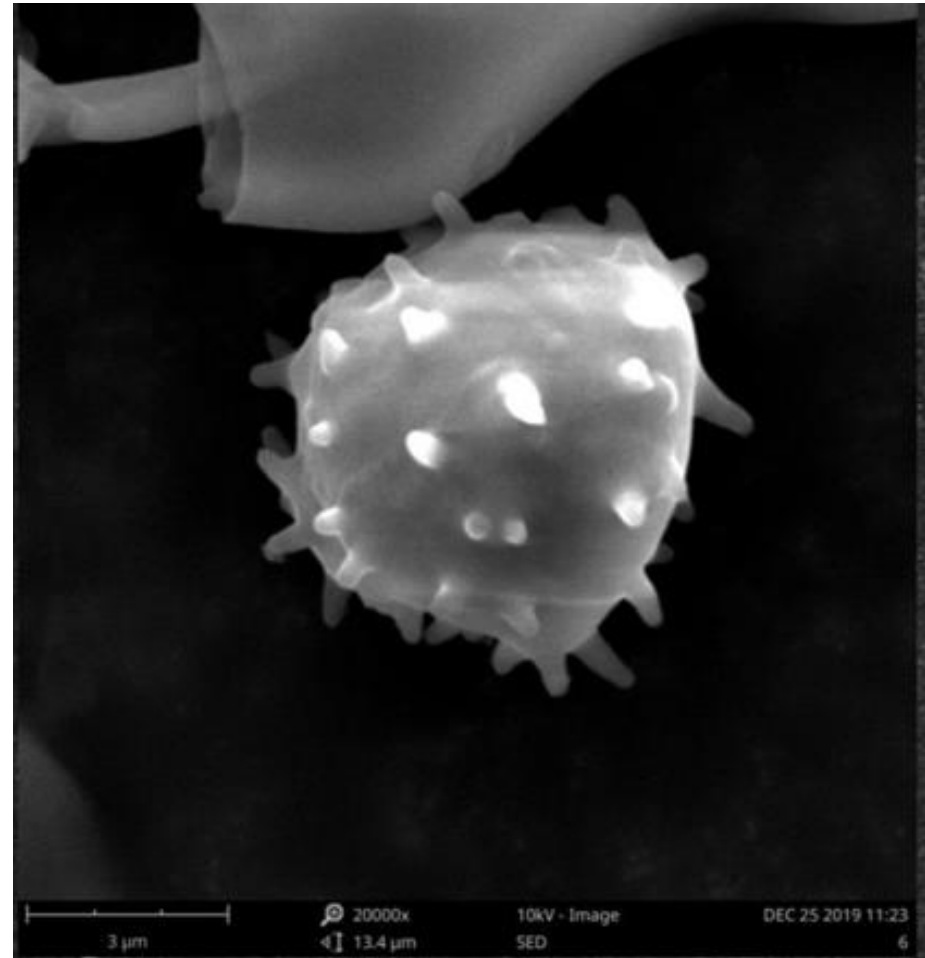


SED 20,000×

SEM

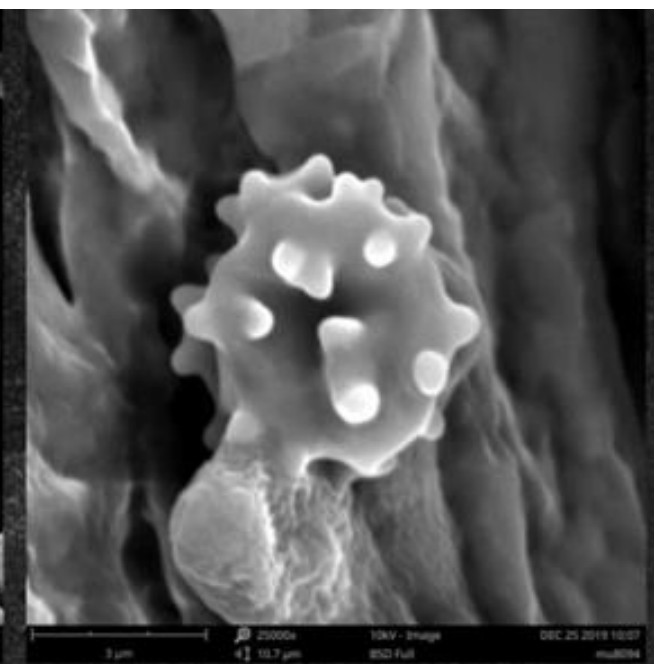
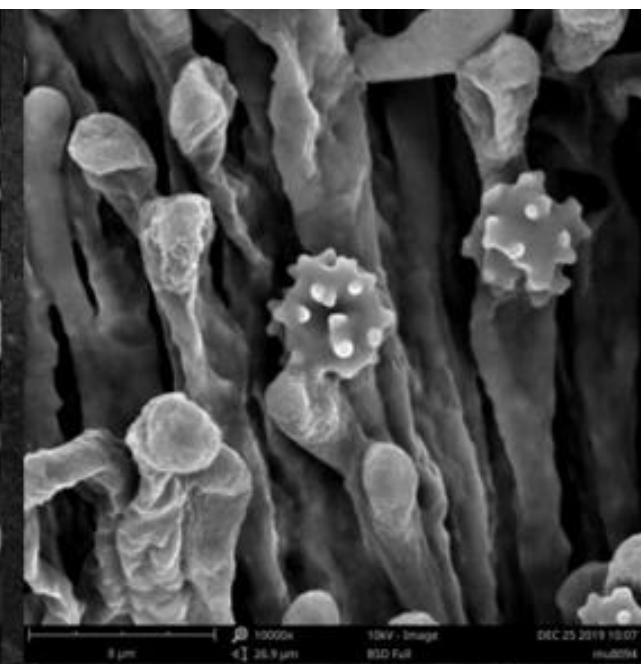
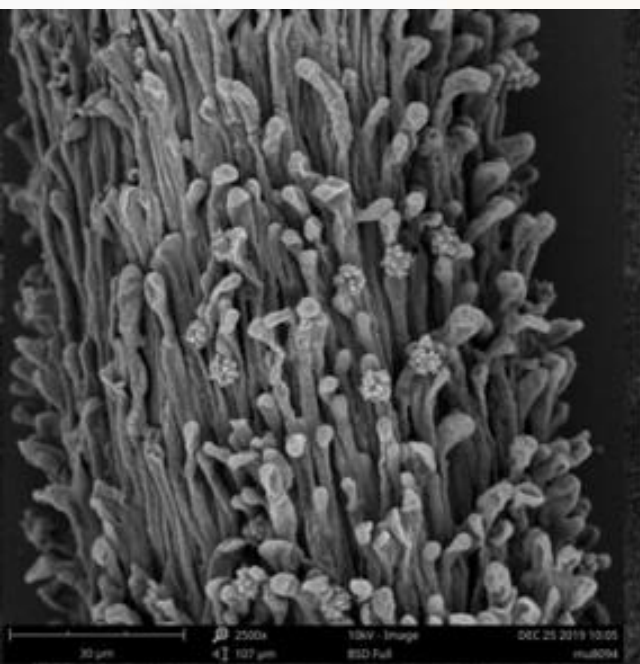


BSD 20,000×



SED 20,000×

SEM



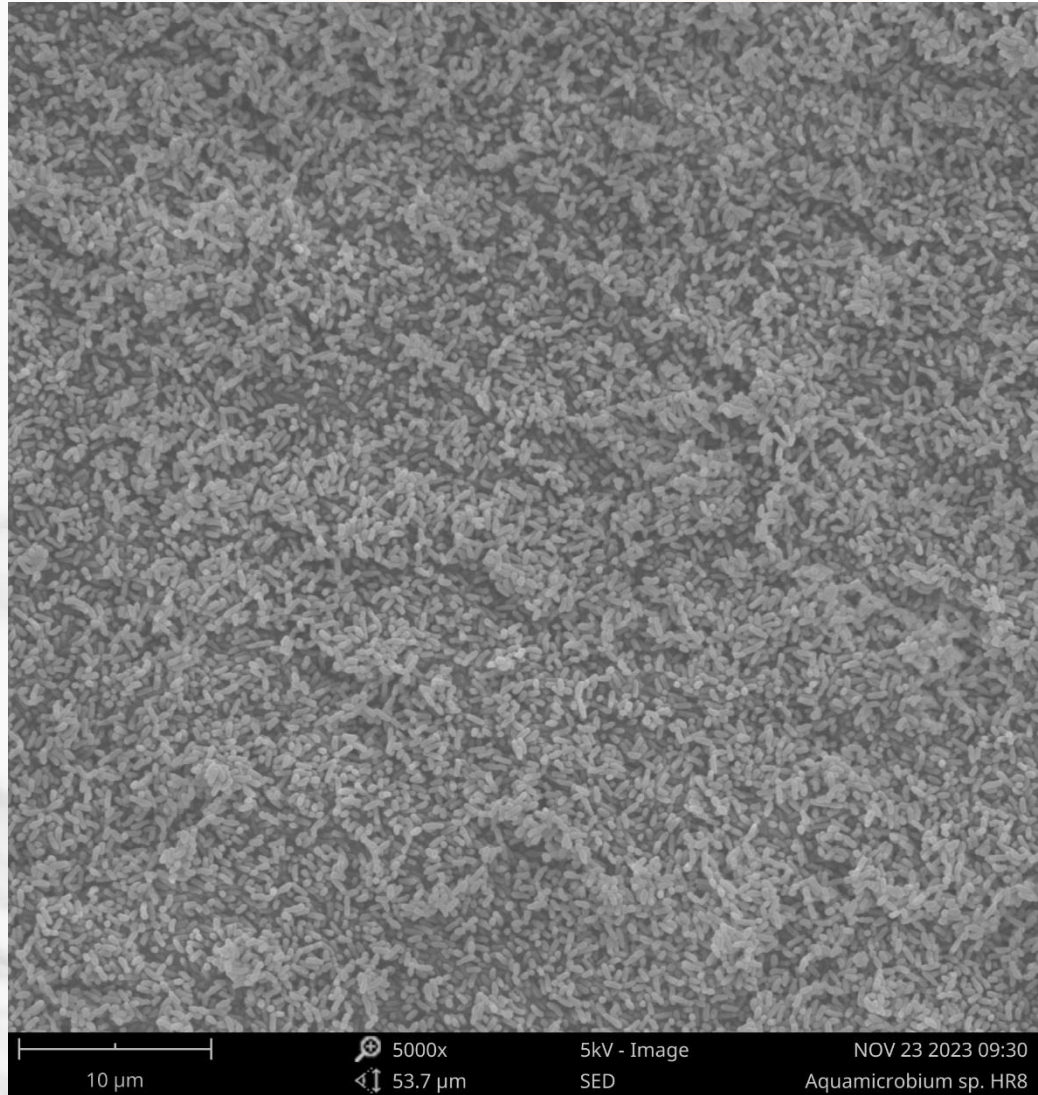
2,500 ×

5,000 ×

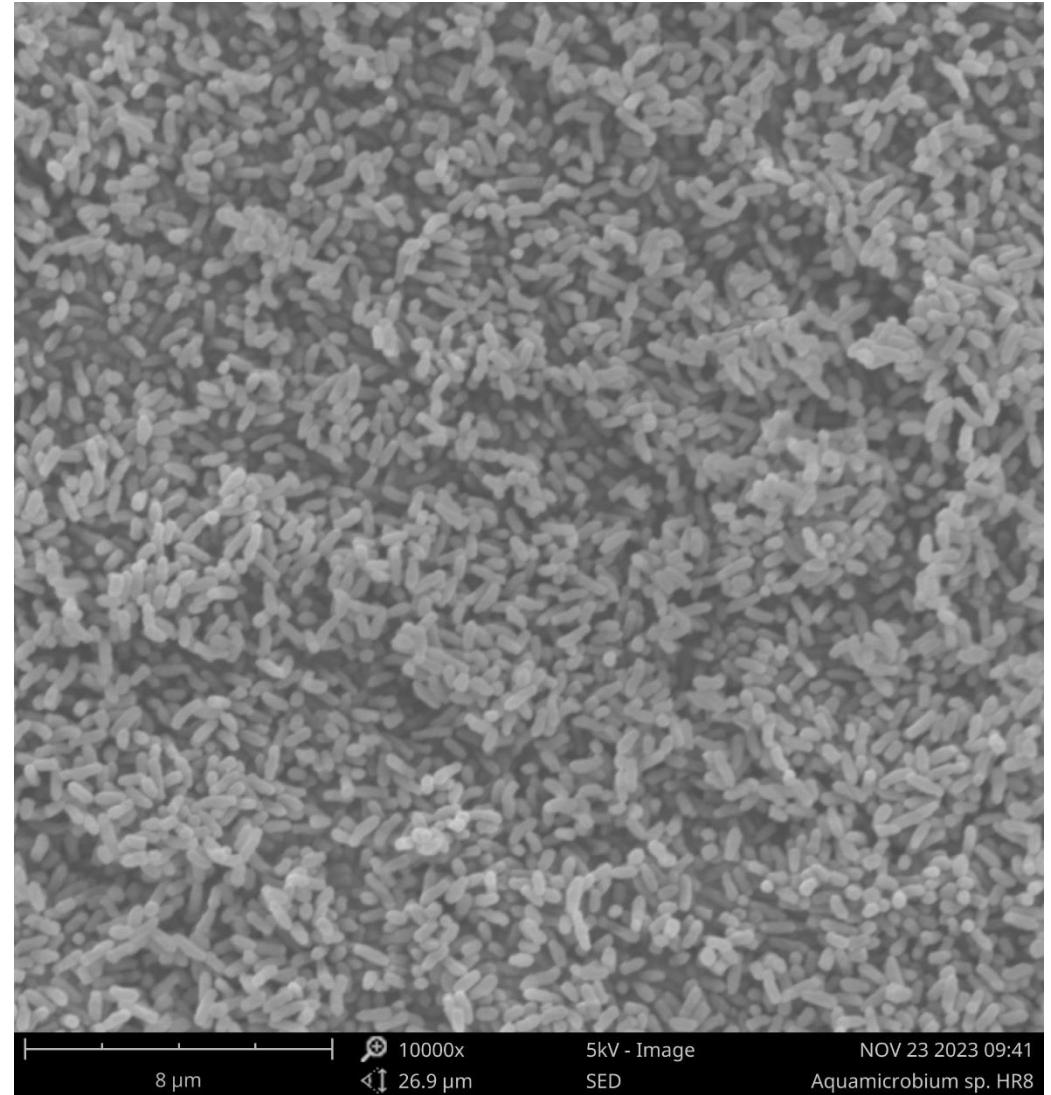
10,000 ×

25,000 ×

SEM

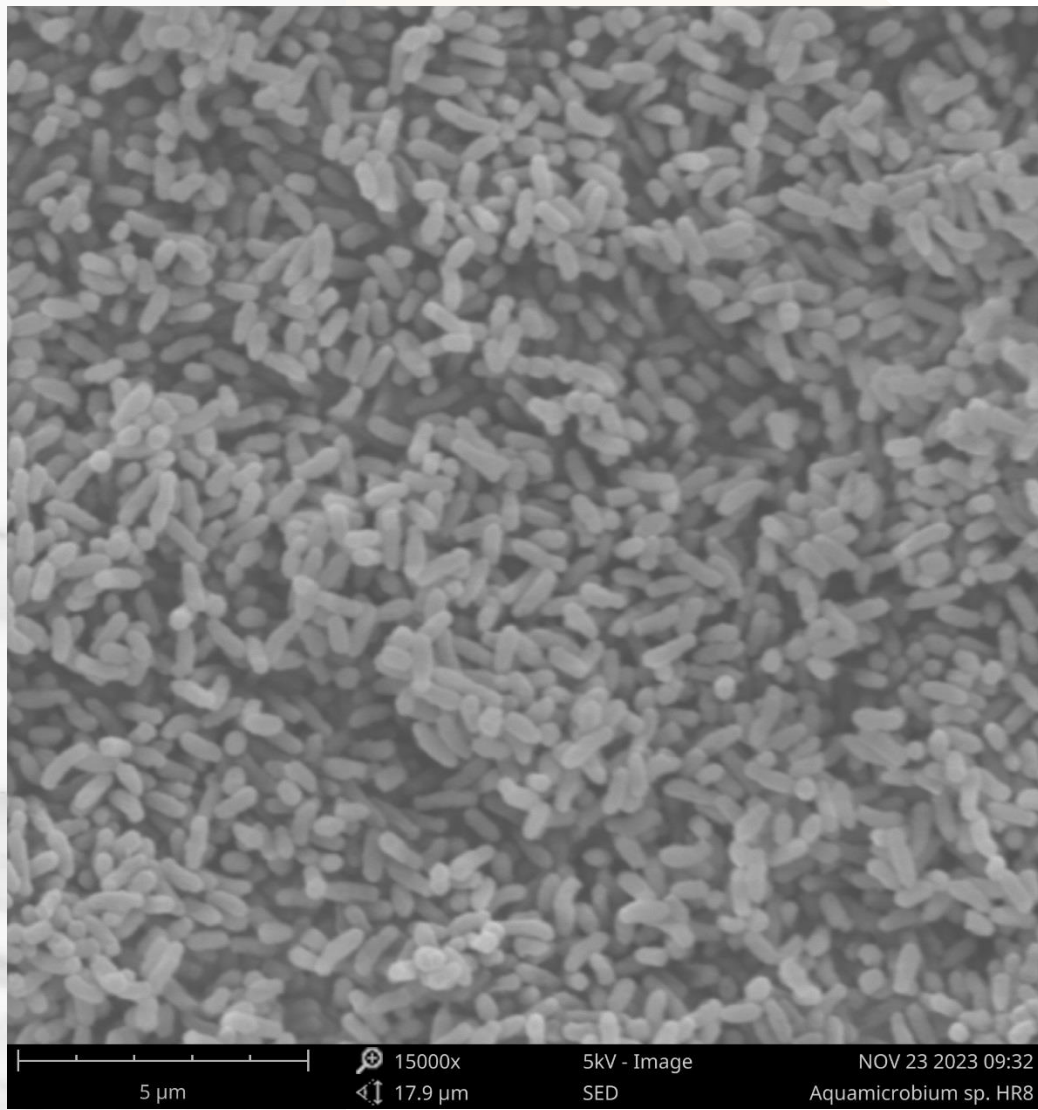


5000 ×

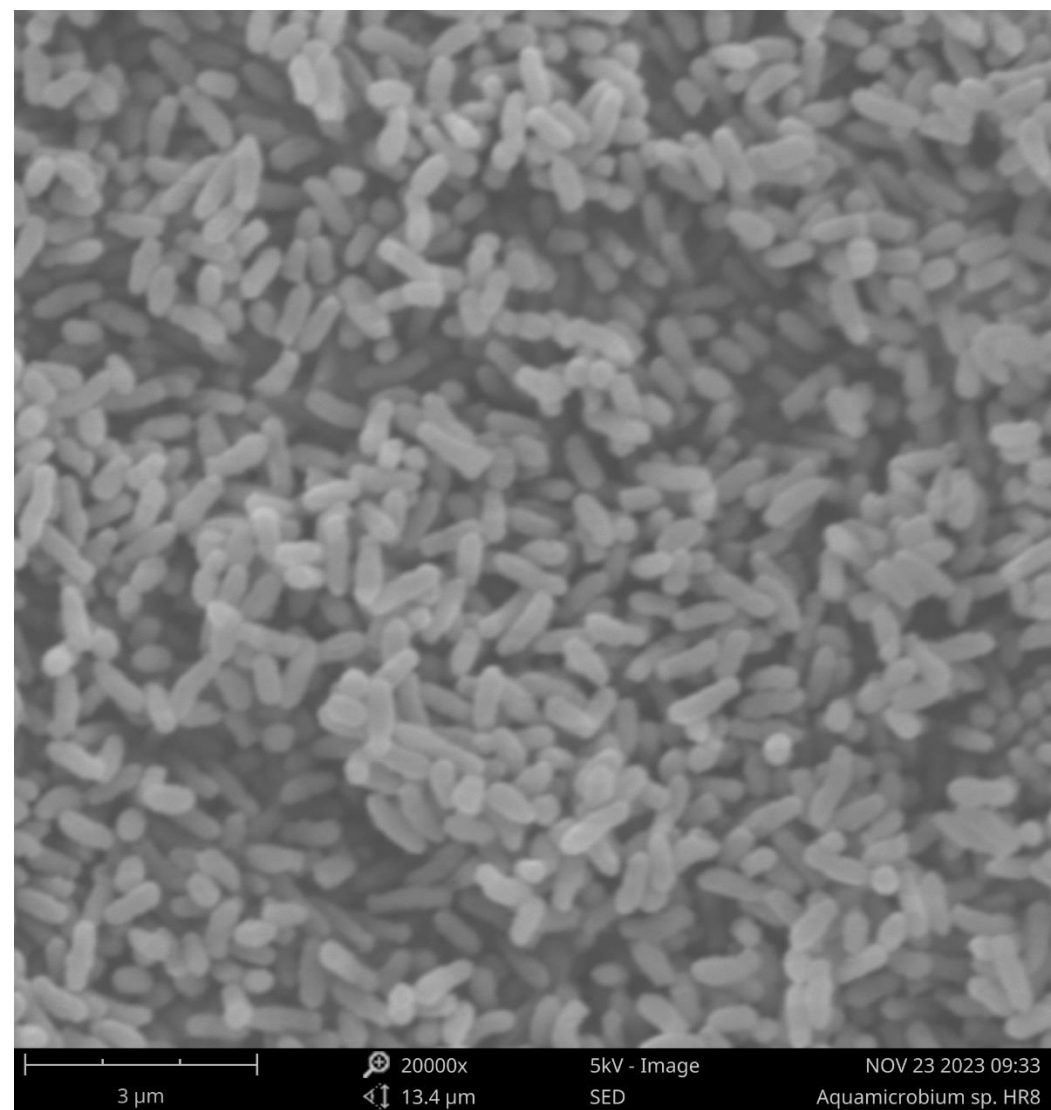


10000 ×

SEM

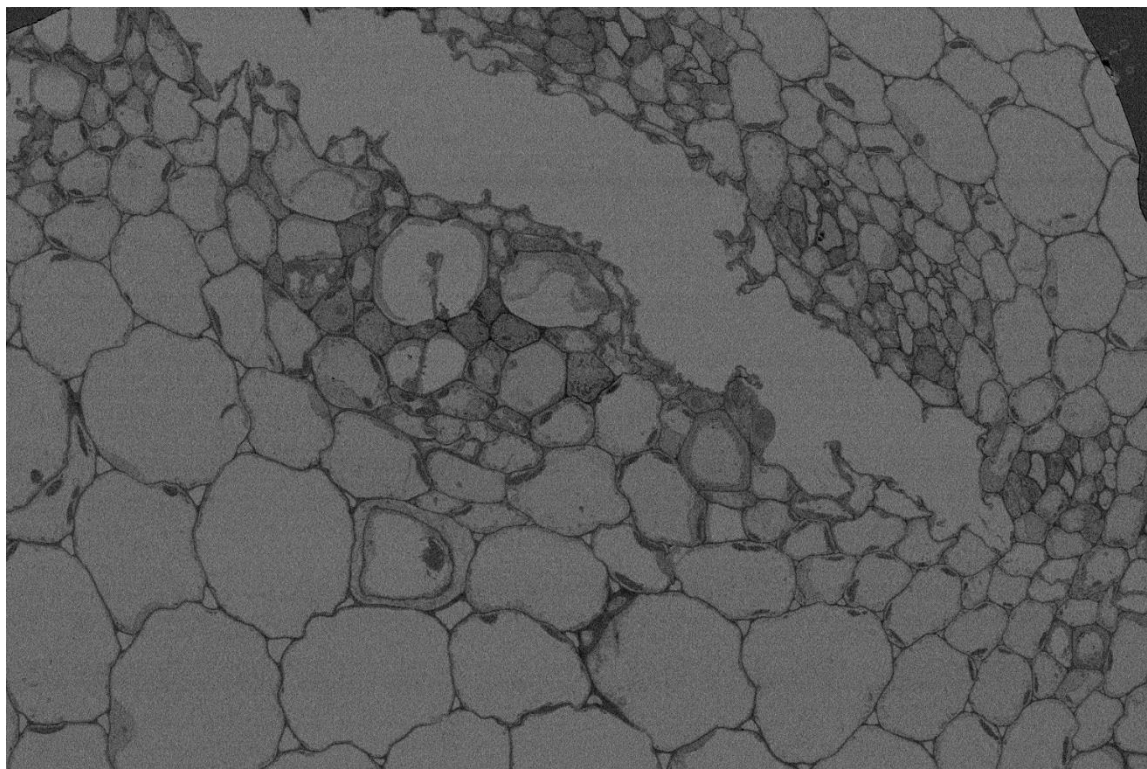


15000 ×

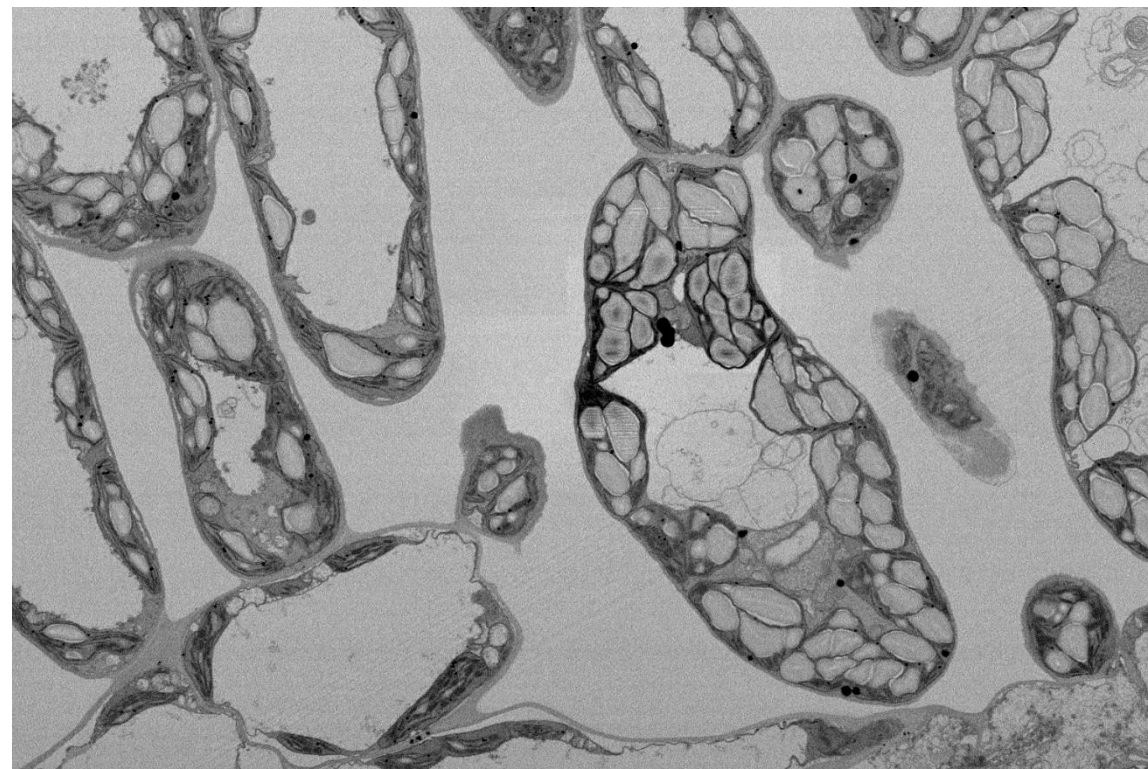


20000 ×

FESEM



Det BSED-USER HV 3kV GP 1.3e-7Pa WD 11.89mm SEM5000S
MAG x550 HFW 0.23mm Res 1536x1024 Dwell 1us |—20um—|

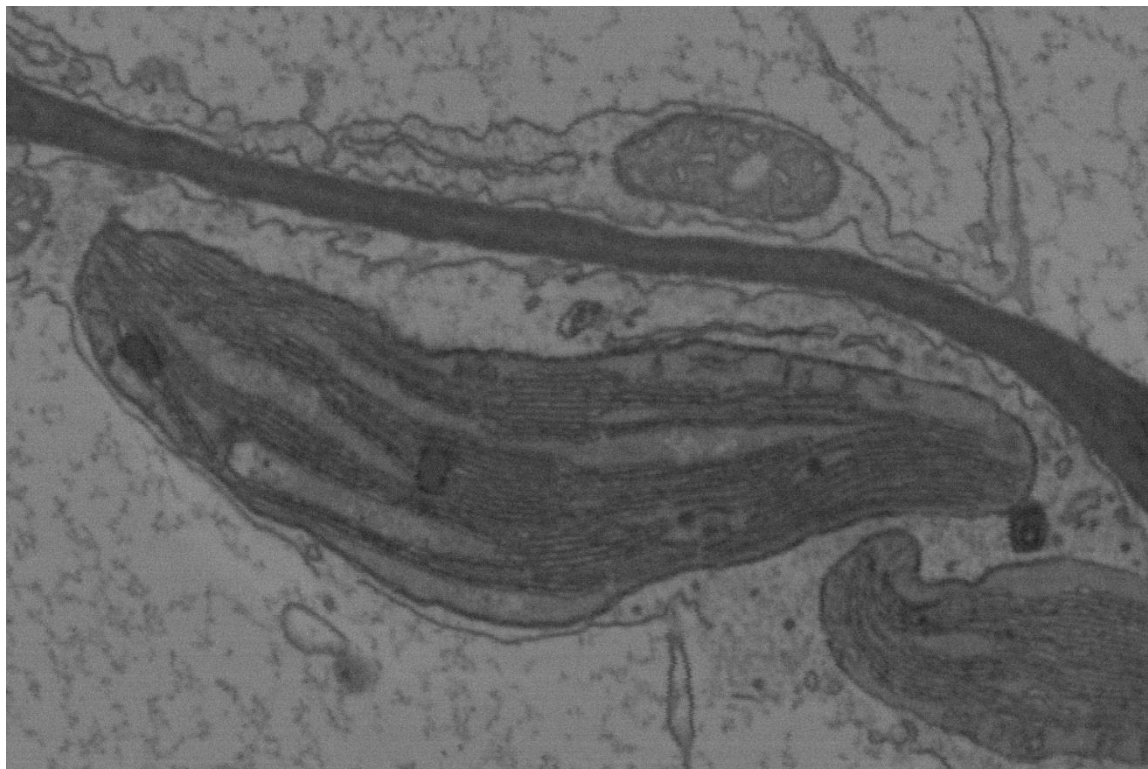



Det BSED-USER HV 3kV GP 1.3e-7Pa WD 9.55mm SEM5000S
MAG x1800 HFW 71.17um Res 1536x1024 Dwell 1us |—10um—|

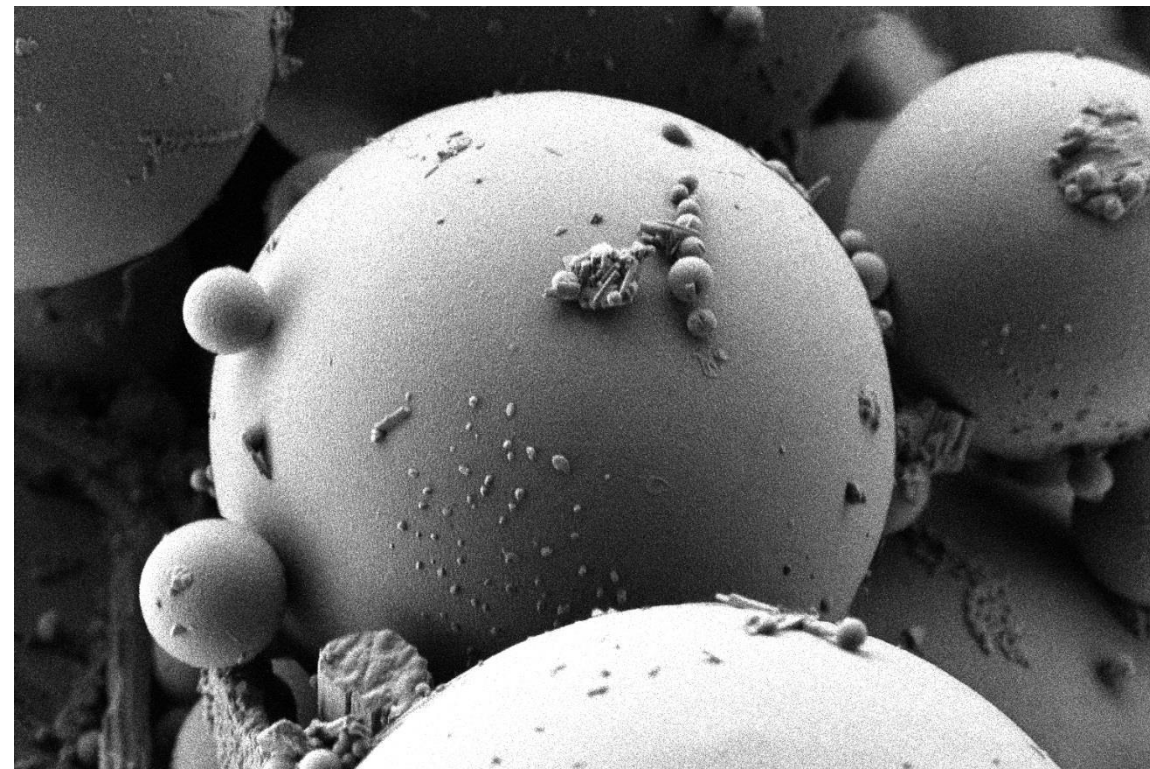
探测器	放大倍数	加速电压
BSED	550X	3kV


探测器	放大倍数	加速电压
BSED	1800X	3kV

FESEM




 Det BSED-USER HV 3kV GP 1.3e-7Pa WD 12.05mm **SEM5000S**
 MAG x20000 HFW 6.41um Res 1536x1024 Dwell 10us |—500nm—|

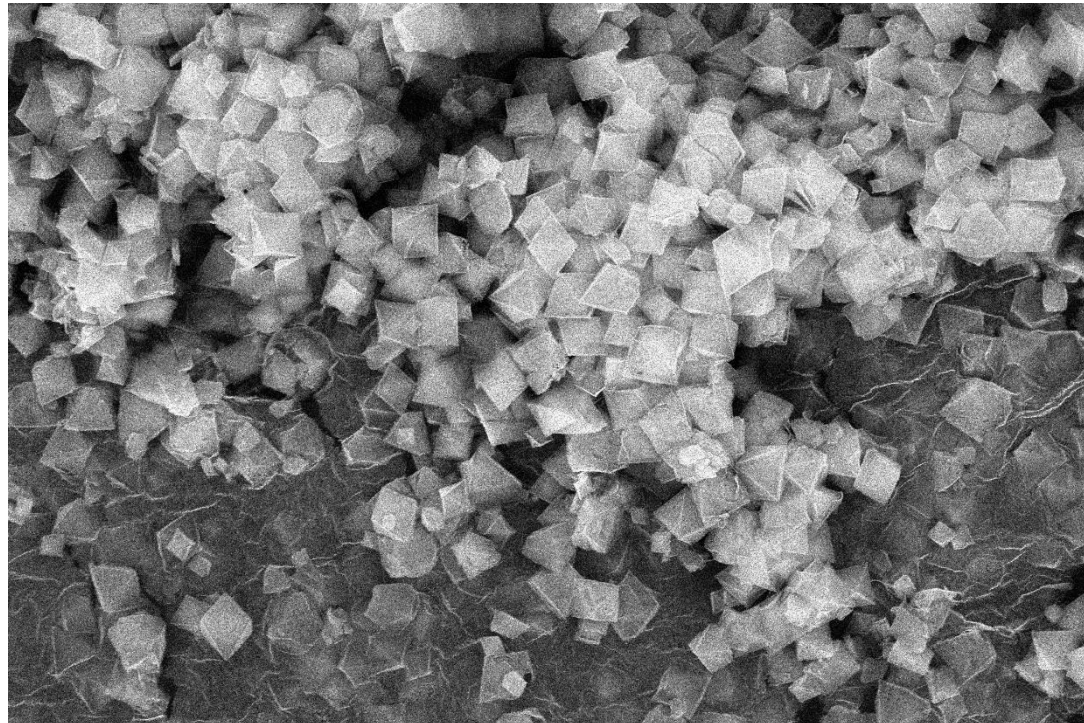



 Det ETD-SE HV 500V GP 1.3e-7Pa WD 5.16mm **SEM5000S**
 MAG x3000 HFW 42.71um Res 1536x1024 Dwell 10us |—5um—|

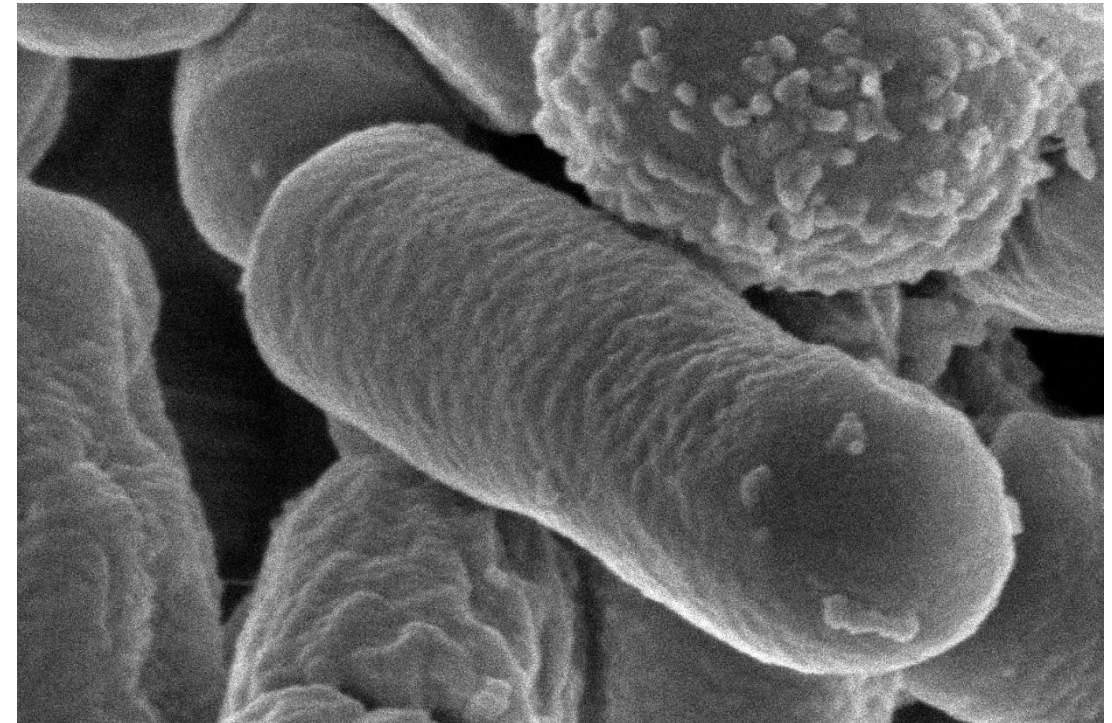
探测器	放大倍数	加速电压
BSED	20000X	3kV


探测器	放大倍数	加速电压
ETD-SE	3000X	500V

FESEM



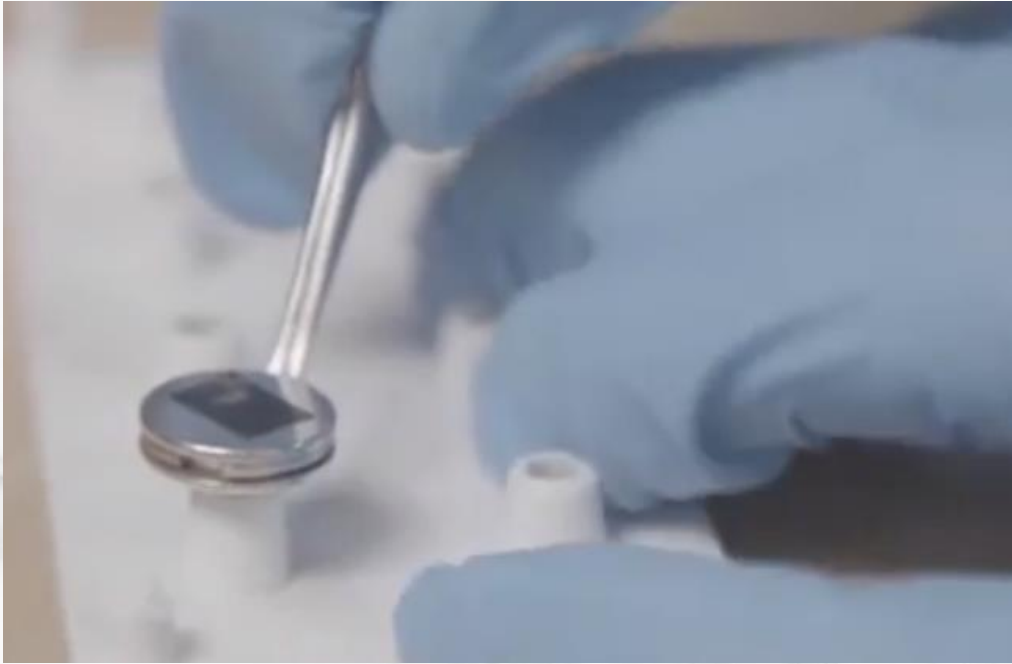

 Det BSED-COMP HV 15kV GP 1.0e-7Pa WD 13.55mm **SEM5000S**
 MAG.S x20000 HFW 20.32um Res 8448x5632 Dwell 0.82us |—2um—|




 Det INLENS HV 3kV GP 8.8e-8Pa WD 7.55mm **SEM5000S**
 MAG x75000 HFW 1.71um Res 1536x1024 Dwell 0.8us |—200nm—|

探测器	放大倍数	加速电压
BSED	2,0000X	15kV

探测器	放大倍数	加速电压
Inlens	7,5000X	3kV



样品制备技术



样品制备

大部分生物样品具有以下主要特点：

- 含水量较多，有的可达80%以上，质地柔软；
- 机械强度低，对热、干燥、压力和电子束轰击的耐受力差；
- 一些生物样品的形貌结构易受渗透压、pH、湿度等环境因素影响；
- 绝大多数生物组织主要是低原子序数元素组成，导电性能较差；二次电子产率低。



样品制备

水分对SEM的影响：

- 样品表面蒸发的水蒸气，遇到高能电子束，会电离放电，引起束流大幅波动，导致影像模糊，甚至不能成像；
- 大部分含水生物样本，在高真空条件下，容易发生形态损伤，产生皱缩或形变；
- 样品水分挥发，会造成SEM侦测器与电子枪内部组件污染；
- 灯丝会因为水分蒸发，发生氧化，缩短工作寿命；
- 含水样品二次电子 (SED) 产出率低，对电子束敏感。



样品制备

SEM生物样品切片制备过程：

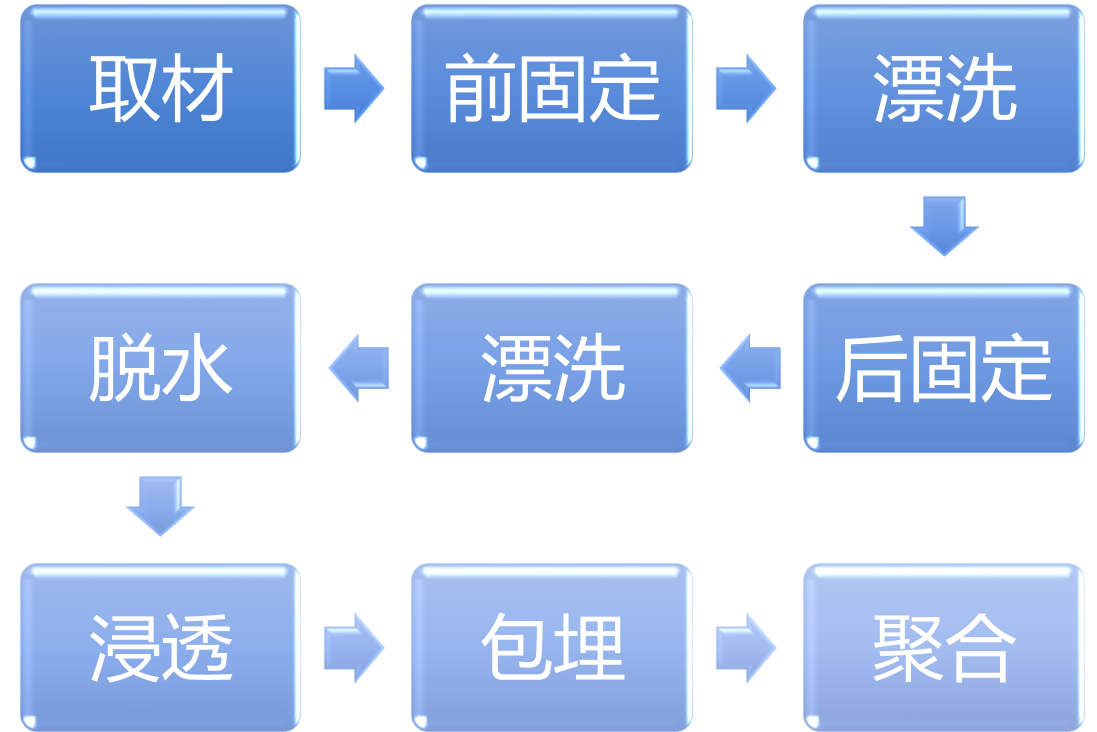
取材：快、准、轻、冷、小；

前固定：用化学法和物理法迅速杀死细胞的过程叫做固定，使用2.5%戊二醛4℃过夜；

漂洗：加入0.1M PBS漂洗3次，15min/次；

后固定：加入1%**钨酸**固定1-2h，以样品变黑为准；

脱水：指用有机溶剂将组织内所含的游离水完全取代的过程，使用不同梯度的乙醇进行梯度脱水，再用丙酮进行置换，每次10min；



样品制备

SEM生物样品切片制备过程：

浸透：使包埋剂逐渐取代样品中的脱水剂，使细胞内外所有空隙都被包埋剂所填充，常用包埋剂为环氧树脂812；

包埋聚合：将液态包埋介质聚合成质地均匀、硬度适宜的固态的过程。

超薄切片的厚度通常为70nm左右，约等于红细胞直径的1%，获得如此薄的切片要涉及许多技术环节，必须使用专门的超薄切片机完成。





样品制备

SEM真菌样品制备过程:

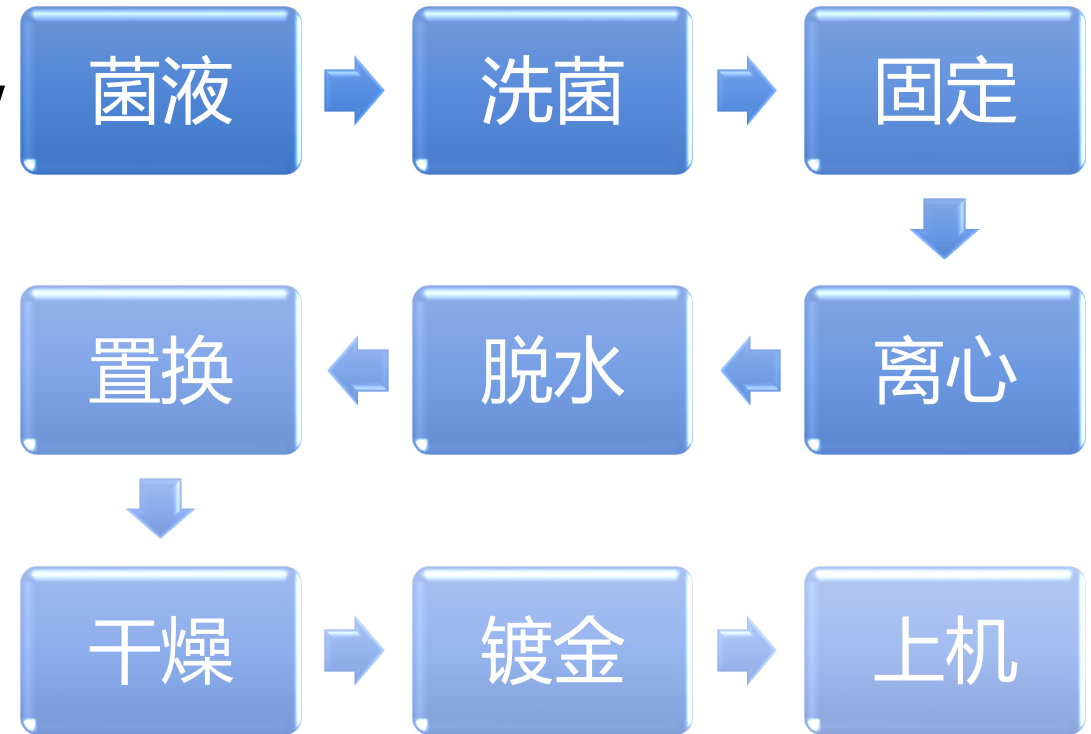
真菌爬片: 在固体培养基表面, 斜插一片盖玻片, 让真菌菌丝自然爬到玻片上。取下玻片用双面导电胶带固定于扫描电镜样品座上, 离子溅射仪上喷金后, 上机观测。一般老的菌丝会变形, 新长出的菌丝比较饱满。

不锈钢网片: 在超净工作台中进行真菌的接种, 将菌饼接种于培养基的中心点, 平贴于培养基上放入已灭菌的2-5片直径0.8mm不锈钢编织网片, 所述不锈钢编织网片距离培养基的中心点位置3-4cm; 然后用无菌膜密封, 置于适宜条件的培养箱中培养, 当露出的不锈钢编织网片已经被菌丝覆盖2/3时, 停止培养。

样品制备

SEM生物样品制备过程:

收集对数生长期的新鲜菌液，无菌水洗涤3次，置于2.5%戊二醛磷酸缓冲液（pH7.2中），于4°C固定过夜；次日使用0.15%PBS缓冲液冲洗；然后依次用30%、50%、70%、90%和100%的乙醇分别脱水15min；脱水后用叔丁醇置换乙醇离心；将样品置于真空冷冻干燥机或临界点干燥仪中干燥。





样品制备

SEM干燥方式:

脱水后样品内仍含有脱水剂及少量残留水分，需进一步进行干燥处理。

大多数动植物的生物类样品，在干燥的过程中，容易发生明显的塌陷，皱缩与变形，因此必须针对不同的生物类样品，选择合适的干燥方式。

自然干燥法

烘干干燥法

临界点干燥法

真空冷冻干燥法



样品制备

烘干干燥法：在常压下，利用干热空气进行干燥的方法。烘干温度不宜过高，适用于植物类、矿物类样本，不适用于生物类样本，易发生坍塌、形变。

真空冷冻干燥法：是将新鲜样品或仅做固定及脱水处理的样品，迅速投入液氮或其他制冷剂中，样品快速冷冻固定后抽真空，样品中已结为固态的“水分”或有机溶剂在真空状态下升华而使样品干燥。

真空冷冻干燥法可以直接干燥含水样品，也可以样品脱水后再在有机溶剂中进行冷冻干燥。

样品制备

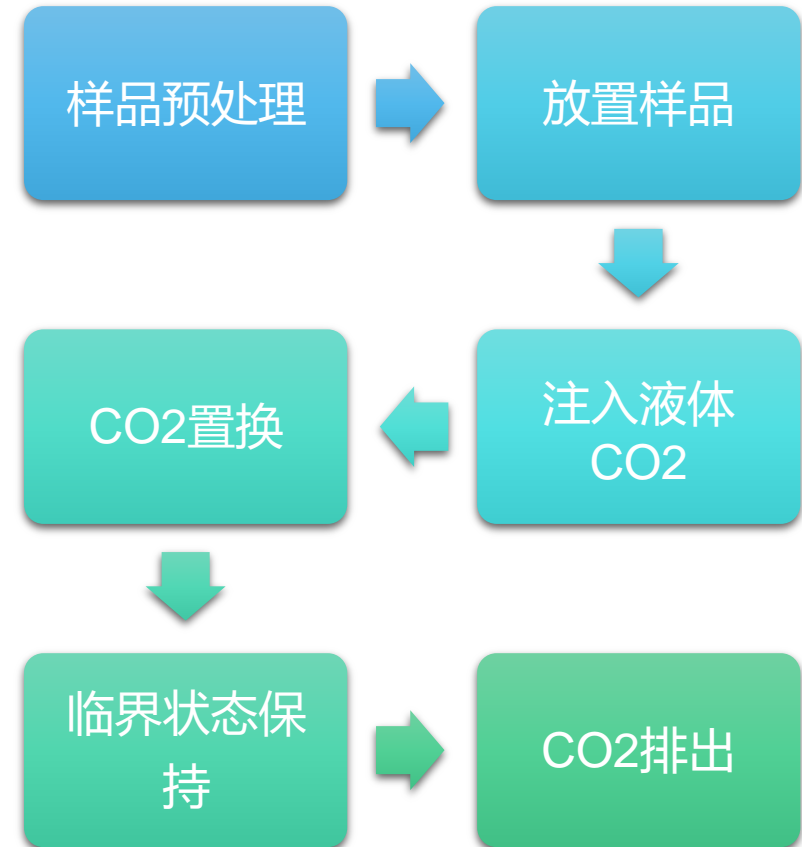
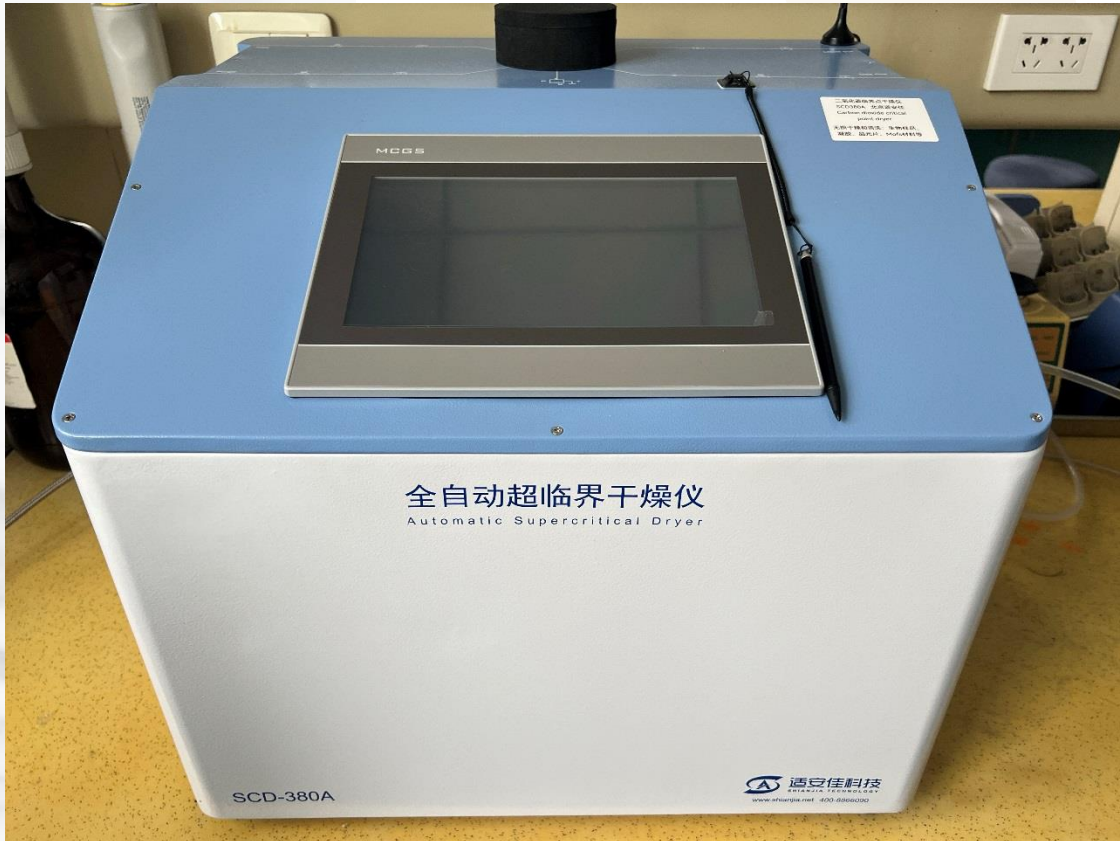


临界点干燥法: 是利用物质在临界点的温度与压力下，液相，气相平衡共存的极限热力状态，液体水分可以轻易被置换出来，而留下最原始与最佳的固相形貌。

原理是利用二氧化碳的特性，在临界点附近调节温度和压力，使二氧化碳处于液态和气态之间的临界状态。在这种状态下，水分会被二氧化碳吸收并溶解于其中，达到干燥的效果。通过适当的温度和压力控制，可以将二氧化碳中的水分含量降低到较低的水平。

样品制备

对于二氧化碳来说，其临界点温度为31.1摄氏度，临界点压力为7.38兆帕。在临界点附近进行干燥处理可以有效地去除二氧化碳中的水分。



样品制备

样品制备注意事项：

- 样品为干燥无水固体，无易挥发溶剂；
- 观察面应该清洁，无污染物；
- 导电和导热性能好；
- 样品热稳性要好，且不会被电子束分解；
- 磁性较强样品要预先去磁。



严禁在样品杯中制样



样品干燥



样品台必须低于样品杯



样品必须固定牢固

样品制备



对导电胶要求：低阻率；
室温较快固化；
颗粒细；
不能与样品及样品台产生反应；
受电子轰击不易分解。

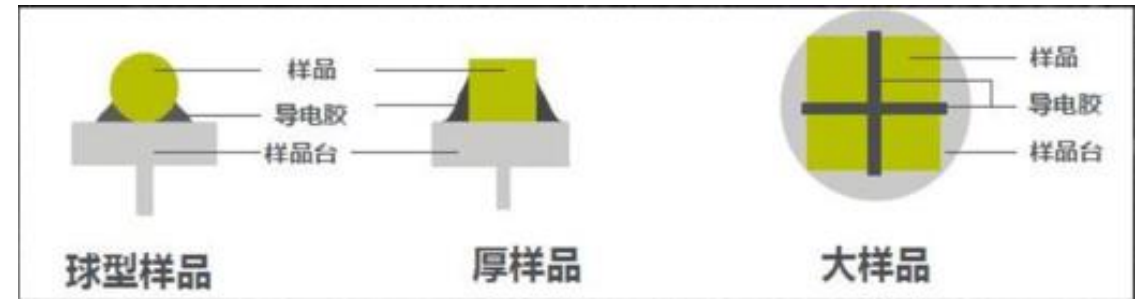
样品制备

特殊样品制备

对于粗糙结构样品，可以试用弹涂胶或银涂胶来把它黏在样品台上；

对于无法固定在导电胶上的大颗粒，可以涂胶制样；

多孔样品会吸收涂胶，堵塞空隙，为避免吸收，最好使用夹持设备或插件来夹持这些样品。





粉末样品制备

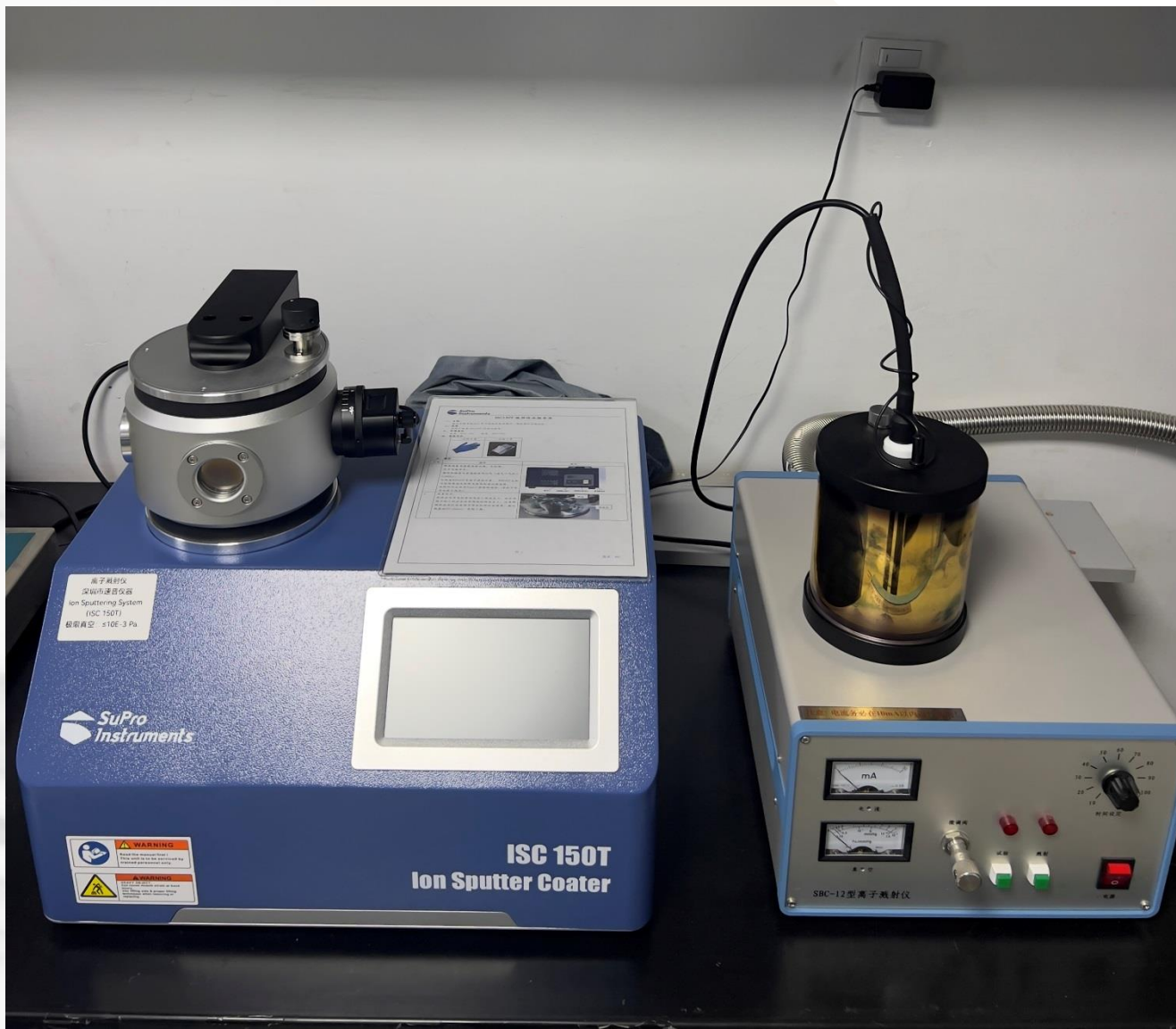
样品必须粘贴牢固，放入电镜前，必须除去任何松散颗粒，每次都使用压缩气体除去样品上的松散颗粒、粉尘、碎屑。

松散的样品颗粒容易在抽真空的时候或观察的时候从样品台上脱落，进入电镜真空腔室，进而污染电镜，损伤电镜探头。

危害

- 污染电镜腔室
- 污染电镜光路部件，引发图像异常
- 损伤或污染探头

样品制备





扫描电镜与能谱分析

样品制备技术