



成大核心設施中心  
Core Facility Center, NCKU

# 儀器設備技術手冊與 訓練教材

## 臨場液態樣品載具

撰寫人：朱紋慧

2022 年 5 月 31 日

## 一、前言簡介

簡要說明機台的功能規格、廠牌型號、公司或原廠狀況、台灣代理商或維修管道、機台建置過程、…等

本中心貴儀組儀器-高解析穿透式電子顯微鏡於 2021 年開啟了液態樣品的尖端服務，所購置的液態樣品載具為 Protochips 公司所生產，型號為 Poseidon Select，於 2021/9/3 在代理商捷東公司的協助下完成建置。Protochips 位於北卡羅來納州的三角研究園區，是開發創新臨場觀測電子顯微鏡產品的領導者，革命性的系統包括用於液體的 Poseidon Select、用於加熱和電氣的 Fusion，以及用於加壓氣體和加熱的 Atmosphere，其中 Poseidon Select 是唯一獲得 FEI、JEOL 和 Hitachi 對其儀器安全的液體系統。

Poseidon Select 液態樣品載具規格大致如下：

1. 具相容性於原有電鏡平臺:可相容於本中心之 JOEL TEM 使用(JEM-2010、JEM-2100F、JEM-2100F Cs)
2. 相容原有電子顯微鏡功能 (if available on TEM):如 STEM/TEM、diffraction、EDS、EELS、aberration correction(JEM-2100F Cs)。
3. 主要功能及可擴充性:可實現 TEM 中臨場液體的靜態/動態實驗. 並具有三個液體流道，可在樣品載台端進行液體混合實驗. 此外，將來(預計 2022 年底)可升級具備液體加熱及電化學實驗功能.
4. E-chips 晶片選擇及功能:依據使用需求, 原廠提供多種 E-chips 晶片型號選擇，具有多種厚度 E-chips (50nm、150nm、500nm、1  $\mu$ m、5  $\mu$ m)、視窗的晶片供使用者選擇，允許使用者做 EDS 分析。
5. E-chips 晶片大小 (E-chips dimension) :大晶片尺寸為 6.0mm x4.5mm. 小晶片尺寸為 2.0mm x 2.0m.
6. 樣品載台液體容量 (Tip Reservoir Volume) :靜態液體容量約 1.44uL.
7. O 型圈設計 (Number of O-Rings in Tip): 單密封圈設計，密封圈安裝在晶片底部，實現快速準確且安全的樣品製備，無需對中.
8. 管中管設計 (Replaceable Tubing) :內管道可更換，從而避免不同實驗的樣品交叉污染，與不需要拆開樣品桿，更換內管時間小於 2 分鐘.

## 二、 背景知識與原理

### 與本機台相關的背景知識與原理

#### 1. 液態樣品之穿透式電子顯微鏡的發展

在過去的幾年裡，電子顯微鏡的分辨率(resolution)透過像差校正顯著地提高，解決了數十年的像差問題，現在的穿透式電子顯微鏡可以對原子級結構進行詳細的定性和定量分析，以及使用較低電壓的電子成像卻同時保持高分辨率。與此同時，電子探測器的改進也改變了電子顯微鏡的應用，可以用更少的電子獲得圖像，減少對樣品的損壞；也可以對動態過程進行更高速的成像。此外，科技的進步使得儀器可以更有效地收集 X 射線等信號來改善奈米尺度的化學分析。而電子顯微鏡在含有液體的樣品的成像能力也有小規模的進展，這改變了電子顯微鏡在材料中的應用科學、生命科學及其他領域的應用，如觀察在操作過程中電池內部發生的變化、奈米晶體自組裝過程中原子的附著以及處於原生液態的生物材料的結構…等，因此推動了用於觀察液態樣品的電子顯微鏡的發展。

1944 年 Abrams 首次提出了用於電子顯微鏡的封裝晶片的概念[1]，如圖 1，但礙於晶片製程技術，一直到了 1973 年，Double 等人才成功組裝了液態樣品晶片並進行了臨場液體電子顯微鏡觀測，如圖 2，其使用的加速電壓高達 1MV[2]。但由於當時的半導體製程技術尚未成熟，無法大量製造，且隨著環境式電子顯微鏡的發展，這種使用晶片封裝的方式逐漸沒落。而近年來，隨著製程技術越來越成熟，Williamson 等人於 2003 年在 Nature Materials 期刊上以氮化矽薄膜來封裝液體，在液態電子顯微鏡中觀測到電化學現象，如圖 3，才又掀起了研究熱潮。[3]

目前液態電顯大致上分為開放式及封閉式系統，前者為利用不同的幫浦來分別控制顯微鏡內的真空系統及維持樣品高壓的部分；後者則是利用封裝體將液體與顯微鏡中的真空系統隔絕，可用於高蒸氣壓液體或高壓氣體環境，而樣品完全被封住，不需要額外的幫浦控制，但封裝體的設計需要特別小心謹慎，如：顯微鏡觀察的區域必須是電子透明的(electron transparent)，並提供盡可能大的視野。因此封裝模必須很薄，並且是由輕原子製成的材料，才能達成電子透明的目標，但是，它也必須是穩健的，因為大氣壓或更高壓力下的液體和 TEM 的真空兩者之間的壓差會對膜產生應力，迫使它向外凸出朝向真空，特別是如果封裝膜(或稱視窗)面積很大。應力可能導致斷裂，導致液體可能洩漏到真空中，且膜的膨脹會增加液體的厚度，從而降低分辨率。

隨著半導體製程技術的成熟，液態樣品之穿透式電子顯微鏡技術已經變得更加普遍，而本中心所建置的液態樣品載具(Poseidon Select)屬於封閉式系統。

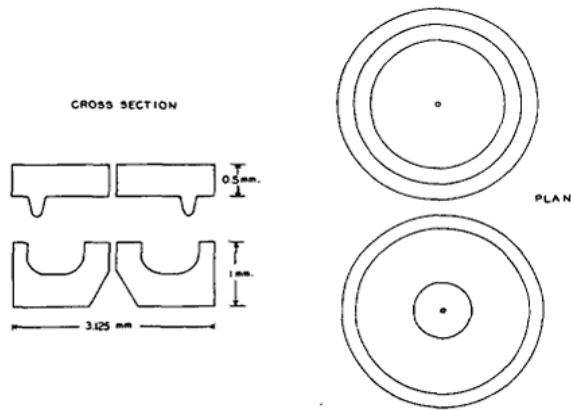


FIG. 1. Perforated platinum disks used to form enclosed electron microscope cell; cell and cover shown in cross section and in plan.

圖 1 Abrams 首次提出了用於電子顯微鏡的封裝晶片的概念。[1]

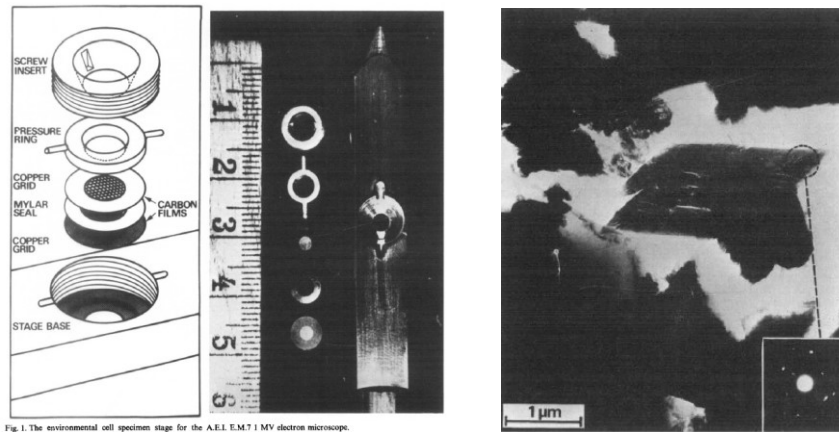
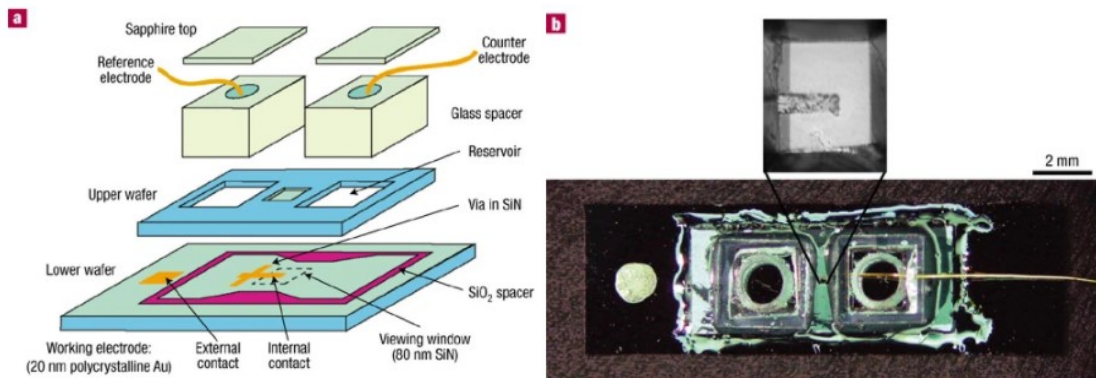


Fig. 1. The environmental cell specimen stage for the A.E.I. E.M.7 1 MV electron microscope.

圖 2 Double 等人成功組裝了液態樣品晶片並進行了臨場液體電子顯微鏡觀測。[2]



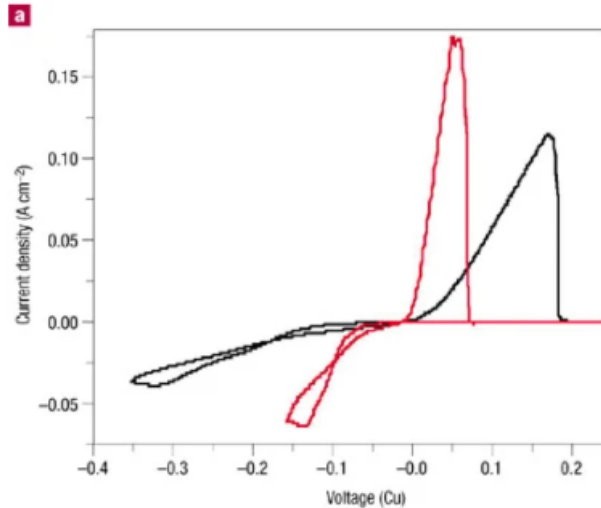


圖 3 Williamson 等人以氮化矽薄膜來封裝液體，在液態電子顯微鏡中觀測到電化學現象。[3]

## 2. 液態樣品於電顯之空間解析度

穿透式電子顯微鏡的解析度主要與電子的加速電壓（亦即波長）和像差（Aberration）有關。加速電壓愈高，波長愈短，解析度也愈佳，同時因電子動能增高，電子對試片的穿透力也增加，所以試片可觀察的厚度也能相對增加。另外影響解析度的因素是像差，像差的來源大致有四種：

- (1) 繞射像差（Diffraction Aberration）—這是物理光學的基本限制。
- (2) 球面像差（Spherical Aberration）—這是來自物鏡的缺陷，不易校正。如圖 4 所示。

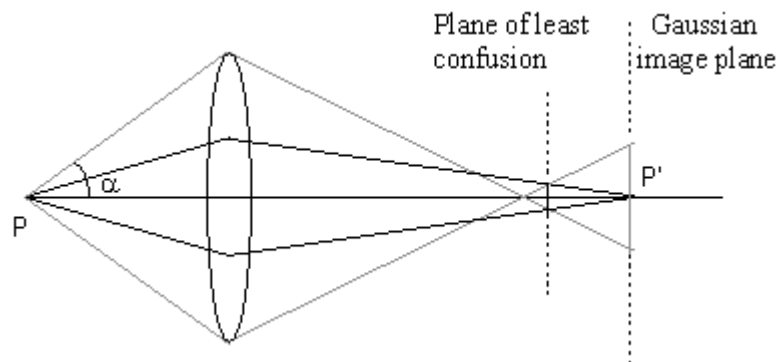


圖 4 球面像差示意圖

- (3) 散光像差（Astigmatism）—這是由物鏡磁場不對稱而來，因為圓形對稱軟鐵磁片製作時精度控制困難，同時顯微鏡使用中，污染的雜質附於極片上也會導致像差，一般用像差補償器（Stigmator）產生與散光像差大小相同方向相反的像差來校正。如圖 5 所示。

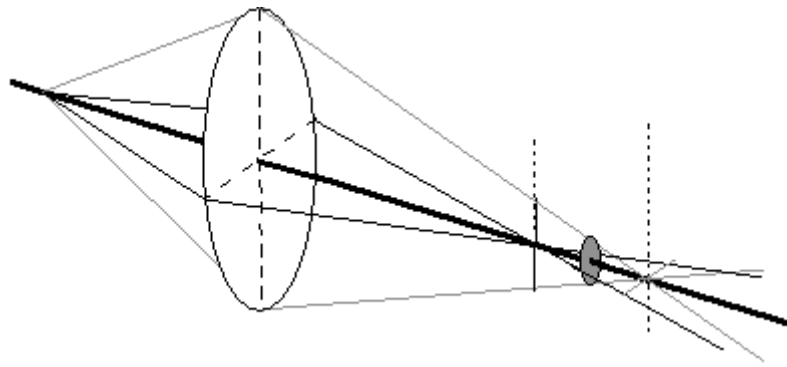


圖 5 散光像差示意圖

(4) 波長散佈像差 (Chromatic Aberration) — 因為電子的波長會隨著加速電壓或透鏡電流不穩而改變，也可能與試片作非彈性碰撞喪失能量，所以電磁透鏡的焦距變化與入射電子能量有關，可以據此導出影像模糊的半徑與波長散佈像差係數成正比。如圖 6 所示。

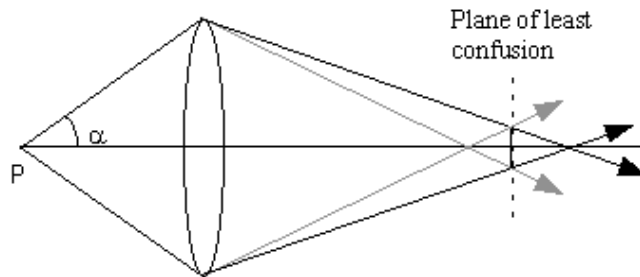


圖 6 波長散佈像差示意圖

此外，在穿透式電子顯微鏡 (TEM) 中，隨著樣品厚度的增加，圖像質量通常會降低，因此這意味著液體必須是薄層的形式，大約是奈米到幾微米的範圍。

在球面像差已校正的情況下，波長散佈像差可能占主導地位，在樣品不是超薄時，波長散佈像差必須修正厚度的影響，特別是液態樣品所使用的晶片含有一定厚度的觀察視窗。透射電子的能量分佈  $\Delta E$  可以表示成下列式子[4]:

$$\Delta E = \frac{N_A e^4 Z \rho T}{2\pi \epsilon_0^2 W m_0^2 v^2},$$

其中  $N_A$  是亞佛加厥常數， $e$  是基本電荷， $W$  是原子量， $Z$  是原子序數， $\rho$  是液體層的密度， $T$  是厚度， $\epsilon_0$  是真空介電常數， $m_0$  是質量， $v$  是電子速度。對於水而言  $Z=4.7$ ，我們可以將上面的方程式組合成下面的分辨率表達式:

$$d_{C,TEM} = 6 \times 10^{12} \alpha C_c T / E^2$$

其中，能量  $E$  的單位為 eV。對於純水，忽略晶片觀察視窗厚度，並使用典型的實驗參數，假設  $\alpha = 10$  mrad， $C_c=2$ mm， $E=200$ keV， $T=1 \mu$ m，我們可獲得  $d_{C,TEM}=4$ nm。

圖 7 顯示最大分辨率理論值與純水液體厚度的函數關係。標示 1-3 的為文獻的數據 [5-8]。

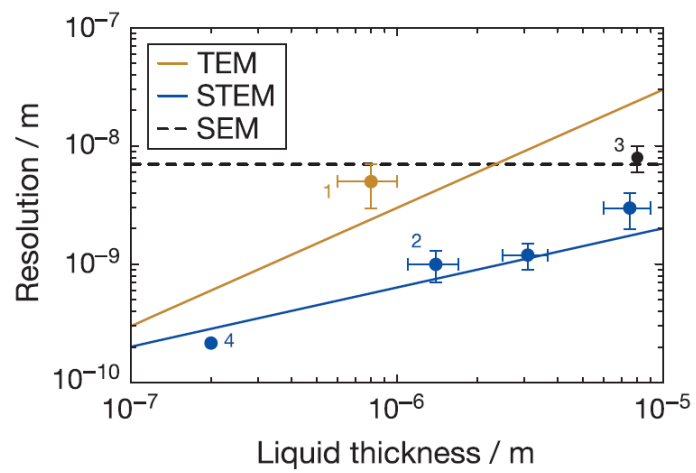


圖 7 TEM 和 STEM 的最大分辨率理論值與水的厚度關係圖。 [3]



## Reference

1. Abrams, I. M., McBain, J. W., A Closed Cell for Electron Microscopy. *Journal of Applied Physics*, 15 (8) (1944). 607-609.
2. Double, *Mater. Sci. Eng.*, 12 (1973), 29–34.
3. M. J. Williamson, R. M. Tromp, P. M. Vereecken, R. Hull & F. M. Ross, *Nature Materials*, 2(2003), 532–536.
4. N. de Jonge and F. M. Ross, Electron microscopy of specimens in liquid. *Nat. Nanotechnol.*, 6 (2011), 695–704.
5. K. L. Klein, I. M. Anderson and N. de Jonge, Transmission electron microscopy with a liquidflow cell. *J. Microsc.*, 242 (2011), 117–123.
6. N. de Jonge, N. Poirier-Demers, H. Demers, D. B. Peckys and D. Drouin, Nanometer resolution electron microscopy through micrometers-thick water layers. *Ultramicroscopy*, 110 (2010), 1114–1119.
7. H. Nishiyama, M. Suga, T. Ogura et al., Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film. *J. Struct. Biol.*, 169 (2010), 438–449.
8. J. E. Evans, K. L. Jungjohann, N. D. Browning and I. Arslan, Controlled growth of nanoparticles from solution with in situ liquid transmission electron microscopy. *Nano Lett.*, 11 (2011), 2809–2813.



### 三、機台介紹

外觀與硬體架構、系統組成、軟體程式、運作原理、功能與規格、…等

在 TEM 液態樣品的動態觀察實驗中，過去一直存在很大的困難，主要是液體無法存在真空中，含水量高的樣品通常因縮水而無法呈現原貌，而另一常見的冷凍法也非這些物質的正常狀態。TEM 液態樣品載具(liquid-cell TEM holder)為利用半導體晶片將液體密封在載具尖端，以進行液體靜態或動態之觀察，此外，可利用客製化的微機電晶片組合選擇液體層厚度、流體通道、觀察視窗尺寸等，此外，載具設置有 3 個液體通道，兩入一出，利用兩入口通道可做樣品混合或反應實驗。其應用範圍包括活體細胞、電池、觸媒、分散液、膠質及其他軟性物質之動態實驗。載具設計以微機電晶片為主軸，其流體量已控制到最小，對觀察的干擾也降到最低，可做奈米級的高倍觀察；此外針對不同類性樣品只需更換晶片，不需更換 holder，大幅提昇其應用涵蓋面。下圖為液態樣品載具示意圖，可利用半導體製程做成的晶片(E-chips)於尖端(左縮圖)進行封裝後，液體藉由注射泵(syringe pump)注入到載具內部進行觀察。

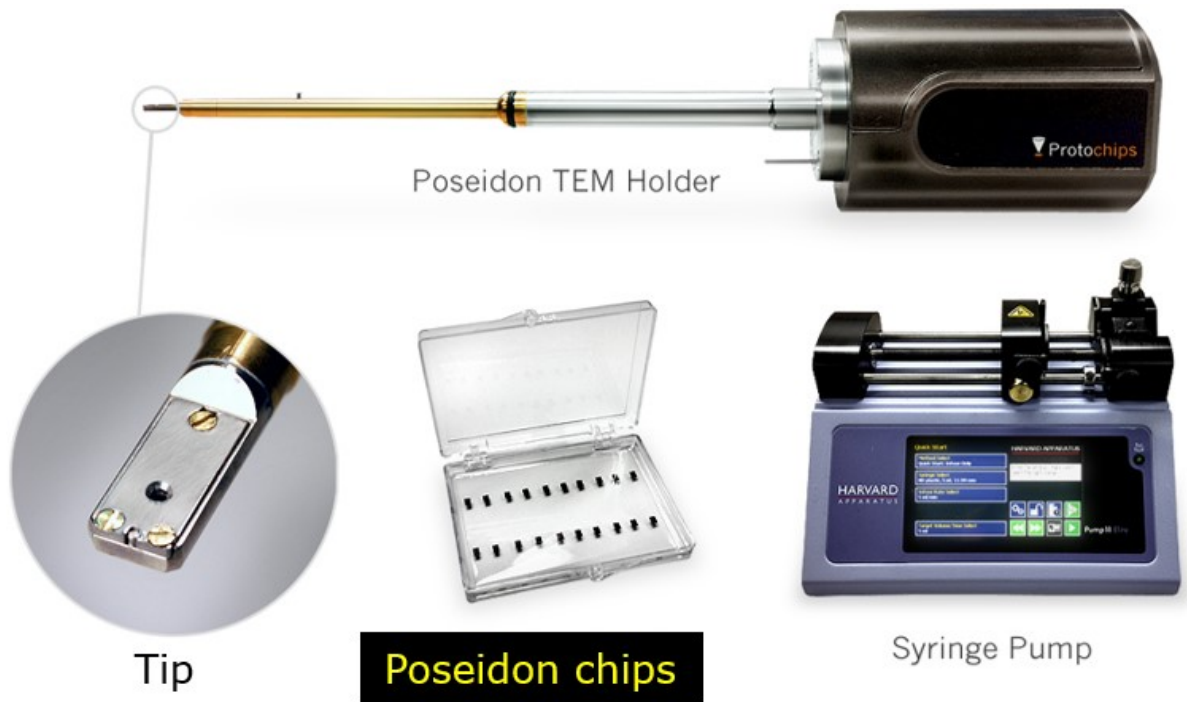


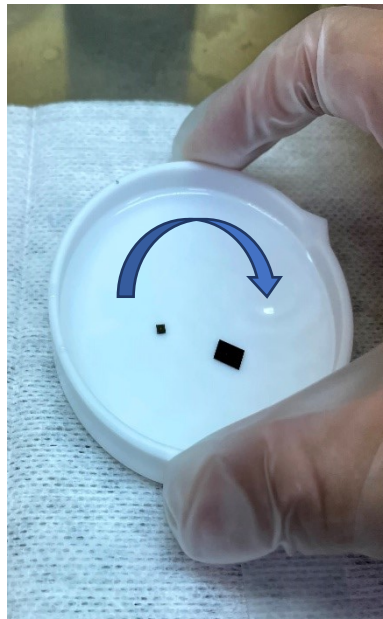
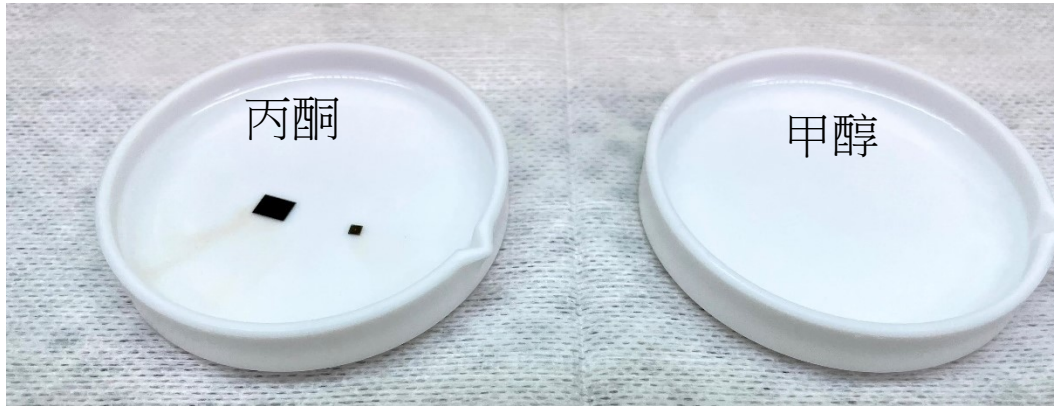
圖 8 穿透式電子顯微鏡之液態樣品載具及其附屬配備。上圖為載具外觀，下圖為載具尖端放大圖、用於封裝液體的 E-chips 及注入液體的注射幫浦(由左至右)。

### 四、機台操作

正確的操作模式或操作方式、重要的動作執行細節、資料擷取與分析應用、…等

以下詳述載具操作過程：

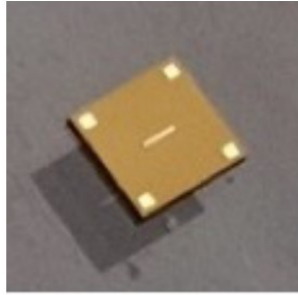
- 1) 選擇適當的晶片進行清洗。
  - a) 將晶片置入丙酮(acetone)內，稍微晃動做清洗，時間約 2 分鐘。
  - b) 將晶片置入甲醇(methanol)內，稍微晃動做清洗，時間約 2 分鐘。



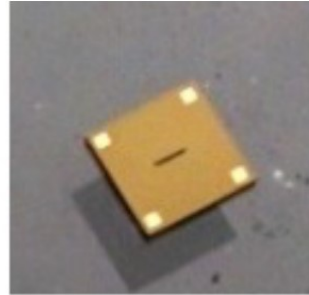
- c) 通過吹平行於表面的氮氣或壓縮空氣來乾燥晶片。  
d) 放入電漿清洗機(Plasma cleaner)清潔約 20 秒以降低表面累積電荷。



- e) 以顯微鏡確認晶片視窗有無破損。(晶片視窗區域呈現亮區)



Correct



Incorrect

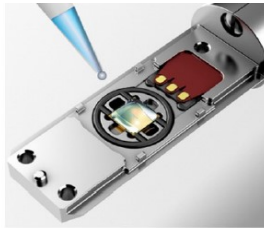
- 2) 取下蓋子並檢查載具尖端。
  - a) 旋下三個螺絲，取下蓋子。
  - b) 確認載具尖端及 O-ring 周圍沒有棉絮或其他碎屑，以及 O-ring 有放好。
- 3) 連接管線並檢查堵塞物
  - a) 連接注射器到 1.5 公尺之 PEEK 管。
  - b) 手動壓下注射器，直到在管道出口處出現液滴。
  - c) 將 PEEK 管連接到載具上。
  - d) 用液體灌注每條液體管路並確認沒有堵塞。
- 4) 放置晶片及樣品
  - a) 將小晶片插入墊片中間位置，膜面朝上。
  - b) 將樣品放置到小晶片上。
  - c) 將大晶片放在小晶片上方，膜面朝下。



1. Insert Gasket



2. Insert Small E-chip



3. Prime with Liquid

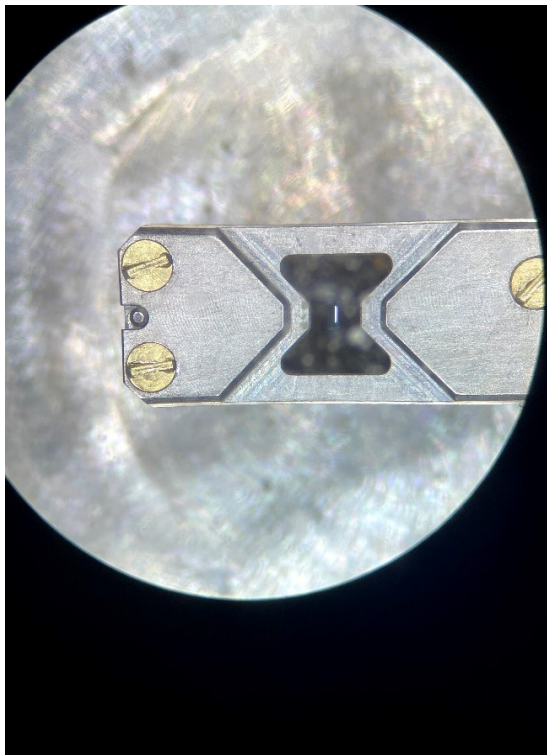


4. Insert Large E-chip

- 5) 蓋上蓋子並使用可調扭力起子密封尖端。



6) 使用顯微鏡檢查載具尖端是否有異狀(如晶片破裂)。

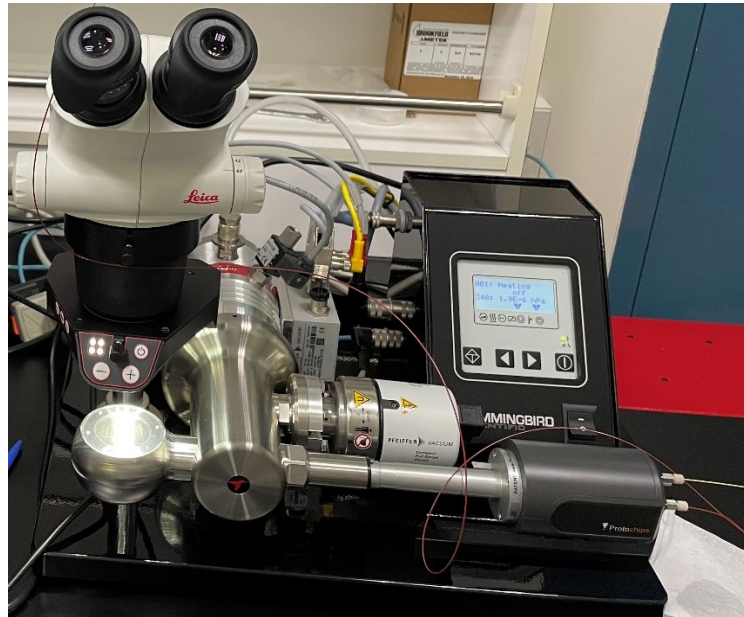


7) 執行洩漏檢查。

a) 使用測漏儀(如下圖)檢查密封性。(15 分鐘內壓力須達到  $4.6E-6$  hpa)。

b) 執行洩漏檢查後，在顯微鏡中重新檢查尖端。





8) 上機。

9) 下機後清潔:

- a) 使用注射泵將蒸餾水流過系統以沖洗支架和管道。
- b) 斷開管道並用注射器手動將蒸餾水流過每個管道。
- c) 取下蓋子和晶片並用水手動沖洗每個輸入/輸出端口及載具尖端，必要時可用超音波震盪器清洗尖端，清洗後以氮氣槍吹乾。
- e) 儲存前以測試片重新組裝。(非必要)

## 五、 其他事項

實際範例、經驗分享、安全議題、機台保護措施、注意事項、…等

注意事項：載具所能使用之溶液須符合原廠所提供之化學相容表，如附件。

## 六、 附件資料

原廠 manuals 與技術手冊、有用之教材資訊、相關鏈結、…等

1. 原廠官網: <https://www.protochips.com/>
2. 代理商捷東公司官網: [http://www.jiedong.com.tw/brand-view.php?brand\\_id=26](http://www.jiedong.com.tw/brand-view.php?brand_id=26)
3. [原廠 manuals](#)。
4. [化學相容表](#)。