

电子显微技术应用于生物纳米材料表征 与测试的研究进展

施云峰^{1,2}, 薛巍^{1*}

(1. 暨南大学 生物医学工程系, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学 分析测试中心, 广东 广州 510632)

摘要: 该文简述了电子显微技术的发展历程, 并介绍了现代电子显微镜的新功能。针对生物纳米材料理化性能与功能应用的特殊性, 结合研究实例, 重点阐述运用电子显微结构表征与原位分析测试技术指导构建新颖纳米结构、揭示材料与细胞/组织相互作用并发挥功能的机制。并在此基础上, 展望了电子显微技术在生物纳米材料研究领域的发展方向(大尺寸图像拼接、三维重构、动态原位实时成像)。

关键词: 电子显微技术; 透射电子显微镜; 扫描电子显微镜; 生物纳米材料

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)05-0631-04

Research Progress on Applications of Electron Microscopy in Characterization and Analysis of Bio-nanomaterials

SHI Yun-feng^{1,2}, XUE Wei^{1*}

(1. Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Test and Analytical Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The development course of electron microscopy (EM) and its new functions in recent years are introduced in this article. In bio-nanomaterials research, EM could be employed to carry out morphology characterization and in-situ chemical analysis, but higher standards of experimental methods are necessary because of the diversity of biomaterials, the complexity of newly created nano-structures and their functionalities tightly connected with living cells/organs. Therefore, the strategies to develop advanced EM hardware and software required by these specialties of bio-nanomaterials are systematically explained. Besides, the development directions for EM in field of bio-nanomaterials research such as large-size mosaic image with high resolution, three-dimensional modeling of tiny and complicate structures, real-time and in-situ characterization and analysis during experiments are prospected.

Key words: electron microscopy; transmission electron microscope; scanning electron microscope; bio-nanomaterials

电子显微技术(Electron microscopy, EM)是利用电子光学系统进行显微成像与原位分析的技术。电子的德布罗意波长更短, 因此使用电子束光源的显微镜具有更高的分辨率。另外, 电子束与样品作用能激发出特征 X 射线、阴极荧光、俄歇电子等有价值的信号, 可应用于原位元素分析。自 20 世纪 30 年代诞生了第一台电子显微镜开始, 随着技术的发展, 电子显微镜的分辨能力由最初的 50 nm 显著提升至亚纳米的原子尺度(配备球差矫正器)^[1], 附件功能也得到了极大拓展, 如: 可进行实验并实现原位观察的样品传送装置^[2]; 用于元素组成与分布测试的波长色散谱仪(WDS)^[3]、X 射线能谱仪(EDS)^[4]、俄歇电子能谱仪(AES)^[5]、电子能量损失谱仪(EELS)^[6]; 用于晶体样品的电子衍射与高分辨成像^[7]; 用于冷冻电镜(Cryo-EM)低衬度成像的直接电子检测成像系统等^[8]。

现代 EM 的推广与应用, 极大地推进了科学进步。尤其在生物纳米材料研究领域, 电子显微镜更是重要的分析与表征工具, 可应用于指导新颖纳米结构的构建、揭示材料与细胞/组织相互作用并发挥

收稿日期: 2019-02-14; 修回日期: 2019-03-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31870943); 广州市珠江科技新星项目(201610010158)

* 通讯作者: 薛巍, 博士, 教授, 研究方向: 生物纳米材料的制备与应用, E-mail: bme_xue@hotmail.com

功能的机制^[9]。本文结合研究实例,重点介绍了适用于生物纳米材料研究的电子显微结构表征与原位分析测试方法。

1 生物纳米材料的定义与分类

生物纳米材料是指一类应用于医学诊断与治疗,人体组织与受损器官结构与功能重建、恢复与增强的功能性材料^[10]。按物理化学属性可分为金属材料、无机非金属材料、有机高分子材料及其复合材料等;按来源可分为天然材料与合成材料两大类。其生物安全性与功能性显著依赖于显微结构特征^[11-12]。

2 电子显微镜的分类及其应用特点

透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)与扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)是开展材料科学研究的两大利器。基于TEM的显微形貌分析、电子衍射与高分辨成像、元素分析可应用于表征纳米晶体(如金属及其氧化物^[13]、氧化硅^[14]等)、纳米片层与纳米管(如石墨烯^[15]、黑磷^[16]、碳纳米管^[4]等)、金属-有机物骨架材料(MOFs)^[17]、聚合物纳米结构^[18](胶束、微球、聚合物纳米涂层等)以及生物质膜伪装纳米载体^[19]等;配备表面分析附件的SEM,可应用于表征样品的表面显微结构,测算其孔隙率和粗糙度,评价表面处理、改性、吸附的效果。此外,电子显微镜也可在细胞或亚细胞结构水平表征细胞或组织对纳米材料的识别、吞噬,以及材料进入胞浆后的转运、药物释放与降解过程,用于精确评价生物安全性并验证预设的治疗效果^[20]。

3 应对生物纳米材料特殊性的电子显微实验方法

生物纳米材料涵盖面广,理化性能复杂多样,对样品制备方法与表征测试条件也有不同的要求。特别针对有机高分子样品(低电子衬度、束流敏感、表面不导电)、磁性样品、介孔样品、材料与细胞或组织复合的样品,需对常规实验方法进行优化。

3.1 TEM 表征有机高分子样品

绝大多数有机高分子基生物纳米材料具有低电子衬度、束流敏感、易受辐照损伤的特点,如蛋白颗粒、由两亲聚合物自组装形成的胶束、脂质体等。常规应对策略有:①增加入射电子束的剂量(Dose rate),这样可增强成像衬度,但也会增加电子辐照损伤,破坏样品结构;②使用重金属染液(磷钨酸、醋酸双氧铀、柠檬酸铅等)增强样品与背景的衬度差,缺点是会导致分辨率降低。如Chetanachan等^[21]报道了脂质体的TEM样品负染色技术(Negative staining),通过优化染色条件(2.5%醋酸双氧铀,30 s),成功表征了双层膜结构。③20世纪80年代出现了冷冻电子显微镜技术(Cryo-electron microscopy, Cryo-EM)。通过对分散有纳米颗粒的悬浮液进行快速冷冻处理,并使用冷台承载样品保持低温氛围,进行TEM成像。Cryo-EM可使冷冻样品的辐照损伤被有效控制,配合使用先进的直接电子检测器可捕获极低衬度的图像信息。Bates等^[22]采用冷冻电镜断层成像技术(Cryo-electron tomography, Cryo-ET)研究含有聚氧化乙烯(PEO)的埃根聚合物在水中自组装形成胶束和囊泡的过程,并使用液态乙烷将样品快速冷冻至玻璃态,在低束流(Low dose)模式下直接获得了高衬度像。

3.2 SEM 表征不导电样品

由于“荷电效应”,表面绝缘的SEM样品表征前需进行导电化处理。虽然使用高真空喷涂铂(Pt)较离子溅射金(Au)对样品极表面纳米结构的遮蔽效果更小,但不可避免地会在高放大倍数下显现出伪像。如何实现不导电生物纳米材料的直接表征,是个亟待解决的技术难题。已报道方法有:①通过特殊的电子光学系统设计,降低电子束的着陆电压,在不损失分辨率的前提下缩短电子束在样品表面的注入深度,减少、减缓负电荷的累积。②通过对样品表面吹气中和荷电的方法(Focal gas injection-based charge compensation),直接表征表面绝缘的样品。如Ellisman等^[23]报道了对样品表面局部吹打氮气中和荷电的方法,实现了对不导电样品的直接表征。

3.3 磁性样品的表征

磁性纳米粒子(如四氧化三铁(Fe_3O_4)等)是一类重要的生物纳米材料,可应用于磁场介导的靶向释放体系^[24]、磁热疗^[25]等。如何利用电子显微镜安全、精确地表征磁性纳米材料,具有较强的挑战

性。由于传统电镜光路系统使用多级磁透镜对电子束进行汇聚，在接近样品的极靴位置会产生磁场泄漏，易吸附磁性纳米颗粒，严重影响电镜的分辨率与使用安全。应对方法包括：①对样品进行消磁处理，缺点是可能会改变样品显微形貌。②通过装备洛伦兹透镜(远离样品的磁透镜)代替物镜的成像功能，TEM可直接观察磁性样品^[26]。③ZEISS公司专利 Gemini 镜筒设计，使用静电透镜和电磁透镜复合的电子光学系统，能显著减少极靴处的磁泄漏。④不具备升级仪器条件时，可通过对样品制备过程进行优化，如使用合页铜网包夹 TEM 样品，或者将 SEM 样品深嵌入导电胶层，防止样品飞溅。

3.4 生物纳米材料的三维结构表征

由于成像原理的限制，传统 TEM 只能利用非弹性散射电子成平面投影像。虽然通过倾转样品可获得连续的投影衬度，但是受限于样品漂移和低信噪比，三维重构质量不高。SEM 二次电子(SE2)检测器可获得样品近表面的三维结构信息，但受景深限制，对大跨度复杂的立体结构与被表面遮蔽的孔隙与镶嵌结构的表征效果较差。因此，如何精确、高效地获取生物纳米材料的三维结构信息具有较强的研究价值。当前主流的解决方案包括：

①连续切片扫描电子显微技术(Serial block-face scanning electron microscopy)：将切片减薄系统置于 SEM 样品室内，对包埋固定的样品进行厚度可控的表面牺牲处理；吹打保护气消除荷电，可直接对新暴露面进行 SEM 表征；收集连续图像信息，重构纳米尺度的大容量三维结构^[27-28]。该技术可为评价纳米颗粒的生物相容性、示踪纳米载体在细胞内、组织间的传递与降解过程，提供更直观、准确的信息。

②冷冻电镜三维重构技术在近年来得到了飞速发展。2017 年诺贝尔化学奖授予了对发展与推广现代冷冻电镜技术做出杰出贡献的 3 位科学家，以表彰其革新冷冻制样方法，开发并推广低电子衬度样品高清成像技术，创新软件算法应用于三维重构。Cryo-EM 单颗粒重构技术适合表征结构均一性好的蛋白质、病毒、DNA 颗粒。该法结合了衬度传递函数的修正，样品投影数据的筛选，二维投影数据的分类和降噪，三维模型的重构与优化等步骤，能够获得近原子尺度的高分辨像。Cryo-ET 通过倾转样品，获得高质量的连续二维投影像，适用于表征结构均一性差的脂质体、聚合物粒子。Stewart^[29]综述了使用 Cryo-EM 和 Cryo-ET 表征蛋白质、DNA、脂质、聚合物纳米颗粒的制样方法与图像处理流程。

3.5 低电压、低束流模式下的能谱测试

基于 TEM/SEM 的能谱分析，可原位测试生物纳米材料的元素组成与分布。但对于束流敏感的有机高分子样品，必须降低束流和加速电压，这样会损失能谱计数率，降低测试的灵敏度和准确度。应对策略包括：①使用大面积的能谱探测器，可增加入射 X 光子的接收率、改善信噪比，但同时也成倍地增加了生产成本。②平插式能谱(如 Bruker QUANTAX FlatQUAD)将环形探测器置于极靴与样品间，较传统斜插方式能获得更大的接收立体角(Solid angle)。其优点在于即使低束流或极低束流($< 10 \text{ pA}$)模式下，仍能获得高计数率和高能量分辨率，对于表面不平整的样品还能消除“阴影效应”。Hodoroaba 等^[30]对比了平插方式与斜插方式在能谱探测器设置、信号接收效率方面的差异(图 1)。平插式能谱具有更优的信噪比、空间分辨率，在低加速电压下仍能获得高计数率，可对束流敏感样品进行更精准的化学分析。

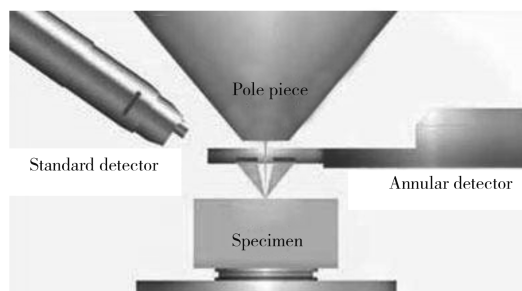


图 1 平插式与斜插式能谱探头的位置示意图^[30]
Fig. 1 Geometry of the annular and conventional SDD EDS^[30]

接收立体角(Solid angle)。其优点在于即使低束流或极低束流($< 10 \text{ pA}$)模式下，仍能获得高计数率和高能量分辨率，对于表面不平整的样品还能消除“阴影效应”。Hodoroaba 等^[30]对比了平插方式与斜插方式在能谱探测器设置、信号接收效率方面的差异(图 1)。平插式能谱具有更优的信噪比、空间分辨率，在低加速电压下仍能获得高计数率，可对束流敏感样品进行更精准的化学分析。

3.6 细胞与组织超微结构的表征

生物纳米材料的安全性与功能性评价，包括细胞实验与动物实验。电子显微镜可应用于表征亚细胞结构。保存活细胞与组织的结构、脱除水分是制样过程的关键。常规化学固定、梯度脱水、树脂包埋、超薄切片与染色的方法，具有操作便捷、适用面广的优点，但化学固定剂(如戊二醛、多聚甲醛等)会破坏样品的生物活性，不利于开展后续生化实验；树脂经渗透过程，替代了部分组织和细胞内容物，发挥支撑增强作用的同时也一定程度上改变了超微结构。高压冷冻、冷冻替代、冷冻超薄切技术，虽避免了化学试剂使用，可兼顾保存样品的结构与生物活性，但对制样设备与操作也提出了更高的要求。

4 展 望

凭借着技术革新,电子显微镜的分辨力极限不断被刷新,使得在原子尺度进行显微结构表征变成了可能;同时附件的功能也不断得到拓展,发展出一系列高精度的原位分析测试技术。“看得更清”、“测得更准”的现代电子显微技术,将对生物纳米材料学科的发展做出更大贡献。

未来电子显微技术的发展方向将更多集中于:①高分辨、超大尺寸图像的拼接与大容量三维结构的重构。可更直观、准确地表征新颖的微纳结构,及其与细胞/组织作用发挥功能的情况;②对动态实验过程进行原位表征与测试。如将液体样品封闭在对电子束透明的薄层中,研究蛋白、多肽、聚合物的自组装过程;③与其他成像技术(激光共聚焦(LSCM)、原子力显微镜(AFM)等)的联用。开发兼容的软件与可拼接硬件系统,预计可实现活细胞/组织的精准定位、整合 AFM 的单分子尺度力学测量数据(弹性、硬度、黏度和表面电荷密度),构建大信息容量的复合图像。

参考文献:

- [1] Urban K W. *Science*, **2008**, 321(5888): 506–510.
- [2] Liu X H, Liu Y, Kushima A, Zhang S L, Zhu T, Li J, Huang J Y. *Adv. Energy Mater.*, **2012**, 2(7): 722–741.
- [3] Friel J J, Lyman C E. *Microsc. Microanal.*, **2006**, 12(1): 2–25.
- [4] Shi Y F, Fu Y Y, Lv H L, Zhong J X, Liu Z H, Ma D, Xue W. *Mater. Lett.*, **2014**, 125: 198–201.
- [5] Jing L J, Chen L, Peng H T, Ji M Z, Xiong Y, Lv G Y. *J. Biomat. Sci – Polyme. Ed.*, **2017**, 28(18): 2154–2170.
- [6] Torruella P, Estrader M, Lopez – Ortega A, Baro M D, Varela M, Peiro F, Estrade S. *Ultramicroscopy*, **2018**, 185: 42–48.
- [7] Cui J B, Jiang R, Guo C, Bai X L, Xu S Y, Wang L Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(18): 5890–5894.
- [8] Zhang P J, Borgnia M J, Mooney P, Shi D, Pan M, O'Herron P. *J. Struct. Biol.*, **2003**, 143(2): 135–144.
- [9] Guterman T, Ing N L, Fleischer S, Rehak P, Basavalingaooa V, Hunashal Y, Dongre R, Raghothama S, Kral P, Dvir T, Hochbaum A, Gazit E. *Adv. Mater.*, **2019**, 31(10): e1807285.
- [10] Place E S, Evans N D, Stevens M M. *Nat. Mater.*, **2009**, 8(6): 457–470.
- [11] Tan J, Saltzman W M. *Biomaterials*, **2004**, 25(17): 3593–3601.
- [12] Qi G B, Gao Y J, Wang L, Wang H. *Adv. Mater.*, **2019**, 30(22): e1703444.
- [13] Duncan B, Kim C, Rotello V M. *J. Control Release*, **2010**, 148(1): 122–127.
- [14] Chen W H, Luo G F, Lei Q, Cao F Y, Fan J X, Qiu W X, Jia H Z, Hong S, Fang F, Zeng X, Zhuo R X, Zhang X Z. *Biomaterials*, **2016**, 76: 87–101.
- [15] Shi Y F, Xiong Z P, Lu X F, Yan X, Cai X, Xue W. *J. Mater. Sci – Mater M.*, **2016**, 27(11): 169–175.
- [16] Fan T J, Zhou Y S, Qiu M, Zhang H. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **2018**, 11(6): 185–189.
- [17] Lu K D, Aung T, Guo N N, Weichselbaum R, Lin W B. *Adv. Mater.*, **2018**, 30(37): e1707634.
- [18] Kamaly N, Xiao Z Y, Valencia P M, Radovic – Moreno A F, Farokhzad O C. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41(7): 2971–3010.
- [19] Zhu J Y, Zhang M K, Zheng D W, Yang B, Ma N, Li R Q, Feng J, Zhang X Z. *Chem. Mater.*, **2017**, 29(5): 2227–2231.
- [20] Asharani P V, Mun G L K, Hande M P, Valiyaveetil S. *ACS Nano*, **2009**, 3(2): 279–290.
- [21] Chetanachan P, Akarachalanon P, Worawirunwong D, Dararutana P, Bangtrakulnonth A, Bunjop M. *Adv. Mater. Res.*, **2008**, 55/57: 709–711.
- [22] Won Y Y, Brannan A K, Davis H T, Bates F S. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106(13): 3354–3364.
- [23] Deerinck T J, Shone T M, Bushong E A, Ramachandra R, Peltier S T, Ellisman M H. *J. Microsc – Oxford*, **2018**, 270(2): 142–149.
- [24] Jiang W, Wu J, Shen Y W, Tian R B, Zhou S, Jiang W. *Nano*, **2016**, 11(11): 45–49.
- [25] Saeed M, Iqbal M Z, Ren W Z, Xia Y Z, Khan W S, Wu A G. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(2): 210–223.
- [26] Phatak C, Petford – Long A K, De Graef M. *Curr. Opin. Solid. St. M.*, **2016**, 20(2): 107–114.
- [27] Mullner T, Zankel A, Mayrhofer C, Reingruber H, Holtzel A, Lv Y Q, Sevc F, Tallarek U. *Langmuir*, **2012**, 28(49): 16733–16737.
- [28] Denk W, Horstmann H. *Plos Biol.*, **2004**, 2(11): 1900–1909.
- [29] Stewart P L. *Wires Nanomed. Nanobi.*, **2017**, 9(2): 1–16.
- [30] Hodoroaba V D, Rades S, Salge T, Mielke J, Ortel E, Schmidt R. *Iop. Conf. Ser – Mat. Sci.*, **2016**, 109: 1–12.

(责任编辑:周启动)