

一种获得高分辨率三维成像的新方法

— Array Tomography (AT)

应用工程师 席得圣

摘要

扫描电子显微镜 (SEM) 的最新应用多种多样^[1,2,3]。现如今, SEM 不再是一款仅用于表面观察和分析的工具, SEM 同样能够提供包含样品内部结构信息的三维分析。阵列层析成像技术 (AT) 是能够获得生物样品的大尺度三维分析的一种方法。超薄切片机制备的一系列超薄切片被顺序放置在基板上, 由 SEM 拍摄获得一系列二维图像^[4,5]。通过对每个部分的二维图像进行叠加重构出三维图像。在 AT 技术中, 通过 SEM 镜筒内电子探测器获得高分辨率的二维图像。此外, 切片是放置在导电性良好的基板上, 因此能够大大减少由样品充电效应造成的图像失真现象, 同时使我们能够在高加速电压下进行能谱分析而无充电效应。本文中, 我们向大家展示基于 AT 技术, 由一系列高分辨的二维图像进行重构获得三维图像的新方法, 并通过 3D-EDS 方法获得元素的三维空间分布。

三维成像工作流程

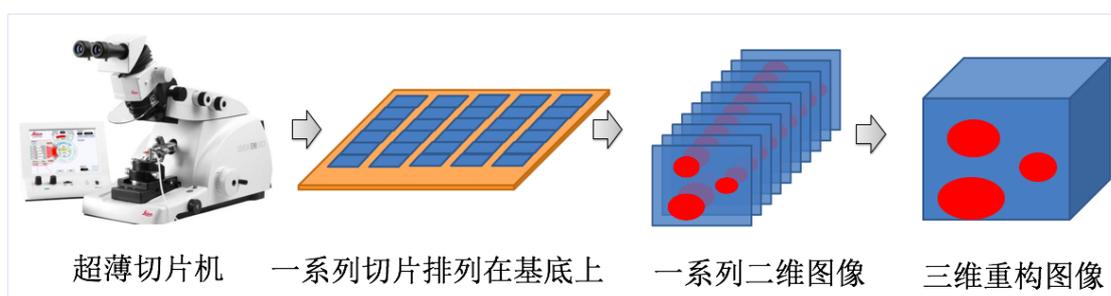


图 1 三维成像工作流程示意图

一、高分辨率三维图像

本文基于 JEOL 公司的高端场发射扫描电镜 JSM-7900F 向大家介绍有关 AT 技术的应用实例, JSM-7900F 有以下特点。

JSM-7900F 配备了带有能量过滤器的镜筒内探测器 UED, 可以选择性地只接收高能量的背散射电子信号, 而将低能量的二次电子信号滤掉。UED 用于三

维成像有以下特点：

- (a) 短工作距离(WD)配合柔和电子束模式，具有非常高的分辨率（1kV 0.7nm）。
- (b) 在低加速电压下获得材料的成分衬度图像，不受材料形貌衬度的影响。
- (c) 镜筒内探测器 UED 具有高固体角闪烁体，响应速度快。

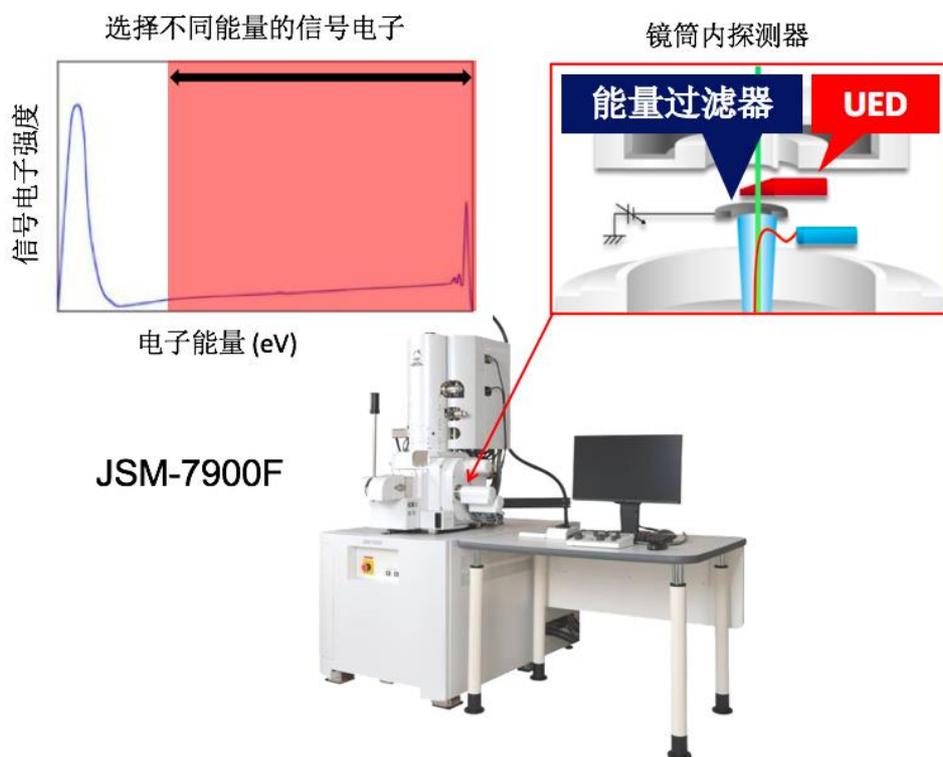


图2 JSM-7900F 外观图及能量过滤器示意图

本实验选用的样品是小鼠的肋间肌组织，样品采用戊二醛、多聚甲醛和四氧化锇固定，使用醋酸铀和柠檬酸铅双染色法给样品染色，以增加电镜图像衬度。

首先，我们需要确定适合本样品成像的最佳电镜条件。为此，我们在不同电镜条件下获得了样品的背散射电子图像，并将图像的衬度进行反转得到背散射电子图像的衬度反转像，如下图所示。

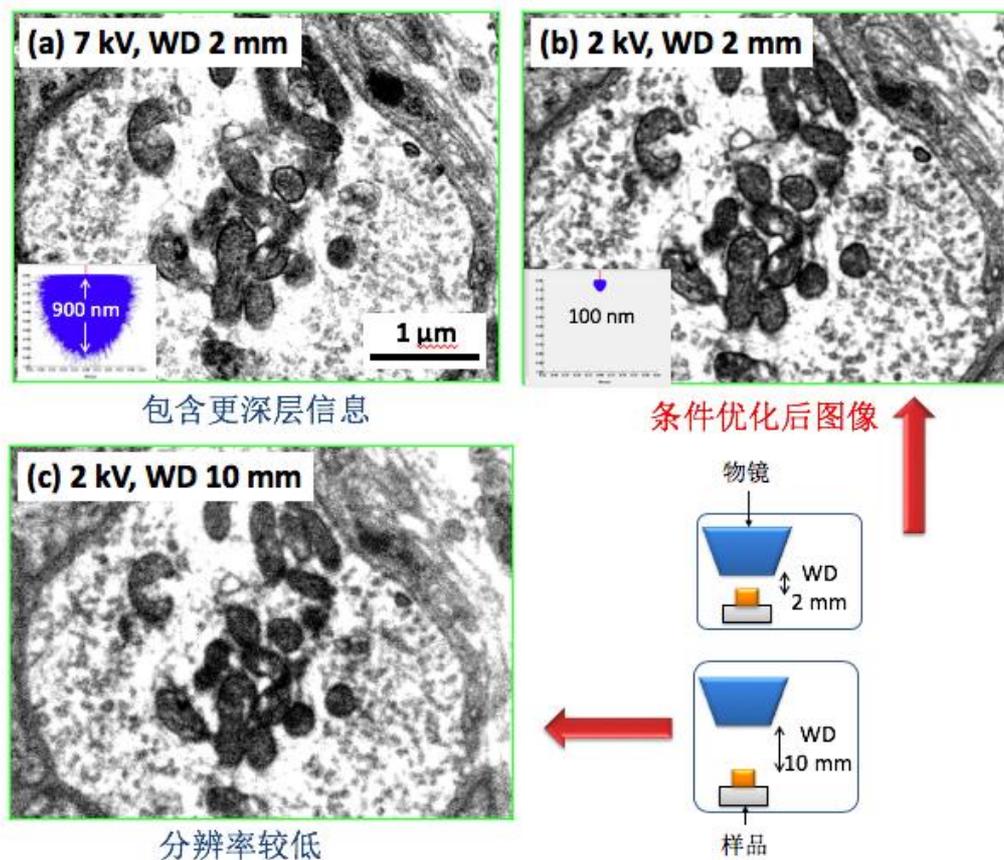


图3 不同工作条件下的图像

由图3可知，图像(a)因加速电压选的太高（7 kV），入射电子束在样品中穿透的太深（约900 nm），散射体积较大，会使得图像的空间分辨率下降，同时图像中包含更深层的信息，不利于我们后期进行三维重构；图像(c)所选用的工作距离（10 mm）太长，使得图像分辨率太低，不够清晰；而图像(b)选用2 kV的加速电压配合短的工作距离（2 mm）获得了最佳图像。因此，我们确定了本实验最佳成像条件为：2 kV的加速电压配合2 mm的工作距离。

在最佳成像条件下，对置于基板上的多个切片分别进行成像，得到样品的一系列二维图像，并把这些图像进行重构，我们获得了小鼠肋间肌组织的三维图像，使得我们能够观察到样品中神经末梢的三维结构和线粒体在神经末梢中的三维空间分布情况。从重构的图像可以看出，有的区域线粒体较多，有的区域线粒体较少。

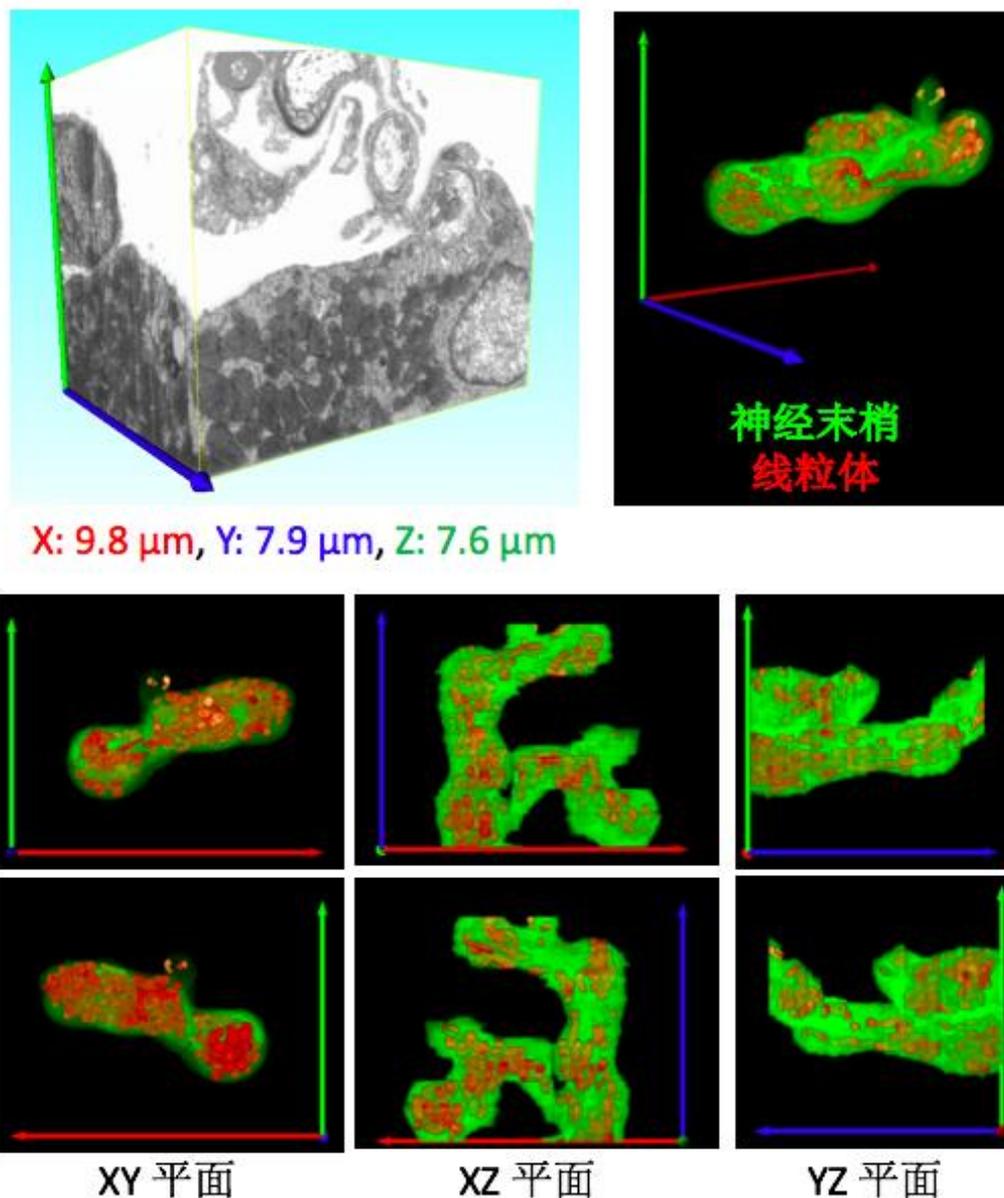


图 4 三维重构图像

二、三维元素分布图像

本实验选用的样品是小鼠的肝组织,样品采用多聚甲醛固定,并且用乙酸铀酯进行染色。切片样品放置的基体选用的是超平碳样品托,它是由无定形碳制成的,其表面经过精细抛光的高密度碳托。超平碳样品托作为能谱用样品托,可以减少基底产生的背散射电子、连续 X 射线和特征 X 射线。除此之外,它的导电性非常好且表面平整,其直径可达 6 mm。

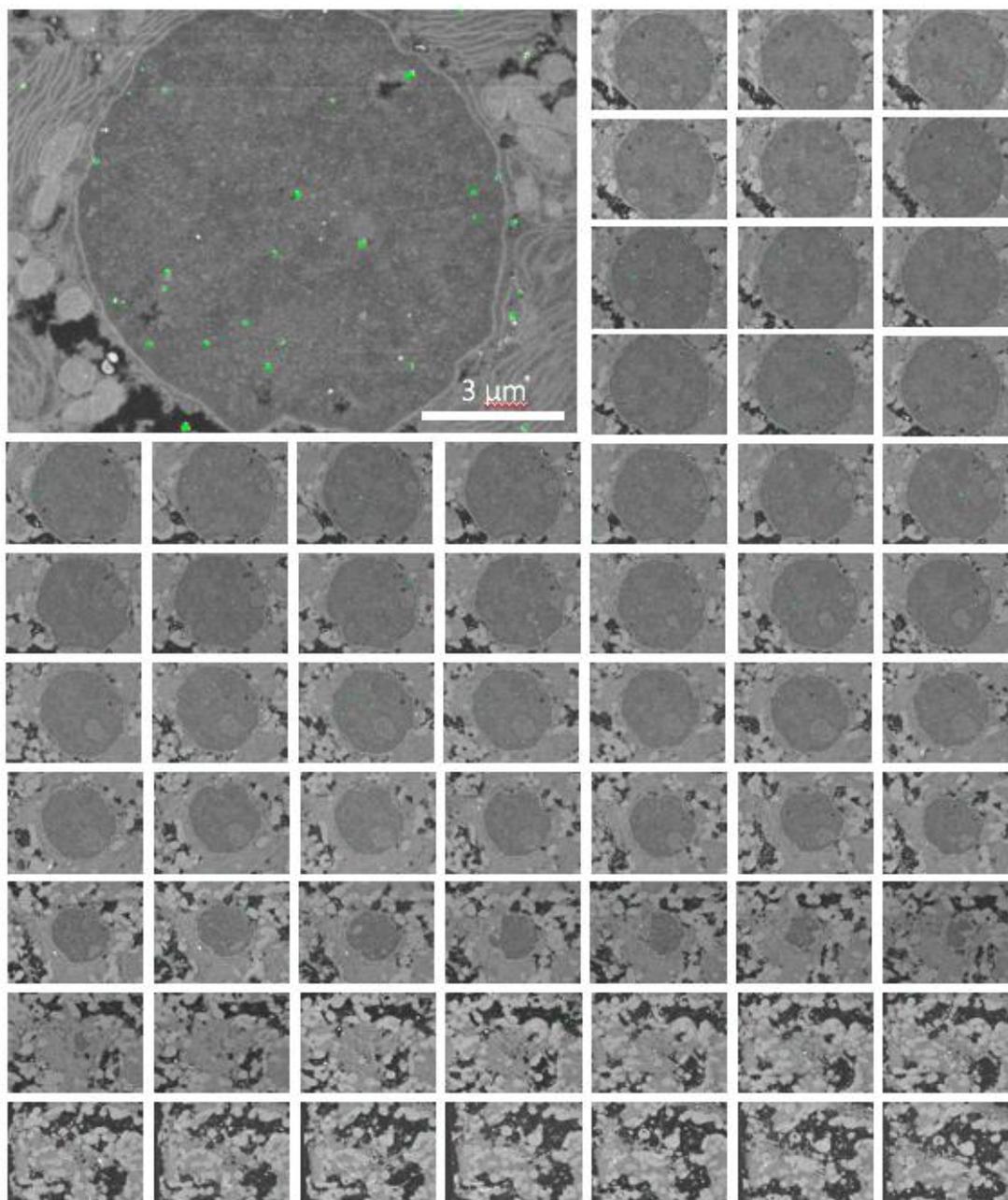


图 5 银纳米粒子(绿色部分)叠加在背散射电子图像上的元素分布图

对顺序放置于超平碳样品托上的一系列切片，我们在 7kV 加速电压下获得了切片的背散射电子图像以及银元素的能谱面分布图，并把银的面分布图叠加到相对应切片的背散射图像上，由此我们获得了银纳米粒子(绿色部分)叠加在背散射电子图像上的元素分布图(图 5 所示)。再通过对获得的一系列的二维元素面分布图进行重构，最终获得了小鼠肝脏组织中元素的三维分布图像。使得我们能够观察银纳米粒子在三维空间中的分布情况，其中，银纳米粒子粒径小于

100nm。

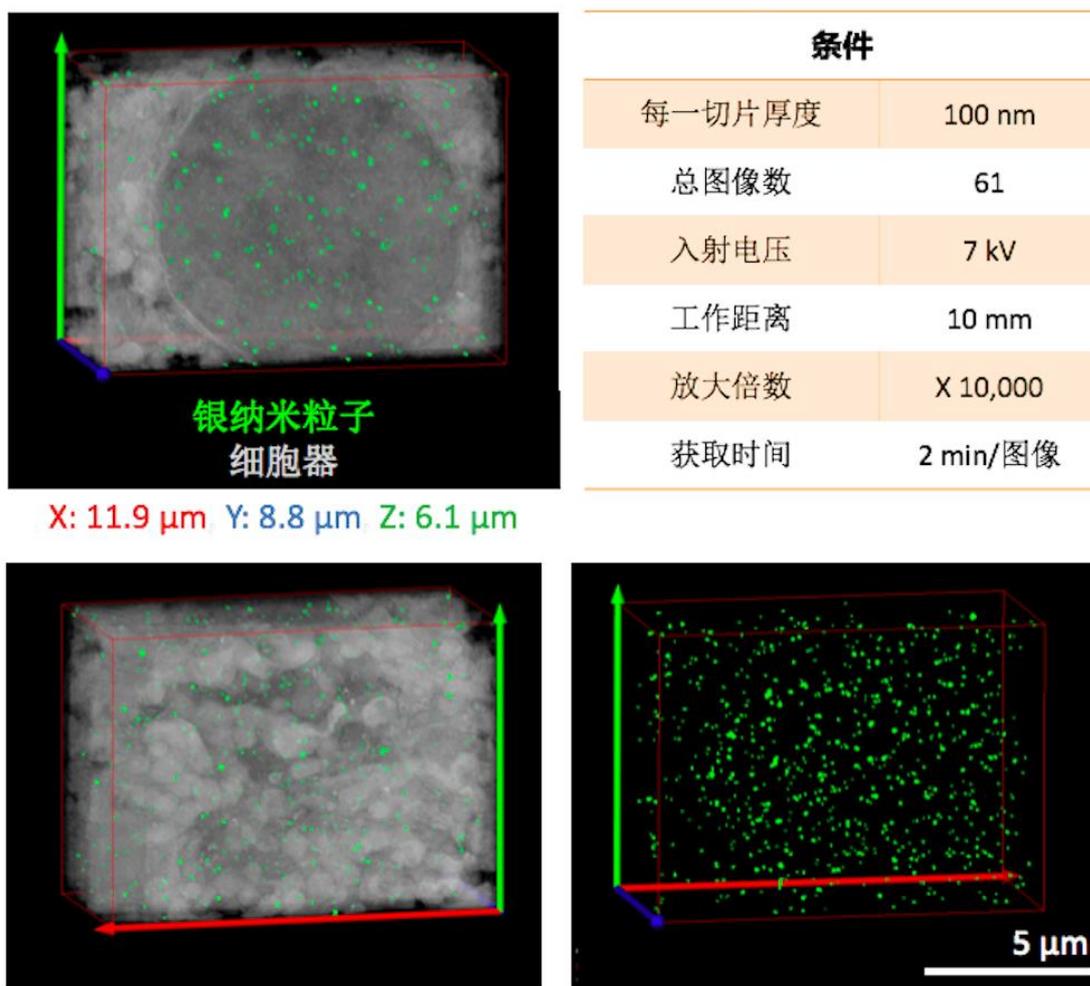


图6 三维元素分布图

总结

(a) 采用 JSM-7900F 的 UED 探测器在低加速电压和短的工作距离 (2mm) 下获得了一系列高分辨的二维背散射电子图像, 并通过对这一系列的二维图像进行重构获得了三维图像。

(b) 重构后的小鼠肋间肌组织的神经末梢的三维结构图像, 向我们展示了线粒体在神经末梢中的三维空间分布情况。

(c) 获得了元素的三维空间分布图 (3D-EDS), 观察到了银纳米粒子在小鼠肝组织中的三维空间分布情况。

(d) 3D-EDS 技术可以获得元素的三维空间分布, 有利于研究生物材料 (例如蛋白质) 中的某些特定元素在生物组织中的分布情况。

参考文献

- [1] M. Suga, et al., Prog. Solid State Chem, 42, 1-21. (2014)
- [2] O. Terasaki, et al., JEOL News, 48 (1),21-31 (2013)
- [3] S. Asahina, et al., APL Materials 2, 113317 (2014); doi: 10.1063/1.4902435
- [4] K. D. Micheva and S. J. Smith, Neuron 55(1) (2007), p.25
- [5] H. Horstmann, et al., PLoS One. 7(4) (2012), e35172.

注：翻译自日本电子东京本部资料

