

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

H01J 37/256

H01J 37/20



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01819906.2

[43] 公开日 2004年7月7日

[11] 公开号 CN 1511332A

[22] 申请日 2001.11.30 [21] 申请号 01819906.2

[30] 优先权

[32] 2000.12.1 [33] US [31] 60/250,879

[32] 2001.7.20 [33] US [31] 60/306,458

[86] 国际申请 PCT/IL2001/001108 2001.11.30

[87] 国际公布 WO2002/045125 英 2002.6.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.2

[71] 申请人 耶德研究和发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

共同申请人 EL-MUL 技术有限公司

[72] 发明人 艾莎·摩西 奥赖·济克

斯蒂芬·蒂贝热

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

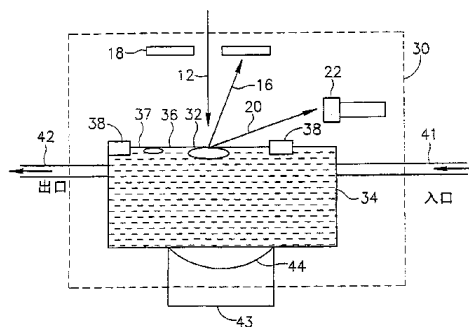
代理人 夏青

权利要求书4页 说明书38页 附图16页

[54] 发明名称 采用扫描电子显微镜在非真空环境下检验样品的装置和方法

[57] 摘要

一种适用于与扫描电子显微镜一起使用的腔室(34)。该腔室包括用隔膜(36)密封的至少一个孔。隔膜(36)适于承受真空，并且是电子可穿透的，而且腔室(34)的内部与所述真空隔离。该腔室可用于使包括活性细胞的湿样品(32)能够在电子显微镜下被观察。



ISSN 1008-4274

1、一种适于与扫描电子显微镜一起使用的腔室，所述腔室包括至少一个孔，该孔用隔膜密封，所述隔膜适于承受真空，并且是电子可穿透的，其中所述腔室的内部与所述真空隔离。

2、根据权利要求1的腔室，适于基本上在大气压力下容纳水。

3、根据权利要求1的腔室，其中用所述隔膜密封的所述孔具有在0.1-4mm范围内的直径。

4、根据权利要求1的腔室，其中所述隔膜具有基本上在200-5000埃范围内的厚度。

5、根据权利要求1的腔室，其中所述隔膜包括选自聚酰亚胺、聚酰胺、聚酰胺-酰亚胺、聚乙烯、聚吡咯、和附加导电聚合物、火棉胶片、火棉胶、Kapton、FomrVar、Vinylec、ButVar、聚乙烯醇缩醛、二氧化硅、一氧化硅和碳的材料。

6、根据权利要求5的腔室，其中隔膜是聚酰亚胺。

7、根据权利要求1的腔室，包括在隔膜附近安放的样品。

8、根据权利要求1的腔室，包括与所述隔膜接触安放的样品。

9、根据权利要求1的腔室，其中所述隔膜由放在隔膜和真空之间的支撑栅板支撑。

10、根据权利要求1的腔室，可放在真空中并密封流体内的样品。

11、根据权利要求1的腔室，可放在真空中并在基本上大气压力下封闭样品。

12、一种与扫描电子显微镜结合使用的腔室，其中所述腔室的壁的至少一部分可抵抗一个大气压力梯度，并且具有高于2keV的能量的电子可穿透。

13、一种采用扫描电子束在腔室中高分辨率地检测物体用的装

置，包括电子束的真空路径和与物体结合放置的耐真空阻挡件，所述耐真空阻挡件被设置以使物体与真空隔离。

14、根据权利要求 13 的装置，其中物体包括荧光和电致发光标记之一，由此使电子束能激发光发射。

15、根据权利要求 13 的装置，还包括光学传感器。

16、根据权利要求 13 的装置，其中所述腔室包括光导的一部分。

17、根据权利要求 15 的装置，其中所述光学传感器包括光电倍增管。

18、根据权利要求 15 的装置，其中所述光学传感器适于感测单个光子，并且所述装置由此适于感测由单个分子的激励产生的发光。

19、根据权利要求 13 的装置，其中用具有高二次电子产率的至少一层材料涂覆阻挡件。

20、根据权利要求 13 的装置，其中阻挡件适于承受在一个大气压范围的压力梯度。

21、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件是隔膜。

22、根据权利要求 21 的装置，其中所述薄膜包括选自聚酰亚胺、聚酰胺、聚酰胺-酰亚胺、聚乙烯、聚吡咯、和附加导电聚合物、火棉胶片、火棉胶、Kapton、FomrVar、Vinylec、聚乙烯醇缩丁醛、聚乙烯醇缩醛、二氧化硅、一氧化硅和碳的材料。

23、根据权利要求 22 的装置，其中隔膜是聚酰亚胺。

24、根据权利要求 21 的装置，其中所述隔膜用放在所述隔膜和所述真空之间的加固栅板加固。

25、根据权利要求 21 的装置，其中所述隔膜具有 200-5000 埃范围内的厚度。

26、根据权利要求 25 的装置，其中所述厚度在 500-1500 埃范围内。

27、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件横穿直径基本上

在 0.1-4mm 范围内的孔而放置。

28、根据权利要求 27 的装置，其中所述直径基本上为 1mm。

29、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件是高能电子可穿透的。

30、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件是具有超过 2keV 的能量的电子可穿透的。

31、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件是具有超过 3keV 的能量的电子可穿透的。

32、根据权利要求 13 的装置，其中所述阻挡件用具有高二次电子产率的一层材料涂覆。

33、根据权利要求 32 的装置，其中具有高二次电子产率的所述材料是氟化锂。

34、根据权利要求 13 的装置，其中清除剂分子被设置与所述阻挡件相结合。

35、根据权利要求 13 的装置，其中物体与所述耐真空阻挡件接触放置。

36、一种以纳米范围分辨率观察湿物体的方法，包括以下步骤：通过采用阻挡件分离所述腔室与真空室，使湿物体隔离在腔室中，提供电子束以便通过所述阻挡件从所述真空室撞击所述样品，并观察从所述腔室射出的二次电子和反向散射电子的至少一种。

37、根据权利要求 36 的方法，其中所述阻挡件包括隔膜，其被选择以承受基本一个大气压，并且是具有超过 2keV 的能量的电子可穿透的。

38、根据权利要求 36 的方法，其中湿物体包括药物成分。

39、根据权利要求 38 的方法，其中湿物体还包括药物成分与之反应的活性细胞。

40、根据权利要求 38 的方法，其中所述腔室包括流体入口，并

且药物成分在观察期间相对于动态通过该入口的浓度和类型之一而被改变。

采用扫描电子显微镜在非真空环境下检验样品的装置和方法

发明的领域

本发明涉及一种采用扫描电子显微镜在非真空环境下检验样品的装置和方法，特别是、但不限于这种装置和方法在湿环境下检验物体的使用。

发明的背景技术

光学显微技术由于光波长而被限制于在一百纳米、通常为几百纳米范围内的分辨率。扫描电子显微镜（SEM）没有这种限制并能实现在几纳米范围内的相当高的分辨率。

SEM 的缺点之一是样品必须保持在真空中，这妨碍了对在自然条件下处理的研究或对湿材料的研究。此外，由有机材料构成的电绝缘样品需要涂层以避免电荷积累。

早在 1960 年，Thornley（剑桥大学，1960 年）的论文公开了在水蒸气的大气环境下保持样品用于电子显微技术的失败尝试。采用隔膜密封腔室使其免受电子束的真空的影响，并且腔室本身具有来自水蒸气的源的入口。

采用电子显微技术用于活性样品的尝试要追溯到 1970 年。由 Swift 和 Brown 发表的文章（J. Phys. E: Sci. Instrum. 3, 924, 1970）公开了采用透射电子显微镜（TEM）用于在大气压力下、例如在水中检验样品。采用具有用胶棉-碳膜密封的孔的容器安装样品。电子束经过孔并撞击样品，并且电子不会被样品阻止而是继续到达闪烁器，在那里产生光子。在大气压力下，虽然声称有 $0.1\ \mu\text{m}$ 的分辨率，但是发现这些结果是“相当嘈杂的”。

美国专利 US4071766 介绍了采用电子显微技术在非真空环境下检测材料的尝试，并将活性物体的检测称为“不断再生问题”。美国专利 US4720633 介绍了采用电子显微技术在非真空环境下检测材料的进一步尝试。在这些专利中，电子束穿过孔运行到湿样品上。然而，在成功地观察湿物体方面，这些尝试都没有成功。这里引证这些文献供参考。

试图解决上述问题的商业产品是环境扫描电子显微镜（ESEM），可从荷兰的埃德霍夫的飞利浦电子光学公司购得，其保持沿着电子束路径的真空梯度。然而，ESEM 需要样品在水-蒸汽平衡状态的临界点工作，并要求将样品冷却到 4℃左右。人们认为在高达 5 毛的压力下可以检验样品。然而，到目前为止，没有证据说明在 10nm 和以下的分辨率可以观察湿的和/或活性物体。关于这种产品和它怎样工作的进一步信息可以在美国专利 US5250808、5362964 和 5412211 中看到，这里引证其内容供参考。

实现有机物质的高分辨率检验的通用方法是透射电子显微技术（TEM）。TEM 要求通常厚度在 50nm 范围内的特殊制备的样品。施加极高压以产生穿过样品的平行电子束。美国专利 US5406087 公开了一种用于 TEM 的样品保持装置，这里引证该文献供参考。样品被密封在能传输电子束的两个膜之间。装置的内部用湿气填充，并且可以放置在 TEM 的真空环境中。极高能束穿过样品运行并包围流体，导致不良的信噪比，并对样品造成相当大的损伤。

由 EM 获得信息通常由其它技术（在 Griffiths（2001）“细胞生物学的趋势”中评论的，11：4：153-154）是不能得到的。EM 的普遍利用不足的主要原因是样品制备的复杂性，这不仅需要大量劳力和耗时，而且涉及关于结果的生物关联的提高。在水环境下实施 EM 的能力将解决这些有问题的样品制备步骤。

因此，目前，尽管长期需要，也没有提出允许在表明宏观分子

和细节分子级的分辨率下研究湿样品的显微镜。在细胞生物和聚合物科学一样不同的领域中以及工业上如石油、食品和微电子学中需要这种能力。特别是在细胞生物领域中，这种显微镜应该能分析细胞并进行分子级工艺的测量，并在药品发现和诊断测量方面打开了一个全新的领域。例如，这种显微镜将允许药品和活性细胞之间反应的详细研究和直接观察。

发明内容

本发明的目的是提供适用于与扫描电子显微镜一起使用的腔室，它使得可以实现对湿样品的电子显微镜检查。

根据本发明的第一方案，提供适用于与扫描电子显微镜一起使用的腔室，所述腔室包括：至少一个孔，该孔用隔膜密封，所述隔膜适于承受真空，并且是电子可穿透的，其中所述腔室与所述真空隔离。

优选的是，腔室适于基本在大气压力下保持水或任何水介质，包括但不限于细胞培养介质。

优选的是，由隔膜密封的孔具有在 0.1-4mm 范围内的直径。

优选的是，隔膜具有基本上在 200-5000 埃范围内的厚度，更优选的是，在 500 和 2000 埃范围内，并且最优选在 500 和 1500 之间的范围内。

该隔膜构成本发明的主要元件，它所需要的特性包括能够承受电子显微镜的真空和包含在由所述隔膜密封的腔室内的环境之间的约一个大气压的压力差，同时它很薄，足以使高能电子穿过并与设置在腔室内的样品相互作用。具有这些属性的任何材料可适用于根据本发明的原理的使用。根据目前优选的实施例，隔膜材料选自聚酰亚胺、聚酰胺、聚酰胺-酰亚胺、聚乙烯、聚吡咯、和附加导电聚合物、火棉胶片、火棉胶、Kapton（聚酰亚胺薄膜）、FomrVar（聚

乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物的一系列产品)、Vinylec(聚乙烯醇缩甲醛)、ButVar(聚乙烯醇缩丁醛)、Pioloform(聚乙烯醇缩醛)、二氧化硅、一氧化硅和碳。

优选的是,样品放置在靠近隔膜的地方。或者,样品被安放而与所述隔膜接触,这样设置的优点是电子束必须经过最小距离穿过物质(与真空相对的)到达样品。隔膜优选由设置在隔膜和真空之间的支撑栅板支撑。

通常,腔室位于真空中,并将样品封闭在流体中或在基本为大气压下,或是这两种情况下。所述腔室的壁的至少一部分可以抵抗一个大气压梯度并对具有高于 2KeV 的电子是可穿透的。

根据本发明的第二方案,提供一种采用扫描电子束在腔室中高分辨率检测物体的装置,包括用于电子束的真空路径和设置成与物体相关的耐真空阻挡件,所述耐真空阻挡件的放置使其隔离物体和真空。物体上可具有荧光和电致发光标记,由此电子束能够激励光子发射。标记可与感兴趣的特定分子或类似物相关,这种方法考虑到含有关于个体分子的信息的基于光的图像。这个实施例优选包括光学检测单元,腔室可构成为光导的一部分。光学检测单元还可包括光电倍增管。

光学检测单元可适于检测单个光子,并且该装置由此适合于检测源自单个分子的激励的发光。

在更优选的实施例中,阻挡件或隔膜可以是聚酰亚胺、聚酰胺、聚酰胺-酰亚胺、Kapton(聚酰亚胺薄膜)、FomrVar(聚乙烯醇缩甲醛)和聚乙烯醇缩丁醛中的任一种。

阻挡件或隔膜可用置于所述隔膜和所述真空之间的增强栅板增强,并且可具有基本上在 200-5000 埃范围内的厚度,更优选在 500 到 2000 埃范围内,并且最优选在 500 到 1500 范围内。

优选的是,阻挡件或隔膜被横穿一孔而放置,该孔的直径基本

上在 0.1-4mm 范围内。在特别优选的实施例中，该直径基本上为 1mm。

阻挡件或隔膜优选可透射高能电子，就是指具有超过 2keV 或 3keV 的能量的电子。

根据一个实施例，用一层材料涂敷阻挡件，该材料具有高二次电子产量，通常为氟化锂。

在一个实施例中，原子团清除剂分子位于与所述物体相关联的位置。

在一个实施例中，物体或样品放置在与所述耐真空阻挡件相邻或与其接触的地方。

根据本发明的第三方案，提供一种隔膜的应用，其中具有 1mm 直径的暴露面积能抵抗一个大气压梯度，并且该隔膜可透射高能电子，从而构成一个腔室，能以基本上优于 100nm 的分辨率在扫描电子束下观察湿样品。

根据本发明的第四方案，提供一种在纳米范围分辨率观察湿物体的方法，包括以下步骤：通过采用阻挡件分开腔室与真空腔室，隔离所述腔室中的湿物体；从所述真空室通过所述阻挡件提供电子束以撞击所述样品；和观察从所述腔室射出的二次和反向散射电子的至少一个。

优选的是，阻挡件包括隔膜，其被选择以承受基本上一个大气压，并且具有超过 2keV 左右能量的电子可穿透。

优选的是，湿物体包括药物成分。

优选的是，湿物体还包括与所述药物成分相互作用的活性细胞。

优选的是，所述腔室包括流体入口，其中药物成分相对于在观察期间动态通过入口的浓度或类型而被改变。

附图的简要说明

为了更好地理解本发明和表明本发明是如何有效实施的，下面参考附图借助例子进行说明，其中：

图 1 是表示现有技术扫描电子显微镜的样品区域的纵向截面的概括示意图。

图 2 是表示包含根据本发明实施例的腔室的扫描电子显微镜的纵向截面的概括示意图。

图 3 是根据本发明一个实施例的腔室的概括截面示意图。

图 4 是被埋置于光导内的根据本发明另一实施例的腔室的概括截面示意图。

图 5 是采用图 3 的实施例获取的电子显微图。

图 6 是用于荧光的组装样品腔室单元的示意图。

图 7A-E 是图 6 的腔室的部件 A-E 的示意图。

图 8 是用于与腔室一起使用的显微镜级适配器的示意图。

图 9 是用于发光的替换实施例的示意图。

图 10 表示在分隔膜下面的固定湿细胞的图像。

图 11 表示在隔膜下面的活性未标记粘附细胞的图像。

图 12 是在隔膜下面的完整的未标记的 CHO 细胞的图像。

图 13 是隔膜下面的活性未粘附细胞的图像。

图 14 是固定 NH3T3 细胞的阴极发光图像。

图 15 是完整 NH3T3 细胞的图像。

发明的详细说明

本发明提供一种适于研究湿样品的扫描电子显微镜的新技术。湿环境设置在由隔膜封闭的小腔室中，其中隔膜足够薄以便高能电子能穿过并与正在被研究的样品相互作用。

我们现在详细公开通过隔膜在扫描电子显微镜中对样品成像时的信号形成的技术和机理。我们还公开作为该方法中的主要元件的

隔膜所需要的机械和空间设置以及性能。

我们公开了关于隔膜的特征的简单测量，提供选择材料和厚度的指南。我们还公开了该技术对各种不同样品进行成像的性能。我们评估了容易实现的对比度和分辨率以及获得该对比度和分辨率所需的过程。我们表明可以用 10nm 数量级的分辨率在水中观察金颗粒，而较低对比度材料可提供 100nm 数量级的相当低的分辨率。这种新技术可适于不同领域中的各种应用，如材料研究和细胞生物学。

本发明基于通过引入膜状分隔件而使流体样品与真空隔离。聚合物技术的近来发展使得可以制造实际上可透射高能电子的薄膜，并具有韧性足以承受在一侧上的大气压和在另一侧上的高度真空。成像的体积位于最靠近隔膜的位置内部，通常为进入流体内几 μm 的位置。这对于位于隔膜表面上或靠近隔膜的物体（如粘附生物细胞）的检验是理想的。这里公开的技术还容易适于所有已有扫描电子显微镜，可以在室温下和大气压力下进行测量。

A、实验设置

我们已经成功地采用本发明的装置和方法在高真空模式下用 JEOL 6400 SEM 和 Philips ESEM 进行工作，但是我们提出的装置可与任何 SEM 一起使用。下面将参照附图详细说明本发明的某些目前的优选实施例。

将样品装在腔室内部，该腔室是沿着标准 SEM 样品安装插头的线设计的。主要重点是样品相对于外部压力差的密封，并且这是由一系列 O 形环实现的。封闭样品存在损伤隔膜的风险，因为如果由于我们用隔膜将样品适当封闭、而有人试图压缩腔室内的流体，将引起相当大的变形。为避免这个问题，小释放沟槽通过插头的柄保持打开，通过流体的少量释放平衡了内部压力。后来用适当旋紧的另一 O 形环密封通向该沟槽的开口。

该隔膜必须具有几个重要特性。第一，必须尽可能地是电子可

穿透的。这暗示着低平均原子数（低 Z ）和低密度。因此聚合物膜是最合适的选择。

该隔膜还需要非常好的机械性能。在保持厚度尽可能小、以便使电子在它们到达感兴趣的区域之前的散射最小化的同时，隔膜必须在用于观测所可能需要的表面区域内能抵抗一个大气压的压力差。它还必须有足够的柔韧性，以在制备样品时能够进行相当量的处理，控制我们的碳膜，因为它们非常脆弱。包括样品固定器并位于样品内部的材料孔隙率必须尽可能减小以保证腔室的合适密封。

理想地，隔膜的导电性应该很高足以防止隔膜的外表面局部带电，这可能妨碍入射电子束和使图像模糊不清。实际上，我们使隔膜外部上的薄碳膜脱水，因此消除了带电效应。

最后，隔膜对被观察物体的亲合力可能是很重要的因素。通常在电子显微镜中，电子从上部区域行进到底部，因此我们将要观察的物体位于隔膜下面。在研究的方法中，当物体紧密靠近隔膜时获得最好的结果，并且在物体被固定在隔膜上时最好。

已经测试了不同的材料以构成隔膜，所有材料都是以碳化合物为基础的。已经测试了在 TEM 中通用的以构成支撑膜[Davison 和 Colquhoun, J. 电子显微技术 2, 35, 1985; Handley 和 Olsen, 超显微技术 4,479,1979]的 Formvar 和 Butvar 以及聚酰亚胺。这些标注日期的测试材料当中，只有最后一种完全满足所有机械和密封要求。根据一个目前优选的实施例，我们采用由 Moxtex 公司提供的 1450' 厚度的聚酰亚胺薄膜。该聚酰亚胺薄膜呈现不可测量的对水的孔隙率：在插入 SEM 中之前，将样品放置在约 10^{-7} 巴的真空中几小时，而没有可检测的损失。它们可抵抗在 1mm^2 以上的窗口中由大气压产生的力。为使隔膜上的这个力和后来的破裂风险最小化，通常采用固定在隔膜外侧上的 TEM Ni 栅板（采用 $125\text{-}330\ \mu\text{m}$ 的网格）减

小该表面。对于导电性，发现在外表面上 50' 的碳淀积就足够了。如果需要的话，通过内表面处理实现亲合力性能。

B、对比度成型的机制

对在检测器上形成信号有两个不同的贡献。第一是均匀噪声的来源，第二包括信号：

1、当电子束撞击隔膜时，通过隔膜本身产生反向散射电子（BSE）和二次电子（SE）。只有在最初几纳米中产生的 SE（二次电子的平均自由程）能从隔膜逸出[Goldstein 等人，扫描电子显微镜和 X 射线微量分析，第 113 页，Plenum press，纽约，伦敦，1992]。它们的平均自由程在导体（薄碳层）中约为 1nm 左右，并在绝缘体（如聚酰亚胺和它以外的流体）中为 10nm 之内。在隔膜和碳涂敷屏蔽件中都产生 SE。

因此我们由于隔膜而实现对信号的第一贡献，其由 BSE 和 SE 构成。这个贡献是均匀的，因为我们使用的隔膜的成分和厚度在任何地方都相同。在下文中，下标 'm'（用于隔膜）将表示该贡献。

2、当穿过隔膜时未反向散射的来自电子束的部分电子撞击到样品上。再次产生二次电子和反向散射电子。

这里产生的 SE 没有机会逸出，它们将被隔膜（绝缘体）或薄碳涂层屏蔽件（导体）截住。相反，在样品中产生的 BSE 有可能通过隔膜向后退出。在它们穿过隔膜时，它们可能产生二次电子，如果产生二次电子，并且距离表面的距离小于它们的平均自由程，则这些二次电子可以向检测器逃逸。

因此，由于在感兴趣区域中的反向散射事件，我们实现对于信号的这个第二贡献，这些事件都影响 SE 和 BSE 检测器。在下文中，下标 's'（对于样品）将表示这个贡献。

第二贡献显然是人们感兴趣的贡献。它携带我们想得到的信息，而第一贡献只涉及隔膜（m）。如果两个相邻点之间的样品信号的差

别高于隔膜信号中的波动，则可观察到这两个相邻点之间的对比度。

因此通过获得大信噪比的概率确定我们形成图像的能力。这又由位于样品内部的材料反向散射系数的差值（“材料对比度”）确定，并且也取决于隔膜。

给定两种不同材料（其反向散射系数是公知的）并用于特殊隔膜的，我们将确定为了形成图像而使我们必须实现的条件。

收集的总信号 S 由二次电子和反向散射电子构成：

$$S \sim \varepsilon_{BS} \eta + \varepsilon_{SE} \delta \quad (1)$$

η 和 δ 分别是 BSE 和 SE 电流与电子束电流的比值。系数 ε 是被检测到的两种电子的收集效率。

反向散射系数 η 是在它自己上由两个贡献构成：来自隔膜 (m) 内部的 BSE 和来自样品 (s) 内部的 BSE, $\eta = \eta_m + \eta_s$ 。

同样，SE 散射系数 δ 具有两个贡献： $\delta = \delta_m + \eta_s \Delta_m$ 。

差值是在 δ_m 表示由进入隔膜的射束电子产生的二次电子， Δ_m 表示在电子向外的路径上由电子在隔膜中产生的二次电子时，在样品内部的相关反向散射事件之后的差值。

因此反向散射系数 η_s 乘以 Δ_m ，因为反向行进穿过隔膜的高能电子束的通量从 1 减少 η_s 。

注意 δ_m 和 Δ_m 都描述了由于接近隔膜的表面的二次发射。对于 δ_m ，产生二次发射的高能电子是入射电子束的主要部分，从已经在隔膜内部反向散射的电子得到的贡献很小。对于 Δ_m ，产生二次发射的电子束已经在样品中经历了反向散射事件。为此， Δ_m 可含有缓慢材料相关性。根据位于隔膜下面的材料，这个区域中的 BSE 的能谱可以是不同的，并且 BSE 的不同能量可能产生不同的 SE 发射。

注意我们使用的反向散射和二次系数的定义和在文献中通常所述的系数稍有不同。后者不能用于半无限介质，并且是材料（金、碳、尼龙等）的特性。在这里，系数描述具有其特定厚度和它的碳

屏蔽件的隔膜的电荷发射。它们不描述聚酰亚胺材料的半无限材料的电荷发射。通过同样的方式，样品系数描述了来自样品内部但被隔膜覆盖的材料的信号。在下面的说明中我们的目的之一将通过实验使测量系数与材料本身（例如水、金等）的传统理论系数特性相关。

让我们考虑提供信号 S_A 和 S_B 的两个相邻点。它们之间的材料对比性定义如下：

$$C_{AB} = (S_A - S_B) / S_A \quad (2)$$

（假设 $S_A > S_B$ ）。

有两个基本方式修改信号 S 。一种方式是将其乘以常数（放大）。另一种方式是给信号添加正或负的常数（即“黑色电平”）。隔膜对该信号的贡献在每个地方都相同。它的厚度和它的成分非常好确定。因此在点 A 和 B 之间不会因为隔膜出现成分对比性和地形对比性。

因此贡献 m 是一个常量，其能通过适当选择黑色电平除去。注意，尽管 pn 数量级的噪声可能干扰测量，其中 n 是从隔膜散射的电子数，但是我们那时忽略了它，下面回到它。通过这种选择，点 A 和 B 之间的对比就大大简化了：

$$C_{AB} = (\eta S_A - \eta S_B) / \eta S_A \quad (3)$$

材料对比性只与发生在位于点 A 和 B 上的隔膜下面的材料中发生的反向散射事件的数量的差有关。

回到贡献 m ，它产生可能完全破坏图像的噪声，如果它具有由样品内部的事件产生的信号的幅度的数量级。为此，我们必须研究隔膜特性和量化只涉及隔膜并且通过适当选择黑色电平在对比性的表达式（等式 3）中被抑制的部分信号。

C、电子穿过隔膜的通道

我们现在继续实验性地量化隔膜对信号的贡献。为此我们根据随能量而变化的、从其表面发射的 BSE 和 SE 进行了研究。我们采

用的方法是测量在不同位置穿过样品的总电流，相减得到在 BSE 和 SE 中的损失。我们毫无妨碍地测量电流以估算 SEM 在样品中提供的全部电流，然后测量隔膜对这个电流的影响。最后，我们测量通过隔膜并到达给定材料的电流，在我们的情况下给定材料为金和水。

为此，我们采用四个不同样品和允许不同样品同时插入显微镜内部的组件（我们具有的四个样品中，三个可以一起插入，因此我们用重叠的三个一组和相同条件进行重复实验）。对于不同的能量，电子束成功地定位在每个样品上，并且测量到了地和样品之间的电流。

样品 1 就是法拉第杯[Goldstein 等人, 扫描电子显微镜和 X 射线微分析仪, 第 65 页, Plenum press, 纽约, 伦敦, 1992], 用于通过收集所有的射束的电荷（反向逸出的电荷的量可忽略）来测量束流 I_{beam} 。它是由连接到地的碳块构成，并在其顶部有腔（2mm 的直径，3mm 深），由在中间有直径为 $10_{\mu\text{m}}$ 的孔的镍板封闭。射束通过该孔进入并撞击碳腔的底部，因此主射束和实际上所有散射电子被收集。

样品 2 在设计上是相同的，除了孔用隔膜覆盖之外。我们称这种测量结果为 $I_{\text{隔膜}}$ 。

样品 3 由连接到地并由隔膜覆盖的纯金样品构成。金首先熔化，使得它的表面足够光滑以获得大区域，在其中实现与隔膜的“直接”接触。最后，样品 4 是我们的实验腔室，含有水并被隔膜密封。样品 3 和 4 确定用于 $I_{\text{材料}} + I_{\text{隔膜}}$ 的两个值。

在样品 1 和 2（由样品 1 标准化）上测量的电流差提供通过与隔膜的相互作用发射的电子的百分比。这测量了隔膜的二次和反向散射系数的贡献：

$$[(I_{\text{beam}} - I_{\text{隔膜}}) / I_{\text{beam}}] = \eta_m + \delta_m :$$

射束电流（样品 1）与在样品 3 或 4 上测量的电流之间的差提

供从到达外部的样品发射的电子的百分比。这些包括与隔膜和材料（分别为金或水）都互相作用的电子：

$$[(I_{\text{beam}} - I_{\text{隔膜+材料}}) / I_{\text{beam}}] = (\eta_m + \delta_m) + \eta_s (1 + \Delta m);$$

下标 s 表示材料，这里为金或水。

对于低于 5keV 的能量，可以看到金和水曲线叠加在隔膜曲线上。这意味着射束的能量不足以到达样品和发送 BSE 返回到检测器。

对于高于 5keV 的能量，三个曲线的斜率不同。检测信号的生长部分是由于与考虑的材料相互作用造成的。随着能量增加，这个差也增加：信号的材料分量成为主要部分。

对于水样品和 10keV 的入射电子能量，射束-隔膜作用对电荷发射的贡献为 50%。它们的贡献在 15keV 时减少到 35%。

在金的情况下，由于其高原子数，该比例非常小。在 10keV 时，只有发射电荷的 4%是隔膜特有的。在 15keV 时，隔膜贡献下降到 2%。

在这个阶段，我们可以从总电子发射中减去隔膜分量，并得到材料对信号的贡献。这只包括由它们与感兴趣的材料相互作用而散射的电子。

在低能量时，射束电子不能到达样品并且这些曲线应该为零。在非常高的能量时，这些曲线应该遵从材料的反向散射系数的特性，因为隔膜实际上变为可穿透的。这就是我们在两个曲线上所观察到的事实。水曲线的下降倾斜率遵从反向散射系数的理论特性，正如根据 Hunger 和 Kuchler 的推导 [Phys. Status. Solidi A 56, K45, 1979; 还参见 Goldstein op cit, p.95] 计算的。金曲线的增长的倾斜率也直接遵从用能量的计算反向散射系数评估（如从相同表达式所推导的）。

通过由各个材料的反向散射系数对这些曲线进行归一化（利用它们的合适能量相关性），我们得到其中只有保持低材料相关性的曲线。

对于水的结果表示比由 Hunger 和 Kuchler 预言的理论曲线低约 25%的反向散射系数。我们不能确定这个差的起源是什么，但是由于我们的样品完全被封闭，被污染的可能性非常小，因此我们相信我们的实验确定值是此时对于这个量可得到的最纯净的结果。

尽管我们尚未对此做直接测量，但是隔膜下面的材料的性能也明显影响了被发射的 BSE 的能谱。能量的范围从 0 到 E_0 ，其中 E_0 是入射电子的能量。轻材料（如碳）具有约以值 $E_0/2$ 为中心并且是对称的分布[Bishop in Proceedings of the 4th Intl. Conf. X 射线光和微量分析，由 Hermann 编辑(巴黎,1966); 还可参见 Goldstein op cit,p.100]。重材料（如，金）具有非常不对称的 BSE 能量分布，峰值更接近 E_0 。这个差产生两个效果。第一，能返回穿过隔膜的 BSE 与产生的总 BSE 的比值对于重材料比轻材料高。隔膜实际上用于滤出低能 BSE，由此人为地增强轻元素和重元素之间的对比性。第二，BSE 的能谱差也能影响 SE 发射 Δm ，这是因为低能 BSE 具有更高的可能性以在它们射出的路径上产生 SE。

对于原子数在水和金之间的其它材料，对应的曲线应位于所示的两个极限之间。我们从以上结果总结了我们的结论如下：

a) 对于在 4-keV 以下的能量，从样品不能检测到信号；可采用更薄的隔膜减小这个阈值。

B) 能量的中间区域是令人感兴趣的区域，原因如下：首先，隔膜对低能 BSE 的过滤效应增强了重材料和轻材料之间的对比性。其次，在这种状态下的 SE 的发射是很重要的，并且可以利用 SE 检测器很容易成像。金曲线上的峰值到达高于 1 的值，这表示 SE 的高发射。

c) 对于超高的能量，发射的电荷接近理论预计的 BSE 系数。原因是在更高电子能量（对于射束和反向散射电子的两种电子）时，对于 BSE 穿过隔膜的可能性更高，并且在它们的射出路径上的 SE 的

可能性是更低的。涉及 Δm 的二次发射降低了，因此如实验观察到的，通过BSE检测器更容易成像。

对BSE的隔膜过滤效应在高能时变得可以忽略。在对比性的表达式（等式3）中，反向散射系数可由考虑的材料（水、金、碳等）的反向散射系数代替。实现平稳段的能量表示最小能量，在该最小能量以上，这个近似值有效。对于这里所示的隔膜，这个值在15keV左右。

D、推断用于观察给顶材料对比性的最小探测电流

一旦在两个点之间存在小的成分差（平均原子数的差），理论上讲可以观察到它。问题是很多电子必须怎样撞击到这些点上以进行观察。

这种评估是有用的，有几个原因如下。第一，被选择的电流影响分辨率：高电流引起射束聚焦不好。这是在显微镜的电子源为钨丝时问题的更多方面，并且对于场发射显微镜来说是不敏感的问题。第二，电子源可只产生有限数量的电荷，第三，高辐射剂量可能损害样品。

一般情况下，我们感兴趣是含有液体的样品，如乳胶、生物物质、聚合物溶液等，在大多数情况下这些材料被证实了是低对比性样品。

对于足够可见性的某些任意但有用的准则是“玫瑰准则”[Goldstein op cit, pp215]。该准则表示为了观察两个点A和B之间的差，这些点之间的信号幅度的差必须高于噪声电平的5倍：

$$(S_A - S_B) > 5N。$$

测量在射束以不同扫描处于点A时进入检测器的电子数量，我们得到分布，其标准偏差由以下给出：

$\sim \eta^{1/2}$ 和中心在平均值 \bar{n} 。因此该信号与 η 成正比例，并且噪声与 $\eta^{1/2}$ 成正比例。信噪比为 $S/N \sim \eta^{1/2}$ 并且可观察到的材料对比

性的最小水平为 $C_{\min} = 5/\eta^{1/2}$ 。

这样，为了观察特定材料对比性 C 而必须收集的电子的平均数通常由 $\eta > (5/C)^2$ 给定。对应的电流（在检测器中）为 $I_s > (q/t)(5/C)^2$ ，其中 q 是电子电荷， t 是射束在每个点上的时间。 t 还可表示为 $t = T/n_p$ ，其中 T 是扫描时间， n_p 是每帧的像素数量。对于高质量图像，通常 $n_p = 10^6$ 个像素。测量 I_s （皮安培）和 T （秒），我们发现在检测器为获得给定材料对比性 C 的所需电流为：

$$I_s > 4/TC^2 \quad (4)$$

最后，信号电流 I_s 和射束电流 I_B 有以下关系：

$I_s = \eta_s (\epsilon_{BS} + \epsilon_{SE} \Delta m) I_B$ 。与 Everhart-Thornley 检测器一样，SE 检测器是非常有效的，具有对 BSE 的良好抑制 [Goldstein op cit]。BSE 检测器不收集 SE，并且由于它通常具有小的特征，因此只有介质收集效率。我们实验发现在 10keV 左右的能量，BSE 和 SE 模式的图像以相同的对比度出现，同时在更高能量时 BSE 模式更好。收集效率的合理评估选择为 25%，我们得到为获得对比性 C 所需要的射束电流是 [19]（还在 [Goldstein 第 217 页]）：

$$I_B > 16/\eta_s TC^2 \quad (\text{pA}) \quad (5)$$

在高能时，对比性 C 简单由等式 3 涉及到隔膜下面的材料的反向散射系数。表 I 表示观察生物样本如细胞、油/水乳胶和在水中的金颗粒所需的最小电流的计算结果。

四种元素 C、H、N 和 O 构成生物样本（如细胞）重量的约 99%。细胞由 70% 的水和 29% 的有机化合物构成。这些化合物中约 50% 的原子是氢原子，24% 是碳，24% 是氧，和 1% 是氮原子 [20]。给定这些值，典型有机分子的平均原子数为 6.72。水的平均原子数为 7.22，并且活性细胞的平均原子数为 7.07。在 20keV 的相应反向散射系数的计算对于水来说为 0.075，细胞为 0.073。这样，被水介质包围的细胞呈现低对比性 $C = 2:5\%$ ，并且反向散射系数很低。这个计算表

明在纳安培范围内的最小电流被要求用于 100s 的典型扫描。

材料	Z	η	与水的对比性	I (pA)
水	7.22	0.075	-	-
细胞	7.07	0.073	0.027	2900
油	5.8	0.055	0.267	30
金	79	0.78	0.90	0.25

表 I

观察含有水的不同样品所需的最小电流的评估。I 是根据等式 3 计算的。 η 的值是根据 Hunger 和 Kuchler 的等式在 $E=20\text{keV}$ 的能量并采用所示平均原子数值 Z 计算的。扫描时间 $T=100$ 秒是典型的精确慢速扫描。

油/水乳胶可以更容易地被观察和呈现十倍高的对比性： $C=26:7\%$ 。在这种情况下，最小电流落入几十皮安。对于浸渍在水中的金颗粒，对比性非常高 ($C=90\%$)。使它成像只需要几分之一皮安 (表 1)。

生物样品 (如细胞) 需要高电流以在合理的积分时间成像。人们可以有利地采用具有重标记的标签 (如胶质的金颗粒) 以装饰细胞。油/水的乳胶可以直接在电流和积分时间的标准条件下观察。

在低能量 (10keV 和以下) 时，隔膜的影响变得很重要。因而，低对比性样品需要更多的电流来使其成像。

E、该技术的分辨率的评估

如在任何电子显微镜测量中那样，分辨率的问题最终简化为具有高电子含量的散射原子的存在。在不存在强的散射原子时，射束将到达并进入样品很深，在经受足够的互相作用以返回之前，与原先相比增宽和损失分辨率。在具有高电子密度的材料中，射束在返回或被吸收之前只行进短距离，因此散射体积很小，并且分辨率高。

为观察隔膜对分辨率的效果，我们必须评估有效信号产生体积，其特征在于直径 d_{eff} [Goldstein op cit., pp.162]:

$$d_{\text{eff}} = (d_B^2 + d_m^2 + d_{\text{BSE}}^2)^{1/2} \quad (6)$$

其中 d_B 表示进入隔膜的射束的直径。随着射束穿过隔膜，产生某些散射，这在低能时非常重要，并在高能时往往是可忽略的。 d_m 表示由于射束与隔膜的相互作用而导致射束的增宽，具有零初始宽度 $d_B=0$ 的射束将从直径为 d_m 的隔膜射出。

距离 d_{BSE} 是在电子作为 BSE 返回之前被样品中的电子覆盖的体积的平均直径。 d_{BSE} 可以在文章 [Goldstein op cit, 第 105 页] 中发现，并且涉及 Kanaya-Okayama (KO) 范围。通过 KO 范围改变所有特性长度除去大部分的材料相关性，只留下小原子数 Z 相关性。在金样品的情况下，BSE 的 90% 开始出现在直径 $d_{\text{BSE}}=0.3R_{\text{KO}}$ 的体积中。对于碳，相同的关系给出 $d_{\text{BSE}}=0.6R_{\text{KO}}$ 。

KO 范围提供材料内部的电子相互作用的体积的典型尺寸。它等效于以在射束撞击点的表面上为中心的圆环的半径，其圆周包围相互作用的限制包封：

$$R_{\text{KO}} = 0.0276(A/Z)Z^{0.11}E_0^{1.67}/\rho \quad (7)$$

R_{KO} 以 μm 为单位， E_0 是以 keV 为单位的入射射束能量， A 是以克/摩尔表示的原子量， ρ 是以 g/cm^3 表示的密度， Z 是原子数。

在三个不同层的一般情况下（碳隔膜-材料）计算理论分辨率是很重要的。然而，在具有非常低或非常高原子数的材料的两个极限情况下，这种评估是可能的。

A、在低能时低对比性样品的分辨率

轻材料如水、油或构成隔膜的材料原子数足够接近，使得简单评估可将它们看作是相同的。然后，分辨率的评估就是：

$$d_{\text{eff}} = (d_B^2 + d_{\text{BSE}}^2)^{1/2} \quad (8)$$

其中 d_{BSE} 是以平均轻材料计算的。这种评估可以检测只要 d_{BSE}

大于隔膜厚度即可。

射束的直径 d_B 取决于显微镜中使用的电子源。场发射源在最好条件下（低电流、高能）产生 1nm 尺寸的射束，而在最困难条件下，该尺寸为 10nm 左右。对于钨丝显微镜，射束的直径可从 10-100nm 变化。

这样，在轻样品的情况下获得的分辨率处于 200nm 数量级。在 10keV、低电流和场发射源的情况下，提供如下估算：

$d_{\text{eff}}=170 \text{ nm}$ ，而在 20keV 时，它达到 $d_{\text{eff}}=500\text{nm}$ 。

通过实验，我们发现难以获得比隔膜厚度更好的分辨率。当降低能量时，分辨率提高，这是因为隔膜下面的取样体积变小。但是实际上，随着能量降低，对比性折衷降低。更少的电子从样品反向散射，并且样品信号与隔膜信号的比降低。这样，分辨率的实际限制由能被检测的最小对比度提供。如果可以减小隔膜的厚度，则使样品成像的最小能量将降低，并且分辨率将大大提高。

分辨率的这个估算表示在这个阶段对于低对比性样品（如在水乳胶中的油）、为何我们的技术在光学显微技术上不会提高太多。它可以通过技术发展如较薄的隔膜而得到提高。然而，当观察水中的金颗粒，或者更一般地在由重材料构成并浸渍在轻材料中的小物体时，这种情况完全改变。

B、在高能时的高对比性样品的分辨率

水中的金颗粒的情况是非常令人感兴趣的。通过实验在高能获得的分辨率在几十纳米范围内。能量越高，获得的分辨率越好。在 30keV 时，实际直径为 40nm 的小珠（bead）看起来约为 50nm 直径，在小于 BSE 的相互作用的体积的大小的数量级上（由 dBSE 提供）。这表明分辨率与互相作用的范围无关。在这种情况下，分辨率与到达颗粒深度时的射束直径相关。

在高能时，如果没有小珠阻止它，射束可在水内部扩散，并且

由 BSE 采样的体积很深和很宽（1 到几微米）。BSE 产生的信号是在非常大的体积上结合为整体的结果，为此，在射束扫描时不会显著变化。此外，在高放大倍数，当其图像尺寸本身处于 BSE 采样体积的尺寸数量级时，这个深度 BSE 信号是常量，并且可通过适当选择黑色电平除去。另一方面，当电子束穿过重材料小珠时，相当大部分的射束被阻止并且立刻发射大量更多的 BSE（高反向散射系数）。这样，得到的分辨率取决于在小珠的深度的电子束的空间延伸。

位于隔膜下面的小珠以最好的分辨率成像。颗粒在样品内部越深，它可成像的分辨率越低。

射束的扩散是很好地适合于由 Monte Carlo 模拟采用的方案的问题。我们采用由 D.C.Joy “用于电子显微镜和微量分析的蒙特卡罗模型化（牛津大学出版社，纽约，伦敦，1995）”设计的代码以进行这种计算。对于这些模拟的输入值是聚酰亚胺化学计量式 $C_{22}O_5H_{10}N_2$ ，平均原子数 6: 4 和平均原子量 9.8g/mol。材料的密度为 1.4g/cc。

在 20keV 时，在隔膜下 60nm 处评估分辨率的极限。在 30keV，计算的射束直径为 35nm，当小珠与隔膜接触时、与实验获得的分辨率相符合的值。

该计算表明如果采用两倍薄的隔膜，在高能时可以以 10nm 分辨率成像。

对于位于样品内部更深的小珠，必须考虑由于其间的水的层导致射束的扩散。分辨率的近似值由 $d_{\text{eff}} = \sqrt{(d_{\text{电子束}}^2 + d_{\text{隔膜}}^2 + d_{\text{水}}^2)}$ 给出。d_水 是根据 Monte Carlo 模拟计算的。

通过使用的隔膜和在 30keV 时，位于隔膜下面 100nm 处的金颗粒可以以 45nm 的分辨率成像。小珠 200nm 深度可以用相同能量以 80nm 的分辨率成像。

F、采样深度

为了完整性，感兴趣的是评估可以检测样品内部多深的重颗粒。

在轻材料中，逸出的几乎 50%的 BSE 在返回表面之前到达等于 $0.2R_{k0}$ 的深度[Goldstein op cit pp.105]。数字系数 0.2 是用于碳的，但是对于水和构成隔膜的材料应该非常相似，因为系数随着原子数变化的非常慢。

将这个值作为我们的评估采样深度，在 6keV，采样深度为 150nm 左右。这个值与我们的观察一致，其中在这个能量以下利用我们的 145nm 厚的隔膜几乎不能成像。

在水中，在 10keV 时采样深度约为 $0.4\mu\text{m}$ ，在 20keV 时为 $1.2\mu\text{m}$ ，在 30keV 时为 $3.1\mu\text{m}$ ，这是在很多扫描电子显微镜上可得到的最大能量。这些值提供可以在水内部检测金颗粒的深度范围的评估。

G、腔室内部压力的评估

下面是湿腔室内部压力的简单计算。该计算主要涉及设置，其中假设腔室用水填满并且内部只有非常少的空气（就是说，少量气泡）。

为简化计算，考虑下面的假设条件：

1、我们以封闭腔室开始，其中主要用水在大气压力下填充。在内部具有少量体积 V_a （在大气压下测量的）的空气，这与把腔室放入真空之后的体积膨胀 V 相比很小。

2、隔膜被模拟为由具有弹性常数 k 的弹簧固定的活塞。这个模拟可能是很准确的，因为只假设了隔膜上的力和隔膜的位移 X 之间的线性关系。这个有效常数很容易通过实验进行评估。隔膜（活塞）的表面面积由 S 表示。

3、假设水是不可压缩的。一旦将腔室放在真空中，活塞移动直到达到平衡为止。膨胀的体积 V_e 由平衡条件确定，并且由空气和水蒸气填充。水蒸气压力 P_{H_2O} 只由温度确定并与体积无关（见 Kittley 的“热物理学”）。空气和水蒸气都被假设为理想气体。

水蒸气分子数由下式给定：

$$(1) N_{H_2O} = \frac{P_{H_2O} V_e}{RT}$$

其中 T 是温度。

插入真空之后腔室内的总压力为：

$$(2) P_{tot} = \frac{N_{tot} RT}{V_e} = \frac{(N_a + N_{H_2O}) RT}{V_e}$$

其中 $N_a = \frac{P_{atm} V_a}{RT}$ 是空气（氮）分子的数量。在（1）和（2）中，

我们使用假设 1： $V_e > V_a$ 。

压力的另一等式由平衡条件给出：

$$(3) P_{tot} S = kX$$

采用 $V_e = XS$ ，我们得到体积等式 V_e 的等式：

$$(4) V_e = \frac{P_{tot} S^2}{k}$$

将（4）代入（1）和（2）中，在做一些处理之后得到取决于初始参数的 P_{tot} 的等式：

$$(5) P_{tot}^2 = \frac{P_{atm} V_a k}{S^2} + P_{H_2O} P_{tot}$$

这个等式可变换成（通过除以最后一项）：

$$(6) \frac{P_{tot}}{P_{H_2O}} = 1 + \frac{P_{atm} V_a}{P_{H_2O} V_e}$$

或者变换为：

$$(7) \frac{P_{tot}}{P_{atm}} = \frac{P_{H_2O}}{P_{atm}} + \frac{V_a}{V_e}$$

等式（7）可用于评估 P_{tot} 。右侧的第一项约为 0.025。如果第二项上的比率比这个值小很多，则可忽略气泡，并且腔室中的压力是水蒸气压。如果它很大，则这个比率给出来自大气压的总压力的几分之几。注意这个等式是用 $V_e > V_a$ 的条件得来的。如果 $V_a > V_e$ ，则压力将保持在接近大气压力，并且水蒸气压是无关的。

优选实施例的详细说明

现在参见图 1，图 1 是表示现有技术 SEM 10 的样品区域的纵截面的概括示意图。一次电子束 12 通过真空路径行进到达样品 14。该电子束撞击样品 14 以形成一连串反向散射电子 16，其撞击反向散射电子检测器 18。除了反向散射电子之外，由样品发射的二次电子 20 向二次电子检测器 22 加速。

通过大气的电子的平均自由程非常小，因此从反射器经样品到检测器的整个电子路径处于真空中，这就不可能研究湿样品或体内处理。

现在参见图 2，图 2 是表示根据本发明第一方案的扫描电子显微镜的纵截面的概括示意图。与前述图中相同的部件用相同的参考标记表示，除了用于理解本实施例而必须说明之外，不再进行说明。

在图 2 中，一次电子束 12 通过真空室 30 向放在腔室 34 中的样品 32 行进。密封在腔室 34 中的是适合保持湿的和活性组织的气氛，其中可以进行气氛体内处理。最合适的环境将包括水介质。

为了密封该腔室与真空室隔开，通常为隔膜的阻挡件 36 穿过由环 38 限定的孔延伸。环 38 被设计成在其端部以气密方式保持隔膜 36，正如下面结合图 3 更详细所示的那样。样品 32 优选靠近隔膜 36 放置，使得电子束不必穿过腔室内的气氛，以便达到样品。在优选实施例中，样品 32 与隔膜实际物理接触，并在活性组织的情况下，可以采用公知方法生长在隔膜上或固定到其上，如下面所述。

优选地，腔室 34 包括排放出口 40，下面将结合图 3 详细说明该部件。它还包括用于流体的入口 41 和出口 42，流体保持用于样本的合适条件。例如，可以利用入口 41 和出口 42 改变被研究样本的化学环境。这个特征在研究药物上特别有用，在那里，随着给定药物浓度的改变可以观察细胞的动态反应。

隔膜 36 可以是箔或薄膜，并且最好能承受高达一个大气压的压

力梯度，同时可透射电子束。在一个示意实施例中，采用基本上为 1500 埃厚的聚酰亚胺层，因为它能承受该压力梯度并且可透射具有在 3keV 和更高之范围的能量的电子束。较薄的隔膜对 2keV 是可穿透的。一般来说，该厚度可位于 200-5000 埃的范围内，以便承受必要的压力梯度，同时对于可获得的射束能量的电子是可穿透的。优选材料例如是分子式为 $C_{12}H_{12}N_2O$ 的聚酰亚胺、聚酰胺、聚酰胺一酰亚胺、聚乙烯、聚吡咯、和附加导电聚合物、火棉胶片、火棉胶、二氧化硅、一氧化硅、碳以及具有以下商标的材料，包括 Kapton™、FomrVar™、Vinylec™、Pioloform™ 和 ButVar™。由前述聚酰亚胺构成的隔膜便于一次电子束和得到的反向散射电子 16 通过。

二次电子 (SE) 一般具有比前述那些电子低的能量，并且通常往往被吸收在水中。因此通常检测不到从样品发射的 SE。然而，在优选实施例中，通过在隔膜上涂敷一层或多层具有高二次电子产率的材料 37，增强 SE 信号。典型的材料包括氟化锂。

显然，SE 通过 SE 检测器 22 被检测到，并因此用于增强整个信号。

在优选实施例中，孔内的隔膜 36 的露出区域的直径基本上为 1-3mm。隔膜通常被支撑在栅板上，栅板内的每个开口具有约为 0.1mm 的最大直径。栅板增强了隔膜承受压力梯度的能力。栅板示意性地示于图 3 中。

隔膜优选允许维持腔室 34 的正常大气条件，并因此允许检测包括活性细胞、细胞器官或其部件、以及蛋白质。它还允许检测表面活性剂、胶体、油颗粒、乳胶、以及聚合物或胶束溶液。在药物工业中，该腔室例如可以用于检查药物的动态性能，如溶胀、溶解和分解，甚至细胞对某些药物的抵抗力。在纺织工业中，该腔室可用于研究湿和干的毛、棉和合成纤维。本发明可适用的其它领域可包括石油、食品、地质学、微电子学、纸张涂层以及材料科学。

腔室 34 本身可用所希望的气体或液体填充，并且由于电子束的纳米范围分辨率而可以在分子级监视样品。由隔膜造成的分辨率损失可忽略，因为其中几乎不发生散射事件。当用气体填充该腔室时，优选可在腔室中设置包括弹簧 43 和附加隔膜 44 的减压器件，以便防止隔膜 36 破裂。

根据本发明的实施例，腔室 34 可结合到标准 SEM 中，如下面参照图 3 所述。腔室 34 兼容标准样本固定器或样本安装架。样本固定器是根据标准商业样本固定器的尺寸设计的，因此它可以很容易结合到样本腔室，即用于放置样本固定器的显微镜的外壳中。

虽然前面该腔室已经被描述为含有大气压力，但是不是对于所有样品都是必须的，在某些情况下，发现较低压力也是适合的，因此减少了穿过隔膜 36 的压力梯度。

采用电子束观察活性细胞或体内处理的难度在于电子束本身将损坏样品。例如，对 DNA 的最大损伤发生在 4keV。选择 3keV/1500 埃的聚酰亚胺隔膜安全地处于最大损伤水平以下。

通过发现使对单独样品的损伤最小化的能量级，损伤水平可进一步被优化。

现在参照图 3，图 3 是图 2 的腔室的另一实施例的简化并稍微放大的更详细的截面图。腔室 50 的尺寸优选能装配到常规样品固定器中，该腔室 50 包括样品固定组件 51，该组件 51 包括封闭样品区 54 的本体件 52，样品区具有开口表面 55。在图 3 的例子中，本体件 52 是标准的 SEM 样本安装架。样品区由前述类型的隔膜 56 封闭，其装配在样品区 54 的暴露侧上。栅板 59 位于隔膜上并通过隔板 57 分离。封闭件 58 以围绕其边缘卡紧隔膜 56 的方式装配在本体件 52 上。封闭件经装配到封闭件 58 中的相应孔中的螺钉 62 固定到本体上，其中封闭件 58 中的孔与本体件 52 中的螺纹孔 60 是连续的。为了提供样品区 54 的气密密封，O 形环密封垫 66 围绕样品区 54 装配

到本体件 52 中。

示出的样品 64 与隔膜 56 紧密靠近。优选地，它应该是实际上与隔膜接触或处于纳米范围内，以便使电子束不必行进通过任何相当量的空气。

当通过拧紧螺钉 62 而密封样品区时，可能在样品区内产生压力。因此提供减压组件 68，以便释放过量流体。组件 68 包括封闭通道 72 的套筒 70。通道 72 将样品区 54 与在套筒 70 的远端的另一开口 74 连接。在套筒 70 周围是滑动圆筒封闭件 76，该封闭件 76 包括装配到下部件 79 上以便相对第二 O 形环密封垫 78 向内压紧它的上部件 77。封闭件 76 优选只在样品区本身已经被密封之后用于密封开口 74，由此允许有样品固定组件 51 的用于过量流体的路径。

插塞 73 便于插到样品固定器（未示出）中。

现在参照图 4，图 4 是图 2 和 3 的腔室的实施例，适用于通过光学装置进行的附加采样。在图 4 中，腔室 80 作为光导 82 的一部分而制成。由封闭件 86 固定的隔膜 84 密封腔室 80 保持真空。反射涂层 90 优选涂敷光导 82 的一端，另一端沿箭头 92 的方向通向光电倍增管（未示出）。样品 94 用电致发光（荧光）标记做上标记，该标记由电子束激发。光沿箭头 92 的方向偏转以被光电倍增管（未示出）放大。因此可以检测单个光子，并且优选提供用于以 SEM 的纳米尺度分辨率进行光学检测的装置。

现在参见图 5，图 5 是表示采用图 3 中所示实施例进行湿样本检测的电子显微照片。样品是水中油乳胶，如用在前述实验以展示 ESEM 对比性的样品，由 Matthews (Proceeding of Institute of Physics, EMAG99, 第 95 页, 谢菲尔德, 1999) 所述，这里引证其全部内容供参考。该电子显微照片是用具有低分辨率的 JEOL 8400 SEM 拍摄的，并且示出了尺度标记。采用根据本发明的隔膜获得的分辨率实际上与在没有隔膜的常规方式中采用 SEM 实现的分辨率水平相

同。得到良好的对比性，并且总的结果对于湿样本检测足够了。

应该理解，为清楚起见，在各个实施例中所述的本发明的各个特征还可以与单个实施例相组合设置。相反，为简化起见，在单个实施例中所述的本发明的各个特征也可以独立设置或设置在任何合适的子组合中。

本发明的优选方法的详细说明

理想地，用于对包括（但不限于）活的非固定细胞的湿样品成像的技术应提供以下性能：

1、成像性能：

至少 100nm 的分辨率，优选在 1-20 纳米范围内

高信噪比和信号与背景比

2、细胞的生理环境：

在湿的非固定细胞的湿环境中工作的能力

最小辐射损伤（对成像的最小干扰，对结果的生物关联的最小影响）

3、生产量

最少样品制备步骤。

自动化战略

本发明基于扫描电子显微镜，我们修改了它使其满足上述规范。

最少样品制备步骤

传统的 SM 程序需要涂敷样品以防止其带电。这里，包围细胞的水电解液（介质）足以防止带电。这样，样品制备不需要涂敷步骤，并允许用活性细胞工作。与常规 SEM 相比，样品制备不需要固定、脱水或涂敷的事实显著地缩短并简化了样品制备程序，并且大大提高了结果的质量。这里有一个作为非限制例子的样品制备程序。这个例子适合于给细胞外细胞成分做标记，如隔膜蛋白质的细胞外部分。其它标记技术包括给细胞内细胞成分做标记，在下述例子中

有介绍。对细胞做标记是通过规则免疫标记程序进行的。

我们的结果表明这个湿 SEM 技术适合于固定和活性细胞，并且适合于粘附和非粘附细胞。此外，这些结果表明尽管标记必须具有单个分子检测，可以在没有标记的情况下对细胞成像。

自动化策略

本发明还解决了实验 SEM 的低产率问题。本发明利用为晶片检测的半导体工业研制的 SEM 自动化用于生物样品。在生物学中利用为晶片检测研制的 SEM 自动化的这个想法在主题为“识别和量化生物分子的方法及其设备”的共同未审 PCT 申请（PCT/IL01/00764）中详细进行了说明。其中，样品是干的，以便用于“晶片检测扫描电子显微镜”（WISEM）或 WISEM 类显微镜的明确用途。这个想法不能适用于在它们的自然含水环境中获得的生物样品，因为这种样品的制备应符合常规电子显微技术的真空要求，包括 WISEM，施加激烈和复杂的步骤可能妨碍自动化。本发明能对含水样品进行成像，而不需要这些有疑问的样品制备步骤。这样，允许在生物学中利用为晶片检测的半导体工业研制的 SEM 自动化。这个使用将大大降低了实现该方法所需的设备的成本。

自动化策略（automation strategy）是描述在利用 WET SEM 技术进行活性细胞样品的自动成像中使用的程序的一组指南。在本发明的优选实施例中，自动化程序将包括：含有大量隔离腔室的“细胞芯片”，其中每个腔室含有为湿 SEM 成像制备的样品。每个这种分部（隔离腔室）含有在其上生长细胞样品（可以是相同的或不同的）的分隔隔膜。

在制备样品时可采用标准自动流体控制。

一旦细胞芯片准备用于成像，它就可以采用标准光学显微镜或集成到 SEM 中的特殊设置（如光纤等）进行自动光学成像（或低放大倍数 SEM 扫描）。这个扫描将提供每个腔室中的细胞的概观图像、

它们的位置以及与实验相关的任何其它信息。在这个扫描中关于细胞的信息将采用特殊研制的算法自动检测。

分隔隔膜安装在金属栅板上，以便实现机械稳定性。栅板为每个图像的坐标提供便利的、极其稳定的基准。

在 SEM 外部进行光学扫描的情况下，细胞芯片被传送到 SEM 腔室中，用于 SEM 成像。校准算法将用于在光学显微镜和 SEM 的坐标系之间匹配。

一旦这两个坐标系匹配了，SEM 将对根据光学扫描（或低放大倍数 SEM 扫描）自动选择的感兴趣的指定区域（ROI）进行成像。这种 ROI 可包括发生重要的生物活动的细胞内的指定区域、或涉及细胞内中的特殊子定位的区域、或提供细胞中的其它区域的统计学表示的区域。金胶体将要在每个这种区域中成像。

这种 ROI 可具有不同的尺寸，因此需要不同放大率的 SEM。注意到，可以在成像视场和可观察到的标记的尺寸之间进行折衷。因此，为在不同的视场进行成像将需要标记的不同尺寸。具体而言，对于整个单一细胞的成像，需要大的视场。这种大的视场意味着放大率和只观察大金胶体的能力（取决于扫描的分辨率）。或者，以更高的放大率取得的很多小视场图像可以组合，以提供整个细胞的高分辨率照片。

SEM 图像被自动拍摄。这包括 SEM 操作台的自动定位、自动聚焦和像散校正、自动亮度和对比度。

可采用图像分析算法自动分析通过 SEM 拍摄的图像。这包括被观察的金胶体的位置和尺寸的鉴别、计算和对比。

在 SEM 成像中还可以测量其它信号。这些信号包括来自阴极发光标记（如下所述）的信号或来自样品的 X 射线发射，这可提供样品的分析化学分析。

在利用 SEM 扫描一个细胞芯片的同时，可以光学方式扫描另一

个。

在 SEM 中的超高分辨率光学成像

令人非常感兴趣的选择是采用窄电子束在样品中激发光发射。这种光发射被称为阴极发射 (cathodoluminescence, CL), 并且过去已经对脱水样品进行了研究 (由 Hough PVD 所述的, 扫描电子显微技术 I, 257, 1977)。这将能以比光显微技术中的理论限制更好的分辨率检测光发射。这个方案组合了 SEM 成像的高分辨率与常见的荧光标记。当在 SEM 中对湿和活性样品进行成像时, 这个选择方案非常有利。在这个成像系统中, 电子束产生二次电子 (SE) 发射, 激发 CL (荧光) 标记分子, 并进而发射可见光。然后这个发射的光被收集在与常用电子检测分离的收集路径中。由二次电子进行的激发可以表明是与宽带 UV 辐射等效的 (见 Hough PVD, 扫描电子显微技术 I, 257, 1977)。这种方法的优点如下:

- 1、荧光和金标记的组合具有很多生物学的优点。
- 2、获得被标记分子的高分辨率图像可提供新的和重要的生物信息。
- 3、单一光子检测容易被管理并确保发射的光子的相当大部分的恢复。
- 4、DNA 编码荧光蛋白质的可用性展现了电子显微技术的新标记机会。
- 5、专用探针如量子点和荧光珠在这个技术中可用做标记, 提供在其它技术中不可获得的多功能性和优点。

湿-CL 装置的实施例可基于已有的 CL 检测器, 或可包括新收集几何形状和结构的发展。已有的检测器例如是从上半平面 (样品上面) 收集光的那些检测器。在这个镜面配置中, 椭球面镜放置在样品上方, 其中有小孔以允许电子束通过。光被该镜子收集并导向显微镜中的窗口, 在窗口的外部设置光子检测器。这种收集结构可从

市场上获得，例如从 Gatan 公司（先前的牛津仪器公司）。下面我们讨论用于下半面中收集的两个示意结构，其中光子在样品下面被收集，并且由光导引导到显微镜外部的检测器。

该装置的制造如下：样品腔室（由不锈钢构成）在上部部件上由分隔隔膜封闭，在下部部件上由小透镜封闭，以便隔膜位于透镜的聚焦平面中。这样，在隔膜附近发射并被透镜收集的光射出，并在离开透镜时被校准。样品腔室放在操作台内部，其中棱镜将射出透镜的光以 90 度角度（即水平）再次引导。

操作台也含有透镜，用于再聚焦在光纤入口处的光。光纤从操作台通向位于显微镜外部的检测器。使用的检测器是单光子模件检测系统。对于被检测的每个光子，输出信号是 TTL 信号（0-5V 方波信号）。

检测器的输出连接到计算机插件，计算机插件计算接收到的 TTL 信号（光子）的数量。计算机插件还接收来自显微镜的几个信号：图像获取的开始；新帧的开始；新行的开始。采用特殊设计的适当软件，根据收集数据实时重构图像。

图 6 表示具有组装一起的不同部件 a-E 的样品腔室。单个部件在图 7A-E 中有详细介绍。

装配用于荧光实验的结构

图 7（S-E）表示用于荧光实验的组件的第一实施例。

部件 A 在一侧含有直径为几毫米的孔，它在桌子上颠倒放置。部件 B 放在内部以小心对准部件 A 和 B 的螺孔。两个 O 形环插在部件 B 中。隔膜被适当放置。隔膜安装在厚度为 0.1mm 的塑料支架上。塑料支架的直径必须在使用的 O 形环的两个直径之间选择。预先在塑料支架的中间形成直径为 3mm 的孔，这是没有隔膜的区域。TEM 栅板在其中部粘接在隔膜一侧（外部侧）上。然后插入部件 C。水平导管与部件 A 的侧孔对准是很重要的。插入 6 个螺钉。隔膜、

部件 A、B 和 C 用螺钉固定在一起。然后准备用水或任何其它水介质填充样品。液体介质在部件 C 的中间的自由空间内部沉积（它仍然倒置）。通过在部件 A 和 C 的侧面上形成的孔插入细针（直径为 0.1mm）。针插入内部更深的位置，直到它的末端到达湿腔室。针的另一末端位于外部。最后的 O 形环放在部件 C 中的正确位置上。

（在这个阶段，O 形环不能完全就位，因为针在那里，正好位于其下。这是很正常的，并对于下列步骤有用）。将部件 D（在中部包括透镜以校准光---未示出）放在组件中。透镜的内侧由填充腔室的介质弄湿。最后插入部件 E。当在组件中翻转部件 E 时，部件 D（具有透镜）逐渐压在（部件 C 的）O 形环上。由于 O 形环因针而没有完全就位，因此它还不会使腔室与外部分离。当拧紧部件 E 时，湿腔室的体积减小，因此过量介质可以在靠近针的 O 形环下面流出。通常，从部件 C 中的导管流出某些液滴。当充分压紧 O 形环并且透镜正确定位时，针被缓慢拉出。在组件的这个阶段，部件 B 中的 O 形环可以自由占据所有空间。它进入其正常位置，在此位置它密封腔室。这样，最后在该阶段完全密封腔室。然后将这个组件（部件 A-E）转到其正常位置（上端朝上）并插入为它特别设计的显微镜操作台中。

图 8 表示适于与组件一起使用的显微镜操作台。操作台（2）的顶腔是其中插入样品腔室的凹槽。在其下面的是棱镜。棱镜（1）用于使光沿孔的方向改变方向。在这个孔中，透镜（未示出）在光纤的入口处使光聚焦。

为了获得更高的光收集效率，设计了一种可替换的结构，其中在生物样品和光导之间建立直接耦合。这个可替换的结构示于图 9 中。它包含真空气密室，光从样品区直接射向上述单一光子检测器结构。在该图中，采用螺钉（6，7）将外壳（1）固定到支架（2）和盖子（3）上，内部设置腔盘（4），并具有隔膜，进一步连接到光

导(5)，用O形环(8)密封。

标记技术

本发明适于在细胞的细胞内或细胞外部分中对细胞成分成像。

可考虑不同的方案给细胞的细胞内部分做标记：

如果细胞可在固定后使用，则常用方法包括细胞薄膜的渗透或提取。

适于活性细胞的另一方案是，通过胞饮（pinocytotic）反应插入标记。然后可以在它是活性的同时固定细胞或观察细胞。如果是在适当的条件下进行的，胞饮反应保持了细胞的成活力。它允许插入分子（在本领域公知的大多数应用中为荧光标记）或纳米尺度颗粒（如特别适合于本申请的）。一些研究人员已经报告了成功地在细胞内引入微米尺度的小珠。

渗透和提取程序适合于固定细胞。可采用几个程序，这取决于操作者是否想完全除去细胞薄膜或者只产生一些孔。

提取和固定意味着首先完全除去细胞的外部薄膜。然后，立刻固定细胞。这种程序有利于呈现细胞质、细胞核或细胞骨架中的结构。

固定和渗透意味着首先固定细胞，然后将使细胞薄膜成为可渗透的。

胞饮反应适于活性细胞。例如，可采用试剂（如市场上可买到的 Influx（注入剂））（分子探针 1-14402）以便将颗粒引入细胞内。注入细胞承载技术基于胞饮泡的渗透溶解。简言之，要装载的化合物以高浓度与高渗媒质混合，允许通过胞饮泡（vesicle）将该材料传入细胞内。然后这些细胞被传送到低渗介质，这导致从细胞内的胞饮泡释放捕获的材料，用化合物填充细胞溶质。

遵照“分子探针”提供的协议，我们将“胶体金”、几百纳米尺寸的金颗粒、微米尺寸的荧光小珠和量子点引入到细胞内。细胞可

固定并且在观察之前增强金或银。当采用这种方法时，一定比例的细胞死亡。在进行的多数实验中，损失不超过 10-20%的细胞。

可用对细胞具有低损伤的金颗粒对活性细胞的细胞表面做标记。有一种为与本发明结合使用而研制的示意协议，它利用抗生蛋白链菌素标记方法，如在本领域中公知的。这个想法是用维生素 H 培育细胞，维生素 H 将粘附到细胞表面上的一定百分比的蛋白质上。然后，用链接到金颗粒的抗生蛋白链菌素培育细胞，其中金颗粒将粘附到维生素 H 上。必须小心控制用于培育的维生素 H 的剂量，因为薄膜蛋白质上的太多的维生素 H 可能扰乱它们的活性并导致细胞死亡。不同的研究已经表明维生素 H 可用于细胞跟踪应用。几项研究涉及红血细胞（例如 Hoffmann-Fazer 等人的，血液学年报，74，231-238, 1997; Ault, K.A. 和 Knowles, Exp 血液学, 23,996-1001,1995, 在这里供参考）。维生素 H 给很多细胞做标记并使它们的生物性能有很少或没有改变，并在需要时允许检测它们和恢复它们。

微型柱。将使生产率增加的另一项研究是与利用微型柱的并行检测。微型柱是由集成硅工艺制造的微型扫描电子显微镜。由于它们的尺寸，微型柱可以并行操作；大大减少了基于 SEM 的系统的扫描时间和庞大体积。微型柱的进一步详细说明在 Feinerman 和 Crewe 的“微电子光学”，成像和电子物理学的进展，第 102 卷,187(1998) 以及美国专利 US5122663 中有介绍,这里引证这些文献的全部内容供参考。这种在生物应用中利用基于微型柱的电子显微镜的想法在名称为“识别和量化生物分子的方法及其装置”的共同未审 PCT 申请（PCT/IL01/00764）中有介绍。

以下提供本发明的原理的例子，只用于说明性的目的的而非限制性的。

例子

在隔膜上生长细胞

下面是作为非限制例子给出的在隔膜上生长细胞的示意程序。首先用纤维连接蛋白（0.1mg/ml）涂敷聚酰亚胺分隔隔膜 15 分钟。用 PBS 和培养基清洗之后，用常用方法，以在每腔室 12-15 μ l 中 800-1500 个细胞的浓度涂覆细胞。24 小时之后，细胞准备操作/做标记。大多数细胞类型可在分隔隔膜本身上生长而不用附加基体（如纤维连接蛋白）的支持，但是在这种条件下，在大范围清洗程序期间它们更容易被清洗掉。细胞的成活力不受这些任何工序的影响。

本发明兼容依附或非依附细胞（如下所述）。为实现非依附细胞（例如淋巴细胞）成像的目的，首先在悬浮液中给细胞做标记，然后在 30 分钟内允许粘接到分隔隔膜上，该隔膜用 0.4%聚赖氨酸预处理 1-3 小时。

最小化辐射损伤

目前我们已经举例说明了只在短时间尺度（秒）上的未受干扰处理的成像动力。必须考虑的一种辐射损伤是由自由基产生的损伤，该自由基是由电子束撞击水分子形成的。

防止这种损伤的一个可能策略是使细胞介质中包括可吸收由辐射产生的自由基的添加剂，由此使对细胞的辐射损伤最小化。适于清除基团的任何已知化合物都可使用，只要它对细胞是无毒的即可。用于这种添加剂的一个例子是蔗糖，它已经被看作是自由基吸收剂。这个方案只可以用于本发明，因为常规电子束技术在湿环境下不能工作。

通过免疫标记给细胞做标记

给细胞做标记是通过规则免疫标记程序进行的。清洗细胞，并任选地通过 2%仲甲醛固定 7 分钟。用适当的血清封闭之后，用特殊单或多克隆抗体培育细胞一小时。清洗之后，用区别于第一特殊抗体的第二抗体培育样品。这个第二抗体链接到一个 5, 10, 20 或 40nm 金群上。然后采用为每种胶体小心校准的条件，通过银增强剂可进

一步放大金标记。

在分隔隔膜下固定的湿细胞

生长因子感受器被标记在固定的 A431 细胞和 C2C12 鼠成肌细胞上。

用 2%的仲甲醛固定细胞，并用抗 FGF 受体单克隆抗体（在 C2C12 成肌细胞上）或抗 EGF 单克隆抗体（A431 细胞）做标记，然后通过抗鼠 IgG 连接到 20nm 直径的金胶体上。细胞被固定，采用银增强剂增加标记颗粒的尺寸。XL30 ESEM 用于成像，并且用反向散射电子（BSE）模式检查细胞。FGF 感受器金标记可作为亮点在图 10A 所示的细胞上看到。EGF 感受器在图 10B-D 的 A431 细胞上是可见的。细胞核区域周围的标记模糊不清是金颗粒之间的结构差别造成的。靠近隔膜的金标记是清楚的和清晰的，而细胞核周围和以外的更远端的标记是模糊不清的。在细胞核区域中的标记模糊不清证明了这个区域中的标记远离分隔隔膜。这个模糊不清实际上提供了用于确定标记距离隔膜的平面的距离的工具，因而提供了三维信息。采用能使附加媒质在隔膜和标记之间的效果去卷积的图像分析算法，可提供这个距离的精确评估。

为实现在细胞远侧（与固定到隔膜底层的一侧相对）上的标记的更高分辨率的图像，可采用其它腔室设计。在这种设计中，细胞生长在只有覆盖它们的薄层液体的平台上。然后，将分隔隔膜放在覆盖细胞的平台的顶部。通过这种方式，使细胞的顶侧成像，并且细胞仍然处于湿环境中。

在隔膜下的活性未做标记的粘附细胞

活性 C2C12 鼠成肌细胞。细胞被涂覆在它们正常的培养基中的纤维连接蛋白上。24 小时之后，用 BSE 模式检测细胞。活性 C2C12 细胞（图 11A-D）和 CHO 细胞（图 12）清楚示出了细胞的轮廓线和它的细胞核以及某些子细胞核的细胞器官。

在 Jurkat (T 淋巴细胞系) 人体淋巴细胞上标记的 IL-2 受体 α

用抗人体 IL-2 受体单克隆抗体给细胞作标记, 然后将抗鼠 IgG 连接到直径为 20nm 金胶体上。允许细胞粘接到聚赖氨酸预涂覆隔膜上 30 分钟, 然后用 BSE 模式检测。图 13 表示进出的聚焦金标记, 其由在前述固定 C2C12 的 FGF 受体标记中看到的金颗粒 (图 10A) 与 A431 细胞的 EGF 受体标记 (图 10B-D) 之间的结构差别得到。

用这个阴极发光 (CL) 结构得到的图像。

即使信号很弱 (可能由于低光收集效率造成的), 可清楚观察细胞。即使没有 CL 标记也可以观察细胞 (即细胞的某些部分是自动发光的)。利用 CL 标记和改进的收集效率, 可得到更高的分辨率。

固定细胞 NIH3T3 的阴极发光图像。没有发光标记插入细胞。因此, 发射的光是从细胞的“自然”阴极发光得到的, 如图 14A-C 所示。细胞宽度约为 20 微米。

基于维生素 H 在 NIH3T3 细胞上标记:

材料:

硫代-NHS-LC-维生素 H (西格玛 B1022) (在 DMSO 中溶解 10mg/ml 并保持在 4°C)。

链霉抗生物素, 链接直径为 10nm-40nm 的金颗粒。

磷酸缓冲生理盐水 (PBS), 在 37°C 下预热。

用于细胞系的培养基 (在培育温度下为细胞系预热)。

预热的无血清培养基。

制备溶液:

溶液 A: 硫代-NHS-LC-维生素 H 以 0.5mg/ml 在预热的 PBS。溶液必须在使用之前制备, 因为在水中会发生退化。

溶液 B: 链霉抗生物素金 (1/10 到 1/100), 溶解在 PBS+无血清培养基 (1-5 体积比) 中。

溶液 C: 全培养基-PBS 溶液 (1-5 体积比)。

程序：

- 1、细胞的胰酶消化。
- 2、以 1250t/分钟进行离心作用 4 分钟。
- 3、除去上层清液和在 10ml 新鲜培养基中再悬浮。
- 4、取 3ml 分入两个 1.5ml 微量离心管。
- 5、进行离心作用 1600t/分钟达 3 分钟。
- 6、尽可能多地除去上层清液。
- 7、在 37 度轻轻地加入 PBS 以在管中获得 1.5ml (清洗)。再悬浮细胞。
- 8、再次进行离心作用 3 分钟。
- 9、除去 PBS 和加入维生素 H (溶液 A)。再悬浮细胞和轻轻地并很好地混合。
- 10、在 37 度下培育 20 分钟 (每 3 分钟摇动一次)。
- 11、进行离心作用
- 12、除去上层清液并在 1.5ml 的新鲜培养基中再悬浮
- 13、传送到陪替氏培养皿或隔膜并在晚上培育几小时。
- 14、用 PBS 清洗 1 到 2 次。
- 15、用溶液 B 培养 1 小时，如果可能的话有时可以混合。
- 16、用 PBS 清洗 1—2 次。
- 17、除去 PBS 并用溶液 C 代替。
- 18、在电子显微镜下开始观察。

活性 NIHT3 细胞。对细胞表面蛋白质进行生物素酰化，并链接到链霉抗生物素，其被固定在 40nm 的金颗粒上，如图 15 所示。

本领域普通技术人员都知道，本发明不限于前面特别示出和介绍的例子。本发明的范围包括前述各个特征的组合和子组合以及本发明的各种改变和修改，这些改变和修改是由本领域技术人员在阅读了前述说明之后可实现的，并且在现有技术中没有记载。

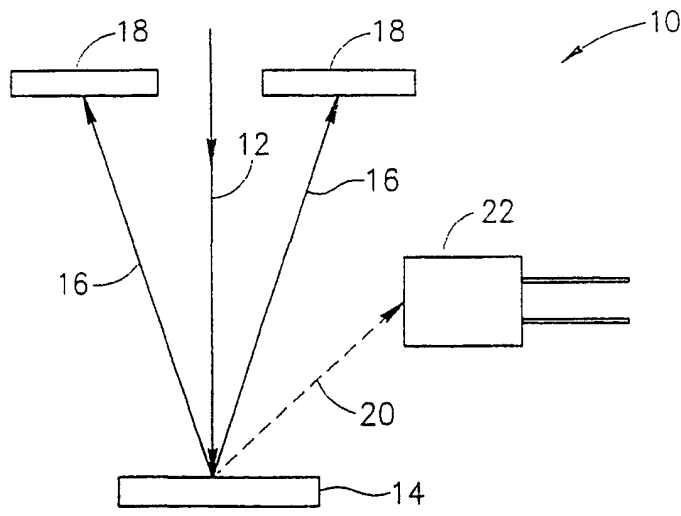


图1
现有技术

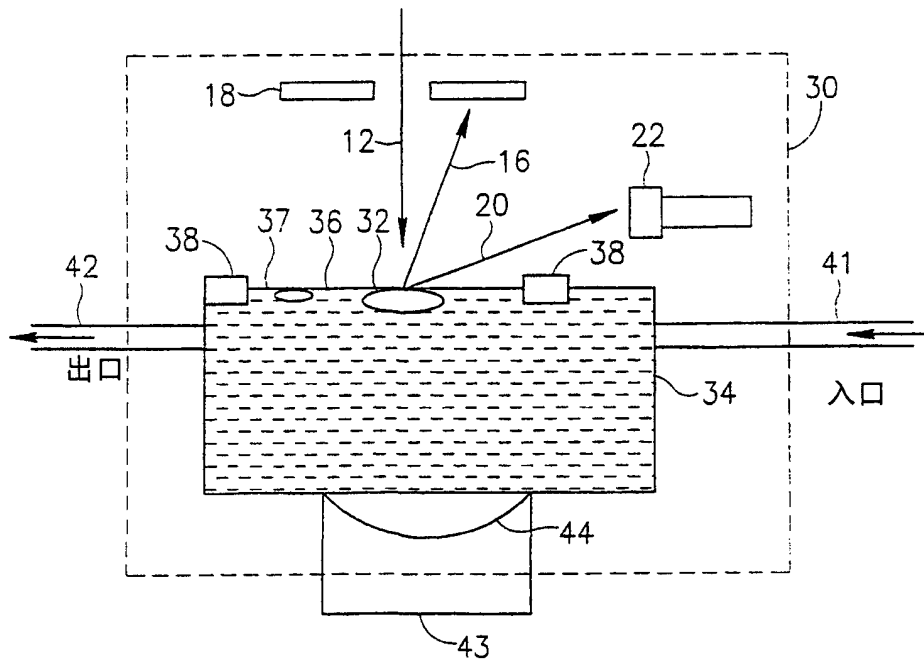


图2

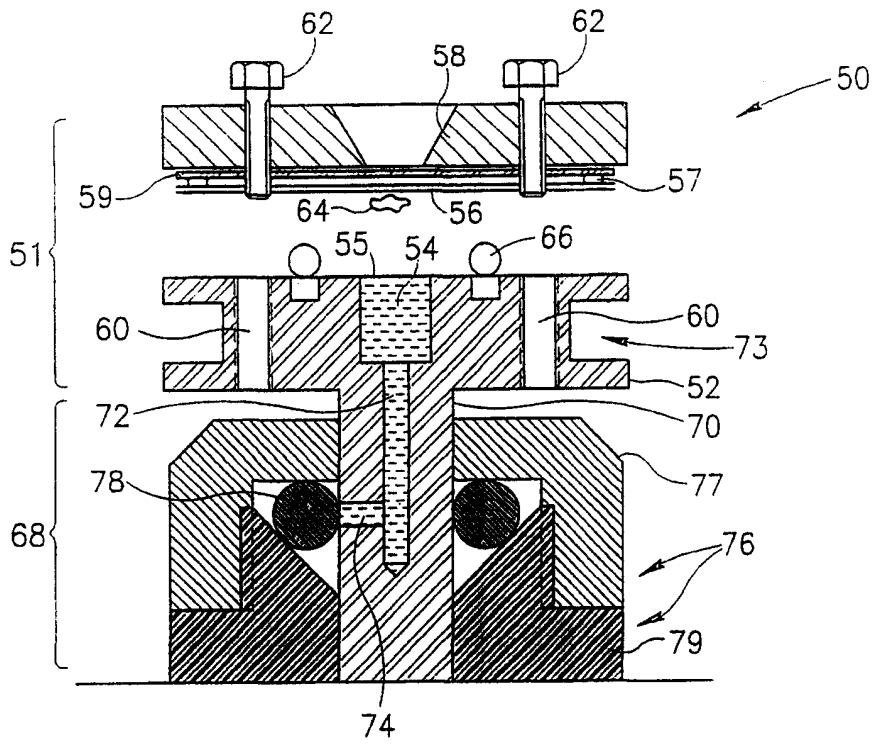


图3

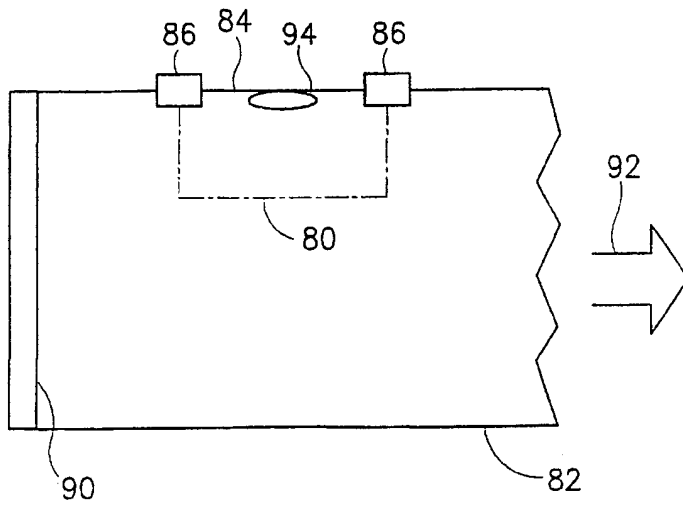


图4



图5

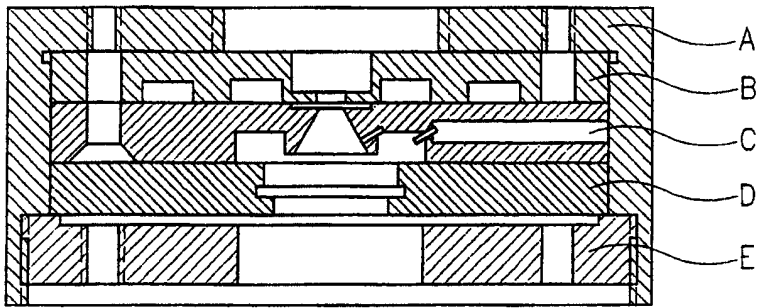


图6

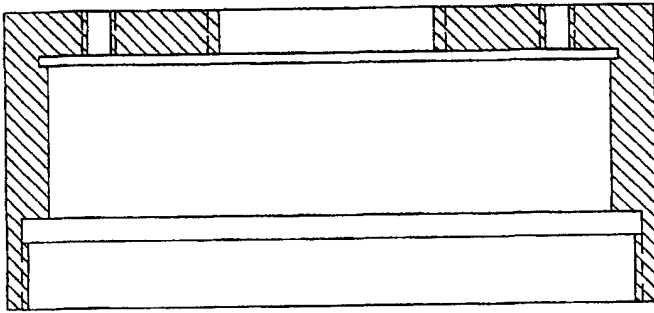


图7A

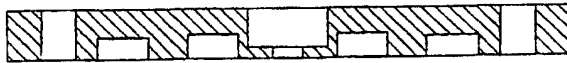


图7B

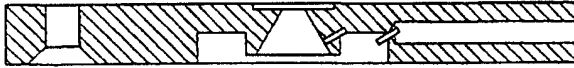


图7C/1

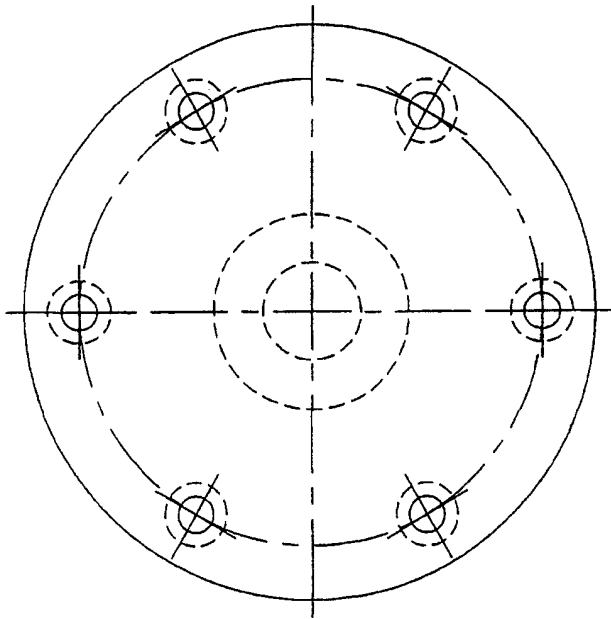


图7C/2

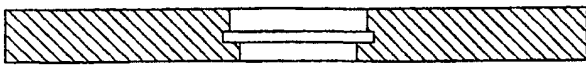


图7D



图7E/1

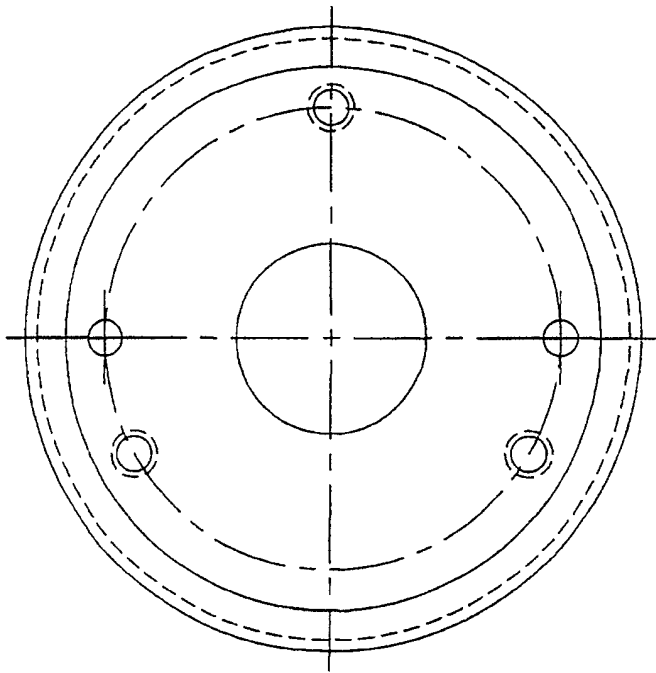


图7E/2

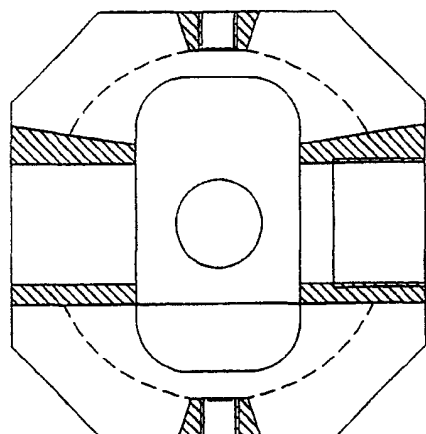


图8A

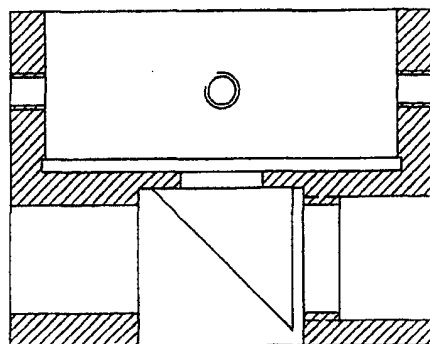


图8B

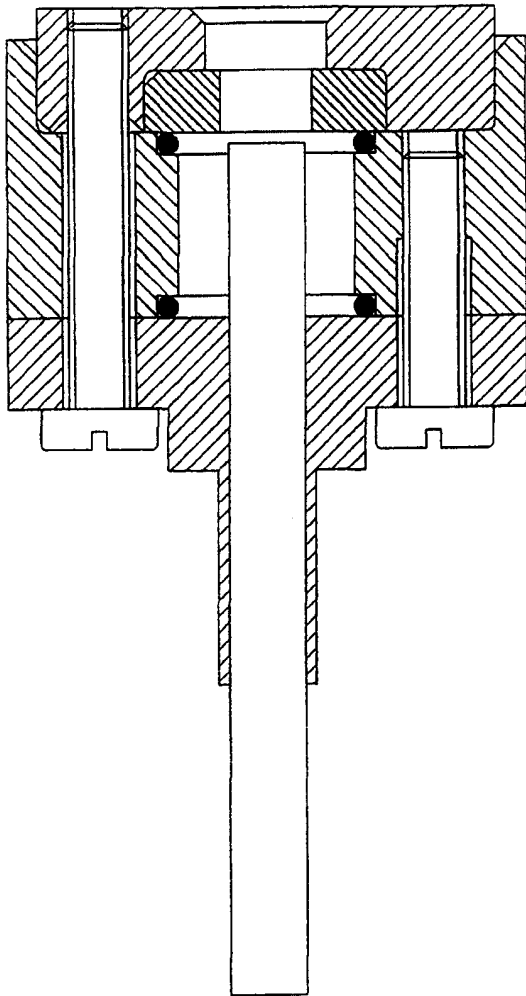


图9

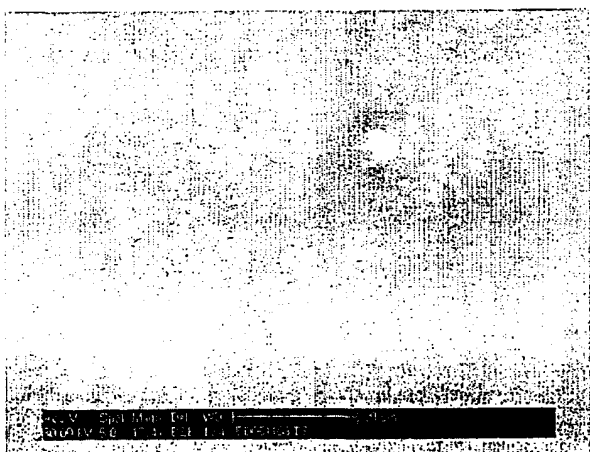


图10A

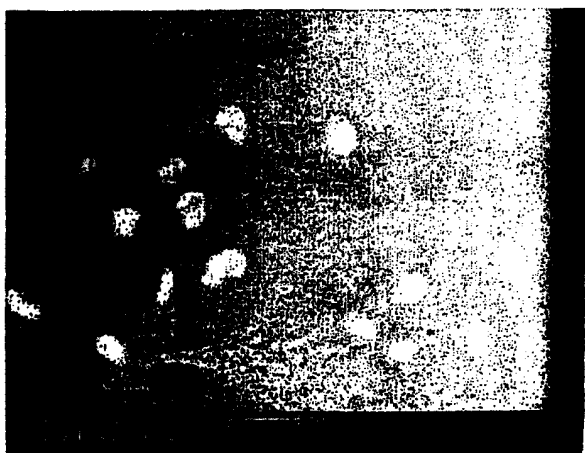


图10B

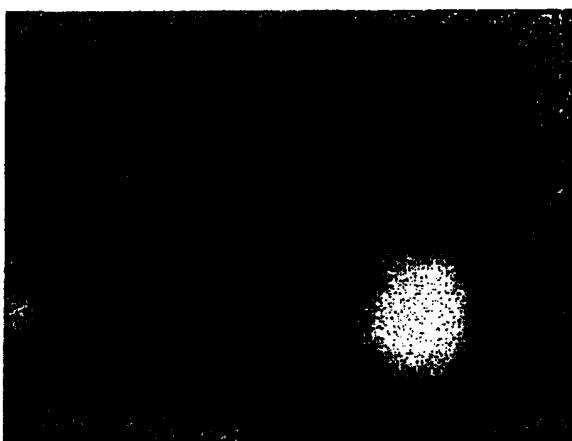


图10C

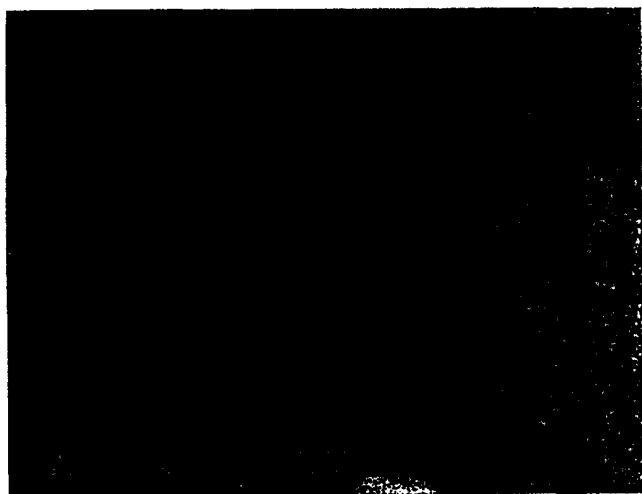


图10D

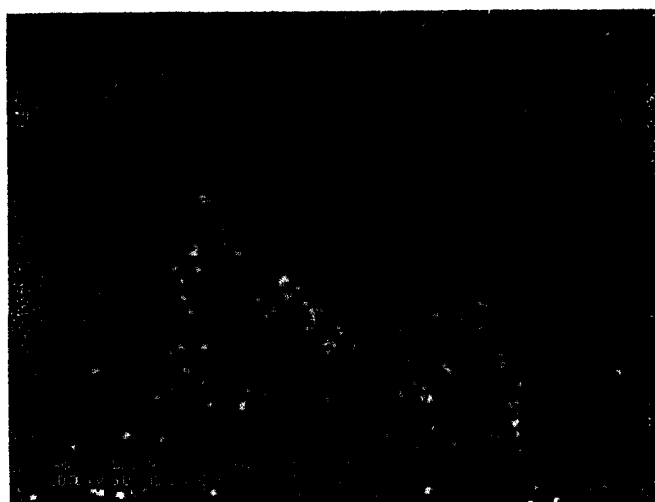


图10E

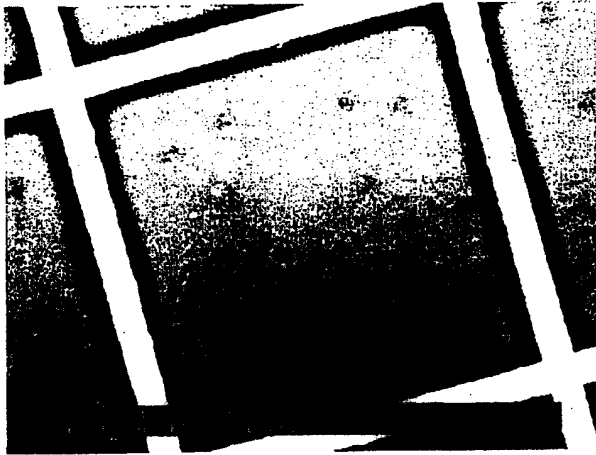


图11A



图11B



图11C

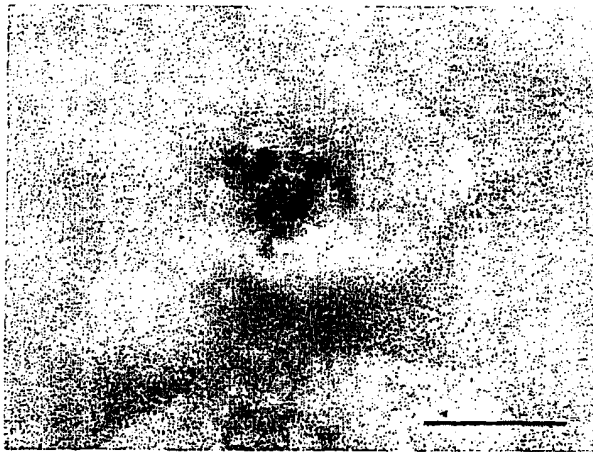


图11D

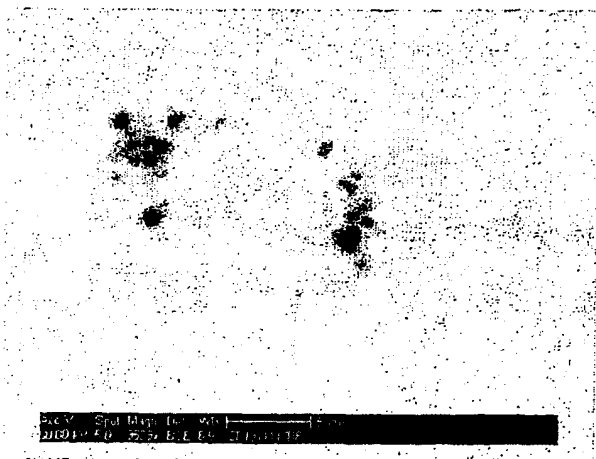


图12

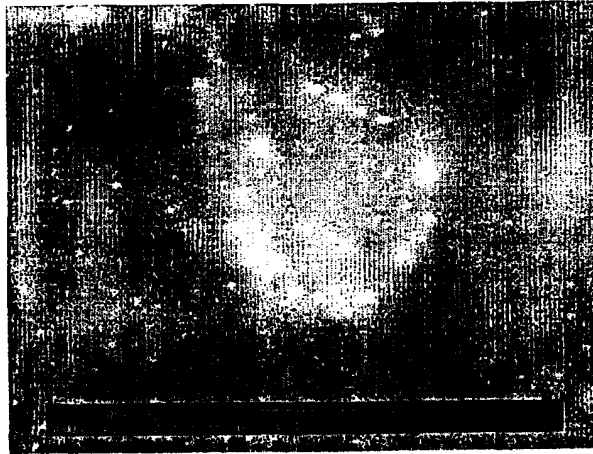


图13

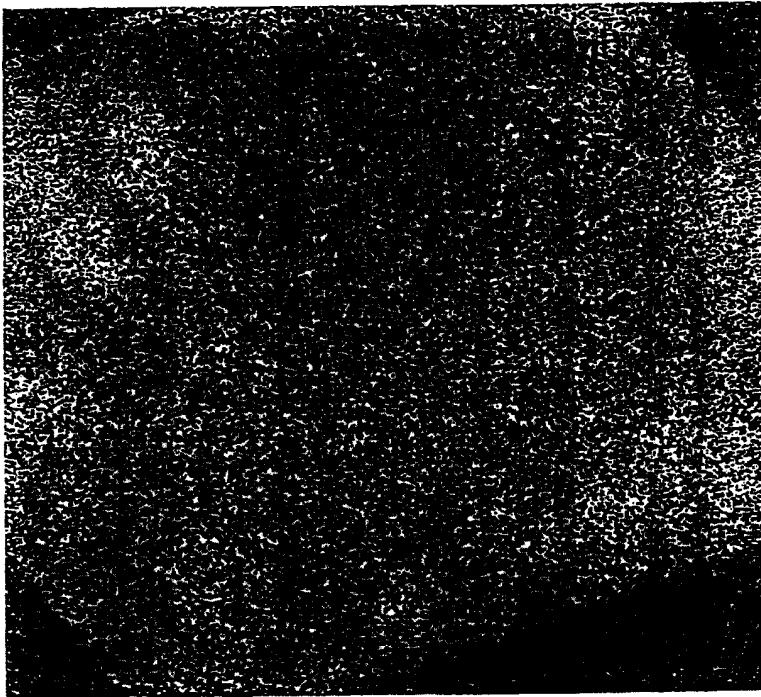


图14



图14B

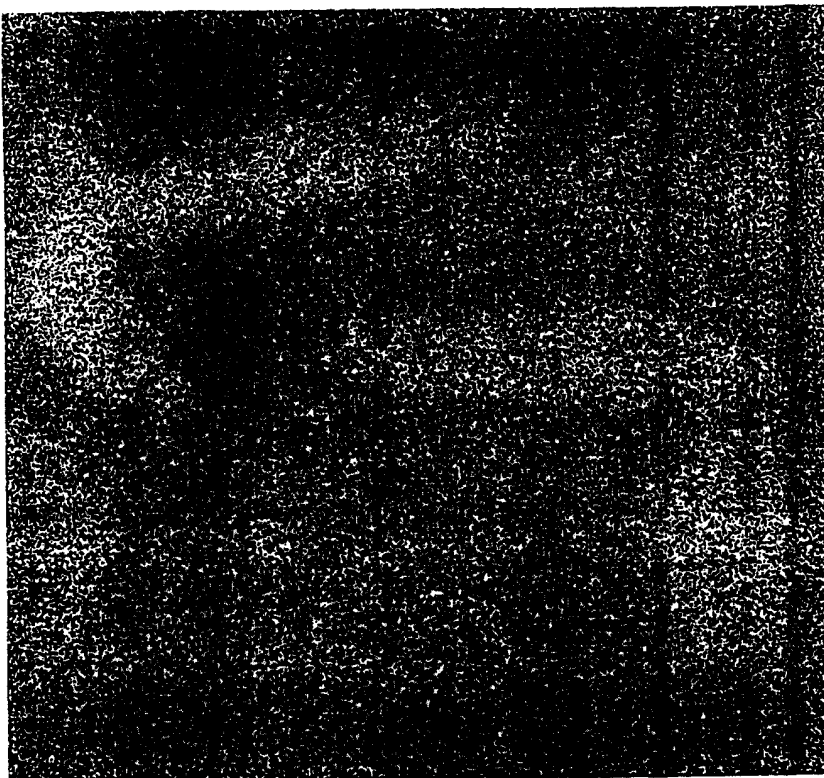


图14C



图15