

空錐照射暗場像於生物樣品之應用

Hollow Cone Dark Field Imaging for Biological Material

蔡俊穎、張淵智、陳福榮

Chun-Ying Tsai, Yuan-Chih Chang, Fu-Rong Chen

近年來高分辨電子顯微鏡生物影像仍受限於電子束輻射損傷以及低對比的限制。雖然在低頻率空間的相位可以利用高離焦值來增加生物樣品的對比，但卻會降低其影像解析度。近期相位版的發展可以在較低的離焦值下增強生物樣品的對比，但其電荷累積所造成的影像失真仍然為一個難以解決的議題。因此我們提出以收集生物樣品之熱漫散射電子的「空錐照射暗場像」來增強生物樣品在電子顯微鏡中的對比。在本文中我們展示以負染色法、冷凍電子顯微術、臨場濕式電子顯微術來製備生物樣品，並藉由空錐照射暗場像來拍攝，其對比較傳統明場像約增強五倍。

Recently the high resolution biological imaging in electron microscopy still be limited due to the radiation damage and low contrast. Phase plates have been developed to enhance the contrast at small defocus but electrical charging remains a problem. Although the phase contrast at low spatial frequencies can be enhanced by using a large defocus but this strongly reduces the resolution. Hence we propose a new route to enhance the contrast at small defocus by hollow cone dark field imaging technique using thermal diffuse scattered electrons in electron microscopy. We demonstrate the hollow cone dark field imaging technique in three biological sample preparation methods (negative staining method, Cryo-electron microscopy method and in situ liquid electron microscopy method) gives about 5 times contrast increase as compared to bright field imaging.

一、前言

四百多年前，光學顯微鏡的發明對於近代科學研究有了重大的影響，其發明的原動力來自於人們想要更進一步的瞭解肉眼所無法觀測到的微小物體。在十七世紀，英國人虎克 (Robert Hooke) 利用光當作光源，自行發明的複合式顯微鏡觀察軟木塞細胞，開啟了顯微學蓬勃發展的大門。一直到十九世紀，顯微鏡的發展已有了長足的進步，並奠定了

現今顯微鏡的基本規格。時至今日，隨著製程技術的進步，科學研究尺度已經由微米時代進入到奈米時代，由於光學顯微鏡受限於光源，其解析度最佳只能達到約 0.3 微米。因此，如何觀察到奈米等級的樣品則是一大挑戰。

1930 年代初期，Ernst Ruska 利用電子束繞射及聚焦成像原理，開發出世界上第一台穿透式電子顯微鏡，成功的突破了傳統光學顯微鏡的極限，成為材料領域與生物領域研究的新寵兒。近年來，更

由於球面像差校正器的發展，穿透式電子顯微鏡應用於材料類樣品最佳可達到 50 pm 的解析度。但對於主要由碳氫氧等較低原子序原子所組成的生物樣品而言，置於穿透式電子顯微鏡下觀察時，低原子序的原子對於入射電子的散射能力較弱，故對比相較於材料類樣品來得低。目前穿透式電子顯微鏡在觀察生物樣品上，主要有三種方法：負染色法 (negative staining)、冷凍電子顯微術 (cryo electron microscopy)，和最近十年開始蓬勃發展的臨場濕式電子顯微術 (*in situ* liquid electron microscopy)。負染色法主要是藉由醋酸鈾鹽 (uranyl acetate) 或四氧化錳 (OsO_4) 等重金屬染劑來提升對比，但會破壞原有的細微結構。冷凍電子顯微術是藉由將生物樣品快速冷卻至低溫使得水來不及結晶化而形成非晶質無序冰層，在觀察上更接近其原始狀態。臨場濕式電子顯微術是藉由微積電製程技術製作出可以隔絕顯微鏡真空以及濕式樣品的臨場濕式晶片，以氮化矽薄膜做為觀察之窗口，此一技術可以觀察到生物樣品最原始的狀態。

穿透式電子顯微鏡中，影像強度來源主要來自於相位對比 (phase contrast) 和振幅對比 (amplitude contrast)。相位對比為電子束通過樣品時相位改變量；而振幅對比是來自於厚度差異或是原子序差異所產生的對比，又稱為厚度/原子序對比 (thickness/Z-contrast)。一般而言，由於電子束穿透低原子序生物樣品時幾乎不產生散射，因此導致相位對比低而不易觀察。一般為了提升影像上的對比會使用調整物鏡的方式，使離焦 (defocus) 變大改變透鏡轉移函數進而提升相位對比，但此方法會使得高頻的訊號流失，解析度下降。於是電子顯微鏡學家向光學顯微鏡借鏡，發展出 Zernike 相位板來提升生物樣品之對比。1935年，荷蘭科學家 Frits Zernike 在研究繞射光柵時，意外發現將由氫氟酸在玻璃表面蝕刻出一道寬約釐米等級的溝槽，深度均為半個波長，而不影響其透光性質之 Phase Strip 置於光學顯微鏡的後聚焦平面上，可得到相位對比的影像。此項發現對於光學顯微鏡影像的品質有很大程度的突破，利用這項技術，不需染色就可以直接觀察到活體細胞，也因為這項成就，Zernike 獲得了諾貝爾獎的殊榮。在穿透式電子顯微鏡中，藉由 Zernike

相位板的應用，將相位板置於後聚焦面上改變透光與繞射光之間的相位，使相位差達到 $\pi/2$ ，對比轉移函數 (contrast transfer function, CTF) 則從正弦函數轉變為餘弦函數，使得低頻區域的對比得以提升。近年來應用於穿透式電子顯微鏡的相位板主要可以分為兩種形式：碳膜式相位板以及靜電式相位板⁽¹⁾。此兩種相位板伴隨著使用時間的增加，相位板的污染也會漸趨嚴重，污染對於相位改變的影響難以估計且會造成電荷累積 (charging)，即使以加熱的方式來清除污染物，也僅僅是短暫的延長其使用壽命。近年來，一系列的文獻指出，穿透式電子顯微鏡暗場像 (dark field) 能夠增強生物樣品的對比⁽²⁻⁵⁾。在眾多暗場像技術中，其中又以藉由收集穿透電子束和生物樣品作用後之熱漫散射 (thermal diffuse scattering, TDS) 電子來成像之「空錐照射暗場像」不需要額外改裝顯微鏡硬體設備，且能夠自由調整收集角度以收集到最完整之暗場像，因此最為廣泛應用在穿透式電子顯微鏡中。

早在 1970 年代，由於電子顯微鏡的發展仍受到硬體的限制，解析度無法成功的提升至原子解析度，因此 Heineman 和 Poppa 提出以空錐照射 (hollow cone illumination) 技術來提升解析度，並且成功的取得金顆粒之 1.44 埃晶格條紋影像，這是電子顯微鏡史上，第一次達到原子解析度。Hanssen 和 Trepte 更進一步指出在同樣實驗條件下，空錐照射明場像之高頻對比轉移函數為一般明場像兩倍，使得空錐照射明場像在 1970 年代蓬勃發展，但由於空錐照射明場像的色像差 (chromatic aberration)，以及隨著穿透式電子顯微鏡硬體的發展，達到原子解析度已不是難事，因此空錐照射明場像已漸漸式微。此外，空錐照射技術另一應用為空錐照射暗場像 (hollow cone dark field, HCDF)，此技術是在電子顯微鏡的後聚焦平面放置一物鏡光圈，擋住穿透電子束，則可形成空錐照射暗場像。

在現今電子顯微鏡的技術中，一般高分辨影像及明場像對材料內部之成份的訊息非常不敏感。對成份敏感之訊息在於高角度的熱漫散射電子。掃描穿透式電子顯微鏡 (STEM) 利用一個環狀偵測器收集高角度的熱漫散射電子來成像，根據所收集的角度可以分為低角度環形暗場像 (low angle annular

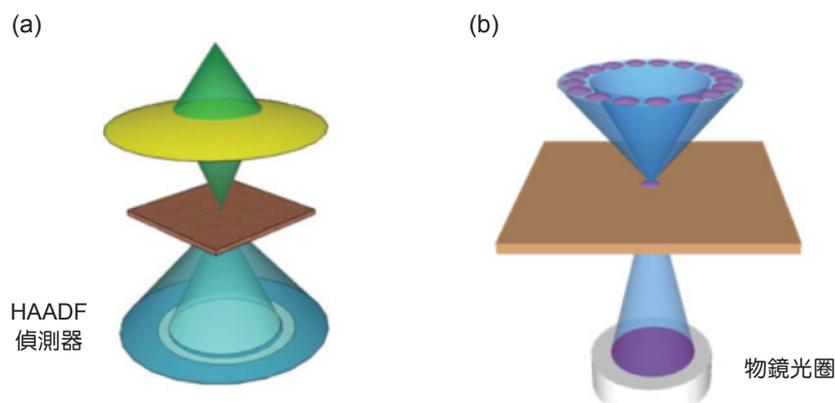


圖 1. (a) 掃描穿透式電子顯微鏡高角度環形暗場像，(b) 空錐照射暗場像示意圖。

dark field, LAADF) 和高角度環形暗場像 (high-angle annular dark field, HAADF)。其影像屬於原子序對比影像。但掃描穿透式電子顯微鏡造價較一般電子顯微鏡高而且需要極安靜的操作環境。它的解析度很高可以到 0.2 個奈米以下，但是最大的缺點是雜訊太高，造成影像解釋上的困難。自 Riecke 在 1964 年提出空錐照射暗場像的概念起，藉由光學中的倒易原理 (principle of reciprocity)，在傳統電子顯微鏡中也有辦法得到原子序對比的影像 (Z-contrast image)⁽⁶⁾。圖 1 顯示掃描穿透式電子顯微鏡與空錐照射暗場像電子光路示意圖。空錐照射暗場像是連續傾斜入射電子束，並且透過物鏡光圈擋住透射光，如此會使得高角度的熱漫散射電子都被傾斜至光軸上成像，以得到原子序對比的影像。空錐照射暗場像的優勢在於影像抗雜訊的能力比較強，儀器整體價格也不像掃描穿透式電鏡那麼昂貴，也不需要額外改裝電子顯微鏡即可成像。時至今日，空錐照射暗場像被應用於觀察 DNA、超薄切片組織、病毒顆粒等負染過後的生物樣品。在本文中我們展示藉由空錐照射暗場像技術來拍攝不同製備方式之生物樣品，且相較於傳統明場像，約可以增強四倍以上的對比。

二、實驗方法

1. 負染生物樣品製備

負染色法最初由 Brenner 和 Horne 用於病毒顆粒的觀察，其染色原理是藉由四氧化鐵、磷酸

鎢 (phosphotungstic acid, PTA) 或醋酸鈾鹽 (uranyl acetate, UA) 等高原子序的重金屬染劑來進行染色⁽⁷⁾。由於生物樣品表面帶負電，染劑通常也帶負電，因此重金屬染劑會附著在生物樣品間隙以及碳膜背景上。當電子束通過樣品時，由於重金屬染劑對電子散射能力較強，會呈現較深對比以凸顯出生物樣品樣貌，此種對背景染色，而非直接對生物樣品染色的方法稱為負染色法。負染色法的優勢在於製作樣品容易，負染過後的生物樣品不會因為高能電子束而造成輻射損傷。

在本實驗中，以醋酸鈾鹽負染的 GroEL 蛋白質做為觀察的生物樣品標的。GroEL 蛋白質分子量約在 800 kDa，目前 GroEL 的三維結構已經被解到 4 Å 左右的解析度，其三維結構是由 14 個次體所組成的兩層背靠背雙環中空圓柱結構，且樣品也非常容易取得，因此很適合拿來做負染的樣品。在常溫負染電子顯微鏡中，我們以荷蘭飛利浦公司型號為 Tecnai F20，操作電壓為 200 kV 電子顯微鏡來進行實驗。文獻顯示在空錐照射暗場像中，物鏡光圈的大小亦非常重要，太大的物鏡光圈雖然可以收集更多的熱漫散射電子，但卻會降低影像的解析度。然而太小的物鏡光圈可以大幅提稱影像的解析度，但卻會因為過少的熱漫散射電子而需要長達數十秒的曝光時間。為了平衡影像解析度以及曝光時間，最佳傾轉角度設定為 17 mrad，以直徑 40 微米的物鏡光圈來限制透射電子束形成空錐照射暗場像，因此熱漫散射電子的收集角度為 9.58–20.40 mrad 區間。

2. 冷凍生物樣品製備

由於負染色法是利用重金屬染劑鑲嵌在生物樣品間隙以及碳膜背景上，解析度最佳只能達到約 20 Å 左右，無法觀察到更細微的結構。因此自 1970 年代 Taylor 和 Glaeser 開發出冷凍電子顯微術 (cryo electron microscopy, Cryo-EM) 後，經過近四十年的發展，冷凍電子顯微術領域十分廣泛，如生物大分子結構、病毒、穿膜蛋白、蛋白質等等。近幾年來冷凍電子顯微術在研究蛋白質結構上解析度已達到約 4 Å，雖仍不及 X 光結晶學或核磁共振光譜學，但由於冷凍電子顯微術所研究的樣品可以是具有晶體結構的生物樣品，亦或是非晶體結構生物樣品，甚至是高分子結晶學領域也可適用；且對於生物樣品的分子量並沒有限制。因此大大的突破了傳統 X 光結晶學或核磁共振光譜學只能研究分子量小於 100 KDa 樣品的限制。另一方面，冷凍電子顯微術是透過將生物樣品急速冷凍的方式進行固定，降低了因化學固定、重金屬染色等對於生物樣品結構的影響，更加貼近生物樣品原始樣貌。

在本實驗中以腺病毒 (adenovirus) 作為冷凍電子顯微鏡之樣品。由荷蘭 FEI 公司所開發的 Vitrobot 自動低溫樣品製備機，將腺病毒顆粒在數個毫秒內急凍至低溫液態乙烷中，使水來不及結晶化而形成非晶質無序冰層，藉由將腺病毒包覆在非晶質無序冰層中，可以將生物樣品最原始的結構固定起來。在冷凍電子顯微鏡中，我們以荷蘭飛利浦公司型號為 Tecnai F20，操作電壓為 200 kV 電子顯微鏡來進行實驗，為了避免無序冰層的融化以及降低高能電子束的輻射損傷，冷凍電子顯微術必須在液態氮或液態氦溫度下操作，且在成像過程中必須降低電子劑量至 $30\text{e}^-/\text{Å}^2\text{s}$ 以下，以避免因電子束輻照將冷凍樣品破壞，影響影像品質。

3. 臨場濕式生物樣品製備

1995 年 JEOL 公司開發出以薄膜封裝式 (film sealed type) 的臨場濕式電子顯微鏡，其使用是在特製的樣品桿上以 O 型環夾著兩層電子穿透薄膜，形成氣密環境。在特製樣品桿上設計氣、液輸送管通入腔體中，使生物樣品能在潮濕的環境中維持常壓，但所使用的薄膜是機械應力較差的碳膜，

須在上方加裝壓力控制設備才能維持正常運作。

隨著半導體製程技術逐漸成熟，氮化矽 (Si_3N_4) 薄膜有較佳的機械強度亦不需要額外加裝壓力控制裝置，即可承受一大氣壓的壓差，逐漸取代以碳膜為主的臨場濕式電子顯微鏡。2010 年 Niels de Jonge 團隊開發出具有液體交換管路的電子顯微鏡樣品桿^{(8), (9)}。此具有液體交換管路之電子顯微鏡樣品桿利用內外徑分別為 50 微米、350 微米的 PEEK 管連接樣品區和針筒式幫浦後，以一管推送培養液進入樣品區；另一管攜帶多餘液體離開，達到連續的液體抽換與樣品輸送。一般而言，在臨場濕式電子顯微鏡中有新鮮的液體可以做代換，電子劑量可以提高到約 $50\text{e}^-/\text{Å}^2\text{s}$ 以下。但在 STEM 模式下必須將電子束匯聚成一點對樣品進行掃描，單位面積的電子劑量高，生物體易受輻射損傷，僅拍攝前一刻尚處於存活狀態，影像擷取完細胞已死亡。然而空錐照射暗場像對於此種臨場濕式電子顯微鏡的優勢在於可以控制電子劑量，對生物樣品的輻射損傷會降至最低。

我們自行設計的臨場濕式電子顯微鏡樣品桿主要分為兩個重要部份，分別為濕式腔體晶片及樣品桿設計。濕式腔體晶片利用蝕刻技術掏空矽基板，留下 50 奈米厚度氮化矽薄膜作為電子束穿透的窗口。濕式蝕刻凸角會受到角落攻擊，形成八角形，在設計上加了角落補償，能使濕式腔體晶片保留方形的形狀，以便符合液態樣品桿之組裝。另外，為了符合不同生物樣品大小，亦在晶片上鍍上金屬或是光阻作為墊高層來控制所需要的厚度與空間，在搭配日本 JEOL 公司的 2010F 200 kV 場發射電子顯微鏡，使此樣品桿不僅可以應用在細胞、細菌甚至可以應用在材料科學上。圖 2(a) 為自行設計臨場濕式電子顯微鏡樣品桿之剖面圖，紅色部分為 50 奈米氮化矽薄膜，黃色為墊高層，此外我們使用三層 O 型環來隔絕濕式腔體以及電子顯微鏡之間的真空，圖 2(b) 為空錐照射暗場像應用於臨場濕式電子顯微鏡之示意圖。

在生物樣品的選擇上以樣品本身就帶有氧化鐵之磁性細菌為觀測目標。磁性細菌細胞內含有不同形狀外觀之磁小體 (magnetosomes)。磁性細菌內的磁小體被認為是此類原核生物的生物礦化機制

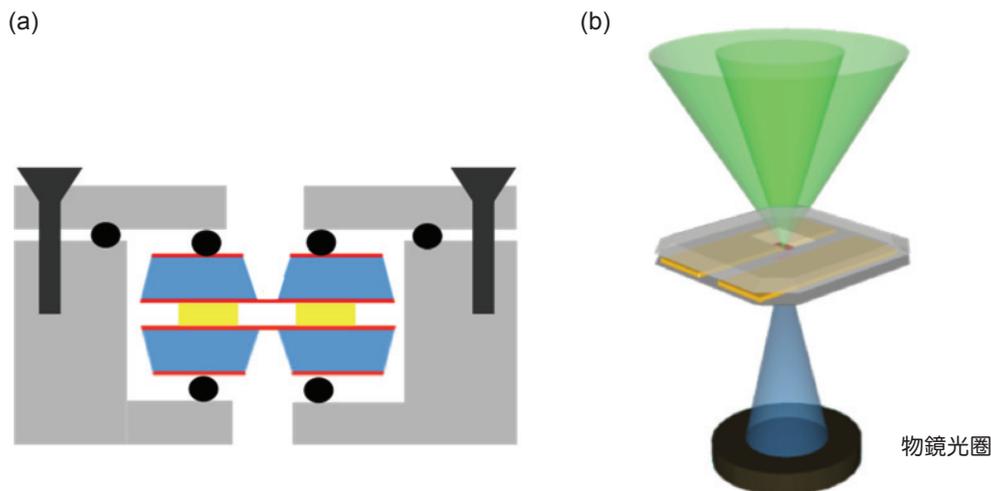


圖 2. 臨場濕式穿透式電子顯微鏡示意圖 (a) 自行設計臨場濕式樣品桿剖面示意圖，(b) 空錐照射暗場像及臨場濕式樣品區域示意圖。

模型，對未來開發研究奈米材料合成有極大的幫助。磁小體成分為大小約為 30–50 奈米的氧化鐵 (Fe_3O_4) 及硫化鐵 (Fe_3S_4)，磁小體表層有約 10 奈米之磁小體膜控制磁小體結晶成長方向、大小以及形狀。相較於人工合成氧化鐵顆粒，磁小鐵有以下優點：單一磁域、顆粒大小平均、完美晶體、永久磁性以及生物相容性高⁽¹⁰⁾。

三、結果討論

1. 熱漫散射電子

對電子顯微鏡樣品而言，樣品中的原子並非靜止不動，事實上原子會因為熱在其「平衡位置」之間來回振動，而產生熱振動亦稱為聲子。對高能電子束而言，由於電子束速度快，大部分的電子視原子在其平衡位置靜止不動，對此原子之「平衡位置」會形成彈性散射電子產生明顯的 Bragg 繞射，同時另一部分的入射電子也會出現由熱振動的無序位移所產生的漫射，稱為熱漫散射電子。熱漫散射並不會影響 Bragg 繞射的位置，但會影響 Bragg 繞射的強度。對於材料類有序晶體樣品而言，原子熱振動的位移約在 0.1 Å，但對於生物樣品而言，由於結構為無序排列，相較於有序晶體而言較為鬆散，因此原子熱振動的位移可高達 0.3 Å。

讓我們以單原子來簡化，當電子束通過一顆具

有 $V(\mathbf{r})$ 靜電位能的單原子時，此靜止原子在倒空間之散射因子可以根據 Mott-Bethe 方程式寫成：

$$V(\mathbf{g}) = \alpha \frac{(Z - f_x(\mathbf{g}))}{g^2}$$

式中， $f_x(\mathbf{g})$ 為 X 光繞射因子， Z 為該原子之原子序， α 為 2 me/h^2 。接著，我們定義 $\langle V(\mathbf{g}) \rangle$ 為此原子在平衡位置之平均靜電位能。因此，彈性散射可視為是原子的靜電位能乘上一個高斯函數，由此高斯函數來描述原子位移，亦稱為「Debye-Waller」因子。因此， $\langle V(\mathbf{g}) \rangle$ 可寫為：

$$\langle V(\mathbf{g}) \rangle = V(\mathbf{g}) \exp(-\pi^2 \sigma^2 g^2)$$

其中 σ 為原子之方均根位移量。熱漫散射為 $V(\mathbf{g})$ 和 $\langle V(\mathbf{g}) \rangle$ 之間差值，可寫為：

$$\text{TDS} = V(\mathbf{g}) - \langle V(\mathbf{g}) \rangle$$

熱漫散射在倒空間的分佈會與原子的方均根位移成反比，在電子顯微鏡所收到的影像中，熱漫散射的強度近似於 $I = C\sigma^2 Z^2$ 。由此可見，熱漫散射不僅僅和原子序有關，亦和原子的方均根位移量有關^(11, 12)。由於生物樣品中幾乎是由較輕原子序之原子所組成，也因為其原子之間鍵結較材料類樣品

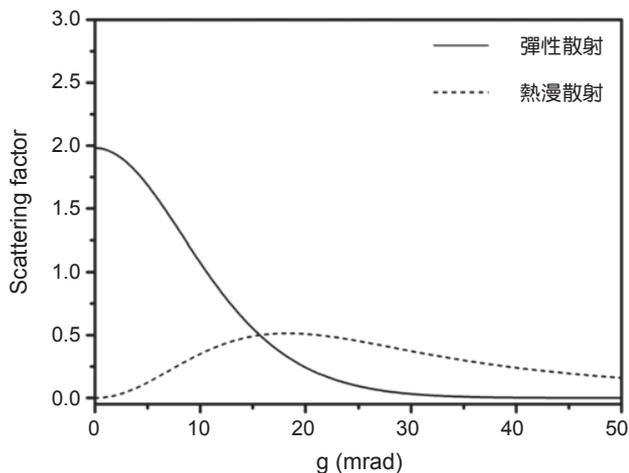


圖 3. 碳原子在 0.3 \AA 方均根位移時，彈性散射與熱漫散強度與角度射示意圖。

來的鬆散，生物樣品之方均根位移會較一般有結晶性材料類樣品高，由熱漫散射電子所成的原子序對比影像更適合應用於生物樣品的觀察。生物樣品主要是以碳原子所組成，圖 3 則為碳原子在 0.3 \AA 方均根位移所計算彈性散射因子與熱漫散射因子對倒空間向量之關係圖。由圖 3 可以得知，當角度小於 16.14 mrad 時，彈性散射強度遠遠大於熱漫散射強度。當角度大於 16.14 mrad 時，彈性散射強度將會大幅的衰減，此時影像將主要由熱漫散射所主導，因此在空錐照射暗場像中，電子束會傾轉至約 16 mrad 以取得最大的熱漫散射分佈。

2. 空錐照射暗場像應用實例

空錐照射暗場像和傳統明場像最大的差異在於：空錐照射暗場像為原子序對比；傳統明場像為相位對比。因此空錐照射暗場像在影像解釋上較傳統明場像來得簡單。其最佳離焦值和電子波長及所使用的物鏡光圈大小有關，其式如下：

$$\Delta Z = C_s \lambda^2 g^2$$

式中， C_s 為電子顯微鏡球面像差係數，FEI Tecnai F20 穿透式電子顯微鏡之球面像差係數為 2 mm 。 λ 為入射電子波長，在 200 KeV 加速電壓下，電子波長為 0.0251 \AA 。 g 為以倒空間向量表示之所選用的物鏡光圈，半徑為 20 微米 的物鏡光圈在倒空間可換算約為 0.3 \AA^{-1} 。因此空錐照射暗場像的最佳化離焦值為 -57 nm 處。

圖 4 為在半徑 20 微米 物鏡光圈下所拍攝的明場像與空錐照射暗場像，為了可以更顯著看出兩種模式下的差異，明場像灰度有經過反轉對比的處理。定性上來看，在相同的對比和亮度下，空錐照射暗場像的對比明顯高於明場像，且亦能呈現 GroEL 蛋白質細微結構，在空錐照射暗場影像中更可以明顯地分辨出 GroEL 蛋白質七軸對稱的兩層背靠背雙環中空圓柱結構。為了更進一步的定量分析空錐照射暗場像所增強的對比，可藉由以下公式

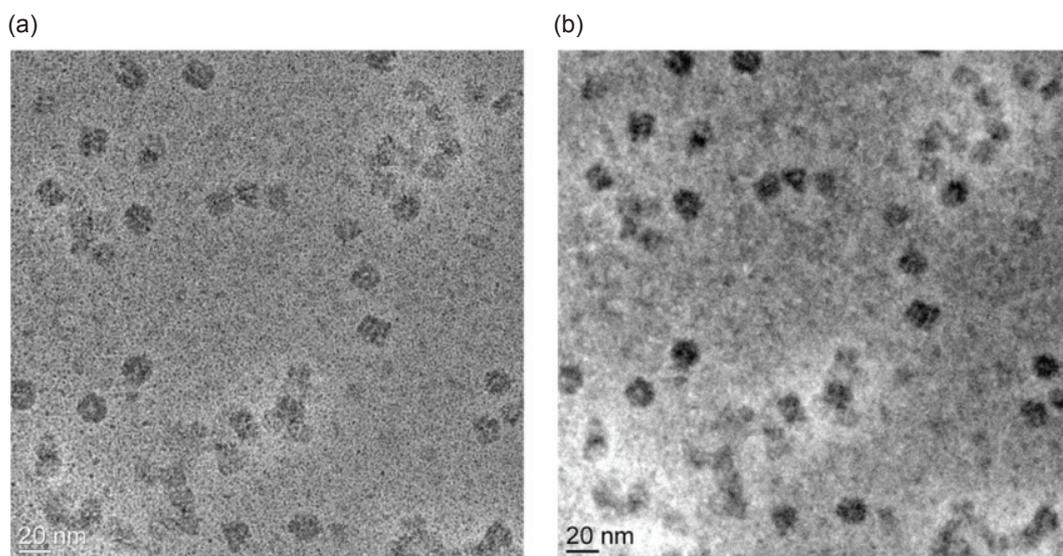


圖 4. 以負染法製備 GroEL 蛋白質 (a) 傳統明場像，(b) 空錐照射暗場像。

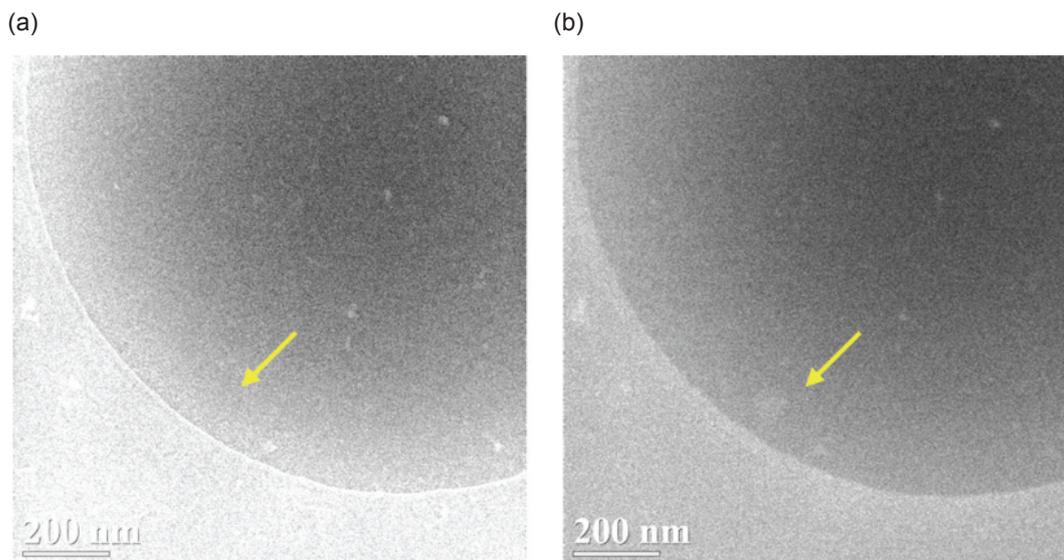


圖 5. 以冷凍電子顯微術所拍攝腺病毒樣品 (a) 傳統明場像，(b) 空錐照射暗場像。

來量化對比：

$$\text{Contrast} = \frac{\Delta I}{I_{\text{Background}}}$$

式中， ΔI 為樣品區域和背景區域強度的差異， $I_{\text{Background}}$ 為背景值之強度。因此，空錐照射暗場像所拍攝的負染生物樣品，相較於傳統的明場像，約可以提升五倍的對比。由此可見，空錐照射暗場像再觀察負染生物樣品時，較傳統明場像更有優勢。

圖 5 為腺病毒在冷凍電子顯微鏡中以傳統明場像 (圖 5(a)) 及空錐照射暗場像 (圖 5(b)) 所拍攝影像。以 $25e^{-}/\text{\AA}^2$ 的電子劑量在相同區域、相同物鏡光圈以及相同離焦值下連續取得兩張相同位置的影像。空錐照射暗場像可以明顯的定義出腺病毒顆粒的位置，如圖 5(b) 箭頭所示，但明場像卻由於離焦值太少，沒有足夠的相位對比，因此無法明顯觀察到腺病毒顆粒。在冷凍電子顯微術中，空錐照射暗場像之對比約為傳統明場像之五倍。

在臨場濕式電子顯微鏡方面，圖 6(a) 為空錐

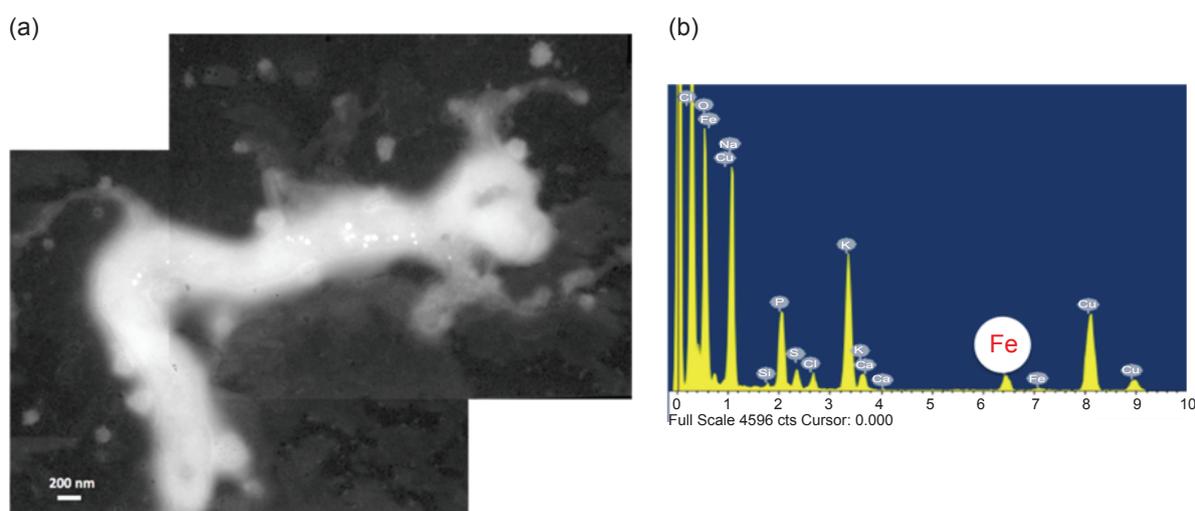


圖 6. (a) 以空錐照射暗場像拍攝乾式磁性細菌樣品，(b) EDS 分析圖。

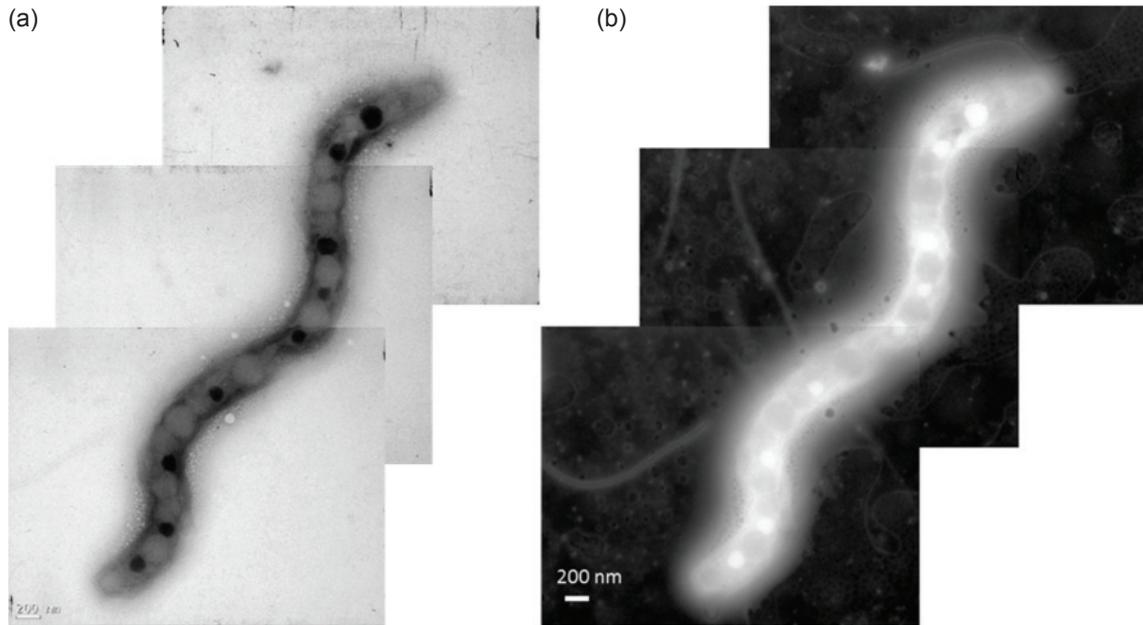


圖 7. 在同樣尺寸物鏡光圈下所拍攝乾式磁性細菌 (a) 傳統明場像，(b) 空錐照射暗場像。

照射暗場像所拍攝的乾式生物樣品，並且輔以能量色散 X 光能譜儀分析結果 (圖 6(b))，確認對比較強處為氧化鐵奈米顆粒，氧化鐵顆粒的對比遠高於由碳氫氧等低原子序的磁性細菌，因此很適合用作臨場濕式電子顯微鏡之生物樣品。圖 7 為傳統明場像 (圖 7(a)) 以及空錐照射暗場像 (圖 7(b)) 所拍攝乾式磁性細菌。細菌鞭毛寬約 30 奈米，在一般明場像對比差的情況難以觀察到；但在空錐照射暗場像中，僅藉由收集熱漫散射電子影像，可以明顯地

定義出細菌鞭毛位置以及形狀。

在臨場濕式電子顯微鏡中，以 400 奈米金屬墊高層建立磁性細菌存活空間，搭配自行開發之臨場濕式電子顯微鏡樣品桿，可以將磁性細菌培養在臨場濕式電子顯微鏡樣品桿中，流體系統可以連續提供細菌所需養分並移除細菌產生代謝物。相較於乾式環境影像，臨場濕式樣品因液體使樣品厚度增加導致影像解析度及對比下降，較難在視野下觀察到磁性細菌。磁小體在電子顯微鏡中對比高，

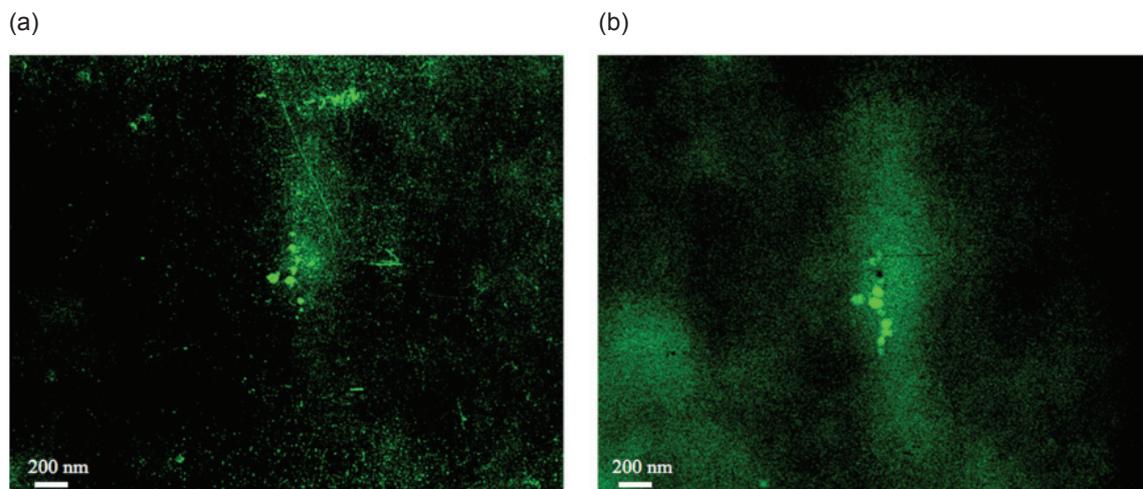


圖 8. 以假色處理之臨場濕式電子顯微鏡影像 (a) 傳統明場像，(b) 空錐照射暗場像。

可作為磁性細菌定位指標。圖 8 為以假色 (Pseudo Color) 來提高影像的判釋結果之傳統明場像 (圖 8(a)) 以及空錐照射暗場像 (圖 8(b))，電子劑量為 $50 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ ，熱漫散射電子的收集角度為 $11.8-20.48 \text{ mrad}$ 。由於液膜厚度厚，使得大部分電子都被散射，在明場像中無法觀察到明顯的細胞外形，僅可觀察到磁小體。然而由收集熱漫散射電子的空錐照射暗場像中，可以明顯的觀察到磁小體，亦可定位出磁性細菌的外形。計算在相同位置的對比時，空錐照射暗場像對比為傳統明場像之 4.32 倍。

四、結論

總括而言，藉由收集熱漫散射電子之空錐照射暗場像不僅可以控制電子劑量，並且可以增強生物樣品之對比。空錐照射暗場像並不須額外購買設備，即可應用於任一台穿透式電子顯微鏡中。空錐照射暗場像已經成功的應用於不同生物樣品製備方式 (負染色法、冷凍電子顯微術以及臨場濕式電子顯微鏡)。空錐照射暗場像更能自由控制熱漫散射電子的收集角度，亦可應用於材料科學領域，這添加空錐照射暗場像之多樣性，使其能夠被應用於更多領域。

致謝

感謝科技部 (NSC 101-2221-E-007-063-MY3 及 MOST 104-2321-B-007-004) 提供研究經費上的支持，中研院細生所低溫電顯核心實驗室的大力協助，以及本團隊劉鈺誼、蔡承廷、翁宇泓、鄭弘田、楊祖豪等對於本研究計畫皆有重要的貢獻。

參考文獻

1. K. Nagayama, *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **60**, 43 (2011).
2. J. Dubochet, M. Ducommun, M. Zollinger, and E. Kellenberger, *J. Ultrastructure Res.*, **35**, 147 (1971).
3. J. M. Cowley, *Acta Crystallogr. Sect. A*, **29**, 529 (1973).
4. F. P. Ottensmeyer and M. Pear, *J. Ultrastructure Res.*, **51**, 253 (1975).
5. G. Dupouy *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **16**, 5 (1967).
6. V. W. D. Riecke, *Z. Naturf.*, **19**, 1228 (1964).
7. S. Brenner and R. W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103 (1959).
8. E. a Ring and N. de Jonge, *Microsc. Microanal.*, **16**, 622 (2010).
9. N. de Jonge, W. C. Bigelow, and G. M. Veith, *Nano Lett.*, **10**, 1028 (2010).
10. A. C. V Araujo, F. Abreu, K. T. Silva, D. A. Bazylinski, and U. Lins, *Marine Drugs*, **13**, 389 (2015).
11. D. Van Dyck, *Ultramicroscopy*, **111**, 894 (2011).
12. C. Tsai, Y. Chang, I. Lobato, D. Van Dyck, and F. Chen, *Sci. Rep.*, **6**, 27701 (2016).



蔡俊穎先生為國立清華大學工程與系統科學系博士班學生

Chun-Ying Tsai is currently a Ph.D. candidate in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.



張淵智先生為國立雲林科技大學工程科技博士，現任中央研究院細胞與個體生物學研究所研究助技師

Yuan-Chih Chang received his Ph.D. in Engineering Science and Technology from National Yunlin University of Science and Technology, Taiwan. He is currently an assistant research scientist in the Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica.



陳福榮先生為美國紐約州立大學石溪分校材料科學博士，現任國立清華大學工程與系統科學系教授

Fu-Rong Chen received his Ph.D. in material science from Stony Brook University of New York, USA. He is currently a professor in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.