



中华人民共和国国家标准

GB/T 33834—2017

微束分析 扫描电子显微术 生物试样扫描电子显微镜分析方法

Microbeam analysis—Scanning electron microscopy—
Scanning electron microscope analysis of biological specimens

2017-05-31 发布

2018-04-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本原理	2
5 仪器设备和材料	3
6 试样	4
7 观察分析步骤	5
8 结果表述	6
9 异常情况的处理	6
10 分析结果报告	6
附录 A (资料性附录) 常用固定液的配方	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国微束分析标准化技术委员会(SAC/TC 38)提出并归口。

本标准起草单位:浙江大学、同济大学、中国人民解放军第二军医大学、复旦大学。

本标准主要起草人:洪健、陈汉民、戎念杭、祝建、杨勇骥、俞彰。

引 言

扫描电子显微镜是观察分析固态试样表面形貌和超微结构的分析仪器,要求试样干燥和表面导电。大多数生物试样(动物、植物和微生物)水分含量高、不导电,进行扫描电镜观察分析时极容易在真空环境中收缩变形,导致真实的形态结构被破坏,且不能获得良好的结构信息。因此,需采用化学或物理的手段对生物试样进行处理,才能最大限度地保持试样的原貌,供扫描电镜观察和分析。随着电子显微镜技术的发展,在扫描电镜生物试样常规化学处理方法的基础上,又发展了一些新的物理处理技术如冷冻扫描电镜技术,并在实践中得到了良好应用。为了规范扫描电镜生物试样的制备程序,正确指导生物试样的扫描电镜分析工作,有必要制定生物试样扫描电镜分析方法的国家标准。



微束分析 扫描电子显微术

生物试样扫描电子显微镜分析方法

1 范围

本标准规定了生物试样扫描电子显微镜分析的技术要求和规范。

本标准适用于各种类型的扫描电子显微镜。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 21636 微束分析 电子探针显微分析(EPMA) 术语

GB/T 23414 微束分析 扫描电子显微术 术语

3 术语和定义

GB/T 23414 和 GB/T 21636 界定的术语和定义以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

电子枪 electron gun

电子显微镜中的电子光源,由一发射体(加热钨丝、六硼化镧 LaB₆ 灯丝、冷场或热场发射尖端)与电子加速系统组成。

3.2

电子束 electron beam

由电子光学系统聚焦到试样表面的一束电子。

3.3

加速电压 accelerating voltage

为加速从电子源发射的电子而加到灯丝和阳极之间的电位差。

3.4

生物试样 biological specimens

供扫描电子显微镜分析用的具有或者曾具有生命形式的各种动物、植物和微生物样品。

3.5

二次电子 secondary electron

由于入射电子轰击试样而从试样表面发射的电子。

注:通常把能量小于 50 eV 的电子称为二次电子。

3.6

背散射电子 backscattered electron

通过背散射过程从试样的电子入射表面出射的电子。

注:通常把能量大于 50 eV 的电子称为背散射电子。

3.7

图像分辨率 image resolution

能被清楚地分开、识别的两个图像特征之间的最小间距。

3.8

图像放大倍率 image magnification

扫描电镜显示的线性尺度 L 与试样上扫描范围的相应长度 l 之比则为图像放大倍率,以 M 表示, $M=L/l$ 。

3.9

工作距离 working distance

物镜极靴下表面与试样表面之间的距离。

3.10

像散 astigmatism

一个物点发出的电子,不是像理想柱状透镜聚焦成一点,而是聚焦形成 2 条互成 90° 的分离聚焦线。

注:像散是由于极靴加工精度、极靴材料不均匀、透镜内线圈不对称及不完善的光阑形成的透镜不对称磁场产生。

3.11

荷电 charging

由于缺少足够的对地导电途径,当试样受入射电子束轰击时其表面发生电荷积累的现象。

3.12

导电镀层 conductive coating

一种覆盖到绝缘试样表面的低电阻材料(如金、铂、铬、碳等)薄镀层,以提供电子束轰击时可能在表面积累电荷的接地通道。

注:导电镀层一般厚度为 $2\text{ nm} \sim 20\text{ nm}$ 。

3.13

扫描电子显微镜 scanning electron microscope; SEM

通过电子束扫描试样表面产生放大图像的一种仪器。该仪器用细聚焦的高能电子束轰击试样表面,通过电子与试样相互作用产生二次电子、背散射电子等信息,可对试样表面或断口形貌进行观察。

3.14

冷冻扫描电子显微镜 cryo-scanning electron microscope; Cryo-SEM

样品台由液氮致冷的专用扫描电镜,以及在扫描电镜上附加液氮致冷的冷冻样品台附件,可将含水、含油试样超低温快速冷冻至固体状态下进行观察。

4 基本原理

4.1 扫描电镜的成像原理

由电子枪发射电子,经聚光镜和物镜的逐级会聚,形成具有一定能量和照明强度、束斑直径极细的入射电子束(电子探针),在扫描线圈的作用下,电子束在试样表面作光栅状扫描,通过闪烁体等检测器件接收试样中被激发出的二次电子、背散射电子等信号,把它转变成光信号,再经光电倍增管放大并转变成电信号,最后由计算机进行信号数据处理,在显示器上呈现试样表面形貌的电子图像。

4.2 冷冻扫描电镜的成像原理

冷冻扫描电镜的成像原理同常规扫描电镜,区别在于样品台是由液氮致冷,并可以调节温度,控制冰的升华,观察的是经过超低温冷冻固化的试样。

5 仪器设备和材料

5.1 扫描电镜

5.1.1 扫描电镜由电子光学系统(电子枪、电磁透镜、光阑、扫描线圈、合轴线圈、消象散器、样品室)、信号检测处理系统、真空系统、电气系统和计算机系统等组成。

5.1.2 冷冻扫描电镜除了扫描电镜所有的组件外,还包括冷冻样品台和外置的样品快速冷冻装置,主要有:液氮泥装置、真空转移装置、准备室、扫描电镜样品室内的组件、控制板、电子箱和真空泵系统、氮气和氩气装置、红外观察器等。

5.2 辅助制样设备

5.2.1 临界点干燥仪。

5.2.2 冷冻干燥仪。

5.2.3 离子溅射仪。

5.3 仪器的环境条件

5.3.1 电源电压及频率稳定($220\text{ V}\pm 22\text{ V}$, $50\text{ Hz}\pm 1\text{ Hz}$)。

5.3.2 室内相对湿度小于60%。

5.3.3 室温为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.4 场发射扫描电镜要求杂散电磁场干扰应小于 $0.1\text{ }\mu\text{T}$ 。

5.3.5 场发射扫描电镜的地基振动不超过 $5\text{ }\mu\text{m}$ (峰-峰值)。

5.3.6 具备仪器专用地线,接地电阻值参照仪器的要求。

5.4 试剂及材料

5.4.1 戊二醛(分析纯)。

5.4.2 四氧化锇(晶体)。

5.4.3 丙酮(分析纯)。

5.4.4 乙醇(分析纯)。

5.4.5 醋酸异戊酯(分析纯)。

5.4.6 叔丁醇(分析纯)。

5.4.7 液态二氧化碳。

5.4.8 导电银胶。

5.4.9 导电双面胶带。

5.4.10 冷台粘样胶水。

5.4.11 液氮。

5.4.12 氮气(高纯)。

5.4.13 氩气(高纯)。

5.4.14 离子溅射金靶。

5.4.15 离子溅射铂靶。

6 试样

6.1 生物试样的要求

6.1.1 自然状态下化学和物理性能上稳定的固体生物样品如：动物毛发、骨头、牙齿、干燥的植物种子、干标本等，在真空及在电子束轰击下不挥发、不变形、无放射性和腐蚀性，适合于扫描电镜在高、低真空条件下观察分析。

6.1.2 自然状态的生物样品如：动物组织和细胞，植物的根、茎、叶、花，真菌、细菌等微生物样品，水生生物，培养在各种固体材料上的生物细胞等，需要用化学或物理方法进行试样干燥和表面导电处理，然后进行扫描电镜观察分析。或者不经过试样干燥处理，采用冷冻扫描电镜进行观察分析。

6.2 生物试样的制备

6.2.1 扫描电镜观察生物试样表面的制备方法

6.2.1.1 取材：将生物组织切成直径不大于 10 mm，高度为 3 mm~5 mm 的小块，采用与固定液配置相同的缓冲液或生理盐水清洗试样表面，游离细胞或微小试样用缓冲液离心漂洗。

6.2.1.2 前固定：将清洗后的试样放入由 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（或其他缓冲液）（pH 6.8~7.2）配置的 2%~3% 戊二醛固定液中进行前固定，植物组织前固定期间应经过抽气以排出组织内含的气体，使固定液充分渗透进入试样，4℃ 下前固定 2 h 以上。培养细胞和游离细胞固定的时间可以缩短至 1 h。固定液的配置参见附录 A。

6.2.1.3 后固定：经戊二醛固定的生物试样用与前固定相同的缓冲液充分漂洗后，加入相同缓冲液配置的 1% 四氧化锇固定液，4℃ 下固定 1 h~2 h。

6.2.1.4 脱水和置换：用浓度分别为 50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇或丙酮进行梯度脱水，每级浓度脱水 5 min~15 min。吸弃 100% 脱水剂，转入醋酸异戊酯与脱水剂 1:1 的混合液中置换 10 min~20 min，并适当摇动，再转入纯醋酸异戊酯中充分置换。

6.2.1.5 干燥：脱水后的生物试样可选用临界点干燥法或冷冻干燥法进行干燥。

临界点干燥：脱水后的生物试样采用临界点干燥法进行干燥，临界点干燥仪采用液态二氧化碳为介质，具体步骤按照临界点干燥仪的操作说明进行。

冷冻干燥：脱水后的生物试样也可以采用冷冻干燥法进行干燥，经 100% 脱水剂脱水后，转入 75% 的叔丁醇中过渡 10 min，再置于 100% 的叔丁醇中两次，然后在冷冻干燥仪上进行冷冻干燥，具体步骤按照冷冻干燥仪的操作说明进行。

6.2.1.6 粘样：用导电双面胶带或导电银胶将试样粘接在扫描电镜样品台上，使试样观察面朝上。

6.2.1.7 表面导电处理：采用离子溅射法对干燥后的生物试样表面喷镀一层导电镀层，如金、铂或碳。场发射扫描电镜高分辨观察的试样应用铂进行表面喷镀，具体步骤按照离子溅射仪的操作说明进行。

6.2.2 扫描电镜观察生物试样断面的制备方法（乙醇割断法）

6.2.2.1 将生物组织切成 (1 mm~3 mm) × (5 mm~10 mm) 左右的长条状，按照与表面观察相同的试样制备方法进行化学固定和乙醇梯度脱水。

6.2.2.2 将试样连同 100% 乙醇包裹在空心胶囊中，封闭胶囊，不留气泡。

6.2.2.3 将此胶囊迅速投入液氮快速冷冻，用钳子夹持单面刀具插入液氮预冷，然后将刀刃对准胶囊想要割断的部位，用榔头敲击刀背割断试样。

6.2.2.4 将冷冻割断的试样迅速投入室温下的乙醇中，融化后试样与胶囊脱离，再转入醋酸异戊酯中过渡，进行临界点干燥；或者转入叔丁醇中过渡，进行冷冻干燥。

6.2.2.5 将试样的割断面朝上粘到样品台上,然后采用离子溅射法在割断面上喷镀导电镀层。

7 观察分析步骤

7.1 仪器的工作条件

调试扫描电镜使之达到规定的技术指标,保证仪器正常运行并能提供清晰、正确的图像。

7.2 扫描电镜观察分析步骤

7.2.1 开启扫描电镜,待真空度达到仪器规定的高真空指标后进行观察前的仪器检查,对中电子束,消除图像像散。

7.2.2 关闭电子枪发射后对样品室放气,按要求将试样装入样品室,重新抽真空。对于场发射扫描电镜则是切断电子束通道后进行样品室放气和安装试样,不关闭电子枪发射。对于设有换样预抽室的扫描电镜则是通过该装置进行换样操作,无需对电镜样品室放气和重新抽真空。

7.2.3 根据不同生物试样的观察要求,设置扫描电镜观察条件。高分辨观察需要短工作距离,大视野低倍率观察需要长工作距离,观察生物试样时工作距离一般选择在 10 mm 左右,高分辨率观察可选择在 3 mm~5 mm。样品台倾角根据试样情况进行调整,对于表面平坦的试样可选择 30°~45°甚至更大的倾角。对于导电性良好的试样,加速电压一般选用 15 kV~20 kV,对于导电性差容易产生荷电的试样可采用 1 kV~3 kV 甚至 1 kV 以下的低电压。

7.2.4 打开电子枪束流,选择需要的信号检测器,获得二次电子扫描图像或背散射电子扫描图像。

7.2.5 根据观察需要选择合适的放大倍率,进行图像聚焦、消像散、亮度和反差调节等操作。

7.2.6 根据不同需要选择物镜可变光阑。

7.2.7 根据不同需要选择图像扫描模式和扫描速度。

7.2.8 对感兴趣区域的生物试样形态结构进行图像记录。

7.2.9 观察结束后,依次关闭扫描电镜的灯丝电流和加速电压,关闭主机电源和稳压器,油扩散泵真空系统需要等待 15 min 后再关闭冷却循环水。场发射扫描电镜观察结束后,关闭加速电压,退出计算机系统,让仪器处于抽真空待机状态。

7.3 冷冻扫描电镜(或配置冷冻台附件的扫描电镜)的试样处理和观察分析步骤

7.3.1 试样:冷冻扫描电镜(或配置冷冻台附件的扫描电镜)观察用的含水生物试样不需经过任何处理,保持试样原貌或仅做适当的表面清洁即可。

7.3.2 准备及观察步骤如下:

- a) 开启扫描电镜,打开冷冻部分的电源开关,对准备室抽真空。
- b) 待准备室达到要求的真空度后,加液氮降温,使准备室样品台温度降至-150℃以下。
- c) 在液氮泥装置里注入液氮,并抽真空,使液氮成为液氮泥。
- d) 给扫描电镜样品室内的组件加液氮或者通入经过液氮冷却的干燥氮气,使其温度降至-150℃以下。
- e) 用冷台粘样胶水将固体试样粘于样品台上,液体试样可直接滴在样品台上,用真空转移装置把粘有试样的样品台迅速插入液氮泥中充分冷冻。抽真空后,把试样拉入真空转移装置的腔内,盖上盖,转移到准备室。如需要,在准备室内完成试样的冷冻断裂。
- f) 设定升华温度进行试样的升华。
- g) 升华结束后,使试样温度重新达到-150℃以下。打开氩气,按下镀膜键,进行表面镀膜。
- h) 镀膜结束,待真空达到要求后,打开准备室与扫描电镜样品室之间的隔离阀,将试样从准备室移入扫描电镜样品室内,然后退出真空转移装置,关闭隔离阀,进行扫描电镜观察,记录图像。

在观察期间需保持扫描电镜样品室内组件温度在 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,视需要可续加液氮。

- i) 观察结束后,关闭扫描电镜电子枪发射,打开隔离阀,拉出试样。
- j) 放出剩余液氮,给样品室内组件和准备室回温,待温度回到室温后,才可关闭冷冻部分的电源。视需要选择关闭扫描电镜或者让其继续运行。

8 结果表述

生物试样的扫描电镜形态观察结果以记录的电子图像形式提供,图像上应注明样品名称、标尺、放大倍率等工作条件。在文字报告中应注明电镜型号、工作条件和制样方法。

9 异常情况的处理

9.1 荷电

如果图像显示器上出现横向条纹闪烁、图像结构断裂、图像衬度及亮度异常等现象,表明生物试样导电性不佳,应该停止观察,取出试样后重新喷镀表面导电镀层。

9.2 试样变形损伤

如果图像显示器上显示试样变形或损伤严重,表明试样前处理不符合要求,应重新进行试样的前处理。

9.3 冷冻扫描电镜的试样结霜、产生冰晶等

如果在冷冻扫描电镜观察时发现试样表面结霜,冷冻断裂样品时发现试样内部产生异常大的冰晶结构,表明试样快速冷冻速率不够,或除霜处理不当,应重新进行试样快速冷冻,调整除霜参数,以得到结构良好的图像。

10 分析结果报告

分析结果报告应包括以下信息:

- a) 分析报告的唯一编号;
- b) 分析报告的页码;
- c) 样品名称;
- d) 送样人姓名、单位和地址;
- e) 样品的接收日期;
- f) 实验室名称和地址;
- g) 分析检测依据;
- h) 分析仪器及其工作条件;
- i) 分析结果和必要的说明;
- j) 分析报告负责人的签字;
- k) 分析报告的日期。

附录 A
(资料性附录)
常用固定液的配方

A.1 戊二醛固定液

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸缓冲液

分别配制 A 液和 B 液,然后按照表 A.1 量取 A 液和 B 液混合后测 pH 值。

A 液 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.60 g
或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 g
加双蒸馏水到 1 000 mL

B 液 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.61 g
或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 g
加双蒸馏水到 1 000 mL

表 A.1 不同 pH 值磷酸缓冲液配制表

pH 值	6.1	6.5	6.8	6.9	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5
A 液/mL	85	68	51	45	39	33	28	23	19	16
B 液/mL	15	32	49	55	61	67	72	77	81	84

A.1.2 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的戊二醛固定液

分别取 0.2 mol/L 磷酸缓冲液、25%戊二醛水溶液和双蒸馏水,按照表 A.2 量取混合。

表 A.2 戊二醛固定液配制表

0.2 mol/L 磷酸缓冲液/mL	50	50	50	50	50	50	50
25%戊二醛水溶液/mL	4	6	8	10	12	16	20
加双蒸馏水至/mL	100	100	100	100	100	100	100
戊二醛最终浓度	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	4.0%	5.0%

A.2 四氧化钨固定液

A.2.1 2%四氧化钨贮存液

将装有四氧化钨的安瓿(共 0.5 g)清洗干净,用玻璃划割器在上面刻痕,再用蒸馏水冲洗几次,放入洁净棕色广口玻璃瓶内,加上 25 mL 双蒸馏水,用洁净玻璃棒捣破安瓿。然后用石蜡将广口玻璃瓶严密封口,贴上标签备用。将配好的 2%四氧化钨贮存液置于干燥器中,4 ℃保存。

A.2.2 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的四氧化铁固定液

取等量的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.2)与 2%四氧化铁贮存液混合,现配现用。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
微束分析 扫描电子显微术
生物试样扫描电子显微镜分析方法
GB/T 33834—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 18 千字
2017年6月第一版 2017年6月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-56788 定价 18.00 元



GB/T 33834-2017

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107