

鑑別染色原理在掃描探針顯微技術上的應用

Application of Chemical Staining Method in Scanning Probe Microscopy

謝明峰、林登松

Ming-Feng Hsieh, Deng-Sung Lin

由於掃描探針顯微鏡的快速發展，清楚地看到一顆顆的原子並非難事。但是在晶體或薄膜表面上含有多種不同原子的複雜系統中，要能判別影像上每個原子種類就常常很困難。而首先提出將微生物學中常使用於光學顯微鏡搭配染色技術來進行觀測的方法應用在掃描探針顯微鏡上，將選用的適當原子當作染劑，成功地使影像上不同種類原子顯現對比，解決一些複雜表面的物理機制問題。我們相信這種「鑑別染色」原理確實可以被廣泛應用於所有的掃描探針顯微技術上。

Since the various kind of scanning probe microscopes (SPM) were invented during the last three decades, seeing individual atoms has become routine work in many laboratories. On many complex surfaces on crystals and thin films consisting more than one kind of atoms, however, it has been proven to be extremely difficult to distinguish different atoms, if not impossible. Our research group has introduced into the scanning tunneling microscopy the use of the chemical staining method widely used in optical microscopy of microbiology. We have succeeded resolving the Si and Ge atoms in the Si/Ge surfaces. This concept of staining method should be also very useful for any type of scanning probe microscopes.

一、前言

英國物理學家虎克 (Robert Hooke, 1635 – 1703) 於 1665 年前後以其自製的光學顯微鏡觀測到軟木的切片組織，並將其變空的小室命名為「細胞 (cell)」，這是人類首次利用顯微鏡技術來觀測微小

物質。而一直到十七世紀後半期，荷蘭的布商雷文霍克 (Antony Van Leeuwenhoek, 1632 – 1723) 成功地使用改良的顯微鏡看到了一些微生物和細菌，這才將微觀的生物世界呈現於世。但一般細胞內含大量水分，不僅極為渺小，而且無色透明、不易觀測，所以十九世紀末期發展出各種染色方法，使細

胞內的特殊部位能獲得充分對比，以利於分辨細胞內的超微組織。

一般而言，輻射線不能探測比其波長還小的構造，所以光學顯微鏡受到光本身物理性質（波長約 $0.4-0.7\ \mu\text{m}$ ）的限制，使得其解析度極限為 $0.2\ \mu\text{m}$ ，放大倍率約 $1,000-2,000$ 倍⁽¹⁾。為了突破傳統光學顯微鏡的解析極限，1940 年代初期科學家們以電子束代替光波開發出電子顯微鏡，而其與光學顯微鏡的運作原理極為類似，只是電子束的波長僅為光的十萬分之一，所以能使其提高解析度至 $2\ \text{nm}$ ，放大倍率約為十萬倍。但因為生物細胞也有不太吸收電子的，如果原封不動地在電子顯微鏡底下是不易觀察到的，所以為了增加可見度，一般生物材料切片都先用重金屬鹽（如鈾或鉛）加以鍍膜「染色」，使其與容易吸收電子的重金屬相結合，如此便可得到清晰的影像⁽²⁾。

1982 年賓尼 (Binnig) 與羅雷爾 (Rohrer) 在瑞士的 IBM 實驗室發明出掃描穿隧顯微鏡 (scanning tunneling microscope)，讓科學家首次觀察到原子級的解析度，其高度的解析度可精準至 $0.01\ \text{nm}$ ，放大倍率可到 10^7 倍。STM 發展至今僅僅二十多年，根據類似原理開發出來的掃描探針顯微鏡相繼問世，如原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM)、磁力顯微鏡 (magnetic force microscopy)、掃描熱顯微鏡 (scanning thermal microscopy) 等，形成了龐大的掃描探針顯微鏡 (SPM) 家族，顯微鏡技術的發展至此算是淋漓盡致。

但是 SPM 在薄膜表面含有多種不同原子的複雜系統中，常因為無法判別原子種類，而使 SPM 技術所得到的資訊受到限制，因此我們首先提出可以將顯微鏡搭配染色技術的觀念應用在 SPM 上，以輔助表面的分析。而因為 SPM 所觀測的是原子級的影像，所以相對地染料的選擇也要是一顆顆的原子才行—在後面的文章我們會介紹一些利用「原子染色」方法，成功地增進 SPM 分析辨別能力的例子。

圖 1 用來比較光學顯微鏡、電子顯微鏡和掃描探針顯微鏡的解像範圍，以及這些顯微鏡經常搭配使用的染劑類型，而利用顯微鏡搭配染色技術的觀念可以增進影像之解析。

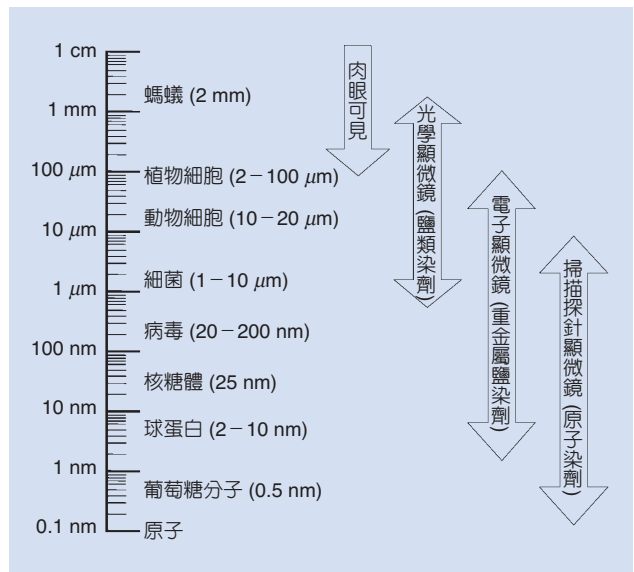


圖 1. 光學顯微鏡、電子顯微鏡以及掃描探針顯微鏡的適用範圍及其所常搭配使用的染劑類型。

二、顯微鏡與染色技術結合的概念

自從顯微鏡發明以來，便常被利用來觀測微生物細胞，而多數細胞的含水量大於 70% ，所以細胞組織很少會阻礙光線的穿透，因此多數未經處理的細胞在顯微鏡下的對比度是很差的，而使它們的組織構造能被分辨出來的方法是應用具有選擇性的有機染料來染色。由於十九世紀的工業革命使得紡織業大盛，因為紡織品需要染料加以染色，所以工業界製成了很多的染劑進行紡織品的染色工作，有一些生物學家就利用這些染劑進行細胞染色，他們發現利用鹼性的染劑會將細胞中的一些物質加以染色，然後便可在顯微鏡下觀測到前所未見的細胞超微組織。在此先介紹簡單的染色原理與類型，如此有助於瞭解為何染色技術能有效應用在顯微鏡的觀測上，以提高其分辨解析之能力。

1. 染色的原理

微生物染色的原理，主要是染料分子與細胞表面或細胞內活化位置 (active site) 產生化學反應。一旦我們知道染料結合 (dye binding) 的化學機制，就可以細胞的染色反應來揭露細胞組織的化學組成。但使用染色技術研究微生物，需注意下列兩

點：① 使用的化學染料，應只能與細胞組織內的特定一種化學成分作用；② 因為進行細胞染色的目的，主要在揭露細胞構造及其化學組成，故所有的試劑也不應該損害原來組織的型態。

一種染料之所以可用來做為微生物的染色，是因為其包含兩個重要的基本成分：生色基 (chromophore) 和著色基 (auxochrome)⁽³⁾。

(1) 生色基

生色基為染料分子裡的雙鍵部分，能夠吸收特定波長的光線，因而產生顏色。普通染料和螢光染料對可見光或紫外光的吸收，小部分決定於整個染料分子的化學結構，大部分光的吸收則在於染料的雙鍵上。如圖 2(a)，當光透過未染色的細胞時，並不改變光的振幅，因此無法觀察到細胞的細部結構。圖 2(b)，當光透過染色後的細胞，則染色分子的生色基會吸收某些波長的光波振幅，故可以清楚地看到細胞核等結構。

(2) 著色基

著色基主要是接在染料分子芳香族核心上的親水成分，例如氨基 (-NH₂ amino group)、氫氧基 (-OH hydroxyl group) 或羧基 (-COOH carboxyl group)。它們可使染料易溶於水，並且負責染料與組織結合地點的化學反應性。根據著色基在釋出陰



圖 2. 典型的植物表皮細胞：(a)染色前只能看到細胞壁結構；(b)染色後可以分辨出細胞核結構。

離子 (如 OH⁻, Cl⁻) 或陽離子 (如 H⁺) 以後，其染色分子所帶的電荷性是正或負，可將染料區分為鹼性 (basic) 或酸性 (acid)。我們舉常用的鹼性染料甲基藍分子 (methylene blue) 為例，其生色基與著色基如圖 3(a) 所示。

2. 染色的類型

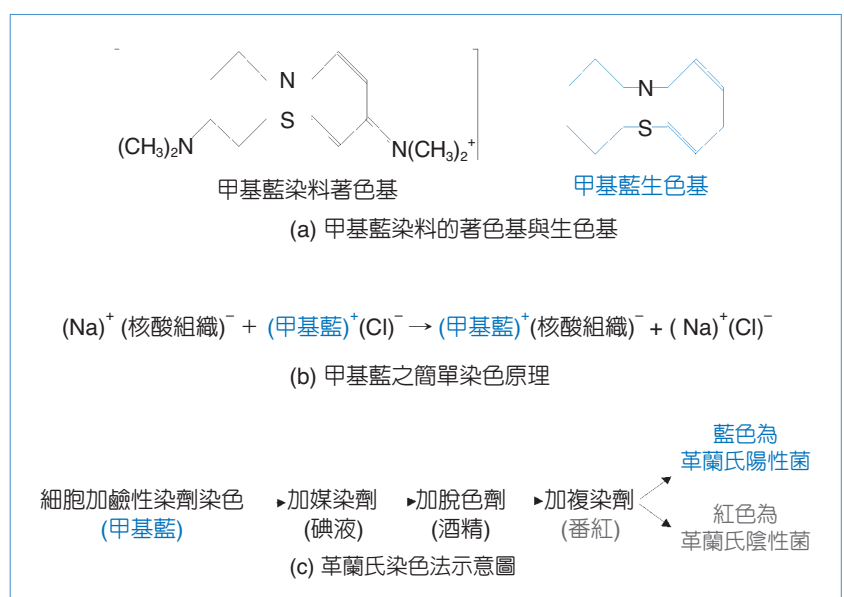
目前一般微生物學所使用的染色技術主要分為簡單染色與鑑別染色兩大類。

(1) 簡單染色

簡單染色 (simple staining) 是指利用單一染劑對微生物染色的方法，主要應用在一般型態的觀

圖 3.

- (a) 甲基藍染料的著色基與生色基；
- (b) 簡單染色原理；(c) 鑑別染色的革蘭氏染色法示意圖。



察，但無助於觀測細微的結構。舉例而言，細胞中的核酸或蛋白質會分解氨基酸，可在鹼性溶液中溶解，形成帶負電的原子團與帶正電的鈉離子或鉀離子^(4,5)。利用微生物細胞特殊組織帶有負電的特性，可以帶正電的鹼性單一染劑 (如甲基藍) 與細胞壁吸引、結合，使微生物呈色，如圖 3(b) 所示。

(2) 鑑別染色

鑑別染色 (differential staining) 是利用一種以上的染劑進行染色，主要用來區分細胞特定部位的染色及鑑別菌體的特殊部位。我們在此舉革蘭氏染色為例，此染色法是於 1884 年由丹麥的醫生 Hans Christian Gram 發明的，是目前細菌分類和鑑定的主要方法之一。革蘭氏染色法是利用細菌的細胞壁結構間之差異性，將細胞分類成革蘭氏陽性菌或陰性菌。

其染色的基本原理是利用僅存於革蘭氏陽性菌的核糖核酸鎂鹽-蛋白質-醣類複合物 (陰性菌內沒有此物質) 與鹼性染劑 (甲基藍) 作用，再加入媒染劑 (碘分子) 使染劑分子與細胞內的複合物形成不易被酒精所溶解的物質，保留了複合物的生成。再加入脫色劑 (酒精)，因革蘭氏陽性菌的細胞壁為單層且厚、所含脂質少，所以在作脫色處理時，細

胞壁會形成脫水現象、滲透減小，使複合物留於細胞質中無法溶出，顏色保留藍色。而革蘭氏陰性菌則為多層且薄、所含脂質多，當加入酒精時會使細胞壁的脂質溶解、使壁之孔隙變大、滲透增加，可以溶出甲基藍-碘的複合物，再加入複染劑 (番紅) 則成紅色，圖 3(c) 為其示意圖。

三、染色法在 SPM 的實際應用

在此使用 SPM 裡的掃描穿隧顯微鏡 STM 來進行實驗，首先簡介一下 STM 的操作原理，然後再舉一些利用「原子染色」方法來增進 SPM 影像的實驗範例。

1. 掃描穿隧顯微鏡

STM 的原理是利用在極尖的導體探針與晶體樣品之間加上偏壓，當探針與樣品的距離 d 夠小時 (約小於 2 nm)，則會使針尖的原子與樣品表面發生量子穿隧電流 I_t 。因為此穿隧電流 I_t 與距離 d 是呈負指數的關係： $I_t \propto e^{-d}$ ，所以 I_t 對於 d 的大小變化相當靈敏，當 d 減少 0.1 nm (10^{-10} m) 時，則 I_t 增加約 10 倍，利用此一特性，可以在高度上得到 0.01 nm 的精密解析度，而側向解析度可達 0.1–0.2 nm。

STM 所使用的是金屬探針 (通常是用鎢)，其針尖約只有數個原子甚至只有單一原子，測量到的穿隧電流大約只有幾個 nA (10^{-9} A)，所以必須把它放大才能在電路中做訊號的處理，這時就要用到電流放大器 (current amplifier)。利用電流放大器將 I_t 放大後，再進入回饋電路設定 I_t 的大小，使 I_t 維持固定值來掃描樣品表面 (也就是維持一定高度 d)，則可得到樣品表面的高低起伏，進而解析樣品表面的原子排列結構。

舉圖 4(a) 之示意圖為例，矽 (100) 表面的矽原子經過加熱退火後會重構形成 2×1 雙原子單體 (dimer) 結構，但每個矽原子在表面會殘留下一個懸浮鍵 (dangling bond)，而懸浮鍵是一種不太局部化的電子雲結構，所以在 Si (100) 上面再曝上一層氯原子跟矽原子之懸浮鍵做鍵結，可得到分布較集中的電子雲分布，以利於取得較清晰的 STM 掃描

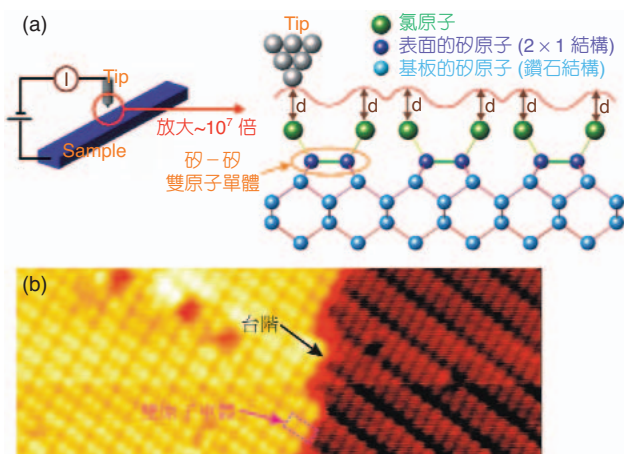


圖 4. (a) 為利用 STM 掃描樣品矽 (100)- 2×1 : Cl 表面的示意圖，其表面的矽-矽雙原子單體的間距約為 7.6 Å；(b) 為同一表面之 STM 掃描影像，其大小為 30 nm × 10 nm，下方虛線所框起來的位置為一個雙原子單體的結構。

影像。圖 4(b) 為在矽 (100) 表面曝上一層氫原子，再利用 STM 所掃描出來的圖形，其虛線矩形表示一個雙原子單體的單位，每個雙原子單體間距約為 7.6 Å，而左邊較亮的部分比右邊較暗的要高出一個原子台階，其台階高度約為 1.36 Å。

2. 「原子染色」方法

我們引進了微生物學的細胞染色原理，來將表面原子進行「染色」，以提高 STM 之解析能力，而因為所觀察的表面是原子級的解析度，所以選用的染料也必須是一顆顆的原子才行。以下將舉出幾項利用原子染色的觀念來提高 STM 解析能力的成功例子。

(1) 氫終結

過去一種類似原子染色的方法已經廣泛地被使用，也就是利用氫終結 (hydrogen termination)，將氫原子與表面的懸浮鍵 (dangling bonds) 鍵結，以減少淺層價電子，使表面電子雲密度的範圍縮小，以達成提高解析度的目的，以下舉出實驗上的實例以資說明。

在乾淨的矽 (100) 面上，其表面的矽原子會重構成更穩定的 2×1 雙原子單體結構，而每個矽原

子都會殘存一個懸浮鍵 (圖 5(a))，而懸浮鍵本身是一種不很局部化的電子雲狀態，所以用 STM 來進行觀測時，並不容易得到良好的 STM 影像 (圖 5(b))。而如果在矽 (100) 表面上再曝上一層氫原子，使其與懸浮鍵做鍵結，則可以使表面電子雲密度分布較集中 (圖 5(c))，以得到高解析度的 STM 原子級影像，如此便可以清楚的看出矽 (100) 的表面結構 (圖 5(d))。

(2) 應用在分辨鍺、矽的系統

當我們利用單原子層磊晶成長法 (atomic-layer epitaxy, ALE) 在矽 (100) 面上成長 0.4 ML (1 ML = 單原子層) 的鍺時⁶⁾，因鍺跟矽的晶格常數相近 (分別為 5.56、5.43 Å)，所以會跟矽 (100) 面一樣形成 2×1 的雙原子單體結構。但鍺/矽 (100) 表面有兩種原子，所以會形成三種雙原子單體結構：Ge-Ge、Ge-Si 及 Si-Si dimer。而在乾淨的鍺/矽 (100) 表面，其 dimer 結構並不水平對稱，且表面都是電子雲密度相當高的懸浮鍵結，所以 STM 所掃出來的圖形非常不清楚 (圖 6(a))。我們先嘗試將表面曝上氫原子，則氫原子會吸附在懸浮鍵上，使雙原子對傾斜的情況亦大大減少，讓 STM 所掃描出來的圖形更為清楚、解析度也提高了，不過 Ge、Si 的

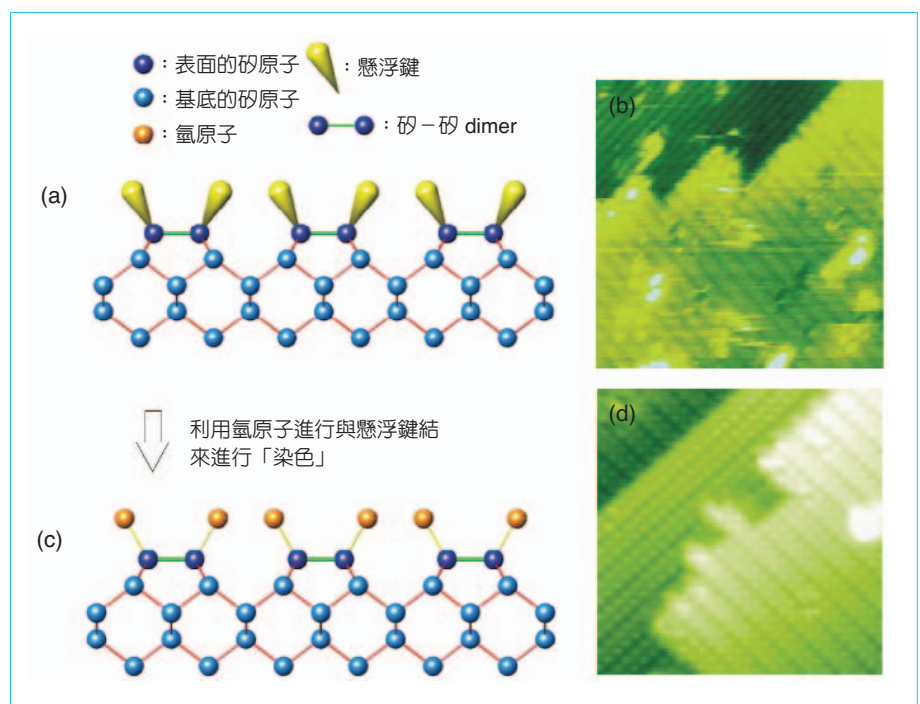


圖 5.

(a) 為 Si(100)- 2×1 表面的示意圖，而 (b) 為其 STM 影像，大小為 15 nm \times 15 nm；(c) 為利用氫原子與 Si(100)- 2×1 表面之懸浮鍵做鍵結之示意圖，而 (d) 為其 STM 之影像，大小為 10 nm \times 10 nm。

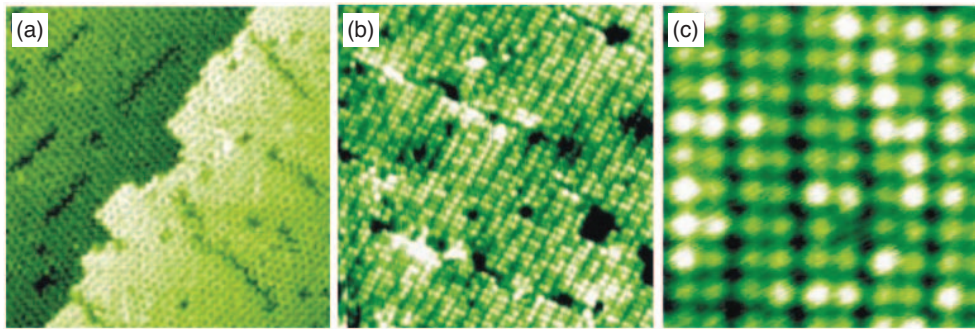


圖 6. STM 掃描下面表面之影像：(a) 乾淨的 Ge/Si(100) 表面，大小為 20 nm × 20 nm；(b) 與 (c) 為在 Ge/Si(100)-2 × 1 鍵結氯原子的表面 (影像大小 (b) 為 16 nm × 16 nm；(c) 為 3 nm × 3 nm)。

位置亦缺乏對比度，所以無法個別地分辨出 Ge、Si 原子，因此我們必須尋找另一種適當的原子當染劑來區別 Ge、Si 原子。

為了使化學鍵的差異足以鑑別出 Ge、Si 原子的位置，我們改選用氯原子來對 Ge/Si (100) 面進行「染色」，這是因為氯原子通常形成單鍵，因此於室溫下吸附不會破壞原本的 Ge/Si (100) 表面結構。由於鍺、矽陰電性不同，氯原子與鍺、矽鍵結的電荷轉移不同，也就是費米能階附近電荷密度不同，STM 利用此一特性便得以分辨出 Ge、Si 原子的不同。故在 Si (100) 面上成長 Ge 後的表面再以 Cl 原子覆蓋，我們發現 Cl 鍵結在 Si 或是 Ge 的位置變得可以清楚的分辨出來了，如圖 6(b) 及 (c)，較亮的原子位置 (表示其所在處的高度較高) 對應 Cl-Ge 鍵結處，較暗的位置則對應 Cl-Si，由此得以判別 Si、Ge 的位置，也可以統計 Ge-Ge、Ge-Si 及 Si-Si 三種 dimer 所佔有的比例，此種方法與微生物學的簡單染色法十分類似。

(3) 應用於研究氫分子在 Ge/Si (100) 上熱脫附的現象

表面分子的熱脫附現象 (thermal desorption) 是指在一定溫度下，固體表面層的原子或原子團經由熱擾動，而與周遭原子聚合成分子而脫離晶體的束縛至真空中的過程。舉例而言，在 Si (100)-2 × 1 表面曝滿氫原子後再加熱，當溫度高至 800 K 時，氫原子會形成氫分子從 Si-Si dimer 上脫附至真空；若為 Ge (100)-2 × 1 表面，則溫度只需要加至 600 K 以上，就會從 Ge-Ge dimer 上發生氫分子的熱脫附現象。由此可簡單地判讀為：氫分子由 H-Ge-

Ge-H 熱脫附的位勢障礙比 H-Si-Si-H 要來得小。在 Ge/Si (100) 表面有三種 dimer 的形式 (Si-Si, Ge-Si 以及 Ge-Ge)，經由前面簡單的 Si、Ge 單一晶體的氫熱脫附現象，可以推測氫分子要從三種 dimer 上熱脫附的位能障礙，應該是 Si-Si 最大，Ge-Si 次之，Ge-Ge 最小。我們用 STM 來觀察 H 分子在 0.4 ML Ge/Si (100)-2 × 1 上的熱脫附現象，溫度由 590 K 慢慢加至 785 K，結果得到圖 7，圖上的亮點為氫從表面熱脫附後殘留下來的懸浮鍵 (表示位置較高)。

由圖 7 可看出隨著加熱溫度越來越高，氫分子熱脫附後而 STM 圖上的懸浮鍵 (為亮點位置，表示探針的位置偏高) 也越來越多，但亮點的形狀、位置也變得不容易分辨，所以再次利用氯原子將懸浮鍵的位置「染色」，結果經過氯原子染色後的懸浮鍵變得清晰可見 (圖 8)。依據之前介紹過的鑑別染色法之原理，當經過氫分子的熱脫附過程 (脫色) 後，再加入氯原子將所有的懸浮鍵「染色」，如此則可以清楚的看出氫分子熱脫附時的位置，進而可以分析氫在 Ge/Si(100) 表面的熱脫附到底是以怎樣形式完成。

四、結論

在觀測微生物時常使用顯微鏡技術搭配染色技術的方法，如果選擇適當的化學染劑，可以在特殊組織中得到更好的解析度。雖然目前 SPM 技術的應用使得表面科學界對許多晶體的表面原子結構已經足夠、且相當接近事實的瞭解，但對於一些具有多種原子的複雜系統，仍然缺乏有利的工具來幫助

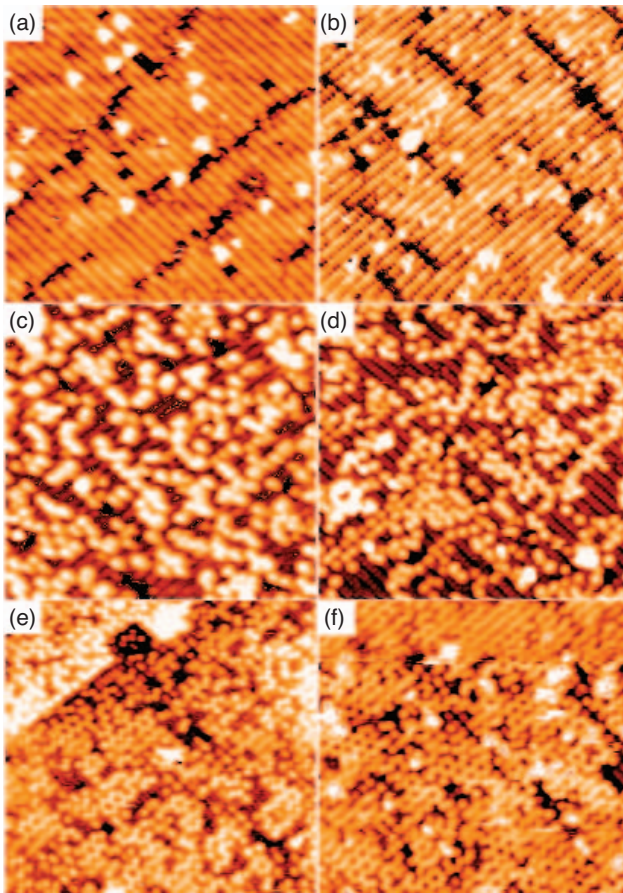


圖 7. (a) 在室溫下 0.4 ML Ge/Si(100)- 2×1 上吸附一層氫原子，以及其經過不同溫度下熱脫附的 STM 影像；(b) 590 K；(c) 660 K；(d) 725 K；(e) 760 K；(f) 785 K，其影像大小為 $15 \text{ nm} \times 15 \text{ nm}$ 。

分辨不同種類的原子。所以首先提出利用微生物學中化學染色技術的原理，試圖找出適當的原子來當作染劑，以「原子染色」的方法來輔助 SPM 對不同原子的解析能力。在我們的 STM 實驗中應用氯原子為染劑對表面的特殊部位進行染色，能成功地辨別出 Ge/Si (100) 表面上個別的 Ge 原子與 Si 原子。同時也利用同樣的方法研究氫分子在 Ge/Si (100)- 2×1 表面上的熱脫附現象，可以更清楚地辨別出氫原子熱脫附的位置。

我們提出的原子染色概念，確實可以輔助 SPM 進行表面的分析，相信不久的將來，一定能更廣泛地應用在含有各種原子的複雜表面系統上，幫助分辨表面不同種類原子以及分析各種特殊結構。

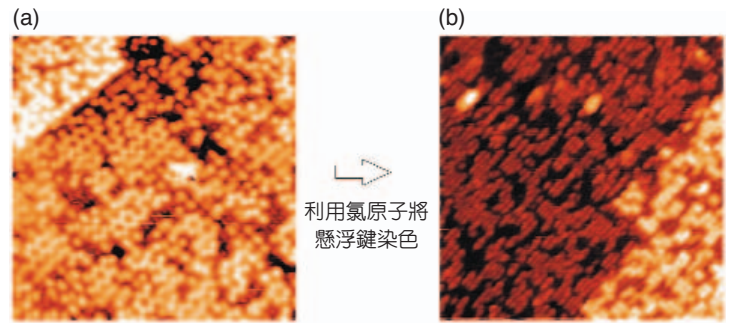


圖 8. (a) 在 0.4 ML Ge/Si(100)- 2×1 表面上的氫原子經過 760 K 加熱一分鐘後的 STM 影像；(b) 同一樣品經過氯原子「染色」後的影像。其影像大小均為 $40 \text{ nm} \times 40 \text{ nm}$ 。

參考文獻

1. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 164 (2002).
2. 長野敬著，趙琪譯，透視細胞組成—顯微鏡下的大千世界，初版，台北縣中和市：21 世紀文化，42 (2000).
3. 趙新生，研究細胞的方法，四版，台北市：徐氏基金會，125 (1982).
4. 張碧芬，袁紹英，游呈祥，微生物學的世界，初版，台北：天下遠見，214 (2004).
5. 鄧小晨，胡辰，微生物學，初版，台北：新文京開發，21 (2001).
6. D.-S. Lin, J.-L. Wu, S.-Y. Pan, and T.-C. Chiang, *Phys. Rev. Lett*, **90**, 046102 (2003).

- 謝明峰先生為國立交通大學物理碩士，現為國立交通大學物理研究所博士班學生。
- 林登松先生為美國伊利諾大學物理博士，現任國立交通大學物理研究所教授。
- Ming-Feng Hsieh received his M.S. in physics from National Chiao Tung University. He is currently a Ph.D. student in the Institute of Physics at National Chiao Tung University.
- Deng-Sung Lin received his Ph.D. in physics from the University of Illinois at Urbana-Champaign, USA. He is currently a professor in the Institute of Physics at National Chiao Tung University.