

Instruments Today 2025 Q2

科儀新知



TEM 試片製備技術

Advanced TEM Specimen Preparation Technology

【人物專訪】

閱康科技股份有限公司 謝詠芬 董事長

243

ISSN 1019-5440



以精密量測技術貢獻社會

1987年正式在台成立，除了銷售精密量測儀器的業務，並且建構以技術服務為主軸的量測技術支援中心。提供最好的售前與售後服務體系，為快速提供客戶所需要的服務，台灣三豐分別於台北、台中、高雄設立營業所，包括量測技術支援中心(M3SC)以及技術服務部門，就近迅速提供客戶所需要的量測DEMO、各種量測Solution、與售後服務。



Product Lineup

大產品種類

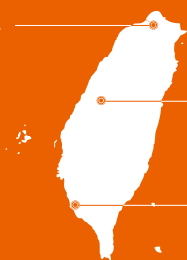


承蒙惠顧，三豐已由測微器、游標卡尺之類的小量具，發展成為一個運用電腦驅動的FA關連機器—三次元座標量測儀、畫像測定機、顯微鏡、投影機、表面粗度、真圓度測定機、輪廓測定機、硬度機、雷射測定機等，已成為世界第一大精密儀器的綜合製造商。

服務據點

台北總公司 / 台北量測技術支援中心

114台北市內湖區洲子街71號4樓
營業部代表號：(02)5573-5900
技術部代表號：(02)5573-5901
管理部代表號：(02)5573-5902
FAX：(02)8752-3267
營業部：sales@mitutoyo.com.tw
技術部：technical@mitutoyo.com.tw
校正實驗室：lab@mitutoyo.com.tw



台中辦事處 / 台中量測技術支援中心

414台中市烏日區高鐵一路299號1樓
TEL：(04)2338-6822
FAX：(04)2338-6722

高雄辦事處 / 高雄量測技術支援中心

802高雄市苓雅區海邊路31-1號1樓
TEL：(07)334-6168
FAX：(07)334-6160

GMM

均華精密工業股份有限公司 Gallant Micro. Machining Co., Ltd.

(股票代號：6640)

2010

總部成立於土城工業區內

主要從事半導體相關生產設備及模具之研發、製造及銷售。
主力產品>>精密取放技術之晶粒挑揀機與黏晶機、精密加工技術之沖切成型機與自動封膠機、光電整合技術之雷射刻印機與光學檢測機等。

2018

正式掛牌上櫃(6640)

均華不斷致力新製程需求的設備研發，深受客戶肯定。開發先進的封裝設備關鍵技術，也結合國外關鍵模組廠商技術優勢，以優異的整合能力憑藉有限資源發揮最大研發成果，因而建立良好的獲利基礎。更因長年的技術積累，相關核心技術亦居於國內相關產業之領先地位。

主要商品/服務項目

半導體先進封裝精密取放設備設計、製造、銷售

自動雷射刻印機、自動沖切成型機設計、製造、銷售

精密模具及機械設備之設計、製造、銷售

半導體先進封裝、異質整合

歡迎各界菁英加入 共創產業未來

★完善的獎勵

年終獎金、員工分紅(視公司年度營運狀況、個人績效表現分發) / 三節禮金 / 生日禮金

★完善教育訓練

新進人員基礎訓練(師徒制) / 強化研發技術能量(內部教育訓練課程) / 個人潛能提升課程

★完整的保險福利

勞工保險 / 勞工退休金(新制) / 全民健康保險 / 公司團體保險(壽險、意外傷害險、意外醫療險、住院醫療險、癌症醫療險) / 員工及眷屬保險(提供優惠方案給予眷屬納保)

★休假

有薪病假3天 / 生理假 / 產檢假 / 陪產假

★職工福利

公司及福委會提供結婚禮金、生育禮金、喪葬補助金 / 員工家庭日 / 部門聚餐、歲末尾牙餐會 / 員工健康檢查 / 哺乳室 / 職工福利委員會特約廠商優惠 / 員工子女獎助學金 / 提供書刊及雜誌借閱 / 國內外旅遊

GMM

236 新北市土城區民生街2-1號
TEL：02-2268-2216 FAX：02-2268-0665

302 新竹縣竹北市台元一街8號7樓之9
TEL：03-5601222 FAX：03-5601292



高科技領導廠商

CONTREL

東捷科技



專注研發核心技術

自動化整廠規劃與製程設備

雷射應用設備

光學檢測設備

物流規劃與設備

真空製程設備

巨量轉移/巨量修補設備

以研發為主的設備製造商
專注於新型雷射應用與雷射微加工技術

擅長LCD製程設備整合整廠自動化

近年將技術應用擴展至 (micro) LED及半導體產業

為國內高科技領導廠商!

完善服務網絡・服務據點在地化
維修保養、定期設備調校、客戶問題即時對應!

WWW.CONTREL.COM.TW

☎ 06-5051188(台南總公司) 📍 服務據點:新竹.台中.台南.高雄

關注東捷



CNC控制器・自動化控制器・ 機械手臂・雲端 整合方案



ONE FOR ALL
ALL IN SYNTEC

最值得信任的電控夥伴

新代科技股份有限公司
SYNTEC Technology Co., Ltd.

台灣新竹市東區研發二路25號

☎ 886-3-6663553
☎ 886-3-6663505

✉ sales@syntecclub.com.tw



SYNTEC



LEANTEC



LINE

HIWIN®

實現您的智慧工廠

HIWIN 為工業 4.0 提供高附加價值的整體解決方案
全方位系列產品，實現您的智慧工廠。



關節式機器手臂
Articulated Robot



史卡拉機器手臂
SCARA Robot



晶圓機器人
Wafer Robot



晶圓移載系統
EFEM



智慧型滾珠螺桿
Intelligent 4.0 Ballscrew
智慧型線性滑軌
Intelligent 4.0 Guideway



諧波減速機
DATORKER® Strain Wave Gear
旋轉致動器
DATORKER® Strain Wave Gear System



RCH系列



RCV系列



RAS系列

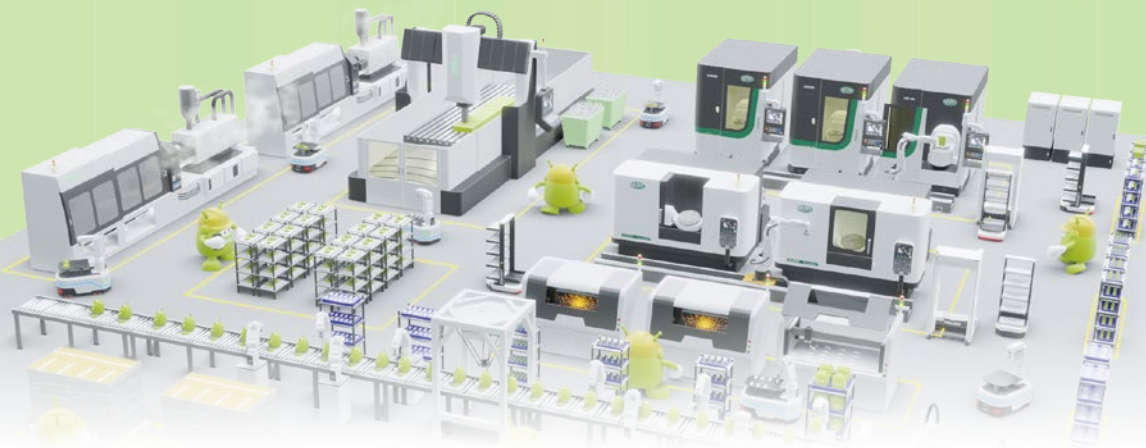


RAB系列

Torque Motor 迴轉工作台
Torque Motor Rotary Table



了解更多
HIWIN產品



全球營運總部

上銀科技股份有限公司
HIWIN TECHNOLOGIES CORP.
台中市40852精密機械園區精科路7號
Tel : (04) 2359-4510
www.hiwin.tw
business@hiwin.tw

關係企業

大銀微系統股份有限公司
HIWIN MIKROSYSTEM CORP.
台中市40852精密機械園區精科中路6號
Tel : (04) 2355-0110
www.hiwinmikro.tw
business@hiwinmikro.tw

全球銷售暨服務據點

德國 www.hiwin.de	日本 www.hiwin.co.jp	美國 www.hiwin.us	義大利 www.hiwin.it
瑞士 www.hiwin.ch	捷克 www.hiwin.cz	法國 www.hiwin.fr	新加坡 www.hiwin.sg
韓國 www.hiwin.kr	中國 www.hiwin.cn	以色列 www.mega-fabs.com	

TILTdot

無線傾斜儀

TILTdot 為一款具有 NB-IoT 無線傳輸功能之無線傾斜儀，同時提供雙軸向角度及溫度量測功能。

TILTdot 具有堅固的防水外箱及低耗電量的設計，使用2顆 18650 鋰電池可提供長時間量測記錄及資料上傳至 dot雲端網頁服務，其內建 32 GB Micro SD卡可備份儲存一佰萬筆以上資料。

- 大樓結構物傾斜監測
- 捷運、高鐵、橋梁等墩柱傾斜監測
- 捷運、高鐵等隧道結構傾斜監測
- 邊坡擋土牆傾斜監測
- 地表滑動監測



都市土木新建工程



河川水利工程



橋梁工程



邊坡安全



pALERT F330

一體化力平衡式地震儀

擁有高精度的三軸力平衡加速度計，擁有早期警報技術和先進功能，用於全面的地震防備。提供三種觸發邏輯 (Pd, PGA, STA/LTA) 和過濾選項，包括高通濾波器和低通濾波器，以減少非自然地震噪音。

- 地震預警系統(EEWS)
- 結構健康監測(SHM)
- 工業風險管理增強
- 生產線地震安全停機機制



住宅建築



工業基礎設施



製造廠



公共設施





我們矢志成為光電及半導體產業中，
真空設備核心技術提供者。

我們目標是整合高科技產業真空設備
元件，提供有信賴感的產品，登上全
球領導品牌。

磁流液軸封



特點

- 台灣設計/製造
- 高度密封性與高潔淨度
- 可依需求進行客製化設計
- 可提供維修服務
- [選配] 軸封洩漏檢知系統

接觸角影像分析儀



應用領域

- 生物相容性研究
- 奈米抗潑水表面驗證
- 玻璃基板潔淨度驗證
- 晶圓潔淨度管制
- HMDS製程管制
- 光阻與顯影製程開發
- BGA接合點潔淨度驗證
- 封裝接合面前處理



快速升溫/退火爐
(RTP/RTCVD)



AS-One 100



直接液體注入
(DLI)模組

VAPBOX 300

KEMSTREAM
ADVANCED VAPORIZERS ●●●

科儀新知

INSTRUMENTS TODAY 季刊

中華民國 114 年 6 月 30 日出版



封面說明

整合掃描穿透式電子顯微術 (scanning transmission electron microscopy, STEM) 與原子針尖斷層分析技術 (atom probe tomography, APT)，以同步獲取材料中原子級的結構定位與元素組成資訊，為目前奈米尺度材料分析領域最前沿且具高度挑戰性的研究方向。透過聚焦離子束 (focused ion beam, FIB) 製作之針狀試片，可將目標結構準確地定位於針尖端，實現 APT 量測所需之幾何形貌。由於 APT 為破壞性分析技術，本研究先利用設置於國家實驗研究院國家儀器科技研究中心之球面像差修正掃描穿透式電子顯微鏡 FEI Titan G2 80-200 ChemiSTEM 進行高解析 STEM 影像拍攝，以取得樣品的原子級結構資訊。隨後，運用國家實驗研究院台灣半導體研究中心所建置之原子探針斷層影像儀 CEMECA LEAP 5000 XR 進行 APT 實驗與元素分析，並結合雙重量測結果進行整合性的資料解讀與交叉驗證。此技術整合策略有效提升原子尺度材料分析的空間解析度與化學敏感度，為探索奈米結構中異質性與界面現象提供嶄新解決方案。

• 發行人：潘正堂

• 客座主編：陳健群

• 執行編輯：林麗娥、陳柏荔、魏崇倫

• E-mail：ncir-editor@niar.org.tw

• 網址：<https://www.ncir.niar.org.tw/Publication/InstTdy>

• 地址：新竹市科學園區研發六路 20 號

中華民國 68 年元月創刊

• 電話：(03) 5779911 轉 304, 313

• 傳真：(03) 5789343

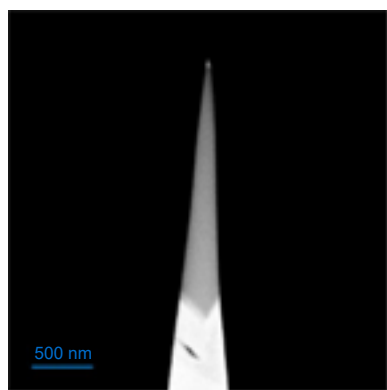
• 設計排版：宇豐廣告實業社

• 電話：(03) 5306633

國家實驗研究院國家儀器科技研究中心出版



29



52

人物專訪

- 4 閎康科技股份有限公司－謝詠芬董事長
享受人生自在隨我

林麗娥

先進 TEM 試片製備技術

- 10 「先進 TEM 試片製備技術」專題介紹

陳健群

- 12 穿透式電子顯微鏡試片製備技術：從早期機械加工到現代奈米科技的演進

楊子逸、闕郁倫

- 26 穿透式電子顯微鏡金屬材料試片製備技術

楊唯翌、徐暉翔、蔡清璇、鍾采甫

- 39 會聚型氬離子束減薄拋光系統製備穿透式電子顯微鏡試片應用研究

李威志、陳健群、鍾采甫、彭裕庭、蕭素淳、蕭健男

- 47 整合三維電子斷層與原子針尖分析技術的針狀樣品製備方式

彭裕庭、劉宇倫、蕭素淳、蕭健男、陳健群

- 55 Cryo-TEM 的先進試片製備技術

黃士旻、章為皓

- 69 先進 TEM 試片製備技術：液態穿透式電子顯微鏡試片開發與發展

陳睿遠、黃浚瑋、吳文偉

- 78 K-kit—應用於奈米溶液原位電子顯微鏡分析的創新微晶片

陳弘仁

INSTRUMENTS TODAY

June 2025

People

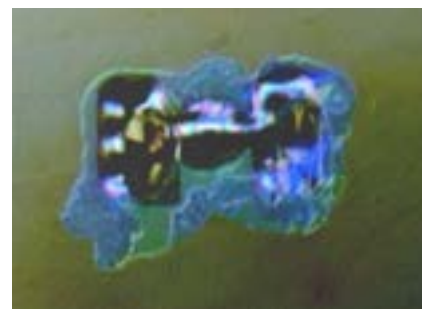
- 4** **Dr. Yong-Fen Hsieh, Chairman & CEO of Materials Analysis Technology Inc.
Enjoy the Life.**

Claire Lin

Special Issue: Advanced TEM Specimen Preparation Technology

- 10** **Special Issue Introduction of "Advanced TEM Specimen Preparation Technology"**

Chien-Chun Chen



73

- 12** **Transmission Electron Microscopy Specimen Preparation Technology: Evolution from Early Mechanical Methods to Modern Nanotechnology**

Tzu-Yi Yang, Yu-Lun Chueh

- 26** **Metallic Transmission Electron Microscope Specimen Preparation**

Wei-Yi Yang, Wei-Hsiang Hsu, Yu Hsuan Tsai, Tsai-Fu Chung

- 39** **Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy by Using Concentrated Argon Ion Beam Milling System**

Wei-Chih Li, Chien-Chun Chen, Tsai-Fu Chung, Yu-Ting Peng, Su-Chun Hsiao, Chien-Nan Hsiao

- 47** **Needle-shaped Specimen Preparation for Integrating 3D Electron Tomography and Atom Probe Analysis**

Wei-Chih Li, Chien-Chun Chen, Tsai-Fu Chung, Yu-Ting Peng, Su-Chun Hsiao, Chien-Nan Hsiao



82

- 55** **Advanced Cryo-TEM Specimen Preparation Technology**

Shih-Hsin Huang, Wei-Hau Chang

- 69** **Advanced Transmission Electron Microscope Specimen Preparation Technology: Manufacturing and Development of Liquid Cell TEM Specimens**

Jui-Yuan Chen, Chun-Wei Huang, Wen-Wei Wu

- 78** **The K-kit—Innovative Microchip for *in-situ* Electron Microscopy of Nanofluids**

Hung-Jen Chen



閎康科技股份有限公司
謝詠芬 董事長

享受人生自在隨我

Enjoy the Life.

撰文：林麗娥

在生理上是男性還是女性，在絕大多數情況下，我們只能選擇一種。但做為一位創業家，在心理素質上同時具有陽剛與陰柔特質，可能是通往成功的捷徑。鑒於先進半導體技術的推進，產學研界有大量的檢測需求，《科儀新知》243期特別推出「先進TEM試片製備技術」專題，邀請亞太第一大半導體材料檢測公司—閎康科技股份有限公司謝詠芬董事長現身說法，與讀者分享她的研究與創業歷程。透過專訪我們了解謝董事長是如何在不被眾人看好的情況下，大膽地購買地表最昂貴的檢測儀器進行創業，善用學經歷幫助客戶解決問題，獲得國際大廠信賴。訪談間，謝董事長說話節奏暢快、妙趣橫生，說到自己創業過程所面臨的危機處理是堅毅果斷，對待客戶又是有情有義，十足俠女性格。甚至將 Outsourcing Lab 與 In-house Lab 檢測，以市井俗話的比喻「站壁」與「正宮」相互比擬，帶領閎康科技形塑出特殊的商業模式，進行營運、創造價值。

年輕時投稿《科儀新知》，用打工學習這世界

謝董事長就學期間曾經在《科儀新知》發表數篇文章，探討有關穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 等研究。博士畢業後，先後任職於工研院、美國貝爾實驗室、聯電、友達等企業，累積豐厚的產業資歷及學術底子。時間的價值會站在勤奮努力的人這邊，當《科儀新知》編輯再與謝董事長聯繫時，她已搖身一變成為自行創立閎康科技股份有限公司的總經理，儘管創業忙碌依然繼續抽空撰寫文章，與《科儀新知》讀者分享其在材料分析技術上的研究成果。

謝董事長分享她學生時期，常常靠英翻中、中翻英的寫作打工，增加自己的語言能力，博士畢業後在貝爾實驗室進行博士後研究，第一年就發表十多篇論文，並獲得兩大應用物理頂級期刊 APL (Applied Physics Letters)、JAP (Journal of Applied Physics) 邀請，成為論文的審核員 (reviewer)，也透過在實驗室報告強化口語表達能力。謝董事長大學、碩士、博士都在國立清華大學完成，是最忠誠的三清族。儘管未出國留學，但卻說了一口流利的英語。謝董事長鼓勵學生時期的打工，盡量選擇可以加值自己能力的工讀，既可學習又可以增加生活費。



謝詠芬董事長分別於 2003 年、1999 年所發表的研究著作與《科儀新知》讀者分享。

每當媽媽把門關上，爸爸就會幫她開一扇窗

謝董事長從小就是個學霸，會玩又會唸書，創業又這麼出色，父母從小對她的養成教育應該是灌注很多資源吧？謝董事長表示：「我那年代的家庭，家裡的資源都會灌注在男孩身上，我媽媽最反對我唸書、最怕我考第一名。她總是希望我國中畢業後，念個商校找個穩定的會計工作，之後就結婚生子。」初中三年級時，謝董事長同時考上了新竹師專、新竹女中以及台北商專。媽媽希望她公費念新竹師專，但謝董事長想念新竹女中，想說也許以後可以像哥哥一樣考上國立臺灣師範大學。媽媽就唸說：「全新竹市就 6 個考上，育賢國中也就兩個考上，這麼難得的名額又不用錢你就不去念？！」、「你給我記著，你真的去念新竹女中的話，就給我保證考上國立大學，絕對不會給你念什麼私立大學！」

每當媽媽把門關上，爸爸就會再幫她開一扇窗，爸爸回應說：「沒關係，讓她念念看，也許念新竹女中可以考上師範大學。」，媽媽依舊一口刀子嘴說：「你哥哥念新竹中學，班上第 10 名才考得上，你以後要念第幾名才會考得上？」

『可能是父母愈限制、愈沒有資源，就愈激發我的好勝心』，謝董事長憑著自身的努力，一路念到博士畢業，每到一個升學階段，媽媽都會不斷地勸退。新竹女中畢業後，考上

國立清華大學，全家都感到不可思議。過了兩三天，等到媽媽驚魂甫定之後，依舊對她說：「你不要以為運氣好考上清華大學就可以怎麼樣，你如果畢不了業，我看你怎麼辦！」等到清華大學畢業後，又說要繼續唸碩士，媽媽就又唸說：「你夠了沒？清華大學畢業你還不趕快去賺錢，你還想幹嘛？」「女孩子讀這麼多書要做什麼？」

因為常常不願意配合媽媽的期待，從小總是少不了對她一頓責罵，謝董事長有時也懂得迴避衝突、充耳不聞，找到在家生存的策略。謝董事長表示，父母教育程度都不高，傳統「重男輕女」的觀念影響下，她又常常跳脫父母能力所及與經驗可控的範圍，所以媽媽常用指責的方式來表達關愛。知道她徵選上貝爾實驗室博士後研究的機會難得，剛出生的小孩需要照顧，邊罵還是邊幫忙謝董事長尋找合適的褓母來分擔。爸爸則是扮演鼓勵、跟著她一起努力的角色。父親只有日治小學畢業，靠著自修通過高普考、檢定特考，最後考取省立新竹醫院（現為臺大醫院新竹分院）的主任秘書。父親還與謝董事長同年考上空中大學，期中、期末考時她會幫父親猜題、解題，父女倆同年畢業，成為鄰里間的佳話。謝董事長表示，回首生命歷程，從小的家庭環境與資源，養成她堅韌、耐挫與獨立的個性，讓她更有毅力可以面對商場的風雲變幻與博弈，同時她也很感恩生命中的一切經歷，求學、研究、結婚、生子、創業…等，最後她又可以把人生的焦點回歸到自己身上。

「站壁」精神的商業模式

謝董事長在 43 歲時，決定自友達光電股份有限公司離職出來創業，而且創業需要採購的是動輒數千萬元的穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM)、二次離子質譜分析儀 (secondary ion mass spectrometer, SIMS) 等貴重儀器設備，這些都是以往國家級實驗室才能負擔的。在不被看好、沒有親友資助下，2002 年開創閎康科技公司，成立國內首家半導體材料檢測實驗室，靠著「幫半導體做體檢」闖出一片天。公司開張時只有一台 TEM，要價就要 3000 多萬元，閎康科技第一年營收就高達 4000 多萬元，第二年則達 7000 多萬，創業第五年公開發行、第七年上櫃。謝董事長用巧妙、幽默的方式將一般公司研究單位的 In-house Lab 比喻為公司包養的「正宮」，閎康科技的 OutsourcingLab 則比喻為「路邊站壁」。In-house Lab 可能只要處理公司某一領域的檢測，OutsourcingLab 是「客人如果來，我們就要趕快服務」，服務百工百業、各種檢測上的疑難雜症都要處理，閎康科技成立初期，也幫客戶做過各式珠寶鑑定。因為觸及的領域多元、累積的領域知識 (domain knowledge) 比較廣泛，因此練就一身功夫，各個領域的應用檢測包括 IC、LED、TFT-LCD 平面顯示器、生醫奈米、太陽能等，閎康科技都可以一一協助客戶解決問題。尤其試片製備技術向來是影響檢測技術最重要的一環，包括試片的厚度、表面的平整度及試片製作過程所引起的內部應力等，都會顯著地影響分析的準確性。像是生醫類樣品通常本身含水量高，造成其在 TEM 觀測時影像對比度較低。閎康科技擁有獨家的專利以適當的樣品製備方法 (K-kit)，使該類樣品能維持原來的結構外觀來進行觀察。

謝董事長也分享要可以讀懂客戶的心，透過客戶的言行、肢體行為探悉客戶的心理行為，從中尋找到突破口與客戶需求，才可以掌握促成合作的機會。好比老人家去醫院看病，有時候不一定是真的生病，而是去給醫生摸頭，尋求安慰劑。閎康公司是半導體檢測分析廠商，其主要是結合顧問與諮詢的功能。接到客戶的單子，雖然不知道產品的真正功能，但靠著經驗判斷與專業知識，準確地提供各種試片製備服務，以滿足客戶在研發電子產品和開發新材料結構、新製程時的分析需求。

創業過程中最大的危機

提到創業危機，謝詠芬笑說：「創業哪有沒有挫折的，創業就是一場永無休止的馬拉松競賽，她已經在挫折裡滾過好幾回合，像煮餃子一樣，皮都滾到都爛了。」她創業以來最大的危機就是公司的技術主管跳槽到同業公司，還一次帶走 30 幾位閎康員工。競爭對手一下子多了 30 幾位員工，而閎康科技卻突然間少了 30 幾位經驗豐富的研究人力，此消彼長，對於公司的營運損傷頗深。為了繼續取得領先地位，謝詠芬隨即到中國大陸深圳、廈門建立實驗室，成功擴大市場版圖渡過危機。謝董事長也提到，不知道同仁跳槽的真正原因，但是待在大公司看到的視野肯定是不一樣的，企業的安排與布局也是沒辦法複製的。謝董事長引自《戰國策·韓策一》的古語：「寧為雞首，不為牛後」來表示，這句話是比喻寧願在小場面中作主，而不願意在大場面聽人使喚。只是放到現在來看，不一定是正確的。實際上，雞首牛後所看到的視野與經歷不同，待在優秀環境的「牛後」認知邊界會大幅度的拓展，因為團體裡的人不是天賦異稟，就是極度努力，甚至既聰明又努力。待過這樣環境的人，毅力會比較強，知道自己還有努力的空間，進而在競爭中設法找到自己優勢的方向。

做生意本來就多變數，尤其在中國做生意要面對各式各樣的潛規則，然而謝董事長表示：「人只要不貪，就沒有災禍，不要因為對方提供多少誘因，讓你減稅蓋廠房你就去，就不會因為中國政策改變就覺得被欺騙。」謝董事長也透露，她平常也不靠應酬談生意，而是靠技術和服務，幫助客戶提高效率，爭取市場支持。如果產品沒有價值，用什麼溝通方法、談判策略都不可行。也因為這樣可以順利在台灣、中國大陸及日本三地建立實驗室，客戶遍佈世界各區，獲得台積電 (TSMC)、三星 (Samsung)、英特爾 (Intel) 等國際大廠的信賴。謝董事長也提到，中國本地陸陸續續成立 20 多家檢測公司，閎康矢志要繼續當第一名，笑說她自己的好勝、不服輸的個性就是「牛就是牛，牽到北京還是牛」，同行要怎麼打擊我，就證明我們還是業界的領頭羊。



閎康科技第 16 座實驗室－北海道實驗室外觀，繼名古屋與熊本後，這座新實驗室成為閎康在日本的第三個據點。

成功的創業家所必須具備的特質

雖然成功的經驗不能被複製，但成功的創業家肯定有類似的特質。《科儀新知》採訪團隊發現，謝董事長除了具備創新思維、持之以恆、樂於學習以及高抗壓性的特質之外，還擁有「就算全世界都說你瘋了，仍堅持做自己想做的事」的力量、決心和勇氣。深知高科技產品開發過程相當仰賴分析機台，尤其是材料分析 (materials analysis, MA) 及故障分析 (failure analysis, FA)。

然而設備昂貴及人員能力不足等問題，使得許多業者無法進行完整及深入的分析。在創業前，謝董事長於半導體及光電產業已歷練二十餘年，她相信自己的觀察，洞悉產業需求缺口，率先以創新服務及營運模式卡位市場，創立了閎康科技，成就今天亮麗的成績。謝董事長另一項特殊的人格魅力便是同時具備陽剛與陰柔的心理素質。陽剛的特質偏向「工作取向」特質，這樣的特質比較能發揮效率完成工作；陰柔的女性特質則偏向「關係取向」特質，讓她容易贏得良好的人際關係。謝董事長可以跟男董事長們一起吃飯、聊軍事、聊科技，轉身也可以跟董娘們唱歌、聊名牌、聊旅遊。這些特質都支持著謝董事長克服一次又一次的挑戰，邁向成功。

閎康導入 Cs Corrector TEM，加速 2 奈米製程技術開發

好的企業會與時俱進，持續不斷地適應時代的變化與進步，才能在激烈的市場競爭中生存和發展，閎康科技為協助晶圓代工大廠推進 2 奈米以下製程開發，今 (2025) 年 4 月於竹科矽導實驗室導入全球頂級、要價超過 500 萬美元的超埃米解析球差修正穿透式電子顯微鏡 (Cs Corrector TEM) 正式投入營運。謝董事長表示 Cs Corrector TEM 為傳統電子顯微鏡的 3 倍以上價格，設備高達 3.3 公尺。具備超埃米級成像解析能力，可精準觀測 1 奈米以下的啞鈴型對稱影像，呈現原子級電子軌域細節，大幅提升先進製程材料與結構研究的深度與效率。適用於鰭式場效電晶體 (fin field-effect transistor, FinFET)、環繞式閘極場效電晶體 (gate-all-around FET, GAAFET) 等先進晶體管結構分析，可協助加速 2 奈米級更先進製程節點的開發驗證，提供晶圓代工 (foundry)、垂直整合製造 (integrated device manufacturer, IDM)、高階封裝與 IC 設計廠完整的 MA 及 FA 服務。



閎康科技於竹科矽導實驗室導入超埃米解析球差修正穿透式電子顯微鏡 (Cs Corrector TEM)。

謝董事長進一步指出，閎康科技持續透過創新與技術領先，致力於提供高精度且具前瞻性的半導體檢測與分析解決方案，以穩固在全球市場的領導地位，成為引領技術潮流、橫跨各領域的半導體廠商首選研發夥伴。

採訪後記

重情重義的謝董事長在採訪過後，還特別請助理寄了閎康科技製作的資料夾、便條紙、蛇年桌曆、口罩等設計精美實用的紀念品送給當日的採訪團隊。翻開桌曆是滿滿的驚喜，封面及裡面有很多月份的圖片是出自謝董事長親手的畫作。對照回想採訪時謝董事長多變、轉換自然的形象，日常國語表達是字正腔圓，說起台語，又是「台味」十足，模仿媽媽如何用言語挫敗她時，十分接地氣。拿起畫筆，又畫得栩栩如生、直逼職業畫家水準。維度越高的人總是大象無形，可以隨時跟不同層次的人同頻，相處起來讓人感到如沐春風般的舒服。似乎放到哪個位置，都不違和。謝董事長形容她就是很簡單地 *enjoy the life*，享受人生、不管酸甜苦辣。她抱起小寶寶也會像抱孫的阿嬤一樣親切可愛。這是專屬謝董事長最頂級的人格魅力，也是頂級的人生智慧。



閎康科技蛇 (2025) 年桌曆封面及 9 月圖片—黛安娜王妃畫像，為謝詠芬董事長所畫。

「先進 TEM 試片製備技術」專題介紹

Special Issue Introduction of “Advanced TEM Specimen Preparation Technology”

客座主編－陳健群 博士

國立清華大學工程與系統科學系副教授

由於電子顯微鏡具備多種功能，如影像觀察、電子繞射與成分分析等，再加上其解析度可達奈米甚至原子級範圍，已成為材料科學與工程領域在材料與元件開發上的重要研究工具。其中，穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 是透過高能電子束穿透厚度低於 100 奈米的試片，並藉由電子與試片內部結構間不同程度的散射，來進行觀測與分析。試片的厚度、表面平整度，以及在製備過程中所產生的內應力，皆會對最終分析結果產生顯著影響，因此，優良的試片製備技術可說是 TEM 檢測成功的關鍵所在。緣此，敝人受邀擔任《科儀新知》客座主編規劃「先進 TEM 試片製備技術」專題，邀集來自不同領域的學者與專家，分享他們在試片製備技術上的研究成果，以進一步促進奈米尺度分析儀器的應用與發展。

這期我們特別邀請到亞太地區最大半導體材料檢測公司－閎康科技股份有限公司的謝詠芬董事長，擔任「人物專訪」的嘉賓。透過這次專訪，可深入了解謝董事長如何以大膽決策投資全球最昂貴的檢測設備進行創業，並運用其紮實的學經歷協助客戶解決各式問題，進而贏得國際知名大廠的信任。她更以創新思維打造出公司獨特的 Outsourcing Lab 商業模式，並巧妙地將其與 In-house Lab 檢測做出對比，以市井俗語「站壁」與「正宮」形象比喻，既生動又發人深省，精彩內容值得一讀。

專題內容首先由國立清華大學材料科學工程學系－闕郁倫教授團隊為讀者介紹「穿透式電子顯微鏡試片製備技術：從早期機械加工到現代奈米科技的演進」，其後國立陽明交通大學材料系－鍾采甫助理教授團隊透過「穿透式電子顯微鏡金屬材料試片製備技術」一文介紹傳統樣品的製備技術，包括金屬塊材的切割、金屬薄片試片研磨、雙噴電解拋光機及聚焦氬離子束儀器等步驟，並深入探討每個步驟中可能遇到的困難、製程控制細節及相關問題的可能解決方法。

隨著科學需求與技術創新的相互推動，提升了試片品質與製備效率，亦擴展了 TEM 在材料科學與其他領域的應用研究。國研院國家儀器科技研究中心－蕭健男技術副總監則與團隊共同撰文「會聚型氬離子束減薄拋光系統製備穿透式電子顯微鏡試片應用研究」，說明如何使用氬氣作為工作氣體，以電子碰撞解離氬氣產生氬離子電漿後，氬離子電漿持續掃描樣

品表面，達到試片表面清潔、試片厚度薄化的效果，並優化穿透式電子顯微鏡電子束之穿透品質。國立清華大學工程與系統科學系－陳健群副教授等人則以「整合三維電子斷層與原子針尖分析技術的針狀樣品製備方式」一文說明針狀試片的製備流程，並探討其與傳統 TEM 試片製備方法的差異，如何提升三維原子級顯微分析的精度與可靠性。中央研究院化學研究所－章為皓副研究員團隊，則以「Cryo-TEM 的先進試片製備技術」說明冷凍電子顯微鏡技術為結構生物學研究的關鍵平台，系統性探討試片製備技術的發展歷程與挑戰以及當前試片製備技術的發展狀況，避免目標生物顆粒與空氣－水介面 (air-water interface, AWI) 的接觸以及實現對均勻冰層厚度的精確控制是當前致力的目標。國立陽明交通大學材料科學與工程學系－吳文偉教授與國立聯合大學材料科學工程學系－陳睿遠副教授等人則共同撰文「先進 TEM 試片製備技術：液態穿透式電子顯微鏡試片開發與發展」，介紹其團隊所開發的一體成型液態穿透式電子顯微鏡試片，在厚度、密封性、安裝及應用等面向均優於現行技術，並將此技術應用於氧化鋅奈米線與金－氧化亞銅核殼奈米晶體的生長研究，展示液態穿透式電子顯微鏡在材料科學中的應用潛力。本專題亦邀請業界閎康科技股份有限公司研發中心－陳弘仁處長透過「K-kit－應用於奈米溶液原位電子顯微鏡分析的創新微晶片」介紹創新的微型液池晶片「K-kit」，可利用毛細力快速載入溶液，適用各種 TEM 設備，並可透過濕式負染提升奈米粒子影像對比度，實現高品質之液態樣品電子顯微鏡影像觀測。

期盼透過本期作者群深入淺出的介紹，能激發讀者與產學界夥伴對電子顯微鏡設備的研究興趣與創新思維，攜手推動台灣在科學研究領域的持續競爭力與創新發展。

穿透式電子顯微鏡試片製備技術：從早期機械加工到現代奈米科技的演進

Transmission Electron Microscopy Specimen Preparation Technology: Evolution from Early Mechanical Methods to Modern Nanotechnology

楊子逸、闕郁倫

Tzu-Yi Yang, Yu-Lun Chueh

穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 試片製備是實現高解析度顯微觀察的關鍵技術，其發展歷程反映了材料科學與生物學研究的進步。本文回顧了 TEM 試片製備從早期機械方法到現代奈米技術的演進，分析各階段技術的特點、應用及局限，並介紹當前最先進的冷凍電子顯微鏡 (cryo-EM) 和自動化聚焦離子束 (focused ion beam, FIB) 系統，探討其對科學研究的影響。通過文獻回顧與技術比較，本文旨在為研究人員提供全面的技術參考。

The transmission electron microscopy (TEM) specimen preparation is a critical technology for achieving high-resolution microscopic observations, and its development trajectory mirrors advancements in materials science and biological research. This article reviews the evolution of TEM sample preparation from early mechanical methods to modern nanotechnology, analyzing the characteristics, applications, and limitations of techniques at each stage. It also introduces the state-of-the-art cryo-electron microscopy (cryo-EM) and automated focused ion beam (FIB) systems, exploring their impact on scientific research. Through a literature review and technical comparison, this paper aims to provide researchers with a comprehensive technical reference.

一、引言

穿透式電子顯微鏡 (TEM) 自 1931 年由德國科學家 Ernst Ruska 發明以來，已成為材料科學與生命科學研究不可或缺的工具⁽¹⁾。然而，TEM 的高解析度依賴於試片的厚度，通

常需小於 100 奈米，以允許電子束穿透並生成清晰影像⁽²⁾。試片製備技術的發展直接影響 TEM 的應用範圍與成像質量。本文將系統回顧 TEM 試片製備技術的歷史演進，並介紹當前的前沿方法。

二、早期試片製備技術 (1930s-1960s)

2.1 技術原理與步驟

穿透式電子顯微鏡於 1931 年問世後，試片製備技術的首要目標是將樣品減薄至電子束可穿透的厚度 (< 100 奈米)。早期技術依賴機械研磨與拋光，其原理基於物理摩擦與磨料移除材料。該方法適用於金屬 (如銅、鐵) 與礦物 (如石英) 等硬質樣品，因其結構穩定，能承受機械加工的應力⁽³⁾。

具體步驟包括：首先，使用粗砂紙 (粒度約 100–200 目) 將樣品從毫米級減薄至約 100–200 微米，形成初始薄片；接著，換用細砂紙 (粒度 400–1000 目) 與研磨劑 (如氧化鋁懸浮液) 進一步減薄至數十微米；最後，通過手工拋光 (使用軟布與細粒磨料) 嘗試達到數微米厚度⁽⁴⁾。部分研究者將薄片置於電解液中進行最終減薄，利用電化學腐蝕移除表面材料，期望獲得更薄的區域⁽²⁾。完成後，試片置於 TEM 樣品架上觀察。

2.2 技術限制

機械研磨的簡單性掩蓋了其諸多缺陷。首先，厚度控制極為困難，因手工操作無法精確監控減薄過程，試片常厚達數微米，超出電子穿透範圍 (約 50–100 奈米)，導致影像模糊或無法成像。其次，研磨過程引入的機械應力易造成表面劃痕、裂紋或晶體變形，這些偽影在 TEM 中放大，干擾結構分析⁽⁴⁾。此外，該方法對樣品均勻性要求高，若初始樣品不平整，加工後的厚度差異更大，僅邊緣偶爾達到可觀察厚度，效率低下。對於軟質或脆性材料 (如生物樣品或某些合金)，機械加工常導致樣品破碎，應用範圍受限。

2.3 修正方法

為克服上述限制，科學家嘗試多種修正策略。化學輔助減薄是一種常見改進，利用酸性溶液 (如硝酸或磷酸) 腐蝕金屬表面，進一步減薄試片並平滑表面。然而，腐蝕速率難以控制，且僅適用於耐腐蝕材料，對非金屬樣品無效⁽²⁾。另一修正為雙面研磨，通過同時加工樣品兩側提高均勻性，但仍無法避免應力損傷。部分研究者引入低速拋光，使用低轉速設備與超細磨料 (如鑽石粉) 減少熱與機械損傷，卻大幅延長加工時間 (數小時至數天)⁽⁵⁾。這些修正雖略有改善，但未能根本解決精度與損傷問題，促使後續離子研磨 (ion milling) 技術的發展。

三、離子研磨時代 (1960s-1980s)

隨著材料科學的發展，對高品質試片的需求日益增加，離子研磨技術於 1960 年代應運而生。該方法利用加速的離子束 (通常為氬離子) 轟擊樣品表面，通過濺射作用逐漸移除材料，直至試片厚度達到電子可穿透的程度⁽⁶⁾。與機械研磨相比，離子研磨的優勢在於能夠實現更高的均勻性和可控性，試片厚度可精確至數十奈米，適用於金屬、陶瓷甚至部分半導體材料。

離子研磨的典型流程包括：首先將樣品機械預減薄至約 50 微米，然後置於離子研磨機中，通過雙面離子束轟擊逐漸減薄至穿孔狀態。穿孔邊緣的極薄區域即為 TEM 觀察的理想部位。隨著技術進步，1970 年代的離子研磨設備引入了低溫冷卻系統，減少了離子轟擊產生的熱損傷。此外，角度可調的離子束設計進一步提高了加工效率與試片質量⁽⁷⁾。

然而，離子研磨並非完美無缺。其加工時間通常長達數小時，且離子束可能在樣品表面引入非晶層或微小損傷，影響高解析度成像。此外，對於複雜結構的奈米材料，離子研磨的非選擇性加工難以滿足需求。這些問題推動了下一代技術—聚焦離子束的發展。

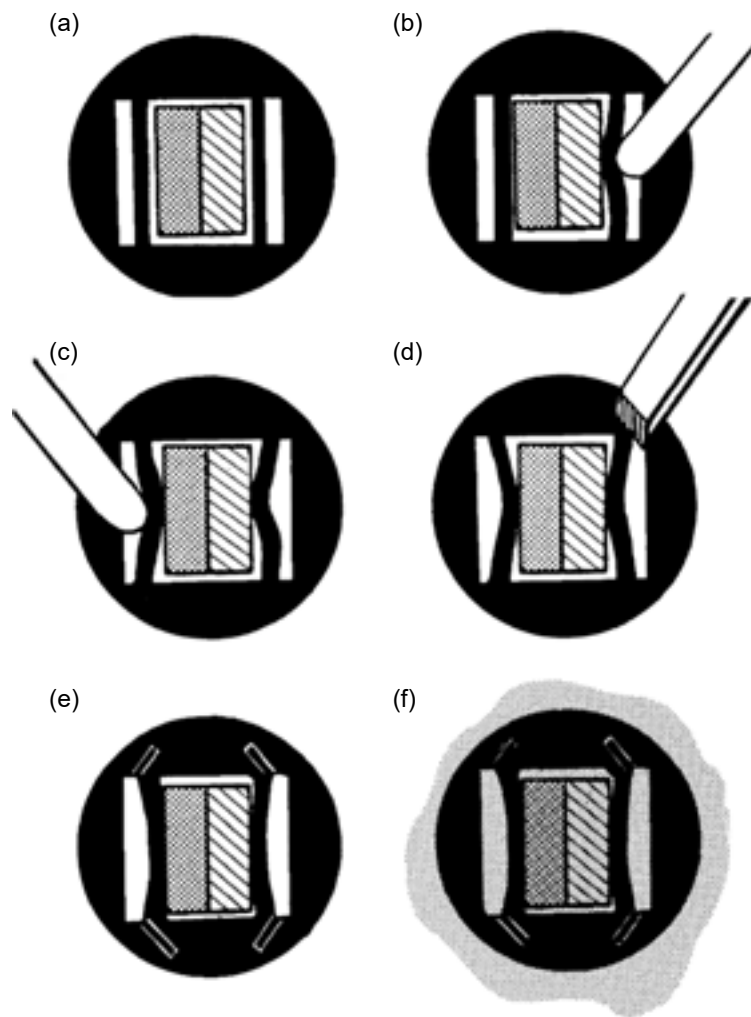


圖 1. 離子研磨製作 TEM 樣品步驟：(a) 大約 $1.5 \times 3 \times 0.5 \times 0.5$ mm 的小材料條邊緣相對、面對面地放置在鈦網格的大矩形孔中。(b) 和 (c) 鈦網格由鑷子支撐，一個小圓形的螺絲刀形工具插入鈦網格中的每個小矩形槽中，並扭動以變形兩槽之間的薄鈦帶。這樣可以通過將兩塊樣品材料壓緊來固定樣品的位置。(d) 和 (e) 一個第二個形狀像鑿刀的小工具在所示位置壓入鈦網格，以增強網格對樣品材料的支撐。(f) 包含樣品材料的網格現在浸入一滴 M-Bond 610 環氧樹脂或等效物中，並將樣品放置在烤箱中以使環氧樹脂固化。⁽⁷⁾

四、聚焦離子束技術的突破 (1990s-2000s)

4.1 FIB 技術的出現與發展背景

進入 1990 年代，隨著奈米科技和半導體產業的迅速發展，傳統的離子研磨技術已無法滿足對試片製備在空間精度和選擇性上的更高要求。聚焦離子束 (FIB) 技術應運而生，成為 TEM 試片製備的一次革命性突破。FIB 最初於 1980 年代作為半導體加工的微細修復工具被開發，但其在試片製備中的潛力很快被材料科學家發現並廣泛應用⁽⁸⁾。

FIB 技術的核心在於利用聚焦的離子束精確移除材料，從而在樣品中特定區域製備出厚度僅數十奈米的薄片。這一能力使其成為研究奈米結構 (如半導體器件、奈米線和複合材料) 的理想工具。到 2000 年代，FIB 系統進一步整合了掃描電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM)，實現了即時觀察與加工的結合，大幅提升了試片製備的效率與精度⁽⁹⁾。

4.2 FIB 的離子束物理機制

FIB 技術的基礎是離子束與材料的相互作用，其物理機制涉及離子濺射、能量轉移與材料移除等多個過程。以下是其詳細原理：

1. 離子源與聚焦

FIB 系統通常使用液態金屬離子源 (liquid metal ion source, LMIS)，以鎵 (Ga) 為主要離子材料。鎵在高電場作用下從針尖蒸發並電離，形成高密度的離子流。這些離子隨後通過靜電透鏡系統聚焦成直徑小至數奈米的離子束，提供極高的空間解析度⁽¹⁰⁾。

2. 離子－固體相互作用

當高能鎵離子 (通常加速至 5–50 keV) 撞擊樣品表面時，其動能轉移至目標原子，引發一系列物理效應。主要過程包括：

- 濺射 (sputtering)：離子撞擊使樣品表面原子獲得足夠能量脫離晶格，形成材料移除的主要機制。濺射效率取決於入射角度、離子能量及目標材料的原子序數⁽¹¹⁾。
- 離子植入 (ion implantation)：部分鎵離子未引發濺射，而是嵌入樣品表層，形成非晶層或化學污染。
- 次級效應：離子撞擊還會產生次級電子和熱效應，對 SEM 成像或樣品損傷有一定影響。

3. 加工控制

FIB 系統通過調整離子束電流 (pA 至 nA 範圍) 和掃描模式實現精細加工。低電流用於精確減薄，高電流則用於快速移除大體積材料。這種靈活性使 FIB 能從微米級粗加工過渡到奈米級精加工，滿足 TEM 試片的嚴格要求⁽¹²⁾。

4.3 FIB 在 TEM 試片製備中的應用流程

圖 2 展示了使用聚焦離子束技術製備 TEM 試片的標準流程，特別針對平面視角 (plan-view) 樣品，如二維薄膜材料。該流程利用高精度的鎵離子束 (Ga^+) 進行奈米級加工，確保試片厚度達到電子穿透要求 (通常 < 100 奈米)，同時保留檢測區域 (region of interest, ROI) 的結構完整性。以下根據文獻⁽¹³⁾ 及相關研究 2 詳細描述圖 2 中 FIB 製備 TEM 試片的步驟，並闡明各階段的技術細節與注意事項。

1. 樣品選擇與定位

此步驟旨在精確識別樣品中的檢測區域。使用光學顯微鏡或掃描電子顯微鏡觀察樣品表面，確定需要分析的特定區域，例如半導體中的電路結構、奈米材料中的缺陷或二維材料(如石墨烯)的晶界。在圖 2(a) 中，這一步通常表現為樣品表面的初始影像，標記出 ROI 的具體位置。為確保後續加工的準確性，操作者需校準 FIB 系統的成像功能，並記錄 ROI 的座標。對於二維薄膜材料，需特別注意避免因過度曝光而損壞脆弱的表面結構。

2. 保護層沉積

為保護 ROI 免受離子束轟擊的損傷，需在樣品表面沉積一層保護層。圖 2(b) 中顯示一層均勻的鉑 (Pt) 或碳 (C) 保護層，通過離子束誘導沉積 (ion beam-induced deposition, IBID) 技術形成。具體方法是利用 FIB 系統中的氣體注入系統 (GIS)，將前驅物氣體 (如有機鉑化合物) 噴射至 ROI 表面，離子束引發化學反應形成沉積層。保護層厚度通常為 0.5–2 微米，視樣品性質而定。

3. 粗加工與切割

在 ROI 兩側使用高電流離子束 (通常 1–30 nA) 進行粗加工，挖掘出 U 形槽，形成厚度約 1–2 微米的薄片 (lamella)。圖 2(c) 中展示 U 形槽的形成過程，顯示離子束從樣品表面兩側逐步移除材料，留下中間的薄片結構。此步驟需精確控制離子束的掃描路徑與劑量，以避免過度移除或損壞 ROI。

4. 精細減薄

粗加工後，薄片厚度仍過高，需進一步減薄至 TEM 觀察所需的 50–100 奈米。圖 2(d-f) 顯示離子束以低電流 (50–500 pA) 逐漸掃描薄片兩側，逐步移除材料直至達到目標厚度。為確保均勻性，操作者需不斷監控 SEM 影像，並調整離子束角度 (通常為 1–2° 傾斜) 以修整邊緣。使用低能量離子束 (< 5 keV) 可減少非晶層形成，提升試片品質。

5. 提取與轉移

最後，將減薄後的薄片從樣品中提取並轉移至 TEM 樣品架。圖 2(g-o) 展示奈米操作器 (*in-situ* lift-out) 或外部轉移過程，其中薄片被微探針拾取並固定至銅或鉬製的 TEM 試片承載環。文獻⁽¹³⁾ 描述了一種針對二維材料的改良提取技術，通過優化探針與薄片的接觸方式，降低機械應力與污染風險。轉移後，薄片需檢查是否平整並無損傷，以確保 TEM 觀察的可靠性。此步驟後可重複執行步驟 4 精細減薄 TEM 試片。

4.4 FIB 技術的優勢

相較於之前的機械研磨和離子研磨，FIB 技術帶來了以下突破：

1. 高空間精度：離子束聚焦至奈米級，允許從微小區域 (如單個奈米顆粒) 製備試片。
2. 選擇性加工：能針對特定結構進行加工，避免傳統方法對周邊區域的破壞。
3. 多功能性：FIB 不僅用於試片製備，還可用於表面修飾、斷面分析和微加工，擴展了其應用範圍⁽¹⁴⁾。

這些特性使 FIB 成為半導體失效分析、金屬合金研究和奈米材料表徵的標準工具。例如，在 1990 年代後期，FIB 成功應用於解析積體電路的奈米級缺陷，推動了電子產業的技術進步⁽¹⁵⁾。

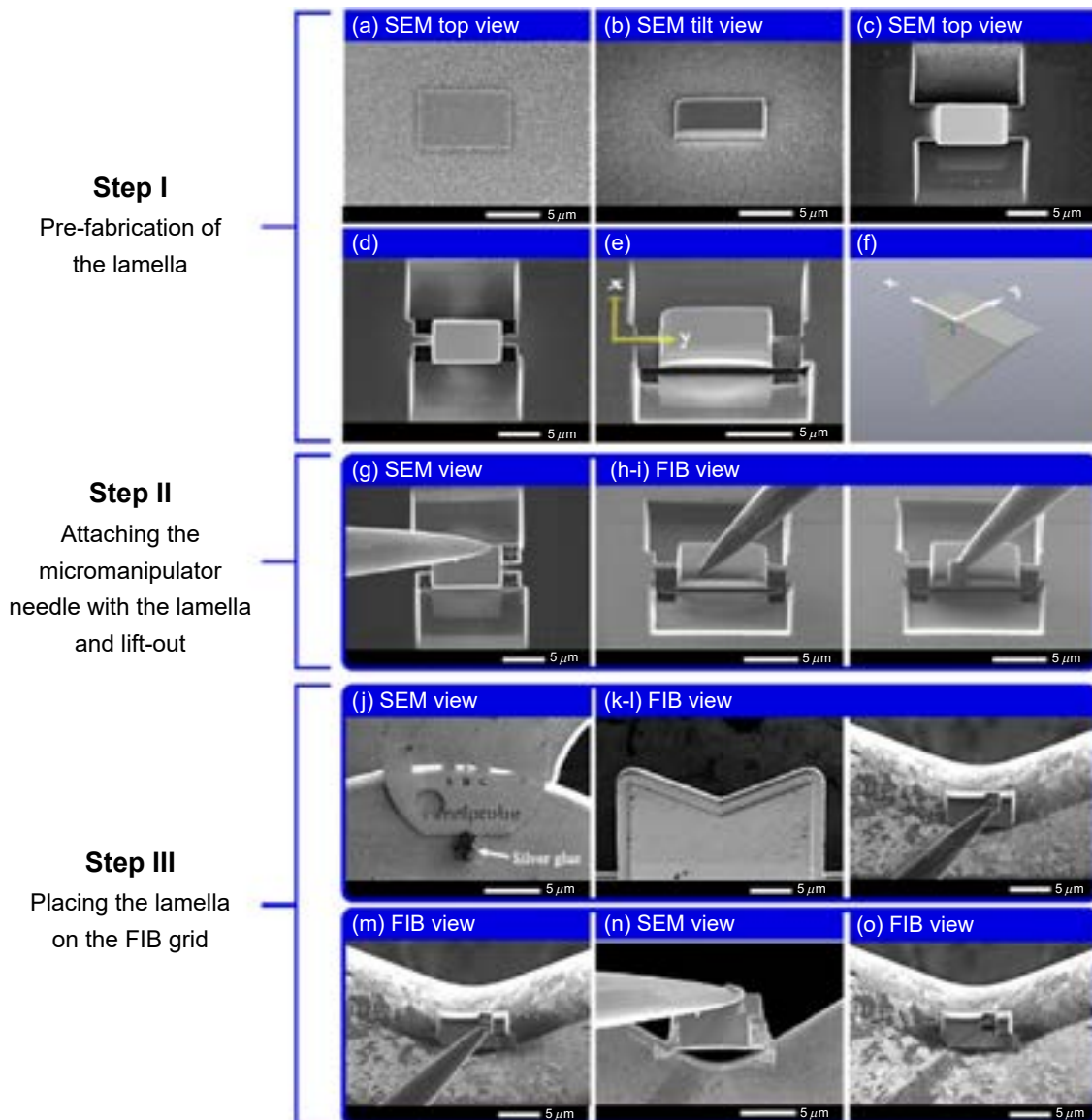


圖 2. FIB 製作 TEM 樣品示意圖。(13)

4.5 技術挑戰與改進

儘管 FIB 技術極具優勢，但其應用中也面臨若干挑戰：

1. 離子束損傷

高能鎢離子可能在試片表面引入非晶層或鎢植入，改變樣品的原子結構。這種損傷在高解析度 TEM (HRTEM) 中尤為明顯，對晶格影像的分析構成干擾⁽¹⁶⁾。

2. 加工時間與成本

FIB製備需要數小時的精密操作，且設備價格昂貴，限制了其在小規模實驗室中的普及。

3. 熱效應

離子束撞擊產生的局部熱量可能改變敏感材料的性質，如有機物或低熔點合金。

為應對這些問題，研究人員開發了多種改進方法。例如，低能量 FIB (< 5 keV) 被用於最終減薄步驟，以減少非晶層厚度。此外，冷凍 FIB (cryo-FIB) 技術於 2000 年代初興起，將樣品冷卻至液氮溫度，顯著降低熱損傷，特別適用於生物樣品和軟材料⁽¹⁷⁾。同時，FIB 與 SEM 的雙束系統 (dual-beam FIB/SEM) 整合，使研究人員能在加工過程中即時監控樣品狀態，進一步提高製備質量。

五、現代試片製備技術 (2010s 至今)

進入 21 世紀第二個十年，穿透式電子顯微鏡試片製備技術在奈米科技、自動化與跨學科需求的推動下實現了顯著進展。現代技術不僅提高了試片的精度與效率，還滿足了材料科學與生命科學對複雜樣品分析的需求。本節將詳細介紹三種代表性方法：超薄切片技術、冷凍電子顯微鏡 (cryo-EM) 試片製備，以及自動化聚焦離子束－掃描電子顯微鏡 (FIB-SEM) 系統，並深入剖析其技術原理與應用。

5.1 超薄切片技術與生物樣品製備

5.1.1 技術原理

超薄切片技術主要用於製備生物樣品 (如細胞、組織) 或軟質聚合物樣品，其目標是將樣品切割成厚度約 30–100 奈米的薄片，以滿足 TEM 電子束穿透的要求。該技術的核心設備是超薄切片機 (ultramicrotome)，配備鑽石刀或玻璃刀，在精確控制的條件下進行切割⁽¹⁸⁾。

圖 3 展示了利用超薄切片技術 (ultramicrotomy) 製備生物樣品試片的完整流程，該流程旨在將生物樣品 (如細胞或組織) 加工成厚度約 30–100 奈米的薄片，以滿足穿透式電子顯微鏡 (TEM) 的電子束穿透要求。⁽¹⁹⁾

1. 樣品固定

生物樣品 (如組織或細胞) 首先經過化學固定，以穩定其結構，防止後續處理中的降解或變形。常用的固定劑包括戊二醛 (2.5% 溶液, pH 7.4) 或福爾馬林，這些試劑通過交聯蛋白質分子保持細胞超微結構的完整性。圖 3(a) 展示一個組織塊或細胞懸浮液置於固定劑溶液中的示意圖，可能顯示樣品浸泡於試劑瓶內，旁邊標註「戊二醛固定」或「福爾馬林固定」。固定時間通常為 1–2 小時，視樣品大小而定。過度固定可能導致結構硬化，影響後續切割。

2. 脫水與包埋

固定後的樣品需脫水以移除水分，隨後包埋於樹脂中形成硬化塊體。脫水過程使用乙醇或丙酮的濃度梯度 (50%、70%、90%、100%)，每次浸泡 10–15 分鐘。隨後，樣品滲透於環氧樹脂 (如 Epon 812) 或丙烯酸樹脂 (如 Lowicryl) 中，並在 60 °C 下聚合固化，形成硬化塊體。圖 3(b) 展示脫水與包埋流程，可能以一系列試管表示乙醇濃度梯度，隨後顯示樣品置於樹脂模具中，標註「脫水」和「樹脂包埋」。模具中硬化的樣品塊以截面圖呈現，顯示均勻的樹脂包圍樣品。樹脂選擇取決於樣品性質，例如環氧樹脂適用於常規組織，丙烯酸樹脂適用於免疫標記研究。

3. 修塊與切割

圖 3(c) 展示硬化塊體修整成梯形或錐形尖端，以減少切割面積並提高精度。修整後的塊體固定於超薄切片機 (如 Leica EM UC7) 上，使用鑽石刀或玻璃刀以 1–6° 的切割角度和

0.1–1 mm/s 的速度進行切割，生成連續的超薄切片 (厚度 30–100 奈米)。圖 3(d) 展示超薄切片機的工作場景，顯示鑽石刀切割樹脂塊的放大視圖，切片從刀口滑出並漂浮於水槽表面。鑽石刀的鋒利度與切割參數 (如速度和角度) 直接影響切片質量，需精確控制以避免刀痕或樣品變形。

4. 切片收集與後處理

切割生成的薄片漂浮於超薄切片機的水槽表面，使用銅網 (通常 200 目，覆有碳膜或 Formvar 膜) 小心撈起並乾燥。為增強 TEM 成像的對比度，切片通常以鈾醋酸 (2% 溶液，染色 5–10 分鐘) 和鉛檸檬酸 (0.4% 溶液，染色 2–5 分鐘) 進行染色，增強細胞器或蛋白質結構的電子密度。染色劑選擇需根據樣品特性調整，例如鈾醋酸增強核酸對比度，鉛檸檬酸增強膜結構對比度。

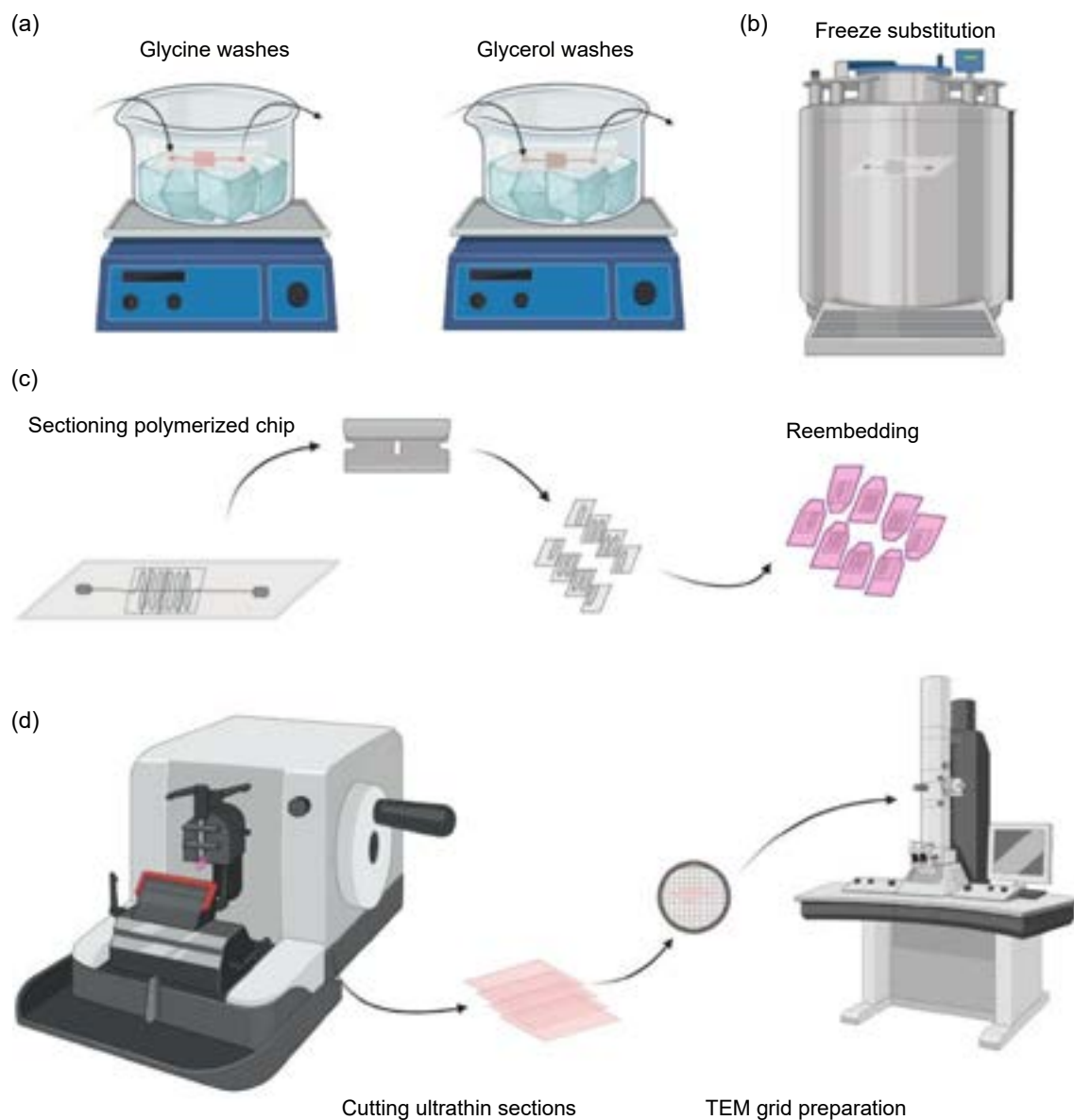


圖 3. 生物樣品製備示意圖。⁽¹⁹⁾

5.1.2 現代進展

近年來，自動化超薄切片系統 (如 Leica EM UC7) 的發展顯著提高了製備效率與一致性。這些設備配備數位控制系統，能精確調節切片厚度 (最小至 15 奈米) 並自動收集切片，減少人為誤差。此外，低溫切片技術 (cryo-ultramicrotomy) 結合液態氮冷卻，使樣品在 -120°C 以下切割，適用於未固定的冷凍樣品，為冷凍電子顯微鏡提供了基礎⁽²⁰⁾。

5.1.3 應用與局限

超薄切片技術在細胞超微結構研究中應用廣泛，例如觀察線粒體或內質網的細節。然而，該方法對樣品硬度要求較高，且切割過程可能引入機械應力或刀痕偽影，影響高解析度成像。

5.2 冷凍電子顯微鏡試片製備

5.2.1 技術原理

冷凍電子顯微鏡試片製備旨在保持生物樣品的天然狀態，避免傳統固定與脫水過程中的結構損壞。其核心技術是快速冷凍 (vitrification)，將樣品瞬間冷卻至玻璃態 (非晶態冰)，防止冰晶形成破壞分子結構⁽²¹⁾。

具體步驟如下：

1. 樣品懸浮與塗布：將含蛋白質或細胞的懸浮液滴加至穿孔碳膜銅網上。
2. 吸液與冷凍：使用濾紙吸去多餘液體，留下薄層液膜 (厚度約 20–100 奈米)，隨即將銅網浸入液態乙烷 (-183°C)，冷卻速率達 10^6°C/s 以上，使水分子來不及結晶而形成玻璃態冰。
3. 低溫轉移與觀察：冷凍樣品在液態氮 (-196°C) 環境下轉移至 TEM，並在低溫樣品台 (約 -175°C) 上觀察⁽²²⁾。

5.2.2 技術細節與進展

快速冷凍的成功依賴於精確控制液膜厚度與冷卻速率。現代設備 (如 FEI vitrobot) 引入自動化吸液與冷凍系統，可調節濕度、溫度與吸液時間，確保試片一致性。此外，近年開發的「冷凍聚焦離子束 (cryo-FIB)」技術能在冷凍狀態下減薄樣品，適用於較厚的細胞樣品⁽²³⁾。

5.2.3 應用與影響

冷凍電子顯微鏡在結構生物學中實現了革命性突破，例如 2017 年解析的 TRPV1 離子通道結構 (分辨率達 $3.4\text{ \AA}$) 展示了其能力⁽²⁴⁾。該技術的普及得益於直接電子探測器與圖像處理軟體 (如 RELION) 的進步，使其成為研究蛋白質複合體與病毒結構的主流方法。然而，設備成本高與操作複雜性仍是其推廣的障礙。

5.3 自動化 FIB-SEM 系統

5.3.1 技術原理：聚焦離子束 (FIB) 的物理機制

聚焦離子束技術利用高能離子束 (通常為鎵離子， Ga^+) 對樣品進行精確切割與減薄，其物理機制基於離子－固體相互作用⁽²⁾。

- 離子束生成與聚焦：液態金屬離子源 (LMIS) 通過高壓電場 (約 30 keV) 從鎢金屬尖端提取離子，經靜電透鏡聚焦成直徑約 5–10 奈米的離子束。
- 濺射過程：高能鎢離子撞擊樣品表面，通過動量轉移將表面原子逐出，形成濺射效應。濺射速率與入射角度、離子能量及樣品材料有關，例如在 45° 入射角下，矽的濺射產率約為 2–3 原子 / 離子⁽²⁵⁾。
- 試片製備流程：FIB首先在樣品表面切割出矩形溝槽，暴露目標區域；隨後通過「lift-out」技術將薄片提取並焊接至銅網上；最後以低能量離子束 (5–10 keV) 精細減薄至 50 奈米以下⁽²⁶⁾。

5.3.2 自動化 FIB-SEM 整合

自動化 FIB-SEM 系統結合 FIB 的切割能力與 SEM 的成像功能，實現連續試片製備與三維重建。工作流程如下：

1. 層層切割：FIB 以固定間隔 (通常 5–20 奈米) 逐層移除樣品表面。
2. 即時成像：SEM 同步對每層暴露面進行高分辨率成像，生成數千張二維影像。
3. 三維重建：通過軟體 (如 ImageJ 或 Amira) 將影像堆疊，重建成樣品的完整三維結構⁽²⁷⁾。

5.3.3 現代進展與應用

近年，FIB-SEM 系統引入了多束離子源 (如氬離子) 與冷凍兼容性，提升了加工速度並減少了離子損傷。例如，Thermo Fisher 的 Helios G4 系統能在數小時內完成微米級樣品的三維成像⁽²⁸⁾。該技術在材料科學中用於分析奈米複合材料的界面結構，在生命科學中則揭示了細胞器如高爾基體的空間分佈⁽²⁹⁾。然而，鎢離子植入與高成本仍是其挑戰，低能量 FIB 與後處理技術 (如氬離子拋光) 正逐步解決這些問題。

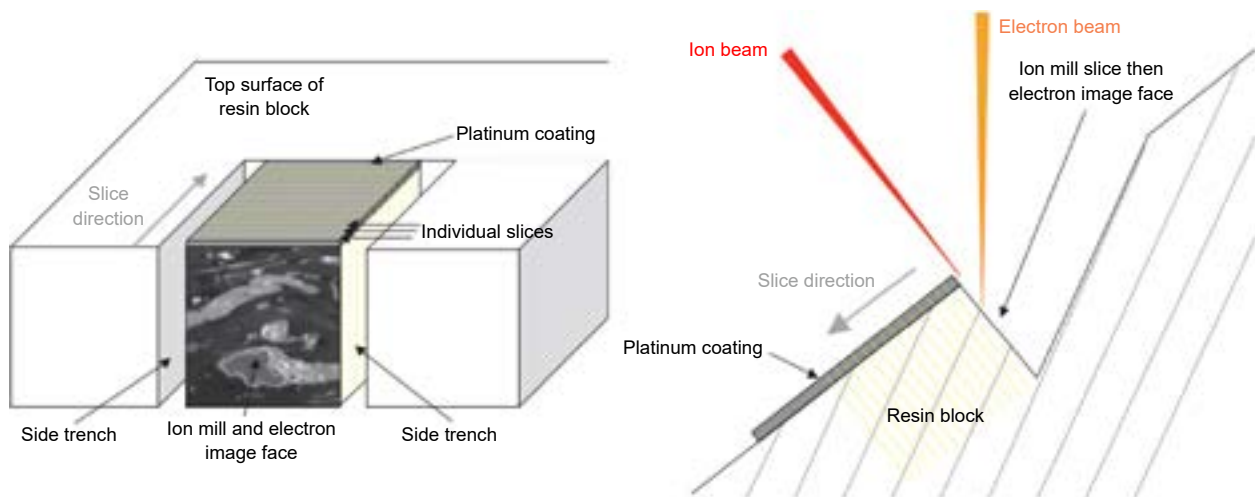


圖 4. 聚焦離子束掃描電子顯微鏡三維結構成像示意圖。⁽²⁸⁾

六、技術比較與未來展望

6.1 方法比較

穿透式電子顯微鏡試片製備技術的發展歷程中，不同方法在加工精度、適用範圍和操作

難度上各有特色。以下對主要技術進行系統比較，並分析其優勢與局限性。

機械研磨與拋光是 TEM 試片製備的起點，因其設備簡單、成本低廉而廣泛應用於早期研究。該方法適用於金屬、礦物等硬質材料，但厚度控制依賴手工操作，難以達到奈米級精度，且加工過程中易引入表面缺陷⁽³⁾。其加工時間通常為數小時，但效率低且試片質量不穩定，限制了其在現代高解析度 TEM 中的應用。

離子研磨在 1960 年代成為主流技術，利用氬離子束濺射減薄樣品，能製備出厚度均勻的試片（約 20–100 奈米），適用於金屬、陶瓷和部分半導體材料⁽⁶⁾。相較於機械方法，離子研磨提高了精度與可重複性，但加工時間長（數小時至數十小時），且可能在樣品表面引入非晶層或熱損傷，影響奈米結構的觀察⁽⁷⁾。此外，其非選擇性加工特性使其難以應用於特定區域的精細分析。

聚焦離子束技術於 1990 年代問世，利用鎢離子束實現奈米級精確加工，能從樣品特定區域製備出厚度低至 10 奈米的試片⁽²⁾。FIB 的高定位能力使其在半導體、奈米材料和複合材料研究中表現出色。然而，FIB 設備成本高昂（數百萬美元），且加工過程中可能引入鎢離子污染或局部損傷，需額外的低能量後處理來減輕影響⁽²⁶⁾。加工時間通常為數十分鐘至數小時，視樣品複雜度而定。

超薄切片技術主要服務於生物樣品製備，通過冷凍或樹脂包埋後切割出厚度約 30–80 奈米的切片⁽¹⁹⁾。該方法能保持生物結構的完整性，但在硬質材料上無用武之地。自動化切片系統的引入縮短了製備時間（數小時），但設備操作複雜且成本較高（數十萬美元）。

冷凍電子顯微鏡試片製備是當前生物學研究的尖端技術，通過快速冷凍將樣品固化於玻璃態水中，避免傳統固定與脫水帶來的損傷⁽²¹⁾。cryo-EM 試片厚度通常為 50–200 奈米，適用於蛋白質、細胞等軟質樣品。其製備時間短（數分鐘至數小時），但需要昂貴的冷凍設備（如液態乙烷冷卻系統）與高真空 TEM，總成本可能超過數百萬美元。

自動化 FIB-SEM 系統結合 FIB 與掃描電子顯微鏡 (SEM)，實現連續切割與三維成像，試片厚度可精確至數奈米⁽²⁷⁾。該技術適用於材料與生命科學的複雜結構分析，但設備價格極高（數百萬美元），且加工時間隨三維重建需求增加而延長（數小時至數天）。

為直觀展示各方法的差異，以下提供技術參數比較表：

表 1. TEM 試片製備技術參數比較。

技術方法	加工時間	設備成本 (美元)	試片厚度 (奈米)	適用材料	主要優勢	主要局限
機械研磨 與拋光	數小時	數百至數 千	數百至數 千	金屬、礦物	簡單、低成本	精度低、易損傷
離子研磨	數小時至 數十小時	數萬至數 十萬	20–100	金屬、陶瓷、半 導體	均勻性好	時間長、可能引 入非晶層
聚焦離子 束 (FIB)	數十分鐘 至數小時	數百萬	10–50	奈米材料、半導 體、複合材料	高精度、定位能 力強	成本高、離子污 染
超薄切片	數小時	數十萬	30–80	生物樣品	保持生物結構	僅限軟質材料、 操作複雜
cryo-EM 試片製備	數分鐘至 數小時	數百萬	50–200	蛋白質、細胞	接近生理狀態	設備昂貴、技術 要求高
自動化 FIB-SEM	數小時至 數天	數百萬	5–50	材料與生物複雜 結構	三維重建能力	成本極高、加工 時間長

備註：加工時間與成本依樣品性質與設備型號有所變動，表中數據為典型範圍。

從表 1 可見，各技術的選擇需根據研究目標與樣品特性權衡。例如，材料科學家在分析奈米結構時可能優先選擇 FIB，而結構生物學家則傾向於 cryo-EM。成本與效率的平衡也是實際應用中的重要考量。

6.2 未來趨勢

TEM 試片製備技術的未來發展將圍繞精度、效率與低損傷三大方向展開，以下為幾個潛在趨勢：

1. 低損傷技術的進步

TEM 試片製備中的離子束損傷 (如非晶層與離子植入) 限制了高解析度成像的品質，推動低損傷技術的發展。當前，低能量離子束 ($< 5 \text{ keV}$) 已顯著減少銻離子植入與熱效應，特別在聚焦離子束 (FIB) 最終減薄階段效果顯著⁽¹⁶⁾。惰性氣體 (如氬或氫) 離子源的應用進一步降低化學污染，提升試片純度，適用於半導體與奈米材料分析。近年，雷射輔助減薄技術嶄露頭角，利用非接觸式光熱效應移除材料，避免機械應力與熱損傷，特別適合軟材料與生物樣品。冷凍 FIB 技術也在低溫環境下加工，保護熱敏結構，成為結構生物學的潛力工具⁽³⁰⁾。未來，結合低能量離子束與雷射技術的混合系統可望實現近乎無損的奈米級加工，進一步提升 TEM 在原子尺度研究的精確性。這些進展將擴展試片製備的材料範圍，推動奈米科技與生命科學的交叉應用。

2. 自動化與智能化

自動化技術已革新 TEM 試片製備流程，未來智能化將進一步提升效率與一致性。當前，自動化超薄切片機與 FIB-SEM 系統通過數位控制實現精確加工，減少人為誤差，如 Leica EM UC7 可自動調節切片厚度至 15 奈米⁽²⁰⁾。人工智能 (artificial intelligence, AI) 的引入正改變試片製備模式，基於機器學習的 FIB 加工系統能根據樣品特性自動優化離子束參數 (如角度、電流)，縮短加工時間並提高試片品質⁽³¹⁾。例如，AI 可識別樣品缺陷並調整加工路徑，避免損傷關鍵結構。智能化還體現在數據處理，如自動化三維重建軟體 (Amira) 能快速處理 FIB-SEM 生成的影像，提升分析效率。未來，AI 與自動化設備的深度整合將實現高通量試片製備，適用於大規模研究。這些技術的普及將降低操作門檻，使中小型實驗室也能參與尖端 TEM 研究，推動材料與生物科學的進展。

3. 臨場製備與觀察

臨場試片製備與觀察技術 (*in situ* TEM specimen preparation) 是一種將聚焦離子束 (FIB) 與穿透式電子顯微鏡 (TEM) 整合的先進方法，允許在顯微鏡內直接加工樣品並即時觀察其微觀結構，避免傳統試片製備中樣品轉移可能導致的損壞或污染。該技術的核心在於利用 FIB 的高精度奈米加工能力，直接在 TEM 的樣品台上切割、減薄或修整樣品，同時透過 TEM 的電子束進行即時成像，從而實現動態過程的連續觀察。在臨場系統中，FIB 與 TEM 的真空腔整合，樣品台可精確移動與旋轉，確保加工與成像無縫銜接。這種集成系統 (如 FEI Helios NanoLab 與 Tecnai TEM 的結合) 不僅提高了試片製備的效率，還允許研究人員在奈米尺度下觀察動態過程，例如材料變形、相變或生物樣品的化學反應。⁽³²⁾

4. 多模態技術整合

多模態技術整合是 TEM 試片製備的未來趨勢，旨在結合多種方法以滿足複雜樣品分析需求。冷凍 FIB 與冷凍電子顯微鏡的融合是典型案例，cryo-FIB 在低溫下減薄細胞樣品，cryo-EM 則解析其天然結構，已在膜蛋白與病毒研究中展現潛力⁽³¹⁾。另一整合方向是 FIB 與掃描電子顯微鏡結合，實現三維結構重建，適用於奈米複合材料與細胞器分析⁽²⁷⁾。此外，FIB-SEM 系統可進一步整合 X 射線光譜 (X-ray absorption spectroscopy, XAS) 或電子能量損失譜 (electron energy loss spectroscopy, EELS)，提供結構、化學成分與電子態的綜合信息。未來，雷射輔助加工與離子研磨的結合將實現快速粗加工與精細減薄的無縫銜接，適用於多尺度分析。這些多模態系統將拓展 TEM 的應用範圍，從基礎研究到工業應用，促進跨學科突破，但需克服設備複雜性與成本挑戰。

5. 成本降低與普及化

TEM 試片製備技術的成本高昂 (設備動輒數百萬美元) 限制了其普及，未來降低成本與模組化設計將推動技術民主化。當前，模組化冷凍系統 (如小型液態乙烷冷卻器) 已降低 cryo-EM 的入門門檻，部分設備價格降至數十萬美元。低成本離子研磨機的開發也使中小型實驗室能進行高品質試片製備⁽³⁰⁾。未來，開源軟體與標準化製備流程的推廣將降低操作與維護成本，如 ImageJ 等免費工具已廣泛用於 FIB-SEM 數據處理⁽²⁷⁾。小型化 FIB 系統的研發將進一步壓縮設備體積與價格，保留核心功能。這些進展將使 TEM 技術從頂尖研究機構擴展至教育與中小企業應用，促進新材料開發與生物醫學研究的普及。同時，國際合作與技術共享也將加速成本下降，推動全球 TEM 研究的均衡發展。

七、結論

穿透式電子顯微鏡試片製備技術的演進，從早期機械研磨的粗糙操作到現代奈米級精密加工，體現了科學需求與技術創新的相互推動。機械研磨奠定了基礎，但精度不足；離子研磨提高了均勻性，卻受限於加工時間與損傷；聚焦離子束技術實現奈米級定位，拓展了半導體與奈米材料研究；超薄切片與冷凍電子顯微鏡則為生物學開啟了接近生理狀態的觀察窗口；自動化 FIB-SEM 系統進一步實現三維結構重建，滿足跨學科需求。這些技術的突破不僅提升了試片品質與製備效率，還擴展了 TEM 在材料科學與生命科學中的應用邊界。未來，隨著低損傷技術、自動化、臨場觀察及多模態整合的進展，試片製備將更高效、低成本，並進一步融入人工智能與冷凍技術，推動基礎與應用研究的深度融合，為解析奈米尺度結構與動態過程提供更強大的工具。

參考文獻

1. Ruska, E., *Angewandte Chemie International Edition in English*, **26** (7), 595 (1987).
2. Williams, D. B., & Carter, C. B., *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, Springer (2009).
3. Hirsch, P. B., et al., *Philosophical Magazine*, **1** (7), 677 (1956).
4. Fisher, R. M., *Journal of Applied Physics*, **25** (12), 1529 (1954).
5. Goodhew, P. J., *Practical Metallography*, **1**, 1 (1972).
6. Barna, Á., et al., *Microscopy Research and Technique*, **30** (3), 267 (1999).
7. McCaffrey, J. P., et al., *Preparation of Cross-Sectional TEM Samples for Low-Angle Ion Milling*, *Microscopy Research Technique*, **40** (2), 141 (1998).

8. Orloff, J., et al., *High Resolution Focused Ion Beams: FIB and its Applications*, Springer (2003).
9. Giannuzzi, L. A., & Stevie, F. A., *Introduction to Focused Ion Beams: Instrumentation, Theory, Techniques and Practice*, Springer (2005).
10. Melngailis, J., *Journal of Vacuum Science & Technology B*, **5** (2), 469 (1987).
11. Sigmund, P., *Physical Review*, **184** (2), 383 (1969).
12. Langford, R. M., & Petford-Long, A. K., *Journal of Vacuum Science & Technology A*, **19** (5), 2186 (2001).
13. Amal Al Ghaferi, *Ultramicroscopy*, **235**, 113496 (2022).
14. Volkert, C. A., & Minor, A. M., *MRS Bulletin*, **32** (5), 389 (2007).
15. Phaneuf, M. W., *Micron*, **30** (3), 277 (1999).
16. McCaffrey, J. P., et al., *Ultramicroscopy*, **87** (3), 97 (2001).
17. Marko, M., et al., *Journal of Microscopy*, **222** (1), 42 (2006).
18. Reid, N., *Ultramicrotomy*, Elsevier, (1975).
19. Silvia Pujals, et al., *Applied Nano*, **2** (4), 289 (2021).
20. Al-Amoudi, A., et al., *EMBO Journal*, **23**, 3583 (2004).
21. Dubochet, J., et al., *Quarterly Reviews of Biophysics*, **21** (2), 129 (1988).
22. Nogales, E., & Scheres, S. H. W., *Molecular Cell*, **58** (4), 677 (2015).
23. Marko, M., et al., *Nature Methods*, **4**, 215 (2007).
24. Liao, M., et al., *Nature*, **504** (7478), 107 (2013).
25. Orloff, J., et al., *High Resolution Focused Ion Beams: FIB and its Applications*, Springer (2003).
26. Langford, R. M., & Clinton, C., *Micron*, **35** (7), 607 (2004).
27. Heymann, J. A. W., et al., *Journal of Structural Biology*, **155** (1), 63 (2006).
28. Bushby, A. J., et al., *Nature Protocols*, **6** (6), 845 (2011).
29. Knott, G., et al., *Journal of Neuroscience*, **28** (12), 2959 (2008).
30. Schaffer, M., et al., *Journal of Structural Biology*, **197** (2), 73 (2017).
31. Sreenivas, B., et al., *Microscopy Today*, **32** (6), 13 (2024).
32. Dongqing Liu, et al., *Advanced Materials*, **31** (28), 1806620 (2019).

作者簡介

楊子逸先生現為國立清華大學材料科學工程學系博士班學生。

Tzu-Yi Yang is currently a Ph.D. student in the Department of Materials Science and Engineering at National Tsing Hua University.

闕郁倫先生為國立清華大學材料科學工程學系博士，現為國立清華大學材料科學工程學系講座教授。

Yu-Lun Chueh received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Tsing Hua University. He is currently a Chair Professor in the Department of Materials Science and Engineering at National Tsing Hua University.

穿透式電子顯微鏡金屬材料試片 製備技術

Metallic Transmission Electron Microscope Specimen Preparation

楊唯翌、徐暉翔、蔡涓璇、鍾采甫

Wei-Yi Yang, Wei-Hsiang Hsu, Yu Hsuan Tsai, Tsai-Fu Chung

自工業革命後逐步進入奈米科技時代，科技的發展也從宏觀的世界延伸至微觀尺度，為了探索這些肉眼無法直接觀察的細微結構，人們發明了光學顯微鏡。光學顯微鏡的主要功能是将微小的物體與結構放大成清晰的影像，以利於人們進行觀察與分析。然而，隨著對更細微世界的探索需求逐步增加，傳統的光學顯微鏡逐漸面臨解析度的極限，因而催生了電子顯微鏡的發明。電子顯微鏡利用高速電子束與物質交互作用所產生的多種訊號，來觀察分析材料內部的顯微組織、晶體結構、化學成分，甚至是原子級的精細結構⁽¹⁾。其中，穿透式電子顯微鏡憑藉其卓越的空間解析度及多元分析能力，已成為材料科學、半導體工業、高分子聚合物、多功能氧化陶瓷、生物工程等多種先進材料研究領域中最不可或缺的分析工具之一^(1, 2)。透過穿透式電子顯微鏡的高倍放大能力及強大的結構鑑定技術，研究人員能夠深入探索材料內部的微結構變化、界面特性、缺陷與析出物的形成機制等，進而對材料的性能與應用潛力做出更精確的掌握與評估。穿透式電子顯微鏡的工作原理是利用電子束穿過厚度通常小於 100 奈米的試片，在穿透試片的過程中，電子束會與試片內的原子產生交互作用，進而產生各種電子散射訊號⁽¹⁾。這些散射電子訊號會透過不同類型的電子訊號偵測器加以蒐集，根據不同的散射電子特性進行影像、結構及化學成分分析。此過程凸顯了穿透式電子顯微鏡試片製備的重要性，包括試片的厚度、表面的平整度及試片製作過程所引起的內部應力，都會顯著影響穿透式電子顯微鏡分析的準確性。舉例來說，試片厚度過厚可能導致電子束無法有效穿透，降低影像清晰度；表面不平整可能干擾電子散射訊號，影響影像解析度；而試片製備過程中若產生過多內部應力，則可能影響材料內部的晶格結構分析結果；此外，試片表面若潔淨度不足，也可能會造成影像拍攝之結果不佳。本文將著重於從穿透式電子顯微鏡試片之金屬塊材製備成薄片試片的流程介紹，包括金屬塊材的切割、金屬薄片試片研磨、雙噴電解拋光機及聚焦氬離子束儀器等步驟，並深入探討每個步驟中可能遇到的困難、製程控制細節及相關問題的可能解決方法。期望透過系統性的理論分析與實務實驗經驗討論，提供研究人員在進行穿透式電子顯微鏡分析時更為可靠且精確的試片製備指引，進一步提升穿透式電子顯微鏡分析的品質與研究成果的可靠性。

The evolution of nanotechnology has progressively shifted scientific inquiry from macroscopic observation to the atomic scale. Optical microscopy initially enabled visualization of structures beyond the resolution of the naked eye; however, its intrinsic resolution limit prompted the advent of electron microscopy. By utilizing high-energy electron beams and their interactions with matter, electron microscopy facilitates high-resolution characterization of microstructures, crystallographic orientations, chemical compositions, and atomic-scale features. Among various electron microscopy techniques, transmission electron microscopy (TEM) is particularly distinguished by its superior spatial resolution and analytical versatility. TEM has become indispensable in diverse scientific domains including materials science, semiconductors, polymers, advanced ceramics, and biomedical engineering. It enables detailed investigations of microstructural evolution, interface phenomena, defect dynamics, and precipitation mechanisms, thereby supporting the development of structure-property relationships. The fundamental operation of TEM involves the transmission of an electron beam through an ultrathin specimen (< 100 nm). The interaction between the incident electrons and the specimen generates scattering signals, which are subsequently captured by detectors to produce high-resolution images and analytical data. Given the sensitivity of TEM to sample condition, specimen preparation is of paramount importance. Critical factors such as thickness uniformity, surface integrity, contamination, and residual stress introduced during preparation can substantially affect the fidelity of imaging and interpretation. This study presents a comprehensive methodology for preparing TEM specimens from bulk metallic materials. Key steps including cutting, polishing and lapping, twin-jet electro-polishing, and low-energy ion milling (M1040 NanoMill, E.A. Fischione Instruments) are described in detail. Emphasis is placed on overcoming common technical challenges, optimizing process parameters, and ensuring reproducible specimen quality. The objective is to establish a robust protocol that enhances analytical precision and contributes to the reliability of TEM-based investigations.

一、電子顯微鏡分析與樣品處理設備介紹

於穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 試片的製作過程中，首先必須清楚地定義試片分析的具體目的，並充分了解所選用材料在性質上的差異，以便能夠適當地選擇並規劃最適合的試片製備方法。目前針對半導體材料試片的製備，目前一般多採用聚焦離子束 (focused ion beam, FIB) 技術^(3, 4)，即利用配備有 FIB 系統的掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM)，透過精準調控電子束並以特定角度進行樣品的精細切割與加工，能有效達到所需的高精度試片品質⁽⁵⁾。此外，若是奈米粉粒型態的材料，由於材料本身具有極小的尺寸，製作方式則相對簡單，只需將奈米粉體均勻分散於適合的溶劑（如無水酒精）之中，接著將混合好的懸浮液滴取於專用的銅環上，待溶劑完全揮發乾燥後即可直接進行顯微觀察。然而，相較於上述半導體及奈米粉粒試片，金屬材料的試片製作方式雖然無法如奈米粉粒試片般簡單迅速，但相對於半導體材料需採用成本較高且技術門檻較高的聚焦離子束製程且觀察範圍有限的限制下，本研究介紹的金屬試片製備方法則具備明顯的優勢，如成本更低、製程相對簡易等。

本次實驗將利用本國立陽明交通大學材料系鍾采甫老師實驗室內以及國家實驗研究院國家儀器中心協助提供的多種設備進行金屬試片的製備及處理流程，(如圖 1 與 2 所示) 使用精密切割機 (CLM50, TOP TECH) 進行塊材初步切割、雙面噴射電解拋光機 (Twin Jet Electro-Polishing E.A. Fischione Instrument) 進行精細拋光處理、聚焦氬離子束研磨儀器

(M1040 NanoMill, E.A. Fischione Instrument) 實施精確之薄化與平整化處理，以及電漿清潔機 (Fischione Model 1020 Plasma Cleaner, E.A. Fischione Instrument) 進一步提升試片表面的潔淨度與品質。透過系統性地整合這些設備的操作步驟與技術細節，本研究期望能有效解決試片製備過程中可能遇到的各種問題，並提供具體且可行的製程控制指引，使穿透式電子顯微鏡分析之試片品質更加穩定可靠。



圖 1. 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 試片製備流程圖。

二、電子顯微鏡樣品切割與處理技術

本實驗的金屬塊材，最初會先使用大型切割機進行初步條狀切割處理，將材料尺寸調整至約長、寬、高分別為 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 的規格，以便能更方便地固定至精密切割機 (CLM50, TOP TECH) 之專用載具上進行後續的精密切割步驟。在利用精密切割機 (CLM50, TOP TECH) 機進行金屬薄片的切割時，必須嚴格控制切割機的切割轉速，建議將刀子轉速控制在 4000 rpm 到 2500 rpm 以及進刀速率控制在 0.07 m/s 至 0.02 m/s 區間範圍左右，這樣能有效確保切割出來的金屬薄片試片具有較佳的表面平整度，(如圖 3 所示)。若在處理某些硬度極高或相對較軟的特殊材料樣品時，更應特別注意控制切割速率，避免轉速過快。切割

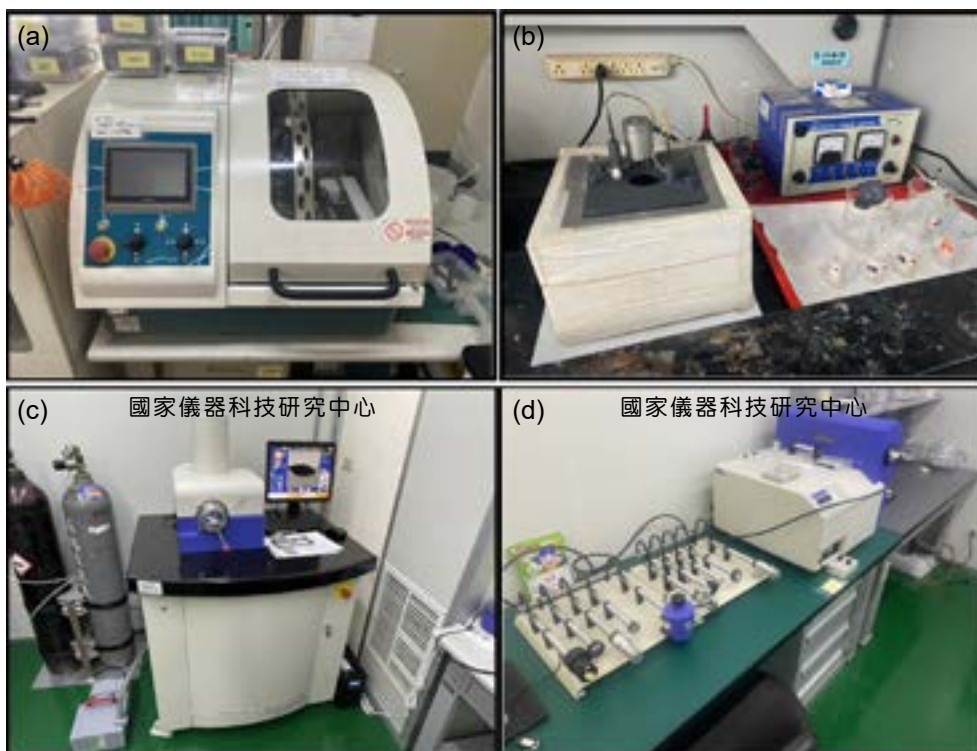


圖 2. (a) 精密切割機 (CLM50, TOP TECH)。(b) 雙面噴射電解拋光機 (Twin Jet Electro-Polishing, E.A. Fischione Instrument)。(c) 聚焦氬離子束儀器 (M1040 NanoMill, E.A. Fischione Instrument)。(d) 電漿清潔機 (Fischione Model 1020 Plasma Cleaner, E.A. Fischione Instrument)。



圖 3. (a) 精密切割機 (CLM50, TOP TECH)。(b) 材料處理放置與操作位置。(c) 切割機介面相關設定示意圖。(d) 機構內確認水柱噴灑位置示意圖。

轉速若過高，砂輪刀片接觸材料時產生的瞬間衝擊力可能導致試片表面產生明顯的不平整現象或局部變形，例如：翹曲或歪斜等問題 (如圖 4 所示)。這些缺陷將大幅提高後續試片表面精細研磨、拋光或其他平整處理步驟的難度，並可能影響後續穿透式電子顯微鏡分析的品質和準確性。因此，本研究建議在進行精密切割時，需根據材料特性適當調整操作參數，並定期檢查刀片狀態，以維持穩定且高品質的切割效果。

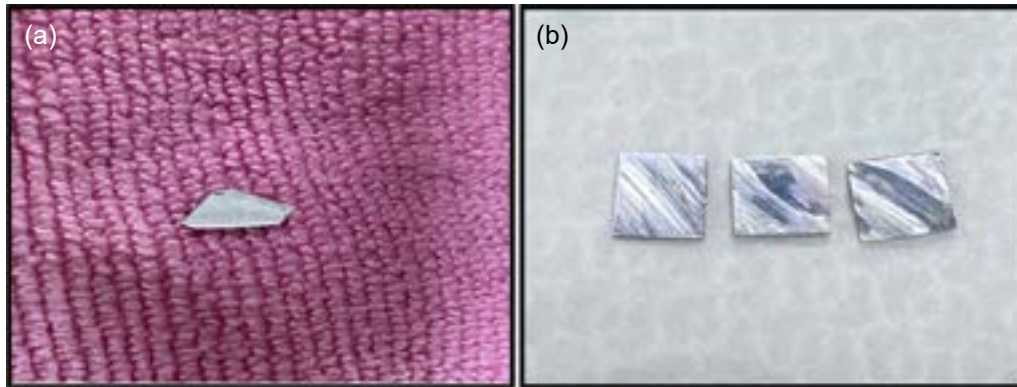


圖 4. (a) 圖為切割速率錯誤示範設定示意圖，因為進刀較快導致試片左上角跟右下角有翹曲歪斜變形等現象發生。(b) 圖為 0.04 m/s 正確進刀速率示意圖。

三、電子顯微鏡樣品研磨處理技術

金屬試片的製備過程中，研磨是一個極為關鍵的步驟，其主要目的是透過逐步研磨程序，去除試片在切割過程中所產生的應變層與表面缺陷，進而獲得一片厚度均勻、表面平整且無彎曲變形的樣品。這樣的試片才能符合穿透式電子顯微鏡觀察與分析的基本要求。由於研磨品質直接影響後續分析的準確性與影像清晰度，因此整個操作過程必須小心謹慎，並嚴格遵循標準流程進行。在實際操作上，所需的材料包括一塊平整的橡膠基座作為支撐基底、不同號數的砂紙 (如 P400、P1000、P1200、P1500、P2000)、金屬試片 (建議初始厚度為 500 μm)，以及螺旋測微器和 Punch 壓片機 (SPI# 17001-AB)，如圖 5 所示。橡膠基座的平整性十分重要，能確保研磨過程中施力均勻，而各種砂紙則依照研磨階段依序使用，從粗至細，逐步將試片研磨至所需厚度與表面狀態。

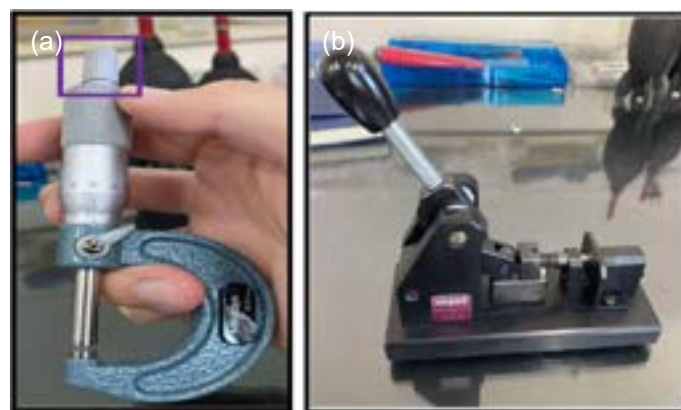


圖 5. (a) 圖為螺旋測微器，紫色方框為調整旋轉位置。(b) 圖為 Punch 壓片機。

研磨操作通常是將金屬試片放置在橡膠基座上，並在平放於桌面的砂紙上來回推磨。施力方向應保持水平且均勻，以避免試片傾斜或產生彎曲變形。為了徹底消除切割時留下的應變層，兩面皆需進行研磨。在過程中，會依據試片厚度變化選用適合的砂紙，例如，當厚度從 $500\text{ }\mu\text{m}$ 降低 $300\text{ }\mu\text{m}$ 時，通常使用 P1000 號砂紙； $300\text{ }\mu\text{m}$ 進一步降至 $200\text{ }\mu\text{m}$ 時，則改用 P1500；當厚度低於 $200\text{ }\mu\text{m}$ 時，則以 P2000 號砂紙進行細部研磨 (如圖 6(a) 所示)，假如換置下一個號數請垂直於前一號數方向研磨，使前一號數刮痕可被研磨消除。若使用的金屬材料並非法規範中的鋁合金，則建議依據實際材料性質調整砂紙選擇，並可諮詢有經驗之操作者。研磨過程中需持續進行厚度量測，以掌握試片狀態。此時可使用螺旋測微器進行精密量測。為避免試片因壓力過大而受損，建議使用螺旋測微器上方的旋鈕來控制夾持力度，並在量測前確認儀器是否已歸零。若未歸零，則需將偏差值扣除。為確保厚度分佈均勻，可於試片不同位置進行多點量測。當試片研磨至約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 厚度時，即可使用 Punch 壓片機製作圓形試片。在此步驟中，必須特別注意試片厚度不得超過 $100\text{ }\mu\text{m}$ ，以避免對壓片機造成損壞。此外，在操作前需清除 Punch 壓片機 (SPI# 17001-AB) 內部可能殘留的碎屑，並檢查試片是否有裂痕或缺角，避免在壓片過程中產生瑕疵。成型後的圓形試片邊緣應保持圓滑完整，以利進行後續的雙噴拋光 (Twin-jet Polishing) 程序。圓形試片 Punch 壓片機 (SPI# 17001-AB) 成型後 (如圖 6(b) 所示)，尚需進一步研磨至約 $70\text{ }\mu\text{m}$ 的厚度，以符合穿透式電子顯微鏡分析的需求。由於試片越薄則越易破碎，因此操作時必須特別小心，避免因施力不當導致破裂。此外，為消除 Punch 壓片機 (SPI# 17001-AB) 製程可能產生的變形層，兩面皆需再次研磨，以確保最終樣品具備理想的觀察條件。總結而言，整個研磨操作過程中應始終施以水平方向的均勻力量，以避免試片彎曲。若產生彎曲現象，將可能在穿透式電子顯微鏡觀察時造成彎曲干涉 (bending contour)，干擾分析結果。同時，砂紙需定期更換與清潔，以防止污染與降低研磨效率。若在研磨過程中發現試片翹曲、破裂或邊角受損，應重新剪裁並進行新的研磨作業。整個製片過程亦應保持操作環境整潔，避免雜質混入樣品之中，以確保最終獲得高品質、可用於高解析觀察之金屬試片。

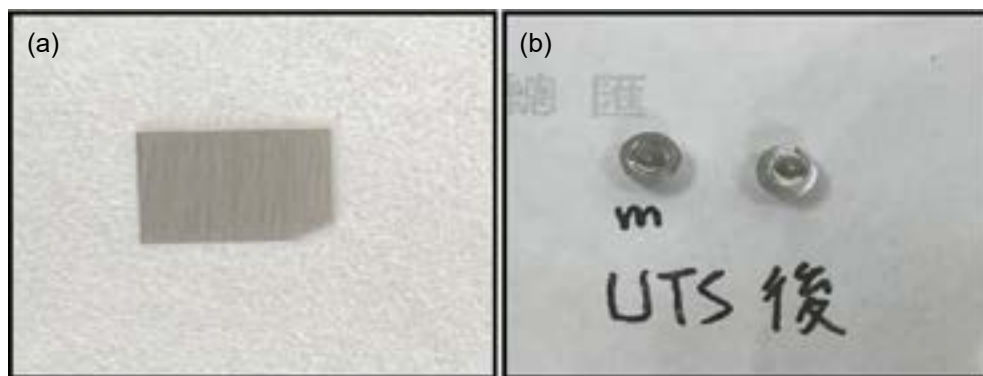


圖 6. (a) 圖為經過砂紙研磨後金屬試片示意圖。(b) 圖為被 Punch 壓片機壓過後，又經過 twin jet 最後成品圖片。

四、電子顯微鏡片樣品之雙噴射電解拋光製備技術

於穿透式電子顯微鏡試片的製備流程中，電解拋光是一個不可或缺的關鍵步驟。其主要目的在於去除 Punch 成型後殘留的應變層，並藉由電化學作用，使試片中心逐漸形成一個極

薄的穿孔區，再利用光敏電阻，與燈光產生警示來製作極薄穿孔試片，如圖 7 所示，從而達到電子束可穿透的厚度要求。為了確保試片品質，在操作過程中必須精確控制溫度、電壓與時間。在進行電解拋光前，需準備多種材料與設備，包括電解拋光主機 (如圖 8 所示) 與專用 Holder。依據不同材料性質調配的電解液 (參照期刊或具經驗者建議)、保溫酒精、液態氮或冰塊 (作為冷卻介質)、99.5% 的酒精與異丙醇 (分別用於初步與最終清洗)、玻璃錶片 (防止電解液液揮發)、四個軟墊支撐保溫盒，以及必要的洗滌器具如：漏斗、溫度計、濾紙、鱷魚夾與 OM 光學顯微鏡等。在正式拋光前的準備階段，需先將電解液倒入內盤並以玻璃錶片覆蓋以防揮發；接著在裝有四顆軟墊的外盒中加入冰塊與保溫酒精混合物，作為冷卻介質以穩定拋光過程的溫度。此外，需事先配置洗滌區，包括兩大杯酒精 (i.e., 250 ml) 與三小杯酒精 (i.e., 50 ml)，以及最右側一小杯異丙醇 (i.e., 50 ml)，作為拋光後的試片清洗用。啟動總開關並調整水流至適中之後，若使用零下 100 °C 以下之液態氮，則須維持電解拋光機馬達機構運轉狀態，再由漏斗將液態氮加入小孔處進行降溫，避免馬達結冰。最後，將溫度計插入內架圓孔，靜置十分鐘以達成熱平衡⁽⁶⁾。



圖 7. (a) 利用電解拋光穿破試片中心產生一個洞，光源會透過去使光敏電阻產生警示聲音，用以判斷穿洞是否成功。(b) 為治具拿取方式示意圖，接觸點的正中間的小洞為試片放置處。(c) Twin jet 電解拋光之內部示意圖。

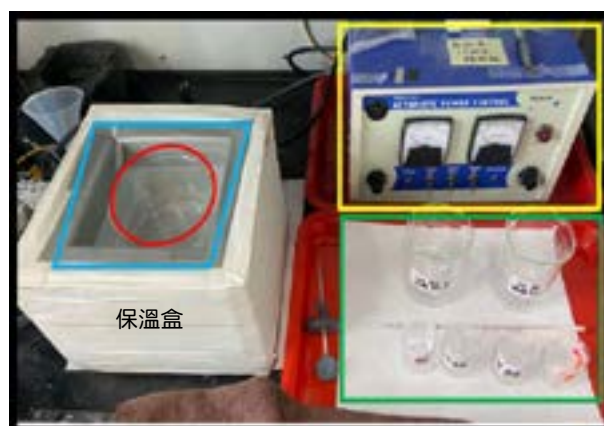


圖 8. Twin jet 整體功能示意圖，紅色區為電解液放置位置，藍色區為液態氮與冰塊放置位置，黃色區為電源供應，綠色區為六個洗滌試片用的燒杯。

電解拋光的正式操作始於將事先研磨至約 70 μm 厚度的圓形試片放入 Holder 中，並以適度旋緊的方式固定。確認電解液水流穩定後，將 Holder 放入拋光架，並將其突起端朝右擺放，再接上正極的鱷魚夾。接續依序啟動總電源、Polish 功能與 Alarm 警示開關。電壓需依據材料性質適當調整，若無經驗可諮詢資深人員 (可參考附錄 1)。啟動後便可開始計時，待警示聲響起即代表穿孔完成，需立即取出試片。完成拋光後的試片必須立即進行清洗處理。當聽到警報聲響起時，應迅速取下 Holder 並移除鱷魚夾。試片初步在第一杯酒精中上下沖洗 10 次以上，再於第二杯酒精中沖洗 10 次以上。隨後旋開 Holder 蓋子，小心使用反向夾夾取試片，避免碰觸穿孔區，以免造成破損。之後依序將試片浸入其餘各清洗杯中，分別進行 50 次、50 次、50 次與 100 次的上下來回沖洗，最後以濾紙將試片吸乾，並立即使用光學顯微鏡檢查穿孔情形，以確認是否符合穿透式電子顯微鏡觀察需求。

拋光作業完成後，收機程序亦不可忽略。需將使用過的 Jet 液回收至原容器中並妥善封存，以備下次使用。外盒中的保溫酒精與清洗溶劑應完全倒除，而內盤部分則須先以清水清洗並運轉拋光水流約十分鐘，接著改以 95% 酒精進行第二次沖洗，同樣維持水流十分鐘以去除殘餘溶劑與雜質。沖洗後的酒精則回收保存於玻璃瓶並放置於冰箱中，供後續使用者重複利用。最後，操作完成後應整理作業桌面並妥善保存已完成的試片。在實驗過程中可能會遇到若干常見問題。例如，若因冷卻不當導致馬達結凍，應立即關閉電源並將 Holder 架移至常溫水中解凍，待機構可正常轉動後再重新啟動；若發現無電流，則應檢查電源開關、鱷魚夾連接情形及試片是否正確放置；若仍無法導電，可觀察夾具是否生鏽，必要時以砂紙打磨或直接更換夾具。此外，若試片穿孔過大或過小，則可透過一字起子微調 Sensitivity 控制旋鈕 (以圈為單位)，亦可在 Holder 上貼上已戳孔的黑膠布，測試 Alarm 的響應靈敏度與時機。總而言之，Twin-jet 拋光雖屬實驗後期之技術操作，但其對試片品質與最終觀察結果影響深遠，必須以嚴謹態度執行每一步驟，確保試片達到穿透式電子顯微鏡分析所需的結構、厚度與潔淨度標準。

五、電子顯微鏡樣品 NanoMill 製備技術

研究中，為有效去除試片表面於機械研磨、電解拋光或聚焦離子束製程後所產生之非晶質損傷層 (amorphous layer)、雜質植入層 (如 Ga^+ implantation) 與殘留污染物，進一步提升穿透式電子顯微鏡觀測解析度與化學分析品質，我們採用 Fischione Instruments 所開發之 NanoMill[®] TEM specimen preparation system (Model 1040) 進行穿透式電子顯微鏡試片終端薄化與表面清潔。該系統以電子撞擊方式激發氬氣產生氬離子電漿，並透過聚焦離子光學系統將 Ar^+ 離子束聚焦至 1 μm 至 4 μm 小範圍進行選區研磨，相較傳統氬離子束直徑 (大於 500 μm) 更具空間控制優勢，且搭配 $\pm 30^\circ$ 可調傾角樣品座與二次電子影像 (secondary electron imaging, SEI) 功能，使用者可直接觀察樣品表面變化並精準選擇感興趣區域 (area of interest, AOI) 進行研磨處理。操作流程如下：首先將載具二放置進載具一之中，在將穿透式電子顯微鏡試片 (如 FIB lift-out lamella 或經電解拋光製備之金屬薄片) 固定於 3 mm 銅載台上，並安裝至 NanoMill 載具二之中 (如圖 7 所示)。使用載具一輔助載具二插入 Load Lock，如圖 8 所示，並抽氣至系統所需高真空環境 (小於 1×10^{-6} Torr)，啟動系統後進入操作介面設定 Milling 參數。根據樣品材質與損傷深度，建議設定氬離子束能量 (energy) 為 900 eV 至 1200 eV，以兼顧去除效率與溫和性；Emission 設定 100–150 μA ；Dwell 為 20 μs 至 50 μs

及 Resolution 設定 128 至 256，研磨框選區域大小可依照不同材料參數而選擇相對應大小，並設定樣品傾角分別為正角度 10° 至 30° 以及負角度 10° 至 30° 以避開離子直射、降低穿透損傷 (如圖 9 所示)；每次研磨時間控制於 5–10 分鐘，並可搭配 Protocol Editor 設計自動分段研磨程式。研磨過程中應以 二次電子影像模式即時監控樣品表面，確認 Amorphous 層移除程度與晶格表現。



圖 9. (a) 載具一示意圖 (b) 載具二示意圖。 (c) 載具一和載具二與樣品放置示意圖。



圖 10. (a) 將載具 Load Lock 之示意圖。 (b) 載具二放置進腔體前之示意圖。

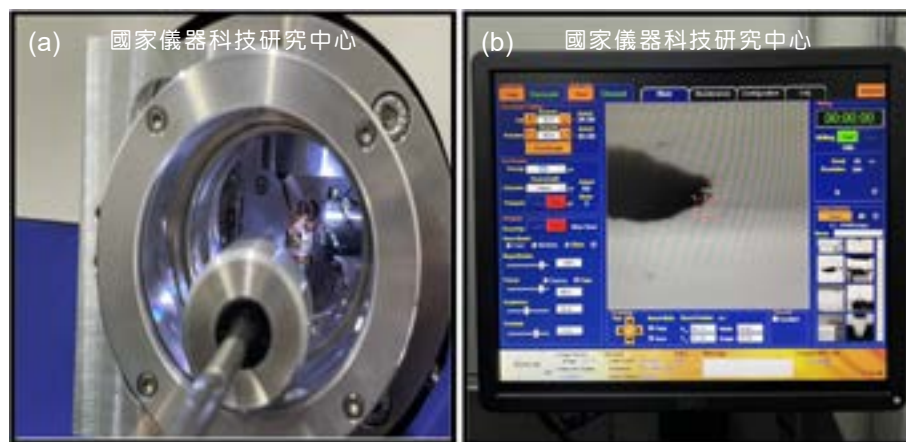


圖 11. (a) NanoMill 放入腔體示意圖。 (b) NanoMill 介面 (圖上紅色選框為電漿處理位置之面積大小) 示意圖。

若樣品為 FIB 製備之 Lamella，需特別注意其兩側因 Ga^+ 轟擊產生的植入層與 Amorphous 層厚度，可採兩面交替薄化方式進行修整，並於完成後以 EDS 驗證 Ga 雜質是否完全移除。此外，為避免熱敏感樣品 (如鋰電池材料、聚合物、低熔點金屬) 於 Milling 過程中受熱造成相變或結構崩解，建議搭配液態氮 (LN_2) 冷卻模組操作，以維持樣品穩定性。整體 Milling 完成後，試片厚度可控制至小於 20 nm，表面幾乎無 Amorphous 損傷與雜質殘留，適用於高解析 HR-TEM、Cs-corrected HAADF-STEM 原子級影像分析^(6, 7) 與能譜分析 (EDS/EELS)。此技術不僅可提升晶格條紋清晰度與 FFT 銳利度，亦有效避免 FIB 所造成的分析誤差與解析限縮，是目前進行鋁合金析出物分析、奈米材料界面結構研究與電子結構定量分析等高階 TEM 應用中不可或缺之試片製備關鍵步驟。

六、試片 Plasma 清潔處理

試片需進行電漿 (plasma) 表面清潔處理，以有效去除前述製備流程中可能產生的粉塵、有機污染物或碳氫化合物污染物，如圖 12 所示。由於前述的多數試片製作流程通常都在非無塵環境中進行，因此在每個製備步驟中難以避免會引入粉塵或其他污染物。例如，在雙噴電解拋光的最終步驟中，通常會使用數個乾淨的燒杯，內置無水酒精進行多次試片沖洗，以有效防止電解液殘留。然而，試片在清洗後的夾取與搬運多半是在一般環境下進行，難免存在其他不可預測的污染風險。因此，電漿清潔成為確保試片表面潔淨度及後續穿透式電子顯微鏡分析品質的重要步驟。電漿清潔的原理是利用高能量電子撞擊中性氬氣，使氬氣電離形成氬離子 (電漿)。此過程中產生的氬離子具有足夠的能量，可以有效去除試片表面的有機物與碳氫化合物等污染物。此外，實際使用的電漿氣體組成中通常包含約 25% 的氧氣，其餘則為氬氣⁽⁸⁾。在電漿清潔機 (Fischione Model 1020 Plasma Cleaner) 中，電漿將氧氣分子分解成具有強氧化能力的活性氧自由基，這些自由基會與試片表面的碳氫污染物反應，形成一氧化碳、二氧化碳及水等氣體產物，這些氣體再透過儀器的真空系統排除。由於此種低能量電漿清潔方法幾乎不會導致試片顯著升溫，因此在清潔過程中可避免試片內部產生相變或其他結構性改變，確保試片表面保持結構完整且適合高品質的 TEM 分析。

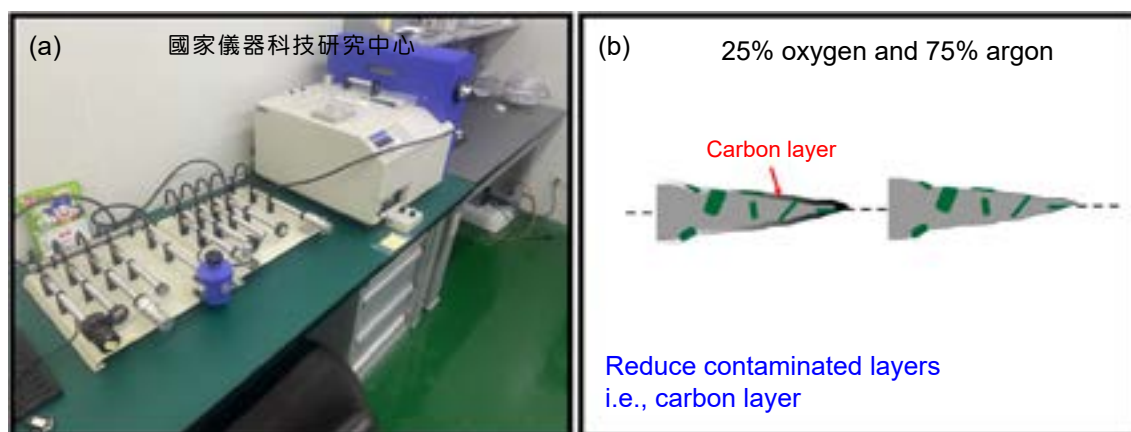


圖 12. (a) Nanoclean 電漿儀器。(b) Nanoclean 電漿去除碳氫化合物／碳層的示意圖⁽⁸⁾。

七、結論

本研究針對金屬材料的穿透式電子顯微鏡試片製備技術進行了全面介紹，並深入探討了各個關鍵製程，從初步切割到精細拋光及表面清潔的各項操作。試片製作過程中的每一個步驟都對最終的 TEM 分析品質有著至關重要的作用，尤其是試片的厚度、表面平整度以及內部應力的控制，這些都會顯著影響最終的分析結果。我們展示的製備方法以其低成本與簡便性，尤其適用於金屬材料的試片製作，並且與傳統的聚焦離子束製程相比，具有明顯的成本優勢。特別是在試片表面清潔和薄化處理方面，使用雙噴射電解拋光機、聚焦氬離子束儀器以及電漿清潔系統等設備的組合，顯著提高了試片的品質與 TEM 分析的可靠性。

這些製程技術不僅能夠有效地去除材料表面的污染物和應變層，還能保證試片在微觀結構分析中的準確性，尤其在對鋁合金等材料的析出物及界面結構的高解析度分析中，具有無可替代的優勢。綜合來看，這些技術的應用極大地促進了材料科學、半導體工業及其他高端材料領域的研究進展。

八、穿透式電子顯微鏡金屬試片製備技術專有名詞解釋

專有名詞	名詞解釋
穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM)	利用高速電子束穿透超薄樣品觀察其微觀結構、晶體結構與組成，具原子等級解析度。
光學顯微鏡 (optical microscope)	利用可見光與透鏡成像，用於觀察人眼無法辨識的微小結構。
聚焦離子束 (focused ion beam, FIB)	利用高能離子束對材料進行精密切割與加工，常用於 TEM 樣品製備。
掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM)	利用電子束掃描樣品表面以產生形貌影像與進行成分分析。
雙噴射電解拋光 (twin-jet electro-polishing)	利用電化學方式與雙噴嘴去除樣品表面材料，製成中央穿孔的 TEM 觀測試片。
聚焦氬離子束儀 (M1040 NanoMill)	利用聚焦 Ar 離子束進行選區精密研磨、薄化和去除損傷層，提高 TEM 樣品品質。
電漿清潔機 (plasma cleaner)	利用電漿去除樣品表面的碳氫化合物與有機污染，提升 TEM 觀測品質。
壓片機 (punch)	機械裝置，用來將金屬薄片沖壓成標準直徑 (約 3 mm) 的 TEM 試片。
螺旋測微器 (micrometer)	精密測量工具，用來監控試片厚度變化，常用於研磨步驟中。
氬離子研磨 (Ar ion milling)	透過氬離子撞擊樣品表面，去除損傷層與雜質，用於 TEM 前處理。
非晶層 (amorphous layer)	材料表面因機械或離子加工所形成的無序結構層，會降低電子顯微影像解析度。
Ga ⁺ 植入層 (Ga ⁺ implantation)	FIB 製程中，高能 Ga 離子植入樣品內部形成的污染層，需移除以提升分析準確性。
穿孔區 (perforated area)	電解拋光後產生的極薄區域，電子束可穿透此區進行 TEM 觀測。
光敏電阻警示系統 (photoresistor alarm system)	電解拋光中利用光通過穿孔產生警示聲的系統，用於判斷拋光是否完成。

鱷魚夾 (alligator clip)	拋光裝置的電極連接夾具，用來連接電源與試片。
OM 光學顯微鏡	製片過程中用於初步觀察穿孔區品質的傳統光學顯微鏡。
二次電子影像 (secondary electron imaging, SEI)	顯微成像技術，用二次電子形成樣品表面影像，可即時監控表面變化。
樣品傾角 (tilting angle)	樣品於 NanoMill 處理時所設的角度，可避開離子束直射並降低損傷。
停留時間 (dwell time)	離子束在樣品表面單位位置上停留的時間，單位通常為微秒 (μs)，會影響研磨深度與速度。
能量色散 X 射線譜 (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS)	能量色散 X 光分析法，搭配電子顯微鏡進行元素定性與定量分析。
電子能量損失譜 (electron energy loss spectroscopy, EELS)	利用電子與樣品互作用所造成的能量損失進行材料電子結構與化學鍵分析的技術。

九、附件一

材料	電解液組成	建議電壓	溫度條件
鋁	20–25% 硝酸 / 甲醇	10–20 V	加入液態氮直到冰層形成後開始
碲化鉍 (Bi_2Te_3)	400 ml 氫氧化鈉 (10%) + 85 ml 酒石酸 (40%)	N.A.	N.A.
鈷合金	20% 高氯酸 / 80% 醋酸	N.A.	–30 °C
鈷鎳合金	25% 高氯酸 / 75% 醋酸	25 V	–30 °C
鈷鎳合金	10% 高氯酸 / 90% 醋酸	80 V	–30 °C
銅及其合金	30% 磷酸 / 70% 去離子水	依氣泡出現再調整	N.A.
鐵	50% 鉻酸 / 50% 醋酸	27 V	N.A.
鐵合金 / 鋼	10% 高氯酸 / 90% 醋酸	10–20 V	N.A.
低碳鋼	100 克 重鉻酸鈉 / 500 ml 冰醋酸	N.A.	N.A.
不鏽鋼	40% 硫酸 / 60% 磷酸	N.A.	N.A.
420 不鏽鋼 (乙醇)	15% 高氯酸 / 85% 乙醇	18V	室溫
420 不鏽鋼 (磷酸 + 硫酸)	60% 磷酸 / 40% 硫酸	10V	60 °C
玻璃	10 ml 鹽酸 / 90 ml 氫氟酸 (僅化學拋光)	N.A.	N.A.
鉬	20 ml 氫氟酸 / 80 ml 硫酸	N.A.	N.A.
鈮及其合金	5 ml 氫氟酸 + 10 ml 硫酸 + 600 ml 甲醇	N.A.	–50 °C
鈦	30 ml 高氯酸 + 295 ml 甲醇 + 175 ml 丁醇	N.A.	乾冰冷卻
鈦 (甲醇 + 鹽酸 + 硫酸)	30 份甲醇 + 1 份鹽酸 + 1 份硫酸	N.A.	乾冰冷卻
鈦及其合金	6 ml 高氯酸 + 60 ml 甲醇 + 35 ml 丁基纖維素	N.A.	–30 °C
鈦–鋅合金	30 份甲醇 + 1 份鹽酸 + 1 份硫酸	N.A.	N.A.
鎢	2% 氫氧化鈉於水中 (低速流動)	N.A.	N.A.
鋯合金	20% 高氯酸 / 80% 醋酸	N.A.	N.A.
Ni-Mo / Cu / Cu-Ti / Cu-Be / Al-Cu / Fe-Al 合金	33% 硝酸 / 66% 甲醇	N.A.	–40 °C 到 –50 °C

下列為參考 E.A. Fischione 儀器公司官網的 Twin jet 實驗參數，但仍需考慮實際材料與試片狀況做參數調整⁽⁹⁾。

參考文獻

1. 鮑忠興, 劉思謙, *Pratice of Current Transmission Electron Microscopy* (近代穿透式電子顯微鏡實務), 滄海書局, (2012).
2. D.B. Williams, C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*, third ed., Springer, New York, (2009).
3. J. Mayer, L.A. Giannuzzi, T. Kamino, J. Michael, *MRS Bulletin*, **32** (5) 400 (2007).
4. D.S. Rao, K. Muraleedharan, C. Humphreys, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, **2**, 1232 (2010).
5. T. Zhou, R.P. Babu, Z. Hou, P. Hedström, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, **47** (3), 388 (2022).
6. C.-L. Tai, Y.-N. Chiu, C.-J. Chen, S.-K. Lin, H.-C. Lin, R.D.K. Misra, Y.-L. Yang, C.-N. Hsiao, C.-S. Tsao, T.-F. Chung, *Materials Today Advances*, **25**, 100557 (2025).
7. C.-W. Yeh, C.-J. Chen, C.-L. Tai, Y.-L. Yang, R.D.K. Misra, C.-N. Hsiao, C.-C. Chen, C.-S. Tsao, U.S. Jeng, H.-C. Lin, T.-F. Chung, *Journal of Alloys and Compounds*, **1008**, 176677 (2024).
8. 鍾采甫, AA7050 (Al-Zn-Mg) 和 AA2050 (Al-Cu-Li) 鋁合金 原子級析出物之演化, 材料科學與工程學研究所, 國立臺灣大學博士論文, (2019).
9. E.A.F. 儀器股份有限公司, *Manual - Twin-Jet Electropolisher MODEL 110*, (<http://www.labmet.cl/Documentos/Manuales/Manual%20-%20Twin-Jet%20Electropolisher%20MODEL%20110.pdf>).

作者簡介

楊唯翌先生現為國立陽明交通大學材料所博士生。

Wei-Yi Yang is currently a Ph.D. student in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

徐暉翔先生現為國立陽明交通大學材料所博士生。

Wei-Hsiang Hsu is currently a Ph.D. student in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

蔡涓鑣先生現為國立陽明交通大學材料所博士生。

Yu-Hsuan Tsai is currently a Ph.D. student in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

鍾采甫先生為國立臺灣大學材料所博士，現為國立陽明交通大學材料系助理教授。

Tsai-Fu Chung received his Ph.D. in Materials Science and Engineering from National Taiwan University. He is currently an Assistant Professor in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

會聚型氬離子束減薄拋光系統製備穿透式電子顯微鏡試片應用研究

Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy by Using Concentrated Argon Ion Beam Milling System

李威志、陳健群、鍾采甫、彭裕庭、蕭素淳、蕭健男

Wei-Chih Li, Chien-Chun Chen, Tsai-Fu Chung, Yu-Ting Peng, Su-Chun Hsiao, Chien-Nan Hsiao

製備穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 試片常見的方法有機械研磨方法 (mechanical polishing)，電解拋光法 (electropolisher) 以及利用會聚離子束 (focus ion beam, FIB) 系統，若再搭配氬離子束拋光減薄系統 (argon ion milling system)，將可完成近乎苛求的穿透式電子顯微鏡試片製備。該系統使用氬氣 (argon gas) 作為工作氣體 (process gas)，以電子碰撞解離氬氣產生氬離子電漿 (argon plasma) 後，氬離子電漿持續掃描樣品表面，達到試片表面清潔、試片厚度薄化的效果，並優化穿透式電子顯微鏡電子束之穿透品質；此方法已經被廣泛使用數十年。目前常見的氬離子束拋光減薄系統，其氬離子束的大小 (beam size) 約在 500 微米 (micro-meter, μm) 以上；隨著科學技術的發展，本文所介紹會聚型氬離子束拋光減薄系統，氬離子束可會聚至 1–2 微米，且具備選區 (area of interest, AOI) 減薄拋光的功能；此外，本文亦討論應用會聚型氬離子束拋光減薄系統提升使用不同製備方法的穿透式電子顯微鏡試片之品質。

The most common methods for preparing transmission electron microscopy (TEM) specimens include mechanical polishing, electropolishing, and the use of a focused ion beam system. If the sample preparation method combined with an argon ion beam polishing and thinning system, it will be possible to complete the most demanding electron microscope sample preparation. An ion milling system uses argon gas as the process gas, applying electron impact to dissociate the argon gas to produce argon ion plasma, which will bombard the sample continuously to achieve the purpose of surface cleaning and thinning the sample to a thickness that allows the electron beam of a transmission electron microscope to penetrate, representing the sample in its natural state. This method has been widely used for decades. The conventional argon ion beam ion milling system on the market has an argon ion beam size of about 500 micrometers or more. With the development of science and technology, a new generation of argon ion beam polishing and thinning systems

has been launched to the market, and the size of the argon ion beams is about 1-2 micrometers, allowing targeting and selected area ion milling on the area of interest. This article will discuss how the new generation of argon ion beam polishing and thinning systems can improve the quality of transmission electron microscopy specimens prepared in different methods.

一、影響穿透式電子顯微鏡試片品質的原因

近年穿透式電子顯微鏡因像差修正器 (aberration corrector)、影像偵測器與高速電腦之發展，在解析度提升上獲得顯著的進展，亦可進一步取得與原子影像相對應之元素分布。然而，為使穿透式電子顯微鏡達到其最佳的解析度，其樣品的製備品質已經成為影響分析結果精確性的關鍵因素；穿透式電子顯微鏡試片的品質可以分成兩大部分討論：試片的厚度 (thickness of specimen) 與試片表面的潔淨程度 (cleanliness of specimen)。

當電子束離開穿透式電子顯微鏡的電子槍後，將沿著光軸前進並與試片交互作用，此時的試片厚度即為電子需要穿透的深度。如圖 1 所示，在電子穿透試片的過程中，會因試片的厚度以及試片元素成分有不同程度的發散 (beam broadening)，造成電子訊號強度的損失，影像解析度將大幅降低⁽¹⁾。假設圖 1(a) 的電子顯微鏡試片厚度為 100 奈米 (nanometer)，如果想要拍攝清晰的超高解析度影像，避免電子束與樣品交互過程中，電子束過度發散，試片的厚度必須小於 20 奈米，如圖 1(b) 所示，試片厚度減薄所帶來的效益將是更清晰的影像與更準確的結構分析與成分結果。

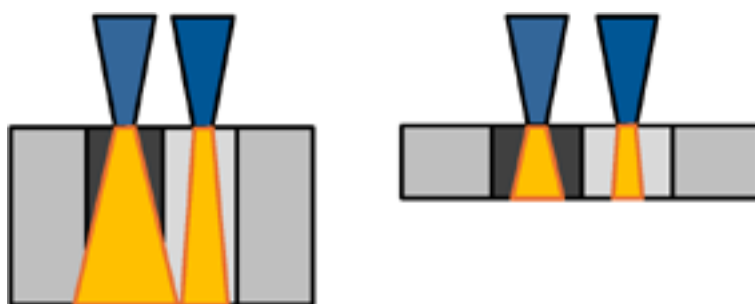


圖 1. 試片厚度對電子束發散的影響：試片為一雙層結構，白色代表輕元素組成，黑色代表重元素，電子在重元素區域發散的結果比在輕元素區域中明顯⁽¹⁻²⁾。

試片表面的潔淨程度取決於樣品製備的方法；通常選用機械研磨方法製備的穿透式電子顯微鏡試片為矽 (silicon, Si) 或是陶瓷 (ceramic) 等低延展性的樣品，使用碳化矽砂紙與鑽石砂紙將樣品磨薄後，搭配二氧化矽 (SiO_2) 的懸浮液拋光，可以將樣品薄化到 100 奈米 (nm) 以下，然而利用此方法準備的試片，因研磨樣品的應力而造成試片表面有殘留應力層以及二氧化矽拋光液殘留在試片表面以及形成氧化層等問題，往往影響了試片的品質與清淨度。為了將試片表面的殘留應力以及氧化物有效的清除，使用氫離子拋光系統是常見的方法。

常見的金屬樣品如鋼鐵、銅、鈷、鎳及鋁等，因具有延展性，不建議使用機械研磨的方法製備，可採用電解拋光的電化學方法製備穿透式電子顯微鏡的試片⁽³⁾。電解拋光製備試片需選擇合適的電解液配方、電解液溫度、試當的操作電壓等實驗條件，完成電解拋光後的試

片須將殘留在樣品表面的電解液清洗乾淨並乾燥後，再送入穿透式電子顯微鏡中進行分析；使用電解拋光製備穿透式電子顯微鏡樣品的人員，常面臨到樣品製備失敗的結果，其可能的原因有：試片的厚度過厚以致影像不清晰或是試片可觀察的區域並未有預期觀察的結構，另一種可能的原因是電解液未清洗乾淨，殘留並固化在試片表面，此時試片一經電子束照射導致殘留電解液揮發後，影響到穿透式電子顯微鏡腔體的真空而被迫中斷試驗。此時，常見的作法是利用氬離子束拋光減薄系統對試片進行修整，清潔試片表面並減少試片的厚度，以期能從樣品得到預期的結果。

聚焦離子束系統是使用質量比電子大上許多的鎢 (gallium, Ga) 在試片上選擇待測位置，以轟擊 (bombardment) 進行選擇性研磨 (selective milling)，來達到定點加工及切割試片的目的，具有試片厚度可精準控制以及試片準備成功率高的優點^(2, 4-5)。樣品經鎢離子切割後，試片形狀似為楔形 (wedge-shaped specimen)，形狀如圖 2 所示。使用鎢離子在切割樣品的過程中，將在試片表面形成非晶質損傷層 (amorphous layer)，圖 3 為矽單晶的穿透式電子顯微鏡高分辨影像 (high resolution transmission electron image, HR-TEM) 及其快速傅立葉轉換 (fast Fourier transform, FFT)，從快速傅立葉轉換可以清楚看到非晶層存在 FIB 製備的試片表面。同時，鎢離子會殘留在試片的損傷層與試片之間 (gallium implantation)，導致進行試片的成分分析時，將無法避免將鎢原子採集到能譜 (energy dispersive spectrum, EDS) 中，從圖 4 中清楚可見鎢離子訊號出現於能譜中。氮化鎢 (gallium nitride, GaN) 或是砷化鎢 (gallium arsenide, GaAs) 類別的樣品為下世代半導體的代表材料，若是使用 FIB 製備成電子顯微鏡試片，成份分析結果的準確性將受到質疑。

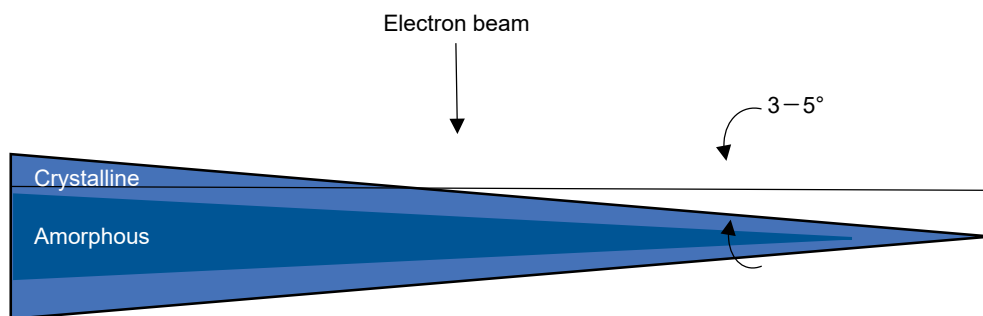


圖 2. 焦離子束製備的試片外觀為楔形⁽⁶⁾。

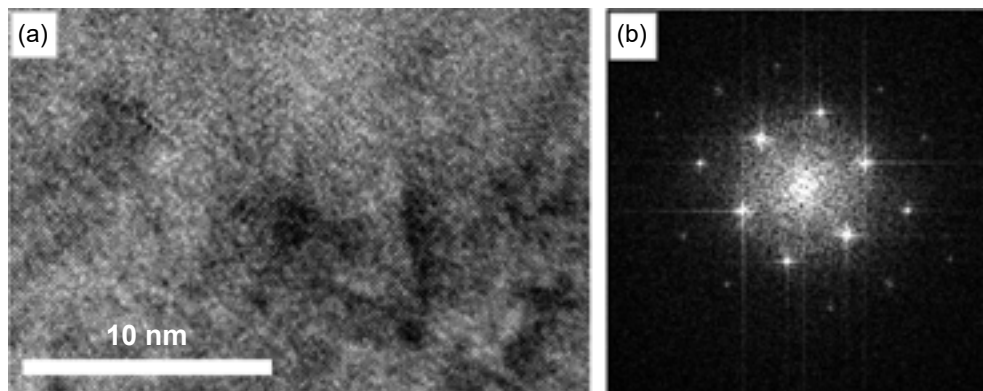


圖 3. 純矽樣品使用 FIB 所製備之穿透式電子顯微鏡試片：(a) 以穿透式電子顯微鏡拍攝的高解析穿透式電子顯微鏡影像及其 (b) 快速傅立葉轉換⁽⁷⁾。

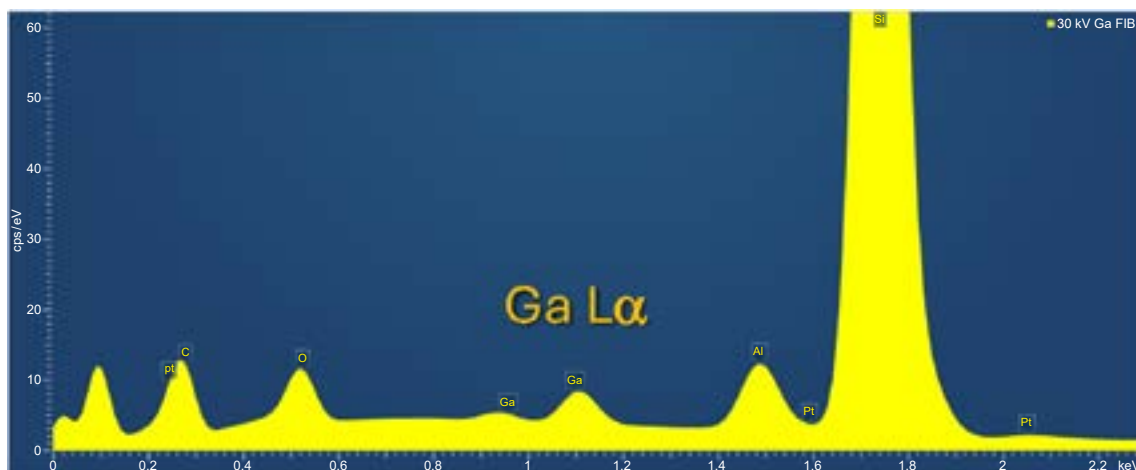


圖 4. 使用 FIB 製備成穿透式電子顯微鏡試片，在能譜中出現鎵離子的訊號⁽⁷⁾。

當試片在穿透式電子顯微鏡中進行觀察時，電子束是從試片的正上方進入試片而產生電子訊號與 X 光，此時試片的整體厚度包含了試片兩側的含鎵離子損傷層，因此需以氬離子束拋光減薄系統移除試片兩側的損傷層以及試片中殘留的鎵離子，方可完成高品質樣品的準備程序。

二、會聚型氬離子束拋光減薄系統

圖 5 為會聚型氬離子束系統與關鍵組件示意圖，氬離子源產生是藉由電子撞擊氬氣後所形成，氬離子束大小為 1–2 微米，此系統的離子槍可使用的能量範圍為 100 V 至 2 kV，具有選區定點拋光 (point mode) 及局部範圍選區 (selected area) 拋光的功能，並使用二次電子偵測器以成像試片，選擇試片上特定區域進行減薄。

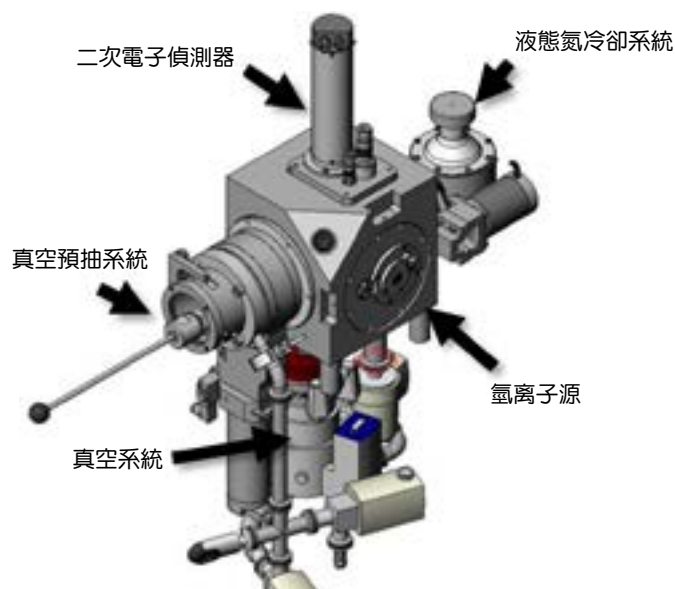


圖 5. 會聚型氬離子束拋光減薄系統內部元件組成示意圖⁽⁶⁾。

圖 6 為使用會聚型氬離子束系統，以不同氬離子束能量逐步地將 FIB 試片表面的損傷層和銻離子移除的過程。損傷層中原子的鍵結能較低，將清潔試片氬離子的能量降低至 500 電子伏特 (eV) 以下，可以完全去除表面損傷層，而不損傷試片⁽²⁾。與圖 3 之高解析穿透式電子顯微鏡影像及快速傅立葉轉換相比較，除了高分辨影像的清晰度獲得明顯的改善，快速傅立葉圖形中代表損傷層訊號的白色同心圓也消失，繞射點亦變得更加清晰⁽⁶⁾。前文提及，試片的製備過程會產生損傷層以及應力殘留在試片的表面，因此計算使用氬離子拋光系統移除損傷層以及應力層所需的最短時間，將有助於提高樣品製備的成功率。

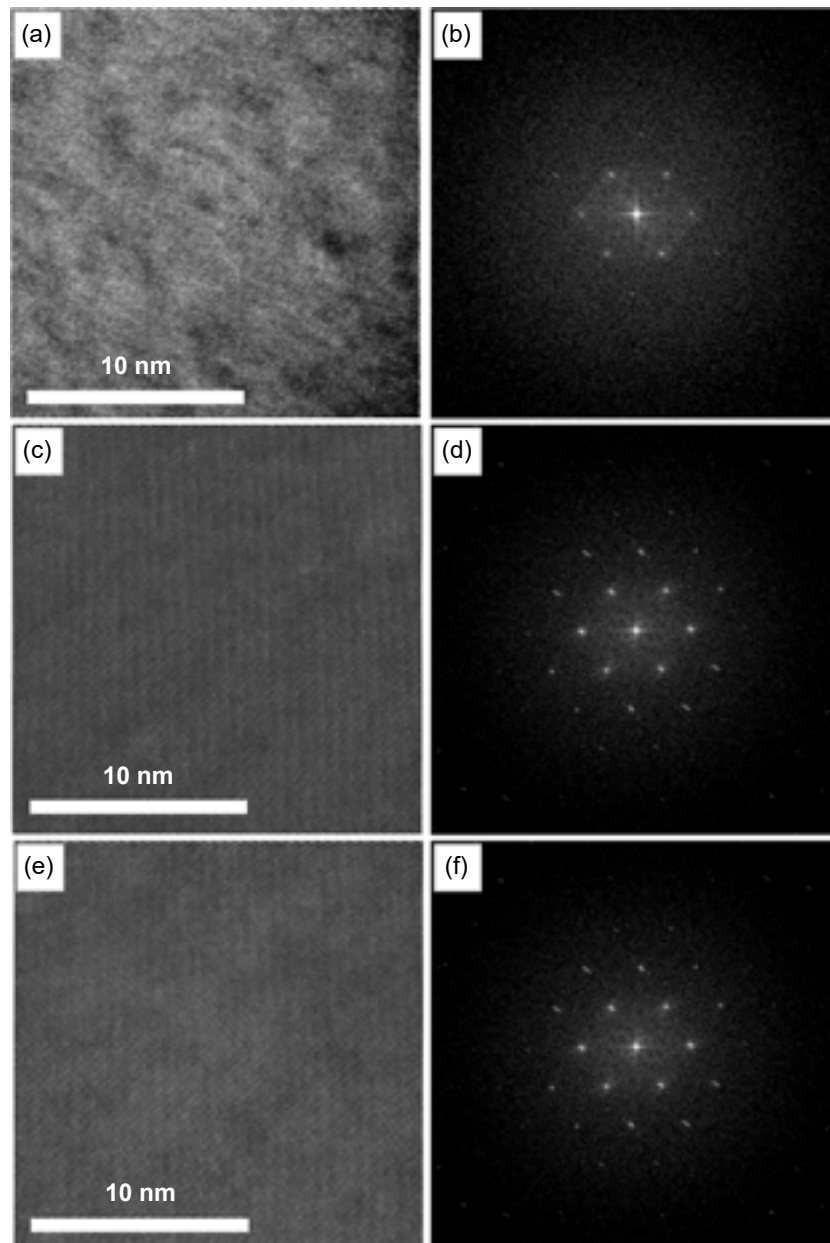


圖 6. FIB 製備的純矽試片經過會聚型氬離子束系統拋光後，試片表面的變化：(a) FIB 製備試片；(b) 為 (a) 的快速傅立葉轉換；(c) 氬離子束使用能量 500 V，拋光 5 分鐘；(d) 為 (c) 的快速傅立葉轉換；(e) 氬離子束使用能量 1 kV，拋光 5 分鐘；(f) 為 (e) 的快速傅立葉轉換⁽⁸⁾。

一般而言，不論試片的製備方法，在試片邊緣的地方可以觀察到損傷區域的寬度，以圖 7 為例，試片邊緣損傷層的寬度約為 45 nm；從圖 8 的說明可知，非晶質層的寬度為 $d = 40$ nm，因此試片表面的氧化層厚度 $d = w \times \sin \theta = 40 \times \sin 10^\circ = 6.95$ nm。以會聚型氬離子束拋光減薄系統，對矽材料的移除率為每分鐘 1.5 nm 推算，移除試片單側的損傷層所需時間約為 5 分鐘。經由以上的步驟，使用者可以計算該試片在會聚離子減薄拋光系統完成兩側所需的時間為 10 分鐘。圖 9 為高強度七系列鋁合金的試片，使用電解拋光法搭配會聚型氬離子束系統，完成穿透式電子顯微鏡試片的製備，並得到清晰的原子影像⁽³⁾。

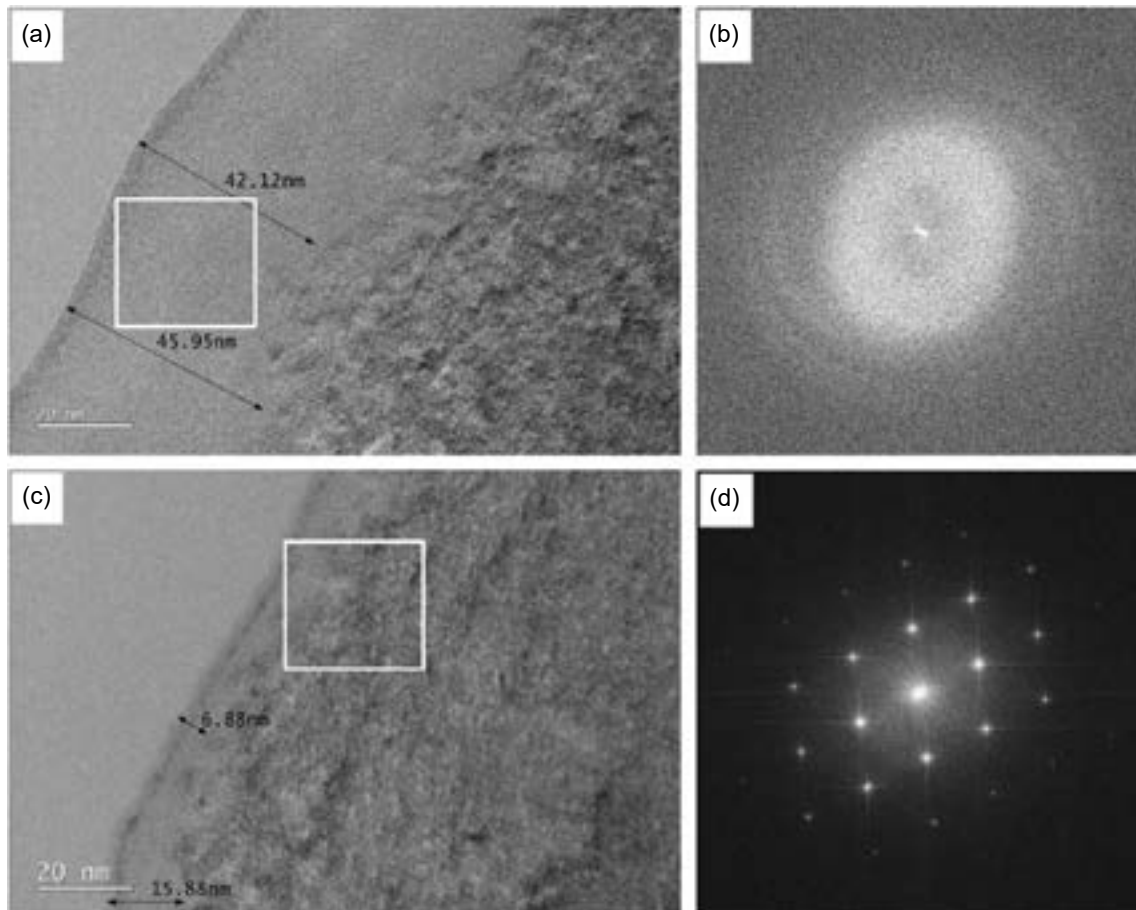


圖 7. 純矽樣品之穿透式電子顯微鏡影像，顯示樣品邊緣的非晶層平均寬度：(a) 未經過會聚離子減薄拋光系統的試片，其非晶層的平均寬度約為 45 nm；(b) 從圖 (a) 白色區域取得的快速傅立葉轉換圖形，(c) 經過會聚離子減薄拋光系統的試片，其非晶層的寬度從 45 nm 減少為約 7 nm，(d) 從圖 (c) 白色區域取得的快速傅立葉轉換圖形⁽⁹⁾。

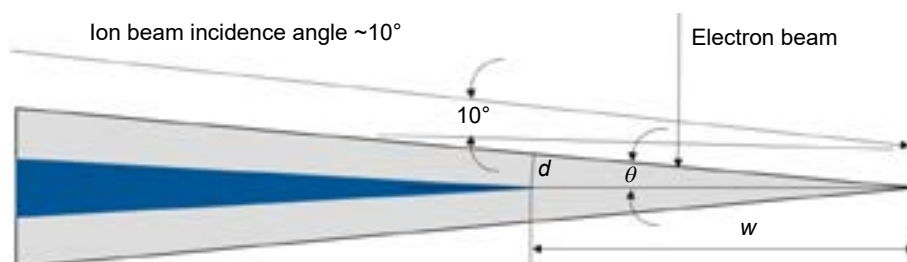


圖 8. 試片表面非晶層厚度的計算方法⁽⁹⁾。

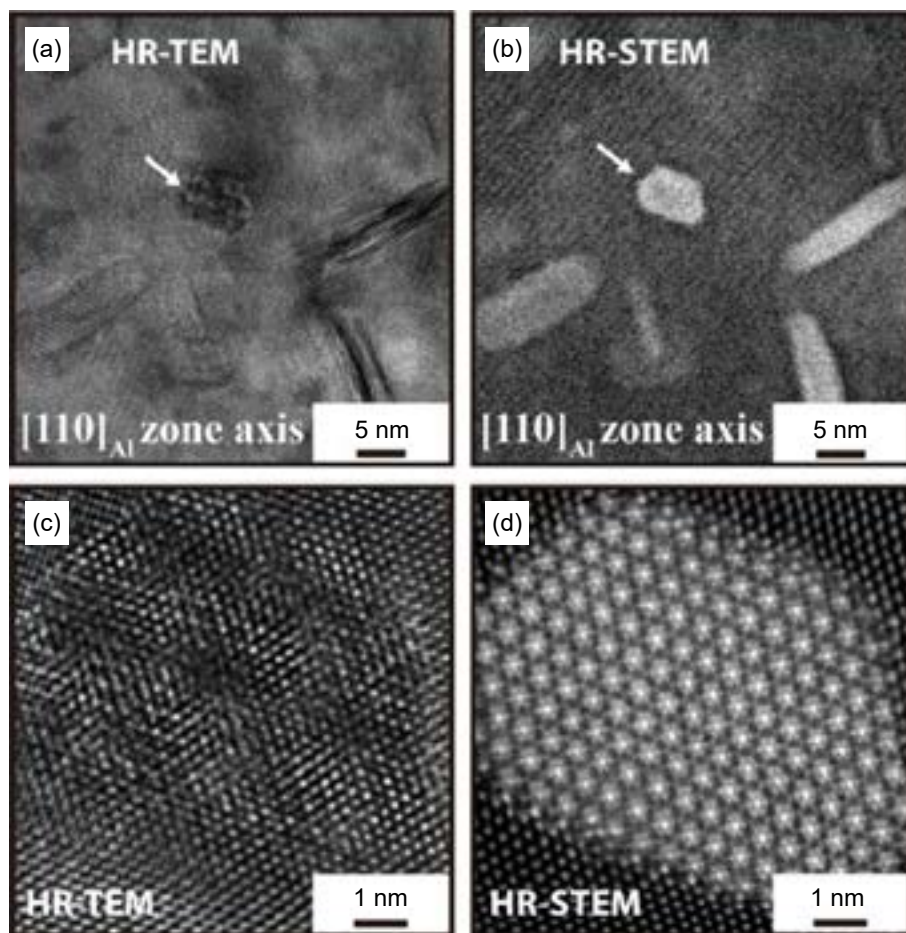


圖 9.高強度七系列鋁合金，電子束沿著基地 $[110]_{\text{Al}} // [0001]_{\eta_4}$ 晶軸下，豎立於鋁合金基地 $(110)_{\text{Al}}$ 平面之同一顆 η_4 析出物。(a) 穿透式電子顯微鏡射明視野 (bright field, BF) 影像，(b) 掃描穿透式電子顯微鏡之高角度環狀暗視野 (high angle annular dark field, HAADF) 影像，(c) 高解析穿透式電子顯微鏡之相對比影像，(d) 高解析高角度環狀暗視野影像⁽³⁾。

三、結論

回顧穿透式電子顯微鏡的技術發展歷程，製備高品質的試片一直是電子顯微鏡使用人員努力的目標，以各種方式所製備的樣品，期望試片的厚度可減薄於 20 nm 到 100 nm 之間且試片表面的潔淨度呈現最理想的狀態，若能符合上述的要求，將有利於試片顯微結構觀察與成分分析，呈現試片本身所蘊含的訊息。本文提及的會聚型氬離子束減薄拋光系統是實現這一目標的有力工具。

參考文獻

1. David B. Williams and C. Barry Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, 2nd ed., Springer, 669-670 (2009).
2. 鮑忠興與劉思謙, 近代穿透式電子顯微鏡實務, 二版, 台北: 滄海, 268 (2012).
3. 鍾采甫, 科儀新知, **232**, 9 (2022/09).
4. Kato, N. I., *Journal of Electron Microscopy*, **53** (5), 451 (2004).

5. Jeanne Ayache , Luc Beaunier , Jacqueline Boumendil , Gabrielle Ehret , Daniele Laub, *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*, Springer, 95-96 (2010).
6. Image courtesy of E.A. Fischione Instruments, Inc.
7. P Nowakowski, CS Bonifacio, MJ Campin, ML Ray, PE Fischione, *Microscopy and Microanalysis*, **23** (S1), 300 (2017).
8. Images provided by E.A. Fischione Instruments, Inc., Courtesy of P. Midgley, R. Dunin-Borkowski, and D. Cooper, University of Cambridge, Cambridge, UK.
9. A. Barna, R.E. Dunin-Borkowski, A.C. Twitchett, D. Cooper, P.A. Midgley, and B. Pecz. Proceedings of the 13th European Microscopy Congress, Antwerp (2004) 2 779-780.

作者簡介

李威志先生為國立台灣大學材料科學與工程學系暨研究所博士，現職為 E.A. Fischione Instruments 的業務經理。

Wei-Chih Li received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Taiwan University. He is currently working for E.A. Fischione Instruments as a Sales Manager.

陳健群先生為美國加州大學洛杉磯分校物理博士，現為國立清華大學工程與系統科學系副教授。

Chien-Chun Chen received his Ph.D. in the Department of Physics from University of California, Los Angeles. He is currently an Associate Professor in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.

鍾采甫先生為國立臺灣大學材料所博士，現為國立陽明交通大學材料系助理教授。

Tsai-Fu Chung received his Ph.D. in Materials Science and Engineering from National Taiwan University. He is currently an Assistant Professor in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

彭裕庭先生現為國立清華大學工程與系統科學系博士生。

Yu-Ting Peng is currently a Ph.D. student in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.

蕭素淳女士為淡江大學銀行學系學士，現為國家實驗研究院國家儀器科技研究中心真空儀器與檢校技術組助理技術師。

Su-Chun Hsiao received her B.C. in the Department of Banking and Finance from Tamkang University. She is currently an Assistant Technologist of Vacuum Instrument and Metrology Division, National Center for Instrumentation Research, NIAR.

蕭健男先生為國立台灣大學材料科學與工程學系暨研究所博士，現為國家實驗研究院國家儀器科技研究中心真空儀器與檢校技術組研究員兼真空群技術副總監。

Chien-Nan Hsiao received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Taiwan University. He is currently a Research Fellow and Deputy Technology Director of Vacuum Instrument and Metrology Division, National Center for Instrumentation Research, NIAR.

整合三維電子斷層與原子針尖分析技術的針狀樣品製備方式

Needle-shaped Specimen Preparation for Integrating 3D Electron Tomography and Atom Probe Analysis

彭裕庭、劉宇倫、蕭素淳、蕭健男、陳健群

Yu-Ting Peng, Yu-Lun Liu, Su-Chun Hsiao, Chien-Nan Hsiao, Chien-Chun Chen

近年來，隨著三維原子級斷層顯微技術 (three-dimensional atomic-scale tomography) 的發展，對試片製備技術的要求日益提升。高品質的三維斷層影像重建依賴於精確的樣品形貌，無論是原子級電子斷層顯微技術 (atomic electron tomography, AET) 或原子針尖斷層影像技術 (atom probe tomography, APT)，針狀試片 (needle-shaped) 皆被視為最適合的設計。在 AET 中，針狀試片可確保觀測區域於不同投影角度下不受遮蔽，且厚度與尺寸可以保持一致，以提升三維影像重構的精確度。APT 仰賴高電場蒸發機制，針狀試片可確保最大電場集中於針尖，從而提高元素解析的準確性。針狀試片的製備與傳統穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 的薄片形試片 (lamella) 製作方法相比有所不同，本文將描述針狀試片的製備流程，並探討其與傳統 TEM 試片製備方法的差異，以提升三維原子級顯微分析的精度與可靠性。

With the development of three-dimensional atomic-scale tomography, the requirements for specimen preparation technology have been increasing in recent years. High-quality 3D tomographic reconstruction depends on precise sample morphology. Whether it is atomic electron tomography (AET) or atom probe tomography (APT), needle-shaped specimen are considered the most suitable design. In AET, the needle-shaped specimen can ensure that the observation area is not barred in different projection angles and maintain consistency in thickness and size to improve reconstruction accuracy. APT leans on a high electric field evaporation mechanism. The needle-shaped specimen ensures that the maximum electric field is concentrated at the needle tip, and improving the accuracy of element analysis. The needle-shaped specimen's fabrication differs from the traditional lamella fabrication method for transmission electron microscopy (TEM). This article will describe the fabrication process of needle-shaped specimen and explore the differences between the traditional lamella specimen to improve the accuracy and reliability of 3D atomic-level microscopic analysis.

一、前言

三維原原子級電子斷層顯微技術與原子針尖斷層影像技術是現今材料科學領域中非常先進的技術⁽¹⁻⁴⁾，它們使研究人員能夠在原子尺度上詳細分析材料的結構與組成。AET 技術結合了高解析度電子顯微鏡成像和斷層重建技術，能夠為各種材料 (包括晶體和非晶材料) 提供精確的三維原子級結構數據⁽⁴⁻¹⁰⁾；而 APT 則利用原子量分析來獲取材料中各元素的精確位置，並重建其三維元素分佈^(11, 12)。然而，有了這些檢測技術的進展，仍然存在幾個挑戰。其中一個主要的難題是樣品準備技術的需求，必須能夠在成像過程中保持原子結構的完整性。雖然傳統上，使用聚焦離子束顯微鏡 (focused ion beam, FIB) 加工薄片試片 (lamella) 製作的技術上已相當成熟，且有不少方式可以解決過去離子束對材料造成物理或化學損傷，但其片狀形貌並不適合做為三維影像分析的試片，例如：樣品在不同角度下的投影是否皆為厚度、大小一致以及在不同角度下是否會被自身或是載具遮蔽到；又或者是在 APT 實驗中進行場蒸發時，是否可以確定最大電場是我們欲觀測的區域。綜合以上幾個問題，過去 lamella 試片雖然已經發展成熟，但其實並不適合做為三維原子級斷層顯微技術所使用之試片。為了適應三維原子級斷層顯微技術的需求，試片必須相應調整為最適合的形貌：針狀試片 (needle-shaped) 又或稱為針狀試片⁽¹⁰⁾。在本文中，將會提到傳統 lamella 試片以及針狀試片的製作過程及其差異，並會呈現一組使用針狀試片做出來的 AET 與 APT 的實驗結果，透過 TEM 影像與 APT 分析結果的交叉比對互相驗證，結果顯示，針狀試片能有效減少傳統 lamella 在高傾角成像時的遮蔽問題，並提供三維原子級斷層顯微技術可靠的試片製備方案。

二、掃描穿透式電子顯微鏡與薄片試片

在常見的掃描穿透式電子顯微鏡 (scanning transmission electron microscope, STEM) 分析中，試片通常採用薄片狀形貌，以確保電子束能夠順利穿透並獲得高品質影像。若需進行原子級高解析度成像 (high-resolution STEM, HR-STEM)，試片厚度通常需控制在 100 nm 以下，以降低電子散射效應並提升影像對比。

目前，薄片試片的製備方法主要包括機械研磨、電解拋光以及使用聚焦離子束顯微鏡等方式加工。其中，聚焦離子束顯微鏡已成為最常見且最具效率的技術，因其具備高精度材料去除能力，能夠精確定位並製備特定區域的超薄試片，特別適用於半導體、金屬及奈米材料等領域的高解析度結構分析^(13, 14)。

使用 聚焦離子束顯微鏡製備 TEM 試片的流程大致遵循以下步驟：

1. 保護層沉積

在試片的目標區域 (即需要進行分析的部位，region of interest, ROI) 使用氣體注入系統 (gas injection system, GIS)⁽¹⁴⁾，先在試片表面鍍上一層厚度約 1 微米之保護層，以降低後續離子束加工過程中對樣品表面造成的損傷。由於離子束沉積 (ion beam deposition, IBD) 的鍍率 (deposition rate) 遠高於電子束沉積 (electron beam deposition, EBD)，因此為了減短試片製作的時間，通常會分為兩個步驟鍍上。先使用電子束沉積鍍上約 100 奈米，減緩離子束對焦與沉積過程中對試片表面產生的損傷，再使用鍍率較高的離子束沉積將總厚度補足。常見的保護層材料通常有鉑 (Pt)、碳 (C) 或鎢 (W)，可根據需求選用適合的材料作為注入氣體搭配電子束或離子束鍍在樣品表面。

2. 粗切

此步驟是為了快速去除多餘材料，如圖 1(a)，並確保試片具有適當的尺寸，因此會先使用較高的離子束電流 (約 10 nA) 在樣品上進行初步切割，以獲得一塊厚度約 1.5 微米、深度約 5 微米的試片。

3. 試片提取與轉移

經過粗切把多兩側多餘的材料清除後，使用探針取出法 (如 omni-probe 或 micro-probing system)，在圖 1(b) 及 (c) 中將試片從樣品基板中提取、轉移至 TEM 銅網上，並透過 GIS 焊接固定，以便後續減薄處理。

4. 減薄並定位

如圖 1(d) 所示，試片固定至 TEM 銅網後，使用較小的離子束電流 (1–3 nA) 對試片進行減薄。此過程從試片的兩面開始切削，使其厚度逐漸降低，且確保待觀察區域有保持在試片的中心，最終減薄至小於 100 奈米。

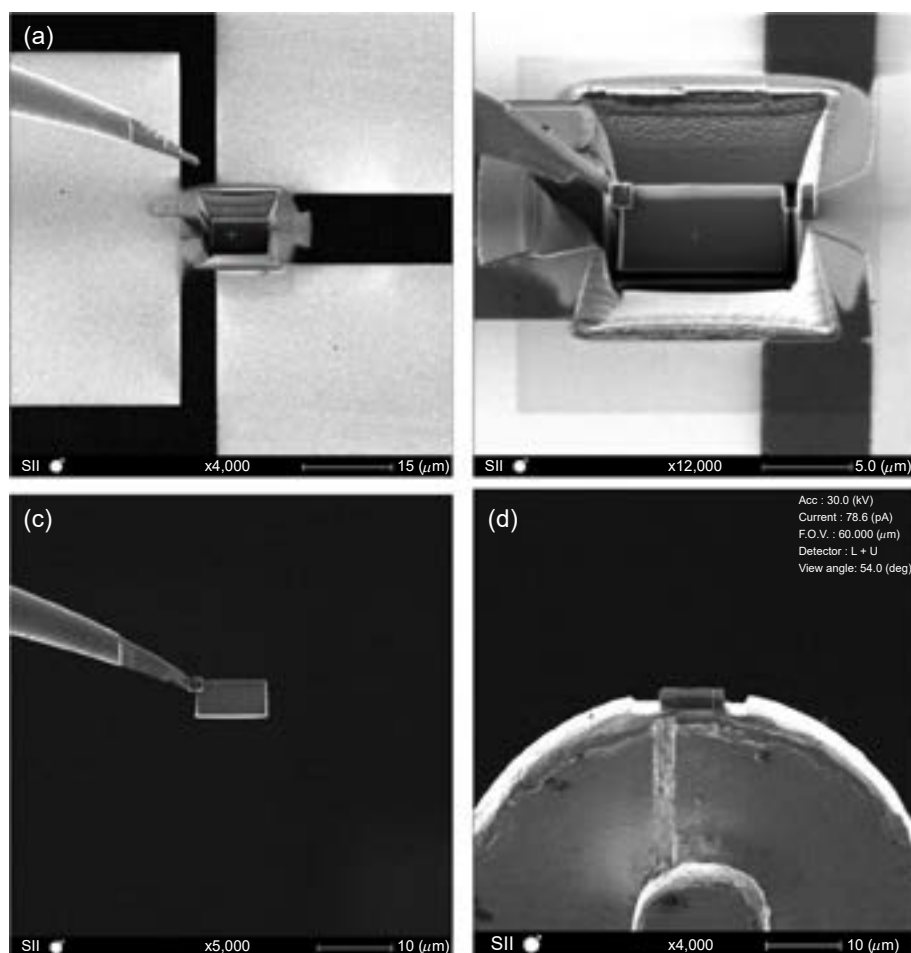


圖 1. (a) 使用大電流快速將試片兩側多餘的材料去除，只保留厚度約 1.5 微米。(b) 將探針焊接至試片上方，並把試片與基板切開分離。(c) 用探針將試片挑起離開基板，並轉移至銅網上。(d) 將挑起的試片焊接在銅網上並分離探針，最後將試片修薄至符合 TEM 可以觀測之 lamella 規格。

5. 低電壓拋光

當試片厚度達到預定的厚度後，為進一步去除離子束加工過程中在表面產生的損傷，需將離子束電壓降低至 5 kV 或 2 kV，進行低電壓拋光 (low-kv polishing)。將高能離子束造成的晶格損傷及表面污染去除，提升試片品質，確保 TEM 影像具有更高的信噪比與解析度。

根據上述的方式製作出來的 lamella 通常都有大面積的薄區可以進行 TEM 觀測，對於傳統二維檢測而言，可以快速且精確地獲得高品質的超薄試片，以滿足高分辨率透射電子顯微分析的需求。

三、三維斷層掃描與針狀樣品

製作 lamella 雖然已是非常成熟的技術，不過若是要進行三維原子級斷層顯微技術的話將會遇到幾個問題^(5, 10)：(1) 如圖 2(a)，樣品在傾轉拍攝時，一般網格型的 TEM 試片在傾轉到大概 70 度以上時將會被試片自己的銅網或是樣品桿本身遮蔽到，因此僅能拍攝約正負 70 度。(2) 在圖 2(b) 中，樣品在傾轉時，也會因為自身的厚度投影的關係，在樣品旋轉時造成投影出來的影像受到影響。

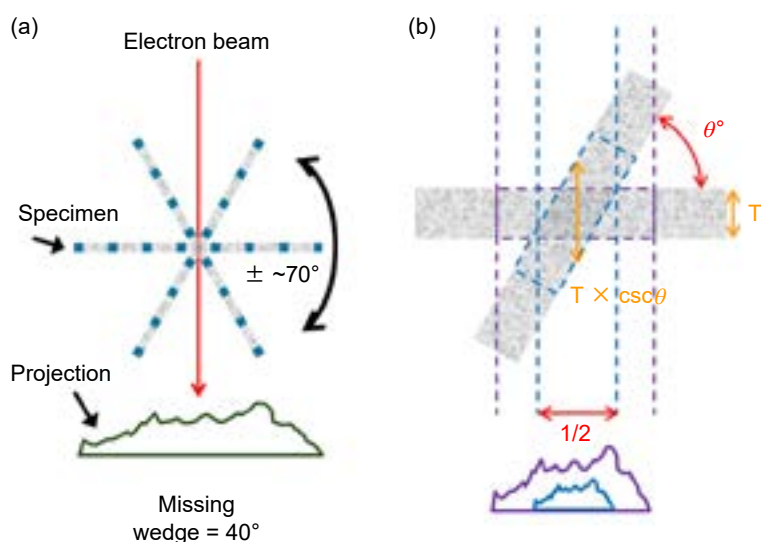


圖 2. (a) 網格型的 TEM 試片在傾轉到大概 70 度以上時之示意圖，圖中棕色部分為銅網，試片在高角度時可能會被銅網或是樣品桿本身遮蔽到。(b) 樣品在傾轉時，自身的厚度投影隨角度變化之關係。

因此，為了適應三維原子級斷層顯微技術的需求，試片的形貌必須相應調整，而針狀形貌可確保在 AET 傾轉的過程中，在任何角度下，樣品的尺寸與厚度皆保持一致，從而提升影像重建的精確度。此外，針狀結構能有效降低傾轉時因遮蔽效應造成的視野受限問題，確保觀測區域不受傾轉角度影響，進一步提高三維影像的解析度與可靠性。在 APT 實驗中，也可以確保最大電場集中於針尖，避免樣品內部元素影響電場分佈，從而提高元素解析的準確性。

在使用 FIB 製備針狀試片時，相較於傳統 lamella 試片的製作流程，存在顯著差異。初始步驟與 lamella 製備相同，均需透過氣相沉積系統 (GIS) 在待分析區域沉積一層保護層，以減少離子束輻照損傷，隨後使用大電流離子束移除周圍多餘材料。然而，與 lamella 試片需要從樣品中提取一塊薄片不同，針狀試片的製作通常直接提取一塊底部呈三角形的小塊材⁽¹⁵⁾，並利用 GIS 將其焊接至 AET 或 APT 專用基座，如圖 3 及圖 4 中兩者的區別。

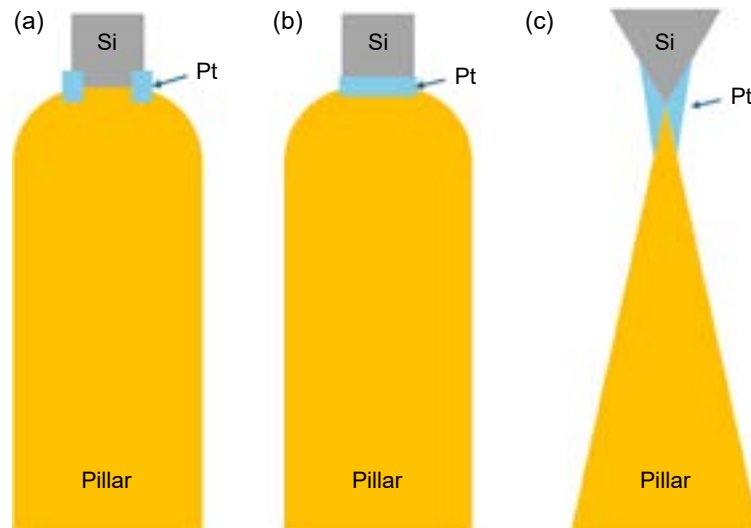


圖 3. (a)、(b) lamella 型 TEM 試片固定在銅網上的示意圖，圖中棕色部分為銅網，灰色部分為試片，淺藍色部分為使用 GIS 焊接時的 Pt 位置，可以看到 Pt 通常是鍍在樣品表面兩側或是底部表面，中間樣品與底座接觸的地方是沒有鍍材的。(c) 針狀試片固定在針狀底座示意圖，上面三角形的灰色為挑起的試片，試片下面的錐形尖端與底座尖端互相接觸，左右兩邊的空隙藉由 GIS 去沉積填滿空隙，這樣即使後續把外圍切削掉後仍保有部分 Pt 將兩者緊緊相黏。

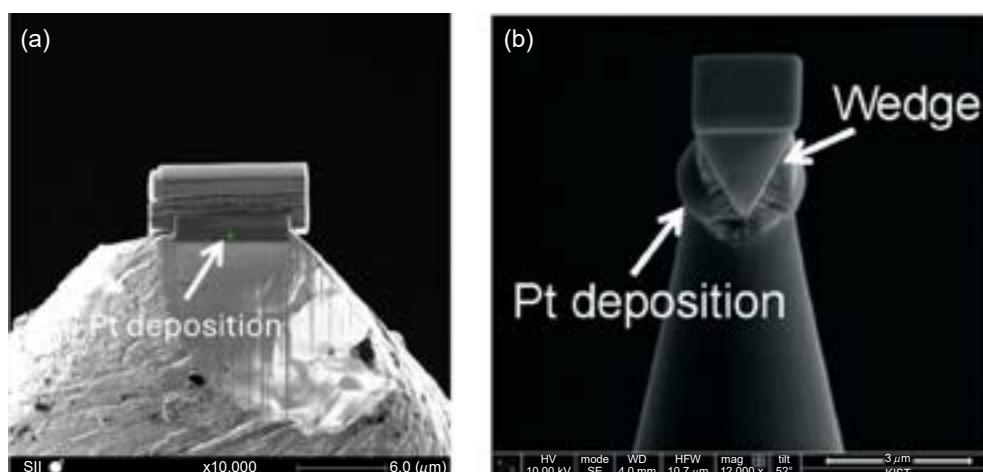


圖 4. (a) lamella 型 TEM 試片固定在銅底，可以看到 Pt 通常是鍍在樣品底部表面。(b) 針狀試片固定在底座，上面三角形的為挑起的試片，試片下面的錐形尖端與底座尖端互相接觸，左右兩邊的空隙藉由 GIS 去沉積填滿空隙，這樣即使後續把外圍切削掉後仍保有部分 Pt 將兩者緊緊相黏。

由於針狀試片的製備過程涉及環狀削除 (annular milling)，若僅依賴傳統 lamella 製程中的側向或表面焊接方式，在削除過程中固定點將會喪失，導致試片無法牢固附著於基座。因此，在製備初期即需提取底部呈三角形的試片，並利用 GIS 充分填補縫隙，以確保即使經過環狀削除，GIS 焊接點仍能穩固支撐試片，使待分析區域保持完整且牢固固定。

針狀試片會持續透過環狀削除將試片由外而內逼近至目標區域，切需搭配掃描式電子顯微鏡隨時注意樣品是否有維持在圓心，並根據當前的直徑調整離子束的距離及電流，最終將試片逼近至中心。

四、針狀樣品案例

此試片由國立清華大學工程與系統科學系 (NTHU) 吳永俊教授研究團隊提供，為一具有超晶格 (super lattice, SL) 結構的樣品。該 SL 試片由厚度僅約 5 奈米之矽 (Si) 與矽鍺 (SiGe) 交替堆疊，形成三週期的層狀排列⁽¹⁶⁾。由於其層狀結構清晰、元素分布均勻且穩定，能有效減少成分變異對分析結果的影響，因此特別適合作為 AET 與 APT 的對比與交叉驗證樣品。

我們透過上述之 FIB 針狀試片製作方法，將該 SL 結構保持在針尖上，由於 APT 是破壞性檢測，因此我們先使用位於國家實驗研究院國家儀器科技研究中心 (National Center for Instrumentation Research, NCIR) 之球面像差修正掃描穿透式電子顯微鏡 FEI Titan G2 80-200 ChemiSTEM 進行 STEM 的拍攝後，再與台灣清華大學工程與系統科學系朱鵬維教授研究團隊合作，使用財團法人國家實驗研究院台灣半導體研究中心 (Taiwan Semiconductor Research Institute, TSRI) 之原子針尖斷層影像儀 CEMECA LEAP 5000 XR 進行後續 APT 實驗及數據結果分析。

圖 5(a) 為 FIB 製程中透過 SEM 拍攝的影像，可清楚觀察到針狀試片的頂端待檢測區域約 60 nm，且周圍無任何遮蔽結構，確保後續 AET 與 APT 分析的視野不受影響。圖 5(b) 顯示 TEM 低倍 HAADF (high-angle annular dark field) 影像，其中可見試片與基座的銜接處呈

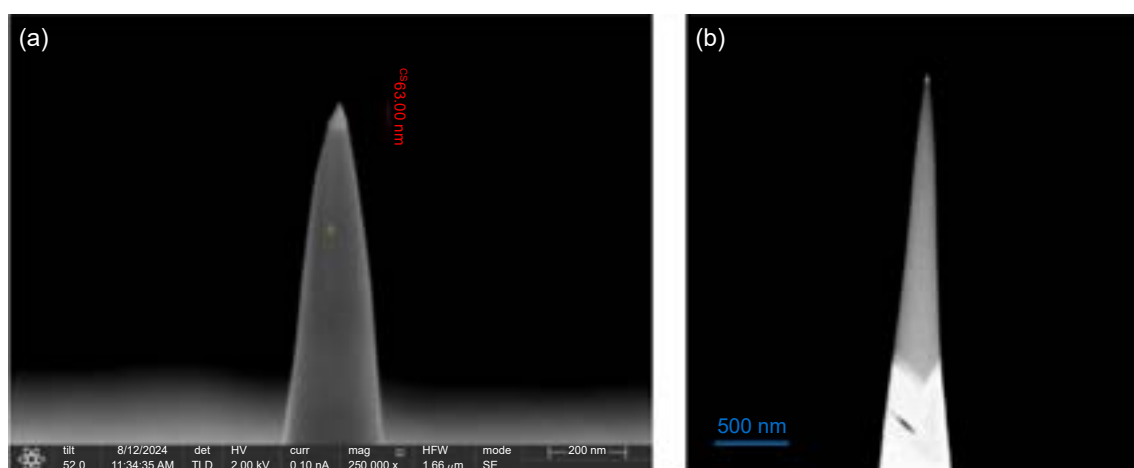


圖 5. (a) 為 FIB 製程中透過 SEM 拍攝的影像，可清楚觀察到針狀試片的頂端待檢測區域使用 FIB 切到僅剩約 60 nm 深度，且周圍無任何遮蔽，確保後續 AET 與 APT 分析的視野不受影響。(b) 為 TEM 中拍攝的低倍 HAADF 影像，可以清楚看到試片與基座的銜接處呈現錐形結構，且樣品確定沒有任何遮蔽。

現錐形結構。這是為了確保樣品能夠穩固焊接於基座上，避免試片在製程或分析過程中發生位移。此外，兩側填充部分為 GIS 沉積的鉑 (Pt)，進一步增強機械穩定性。

圖 6(a) 為該針狀試片的高倍 HAADF 影像，透過影像分析可精確測量每一層 SL 結構的厚度，並確認其層狀排列的均勻性。圖 6(b) 則為 APT 實驗所得的三維重建影像，可直觀顯示各元素在空間中的分布情況。透過 TEM 影像與 APT 分析結果的交叉比對，能夠確認各元素的位置互相對應，且各層的厚度相近，進一步驗證 AET 與 APT 所獲得的結構資訊具有高度一致性。

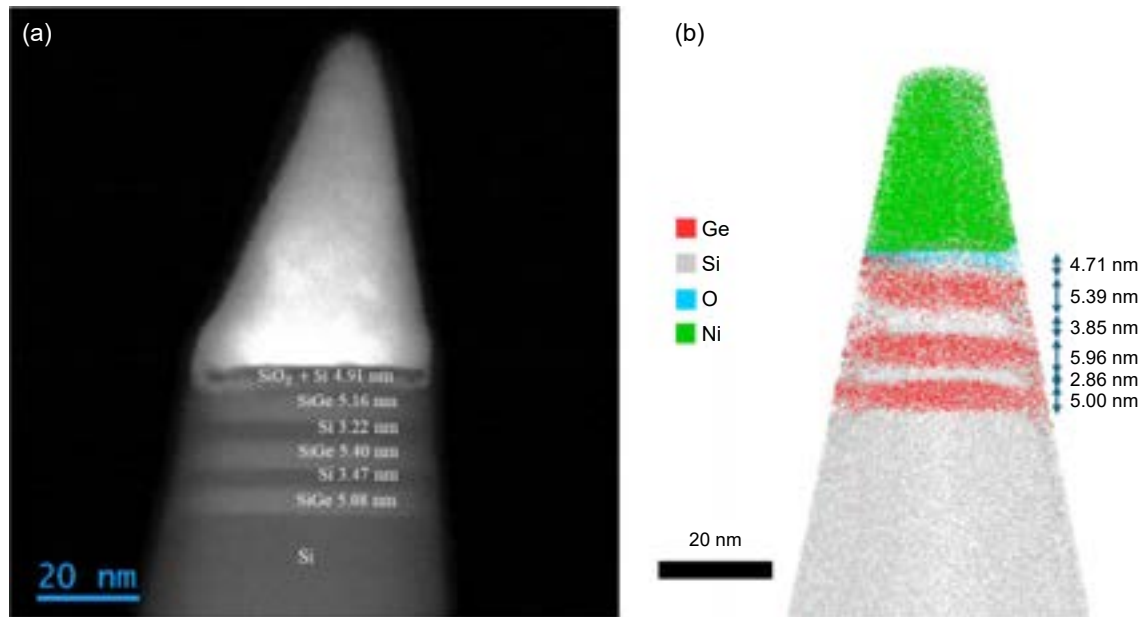


圖 6. (a) 為針狀試片的高倍 HAADF 影像，可以清楚看到 SL 每一層의影像，並量測出其厚度。(b) 為該針狀試片拍攝完後去做 APT 分析的結果。經由重組後，可以比對出各原子的空間分佈，厚度與位置皆與 TEM 中觀測到的結果有高度一致性。

本研究成功展示了高品質針狀試片的製備，其形貌須同時滿足 AET 與 APT 的試片要求，包括無遮蔽結構、確保樣品區域不受影響，且不得有比待測區域更突出的針尖，以避免場蒸發過程中的電場分布異常。這些條件的滿足使得 AET 和 APT 分析結果能夠互相驗證與比較，大幅提升試片的適用性與研究價值。

五、結論

透過 FIB 技術可以成功製備高品質的針狀試片，並結合 AET 及 APT 分析技術，驗證了試片在三維結構解析中的適用性與穩定性。結果顯示，針狀試片能有效減少傳統 lamella 在高傾角成像時的遮蔽問題，確保高解析度影像的獲取，並提升 APT 分析的精確度。此研究不僅為三維原子級斷層技術提供了可靠的試片製備方案，也為未來奈米材料的結構分析與元素分布研究奠定了重要基礎。

參考文獻

1. Miao, J., et al., *Microscopy and Microanalysis*, **26** (S2), 652 (2020).
2. Zhou, J., et al., *MRS Bulletin*, **45** (4), 290 (2020).
3. Kelly, T.F., et al., *Microscopy and Microanalysis*, **19** (3), 652 (2013).
4. Miao, J., P. Ercius, and S.J. Billinge, *Science*, **353** (6306), aaf2157 (2016).
5. Leary, R.K. and P.A. Midgley, *Electron Tomography in Materials Science*, in *Springer Handbook of Microscopy*, P.W. Hawkes and J.C.H. Spence, Editors, Springer International Publishing: Cham., pp.1279-1329 (2019).
6. Helveg, S., et al., *Nature*, **427** (6973), 426 (2004).
7. 陳健群, 科儀新知, **212**, 85 (2017).
8. Chen, C.-C., et al., *Three-dimensional imaging of dislocations in a nanoparticle at atomic resolution*. *Nature*, 2013. **496** (7443): p. 74-77.
9. Scott, M., et al., *Nature*, **483** (7390), 444 (2012).
10. 彭裕庭, 劉宇倫, 陳健群, 科儀新知, **232**, 48 (2022).
11. Miller, M.K., *Atom probe tomography: analysis at the atomic level*, Springer Science & Business Media, (2012).
12. Gault, B., et al., *Nature Reviews Methods Primers*, **1** (1), 51 (2021).
13. Melngailis, J., *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics Processing and Phenomena*, **5** (2), 469 (1987).
14. Volkert, C.A. and A.M. Minor, *MRS bulletin*, **32** (5), 389 (2007).
15. Lee, J.Y. and J.-P. Ahn, *Applied Microscopy*, **46** (1), 14 (2016).
16. Yao, Y.-J., et al., *Nanomaterials*, **13** (8), 1310 (2023).

作者簡介

彭裕庭先生現為國立清華大學工程與系統科學系博士生。

Yu-Ting Peng is currently a Ph.D. student in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.

劉宇倫女士現為國立清華大學工程與系統科學系博士生。

Yu-Lun Liu is currently a Ph.D. student in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.

蕭素淳女士為淡江大學銀行學系學士，現為國家實驗研究院國家儀器科技研究中心真空儀器與檢校技術組助理技術師。

Su-Chun Hsiao received her B.C. in the Department of Banking and Finance from Tamkang University. She is currently an Assistant Technologist of Vacuum Instrument and Metrology Division, National Center for Instrumentation Research, NIAR.

蕭健男先生為國立台灣大學材料科學與工程學系暨研究所博士，現為國家實驗研究院國家儀器科技研究中心真空儀器與檢校技術組研究員兼真空群技術副總監。

Chien-Nan Hsiao received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Taiwan University. He is currently a Research Fellow and Deputy Technology Director of Vacuum Instrument and Metrology Division, National Center for Instrumentation Research, NIAR.

陳健群先生為美國加州大學洛杉磯分校物理博士，現為國立清華大學工程與系統科學系副教授。

Chien-Chun Chen received his Ph.D. in the Department of Physics from University of California, Los Angeles. He is currently an Associate Professor in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University.

Cryo-TEM 的先進試片製備技術

Advanced Cryo-TEM Specimen Preparation Technology

黃士忻、章為皓

Shih-Hsin Huang, Wei-Hau Chang

冷凍電子顯微鏡技術已成為結構生物學研究的關鍵平台，本文將系統性探討冷凍穿透式電子顯微鏡 (cryo-TEM) 試片製備技術的發展歷程，從 Jacques Dubochet 開創性的「plunge-freezing」技術，到當代先進的製備方法。首先，無序冰厚度的控制對影像品質至關重要。理想厚度範圍為 20–100 nm，需在樣品包埋的完整性與電子穿透率中取得平衡；而空氣–水介面 (air-water interface, AWI) 的瓶頸，限制了高解析度結構解析的成功率。研究顯示，AWI 導致生物分子變性、優先方向性問題及不均勻分佈，將嚴重影響單顆粒分析的重建品質。針對此核心挑戰，筆者整理了三大創新解決策略：(1) 載網材料改進，包括石墨烯支持膜、親和性網格及自排濕網格技術；(2) 儀器優化方法，涵蓋 Spotiton 快速冷凍系統、VitroJet 無濾紙技術及冷凍聚焦離子束研磨；(3) 樣品配方調整，運用介面活性劑、LEA 蛋白等保護性添加劑。最後，在材料科學方面，cryo-EM 技術也展現了在電池材料、軟物質高分子及電催化劑研究的廣泛應用潛力。

Cryo-electron microscopy (cryo-EM) has emerged as a pivotal platform for structural biology research. This review systematically examines the developmental trajectory of cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) specimen preparation techniques, spanning from Jacques Dubochet's pioneering plunge-freezing methodology to contemporary advanced preparation protocols. First, vitreous ice thickness control proves critical for imaging quality optimization. The ideal thickness range of 20–100 nm necessitates careful balance between sample embedding integrity and electron penetration efficiency. However, the air-water interface (AWI) bottleneck continues to constrain the success rates of high-resolution structural determination. Scientists have demonstrated that AWI-induced biomolecular denaturation, preferred orientation artifacts, and heterogeneous particle distribution significantly compromise single-particle analysis reconstruction quality. Addressing these fundamental challenges, we listed three principal innovative solution strategies: (1) grid material enhancements, encompassing graphene support films, affinity grids, and self-wicking grid technologies; (2) instrumentation optimization approaches, including Spotiton rapid vitrification systems, VitroJet blotting-free methodologies, and cryo-focused ion beam milling techniques; (3) sample formulation modifications utilizing surfactants, LEA proteins, and other protective additives. Finally, in material science applications, cryo-EM technology demonstrates extensive potential for investigations of battery materials, soft matter polymers, and electrocatalyst systems.

一、冷凍電子顯微鏡技術的發展與應用

冷凍電子顯微鏡技術 (cryo-EM) 已成為解析生物分子結構的關鍵方法，特別適用於難以結晶的生物大分子。其主要特點是在極低溫度下觀察樣品，保持近天然狀態，避免傳統染色或固定過程導致的結構改變。冷凍電子顯微鏡主要包含冷凍穿透式電子顯微鏡 (cryo-TEM) 和冷凍掃描式電子顯微鏡 (cryo-SEM)。

冷凍電子顯微鏡技術可追溯至 20 世紀 70 年代，但傳統冷凍方法常導致冰晶形成，破壞樣品結構。1980 年代，Jacques Dubochet 及研究團隊開發「快速冷凍」(plunge-freezing) 技術，將生物樣品快速冷凍為玻璃態冰，有效避免冰晶形成，因此與 Joachim Frank 和 Richard Henderson 共同獲得 2017 年諾貝爾化學獎。

從「團塊學 (blobology)」到「解析度革命」⁽¹⁾，當前低溫電子顯微技術的成功得益於三大關鍵發展：(1) 保持生物分子水合狀態的樣品凍結製備方法、(2) 低溫環境下生物分子的穩定化、以及 (3) 計算生物分子結構的演算法。相較於傳統的 X 射線晶體學和核磁共振光譜學 (NMR)，cryo-EM 不需要樣品結晶，就可觀察更大、更複雜的生物分子複合體，同時能解析動態生物分子中的多種構形狀態⁽²⁾。

值得注意的是，cryo-EM 技術的應用範圍已從結構生物學擴展至材料科學領域。材料科學家開始採用 cryo-EM 技術研究易受電子束輻射損傷或環境暴露影響的材料，如電池材料、軟質高分子、金屬有機骨架 (MOFs)、鈣鈦礦太陽能電池、電催化劑及量子材料等。這些材料通常具有弱鍵結或高反應性，傳統室溫下的透射電子顯微鏡 (TEM) 和掃描透射電子顯微鏡 (STEM) 技術難以觀察其原始狀態結構。

引此，要獲得高解析度的 cryo-EM 數據，優質的試片製備至關重要。本文將探討 cryo-TEM 試片製備的關鍵技術，尤其著重於解決空氣－水介面 (air-water interface, AWI) 帶來的問題。

二、Dubochet 與「plunge-freezing」技術的突破

Jacques Dubochet 的「plunge-freezing」技術是 cryo-TEM 發展史上的里程碑。在此之前，電子顯微鏡樣品製備通常需要乾燥或重金屬染色，這些處理往往破壞生物分子的天然結構。

Dubochet 的研究受到前輩科學家的啟發。1970 年代，Nigel Unwin 和 Richard Henderson 利用糖作為環境取代重金屬鹽，並於 1975 年成功解析第一個膜蛋白－紫色膜菌視紫質 (purple membrane bacteriorhodopsin) 的三維結構⁽³⁾。1976 年，Bob Gleaser 在 -170°C 下觀察細菌的研究，啟發了 Dubochet 研究無序冰⁽⁴⁾。

Dubochet 和同事 Alasdair McDowall 發現，使用液態乙烷作為冷卻劑快速冷卻水滴，可形成非晶態的玻璃態冰⁽⁵⁾。1981 年時他們發現：若冷卻速率夠快，從稀釋溶液甚至純水中也能獲得玻璃態⁽⁶⁾。Marc Adrian 發明了在有微米大小孔洞的支撐膜上放置生物懸浮液，用吸水紙吸走大部分液體，再將樣本快速冷凍在液態乙烷中的方法⁽⁷⁾。

「低溫速凍樣品製備」(plunge-freezing) 技術的核心原理是將生物樣品快速冷凍至極低溫度 (通常低於零下 160°C)，使水分子來不及形成有序的冰晶結構，進而形成無序的玻璃態冰 (vitreous ice)⁽⁸⁾。其主要步驟包括：將生物樣品懸浮液放置在電子顯微鏡網格上；使用濾紙吸去多餘液體，留下薄薄的一層，然後將網格快速浸入預冷的液態乙烷冷卻劑中，隨後將冷凍後的網格轉移至液態氮中保存或直接進行觀察。

此技術解決了「如何在保持樣品水合狀態的同時，又不使其在電子顯微鏡的高真空環境中蒸發？」的核心難題。透過快速冷凍形成玻璃態冰，水分子被固定在無序狀態，既不會形成破壞樣品結構的冰晶，又不會在真空中蒸發。

而在材料科學領域，特別是軟物質和多孔材料的研究中，plunge-freezing 技術同樣適用，但需要針對有機溶劑進行優化。1990 年代，材料科學家開始將 cryo-EM 應用於表面活性劑、高分子及其與其他材料的相互作用研究。例如，Lin 等人使用 cryo-TEM 研究矽氧烷表面活性劑的水溶液中的囊泡和微胞結構⁽⁹⁾；Regev 等人則利用 cryo-TEM 與其他技術結合，研究四組分非離子型微乳液的微觀結構⁽¹⁰⁾。

三、水的超臨界研究

水的相態行為在 cryo-TEM 中扮演著關鍵角色，因為樣品製備過程中水的冷凍狀態直接影響到成像質量和結構解析的準確性。水的超臨界狀態是指水在超過臨界溫度 (374 °C) 和臨界壓力 (22.1 MPa) 時的特殊狀態⁽¹¹⁾。在此狀態下，水會展現出介於液態和氣態之間的特性：密度較低，黏度接近氣體，擴散係數顯著提高，且溶解性增強。雖然超臨界水不直接應用於 cryo-TEM 樣品製備，但其研究為理解「水在極端條件下的行為」提供了重要參考值⁽¹²⁾。

玻璃化過程是指液體在快速冷卻過程中未形成有序的晶體結構，進而直接成為無序固態的現象⁽¹³⁾，如圖 1 所示。此過程的關鍵在於冷卻速率必須足夠快到使分子來不及重新排列形成晶體結構。在 cryo-TEM 中，樣品中的水經快速冷凍後形成的非晶態固體被稱為非結晶冰 (amorphous ice) 或無序冰 (vitreous ice)⁽¹⁴⁾。根據冷凍條件的不同，可形成不同密度的非晶冰，主要包括低密度非結晶冰 (Low-Density Amorphous ice, LDA) 和高密度非結晶冰 (High-Density Amorphous ice, HDA)⁽¹⁵⁾。

LDA 具有約 0.94 g/cm³ 的密度，通常通過在環境壓力下快速冷卻液態水形成，如使用「plunge-freezing」技術。其形成溫度通常需低於 136 K (−137 °C)，結構特徵類似於常規六方冰 (hexagonal ice)，但分子排列呈無序狀態⁽¹⁶⁾。在 cryo-TEM 實驗中的冰層大多屬於 LDA，具有良好的電子穿透性⁽¹⁷⁾。

相對而言，HDA 密度高達約 1.17 g/cm³，通常需在高壓條件下 (> 1.5 GPa) 冷凍六方冰，或使用「high-pressure freezing」技術製備⁽¹⁸⁾。其分子排列更為緻密，類似於高壓下液態水的結構特性⁽¹⁶⁾。值得注意的是，HDA 在電子束照射下可能轉變為 LDA，導致樣品體積變化⁽¹⁹⁾。

玻璃轉化溫度 (T_g) 是評估非晶態冰穩定性的關鍵參數，代表非晶態物質從剛性固態 (玻璃態) 轉變為黏性液態 (過冷液體) 的臨界溫度⁽²⁰⁾。LDA 的 T_g 約為 136 K (−137 °C)，而 HDA 的 T_g 則約為 116 K (−157 °C)。在 cryo-TEM 操作過程中，必須確保樣品溫度低於相應的 T_g，以維持非晶冰的結構穩定性⁽²¹⁾。

在材料科學研究中，除水溶液外，有機溶劑的玻璃化也是 cryo-TEM 樣品製備的重要考量。許多軟物質和多孔材料需在有機溶劑中保持其天然結構。例如：de with 等人成功使用 cryo-TEM 研究玻璃化有機溶劑中的聚 (3-己基噻吩) (poly(3-hexylthiophene, P3HT) 組裝體，顯示納米線中 1.7 nm 間距的三維片層結構⁽²²⁾。研究團隊證實有機溶劑如：正癸烷、甲苯、1,2-二氯苯，都能通過適當的 plunge-freezing 技術成功玻璃化，但需注意其玻璃化溫度和冷凍條件與水溶液有所不同。

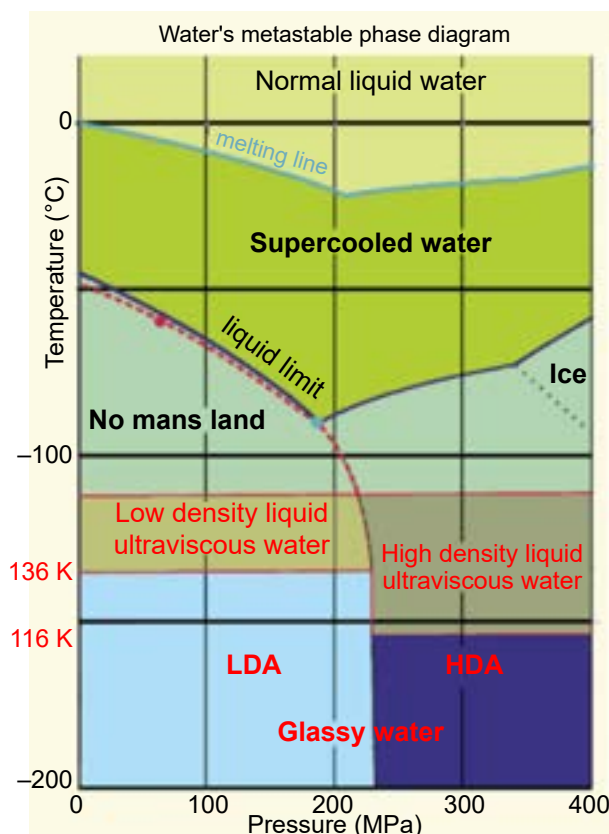


圖 1. 為水的亞穩態相圖 (metastability phase diagram) 呈現了在不同溫度與壓力條件下的複雜相變行為。該圖顯示從常態液態水至超冷水、玻璃態水的轉變區域。「無人可及區」(no mans land) 為實驗難以探測的區域。更下方呈現了兩種不同的相態：「低密度水 (LDL) 與低密度非結晶冰 (LDA) 對應著「高密度水 (HDL) 與高密度非結晶冰 (HDA)。兩者的液態相會存在著臨界點 (藍色點與紅色點)，而兩相態的交界面沿著臨界點延伸，即為威登線 (widom line)，以紅色虛線表示之。LDA 的玻璃轉化溫度 (T_g) 約為 136 K (-137°C)，而 HDA 的 T_g 則約為 116 K (-157°C)。LDA 與 HDA 都屬於非結晶冰 (amorphous ice)，也稱為玻璃狀冰 (glassy ice)，無序冰 (vitreous ice)。圖片與圖說引用自：Martin Chaplin - Water Structure And Science 網站：https://water.lsbu.ac.uk/water/amorphous_ice.html。

四、無序冰厚度影響 Cryo-TEM 的觀測

無序冰厚度是決定 cryo-TEM 觀測質量的關鍵參數。適當的冰層厚度在確保樣品完全包埋的同時，還需提供足夠的電子穿透率以獲得高對比度影像。

冰層厚度的調控面臨著雙重挑戰：如圖 2 所示：過薄的冰層可能導致樣品部分暴露於空氣中，造成乾燥或變形⁽²³⁾，增加樣品與空氣－水介面 (AWI) 接觸的機會，導致蛋白質變性或優先方向性問題⁽²⁴⁾，且可能無法完全包覆較大的生物分子複合體；而過厚的冰層則會增加電子散射，會顯著降低影像對比度和信噪比⁽²⁵⁾，加劇電子束穿透過程中的樣品輻射損傷⁽²⁶⁾，並可能因多次散射產生影像假影 (artifact) 而降低最終解析度⁽²⁷⁾。

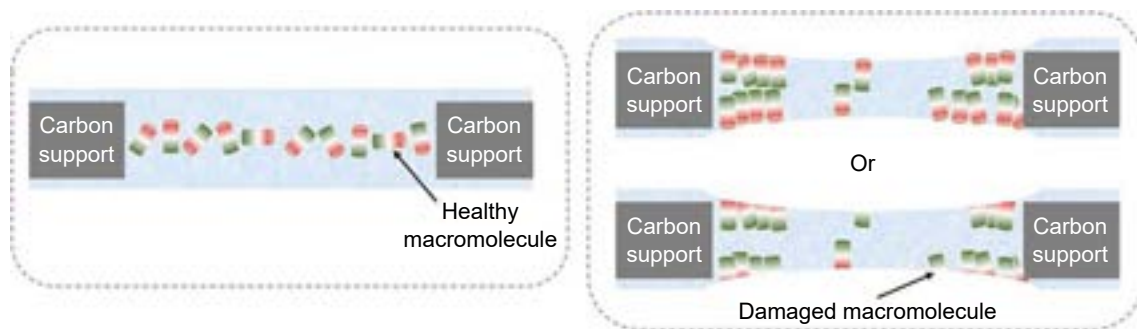


圖 2. 為生物巨分子(如蛋白質)在薄冰層中的理想與實際狀況比較示意圖。左側為理想狀態下，健康的巨分子均勻分佈於冰層中央平面，維持原生構形。右側顯示實際上，生物巨分子往往會被吸附至空氣－水介面(AWI)，因而導致兩種不良結果：(1) 巨分子傾向於聚集在冰層表面，產生優選取向問題(右上)；(2) 因 AWI 環境而變性，失去原生結構特徵(右下)。此情形常使冷凍電子顯微鏡樣品品質降低，進而影響後續高解析度結構分析。圖片與圖說引用自文獻⁽⁷⁹⁾。

實驗研究顯示，理想的冰層厚度應略大於目標樣品顆粒直徑⁽²⁸⁾。對於大多數的蛋白質複合體，最佳冰層厚度通常維持在 20–100 nm 範圍內⁽²⁹⁾；而對於更大的樣品(如胞器或細胞切片)，則可能需要 100–300 nm 的冰層厚度以確保完整包埋⁽³⁰⁾。

在冷凍技術的選擇上除「plunge-freezing」外，還有「高壓冷凍法」(High-pressure freezing, HPF)。兩者各有特點：「plunge-freezing」主要形成低密度非晶態冰(LDA)，冰層通常較薄(< 100 nm)，適合小型樣品⁽³¹⁾，具有較高的冷凍速率和操作便捷性，但僅適用於薄樣品(< 10 μm)；而 HPF 則主要形成高密度非晶態冰(HDA)⁽³²⁾，可處理厚度達 200 μm 的樣品，通過高壓(約 2000 bar)冷凍過程抑制冰晶形成，雖然設備較為複雜⁽³³⁾，但特別適合細胞和組織切片等體積較大樣品的冷凍處理⁽³⁴⁾。

為了精確控制冰層厚度，研究者開發多種方法：傳統的濾紙吸附法(blotting)通過調整濾紙接觸時間和壓力控制剩餘液體量⁽³⁵⁾；自動化設備如 ThermalFisher Vitrobot、Leica GP、Gatan Cryoplunge 等提供精確的參數控制⁽³⁶⁾；無濾紙吸附技術(blotting-free methods)如：Spotiton、VitroJet 等通過控制液滴體積和噴射參數直接調控⁽³⁷⁾；而聚焦離子束(focused ion beam, FIB)研磨則用於冷凍後的精準削薄處理⁽³⁸⁾。

在材料科學領域，冰層厚度的控制同樣需要被重視。Weber 等人使用 cryo-ET 技術首次觀察到水合 Nafion 的三維重建結構，顯示其具有約 5 nm 間距的互連通道型網絡，這種直接成像方法為質子傳輸的分子動力學模擬提供了重要參考⁽³⁹⁾。此外，Minor 團隊結合 4D-STEM 與低溫技術，成功建立有機系統的結構－性能關係，利用添加劑帶來的設備性能改善與高分子中納米晶體區域的分佈和取向相互關聯。然而，這個系統即使在液氮溫度下，電子束損傷的影響仍限制了電子顯微鏡的掃描步進長度，這進一步表明降低電子劑量是優化成像的關鍵策略⁽⁴⁰⁾。

五、空氣－水介面對 Cryo-TEM 樣品的影響

空氣－水介面「air-water interface」(AWI)是指液體水與空氣接觸形成的界面區域⁽⁴¹⁾。在 cryo-TEM 樣品製備過程中，當樣品溶液被滴加到載網上並經濾紙吸附後，形成厚度僅 50–100 nm 的薄膜⁽⁴²⁾，其兩側表面與空氣接觸即構成 AWI。

AWI 的形成受多因素影響：水的高表面張力：(約 72 mN/m, 25 °C) 使水分子傾向最小化表面積；生物分子的兩親性特質 (同時具有親水和疏水區域)：導致它們在介面處產生優先方向性 (preferred orientation)；緩衝液中的各類添加劑也可能改變界面的物理化學特性。

AWI 對生物樣品的影響主要表現在三個方面：首先，蛋白質分子在 AWI 處傾向攤開結構，暴露其內部疏水核心，導致不可逆的構形變化⁽⁴³⁾。此外，如圖 3 所示：研究發現許多蛋白質會在 AWI 處停留並伴隨活性喪失，甚至產生聚集 (protein aggregation)⁽⁴⁴⁾；其次，生物分子在 AWI 處會為了能量最小化而採取優先方向性 (preferred orientation)⁽⁴⁵⁾，因而限制了顆粒在 cryo-TEM 中的可觀察視角，導致三維重建中出現方向性資訊缺失⁽⁴⁶⁾；第三，AWI 可能導致樣品在冰層中分佈不均勻，造成數據收集效率下降⁽⁴⁷⁾。

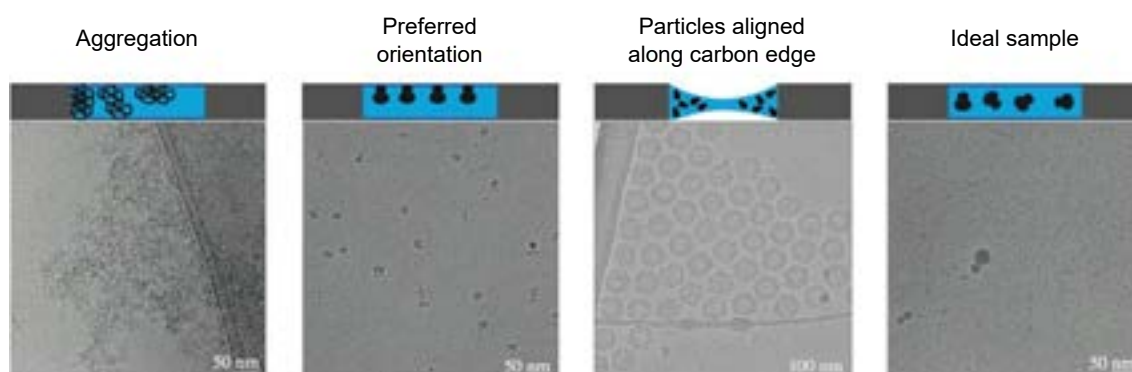


圖 3. 為顆粒分佈較差的例子，顯示「聚集」、發生在空氣－水介面 (AWI) 的「優先方向性」、以及顆粒沿著碳膜邊緣散佈等狀況示意圖及實際照片。圖片與圖說引用自：https://myscope.training/CRYO_Optimisation_of_orientation_and_distribution。

在後續的 cryo-TEM 單顆粒分析「single particle analysis」(SPA) 三維重建方面，AWI 的對其負面影響為：因優先方向性導致傅立葉空間中某些方向資訊缺失，產生解析度各向異性 (anisotropic)⁽⁴⁸⁾；蛋白質變性可能導致顆粒分類 (2D classification) 和對齊 (alignment) 錯誤，降低最終重建質量；大量來自 AWI 處的變性顆粒可能導致重建結構與天然構形間產生顯著差異⁽⁴⁹⁾。這些問題不僅影響結構解析度，還可能導致生物學功能解釋的偏差。

在電池材料的相關研究方面，由於「固體－液體交界面」在 TEM 真空腔體內的低壓需求而難以達成，因此該領域以往的策略是使用 in situ liquid phase TEM (原位液相透射電子顯微鏡，LP-TEM) 完成的。隨著 cryo-EM 的發展，藉由使液體電解質玻璃化並開發低溫切片技術，科學家們能研究和保存這些通常難以捕捉的界面。2017 年，Li 等人首創將低溫電子顯微鏡技術應用於敏感性電池材料，透過特殊樣品製備協議迅速冷凍電池材料，避免環境暴露，成功保存原生電化學狀態。研究發現鋰金屬表面兩種不同界面奈米結構，建立了界面結構與電池性能的關聯性，為電池界面研究開創新方法 (如圖 4 所示)⁽⁵⁰⁾。此後，Meng 團隊使用低溫電子顯微鏡觀察到了成核初期階段的非晶態鋰金屬⁽⁵¹⁾，而 Kourkoutis 團隊使用低溫掃描透射電子顯微鏡結合電子能量損失譜學 (EELS)，探測到了電池運行過程中產生的大量 LiH，觀察約 100 nm 厚，液體電解質中的軟性、延伸的固體－電解質交界面 (solid-electrolyte interphase, SEI)，並繪製了包封在玻璃化電解質中的鋰的液體/固體界面圖⁽⁵²⁾。這些研究說明了，對於高度活性的鋰金屬等電池材料而言，「保持樣品原始狀態」是使用低溫電子顯微鏡技術關鍵目的，亦即避免其與空氣接觸而導致的降解或改變。

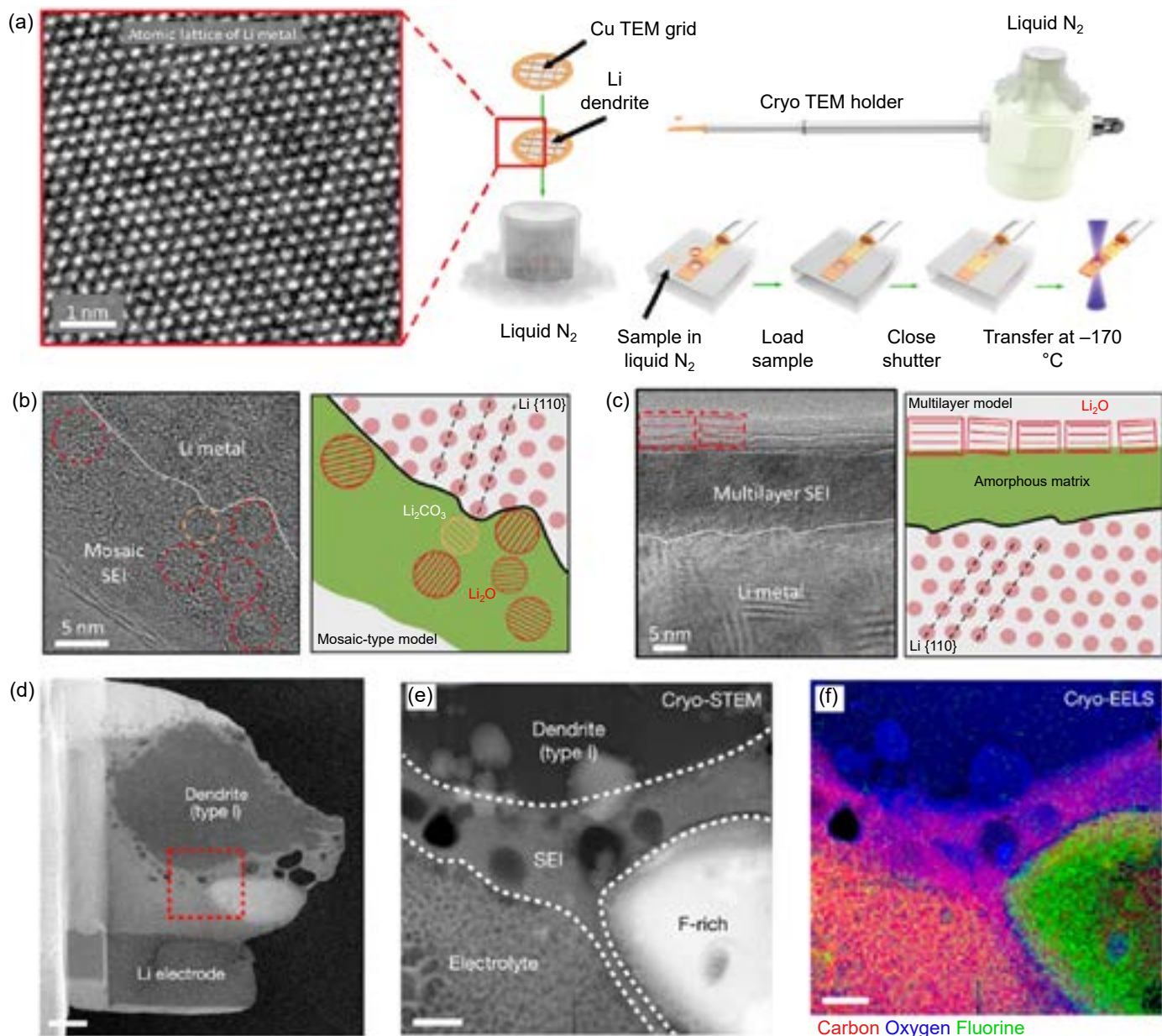


圖 4. 為電池材料在冷凍電子顯微鏡下的影像分析。(a) 為鋰金屬的原子解析度冷凍電子顯微鏡圖像，與樣品低溫轉移過程的示意圖。(b,c) 為在不同電解質化學環境中觀察到的 (b) 馬賽克狀固體電解質界面 (SEI) 納米結構，和 (c) 多層固體電解質界面納米結構的低溫電子顯微鏡圖像。(d) 經冷凍聚焦離子束 (cryo-FIB) 剝離 (life-out) 後的薄片 (lamellae)。(e) 電池內部固-液界面的冷凍掃描穿透式電子顯微鏡 (STEM) 圖像。(f) 電子能量損失譜學 (EELS) 元素映射顯示界面處的碳、氧和氟成分圖片與圖說引用自 ACS Nano 2020, 14, 9263-927653。

電催化劑領域，三相邊界 (the triple phase boundary, TPB) 是電催化發生的區域，也許是最令人興奮但最難成像的結構。通過在氫演化反應 (hydrogen evolution reaction, HER) 期間在薄液膜 (約 50 nm) 中凍結 Pt 催化劑，可能保存固體、液體和氣體之間接觸的區域，以觀察這些電化學活性區域，也是應用了 cryo-EM 的相關技術⁽⁵³⁾。

六、為解決 AWI 而開發的先進試片製備技術

針對 AWI 引發的問題，研究者已開發多種創新製備技術，筆者將其分為載網材料改進、儀器優化和樣品配方調整三大類策略。

TEM 網格材料表面的改善

親水性支持膜 (hydrophilic support films) 技術通過增強樣品與支持膜的親和力，減少樣品向 AWI 擴散的傾向⁽⁵⁴⁾。其中，石墨烯 (graphene) / 氧化石墨烯 (graphene-oxide) 支持膜，因為其原子級厚度 (< 1 nm) 和優異的電子穿透性，已成為高解析 cryo-TEM 的理想選擇⁽⁵⁵⁾，能有效減少樣品的優先方向性問題⁽⁵⁶⁾；而連續碳膜的厚度通常為 3–10 nm，需經電漿清洗處理增強親水性⁽⁵⁷⁾；親水性聚合物膜如聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)、聚酰胺 (polyamide, PA) 等則提供良好的生物相容性⁽⁵⁸⁾。

「親和性網格」(affinity grids) 通過特異性分子識別固定目標生物分子⁽⁵⁹⁾，常見類型包括：脂質單層修飾網格，如 Ni-NTA 脂質修飾網格可特異結合組氨酸標籤 (his-tag) 蛋白質⁽⁶⁰⁾；蛋白質修飾網格，如鏈黴親和素 (streptavidin) 修飾網格可捕捉生物素化 (biotinylated) 的樣品⁽⁶¹⁾；而 DNA 修飾網格則利用鹼基互補配對原理來實現⁽⁶²⁾。

表面電漿清洗 (glow-discharge) 技術通過改變網格表面電荷分佈調控其親水性：在氧氣環境中進行的負離子電漿清洗使表面帶負電荷，適合大多數中性或帶正電的樣品；而在戊胺 (amylamine) 環境中進行的正離子電漿清洗則使表面帶正電，適用於核酸等帶負電樣品⁽¹⁴⁾。

「自排濕網格」(self-wicking grids) 為新一代 cryoTEM 網格材料設計的創新方向，例如「nanowire grids」奈米線修飾網格，即是利用表面上的金屬奈米線微小空隙形成均勻分布的毛細管結構，能比傳統的濾紙吸附法 (paper-blotting) 更迅速，且更均勻地吸收多餘液體，減少樣品暴露於 AWI，形成厚度一致的 50–100 nm 薄膜，進而實現液體與樣品的均勻分佈⁽³⁵⁾ 如圖 5。

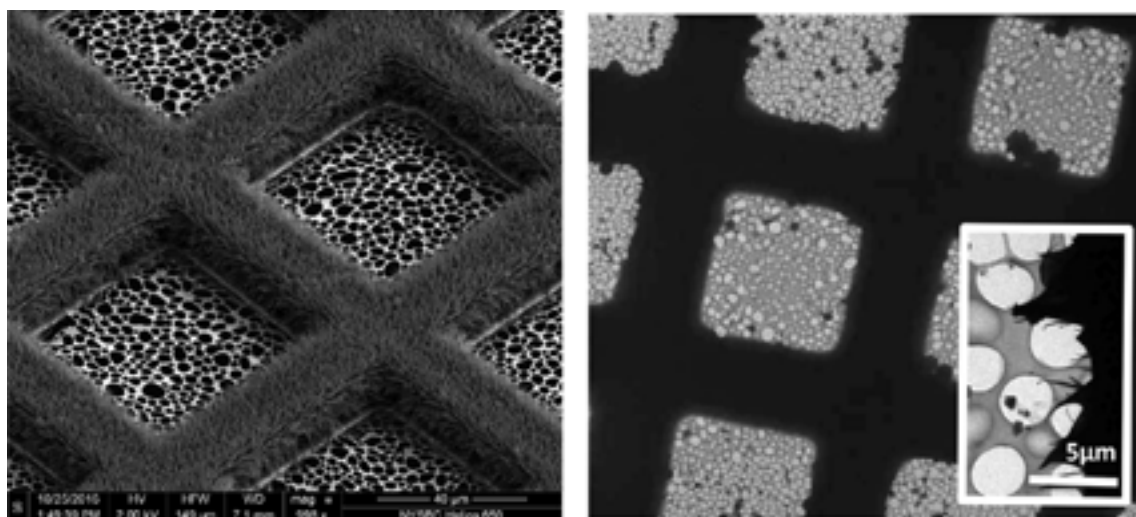


圖 5. 為「奈米線」網格的電子顯微鏡照片。左側為奈米線附著於 Cu/Rh 網格 Rh 面的蕾絲膜金網格 SEM 影像；右側使用碳基底奈米線網格玻璃化樣品的穿透式電子顯微鏡 (TEM) 影像，可見奈米線突出延伸至網格方格邊緣。此種奈米線修飾的網格結構可顯著改善冷凍電子顯微鏡樣品製備過程中的液體控制與均勻分佈。圖片與圖說引用自文獻⁽⁸⁰⁾。

「Plunge-freezing」技術的儀器改善

縮短樣品「從滴樣吸收成薄膜到冷凍的時間」(spot-to-plunge time) 是減少 AWI 暴露的有效策略⁽⁶³⁾。舉例如下：

商業化的 Spotiton / Chameleon 系統採用噴墨列印技術，如圖 6 所示：Spotiton 能將皮升 (picoliter) 級體積的樣品精確噴射到網格上並立即冷凍，能將時間縮短至 50–100 毫秒⁽³⁶⁾，顯著減少生物分子向 AWI 移動的機會。

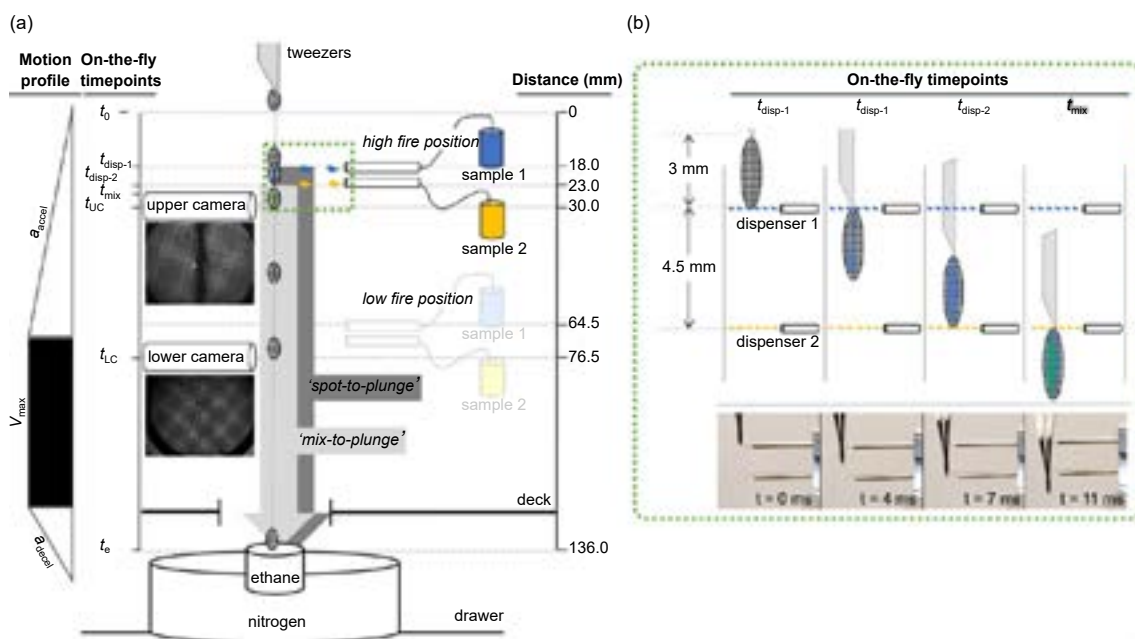


圖 6. 為 Spotiton 快速冷凍系統的運作機制示意圖。(a) 呈現樣品噴射與混合過程中的兩個關鍵參數：固定距離與可變時間點。鑷子夾著網格自上而下移動，兩組樣品 (藍色樣品 1 與黃色樣品 2) 於噴射器位置分別加入，並透過上、下攝影機即時監測過程，透過精確控制加速度 (a_{accel})、減速度 (a_{decel}) 及最大速度 (v_{max}) 達成「點一至一冷凍」(spot-to-plunge) 的時間控制。(b) 放大顯示不同時間點 ($t = 0 - 11$ ms) 的載網與噴射過程，下方為高速攝影捕捉的實時影像。此技術可實現毫秒級的「樣品混合冷凍反應」(mix-to-plunge)，這樣冷凍電子顯微鏡樣品製備能夠實現兩樣品交互作用過程的「時間解析」，便於研究生物分子的動態過程。圖片與圖說引用自文獻⁽⁸¹⁾。

無濾紙吸液技術 (blotting-free freezing) 避免了傳統濾紙吸附過程中樣品損失和濾紙纖維污染的問題⁽⁴⁷⁾；如圖 7 所示：VitroJet 系統採用精確的「pin-printing」技術控制樣品體積，同時利用雙面噴射式冷凍提高冷凍均勻性⁽³⁷⁾；圖 8 顯示 CryoWriter 系統則通過微流體技術精確控制液膜厚度和均勻性，特別適合稀有或微量樣品的處理⁽⁶⁴⁾。

在冷凍方式創新方面：「microfluidic spraying-plunging」技術利用微流體系統將樣品霧化為微液滴，實現超高冷凍速率⁽⁶⁵⁾；Electrospray 技術利用靜電場將樣品分散為帶電微滴，實現更均勻的樣品分佈⁽⁶⁶⁾；超音波輔助冷凍則通過聲波能量加速熱交換過程，提高冷凍均勻性⁽⁶⁷⁾。

冷凍聚焦離子束研磨 (Cryo-FIB milling) 為解決厚樣品觀察難題提供了創新解決方案⁽⁶⁸⁾：薄片製備 (lamella preparation) 技術使用精確控制的離子束，從冷凍細胞中切削出厚度小

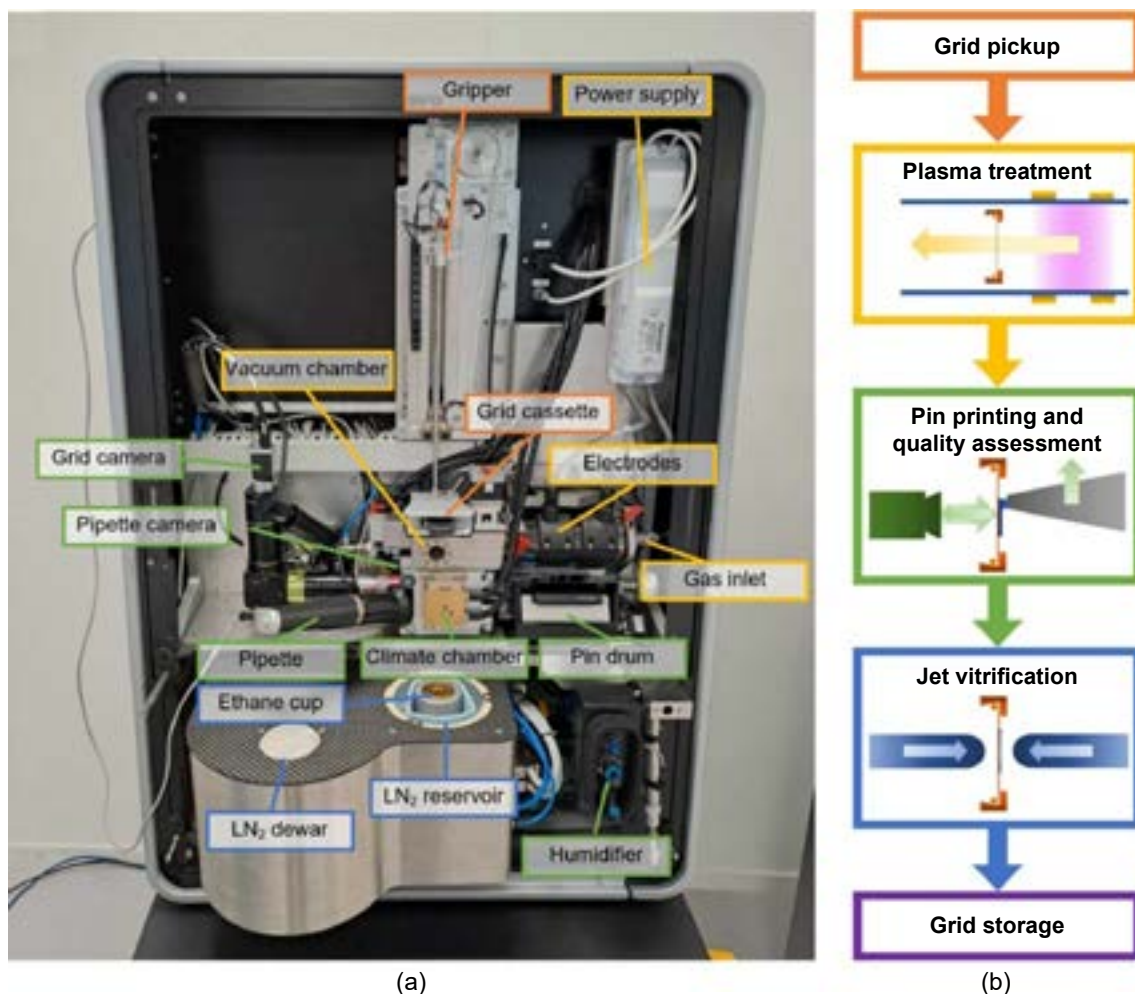


圖 7. 為 VitroJet 系統的介紹：右側顯示其配置與工作流程。左側為內部結構圖，揭示各功能單元：真空室、電極、氣體入口、氣候室、液氮槽等精密組件。右方：工作流程示意：網格取出 → 電漿處理 (增強親水性) → 針印技術 (精確樣品噴樣) → 噴射式冷凍 (雙向噴射，提高冷凍效率) → 自動化載網儲存。此系統克服傳統冷凍電子顯微鏡樣品製備中濾紙吸液步驟引起的空氣－水介面問題，實現高再現性、低樣品消耗的先進冷凍試片製備技術。圖片與圖說引用自文獻⁽⁸²⁾。

於 100 nm 的薄片，提高電子穿透率，使細胞內結構的原位觀察成為可能⁽⁶⁹⁾。

在材料科學方面，Zachman 團隊使用低溫掃描透射電子顯微鏡 (cryo-STEM) 結合電子能量損失譜 (EELS) 和冷凍聚焦離子束技術，剖面樣品探測固－液界面碳、氧和氟成分的空間分布⁽⁵²⁾。而 Levin 等人則開發了無升華損傷的硫和納米結構硫電池陰極的電子顯微鏡觀測方法，解決了高真空環境中易揮發材料的穩定問題⁽⁷⁰⁾。

樣品配方的改進策略

介面活性劑通過在 AWI 形成保護層，減少生物分子與 AWI 的直接接觸⁽⁷¹⁾，具體如下：非離子型介面活性劑如：DDM、Tween-20 等，可有效減少蛋白質在 AWI 的吸附⁽⁴⁷⁾；而兩性離子型介面活性劑如：CHAPSO、CHAPS 等，則因其良好的蛋白質相容性而被廣泛應用，且 CHAPSO 在低於臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC) 時效果最佳⁽⁷²⁾，如圖 9 所示。

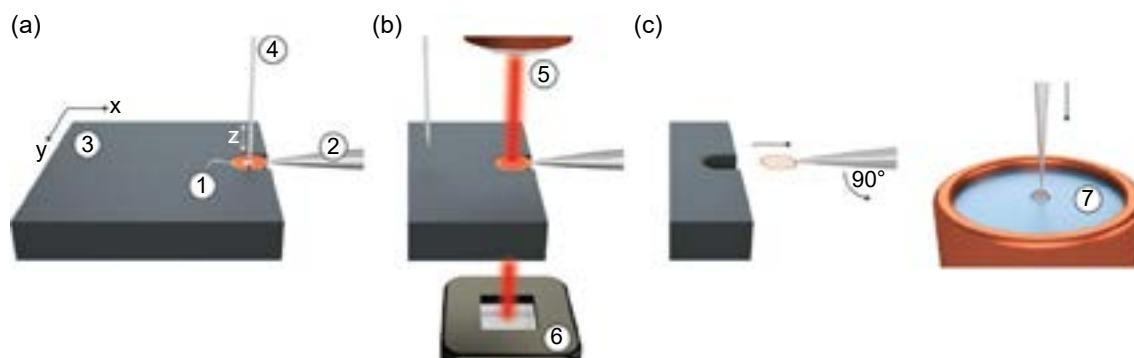


圖 8. 為 CryoWriter 裝置的操作流程示意圖。(a) 多孔碳膜電子顯微鏡載網 (1) 固定於鑷子 (2) 上，置於溫控槽 (3) 中。微量毛細管 (4) 在 xy 軸電動控制下降至網格上方數微米處，以蜿蜒形式滴樣納升 (nanoliter) 級樣品。(b) 滴樣後，毛細管撤回，載台移動使載網定位於雷射 (5) 與偵測器 (6) 間，監測水分蒸發程度。(c) 當訊號達設定的閾值，則啟動冷凍過程：鑷子迅速抽回，旋轉 90 度至垂直位置，將載網浸入冷凍劑中⁽⁷⁾，整個過程僅需數百毫秒，進而實現精確控制冰層厚度的非吸式冷凍電子顯微鏡樣品製備。圖片與圖說引用自文獻⁽⁶⁴⁾。

保護性添加劑為減輕AWI 影響提供了另一種策略：LEA 蛋白 (late embryogenesis abundant protein, 晚期胚胎豐富蛋白) 是一類天然保護劑，可優先在 AWI 形成保護層⁽⁷³⁾，其高度親水性和良好生物相容性使其成為理想的樣品添加劑⁽⁷⁴⁾；兩親性聚合物如：amphipols 可有效穩定膜蛋白結構⁽⁷⁵⁾；而低濃度的蔗糖、海藻糖或牛血清白蛋白 (BSA) 等也可在 AWI 形成保護層⁽⁷⁶⁾。

計算處理策略

在演算法方面，針對方向性偏差的校正算法也有所發展：基於深度學習的 spIsoNet 等方法，能有效校正優先方向性導致的重建偏差⁽⁷⁷⁾；RELION 軟體的三維變分自編碼器 (variational auto-encoder, VAE) 則利用機器學習技術，從有限角度，數據中重建更完整的三維資訊⁽⁷⁸⁾，為解決 AWI 問題提供了電腦運算層面的補救策略。

七、結論與展望

冷凍電子顯微鏡技術已發展成為結構生物學研究的關鍵平台。本文整理了cryo-TEM 無序冰的發現並普及化的歷史脈絡，面臨到的挑戰，以及當前試片製備技術的發展狀況。我們可以發現：避免「目標生物顆粒與 AWI 介面接觸」，以及「實現對均勻冰層厚度的精確控制」是當前致力的目標。

長遠來看，先進 cryo-TEM 試片製備技術的發展，不僅能幫助生物學家更準確地解析生物大分子結構，還將為材料科學家提供前所未有的機會，解決許多材料科學中的核心問題。例如，對於電池研究，cryo-EM 可揭示固體電解質介面 (SEI) 的納米結構演變及其與電池效率損失的關係；對於軟物質高分子研究，cryo-EM 可實現區域結晶度和化學分布的高分辨率成像；對於金屬有機骨架材料，cryo-EM 可直接觀察客體分子在框架中的分布和取向；對於鈣鈦礦太陽能電池和電催化劑，cryo-EM 可捕捉這些材料在操作條件下的中間態結構。

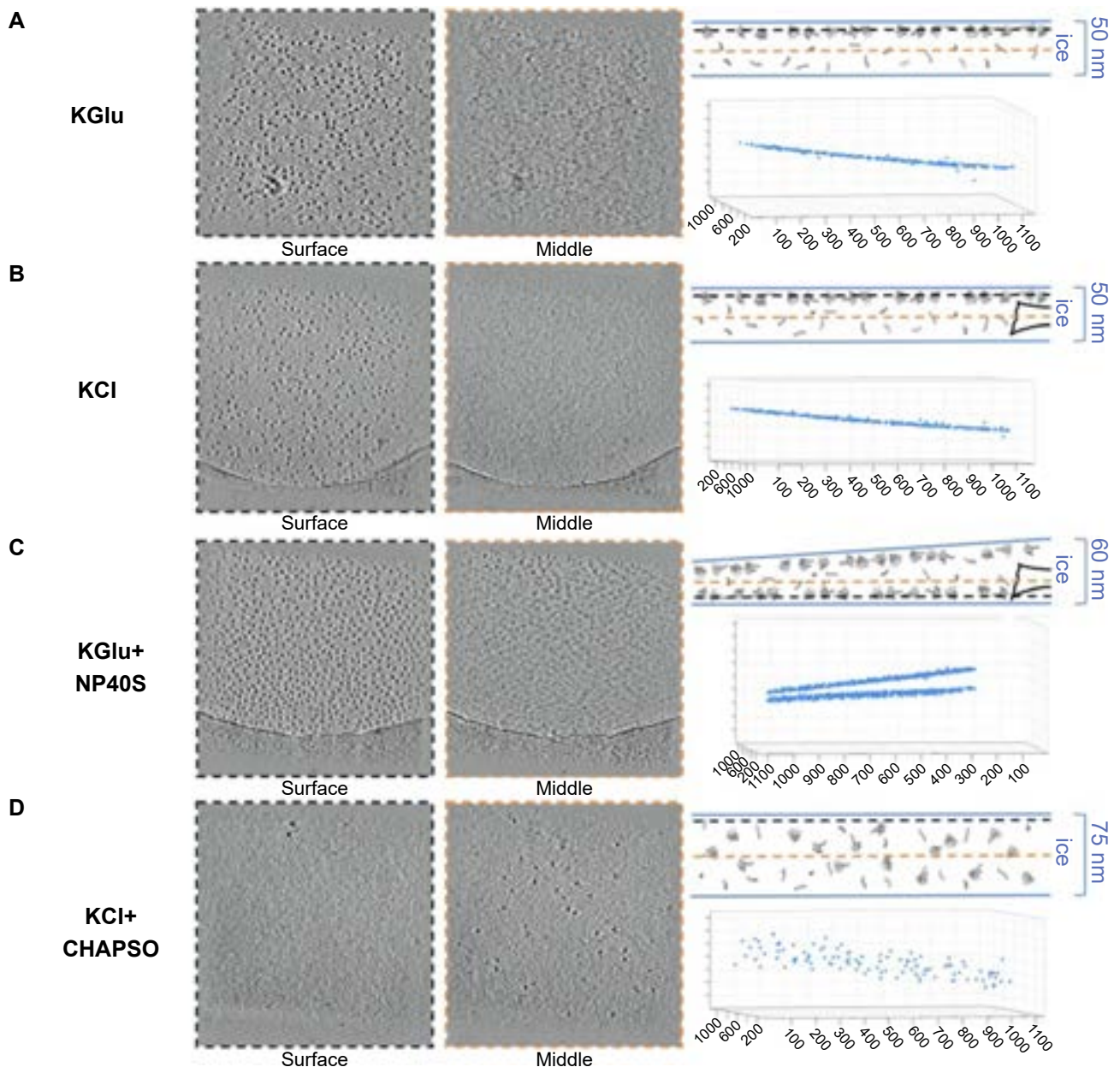


圖 9. 為 6S RNA 與細菌 RNA 聚合 $\sigma 70$ 複合體在不同緩衝液條件下製成冷凍電顯樣品，經過冷凍電子斷層掃描 (cryo-ET) 技術判定顆粒的分布圖。左側顯示「玻璃態冰層的表面橫截面」；中間代表「玻璃態冰層的中段橫截面」；右上顯示顆粒在玻璃態冰中分佈的示意圖，冰層的上下表面以實心藍線顯示。圖示右側的括號為冰層厚度。圖中的灰色顆粒顯示 6S-E $\sigma 70$ 複合體及游離的 6S RNA；右下為「顆粒在玻璃態冰層中的空間分佈圖」：垂直於冰表面的方向。每個 6S-E $\sigma 70$ 顆粒根據其在冰層中的三維位置，以藍色點表示。A、B 顯示在 KGlu 和 KCl 緩衝液環境中製備的 6S-E $\sigma 70$ 顆粒侷限於冰表面的一層薄層。C 為在添加 NP40S 表面活性劑的 KGlu 條件下的 6S-E $\sigma 70$ 顆粒，侷限於對應於冰層兩個表面的薄層。D 在添加 CHAPSO 表面活性劑的 KCl 條件下，顆粒被排除於空氣／水介面之外，且均勻分佈於冰層的中間區域。圖片與圖說引用自文獻⁽⁷¹⁾。

這些應用將有助於改善樣品完整性和均勻性、提高結構解析率，以及擴大適用樣品範圍。例如：膜蛋白、柔性大分子複合體等傳統難處理樣品；實現生物分子動態過程的時間解析研究；加速結構導向的標靶藥物設計，甚至實現原位細胞環境的高解析立體影像等。冷凍電子顯微鏡技術跨越生命與材料科學的應用，將為這兩個領域的交叉研究帶來革命性的影響。

參考文獻

1. Werner Kuhlbrandt, *Science*, **343**, (6178), 1443 (2014).
2. Henderson, R. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **28**, 171 (1995).
3. Henderson, R. & Unwin, P. N. T., *Nature*, **257**, 28 (1975).
4. Taylor, K. A. & Glaeser, R. M., *Science*, **186**, 1036 (1974).
5. Dubochet, J. & McDowell, A. W., *Journal of Microscopy*, **124**, 3 (1981).
6. Dubochet, J. *et al.*, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **21**, 129 (1988).
7. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. W., *Nature*, **308**, 32 (1984).
8. Dobro, M. J., Melanson, L. A., Jensen, G. J. & McDowell, A. W., *Methods in Enzymology*, **481**, 63 (Elsevier, 2010).
9. Lin, Z., Hill, R. M., Davis, H. T., Scriven, L. E. & Talmon, Y., *Langmuir*, **10**, 1008 (1994).
10. Regev, O. *et al.*, *Langmuir*, **12**, 668 (1996).
11. Amann-Winkel, K. *et al.*, *Chemical Reviews*, **116**, 7570 (2016).
12. Handle, P. H. & Loerting, T., *Physical Chemistry Chemical Physics*, **17**, 5403 (2015).
13. Loerting, T. *et al.*, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **13**, 8783 (2011).
14. Dubochet, J., Lepault, J., Freeman, R., Berriman, J. A. & Homo, J. -C., *Journal of Microscopy*, **128**, 219 (1982).
15. Loerting, T., Salzmann, C., Kohl, I., Mayer, E. & Hallbrucker, A., *Physical Chemistry Chemical Physics*, **3**, 5355 (2001).
16. Tse, J. S. *et al.* *Nature*, **400**, 647 (1999).
17. Dubochet, J., McDowell, A. W., Menge, B., Schmid, E. N. & Lickfeld, K. G., *Journal of Bacteriology*, **155**, 381 (1983).
18. Kanno, H., Speedy, R. J. & Angell, C. A., *Science*, **189**, 880 (1975).
19. Heide, H.-G., *Ultramicroscopy*, **14**, 271 (1984).
20. Johari, G. P., Hallbrucker, A. & Mayer, E., *Nature*, **330**, 552 (1987).
21. Pablo G. Debenedetti, and H. Eugene Stanley, *Physics Today*, **56** (6), 40 (2003).
22. Wirix, M. J. M., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Sommerdijk, N. A. J. M. & De With, G., *Nano Letters Journal*, **14**, 2033 (2014).
23. Passmore, L. A. & Russo, C. J., *Methods in Enzymology*, **579**, 51 (Elsevier, 2016).
24. Glaeser, R. M., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **34**, 1 (2018).
25. Rice, W. J. *et al.*, *Journal of Structural Biology*, **204**, 38 (2018).
26. Baker, L. A. & Rubinstein, J. L., *Methods in Enzymology*, **481**, 371 (Elsevier, 2010).
27. Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A. & Walz, T., *Cell*, **161**, 438 (2015).
28. Noble, A. J. *et al.*, *ELife*, **7**, e34257 (2018).
29. Cheng, Y., *Cell*, **161**, 450 (2015).
30. Bai, X., McMullan, G. & Scheres, S. H. W., *Trends in Biochemical Sciences*, **40**, 49 (2015).
31. Grassucci, R. A., Taylor, D. J. & Frank, J., *Nature Protocols*, **2**, 3239 (2007).
32. Studer, D., Humbel, B. M. & Chiquet, M., *Histochemistry and Cell Biology*, **130**, 877 (2008).
33. McDonald, K. L. & Auer, M., *BioTechniques*, **41**, 137 (2006).
34. Han, H. -M., Zuber, B. & Dubochet, J., *Journal of Microscopy*, **230**, 167 (2008).
35. Razinkov, I. *et al.*, *Journal of Structural Biology*, **195**, 190 (2016).
36. Jain, T., Sheehan, P., Crum, J., Carragher, B. & Potter, C. S., *Journal of Structural Biology*, **179**, 68 (2012).
37. Ravelli, R. B. G. *et al.*, *Nature Communications*, **11**, 2563 (2020).
38. Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J. & Mannella, C., *Nature Methods*, **4**, 215 (2007).
39. Allen, F. I. *et al.*, *ACS Macro Letters*, **4**, 1 (2015).
40. Panova, O. *et al.*, *Nature Materials*, **18**, 860 (2019).
41. Glaeser, R. M. & Han, B.-G., *Biophysics Reports*, **3**, 1 (2017).
42. Glaeser, R. M. *et al.*, *Biophysical Journal*, **110**, 749 (2016).
43. Taylor, K. A. & Glaeser, R. M., *Journal of Structural Biology*, **163**, 214 (2008).

44. De Jongh, H. H. J. *et al.*, *Biopolymers*, **74**, 131 (2004).
45. Tan, Y. Z. *et al.*, *Nature Methods*, **14**, 793 (2017).
46. Noble, A. J. *et al.*, *Nature Methods*, **15**, 793 (2018).
47. Drulyte, I. *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, **74**, 560 (2018).
48. Lyumkis, D., Brilot, A. F., Theobald, D. L. & Grigorieff, N., *Journal of Structural Biology*, **183**, 377 (2013).
49. Scheres, S. H. W., *Journal of Structural Biology*, **180**, 519 (2012).
50. Li, Y. *et al.*, *Science*, **358**, 506 (2017).
51. Wang, X. *et al.*, *Nano Letters Journal*, **17**, 7606 (2017).
52. Zachman, M. J., Tu, Z., Choudhury, S., Archer, L. A. & Kourkoutis, L. F., *Nature*, **560**, 345 (2018).
53. Li, Y., Huang, W., Li, Y., Chiu, W. & Cui, Y., *ACS Nano Journal*, **14**, 9263 (2020).
54. Russo, C. J. & Passmore, L. A., *Nature Methods*, **11**, 649 (2014).
55. Han, Y. *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, **117**, 1009-1014 (2020).
56. Naydenova, K., Peet, M. J. & Russo, C. J., *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, **116**, 11718 (2019).
57. Russo, C. J. & Passmore, L. A., *Current Opinion in Structural Biology*, **37**, 81 (2016).
58. Marr, C. R., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. L., *Journal of Structural Biology*, **185**, 42 (2014).
59. Kelly, D. F., Dukovski, D. & Walz, T., *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, **105**, 4703 (2008).
60. Benjamin, C. J. *et al.*, *Scientific Reports*, **6**, 32500 (2016).
61. Wang, L., Ounjai, P. & Sigworth, F. J., *Journal of Structural Biology*, **164**, 190 (2008).
62. Mougous, J. D. *et al.*, *Science*, **312**, 1526 (2006).
63. Naydenova, K. & Russo, C. J., *Nature Communications*, **8**, 629 (2017).
64. Arnold, S. A. *et al.*, *Journal of Structural Biology*, **197**, 220 (2017).
65. Feng, X. *et al.*, *Structure*, **25**, 663 (2017).
66. Klebl, D. P. *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, **76**, 340 (2020).
67. Rubinstein, J. L. *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, **75**, 1063 (2019).
68. Medeiros, J. M., Bock, D. & Pilhofer, M., *Current Opinion in Microbiology*, **43**, 62 (2018).
69. Villa, E., Schaffer, M., Plitzko, J. M. & Baumeister, W., *Current Opinion in Structural Biology*, **23**, 771 (2013).
70. Levin, B. D. A. *et al.*, *Microscopy and Microanalysis*, **23**, 155 (2017).
71. Chen, J., Noble, A. J., Kang, J. Y. & Darst, S. A., *Journal of Structural Biology: X*, **1**, 100005 (2019).
72. Lyumkis, D., *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 5181 (2019).
73. Abe, K. M., Li, G., He, Q., Grant, T. & Lim, C. J., *Nature Communications*, **15**, 7705 (2024).
74. Goyal, K., Walton, L. J. & Tunnacliffe, A., *Biochemical Journal*, **388**, 151 (2005).
75. Frauenfeld, J. *et al.*, *Nature Methods*, **13**, 345 (2016).
76. D'Imprima, E. *et al.*, *ELife*, **8**, e42747 (2019).
77. Liu, Y.-T., Fan, H., Hu, J. J. & Zhou, Z. H., *Nature Methods*, **22**, 113 (2025).
78. Kimanius, D., Forsberg, B. O., Scheres, S. H. & Lindahl, E., *ELife*, **5**, e18722 (2016).
79. Liu, N. & Wang, H.-W., *Journal of Molecular Biology*, **435**, 167926 (2023).
80. Wei, H. *et al.*, *Journal of Structural Biology*, **202**, 170 (2018).
81. Dandey, V. P. *et al.*, *Nature Methods*, **17**, 897 (2020).
82. Henderikx, R. J. M. *et al.*, VitroJet: new features and case studies. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, **80**, 232 (2024).

作者簡介

黃士忻先生為國立臺灣大學生化科學研究所博士，現為國防醫學院預防醫學研究所 助研究員。

Shih-Hsin Huang receive his Ph.D. in the Institute of Biochemical Sciences from National Taiwan University. He is currently an Assistant Research Fellow in the Graduate Institute of Medical Sciences at National Defense Medical Center.

章為皓先生為美國史丹佛大學生物物理博士，現為中央研究院化學研究所副研究員。

Wei-Hau Chang receive his Ph.D. from Stanford University, USA. He is currently an Associate Research Fellow in the Institute of Chemistry, Academia Sinica.

先進 TEM 試片製備技術：液態 穿透式電子顯微鏡試片開發與發 展

Advanced Transmission Electron Microscope Specimen Preparation Technology: Manufacturing and Development of Liquid Cell TEM Specimens

陳睿遠、黃浚瑋、吳文偉

Jui-Yuan Chen, Chun-Wei Huang, Wen-Wei Wu

本文探討液態穿透式電子顯微鏡 (liquid transmission electron microscopy, LCTEM) 技術的發展與應用。LCTEM 克服傳統 TEM 僅能觀察固態樣品的限制，為材料科學、生物醫學等領域帶來全新機遇。本文除了介紹 LCTEM 試片的演進，包括解析度、密封性與操作便利性的改良，亦重點的介紹本團隊開發的一體成型 LCTEM 試片。透過氧化鋅奈米線與金－氧化亞銅核殼奈米晶體的生長研究，展示 LCTEM 在材料科學中的應用潛力。最後，我們探討 LCTEM 技術面臨的挑戰與其未來發展方向。

The development and applications of liquid transmission electron microscopy (LCTEM) technology are discussed in this article. The LCTEM overcomes the limitation that traditional TEM can only observe solid samples, bringing new opportunities to the fields such as materials science, biomedicine, and other fields. This article not only introduces the development of LCTEM samples, including improvements in resolution, sealing, and ease of operation, but also introduces the one-piece LCTEM sample developed by our group. The application of LCTEM in materials science research is demonstrated through the study of ZnO nanowires and Au-Cu₂O core-shell nanostructures. Finally, we discuss the challenges of LCTEM technology and envision its future directions.

一、LCTEM 的發展

在深入探討液態穿透式電子顯微鏡技術之前，有必要先回顧穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 的基本原理與構造。TEM 作為材料結構分析的重要

工具，在材料科學領域應用廣泛。其核心原理是利用高能電子束穿透極薄的樣品來成像。當電子束穿過樣品時，會與樣品中的原子發生交互作用，例如散射與繞射等，這些交互作用會改變電子束的方向和能量。透過一系列精密的電磁透鏡系統，將穿透樣品後的電子束聚焦並放大，最終在螢幕或感測器上形成具有明暗對比的影像，可反映出樣品內部的微觀結構。TEM 的最大優勢在於其極高的影像解析度，甚至可以達到原子等級。此外，它還可以搭配電子能量損失譜儀 (electron energy loss spectroscopy, EELS) 或 X 光能量散失光譜儀 (energy dispersive X-ray spectrometer, EDS) 等分析儀器，來分析樣品的成分、化學鍵結和元素分佈等資訊。然而，傳統 TEM 的一個主要限制是其操作環境必須維持在高真空狀態，以確保電子束的在行進過程中不受氣體分子的散射干擾才能成像。此外，對於需要在液態環境下觀察的樣品，尤其是含有水分的生物或化學樣品，高真空會導致液體迅速蒸發，使得在真實液相中進行動態觀察變得極為困難。LCTEM 技術正是在此背景下發展起來，旨在克服傳統 TEM 在液體樣品觀察上的限制。為突破此限制，液態穿透式電子顯微鏡技術應運而生，為在真實液態環境下觀察材料的微觀結構和動態行為開闢新途徑。

LCTEM 的發展不僅拓展了 TEM 的應用範圍，更為深入了解材料的基礎特性提供機會。透過 LCTEM，科學家得以直接觀察奈米材料在液相中的成核、成長、組裝等過程。例如，研究人員可利用 LCTEM 觀察金及鉑奈米晶體在溶液中的動態影像⁽¹⁻²⁾，或樹枝狀結構鉛的化學反應⁽³⁾，如圖 1 所示。這些研究不僅有助於調整奈米材料的合成，更有助於理解材料在液相中的基礎特性。

除了材料科學，LCTEM 在生物醫學、電化學反應研究、有機材料的觀察和催化過程等領域也展現出潛力。藉由觀察生物性材料的影像，如蛋白質和活細胞，研究人員可深入了解藥物反應、藥物傳輸和細胞行為。亦或是奈米液滴與氣泡的生成、有機材料的觀察和催化過程的研究⁽¹⁻⁴⁾。隨著 LCTEM 的發展，LCTEM 不僅解決了液態材料觀察的技術瓶頸，更促進了材料科學、生物醫學等多學科的交叉融合，為相關領域的研究開闢新方向。

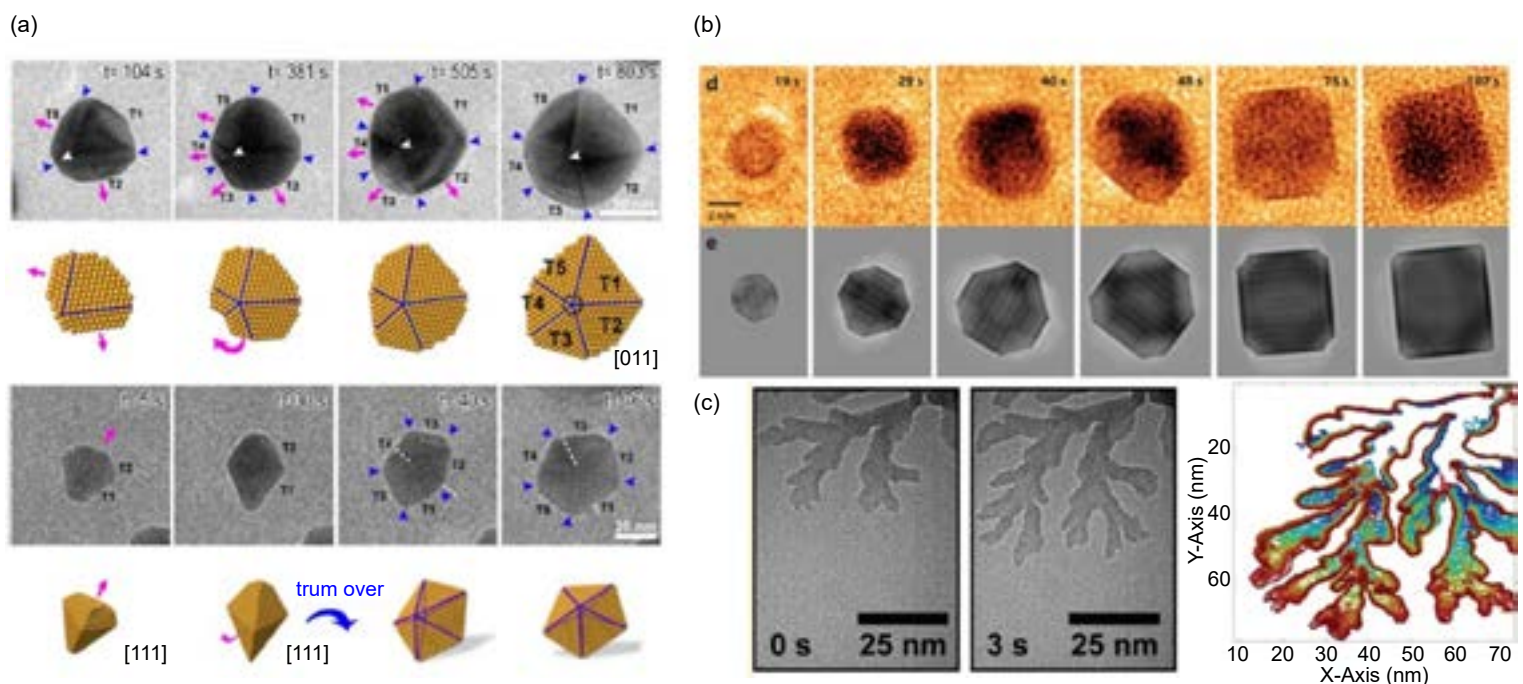


圖 1. (a-b) 金及鉑奈米粒子於 LCTEM 中成長的連續影像⁽¹⁻²⁾。(c) 樹枝狀結構鉛的化學反應⁽³⁾。

二、LCTEM 試片的演進與發展

LCTEM 試片的開發，起初是為了克服傳統 TEM 僅能觀察固態樣品上的限制。根本原因在於 TEM 需要在高真空的環境下操作，液態樣品如何維持在液態的同時，又能置入 TEM 中觀察，即成為一項挑戰。為了觀察液態樣品，科學家嘗試將液體封裝 LCTEM 試片後再置入 TEM 內進行觀察。此外隨著 LCTEM 在各領域的應用及需求增加起，LCTEM 試片開發的重要性日益凸顯，進而推動了試片設計和製造技術的發展。

早期開發的 LCTEM 試片是利用兩片薄膜 (例如氮化矽 Si_3N_4) 將液體樣品密封起來⁽⁵⁾。這種設計可以有效防止液體揮發以延長觀察時間，如圖 2(a) 所示。早期的封裝方式是透過組裝的方式來進行封裝：在晶圓上沉積薄膜，並透過黃光微影製程及蝕刻，在特定區域產生電子束可穿透的 Si_3N_4 薄膜作為觀察窗口，並以銅作為墊高及封裝的材料。待注入液體後，再以覆蓋方式與另一片載片組裝並密封。當液態樣品置於試片中時，會形成一個與真空環境隔離的獨立液態環境，得以在 TEM 高真空腔體內進行液相臨場觀察。

而根據液態的流動性與否，LCTEM 的結構設計和應用方式大致可分為兩種類型：靜態式液態試片 (static LCTEM sample) 和動態式液態 (flow LCTEM sample)。靜態式液態試片結構相對簡單，其液體樣品以固定容量密封於試片中⁽⁶⁾，如圖 2(b) 所示，無法進行流動或更換。此類型試片適用於觀察相對穩定的液體樣品，例如奈米粒子的形貌和結構變化、或是在固定條件下的簡易蝕刻反應等。流動式液態試片本身通常會有微流道的設計⁽⁷⁾，如圖 2(c) 所示，可以透過外部設備精準控制液態樣品的注入及流出。適合觀察需要持續提供前驅物的液相反應或是不同液態樣品的化學反應觀察，通常需要搭配特殊規格的 TEM 載具。特殊規格的 TEM 載具通常能提供更多的功能性，例如同時注入不同液態樣品。此外，也有氣液混合式液態試片，可同時通入氣體與液體，觀察氣液界面的反應，或是電化學液態試片，整合電極以在液體樣品中施加電場，研究電化學反應。但這些特殊規格的 TEM 載具通常價格較高普及不易。

近年來，LCTEM 試片的發展主要集中在以下幾個方向：提高解析度、多功能整合、簡化操作以及減少側漏問題。例如有科學家開發石墨烯液態試片，是為了提高解析度所選擇的新觀察窗口材料：由於石墨烯具有優異的機械性能和極薄的厚度，因此可以封裝液態並實現更高的解析度⁽⁸⁾，如圖 2(d) 所示。再者，減少側漏提升密封性也是試片開發的重要目標：包含不同世代 LCTEM 的封裝結構設計、密封材料的選擇等等，科學家們也試圖透過改變設計來降低實驗門檻。

綜觀 LCTEM 試片的發展演進歷史，是一部不斷追求更高解析度、更強密封性、更簡便操作的歷史。開發 LCTEM 試片除了可以避免需要昂貴的設備之外，更有機會可以普及。隨著材料科學和技術的進步，LCTEM 試片將有機會在更多領域發揮重要作用。

三、一體成型 LCTEM 試片開發

儘管 LCTEM 試片在解析度、密封性和操作便利性上不斷提升，但現有技術仍存改良之處。此開發動機源於 LCTEM 試片的多層封裝結構，在實際放置到一般 TEM 載具時，由於厚度較厚，可能需要特定的載具或調整，增加了操作的複雜性。雖然多層封裝結構在製程上較易於掌控，但由兩片基板封裝而成的試片會使試片厚度大幅增加，且使用的封裝材料 (如銅) 可能與溶液反應，從而限制了可觀察的樣品種類。此外，大面積的覆蓋方式使得需要密

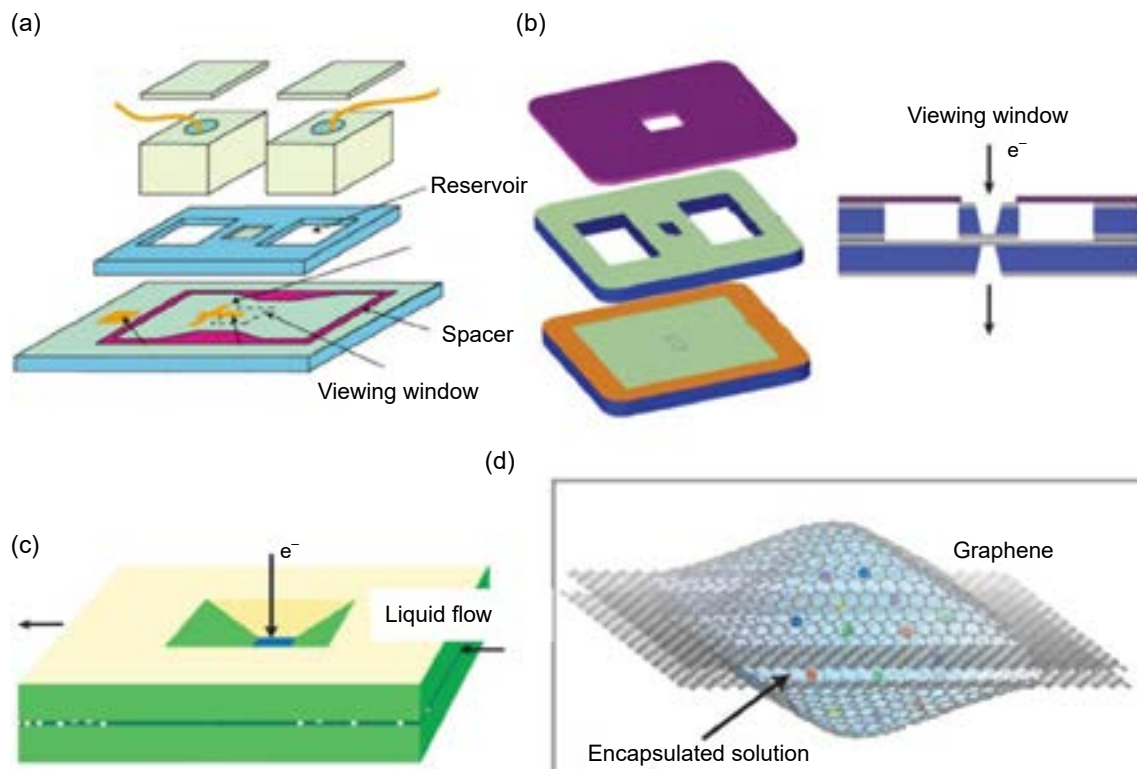


圖 2. (a-c) 不同組成架構的 LCTEM 封裝示意圖⁽⁵⁻⁷⁾。(d) 局部石墨烯液態封裝示意圖⁽⁸⁾。

封的面積增加，側漏的機率增多，進而降低了試片的密封性。因此，本研究團隊為了解決這些問題，開發了一體成型的 LCTEM 試片。

在結構與做法上，此新型的 LCTEM 試片採用了單片晶圓的一體成型設計，流程如圖 3 所示，從而避免了任何接合的步驟。透過微機電系統 (micro-electro-mechanical systems, MEMS) 技術，利用微影和蝕刻製程製作試片。新的光罩設計縮小了覆蓋面積，減少注入液態樣品後的封裝面積能進一步提升密封性。在材料選擇上，一體成型的 LCTEM 試片不使用鋁作為墊高材料，而是仍為矽。具體的製程步驟包括：首先對矽基板進行 RCA 清洗，如圖 3(a) 所示。接著，在矽基板正反兩面成長二氧化矽 (SiO_2) 作為蝕刻阻擋層，如圖 3(b) 所示。然後，在矽基板正反兩面沉積低應力氮化矽 (Si_3N_4) 薄膜，如圖 3(c) 所示。隨後，透過微影製程在正面定義出注入孔 (injection hole) 的圖形後透過離子蝕刻至矽基板層，以作為後續對接矽穿孔 (through silicon via, TSV) 製程的液態注入孔，如圖 3(d) 所示。在正面鍍上矽 (Si) 作為間隔層 (spacer) 材料，此矽層也作為後續封裝液態樣品的預留空間，如圖 3(e) 所示。接著，在矽基板正反兩面沉積低應力 Si_3N_4 薄膜，如此，與前一道沉積的氮化矽 (Si_3N_4) 薄膜將能作為觀察窗將液態樣品夾於其中，如圖 3(f) 所示。利用光阻塗佈機塗佈光阻於試片背面，再通過雙面對準曝光機進行紅外光對準，將正面注入孔的圖形與背面光罩上的圖形對準，完成顯影後確認背面的 TSVs 圖形與正面的注入孔有對準，如圖 3(g) 所示。利用介電材料活性離子蝕刻系統 (reactive ion etching, RIE) 蝕刻背面的 Si_3N_4 薄膜。再利用矽深蝕刻系統 (Si Deep-RIE) 進行 SiO_2 及 Si 蝕刻，如圖 3(h) 所示。最後，利用氫氧化鉀 (KOH) 溶液的濕式異向蝕刻特性，能將預留空間的矽蝕刻去除，從而提供液態樣品注入空間，完成之一體成型 LCTEM 試片，如圖 3(i) 所示。完成之一體成型 LCTEM 試片的 2D、3D 示意圖分層結構，如圖 4(a) 所示，結構分層示意圖，如圖 4(b) 所示。液態樣品注入可以透過微量滴管

將液態樣品滴入試片，剖面的 SEM 影像可以清楚看到 TSVs 的結構能作為注入孔，以及中間的觀察窗口，如圖 4(c) 所示。圖 4(d) 則為注入液態時示意圖及實際注入液體後的 OM 影像。再利用簡單的覆蓋方式密封試片的背面，即能完成試片的封裝。

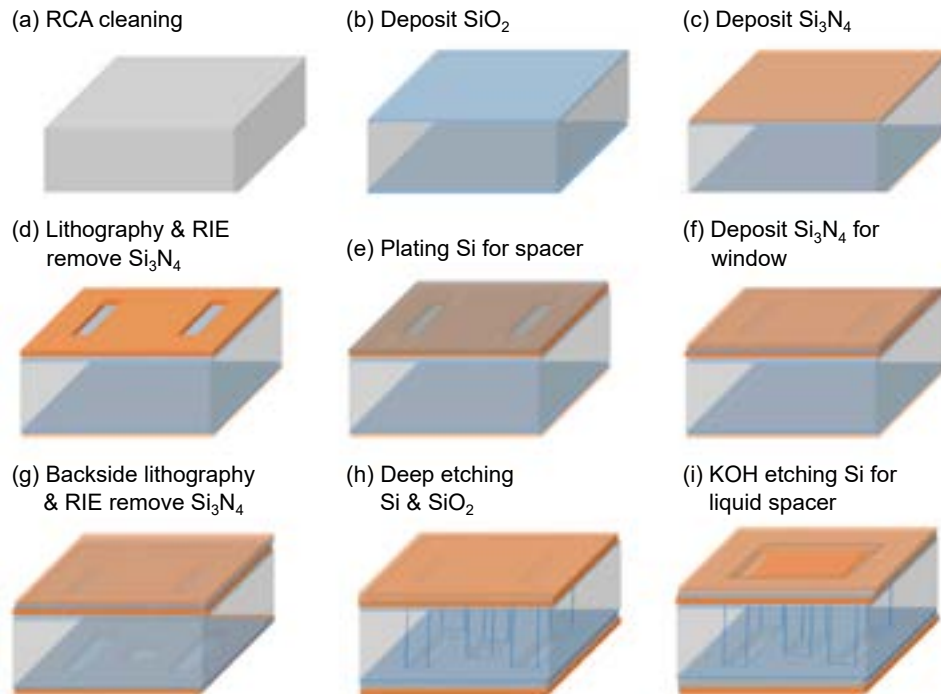


圖 3. 一體成型 LCTEM 的製作的流程示意圖。

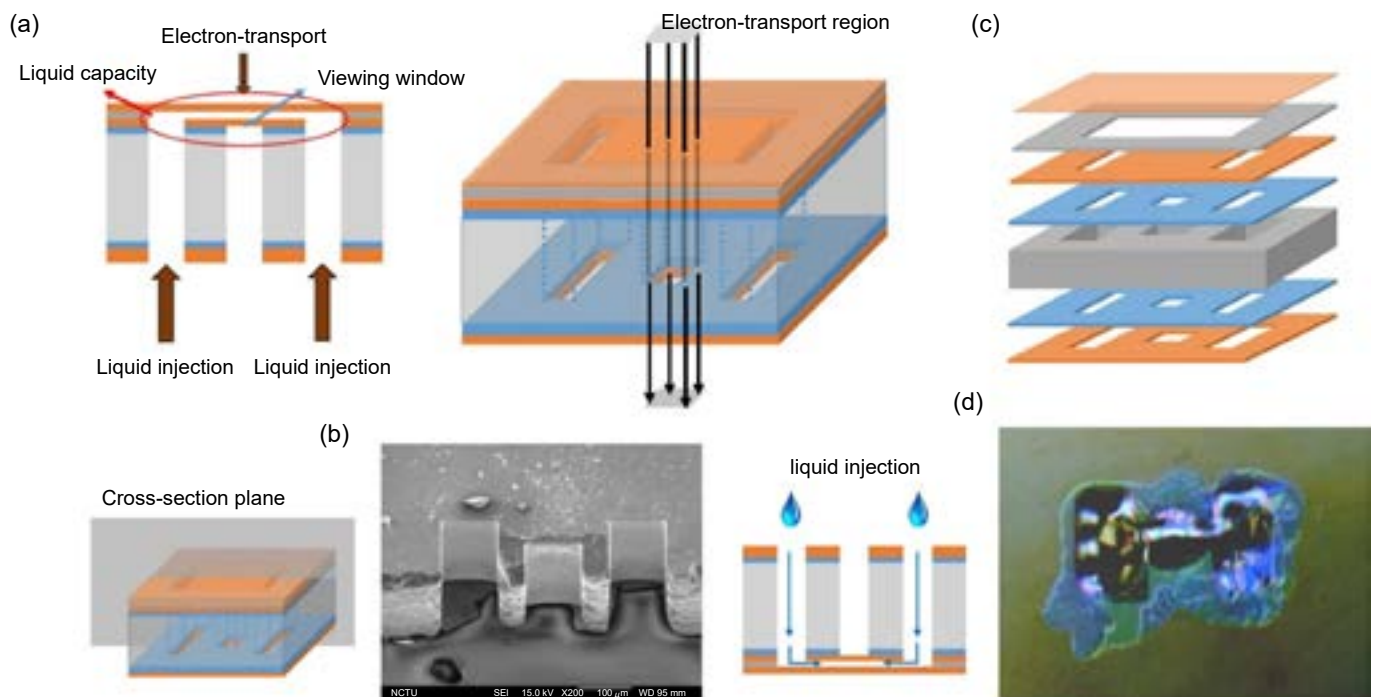


圖 4. (a) 一體成型 LCTEM 的 2D、3D 示意圖。(b) 分層示意圖。(c) 剖面 SEM 影像。(d) 注入液態時的 OM 影像。

本試片採用單一晶圓製程，不包含任何接合製程，此一體成型的 LCTEM 試片相較於傳統 LCTEM 試片設計，具有獨特的優勢。相較於傳統 LCTEM 試片或現有市售液態試片。在厚度上，一體成型試片整體厚度小於 $250\ \mu\text{m}$ ，而傳統試片厚度為兩片基板再加上 spacer，厚度可能大於 $500\ \mu\text{m}$ 。在密封性方面，一體成型試片由於其整體側壁面積均能有效密封，降低了橫向洩漏的可能性，於背面的密封口也減低了密封的難度。在泛用性上，此一體成型 LCTEM 適用於所有型號的 TEM，不需搭配特定載具及儀器。在安裝及應用上，一體成型試片的安裝過程更簡單，注入液態樣品時不需任何接合對準過程。在溶液限制上，由於不使用銅作為墊高材料，從而避免了液溶反應的限制。

四、液態樣品觀察的應用實例

以下將以兩個實際案例，展示 LCTEM 在材料科學研究中的應用。

案例一：觀察氧化鋅奈米結構的水熱法合成成長反應

本團隊於 2016 年發表在 *Chemistry of Materials* 的文章，此研究使用 LCTEM 技術搭配穿透式電子顯微鏡 (TEM)，成功觀察到氧化鋅 (ZnO) 奈米線在水熱合成中的生長過程⁽⁹⁾。研究發現 ZnO 奈米線的生長分為兩個階段：奈米粒子的成核與成長，以及奈米粒子異向性成長為奈米線。奈米粒子的成長主要來自單體附著和聚結，其中聚結過程可由沃爾夫構造 (Wulff construction) 理論解釋。帶負電的單體更容易附著在 Zn^{2+} 終止的 (0001) 表面，促使 ZnO 奈米線沿 [0001] 方向異向性成長。成長速率分析表明，液相中的生長過程是一個反應控制系統，且奈米線的直徑取決於奈米粒子的原始尺寸。此研究揭示了水熱合成 ZnO 奈米線的動態機制。

圖 5 主要展示了 ZnO 奈米線的異向生長過程，為一系列 TEM 截取影像，顯示奈米線僅沿著特定的方向生長 ([0001] 方向)，如圖 5(a) 的紅色箭頭方位所示。在 0:15 到 0:23 的 TEM 影像可以發現，即使成長的方向遇到阻礙物，ZnO 的奈米線不會延反方向的 $[000\bar{1}]$ 生長，仍然會推擠阻礙物繼續延原方向生長。

圖 5(b) 則解釋了這種異向生長的原因，是由於 ZnO 晶體的極性結構。ZnO 晶體的 (0001) 面由帶正電荷的 Zn^{2+} 終止，而 $(000\bar{1})$ 面由帶負電荷 O^{2-} 終止。這種偶極矩的結構導致奈米線會沿 c 軸產生自發偶極矩。由於偶極矩的基本特性，帶正電的表面會吸引溶液中帶負電的成長單體離子 $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ 。單體由於靜電吸引而傾向於附著在 (0001) 表面。相反地，由於靜電排斥單體難以附著在 $(000\bar{1})$ 表面。因此，ZnO 沿著 c 軸的一個末端異向生長。這些液態水熱法合成的 TEM 影像清晰地呈現了 ZnO 奈米粒子在液體中的成長方式，為研究 ZnO 奈米結構的控制與應用提供了重要的參考資訊。

案例二：金－氧化亞銅核殼奈米晶體於水溶液生長成長研究

本團隊於 2019 年發表在 *Nanoscale* 的文章，此研究利用液相穿透式電子顯微鏡 (LCTEM) 原位觀察 Au-Cu₂O 核殼奈米粒子的形成過程⁽¹⁰⁾。實驗發現金奈米粒子表面的檸檬酸配體的數量會影響核殼結構的形狀，導致產生多面體和立方體兩種結構。多面體奈米粒子中的金和氧化亞銅之間存在磊晶關係，而立方體奈米粒子則顯示氧化亞銅獨立成核和生長。此外，研究還觀察到奈米粒子的運動，它們在最終聚集成簇之前會自由漂浮和旋轉。這些發現為功能性核殼奈米結構的生長機制提供了直接的證據。

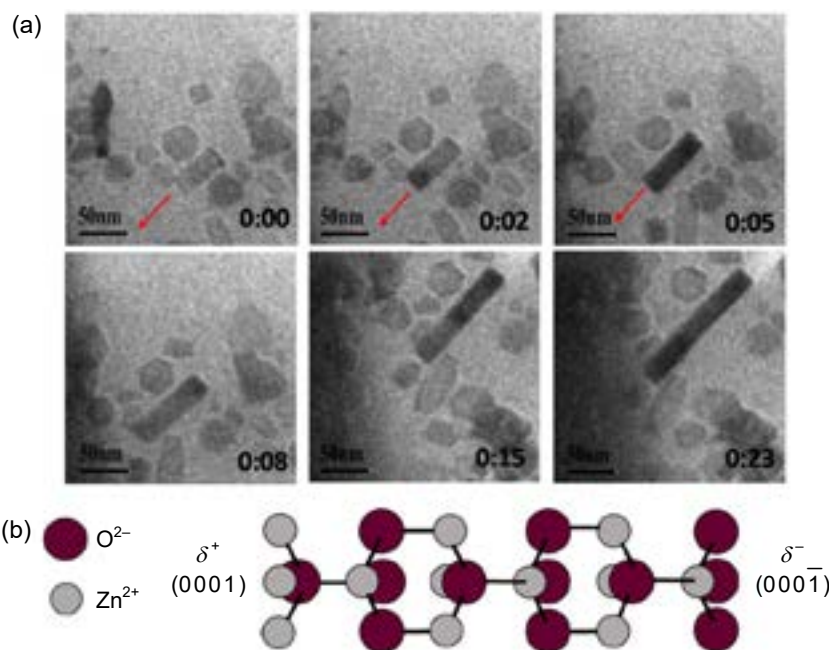


圖 5. (a) 以 LCTEM 技術臨場觀察 ZnO 奈米線的水熱法合成之系列 TEM 影像。(b) ZnO 奈米線微結構與偶極矩的示意圖⁽⁹⁾。

圖 6 呈現了一系列原位穿透式電子顯微鏡 (TEM) 影像，顯示了在液態環境中金 (Au) 核心包覆上銅氧化物 (Cu_2O) 殼層，形成多面核殼奈米粒子的合成過程。圖 6(a) 顯示在剛開始時只有金奈米粒子存在於液態環境中。隨著時間的推移，可以發現在圖 6(b) 和 6(c) 顯示殼層開始在金奈米粒子外部鍍覆，形成核殼奈米粒子。然而，仍可以觀察到圖 6(d) 中紅色箭頭所指的金奈米粒子團簇沒有被鍍上殼層。是由於這些金奈米粒子團簇造成它們的表面缺少檸檬酸配位體 (citrate ligands)，導致殼層鍍覆失敗。而在圖 6(b) 中黃色箭頭標記的金粒子雖然沒有發生聚集，但金粒子們彼此的距離過於接近而產生空間局限效應，核殼奈米粒子的形成受到鄰近奈米粒子的影響，因此沒有形成完整包覆的核殼結構。而在圖 6(b) 黃色虛線標示的金奈米顆子則因分散性良好，得以反應生成完整的 $\text{Au-Cu}_2\text{O}$ 核殼奈米粒子。圖 6(e) 顯示了核心和殼層的面積隨時間變化的曲線，對應於黃色虛線框中的粒子。金核心的面積在包覆沒有變化，證實了金奈米粒子的穩定性並保持了其原始尺寸。對於殼層，殼層在金的表面上磊晶生長速率約為 $210 \text{ nm}^2/\text{s}$ 直到達到 2500 nm^2 的面積，呈現線性生長。

五、液態 TEM 的困境與挑戰

液態穿透式電子顯微鏡 (LCTEM) 技術近年來雖有顯著進展，但在分析應用與試片開發上，整體而言仍面臨解析度、樣品代表性、電子束效應、試片製備和數據分析等多重挑戰與困境。這些挑戰與困境不僅限制了 LCTEM 的應用範圍，也對實驗設計和數據解讀提出了更高的要求。具體而言，這些挑戰與困難如下：

1. 解析度限制

由於電子束需要穿透液態層才能成像，液態本身會散射電子，導致影像模糊和解析度降

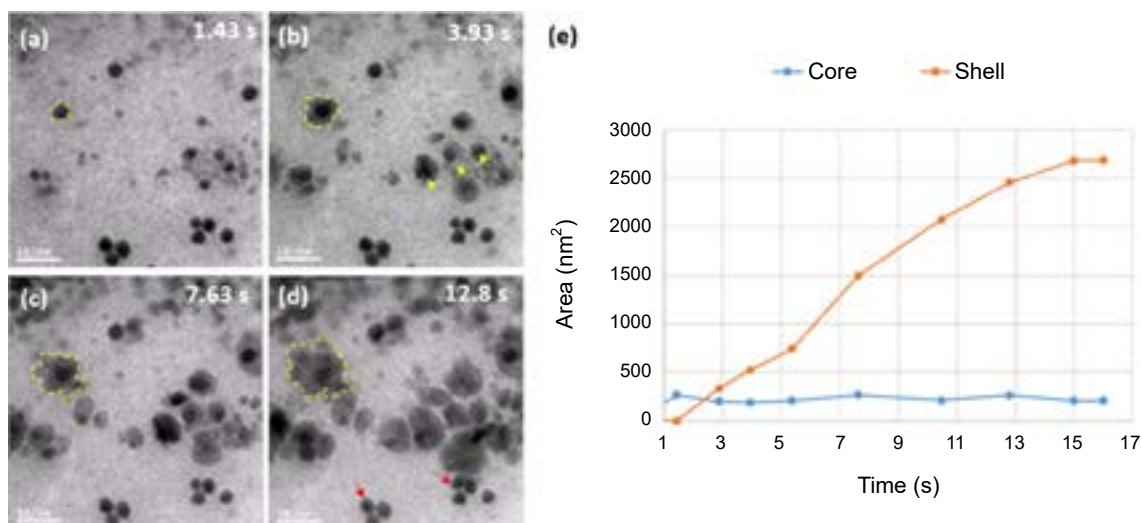


圖 6. (a-d) 以 LCTEM 技術臨場觀察 Au-Cu₂O 核殼奈米粒子殼層包覆過程之系列 TEM 影像。
(e) 核與殼於成長過程隨時間的變化⁽¹⁰⁾。

低。為了維持 TEM 的高真空環境，液態樣品通常被封裝在薄膜之間，這些薄膜也會進一步散射電子，進一步加劇解析度下降的問題。因此，如何選用更薄的薄膜以提升解析度，同時確保薄膜強度足以維持樣品穩定性；或是在設計上精準控制液體層厚度，避免過厚的液體層影響解析度，並確保微量液體環境足以代表真實溶液中的行為，是 LCTEM 技術的一大挑戰。

2. 液態樣品動態行為之影響

液態樣品中的觀察物能夠自由移動，在 Z 軸方向的移動會導致觀察物載浮載沉，將導致電子束難以對焦，影響影像清晰度；在 XY 軸方向的移動則可能使觀察物偏移至觀察視野之外。此外，若物體旋轉導致觀察的區軸 (zone axis) 及晶面改變，也會使得分析鑑定更加困難。因此觀察物的動態行為會對 TEM 觀察造成聚焦困難、視野偏移以及分析鑑定上的影響。因此，如何追蹤鎖定液態樣品中的觀察物及維持觀察物的穩定性，是一個重要的課題。

3. 電子束效應

電子束與液體產生非彈性碰撞導致升溫效應，以及電子束本身造成的輻射損傷，都可能改變樣品結構，進而影響觀察結果的準確性。以水溶液為例，電子束可能導致水分解反應，產生的微氣泡不僅影響觀察，高蒸汽壓的密封環境也使液體難以維持穩定。此外，水分解反應 (water splitting effect) 產生的水合電子、氫自由基、氫氧自由基等，亦可能作為氧化劑或還原劑參與反應，進而改變溶液中的化學平衡。

4. 試片製備困難

LCTEM 試片的製備過程比傳統 TEM 試片製備更加繁瑣，需要多個步驟的組裝和接合，樣品注入和封裝過程也需要一定的技巧和經驗，這增加了操作難度。若不幸發生側漏不僅影響實驗結果的準確性，還會污染 TEM 儀器。因此，如何在試片設計上兼顧電子束穿透性、樣品穩定性和密封性，是一個需要仔細權衡的問題，尋找更穩定、與樣品相容，且不影響電子束穿透的新型材料，也是試片開發的重要方向。

5. 數據分析複雜

LCTEM 實驗產生龐大的數據量，如何有效地分析和解讀數據，提取有用的訊息，也是一項繁重的任務。分析者需要區分電子束引起的樣品變化和真實的溶液反應，需要精密的控制實驗參數和深入的理論分析。

六、結論

本文介紹了 LCTEM 的發展及演進，並討論了 LCTEM 開發試片及樣品觀察所面臨的挑戰。總體而言，LCTEM 技術的發展仍需要不斷改進試片設計、優化實驗條件、提升數據分析能力，以及開發新的材料和方法，才能克服現有困境，使 LCTEM 得以充分發揮其在材料科學、化學、生物學等領域的應用潛力。

參考文獻

1. H.-G. Liao, D. Zhrebetskyy, H. Xin, C. Czarnik, P. Ercius, H. Elmlund, M. Pan, L.-W. Wang, H. Zheng, *Science*, **345**, 6199 (2014).
2. X. Ma, F. Lin, X. Chen, and C. Jin, *ACS Nano*, **14**, 9594 (2020).
3. M. R. Hauwiler, X. Zhang, W.-I. Liang, C.-H. Chiu, Q. Zhang, W. Zheng, C. Ophus, E. M. Chan, C. Czarnik, M. Pan, F. M. Ross, W.-W. Wu, Y.-H. Chu, M. Asta, P. W. Voorhees, A. P. Alivisatos, and H. Zheng, *Nano Letters*, **18**, 6427 (2018).
4. T. Tarnawski, M. Parlińska-Wojtan, *Chemistry Methods*, **4**, e202300041 (2023).
5. M. J. Williamson, R. M. Tromp, P. M. Vereecken, R. Hull, and F. M. Ross, *Nature Materials*, **2**, 532 (2003).
6. H. Zheng, R. K. Smith, Y.-W. Jun, C. Kisielowski, U. Dahmen, and A. P. Alivisatos, *Science*, **324**, 1309 (2009).
7. N. de Jonge, D. B. Peckys, G. J. Kremers, and D. W. Piston, *Proc. National Academy of Sciences*, **106**, 2159 (2009).
8. J. M. Yuk, J. Park, P. Ercius, K. Kim, D. J. Hellebusch, M. F. Crommie, J. Y. Lee, A. Zettl, and A. P. Alivisatos, *Science*, **336**, 61 (2012).
9. T.-H. Hsieh, J.-Y. Chen, C.-W. Huang, and W.-W. Wu, *Chemistry of Materials*, **28**, 4507 (2016).
10. F.-C. Chen, J.-Y. Chen, Y.-H. Lin, M.-Y. Kuo, Y.-J. Hsu, and W.-W. Wu, *Nanoscale*, **11**, 10486 (2019).

作者簡介

陳睿遠先生為國立交通大學材料科學與工程博士，現為國立聯合大學材料科學工程學系副教授。

Jui-Yuan Chen received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Chiao Tung University. He is currently an Associate Professor in the Department of Materials Science and Engineering at National United University.

黃浚璋先生為國立交通大學材料科學與工程博士，現為逢甲大學材料科學與工程學系副教授。

Chun-Wei Huang received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from National Chiao Tung University. He is currently an Assistant Professor in the Department of Materials Science and Engineering at Feng Chia University.

吳文偉先生為國立清華大學材料科學與工程博士，現為國立陽明交通大學材料科學與工程學系教授。

Wen-Wei Wu received his Ph.D. in the Department of Materials Science and Engineering from the National Tsing Hua University. He is currently a Professor in the Department of Materials Science and Engineering at National Yang Ming Chiao Tung University.

K-kit—應用於奈米溶液原位電子顯微鏡分析的創新微晶片

The K-kit Innovative Microchip for *in-situ* Electron Microscopy of Nanofluids

陳弘仁

Hung-Jen Chen

隨著奈米溶液應用擴展，全球對液態奈米產品的檢測標準日趨嚴格，要求精確分析溶液中奈米粒子的形貌與分佈。近年來穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 在液態原位分析方面已取得進展，特別是微型液池矽晶片技術。本文介紹一款創新的微型液池晶片「K-kit」，其可利用毛細力快速載入溶液，適用各種 TEM 設備，並可透過濕式負染提升奈米粒子影像對比度。K-kit 具備多項獨特產品優勢，已廣泛應用於學術研究及電子、化工、醫藥、食品等產業領域的奈米溶液分析。

With the expanding applications of nanofluids, global standards for the analysis of liquid-phase nanoproductions are becoming increasingly stringent, requiring precise characterization of nanoparticle morphology and distribution in solution. In recent years, transmission electron microscopy (TEM) has made significant advancements in *in-situ* liquid analysis, particularly with the development of microfluidic silicon chip technology. This article introduces an innovative microfluidic chip, “K-kit,” which uses capillary forces to quickly load the solution, is compatible with various brands of TEM equipment, and enhances nanoparticle image contrast through wet negative staining. K-kit offers several unique advantages and has been widely applied in academic research as well as industries such as electronics, chemical engineering, pharmaceuticals, and food etc.

一、奈米溶液的分析需求與挑戰

奈米溶液的應用已深入日常生活，隨著奈米科技發展，歐美各國近期也陸續推動液態奈米產品的標示與審查法規，強調需對最終產品的物理化學特性進行全面分析。特別是在液態環境下，對奈米添加物的成份種類、尺寸形狀、粒子濃度、粒徑分佈及群聚團聚等關鍵特性進行評估，以確保產品的安全性與穩定性。

國際標準組織 ISO 於 2012 年 5 月發布 ISO/TR 13014:2012《奈米技術－毒理評估所需

的人造奈米材料物理化學特性分析指引》(Nanotechnologies - Guidance on Physico-chemical Characterization of Engineered Nanoscale Materials for Toxicologic Assessment)，強調在進行毒理學評估前，必須先完成物理化學特性分析，以建立奈米材料與測試結果之間的相關性。如圖 1 所示，該標準列出了八項關鍵的奈米檢測參數。這些參數對於評估奈米材料的安全性、環境影響及產品應用至關重要。此外，ISO/TR 13014:2012 亦提供一套標準化測試方法，幫助研究機構與企業建立一致的奈米材料評估流程。

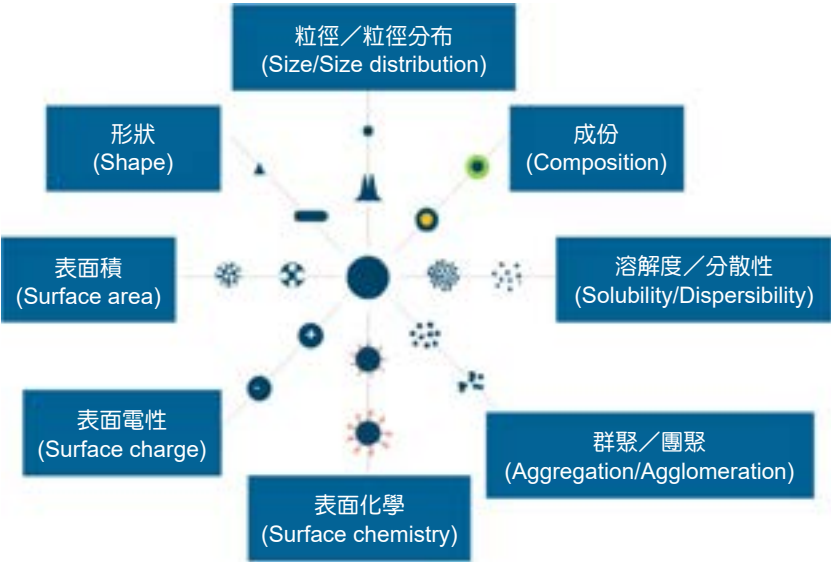


圖 1. ISO/TR13014 規範 8 項重要奈米檢測參數 (2012 年版)。

奈米材料的分析方法如表 1 所列，多數項目已可透過市售儀器進行檢測，唯有奈米溶液分析技術仍面臨諸多挑戰。尤其對於「形狀」、「粒徑／粒徑分布」、「群聚／團聚」及「溶解度／分散性」4 項檢測參數，需要獲取粒子於溶液中的實際影像資訊，才能確保分析結果的準確性。為滿足奈米產業的檢測需求，若能利用電子顯微鏡於微觀尺度下直接觀測溶液內奈米粒子，將有助於獲得產品成份與特性最真實的影像資訊。

表 1. 常見的奈米材料分析方法。

檢測參數	檢測方法
成份	SEM/EDS, TEM/EDS, XRD, ICP-MS, ICP-OES, TGA, XPS, AES, Raman, etc.
粒徑／粒徑分布	DLS, SPM, SEC, SEM/TEM, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
形狀	SEM, SPM, <u>Liquid-TEM</u> etc.
群聚／團聚	Cryo-SEM, Cryo-TEM, CLS, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
溶解度／分散性	ICP-MS, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
表面電性	PI, IEP, ELS, Electrophoresis etc.
表面化學	XPS, XRD, AES, SAM, SIMS, EDS, EELS, Raman, etc.
表面積	BET, TGA, DLS, SEM/TEM, etc.

穿透式電子顯微鏡長久以來一直是探索材料結構的關鍵技術。近幾十年來，該技術經歷了多次突破性發展，例如像差校正 (aberration correction) 技術實現了原子級尺度成像、冷凍電鏡 (Cryo-TEM) 技術為生物樣品提供了高解析度影像觀察，以及各種創新的 TEM 結構設計，使得動態系統的原位 (*in-situ*) 分析成為可能。近年來，基於矽晶片應用架構的原位技術迅速發展，使得模擬真實環境條件下材料和生物樣品的動態變化觀察實驗，能夠在 TEM 腔體內之高真空環境下進行。其中，最受關注的技術之一是利用矽晶片封裝液體，實現在 TEM 內進行奈米尺度的液相動力學觀察⁽¹⁾。透過液態原位 TEM (*in-situ* liquid TEM) 成像觀察液相反應，研究人員得以深入探究電化學過程、抗菌與病理機制、生物細胞行為等重要領域的基礎原理。

二、液態原位電子顯微鏡技術演進

原位電子顯微鏡 (*in-situ* electron microscopy) 技術的發展，突破了傳統電子顯微鏡僅能在高真空環境中運行的限制。早在 1950 至 1960 年代，學者們便開始探索在受控氣體環境下進行電子顯微鏡觀察，並發現這些氣體環境技術有效減少了電子束對樣品的損害。其中 Heide (1962)⁽²⁾ 的相關研究，為後來液態環境下的電子顯微鏡觀察奠定了重要基礎。然而，此類直接修改設備結構、將流體管路建置於 TEM 真空腔體內的作法，不僅成本高昂、清潔維修困難，還存在溶液洩漏之風險。而受限於傳統機械加工精度限制，也難以獲得高解析度的奈米粒子影像 (液層較厚)。

在 1990 年代，液態池 (liquid cell, LC) 的技術問世。這項技術利用強韌的薄膜材料 (如氮化矽 SiN) 來封裝溶液樣品，使其在電子顯微鏡中能夠保持液態，同時又不會影響電子束的穿透。隨著精密加工技術進步，隨後也逐漸發展出可實現動態觀察、功能更強大的液態流動池 (liquid flow cell, LFC)。這項技術的核心在於利用特殊設計的 TEM 樣品桿 (TEM holder)，其內部整合了流道系統。在該樣品桿前端，透過精密鎖合兩片矽晶片、金屬蓋板及密封環等元件，形成一個具備液體流動能力的液池觀察窗口，使得研究者能夠實現奈米尺度液體樣品的動態變化觀察。目前，奧克里奇國家實驗室 (Oak Ridge National Laboratory, ORNL) 和美國國家電子顯微鏡實驗室 (National Center for Electron Microscopy, NCEM) 在此研究領域處於領先地位，並積極支持多家 TEM 原位樣品桿 (*in-situ* TEM holder) 商業設計公司，如 Hummingbird Scientific⁽¹⁷⁾ 和 Protochips⁽¹⁸⁾，推動實際產品的開發與銷售。此外，荷蘭 DENSsolutions、及瑞典 Nanofactory 等公司也已進入市場，成為該領域的重要競爭者。

由於半導體製程與精密加工技術的進步，現今液態原位 TEM 樣品桿 (*in-situ* liquid TEM holder) 產品已多能支援液體流動、加熱、通電等功能，研究人員可在電子顯微鏡內操控液體環境，實現連續反應觀測，從而推動奈米材料成長、觸媒催化與電化學反應等研究。圖 2 為 Protochips 公司推出的液態原位 TEM 樣品桿產品及其配件。然而，此類原位觀測技術通常須依賴特定廠商提供的樣品桿，並須搭配使用專屬設計之矽晶片，導致設備相容性受限、並且成本高昂。此外，樣品桿的組裝、測漏、前處理及清潔等過程也相當繁瑣，單次觀測往往需要花費數小時以上。因此，目前液態原位 TEM 樣品桿產品的應用，主要仍集中在學術研究領域，難以滿足產業界對於高效率、低成本、大量分析樣品之檢測需求。

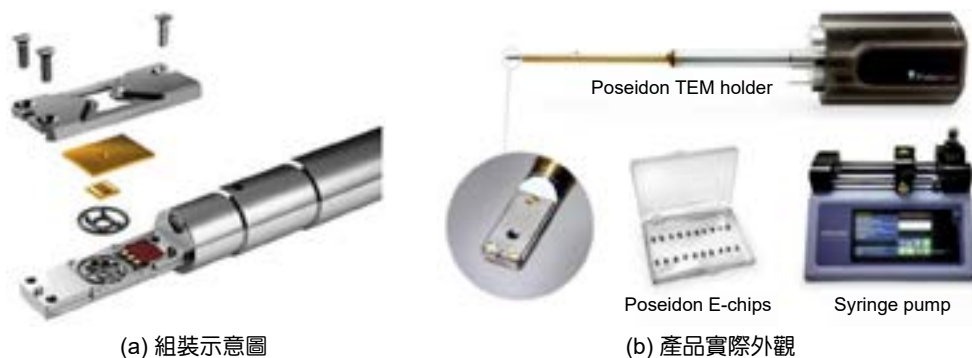


圖 2. 美國 Protochips 公司的液態原位 TEM 樣品桿產品 (圖片來源：⁽¹⁸⁾)。

2016 年，國內知名半導體檢測大廠閎康科技 (Materials Analysis Technology Inc.) 基於獨家專利技術，研發出單體式微型液態池晶片「K-kit」，為奈米溶液樣品的 TEM 影像分析帶來創新突破⁽¹⁶⁾。如圖 3 所示，K-kit 採用通用尺寸 3 mm 外徑的 TEM 標準銅環作為承載平台，具備高度相容性，可直接適用於 Hitachi、FEI、JEOL 等各大品牌之電子顯微鏡設備，無需額外添購昂貴的液態原位 TEM 樣品桿。此外，其單體式結構設計大幅簡化了樣品製備流程，使操作更加快速便利，同時也降低檢測成本。圖 4 展示了 K-kit 對於不同奈米溶液的電子顯微鏡影像觀測結果。憑藉其高適用性、便利性與經濟性，K-kit 不僅能夠滿足學術研究之分析需求，也為產業界提供實用的液態奈米材料檢測方案。

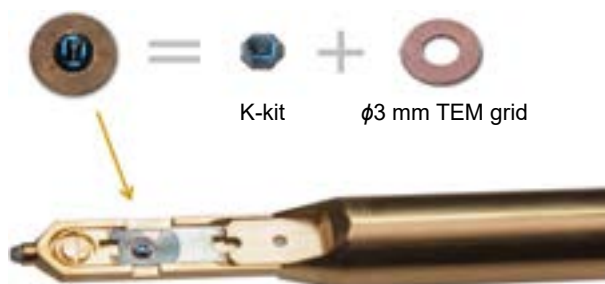


圖 3. K-kit 採用 TEM 標準銅環承載，可適用於各廠牌的 TEM 設備進行觀測。

三、奈米溶液分析的新利器 K-kit

3.1 K-kit 結構原理

K-kit 晶片採用微機電系統 (micro electro mechanical systems, MEMS) 技術製作，其結構由兩片對稱設計的矽晶片上下對準後，經高溫接合與濕蝕刻等製程形成。圖 5 是完成製造的 K-kit 晶圓外觀及單顆 K-kit 晶片之掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 影像。如圖 6 所示，K-kit 內部中央設有一微型儲液通道，並可通過該通道兩端的開口載入及密封溶液。K-kit 本體結構的上下兩面各設置有一凹槽，該凹槽底部具有一個由奈米厚度的氮化矽 (Si_3N_4) 薄膜所組成之液池觀測窗，能允許電子顯微鏡的電子束穿透並成像。K-kit 結構本體由堅硬的矽晶材料製成，並且氮化矽薄膜也具有高強韌性，此使得 K-kit 晶片不僅能

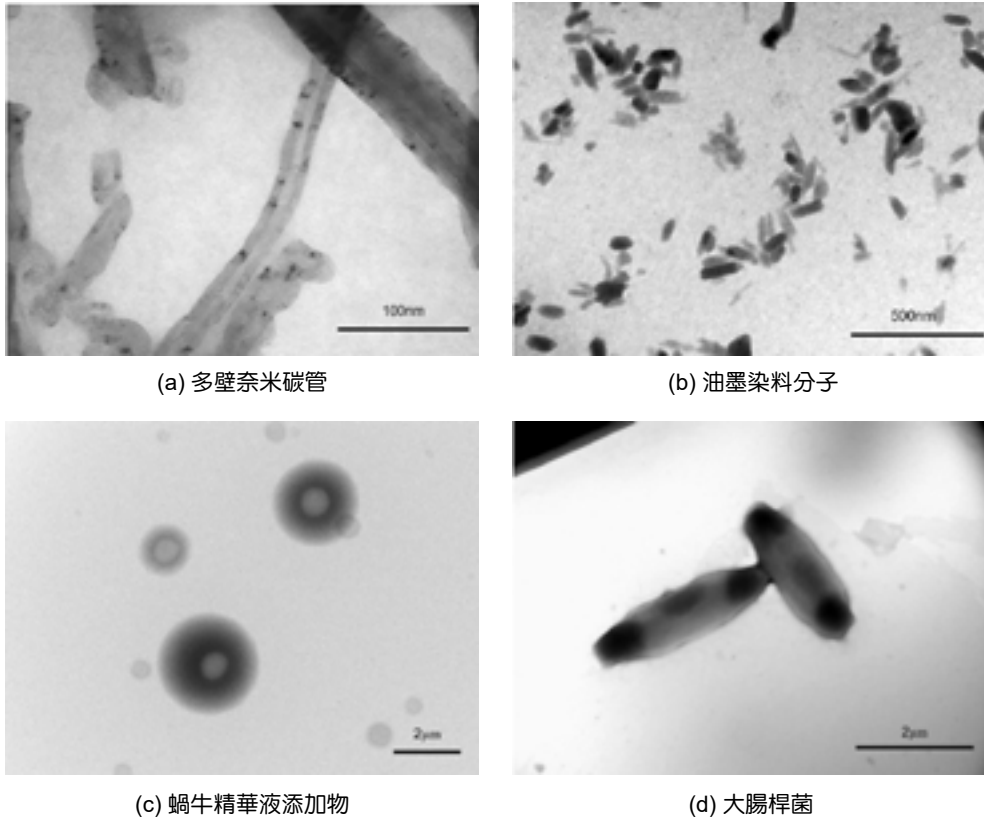


圖 4. K-kit 對於各類奈米溶液樣品的電子顯微鏡影像觀測結果。

夠承受極大之真空環境壓力變化，還能搭配應用具備加熱或冷卻功能的 TEM 樣品桿，進行液態樣品在變溫條件下之原位觀測 (建議操作溫度範圍為 -196°C 至 120°C)。

K-kit 是一款已在市場上銷售多年的液態原位電子顯微鏡影像分析產品，可透過全球超過 20 家知名電子顯微鏡耗材通路商購入使用。如圖 7 所示，K-kit 晶粒的尺寸為 $1.7\text{ mm} \times 1.4\text{ mm} \times 0.8\text{ mm}$ ，上下表面凹槽內的觀測窗尺寸為 $300\text{ }\mu\text{m} \times 25\text{ }\mu\text{m}$ 。本體結構左右兩端的

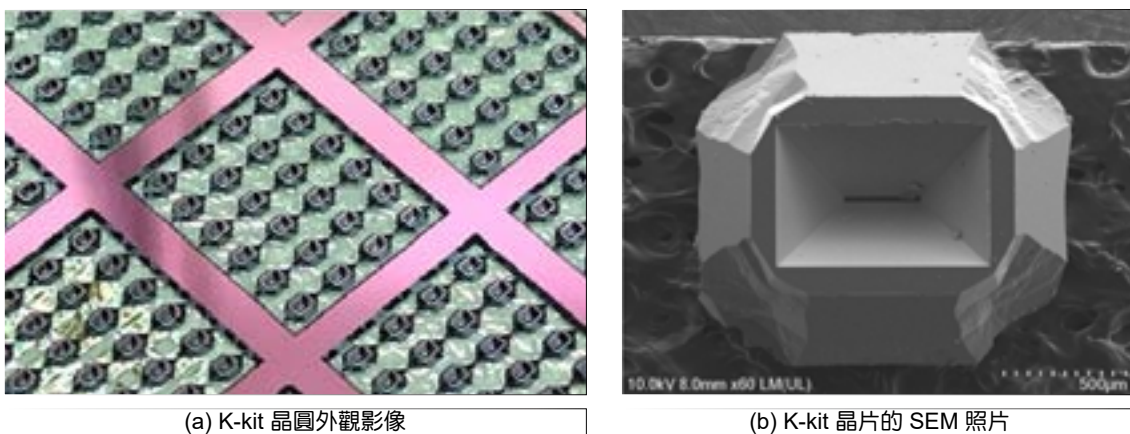


圖 5. K-kit 晶圓及單顆 K-kit 晶片之結構外觀。

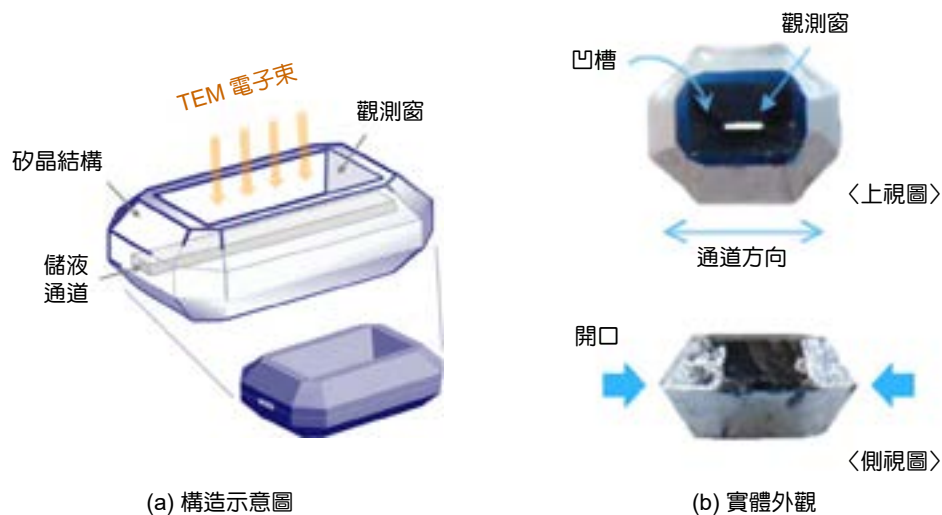


圖 6. K-kit 晶片的結構 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)

微通道開口尺寸決定了可載入奈米粒子之大小，因此為滿足不同樣品的觀測需求，K-kit 產品提供了 6 種通道高度選項，分別為 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.2\ \mu\text{m}$ 、 $0.5\ \mu\text{m}$ 、 $1\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ 及 $5\ \mu\text{m}$ 。此外，其觀測窗的氮化矽薄膜厚度，亦提供 30 nm 和 100 nm 兩種選擇。

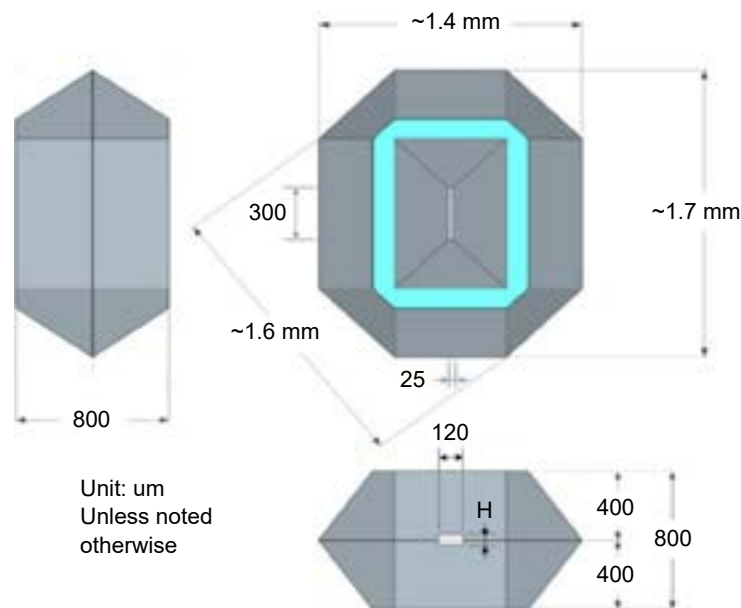


圖 7. K-kit 晶片尺寸。

如圖 8 所示，為了便利 K-kit 晶片的樣品製備操作，閎康科技也設計了一套專屬的 K-kit 工具盒，藉以提高使用者樣品製備之速度與可靠性。目前 K-kit 的出貨包裝盒有兩款，分別為四顆裝與六顆裝。另外，每顆 K-kit 在出貨時都配置一個基座 (carrier)，並以一透明塑膠蓋密封保護。而該基座底部內已預置一個 TEM 標準銅環，卸除底板後可取出使用。



圖 8. K-kit 工具盒與出貨包裝。

3.2 樣品製備流程

K-kit 的樣品製備方法十分簡單，如圖 9 所示。通常全新的 K-kit 兩端各有一密封塊，以維持微通道內的真空狀態，確保其內表面高度潔淨、藉以提升溶液載入效果。使用時，需先使用鑷子或通道開啟裝置 (channel opener) 移除密封塊，然後將微通道任一端開口輕觸液滴表面，使奈米溶液經毛細力作用 (capillary action) 吸入微通道內。溶液載入之後，接續進行兩端塗膠密封與承載銅環的黏貼。待膠材固化後 (建議可放置於簡易真空設備中加速乾燥)，即可將 K-kit 樣品裝載至 TEM 樣品桿上進行觀察。整個樣品製備過程約 30 分鐘即可完成。

K-kit 晶片的單體式結構設計，展現出相較於原位液態 TEM 樣品桿之獨特優勢。憑藉一體成型的設計，K-kit 能自適應溶液載入量，無需特別控制樣品液滴大小。此外，K-kit 內部極小的儲液通道可產生強大毛細作用力，即使是高黏性或油性樣品，通常也可直接加載，無需額外稀釋 (經過實測，即使黏滯係數超過 3,000 mPa·s 之溶液也可以順利載入)。此種設計確保了溶液載入的穩定性與可靠性，也大幅提升操作之便利性。

對於微通道開口的密封，建議可使用知名品牌 Torr-seal 真空膠。Torr-Seal 是一種環氧樹脂 (epoxy) 型真空密封膠，具有優異的密封性能，固化後不會釋放揮發性物質，因此適合於高真空環境使用。再者，該膠材穩定性高，且與多數化學溶液不反應，因此在密封時即使與 K-kit 內樣品溶液接觸，也不易產生污染，確保實驗觀察結果之可靠性。

K-kit 本體結構採用具抗酸鹼性的矽晶材料製成，並搭配對多數化學溶液具高穩定性的 Torr Seal 密封膠，因此能廣泛應用於各種常見化學溶液之觀測與分析。表 2 是將 Torr Seal 膠材浸泡於各類化學溶液 24 小時後，所進行的 FTIR 檢測分析 (判斷是否有成份溶解) 以及目視觀察結果 (評估膠材是否在溶液中擴散)。經長時間浸泡測試後，大多數溶液中皆未發

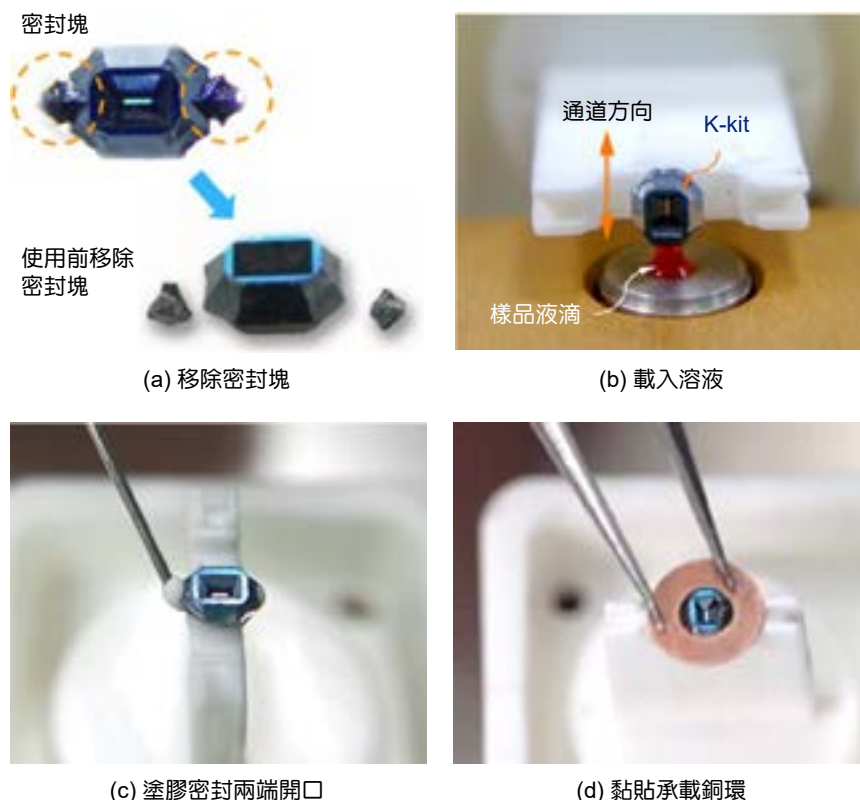


圖 9. K-kit 的樣品製備步驟。

現 Torr Seal 膠材有溶解或散佈現象。僅有少數溶液的 FTIR 檢測結果顯示膠材成份有微量溶出。然而，即便如此，Torr Seal 對這些特定溶液仍展現了良好的耐受性，可在短時間內（約數小時內）用於 K-kit 的密封操作，並順利完成影像觀測。

表 2. Torr Seal 膠材浸泡於各類化學溶液的測試結果⁽¹⁶⁾。

✓- Compatible (FTIR not detected) ▲-Use with care (FTIR detected)

Compatibility (FTIR)	Water	PEG400	DMSO	Ethanol	0.1N HCl	0.1N KOH
	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Toluene	NMP	ACN (CH ₃ CN)	Chloroform (CHCl ₃)	1% NH ₄ OH	0.1N HNO ₃
	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Hexane	IPA	Methanol	DCM	THF	Acetone
	✓	✓	✓	▲	▲	▲

在實際應用中，只要樣品溶液不與 Torr Seal 發生化學反應，即可使用 K-kit 進行影像觀測。根據實測經驗，即使是未經稀釋的強酸（如 pH 約為 1 的硫酸）或強鹼（如 pH 約為 12 的氨水）等溶液，亦可穩定封裝於 K-kit 中進行觀察。然而，於製備含強酸或強鹼樣品的過程中，仍須特別留意操作風險，確實穿戴適當的個人防護裝備，以確保使用人員安全無虞。

另外，為提升 K-kit 樣品製備效率，並避免因銅環與晶片黏附不良而在夾取過程中脫落，閎康科技運用專利技術開發出一款便利使用的 K-kit 開合式銅網 (K-kit folding grid)，如圖 10 所示。該銅網採用 MEMS 技術製造，具可摺疊設計，能精準對合上下兩半部結構。每一半部中央皆設置有凹槽，用於固定承載 K-kit 晶片，且凹槽底部具備中央開孔設計，當上下結構蓋合後，可供 TEM 電子束穿透，實現成像觀測。

原本 K-kit 的樣品製備須透過塗膠將其固定於 TEM 銅網，此作法不僅膠材固化需時較長，且塗膠過程若稍有不慎，可能導致膠材流入 K-kit 視窗內，造成氮化矽薄膜受到污染。透過該專用銅網的導入，不僅能顯著提升 K-kit 之使用便利性與樣品製備速度，更可有效避免塗膠不當造成之樣品製備失敗風險。並且，此銅網可重複使用多次，也在降低成本方面具有極大效益。

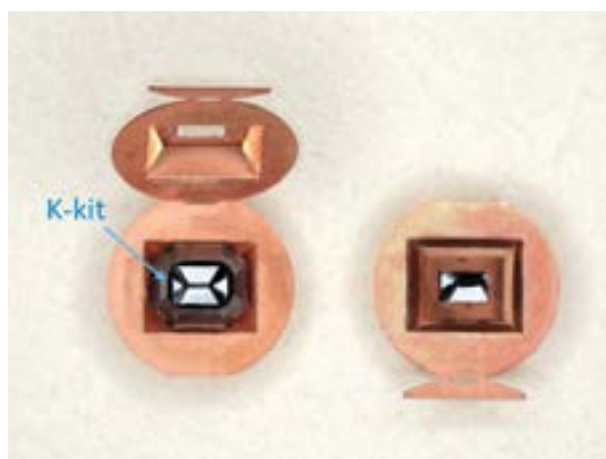


圖 10. K-kit 開合式銅網外觀。

3.3 溼式與乾式樣品製備

K-kit 採用單體式結構設計，在樣品製備方面展現出顯著的差異化特點。如圖 11 所示，透過適當的樣品製備方法，可在 K-kit 微通道內形成乾式與濕式兩類不同的載液狀態，且無論乾、濕狀態，皆能夠維持均勻一致的奈米粒子分布，確保穩定且高品質的觀測結果。

在 K-kit 樣品製備過程中，透過選擇適當的微通道尺寸，並控制從載入溶液至塗膠密封之間的時間間隔，可形成如表 3 所示的四種不同儲液狀態樣品。一般而言，建議使用通道高度較大的 K-kit (例如 $2\ \mu\text{m}$) 製備乾式樣品，而通道高度較小之 K-kit (例如 $0.2\ \mu\text{m}$) 則較適合用於製備溼式樣品。其主要原因在於通道高度較大的 K-kit 具備較大的開口端，液體在室溫下較易自然蒸發，或可在真空環境下迅速移除。因此，製備乾式樣品時，可不必要於通道兩端塗覆真空膠進行密封，即可確保溶液完全乾燥。

使用者可依據分析需求，選擇製備乾式或溼式之 K-kit 樣品。若僅需觀察溶液內粒子的形態、尺寸或團聚狀態，建議優先選擇乾式 K-kit，以獲得較佳的 TEM 影像品質。若研究目標為溶液內之化學反應 (例如 AuCl_4^- 溶液在電子束作用下的金還原反應)、或是需要有溶液維持於 K-kit 內 (例如觀測生物或有機粒子的真實形貌)，則適合採用濕式 K-kit。此外，有些樣品溶液在 TEM 電子束照射下容易產生氣泡或擾動，進而影響影像觀察的清晰度與穩定性者，則可採用乾式 K-kit 製備方法改善，藉由減少通道內之溶液量，降低電子束對樣品的影響。

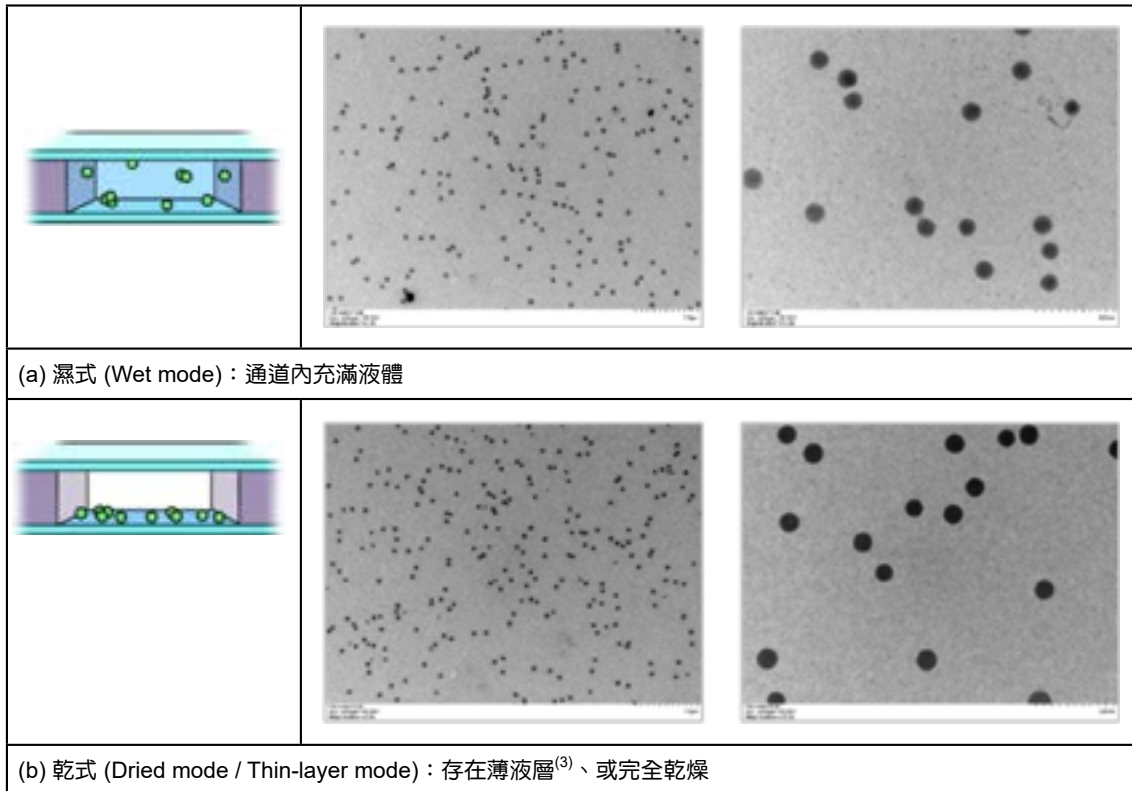
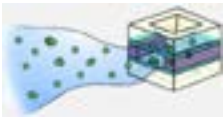


圖 11. 濕式與乾式 K-kit 的 TEM 影像觀察結果。本例 K-kit 載入之樣品為 NIST 100 nm 聚苯乙烯粒子 (polystyrene spheres)。

表 3. K-kit 樣品製備可實現的不同儲液態樣。

K-kit 樣品製模式	濕式 (Wet)	乾式 (Thin Layer)
	存在液體 	乾燥 
影像解析度	良好	極佳
適用通道尺寸 (μm)	0.1, 0.2, 0.5	0.5, 1, 2, 5
可載入樣品粒子尺寸 (nm)	< 500	< 3,000
樣品粒子外形	原始樣貌	潛在輕微變形的可能性
電子束作用時潛在發生化學反應、或是粒子受到破壞的風險	高	低
K-kit 可形成的內部狀態	 完全充滿液體  部份充滿液體	 壁面存在薄液層  乾燥狀態

乾式模式之 K-kit 樣品製備，可使通道內完全乾燥、或於壁面形成奈米厚度的薄液層^(3, 4)，有效提升影像觀察品質，這也是 K-kit 相較於市場上其它液態池晶片產品之主要優勢之一。

3.4 濕式負染與多次載入

基於獨特的單體式結構，K-kit 同時也是市場上唯一可實現多次載入 (multiple loadings) 及濕式負染 (wet negative staining) 應用的微型液池晶片。此優勢對於低影像對比度的生物樣品觀察、或是免疫電子顯微學 (immuno-electron microscopy) 研究等，皆可提供相當大的助益。

K-kit 可應用於例如觸媒反應機制研究、或免疫檢測技術開發等，需要執行多次載入不同樣品溶液的實驗研究，如圖 12 所示。此獨特功能是市場上其它類型產品，如兩片組合式液態池晶片、或原位液態 TEM 樣品桿等所無法實現的。



圖 12. 利用 K-kit 可執行多次樣品載入操作，且重複載入次數無限制。

圖 13 是 K-kit 應用於免疫檢測的研究案例⁽⁵⁾。本例將經過分離處理的血小板 α 粒子，透過 K-kit 重複進行多次樣品載入，成功獲得奈米金標定 α 粒子 (α Granules) 之 TEM 清晰影像。該免疫學樣品的 K-kit 製備過程如下：首先，透過 K-kit 分別載入不同溶液進行內部清潔與表面處理，接著依次載入初級抗體 Mouse monoclonal anti-P-selectin antibody 和二級抗體 6-nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG antibody，並在加熱至 37 °C 環境培養約 2 小時，使抗體發生反應。由於電子顯微鏡無法偵測螢光訊號，此免疫金標記方法藉由將金粒子與抗體結合，利用金在電鏡影像中的高對比度，清楚標定出所有血小板釋出之 α 粒子位置。

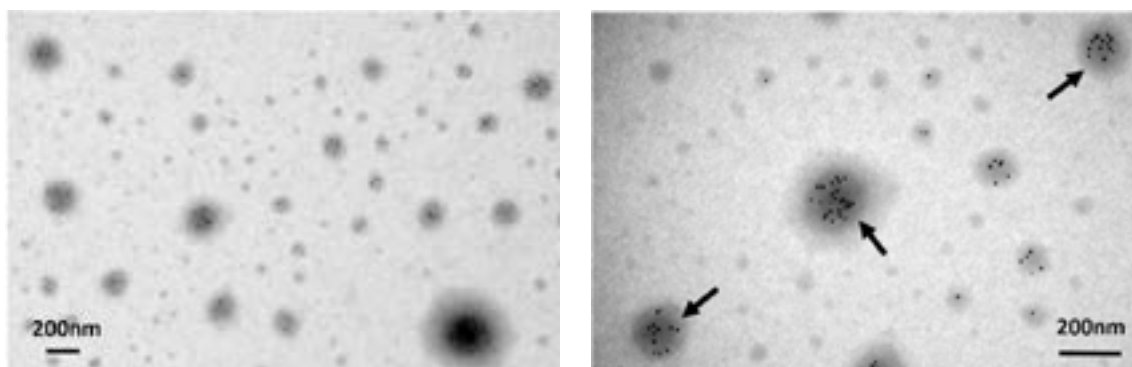


圖 13. 利用 K-kit 經過多次載入步驟，成功以 6 nm 奈米金標定血小板釋出物 α 粒子的 TEM 影像結果。(圖片來源：⁽⁵⁾)

對於較低對比度的生物樣品，例如病毒、細菌、微脂體 (liposomes) 或外泌體 (exosomes) 等之電子顯微鏡觀測，一般常用的影像改善方法是進行所謂負染 (negative staining) 處理。負染的原理是通過將重金屬染劑堆積在奈米樣品周圍，從而加深影像背景，進一步突顯出該樣品之形貌。傳統負染作法是將染劑滴加於已放置樣品的銅網上，靜置乾燥之後，再將銅網載入電子顯微鏡進行觀察。然而，此一乾燥過程中，有機樣品常因水分流失而發生結構塌陷，尤其是微脂體或外泌體等囊泡型態的生物樣品，極易導致原應呈現圓球狀之樣品粒子外觀塌陷、並堆積染劑。閎康科技基於豐富的生醫樣品分析經驗，開發了獨特之 K-kit 濕式負染技術，可在「濕」的溶液狀態下同樣達到樣品負染效果，成功實現低對比度生物樣品在液態環境的電子顯微鏡清晰影像觀測。

K-kit 濕式負染方法非常簡單，通常可使用 2% 醋酸鈾鹽 (uranyl acetate, UA) 溶液作為負染劑，將 10 μL 的樣品溶液與 10 μL 的負染劑均勻混合後，直接載入 K-kit 進行觀察即可。建議使用者可依實際測試結果適當調整負染劑與樣品溶液的混合比例，以獲得最佳負染效果。圖 14 是人造膠原蛋白纖維束 (collagen fiber) 在銅網與 K-kit 上的負染觀察結果。如圖 14(b) 所示，K-kit 濕式負染處理後，可在溶液狀態下清楚觀察到膠原蛋白樣品的束狀結構影像。圖 15 是兩種極低影像對比度的生物樣品微脂體與外泌體⁽⁵⁾，其負染處理後的 K-kit 影像觀測結果。

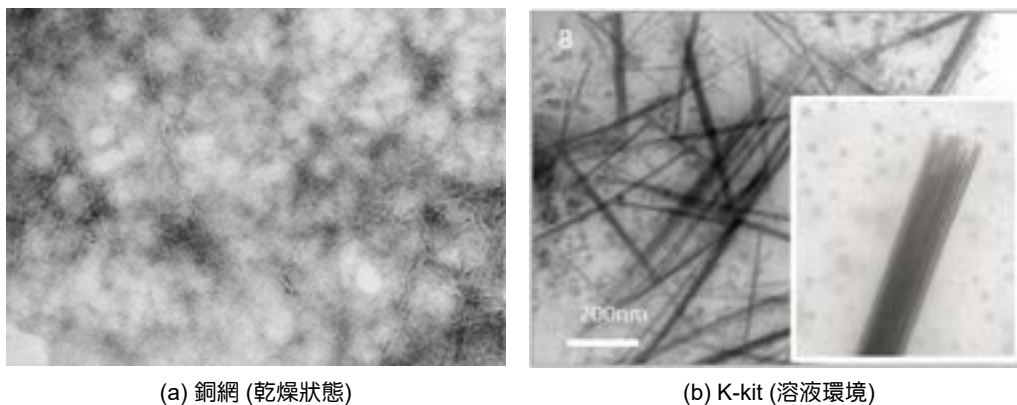


圖 14. 膠原蛋白纖維束在銅網與 K-kit 上的負染影像結果。

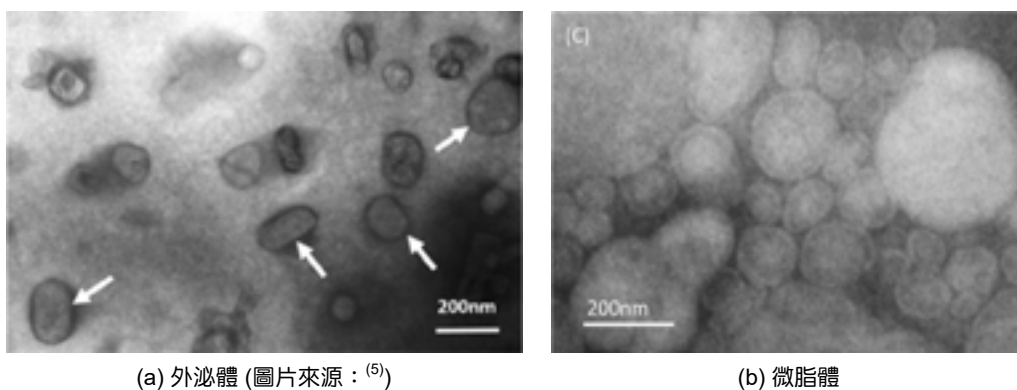


圖 15. 低影像對比度生物樣品的 K-kit 濕式負染觀察結果。

3.5 其它產品特點

K-kit 除了可應用於各種品牌的 TEM 設備進行觀測外，它也是市場上唯一可同時適用於掃描電子顯微鏡及聚焦離子束－掃描電子顯微鏡 (focus ion beam- scanning electron microscopy, FIB-SEM) 觀測的微型液態池晶片產品。圖 16 是 K-kit 利用 TEM 及 FIB-SEM 觀測液態環境下 100 nm NIST 聚苯乙烯 (polystyrene) 粒子之影像比較結果。

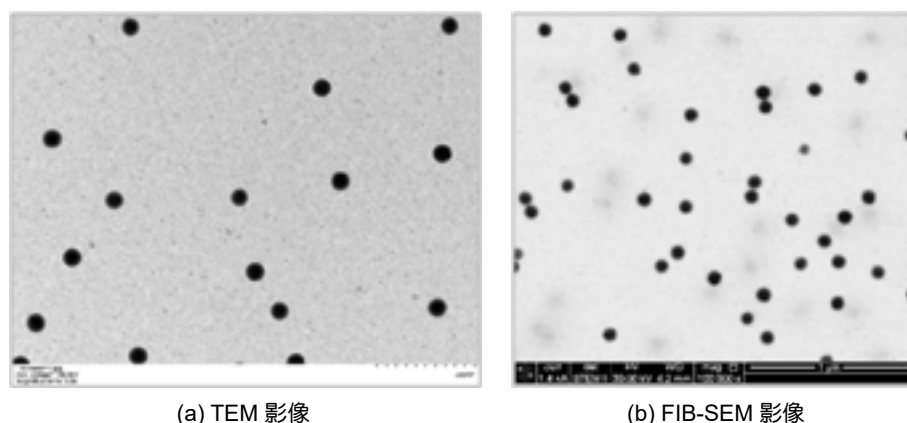


圖 16. 利用 TEM 與 FIB-SEM 觀測 100 nm 聚苯乙烯粒子之 K-kit 影像比較結果 (本例使用之觀測設備分別為 Hitachi HT7700 TEM 與 FEI Helios 400 FIB)。

此外，K-kit 的觀測視窗由極薄 (約 30 nm) 的氮化矽薄膜組成，其不僅可提供電子顯微鏡之電子束穿透成像，還能對奈米粒子進行包括能量散射 X 射線譜 (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX) 成份及晶格繞射等分析。圖 17 為 FIB-SEM 觀測載入 K-kit 之氯金酸 (AuCl_4) 溶液，經電子束還原反應後所形成金粒子的影像與對應之 EDX 元素分析結果。而圖 18 則是 K-kit 內奈米金粒子樣品的 TEM 晶格繞射圖形 (lattice diffraction pattern) 觀察結果。

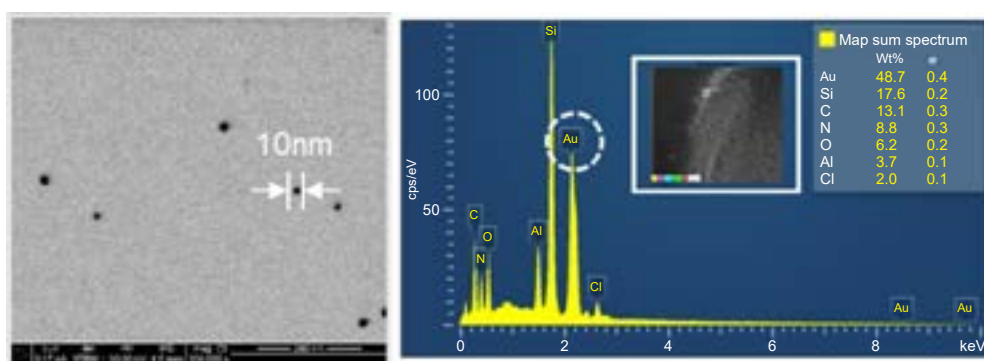
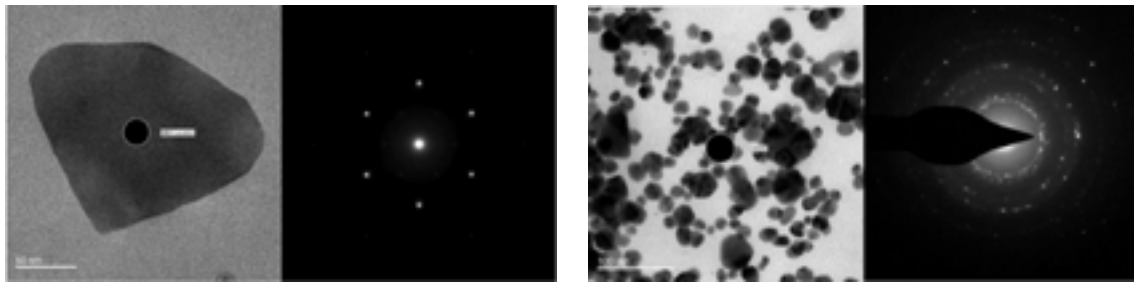


圖 17. 使用 FEI Helios 400 FIB-SEM 觀測 K-kit 內的金粒子影像及其 EDX 分析結果 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)。

3.6 K-kit 應用實例

K-kit 在液態樣品的電子顯微鏡觀測中展現出高度的應用潛力，能支援多領域的分析需求。例如，在電子產業中，可應用於液態奈米材料的開發與製程品管；在生醫領域，適用於於



(a) 奈米束電子繞射 (nano-beam diffraction, NBD)

(b) 選區電子繞射 (selective area diffraction, SAD)

圖 18. K-kit 內奈米金粒子的 TEM 晶格繞射分析結果 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)。

新藥研發與病理機轉研究；於食品與飲料產業，可用在分析產品中添加劑的成份與分佈。此外，K-kit 亦可應用於美妝產品，檢驗如防曬乳或含奈米成份的化妝水等^(6, 13)，提供高效正確之全面性奈米溶液檢測方案。圖 19 應用案例是將半導體製程使用的化學機械研磨溶液 (CMP Slurry)，直接載入 K-kit 進行 TEM 影像觀察及粒子尺寸分佈定量分析。圖 20 則是分析市售防曬乳產品內添加氧化鈦 (TiO₂) 奈米顆粒之實際範例。

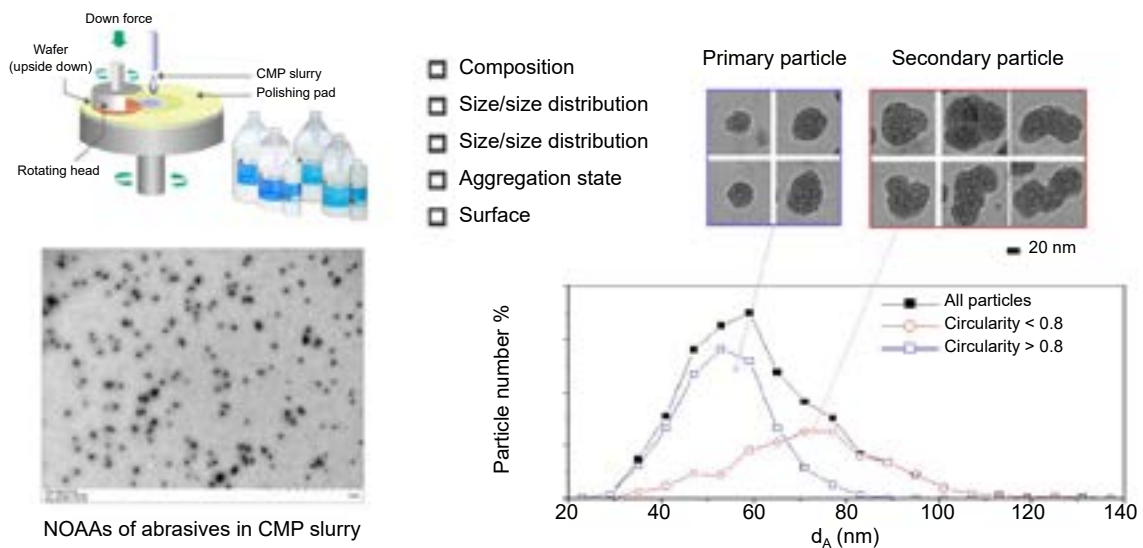


圖 19. K-kit 載入CMP 溶液進行 TEM 影像分析之結果。

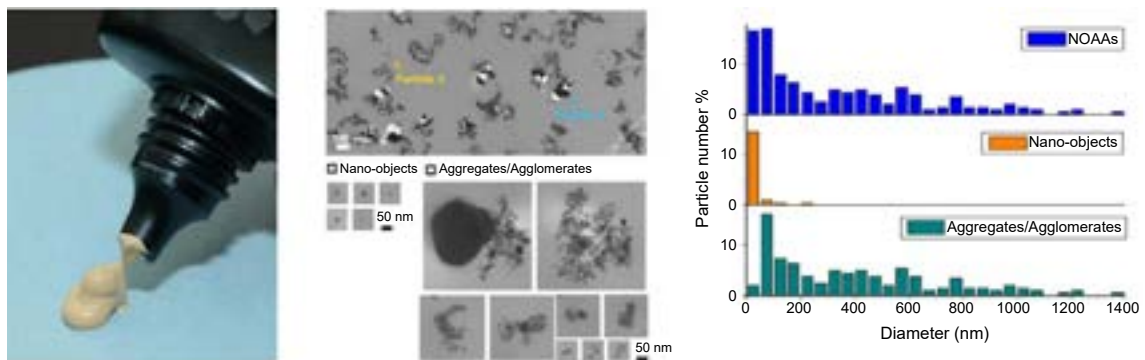


圖 20. 市售防曬乳產品添加 TiO₂ 奈米顆粒的 K-kit 影像分析結果。

特別是在奈米醫療相關領域，K-kit 也展現出卓越的應用價值。其可使用於新藥開發、生物醫學研究、疾病檢測、血液篩檢等，提供具體直觀的液態樣品電子顯微鏡影像，助力醫療診斷與科研之發展。圖 21 為使用 K-kit 分析 Abraxane[®] 藥液中的蛋白質顆粒尺寸分布結果之實際案例。

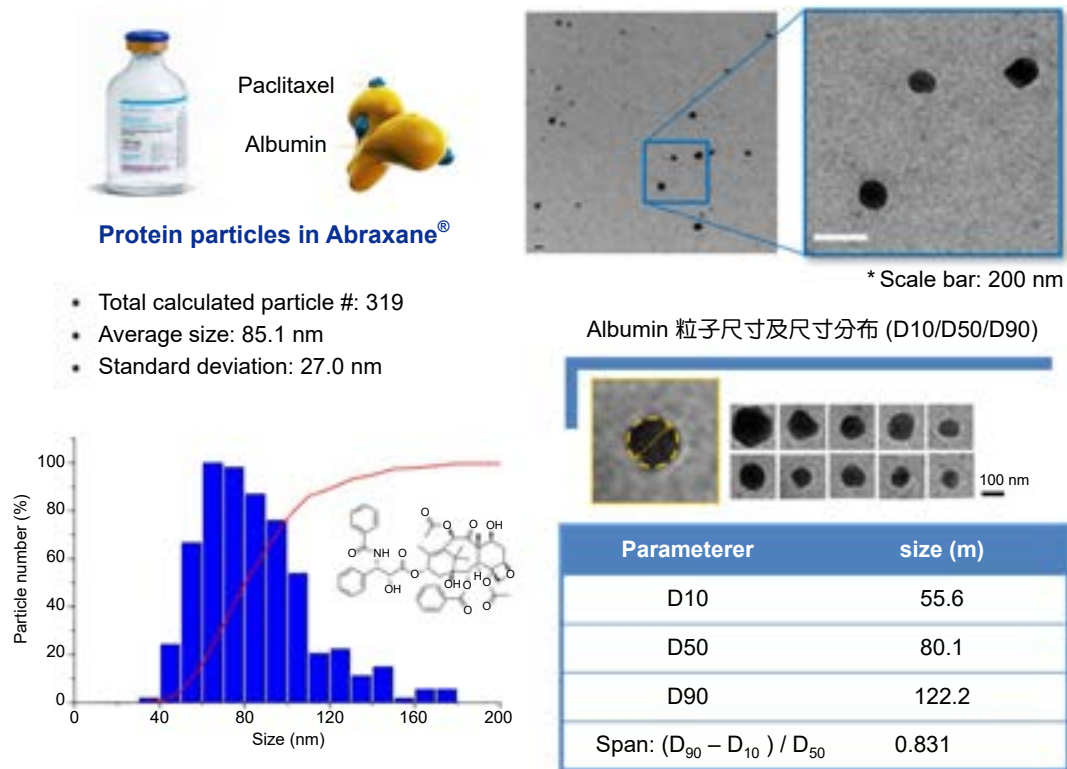


圖 21. 使用 K-kit 分析 Abraxane[®] 藥液中的蛋白質顆粒影像分布情形。

早在 2008 年，已有研究團隊率先利用 K-kit 實現液相環境中活細胞的電子顯微成像觀察⁽⁷⁾。該研究成功以 K-kit 觀察到活體大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 細胞、如圖 22 所示，以及肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 進行亞碲酸鹽還原的過程。此外，研究亦顯示，K-kit 中的肺炎克雷伯氏菌與酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在連續 TEM 觀測下可分別存活長達 14 秒與 42 秒。此實驗研究不僅大幅簡化了液相 TEM 樣品製備流程，更實現了最早的活細胞電子顯微成像研究成果。儘管該技術在解析度與自由基防護方面仍有侷限，然而其創新應用至今仍被視為液相生物成像領域的重要里程碑⁽¹⁰⁾。

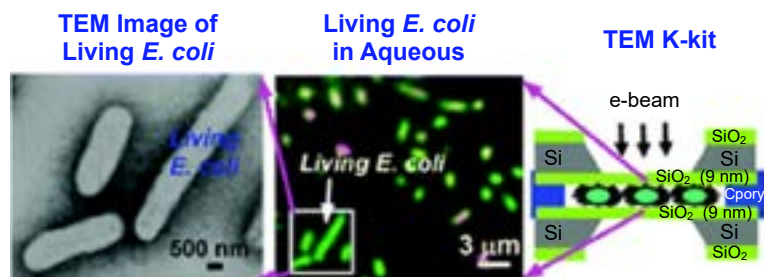


圖 22. 利用 K-kit 成功觀察到活的大腸桿菌細胞 (圖片來源：⁽⁷⁾)。

另外，透過液態池晶片 K-kit 的應用，也能對生物「體外 (in vitro)」或「體內 (in vivo)」處於原液環境的血液樣品所含之奈米顆粒，進行完整的物理化學特性分析。此在人體對於藥物的吸收、分布、代謝 (metabolism) 及排泄 (excretion) 等藥物動力學 (pharmacokinetics) 研究或物質毒性 (toxicity) 評估等方面，展現出高度的應用潛力。2012 年時，學者以 K-kit 進行此類相關實驗研究⁽⁸⁾，其將經過檸檬酸鹽 (citrate) 與聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等不同聚合物修飾的金奈米粒子與血液混合，分別載入 K-kit 中，觀察該金粒子之分散情形。同時，此研究亦將 cPEG5k 修飾之金奈米粒子注射至小鼠體內，追蹤其在血液中的濃度隨時間變化情形，並將結果與電感耦合電漿質譜儀 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 所測得的數據進行比較。如圖 23 所示，K-kit 的影像觀察結果與 ICP-MS 測得的金粒子濃度變化趨勢高度一致，顯示 K-kit 同時具有定性及定量分析的實際應用潛力。

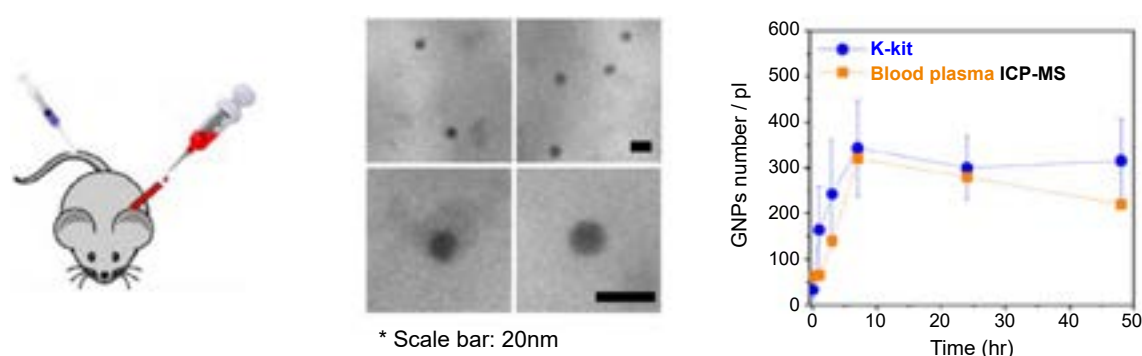
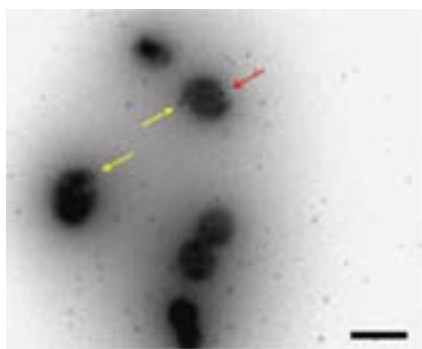


圖 23. 將 PEG 修飾之金奈米粒子注射至小鼠體內，並分別以 K-kit 與 ICP-MS 分析其在血液中金粒子濃度隨時間變化的趨勢，並比較兩者之分析結果 (圖片來源：⁽⁸⁾)。

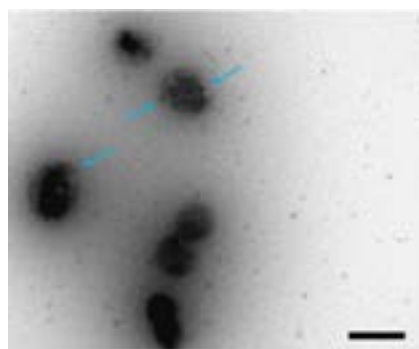
2022 年時，學者利用 K-kit 首次觀測到穀胱甘肽 (glutathione) 分解醋酸菌 (*A. aceti*) 的動態發展過程⁽⁹⁾。如圖 24 所示，此研究藉由 K-kit 清楚觀察到穀胱甘肽分解醋酸菌的四大階段，包括附著與內部化、早期破壞、顯著破壞、及完全破壞之完整變化影像，展現了 K-kit 在微生物動態研究中的應用潛力。

在 2024 年，研究團隊藉由結合 K-kit 液池晶片應用，成功開發出一套快速電子斷層掃描 (electron tomography) 技術，實現在原位液相環境中對內部含有奈米金粒子的小尺寸膠體組裝體 (small colloidal assemblies) 進行定量三維 (3D) 結構分析之創新方法⁽¹¹⁾。膠體組裝體是由奈米或微米等級的膠體粒子透過自組裝、自聚集或外力操控所形成的有序或非有序結構體。這類結構體具有高度可設計性與多功能性，廣泛應用於例如藥物傳遞及生醫材料、光電與光子晶體、催化和感測器、功能性薄膜與塗層等重要領域。

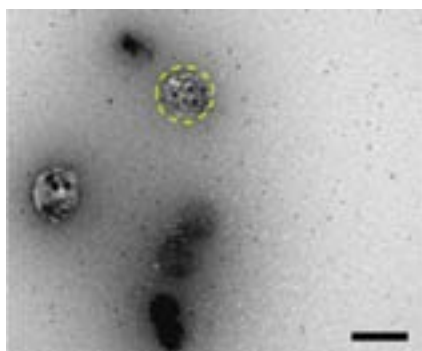
電子斷層掃描技術已廣泛應用於奈米材料的三維結構研究，其特別適用於膠體奈米粒子的組裝體分析。然而，傳統電子顯微鏡觀測必須在高真空條件下進行，導致以濕式膠體化學法製備的樣品，在觀測前需先經過溶劑蒸發與沉積至固態基材等前處理程序，這些步驟往往會改變奈米粒子的原始排列結構。為克服此限制，該研究團隊提出一項創新技術，如圖 25 所示，可在保留樣品液態原位環境之情況下進行電子斷層掃描觀測。該方法利用市售的 K-kit 液態池晶片，搭配快速影像採集流程及專屬的影像對位與三維重建演算法，有效解決



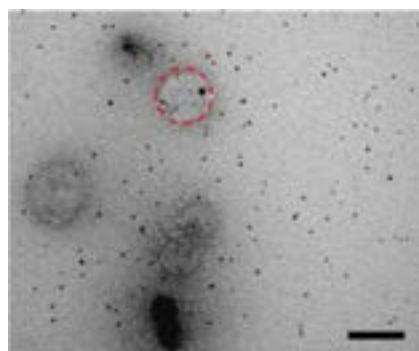
(a) 附著與內部化 (黃色箭頭：GSH-AuNCs 附著於細菌膜上；紅色箭頭：GSH-AuNCs 穿透 *A. aceti* 細菌內部)



(b) 早期破壞 (藍色箭頭：GSH-AuNCs 分佈於細菌膜周圍)



(c) 顯著破壞 (黃色圓圈：細菌出現崩解跡象)



(d) 完全破壞 (紅色圓圈：細菌完全被破壞)

圖 24. 利用 K-kit 觀察穀胱甘肽修飾金奈米簇 (GSH-AuNC) 處理後的 *A. aceti* 細菌完全破壞之過程 (比例尺：2 μm)。本例影像拍攝時間分別為：GSH-AuNCs 與 *A. aceti* 共培養後 (a) 80分鐘、(b) 86分鐘、(c) 96分鐘與 (d) 114分鐘。(圖片來源：⁽⁹⁾)。

了液相條件下斷層觀測所面臨之技術挑戰。此技術同時具備高效率與高解析度的結構解析能力，為膠體奈米粒子組裝體的原位觀測與定量分析開啟了嶄新的技術路徑。

除此之外，近期多項重要的應用研究還包括：使用 K-kit 在 TEM 電子束下誘導成長晶體並重建其三維影像⁽¹²⁾、探討美妝產品中活性奈米粒子的分佈與特性⁽¹³⁾、以及抗癌藥物奈米晶體研究觀察及製備方法開發⁽¹⁴⁾等。這些研究主題內容廣泛且多元，充份展現出 K-kit 在生醫應用領域中的高度潛力。

四、K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的應用限制及技術比較

事實上，K-kit 在液態樣品的電子顯微鏡觀測方面仍存在一定的應用限制。相較於原位液態 TEM 樣品桿方案，K-kit 其內部儲液通道為封閉腔體，因此僅適用於靜態溶液觀測，難以實現流動液體的動態研究分析。此外，由於 K-kit 尚未內建電路、電極或感測元件，也難以進行例如微區加熱觀察、或電化學反應等相關研究。

相較之下，原位液態 TEM 樣品桿具備更強大的功能，能夠通入流動液體，進行液相環境下的動態觀測，例如奈米顆粒成長、電化學反應、生物分子運動等。另外，其組合式液池

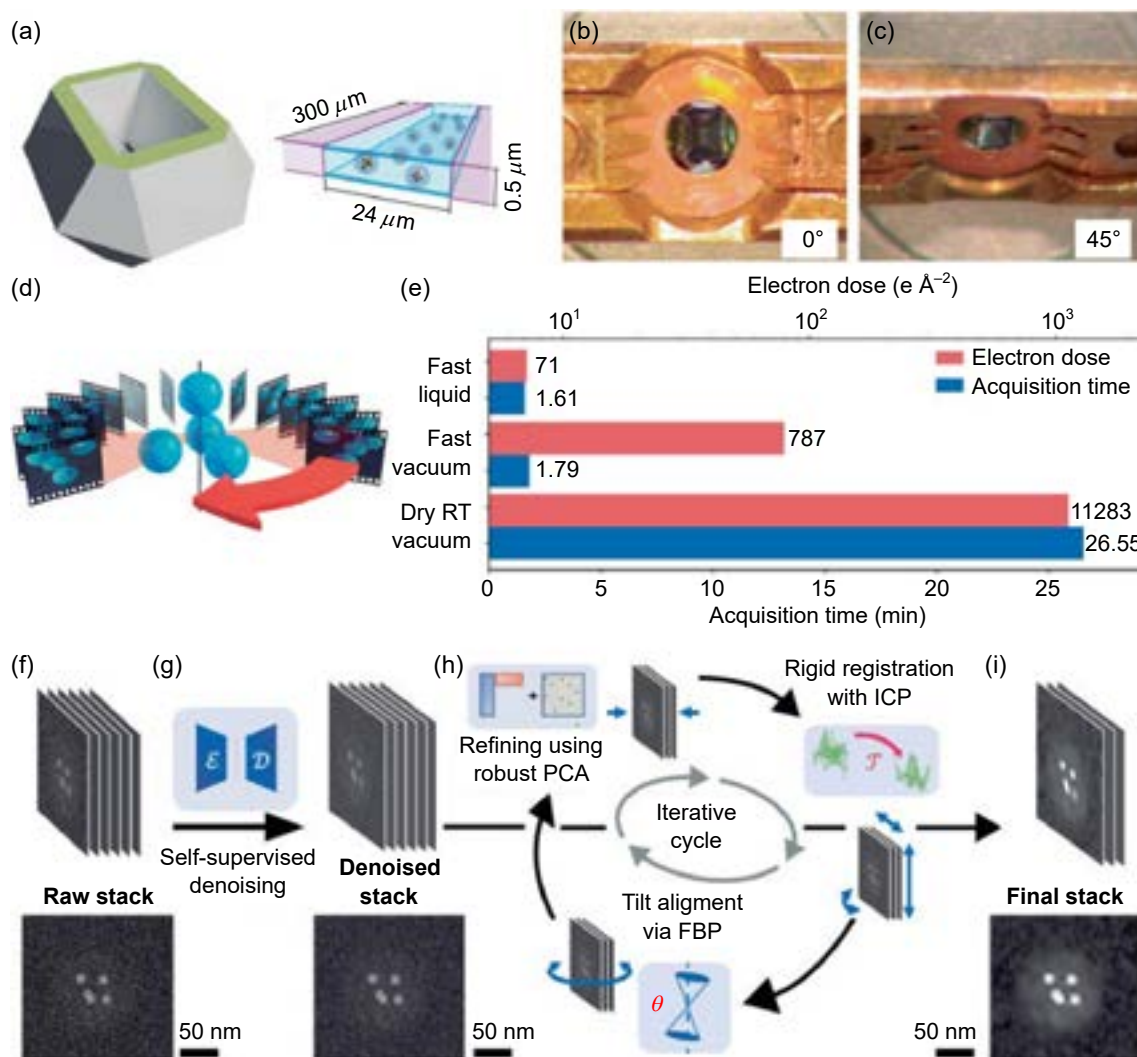


圖 25. 本例之研究利用 K-kit 液態池晶片建立快速電子斷層掃描技術，並在原液環境下對小型膠體組裝體進行定量三維結構分析。(a) 用於實驗研究的 K-Kit 液態池晶片示意圖；(b-c) 裝載在單軸斷層掃描支架上的 K-Kit 晶片外觀，其傾斜視角分別為 0° 與 45°；(d) 液相快速電子斷層掃描的傾斜序列採集方法：持續傾斜樣品，同時記錄樣品的投影影像；(e) 比較在液體與真空中進行快速電子斷層掃描，以及在真空中進行常溫乾式電子斷層掃描所需的時間與電子劑量；(f-i) 快速電子斷層掃描傾斜序列的前處理流程；(g) 使用自監督學習的卷積自編碼器 (CAE) 進行去噪處理的示意圖；(h) 所採取的重建流程概述；(i) 最終處理後的堆疊影像，已完成精煉、對齊與去噪。(圖片來源：⁽¹¹⁾)。

晶片上也多已配置電極設計，可在液體環境中施加電場，研究電池電極材料的充放電過程、電催化反應機制等，並可透過電極進行局部加熱，探討溫度變化對材料溶解、結晶及相變化等影響。因此，原位液態 TEM 樣品桿特別適合應用於較深入的學術研究。

然而，在需要快速獲取分析結果的產業應用、或需處理大量測試樣品的研究場景下，僅依賴原位液態 TEM 樣品桿亦難以全面滿足需求。因此，建議使用者可根據分析目的選擇最適合的技術，或結合 K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的產品技術優勢，相互搭配使用，以建立兼具效率與全面性的液態奈米材料檢測方案。表 4 比較了 K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的技術特點，供使用者參考。

表 4. K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的技術特點比較。

產品技術	K-kit	原位液態 TEM 樣品桿
晶片尺寸	1.7mm x 1.4mm (Fit in with Ø3 mm grids)	> 2.4 mm × 2.4 mm
適用特定設備	否	是
價格	≤ US\$200	~ US\$100,000
優勢	• 簡單、快速、便宜 • 可使用 SEM 觀測 • 可適用各種化學溶液分析 • 無交叉汙染問題 (一次性) • 可量化分析粒子分佈 • 可載入黏性液體 (毛細力) • 可進行負染及多次載入 • 適用溫度 -196 °C to 120 °C	可研究液體流動及電化學現象
缺點	• 僅適合靜態液體的分析 • 無法通電 (無電極設計)	• 價格昂貴 • 需要清潔及組裝 • 有溶液洩漏風險 • 有交叉汙染疑慮 • 不適用黏性液體
客戶群	產業界及學術界	僅適合學術界

五、結論

K-kit 的應用可實現高品質之液態樣品電子顯微鏡影像觀測，無論針對液態樣品在最終產品的實際樣態、或是一般乾燥樣品，皆可直接觀察、分析奈米物體與其群聚團聚現象。K-kit 具有方便使用、檢測快速及適用性高等優勢特點，且能因應分析需求，製備多種不同儲液型態樣品，並可實現包括溼式負染、多次載入、晶格繞射、成份分析等獨特功能，是市場上唯一適合同時應用於具有複雜測試條件的學術研究、及產業相關奈米溶液分析的最佳選擇。此外，K-kit 也可應用 SEM 或 FIB-SEM 來進行樣品分析。目前 K-kit 產品在全世界超過 20 家以上的知名電鏡耗材通路商進行銷售，同時閎康科技也基於此獨家專利技術，對外提供全面性的液態樣品分析服務。

參考文獻

1. Pu, S., Gong, C., & Robertson, A. W., *Royal Society Open Science*, **7** (1), 191204 (2020).
2. Heide, H. G., *Journal of Cell Biology*, **13**, 147 (1962).
3. Lai, S. E., Hong, Y. J., Chen, Y. T., et al., "Direct-Writing of Cu Nano-Patterns with an Electron Beam", *Microsc. Microanal.*, **21**, 1639, (2015).
4. Hong, Y. J., Tai, L. A., Chen, H. J., et al., "Stable Water Layers on Solid Surfaces", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **18**, 5905 (2016).
5. Trang, N., Chang, J., Chen, W. A., et al, *Applied Sciences*, **10** (14), 4946 (2020).
6. Lu, P. J., Fang, S. W., Cheng, W. L., et al., *Journal of Food and Drug Analysis*, **26**, 1192 (2018).
7. Liu, K.L., Wu, C.C., Huang, Y.J., et al., *Lab on a Chip*, **8**, 1915 (2008).
8. Tai, L.A., Kang, Y. T., Chen, Y. C., et al, *Analytical Chemistry*, **84**, 6312 (2012).
9. Kuo, J. C., Tan, S. H., Hsiao, Y. C., et al., *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **10**, 1, 464 (2022).
10. Kaczmarczyk, O., Augustyniak, D. & Zak, A., *ACS Nano*, **19**, 12710 (2025).

11. Arenas Esteban, D., Wang, D., Kadu, A., et al., *Nature Communications*, **15** (1), (2024).
12. Das P. P., Cookman, J., Pérez, A. G., et al., *Microscopy and Microanalysis*, **28**, S1, 854 (2022).
13. Ilett, M., Naveed, E., Roncal-Herrero, T. et al., *Journal of Nanoparticle Research*, **25**, 122 (2023).
14. Sharma, S. K., Palanikumar, K. L., Pasricha, R., et al., *Pharmaceutics*, **16** (11), 1471 (2024).
15. Kawamoto, H., Wakui, A. & Tamura, K., et al., "Image sharpening by the ES-Corrector for TEM observation of specimen in-liquid," *In proceedings of 13th Asia Pacific Microscopy Congress*, Brisbane, Australia, February 2-7, (2025).
16. "MA-tek K-kit Services." MA-tek Inc., please refer to the website: www.matek.com/services/index/K-kit. Accessed May 8, (2025).
17. "Hummingbird Scientific Homepage." Hummingbird Scientific Inc., please refer to the website: www.hummingbirdscientific.com/. Accessed May 8, (2025).
18. "Protochips Solutions." Protochips Inc., please refer to the website: www.protochips.com/solutions/. Accessed May 8, (2025).

作者簡介

陳弘仁先生為國立成功大學航空太空工程研究所博士，現為閎康科技科技股份有限公司研發中心處長。

Hung-Jen Chen received his Ph.D. in the Institute of Aeronautics and Astronautics from National Cheng Kung University. He is currently serving as the Director of the R&D Center at MA-tek Inc.