

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。

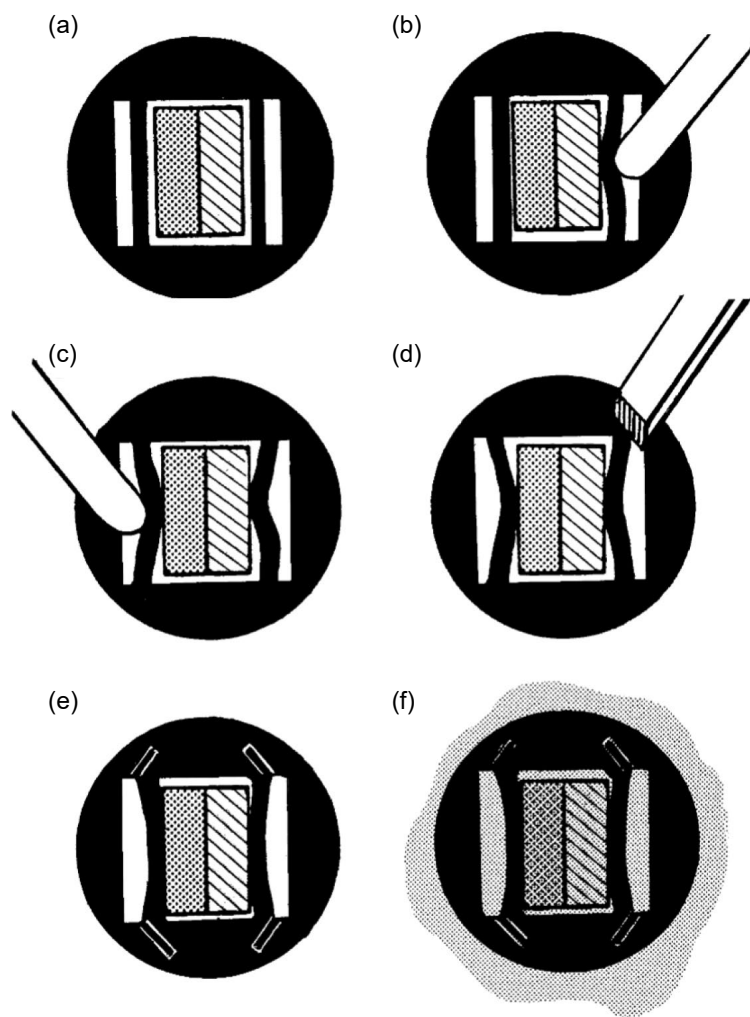


圖 1. 離子研磨製作 TEM 樣品步驟：(a) 大約 $1.5 \times 3 \times 0.5 \times 0.5$ mm 的小材料條邊緣相對、面對面地放置在鈦網格的大矩形孔中。(b) 和 (c) 鈦網格由鑷子支撐，一個小圓形的螺絲刀形工具插入鈦網格中的每個小矩形槽中，並扭動以變形兩槽之間的薄鈦帶。這樣可以通過將兩塊樣品材料壓緊來固定樣品的位置。(d) 和 (e) 一個第二個形狀像鑿刀的小工具在所示位置壓入鈦網格，以增強網格對樣品材料的支撐。(f) 包含樣品材料的網格現在浸入一滴 M-Bond 610 環氧樹脂或等效物中，並將樣品放置在烤箱中以使環氧樹脂固化。⁽⁷⁾

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)，以鎢 (W) 為主要離子材料。鎢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

當高能鎢離子 (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)：部分鎢離子未引發濺射，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鎢離子束 (W^+) 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⁾。

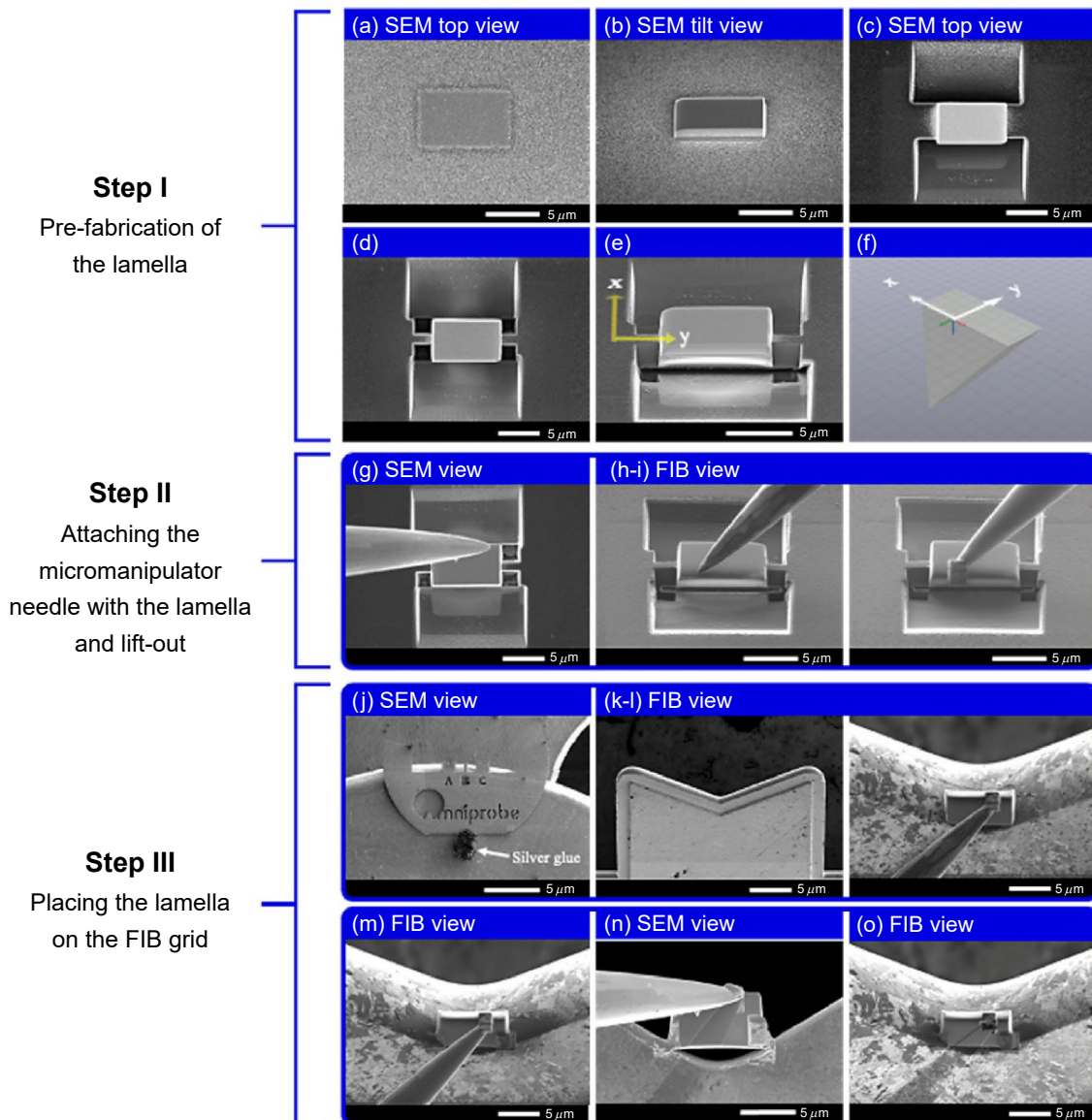


圖 2. FIB 製作 TEM 樣品示意圖。(13)

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。

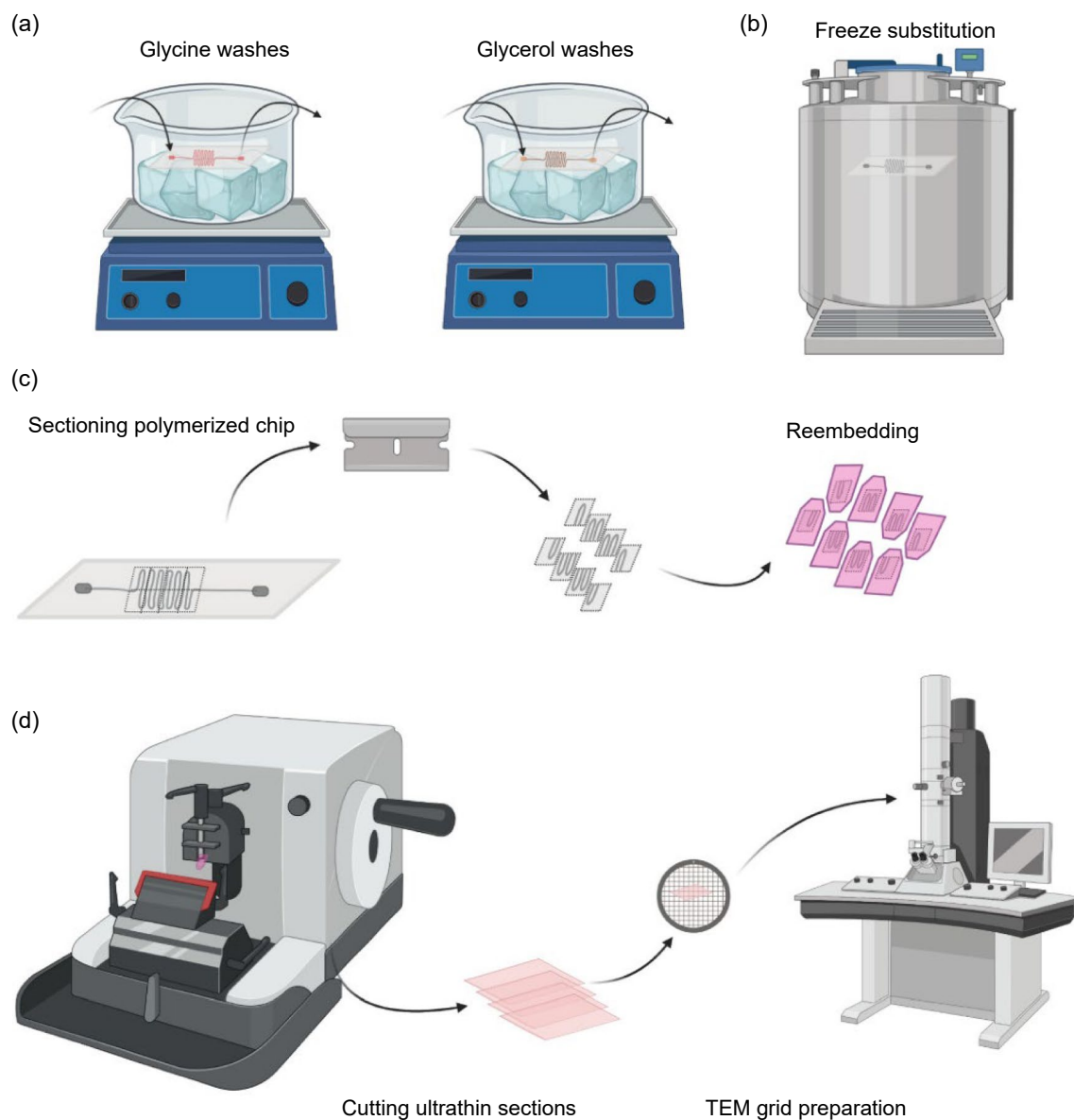


圖 3. 生物樣品製備示意圖。⁽¹⁹⁾

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。

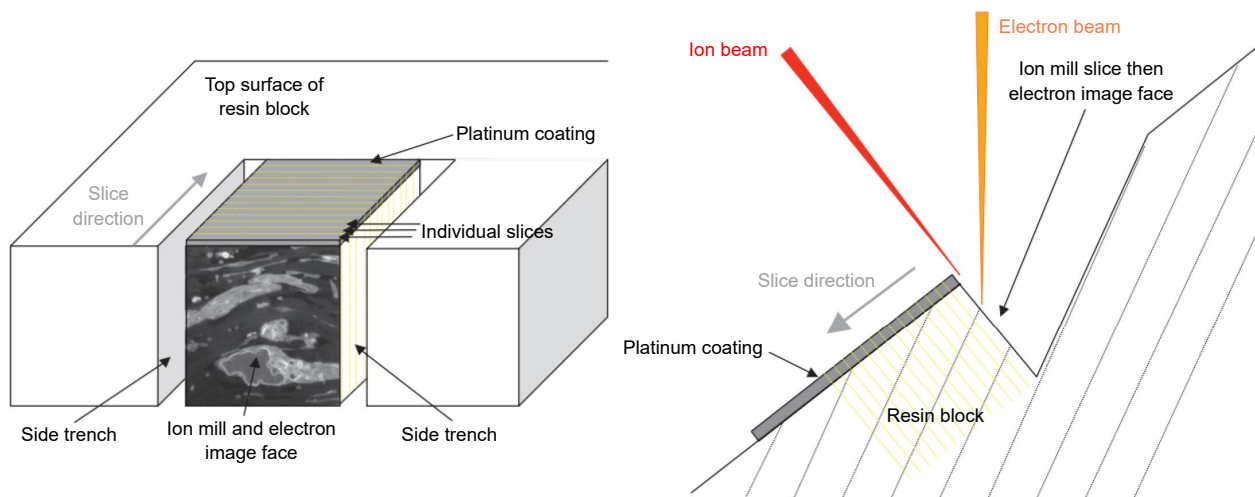


圖 4. 聚焦離子束掃描電子顯微鏡三維結構成像示意圖。⁽²⁸⁾

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.