

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。

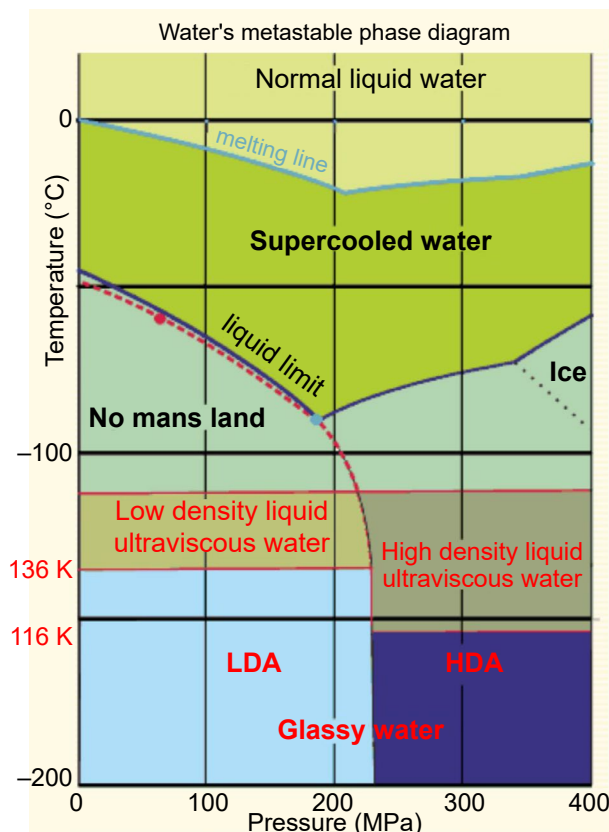


圖 1. 為水的亞穩態相圖 (metastability phase diagram) 呈現了在不同溫度與壓力條件下的複雜相變行為。該圖顯示從常態液態水至超冷水、玻璃態水的轉變區域。「無人可及區」(no mans land) 為實驗難以探測的區域。更下方呈現了兩種不同的相態：「低密度水 (LDL) 與低密度非結晶冰 (LDA) 對應著「高密度水 (HDL) 與高密度非結晶冰 (HDA)。兩者的液態相會存在著臨界點 (藍色點與紅色點)，而兩相態的交界面沿著臨界點延伸，即為威登線 (widom line)，以紅色虛線表示之。LDA 的玻璃轉化溫度 (T_g) 約為 136 K (-137°C)，而 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⁾。

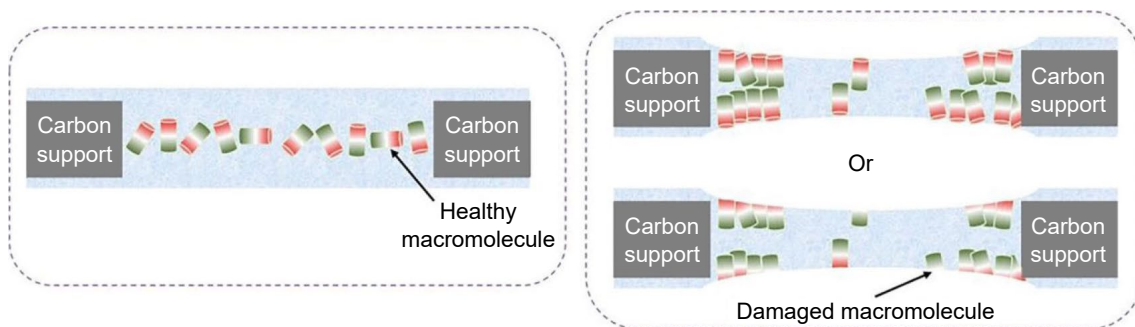


圖 2. 為生物巨分子(如蛋白質)在薄冰層中的理想與實際狀況比較示意圖。左側為理想狀態下，健康的巨分子均勻分佈於冰層中央平面，維持原生構形。右側顯示實際上，生物巨分子往往會被吸附至空氣－水介面(AWI)，因而導致兩種不良結果：(1) 巨分子傾向於聚集在冰層表面，產生優選取向問題(右上)；(2) 因 AWI 環境而變性，失去原生結構特徵(右下)。此情形常使冷凍電子顯微鏡樣品品質降低，進而影響後續高解析度結構分析。圖片與圖說引用自文獻⁽⁷⁹⁾。

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⁾。

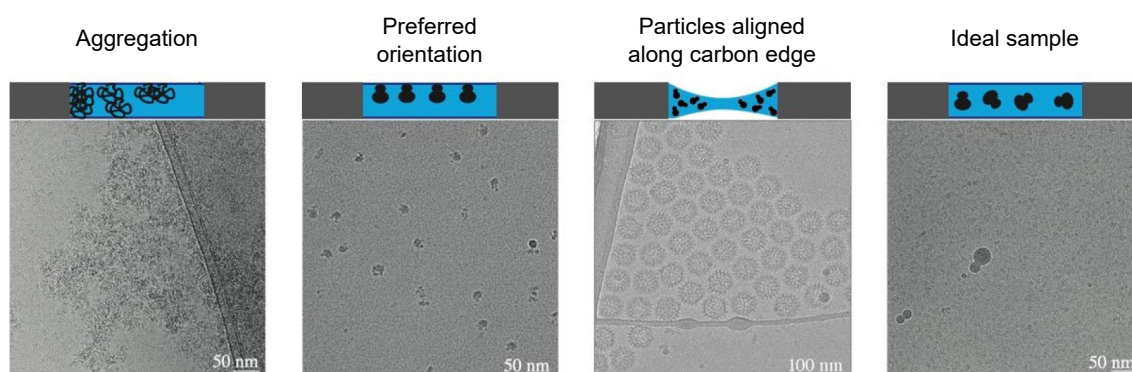


圖 3. 為顆粒分佈較差的例子，顯示「聚集」、發生在空氣－水介面 (AWI) 的「優先方向性」、以及顆粒沿著碳膜邊緣散佈等狀況示意圖及實際照片。圖片與圖說引用自：https://myscope.training/CRYO_Optimisation_of_orientation_and_distribution。

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。

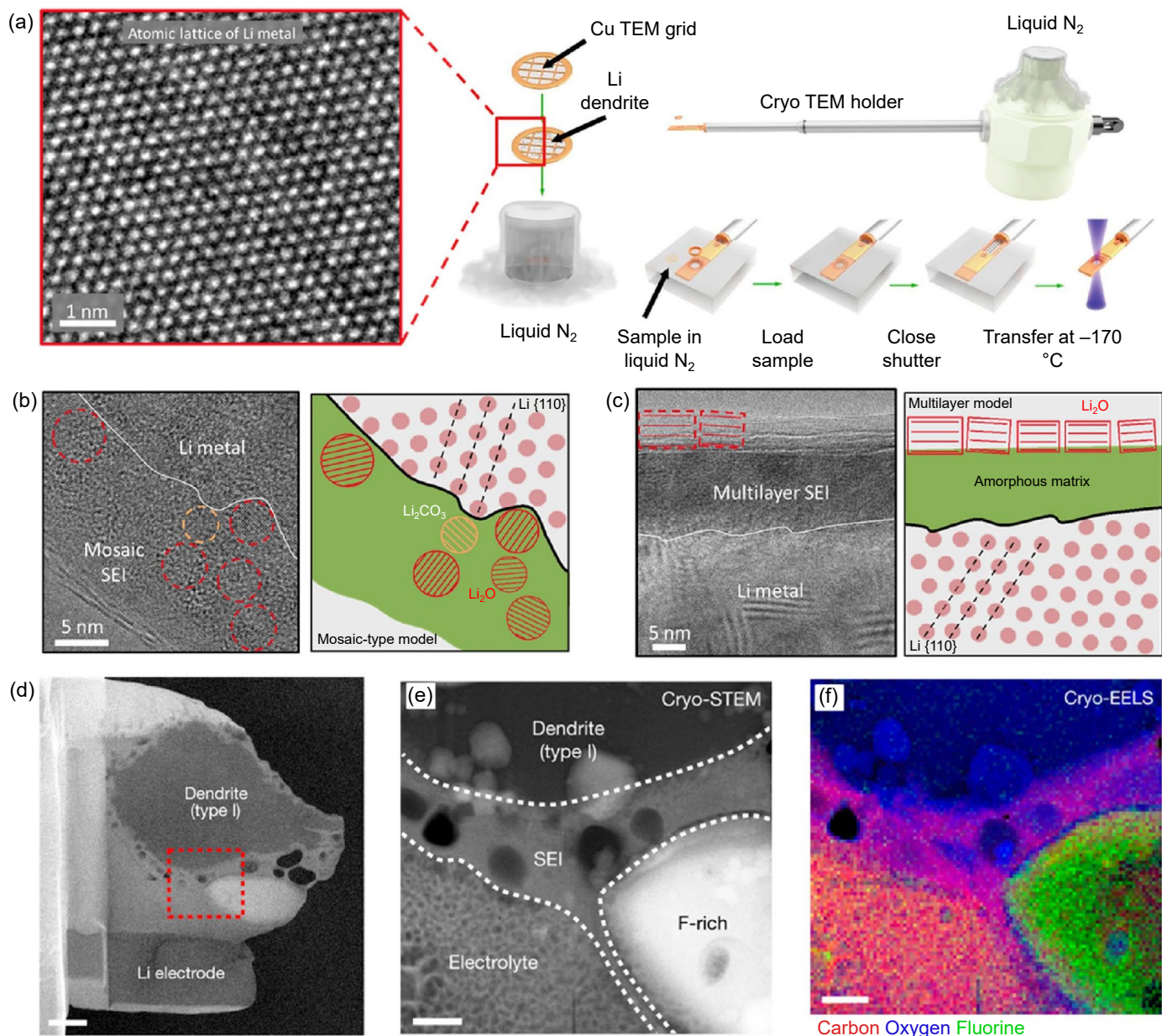


圖 4. 為電池材料在冷凍電子顯微鏡下的影像分析。(a) 為鋰金屬的原子解析度冷凍電子顯微鏡圖像，與樣品低溫轉移過程的示意圖。(b,c) 為在不同電解質化學環境中觀察到的 (b) 馬賽克狀固體電解質界面 (SEI) 納米結構，和 (c) 多層固體電解質界面納米結構的低溫電子顯微鏡圖像。(d) 經冷凍聚焦離子束 (cryo-FIB) 剝離 (lift-out) 後的薄片 (lamellae)。(e) 電池內部固-液界面的冷凍掃描穿透式電子顯微鏡 (STEM) 圖像。(f) 電子能量損失譜學 (EELS) 元素映射顯示界面處的碳、氧和氟成分圖片與圖說引用自 ACS Nano 2020, 14, 9263-927653。

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 ($< 1\text{ nm}$) 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 $3-10\text{ nm}$ ，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 $50-100\text{ nm}$ 薄膜，進而實現液體與樣品的均勻分佈⁽³⁵⁾ 如圖 5。

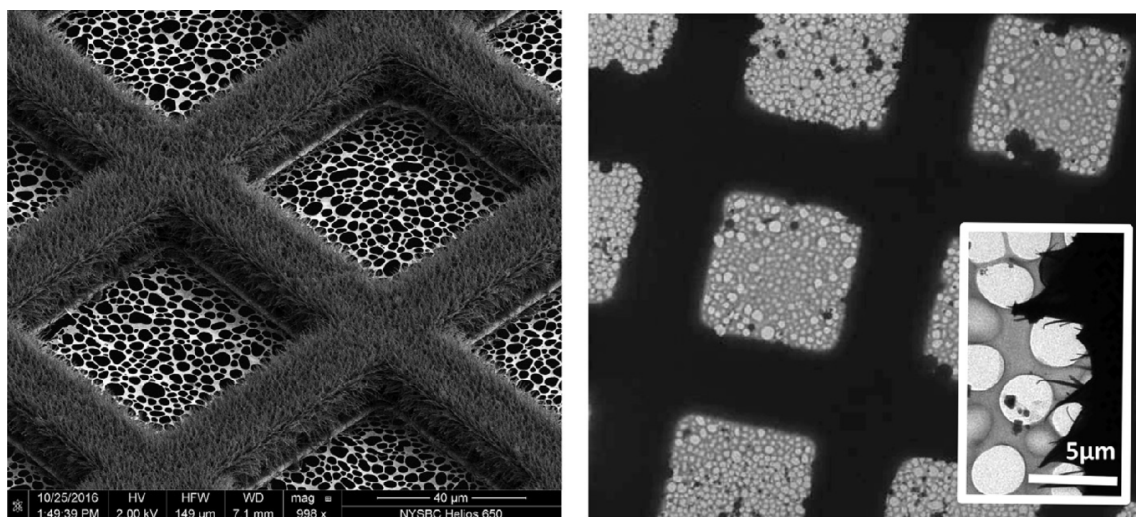


圖 5. 為「奈米線」網格的電子顯微鏡照片。左側為奈米線附著於 Cu/Rh 網格 Rh 面的蓄絲膜金網格 SEM 影像；右側使用碳基底奈米線網格玻璃化樣品的穿透式電子顯微鏡 (TEM) 影像，可見奈米線突出延伸至網格方格邊緣。此種奈米線修飾的網格結構可顯著改善冷凍電子顯微鏡樣品製備過程中的液體控制與均勻分佈。圖片與圖說引用自文獻⁽⁸⁰⁾。

「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。

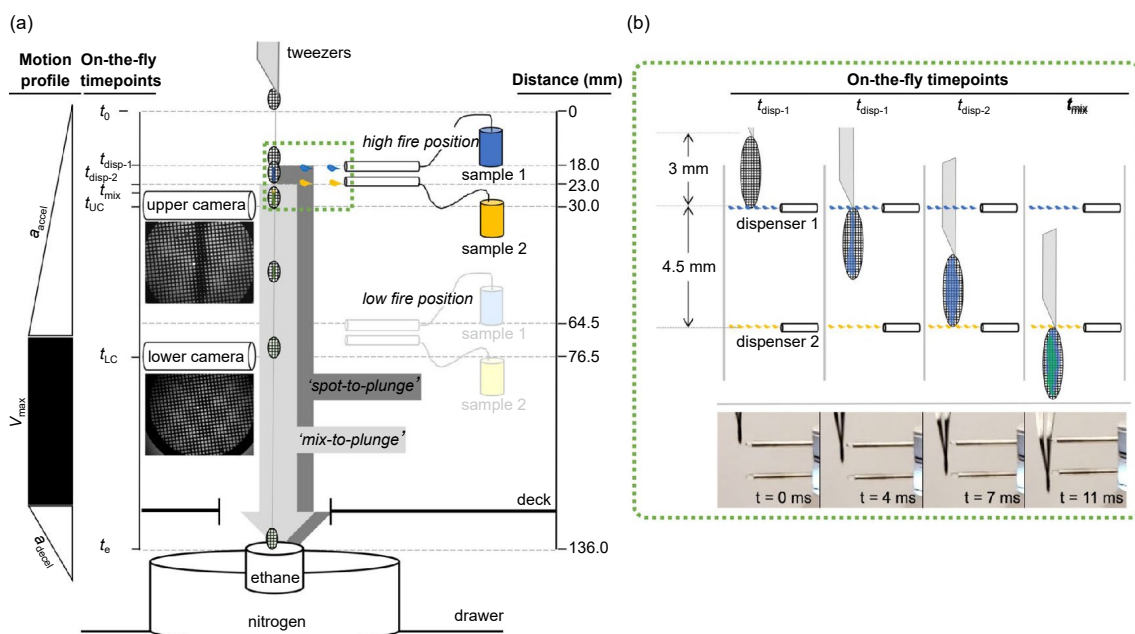


圖 6. 為 Spotiton 快速冷凍系統的運作機制示意圖。(a) 呈現樣品噴射與混合過程中的兩個關鍵參數：固定距離與可變時間點。鑷子夾著網格自上而下移動，兩組樣品 (藍色樣品 1 與黃色樣品 2) 於噴射器位置分別加入，並透過上、下攝影機即時監測過程，透過精確控制加速度 (a_{accel})、減速度 (a_{decel}) 及最大速度 (v_{max}) 達成「點一至一冷凍」(spot-to-plunge) 的時間控制。(b) 放大顯示不同時間點 ($t = 0 - 11 \text{ ms}$) 的載網與噴射過程，下方為高速攝影捕捉的實時影像。此技術可實現毫秒級的「樣品混合冷凍反應」(mix-to-plunge)，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

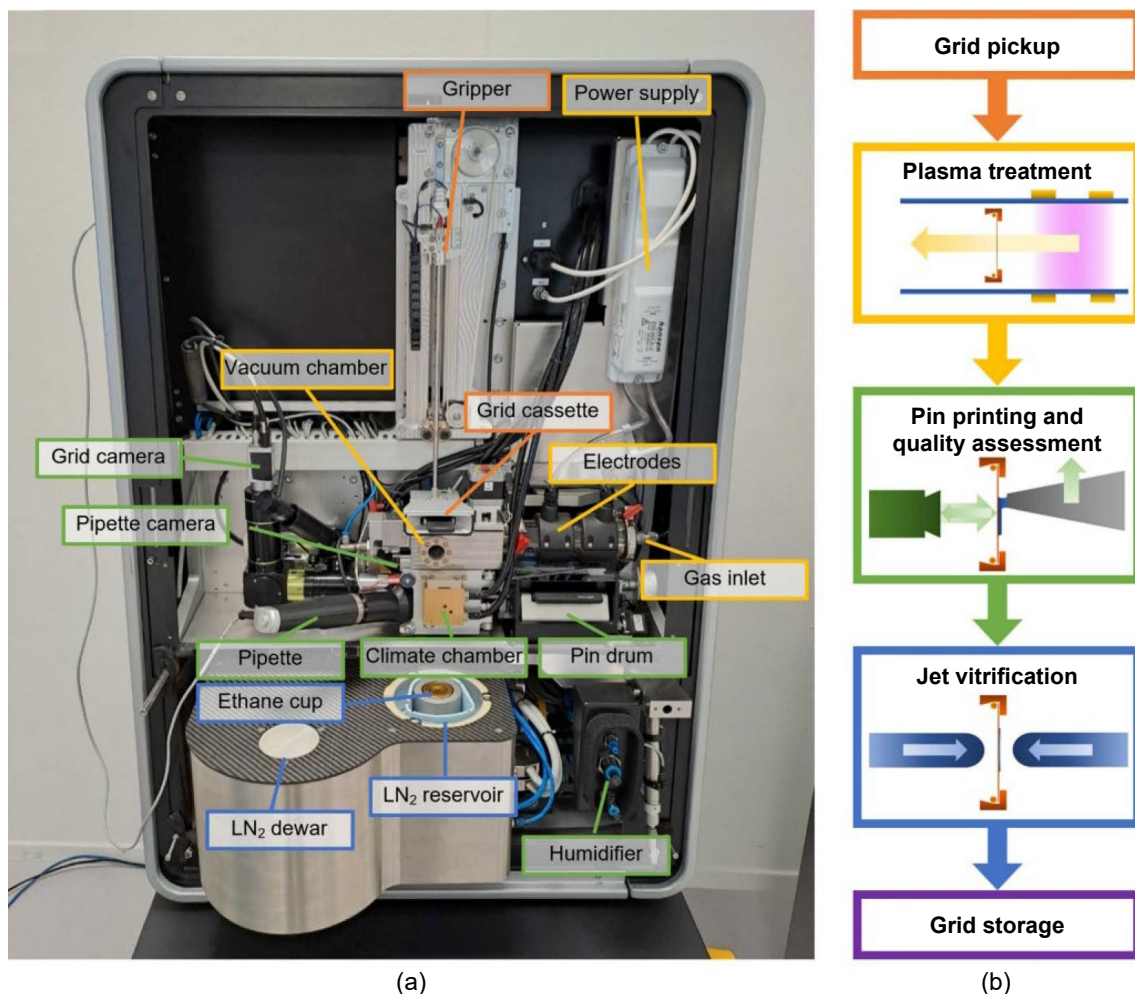


圖 7. 為 VitroJet 系統的介紹：右側顯示其配置與工作流程。左側為內部結構圖，揭示各功能單元：真空室、電極、氣體入口、氣候室、液氮槽等精密組件。右方：工作流程示意：網格取出 → 電漿處理 (增強親水性) → 針印技術 (精確樣品噴樣) → 噴射式冷凍 (雙向噴射，提高冷凍效率) → 自動化載網儲存。此系統克服傳統冷凍電子顯微鏡樣品製備中濾紙吸液步驟引起的空氣－水介面問題，實現高再現性、低樣品消耗的先進冷凍試片製備技術。圖片與圖說引用自文獻⁽⁸²⁾。

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。

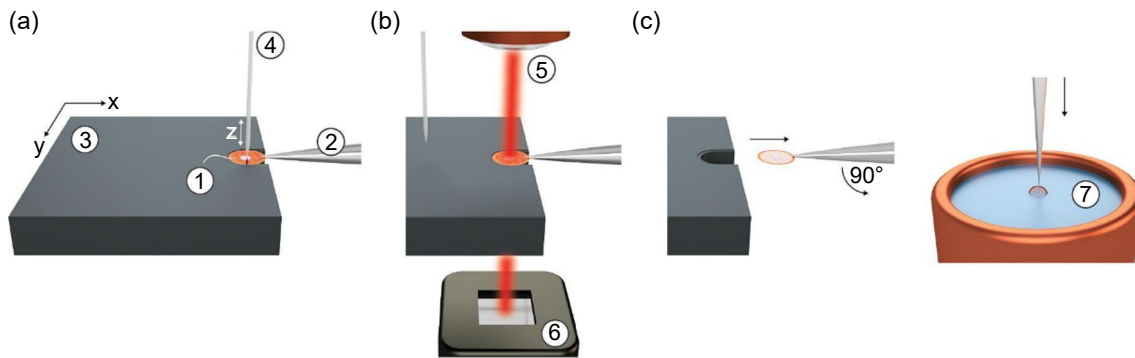


圖 8. 為 CryoWriter 裝置的操作流程示意圖。(a) 多孔碳膜電子顯微鏡載網 (1) 固定於鑷子 (2) 上，置於溫控槽 (3) 中。微量毛細管 (4) 在 xy 軸電動控制下降至網格上方數微米處，以蜿蜒形式滴樣納升 (nanoliter) 級樣品。(b) 滴樣後，毛細管撤回，載台移動使載網定位於雷射 (5) 與偵測器 (6) 間，監測水分蒸發程度。(c) 當訊號達設定的閾值，則啟動冷凍過程：鑷子迅速抽回，旋轉 90 度至垂直位置，將載網浸入冷凍劑中⁽⁷⁾，整個過程僅需數百毫秒，進而實現精確控制冰層厚度的非吸式冷凍電子顯微鏡樣品製備。圖片與圖說引用自文獻⁽⁶⁴⁾。

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。

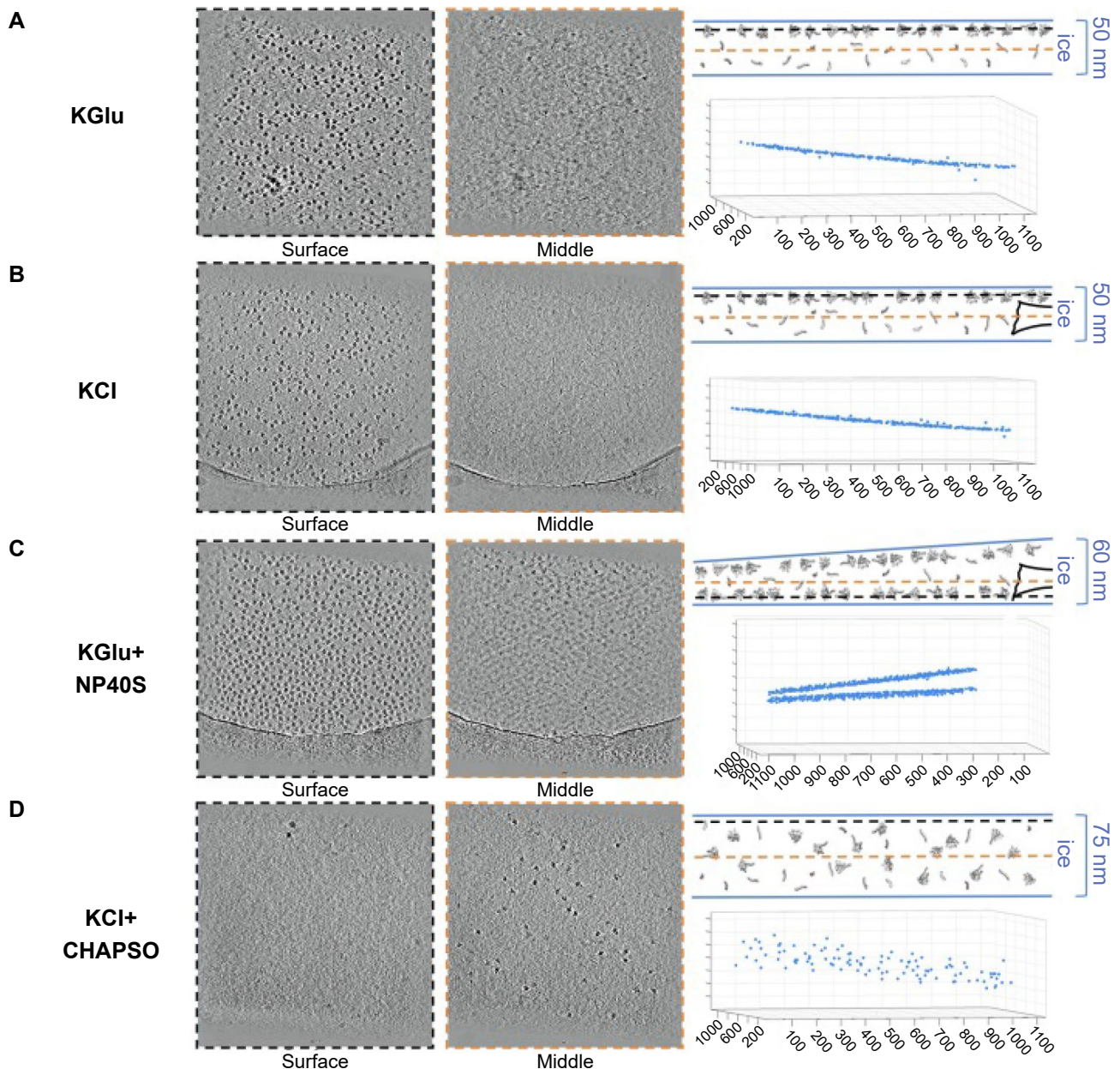


圖 9. 為 6S RNA 與細菌 RNA 聚合 $\sigma 70$ 複合體在不同緩衝液條件下製成冷凍電顯樣品，經過冷凍電子斷層掃描 (cryo-ET) 技術判定顆粒的分布圖。左側顯示「玻璃態冰層的表面橫截面」；中間代表「玻璃態冰層的中段橫截面」；右上顯示顆粒在玻璃態冰中分佈的示意圖，冰層的上下表面以實心藍線顯示。圖示右側的括號為冰層厚度。圖中的灰色顆粒顯示 6S- $E\sigma 70$ 複合體及游離的 6S RNA；右下為「顆粒在玻璃態冰層中的空間分佈圖」：垂直於冰表面的方向。每個 6S- $E\sigma 70$ 顆粒根據其在冰層中的三維位置，以藍色點表示。A、B 顯示在 KGlucose 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 KGlucose 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.