國立臺灣大學電機資訊學院生醫電子與資訊學研究所 博士論文

Graduate Institute of Biomedical Electronics and Bioinformatics College of Electrical Engineering and Computer Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

聚焦離子束運用於生物醫學研究

Applications of Focused Ion Beam in Biomedical Research

林伯剛

Po-Kang Lin

指導教授:管傑雄 博士

Advisor: Chieh-Hsiung Guan, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022

doi:10.6342/NTU202203997

國立臺灣大學博士學位論文 口試委員會審定書



聚焦離子束運用於生物醫學研究 Application of Focused Ion Beam in Biomedical Research

本論文係林伯剛君(學號 D98945011)在國立臺灣大學生醫 電子與資訊學研究所完成之博士學位論文,於民國 111 年 8 月 23 日承下列考試委員審查通過及口試及格,特此證明

捷 件 海

口試委員:

.00



i

致廷 長: 所

序言或謝辭



有太多的人需要感謝。首先當然是感謝我的指導教授管傑雄教授。管教授提 供指導了我這麼有趣的研究題目,也提供了昂貴的設備,與大筆的研究經費,使 我們能夠長期的從事研究。能從頭開始,一步一步建立整個系統,也開始找到臨 床上實際的應用。如果這樣的方法,未來能在生物醫學上發揮重大的功效,這都 要歸功於管老師的高瞻遠矚。其次非常感謝我的研究夥伴,隋孟君博士。他與我 花了許多時間,一步一步的從標本整理到上機切片。這是一個非常耗時耗力的工 作,我必須特別的感謝他。還要感謝師大的藍彥文教授,教導我們石墨烯薄膜的 製備開發。我也要感謝與我一路走來的台大同學們。包括早期的陳建丞碩士,陳 宏銘博士,梁伯維博士,與陳冠斌博士等。要感謝的人實在太多了。同時更加感 激台大生醫電子所,匯集了優秀的教授群,以及提供了精密先進的設備,我們才 能戮力研究。更希望將來有朝一日,此研究的成果對人類有實際的貢獻。

中文摘要



聚焦離子束 (focused ion beam, FIB) 是半導體界和材料科學界的重要強大工具。積體電路常常需要觀察修補金氧半導體元件,以及連接線路的組成與配置。 而具備適當能量的聚焦離子束,能切割和銑削積體電路,同時能以機器內建之掃 描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) 觀察超微結構。

而 FIB 可以使用在生物與醫學的範疇嗎?這是一個新興的研究發展項目,相 關的研究仍然不多。生物材料的配置,前處理,與切削的參數,都仍然是必須開 發的研究項目。使用傳統的透射電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM),生物組織必須先經過固定,脫水,染色,塑膠包埋 (plastic embedding), 切片等一系列複雜的流程。常常必須先做粗切片,先於光學顯微鏡下觀察,再開 始做超細微切片,繼而上機尋找想看的關鍵處。但若上機後看不到想看的關鍵 處,就必須重復粗切與細切的過程,再重新上機觀察。整個步驟非常的繁瑣耗 時。

而 FIB/SEM 可以做原位特定點 (in-situ site-specific) 切片並直接觀察。亦即 FIB 可以在 SEM 下,直接找尋關鍵特徵,進行切削,切削後也可以直接觀察切削 的表面。所以可以大幅減低傳統 TEM 必需消耗的時間與人力。FIB/SEM 也適合 做序列切片,而重建三維空間的影像。FIB/SEM 也可製備用於 TEM 分析的薄片 剝離技術 (lift-out)。

本研究聚焦於發展簡單而有效的實際方法,以運用 FIB/SEM 切削並觀察生物 醫學標本。本研究一開始的時候只採用冰凍法,直接處理標本。極為耗時耗力耗

iii

財,並不是很實用的方法。而且實際冰凍 FIB 切片結果,影像解析度並不佳。我們便開始思考是否有其他較具實用性的切片方法。

我們於是從三個方向著手:第一個方向,是標本的處理。第二個方向,是標 本載台的選擇與製備。第三個方向,是切削方法與參數的嘗試。而本研究實際時 用的研究標本,包括酵母菌,新鮮植物葉片的葉綠體,人類網膜色素上皮細胞胞 株,人類白內障水晶體的前囊,人類的紅血球與白血球細胞,與電子顯微鏡量子 點免疫染色等。

標本處理方向,我們研究了液態氮或戊二醛樣品固定、四氧化鋨後固定和硫 代碳酰肼增強的各種不同組合與順序。標本載台選擇製備方向,研發包括金屬和 半導體的各種不同基板。我們進行光蝕刻,在半導體板上產生圖案,以提高圖像 分辨率。我們研究了不同類型的半導體基板,例如 N、N+、P、P+、GaN、 GaN+ 等。更進一步轉印石墨烯薄膜在各種相應的半導體板基上。切削方法參數 方向,我們嘗試運用不同的切削角度與照相角度,以及各種電壓電流切削標本。

結果我們發現,傳統 TEM 必須先使用環氧樹脂,做細胞組織樣本包埋才能 切片,而在我們的系統上可以避免。傳統 TEM 必須使用鑽石刀,切片環氧樹脂 包埋的樣本,也可以避免。因此我們的系統能大幅削減所需的人力物力與時間。 標本的前處理,我們設計的新 T-O-T-O-T 方法,效果勝於傳統 O-T-O-T-O 方法。 切削的標本載台,我們發現有幾種半導體基質的效果較佳,如 N+, GaN+。我們 發現具有轉印石墨烯薄膜的半導體基質,可以減低白點背景雜訊,也可以更加提 高解析度。我們也發現使用低角度切削,效果比傳統的垂直切削更加優越。我們 成功切削了酵母菌,葉綠體,網膜色素上皮細胞胞株,水晶體的前囊,紅血球與 自血球細胞。我們完成了序列切片,也完成電子顯微鏡量子點免疫染色。

iv

與傳統 TEM 相比,我們的 FIB/SEM 系統獲取的圖像,能顯示出相似的分辨 率和對比度。我們從頭開始,一步步建立了可運用於生物醫學領域的 FIB/SEM 方法系統。這樣的系統,可以減輕 TEM 樣品製備與切割的沉重負擔,並實現了 直接可視化下的切削需求,具有運用在臨床生物與醫學上的巨大潛力

關鍵字:生物醫學,聚焦離子束,石墨烯,掃描電子顯微鏡,晶圓

English abstract



The focused ion beam (FIB) is an important and powerful tool in the semiconductor and materials science communities. Integrated circuits often require observation and repair of metal oxide semiconductor components, as well as the composition and configuration of connecting lines. A focused ion beam with appropriate energy can cut and mill integrated circuits, and at the same time, it can observe the ultrastructure with the built-in scanning electron microscope (SEM).

Can FIB be used in the field of biology and medicine? This is an emerging research development project, and there are still not many related studies. Biomaterial configuration, pretreatment, and cutting parameters are still the research topics that must be explored. Using traditional transmission electron microscopy (TEM), biological tissues must first undergo a series of complex procedures such as fixation, dehydration, staining, plastic embedding, and sectioning. It is often necessary to do rough sections first, observe under an optical microscope, and then start to do ultra-fine sections, and then go on the machine to find the key points to see. But if you can't see the key points after getting on the machine, you must repeat the process of rough cutting and fine cutting, and then go on the machine again to observe. The whole step is very cumbersome and timeconsuming. FIB/SEM can do in-situ site-specific sectioning and direct observation. That is to say, FIB can directly find key features under SEM, perform cutting, and directly observe the cut surface after cutting. Therefore, the time and manpower that the traditional TEM must consume can be greatly reduced. FIB/SEM is also suitable for serial sectioning and reconstruction of three-dimensional images. FIB/SEM can also prepare a lift-out technique for TEM analysis.

This study focuses on developing simple and effective practical methods to cut and visualize biomedical specimens using FIB/SEM. In the beginning of this study, only the freezing method was used, and the specimens were directly processed. It is extremely time-consuming and labor-intensive, and it is not a very practical method. The actual frozen FIB section results in poor image resolution. We then began to think about whether there are other more practical slicing methods.

So we started from three directions: The first direction is the processing of specimens. The second direction is the selection and preparation of the specimen stage. The third direction is the attempt of cutting methods and parameters. The actual research specimens used in this study include yeast, chloroplasts of fresh plant leaves, human retinal pigment epithelial cell line, human cataract lens anterior capsule, human erythrocytes and leukocytes, and electron microscopy quantum dot immunostaining, etc. . For specimen processing, we investigated various combinations and sequences of liquid nitrogen or glutaraldehyde sample fixation, osmium tetroxide postfixation, and thiocarbazide enhancement. The preparation direction of the specimen stage is selected, and various substrates including metals and semiconductors are developed. We perform photolithography to create patterns on semiconductor plates to increase image resolution. We study different types of semiconductor substrates such as N, N+, P, P+, GaN, GaN+, etc. Further transfer the graphene film on various corresponding semiconductor substrates. In the direction of cutting method parameters, we try to use different cutting angles and camera angles, as well as various voltages and currents to cut specimens.

As a result, we found that traditional TEM must first use epoxy resin to embed cells and tissue samples before sectioning, which can be avoided on our system. Conventional TEM must use a diamond knife, which can also be avoided for slicing epoxy-embedded samples. Therefore, our system can greatly reduce the required manpower, material resources and time. For the pretreatment of specimens, the new T-O-T-O-T method we designed is more effective than the traditional O-T-O-T-O method. For the cut specimen stage, we found that several semiconductor substrates work better, such as N+, GaN+. We found that semiconductor substrates with transferred graphene films can reduce white spot background noise and further improve resolution. We have also found that using a low angle cut is more effective than a traditional vertical cut. We successfully dissected yeast, chloroplasts, retinal pigment epithelium cell lines, the anterior capsule of the lens, and red and white blood cells. We performed serial sections and also performed electron microscopy quantum dot immunostaining.

Compared to conventional TEM, images acquired by our FIB/SEM system show similar resolution and contrast. We started from scratch and built step by step a FIB/SEM method system that can be applied in the biomedical field. Such a system can reduce the heavy burden of TEM sample preparation and cutting, and realize the cutting requirements under direct visualization, which has great potential for application in clinical biology and medicine

Keywords: Biomedicine, focused ion beam, graphene, scanning electron microscope,

wafer

目 錄



口試委員會審	译定書i
序言或謝辭	ii
中文摘要	iii
英文摘要	vi
圖目錄	xii
表目錄	xv
第一章 研究	2背景1
第一節	背景1
第二節	近況4
第三節	本研究的研究目標6
第四節	本研究的研究方向6
第五節	本研究的研究標的7
第二章 材料	4與方法11
第一節	葉綠體標本製備11
第二節	Fixation method12
第三節	Staining method12
第四節	Substrate
第五節	Patterned substrate
第六節	Ga ion milling voltage and current 15
第七節	Milling angle 15
第八節	Wafer graphene ARPE-culture 16
第九節	Quantum dots preparation steps 22

	第十	節	Immunofluorescence with FIB/SEM	23	14 III
第三	章	結果		24	
第四	章	討論		50	42 Mil 44
參考	文獻			. 56	ISPA

圖目錄
Figure 1. FEI Nova 600i Dual beam system
Figure 2. Scheme of dual beam system of FIB/SEM with a 52-deg
apart
Figure 3. Roadmap of FIB for biomedical study
Figure 4. Methods of roadmap of FIB for biomedical study 10
Figure 5. Fabrication of substrate
Figure 6. Various kinds of substrate
Figure 7. Ion beam milling angle of FIB16
Figure 8. A 2-inch wafer on a 3-inch stage, attached with adhesive copper
tapes
Figure 9. Graphene wet transfer printing with PMMA. ~Courtesy of Liang Bo-Wei,
phD
Figure 10. ARPE cross section with FIB milling, with cryo-preparation
only
Figure 11. Cross-section of an yeast, showig nucleus and vacuoles
Figure 12. Chloroplast, OTOTO, stub+Cu, TON?
Figure 13. A dividing choloroplast on Titanium-Oxide-N substrate, milled by
FIB
Figure 14. Chloroplast cross section on different substrate with FIB
milling
Figure 15. Image comparison between 52-deg and 15-deg milling angle of FIB ion
beam

	5101010
Figure 16. Comparison of Ga ion content in the groove base of substrate between 1	5-
deg and 52-degree milling angle of FIB	34
Figure 17. Chloroplast cross section. Taking image picture from different photo	
angle	35
Figure 18. Chloroplast serial milling	36
Figure 19. ARPE-19 on a wafer N+, milled by FIB	37
Figure 20. Cross section image of APRE, milled with FIB	38
Figure 21. Ultrahigh magnification of APRE mitochondria, milled with FIB	39
Figure 22. ARPE cross section milled with FIB, after different staining	
sequences	40
Figure 23. ARPE on differnet wafers with graphene.	41
Figure 24. ARPE on different wafers without graphene.	42
Figure 25. ARPE on P wafers milled with FIB.	43
Figure 26. ARPE on N wafers milled with FIB.	44
Figure 27. ARPE on GaN wafers milled with FIB	45
Figure 28. A basophil of a NARP (neuropathy, ataxia, retinitis pigemntosa) patient,	
milled by FIB.	46
Figure 29. Human lens anterior capsule with lens epithelial cells, milled by	
FIB	47
Figure 30. Confocal image of quantum dot immunostaining to beta-actin of APRE	
cells.	48
Figure 31. ARPE cells with quantum dot-beta actin immunostaining, milled by	
FIB	49
Figure 32. Chloroplast FIB/SEM image vs TEM image	52

Figure 33. Comparison of white dots background noise between graphene and no-		
graphene substrate	· 1	
Figure 34. Yeast images were shown by four different approaches		
Figure 35. Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) versus other		
electron microscopy (EM) approaches in imaging viruses and		
cells		

表目錄	× 12 × 12
表格 1. Different wafers with respective doping and resistivity	A 17
表格 2. Performance comparison among different high-resolution	*** *** *** *** *** ***
microscopy	

第一章 研究背景

第一節 背景



聚焦離子束(focused ion beam, FIB)是半導體界和材料科學的重要工具。積體電 路常常需要觀察修補金氧半導體元件,以及連接線路的組成與配置。而具備適當 能量的聚焦離子束,能切削積體電路,同時能以機器內建之掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy, SEM)觀察。(Figure 1)常用的FIB機器,配備位於側 面之鎵離子束(Ga)以切削半導體,而SEM位於正上方以觀察切面,兩者具有一定 的夾角,離子束和電子束可以聚焦在一個點上。(Figure 2)半導體樣品固定於高度 真空的腔室內,而其所依附之載台可以各方向移動與傾斜。這是個高度精密的儀 器,需要精準的定位,與使用適當的電壓電流,才能得到高解析度的切面影像。 應用包括 FIB/SEM 斷層掃描,即去除表面的一些納米,然後對剩餘的塊面進行成 像,銑削橫截面並獲得內部結構的圖像,或製備薄層以通過透射式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM)成像[1]。機器又配置各種不同的氣體可做 電路的修剪,所以是一個非常強大的工具。FIB 也常使用在半導體的蝕刻,可以直 接在半導體表面刻出細密的溝槽與各種形態,而不需使用光罩。 (Figure 1)



What is 'dual-beam' of a FIB system?



Figure 1. Dual beam of FIB based on FEI Nova 600i Dual beam system. ~Courtesy of Hon-Ming Chen, phD.



Figure 2. Scheme of dual beam system of FIB/SEM with a 52-deg apart. ~adpated from Handbook of FEI Nova 600i

而 FIB,可以使用在生物與醫學的範疇嗎?這是一個新興的研究發展項目,相 關的研究仍然不多 [2]。聚焦離子束和掃描電子顯微鏡與低溫製備/轉移系統相結 合,可以在低溫下研磨樣品。 然而,特別是對於生物樣本,結果的質量很大程度 上取決於樣本表面的正確製備 [3]。生物材料的配置,前處理,與切削的參數,都仍 然是必須開發的研究項目。由於生物組織通常質地柔軟,且富含水份,所以生物材 料樣品的前處理非常關鍵 [4]。使用傳統的 TEM,生物組織必須先經過固定,脫 水,染色,塑膠包埋 (plastic embedding),切片等一系列複雜的流程,才能上機開 始電子顯微鏡的觀察 [5]。切片的步驟非常的精細煩鎖,為了得到一個關鍵特徵的 影像,常常必須先做粗切片,於光學顯微鏡下觀察,先確定大致在關鍵位置附

近,再開始做超細微切片,然後才能上機。但若上機後看不到想看的關鍵特徵, 就必須重複粗切再細切的過程,再重新上機觀察。整個步驟非常的繁瑣耗時。

FIB/SEM 可以做原位特定點 (*in-situ* site-specific) 切片並直接觀察。亦即 FIB 可以在SEM 下,直接找尋關鍵特徵,進行切削,切削後也可以直接觀察切削的表 面 [6]。所以可以大幅減低傳統TEM 必需消耗的時間與人力。FIB/SEM 也適合做 序列切片,而重建三維空間的影像 [7,8]。FIB/SEM 也可製備用於TEM 分析的薄 片剝離技術 (lift-out)。

然而 這樣的嘗試,不可避免的會面臨一些問題:

- 第一,生物樣品可以被聚焦離子束切削嗎?
- 第二,掃描式電子顯微鏡,看得清楚切削面嗎?
- 第三,切削的深度如何?

第四·有可能做免疫電子顯微鏡觀測嗎?

第二節 近況

我們將概述 FIB/SEM 的發展,並討論有關樣品製備和成像的一些重點。最近 已開始有 FIB/SEM 應用於生物學之研究。但使用 FIB 系統研究生物和聚合物材料 的經驗仍相對不多,關於該主題的出版物也相對較少。Lewis 等人(1968) 在使用 氫、氫、氧和水蒸氣進行離子蝕刻後,以 SEM 研究了人體血細胞 [9]。這種可能 是 FIB 相關生物學研究的第一份報告。Yonehara 等人(1989) 研究了小鼠小腸細胞 的微絨毛之氫離子束蝕刻,通過蝕刻微絨毛的縱向側,研究了標本之形貌特徵 [10]。Ishitani 等人(1995) 使用人類頭髮與家蠅的眼睛,研究了用於生物樣本的聚 焦離子束銑削(milling)技術 [11]。FIB 可用於研究細胞,這在酵母菌細胞得到證實, 於不需進一步樣品製備的情況下,研究了酵母細胞的 3D 結構、形貌與內部構造 [12]. Hing (2005) 報告 FIB 可用作生物樣品的微加工工具,允許在任意所需位置, 對單個細胞進行切片,而一些樣品如花粉並不需要脫水程序 [2]。Drobne (2005) 試 驗切片消化道的腺細胞,則報告在目前的技術狀態下,FIB/SEM 系統成像的超微 結構元素,無法通過與 TEM 圖像的比較直接識別 [13]。可見直到 2005,技術的 發展仍然非常原始不成熟。Marko (2006)報告以 FIB 研磨玻璃體成功,亦即 FIB

可作為以冷凍超薄切片法處理生物樣品的替代方法 [14]。Stokes (2006) 報告通過 選擇,可以按順序進行橫截面,以特定間隔創建一系列切片。然後可以使用 3D 重 建軟體,對 2D 切片中的信息進行體積渲染,使我們能夠立即看到微結構組件之 間的 3D 空間關係 [15]。Hing (2007)使用 FIB 成功的切削了酵母菌以及SARS 病 毒,酵母菌的橫切面已經可以開始看到各種結構,也可看到病毒的橫切面,雖然 細節尚不清楚 [16]。Hekking (2009) 則以 FIB 探索大體積動脈粥腫樣硬化,證明 FIB 可切削組織加以觀察 [17]。FIB 也逐漸有臨床應用研究。Liu (2014) 使用 FIB 評估抗生素對單個細菌細胞的奈米尺度作用 [18]。

FIB/SEM 應用於生物學,主要在於以 FIB 進行橫截面樣品製備。FIB 之半導體 製樣,具有橫截斷面定位精度高、斷面均勻、輻射損傷小、可束流加熱等優點 [19]。 而對生物組織進行 FIB 操作,Drobne 和 Tatti 等報告說,FIB 會影響離子束光柵化 的樣品區域。FIB 引起的表面主要工件是熔化樣效應、出汗樣效應、形態變形和鎵 (Ga(+)) 植入。通過在暴露於光束的表面上應用保護性鉑條,和選擇合適的操作方 式,可以減少由入射 Ga(+) 離子引起的 FIB 誘導的表面偽影 [20]。他們還報導了 FIB/SEM 和 TEM 獲得的消化腺層狀體影像,具有可比性和互補性,顯示出多層細 胞內結構的超微結構之相同複雜性。因此 FIB/SEM 可以顯著促進生物學結構知識 [21]。

Drobne 和Leser 等還測試了生物的 FIB 切削研磨(milling)和 SEM 的不同製備程序。結果發現,為常規SEM(乾燥)製備的 FIB/SEM 樣品,適合展現細胞內形態特徵。當樣品像製備 TEM 切塊一樣,嵌入塑料中,並以背散射電子 (back scattered electron, BSE) 成像時,可以 FIB/SEM 分辨出細胞器 (organelle)。當樣品用 O-T-O-T-O 方法 (Osmium tetroxide, thiocarbohydrazide)進行醛固定和導電染色 (conductive staining)時,影像對比度方面可獲得最佳結果 [22]。

Drobne 進一步報告,用於 FIB/SEM 研究的樣品可以嵌入塑料基質中,這是製備 TEM 樣品的傳統方法,也可以像為SEM 成像準備的樣品一樣簡單乾燥。 FIB/SEM 具備可觀測任何選定區域的表面特徵,與納米尺度的細胞內結構細節,

以及可探討其間的聯繫的能力,是在生命科學中的一個有吸引力的應用,值得進 一步探索 [6,23]。

第三節 本研究的研究目標

研究發展簡單有效的實際方法,以運用 FIB/SEM 切削並觀察生物醫學標本。

第四節 本研究的研究方向

本研究一開始的時候只採用冰凍法,直接處理標本 [24]。FIB 的機器,可以 在真空腔室內裝載標本冷凍載台,載台可連接液態氮管路以維持標本於持續冷凍 狀態。所以我們可以直接冷凍生物標本,在冷凍載台上切削。標本必須先在機器 外,以冷凍冰沙的方式(high pressure freezing, HPF)冷凍到-190C,再以一根長桿送 入機器的真空腔室內。此方法必須使用大量的液態氮,耗費不貲。冷凍冰沙的製 作與標本的冷凍,都極為耗時。以長桿將標本送入腔室內並連接冷凍載台,也需 要極高的熟練技術。而且真空腔室必須達到極高度的真空,通常在使用前必須連 續抽真空 3 天,才有辦法達到所需要的工作真空度。綜而論之,直接冷凍切片的 方法,極為耗時耗力耗財,並不是很實用的方法。而且實際切片結果,影像解析 度並不佳。因此在初步完成了一些直接冷凍切片之後,我們便開始思考是否有其 他較具實用性的切片方法 [25]。

臨界點乾燥 (critical point drying, CPD):

這是SEM的標準做法。然而使用在我們的系統,標本表面會隨著細胞的超微 結構,形成各種腔室,與我們要觀測的切面細微構造並不相符。

我們從三個方向著手:

第一個方向,是標本的處理。

標本的處理,我們直接使用類似傳統TEM的標本處理方法。標本先經戊雙醛 (glutaraldehyde)固定,再經過O-T-O-T-O (Osmium tetroxide, thiocarbohydrazide)的 傳導染色(conductive staining)處理流程。戊雙醛用作固定劑,可有效交聯蛋白質和

維持細胞微結構,但滲透組織相對較慢。而甲醛由於其低分子量而迅速滲透組織,但 維持細胞微結構較差,故不使用。四氧化鐵用於後固定,既可用作固定劑,又可 用作電子染料。它可以保留許多脂質並穩定一些蛋白質,將它們變成透明凝膠,而不 破壞它們的許多結構特徵。O-T-O-T-O 傳導染色法使用T 作為配體(ligand)。它是 雙齒性的結合四氧化鋨(O)分子以產生 T-O-T。通過這種方式,鋨對不飽和脂質的 天然親和力得到增強或增強。這種鋨沉積增加,所賦予組織的導電性,減少了 SEM 過程中的標本充電(charging)。而我們並沒有經過酒精序列脱水,也沒有經過 塑膠包埋的過程。標本需再經過抽真空乾燥,或自然乾燥,再把標本放置於載台 上,便可以直接切片。

第二個方向,是標本載台的選擇與製備。

載台的選擇用了許多可能的方法,包括導電膠,鋁片,導電玻璃(ITO),濺鍍 各種金屬薄膜,以及半導體晶圓片。我們首先在半導體晶圓片上做出各種溝槽的蝕 刻與加工,製造出一系列具有特定圖案(pattern)半導體晶片。我們也使用小片及完 整的半導體晶圓片。為改善導電度,我們使用了數種不同的晶圓作為載台基質 (substrate)。更進一步使用石墨烯薄膜,轉移貼附於各種晶圓表面,測試其表現 [26]。

第三個方向,是切削方法與參數的嘗試。

我們嘗試了各種不同的電壓電流配對,驅動Ga^{3+ ions做切削。我們發現不同的標本載台角度,會導致 各式各樣的解析度與切面構度。切削後的SEM的成像,不同的參數下也會有不同的結果。常規 SEM 發射的信號主要取決於表面形貌和表面元素的原子序 數。形貌對比度與樣品發射的二次電子(secondary electron, SE)的強度成正比。對於嵌入塑膠包埋中的樣品(plastic embedding),使用背散射電子探測器 (back scattered electron, BSE) 生成表面圖像,BSE 信號的強度很大程度上取決於樣品的原子序數,所以塑膠包埋樣品必須用重金屬染色。總而言之,這 是一個相當複雜的操作系統,牽涉到各種參數的組合,我們便一個一個賞試。}

第五節 本研究的研究標的

<酵母菌>

酵母菌為單細胞生物,也具有細胞壁,標本相對容易取得。我們的研究標的,從酵母菌開始。(Figure 3)

<植物細胞>

植物細胞有細胞壁,細胞較為堅固,標本的固定染色切片,相對較為簡單。 我們使用新鮮植物葉片的葉綠體,作為研究標的。

<動物細胞>

動物細胞沒有細胞壁,固定染色切片較為困難。我們使用人類視網膜色素上 皮細胞株(ARPE),作為研究標的。

<組織切片>

組織切片較為困難。組織有一定的厚度,FIB 切片深度不得而知,組織片的導 電度可能不足,都會影響到組織切片的結果。我們使用人類白內障水晶體的前囊 作為研究標的。

<血球細胞>

因為它是單細胞,是很好的研究標的。我們使用人類的紅血球與白血球作為研究標的。

<免疫染色>

電子顯微鏡免疫染色切片,是否也可以在此系統作用?是我們的一個研究方向。我們使用細胞免疫荧光染色,與量子點(quantum dot),或免疫奈米金顆粒作為研究標的。(Figure 4)



(Figure 3)



Figure 3. Roadmap of FIB for biomedical study



Figure 4. Methods of roadmap of FIB for biomedical study

第二章 材料與方法

第一節 葉綠體標本製備

葉綠體取自新鮮菠菜,剪碎研磨,紗布過瀘,離心 2000 轉,取沈積物得之

- 葉綠體以 4% glutaraldehyde solution with sucrose-phosphate buffer prefix for
 O/N.,期間置於 4℃ shaker 上搖晃。
- 2. 離心 2000 轉 15 分鐘,除上清液。
- 以 PBS buffer 50 ml 懸浮, vortex mix, 然後上下翻轉離心管搖晃 50次, 離心
 2000轉 10 分鐘,除上清液。
- 4. 重複step3.四次以上,直到沒有glutaraldehyde味道為止
- 5. 用1% Osmium solution with PBS buffer 懸浮,置於4℃ shaker 上搖晃2 hrs。
- 6. 離心 2000 轉 10 分鐘,除上清液。
- 以 PBS buffer 50 ml 懸浮, vortex mix, 然後上下翻轉離心管搖晃 50 次, 離心
 2000 轉 10 分鐘,除上清液。
- 8. 重複 step7 四次以上,直到上清液澄清,不黑為止。
- 9. 以飽和的 Thiocarbohydrazide 水溶液懸浮,置於shaker 上搖晃 1 hrs。
- 10. 離心 1500轉10分鐘,除上清液。
- 以PBS buffer 50 ml懸浮, vortex mix 然後上下翻轉離心管搖晃50次, 離心1500
 轉 10 分鐘,除上清液。
- 12. 重複step11四次以上,直到上清液澄清不含Thiocarbohydrazide為止。
- 13. 用1% Osmium solution with PBS buffer 懸浮,置於4℃ shaker 上搖晃 O/N。
- 14. 離心 2000 轉 10 分鐘,除上清液。
- 以 PBS buffer 50 ml 懸浮, vortex mix, 然後上下翻轉離心管搖晃 50次, 離心
 2000轉 10 分鐘,除上清液。
- 16. 重複 step15 四次以上,直到上清液澄清,不黑為止。
- 17. 以飽和的 Thiocarbohydrazide 水溶液懸浮,置於shaker 上搖晃1hr。
- 18. 離心 2000 轉 10 分鐘,除上清液。

- 以 PBS buffer 50 ml 懸浮, vortex mix, 然後上下翻轉離心管搖晃 50次, 離心
 2500轉15分鐘,除上清液。
- 20. 重複step19四次以上,直到上清液澄清不含Thiocarbohydrazide為止。
- 21. 用1% Osmium solution with PBS buffer 懸浮,置於4℃ shaker 上搖晃1hr。
- 22. 離心 2500 轉 10 分鐘,除上清液。
- 23. 以PBS buffer 50 ml懸浮, vortex mix 然後上下翻轉離心管搖晃50次, 離心2500
 轉 10 分鐘,除上清液。
- 24. 重複step23 四次以上,直到上清液澄清不會黑黑的為止。最後兩次離心將 PBS buffer 以二次水取代。
- 25. 黑色的沉澱物以少許二次水充分懸浮後,以液態氮快速冷凍葉綠體懸浮液, 置入抽氣罐中以冷凍乾燥機抽乾(視體積而定,約需兩天)。
- 26. 乾燥後的樣本將瓶蓋旋緊,放置4℃冰箱保存。

第二節 Fixation method

- 1. Glutaraldehyde: 2.5%, 4%
- 2. Paraformaldehyde: 1.5%
- 3. Combination (P+G)

第三節 Staining method

- 1. OTOTO (OsO4 and Thiocarbohydrazide)
- 2. Various: OOO, TOOO, OTOO, OOTO, OOOT, etc. With different osmium reaction time and different T reaction time or T concentration.
- 3. Various: TOOOT 、 TOOOTO 、 TTTOOO 、 TOTOTO 、 TOOTO & wash condition
- 4. TOTOO
- 5. Uranyl acetate, lead citrate: OOOU, OOOL, OOOUL, TOOOU, OOTOU

第四節 Substrate



- 1. Milling stage size: 1 cm, 1 inch, 2.5 inch
- 2. Copper tape, carbon glue, Ag glue
- 3. SiO2, Aluminum, Titanium

第五節 Patterned substrate

1.	Р	

- 2. N^+ (Figure 5)
- 3. P + Oxide 200nm
- 4. N^+ + Oxide 200nm
- 5. N^+ Substrate + grounding metal (Ti)
- 6. N^+ Substrate + SiO₂ + grounding metal (Ti) (Figure 6)

(Figure 5)





RIE recipe: CHF₃ 30sccm, 1.3Pa, RF power 90W, etching time 3hr Etching depth: 0.8um

Figure 5. Fabrication of substrate



Figure 6. Various kinds of substrate

第六節 Ga ion milling voltage and current

- 1. 30kV, 49pA
- 2. 16kV, 21pA/42pA
- 3. 8kV, 61pA

第七節 Milling angle and photo angle

From 0-degree to 52-degree, about 15-degree increment. (Figure 7)

(Figure 7)



Figure 7. Ion beam milling angle of FIB.

第八節 Wafer, graphene, ARPE culture

A. Wafers as the target substrates

Various semiconductor wafers used in this experiment were purchased from Summit-Tech. Co. and Kyma Tech. Co. They included P-type and P+-type silicon wafers, N-type and N+-type silicon wafers [27], and GaN wafers. (表格 1) The wafers were cleaned sequentially with an appropriate amount of acetone, methanol, and secondary water. Each was agitated in an ultrasonic cleaner for 10 min, then soaked in an appropriate amount of 75% alcohol for 10 min. The wafers soaked in alcohol were dispersed in a biological safety cabinet and air-dried for 30 min, then moved to a suitable container by aseptic operation for later use. (Figure 8)



表格 1. Different wafers with respective doping and resistivity.

Wafer type	Doped element	Resistivity Ω-cm
n type Si	Phosphorus	1-10
n+ type Si	Arsenic	0.001-0.005
p type Si	Boron	5-10
p+ type Si	Boron	0.001-0.005
GaN	undoped	<5
GaN n+	Silicon	<0.02

(Figure 8)





Figure 8. A 2-inch wafer on a 3-inch stage, attached with adhesive copper tapes.

B. Graphene sheets growing on copper foils [28]

Graphene was grown by chemical vapor deposition (CVD) on catalytic copper (Cu) substrates following previous reports. Briefly, Cu foil (99.8%, Alfa-Aesar, no. 13382) was electropolished before growth in a 1inch clamshell furnace, annealed at 1000 °C in a hydrogen flow of 200 sccm for 30 min. Graphene growth was initiated by introducing 10 sccm CH₄ at a pressure of 8 Torr and growth duration was chosen to be 6 hr. The grown samples were cooled down to room temperature in a 10 sccm flow of hydrogen [28].

C. Graphene sheets transferred to wafer target substrates

- 1. The transfers began with the CVD graphene on the Cu foils. We spun 5% polymethyl methacrylate (PMMA) on the graphene side of Cu foils to provide support for graphene or h-BN film [29].
- After the spin-coating, 90 sec bake on a hot plate at 120 °C was applied to solidify PMMA and enhance the adhesion between graphene or h-BN and PMMA films.
- 3. Waiting for 12 hr, floated the sample on a solution of ammonium persulfate (APS, (NH₄)₂S₂O₈, 0.282 g/mL) for approximately 4 hr to etch Cu. After Cu was etched, the sample was transferred to the deionized water on a glass slide, floating on the water surface for 10 sec, to wash out the remaining ammonium persulfate. Then the sample was pulled out of the deionized water through the adherence of a wafer.
- 4. Another bake on a hot plate at 120 °C for 30 min (or 65 °C for 1hr) was applied to achieve well-adhered graphene or h-BN on the target substrate.
- The final step was to rinse the target substrate in acetone at 50-65°C for 1-1.5 hr to lift off PMMA, then in isopropanol (IPA) to wash out acetone. Then dry the wafer with nitrogen gas [29]. (Figure 9)



Figure 9. Graphene wet transfer printing with PMMA. ~Courtesy of Bor-Wei Liang, phD.

- D. Cell cultures on wafers
 - ARPE-19 (human retinal pigmented epithelium cell, BCRC 60383) cells were purchased from the Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan (BCRC) and grown according to the manufacturer's instructions.
 - They were cultured in DMEM/F12 growth medium (GIBCO, 12400-024) with 3 mM glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum (MERCK, TMS-013-BKR). ARPE-19 cells were plated at different cell densities.
- 3. Placed a sterile wafer target substrate as the cell holder in a sterile petri dish of appropriate size, add a culture medium containing an appropriate number of ARPE-19 cells to cover the entire wafer, and placed it in an incubator for culture. The ARPE-19 cells were cultured on different kinds of target substrates. Growth medium was changed every 2–3 days.
- Different kinds of wafer target substrates were used to hold APRE-19 cell cultures, both with graphene sheet and without graphene sheet. Each one included P, P+, N, N+, GaN, GaN+. Totally 12 groups were used.
- E. Fixation and staining
 - The ARPE-19 cell samples were washed with phosphate buffer saline (PBS) (Calbiochem, 6505) twice, and pre-fixed with 4% glutaraldehyde (EMS, 16220) for 2 hr at least.
 - 2. After washed with running water for 10 min to remove glutaraldehyde, the cell samples were post-fixed and stained step by step with saturated thiocarbohydrazide (T) (Aldrich, 223220-5G) aqueous solution and 2% osmium tetroxide (O) (EMS, 19190) solution. Repeat the steps following a sequence as T1-O1-T2-O2-O3. The staining durations were as follows: T1 overnight, O1 overnight, T2 5~10 min, O2 overnight, O3 overnight.
 - 3. After washed out the remnant staining compounds with running water, the cell samples were dried in a vacuum desiccator.
- F. Cutting, milling, and scanning cells

- We used focused-ion-beam (FIB) to cut, mill, and scan ARPE-19 cells. The FIB apparatus used in this study was Nova NanoLab 600i system (FEI Company, Netherland)
- The FIB milling parameters were as follows: 30 KV/1.5 pA~0.45 nA (9.7 pA mostly), depth 0.1 ~ 0.2 um, sample stage tilted to 15-deg. The milling option was clean cross-section.
- 3. The FIB scanning parameters were as follows: 5.0KV / 98pA with TLD or ETD mode, various dwell time (30 us mostly) and magnification (25000X mostly).
- 4. Wafer type: 12 types

 $P \cdot P + \cdot N \cdot N + \cdot GaN \cdot GaN + /$ with graphene

 $P \cdot P + \cdot N \cdot N + \cdot GaN \cdot GaN + /$ without graphene

第九節 Quantum dots preparation steps

- 1. Antibody concentration and buffer exchange_1 hour
- 2. Modification of antibody carbohydrate domain_4 hours up
- 3. Azide attachment_5 minutes then overnight
- 4. Purification and concentration of modified antibody_1 hour up
- 5. Conjugation with DIBO-modified label_ 5 minutes then overnight
- 6. Purify and concentrate antibody_1 hour up

第十節 Immunofluorescence with FIB/SEM

- 1. Paraformaldehyde fixation
- 2. Qdot reaction
- 3. Fluorescent microscopy
- 4. Glutaraldehyde fixation

- 5. OsO₄ staining
- 6. FIB



第三章 結果

本研究主要目標為發展具實際使用性的 FIB/SEM。結果的呈現,基本上都是 以細胞和組織的電子顯微鏡切面圖呈現。從最早的毫無影像圖形開始,漸漸取得 葉綠體橫切面,可以看到堆疊的膜狀結構。進而可以看到視網膜色素上皮細胞的 細胞內超微結構,以及粒線體的膜狀超微結構。因以圖形呈現,而圖像解析度與 畫質的好壞,目前還無法用數學方式分析,只能靠觀測者主關的辨識,而間接決 定切片方法的優劣。因此本研究的結果必須以系列的影像圖形呈現說明。

本研究用 FIB 切削細胞,但是並沒有使用樹脂包埋細胞。我們仍然使用 glutaraldehyde 做前固定,也使用 Osmium 做後固定以及。通常TEM 電子顯微鏡的 組織處理 使用 OTOTO 依序處理,但是在之前的初步測試中,我們發現使用 TOTOO 的效果比一般常用的OTOTO 來得好。因此這個研究我們使用 TOTOO。 經過固定染色處理的單顆細胞,FIB 可以很平順的切削細胞,並且以 SEM 成功地 對切削表面照相紀錄。細胞核和與細胞漿的細微構造都可以清楚的顯露。Ga 離子 研磨的細胞橫截面的 SEM 圖像與傳統的 TEM 圖像略有不同,尤其是細胞器與 周圍細胞質的對比度。它變成灰色而不是 TEM 中的白色。出現這種情況的原因 可能是由於 SEM 的內在屬性。然而,細胞器的細節仍然可以識別,細胞膜、核 膜和線粒體膜的雙層膜結構可以清楚地展示出來。顯露高爾基體、色素顆粒、液 泡、微管等。

對於一般放大倍率,我們使用 ETD 模式。在使用高倍率(>1000X)時,TLD 模式的圖像清晰度會比 ETD 模式好很多。掃描線密度越高,掃描時間越長,畫 質越清晰細膩。但是如果掃描時間過長,過程中容易受到周圍環境因素的影響, 使得輸出的圖形容易失真,也容易受電子積累的影響,使畫面過曝變白。掃描時 間也有同樣的問題。在樣品上鍍鉑(Pt)可以使掃描狀態更穩定,大大降低幕布效 應,更好地耗散多餘電子,最終使掃描斷面更清晰, 雜訊更小。

切削半導體,一般使用 52 度載台傾斜角度。這個研究常用的角度是 15 度。 如果基板導電性良好,不同載台傾斜角度角度,在我們的這個系統中並沒有太大 的差別。如果基板導電性不好,較小的切削角度結果較好。

最早期的酵母菌,純粹以冷凍方式直接切片。大多數的時候形成大量的空泡,內部的構造幾乎全被破壞。技術純熟之後,則可以初步看到酵母菌的横切面,看到酵母菌內部的細胞核,與許多液泡。(Figure 10)

原核生物切片成功後,下一步是切植物細胞,因具有細胞壁,操作相對容易, 主要是切削菠菜的葉綠體。葉綠體只比酵母菌略大,然而其內部構造非常複雜,具 有很纖細的堆疊式的膜狀構造區塊,正足以測試我們的方法是否有效。(Figure 11)

開始切削葉綠體時,我們已經漸漸改善載台基質的選擇與製備,也在切削葉 綠體時,我們確定了切削的角度與照相的角度。從葉綠體的橫切面,我們已經可 以看到各式各樣的葉綠體膜狀堆疊塊狀構造。(Figure12)不同的條件有不同的呈 現,從各個圖可以看得出來。主要的發現在於,有幾種特殊蝕刻的基質,如T-O-N 具有較好的切削影像結果。(Figure 13,14)而低角度的切削,比起傳統的垂直切, 削具有較好的結果。(Figure 15,17)何以低角度的切削較好,可能的解釋是低角度 時,大部分的 Ga 離子殘留在基質上或者彈出去,而非反濺回細胞,而造成雜訊干 擾。(Figure 16)我們也在葉綠體上進行了序列切削,將同一顆葉綠體之一端,以 固定分距,一直切到另一端。影像清晰。(Figure 18)

葉綠體之後,開始進行動物細胞的切削,主要是以人類視網膜色素上皮細胞 株為主。因是動物細胞,沒有細胞壁,處理相對困難。我們使用這個細胞株進行 了許多研究。(Figure 19, 20,21) 在標本的前處理上,我們發現固定劑與染色劑的組 成與順序,會大幅影響染色與切削的效果。傳統使用的O-T-O-T-O 法,似乎沒有 我們創新設計的 T-O-T-O-O 法優秀。(Figure 22)

doi:10.6342/NTU202203997

我們也使用這個細胞株進行了許多載台的測試,結果發現很簡單的使用商業 上可以購買的半導體晶圓片,是簡單直接有效的方法,而不必自行蝕刻晶片。這 個研究使用了六種不同的晶圓基質作為細胞的載台。ARPE-19 細胞可以在各種晶 圓基板表面穩定生長,包括P型Si、P+型Si、N型Si、N+型Si、GaN和GaN+。 各種晶圓具有不同的參雜物質與不同的阻抗,導電度。(表格 1) 理論上晶圓載台 的導電度越好,離子反濺的程度越少,因此解析度及雜訊能夠改善。

大小約為兩寸的半導體晶圓片,效果較好。(Figure 8) 再大無益。我們也使用 這個系統做超高放大倍率的測試,可以觀測到 325000 倍放大,幾乎看到細胞分裂 時的染色絲。(Figure 19)

我們更使用這個細胞株在已有的6種半導體基質載台上,進行石墨烯薄膜的 測試,希望能更進一步的改善導電度,從而增進切面呈現的解析度以及降低雜訊。 ARPE-19細胞也可以在石墨烯塗層的各種基材表面穩定生長。12種晶圓基板的生 長差異均不顯著。

根據對不同材質晶圓的測試,晶圓的導電性越好,結果越清晰,圖像越細膩。 因此,具有低電阻和良好導電性的材料,對這項研究具有積極的影響。12種基板的 SEM 圖像質量其實沒有太大差異。每種類型都可以提供細胞結構和組件的清晰可 見性。但是,確實存在 SEM 圖像質量的微小差異。從使用相同參數切割、研磨 和拍攝的 SEM 圖像中,我們發現 GaN+ 提供了最佳的 SEM 圖像質量。圖像質 量最差的可能是 P+ 型。整體而言,GaN+ wafer 效果最好,但是太貴。性價比是 N+表現最好。至於石墨烯薄膜的有無,並沒有大的增益。有塗層石墨烯薄膜的晶 圓,圖像更清晰,解析度提高,也可以減低白點背景雜訊,但不會太多,因為許多 其他因素會影響結果。(Figure 23, 24, 25, 26, 27)

基於開發臨床應用,我們先測試了人類紅血球與白血球。白血球是非常重要的研究標的,我們的系統非常適合切削白血球,可以很清楚的看到白血球的內部構造。(Figure 28)

doi:10.6342/NTU202203997

組織切片的嘗試,主要是以人類水晶體前囊作為主要的研究標的。這個系統 最適合切削細胞,然而是否能切削組織,之前並不清楚。由我們的結果可以看出,於 適當的深度,的確是可以切削,然而太厚的組織,這個系統就無能為力。在可以切削 的深度內,可以看到構成組織的細胞其內部結構,也可以看到基底膜與其構造,也可 以看到細胞間的聯接。(Figure 29)所以仍然是一個有效的方法。

在生物醫學研究上,常常會用到細胞與組織的免疫荧光染色,而電子顯微鏡 的免疫染色操作則較為困難。本系統則使用量子點作為研究標的,而我們的結果 的確可以看到 ARPE 細胞內免疫連結 beta-actin 的量子點顆粒簇群。(Figure 30, 31) 這種免疫染色可能性,為將來 FIB/SEM 在生物醫學的研究應用上,開啟了一個重 要的方向。

<酵母菌>







Figure 10. Cross-section of an yeast, showig nucleus and vacuoles. The milling was done on a cryo-stage. ~Courtesy of Yu Chen, BEBI, NTU

<葉綠體>

(Figure 11)





Figure 11. Chloroplast cross section with FIB milling, with cryo-preparation only. Many bubbles are present.





Figure 12. Chloroplast cross section on copper substrate, milled with FIB.





Figure 13. A dividing chloroplast on Titanium-Oxide-N (TON) substrate, milled with FIB.

(Figure 14)





(milling angle15^{-deg}, 16kV, 21pA)

Figure 14. Chloroplast cross section on different substrate with FIB milling.

(Figure 15)



Substrate : N^+ + Trench + Oxide 16kV, 21pA



Figure 15. Image comparison between 52-deg and 15-deg milling angle of FIB ion beam. The 15-deg cross section image is more clear and shows much more details than the 52-deg one.



Figure 16. Comparison of Ga ion content in the groove base of substrate between 15-deg and 52-degree milling angle of FIB. (A) 15-deg, Ga content 37.07%. (B) 52-deg.Ga content 20.21%.



Substrate : N^- + Trench

Figure 17. Chloroplast cross section. Taking image picture from different photo angle.

(Figure 18)



Figure 18. Chloroplast serial milling

<視網膜色素上皮細胞株>

(Figure 19)



Figure 19. ARPE-19 on a wafer N+, milled by FIB. (A) A single ARPE-19 cell grown on a wafer surface, photographed with incorporated SEM. 4000x. (B) A cut surface of a ARPE-19 was achieved with FIB, and photographed with SEM, showing nucleus and cytoplasmic organelles. 10000x. (C) Mitochondria of a ARPE-19, showing outer and inner membranes, matrix, and cristae. 50000x. (D) Chromatin-like materials were observed in a dividing ARPE-19 cell. 325000x.





Figure 20. Cross section image of APRE, milled with FIB. (12500X)





Figure 21. Ultrahigh magnification of APRE mitochondria, milled with FIB. (75000X)



Figure 22. ARPE cross section milled with FIB, after different staining sequences.

(Figure 23)



Figure 23. ARPE on different wafers with graphene. A:P, B:N, C:GaN, D:P+, E:N+, F:GaN+.

(Figure 24)



Figure 24. ARPE on different wafers without graphene. A:P, B:N, C:GaN, D:P+, E:N+, F:GaN+.

(Figure 25)





Figure 25. ARPE on P wafers milled with FIB. (A) with graphene. (B) without graphene. (32500X)

(Figure 26)





Figure 26. ARPE on N wafers milled with FIB. (A) with graphene. (B) without graphene. (25000X)

(Figure 27)





Figure 27. ARPE on GaN wafers milled with FIB. (A) with graphene. (B) without graphene. (32500X)





(Figure 28)



Figure 28. A basophil of a NARP (neuropathy, ataxia, retinitis pigemntosa) patient, milled by FIB. (17500X)

<水晶體的前囊>

(Figure 29)





Figure 29. Human lens anterior capsule with lens epithelial cells, milled by FIB.

<免疫染色> (Figure 30)





Figure 30. Confocal image of quantum dot immunostaining to beta-actin of APRE cells.







Figure 31. ARPE cells with quantum dot-beta actin immunostaining, milled by FIB.

第四章 討論

最初為技術材料的成像,和微加工而開發的聚焦離子束系統,可以成功地應 用於生物材料的研究。FIB 系統的巨大優勢在於它結合了高分辨率顯微鏡(空間 分辨率 6 nm)與高焦深,和特定位置切割的選項(空間分辨率 10 nm)。探索此 類結構的常規技術是光學顯微鏡、TEM 和 SEM 研究,它們需要精細的樣品製備 方法,如嵌入和連續切片。除了嵌入過程中引入的人工製品之外,這些方法的主 要缺點是它們不是特定點的特徵定位研究,必須先製作一組切片,才能在其中找 到感興趣的特徵。

樣品必須乾燥是 FIB 研究生物材料的主要缺點。要求是樣品至少在風乾後才 能在 FIB 中進行研究。乾燥生物材料會導致諸如收縮、裂縫形成和材料特性變化 等偽影。另一個缺點是在銑削過程中濺射材料的重新沉積。第三個缺點是鎵離子 轟擊導致鎵注入樣品表面,這與能量轉移到材料中有關。這種能量會導致局部溫 度升高,並結合材料的化學和結構變化 [30]。

FIB 對生物成像的性能,可以與不同的高分辨率顯微鏡技術進行比較與互補, 包括軟 X 射線接觸顯微鏡 (SXCM)、原子力顯微鏡 (AFM)、和透射電子顯微鏡 (TEM)。(表格 2) (Figure 34)

而 FIB 技術,允許在成像過程中選擇靶細胞、快速操作、高分辨率、與 3D 成 像 [12]。根據電子光學原理,FIB 圖像分辨率雖可以與 TEM 相比擬,但通常略 差 [31]。 (Figure 35)

V. Baena 闡釋,在 FIB 中,大範圍體積細胞之超微結構的可視化變得可能。 並且以自動化銑削和成像的迭代,在數十奈米或更小的分辨率下,可在 3D 中獲致 微米厚的樣本組,從而進行"體積電子顯微鏡"(vEM)之研究。在 SARS-CoV-2 感 染的一項體外研究中,經由 FIB/SEM 成像,對病毒密度和表面曲率的準確定量, 揭示了 SARS-CoV-2 病毒優先位於具有正均值曲率的質膜區域 [31]。

用於奈米級細胞成像的技術,正在進行一場悄無聲息的革命。以前僅限於材 料科學和半導體領域的聚焦離子束,正迅速成為生物樣品超微結構成像的強大工 具。細胞和組織結構,保存在塑料包埋的樹脂中或以冷凍形式保存,可以通過 SEM 對使用 FIB 逐步去除材料而產生的新表面,進行 SEM 成像,在三個維度上進行研 究。FIB 也可以用作雕刻工具,以創建特定的樣品形狀,例如薄片或針狀,可以通 過 TEM 或探測化學成分的方法(EDX)進一步分析。高壓冷凍(HPF)與冷凍替 代(FS)和樹脂包埋相結合,構成了一種在超微結構保存和細胞成分的高對比度之 間找到最佳折衷的方法。但我們於本研究中,並沒有在 HPF 之後執行 FS。然而 我們曾在-30C 進行後固定與染色(O+T)。結果對比度提高且雜訊減少。

結果我們發現,傳統TEM必須先使用環氧樹脂,做細胞組織樣本包埋才能切 片,而在我們的系統上可以避免。傳統TEM必須使用鑽石刀,切片環氧樹脂包埋 的樣本,也可以避免。因此我們的系統能大幅削減所需的人力物力與時間。標本 的前處理,我們設計的新T-O-T-O-T 方法,效果勝於傳統O-T-O-T-O 方法。切削 的標本載台,我們發現其實完整的2 inch 半導體晶圓片,就是最簡單,使用最方便 有效的載台。以N+與Ga+N 晶圓片為佳,具有轉印石墨烯薄膜更佳 [32]。可以減 低白點背景雜訊,也可以更加提高解析度。(Figure 33) 我們也發現使用低角度切 削,效果比傳統的垂直切削更加優越。載台角度以15 度的綜合實用性與高解析度, 成為我們的首選。我們成功切削了酵母菌,葉綠體,網膜色素上皮細胞胞株,水 晶體的前囊,紅血球與白血球細胞。我們完成了序列切片,也完成電子顯微鏡量 子點免疫染色 [33]。

與傳統TEM 相比,我們的 FIB/SEM 系統獲取的圖像,能顯示出相似的分辨 率和對比度。(Figure 32) 我們從頭開始,一步步建立了可運用於生物醫學領域的 FIB/SEM 方法系統。這樣的系統,可以減輕TEM 樣品製備與切割的沉重負擔, 並實現了直接可視化下的切削需求,具有運用在臨床生物與醫學上的巨大潛力 [34, 35]。



表格 2. Performance comparison among different high-resolution microscopy.

Technique	Resolution	Sample choice	Sample preparation	Inner imaging	Average imaging time	Image plane selection
TEM	very good	restricted	complex and time- consuming (hours)	possible (with restrictions)	minutes	possible (with restrictions)
AFM	very good (at surface)	easy	absent	impossible	minutes	impossible
SXCM	good	restricted	absent	possible (with image analysis)	hours	impossible
FIB	very good	easy	absent	easy	minutes	easy
~M. Milani, The European Physical Journal Applied Physics, 26, 123–131 (2004)						

(Figure 32)



Figure 32. Chloroplast FIB/SEM image vs TEM image (A) FIB/SEM image (B)TEM image origin : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chloroplast_in_leaf_of_Anemone_sp_TEM_85000x.pn g

(Figure 33)



White dots background noise comparison



no graphene



Figure 33. Comparison of white dots background noise between graphene and no-graphene substrate. The graphene group shows significant less white dots noise.





Figure 34. Yeast images were shown by four different approaches. FIB performances can be compared with different high-resolution microscopy techniques. (A) Transmission Electron Microscopy (TEM), (B) Atomic Force Microscopy (AFM), (C) Soft X-ray Contact Microscopy (SXCM) and (D) Focused Ion Beam (FIB). ~M. Milani. The European Physical Journal Applied Physics, 26, 123–131 (2004).

(Figure 35)



Figure 35. Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) versus other electron microscopy (EM) approaches in imaging viruses and cells. Representative images of SARS-CoV-2 infected Vero E6 cells taken by different EM imaging modalities. Images were acquired at ~15,000×. TEM: transmission electron microscopy, STEM: scanning transmission electron microscopy. Scale bars: 1 µm. ~V. Baena, Viruses. 2021 Apr 2;13(4). pii: v13040611.

參考文獻

- 1. Kizilyaprak, C., J. Daraspe, and B.M. Humbel, *Focused ion beam scanning electron microscopy in biology*. J Microsc, 2014. **254**(3): p. 109-14.
- Hing, H.L., et al., *The Application of Focused Ion Beam (FIB) on Biological Samples*. Microscopy and Microanalysis, 2005. **11**(S02): p. 798-799.
- Hayles, M.F., et al., A technique for improved focused ion beam milling of cryo-prepared life science specimens. J Microsc, 2007. 226(Pt 3): p. 263-9.
- 4. Milani, M., D. Drobne, and F. Tatti, *How to study biological samples by FIB/SEM?*, in *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. 2007. p. 787-794, pril.
- 5. Kizilyaprak, C., et al., *Investigation of resins suitable for the preparation of biological sample for 3-D electron microscopy*. J Struct Biol, 2015. **189**(2): p. 135-46.
- 6. Narayan, K. and S. Subramaniam, *Focused ion beams in biology*. Nat Methods, 2015. **12**(11): p. 1021-31.
- Scott, K., 3D elemental and structural analysis of biological specimens using electrons and ions. Journal of Microscopy, 2011. 242(1): p. 86-93.
- 8. Al-Abboodi, A., et al., *Three Dimensional Characterization of Cells in Hydrogel with Focused Ion Beam.* Microscopy and Microanalysis, 2011. **17**(S2): p. 692-693.
- 9. Lewis, S.M., J.S. Osborn, and P.R. Stuart, *Demonstration of an internal structure within the red blood cell by ion etching and scanning electronmicroscopy*. Nature, 1968. **220**(5167): p. 614-6.
- 10. Yonehara, K., N. Baba, and K. Kanaya, *Application of ion-beam* etching techniques to the fine structure of biological specimens as examined with a field emission SEM at low voltage. Journal of Electron Microscopy Technique, 1989. **12**(1): p. 71-77.
- Ishitani, T., H. Hirose, and H. Tsuboi, *Focused-ion-beam digging of biological specimens*. J Electron Microsc (Tokyo), 1995. 44(2): p. 110-4.
- 12. Milani, M., et al., *High resolution microscopy techniques for the analysis of biological samples: a comparison.* The European Physical Journal Applied Physics, 2004. **26**(2): p. 123-131.
- 13. Drobne, D., et al., *Electron and ion imaging of gland cells using the FIB/SEM system.* J Microsc, 2005. **219**(Pt 1): p. 29-35.

瀆
- 14. Marko, M., et al., Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples. J Microsc, 2006. 222(Pt 1): p. 42-7.
- 15. Stokes, D.J., F. Morrissey, and B.H. Lich, A New Approach to Studying Biological and Soft Materials Using Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB SEM). Journal of Physics: Conference Series, 2006. **26**: p. 50-53.
- Hing, H.L., et al., *Applications of Focused Ion Beam (FIB) On Yeast Cell and SARS Virus*. Microscopy and Microanalysis, 2007. 13(S02): p. 1528-1529.
- Hekking, L.H., et al., Focused ion beam-scanning electron microscope: exploring large volumes of atherosclerotic tissue. J Microsc, 2009. 235(3): p. 336-47.
- Liu, B., et al., Nanoscale focused ion beam tomography of single bacterial cells for assessment of antibiotic effects. Microsc Microanal, 2014. 20(2): p. 537-47.
- Ishitani, T. and T. Yaguchi, *Cross-sectional sample preparation by* focused ion beam: a review of ion-sample interaction. Microsc Res Tech, 1996. 35(4): p. 320-33.
- 20. Drobne, D., et al., *Surface damage induced by FIB milling and imaging of biological samples is controllable*. Microsc Res Tech, 2007. **70**(10): p. 895-903.
- 21. Drobne, D., et al., *Imaging of intracellular spherical lamellar structures and tissue gross morphology by a focused ion beam/scanning electron microscope (FIB/SEM)*. Ultramicroscopy, 2008. **108**(7): p. 663-70.
- 22. Leser, V., et al., *Comparison of different preparation methods of biological samples for FIB milling and SEM investigation.* J Microsc, 2009. **233**(2): p. 309-19.
- 23. Drobne, D., *3D imaging of cells and tissues by focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM)*. Methods Mol Biol, 2013. **950**: p. 275-92.
- 24. Stokes, D. and M. Hayles, *Methodologies for the preparation of soft materials using cryoFIB SEM*. SPIE Scanning Microscopy. Vol. 7378. 2009: SPIE.
- 25. Bobik, K., J.R. Dunlap, and T.M. Burch-Smith, *Tandem* high-pressure freezing and quick freeze substitution of plant tissues for transmission electron microscopy. J Vis Exp, 2014(92): p. e51844.

- 26. Archanjo, B.S., et al., *The use of a Ga+ focused ion beam to modify graphene for device applications*. Nanotechnology, 2012. **23**(25): p. 255305.
- 27. Cotter, J.E., et al., *P-Type Versus n-Type Silicon Wafers: Prospects* for High-Efficiency Commercial Silicon Solar Cells. IEEE Transactions on Electron Devices, 2006. **53**(8): p. 1893-1901.
- 28. Hsieh, Y.-P., et al., *High-Throughput Graphene Synthesis in Gapless Stacks*. Chemistry of Materials, 2016. **28**(1): p. 40-43.
- 29. Liang, B.-W., et al., *High-Frequency Graphene Base Hot-Electron Transistor*. ACS Nano, 2021. **15**(4): p. 6756-6764.
- 30. Orso, S., *Structural and mechanical investigations of biological materials using a Focussed Ion Beam microscope*. 2005, Stuttgart: Max-Planck-Institut für Metallforschung.
- Baena, V., et al., FIB-SEM as a Volume Electron Microscopy Approach to Study Cellular Architectures in SARS-CoV-2 and Other Viral Infections: A Practical Primer for a Virologist. Viruses, 2021. 13(4).
- 32. Zhou, Y., et al., *Precise milling of nano-gap chains in graphene with a focused helium ion beam.* Nanotechnology, 2016. **27**(32): p. 325302.
- 33. Oorschot, V., et al., *TEM*, *SEM*, and *STEM-based immuno-CLEM* workflows offer complementary advantages. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 899.
- 34. Henn, I., et al., *SEM/FIB Imaging for Studying Neural Interfaces*. Dev Neurobiol, 2020. **80**(9-10): p. 305-315.
- 35. Parisi, L., et al., *Preparation of hybrid samples for scanning electron microscopy (SEM) coupled to focused ion beam (FIB) analysis: A new way to study cell adhesion to titanium implant surfaces.* PloS one, 2022. **17**(8): p. e0272486-e0272486.