

激光软 X-射线近贴显微技术初步研究

赵 卫 张小秋 龚美霞 刘秀琴 雷志远

(中国科学院西安光学精密机械研究所,瞬态光学技术国家重点实验室,西安 710068)

提 要

描述了用高功率脉冲激光打靶产生的等离子体作为软 X-射线源而进行的近贴显微研究,并得到了分辨率好于 $1\ \mu\text{m}$ 的结果.

关键词 软 X-射线近贴显微,激光等离子体,水窗.

1 引 言

软 X-射线显微技术克服了光学和电子显微镜在样品准备时的缺点,对活的或新鲜的样品可进行直接观察,而且可以了解细胞微观结构动态的变化过程及其内部的层次起伏.该技术可用来观察活细胞新陈代谢、生长和退化,特别是细胞的结构如丝状物的形成和分布,吞噬作用、排泄作用等等.在低分辨的光学显微技术同高分辨但无法观察活细胞的电子显微术之间软 X-射线显微术是一个重要而且不可缺少的补充^[1].

目前用于软 X-射线显微术的软 X-射线源主要有三种:同步辐射源、喷气式 Z 箍缩源、激光等离子体源.同步辐射源不论从其造价还是从其体积对使用者来讲都是不方便的,最主要的缺点是曝光时间太长(几十秒到几小时).而 Z 箍缩源的源直径较大,一般约为 $0.5\ \text{mm}$,另外其溅射很强.激光等离子体源与前二者相比有明显的优势,如曝光时间可以很短(几十个 ps 到几个 ns),亮度高(比同步辐射源还高 4~5 个量级).它的源直径很小一般约几十个 μm ^[3],与源和样品的距离相比,可以认为它是一个理想的点源.激光等离子体源可以小型化,是向实用化发展的一个重要的软 X-射线源.

本文采用激光打靶产生的激光等离子体作为软 X-射线光源,进行了生植物样品的显微技术研究,并得到了一些较好的结果.

2 实验原理

2.1 近贴显微原理

软 X-射线有一“水窗”(2.3~4.4 nm),蛋白和水对它的吸收系数相差近一个量级,这样就使得样品不必染色,在自然状态下就可得到衬度很好的图像.由于该波段 X-射线较软,曝光时间很短,所以在活细胞受到辐射损伤之前就已成像.近贴显微术原理如图 1 所示,把要观察的样品直接紧贴在对 X-射线敏感的胶面上(一般采用的是 PMMA,即聚甲基丙烯酸甲酯),然后用软 X-射线进行曝光.适量曝光后放入 MIBK 和 IPA 的混合液中进行显影,最终胶面上留下

凹凸不平的微细结构,即样品内部细节的再现.

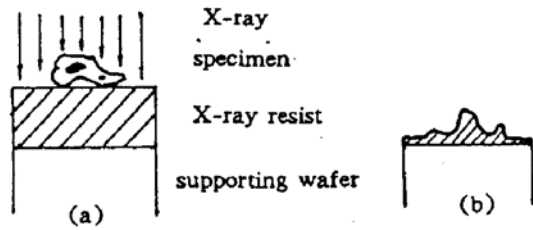


Fig. 1 Schematic showing the contact imaging concept: X-ray exposure: (a) is following by chemical development; (b) leaving a replica of the shape of the original specimen

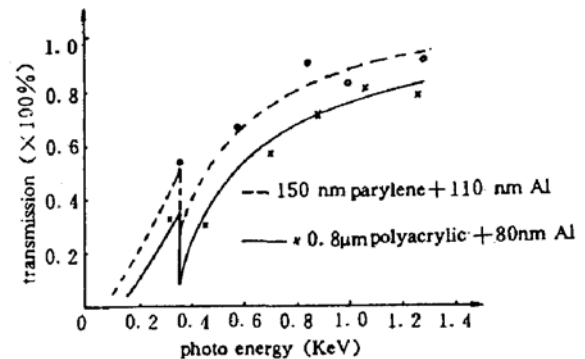


Fig. 2 Transmission of filters

“水窗”波段的软 X-射线的产生,可以方便地通过选择激光功率密度和靶材来达到. 实验中采用的是平面金靶,因为金靶的 X-射线的转换效率高. 由于金等离子体的辐射是连续谱,其 X-射线能量主要在 1 keV 以下^[4],为了获得“水窗”内的 X-射线,研制了两种滤膜如图 2 所示. 用日立 307 色彩分析仪检查其透光情况,波长从 380 nm~780 nm 透光率读数均为 00.00%. 所以该二种滤膜可以滤除可见光及较长波长的光,大大减少了由于较长波长的光衍射造成的图像分辨率下降. 对于高能的 X-射线(700 eV 以上),它随激光功率密度的下降而明显地下降,对低能的 X-射线成份(约 300 eV),随着激光功率密度的下降它所占的比例在增大,并且低能 X-射线增长得很快^[5]. 所以为了减少较硬 X-射线辐射的影响,在满足曝光量的前提下应尽量减小激光功率密度,以确保 X-射线辐射尽量落入“水窗”.

2.2 影响分辨率的因素

影响最终图像分辨率的因素很多,如感光材料本身的分辨率、光源的空间尺寸及波长等等. 但首先取决于使用的抗蚀剂. 在最佳条件下($\lambda = 5 \text{ nm}$, 辐射剂量 10^4 J/g) PMMA 的最小分辨率可达 5 nm,这与 X-射线衍射限制一致. 对更短波长,由于抗蚀剂损伤范围加大,分辨率变差. 从辐射损伤考虑,抗蚀剂灵敏度的提高都伴随着分辨率的降低. 除了抗蚀剂的因素外,另外有两个对分辨率限制的因素即光源的空间尺度及光源对样品和样品与胶面的有限距离造成的半影效应和 X-射线衍射限制. 它们之间的关系由下式得到^[6]:

$$\delta = \alpha(\lambda)L^{1/2}[\ln E_i - \ln E_r + \ln K(L)]$$

式中 δ 为样品尺寸与显影图像尺寸之差, $\alpha(\lambda)$ 为与波长有关的常数,它与 X-射线源类型有关, L 为样品与感光胶面的距离 (μm), E_i 为入射的 X-射线能量密度 (mJ/cm^2), E_r 为感光胶的感光阈值 (mJ/cm^2), $K(L)$ 为与 L 有关的常数,与光源类型有关.

由此可以看到,如果光源和感光材料一定,则可把 λ 和 E_r 看作常数,上式就可写成如下形式

$$\delta = \alpha(L)^{1/2}[\ln E_i - b]$$

所以 δ 正比于 E_i 的对数和 $(L)^{1/2}$, 它们的取值直接影响着分辨率. 要完全消除 L 是不可能的,但应采取措施尽量减小 L 值. 同样 $\ln E_i$ 取值也很重要, δ 随 $\ln E_i$ 的增加而线性增加,但 E_i 又不可太

小,所以 E_c 有一最佳值需在实验中进行确定.

3 实验装置及条件

实验装置如图 3 所示. 对活的或新鲜的样品,它要求实验时的环境仍是原来的状态,这样就必须有生物样品室,其窗口材料最好是 Si_3N_4 薄膜,它对紫外辐射强烈地吸收,而对水窗内的 X-射线透过率高达 80%. 本文采用了 $0.8 \mu\text{m}$ 的聚丙烯薄膜加 1 mm 间隔的铜网组成的窗口,同时将一只活苍蝇放入该样品室内,再将样品室放入真空靶室内进行可靠性实验,真空度在 $1.33 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 持续近两小时,最终将苍蝇从生物样品室取出后,苍蝇仍能飞行. 这说明该生物样品室是可靠的. 同时采用了对 X 射线透过率高的 Parylene 有机薄膜,使得样品和 PMMA 胶面紧贴,很好地解决了由于 L 值较大而引起的图像分辨率下降的问题.

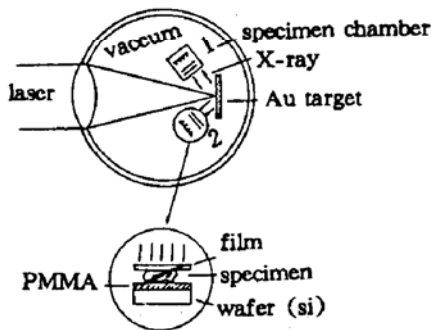


Fig. 3 Schematic diagram of the experiment

- 1—fresh sample chamber
- 2—dehydrated specimen

激光器是四级放大的钕玻璃高功率激光器,输出能量 1 J ,脉宽 50 ps 左右,激光聚焦后的焦点直径 $100 \mu\text{m}$. 靶室真空度 $1.33 \times 10^{-3} \text{ Pa}$,真空是为了防止激光聚焦后空气被击穿,另外也可使得等离子体辐射的软 X-射线无衰减的到达生物样品室的窗口前.

PMMA 感光胶曝光后一般是在 MIBK 和 IPA 的混合液中进行冲洗,比例为 2 : 1,时间由半分到 4 分钟,整个过程需在光学显微镜下监视着进行. 冲洗后的胶面经烘干后镀一层金或金钡膜,用电子显微镜扫描得到图像,如果分辨率要求不高的话,用高倍光学显微镜即可得到图像.

4 实验结果

对 20 line/mm 、 50 line/mm 的标准铜网及苍蝇、蚂蚁、人的头发、洋葱及肿瘤切片等生植物样品进行了大量实验,得到了清晰的图像. 这些样品均是在自然状态下进行的,没有经过任何人为的准备程序. 下面的照片是实验的一部分,经冲洗后用 500 倍的反射式光学显微镜拍摄的,如图 4 所示.

4.1 标准铜网

首先用 10 line/mm 、 20 line/mm 、 50 line/mm 的标准铜网进行了一些实验,均获得了清晰满意的图像. 铜网是一个很有用的样品,由于其衬度相当高,所以利用它帮助摸清条件及积累经验,如图 4(a).

4.2 苍蝇翅膀

由于其衬度较低,所以控制曝光显得尤为重要. 曝光量太大,显影时间难以控制,太低,曝光区与非曝光区的消溶速率比太小,这样图像边缘棱角不突出,图像质量不会高. 经多次实验,得到了较好的图像,从照片上可以看到苍蝇翅膀边缘上细小的绒毛,如图 4(b)所示.

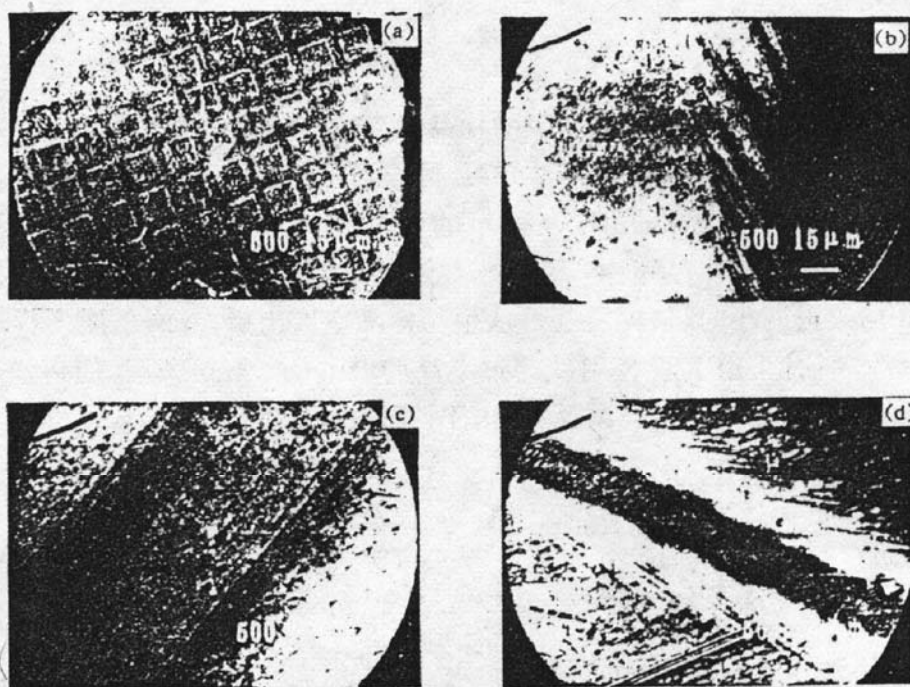


Fig. 4 Replicas of specimen (a) Cu net (501/mm) (b) fly' wing (c) hair (d) ant' s leg. Washed time was about 40 s in a 2 : 1 mixture of MIBK and IPA. Laser energy was one joules/ shot, adding up to 35 shots and pulse length was 50 ps. These photographs were taken by optical microscope and its magnification was 500

4.3 头发

这个样品较成功,它剪下后直接进行实验.从照片上可清晰地看到头发的几层包层,而用光学和电子显微镜不经特殊准备程序是无法看到的,如图 4(c)所示.

4.4 蚂蚁腿

这张照片是将蚂蚁(用对软 X-射线透过率很高的有机薄膜)压在 PMMA 感光胶面上,放入样品室然后再将样品室放入靶室内进行实验的.当实验完后,蚂蚁还可微动,所以这张照片可以说是活蚂蚁的显微照片.从照片上可以比较清楚地看到其腿内部有类似“骨头”状的组织,如图 4(d)所示.

感谢中国科学院西安分院给予的大力支持.杜娟同志对本实验工作给予了很多帮助,在此表示感谢.

参 考 文 献

- [1] R. L. L. Davies, N. A. Flores, J. K. Pye, Developments in contact X-ray microscopy in biomedical research. *J. Microscopy*, 1985, 138(3) : 293~300
- [2] A. G. Michette, P. C. Cheng, R. W. Eason *et al.*, Soft X-ray contact microscopy using laser plasma sources. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 1986, 19 : 363~372

- [3] I. C. E. Turcu, M. C. Gower, C. J. Reason *et al.*, 100 Hz KrF laser-plasma X-ray source. *Proc. SPIE, Excimer Laser and Applications II*, 1991, 503 : 391~405
- [4] H. C. Gerritsen, H. Van Brug, F. Bijkerk *et al.*, Laser-generated plasma as soft X-ray sources. *J. Appl. Phys.*, 1986, 59(7) : 2337~2344
- [5] R. Kodama, K. Okada, N. Ikeda *et al.*, Soft X-ray emission from ω_0 , $2\omega_0$ and $4\omega_0$ laser-produced plasmas. *J. Appl. Phys.*, 1986, 59(4) : 3050~3052
- [6] D. A. McGillis, DELMER L. Fehrs, Photolithographic linewidth control. *IEEE Trans. Electron. Devices*, 1975, ED-22(7) : 471~427

Preliminary study of laser soft X-ray contact microscopy

ZHAO Wei ZHANG Xiaoqou GONG Meixia LIU Xouqin LEI Zhiyuan

(State Key Laboratory of Transient Optics and Technology,

Xian Institute of Optics and Precision Mechanics, Academia Sinica, Xian 710068)

(Received 20 March 1992; revised 29 July 1992)

Abstract

The technology of soft X-ray contact microscopy (SXCM) enables living biological specimens to be imaged at sub-optical resolutions. Using high-power pulsed lasers produced plasma as soft X-ray source for contact microscopy is described in this paper, the resolution of contact micrographs better than is obtained 1 μm is obtained.

Key words soft X-ray contact microscopy, laser plasma, water window.