

# 同步辐射软 X 射线接触显微成像

谢行恕 贾成芝

(中国科学技术大学基础物理中心, 合肥国家同步辐射实验室, 合肥 230026)

**摘 要** 软 X 射线显微术适合于自然状态下生物样品的高分辨率显微成像。软 X 射线接触显微术是 X 射线显微成像方法中最简单也是迄今唯一达到接近理论分辨率的方法。本文阐述软 X 射线接触显微成像的原理和方法, 并报告用合肥同步辐射光源进行软 X 射线接触显微成像的一些实验结果。

**关键词** 软 X 射线, 接触显微术, 同步辐射.

## 1 引 言

长期以来, 光学显微镜和电子显微镜是研究样品显微结构的最常用的工具。光学显微镜使用可见光为光源, 由于受光波波长衍射效应限制, 它的成像分辨率不能超过 200 nm, 而且应用时经常需要对样品进行染色。电子显微镜有很高的仪器成像分辨率, 但是由于电子对于样品的有限穿透力、电子对样品的辐射损伤以及电子散射没有元素区分能力, 这些基于电子成像衬度机制的限制使其成像时要求对样品做诸如切片、染色、固定和脱水等复杂的准备工作, 而且由此可能引入一些成像中不真实因素。因此使得电子显微镜对于观测自然状态下生物样品(特别是活性样品)的应用存在着很大的缺陷。

自从 X 射线发现以来人们就试图以 X 射线为光源组成 X 射线显微镜, 而应用软 X 射线(波长范围大约为 1~10 nm)更合适于样品高分辨率的显微成像。特别是使用“水窗口”波长范围(2.3~4.4 nm), 生物样品中水成份的透明度大约是组织结构(主要是碳、氮等元素组成)透明度的 10 倍, 因此在含水情况下生物样品仍将有很好的图像衬度, 这是电子显微成像衬度所不具备的。七十年代以后, 同步辐射光源、等离子体 X 射线源以及 X 射线激光的发展可以提供高亮度的、可调波长的、以至一定相干性的软 X 射线光源。同时 X 射线光学元件以及探测器研究有了很大发展。它们促使了 X 射线显微成像研究的进展。当前各种软 X 射线显微成像方法研究发展迅速, 并将发展成为一种新的有力的显微成像工具<sup>[1,2]</sup>

软 X 射线接触显微成像是 X 射线显微成像中最简单, 也是迄今为止唯一能达到接近理论分辨率(约 10 nm)的方法。接触 X 射线显微术不需要使用 X 射线光学元件。它最重要的进展是使用了高分辨率的 X 射线抗蚀剂作为探测器以及发展了各种后继观测 X 射线显微图的

\* 合肥国家同步辐射实验室和国家自然科学基金资助课题。

收稿日期:1994 年 10 月 16 日; 收到修改稿日期:1994 年 12 月 22 日

方法<sup>[3,4]</sup>。目前美、英、日等国科学家已使用接触 X 射线显微成像方法得到了高分辨率的 X 射线显微图,并在生物样品的显微成像研究和应用中起到重要作用<sup>[5,6]</sup>。

合肥国家同步辐射光源为软 X 射线显微成像研究提供了极有利的条件。自 1984 年开始进行软 X 射线显微术实验站建设,还使用自建的实验室固定靶软 X 射线光源装置进行了软 X 射线成像方法的研究<sup>[7]</sup>。现在合肥国家同步辐射光源已建成运行。软 X 射线显微术光束线、实验站是它首期建立的五个光束线、站之一。在实验站上装有扫描 X 射线显微镜,并且已应用同步辐射光进行了软 X 射线接触显微成像的实验。本文将介绍在软 X 射线接触显微术方面的工作,说明它的工作原理和方法,以及用同步辐射光进行软 X 射线接触显微成像得到的一些结果。

## 2 原理和方法

接触软 X 射线显微术不需要使用 X 射线光学元件,没有图像直接放大作用。它的成像原理是利用 X 射线对于探测器材料的辐射损伤作用。最常用的探测器是 X 射线抗蚀剂(或称光刻胶),这是一种大分子量的高聚物材料,主要应用在制造大规模集成电路的光刻工艺中。被观测的样品紧贴地放在记录探测器上。样品经过 X 射线“曝光”后在抗蚀剂上记录下损伤图样(潜像)。然后用显影液“显影”,损伤图样转化成抗蚀剂的轮廓变化(复型图)。通过光学或电子显微镜对复型图的观测就得到放大的 X 射线显微图。接触 X 射线显微术的分辨率首先取决于使用的抗蚀剂。如使用 PMMA(一种高分辨率的抗蚀剂材料),在它最好的工作条件下(波长用 4.36 nm,辐射剂量  $10^4$  J/g),能达到的最好分辨率是 5 nm。抗蚀剂的灵敏度与分辨率成反比。使用高灵敏度的抗蚀剂将使达到的分辨率降低。而且实际应用时比理论预计的分辨率降低更多。除了抗蚀剂因素外,影响分辨率的因素还有衍射效应和半影效应。使用同步辐射光源时,它极好的准直性可以将这种半影模糊限制到很小而不足以影响成像分辨率。衍射效应除取决于 X 射线波长外,还与样品到抗蚀剂表面距离有关,它要求样品紧贴在抗蚀剂表面。

软 X 射线接触显微成像技术的一个重要发展就是用透射电子显微镜观测 X 射线显微图。用透射电镜观测不仅可能达到更高的观测分辨率,而且图像直观,更易于辨认和比较。第一种方法是使用  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄窗作为衬底,它的厚度约 100 nm,足以使电子穿透,因此经过显影后的 X 射线图像可以直接用透射电镜观测。第二种方法是“复型复制”方法。抗蚀剂涂敷在玻璃盖玻片上,样品紧贴在抗蚀剂表面。曝光和显影以后,在抗蚀剂倾斜方向蒸镀一层金,然后再在垂直方向镀一层碳。将抗蚀剂-金-碳三层体从玻璃上取下并置于电镜栅网上。将抗蚀剂溶解后,抗蚀剂表面的复型,就留在电镜栅网上可以用于透射电镜的观测。这种方法操作难度较大,但可以得到好的图像质量。作者在实验室试验和使用了这两种技术<sup>[8]</sup>。另外,还进行了制造  $\text{Si}_3\text{N}_4$  膜窗工艺研究并自行制作了实用的  $\text{Si}_3\text{N}_4$  窗。

## 3 实验和结果

### 3.1 实验装置

使用波带片直线单色仪,改变三块波带片可使软 X 射线光束线波长复盖范围为 2.0 nm ~ 5.4 nm。进行软 X 射线接触显微术曝光试验的样品室接在光束线末端,它与光束线真空相

容并能方便地更换样品。实验样品放在一个可更换的样品托上,它有 5 个位置,可同时放置 4 个样品做顺序曝光之用,另一个位置涂有荧光粉用于光束调整对准之用。样品调节用调整杆,在样品室外可以精确地调节并对准到光斑位置。为了进行生物湿样品的显微成像试验,试制了生物湿样品室。图 1 是它的构造示意图和实物照片。样品室设计是需将样品放在空气中,以及保持适当的生理环境能保持生物细胞的存活。

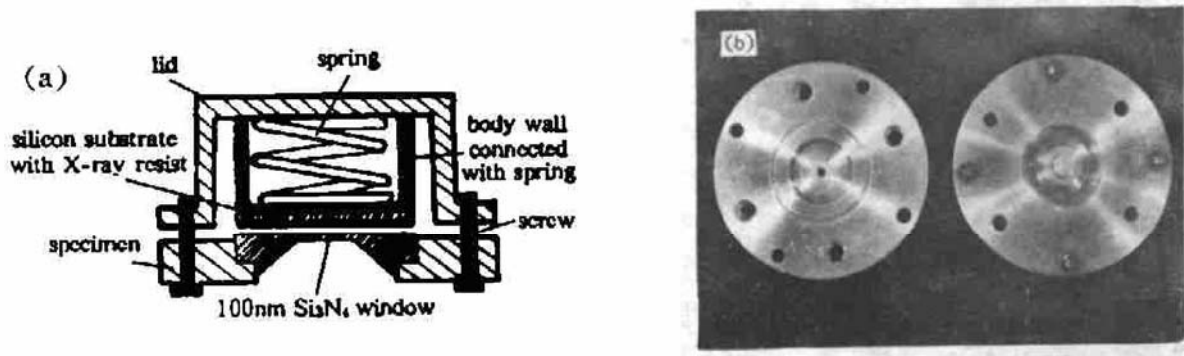


Fig. 1 Wet cell for x-ray image of hydrated biological specimens (a) sketch (b) photograph

### 3.2 实验结果

曾选用了多种样品进行软 X 射线接触显微成像的试验。下面给出一些实验结果和例子。图 2 是蚊翅 X 射线显微图,用同步辐射单色光曝光。波长 3.2 nm, 储存环电流 86 mA, 曝光 30 min。X 射线抗蚀剂为 PMMA(日产)。显影后, X 射线显微图用扫描电镜观测。由图显示样品的最小细节分辨率好于 60 nm。图 3 是人鳞癌细胞组织切片的 X 射线显微图。样品取自人的食管组织切片, 样品厚度 2  $\mu\text{m}$ 。用同步辐射单色光曝光。波长 3.2 nm, 储存环电流 60 mA, 曝光 30 min。抗蚀剂用 PMMA(日产)。X 射线显微图用微分干涉差显微镜观测。由图可以明显分辨出细胞核仁和细胞染色体, 并看出致密胞浆及胞壁排列结构<sup>[9]</sup>。

图 4 是洋葱皮细胞 X 射线显微图。用宽带同步辐射光曝光, 储存环电流 50 mA, 曝光 2 min。X 射线显微图用扫描电镜观测。被测样品为含水状态并保持在空气环境中。图中方框显示  $\text{Si}_3\text{N}_4$  窗口边缘。该实验也证明作者制作的  $\text{Si}_3\text{N}_4$  窗(面积 0.6 mm  $\times$  0.6 mm)能很好承受大气压强, 不致破裂和漏气, 厚度可满足软 X 射线透过率要求。

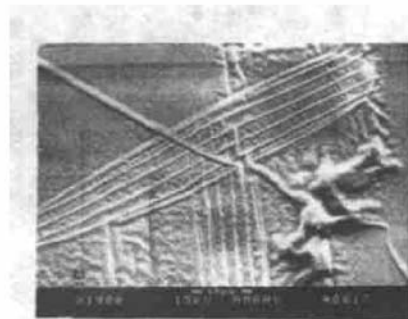


Fig. 2 X-ray image of mosquito wing observed under SEM



Fig. 3 X-ray image of section of human esophagus squamous cell carcinoma observed under differential interference microscope

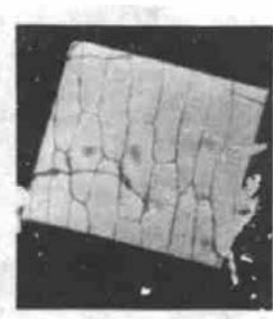


Fig. 4 X-ray image of onion cell (wet) observed under SEM

**结 论** 对于软 X 射线接触显微术进行了较系统的研究和实验, 建立了规范的实验方法(样品准备, 曝光, 显影, 后继观测手段等), 摸索了实验条件和了解了它的技术关键。同时使用

同步辐射光源对于若干样品进行了显微成像实验,取得了一定的结果,为它的实际应用建立了条件。现在还在进行其它软 X 射线显微成像方式的研究试验(包括扫描 X 射线显微术,直接放大成像 X 射线显微术和 X 射线全息术\*),并期望将它们用于生物、医学及其它学科方面的显微成像之中。

作者感谢合肥国家同步辐射实验室和作者所在研究组的同事在同步辐射光源运行及实验工作中给予的帮助及所做的许多工作。感谢解放军 105 医院在生物样品准备和结果分析上给予的帮助。

### 参 考 文 献

- [1] M. R. Howells, J. Kirz, D. Sayre, X-ray microscopies. *Scienti. Amer.*, 1991, **264**(2): 88~94
- [2] 谢行恕, 生物样品的软 X 射线显微术. *物理学进展*, 1992, **12**(3): 333~358
- [3] R. Feder, E. Spiller, J. Topalian *et al.*, High resolution soft X-ray microscopy. *Science*, 1977, **197**(4300): 259~260
- [4] P. C. Cheng, D. M. Shinozaki, K. H. Tan, Recent advances in contact imaging of biological materials. *X-Ray Microscopy Instrumentation and Biological Applications*. ed. P. C. Cheng, G. T. Jan, Berlin. Springer Verlag, 1987: 65~104
- [5] A. G. Michette, X-ray microscopy. *Repts. Prog. in Phys.* 1988, **51**(12): 1525~1606
- [6] K. Shinohara, H. Nakano, M. Watanabe *et al.*, X-ray contact microscopy of human chromosomes and human fibroblasts. *X-Ray Microscopy I*, ed. D. Sayre, J. Kirz, H. Rarback Berlin, Springer-Verlag, 1988: 429~432
- [7] X.-S. Xie, S.-X. Kang, C.-Z. Jia *et al.*, Soft X-ray microscopy at the Hefei Synchrotron Radiation Laboratory. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. (A)*, 1986, **246**: 698~701
- [8] C.-Z. Jia, Z. H. Zhou, X.-S. Xie *et al.*, Observation of an X-ray image by transmission electron microscopy at Hefei. *X-Ray Microscopy in Biology and Medicine*, ed. K. Shinohara *et al.*, Tokyo, Japan Sci. Soc, Berlin: Springer-Verlag, 1990: 247~250
- [9] 郝建, 丛勤滋, 贾成芝等, 食管鳞癌细胞软 X 射线显微成像. *中华物理医学杂志*, 1994, **16**(3): 137~139

## Soft X-Ray Contact Microimaging Using Synchrotron Radiation

Xie Xingshu      Jia Chengzhi

(Center for Fundamental Physics, University of Science and Technology of China

National Synchrotron Radiation Laboratory of Hefei, Hefei 230026)

(Received 16 October 1994; revised 22 December 1994)

**Abstract** Soft X-ray microscopy is mostly suitable for the high resolution imaging of biological specimens in nature or living state. Soft X-ray contact microscopy is the simplest method of imaging in soft X-ray microscopy and the only one to date to obtain the resolution near the theoretical limit. In this paper we interpret the principle and method of soft X-ray contact microscopy and present some experimental results of soft X-ray contact microimaging performed with synchrotron radiation in the National Synchrotron Radiation Laboratory of Hefei.

**Key words** soft X-ray, contact microscopy, synchrotron radiation.

\* 接触 X 射线显微成像的实验技术非常有益于伽伯同轴方式的 X 射线全息图记录。