

真空环境中含水生物样品的软 X 射线 成像研究

蒋诗平 张玉焯 张新夷 付绍军

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室, 合肥 230029)

陈建文 陈 敏 徐至展

(中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)

摘 要 采用了一种简便易行的方法, 在真空环境中进行含水生物样品(植物叶表皮细胞)的软 X 射线显微成像实验, 获得了高分辨率显微图像。与在大气环境中成像相比, 这种方法具有缩短曝光时间和操作更加安全等优点。

关键词 真空, 软 X 射线成像, 含水生物样品。

“水窗”波段(2.3~4.4 nm)的软 X 射线成像非常适用于对含水、甚至是活体生物样品的研究。但由于软 X 射线在大气中易于被吸收^[1], 在大气中进行含水生物样品成像时, 实验所需的时间较长, 难以长时间保持样品中的水分。因此, 减少大气的吸收, 缩短实验所需的时间, 对于实现含水生物样品的软 X 射线成像是非常重要的。合肥同步辐射光源, 虽然它的中心波长(2.4 nm)位于“水窗”波段而有利于软 X 射线显微成像研究, 但是它的光通量较低(到达软 X 射线显微术实验样品处的光通量最大为 $10^6 \sim 10^7$ 光子/秒)^[2], 在进行含水生物样品成像时, 尤其需要避免空气对软 X 射线的大量吸收。本文作者曾将同步辐射软 X 光透过氮化硅窗口引入大气进行含水生物样品的成像研究^[3]。最近, 又设计了另外一种更加安全的方法, 无需将同步辐射软 X 光引入大气即可进行含水生物样品的成像研究。

1 样品及其组合装置的准备

图 1 是本实验所使用的一种简易的组合装置。该装置将含水样品与高真空环境隔开, 氮化硅窗口、样品及其探测器 PMMA (poly-methyl methacrylate) 光刻胶均紧密接触。氮化硅窗口的面积为 $0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$, 厚度为 $0.1 \mu\text{m}$; X 射线探测器 PMMA 膜的厚度是

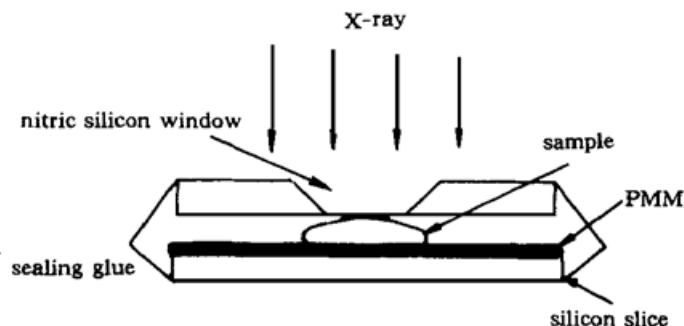


Fig. 1 Experimental setup for soft X-ray images of hydrated samples in a vacuum

* 国家自然科学基金资助项目(No. 19655001)和国家同步辐射实验室开放基金资助项目。

收稿日期: 1998-07-10; 收到修改稿日期: 1998-08-21

0.3 μm(由干涉显微镜测定);硅片的厚度是 0.4 mm。氮化硅窗口与支持物硅片的四周用真空胶密封。将含有样品的该组合装置固定于特制的样品架上后,置于真空曝光室中曝光。

本实验所用样品为一种双子叶植物幼嫩的叶表皮细胞。将叶面上撕下的表皮细胞放入 2.5% 的戊二醛溶液中固定 24 小时,实验时所用样品在普通光学显微镜下检测为单层细胞。

2 含水生物样品的成像与观察

成像实验在国家同步辐射实验室软射线显微术实验站完成。实验所用软X光波长为 2.3 nm,曝光时间为 3.5 小时,同步辐射储存环电流变化从 100 mA 到 60 mA,曝光室中的真空度为 1.6×10^{-3} Pa。曝光结束后,取下组合装置,在普通光学显微镜下观察,发现氮化硅窗口没有破裂。小心去除氮化硅窗口,取下样品置普通光学显微镜下观察并拍摄显微照片(图 2);将曝光后的光刻胶 PMMA 在显影液甲基异丁酮(MIBK)·异丙醇(IPA) = 3:1 中显影 30 秒,用高纯氮吹干,在 PMMA 膜上得到样品的“复型”;将“复型”倾斜、溅射镀金约 20 nm 厚,用扫描电子显微镜观察,结果如图 3 所示。

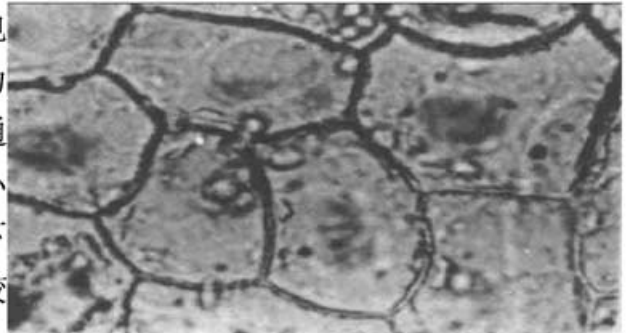


Fig. 2 Micrograph of exposed plant leaf epidermal cells by LM. Water in the sample is still seen

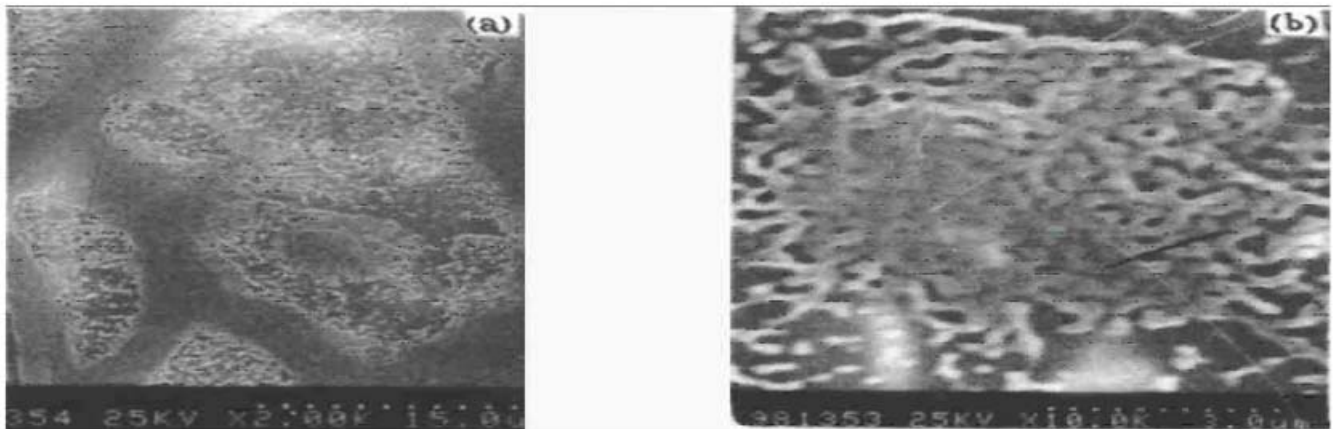


Fig. 3 Soft X-ray images of hydrated leaf epidermal cells under SEM. A whole cell is shown in Photo A (x1 340) and one nucleus of the cell is magnified in Photo B (x6 700)

3 结果与讨论

由图 2 可见,曝光后的样品仍然是含水的。样品上可见少量的水滴,细胞内的结构同干燥后的样品具有明显的不同。这说明氮化硅窗口膜和密封胶可以保持样品内的水分不会散发出来。也就是说,本实验所采用的方法可以实现在高真空环境中进行含水生物样品的软 X 射线成像。图 3 是本次软射线成像的照片。图中可以分辨出该表皮细胞的一些亚微结构[图 3(a)],尤其是细胞核内的结构[图 3(b)]。其成像分辨率明显好于普通光学显微镜的分辨率。

与在大气环境中进行含水生物样品的软 X 射线成像相比,这种方法至少有以下优点:
1) 缩短成像曝光时间。“冰窗”波段的软 X 射线在大气中穿过 1 mm 左右的距离,它的透

过率极小^[1]。这里,用下面的公式作一粗略计算:

$$N = N_0 \exp(-\mu t)$$

N_0 为入射光子数, N 为透过光子数, μ 为吸收系数, t 是穿过物质的厚度。根据文献[1]查得“水窗”波段的软 X 射线在空气中的平均吸收系数 μ 大约为 $2 \times 10^{-3}/\mu\text{m}$ 。当 $t = 1 \text{ mm}$ 时, $N/N_0 = e^{-2}$ 。

在大气中进行成像实验时,为真空安全起见,总是使样品与氮化硅窗口膜相隔一段距离,通常至少 0.5 mm。本实验方法使软 X 射线几乎不经过大气从氮化硅窗口直接到达样品,大大增强了到达样品的软 X 光强度,从而缩短了成像曝光时间。实验结果也证实了这一点,本实验所用时间是 210 分钟,储存环平均束流为 80 mA;而以前在大气中成像则需要 300 分钟,平均束流为 90 mA^[3]。

2) 实验操作更加安全。同步辐射储存环及其光束线内都是高真空的环境(储存环内的真空度达 $1.33 \times 10^{-8} \text{ Pa}$),如果进入大气那就会造成不堪设想的后果。因此,所有实验都必须谨慎行事。本实验所用的方法,即使氮化硅窗口膜破裂也不会破坏光束线和储存环内的真空,非常安全。

3) 这种方法原则上适用于任何一种生物样品,分辨率接近衍射极限。

参 考 文 献

- [1] Michette A G. *Optical Systems for Soft X-Rays*. New York: Plenum Press, 1986. 254~ 269
 [2] Zhang Yunwu, Xu Chaoyin, Xu Xilin *et al.*. Design and construction of soft X-ray microscopy beam-line at HESYRL. *Physica Scripta*, 1990, **41**: 422~ 424
 [3] 蒋诗平,张新夷,阚 娅等. 软 X 射线显微术活体材料成像的实验研究. *光学学报*, 1997, **17**(7): 959

Soft X-Ray Images of Hydrated Biological Samples in a Vacuum

Jiang Shiping Zhang Yuxuan Zhang Xinyi Fu Shaojun

(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230029)

Chen Jianwen Chen Min Xu Zhizhan

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

(Received 10 July 1998; revised 21 August 1998)

Abstract A simple and practicable method was adopted to image the biological samples, plant leaf epidermal cells after being fixed, using soft X-rays in a vacuum environment. The micrographs of their cells were acquired in the experiment. Compared with the image method in air, this method has some advantages such as exposure time decreasing and operation safe.

Key words vacuum, soft X-ray image, hydrated biological samples.