

氦气环境中湿样品软 X 射线显微成像研究*

蒋诗平 张玉焯 张新夷 洪义麟 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 徐至展

(中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)

摘 要 介绍了在国家同步辐射实验室软 X 射线显微术实验站上利用氦气进行软 X 射线显微成像研究的理论依据、实验装置以及实验结果和意义。

关键词 软 X 射线, 显微术, 含水生物样品。

“水窗”波段(2.34~4.37 nm)的软 X 射线显微术可以用来研究含水、甚至活体的生物样品, 它不仅能获得生物样品的高分辨力图像, 还可以研究样品中特定元素的微区分布情况。国家同步辐射实验室储存环电子能量为 0.8 GeV, 其弯铁辐射中心波长为 2.4 nm, 由于该光源的亮度相对较低^[1], 加上软 X 光在大气中穿透深度很小, 因此, 湿样品的成像, 尤其是远场全息成像难以进行。近两年, 我们一直在探索如何更加方便和有效地利用合肥同步辐射光源进行含水生物样品的软 X 射线显微成像实验, 并已取得了一些进展^[2]。本文报道的是利用氦气开展的软 X 射线显微成像的实验结果。

1 理论依据

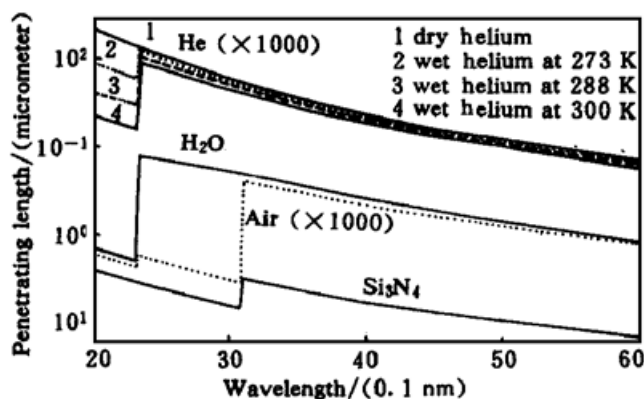


Fig. 1 Curves of penetrating length of X-rays for several materials

图 1 是根据文献提供的数据^[3]和 X 射线穿透深度公式 $t_0 = 1/[\mu(\lambda)\rho]$ 所计算并拟合出的与本研究有关的几种物质中软 X 射线穿透深度曲线。其中 μ 为衰减系数, ρ 为物质的密度。

从图中可以看出相对于空气, 氦气吸收 X 射线的的能力要弱得多, 如在氮元素吸收边(3.1~3.2 nm), X 射线在氦气中的穿透深度可达 42 mm, 而此种情况下空气中只有 0.3 mm; 如在氧元素的吸收边, X 射线在氦气中的穿透深度则超过 100 mm, 而此时在空气中也只有 0.6 mm。因此,

* 国家自然科学基金(No. 19955001)和国家同步辐射实验室开放基金资助项目。

收稿日期: 1999-01-28; 收到修改稿日期: 1999-05-18

在氦气环境中可大大减弱软 X 射线的衰减, 这对软 X 射线成像、尤其是远场全息成像非常有益。另外, 室温下用含饱和水汽的氦气将更有利于含水生物样品的软 X 射线成像。因为室温下水的饱和蒸汽压仅占大气压的 3~ 4%, 所以含饱和水汽的氦气既能保持样品中的水分又不会造成对软 X 射线的大量吸收。

2 实验装置

图 2 是用于氦气环境中软 X 射线显微成像研究的装置示意图。氦气从钢瓶经洗气瓶(含水)到达氦气样品室, 样品室与高真空光束线之间用面积为 $0.3 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm}$ 、厚度约 120 nm 的 Si_3N_4 膜隔开。软 X 射线穿过 Si_3N_4 膜到达氦气样品室即可被使用。

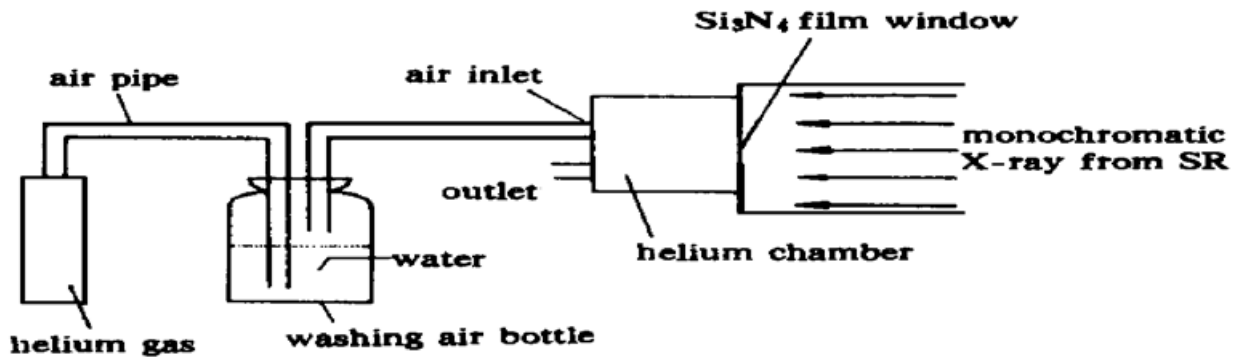


Fig. 2 Experimental setup used to soft X-ray microscopy in helium chamber

3 实验结果与讨论

软 X 射线成像实验的结果非常理想, 特别是样品的曝光时间大大缩短, 所需时间与在真空中曝光几乎相等。例如, 图 3 是人喉癌组织细胞的软 X 射线成像显微图。没有固定和染色的样品放在距 Si_3N_4 膜窗 10 mm 处。记录该图的曝光时间只有 30 min。实验时, 同步辐射储存环束流强度为 80 mA, 所用 X 射线波长约 3.2 nm。与此对照, 同样的束流强度和波长, 在距 Si_3N_4 膜窗 1 mm 处的空气中进行接触成像至少需要 60 min; 如果是几微米厚的生物样品, 在空气中成像则需延长至几小时。曝光时间太长会由于束流光斑漂移、含水样品内部物质的运动所造成的相对位置改变致使成像分辨力下降。这种方法的另一个优点是更有利于拓展软 X 射线显微术的

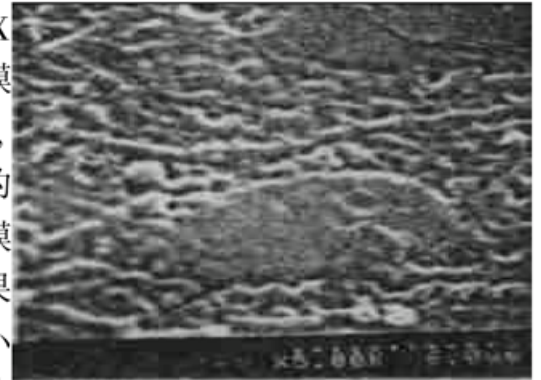


Fig. 3 Soft X-ray micrographs of human laryngocarcinoma tissue by SEM

研究领域。由于 X 射线在其中穿透深度较大, 样品和探测器之间的相对位置的安排可以更加灵活, 不易受空间的约束, 从而有利于拓展研究范围。比如, 在氦气环境中含水样品的远场成像很容易实现, 但在空气中就难以进行。另外, 这种方法真正实现了含水样品的软 X 射线显微成像。以前我们所采用的方法虽然也有可能实现含水样品的成像, 但由于曝光时间太长, 无法给样品补充水分, 往往成功率不高。利用氦气样品室成像既可由于大大缩短了曝光时间有利于保持样品中的水分, 又因为能在供给氦气时给样品补充水分, 从而使这种方法真正能进行含水样品的软 X 射线显微成像实验。值得一提的是: 单从元素对 X 射线吸收系数考虑, 氦气的吸收最弱, X 射线在其中的穿透最深。然而, 氦气属易燃易爆气体, 使用不慎易造

成事故, 故而综合考虑, 以选用氦气为佳。

从图 3 可以看出喉癌组织细胞的核较大而且呈椭球形, 核边缘似乎并不光滑, 核内结构也不均匀。虽然软 X 射线接触显微成像的分辨力可以达到几个纳米的水平, 但由于本实验所用的记录介质光刻胶 PMMA 分辨能力较低, 故该图像的分辨力不理想, 未能获得更多的精细结构信息。但与其它常规显微技术相比, 本实验结果仍然具有其优点: 所用冷冻切片样品无需超薄切片, 厚度达到 $4\ \mu\text{m}$; 且没有固定和染色, 几乎是自然状态的样品。因此, 图像所反映的是样品接近自然状态的真实情况。电子显微镜虽然具有较高的分辨力, 但它们都是在真空中成像, 样品需要固定、脱水、电子染色等, 其图像所反映的结构不一定是样品在自然状态下的本来面目。扫描电子显微镜的图像只能反映的形貌特征, 而不能提供内部结构信息。透射电子显微镜反映样品的是样品内部结构, 但是它的样品制备过程繁琐, 且样品必须很薄(一般为几十纳米)。软 X 射线显微技术由于非常适合于研究自然状态下的生物样品而倍受科学家的青睐。近几年来, 该技术已经取得了突破并且初步应用于生命科学的研究^[4, 5]。可以相信, 随着技术的不断发展与完善, 软 X 射线显微术将在生命科学更多领域的研究中得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Zhang Yunwu, Xu Chaoyin, Xu Xilin *et al.*. Design and construction of soft X-ray microscopy beamline at HESYRL. *Physica Scripta*, 1990, **41**(4) : 422~ 424
- [2] 蒋诗平, 张玉焯, 张新夷等. 真空环境中含水生物样品的软 X 射线显微成像研究. *光学学报*, 1999, **19**(8) : 1150~ 1152
- [3] Henke B L *et al.*. Low-energy X-ray interaction coefficients. *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 1982, **27**(1) : 1~ 144
- [4] Goncz K, Rothman S S. Membrane protein transport in eukaryotic secretion in cells. *Membrane Protein Transport*, 1996, **3**(2) : 279~ 293
- [5] Jacobsen C, Chapman H N, Kirz J *et al.*. Biological microscopy and soft X-ray optics at stony brook. *J. Elect. Spect. & Related pheno.*, 1996, **80**(3) : 337~ 341

Soft X-Ray Microscopy of Wet Samples in Helium Environment

Jiang Shiping Zhang Yuxun Zhang Xinyi Hong Yilin Fu Shaojun
(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230029)

Chen Jianwen Xu Zhizhan

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, the Chinese Academy of Science, Shanghai 201800)

(Received 28 January 1999; revised 18 May 1999)

Abstract Soft X-rays of “water window” waveband is very beneficial to the study of hydrated biological materials. The theoretical basis, experimental setup, experimental results and its significance of the soft X-ray microimaging in helium environment are described. The study is made at Soft X-ray Microscopy Station, NSRL.

Key words soft X-ray, microscopy, hydrated biological materials.