

文章编号 : 0253-2239(2002)01-0118-03

# 原子力显微镜用于软 X 射线接触成像的研究\*

蒋诗平<sup>1)2)</sup> 张玉<sup>3)</sup> 高鸿奕<sup>2)</sup> 陈建文<sup>2)</sup> 张新夷<sup>1)</sup> 徐至展<sup>2)</sup>

(1), 中国科技大学国家同步辐射实验室, 合肥 230029  
(2), 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800  
(3), 复旦大学物理系, 上海 200433

摘要: 论述了在接触显微成像技术中, 后续放大设备对分辨率的影响, 并用实验方法比较了采用光学显微镜和原子力显微镜阅读并放大显微图的结果, 表明采用原子力显微镜放大显微图是一种较为理想的方法。

关键词: 原子力显微镜; 软 X 射线; 接触成像

中图分类号: O434.1 文献标识码: A

## 1 引 言

X 射线接触成像是 X 射线显微术中最简单也是迄今获得最高成像分辨率的一种方式。而且, 接触成像的实验技术也可应用于 X 射线伽博(Gabor)同轴全息实验研究<sup>[1,2]</sup>。典型的接触成像是个两步成像过程——记录和放大。其中的每一步都会影响显微成像的分辨率, 特别是记录介质和放大设备的自身分辨能力更是成像分辨率的决定因素。目前比较常用的放大设备是电子显微镜。但是, 一般的扫描电子显微镜虽然具有很高的横向分辨率, 然而由于受其纵向分辨率的限制而需要被观察的样品具有较大的形貌起伏。X 射线接触成像的衬度是样品不同部位对 X 射线吸收差异产生的。对于生物样品来说, 微小的局部区域对 X 射线的吸收差异可能很小, 以至于在光刻胶上不会产生太大的起伏, 利用扫描电镜往往难以获得高分辨率的显微图像。另外, 光刻胶上的图形在电子束的轰击下也很容易被损伤。利用透射电子显微镜来观察光刻胶上的图形虽然分辨率有可能较高, 但是操作非常不方便。然而, 原子力显微镜(AFM)具有原子水平的横向和纵向分辨率, 而且又不需要对其样品进行特殊处理。因此, 它适合于 X 射线接触成像的后续放大。

## 2 结果与讨论

我们曾用光镜、扫描电镜和原子力显微镜读同

一光刻胶 PMMA 上的接触图像。但由于光刻胶起伏太小, 未能获得电镜放大的图像。图 1 是光学显微镜下植物细胞的软 X 射线接触成像(SXCM)显微图, 图 2 和图 3 是原子力显微镜下该细胞部分结构的软 X 射线接触成像显微图。光镜放大的显微图是用 CCD 拍摄的。图中可分辨出细胞壁、细胞核以及细胞质等结构, 但是难以分辨其超微结构。图 2 是该细胞的细胞核部分的软 X 射线接触成像显微图。整个图像仅是细胞核的一部分。图中可见细胞核中的细微结构, 右下方的圆形结构是核仁, 核仁中央部位对 3.2 nm 的 X 射线的吸收明显不同于核仁周边, 核仁与核质部分的界限不是非常清楚, 而且核质结构也有细微的差别。图 3 是这一细胞的细胞质的一部分。图中显示细胞质结构不均匀, 而且内质网明显可见。受光刻胶的分辨能力限制, 因此难以获得更加精细的结构信息。



Fig.1 Soft X-ray contact micrograph of a plant cell. The picture is taken with CCD camera under an optical microscope. Cell walls, cytoplasm and a cell nucleus are seen in the picture.

\* 国家自然科学基金(19655001)和合肥国家同步辐射实验室开放基金资助课题。

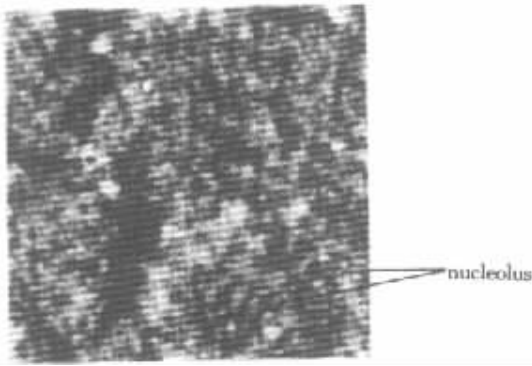


Fig.2 Soft X-ray contact micrograph of part of the nuclear by an atomic force microscope ( $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ). The circular at the right bottom may be a nucleolus

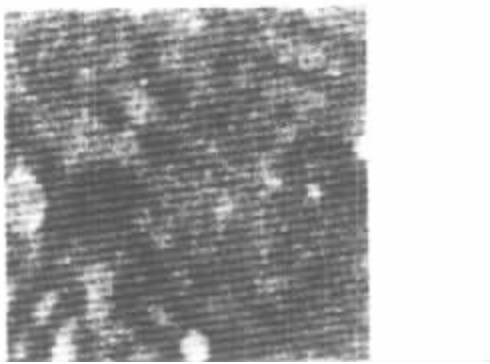


Fig.3 Soft X-ray contact micrograph of the cytoplasm amplified by an atomic force microscope ( $2 \mu\text{m} \times 2 \text{mm}$ )

利用光镜和电子显微镜读出光刻胶上图形有其明显的不足之处,但是原子力显微镜作为软 X 射线接触成像中的放大工具就具有多方面的优势,至少有下面几点:

1) 原子力显微镜是具有极高分辨率的显微技术,而软 X 射线显微术具有能对含水、甚至活体生物样品成像的优势<sup>[3,4]</sup>。将二者结合起来,就比较容易地获得自然状态下生物样品的高分辨率显微图像。但是,尽管软 X 射线显微术有接触、扫描、波带片直接成像以及全息等几种成像方法<sup>[5]</sup>,可由于波带片等光学元件以及 X 射线探测器制造技术的限制,除用 PMMA 作为探测器的接触成像外,目前其它方式的显微成像分辨率都不太高。就目前发展得较好的软 X 射线扫描透射显微镜来说,其最好分辨率也在几十纳米。影响 X 射线扫描显微镜分辨率的主要因素是由微波带片聚焦的 X 射线光斑大小和样品扫描台机械调节精度。就目前的制造技术而言,这些因素都难以保证获得优于几十纳米的成像分辨率。聚焦光斑的线度取决于波带片的最外环宽度,目前,分辨能力最高的 X 射线微波带片的最外环宽度约是 25 nm。即该波带片的理论极限分辨本

领约是 30 nm<sup>[6]</sup>。而实际应用时,由于受诸多实验条件的影响,要获得这一分辨率的实验结果常常是比较困难的。

2) 与其它的高分辨显微镜相比,原子力显微镜不仅具有原子级的横向分辨率而且具有原子级的纵向分辨率,它可分辨出样品表面极小的起伏<sup>[7]</sup>。因此,对于使用 PMMA 作为探测器的接触成像来说,用于曝光的时间就可以大大缩短。这对于含水样品,尤其是活性生物样品的软 X 射线成像是非常有利的,既减少了水分的散失,又减少了辐射损伤。

3) 用原子力显微镜观察光刻胶 PMMA 上的图形时非常简单,不像电镜那样需要镀膜等处理,可直接观察。因此,不存在辐射损伤 PMMA 的问题。这对于获得高分辨率图像也是非常重要的。

4) 目前的原子力显微镜都带有功能很强的图像处理系统,使用者可非常方便地获得适合不同需要、便于储存、加工和传送、更加精美的数字化图像。

原子力显微镜读图的不足之处主要是不能象光学显微镜、电子显微镜那样边观察边移动样品。

作者感谢东南大学分子与生物分子电子学实验室朱纪军博士和沈耀春教授为原子力显微镜实验提供帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang Yuxuan, Jiang Shiping, Fu Shaojun *et al.*. In-line soft X-ray holographic image and digital reconstruction at "water window" wavelength region. *Acta Optic Sinica* (光学学报), 1997, **17**(11):1599 ~ 1600 (in Chinese)
- [2] Howells M, Jacobsen C, Kirz J *et al.*. X-ray holograms at improved resolution: A study of zymogen granules. *Science*, 1987, **238**(4826):514 ~ 517
- [3] Magowan C, Brown J T, Liang J *et al.*. Intracellular structures of normal and aberrant Plasmodium falciparum malaria parasites imaged by soft X-ray microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Cell Biology*, 1997, **99**:6222 ~ 6227
- [4] Jacobsen C. Soft X-ray microscopy. *Trends in Cell Biology*, 1999, **9**:44 ~ 45
- [5] Chen J W, Xu Z Z, Zhu P P *et al.*. X-ray holography. *Progress in Physics* (物理学进展), 1995, **15**(2):135 ~ 147 (in Chinese)
- [6] Medenwaldt R, Abraham-Peskir J, Uggerj E. X-ray microscopy in aarhus with 30 nm resolution. *Synchrotron Radiation News*, 1998, **11**(4):38 ~ 41
- [7] Jiang Shiping, Zhang Yuxuan, Zhang Xinyi *et al.*. Soft X-ray holographic microscopy with sub-micrometer resolution. *Acta Optic Sinica* (光学学报), 1999, **19**(12):1709 ~ 1710 (in Chinese)

## Soft X-Ray Contact Microscopy by an Atomic Force Microscope

Jiang Shiping<sup>1),2)</sup> Zhang Yuxuan<sup>3)</sup> Gao Hongyi<sup>2)</sup> Chen Jianwen<sup>2)</sup>  
Zhang Xinyi<sup>1)</sup> Xu Zhizhan<sup>2)</sup>

(1), *National Synchrotron Radiation Laboratory, The University of Science and Technology of China, Hefei 230029*  
(2), *Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*  
(3), *Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433*

( Received 15 September 2000 ; revised 20 February 2001 )

**Abstract :** The instruments for reading relief in the photoresist related with the resolutions of soft X-ray contact microimaging are described. Comparing the micrographs made by an atomic force microscope with that by optical microscopes experimentally, the conclusion can be drawn that the atomic force microscope is a very good method for amplifying the images in the resists.

**Key words :** atomic force microscope ; soft X-ray ; contact imaging