

软X射线显微成像

谢行恕

(中国科学技术大学 基础物理中心)

摘要: 软X射线显微成像技术为研究生物显微结构开辟了一条新的途径,突破了光学显微镜和电子显微镜在应用上的某些限制。本文评述了软X射线接触显微镜、软X射线成像显微镜、软X射线扫描显微镜以及三维软X射线显微成像和X射线全息术,并介绍了中国科技大学在软X射线接触显微成像方法研究中所取得的成果。

一、引言

生物学家早就梦想有一种显微工具,它可以观察自然状态下的生物样品,分辨率达到或接近分子水平,可以看到活细胞和细胞器的超微结构以至其内部的动态变化。高亮度的软X射线光源(同步辐射、X射线激光等)、高分辨率软X射线光学及高灵敏度、高速的X射线探测器的的发展已使我们可能做成这样一种显微工具,它就是软X射线显微镜。

长期以来,光学显微镜和电子显微镜是研究生物显微结构的最常用工具。光学显微镜使用可见光为光源,由于受波长衍射效应的限制,它的成像分辨率不能超过 2000 \AA ,而且常常需要对样品进行染色。电子显微镜虽然有很高的仪器分辨率,但研究生物样品时仍遇到许多困难。为此,电镜学家采用了许多样品的准备方法如脱水、固定、切片及染色等等。这不仅不可能实现在自然状态下观测生物样品,而且由于人为性的样品准备因素破坏了样品的原始状态,使得人们对观测的真实性保持有一定的疑问。

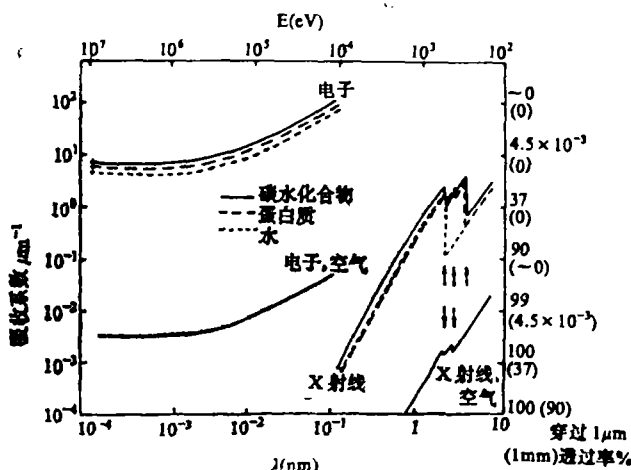


图1 X射线的线性吸收系数和电子散射系数

软X射线显微成像技术开辟了一条新的途径。由于软X射线与物质相互作用的特点使之适用于较厚的生物样品（厚度到几个 μm ，它是典型的完整细胞线度），不需脱水、切片和染色。因此可能直接观察活的生物样品(图1)。在辐射损伤允许的剂量下分辨率仍可达到 100 \AA 。使用同步辐射产生的单色、可调软X射线可以实现对样品的高分辨率微区元素分析。应用软X射线全息等方法还可以做到三维立体成像。

当前，美、德、日、英、法、苏等国的科学家都正在积极研制各种形式的软X射线显微镜，并应用生物、医学的样品进行试验，取得了显著的进展。过去十年中世界范围内从事高分辨X射线显微镜研制的工作增长了一个数量级，而将其应用于生物及医学的研究工作也增长了5倍以上。预计今后十年内各种软X射线显微成像方法将会日趋完善，能够实现活细胞的实时成像，分辨率达到 100 \AA 。这将是九十年代软X射线光学技术研究的一项重要成果。它对于生物，医学及其它科学（冶金、陶瓷、薄膜、地质等）必将发挥重要作用，产生重要的社会及经济意义。

二、高分辨率软X射线显微镜

1. 软X射线接触显微成像

软X射线接触显微术是软X射线显微成像中最简单、但也是迄今唯一能达到理论分辨率极限的方法，原理如图2所示。试验样品紧贴着放在对于软X射线灵敏的探测器上（如X射线光刻胶）。经过软X射线“曝光”及“显影”后在光刻胶上留下辐射损伤的图样。通过光学或电子显微镜可以读出X射线显微图。近期的发展主要是使用了高分辨率的X射线光刻胶（如PMMA）作为探测器及应用高分辨率电子显微镜，特别是透射电镜读出图像。软X射线接触显微术的分辨率极限是衍射效应和光刻胶材

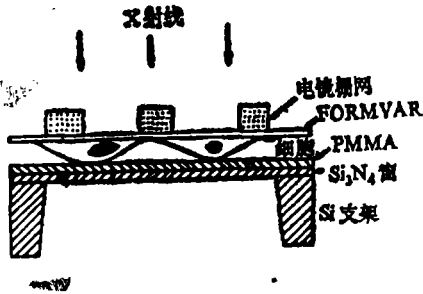


图2 软X射线接触显微成像装置示意图

料分辨率的综合效果。衍射效应分辨率为 $(\lambda S)^{1/2}$ ，其中 λ 为使用波长， S 为样品到探测器表面的距离。

软X射线接触显微术的另一种形式是使用光阴极为探测器，再用电子光学系统对发射的电子进行成像，因而可以做到实时成像。在法国ACO电子贮存环上装置的这台软X射线显微镜分辨率达到 500 \AA 。

2. 软X射线成像显微镜

软X射线成像显微镜是光学显微镜的模拟。它使用软X射线光学元件（衍射元件或反射镜）为聚光及成像元件，将软X射线投射到样品上，再成像到像平面上（装置二维探测器）从而得到直接放大的软X射线显微图。图3是装置在柏林BESSY同步辐射光源上的Gottingen大学软X射线成像显微镜光路安排示意图。它使用X射线波带片作为主要的X

射线光刻胶)。经过软X射线“曝光”及“显影”后在光刻胶上留下辐射损伤的图样。通过光学或电子显微镜可以读出X射线显微图。近期的发展主要是使用了高分辨率的X射线光刻胶（如PMMA）作为探测器及应用高分辨率电子显微镜，特别是透射电镜读出图像。软X射线接触显微术的分辨率极限是衍射效应和光刻胶材

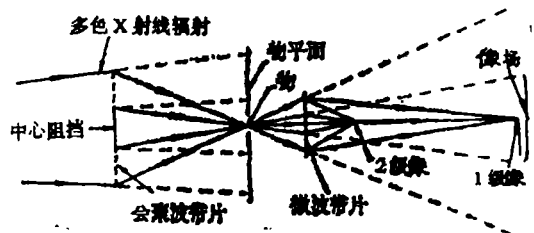


图3 Gottingen大学软X射线成像显微镜光路安排示意图

射线光学元件。图中会聚波带片和针孔组成线性单色器，从同步辐射光源中得到单色的软X射线并投射到样品上。单色仪的波长带宽为 $\Delta\lambda \sim 2d\lambda/D$ ，其中 D 为会聚波带片直径， d 为针孔直径。当工作在波长 $\lambda = 45 \text{ \AA}$ 时， $(\lambda/\Delta\lambda) \sim 225$ 。被单色软X射线照射的样品经过微波带片得到放大的X射线图。在成像平面上用照相底片、微通道板阵列或 CCD 探测器记录。使用波带片成像的软X射线显微镜需用单色软X射线照射，所得X射线显微图的分辨率取决于使用微波带片的最外环宽度。目前他们使用的微波带片主要参数为： $r_1 = 1.76 \mu\text{m}$ ， $r_N = 27.8 \mu\text{m}$ ， $N = 251$ ， $\Delta r = 560 \text{ \AA}$ 。Gottingen大学软X射线成像显微镜的分辨率为 500 \AA ，放大倍数500倍，它是目前世界上性能最好的软X射线成像显微镜。软X射线成像显微镜不需使用相干X射线辐射。曝光时间短，因而可以使用脉冲软X射线光源。它的缺点是由于低效率的X射线光学元件置于样品之后，从而，使样品所受辐射剂量加大，这对生物样品的辐射损伤是极为不利的。最近Gottingen大学的Schmahl和Rodolph提出使用相位衬度组成X射线成像显微镜，它对于扩展使用X射线波长范围及减少样品的辐射损伤都是极为有利的，但它至少需要中等程度的相干X射线辐射。

3. 软X射线扫描显微镜

软X射线扫描显微镜是使用软X射线光学元件（波带片或反射镜系统）将软X射线聚焦成一微束并投射到被观测的样品上。X射线束对样品按电视光栅形式相对扫描，通过探测透射样品的软X射线强度，从而做出样品的X射线显微图。图4是装置在美国NSLS同步辐射光源上的Stony Brook大学软X射线扫描显微镜的聚焦光路示意图。它使用切趾微波带片将软X射线聚焦成微小斑点，并在焦平面上去除零级辐射。软X射线扫描显微镜的分辨率取决于聚焦光斑的大小，因而取决于聚焦光学元件的性能。为了达到衍射极限性能，聚焦元件必须由空间相干的X射线辐射照射。而如果聚焦元件使用波带片则还需用单色(时间相干)的X射线辐射。Stony Brook大学的软X射线扫描显微镜现装置在NSLS的Undulator光束线上，它并使用光栅单色仪得到 $(\lambda/\Delta\lambda) \sim$

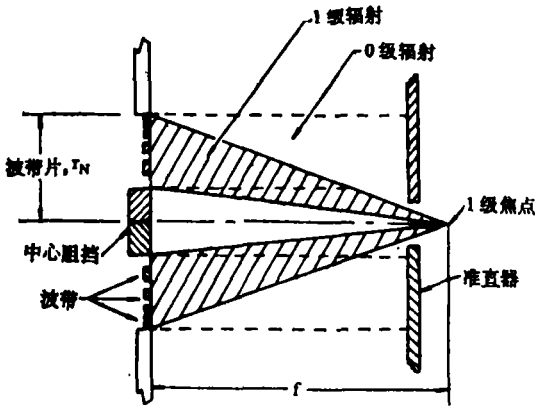


图4 Stony Brook大学软X射线扫描显微镜波带片聚焦光路示意图

500的单色软X射线。目前他们使用的波带片最外环宽度为 400 \AA ，在波长 $\lambda = 32 \text{ \AA}$ 时成像，所得扫描显微图像分辨率约为 500 \AA ，这是目前世界上软X射线扫描显微镜的最好性能。由于在软X射线扫描显微镜中低效率的X射线光学元件均置于样品的前方，且使用的探测器（多为正比计数器）探测效率高，因此可以大大减小样品所受辐射损伤。扫描显微镜的记录方式也极易得出数字图像，这使它非常容易地做出样品的微区元素分析。软X射线扫描显微镜的缺点是由于它是逐点记录得出图像，因此它不能使用单次闪光式脉冲光源，而且相对来说成像时间较长。

替代记录透射样品的软X射线而记录样品产生的荧光辐射或光电子，这就组成了扫描荧光显微镜或扫描光电子显微镜，它们在材料和表面科学研究中都是十分有意义的。

替代记录透射样品的软X射线而记录样品产生的荧光辐射或光电子，这就组成了扫描荧光显微镜或扫描光电子显微镜，它们在材料和表面科学研究中都是十分有意义的。

三、三维软X射线显微成像、X射线全息术

D. Gabor 在1948年提出全息原理时就想像能把它应用到显微术中。但是由于在X射线范围内缺乏高度单色的、准直的及高强度的光源使得X射线全息成像的研究受到限制，在几乎三十年中进展极其缓慢。八十年代以后情况开始改变，这主要是由于软X射线范围内高亮度及相干性光源的出现，包括同步辐射光源插入件 Undulator 辐射及X射线激光器。1987年有几个研究组分别报告了他们使用 Undulator 辐射和X射线激光器完成的X射线全息成像实验，成像分辨率达到优于亚微米的水平，他们的实验结果是非常令人鼓舞的。

图5是M. Howells等在美国NSLS的Undulator光束线上进行的Gabor方式全息试验示意图。为了完成全息图记录，对X射线辐射相干性的要求是

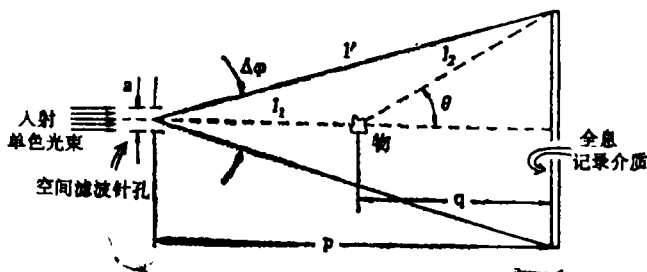


图5 Gabor方式X射线全息试验示意图

$$\lambda^2 / \Delta\lambda [(l_1 + l_2) - l']_{\max} \quad (\text{时间相干性})$$

$$\lambda > a \Delta\varphi / 2 \quad (\text{空间相干性})$$

其中 $\Delta\lambda$ 是波长宽度， a 是针孔直径， $\Delta\varphi$ 是发散角， $[(l_1 + l_2) - l']_{\max}$ 是散射波和参考波间最大光程差。衍射极限分辨率 δ （横向）及 Δ （纵向）将分别为

$$\delta \sim \lambda / \theta$$

$$\Delta \sim \lambda / 2\theta^2$$

其中 θ 为散射辐射在全息图上最大收集半张角。

Howells等使用NSLS的 Undulator 辐射 $\lambda = 24.7 \text{ \AA}$ ，使用光栅单色仪得到波长分辨率 $\lambda / \Delta\lambda \sim 700$ ，从而给出相干长度 $(\lambda^2 / \Delta\lambda) \sim 1.8 \mu\text{m}$ 。针孔直径为 $50 \mu\text{m}$ ，且在样品前 1.74m ，从而提供样品上的空间相干辐照。全息图记录在 2000 \AA 厚的PMMA光刻胶上，它置于样品后方约 $400 \mu\text{m}$ 处。他们使用数值再现方法实现了全息图再现。再现图像分辨率优于 1000 \AA 。

D. Joyeux等在法国ACO同步辐射光源也用 Undulator 辐射进行了类似Gabor方式的X射线全息成像实验。他们使用波长为 100 \AA 的软X射线进行全息图记录，并用He-Ne激光器做全息图再现，得到的分辨率为 $0.5 \mu\text{m}$ 。另外一个很有意义的X射线全息成像实验是由Trebes等在LLNL用Se X射线激光器为光源进行全息图记录，并使用He-Ne激光器再现，分辨率约为 $5 \mu\text{m}$ 。虽然它达到的分辨率还很差，但是很有意义的是它的装置简单性已可能象可见光全息术那样进行了。

X射线全息术作为高分辨率X射线成像方法进行实际应用许多问题还有待研究。除了高亮度及相干性的X射线光源外，对于样品所造成的辐射损伤以及全息图再现中的问题都有待

解决。利用X射线光学元件的发展（如波带片）进行Fourier变换方式的全息记录将有利于得到更好的X射线全息成像的结果（图6），这方面的试验已在进行中。在九十年代人们期望能够使用X射线全息成像方法进行活细胞的成像，并使得分辨率好于500 Å。

四、工作展望

中国科技大学建立的800兆电子伏特同步辐射光源为软X射线光学的研究和应用提供了极有利的条件。已经建立起的一条软X射线光束线将可进行各种软X射线显微成像的研究。它的波长范围在20—25 Å连续可调，波长带宽0.2 Å。拟议中建立的Undulator光束线将可提供高亮度及相干性的真空紫外及软X射线辐射。同时我们建立起的固定靶软X射线源可用于软X射线光学元件及系统的调试。

我们对于软X射线接触显微成像方法进行了较为系统的研究，做出了生物细胞的软X射线显微图（图7）。它使我们对于X射线显微图像的特征有了一定认识。同时实验方法中对PMMA光刻胶的研究及Si₃N₄薄膜窗的研制对X射线全息图的记录也奠定了基础。我们拟议中开展X射线全息图记录及全息图再现的研究。

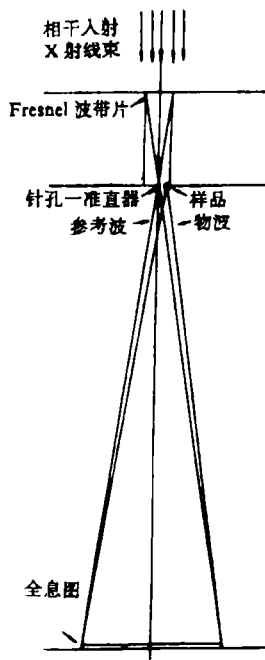


图6 Fourier变换方式 X射线全息示意图



图7 黑色素瘤的X射线显微图，PMMA复型用透射电镜观测。

我们正在研制初型的软X射线扫描显微镜，它将研制高分辨率及高效率的软X射线扫描显微镜建立基础。我们期望其分辨率能优于1000 Å（好于光学显微镜分辨率），它将对生物样品的显微结构及微区元素分析的研究起到十分有意义的作用。

参 考 文 献

[1] G.Schmahl etc. eds., X-ray Microscopy, 1984
 [2] P.C.Cheng etc. eds., X-ray Microscopy, Instrumentation and Biological

Applications, 1987

- [3] D.Sayre etc.eds., X-ray Microscopy II, 1988
- [4] K.Shinohara etc.eds., X-ray Microscopy in Biology and Medicine, 1990
- [5] D.Attwood etc.eds., X-ray Microimaging for the Life Science, 1989
- [6] N.M.Ceglio, Revolution in X-ray Optics, In, X-ray Science and Technology 1, 1989
- [7] X.S.Xie, Status of Soft X-ray Microscopy Project at Hefei, In, Proceedings of International Conference on SR Applications, 1990

Microscopic Imaging of Soft X-ray

Xie Xingshu

Abstract

Soft X-ray microscopy is a promising project about which researches have been intensively carried out in many laboratories around the world. Some current researches and up-to-date results are described in this paper with the attention of using zone plate as imaging elements, and the 3-dimension soft X-ray holography and its applications are also introduced. Progress in the near future is discussed.