

软 X 射线接触式显微术抗蚀膜 显影条件分析*

刘毅楠 王占山 李 哲 曹健林

(中国科学院长春光学精密机械研究所应用光学国家重点实验室, 长春 130022)

林宜平

(福建省劳动卫生研究所, 福州 350001)

摘要 按照生物样品各分辨单元具有多种透过率的特点, 设计了一个多衬度的台阶状蛋白质模型, 模拟各台阶的真实成像条件, 测量了各台阶所对应的抗蚀膜显影速率曲线, 对显影条件作了定量分析, 并将显影条件与分辨率紧密结合起来, 找到了一种较好的定量确定显影条件的方法。

关键词: 软 X 射线接触式显微术; 生物样品; 抗蚀膜; 显影条件

1 引 言

长期以来, 光学显微镜和电子显微镜是研究生物样品结构的最常用工具。光学显微镜使用可见光照明, 受衍射效应的影响, 成像分辨率不能超过 200 nm; 电子显微镜具有极高的分辨率, 但样品必须经过脱水、干燥、染色、超薄切片等处理, 要研究活体生物样品具有极大困难。在软 X 射线波段, 各种生命物质的线吸收系数为 μm^{-1} 量级, 软 X 射线可以穿透几个微米厚的生物样品; 同时各元素在此波段存在大量共振态, 可以通过选择波长得到满意的衬度, 并利用此区域的吸收限进行定量分析。尤其重要的是, 在 2.3–4.4 nm 波段, 各生命物质和水的吸收系数相差约一个数量级, 可以认为水是透明的, 因而可以观察含水的活体生物样品^[1]。

用软 X 射线显微术观察生物样品时, 不需要脱水和染色就可以获得很好的衬度, 这对于排除水的本底干扰, 实现自然状态下的生物活体的高分辨显微观察具有特殊意义。正是由于软

X 射线显微术具有这种独特的优点, 才使它填补光学显微镜和电子显微镜之间的空白成为可能, 并发展成为一种重要的研究和检测工具。

2 软 X 射线接触式显微术原理

接触式显微术是目前软 X 射线成像方法中最简单也是分辨率最高的一种方法。其结构如图 1 所示。这种显微术的原理在于: 软 X 射线与物质相互作用过程中, 弹性散射和非弹性散射相对于光电吸收可以忽略不计, 因此当以平行的软 X 射线照射生物样品时, 可以通过观察透过各分辨单元的软 X 射线的强度变化来获得各分辨单元在光束传播方向的透射率变化, 进而得知样品内部结构及成分等信息。这种方法有以下四个基本步骤: 1) 将样品紧贴在抗蚀膜上; 2) 以适当的曝光量曝光; 3) 将抗蚀膜进行显影处理; 4) 用光镜、电镜或原子力显微镜对抗蚀膜图形进行放大观察。决定这种显微术分辨率的客观因素有: 衍射效应、半影模糊、光刻胶的分辨本领、曝光量、辐射损伤等^[2]。

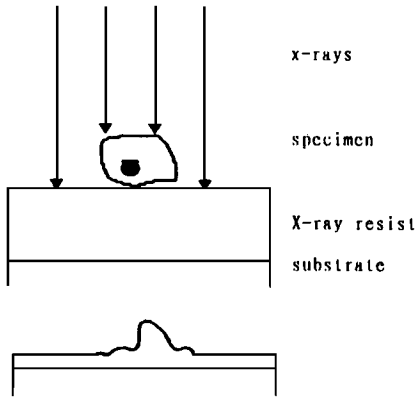


Fig. 1 Soft X-ray contact microscopy

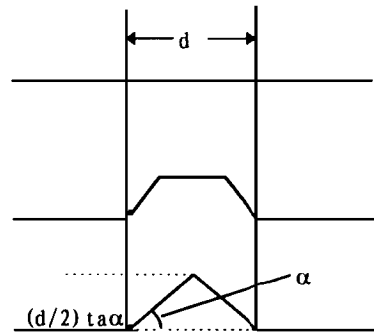


Fig. 2 Profile of a feature in the resist after three different depths of development

在实验中, 我们注意到, 这种显微术有一个不足之处, 就是最后放大观察的不是样品本身, 而是抗蚀膜的显影图形。因此, 抗蚀膜的显影图形能否代表生物样品的原貌, 对成像质量有重要影响, 这就决定了在成像过程中有一个影响分辨率的重要人为因素——显影条件的控制。这种影响包括两个方面: 一种为欠显影, 一种为过显影。欠显影是由于显影量不够造成的, 此时样品经曝光后在抗蚀膜上的潜影没有完全显露出来, 不能真实地反映样品的原貌。除此之外, 最容易发生的就是在显影过程中的侵蚀效应造成的过显影。显影液对曝光区域有较大的溶解速度, 对非曝光区域也有较小的溶解速度。如图 2 所示, 在正常情况下, 先暴露的轮廓的侧壁会发生侵蚀, 边缘成斜坡状。如果显影量过大, 则会造成细节损失, 达不到所要求的分辨率。目前, 显影量的控制基本是依靠实验者的经验来完成的, 很难保证显影条件恰好能够满足分辨率的要求^[3]。在本文中, 我们根据建立的模型, 通过实验的方法, 定量地确定了最佳显影条件, 将显

影条件与软 X 射线接触式显微术的分辨能力有机地结合起来。

3 样品模型的建立

软 X 射线接触式显微术最后得到的结果实际是各分辨单元的透过率图形。当以光强为 I 波长为 λ 的软 X 射线对生物样品成像时,任一分辨单元对软 X 射线的透过率都是光束传播过程中各种生命物质综合作用的结果。为简化讨论,我们仅以一定厚度的一种生命物质(本文选为蛋白质)来代表一个分辨单元对软 X 射线的吸收作用,换算公式为:

$$T = \exp(-\alpha_{\text{蛋白质}} * d_{\text{蛋白质}})$$

其中, T 为某一分辨单元的透过率, $\alpha_{\text{蛋白质}}$ 为蛋白质对波长为 λ 的软 X 射线的线吸收系数, $d_{\text{蛋白质}}$ 为这个分辨单元所等效的蛋白质的厚度。

生物样品的特点是具有复杂的结构及成分,各分辨单元具有多种透过率,即每个分辨单元对应的蛋白质厚度是不相同的。为反映生物样品具有多种衬度的特点,我们通过两种方法建立生物样品模型。第一种模型为等差透过率台阶模型,各台阶对应的蛋白质厚度呈对数关系变化;第二种模型为等间距台阶状蛋白质模型,各台阶对应的透过率呈指数关系变化。这两种模型本质上是等效的,我们仅以第二种模型为例讨论显影条件。

我们在实验中采用 Henke 源曝光, $\lambda = 4.4 \text{ nm}$ (实际上本方法对任何单色光源均适用),蛋白质的线吸收系数为 $\alpha_{\text{蛋白质}} = 0.52 \mu\text{m}^{-1}$ 。在等间距台阶状蛋白质模型中各台阶高度分别为 $0 \mu\text{m}$ 、 $0.5 \mu\text{m}$ 、 $1 \mu\text{m}$ 、 $1.5 \mu\text{m}$ 、 $2 \mu\text{m}$,对应透过率分别为 1 、 0.77 、 0.6 、 0.45 、 0.35 。其中 $0 \mu\text{m}$ 代表完全透光处, $2 \mu\text{m}$ 代表透过率最小的分辨单元(当然随着样品的变化,模型的厚度可适当增加)。

当以 Henke 源曝光 15 h ,各台阶对应抗蚀膜曝光时间分别为: $H_{0\mu\text{m}} = 15 \text{ h}$, $H_{0.5\mu\text{m}} = 12 \text{ h}$, $H_{1\mu\text{m}} = 9 \text{ h}$, $H_{1.5\mu\text{m}} = 6.75 \text{ h}$, $H_{2\mu\text{m}} = 5.2 \text{ h}$ 。

4 显影条件的确定

在显影过程中,显影条件包括三个因素:温度、显影液浓度、显影时间。在一定曝光量下,温度越高、显影液浓度越大、显影时间越长,则抗蚀膜的显影量越大。为讨论方便,我们在恒温 20 的条件下进行显影过程。

1) 显影浓度的确定

抗蚀膜(PMMA)的显影液一般是由良溶剂(对任何分子量的抗蚀膜都能很好地溶解,只存在速率的不同)与非溶剂按适当比例配制而成的混合溶液。PMMA 的良溶剂是甲基异丁基酮(MIKB),非溶剂是异丙醇(IPA)。显影液浓度对显影速率有重要影响,为了确定合适的显影液浓度,我们分别配制了 MIKB:IPA = 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 的混合溶液^[4]。

在实验过程中,最大曝光量为 15 h ,针对五种比例的显影液曝光五片 15 h 的空白抗蚀膜。用特殊方法设置一个基准,采用分段式重复显影的方法,每显影 15 s 就放在 Talystep 台阶仪上测量台阶。结果发现用 MIKB:IPA = 3:1, 2:1 的显影液显影时,抗蚀膜显影过快,难以控制显影质量,而 MIKB:IPA = 1:2, 1:3 的显影液显影速度又过于缓慢,故选择 1:1 的显影液

完成整个实验。

2) 显影时间的确定

对于曝光时间为 15 h、12 h、9 h、6.75 h、5.2 h 的各空白抗蚀膜用 1:1 的显影液显影,每隔 15 s 取三个点测三个台阶,取其平均值作图。由图 3 可见,在不考虑侧向显影的条件下,随着显影时间的增加,样品模型各台阶对应的抗蚀膜向下的显影深度不与台阶呈线性关系。显影时间 $t < 15$ s 时,12 h 与 15 h 曲线基本不可分辨,样品的信息过于集中在很小的抗蚀膜厚度内,而 9 h 与 12 h 曲线间距又相对极大,这样在用电子显微镜等后续手段放大观察时,不利于对细节进行分辨。随着显影时间逐渐增大,各曲线逐渐拉开距离,有利于分辨细节。值得注意的是,上述讨论是在忽略侧向显影的条件下所得的结果,为了避免过显影,作如下分析。

对于 15 h 的背景,当以 12 h、9 h、6.75 h、5.2 h 分别为细节时,显然最接近 15 h 的 12 h 侧向显影将最严重,容易形成过显影。对于在不同曝光时间的背景上,如 12 h 及 15 h,细节曝光为 9 h,则它们的侧向显影程度将基本相同。因此,对于所讨论的模型,在整个显影过程中,只要保证背景为 15 h,细节为 12 h,显影时满足横向分辨率即可避免过显影,所需要的是在完全曝光的背景上选择最小的样品台阶,使其避免过显影。

根据以上分析,我们做如下实验。

首先,准备一片空白抗蚀膜及一片 $0.2 \mu\text{m}$ 厚的矩形金薄片(金片的厚度应小于划分的台阶的厚度,以满足衍射极限及半影模糊的要求);根据金的线吸收系数,计算出金片遮拦部位的透过率为 T ;将金片紧贴在抗蚀膜上,曝光 $3/T$ h 后将金片取下;继续曝光,直到整个程序的曝光时间为 15 h;曝光结束后,将抗蚀膜取下,用 MIKB:IPA=1:1 的显影液显影 15 s、30 s、……120 s 等;显影后的抗蚀膜经镀金后,在扫描电镜下以 80 倾角观察侧向结构,读出单侧向显影距离 X , X 应满足 $X < R/2$, R 为由衍射极限等客观因素决定的横向分辨率。

以上所讨论的样品模型台阶间距较大,如果要求分别的精度更高,可以按上述步骤将样品台阶的梯度确定为 $0.2 \mu\text{m}$ 、 $0.1 \mu\text{m}$ 等,分辨测量显影速率曲线并做过显影分析。对于台阶划分得很细的样品模型,不需要按上述步骤测量每一条曲线,只需将样品模型划分成几个较大间距的台阶,使它们显影后,各曲线保持合理的间距,即可近似地使每条曲线的间距保持合理,便于辨别。做过显影分析时,测量完全曝光区与透过率最大区域的侧向显影分析即可。通过这种方法选择的显影条件,可使显影后的抗蚀膜在满足分辨率的条件下,更真实地反映生物样品的原貌。

resist film thickness (μm)

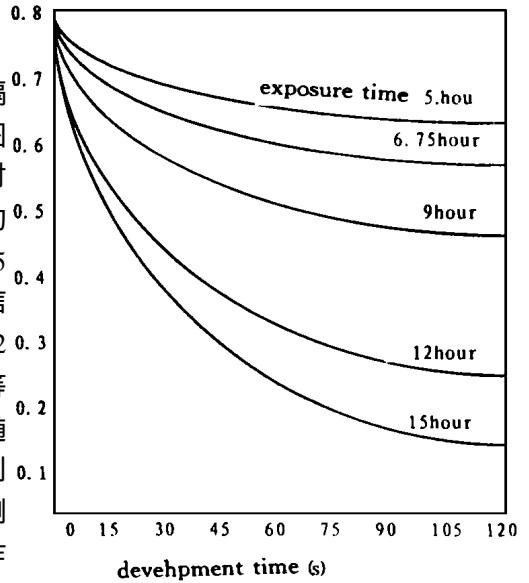


Fig. 3 Development speeds of resist with different exposure

5 结 束 语

在以软 X 射线接触式显微术对生物样品成像过程中, 生物样品曝光后, 通过光学显微镜、电子显微镜或原子力显微镜放大观察抗蚀膜的显影图形来获得样品的内部结构信息, 因此抗蚀膜的显影质量对最后的成像质量有重要影响。本文通过建立多衬度的样品模型, 对具有不同透过率的各分辨单元逐个分析, 将显影条件与分辨率紧密结合起来, 找到了一种新的控制显影条件的方法, 既满足了分辨率, 又能更清晰地观察样品内部结构的信息, 避免了按经验来确定显影条件的不足之处, 提高了软 X 射线接触式显微术的成像质量。

参 考 文 献

- [1] Michette A G. X-ray Microscopy. Rep Prog Phys 1988, **51**: 1525 ~ 1606
- [2] Tomie T, Shimizu H, Majima T, Yanada M, Mium E. Flash Contact X-ray Microscopy of Biological Specimen in Water. Proc SPIE, 1992, **1741**: 118 ~ 128
- [3] Sayre D, Feder R. Exposure and Development of X-ray Resist in Microscopy, IBM Research Report RC-7498, New York Yorktown Heights: 1979
- [4] 张立新译. X 射线光学在固体领域中的应用. 北京: 科学出版社, 1985, 40 ~ 116

Development Conditions of Resist in Soft X-Ray Contact Microscopy

Liu Yinan, Wang Zhangshan, Li Zhe, Lin Yiping, Cao Jianlin

(The State Key Lab. of Applied Optics, Changchun Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract

Different resolution pixels have a series of transmission coefficient, according to this feature of biological specimen, we device a protein model with several different high steps, calculate the resist exposure corresponding to every step, after exposure, measure the resist development speed, analyse the development condition quantitatively, find out a better method to control development condition, especially connect resist development with resolution closely.

Keywords: Soft X-ray contact microscopy, Biological specimen, Resist, Development conditions

林毅楠 男, 1969 年 3 月出生, 1991 年毕业于长春光机学院光学仪器专业, 1994 年考入中国科学院长春光学精密机械研究所, 在应用光学国家重点实验室从事生物样品软 X 射线接触式显微术研究工作, 获硕士学位。1997 年 4 月攻读光学博士学位。