

软 X 射线接触式显微术研究*

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

(福建省劳动保护研究所 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,根据曝光量与衬度,信噪比,抗蚀膜性能的关系,确定了曝光量。同时模拟样品模型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。将曝光量,显影条件,与分辨率紧密结合起来,找到了一种较好的实验方法。

关键词 软 X 射线接触式显微术 生物样品 抗蚀膜 显影条件 曝光量

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,成像分辨率很难超过 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的困难^[1]。

软 X 射线可以穿透几个微米厚的生命物质,避免了生物样品的切片处理;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成像衬度,并可利用此区域的吸收限进行定量分析;特别是在氧的 k_{α} 吸收限 2.3 nm 与碳的 k_{α} 吸收限 4.4 nm 之间(一般称作水窗波段),水对软 X 射线的吸收比各种生命物质的吸收低一个数量级,这对于排除水的本底干扰,实现自然状态下的高分辨显微观察具有重要意义。正是软 X 射线显微术具有这些独特的优点,才使它有可能弥补光学显微镜和电子显微镜在研究活体生物样品时的不足。它的优点不在于分辨率有更高的突破,而在于能够研究自然状态下的尤其是活的生物样品^[1]。

* 本项目得到国家自然科学基金和应用光学国家重点实验室资助

2 软 X 射线接触式显微术原理

软 X 射线与物质相互作用时,主要有弹性散射、非弹性散射和光电吸收三种作用形式。弹性散射和非弹性散射相对于光电吸收可以忽略,可以通过观察透过各分辨单元的软 X 射线的强度变化,来获得样品各分辨单元在光束传播方向的透过率变化,从而得知样品内部结构及成分等信息^[2]。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

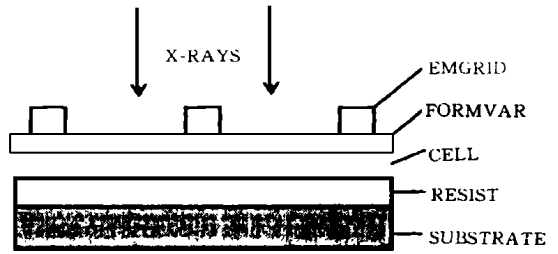


Fig. 1 Soft X-ray contact microscopy

法,其结构如图 1 所示。它是将样品紧贴在软 X 射线抗蚀膜上,然后以适当强度的软 X 射线进行曝光,对曝光后的抗蚀膜进行显影处理,便可在抗蚀膜表面获得反映样品结构的浮雕图形,最后通过光镜、电镜或原子力显微镜放大观察来获得样品的结构信息。

影响这种显微术分辨率因素有:衍射效应、半影模糊、光刻胶的分辨率、曝光量、辐射损伤等^[1]。

3 实验方法

3.1 光源

在实验中采用改进型的 Henke 源^[3],利用碳靶获得 $\lambda = 4.4 \text{ nm}$ 的软 X 射线。这种光源的强度较低,曝光时间较长,不利于生物样品成像。我们主要利用这种光源分析曝光量、显影条件及分辨率的关系,探索实验条件。

3.2 曝光量的确定

3.2.1 曝光量与衬度及信噪比的关系

接触式显微术是以均匀的软 X 射线照射生物样品,通过计量不同分辨单元透过的光子数而获得样品的细节特征。对于如图 2 所示的单衬度样品,当以波长为 λ 的软 X 射线入射时,要求曝光量

$$I_1 = \frac{\gamma^2 G^2 (1+t)}{T_{\text{grou}}^2 (1-t)^2} \quad (1)$$

I_1 代表为分辨如图 2 所示的单衬度模型,每个分辨单元所需要的入射光子数, T_{grou} 为样品模型背景的透过率, t 为分辨细节相对于背景的透过率, γ 为信噪比, G 为灰度^[4,5]。生物样品的特点是具有复杂的结构及成分,具有多种衬度。因此,我们设计了一个多衬度样品模型,如图 3 所示。最高台阶代表样品内部最小透过率处,通过各台阶的不同排列组合可以得到不同的衬度。随着所需分辨细节的衬度的变化,可选择合适的台阶高度和间距进行讨论。我们此处只给出一种讨论的方法。为简化讨论,我们将生物样品模型的材料仅考虑为蛋白质。

$\lambda = 4.4 \text{ nm}$ 时,蛋白质的线吸收系数 $\alpha_{\text{蛋白}} = 0.52 \mu\text{m}^{-1}$ 。在图 3 中各台阶对应透过率分别为 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

。式(1)中的 Y 与 G 都取为 $5^{[4]}$, 任取两个台阶, 一个作为背景, 另一个作为要分辨的细节计算 I_1 。经计算发现, 当背景透过率为 $T_{1.5\mu\text{m}}$ 细节透过率为 $T_{2\mu\text{m}}$ 时, 所需曝光量最大。

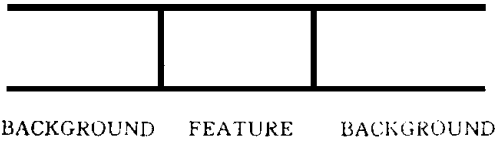


Fig. 2 Single contrast specimen model, the transmission coefficient of background and feature are T and Tt

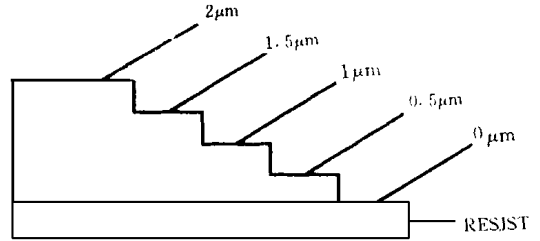


Fig. 3 Several contrast protein specimen model

3.2.2 抗蚀膜性能对曝光量的要求

除了上述因素外, 抗蚀膜的性能对曝光量也有一定要求^[6]。

被抗蚀膜任意一个分辨单元吸收的光子数可表示为

$$\bar{n} = \frac{E_{inc} T}{h\nu} A R^2 \quad (2)$$

T 为生物样品某一分辨单元对软 X 射线的透过率, E_{inc} 为入射曝光密度, $h\nu$ 为每个软 X 射线光子的能量, A 是被长为 R 、宽为 R (R 代表分辨率)、厚度为 d 的抗蚀膜分辨单元吸收的入射能量的分量, 若抗蚀膜吸收系数为 α , 则

$$A = 1 - \exp(-\alpha d)$$

由于光子是互不相干地随机射达抗蚀膜的, 因此被抗蚀膜不同分辨单元吸收的光子实际数目对平均值会有偏离, 这些偏离规定了理想抗蚀膜的性能极限。被抗蚀膜一个分辨单元所吸收的光子的几率可由泊松分布确定

$$p(n, \bar{n}) = \frac{\bar{n}^n}{n!} e^{-\bar{n}} \quad (4)$$

对于一单衬度掩模, 透过率分别为 $T = 1$, $T_{abs} = 0.5$ 时, 若完全曝光的抗蚀膜分辨单元吸收光子数为 $\bar{n} = 16$, 则 T_{abs} 所对应的抗蚀膜的曝光量为 $\bar{n} = 8$ 。

图 4 所示为对应这两种区域下每个分辨单元能够观察到几个光子的几率 $p(\bar{n})$ 。在该图所反映的例子中, 两个泊松分布交叠在一起, 我们无法从抗蚀膜曝光复型上判断哪些光子吸收量处于交叠区域的特殊

部位中, 哪一部分与完全曝光区域相对应, 哪一部分与部分透明区相对应。这个问题将随着掩模衬度的降低而变得更加严重。

泊松分布的宽度由其标准偏差决定, 标准偏差 $\sigma = \sqrt{\bar{n}}$, 人们广泛地应用 3σ 判据作为衡

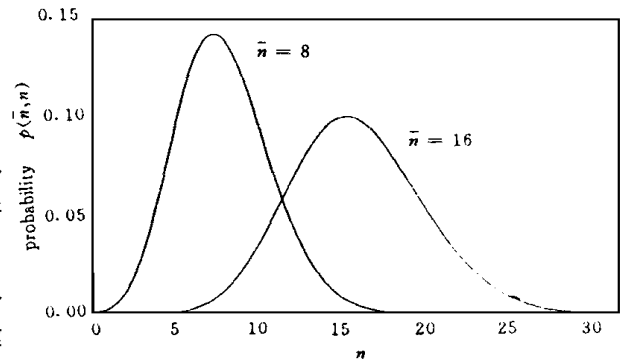


Fig. 4 Exposure probability for different incident

量误差几率是否已下降到可接收程度的尺度。对于上面的例子, 这一判据要求两条泊松分布曲线的交叠位置处于任一条曲线的 3σ 界限之外。

$$\bar{n} - \bar{n}_{ats} = 3S_{clear} + 3S_{abs}$$

得到

$$\bar{n} = 9 / (1 - \overline{T_{abs}})^2 \quad (5)$$

以上讨论仅针对单衬度掩模, 对于图 3 所示的多衬度台阶模型, 需将此公式作一些改进。在多衬度台阶模型中, 取任意两个台阶, 透过率分别为 T_1 和 T_2 , 为满足 3σ 判据应有

$$\bar{n}T_1 - \bar{n}T_2 = 3S_{r1} + 3S_{r2} = 3 \quad T_1\bar{n} = 3 \quad T_2\bar{n}$$

得到

$$\bar{n} = 9 / (\overline{T_1} - \overline{T_2})^2 \quad (6)$$

也就是说, 与样品的每个单元相应的抗蚀膜至少吸收 $\bar{n} = 9 / (\overline{T_1} - \overline{T_2})^2$ 个光子, 才能分辨开透过率分别为 T_1 和 T_2 的两个台阶。将图 3 所示各台阶排列组合后, 经计算可得到一个最大曝光量。将此结果与 3.2.1 的结果比较后, 便可选择一个合适的曝光量。受光源限制, 我们将曝光时间确定为 15h。

3.3 显影条件

在实验过程中, 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。除此此外, 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。这是因为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 5 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^[7]。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^[7]。为定量地确定最佳显影条件, 我们做如下分析。

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。设定曝光时间为 15h 时, 各台阶对应的抗蚀膜曝光时间分别为: $H_{0\mu m} = 15$ h, $H_{0.5\mu m} = 12$ h, $H_{1\mu m} = 9$ h, $H_{1.5\mu m} = 6.75$ h, $H_{2\mu m} = 5.2$ h。

3.3.1 显影液浓度的确定

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

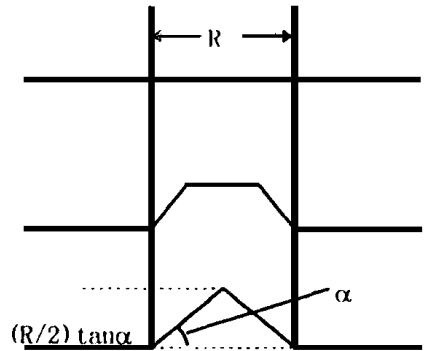


Fig. 5 Profile of a feature in the resist after three different depths of development

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。

在实验过程中,我们首先曝光了五片空白抗蚀膜,曝光量均为 15h, 每片对应一种浓度的显影液,采用分段式重复显影的方法,每显影 15s 就放在 Talystep 台阶仪上测量残余抗蚀膜的厚度。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。

3.3.2 显影时间的确定

对于曝光时间为 15h、12h、9h、6.75h、5.2h 的各空白抗蚀膜用 1 : 1 的显影液显影,每隔 15s 取三个点测三个台阶,取其平均值作图。由图 6 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 $t < 15s$ 时,12h 与 15h 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 9h 与 12h 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 15h 的背景,当以 12h、9h、6.75h、5.2h 分别为细节时,显然最接近 15h 的 12h 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 12h 及 15h,细节曝光为 9h,则它们的侧向显影程度将基本相同。因此,对于图 3 所示多衬度样品模型,在整个显影过程中,只要保证背景为 15h,细节为 12h,显影时满足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,即单向侧向显影距离 X 应满足 $X < R/2$ ^[7]。

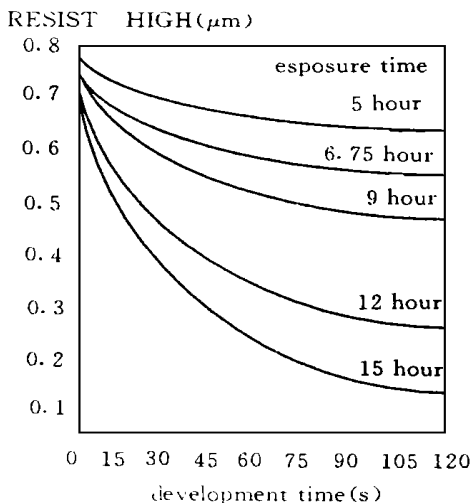


Fig. 6 Development speeds of resists with different exposures

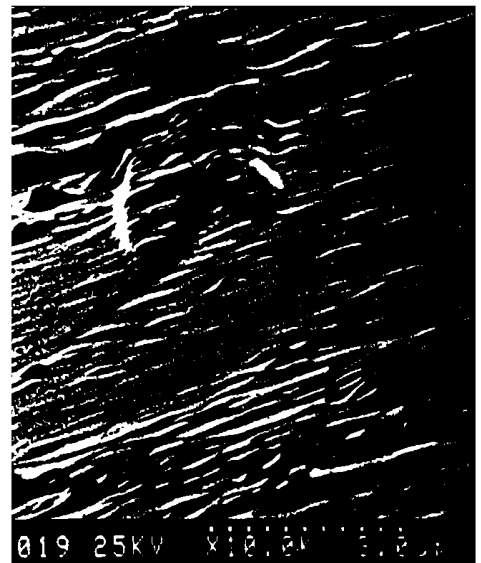


Fig. 7 The image of bee's wing

以上所讨论的样品模型台阶间距较大, 如果要求分辨的精度更高, 可以按上述步骤将样品台阶的间距确定为 $0.2 \mu\text{m}$ 、 $0.1 \mu\text{m}$ 等, 分别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。

3.4 实验结果

采用上述实验方法, 我们分析了蜜蜂翅膀。图 7 所示为蜜蜂翅膀的扫描电镜照片, 观察角为 80° 。可以看到纤毛像梳子一样分布在翅膀的边缘, 长短不一。毛尖及毛根比翅膀密度大, 所以照片上毛尖及毛根比较突出。由照片可以看到个别毛根上两个毛尖。

4 结 论

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。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别单元逐个分析, 将曝光量、显影条件、抗蚀膜厚度与衬度及分辨率紧密结合起来, 找到了一种较好的实验方法, 既满足了分辨率, 又能更清晰地观察样品内部结构的信息, 提高了软 X 射线接触式显微术的成像质量。

参 考 文 献

- 1 Tomie T, Shimizu H, Majima T, Yanada M, Mium E. Flash contact X-ray microscopy of biological specimens in water. Proc SPIE, 1992, 1741: 118~128
- 2 Fletcher Julin, Cotton Robim, Webb Colin. Soft X-ray contact microscopy using laser generated plasma sources. Proc SPIE, 1992, 1741: 142~158
- 3 何其芳, 龚再仲. Henke 型软 X 射线源的研制与测试. 光学机械, 1984(3): 37~47
- 4 Morrison Graeme R. Some aspects of quantitative X-ray microscopy. Proc SPIE, 1984, 1140: 41~47
- 5 Kirz Sayre J, Feder R, Kim D M, Spiller E. Transmission microscopy of unmodified biological materials: Comparative radiation dosages with electrons and ultrasoft X-ray photons. Ultramicroscopy, 1977, 2: 337~349
- 6 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
- 7 Sayre D, Feder R. Exposure and Development of X-ray Resist in Microcopy. IBM Research Report RC-7498, Yorktown Heights, New York, 1979

Soft X-ray Contact Microscopy of Biological Specimen

LIU Yi-Nan, WANG Zhan-Shan, LI Zhe, LIN Yi-Ping, Cao Jian-Lin
(*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 differnt high steps. Then calculate the exposure corresponding to the relationships of exposure, ratio of signal to noise, contrast, and performance of resist. We also analogue the development condition of specimen model, measure the resist development speeds of every step, analyze the development condition quantitatively, connect resist development condition with contrast, resolution and exposure very closely, find out a better experiment method.

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

刘毅楠 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。