

软 X 射线显微术

谢行恕

(中国科学技术大学)

一、引言

X 射线作为一种显微工具已研究多年,且早有介绍^[1]。但以前的研究大多使用波长在 0.1—1 nm 的较硬的 X 射线,这主要是受到 X 射线光源的限制。硬 X 射线与物质作用比较复杂,不利于得到好的衬度。七十年代以来,同步辐射光源的发展,提供了具有高强度的连续可调波长的软 X 射线光源。软 X 射线显微术(波长范围大约在 1—10 nm)具有电子显微术所不具备的优点,尤其是在研究生物物质(特别是活的物质)及轻元素方面。因此,近年来 X 射线显微术的研究重新活跃起来,而且软 X 射线光学也有了新的发展。现在使用软 X 射线光学直接成像的分辨率已经超过光学显微镜的分辨率,预计近年内分辨率还会提高。软 X 射线显微术将成为研究物质(特别是生物试样和轻元素)的显微形态和成分的不可缺少的有力工具。

二、衬度机制和辐射损伤——软 X 射线显微术的优点

1. 衬度机制

(1) 透射 X 射线显微术 (TXM)

在软 X 射线波长范围内,吸收截面远远大于弹性散射和非弹性散射截面。光电吸收的第一个结果,就是入射方向上光子数的减少。它形成了软 X 射线显微术最简单的机制,即透射 X 射线显微术。

$$N = N_0 e^{-\mu t},$$

式中 N_0 为入射光子数, N 为出射光子数, t 为光子穿透厚度, μ 为线吸收系数。特别重要的

物理

表 1 一些生物学上重要物质的 X 射线吸收系数*

波长 (nm)	水	碳水化合物	蛋白质	类脂化合物	核酸	空气
0.13	0.0006	0.0007	0.0006	0.0003	0.0014	0.0005
0.2	0.002	0.003	0.002	0.001	0.005	0.002
0.4	0.018	0.022	0.017	0.008	0.037	0.015
0.8	0.126	0.158	0.113	0.065	0.169	0.108
1.4	0.560	0.719	0.524	0.310	0.768	0.492
2.3	1.93	2.54	1.88	1.13	2.71	1.74
O 吸收边						
2.4	0.112	1.02	1.38	1.00	1.36	1.46
2.7	0.151	1.36	1.84	1.35	1.82	1.95
3.0	0.198	1.77	2.38	1.74	2.34	2.50
N 吸收边						
3.1	0.215	1.92	1.90	1.89	1.74	0.172
3.7	0.336	2.92	2.88	2.87	2.63	0.270
4.2	0.458	3.91	3.85	3.84	3.50	0.369
C 吸收边						
4.4	0.521	0.624	0.522	0.245	1.19	0.415
5.2	0.782	0.941	0.769	0.372	1.69	0.622
7.4	1.84	2.20	1.69	0.872	3.26	1.45
9.0	2.89	3.45	2.38	1.36	4.76	2.28

* 除空气外,单位都是 μm^{-1} , 空气的单位是 mm^{-1}

是 μ 不是波长 λ 的单调函数。图 1 表示蛋白质和水在不同波长时的吸收系数曲线。表 1 是几种重要生物物质的线吸收系数。由图表可见,在软 X 射线波长范围内,那些在生物研究中重要的物质(主要包括轻元素)的线吸收系数大约在 $1 \mu\text{m}^{-1}$ 附近,也就是说经过 $1 \mu\text{m}$ 厚度,入射光子强度减小到 $1/e$ 。所以,我们可以研究几个微米的深度,这正是典型的生物试样的厚度。

仔细选择使用的 X 射线的波长,可以调整对试样的衬度和穿透厚度。在 2.3 nm 到 4.4 nm 之间蛋白质的吸收系数和水的吸收系数差不多

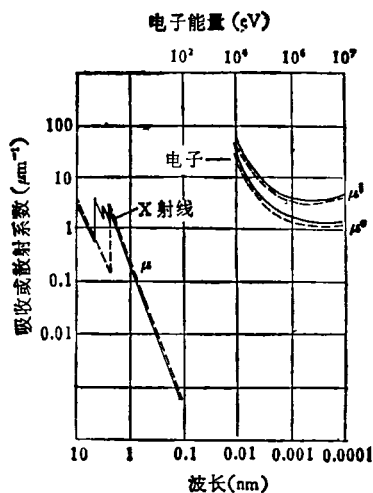


图1 蛋白质(实线)和水(虚线)的吸收系数对波长 λ 的函数曲线(μ' 和 μ'' 是它们对电子的弹性和非弹性散射系数)

有一个数量级的变化,因此它提供了一种天然的衬度机制,使我们可以研究不脱水的生物试样。对比图1中电子的散射系数曲线,电子的穿透深度大约是 $0.01-1\mu\text{m}$,而且没有强的衬度,所以对于试样必须进行人工处理,包括切片、染色等,这增加了准备工作及分析技术的复杂性。由上可见,软X射线透射显微术对于研究自然状态下(完整的、湿的、非染色的)生物试样有特别的优越性^[2-4]。

(2) 荧光X射线显微术和电子发射X射线显微术

入射X射线光子与试样中原子的光电吸收作用,产生光电子并激发原子。原子激发后的弛豫过程可能是荧光或俄歇电子发射。电子与荧光光子又可能再与原子作用产生新的电子和光子,以致最后消耗所有的能量。不记录入射光子的损失而记录簇射中的电子或荧光,也可以确定试样的组成。前者称为电子发射X射线显微术(EXM),后者称为荧光X射线显微术(FXM)。由于上述电子能量低,只能穿透很短的路程,所以EXM只适于观察表面。由于低原子序数 Z 的元素荧光产额很小,所以FXM只适于研究中等 Z 以上的试样。还要指出,TXM是亮背底而EXM和FXM是暗背

底。

2. 辐射损伤和分辨率

入射粒子(X射线或电子)引起试样结构永久性的变化,称为损伤。对于损伤的测量,我们用剂量表示。剂量 D 表示单位吸收物质质量厚度从入射粒子接受的能量,即

$$D = n(h\nu)(\mu/\rho),$$

单位是 J/g ,式中 n 是单位面积内入射到单位质量厚度的粒子数, $h\nu$ 是入射粒子能量, μ 是线吸收系数, ρ 是吸收物质的密度。

对于生物物质,粗略地说,电子和软X射线在相同入射通量时产生的剂量大致相同。Isaacson对生物物质总结了损伤和剂量的关系数据。 10 J/g 的剂量足以杀死活的细胞, 10^4 J/g 的剂量则将造成结构的严重破坏。Sayre等计

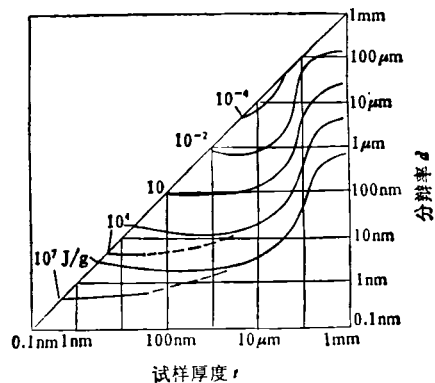


图2 在厚度 t 的水背景中能够分辨线度为 d 的蛋白质组织所需要的最小入射光子剂量(信噪比 $s/n > 5$)实线表示TXM;虚线表示EXM

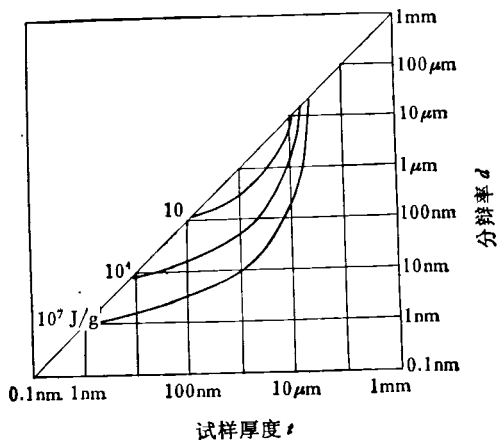


图3 与图2意义相同,但对应于电子显微术TEM

算了蛋白质组织在水背景中保持可见情况下的最低入射粒子数和剂量^[5]。

图 2 是对软 X 射线的剂量结果, 图 3 是对电子的剂量结果。计算时都使用了最佳的波长(或能量)。

由曲线看出, 对于 TXM 当试样厚度为 1 μm , 剂量为 10^4 J/g 时分辨率是 10 nm。对于电子显微术, 相同条件下的分辨率只有 70nm。要达到 10 nm 的分辨率, 剂量必须加大到 10^7 J/g , 这已远远超过使物质结构损伤的极限条件。对于很薄试样的情况, 从图 2 和图 3 看出, 在相同剂量条件下, TEM 可以给出比 TXM 稍好的分辨率。但软 X 射线 EXM 却可得到优于 TEM 的分辨率。

三、成像方法

高分辨率 X 射线显微成像技术比电子显微成像技术远为复杂和困难, 它是近几年来正在蓬勃发展的领域。

1. 接触 X 射线显微术

接触 X 射线显微术是迄今最简单、唯一能达到或接近理论上 X 射线显微术分辨率的方法。这种方法利用 X 射线对物质的损伤, 如图 4 所示, 试样贴放在抗蚀剂上, 均匀的平行的 X 射线经过试样照到抗蚀剂上。抗蚀剂一般使用有机聚合物如 PMMA, X 射线“曝光”之后, 记录经试样后造成的抗蚀剂的损伤图样。经过“显影”将抗蚀剂的损伤图样转化成抗蚀剂的轮廓变

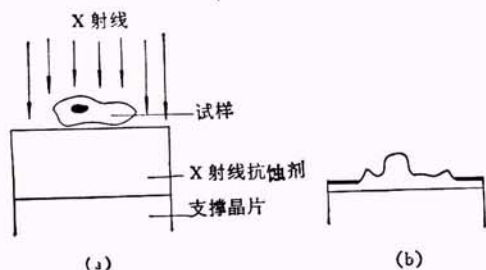


图 4 接触 X 射线显微术原理图
(a) X 射线通过试样照到抗蚀剂上 (b) 经过“显影”后的抗蚀剂轮廓

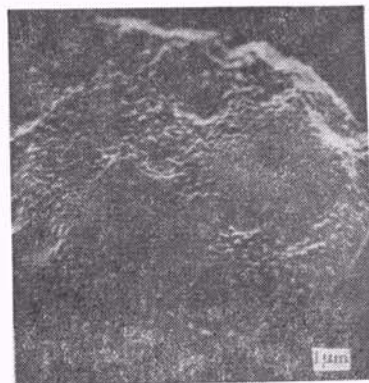


图 5 用 PMMA 抗蚀剂得到的从成胶质细胞组织培养出的人间期核 X 射线显微照片

化, 再使用高分辨率电子显微镜去检查抗蚀剂的表面, 从而可以读出图像。图 5 是一个试验结果。

接触 X 射线显微术的分辨率, 首先取决于使用的抗蚀剂。在最好的条件下 ($\lambda=4.36\text{nm}$, 辐射剂量 10^4 J/g) PMMA 能达到的最好分辨率为 5nm。这与 X 射线衍射限制一致。对更短的波长, 由于抗蚀剂里损伤范围加大, 分辨率变坏。当波长更长时, 由于衍射限制分辨率也变坏。从辐射损伤上考虑, 抗蚀剂灵敏度的提高都伴随着分辨率的降低。实际上, 这种由于辐射剂量减小而降低的分辨率比预期的还要快。比如抗蚀剂 DCPA 工作在 10 J/g 的条件下, 按辐射剂量考虑分辨率应为 50 nm, 而实际上分辨率却降低很多, 达 $0.5 \mu\text{m}$ 。

除了抗蚀剂的因素外, 另外两个对分辨率限制的因素是光源局部大小及光源对试样的有限距离造成的半影效应和 X 射线衍射限制。前者在实际工作装置上远远小于抗蚀剂本身的分辨率。对于衍射效应, 分辨率 $r_d = (\lambda a)^{1/2}$ 。在软 X 射线波长上工作时, 使试样中组织到抗蚀剂的距离 a 减小到大约 25nm, 这使得我们只能在试样最接近抗蚀剂的薄层上达到高分辨率。实际上, 这就提出了高分辨率的三维成像问题^[2,6]。

假如用一种高原子序数材料的转换层代替抗蚀剂, 再用电子光学系统对转换层中产生的次级电子成像, 这就是另一种形式的接触 X 射

线显微术。由于在高原子序数材料内,簇射范围减小因而能使分辨率增高。另外,它还可以做到实时成像。Polack 完成的光电子显微镜,已使它的实际分辨率达到 50 nm^[7]。

2. X 射线光学和几种可能的 X 射线显微镜

X 射线光学和可见光的光学成像一样,也要依靠光在界面上的折射反射和干涉等光学的基本性质。

对于 X 射线波长,折射率略小于 1,在很小的掠入射角的情况下可以产生全反射。因此,掠入射光学可用于设计 X 射线显微镜。掠入射成像的分辨率极限与波长无关,大约在 20nm 左右^[8]。早在 1929 年就提出掠入射镜成像的设想,到 1947 年才有实际上实现的报告发表。1980 年 Silk 等研制了用于等离子诊断用的软 X 射线显微镜^[9]。它是由共焦共轴的椭圆双曲面镜组成的成像系统,放大倍数 10 倍,分辨率也只达到 1—2 μm 。由于非球面镜镜面制造困难,调准技术要求很高和对试样面积的限制都使得掠入射镜难以在显微术中得以推广。Sakayanagi 和 Aoki 等实验用超环面掠入射 X 射线聚焦得到较好的结果。他们预计,提高了制造技术可达到理论的分辨率界限。

当入射光近似垂直入射到单层镜面时,随波长减小反射系数将急剧下降。当波长小于 10 nm 时,反射系数降低到 0.1% 之下。但是在软 X 射线区如采用多层膜涂覆后将可使镜面反射系数急剧增加到 10% 以上。因此,使用近似垂直入射多层膜曲面镜方式将可使软 X 射线成像^[8]。最理想的镜面形式是椭圆面,但球面反射镜也能给出很好的图像。镜面材料的选择及多层膜涂覆技术是实现近似垂直入射显微镜的关键。波长愈短,层数要求愈多,而且每层厚度愈薄(每层厚 $\lambda/4$),光洁度也要求愈高。涂覆层交替使用强吸收和弱吸收材料。为制造软 X 射线(4.5—20 nm)的反射镜面,Spiller 等于 1981 年用真空喷镀达到 200 层膜层。Haelbich 等人的显微镜在 20 nm 波长进行试验,分辨率达到约 1 μm 。能使用的波长预期可达 4.5 nm,分辨率达到 20—30nm 左右^[10]。

迄今为止,用 X 射线光学直接成像能得到最好分辨率的是用波带片作为 X 射线的聚焦放大元件。如果单色光经过一个波带片,由于光的衍射作用将使其聚焦。波带片就是一个环形的透射光栅。当环数足够大时($N > 100$),它可以近似地看成是一个单色透镜。具有 N 个波带的波带片其最外环的宽度近似为分辨率的极限。Schmahl 等建造了第一个使用同步辐射的波带片 X 射线显微镜^[11]。它包括两个波带片,一个会聚波带片和一个微波带片。会聚波带片将单包光会聚到微波带片的物平面上,微波带片再将试样放大成像到照相底板上。它的放大倍数是 110 倍。使用第一级衍射分辨率为 0.15 μm ,效率 10% (使用的波长为 4.6 nm)。Schmahl 等显微镜使用的波带片是用紫外全息方法制造的,它已接近制造方法的衍射极限。为了进一步改善波带片的分辨率,有几种可能的途径。一种叫做“喷镀-切片波带片”,它用明暗相间的材料喷镀在柱形基体上,然后切片形成波带片。另一种方法是使用电子束光刻做成波带片,再用 X 射线光刻使其达到足够的深度。还有一种方法是使用更短的波长产生波带片的干涉图形。使用相位波带片有可能在效率及信噪比等性能上得到优于菲涅耳波带片的结果^[12],但至今还没有试验过。

用相干 X 射线照射物体产生全息图,然后用可见光再现,可以得到放大的像,这就是 X 射线全息显微术的基本原理。Aoki 等用 Al 的 K_α 及同步辐射作为光源成功地记录了全息图,并用激光完成再现^[13]。但他们最好的分辨率只达到 4 μm 。X 射线光源的单色性及 X 射线感光胶片等都是限制得到高分辨率的因素。由于 X 射线全息术有可能得到高分辨率三维成像,因此人们对它寄予极大的兴趣,这方面的研究一直在坚持进行。

3. 扫描 X 射线显微镜

1972 年,Horowitz 等建造了最早以同步辐射为光源的扫描 X 射线显微镜^[14]。X 射线光束经过 2 μm 的针孔准直入射到试样上。显微镜的分辨率由针孔的线度决定。试样以电视光栅形

式通过光束斑点扫描,显示装置与试样同步扫描。通过记录透射的X射线或者荧光而得到试样的图像。扫描X射线显微镜的优点是由于探测器的效率可接近100%,它能更好地利用X射线光子,从而提高效率并减少了试样所受的剂量。它还可以方便地进行数据收集和处理,进行实时成像。扫描显微镜对于X射线微区分析更显示出极大的优越性。为了提高它的分辨率,必须使用X射线光学方法对X射线束光斑再聚焦,上节所述各种方法都正在试验之中。

四、软 X 射线微区元素分析

1. X 射线吸收差分析

假如我们要检查试样中某种原子序数为Z的特定元素,选择X射线波长小于和大于该元素的吸收边,吸收系数有急剧变化。因此调整X射线波长在某种特定元素吸收边两侧并做出两个不同的吸收分布图,通过这两个图的比较,就可以得到该元素的浓度分布。这就是X射线吸收差分析。三十多年前,Engström就开始研究和用这种方法标识试样中的化学组分^[15]。但是,由于没有足够强度及连续可调的X光源,这种方法的应用受到了限制。现在同步辐射光源的应用排除了这个障碍。Polack等用吸收差微区分析方法对一些矿物试样做了分析^[16]。McGowan等则对生物试样做了分析^[17]。他们使用的都是接触显微术的方法,以感光板或抗蚀剂作为记录材料。对于接触方法,在吸收边两侧波长二次曝光时,必须保证二次记录位置完全相同才可比较。同时为了进行定量分析,必须使用类似测微光度计装置做出信号转换才能进行数据分析。使用扫描X射线显微术的方法可以完全克服上面的缺点,而且探测器的高效率可以减少入射X射线光子的剂量并可提高信噪比。现在还没有使用扫描X射线显微镜进行吸收差微区分析的实验结果。按照模型分析,对于入射X射线剂量为 10^4 J/g,分辨率达到10 nm的条件,吸收边在1—10 nm之间($4 < Z < 11$ 的K吸收边, $15 < Z < 30$ 的L吸收边以及

$38 < Z < 60$ 的M吸收边),对于元素探测可达到 10^{-17} — 10^{-18} g的微量,相当于 $1\mu\text{m}$ 厚试样中1—10%的浓度^[2]。使用扫描方式的吸收差微区分析,使我们有可能标识许多对生理功能十分重要的元素,包括Ca, F, Cl, P, K和Fe等。Kirz建议中研究的课题比如有无脊椎动物肌肉活组织中Ca的标识,它对于收缩功能的研究是十分重要的。另外,如对于元素F的标识,F标记在生物细胞标记中很重要,用其他技术难以将它标识出来,使用X射线吸收差的分析方法有可能做到^[18]。电子能量损失谱(EELS)也可适合于对低E元素的分析,但它需将试样保持在真空环境中,且只适于对薄试样的分析,不过它具有能同时标识多元素的特点。

2. X 射线荧光分析

X射线荧光分析是以X射线束作为探针入射到试样中,根据不同元素产生的特征X射线荧光去标识元素,因此它是最直接和简便的方法。入射X射线束的大小决定它的分辨率。目前达到的分辨率在 $1\mu\text{m}$ 左右,X射线光学的发展有可能使它大大降低。最早用同步辐射做X射线荧光分析的是Howitz等^[14]。他们用正比计数器接受X射线荧光。增大探测器接受的立体角及调整入射X射线的能量,刚刚超过激发X射线荧光的界限,将可得到最小的人射辐射剂量。一般说来,X射线荧光分析比较适合于中Z和高Z元素的分析。X射线探针荧光分析与电子探针和质子探针荧光分析进行比较得出,X射线探针产生对试样小得多的辐射损伤。

参 考 文 献

- [1] V. E. Cossleft and W. C. Nixon, X-Ray Microscopy, Cambridge University Press, (1960).
- [2] J. Kirz and D. Sayre, in Synchrotron Radiation Research, H. Winick and S. Doniach eds., Plenum Press, (1980), 277—322.
- [3] P. J. Duke, Submitted to Royal Microscopical Society Proceedings, Preprint, (1981).
- [4] E. Spiller and R. Feder, *Sci. Am.*, **239** (1978), 70—78.
- [5] D. Sayre et al., *Ultramicroscopy*, **2** (1977), 337—349.
- [6] R. Feder et al., *Science* **197** (1977), 259—260.

(下转第37页)