

同步辐射讲座

第三讲 软 X 射线显微术*

蒋诗平^{1,2} 张新夷¹ 陈建文² 徐至展²

(1 中国科学技术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)

摘 要 对生物样品的研究,软 X 射线显微术具有独特的优势.例如,它能够对较厚的活性含水的生物样品直接进行显微成像以及元素分布的微区分析等.文章简要论述了软 X 射线显微术的衬度机制及其优势,列表概括了包括 SCXM, TXM, STXM, Gabor 全息以及衍射等几种类型的 X 射线显微术的基本特性,简要综述了合肥国家同步辐射实验室(NSRL)软 X 射线显微术的研究进展.

关键词 软 X 射线,显微术

SOFT X-RAY MICROSCOPY

JIANG Shi-Ping^{1,2} ZHANG Xin-Yi¹ CHEN Jian-Wen² XU Zhi-Zhan²

(1 National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230029, China)

(2 Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract Soft X-ray microscopy has unique advantages in the study of biological specimens. It can provide micrographs of living hydrated thick samples and their elemental distribution with high resolution. The advantages and contrast of soft X-ray microscopy are described briefly, and the basic characteristics of the microscopy technology such as SXCM, TXM, STXM, Gabor holography and diffraction are tabulated. An overview is also given of the progress of soft X-ray microscopy at the National Synchrotron Radiation Laboratory in Hefei.

Key words Soft X-ray, microscopy

1 引 言

人类对微观世界的认识很大程度上取决于显微技术的发展.人眼能分辨的最小细节约是 0.1mm,而普通光学显微镜则可以使人们观察到更微细的世界.根据公式

$$q = \frac{0.61\lambda}{n\sin\theta}, \quad (1)$$

可以估算出光学显微镜的点分辨率约 0.2 μ m.尽管光学显微镜的分辨率比人眼的分辨率要高近三个量级,但是这一分辨率在认识微观世界中的作用非常有限.利用电子束作为“光源”来成像的电子显微镜,由于电子的德布罗意波长很短,因此它的极限分辨率很高.点分辨达 0.1nm 的电镜早已商品化.尽管

电镜的分辨率非常高,但是它仍然存在局限性,主要表现在(1)样品制备难度大.由于电子穿透能力弱,因此样品必须很薄,一般的生物样品厚度要求在 50nm.制备这样的超薄样品是很困难的.不仅需要一套专门设备,而且要求操作者具有丰富的经验.(2)含水样品不能直接成像.这是因为电镜样品的成像需要在高真空的环境中完成.一般来说,含水的样品是要脱水干燥的.(3)生物样品需要重金属“染色”.生物样品中的物质主要是一些原子序数小的轻元素组成,它们对电子的吸收差异极小,不能产生足够的衬度,因此需要用重金属对生物样品进行“染

* 国家自然科学基金(批准号:19655001)资助项目,国家同步辐射实验室开放基金(批准号:96025)资助项目

2001-09-07 收到初稿,2001-12-20 修回

色”才能成像.由于样品需要切片、脱水 and 染色,因此电镜成像往往会出现假象.

由于光学显微镜和电子显微镜存在着各自的缺陷,因此它们的应用受到很大的限制.软 X 射线显微术正好弥补了光镜和电镜的缺陷,能对较厚的含水样品直接进行高分辨率的显微成像.这一点对生物样品的研究尤为重要.

2 软 X 射线显微术的特色及衬度机制

X 射线显微术的衬度是来自 X 光子与样品中电子的相互作用.X 射线穿过物质时,要发生光电吸收、散射等相互作用,在软 X 射线波段,光电吸收是最主要的形式^[1].

X 射线与物质相互作用时发生的散射有四种形式的效应,即不产生波长变化的弹性散射和瑞利散射以及伴随着波长增加的非弹性散射和康普顿散射.其中,入射的 X 射线和散射的 X 射线之间存在着一定的相位关系的散射被称作相干散射.

X 射线线性散射系数

$$\delta = Zf^2 + (1 - f^2), \quad (2)$$

式中 Z 为原子序数, f 是电子散射因子.(2)式右边的两项分别表示相干和不相干散射的贡献.相干散射以及 X 射线晶体衍射与 X 射线同轴全息显微成像密切相关,它提供了同轴全息成像时的物波.

软 X 射线显微术大多数的工作主要利用光电吸收(也有利用相位衬度).光电吸收的直接效应就是入射方向上的光子数减少,它形成了透射软 X 射线显微术的最简单衬度机制.穿过样品的光子数变化可按照下面的公式计算,

$$N = N_0 e^{-\mu t}, \quad (3)$$

式中 N_0 是入射光子数, N 是出射光子数, t 为光子穿透深度, μ 是线性吸收系数.就软 X 射线显微术来说,特别重要的一点就是 μ 与入射 X 射线波长的函数关系并非单调变化,而有复杂的跃变存在.

图 1 是水、蛋白质和碳水化合物的 X 射线的吸收系数和电子的线性散射系数曲线^[2].从图中可以看出,在软 X 射线波长范围内,蛋白质、碳水化合物等重要的生物物质的线性吸收系数在 $1\mu\text{m}^{-1}$ 左右,也就是经过大约 $1\mu\text{m}$ 厚的样品,入射光子强度减少到 $1/e$.这就是说可以用软 X 射线来研究几个微米厚的样品.由于生物细胞的线度通常在几个微米的范围,因此软 X 射线的穿透深度也非常适合于对完整的细胞进行成像研究.这也是软 X 射线显微术的

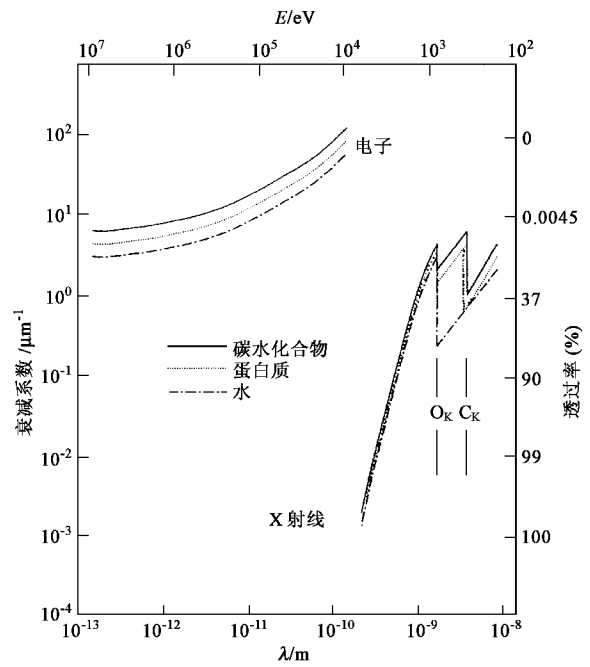


图 1 X 射线线性吸收和电子线性散射系数^[2]
(右边纵轴表示穿过 $1\mu\text{m}$ 厚样品的透射率, O_K 和 C_K 分别表示氧元素和碳元素的 K 层吸收边)

优势之一.

目前,绝大多数 X 射线显微术的研究都是在“水窗”波段.因为在这一波段光子能量位于碳元素和氧元素的 K 层吸收边之间(即能量为 284—543eV)对于能量刚好在氧元素吸收边下的 X 射线(如 517eV),主要含碳的有机材料对 X 射线的吸收,与水对此能量 X 射线的吸收相比,要低 1 个量级.因此,我们可以利用水的天然衬度来研究含水的生物以及其他样品.这是软 X 射线显微术的另一个优势.

软 X 射线显微术还可以利用元素对不同波长 X 射线的吸收差异来研究元素在样品中的分布.在某个波长附近,入射 X 光能量的很小改变会导致某种元素吸收发生很大的变化,而其他元素的吸收变化很小,这个波长就是这种元素的吸收边.对于同一样品,用某一元素吸收边两侧波长的 X 射线分别进行透射成像,就会由于该元素对 X 射线的吸收差异而获得两张不同的图像.如果将这两张图像进行适当的计算处理即可得到样品中该元素的定量图谱.依据不同的情况可获得它的相对数量或绝对数量图谱.生物体结构和功能物质中的最重要元素,如碳、氮、氧、钙、硫、磷等,它们对 X 射线吸收边都在软 X 射线波段.因此,使用软 X 射线吸收差微区分析,特别适合于生物样品的研究^[3].

将 X 射线近限吸收结构谱(EXAFS 和 XANES)理论和显微成像技术结合起来的光谱显微术(Spectromicroscopy)是 X 射线显微术的一种非常有意义的方法^[4-6]. 利用 X 射线近限吸收结构谱可以区分同一元素的不同化学结合状态, 进而获得不同化合物的分布情况. 例如在有机材料和生物学的研究中, 碳元素的含量很高, 其化合状态对材料的性质起着重要作用. 碳元素可以和多种元素结合, 形成 C—C, C=C, C≡C, C=N, C≡N, C=O 等 π 键, 并且不同的 π^* 键具有不同的共振能量. 而且同样的化学键在不同的环境中能量也会有所不同. 在最重要的两种生物物质 DNA 和蛋白质当中, C=C, C≡N, C=O 的浓度不同, 这些化学键都对碳元素的近限吸收结构作出贡献. 因此, 可以预期它们的近限吸收谱也会有所不同.

3 软 X 射线显微术基本类型及其应用举例

按照成像方式的不同, 软 X 射线显微术可以划分为四种基本类型, 即接触显微术、透射 X 射线显微术(波带片直接成像)、扫描显微术和全息显微术. 在每种基本类型中, 又可以依据某种方法, 细分为几种亚型, 比如, 扫描显微术可以有透射吸收、光电发射、衍射、荧光等等形式. 在这四种基本类型中, 目前发展较好的主要是第二和第三种成像方法. 图 2 是

透射 X 射线显微镜 (a) 和扫描透射显微镜 (b) 的示意图. 前者成像分辨率决定于物镜波带片的最外环宽度, 而后者成像分辨率则主要取决于微波带片的最外环宽度和扫描台的精度.

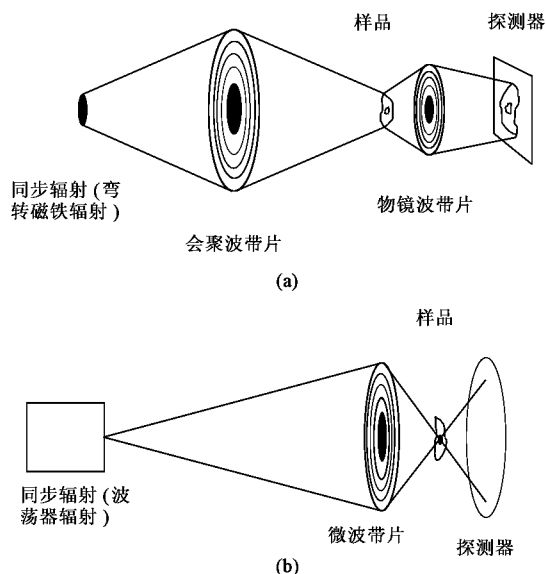


图 2 X 射线透射显微镜 (a) 和扫描透射显微镜 (b) 原理示意图

有关软 X 射线显微术的类型及其在生命科学研究中的应用研究, 作者已经在以前的《物理》上介绍过^[7], 这里将以列表的形式归纳出几种 X 射线显微术的特征(见表 1), 并图示几个研究结果(图 3 至图 6)^[8].

表 1 几种 X 射线显微技术的比较^[8]

	透射 X 射线显微镜	扫描透射 X 射线显微镜	接触 X 射线显微术	Gabo(伽伯)全息	衍射成像
探测器	CCD	计数器	CCD	CCD	CCD
视野大小	物镜波带片决定	操作者控制	大	大	小
分辨率	物镜波带片决定	波带片决定	光刻胶和衍射决定	光刻胶和相干性决定	不受技术限制
剂量	较高	最低	较高	较高	/
成像时间	快(总体)	快(每象素)	快(总体)	快(总体)	慢(3D)
时间相干	单色(ZP)	单色(ZP)	可以多色	单色	单色
光源	多种模式	单一模式	多种模式	单一模式	单一模式
强度变化影响	小	大	小	小	小
闪耀光源	行	不能	行	2D 行, 3D 不	3D 不
相位衬度	Zernike(泽尼克)	微分	不能	内含	内含
暗场成像	有可能	能	不能	不能	不能
光电发射	能	能	不能	不能	不能
荧光成像	不能	能	不能	不能	不能
元素图谱	有可能	能	—	—	—
XANES 图像	有可能	能	很难	很难	很难
偏正	有可能	能	有可能	有可能	有可能
微光谱	难	能	不能	不能	不能

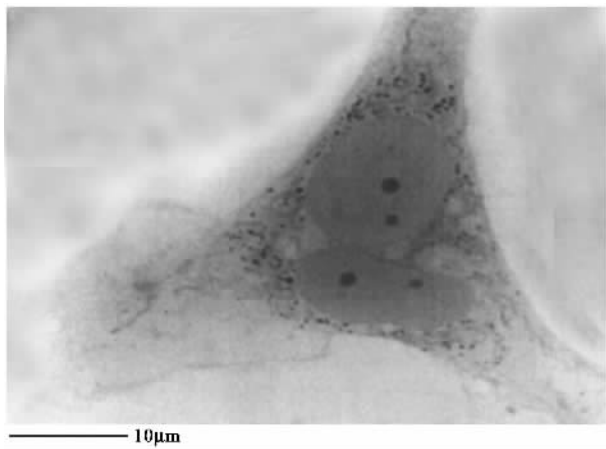


图 3 含水的鸡胚胎皮肤组织纤维原细胞的扫描 X 射线显微图 (细胞用戊二醛固定)

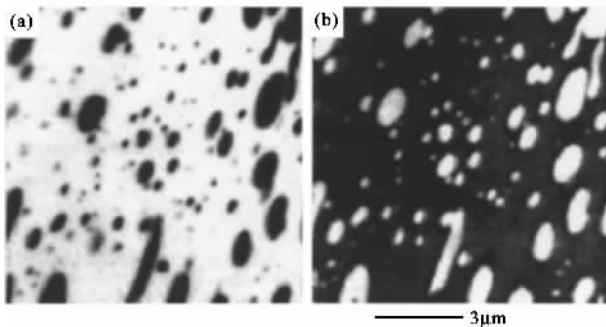


图 4 不同光子能量下的多聚 PC/PET 混合物的 STXM 显微图 (a) 285.36eV (b) 285.69eV

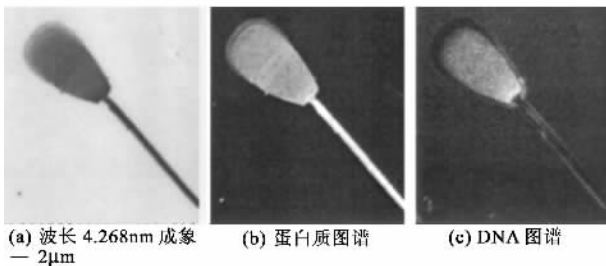


图 5 空气干燥的牛精子的 STXM 图像以及蛋白质和 DNA 的图谱 [从图 (a) 中无法分辨蛋白质和 DNA 的分布,但从图 (b) 和 (c) 的显微图谱可以看出,精子头部有一个蛋白质环带 (b),精子尾部不含 DNA (c)]

4 NSRL 的软 X 射线显微术实验站及其研究进展

实验站的光束线由前端、分束镜箱、六米真空段以及直线型单色仪四部分组成。直线型单色仪由三个不同参数的波带片和三个孔径不同的针孔光阑组成。波带片的参数见表 2。针孔的半径分别是 $100\mu\text{m}$ 、 $15\mu\text{m}$ 和 $4\mu\text{m}$ 。单色仪的工作波长范围为 $1.97\text{--}5.44\text{nm}$,覆盖整个“水窗”波段。实验站的光学系统如

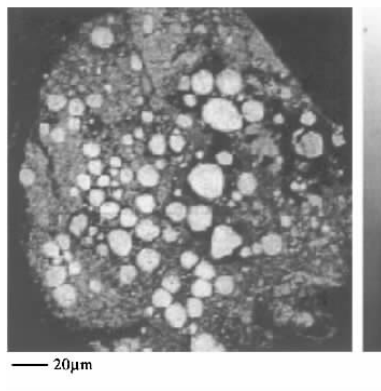


图 6 肌腱炎病人肌腱切片中 Ca 元素的定量图谱 图谱显示出病理情况下 Ca 元素的分布和沉积密度,最亮处的 Ca 的浓度为 $5.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$,切片厚度为 $0.1\mu\text{m}$,图下标尺是 $20\mu\text{m}$

图 7 所示。

表 2 会聚波带片 (CZPs) 主要参数

波带片类型	CZP ₂₃	CZP ₃₂	CZP ₄₅
主要波长/nm	2.3	3.2	4.5
波带片直径/mm	2.8	2.8	2.8
波带数	1506	1082	770
最外环宽度/ μm	0.465	0.647	0.909
一级焦距/mm	566	566	566

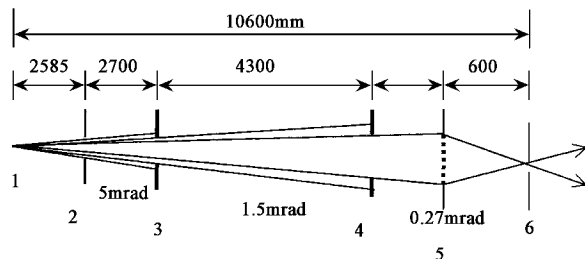


图 7 软 X 射线显微术实验站光束线光学系统图 (1 光源 2 分光板 3 光阑; 4 光阑; 5 波带片 6 针孔)

实验站目前已经开展的研究有 X 射线接触成像和三维成像。软 X 射线扫描透射显微镜正在建设之中。另外,实验站还开展了软 X 射线辐射生物学的研究。

接触显微成像是 NSRL 显微术站最早开展的 X 射线成像方法。目前已建立了一套较为完善的成像系统和方法,获得了癌细胞等多种生物样品的显微图像,且成像的空间分辨率好于 60nm ^[9,10]。

NSRL 开展的 X 射线三维成像研究主要包括同轴全息和全息 CT^[11-13]。同轴 X 射线全息成像的横向分辨率达到亚微米水平(约 $0.2\mu\text{m}$)^[14];将全息理论和 CT 技术结合起来的全息 CT 研究取得了较好的实验结果^[13]。

改造的扫描透射 X 射线显微镜正在建设之中。

20世纪90年代,NSRL曾经研制了一台软X射线扫描显微镜.由于利用直径 $2\mu\text{m}$ 针孔获得扫描光斑,因此该显微镜的分辨率较差.正在建设的扫描透射X射线显微镜将采用国际上目前通行的微波带片聚焦X射线方法获得扫描光斑.按理论计算,该显微镜的分辨率可达 50nm .实际确定的目标为分辨率不差于 100nm .

显微术光束线站提供波长连续可调的高亮度软X射线,且剂量可准确计算和测量.因此,它可用于诱变效应和育种研究.在国家自然科学基金的资助下,已有多位用户来站开展了生物样品软X射线诱变效应的研究并取得成果^[15].尤其值得一提的是,由于实验站可提供光斑直径最小达 $0.05\mu\text{m}$ 的聚焦X射线,因此它最适合生物样品的定位诱变.

在本文结束之际,作者希望广大国内外用户积极参与合肥国家同步辐射软X射线显微术的实验方法和应用研究.

参 考 文 献

[1] Folkard M. In :Mchette A G *et al.* ed. X-Ray Microscopy III , Proc. of the 3rd Intl. Conf. Berlin :Springer-Verlag ,1992 ,306—311
 [2] Mchette A G. Optical system for soft X-rays. New York :Plenum Press ,1986. 254—269

[3] Buckley C. Bone ,1992 ,13 :100
 [4] Jacobsen C. Trends in Cell Biology ,1999 ,9 :44
 [5] Ade H. Synchrotron Radiation News ,1994 ,(7 2) :11
 [6] Zhang X D ,Balhorn R ,Mazrimas J *et al.* J. Structural Biology ,1996 ,116 :335
 [7] 蒋诗平 张新夷. 物理 ,1998 ,27 :173 [Jiang S P , Zhang X Y. Wu(Physics) ,1998 ,27 :173 in Chinese]
 [8] Kirz J , Jacobsen C , Howells M. Quarterly Reviews of Biophysics ,1995 ,28 (1) :33
 [9] 蒋诗平 张玉 张新夷等. 光学学报 ,2000 ,20 :142 [Jiang S P , Zhang Y X , Zhang X Y *et al.* Acta Optics Sinica ,2000 ,20 :142 in Chinese]
 [10] 谢行恕 贾成芝 赵永飞等. 物理 ,1996 ,25 :104 [Xie X S , Jia C Z , Zhao Y F *et al.* Wu(Physics) ,1996 ,25 :104 in Chinese]
 [11] Jiang S P , Zhang Y X , Zhang X Y *et al.* In :Meyer-Illse *et al.* eds. X-Ray Microscopy , Proc. of the 6th Intl. Conf. New York : American Institute of Physics ,USA ,2000. 493—496
 [12] Jiang S P , Zhang Y X , Zhang X Y *et al.* Chinese Laser B ,1999 , B8 (1) :81
 [13] 张玉 张新夷. 物理学进展 ,2001 ,21 :12 [Zhang Y X , Zhang X Y. Progress in Physics ,2001 ,21 :12 in Chinese]
 [14] 蒋诗平 张玉 张新夷等. 光学学报 ,1999 ,19 :1079 [Jiang S P , Zhang Y X , Zhang X Y *et al.* Acta Optis Sinica ,1999 ,19 :1079 in Chinese]
 [15] 谭安江 徐厚容 蒋诗平等. 蚕业科学 ,1999 ,25 (1) :22 [Tan A J , Xu H R , Jiang S P *et al.* Acta Sericologica Sinica ,1999 ,25 (1) :22 in Chinese]

2002 年第 6 期《物理》内容预告

纪念《物理》创刊 30 周年专刊(I)

三十而立(《物理》本届主编阎守胜教授);
 写在《物理》创刊 30 周年(第二届《物理》主编应崇福院士);
 《物理》在推动交叉学科和高新技术应用中大有可为(第三届《物理》主编梅镇岳教授);
 《物理》可以促进物理学研究成果向高新技术产业转化(第三届、第四届《物理》主编吴自勤教授等);
 与时俱进(第五届、第六届《物理》主编王殖东教授);
 生物物理学的几个热点领域(中国科学院生物物理研究所陈润生研究员等);
 物理学与化学交叉——有机分子固体与聚合物的物理问题(中国科学院化学研究所朱道本院士);
 物理学与材料科学结合的机遇与挑战(北京科技大学材料科学学院材料物理系马纪东教授等);
 地震预测与统计物理(中国地震局地球物理研究所吴忠良研

究员等);
 量子通信(中国科学技术大学物理系薛鹏等);
 物理学与太空物理学交叉——太空物理学当代前沿及其交叉特点(中国科学院空间科学与应用研究中心刘振兴院士);
 物理学和天文学(中国科学院研究生院邓祖淦教授);
 天体粒子物理——天文学与粒子物理学的交叉(中国科学院高能物理研究所顾以藩研究员);
 医学物理学——物理学在医学中的应用(北京大学医学部医学物理教研组喀蔚波教授);
 物理学在促进农业发展中的作用(中国农业大学应用物理系金仲辉教授等);
 物理学与计算技术交叉——计算物理当前前沿及交叉特点(清华大学物理系倪军教授等).