

高分辨率 X 射线显微成像及其进展*

陈洁 柳龙华 刘刚 田扬超[†]

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室 合肥 230029)

摘要 介绍了高分辨率 X 射线显微成像产生背景和发展过程,着重分析了基于光学元件波带片的放大成像的基本原理,并简述了高分辨率三维成像的有关理论。同时给出国内外高分辨率 X 射线显微成像研究的最新进展,展望了高分辨率 X 射线显微成像的应用前景。

关键词 X 射线显微成像,高分辨率,波带片

High resolution X-ray microscopy and its new developments

CHEN Jie LIU Long-Hua LIU Gang TIAN Yang-Chao[†]

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

Abstract The background and principle of zone plate based high resolution X-ray microscopy is reviewed, as well as X-ray 3D imaging. The latest developments and future prospects in this field are also discussed.

Keywords X-ray microscopy, high resolution, zone plate

1 引言

1665 年,英国人 Robert Hook 设计和制造了一台光学显微镜,并第一次观察到细胞这一生物单元,从此显微镜登上了研究物质细微结构的历史舞台。显微镜是人类认识微观世界的重要桥梁,随着科学技术的突飞猛进,人们发明了各种显微镜。常规的光学显微镜受波长的限制(400—700 nm),分辨率很难突破 200 nm 的衍射极限。电子的德布罗意波长由加速电压决定,可远小于 1 nm。近代高分辨率透射电镜的点分辨率达 0.3 nm,线分辨率为 0.144 nm。但电子显微镜需要高真空环境,对生物样品的观测还需要一系列诸如切片、脱水等处理,这无疑破坏了样品的内部结构信息。而且电子在样品中的平均自由程很短,所以电子显微镜与近年来发展的力场显微镜和近场光学显微镜一样,虽然分辨率很高,但只适用于研究样品的表面结构。

1895 年,德国科学家伦琴在试验阴极射线管时发现了 X 射线,从此吸引了很多人开始研究 X 射线成像。X 射线波长短、穿透深度大,不仅具有对厚样

品进行无损纳米分辨成像的潜力,而且成像机制多样(如吸收、荧光、化学态、自旋、相位等),衬度来源丰富,同时曝光时间短,效率非常高,因而可观察分析多种微观物理、化学变化和微纳米结构,在生物医学、材料科学和工业上有着广泛的应用。多年来,人们已经发展了多种 X 射线成像技术。例如,X 射线接触式成像技术、X 射线扫描成像技术、X 射线光栅成像技术、X 射线类同轴成像技术(X 射线全息术)、X 射线衍射增强技术、X 射线干涉法成像技术和 X 射线 CT 技术等^[1-8]。然而这些成像技术的空间分辨率很低,一般取决于探测器或记录介质的分辨率,只达到微米或亚微米量级。

空间分辨率是确定图像清晰度的最重要指标。自发现 X 射线 100 多年来,提高 X 射线显微镜的分辨率一直是 X 射线显微学研究者追求的一个重要目标。但是由于缺乏性能优良的 X 射线光源和高分辨率成像光学元件,X 射线高分辨率成像的潜力

* 国家自然科学基金(批准号 10675113)资助项目
2006-12-04 收到初稿,2007-05-09 收到修改稿

[†] 通讯联系人, Email: ychtian@ustc.edu.cn

长期得不到发挥。一方面, X 射线的衍射效率比较低, 亮度较低的 X 射线管不足以产生足够强的携带高分辨信息的大角衍射信号; 另一方面, 缺乏适当的光学元件, 不能够在实验上实现精确的 X 射线聚焦。近 20 年来, 随着高亮度的同步辐射光源、自由电子激光、等离子体 X 射线源的发展, 加上纳米加工技术的飞速进步; 人们能够制作出高效率、高分辨率的物镜波带片; 再加上高速度、高灵敏的 X 射线探测器的研制成功, 高分辨率的 X 射线显微成像技术又重新活跃起来。目前, 基于波带片的高分辨率 X 射线显微术以其独特的魅力吸引了世界各国众多研究者的关注, 它能提供其他无损检测方法所不能提供的样品内部结构的细节信息。世界上许多同步辐射装置上都建造了高分辨率 X 射线成像装置^[9-12], 主要用于细胞分子生物学和材料科学方面的研究。

下面我们对基于波带片的高分辨率 X 射线显微术的原理、高分辨率的三维成像原理以及它们在各学科领域应用等方面进行详细论述。

2 基于波带片的高分辨率 X 射线显微成像

人类对微观世界的认识很大程度上取决于显微术的发展。人眼能达到的分辨率约为 0.2 mm, 而普通的光学显微镜则是利用聚焦透镜放大成像, 使人们观察到更细微的世界。众所周知, X 射线聚焦是一个令人头痛的问题, 这是由于在 X 射线波段中, 各种材料的折射率都近似等于 1。因此, 常规的折射光学元件都无法使用。近年来波带片应用于 X 射线聚焦得到了快速普及, 同时也正逐步作为物镜用于高分辨放大成像。

目前, X 射线成像采用的波带片是菲涅耳波带片 (Fresnel zone plates, FZPs)^[13]。波带片实质上就是一圆形的衍射光栅, 它是由线密度径向增加的明暗相间的同心圆环带组成的。根据菲涅耳圆孔衍射理论, 如果按公式 $r_n = \sqrt{n\lambda}$ 把圆孔连续分割成一个个半波带, 把奇数或偶数个半波带遮住, 就构成一个菲涅耳波带片 (图 1)。

波带片在环带足够多 ($n \geq 100$) 时, 具有与薄透镜一样的成像功能:

$$1/f = 1/L_1 + 1/L_2, \quad M = L_2/L_1, \quad (1)$$

式中 L_1 为物距 (样品到波带片的距离), L_2 为像距

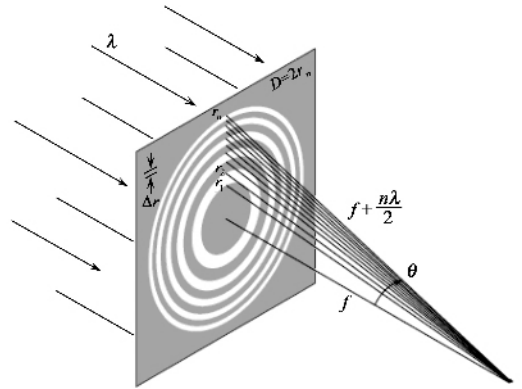


图 1 菲涅耳波带片 (r_1 为第一环带半径, r_n 为第 n 环带半径, Δr 为最外环宽度, λ 为入射光波长, f 为波带片焦距, D 为波带片直径)

(波带片到成像平面的距离) f 为波带片焦距, M 为放大倍率。

透镜空间分辨率的一种度量就是两个彼此不相干的点源能够被分辨的最小间距。它依赖于透镜的点扩展函数 (point spread function), 即一个远处点源在像平面上的强度分布。对于理想透镜, 包括波带片, 点扩展函数都是艾里图案。图 2 是波带片分辨两个衍射点光斑的截面示意图, L 为两点间的距离, r_{null} 为系统的分辨率 (文中用 Δ 表示)。当 $L > r_{\text{null}}$ 时, 系统能分辨出两个点, 否则, 不能分辨出两个点。其横向分辨率 Δ 既依赖于波长又依赖于透镜的数值孔径 (瑞利判据)^[14]:

$$\Delta = k_1 \lambda / NA_{\text{MZF}}, \quad (2)$$

式中 NA_{MZF} 为波带片的数值孔径, k_1 为由光源相干性决定的常量, 取值为 0.3—0.61。对于成像波带片, $NA_{\text{MZF}} = \lambda / 2\Delta r$ ^[15] (Δr 为最外环宽度), 而一般 k_1 取值为 0.61。将这些代入 (2) 式, 则可得到:

$$\Delta = 1.22\Delta r. \quad (3)$$

可见, 基于波带片的 X 射线成像系统的空间分辨率 Δ 取决于物镜波带片的最外环宽度 Δr 。因此, 要实现纳米级的空间分辨率, 波带片的最外环宽度也应为几十纳米, 但是制作这种波带片的技术难度很大。近年来, 在提高纳米加工技术的研究过程中, 人们发展了多种制作波带片的理论方法和新型技术手段 (电子束光刻技术、高分辨率光刻胶合成技术和 Overlay 纳米加工技术等)^[16-18], 同时设计了多种不同功能的波带片 (位相波带片、消色差波带片和多层次高效率波带片等)^[19-21]。这些都使得制造高衍射效率、高分辨率的波带片成为可能, 极大地推动了高分辨率 X 射线显微术的发展。目前, 在硬

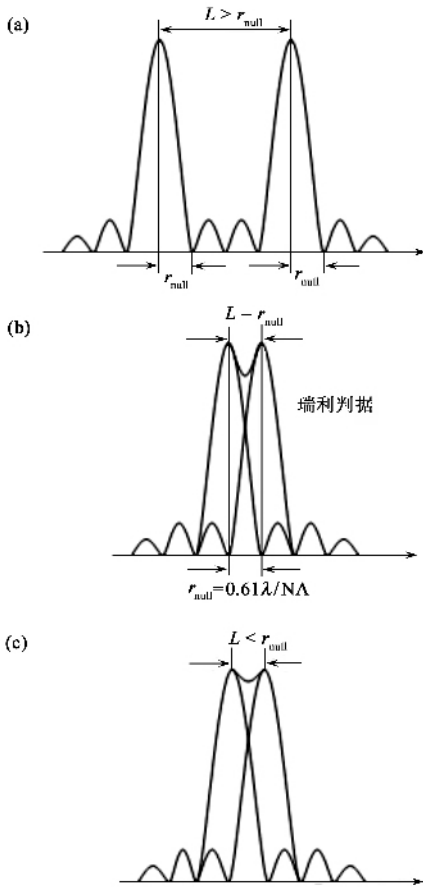


图2 两个衍射光斑能够被恰好分辨开的距离(图中(b)所示即为瑞利判据)

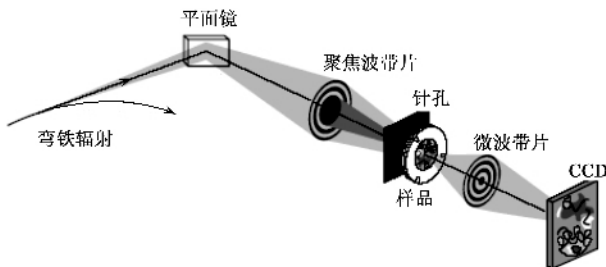


图3 ALS同步辐射光源的软X射线透射式显微镜XM-1

X 射线波段,美国 Xradia 公司已经制作出最外环宽度为 30 nm 的波带片^[22],日本 Spring-8 光源上实现了 30 nm 空间分辨率的 X 射线成像^[23]。在软 X 射线波段,美国的劳伦斯伯克利国家实验室的 Advanced Light Source (简称 ALS)同步辐射光源已经实现了 15 nm 空间分辨率的 X 射线成像^[18]。

图3为 ALS 同步辐射光源的软 X 射线透射式显微镜^[18]。图中聚焦波带片用于 X 射线聚焦和色散。微波带片(也称为物镜波带片)用作 X 射线显微镜的物镜进行放大成像。其中微波带片的参数

为:最外环宽度 $\Delta r = 15 \text{ nm}$,环带数 $n = 100$,直径为 $30 \mu\text{m}$ 。由于使用的光源部分相干,所以(2)式中 k_1 取 0.4,则空间分辨率 $\Delta = 0.8\Delta r$ 。因此,最外环宽度 $\Delta r = 15 \text{ nm}$ 时,其空间分辨率可优于 15 nm。此前,ALS 同步辐射光源已经制作了一个最外环宽度为 25 nm 的物镜波带片,取得了 20 nm 空间分辨率^[24]。

图4为使用最外环宽度分别为 25 nm 和 15 nm 的两个物镜波带片,分别对具有 19.5 nm 和 15.1 nm 半周期的 Cr/Si 多层喷镀金属膜的横断面进行成像。图4(a)图和图4(c)是用最外环宽度为 25 nm 的波带片分别得到的两个样品的 X 射线成像,图4(a)中的条纹和间隔显示了好的调制度(约为 20%),但是图4(c)的调制度为零,根本看不清楚,说明利用最外环为 25 nm 的波带片不能够分辨半周期为 15.1 nm 的多层膜。对于具有 19.5 nm 半周期的多层膜,与图4(a)图相比,用最外环宽度为 15 nm 的波带片得到的图4(b)图噪声更低,图像更加清晰。对于具有 15.1 nm 半周期的多层膜,与图4(c)图相比,利用最外环宽度为 15 nm 的波带片得到的图4(d)图,却显示极为优秀的调制度。这些都验证了 X 射线成像系统的空间分辨率与波带片最外环宽度的关系。

3 高分辨率的 X 射线三维显微成像

X 射线显微术一直是医学诊断和研究物质内部结构的重要手段。但是,X 射线成像装置是将三维的样品显示在二维的记录介质或探测器上,物质内部深度方向上的信息重叠在一起,引起混淆。为了克服这一缺点,所谓的计算机辅助断层成像技术(computerized tomography,简称 CT)发展了起来。1917 年奥地利数学家 Radon 最先提出 CT 的思想,其后又经过 Bracewell,Olendorf,Cormack 等人近一个世纪的发展,CT 技术无论在原理上还是算法上,都已经成熟,并且广泛应用到不同的领域^[25]。

CT 技术的基本思想如下^[26-29]。如图5所示,首先将 X 射线光照射在样品上,我们取得一组数据,然后转动样品台一个小角度 $\Delta\theta$,取得新入射角的另一组数据。如此重复,直至旋转 N_θ 次($N_\theta \times \Delta\theta = 180^\circ$),取得 N_θ 组数据为止,我们称每一组数据为一组“投影数据”。通过处理这些投影数据得到样品三维信息的过程,我们则称为“反投影”。“反投影”重构图像的思想为:断层平面中某一点的密度值可

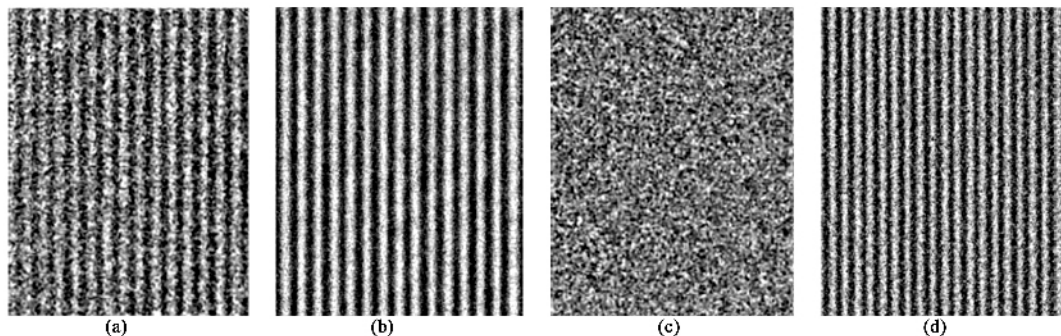


图4 (a)用最外环宽度为 25 nm 的波带片对具有 19.5 nm 半周期的样品的成像 (b)用最外环宽度为 15 nm 的波带片对具有 19.5 nm 半周期的样品的成像 (c)用最外环宽度为 25 nm 的波带片对具有 15.1 nm 半周期的样品的成像 (d)用最外环宽度为 15 nm 的波带片对具有 15.1 nm 半周期的样品的成像。其中 (a)和 (c)在波长为 2.07 nm(光子能量为 600 eV)的情况下获得 (b)和 (d)在波长为 1.52 nm(光子能量为 815 eV)的情况下获得

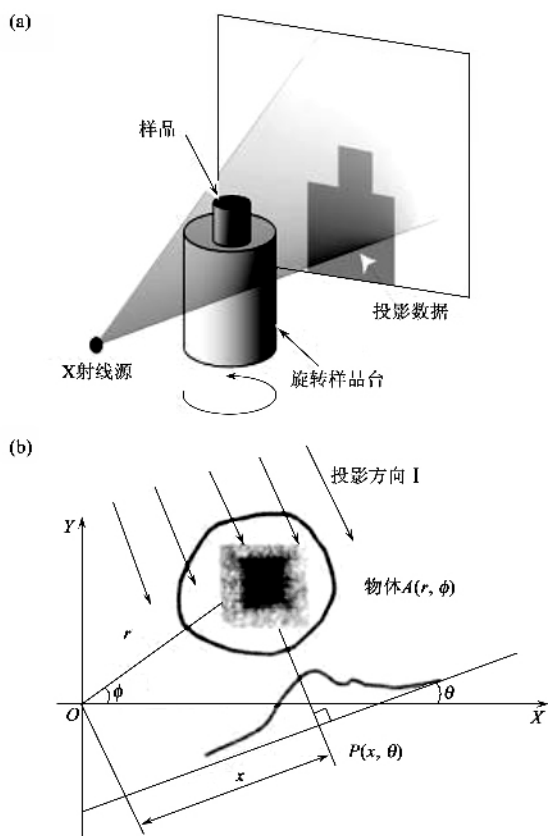


图5 CT 技术的示意图。(a)CT 装置的简单示意图 (b)样品的某一断层的投影示意图 $A(r, \phi)$ 为该断层在 XOY 平面内以极坐标表示的二维分布

看作这一平面内所有经过该点射线的投影之和(或平均值)。就是说,反投影是一个将投影数据“均匀回抹”的过程,在不同的投影线交点处,像素值由各个投影数据叠加得到。反投影得到的是某一个断层截面,最后通过软件将不同的断层截面组合得到样品的三维视图。图6很直观地反映了“反投影”的过程。样品为两个相隔的圆柱,利用反投影法,展示

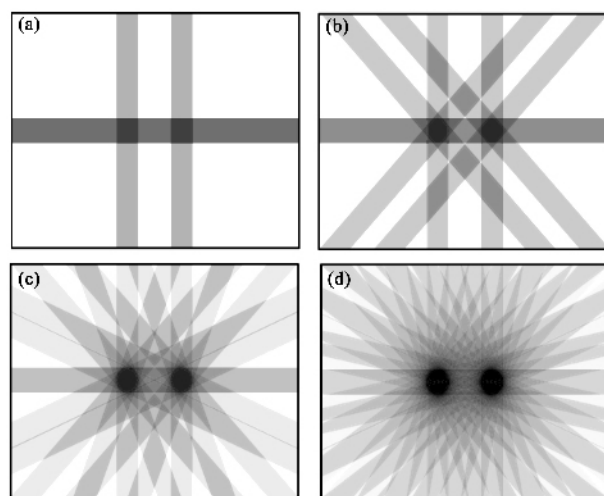


图6 反投影重构样品截面的过程的示意图

了分别由 2, 4, 8, 16 个投影数据叠加而产生的断层截面。由此可见,采集数据密度越大,即 N_θ 越大,得到的断层图像越清晰。

图5(b)是样品的某一断层的投影示意图,设 $A(r, \phi)$ 为该断层在 XOY 平面内以极坐标表示的二维分布,一束平行的射线沿投影方向 I 上穿过物体,在与 I 垂直的方向上(θ 角的方向)记录一维投影数据 $P(x)_\theta$:

$$P(x)_\theta = \int A(r, \phi) \delta[s - r \cos(\theta - \phi)] ds, \quad (4)$$

它表示沿着直线 $s = r \cos(\theta - \phi)$ 的线积分,即投影。用 $f(r, \phi)$ 表示反投影后得到的断层数据。根据反投影的叠加思想,反投影的表示如下:

$$\begin{aligned} f(r, \phi) &= \frac{1}{N_\theta} \sum_{i=1}^{N_\theta} P_{\theta_i} [r \cos(\phi - \theta_i)] \\ &= \frac{1}{\pi} \sum_{i=1}^{N_\theta} P_{\theta_i} [r \cos(\phi - \theta_i)] \Delta\theta_i, \quad (5) \end{aligned}$$

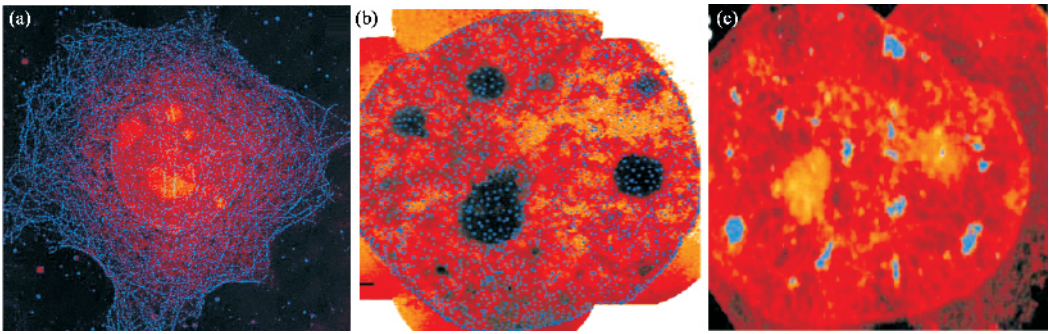


图7 (a)老鼠的乳腺上皮细胞的 X 射线显微成像(蓝色的为标记了的微管网络,橙色的为核仁)(b)人类乳腺上皮肿瘤细胞的核子(蓝色为标记了的细胞核膜上的细孔体系)(c)人类乳腺上皮肿瘤细胞的核子(蓝色为标记了的 RNA)

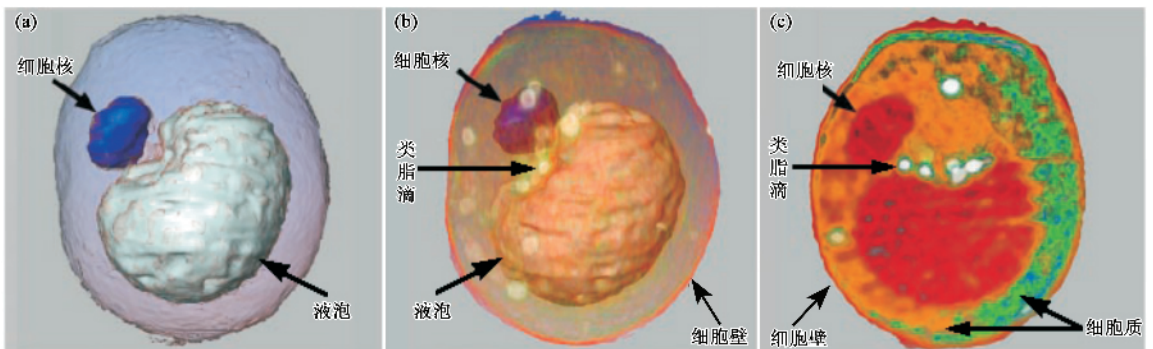


图8 发酵的酵母细胞不但是基因、分子和生物化学分析的模型系统,而且还是蛋白新陈代谢研究的重要对象。酵母细胞直径 $5\mu\text{m}$,显微 CT 空间分辨率为 60 nm 。(a)细胞壁半透明的三维显示 (b)细胞壁透明的三维显示 (c)断层厚度为 $0.5\mu\text{m}$ 的断层像

式中 $P_{\theta_i}[r\cos(\phi - \theta_i)]$ 是经过点 (r, ϕ) 的第 i 个投影值。由 (5) 式过渡到更一般的连续情况下的反投影表达式为

$$f(r, \phi) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\pi} P_{\theta}[r\cos(\phi - \theta)] d\theta. \quad (6)$$

三维图像重建的算法还有很多:傅里叶变换重建、滤波反投影重建、卷积法重建以及代数重建等算法。虽然反投影重建算法是原理最简单、直观的一种,却是理解其他重建算法的基础。把高分辨率的 X 射线成像技术与 CT 技术结合起来,即添加相应的旋转样品台和三维重构图像处理的软件,我们就可以得到高分辨率的物质内部三维分布^[30, 31]。

4 高分辨率 X 射线成像技术的应用

人们想探究物质超微观世界的强烈愿望使得高分辨率 X 射线成像技术成为当今世界的主要研究工具之一。将它与其他相关技术结合,可使其大放异彩。

近年来,生物样品制备技术、低温成像技术以及其他定影技术的迅猛发展,降低了 X 射线对辐射敏感的样品(特别是生物样品)的损伤^[32],使得高分辨率 X 射线成像技术成为研究细胞生物学的又一有力手段。同步辐射高分辨 X 射线成像技术在生物医学方面也取得了一些令人振奋的结果,美国的 ALS 同步辐射装置利用常规吸收衬度与免疫金标记法结合,获得标记的蛋白质或生物大分子体系在整个细胞的空间分布图(见图 7)^[33]。

美国的 ALS 同步辐射装置利用高分辨 X 射线成像技术研究酵母细胞的三维成像,其分辨率达到了 60 nm ,可以清楚地观察到细胞核、细胞质、类脂滴、甚至液泡(见图 8)。此三维图像是通过一系列细胞断层的图片(见图 9)重构得到的^[34, 35]。

在化学元素的吸收边,光子有足够的能量使特定轨道的一个电子跃迁并被吸收。因此,通过调节 X 射线的能量,使其高于或低于某一特定的吸收边,则特定的化学元素对图像的贡献将增加或减少。台湾的国家同步辐射研究中心则利用这一特性,研究

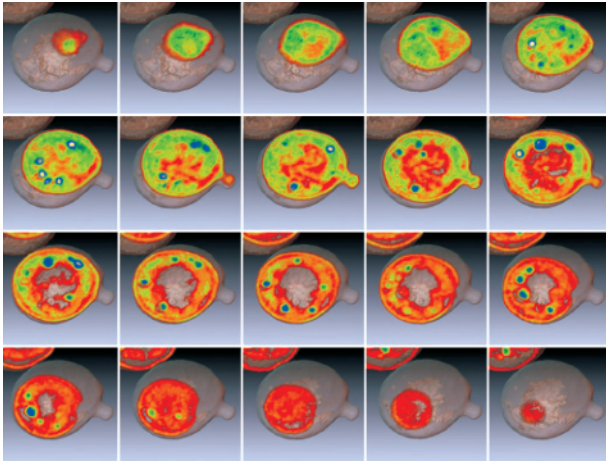


图9 发酵的酵母细胞不同的断层图片

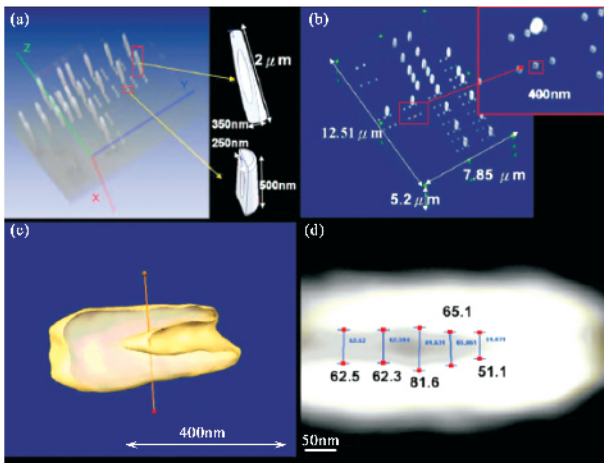


图10 (a)钨插控阵列的三维视图,右边分别为两个生成锁眼的插控 (b)集成电路中的钨插控分布图,红色区域的插控为图(c)中分析的插控 (c)插控的侧面三维示意图 (d)插控中锁眼尺寸的测量

了因生成锁眼(keyhole)而导致集成电路失效的机制(图10)^[36]。实验样品是集成电路中的微钨插控阵列,他们把X射线的波长调到0.118 nm(能量为10.5 keV)略高于钨的吸收边。实验得到了生成锁眼的插控的三维图像,分辨率达到60 nm^[36]。

5 结论与展望

目前,X射线显微成像的空间分辨率主要受限于波带片的最外环宽度和厚度,三维成像也受限于景深和有限的旋转角度。尽管如此,由于相应的光学和纳米制造技术也更加成熟,同时基础设计的不断改进和实用化,高效率的自动显微镜将保证高分辨率X射线显微术在材料、环境和生物科学中有着

光明的应用前景^[37]。当前,细胞显微是研究细胞及其内部各组成部分的结构、行为和功能的最重要的方法之一。近年来很多技术的出现,如4D技术、量子点技术和荧光能量共振技术等^[38-41],使人们可以原位、实时、动态地从细胞或亚细胞层次研究细胞内生物大分子间的相互作用,相互作用点的定位,信号转导通路,以及大分子在细胞内及细胞表面的分布、迁移。从事高分辨率X射线成像的研究者则是希望把这些技术结合起来,发展一种独特的方法来研究美妙的细胞分子世界。

参 考 文 献

- [1] 马礼敦,杨福家. 同步辐射应用概论. 上海:复旦大学出版社,2000. 512[Ma L D, Yang F J. Introduction to Synchrotron Radiation Applications. Shanghai: Fudan University Press, 2000. 512 (in Chinese)]
- [2] Majima T. Trends in Analytical Chemistry, 2004, 23 : 520
- [3] Burge R E, Yuan X C, Knauer J N *et al.* Ultramicroscopy, 1997, 69 : 259
- [4] Pfeiffer F, Wei T T, Bunk O *et al.* Nature Physics, 2006, 10 : 1038
- [5] Wilkin S W, Gureyev T E, Gao D *et al.* Nature, 1996, 384 : 335
- [6] Chapman D, Thomlinson W, Johnston R E *et al.* Phys. Med. Biol., 1997, 42 : 2015
- [7] Bonse U, Hart M. Appl. Phys. Lett., 1965, 6 : 155
- [8] Zhu P P *et al.* Appl. Phys. Lett., 2005, 87 : 264101
- [9] Meyer-Hise W, Warwick T, Attwood D. X-ray Microscopy. In: AIP Proceedings of the Sixth International Conference. Berkeley, CA, 1999. 743
- [10] Chao W L, Anderson E H, Denbeaux G *et al.* Proceedings of SPIE, 2000, 4146 : 171
- [11] Awaji M, Suzuki Y, Takeuchi A *et al.* Nucl. Instrum. Meth. A, 2001, 467-468 : 845
- [12] 柳龙华,刘刚,陈洁等. 中国科学技术大学学报, 2007, 37 : 93[Liu L H, Liu G, Chen J *et al.* Journal of University of Science and Technology of China, 2007, 37 : 93 (in Chinese)]
- [13] Yun W B, Chrzas J, Viccaro P J. SPIE, 1990, 1345 : 146
- [14] Born M, Wolf E. Principles of Optics. New York: Cambridge University Press, 1999
- [15] Yun W B, Howells M R. J. Opt. Soc. Am. A, 1987, 4 : 34
- [16] Anderson E H *et al.* J. Vac. Sci. Technol. B, 2000, 18 : 2970
- [17] Schneider G, Schliebe T, Aschoff H. J. Vac. Sci. Technol. B, 1995, 13 : 2809
- [18] Chao W L, Harteneck B D, Liddle J A *et al.* Nature, 2005, 435 : 1210
- [19] Kaulich B. SPIE, 1998, 3449 : 108
- [20] Wang Y X, Yun W B, Jacobsen C. Nature, 2003, 424 : 50
- [21] Fabrizio E D *et al.* Nature, 1999, 401 : 895
- [22] <http://www.xradia.com>

