

探索

生命科学的又一途径



同步辐射的软X射线显微术

J. 柯 兹*

方法及它的发展前景。



J. 柯兹在实验室

春天,小草钻出土地妈妈的怀抱,在微风中摇晃;树枝发出了嫩芽,给枯秃的枝干带来了生机.冬眠的熊、蛇开始蹭动它们的脑袋,小松鼠、小兔和驯温的鹿儿欣喜欢跃,田野里,绿苗敞开了它们的胸怀…….太阳撒下的万道金光,铸成了大自然永恒的生命.

在人类主宰的地球上,森林、田野、山岳、河川、植物、动物给人们带来赖以生存的新鲜空气、食物和原料.同时伴随着给人们带来灾难和疾病,在生命和生命的搏斗中,人类不断取得胜利,也付出了极其巨大的代价.

什么是生命?多少世纪以来,人们一直在寻求生命的起源,试图揭开生命的秘密.现在科学家们坚持不懈正从不同学科去攀登生命科学的高峰.

生物学家梦寐以求能有一台显微镜,可观察到活体生物在自然状态下的结构,希望能有很高的分辨率,如分子大小或近分子大小,当然越小越好.以求能窥视生物的秘密,以求能找到解开生命之谜的途径.

近几年来,物理学家探索到在软X波段,光子具有某种特性,可以作为这种显微术的探针.随着同步辐射光源的出现以及其他科学技术的发展,1983年科学家首次以75Å这个接近分子大小的分辨率得到了活体细胞的图象!这是何等使人感到欢欣鼓舞的进展啊!下面,我们将向读者介绍利用软X射线高分辨成象的

软X射线光子

目前,分辨率在亚微米级的生物成象技术主要有三种:

一、运用于可见光和近紫外光的光学显微技术.这种显微镜对未经加工的活体生物材料的成象是成功的.但由于波长太长,能量太小而不能达到分子级的高分辨率.

二、运用10keV左右的中间到硬X射线段的光子的X射线衍射.这种技术能得到原子级或近原子级高分辨、高质量的完全的三维图象.现在,科学家们利用X射线衍射研究象蛋白质、核酸和病毒等那些复杂的原子的集合体.但是X射线衍射要求生物样品加工成象宏观晶体或定向纤维那样的非生物状态,不能是在自然状态下的生物活体.

三、运用能量范围为5~2000 keV电子的电子显微镜.电子显微镜能处理非晶体的生物样品,但是通常需要生物样品染色,重原子脱水和生物细胞分解,失去窥视活体生物细胞的可能.

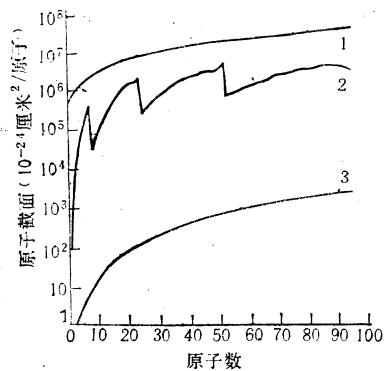


图1 主要成象作用的截面

1. 100keV 电子散射截面
2. 24Å 光子的光电子截面
3. 1.5Å 光子的相干散射截面

所以,迄今为止,

* J. 柯兹为美国纽约州立大学石溪分校物理学教授,美国同步辐射应用委员会执行主席

还没有一种技术,没有一种显微镜,能得到未加工生物细胞分子级分辨率的图象。虽然光谱学能给出未加工细胞的原子结构的某些信息,但不是完全的成象技术。

上述各种成象技术的局限性主要是由于成象粒子本身造成的。在光学显微镜中,正是由于可见光的波长而限制了成象的分辨率。在X射线衍射中,10keV光子相对较低的相干散射截面导致必须使用宏观晶体或定向纤维那样的样品,以便能得到足以成象的相互作用,维持适当的简化结构的需要。在电子显微镜中,由于电子散射截面大,所以有必要分解细胞。又由于散射截面和原子序数只有较弱的依赖关系,产生的图象对比度不高,就需要对样品进行染色和脱水处理。

科学家为了避免以上种种成象技术中的不足,对软X射线光子作为成象粒子进行了研究,发现软X射线的光电子吸收截面和原子序数及光子能量有很强的依赖关系(见图1),使细胞不需要脱水和染色就可获得足够的对比度。在大部分情况下,光子波长若稍大于氧的K吸收边(23.3Å),这光子与水的作用截面就非常小,这样就可以不必脱水,于是对活的生物样品进行成象研究就成为可能。另外,软X射线的光电子反应截面和原子序数及光子能量有很强的依赖关系,就可以容易分辨样品中的元素及其组成。更主要的一点是,软X射线光子的波长能使成象达到分子级分辨率。

到1950年,物理学家已经认识到软X射线的许多优点,但是苦于没有一个理想的软X射线源和良好的光学装置。

现有的显微镜

当软X射线光子与原子作用时,光电吸收为主要反应,其次是相干散射。软X射线显微术主要建立在这些反应及其结果的基础上。例如,光电子的发射、荧光、衍射以及价电子的重新排布。非相干散射对于软

表1 软X射线显微镜

类型	元件	分辨率(Å)	源
成象显微镜	波带片	500	同步辐射
		1000	
	*Wolter	100000	X射线管
扫描显微镜	波带片	2000	同步辐射
		500	
		1000	
	共轴球面镜 Wolter	<500 <1000	X射线管
接触显微镜	用电子显微镜 对化学抗蚀剂 进行图象转换	500 >50	同步辐射X 射线管、同步 辐射等离子体

* Wolter 即指以科学家 Wolter 命名的掠入射双反射镜系统。

X波段说来可以忽略。

表1列出了目前我们所知的已有的或在建造中的主要的软X射线显微系统。

·光学元件· 从表中可以看出,应用于软X射线的光学元件主要有透射型和反射型两种。波带片属于透射型,本质上是衍射装置,犹如反射系统中反射面逐渐使用的人工多层膜一样。软X射线光学主要建立在衍射的基础上,而一般光学和电子显微镜是运用光的折射原理。

波带片是一种圆型衍射光栅,其线密度以焦点辐射的方式径向增长。第m级焦点的聚焦长度近似等于 $r_1^2/\lambda m$,其中 r_1 为最内层波带的半径。根据瑞利判据,分辨率是 $1.22\delta r_n/m$,其中 δr_n 是第n级或最外层波带的宽度。联邦德国的物理学家们发明了一种全息照像术,他们利用紫外线光刻法加工波带片,最外层波带的宽度最小可达550Å。另一种方法是电子束光刻,即由计算机控制的聚焦的电子束将波带片图象印制在辐射敏感的高分子材料上。其他正在研究的技术包括软X射线干涉法,利用这种方法,人们可用一个母波带片产生一个更高空间频率的子波带片。正在研究的技术还包括波带片加工法,即将两层具有不同吸收或折射指数的材料交替溅射在直径为10—20微米的旋转线上。采用这种技术,人们使用一种特殊的车床,将有复盖层的线切割成波带片,利用离子刻蚀可以达到要求的厚度。这些技术或类似的技术大概可以把波带片的最外层宽度加工小到100Å。但时至今日,表1所列的最好波带片比它仍差5倍。

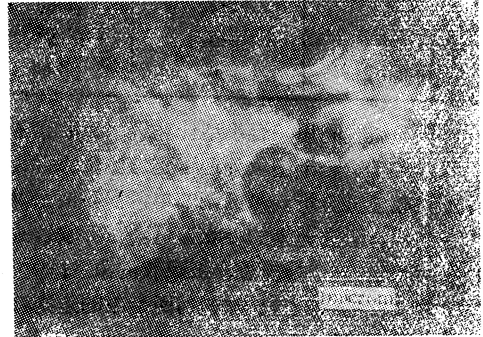


图2 德国科学家在BESSY储存环上用45ÅX射线拍摄的脱水的肝样品的象。曝光时间10秒

软X射线波段的反射光学系统主要应用一种Wolter配置,即用椭球和双曲面镜给出掠入射角上的全反射。据报道,有的实验小组的显微术已达到1微米的分辨率。近年来,随着人工多层膜的发展,有可能在近垂直入射中给出合适的反射率。在DESY的一个组利用共轴球面镜能方便地构成显微系统。Wolter系统也得益于多层镜面镀膜。

近来在衍射光学上的发展主要是建立小的衍射结

构的进展。这样软 X 射线显微术在某种程度上也是现代微加工工业的产物。

• **成象显微镜** • 安装在柏林 BESSY 电子储存环上的成象显微系统上，多色同步辐射光入射到距离 15 米的聚光波带片上。聚光镜将减弱的准单色源的象成在需显象的物体平面上。高分辨的微波带片在视场中产生一个放大的物象。人们可直接拍照或借助于多道分析仪看到象。

德国科学家已经运用它的显微术对湿的和干的样品成象达到大约 500 Å 的分辨率。他们已经利用 45 Å 的 X 射线在第一和第二衍射级成象，而且利用 24 Å X 射线在第一级成象。图 2 显示了一个 4 微米厚肝样品用 45 Å 的 X 射线成的象。

• **扫描显微镜** • 在扫描显微镜中，通过一个小的光束斑点对样品机械扫描。束斑的大小决定了显微镜的分辨率。扫描系统对样品上的束斑进行位置控制，并跟踪它的轨迹而显示出来，这样就不需要对位置敏感的探测器了。此种构置可使 X 射线有效地入射在样品上并减少样品的损坏。此外，光学系统也简化了。因为人们仅需要光轴上的一个静态点，而不需要考虑诸如离轴象差这样的问题。未被吸收的光子由一个正比计数器探测并计数。

成象质量的好坏，关键是要得到小的束斑——精细的“手术刀”。由于人们不能在相空间中增加光子密度，所以强光源是快速成象的重要途径。

表 2 接触显微镜

样品厚度(Å)	间隙 n	分辨率(Å)
<100	<4	50
1000	40	160
10000	400	500

扫描显微镜利用一台小型计算机积累贮存象的信息。这样特别适合于图象处理和定量测量分析。例如，样品的吸收显微分析，可以调节单色器，使光子能量复盖在某种待研究元素的吸收边值，在吸收边两侧分别拍摄两个象，一个是光子未被吸收的象，另一个是已被吸收的象，并从每个象中取数，两个象的差则就显示出这种待研究元素的分布了。

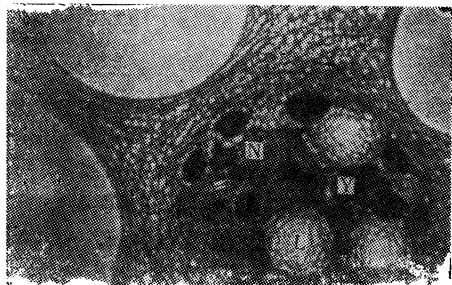


图 3 脊椎肌肉细胞的接触显微象

• **接触显微镜** • 当软 X 射线光子通过样品时，样品中任何一个结构上的细节都会由于吸收光子而产生一个影象。人们可以通过探测器记录这个信息。探测器必须具有适当的空间分辨率去记录成象的任何细小变化。现在的软 X 射线探测器已可达到大约 50 Å 的空间分辨率。可是，事实上，鉴于软 X 射线波段 50 Å 直径的影象实际消失在几个波长内，因此，更准确地说，这种技术的近似分辨率是 $\sqrt{n}\lambda$ 。其中 n 是光在样品细节与探测器之间运行波长数。25 Å 的 X 射线的分辨率可见表 2。

今天，我们所应用的具有高分辨的探测器主要是运用 X 射线感光剂。它们是有机高分子，其化学键结构和可溶性随 X 射线的变化而改变。将已经曝光的感光材料简单地浸到一种溶剂里，记录到的 X 射线的影象就会以感光剂不同密度而显示出样品的轮廓。人们可以在电子显微镜上以高放大倍数确定这个轮廓。图 3 是一个脊椎肌肉细胞的接触显微象。

接触成象技术现在已经在相当程度上在生物学中得到应用。美国 IBM 公司的科学家们已经把接触成象应用于对几种生物学的研究之中。现在对于有关血液片晶的研究，接触成象技术也是一种主要工具，象的显示细节达到了大约 75 Å，可以说，这是活细胞成象达到这样高分辨率的首例。估计，现在每年利用这项技术可以作一千个生物样品的研究。

• **光源** • 显微镜需要的软 X 射线源应有足够的强度，且光谱是可调谐的。高强度是为了快速成象，是获得一个清晰的活的运动细胞的象所必需的条件。可调谐性是为了揭示光子和原子相互作用的能量依赖关系所要求的。在专用的储存环中，0.5—1.0 GeV 的偏转磁铁同步辐射应用最为广泛。这样的源在软 X 射线波段具有峰值流强，光束无硬 X 射线分量而且装备单色器后便可调谐。

表 3 未来的显微术装置

类型	元件	分辨率(Å)	三维成象方式	振荡器
接触显微镜	改进的光学系统	100	多次曝光	
扫描显微镜	改进的光学系统	100	多次曝光	需要
接触显微镜		>50	多次曝光	
全息照相		100	单次曝光	需要
接触显微镜	重建成象法	50	单次曝光	
衍射显微镜		12.5	各种方式	可能需要

注：X 射线波长为 25 Å。

对于大部分的成象研究，特别重要的是光源的光谱亮度。这是因为成象技术中相空间和能量空间的体积通常受到一定的限制。这样光谱亮度就成为衡量集中在相空间和能量空间的辐射光源质量的重要标志。在不久的将来，我们期望在 1—5 GeV 电子储存环中运

用振荡器来加强光谱亮度。振荡器由一组永久磁铁组成。电子在运动过程中,受到磁场作用运动。在多次弯曲路径中,均发出同步辐射光,从而加强了辐射的光谱强度。振荡器的出现使一种能使分辨率达到更高的成象技术成为可能。

软 X 射线激光也是一种令人感兴趣的光源。它将高光谱亮度和高脉冲功率结合起来。对这种源的出现,已有报导。

除此之外,还有一种能适合于生物实验室使用的脉冲等离子体辐射源。它的亮度虽低,但有非常高的脉冲强度。此类源可在市场上买到。

显微术的未来和发展

科学家们正在为得到更好的光源和建设更佳实验系统而作不懈的努力。从表 3 中可以看到未来的软 X 射线显微系统的特性。表中列出了改进的光学系统、新的光源以及全息和有关的成象方法,也可看出对分辨率和三维成象产生的效益。

· 全息照相 · 运用现行的 X 射线显微术的原理进行三维成象是比较困难的,人们必须进行多次定向或焦平面重复进行二维成象。所花时间是很长的。这样的成象不可能用于活的生物样品。全息术能通过单次曝光产生一个三维象,这就提供了将高分辨率的三维成象推广到活的样品上的可能性。

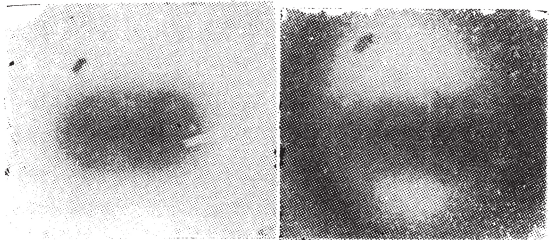


图 4 1—2 微米的石棉纤维软 X 射线全息图象及其再现图象

(a) 是软 X 射线拍摄的石棉纤维全息象,曝光时间一小时 (b) 是可见光激光产生的石棉纤维再现图象。

图 4 给出了近来在布鲁克海文真空紫外同步辐射源上进行的软 X 射线全息术的例子。它比以前的 X 射线全息实验有更好的分辨率。主要原因是由于源的亮度高,它可以大大增强在给定的分辨率水平上发光的相干性。

目前,运用简单的 Gabor 构置和照相胶片并在可见光中再构成象,其横向分辨率能达到 1—2 微米的量级,它和用适当的信噪比记录的条纹的角度是相一致的。这类全息照相分辨率的极限大约是 0.2—0.4 微米。为了获得更好的分辨率,人们可以利用高分辨率的感光剂,或者变成傅里叶变换全息照相。这二种方法现在看来是可行的。科学家们准备在这两方面做更进一步的工作。

由接触显微术产生的象是一个非常近场的全息术。重新成象是困难的。但是如果用一种多层感光薄膜迭在一起形成一组与样品的各种距离相关的全息图,也许再构象就有可能。这种技术一旦成功了,就能使接触显微术得到重大的改进,避免在单次曝光三维成象时由于样品厚度增加而使分辨率下降的现象。

· 衍射成象 · 在衍射成象中,探测器仅仅接受散射光子,而不同于在全息照相中使用的人射和散射光子的相干混合。衍射图的相位必须脱离参考光束而建立,这意味着可能会影响一次曝光成象的能力,它取决于使用的相位技术。然而衍射成象的构置便于考虑完全包围样品的探测器,对象的分辨率和三维性会带来潜在的好处。在布鲁克海文同步辐射实验室,以 J. 柯兹为首的实验组已经从单一生物细胞中记录到至今最大的直径分辨率 300 Å。

元素分析

正如我们前面提到的,当 X 射线光子的能量由低于内壳层电离阈值向高变化时,光电子截面显示出神奇的增长。同步辐射源光束线的可调性使它在软 X 射线显微术中可以很方便地利用这种效应。通常应用略有不同能量的 X 射线得到的同一样品的吸收象看起来非常相似。然而当能量处于一个吸收边或者包含着样品中存在的某元素的吸收边结构的特征值时,元素存在的位置上两个象会有明显不同,而这种差别将显示出元素的量及其化学态的信息。这就是 X 射线吸收微量分析。这种技术在 40 年代得到发展。以前做这类实验是非常困难的,但现在有同步辐射源和先进的成象技术,高分辨率地显示主要构成元素定量分布图象就成为可能。图 3 就是其中的一例。

生物中有兴趣的几种主要的轻元素在软 X 射线范围内有吸收边。这些元素包括碳、氮、氧、磷、硫、氯、钾、钙和铁。吸收微量分析不适合确定重元素的位置,特别当它们仅以痕量浓度存在时。对于这些元素,荧光微量分析提供了必要的灵敏度。因为荧光微量分析使用硬 X 射线,它的分辨率至今还不高,典型的分辨率现在不超过 1 微米。一些科学家在坎布里奇电子加速器上利用荧光信号得到成象信息。在他们的实验中,利用一个小孔出来的光束扫描样品,使用正比计数器或者硅(锂)探测器探测 X 射线荧光。新的 X 射线荧光的成象装置正在研制之中。

从物理学家的观点看来,表 3 所表示的 X 射线显微术将来的发展趋势,在 X 射线光学、全息照相及有关的成象科学,储存环及其他的 X 射线源有很多的工作要做。人们希望可以导致建立一系列能达到 10—100 Å 高分辨的三维成象技术。

如果 X 射线显微术起到了它能起的作用,也许生

物学家要做更多的工作。生物学家在利用电子显微镜方面已经作了许多工作，表现出巨大的智慧。在X射线显微术中，也需要类似的智慧去挖掘它的潜力。由于多年研究并熟悉了电子显微图中细胞结构形貌的科学家，现在必须去研究生物细胞的光子象，是很不容易的。两者看来截然不同，因为不同元素能得到不同的光子成象。科学家们既要熟悉处理过的细胞结构，又要熟悉未加工处理的细胞结构。但最重要的，如果我们真正实现了一种显微术能使活细胞成象，那么我们不仅要得到活体细胞结构的图象，而且还要把活体细胞的活动过程能在显微术中显示出来。

同步辐射光给了人类一把精美无比的手术刀，让人们去剖探活体生物细胞及更精细的结构，为探索生命之谜提供了一条充满光明的途径。

(徐 综 编译)