Røntgenmikroskopi i Århus

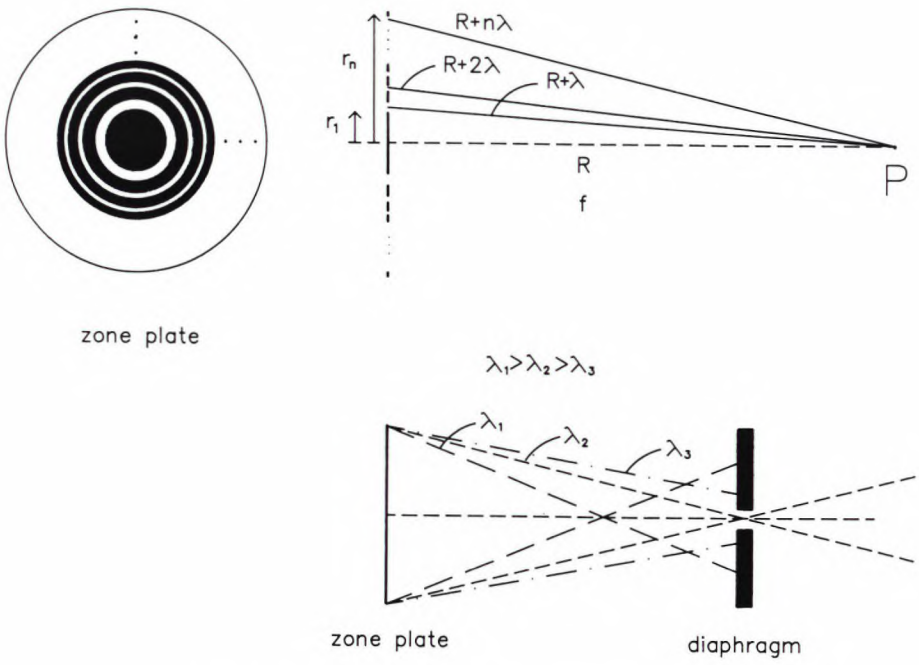
Robin Medenwaldt, ISA, Aarhus Universitet

Et af forskningsprojekterne ved Institut for Synkrotronstråling i Århus, ISA, er opbygning af et røntgenmikroskop. Røntgenmikroskopi er et ret nyt felt, for selvom der allerede i 40'erne blev lavet forsøg på dette område, er det først siden 70'erne, at der er sket større fremskridt i takt med at stærke røntgenkilder som lagerringe blev tilgængelige og udviklingen indenfor røntgenoptik accelererede.

Et mikroskops opløsningsevne er begrænset til omtrent den halve bølgelængde af den anvendte stråling. I et almindeligt optisk mikroskop er grænsen omkring 250 nm, mens et røntgenmikroskop kan afbilde meget finere strukturer, da bølgelængden i det tilfælde er 1 - 5 nm. Det vil ikke kunne konkurrere med elektronmikroskopet med hensyn til rumlig opløsning, men har dog andre fordele, især ved undersøgelse af biologiske materialer, idet en for objektet eventuel skadelig præparation kan undlades. Således har det været muligt, at tage billeder af våde - endda levende -celler med en opløsning på omtrent 60 nm.

Lagerringen i Århus åbner muligheden for at benytte et røntgenmikroskop, idet synkrotronstrålingen udsendt af de højenergetiske elektroner under afbøjningen i hjørnemagneterne har den ønskede energi og intensitet. Den nødvendige optik udvikles gennem et samarbejde med Dr.Schmahl og hans medarbejdere ved instituttet for røntgenfysik i Göttingen. Instituttet har eksisteret siden midten af 70'erne og arbejdet har overvejende været koncentreret omkring røntgenmikroskopi og den deraf udsprungne følgeforskning. For at undgå afhængigheden af en lagerring har gruppen således bygget et scanning røntgenmikroskop med en plasma lyskilde. Tillige byggede de det første billeddannende røntgenmikroskop, som i en forbedret version fungerer rutinemæssigt ved synkrotronstrålingsanlægget BESSY i Berlin. Et nyt mikroskop erstatter det gamle ved BESSY i løbet af foråret.

Den afgørende faktor i udviklingen af røntgenmikroskopi er optikken. Brydningsindekset for røntgenstråling i materiale er nær en, altså ikke meget forskelligt fra indekset i vakuum, hvorfor brydningslinser ikke anvendes til fokusering af strålingen. Omend fokusering af røntgenstråling er muligt med multilag spejle, har man indenfor det felt endnu ikke opnået en opløsning, der er tilstrækkelig til mikroskopi. Foruden brydning og refleksion kan man udnytte bøjning af røntgenlyset. Dette gøres med specielle gitre som Fresnelzoneplader (efter fysikeren Augustin Jean Fresnel, 1788 - 1827). Den såkaldte zoneplade er et diffraktionsgitter bestående af koncentrisk placerede ringe hvis bredde aftager med afstand fra centrum. Princippet er vist i figur 1. Ringene er skiftevis transparent og absorberende. Strålingen i punktet P interfererer konstruktivt, hvis afstandene fra de åbne ringe til P afviger med et helt antal bølgelængder som vist på figuren. Belyses en zoneplade med monokromatisk lys, vil der således et sted i afstand f på den optiske akse være en fokusering af strålingen. Afstanden fra centrum for den n'te ring er givet ved $r_n^2=n\Lambda f$, hvor Λ er bølgelængden. Bredden dr_n af de enkelte zoner er givet ved $dr_n=r_n/2n$.



Figur 1. Principtegning af zoneplader og røntgenmikroskop.

Da fokuseringen skyldes diffraktion, vil der ikke kun være én fokus men flere afhængig af afbøjningens orden m med tilhørende fokallængde $f_m=f/m$. I første orden fokuseres kun ca. 10% af den stråling, der rammer zonepladen. Summeres intensiteten fra alle ordener fås ½, nemlig den del, der går igennem de ikke absorberende zoner. Udnyttes fasedrejningsegenskaberne af det absorberende materiale og gøres zonerne samtidig ikke fuldstændigt absorberende, er det muligt at bøje større andele af lyset ind i de forskellige ordener. Ved zoneplader af germanium med en tykkelse af 400 nm fås en effektivitet, hvilket vil sige bøjning i første orden, på 20% ved en bølgelængde på 2.36 nm.

Opløsningen af strukturer under afbildning med zoneplader er ikke bedre end bredden af den yderste, tyndeste zone og nøjagtigheden af zonernes placering. Da det med de gængse metoder i fremstilling af zoneplader ikke er muligt at lave vilkårligt tynde zoner, er zonepladerne den afgørende faktor for hvor god en opløsning et mikroskop kan have.

Fremstilling af zoneplader er i dag hovedsagelig litografisk eller holografisk. Små zoneplader med en diameter, d, på mindre end omkring 1 mm kan fremstilles litografisk i et scanning elektron mikroskop ved at skrive strukturerne i en fotoresist, hvorefter disse overføres ved electroplating eller plasmaætsning i et underliggende materiale. Store zoneplader, diameter 1-10 mm, som i det billeddannende røntgenmikroskop bruges til fokusering af synkrotronstrålingen, kan ikke fremstilles på denne måde, da det store antal ringe (ca. 40,000 mod 250 ved mikrozonepladerne) vil tage så lang tid at skrive, at tilstrækkelig indbyrdes stabilitet mellem elektronstrålen og resistpositionen ikke er mulig. Disse store zoneplader, kondensorzoneplader, fremstilles ved at belyse en fotoresist med et zonepladelignende diffraktionsmønster fremkommet ved overlejring af to kohærente lysbølger, ligesom det er tilfældet i holografi; deraf betegnelsen holografisk fremstillede zoneplader. Resistmønstret overføres ligesom ved mikrozonepladerne med Reactive Ion Etching, RIE, i et underliggende materiale. Foreløbig har germanium vist sig at være optimal.

Samarbejdet mellem Göttingen og Århus i forbindelse med fremstilling af zoneplader har som sit mål at fremstille såvel kondensorzoneplader som mikrozoneplader af Ge på et Si bærefolie. Hidtil benyttedes polyimid, men dette materiale er ikke modstandsdygtigt overfor strålingen og levetiden derved begrænset. Derfor forsøges med andre materialer, og Si er meget lovende p.g.a. sin høje stabilitet selv ved meget små tykkelser og den lille absorption af strålingen. Fremstilling af tynde Si folier med en tykkelse under 100 nm er velkendt i Århus og sidste efterår lykkedes det at fremstille kondensorzoneplader på et 300 nm tykt Si bærefolie. Målet er Si tykkelser på 100 nm, men produktionen vanskeliggøres af de ødelæggende spændinger, som det pådampede Ge inducerer på foliet.

En zoneplades fokallængde afhænger omvendt proportionalt af bølgelængden, derfor vil en zoneplade i forbindelse med en blende anbragt på den optiske akse i en vis afstand virke som en monokromator, som det er skitseret på figur 1. Disse monokromatoregenskaber udnyttes i mikroskopet.

Århus mikroskopet.

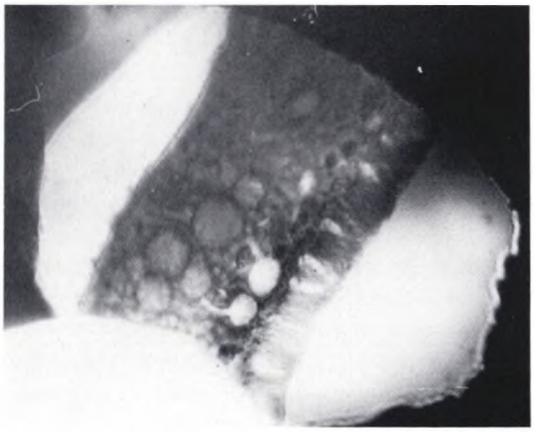
Det nye mikroskop i Århus, der er skitseret på figur 2, vil være et billeddannende. Med kondensorzonepladen, ZP, fokuseres strålingen gennem monokromatorhullet på prøven, O. Som et kompromis mellem rimelig høj monokromasi og alligevel tilstrækkelig intensitet benyttes et hul med en diameter på 0.02 mm hvilket sammen med kondensorzonepladen giver en monokromasi $\Lambda/d\Lambda=250$, ved bølgelængden $\Lambda=2.4$ nm. $d\Lambda$ er spredningen omkring Λ.

Det af objektet diffrakterede lys forstørres af mikrozonepladen, MZP, på en fotografisk plade eller et microchannelplate, MCP. Fokuseringen på objektet, for eksempel en celle, foregår i flere trin for at minimere strålingsbelastningen. I et optisk mikroskop findes cellens placering på prøveholderen som i et koordinatsystem. Herefter flyttes denne specielle holder over i røntgenmikroskopet, hvor positionen findes ud fra koordinaterne. Afstanden fra mikrozonepladen til objektet skal indstilles med mikrometers nøjagtighed grundet den lille fokaldybde. Fokuseringen foretages ved hjælp af microchannelplate, hvorefter det egentlige billede tages på en fotofilm, der har en høj opløsning og gode kontrastevner. Ofte tages flere billeder af objektet i forskellige afstande fra fokus, da fokaldybden er mindre end objektets tykkelse, når det drejer sig om celler, som har en typisk tykkelse på 5 µm. Den lange afstand fra mikrozonepladen til MCP giver den bedste udnyttelse af MCP's lysforstærkning. Kameraet er derimod anbragt det sted, hvor aberrationer fra mikrozonepladen er mindst.

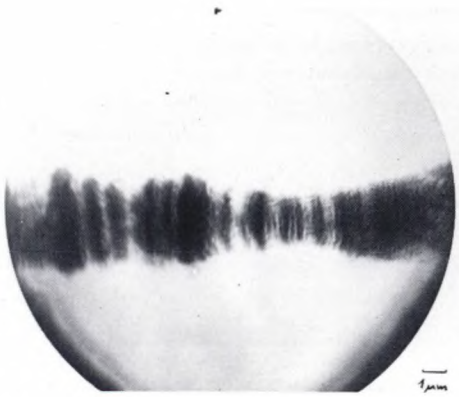
Undersøgelse af biologisk materiale foretages primært ved bølgelængder mellem 2.4 og 4.5 nm. I dette område, vandvinduet, er absorptionen i vand betydelig mindre end i proteiner, hvilket giver en naturlig kontrast mellem det biologiske materiale og det indeholdte og omkringliggende vand. Monokromatoregenskaberne ved mikroskopet kan endvidere bruges til i en vis forstand at kortlægge indholdet af grundstoffer i et objekt. Mekanismen er her den selektive absorption af bestemte bølgelængder fra røntgenspektret for de forskellige grundstoffer. Tages eksempelvis et billede på hver side af kvælstofs K-absorptionskant, vil intensitetsdifferensen af de to billeder netop vise områder med kvælstof.

Århus gruppen har allerede i nogle år i samarbejde med Göttingen gruppen taget billeder af celler ved mikroskopet i Berlin. Et af de første fra samarbejdet vises på figur 3.a. Motivet er et tværsnit af en epithelcelle fra en proximal tubulus i en rottenyre. Indlejringsmaterialet fra standardpræparationen (fiksering, dehydrering, indlejring i kunststof) er fjernet, idet det indeholder kulstof, som ville forringe kontrasten. Kontrasten udgøres derved hovedsagelig af proteinskelettet.

Derudover ses et af de seneste billeder taget ved BESSY af Peter Guttmann og Gerd Schneider. Objektet er et kæmpekromosom fra spytkirtlen af myggelarven Chironimus thummi. Billedet er taget i vandvinduet ved 2.4 nm bølgelængde. Kromosomet er indeholdt i en vandig saltopløsning mellem to 300 nm tykke kunststoffolier. Størrelsesforholdene er indikeret på billedet. Opløsningen i dette tilfælde er omtrent 50 nm. Fibrene mellem de højkondenserede



Figur 2. Snit af rottenyre observeret med røntgenmikroskop.



Figur 3. Røntgenmikroskopbillede af kromosom.

områder har en bredde på 60-120 nm.

Røntgenfotografering af levende celler er i almindelighed vanskeliggjort af cellernes bevægelser og diffusionsprocesser under eksponeringen, der varer mellem 10 sek og et minut. Det er dog lykkedes at tage billeder af levende celler, men denne del er endnu kun i sin begyndelsesfase.

Udviklingen i den nærmeste fremtid.

Zonepladerne er en af de faktorer hvor betydelige forbedringer er mulige. Da opløsningen af strukturer som nævnt afhænger af bredden af de yderste zoner i zonepladen, som i bedste fald har været 18 nm for mikrozonepladen, er der indtil videre opnået en opløsning på lidt under 50 nm. Der forsøges nu at skrive strukturer med en bredde på 10 nm, hvilket vil give en forbedring i opløsningen med en faktor 2. Også andre zoneplade materialer har været på tale i forbindelse med optimering. Si ville i givet fald have en højere effektivitet end Ge, men indtil videre er nogle praktiske problemer i fremstillingsprocessen ikke løst.

Røntgenmikroskopet i Århus forventes færdiginstalleret i løbet af foråret, og objektkammeret til biologiske vådprøver bliver udviklet til sommeren. Således vil mikroskopet være i sin færdige form til efteråret 91. Designet af mikroskopet er lavet med henblik på muligheden for at udskifte enkelte elementer relativ nemt, når nye ideer til forbedring skal realiseres. Denne dynamik, som modulopbygningen indebærer, tillader, at Århus mikroskopet kan holdes up to date i en del år frem. Indenfor biologi og medicin bliver røntgenmikroskopi formentlig et værdifuldt supplement til lys og elektronmikroskopet i kraft af de nye informationer som undersøgelse af biologisk - især levende - materiale kan frembringe.

Billedet af kæmpekromosomet er beskrevet i
'X-Ray Microscopy Investigations on Polytene Chromosomes Isolated from Salivary Glands of Chironimus thummi Larvae', af Peter Guttmann et al. og bliver publiceret i 'X-Ray Microscopy III', eds. A.G.Michette, G.R.Morrison, C.J.Buckley ; Springer Verlag (1991) in press.

En relativ ny artikel er udkommet i Scientific American i febr.'91, 'X-Ray Microscopes' af Malcolm R. Howells, Janos Kirz and David Sayre.

Desuden kan anbefales til yderligere læsning:
X-Ray Microscopy, eds. G.Schmahl and D.Rudolph, Springer Verlag 1984.
og
X-Ray Microscopy II, eds. D.Sayre, M.Howells, J.Kirz, H.Rorbeack, Springer Verlag 1988.



Robin Medenwaldt blev cand.-scient. på Århus Universitet i 1989 med speciale i højenergi channeling og er nu udstationeret for en længere periode i Göttingen med arbejdsområde røntgenmikroskopi.