

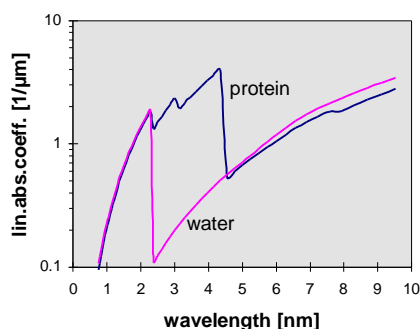
Røntgenmikroskopi i Aarhus med en opløsning på 30 nm

Robin Medenwaldt, ISA, Aarhus Universitet

Indledning

Røntgenmikroskopi er en relativ ny metode, der gør sig mere og mere gældende indenfor studier af mikrobiologiske og kolloidale systemer. Det attraktive ved røntgenmikroskopet er muligheden for at undersøge systemer i deres vandige miljø kombineret med høj opløsning (30 nm) og stærk kontrast. I Aarhus benyttes røntgenmikroskopi til studier i biologi, medicin, materialeteknologi og geo-videnskab. Et oversigt over, hvad der indenfor røntgenmikroskopi foregår på verdensplan, er givet i en artikel af Kirz et al.¹

Sammenlignet med lysmikroskopi er det muligt i mikroskopi med røntgenstråling at opnå en højere opløsning, fordi den benyttede strålings bølgelængde er meget kortere. Eksempelvis er bølgelængden af lys omkring 0.5 μm , mens den bløde røntgen, som benyttes i Aarhus, har en bølgelængde på omkring 2.5 nm, altså 200 gange mindre.



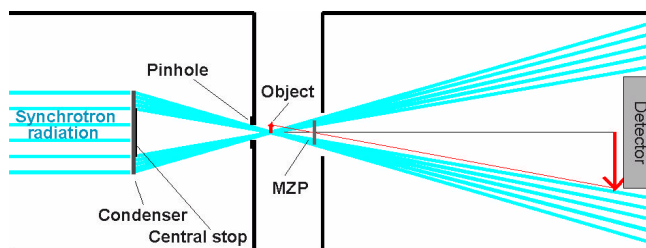
Figur 1. "Vandvinduet". Den lineære absorptionskoefficient μ_l for protein og vand omkring absorptionskanterne for ilt (2.4 nm) og kulstof (4.4 nm). Transmissionen T kan herudfra beregnes ved $T = \exp(-\mu_l \cdot t)$, hvor t er tykkelsen af materialet.

Valget af bølgelængden på 2.5 nm til røntgenmikroskopi er ikke tilfældigt. På figur 1 ser man absorptionen af strålingen i protein i forhold til absorptionen i vand som funktion af bølgelængden. Netop i bølglængdeområdet 2.4 – 4.4 nm for blød røntgenstråling, er absorptionen i vand meget mindre end i protein. Det betyder i praksis ved undersøgelser af biologiske objekter, f.eks. celler, at vandet i og omkring objekterne er næsten gennemsigtigt (hvilket altså ikke er en selvfølge), mens strukturerne, f.eks. cellekomponenter, fremtræder med god kontrast. I Aarhus benyttes for det

meste bølgelængden 2.4 nm, som ligger i vandvinduet og hvor transmissionen gennem vand er højest.

Teknisk beskrivelse

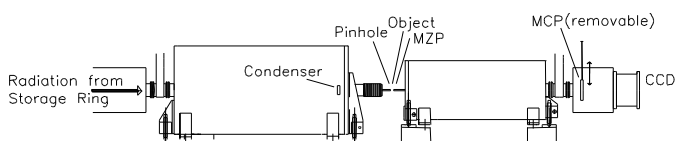
Transmissions-røntgenmikroskopet² ligner i princippet transmissions-lysmikroskopet. Et diagram, der viser strålegangen i Aarhus mikroskopet, er vist på figur 2. Med en kondensorlinse fokuseres strålingen (synkotronstråling fra lagerringen Astrid) på et objekt. Et objektiv bagved objektet (MZP=mikro-zone-plade, forklaret nedenfor) opfanger den transmitterede stråling og danner et billede på en detektor.



Figur 2. Strålegangen i røntgenmikroskopet.

Foran kondensatorlinsen bevirker en blænde ("Central stop" på figur 2), at strålingen danner en hul kegle. På den måde forhindres, at den direkte stråling rammer detektoren; herved undgås en høj strålingsbaggrund i det ønskede billede af objektet.

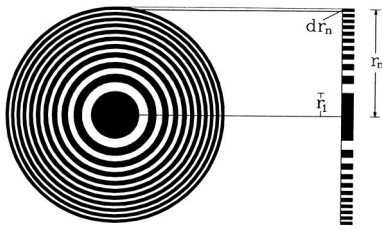
Et skematisk billede af røntgenmikroskopet ses på figur 3.



Figur 3. Skematisk tegning af røntgenmikroskopet i Aarhus. Længden af mikroskopet er omkring 2.5 m. MCP=mikro channel plate er en yderligere detektor, som kan skydes ind i strålen og som bruges til justering af mikroskopet.

I modsætning til lysmikroskopi kan man til blød røntgenstråling i praksis ikke benytte brydningslinser, fordi brydningsindekset i røntgenområdet for alle materialer er meget tæt på 1, ligesom det er for vakuum. Derfor benytter man sig af såkaldte zoneplader, se

figur 4, som er cirkulære gitre, hvor liniebredden aftager med radius.



Figur 4. Schematisk billede af en zoneplade med radius r_n , og yderste zones bredde dr_n .

Zoneplader er akromatiske, d.v.s. fokallængden afhænger af bølgelængden. Sammenhængen mellem zonepladens radius r_n , bølgelængden λ , fokallængden f og bredden af den yderste zone dr_n er givet ved $dr_n = 0.5 \cdot \lambda f / r_n$. Heraf ses, at fokallængden afhænger omvendt proportionalt af bølgelængden. Det har som konsekvens, at man kun kan benytte en zoneplade som objektiv, hvis strålingen er monokromatisk, hvilket vil sige, at den har en veldefineret bølgelængde.

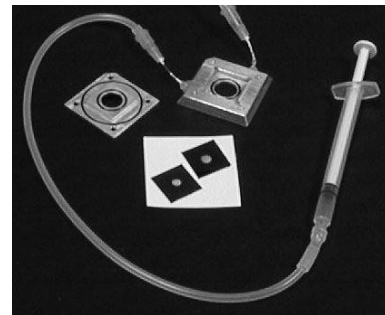
I røntgenmikroskopet opnås monokromatiseringen ved at placere et lille hul foran objektet (pinhole på figur 2 og 3), hvorigennem strålingen "filtreres". Kun stråling, der har en bølgelængde således, at den netop fokuseres i hullet, slipper igennem hullet. Stråling med en anden bølgelængde vil blive fokuseret foran eller bagved hullet og filtreres fra. Hvor veldefineret bølgelængden er, afhænger af hullets og kondensorens diameter. Ved røntgenmikroskopet i Aarhus, hvor disse to størrelser er hhv. $20 \mu\text{m}$ og 9mm , er bølgelængden så veldefineret som $2.40 \pm 0.01 \text{nm}$.

Opløsningen af en linse er generelt givet ved cirka det halve forhold mellem bølgelængden og den numeriske apertur af linsen. I lysmikroskopien er opløsningen derfor begrænset til $0.2 \mu\text{m}$. Sammenholder vi dette med formelen, hvor vi beskrev zonepladen, ser vi, idet den numeriske apertur $\approx r_n / f$, at bredden af den yderste zone netop er lig med opløsningen for zonepladen.

En nedre grænse for zonebredden er bestemt af de fremstillingsmetoder, som man har i dag. Der benyttes forskellige fremstillingsteknikker i dag, hvor den mest almindelige er elektronstråle-litografi^{3,4}, hvor man "tegner" zonerne i en fotoresist med en styret elektronstråle fra et elektronmikroskop. En anden metode, der dog ikke benyttes så meget mere, er holografi⁵, hvor man ved hjælp af laserteknik overlejrer to ultraviolette lysstråler til at danne et mønster, som udgør zonepladen. Det derved fremkomne mønster i fotoresisten overføres derefter til andre materialer, som f.eks. germanium eller nikkel, ved reaktiv ion ætsning. Opløsningen af zoneplader er i dag typisk 30nm og i bedste fald 20nm .

Detektoren er et såkaldt CCD kamera, som adskiller sig fra almindelige video kameraer ved at være kølet og have en langsom udlæsningshastighed. Derved undgås støjsignal fra elektronikken. At tage et digitalt billede med røntgenmikroskopet tager almindeligvis 5-20 sekunder afhængig af objektets tykkelse, der kan være op til $10 \mu\text{m}$.

Når et objekt skal undersøges i røntgenmikroskopet, placeres det imellem to meget tynde ($0.1 \mu\text{m}$) siliciumfolier⁶ i et specielt kammer, der er tætnet med kunststof ringe, så objektet ikke kan tørre ud. Et billede af objekt-kammeret er vist på figur 5. Folierne er valgt så tynde, så de ikke absorberer røntgenstrålingen unødvendigt og dermed forlænger eksponeringen; den forsøges holdt så kort som mulig. For at minimere absorptionen omkring objektet yderligere, omgives det med helium gas.

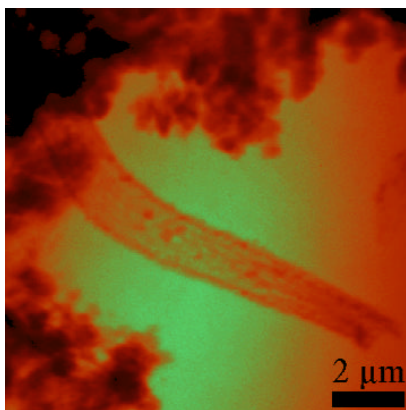


Figur 5. Fotografi af objekt-kammeret (bund og låg) med to sprøjter, der benyttes til at pumpe væske ind og ud af kammeret. Midt i billedet ses to silicium krystaller, der er tynde i midten og imellem hvilke objektet anbringes i kammeret.

Projekter

Som nævnt i indledningen, benyttes røntgenmikroskopet i Aarhus i en række projekter, der spænder over vidt forskellige videnskabelige grene. Et udvalg af projekter skildres i det følgende for at give et indtryk af ISA's forskningsaktivitet i forbindelse med mikroskopet.

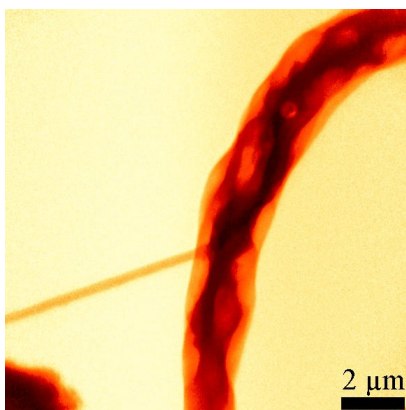
Biologisk jernudfældning: I Danmark er myremalm (myre=mose) et velkendt og hyppigt fundet fænomen. Jernforbindelser fra undergrunden er blevet udfældet i våde områder i en koncentration og mængde, der i århundreder har gjort det rentabelt at udvinde jern til videre forarbejdning. I samarbejde med Geomorfologisk Institut ved Aarhus Universitet undersøges de forskellige jernforbindelser i naturen med henblik på en klarlægning af bakteriernes rolle i udfældningen. På figur 6 er en bakterieskal fra en bakteriekoloni afbildet.



Figur 6. Röntgenbillede af en bakterieskal omgivet af jernslam.

I praksis benyttes bakterier med den egenskab, at de kan udfælde jern, i vandværker ⁷. Specielt omkring Esbjerg findes store mængder af jernforbindelser i undergrunden og pumpes op med grundvandet. Den typisk rødlig brune farve fra okkeraflejringer i åer og søer er velkendt. Det har vist sig, at jernudfældningen ved drikkevandsrensning er meget hurtigere, hvis bakterier involveres i processen, end hvis udfældningen alene foregår ved iltning på ren fysisk/kemisk vis. For at få en bedre forståelse for, hvordan bakteriernes effektivitet kan optimeres, undersøgte, i samarbejde med Aalborg Universitets afdeling i Esbjerg, vandet og jernudfældning i forskellige vandværker omkring Esbjerg.

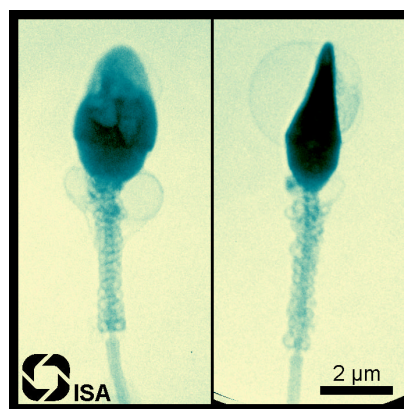
Pollen og deres tråde: Pollen transporteres mellem planter især af insekter, hvor klæbrige tråde på pollen sørger for, at kornet hænger fast på værtten under transporten. Trådenes beskaffenhed er afhængig af plantens art og studeres af botanikere med stor interesse, hvilket førte til et samarbejde med Reading University i England ⁸. På figur 7 ses et röntgenbillede af sådan en tråd fra planten *Clarkia tenella*.



Figur 7: Röntgenbillede af pollentråd.

Human sperm: Sperm fra mennesker er et emne, der har været diskuteret en hel del indenfor de seneste år,

idet sædkvaliteten synes at falde med det resultat, at mange par ikke kan få børn. Vi har i den forbindelse studeret spermatozoernes morfologi i en række projekter med Institutet for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi ved Aarhus Universitet ⁹ og med Department of Obstetrics & Gynaecology, University of Manchester, UK ¹⁰. Figur 8 viser to röntgenbilleder af spermatozoer, en set ovenfra og en set fra siden. Specielt for disse sperm var, at deres mitokondrier (spiralen lige under hovedet) var meget løse, hvilket formentlig hænger sammen med den såkaldte kapacitering, som er spermatozoernes forandring efter ejakulationen for at blive i stand (få kapacitet) til at befrugte ægget. Observeringen af de udvidede mitokondrier er ny og blev først opdaget med röntgenmikroskopet. På længere sigt vil disse studier være til hjælp i forbindelse med spørgsmål om fertilitet og kunstig befrugtning.



Figur 8: Röntgenbillede af human sperm.

Som nævnt var de her nævnte eksempler kun et udvalg af de projekter, som foregår ved ISA, hvor röntgenmikroskopi er involveret. Et besøg af vores web-site <http://www.isa.au.dk/SR/XRM/xrm.html> kan anbefales til dem, der vil følge med i röntgenmikroskopi i Aarhus.

Referencer:

- [1] J.Kirz, C.Jacobsen, M.Howells, *Soft X-ray microscopes and their biological application*. Quarterly Reviews of Biophysics **28**, 1 (1995), 33-130
- [2] R.Medenwaldt and E.Uggerhøj: Description of an X-ray microscope with 30 nm resolution. Rev. Scient. Instr. **69**, 8 (1998), 2974-2977
- [3] C.David, R.Medenwaldt, J.Thieme, P.Guttman, D.Rudolph, G.Schmahl: *Electron Beam Generated Phase Zone Plates with 30nm Zonewidth for High Resolution X-Ray Microscopy*. J-Optics (Paris), vol.23, no.6 (1992).

- [4] S.J.Spector, C.J.Jacobsen, D.M.Tennant, *Process optimization for production of sub-20 nm soft x-ray zone plates*. J.Vac.Sci.Technol. B 15(6), Nov/Dec 1997.
- [5] G.Schmahl, D.Rudolph, P.Guttman, and O.Christ, *Zone plates for X-ray Microscopy*. pp.63-74, in G.Schmahl and D.Rudolph (eds.) X-ray Microscopy, Springer Verlag, 1984.
- [6] R.Medenwaldt and M.Hettwer: *Production of Ultra Thin Silicon Foils*. Journal of X-Ray Science and Technology **5** (1995) 202-206.
- [7] E.Søgaard, R.Medenwaldt, J.Abraham-Peskir: *Comparison of Chemically and Biologically Iron Precipitation on Selected Danish Freshwater Plants*. Submitted to Water Research
- [8] J.V.Abraham-Peskir, R.Searle, R.Medenwaldt, and E.Uggerhøj: *A new technique of Examining Pollen-connecting threads*. Grana **36**, 6 (1997) 343-346
- [9] T.Vorup-Jensen, T.Hjort, J.V.Abraham-Peskir, P.Guttman, J.C.Jensenius, E.Uggerhøj, R.Medenwaldt: *Ultrastructure of Human Spermatozoa Shows Change of Mitochondrial Morphology During Capacitation*. Human Reproduction.
- [10] J.Abraham-Peskir, E.Chantler, C.Mc.Cann, and R.Medenwaldt: *Ultrastructure of Human Sperm using X-ray Microscopy*. Medical Science Research, Vol.26, no.10, (1998)