

# 相干 X 射线衍射成像技术及在材料学和生物学中的应用\*

范家东 江怀东†

(山东大学晶体材料国家重点实验室, 济南 250100)

(2012 年 4 月 19 日收到; 2012 年 5 月 25 日收到修改稿)

无损获取高分辨率、高衬度微纳米材料结构图像, 并能够原位、定量分析是 X 射线成像技术发展方向之一. 最新发展起来的相干 X 射线衍射成像技术, 也称为无透镜成像技术, 为实现这一目标提供了可能. 本文介绍了相干 X 射线衍射成像技术的成像原理和发展过程, 以及在材料学和生物学中的一些典型应用和最新进展, 例如掺杂铋元素在硅晶体中的分布成像, GaN 量子点壳层结构的三维高分辨成像, 染色大肠杆菌的二维成像, 鱼骨的二维成像及矿化机理研究, 单个未染色疱疹病毒的二维高衬度成像, 未染色酵母菌细胞的三维高分辨成像及原位定量分析. 最后对相干 X 射线衍射成像技术的发展方向做了展望. 随着 X 射线自由电子激光的应用和冷冻技术与相干 X 射线衍射成像技术的结合, 相干 X 射线衍射成像技术将得到快速的发展和广泛的应用.

**关键词:** 相干 X 射线衍射成像, 过度取样, 相位恢复, 定量成像

**PACS:** 87.59.-e, 87.64.Bx, 42.30.Rx, 68.37.Yz

## 1 引言

1895 年伦琴首次发现 X 射线以来, X 射线被广泛用于成像和结构解析. 其中布拉格根据晶体的 X 射线衍射现象, 将 X 射线用于解析晶体的原子和分子结构. 经过近 100 年的发展, X 射线晶体学在解析晶体的原子结构方面起了重要作用. 但是 X 射线晶体学的方法不适用于具有复杂结构的非结晶性样品, 如细胞、病毒、多数膜蛋白等生物样品等<sup>[1]</sup>. 因此, 需要通过其他显微成像方法获得此类样品的微观结构图像.

用于获取非结晶性样品微观结构的传统成像方法主要有光学显微镜、电子显微镜、原子力显微镜和透射 X 射线显微镜等. 但是普通光学显微镜的分辨率仅为 200 nm 左右, 很难满足高分辨率的要求. 经过特殊技术处理的光学显微镜分辨率可以达到 50 nm 左右<sup>[2]</sup>, 但是对于生物样品需要染

色处理, 且只有染色部分可见<sup>[3]</sup>. 电子显微镜, 如扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, 简记为 SEM)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, 简记为 TEM) 和原子力显微镜 (atomic force microscope, 简记为 AFM) 尽管可以获取微纳米样品的高分辨率图像, 但是 SEM 和 AFM 仅能提供样品的表面形貌信息. 虽然 TEM 可以进行三维高分辨成像, 但是由于电子的多级散射和穿透能力有限, TEM 只能获得厚度不超过 500 nm 样品的三维结构信息. 对于更厚的样品则需要切片处理, 限制了 TEM 在微米级样品三维无破坏成像中的应用. 由于 X 射线具有波长短、穿透能力强的特点, 是对微纳米样品进行无破坏高分辨成像的理想光源. 但 X 射线聚焦元件制造困难, 目前采用波带片聚焦 X 射线<sup>[4-7]</sup>, 最高分辨率很难超过 10 nm<sup>[8-10]</sup>, 且焦深小于 0.5  $\mu\text{m}$ , 限制了成像样品的厚度. 同时传统的吸收 X 射线显微镜成像衬度和分辨率较低. 一种全新的 X 射线成像技术——相

\* 国家自然科学基金 (批准号: 51002089)、山东省自然科学基金 (批准号: JQ201117)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (批准号: 20110131110016)、山东大学自主创新基金 (批准号: 2010JQ004) 和山东大学优秀研究生科研创新基金 (批准号: yyx10104) 资助的课题.

† E-mail: hdjiang@sdu.edu.cn

干 X 射线衍射成像的出现能够弥补以上显微成像系统的缺陷,在非结晶物质的显微成像方面有广阔的应用前景.

相干 X 射线衍射成像技术 (coherent X-ray diffraction imaging, 简记为 CDI 或 CXDI)<sup>[11]</sup>,是以相干 X 射线为光源,通过测量样品的相干衍射图样,采用相位恢复算法对相干衍射图样进行相位恢复和图像重建的成像方法.由于 CDI 不以透镜为成像元件,克服了由于透镜的数值孔径和波带片对成像分辨率的限制,其理论分辨率仅受到 X 射线波长的限制,可达原子水平.另外,CDI 成像技术不依靠 X 射线吸收成像,不存在衬度降低现象.该方法由 Sayre 等<sup>[12,13]</sup>在 1980 年首次提出.1999 年 Miao 等<sup>[14]</sup>在实验上首次成功实现非晶样品的二维衍射成像.经过十几年的发展,此项技术已经被广泛应用于材料学、生物学、物理学等学科的科学研究中,成像分辨率在不断提高.目前采用 CDI 成像系统,最高二维和三维分辨率分别为 2 nm<sup>[15]</sup>和 10 nm<sup>[16]</sup>,其中,生物样品的二维、三维成像最高分辨率分别为 10 nm<sup>[17]</sup>和 50 nm<sup>[18]</sup>.

经过十几年的发展,CDI 成像技术已经发展为多方向、多用途的高分辨成像方法.根据 CDI 成像技术所采用的光源,主要有以下几个发展方向:1) 基于第三代同步辐射光源的 CDI 成像技术<sup>[14-48]</sup>,是目前应用最广、技术较为成熟的相干衍射成像技术;2) 以 X 射线自由电子激光为光源的 CDI 成像<sup>[49-53]</sup>,对 X 射线自由电子激光相干衍射成像做了初步的探索与应用;3) 基于相干软 X 射线光源和软 X 射线激光光源的桌面 CDI 成像系统<sup>[54-58]</sup>,探索了相干衍射成像技术便捷化和小型化的可能.

本文中我们以基于第三代同步辐射光源的平面波 CDI 成像技术为重点,将文章主要分为五部分:第一部分是对 CDI 成像原理和相位恢复算法的介绍;第二部分对 CDI 成像技术在材料学中的应用进行简单的介绍和讨论;第三部分是 CDI 成像技术在生物学成像中的最新进展和简略评述;第四部分是对 CDI 成像技术的展望;第五部分是结论.

## 2 相干 X 射线衍射成像原理及相位恢复方法

### 2.1 CDI 成像原理

CDI 成像技术是 X 射线晶体学的发展和延伸,二者在成像原理上既存在相同点又各有特点.由于

晶体具有周期性结构,对 X 射线具有衍射增强作用,衍射图样是高强度、离散的布拉格衍射点.非晶样品由于不存在周期性结构,若采用非相干光源照射样品,得到的衍射图样是模糊的衍射信号,没有确定的相位关系.而当一束相干光源,如相干 X 射线、激光、相干电子束等照射非晶样品时,所获得的衍射图样是微弱且连续的衍射信号,具有确定的相位关系<sup>[14-64]</sup>.根据玻恩近似条件,远场处的相干衍射图样为样品的傅里叶变换<sup>[65]</sup>.如果同时知道衍射图样的强度和相位信息,即可得到样品在实空间中的图像,这是 CDI 成像的基本原理,如图 1 所示.但是在 CDI 成像中相位信息不能直接测量,因此在 CDI 成像中同样需要求解相位信息.

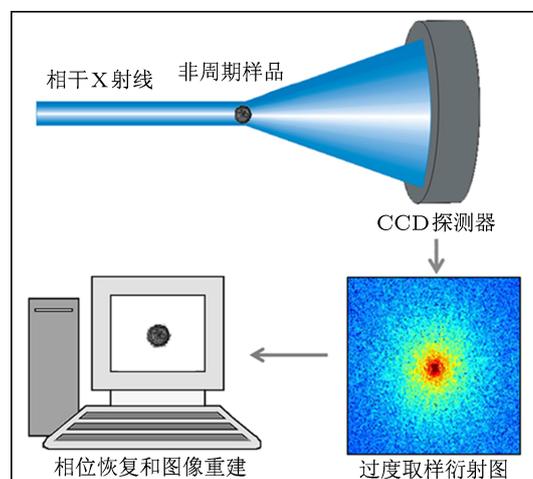


图 1 相干 X 射线衍射成像原理示意图 (color online)

### 2.2 相位问题

相位问题的产生是由于 CCD 或者其他探测器只能记录样品衍射图样的振幅(强度)信息,而不能记录相位信息.只有在同时知道相位和振幅信息的情况下,对衍射图样做反傅里叶变换,才可以获得样品在实空间中的结构图像.由于晶体具有确定的点群和空间群结构,为解决晶体的相位问题提供了充足的信息.目前有多种方法求解晶体衍射图样的相位信息<sup>[66-70]</sup>.由于非晶材料结构的无序性,相干衍射图样是连续且低强度的衍射信号,缺少充足的已知条件进行相位求解.

过度取样理论的提出和发展为非晶样品相干衍射图样的相位求解问题提供了理论基础. Sayre 根据晶体布拉格衍射和 Shannon 取样理论<sup>[71]</sup>,在 1952 年首次提出,如果能够测量晶体布拉格衍射点之间的强度,也许能够直接求解晶体衍射图

样的相位信息<sup>[72]</sup>. 1980年, Sayre又指出单个分离样品的衍射图样是连续的, 不受布拉格衍射的限制, 能够有更高的取样频率, 可将X射线晶体学方法扩展到非晶样品领域<sup>[12]</sup>. Bates<sup>[73,74]</sup>进一步研究了相位求解问题, 在1982年根据自相关理论提出, 在衍射图样每个方向上的取样频率超过布拉格衍射频率两倍的时候, 具有唯一的相位信息. Miao等<sup>[75]</sup>深入研究了过度取样理论, 指出Bates的取样理论过于苛刻, 提出当可测量强度点总数超过图像未知点数目时, 相位信息即可恢复. 过度取样率可表示为

$$\sigma = \text{可测量点总数} / \text{未知点数目}. \quad (1)$$

过度取样方法如图2所示. 图2(a)为样品通过傅里叶变换在倒空间的衍射图样, 过度取样率为1, 可用 $N \times N$ 大小的矩阵表示. 对图2(a)做反傅里叶变换, 得到样品在实空间图像也是 $N \times N$ 的矩阵(图2(b)). 当衍射图样 $XY$ 方向分别以2倍的尼奎斯特频率进行取样, 即过度取样率为4时, 衍射图样矩阵大小为 $2N \times 2N$ (如图2(c)), 对衍射图样做反傅里叶变换, 所得实空间中的图像矩阵大小为 $2N \times 2N$ , 样品部分的矩阵大小仍为 $N \times N$ , 但是在样品的外面被无电子区域包裹如图2(d)所示. 其中, 过度取样率越高, 无密度的区域所占面积的比例也越大. 周光照等<sup>[76,77]</sup>通过数值模拟研究了过度取样率和噪音对重建的影响, 证实过度取样率为3—7之间时重建效果最佳.

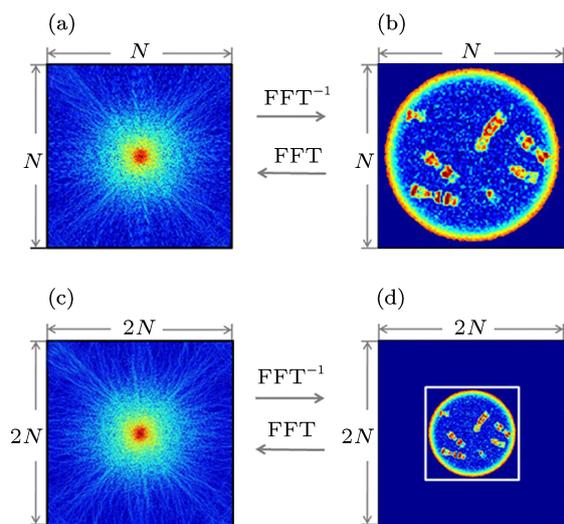


图2 过度取样方法示意图 (color online)

理论上过度取样方法能够有效解决非晶样品衍射图样的相位问题, 但是如何将相位从强

度信息中恢复出来仍是一个难题. 迭代算法为提取相位信息提供了便捷有效的途径. 其中Finup在1978年根据Gerchberg和Saxton<sup>[78]</sup>的工作, 提出了两种迭代算法<sup>[79,80]</sup>, 并在实验上成功进行了相位恢复. 目前常用的迭代复原方法有: 混合输入-输出算法 (hybrid input-output algorithm, 简记为HIO)<sup>[75,76]</sup>, different map算法<sup>[33,81]</sup>, 引导混合输入-输出算法 (guided hybrid input-output algorithm, 简记为GHIO)<sup>[82]</sup>, shrink-wrap算法<sup>[83,84]</sup>等. 其中Fineup的HIO算法以及以此为基础发展而来的GHIO算法是提取相位信息常用的方法. 主要包括以下几个步骤<sup>[82]</sup>: 1) 赋予原始衍射图样一个随机初始相位, 对重组衍射图样进行反傅里叶变换; 2) 设定约束条件, 符合约束条件的重建图像得到保留, 约束条件以外的重建图像逐渐消去; 3) 对施加约束条件的重建图像进行傅里叶变换, 提取衍射图样的相位信息, 将其与实验测得的衍射图样振幅信息进行重新整合, 获得相位更新的衍射图样; 4) 对重新整合衍射图样进行反傅里叶变换, 从而得到更新的重建图像; 5) 反复进行2)—4)步骤. 为了表征图像重建的质量, 将理论计算衍射图样的强度与实际测量衍射图样的强度的误差系数用来作为评价重建质量的标准, 即

$$R_f = \sum \left| \frac{|F_{\text{cal}}| - |F_{\text{exp}}|}{|F_{\text{exp}}|} \right|, \quad (2)$$

$R_f$ 系数越小, 重建图像的正确度越高.

采用过度取样与迭代相结合的方法能够成功解决非晶样品衍射图样相位恢复问题. Miao等<sup>[85]</sup>的模拟计算表明此方法同样适用于求解晶体样品衍射图样的相位问题.

### 3 相干X射线衍射成像技术在材料学中的应用

X射线与物质的作用是X射线与物质电子的相互作用, 由于X射线具有波长短、穿透能力强的优势, 为样品的高分辨成像、电子密度定量计算及样品性质研究等提供了理想光源. CDI成像技术的出现克服了传统X射线显微镜难以聚焦、分辨率和衬底较低的缺陷, 已经被广泛应用于材料三维微观结构成像<sup>[16,18–20,24,34,37,43,47]</sup>、样品定量分析<sup>[21,86–88]</sup>、化学元素分布成像<sup>[32,89]</sup>、纳米晶体应变场成像<sup>[23,24,28,90]</sup>等研究方向.

### 3.1 首次相干衍射实验

1999 年 Miao 等<sup>[14]</sup> 首次成功实现 CDI 成像, 实验证明了非晶样品衍射图样可以进行相位恢复和图像重建. 测试样品是由沉积在厚度为 100 nm 氮化硅薄膜上的金颗粒组成的一组字母, 其扫描电子显微镜和光学显微镜照片分别如图 3(a) 和 (b) 所示, 图 3(c) 为样品的相干 X 射线衍射图样, 图 3(d) 为采用过度取样和迭代算法重建出的样品图像, 分辨率为 75 nm, 同图 3(a) 相对比, 图像几乎完全相同.

此工作为高分辨 CDI 成像技术快速发展的开始, 是将 X 射线晶体学方法扩展到非晶领域的开创性工作. 自此以后, CDI 成像技术得到快速发展和广泛应用<sup>[91]</sup>.

### 3.2 元素分布成像

随着 CDI 成像技术的发展, 将其他分析方法同 CDI 成像方法相结合成为该技术发展的一个热点. 原位定量成像在材料研究中占有非常重要的地位, 能够将材料的微结构, 如形貌、元素分布等<sup>[48]</sup> 与材料的性能一一对应起来, 从而更加真实地反映材料结构与性能之间的关系. 其中, 掺杂元素对材料整体物理性能的改进起重要的作用, 对掺杂元素的精确控制为制备先进功能材料提供了可能<sup>[92]</sup>. 为了充分了解材料的结构和性能之间的关系, 需要在优于 100 nm 分辨率上进行定量成分分析<sup>[93]</sup>.

Song 等<sup>[32]</sup> 在 2008 年将光谱学方法同 CDI 成像相结合, 首次在纳米尺度实现了对掺杂在硅单晶中铍元素的分布成像和定量分析.

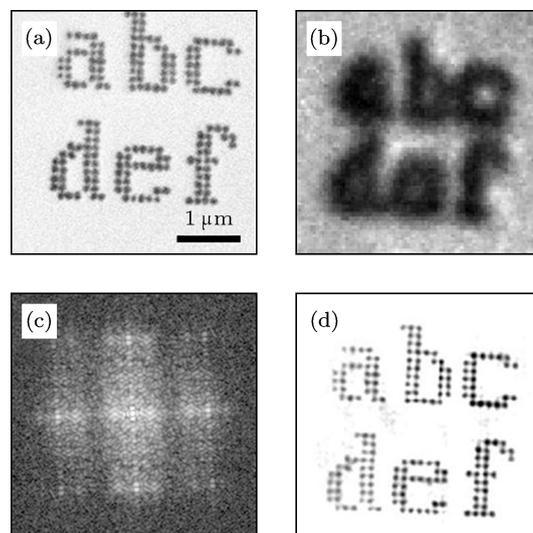


图 3 首次 CDI 成像<sup>[14]</sup> (a) 样品的 SEM 图像; (b) 样品的光学显微镜图像; (c) 相干 X 射线衍射图样; (d) 衍射图样图 (c) 对应的样品重建图像

由于铍元素具有很好的分凝系数和固溶性, 作为表面活性剂得到人们的广泛关注. Song 等利用元素特异性成像技术, 即在元素吸收边两侧原子的 X 射线散射因子有陡然的变化, 成功定量标定出掺杂铍元素在硅单晶中的分布情况. 图 4(a) 为 X 射线在 2.55 keV 时的衍射图样, 图 4(b) 和图 4(c) 分别

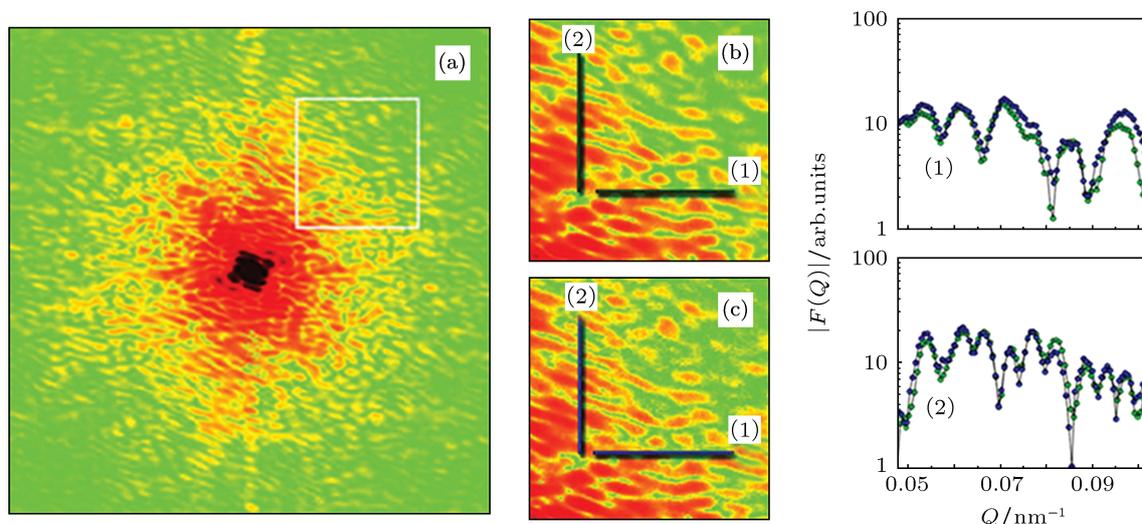


图 4 铍掺杂硅单晶相干 X 射线衍射图样 (color online)<sup>[32]</sup> (a)  $E = 2.550$  keV 时相干 X 射线衍射图样; (b) 白框区域放大图; (c)  $E = 2.595$  keV 时衍射图样相同区域的放大图; (d) 衍射图样 (b), (c) 在相同位置处的线扫描比较图, 绿线和蓝线分别对应于  $E = 2.550$  keV 和  $E = 2.595$  keV

对应 X 射线能量为 2.55 keV 和 2.595 keV 时的高角度衍射图样. 通过对相同位置线扫描比较, 如 4(d) 所示, 两幅衍射图样在衍射强度和衍射斑位置等方面存在着差别. 由于衍射图样不满足中心对称条件, 增加了图像的难度<sup>[94]</sup>, Song 等采用 GHIO 算法进行图像重建<sup>[82]</sup>. 铋元素吸收边两侧归一化重建图像如图 5(a) 和图 5(b) 所示, 形貌与 SEM 图像相一致 (图 5(d)), 分辨率为 15 nm. 图 5(c) 为掺杂铋元素在硅单晶中的空间分布, 铋元素基本上均匀分布于整个样品之中, 与铋元素有较小的分凝系数相一致. 通过分析样品相同位置的线扫描图像, 对铋元素在硅单晶中的分布进行了定量表征, 如图 6 黄线所示, 为铋元素定量分布曲线. 比较图 5(c) 和图 6, 铋元素出现了一定的聚集现象. 通过对结构的分析, 提出层间关联效应的出现是由铋原子和硅原子大小不匹配引起的弹性张力造成的.

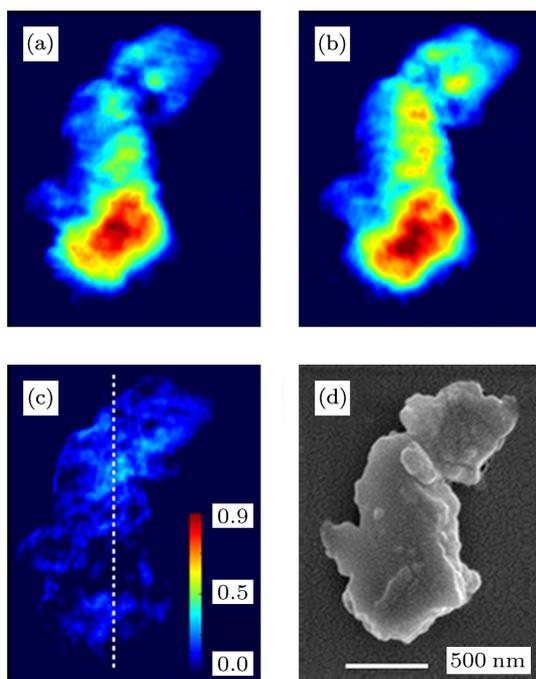


图 5 铋掺杂硅单晶 CDI 重建图像 (color online)<sup>[32]</sup> (a) X 射线能量为 2.55 keV 时重建图像; (b) X 射线能量为 2.595 keV 时重建图像; (c) 铋元素在样品中的分布图像; (d) 同一样品 SEM 图像

对于纳米结构的三维自组装机理研究一般都是采用倒异空间分析技术, 例如散射 X 射线显微镜以及对样品有破坏性的 TEM 等方法. Song 等的方法为在纳米尺度、原位、定量解释样品中掺杂原子生长机理提供了可能, 在磁性材料<sup>[95,96]</sup>、半导体材料<sup>[97]</sup>、生物矿化材料<sup>[98]</sup>等化学态和电子

轨道研究方面有重要意义. 由于 CDI 成像技术在极端条件下具有很好的稳定性, 在解决极端条件下材料的原位分析问题上有着潜在的应用价值. 将三维相干 X 射线衍射成像应用于此领域, 可在不破坏样品的前提下实现掺杂元素的三维分布成像及掺杂量的定量分析等.

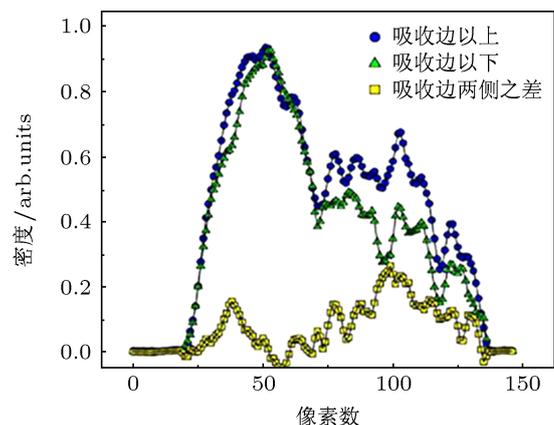


图 6 沿图 5(c) 白色虚线所示方向, 对重建样品的电子密度图像进行定量分析: 蓝线和绿线分别表示在铋元素吸收边上、下两侧对应重建图像的扫描曲线; 黄线表示铋元素分布线扫描曲线, 铋元素在硅单晶中有一定聚集现象 (color online)<sup>[32]</sup>

### 3.3 GaN 量子点三维定量成像

纳米尺度, 甚至原子尺度三维成像是了解物质结构的重要方法. 传统的三维成像方法或是受限于较低分辨率, 或是受限于样品的厚度, 难以满足高分辨三维成像要求. 三维相干 X 射线衍射显微镜的出现很好地克服了上述两个难题, 广泛应用于物质的三维成像和定量研究<sup>[21,86-88]</sup>. 图 7 为三维相干 X 射线显微镜的结构示意图, 主要包括针孔、光栅、旋转样品台、CCD 探测器. 通过旋转样品, 获得样品在一系列不同角度下的衍射图样. 对衍射图样进行二维图像重建, 然后采用断层扫描重建算法实现二维重建图像的三维重建.

GaN 半导体材料作为 III, IV 主族氮化物宽禁带半导体的典型代表, 被广泛应用于光电子器件中, 比如蓝绿光激光器、平板显示<sup>[99,100]</sup>等. 为了进一步理解 GaN 量子点的表面形貌和内部结构, Miao 等在 2005 年<sup>[21]</sup>和 2006 年<sup>[20]</sup>采用三维相干 X 射线衍射显微镜系统对 GaN 量子点进行了三维定量成像. 采用旋转样品的方法, 在  $-69.4^\circ$  到  $69.4^\circ$  之间获得了 27 幅样品衍射图样. 采用 GHIO 算法, 对衍射图样进行二维重建<sup>[82]</sup>, 得到了 27 个角度下的

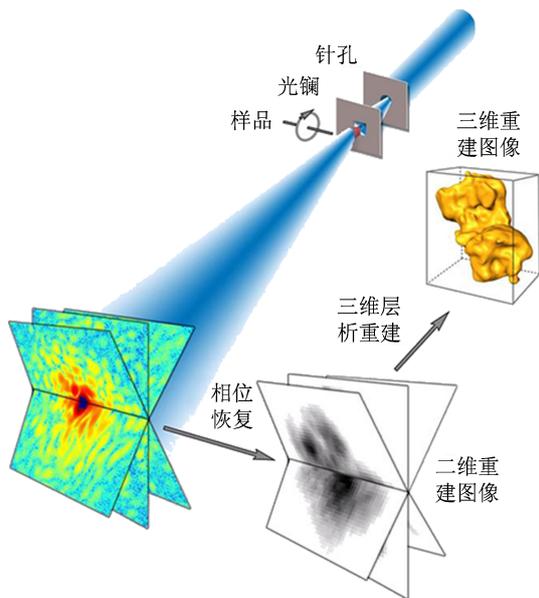


图 7 三维相干 X 射线衍射成像系统及三维重建示意图 (color online)<sup>[20]</sup>

重建图像, 利用等倾断层扫描 (equally-sloped to-

mography, 简称为 EST)<sup>[101]</sup> 三维重建算法重建出 GaN 量子点的三维微观结构图像, 如图 8 所示, 分辨率为 17 nm. 图 8(a), (b) 和 (c) 分别为 GaN 量子点在正面、背面及侧面的形貌图. 为了定量分析 GaN 量子点的内部结构, 将 GaN 量子点三维重建图像进行等厚度切片分析, 如图 8(d) 所示, 切片厚度为 17 nm. 黄色区域代表高电子密度的 GaN, 分布于整个样品接近中心的区域, 氧化而成的  $\beta$ -Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 包裹着 GaN, 形成低密度的外壳, 图 8 中所示的岛状结构就是由 GaN 氧化而成的  $\beta$ -Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 形成的. 从三维成像角度直观地揭示了 GaN 量子点在氧化过程中形成了 GaN-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 壳层结构.

由于三维相干 X 射线衍射显微镜能够实现样品的无破坏三维定量成像, 且具有较高的分辨率, 为多孔材料、半导体材料、量子点、量子线和生物材料等材料的三维成像提供了可靠的途径, 因此可广泛应用于不同晶格量子点的形貌成像、衬底和量子点的界面成像、量子点内部或者表面纳米缺陷成像等量子点半导体材料研究中.

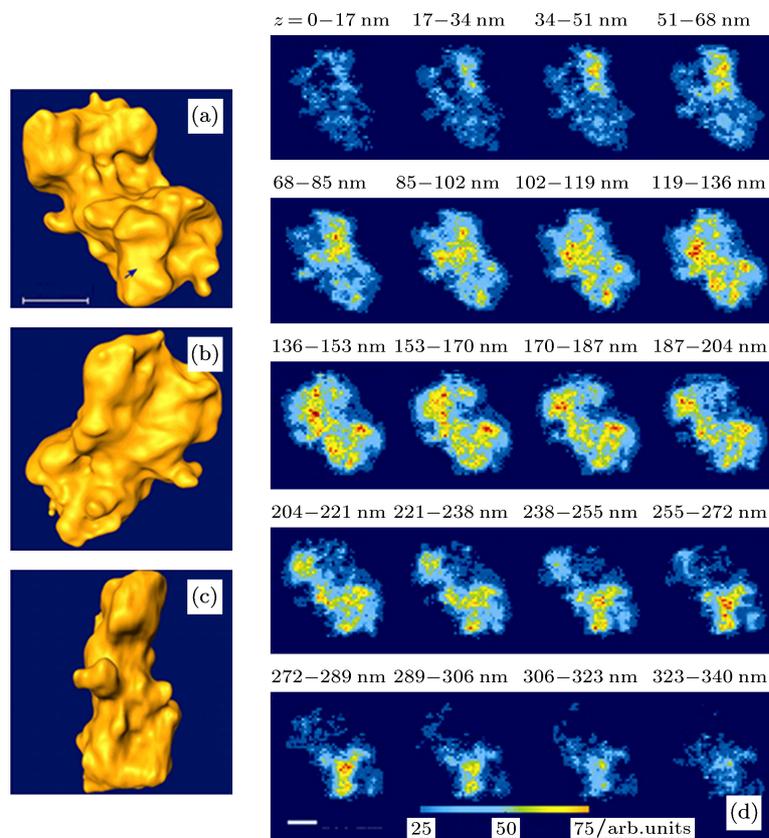


图 8 GaN 量子点重建图像 (color online)<sup>[20]</sup> (a), (b), (c) 分别为 GaN 量子点三维重建图像正面、背面和侧面形貌图 (标尺: 200 nm); (d) 沿三维重建图像 Z 轴方向 (垂直于图 (a)) 等厚度切片的电子密度分布图 (标尺: 200 nm)

## 4 CDI 成像技术在生物学中的应用

生物学的发展得益于新成像方法的出现与完善. 生物学中传统的成像工具有电子显微镜, 透射 X 射线显微镜 (transmission X-ray microscope, 简记为 TXM), 扫描透射 X 射线显微镜 (scanning transmission X-ray microscope, 简记为 STXM)<sup>[102]</sup>, 光学显微镜, X 射线晶体学等. 而电子显微镜样品厚度不超过 500 nm, TXM/STXM 和光学显微镜所获得的分辨率和衬度较低, X 射线晶体学成像则需要晶体样品, 但是大部分生物样品很难或者根本不能结晶. CDI 成像技术克服了以上成像方法的不足, 在生物材料的成像和机理研究方面有非常重要的应用. 成像样品涉及病毒、蛋白质、细胞、细胞器、鱼骨矿化材料等.

### 4.1 大肠杆菌相干 X 射线衍射成像

X 射线成像是生物学重要的研究方法. Miao 等<sup>[22]</sup>在 2003 年首次利用 CDI 成像技术对染色的大肠杆菌细胞进行了二维高分辨成像, 分辨率为 30 nm.

实验中 Miao 等<sup>[103]</sup>研究了 Mn 离子标定组氨酸序列的大肠杆菌, 图 9(a) 为 Mn 离子标定大肠杆菌的衍射图样, 样品受到的辐射剂量约为  $8 \times 10^6$  Gray. 根据前期实验结果<sup>[104]</sup>, 此辐射剂量不会引起样品内部结构变化. 图 9(b) 的样品重建图像与图 9(c) 所示 X 射线显微镜成像结果<sup>[104]</sup>相对比, 两者在形貌与结构上有很好的 consistency. 重建图像高密度部分对应于标定蛋白在细胞中的分布, 与共聚焦显微镜荧光标记蛋白分布图相一致, 但图 9(b) 的重建结果有更好的衬度.

实验中 Miao 等首次将 CDI 成像技术应用于生物学领域, 相比传统的 X 射线显微镜获得了更高分辨率和衬度的重建图像. 对开展生物细胞的无破坏三维高分辨率、高衬度、定量成像以及生物细胞中特异性蛋白、细胞器等分布研究工作有指导意义.

### 4.2 单个未染色病毒 CDI 成像

由于大肠杆菌进行了 Mn 离子标定, 对相干衍射信号具有增强作用, 但是离子标定改变了生物体内部的真实结构, 而自然状态下的生物样品成像更有研究意义. 2005 年 Shapiro 等<sup>[33]</sup>首次利用 750 eV 的软 X 射线对未染色的酵母菌进行了相

干 X 射线衍射成像, 获得了分辨率为 30 nm 的二维重建图像. 2008 年, Song 等<sup>[31]</sup>利用 5 keV 的硬 X 射线首次实现单个未染色小鼠疱疹病毒的成像.

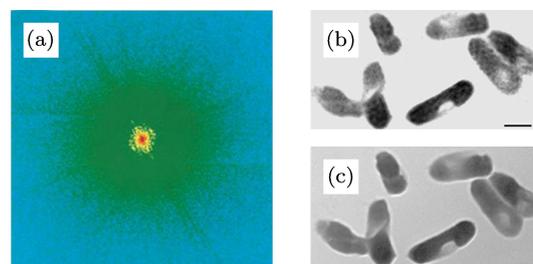


图 9 大肠杆菌 CDI 成像 (color online) (a) 相干 X 射线衍射图像<sup>[22]</sup>; (b) 相干 X 射线衍射重建图像 (标尺: 500 nm)<sup>[22]</sup>; (c) X 射线显微镜图像 (标尺: 500 nm)<sup>[104]</sup>

病毒是由一个或多个核酸分子 (DNA 或 RNA) 与蛋白质构成的非细胞形态的生命体, 其体积非常小. 常规成像方法在不染色情况下很难获得高衬度、高分辨率、量化的图像. Song 等首次实现小体系生物样品的高分辨成像, 重建出分辨率为 22 nm、高衬度的单个未染色病毒的量化图像, 如图 10 所示. 图 10(a) 为样品相干衍射图样, 由于病毒体积小, 相干衍射信号非常微弱. 为了提高信噪比, Song 等<sup>[105]</sup>采用反卷积的方法整合了衍射图样. 图中的特征环反映了病毒体的外形结构, 根据环的直径估算出样品的大小约为 200 nm, 是目前

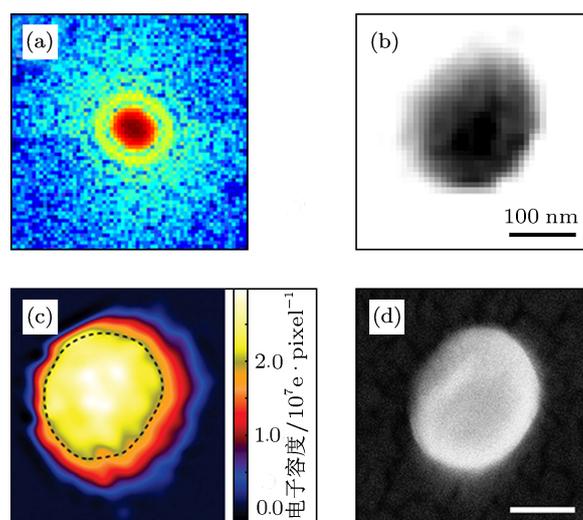


图 10 小鼠疱疹病毒 CDI 成像 (color online)<sup>[31]</sup> (a) 相干 X 射线衍射图样; (b) 相干 X 射线衍射重建图像; (c) 重建图像去除厚度影响后的二维电子密度分布图, 虚线所示为病毒的核壳体结构; (d) 扫描电子显微镜照片

CDI 成像的最小生物样品. 图 10(b) 为通过 GHIO 相位恢复算法获得的重建图像. 重建图像与图 10(d) 所示同一样品的 SEM 照片对比结果表明重建图像的正确性. 但是 SEM 照片只能提供表面信息, CDI 成像结果则有更高的衬度和内部结构信息. 图 10(c) 为重建图像排除样品厚度影响之后的电子密度量化图像, 高电子密度部分集中于病毒的核壳体部分. 对重建图像定量分析结果表明中心区域的电子密度为平均电子密度的 1.3 倍.

Song 等利用 CDI 成像技术观察到了小鼠疱疹病毒的核壳体结构, 获得了高分辨率、高衬度、量化的二维电子密度重建图像. 由于此实验样品只有 200 nm 左右, 为 X 射线自由电子激光在 CDI 成像技术中的应用和 CDI 成像技术研究大分子样品<sup>[106]</sup>, 如单分子蛋白质成像等, 提供了非常有意义的参考.

### 4.3 有机无机复合鱼骨矿化机理研究

有机无机复合材料长期以来是材料研究的一个重要方向, 其中生物体中无机材料的矿化机理具有重要的研究价值. 由于 X 射线具有很强的穿透能力, X 射线散射已经在骨的研究中得到广泛

应用<sup>[107]</sup>, 但是传统的 X 射线散射一般提供的是样品的平均信息, 并且需要根据实验数据预先建模. Jiang 等<sup>[30]</sup> 在 2008 年首次利用 CDI 成像技术对不同矿化程度的鱼骨进行了成像和矿化机理研究.

由于骨中矿化晶体和胶原纤维之间的超微结构和分子结构一直是骨组织结构研究的难点问题, Jiang 等选择具有不同矿化程度的鲢鱼肌内骨, 分别对未矿化、低度矿化和高度矿化的鱼骨进行了成像, 并分析了骨的矿化机理. 从未矿化鱼骨重建图像中能够看到鱼骨的胶原纤维结构, 如图 11(a) 所示, 纤维内部密度变化周期约为 67 nm, 与小角 X 射线散射的结果相一致<sup>[108]</sup>. 图 11(b) 是低度矿化鱼骨的重建图像, 矿化的胶原纤维在一定程度上彼此平行. 两条纤维之间的距离大约为 50—60 nm, 矿化晶粒沉积在纤维内部孔隙. 图 11(c) 为高度矿化鱼骨重建图像, 矿化纤维彼此之间接近平行, 矿化晶粒填充到整个纤维孔隙内部, 形成了周期为 67 nm 的带状结构, 多余的矿物晶体填充到纤维之间的区域, 造成矿化纤维中带状结构的扩大甚至在一定区域的消失. 根据实验结果和矿化机理的分析, 提出了生物矿化机理的动态模型来说明骨内矿化晶体的成核和生长过程<sup>[109]</sup>.

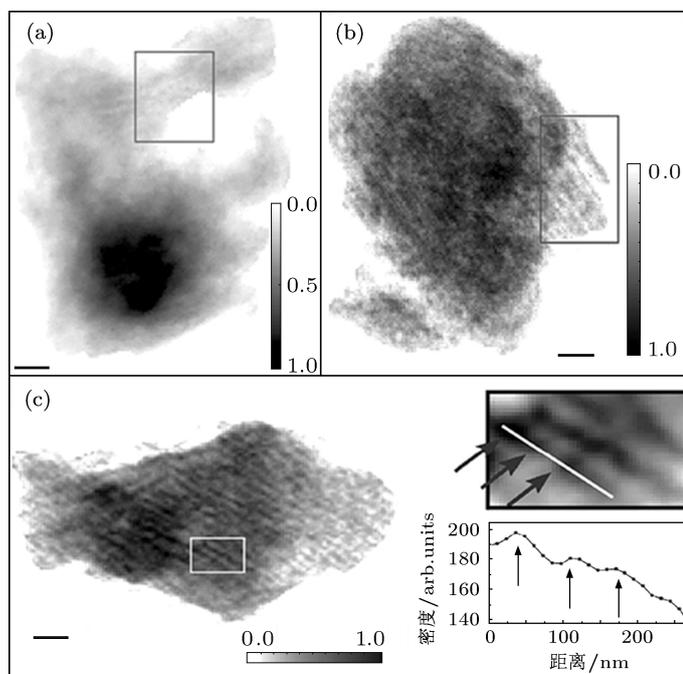


图 11 鱼骨 CDI 成像<sup>[30]</sup> (a) 未矿化鱼骨重建图像 (标尺: 200 nm); (b) 低度矿化鱼骨重建图像 (标尺: 200 nm); (c) 高度矿化鱼骨重建图像 (标尺: 200 nm)

对于具有多级结构的生物矿化材料,传统的成像方法,如光学共聚焦显微镜、电子显微镜和原子力显微镜等,在分辨率或提供材料内部微观结构等方面存在一定的限制.而 CDI 成像技术对胶原纤维的周期性结构成像敏感,且分辨率和衬度高<sup>[110]</sup>,因此在研究生物矿化机理、诊断骨质疏松等疾病、骨组织功能材料的设计和生物相容性材料的制备方面有重要的意义.

#### 4.4 酵母菌细胞三维定量高分辨成像

由于生物细胞结构的复杂性,二维成像提供的信息有限.为了更好地了解生物体内部结构,需要对生物细胞进行无破坏的三维高分辨成像.尽管低温透射电子显微镜可以对生物样品进行高分辨成像,但是电子的穿透能力有限,样品厚度一般小于 100 nm 或者对样品进行切片处理<sup>[111]</sup>.CT (computer tomography)<sup>[112]</sup> 技术可以对生物样品进行三维无破坏成像,但是分辨率只有微米量级<sup>[113]</sup>. Nishino 等<sup>[34]</sup> 在 2009 年首次利用 CDI 成像技术对人体染色体进行了三维成像,但分辨率仅为 120 nm. 2010 年 Jiang 等<sup>[18]</sup> 采用 CDI 成像技术对未染色酵母菌细胞进行定量成像,获得了分辨率为 50 nm 的无破坏的三维重建图像.

裂殖酵母菌细胞由于耐 X 射线辐射,作为细

胞生物学的模板,具有非常重要的研究意义. Jiang 等将化学固定后的酵母菌细胞置于厚度为 30 nm 的氮化硅薄膜上,通过等斜率旋转角度的方法获取  $-69.4^\circ$  到  $69.4^\circ$  之间的 25 幅二维衍射图样.图 12 为酵母菌二维衍射图样和二维重建图像,重建图像中箭头所指部分是厚度约为 120 nm 的细胞壁.将归一化之后的二维重建图像<sup>[114]</sup> 采用 EST 算法进行三维重建,得到酵母细胞的三维重建图像如图 13(a) 所示.相比于传统的滤波反投影重建算法,在投影数量有限的情况下 EST 具有更精确的重建效果<sup>[115,116]</sup>. Jiang 等根据细胞器电子密度的不同,对细胞器的形状、分布进行了标定,计算出酵母菌细胞的平均密度为  $1.14 \text{ g/cm}^3$ ,与其他实验

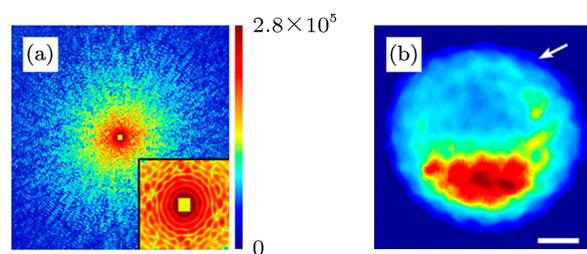


图 12 未染色酵母菌细胞 CDI 成像 (color online)<sup>[18]</sup> (a)  $0^\circ$  相干 X 射线衍射图样,中心像素点因为阻挡直射光而丢失; (b) 相干 X 射线衍射重建图像 (标尺: 500 nm)

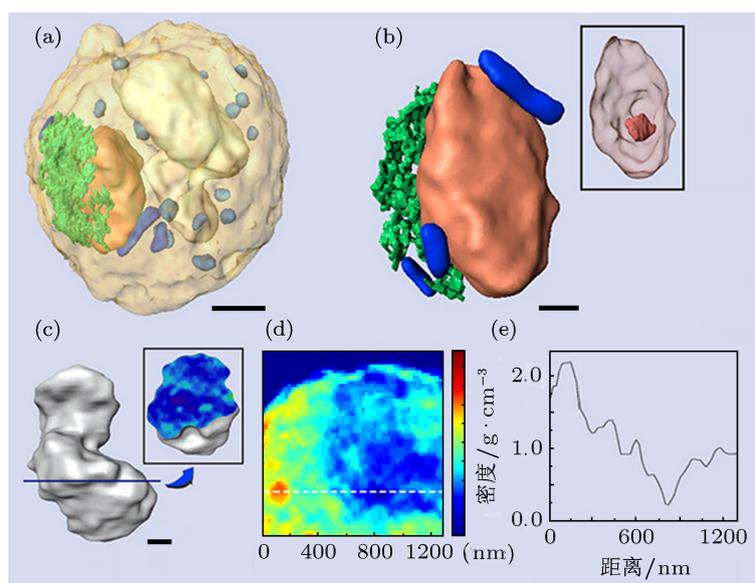


图 13 酵母菌三维重建结构及分析图 (color online)<sup>[18]</sup> (a) 酵母菌三维重建图像及细胞器分布图,主要有细胞核 (橘色)、内质网 (绿色)、液泡 (白色)、线粒体 (蓝色)、颗粒 (浅蓝色 (标尺: 500 nm)); (b) 细胞内细胞核,线粒体和内质网的三维结构,放大大部分为细胞核,内部橘色部分为密度更大的核仁 (标尺: 200 nm); (c) 液泡三维结构 (标尺: 200 nm); (d) 酵母菌细胞切片电子密度分布图; (e) 沿图 (d) 所示白色虚线电子密度线扫描曲线

结果<sup>[117]</sup>相一致. 图 13(b) 给出了线粒体、内质网、细胞核的结构图, 细胞核中心密度更大的核仁部分清晰可见. 通过不规则外形的液泡及其切片图(图 13(c)), 可观测到液泡中存在密度较大的颗粒和凝集的蛋白质. 图 13(d) 和 (e) 是对酵母菌细胞的切片和线扫描, 沿着线粒体和液泡有明显的密度变化.

相比传统的三维显微成像技术, CDI 成像技术对未染色细胞能够得到更高衬度和分辨率的三维结构图像. Jiang 等在无破坏三维相干 X 射线衍射成像技术上取得的进展, 将对构建新型冷冻三维相干 X 射线衍射显微镜系统 (cryogenic coherent X-ray diffractive imaging, 简记为 Cryo-CDI), 实现冷冻状态下的细胞及细胞器等生物材料的三维高分辨成像具有重要参考价值.

## 5 展望

CDI 成像技术的发展弥补了光学显微镜成像分辨率低、SEM 和 AFM 只能提供表面形貌信息、TEM 穿透能力有限、X 射线晶体学只能对晶体样品成像的问题, 是一种非常有应用前景的成像技术. 目前辐射损伤和相比电子显微镜较低的分辨率是限制相干 X 射线衍射成像技术进一步发展的主要因素. 针对辐射损伤和成像分辨率问题主要有以下两个解决办法: 1) 采用冷冻技术对样品进行速冻处理; 2) 采用第四代同步辐射光源, 即 X 射线自由电子激光 (X-ray free electron laser, 简记为 XFEL)<sup>[118]</sup> 对样品进行单脉冲成像.

对样品进行速冻处理是减轻辐射损伤和实现原位观察的有效方法, 且最接近于样品的生存环境<sup>[119-121]</sup>, 已被广泛应用于冷冻透射电子显微镜成像. 将冷冻技术与 CDI 成像技术相结合是 CDI 成像研究的热点. 近期的实验结果表明, 对样品进行速冻处理后, 样品的耐辐射能力显著提高<sup>[122]</sup>. 由于 Cryo-CDI 成像技术处于初步探索阶段, 目前只进行了初步的二维成像, 分辨率较低, 成像方法还有待完善<sup>[17,35,36]</sup>. 提高 Cryo-CDI 的二维成像分辨率和构建三维 Cryo-CDI 成像系统是目前 Cryo-CDI 的研究方向. 理论研究表明采用 Cryo-CDI 成像技术, 三维分辨率有望达到 5—10 nm<sup>[121]</sup>, 在实现自

然状态下生物样品的无破坏三维高分辨成像方面有广阔的应用前景.

CDI 成像技术的成功应用离不开高性能的同步辐射光源, 目前大部分 CDI 成像依托于第三代同步辐射光源. 作为第四代同步辐射光源——XFEL 的出现, 为解决辐射损伤问题, 提高成像分辨率和动态成像提供了理想的光源<sup>[52]</sup>. 由于 XFEL 具有脉冲时间短、能量高、相干性好的特点, 可进行单脉冲成像, 能够在样品结构发生变化前记录下衍射图样<sup>[123]</sup>, 使得获取样品更高分辨率和动态图像成为可能. 实验模拟证实, 采用 XFEL 可以进行单分子, 如单个非结晶蛋白质等原子分辨率的成像<sup>[124]</sup>. 对非结晶性蛋白质结构成像, 比如大部分的膜蛋白, 具有非常重要的意义. Chapman 等<sup>[49]</sup> 在 2006 年已经利用 XFEL 展开前期的成像研究. 利用波长为 32 nm, 脉冲时间为 25 fs 的 flash 软 X 射线自由电子激光进行了相干衍射成像研究, 证实了 XFEL 用于 CDI 成像是可行的. 由于 XFEL 只是初步应用到 CDI 成像方法中, 在成像方法学中还有很多急需解决的关键问题, 如样品制备及数据分析等问题. 目前采用 XFEL 为光源的 CDI 成像技术在方法学上是前景与挑战并存.

## 6 结论

本文介绍了 CDI 成像技术的发展历史、成像原理、相位恢复算法, 重点结合 CDI 成像的典型实例, 介绍了 CDI 成像技术在材料学和生物学中的应用, 并对 CDI 成像技术发展方向进行了展望. CDI 成像技术具有高分辨、高衬度、定量、原位成像的特点, 适合于生物样品的无破坏三维高分辨成像和无机材料的原位定量结构分析, 自 1999 年首次实验成功以来得到成像分析领域的广泛重视和应用. 目前采用 CDI 成像技术, 在无机材料成像中最高分辨率为 2 nm, 利用更高亮度的光源, 如 XFEL 和 KB 镜 X 射线聚焦技术等, 最终分辨率有望达到原子量级. 在生物材料的成像中, 其二维最高分辨率为 10 nm, 采用冷冻技术, 三维分辨率有望达到 5—10 nm. 因此, 随着冷冻技术与 CDI 成像技术的结合和 XFEL 的发展及应用, CDI 成像技术将迎来更加快速的发展与广泛的应用.

- [1] Miao J W, Ishikawa T, Shen Q, Earnest T 2008 *Annu. Rev. Phys. Chem.* **59** 387
- [2] Wang Z B, Guo W, Li L, Luk'yanchuk B, Khan A, Liu Z, Chen Z C, Hong M H 2011 *Nat. Commun.* **2** 218
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [4] Chao W, Harteneck B D, Liddle J A, Anderson E H, Attwood D T 2005 *Nature* **435** 1210
- [5] Jefimovs K, Vila-Comamala J, Pilvi T, Raabe J, Ritala M, David C 2007 *Phys. Rev. Lett.* **99** 264801
- [6] Kang H C, Yan H F, Winarski R P, Holt M V, Maser J, Liu C, Conley R, Vogt S, Macrander A T, Stephenson G B 2008 *Appl. Phys. Lett.* **92** 221114
- [7] Kirz J, Jacobsen C 2009 *J. Phys. Conf. Ser.* **186** 012001
- [8] Mimura H, Handa S, Kimura T, Yumoto H, Yamakawa D, Yokoyama H, Matsuyama S, Inagaki K, Yamamura K, Sano Y, Tamasaku K, Nishino Y, Yabashi M, Ishikawa T, Yamauchi K 2010 *Nat. Phys.* **6** 122
- [9] Chao W L, Kim J H, Rekawa S, Fischer P, Anderson E H 2009 *Opt. Express* **17** 17669
- [10] Rehbein S, Heim S, Guttman P, Werner S, Schneider G 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 110801
- [11] Miao J W, Chapman H N, Kirz J, Sayre D, Hodgson K O 2004 *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** 157
- [12] Sayre D, Schlenker M 1980 *Lecture Notes in Physics* (Vol. 112) (Berlin: Springer) p229
- [13] Sayre D, Schenck H 1991 *In Direct Methods of Solving Crystal Structures* (New York: Plenum) p353
- [14] Miao J W, Charalambous P, Kirz J, Sayre D 1999 *Nature* **400** 342
- [15] Takahashi Y, Nishino Y, Tsutsumi R, Zettsu N, Matsubara E, Yamauchi K, Ishikawa T 2010 *Phys. Rev. B* **82** 214102
- [16] Takahashi Y, Zettsu N, Nishino Y, Tsutsumi R, Matsubara E, Ishikawa T, Yamauchi K 2010 *Nano Lett.* **10** 1922
- [17] Nelson J, Huang X J, Steinbrener J, Shapiro D, Kirz J, Marchesini S, Neiman A M, Turner J J, Jacobsen C 2010 *PNAS* **107** 7235
- [18] Jiang H D, Song C Y, Chen C C, Xu R, Raines K S, Benjamin P F, Lu C H, Lee T K, Nakashima A, Urano J, Ishikawa T, Tamanoi F, Miao J W 2010 *PNAS* **107** 11234
- [19] Miao J W, Ishikawa T, Johnson B, Anderson E H, Lai B, Hodgson K O 2002 *Phys. Rev. Lett.* **89** 088303
- [20] Miao J W, Chen C C, Song C Y, Nishino Y, Kohmura Y, Ishikawa T, Damien R J, Lee T K, Risbud S H 2006 *Phys. Rev. Lett.* **97** 215503
- [21] Miao J W, Nishino Y, Kohmura Y, Johnson B, Song C Y, Risbud S H, Ishikawa T 2005 *Phys. Rev. Lett.* **95** 085503
- [22] Miao J W, Hodgson K O, Ishikawa T, Larabell C A, LeGros M A, Nishino Y 2003 *PNAS* **100** 110
- [23] Robinson I K, Vartanyants I A, Williams G J, Pfeifer M A, Pitney J A 2001 *Phys. Rev. Lett.* **87** 195505
- [24] Williams G J, Pfeifer M A, Vartanyants I A, Robinson I K 2003 *Phys. Rev. Lett.* **90** 175501
- [25] Williams G J, Quiney H M, Dhal B B, Tran C Q, Nugent K A, Peele A G, Paterson D, de Jonge M D 2006 *Phys. Rev. Lett.* **97** 025506
- [26] Williams G J, Hanssen E, Peele A G, Pfeifer M A, Clark J, Abbey B, Cadenazzi G, De Jonge M D, Vogt S, Tilley L, Nugent K A 2008 *Cytometry A* **73A** 949
- [27] Nugent K A, Peele A G, Chapman H N, Mancuso A P 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 203902
- [28] Pfeifer M A, Williams G J, Vartanyants I A, Harder R, Robinson I K 2006 *Nature* **442** 63
- [29] Takahashi Y, Nishino Y, Tsutsumi R, Kubo H, Furukawa H, Mimura H, Matsuyama S, Zettsu N, Matsubara E, Ishikawa T, Yamauchi K 2009 *Phys. Rev. B* **80** 054103
- [30] Jiang H D, Ramunno-Johnson D, Song C Y, Amirbekian B, Kohmura Y, Nishino Y, Takahashi Y, Ishikawa T, Miao J W 2008 *Phys. Rev. Lett.* **100** 038103
- [31] Song C Y, Jiang H D, Mancuso A, Amirbekian B, Peng L, Sun R, Shah S S, Zhou Z H, Ishikawa T, Miao J W 2008 *Phys. Rev. Lett.* **101** 158101
- [32] Song C Y, Bergstrom R, Ramunno-Johnson D, Jiang H D, Paterson D, de Jonge M D, McNulty I, Lee J, Wang K, Miao J W 2008 *Phys. Rev. Lett.* **100** 025504
- [33] Shapiro D, Thibault P, Beetz T, Elser V, Howells M, Jacobsen C, Kirz J, Lima E, Miao H J, Neiman A M, Sayre D 2005 *PNAS* **102** 15343
- [34] Nishino Y, Takahashi Y, Imamoto N, Ishikawa T, Maeshima K 2009 *Phys. Rev. Lett.* **102** 018101
- [35] Huang X J, Nelson J, Kirz J, Lima E, Marchesini S, Miao H J, Neiman A M, Shapiro D, Steinbrener J, Stewart A, Turner J J, Jacobsen C 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 198101
- [36] Lima E, Wiegart L, Pernot P, Howells M, Timmins J, Zontone F, Madsen A 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 198102
- [37] Newton M C, Leake S J, Harder R, Robinson I K 2009 *Nat. Mater.* **9** 120
- [38] Gulden J, Yefanov O M, Mancuso A P, Abramova V V, Hilhorst J, Byelov D, Snigireva I, Snigirev A, Petukhov A V, Vartanyants I A 2010 *Phys. Rev. B* **81** 224105
- [39] Abbey B, Nugent K A, Williams G J, Clark J N, Peele A G, Pfeifer M A, de Jonge M, McNulty I 2008 *Nat. Phys.* **4** 394
- [40] Rodenburg J M, Hurst A C, Cullis A G, Dobson B R, Pfeiffer F, Bunk O, David C, Jefimovs K, Johnson I 2007 *Phys. Rev. Lett.* **98** 34801
- [41] Thibault P, Dierolf M, Menzel A, Bunk O, David C, Pfeiffer F 2008 *Science* **321** 379
- [42] Giewekemeyer K, Thibault P, Kalbfleisch S, Beerlink A, Kewish C M, Dierolf M, Pfeiffer F, Salditt T 2010 *PNAS* **107** 529
- [43] Dierolf M, Menzel A, Thibault P, Schneider P, Kewish C M, Wepf R, Bunk O, Pfeiffer F 2010 *Nature* **467** 436
- [44] Thibault P, Dierolf M, Bunk O, Menzel A, Pfeiffer F 2009 *Ultra-microscopy* **109** 338
- [45] Takahashi Y, Suzuki A, Zettsu N, Kohmura Y, Senba Y, Ohashi H, Yamauchi K, Ishikawa T 2011 *Phys. Rev. B* **83** 214109
- [46] Schroer C G, Boye P, Feldkamp J M, Patommel J, Schropp A, Schwab A, Stephan S, Burghammer M, Schöder S, Riekel C 2008 *Phys. Rev. Lett.* **101** 90801
- [47] Barty A, Marchesini S, Chapman H N, Cui C, Howells M R, Shapiro D A, Minor A M, Spence J C H, Weierstall U, Ilavsky J, Noy A, Hau-Riege S P, Artyukhin A B, Baumann T, Willey T, Stolken J, van Buuren T, Kinney J H 2008 *Phys. Rev. Lett.* **101** 55501
- [48] Takahashi Y, Kubo H, Furukawa H, Yamauchi K, Matsubara E, Ishikawa T, Nishino Y 2008 *Phys. Rev. B* **78** 092105
- [49] Chapman H N, Barty A, Bogan M J, Boutet S, Frank M, Hau-Riege S P, Marchesini S, Woods B W, Bajt S, Benner W H, London R A, Plönjes E, Kuhlmann M, Treusch R, Düsterer S, Tschentscher

- T, Schneider J R, Spiller E, Möller T, Bostedt C, Hoener M, Shapiro D A, Hodgson K O, van der Spoel D, Burmeister F, Bergh M, Caleman C, Hult G, Seibert M M, Maia F R N C, Lee R W, Szöke A, Timneanu N, Hajdu J 2006 *Nat. Phys.* **2** 839
- [50] Seibert M M, Ekeberg T, Maia F R N C, Svenda M, Andreasson J, Jönsson O, Odić D, Iwan B, Rucker A, Westphal D, Hantke M, DePonte D P, Barty A, Schulz J, Gumprecht L, Coppola N, Aquila A, Liang M, White T A, Martin A, Caleman C, Stern S, Abergel C, Seltzer V, Claverie J, Bostedt C, Bozek J D, Boutet S, Miahnahri A A, Messerschmidt M, Krzywinski J, Williams G, Hodgson K O, Bogan M J, Hampton C Y, Sierra R G, Starodub D, Andersson I, Bajt S, Barthelmeß M, Spence J C H, Fromme P, Weierstall U, Kirian R, Hunter M, Doak R B, Marchesini S, Hau-Riege S P, Frank M, Shoeman R L, Lomb L, Epp S W, Hartmann R, Rolles D, Rudenko A, Schmidt C, Foucar L, Kimmel N, Holl P, Rudek B, Erk B, Hömke A, Reich C, Pietschner D, Weidenspointner G, Strüder L, Hauser G, Gorke H, Ullrich J, Schlichting I, Herrmann S, Schaller G, Schopper F, Soltau H, Kühnel K, Andritschke R, Schröter C, Krasniqi F, Bott M, Schorb S, Rupp D, Adolph M, Gorkhover T, Hirseman H, Potdevin G, Graafsma H, Nilsson B, Chapman H N, Hajdu J 2011 *Nature* **470** 78
- [51] Mancuso A P, Gorniak T, Staier F, Yefanov O M, Barth R, Christophis C, Reime B, Gulden J, Singer A, Pettit M E, Nisius T, Wilhein T, Gutt C, Grübel G, Guerassimova N, Treusch R, Feldhaus J, Eisebitt S, Weckert E, Grunze M, Rosenhahn A, Vartanyants I A 2010 *New J. Phys.* **12** 035003
- [52] Barty A, Boutet S, Bogan M J, Hau-Riege S, Marchesini S, Sokolowski-Tinten K, Stojanovic N, Tobey R, Ehrke H, Cavalleri A, Düsterer S, Frank M, Bajt S, Woods B W, Seibert M M, Hajdu J, Treusch R, Chapman H N 2008 *Nat. Photon.* **2** 415
- [53] Mancuso A P, Schropp A, Reime B, Stadler L M, Singer A, Gulden J, Streit-Nierobisch S, Gutt C, Grübel G, Feldhaus J, Staier F, Barth R, Rosenhahn A, Grunze M, Nisius T, Wilhein T, Stickler D, Stillrich H, Frömter R, Oepen H P, Martins M, Pfau B, Günther C M, Könnecke R, Eisebitt S, Faatz B, Guerassimova N, Honkavaara K, Kocharyan V, Treusch R, Saldin E, Schreiber S, Schneidmiller E A, Yurkov M V, Weckert E, Vartanyants I A 2009 *Phys. Rev. Lett.* **102** 35502
- [54] Sandberg R L, Song C Y, Wachulak P W, Raymondson D A, Paul A, Amirbekian B, Lee E, Sakdinawat A E, La-O-Vorakiat C, Marconi M C, Menoni C S, Murnane M M, Rocca J J, Kapteyn H C, Miao J W 2008 *PNAS* **105** 24
- [55] Sandberg R L, Paul A, Raymondson D A, Hädrich S, Gaudiosi D M, Holtsnider J, Tobey R I, Cohen O, Murnane M M, Kapteyn H C, Song C Y, Miao J W, Liu Y W, Salmassi F 2007 *Phys. Rev. Lett.* **99** 98103
- [56] Ravasio A, Gauthier D, Maia F R N C, Billon M, Caumes J P, Garzella D, Géléoc M, Gobert O, Hergott J F, Pena A M, Perez H, Carré B, Bourhis E, Gierak J, Madouri A, Mailly D, Schiedt B, Fajardo M, Gautier J, Zeitoun P, Bucksbaum P H, Hajdu J, Merdji H 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 28104
- [57] Raines K S, Salha S, Sandberg R L, Jiang H D, Rodríguez J A, Fahimian B P, Kapteyn H C, Du J, Miao J W 2009 *Nature* **463** 214
- [58] Seaberg M D, Adams D E, Townsend E L, Raymondson D A, Schlotter W F, Liu Y, Menoni C S, Rong L, Chen C C, Miao J, Kapteyn H C, Murnane M M 2011 *Opt. Express* **19** 22470
- [59] Miao J W, Ohsuna T, Terasaki O, Hodgson K O, O'Keefe M A 2002 *Phys. Rev. Lett.* **89** 155502
- [60] Zuo J M, Vartanyants I, Gao M, Zhang R, Nagahara L A 2003 *Science* **300** 1419
- [61] Morishita S, Yamasaki J, Nakamura K, Kato T, Tanaka N 2008 *Appl. Phys. Lett.* **93** 183103
- [62] Dronyak R, Liang K S, Stetsko Y P, Lee T K, Feng C K, Tsai J S, Chen F R 2009 *Appl. Phys. Lett.* **95** 111908
- [63] Chen C C, Jiang H D, Rong L, Salha S, Xu R, Mason T G, Miao J W 2011 *Phys. Rev. B* **84** 224104
- [64] Bunk O, Dierolf M, Kynde S, Johnson I, Marti O, Pfeiffer F 2008 *Ultramicroscopy* **108** 481
- [65] Miao J W, Kirz J, Sayre D 2000 *Acta Cryst. D* **56** 1312
- [66] Patterson A L 1934 *Phys. Rev. B* **46** 372
- [67] Ladd M F C, Palmer R A 1980 *Theory and Practice of Direct Methods in Crystallography* (New York: Plenum Press) p361
- [68] Giacovazzo C 1998 *Direct Phasing in Crystallography* (New York: Oxford Univ. Press)
- [69] Rossmann M G, Blow D 1963 *Acta Crystallogr.* **16** 39
- [70] Bricogne G 1974 *Acta Crystallogr.* **30** 395
- [71] Shannon C E 1949 *Proc. IRE* **37** 10
- [72] Sayre D 1952 *Acta Crystallogr.* **5** 843
- [73] Bates R H T 1982 *Optik (Stuttgart)* **61** 247
- [74] Bates R H T 1984 *Comput. Vis. Graph. Image Process.* **25** 205
- [75] Miao J W, Sayre D, Chapman H N 1998 *J. Opt. Soc. Am. A* **15** 1662
- [76] Zhou G Z, Tong Y J, Chen C, Ren Y Q, Wang Y D, Xiao T Q 2011 *Acta Phys. Sin.* **60** 028701 (in Chinese) [周光照, 佟亚军, 陈灿, 任玉琦, 王玉丹, 肖体乔 2011 物理学报 **60** 028701]
- [77] Zhou G Z, Wang Y D, Ren Y Q, Chen C, Ye L L, Xiao T Q 2011 *Acta Phys. Sin.* **61** 018701 (in Chinese) [周光照, 王玉丹, 任玉琦, 陈灿, 叶琳琳, 肖体乔 2011 物理学报 **61** 018701]
- [78] Gerchberg R W, Saxton W O 1972 *Optik* **35** 237
- [79] Fienup J R 1978 *Opt. Lett.* **3** 27
- [80] Fienup J R 1982 *Appl. Opt.* **21** 2758
- [81] Elser V 2003 *Acta Cryst. A* **59** 201
- [82] Chen C C, Miao J W, Wang C W, Lee T K 2007 *Phys. Rev. B* **76** 64113
- [83] Marchesini S 2007 *Rev. Sci. Instrum.* **78** 011301
- [84] Marchesini S, He H, Chapman H N, Hau-Riege S P, Noy A, Howells M R, Weierstall U, Spence J C H 2003 *Phys. Rev. B* **68** 140101
- [85] Miao J W, Sayre D 2000 *Acta Cryst. A* **56** 596
- [86] Miao J W, Amonette J E, Nishino Y, Ishikawa T, Hodgson K O 2003 *Phys. Rev. B* **68** 012201
- [87] Abbey B, Williams G J, Pfeifer M A, Clark J N, Putkunz C T, Torrance A, McNulty I, Levin T, Peele A G, Nugent K A 2008 *Appl. Phys. Lett.* **93** 214101
- [88] Diaz A, Trtik P, Guizar-Sicairos M, Menzel A, Thibault P, Bunk O 2012 *Phys. Rev. B* **85** 020104
- [89] Beckers M, Senkbeil T, Gorniak T, Reese M, Giewekemeyer K, Gleber S C, Salditt T, Rosenhahn A 2011 *Phys. Rev. Lett.* **107** 208101
- [90] Harder R, Pfeifer M A, Williams G J, Vartanyants I A, Robinson I K 2007 *Phys. Rev. B* **76** 115425
- [91] Robinson I K, Miao J W 2004 *MRS Bull.* **29** 177
- [92] Kitchen D, Richardella A, Tang J M, Flatté M E, Yazdani A 2006 *Nature* **442** 436
- [93] Ade H, Stoll H 2009 *Nat. Mater.* **8** 281
- [94] Fienup J R 1987 *J. Opt. Soc. Am. A* **4** 118
- [95] Tripathi A, Mohanty J, Dietze S H, Shpyrko O G, Shipton E, Fullerton E E, Kim S S, McNulty I 2011 *PNAS* **108** 13393

- [96] Turner J J, Huang X J, Krupin O, Seu K A, Parks D, Kevan S, Lima E, Kisslinger K, McNulty I, Gambino R, Mangin S, Roy S, Fischer P 2011 *Phys. Rev. Lett.* **107** 33904
- [97] Ade H, Zhang X, Cameron S, Costello C, Kirz J, Williams S 1992 *Science* **258** 972
- [98] Avioli L V, Krane S M 1998 *Metabolic Bone Disease* (New York: Academic)
- [99] Nakamura S 1998 *Science* **281** 956
- [100] Pearsall T P 2000 *Quantum Semiconductor Devices and Technologies* (Dordrecht: Kluwer)
- [101] Miao J W, Förster F, Levi O 2005 *Phys. Rev. B* **72** 052103
- [102] Sakdinawat A, Attwood D 2010 *Nat. Photon.* **4** 840
- [103] Hochuli E, Döbeli H, Schacher A 1987 *J. Chromatogr. A* **411** 177
- [104] Kirz J, Jacobsen C, Howells M 1995 *Q. Rev. Biophys.* **28** 33
- [105] Song C Y, Ramunno-Johnson D, Nishino Y, Kohmura Y, Ishikawa T, Chen C C, Lee T K, Miao J W 2007 *Phys. Rev. B* **75** 012102
- [106] Spence J C H, Doak R B 2004 *Phys. Rev. Lett.* **92** 198102
- [107] White S W, Hulmes D J S, Miller A 1977 *Nature* **266** 421
- [108] Zhou H W, Burger C, Sics I, Hsiao B S, Chu B, Graham L, Glimcher M J 2007 *J. Appl. Crystallogr.* **40** 666
- [109] Jiang H D, Liu X Y 2004 *J. Biol. Chem.* **279** 41286
- [110] De la Cuesta F B, Wenger M P E, Bean R J, Bozec L, Horton M A, Robinson I K 2009 *PNAS* **106** 15297
- [111] Lucic V, Förster F, Baumeister W 2005 *Annu. Rev. Biochem.* **74** 833
- [112] Kinney J H, Nichols M C 1992 *Annu. Rev. Mater. Sci.* **22** 121
- [113] Ritman E L 2004 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6** 185
- [114] Chen C C, Miao J W, Lee T K 2009 *Phys. Rev. B* **79** 052102
- [115] Lee E, Fahimian B P, Iancu C V, Suloway C, Murphy G E, Wright E R, Castaño-Díez D, Jensen G J, Miao J W 2008 *J. Struct. Biol.* **164** 221
- [116] Fahimian B P, Mao Y, Cloetens P, Miao J W 2010 *Phys. Med. Biol.* **55** 5383
- [117] Kubitschek H E, Ward R A 1985 *J. Bacteriol.* **162** 902
- [118] McNeil B W J, Thompson N R 2010 *Nat. Photon.* **4** 814
- [119] Williams S, Zhang X, Jacobsen C, Kirz J, Lindaas S, Van't Hof J, Lamm S S 1993 *J. Microsc.* **170** 155
- [120] Shen Q, Bazarov I, Thibault P 2004 *J. Synchrotron Radiat.* **11** 432
- [121] Howells M R, Beetz T, Chapman H N, Cui C, Holton J M, Jacobsen C J, Kirz J, Lima E, Marchesini S, Miao H J, Sayre D, Shapiro D A, Spence J C H, Starodub D 2009 *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **170** 4
- [122] Owen R L, Rudiño-Piñera E, Garman E F 2006 *PNAS* **103** 4912
- [123] Neutze R, Wouts R, van der Spoel D, Weckert E, Hajdu J 2000 *Nature* **406** 752
- [124] Miao J W, Hodgson K O, Sayre D 2001 *PNAS* **98** 6641

# Coherent X-ray diffraction imaging and its applications in materials science and biology\*

Fan Jia-Dong Jiang Huai-Dong<sup>†</sup>

(State Key Laboratory of Crystal Materials, Shandong University, Jinan 250100, China)

(Received 19 April 2012; revised manuscript received 25 May 2012)

## Abstract

*In situ* quantitative, high-contrast and high-resolution imaging of micro/nanoscale material is an important goal of the X-ray microscopy and imaging. A novel method which is called lensless imaging or coherent X-ray diffraction imaging, is a promising approach to solving these problems. In this review, a brief introduction to imaging theory and development of coherent X-ray diffraction imaging, and some typical applications in material science and biology are presented. For instance, two-dimensional (2D) imaging of Bi dopant distribution in a Si crystal, quantitative three-dimensional (3D) imaging of a GaN quantum dot with core shell structure, 2D imaging of stained Escherichia coli bacteria, nanoscale imaging and mechanisms of biomineralization of fish bones, 2D high-contrast imaging of an unstained herpes virus, 3D high-resolution imaging of an unstained yeast cell and *in situ* quantitative analysis are illuminated. Finally, the future prospect of coherent X-ray diffraction imaging is given. With the development of X-ray free electron lasers and combining cryogenic techniques with coherent X-ray diffraction microscopy, coherent diffraction imaging will be a powerful tool and widely used in materials science and biology.

**Keywords:** coherent X-ray diffraction imaging, oversampling, phase retrieval, quantitative imaging

**PACS:** 87.59.-e, 87.64.Bx, 42.30.Rx, 68.37.Yz

---

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 51002089), the National Science Fund for Distinguished Young Scholars of Shandong Province, China (Grant No. JQ201117), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20110131110016), the Independent Innovation Foundation of Shandong University, China (Grant No. 2010JQ004) and the Graduate Innovation Foundation of Shandong University, China (Grant No. yyx10104).

<sup>†</sup> E-mail: hdjiang@sdu.edu.cn