相干X射线成像进展

吴若楠, 卞雨晗, 席鹏*

北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871

* 联系人, E-mail: xipeng@pku.edu.cn

收稿日期: 2019-06-21; 接受日期: 2019-09-18; 网络版发表日期: 2020-01-21

摘要 X射线显微技术能够弥补光学显微镜分辨率的不足和电子显微镜成像深度的不足, 具有很大的应用潜力. 本文对已有文献进行综合, 从透射、散射、衍射等成像原理方面介绍X射线显微技术, 包括透射X射线显微成像、小角X射线散射成像、相干X射线衍射成像、X射线全息术等技术. 本文同时介绍了多个技术的结合应用, 如扫描透射X射线显微成像与相干X射线衍射成像的结合、叠层衍射成像和扫描小角X射线散射成像的结合、X射线显微技术与荧光技术的结合. 不同技术取长补短, 获得了信息更全、质量更高的成像结果. 最后, 本文从快速定位、算法、射线源、样品制备4个改进方面介绍了X射线成像技术的研究进展.

关键词 X射线显微术, 扫描X射线衍射显微镜, X射线自由电子激光器, 多层层析断层扫描

在生物材料和细胞的成像上, 首先应用的是16世纪末17世纪初出现的光学显微镜. 光学分辨率始终受到Abbe和Rayleigh所定义的衍射极限的限制. 20世纪30年代起产生了电子显微镜(electron microscopy, EM), 现在可以达到埃($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$)级分辨率——目前为止可实现的最高分辨率. 然而, 电子仅具有约100 nm的穿透深度, 这决定了EM只能在样本表面浅层范围内成像, 要研究细胞内部则必须对样品进行切片, 且EM不能用于研究活体样品. 荧光标记技术使得在活细胞中进行分子动态特异性成像成为可能, 但是荧光标记物本身可能对细胞产生不利影响, 而且信号强度极其微弱^[1].

用X射线对物质进行成像始于20世纪50年代. X射线是波长在0.001~10 nm的电磁波, 具有很高的能量, 由德国物理学家W.K.伦琴于1895年发现. X射线具有

很强的穿透能力, 且波长越短, 光子能量越大、穿透力越强. X射线成像直接探测电子密度, 因此不需要对样品进行标记或染色. 利用X射线的透射、散射、干涉、衍射作用, X射线显微技术开始发展起来.

1 X射线成像原理

1.1 透射(吸收)

20世纪70年代出现了透射X射线显微镜(transmission X-ray microscope, TXM)和扫描透射X射线显微镜(scanning transmission X-ray microscope, STXM).

1974年, Gottingen团队设计了透射X射线显微镜, 基本方法是使用波带片作为显微镜的物镜来形成物体的放大图像^[2](图1A). 装置使用波带片作为聚光镜、显微波带片作为成像放大物镜、电荷耦合器件(charge

引用格式: 吴若楠, 卞雨晗, 席鹏. 相干X射线成像进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1213–1221

Wu R N, Bian Y H, Xi P. Coherent X-ray imaging technology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1213–1221, doi: 10.1360/SSV-2019-0112

图1 X射线显微成像基本原理。A: TXM示意图; B: STXM示意图; C: 扫描纳米衍射/扫描SAXS示意图; D: CDI示意图; E: 使用发射球面波的波导同轴全息装置示意图。图片来源: 参考文献[1]。版权: 2017 American Chemical Society

Figure 1 Basic principles of X-ray microscopy. A: Schematic of TXM; B: schematic of STXM; C: schematic of scanning nano diffraction/scanning SAXS; D: schematic of CDI; E: schematic of an in-line holography setup that uses waveguides that emit spherical waves; Source: Ref. [1]. Copyright: 2017 American Chemical Society

coupled device, CCD)为探测器, 分辨率可达10 nm; 可以利用吸收衬度成像或者利用相位衬度成像。

1972年, Horowitz和Howell^[3]设计出第一台扫描X射线显微镜(图1B)。STXM的基本思想是利用微探针(如针孔)一次探测样本上的一个像素。可以达到的最佳分辨率由微探针的大小决定。图像采集速率受到微探针中的X射线通量(光子/秒)的限制。为了在达到亚微米级分辨率的同时使软X射线保持较短工作距离, 需要使用聚焦元件来形成微探针。波带片是使用最广泛的聚焦元件。由于聚焦元件每次只对样品的某一点进行成像, 因此大大简化了全场透射显微镜的光学问题, 且不需要担心轴外像差^[2]。STXM可以利用吸收衬度成像, 也可用相位衬度成像; 可得到明场像, 也可得到暗场像(百度百科, X射线显微镜。2019。 <https://baike.baidu.com/item/X射线显微镜/7687552>)。

1.2 散射或衍射

(1) 散射。X射线散射是电磁波与物质内的电子相互作用发生弹性散射的现象。衍射是散射的一种特殊情况——散射波之间发生相长干涉。当物质内部结构高度有序时会发生X射线衍射^[1]。利用X射线在遇到电子密度不均的物质时发生的小角度(0.1~10°)散射产生了小角X射线散射成像(small-angle X-ray scattering, SAXS)技术。Fratzl等人^[4]在SAXS的基础上开发了扫描小角X射线散射(scanning-SAXS)技术(图1C), 并首先对来自人椎骨的骨切片和来自云杉树的木头样品进行了成像。使用扫描SAXS技术可以对复杂生物材料的结构进行研究^[4]。现在, SAXS已经可以达到亚微米级别分辨率。

(2) 衍射。传统的吸收X射线显微镜成像衬度和分辨率较低^[5], 利用X射线的衍射进行成像可以克服这些

缺点. 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^[5]. Sayre^[6]在1980年首次提出相干X射线衍射成像技术(coherent X-ray diffraction imaging, CDI/CXDI)(图1D). CDI中的一个核心问题是非晶样品的相位问题——如何从衍射图像的强度信息中恢复得到相位信息. 目前解决相位问题的方法是将过采样方法与迭代相位检索算法相结合^[7]. 过采样参数为过采样率 σ :

$$\sigma = \frac{\text{可测量点总数}}{\text{未知点数目}}$$

当 $\sigma > 2$ 时, 相位信息(理论上)可以从傅里叶变换的幅度中恢复出来^[8]. 为了从过采样得到的衍射图案中恢复相位, 目前广泛使用基于傅里叶的迭代算法^[7], 包括混合输入-输出算法(hybrid input-output algorithm, HIO)、Different Map算法、引导混合输入-输出算法(guided hybrid input-output algorithm, GHIO)、Shrink-Wrap算法等. 其中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^[5].

目前CDI可达到的最高分辨率为~2 nm. 基于CDI的显微成像方法被广泛应用于对全细胞、细胞器、病毒和生物材料等的成像和表征, 包括对Ga₂N-Ga₂O₃核壳结构、纳米晶体内应变、酵母孢子细胞、染色体进行成像^[7]. CDI的分辨率受限于对生物样本所受辐射损伤的考量. 使用低温冷冻技术可以减轻辐射损伤效应, 并且可以达到5~10 nm的三维分辨率. Huang等人^[9]使用X射线衍射显微镜对冷冻水合酵母细胞进行了成像, 通过将样品浸入液体乙烷中并将其保持在-170℃以下, 大大减少了由于脱水、冰结晶和辐射损伤引起的伪影. 降低辐射损伤效应的另一种方法是使用超短X射线脉冲^[7].

(3) 全息. 在X射线全息术(X-ray holography)(图1E)中, 样品被高度相干的入射波照射. X射线束与物体相互作用产生相移, 因此出射波含有物体的结构信息. 自由传播射线束和发散波场的自相干可以使相位信息显示出来——干涉图案是物体电子密度分布的投影, 所有分子成分都对相移有贡献. 通过相位恢复可以从记录的全息图重建出射波的相位和幅度; 相位恢复

基于迭代投影算法, 有时直接采用傅里叶滤波. 作为一种全场技术, X射线全息术不需要对样品进行任何横向扫描^[10]. Giewekemeyer等人^[11]使用全息硬X射线技术对冷冻干燥的盘基网柄菌细胞(*Dictyostelium discoideum*)进行成像.

2 新型X射线成像技术

2.1 高分辨率扫描X射线衍射显微镜

CDI有望达到优于10 nm的分辨率, 但重建过程对数据质量和样品制备提出了严格的要求. 相比之下, STXM可以直接进行数据分析, 但其分辨率受到样品上“光”斑尺寸的限制. 2008年, Thibault等人^[12]设计了一种叠层成像方法——扫描X射线衍射显微镜(scanning X-ray diffraction microscopy, SXDM), 通过测量一次STXM扫描中每个点的完整衍射图案来弥合CDI和STXM之间的差距. 在SXDM中, 入射相干X射线束在样本上聚焦到几百纳米. 探针——高强度的焦点——与小部分样本相互作用, 出射波传播到远场区域中的像素阵列检测器. 移动探针扫描样本, 记录衍射图案, 从而得到样本的完整数据记录(图2A). 恢复算法可以重建样本和探针的复值图像. SXDM可以达到CDI方法的高分辨率, 快速大面积扫描可以减少辐射损伤. X射线的高穿透力与高空间分辨率相结合将允许研究各种复杂的介观生命和材料科学样本, 例如嵌入式半导体器件或细胞网络. 未来的发展包括更高的相干光通量、改进聚焦光学系统以及将该方法扩展到无机和有机样品的3D重建.

2.2 叠层衍射成像和扫描SAXS结合

2016年, Hémonnot等人^[13]将叠层衍射成像(ptychography)技术与扫描SAXS技术结合以对上皮细胞的角蛋白束网络进行成像(图2B). 首先, 用叠层衍射获得细胞内角蛋白网络的高分辨率(~60 nm)实空间图像(图2B-a). 从叠层图像(图2B-b)识别出感兴趣区域(region of interest, ROI)之后, 通过扫描纳米衍射获得衍射数据——这一过程能够以纳米精度定位完整细胞中的蛋白质网络, 并随后探测这些网络的局部内部结构. 接着, 计算暗场衬度图像(图2B-c), 其中的每个像素表示全衍射图案的积分强度. 通过分析SAXS信号并将其拟合到模型中, 束直径、细丝直径、细丝距离和排

图 2 新型X射线成像技术. A: SXDM示意图: 入射硬X射线束聚焦在样品上; 像素阵列检测器记录样本每个光栅位置的完整过采样衍射图案. 图片来源: 参考文献^[12]. 版权: 2008 American Association for the Advancement of Science. B: 叠层衍射成像与X线扫描纳米衍射的结合. (a) 全细胞的叠层衍射图像; (b) ROI细节; (c) ROI暗场图像. 图片来源: 参考文献^[13]. 版权: 2016 American Chemical Society. C: STED(红色)与X射线记录(蓝色/绿色)中样品位置的3D示意图. (a) STED显微照片中的肌动蛋白丝(红色); (b) X射线相位图(X射线全息术)中的肌动蛋白丝(蓝色); (c) 分析SAXS信号获得衍射图案(灰度); (d) STED蛋白丝(红色)与全息重建相位图(灰度)的叠加. 图片来源: 参考文献^[10]. 版权: 2018 Springer Nature

Figure 2 New X-ray imaging technology. A: Schematic of SXDM: The incoming hard X-ray beam is focused on the specimen. A pixel array detector records the complete oversampled diffraction pattern for each raster position of the specimen. Image source: Ref. [12]. Copyright: 2008 American Association for the Advancement of Science. B: Correlation between ptychography and X-ray scanning nanodiffraction. (a) Ptychography image of the entire whole cell; (b) detail from the ROI; (c) dark-field image from the ROI, which is calculated using the nanodiffraction data. Reprinted with permission from Ref. [13]. Copyright (2016) American Chemical Society. C: 3D illustration of sample in the STED (red) or the X-ray recording position (blue/green). (a) Actin filaments detected in the STED micrograph (red); (b) filaments detected in the X-ray phase map (X-ray holography) (blue); (c) analysis of the SAXS signal to obtain the diffraction pattern (gray scale); (d) superposition of STED filaments (red) the phase map (gray scale) of the holographic reconstruction. Image source: Ref. [10]. Copyright: 2018 Springer Nature

列就可以确定. 这个过程不需要对细胞进行切片或染色. 纳米衍射仅向较小的ROI照射较高剂量X射线, 对整个样品施加的辐射剂量相对较低, 从而使总辐射损伤最小化^[1,13].

2.3 X射线显微技术与荧光技术结合

X射线显微技术可以提供基于电子密度的量化衬度. 然而, 由于信号来自整个生物分子集合, 因此在没

有任何模型的情况下解释信号比较困难. 荧光标记可以显示特定的分子组分信息, 这有助于确定分子组分模型并对X射线数据分析中的参数施加约束. 因此, X射线技术可以从更成熟的荧光技术中获得很大帮助. 另一方面, X射线结果, 特别是投射电子密度图, 有助于理解荧光标记分子的背景结构^[10].

2018年, Bernhardt等人^[10]结合X射线全息技术、扫描SAXS和受激发射损耗显微(stimulated emission

depletion microscopy, STED)技术, 提出了一种显微成像方法. 他们将所有模态都组合到同一个同步加速器端站中. 这种方式使细胞中标记的和未标记的结构以互补的方式呈现出来. 他们使用该方法对细胞中的肌动蛋白网络进行成像, 通过叠加STED的荧光数据、相位重建和X射线暗场图以实现数据的直接相关(图2C).

3 X射线成像技术发展趋势

3.1 快速定位方法

对于STXM技术, 常见的快速定位方法一种是移动样品, 固定射线^[14,15], 另一种是移动X射线组件^[16-18]. Odstrcil等人^[19]将具有长行程范围的慢样品台与用于光束定义光学元件的快速但小范围定位器相结合(图3A), 避免了样品台的高移动重量导致的机械运动误差和移动X射线组件导致的照明探针的细小变化带来的重建伪影. X射线叠层成像和STXM技术分辨率取决于样品的定位精度, 这种方法使阶跃响应被改进了一个数量级, 有良好的稳定性, 同时不会有额外的计算量及时间.

3.2 算法改进

传统衍射成像, 如纯投影近似(pure projection approximation, PPA), 是在某一平面单点采样, 得到投影的相位信息后成像. 传统三维成像技术, 如单层层析断层扫描(single-slice ptychographic tomography, SSPT)技术, 在PPA的基础上将单角度(或有限角度内)的离散平面结合起来进行叠层成像. 改进的三维成像将多层层析断层扫描(multi-slice ptychographic tomography, MSPT)^[20]应用于X射线成像, MSPT从多个角度上(图3B-a)对样本进行轴向多平面采样, 可以对更厚的样本进行成像, Gilles等人^[21]通过使用多切片优化方法(multislice optimized object recovery, MOOR)来重建3D对象(图3B-b). MOOR是在3D物体的当前猜测的基础上, 模拟探头功能照射波在各种探头位置和入射角处的传播, 以产生一组假设的强度模式, 记录在远场探测器上, 再调整对象的猜测, 来最小化实际探测器平面傅里叶幅度与当前猜测的差异. 由于它基于正向模型而不是波场通过对象的向后传播, 避免了相位展开带来的伪像问题.

3.3 射线源

新型相干X射线源, 例如X射线自由电子激光器(X-ray free-electron lasers, XFELs)^[22,23]和高次谐波波发生源(high harmonic generation sources, HHG)^[24-26], 可以发射飞秒超亮脉冲, 达到纳米级的分辨率^[27], 无需样品晶体具有周期性的结构. 目前, X射线成像技术受限于对样品的X射线损伤和生物材料的低衍射信号. XFEL可在独有的“破坏前衍射”模式下实验, 即发射源(电子)的大量能量将样品转变为等离子体, 破坏了蛋白质晶体的结构, 但XFEL可以提供飞秒级别的短脉冲, 以至于辐射损伤发生之前, 曝光的衍射图案就已经被记录下来, 由此克服了辐射损伤导致的巨大背景噪声. 同时, 在蛋白质上标记金纳米团簇能提高细胞散射信号强度, 可得到两倍以上分辨率. HHG是对XFEL的补充, 可以以非常高的重复率(1~100 kHz)由小规模($\approx$ mJ能量)激光器驱动. 尽管脉冲能量低于XFEL可用的脉冲能量(nJ对mJ), 但重复率更高, 可用于手性介质的阿秒计量. 对于晶体样品, HHG(图3C)能达到横向22 nm, 轴向6 Å的空间分辨率^[28,29], 长工作距离3~10 cm和10 fs的时间分辨率. 对于生物样品, XFELs对活细胞、细胞器和病毒颗粒分辨率低至18 nm^[30-34], 但受到样品上X射线通量密度的限制, 对纳米到微米大小的蛋白质晶体, 已达到最高分辨率1.6 Å^[35], 并已应用于难以生长为大晶体的蛋白质如膜蛋白的结构测定^[36,37].

3.4 样品制备

使用XFELs照射样本时, 有多种样本制备方式, 如液体微射流、挤出射流、气溶胶喷射器、光栅扫描阵列和安装在测角仪上的冷冻环上的大晶体. 其中背景噪声最低的为Bielecki等人^[38], 在真空中使用气动虚拟喷嘴(gas-dynamic virtual nozzle, GDVN)^[39]和电喷雾(electrospray, ES)雾化样品溶液来产生液滴气溶胶束^[40], 经空气动力学透镜聚焦成窄光束, 再引导到XFEL焦点中以对单个气溶胶粒子衍射成像(图3D-a). 降低了传统样品容器或基质带来的背景噪声, 且避免了与基材的接触导致的沉积样品的结构和取向改变的问题. 同时, 由于气体胶束输送样品有独特的高颗粒密度和足够的颗粒速度的特性, 能够高速率收集数据, 对相同粒子的信号平均能重建高分辨率结构. GDVN适

图 3 X射线显微成像研究进展。A: (a), (b)为样品台的典型运动; (c), (d)为逐点扫描期间的FZP扫描仪的有效运动; (e), (f)则显示样品相对于FZP位置随时间的有效运动。图片来源: 参考文献^[19]。(FZP: Fresnel zone plates, 菲涅尔波带板)。B: (a) 模拟实验, 假设透镜产生尺寸为14 nm的半高全宽(full width at half maximum, FWHM)的高斯相干照射探针, 通过该探针在每个物体旋转角度扫描物体, 然后在每次扫描中捕获远场衍射图案。(b) 比较真实物体的3D等值面渲染, 以及使用360°和180°物体旋转的MOOR重建。图片来源: 参考文献^[21]。C: 当中红外激光脉冲聚焦到高压充气波导中时发射的相干千电子伏特X射线超连续的示意图。实验相位匹配的谐波信号随压力呈二次方增长, 随压力 p 增加表现出优异的相位匹配相干累积。图片来源: 参考文献^[26]。D: (a) 瑞利散射显微镜设置的示意图。光束路径被限制在垂直于喷射器轴的平面上。图片来源: 参考文献^[39]。(b) 通过RSM(顶部)和XFEL衍射(底部)确定的ES(绿色)和GDVN(蓝色)气溶胶的初始液滴的尺寸分布。图片来源: 参考文献^[38]

Figure 3 Progress in X-ray microscopy imaging. A: (a) and (b) Typical movements of the sample stage; (c) and (d) FZP scanner during a point-by-point scan; (e) and (f) show the resulting effective motion of the sample relative to the FZP position as a function of time. Image source: Ref. [19]. B: (a) Experimental geometry used in the proposed simulated experiment. The lens was assumed to produce a Gaussian coherent illumination probe with a 14-nm full width at half maximum (FWHM) through which the object is scanned at each object rotation angle. Then, the far-field diffraction pattern is captured during each scan. (b) Comparison of 3D isosurface renderings of the true object and MOOR reconstructions using 360° and 180° object rotation. Rotation in the full 360° range provides improved results. Image source: Ref. [21]. C: Schematic illustration of the coherent kiloelectron volt X-ray supercontinua emitted when a mid-IR laser pulse is focused into a high-pressure gas-filled waveguide. The experimental phase-matched harmonic signal increases quadratically with pressure, demonstrating excellent phase-matched coherent buildup with increasing pressure p . Image source: Ref. [26]. D: (a) Schematic of the Rayleigh scattering microscopy setup. The optical beam path is confined to the plane that is perpendicular to the injector axis. Image source: Ref. [39]. (b) Size distributions of the initial droplets of ES (green) and GDVN (blue) aerosols determined by RSM (top) and XFEL diffraction (bottom). Image source: Ref. [38]

用于直径在80~2000 nm的大蛋白质分子, ES能对最小35 nm的蛋白质分子成像(图3D-b).

4 结论

X射线成像技术有效地避免了电子显微镜只能对样本表面成像的缺陷和荧光技术标记物影响正常生理过程的问题. 研究者利用X射线吸收、散射、衍射等特性设计出一系列具有高分辨率的X射线显微技术, 包括STXM, CDI, SAXS等. 计算方法和原理的突

破使得更多的理论设想成为可能; 多技术的结合则取长补短, 充分发挥了多种成像技术的突出优点. 未来X射线显微技术的发展有赖于对激光源、聚焦元件、控制系统、处理体系的优化, 以降低X射线对样品造成的损伤、提高成像速度和维度、实现更高的分辨率. 有充分理由相信, 随着理论的发展、算法的改进、技术的提高, X射线成像技术在未来仍然可以获得很大发展. 它与电子显微、光学显微等技术互相补充, 已成为显微成像技术领域不可忽视的重要组成部分.

参考文献

- 1 Hémonnot C Y J, Köster S. Imaging of biological materials and cells by X-ray scattering and diffraction. *ACS Nano*, 2017, 11: 8542–8559
- 2 Kirz J, Jacobsen C, Howells M. Soft X-ray microscopes and their biological applications. *Quart Rev Biophys*, 1995, 28: 33–130
- 3 Horowitz P, Howell J A. A scanning X-ray microscope using synchrotron radiation. *Science*, 1972, 178: 608–611
- 4 Fratzl P, Jakob H F, Rinnerthaler S, et al. Position-resolved small-angle X-ray scattering of complex biological materials. *J Appl Crystlogr*, 1997, 30: 765–769
- 5 Fan J D, Jiang H D. Coherent X-ray diffraction imaging and its applications in materials science and biology (in Chinese). *Acta Phys Sin*, 2012, 61: 513–526 [范家东, 江怀东. 相干X射线衍射成像技术及其在材料学和生物学中的应用. *物理学报*, 2012, 61: 513–526]
- 6 Sayre D. Imaging processes and coherence in physics. In: Schlenker M, Fink M, Goedgebuer J P, et al., eds. *Lecture Notes in Physics*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1980
- 7 Miao J, Sandberg R L, Song C. Coherent X-ray diffraction imaging. *IEEE J Sel Top Quant*, 2012, 18: 399–410
- 8 Miao J, Sayre D, Chapman H N. Phase retrieval from the magnitude of the fourier transforms of nonperiodic objects. *J Opt Soc Am A*, 1998, 15: 1662–1669
- 9 Huang X, Nelson J, Kirz J, et al. Soft X-ray diffraction microscopy of a frozen hydrated yeast cell. *Phys Rev Lett*, 2009, 103: 198101
- 10 Bernhardt M, Nicolas J D, Osterhoff M, et al. Correlative microscopy approach for biology using X-ray holography, X-ray scanning diffraction and STED microscopy. *Nat Commun*, 2018, 9: 3641
- 11 Giewekemeyer K, Krüger S P, Kalbfleisch S, et al. X-ray propagation microscopy of biological cells using waveguides as a quasipoint source. *Phys Rev A*, 2011, 83: 023804
- 12 Thibault P, Dierolf M, Menzel A, et al. High-resolution scanning X-ray diffraction microscopy. *Science*, 2008, 321: 379–382
- 13 Hémonnot C Y J, Reinhardt J, Saldanha O, et al. X-rays reveal the internal structure of Keratin bundles in whole cells. *ACS Nano*, 2016, 10: 3553–3561
- 14 Shapiro D A, Yu Y S, Tyliczszak T, et al. Chemical composition mapping with nanometre resolution by soft X-ray microscopy. *Nat Photon*, 2014, 8: 765–769
- 15 Menzel A, Kewish C M, Kraft P, et al. Scanning transmission X-ray microscopy with a fast framing pixel detector. *Ultramicroscopy*, 2010, 110: 1143–1147
- 16 Takeichi Y, Inami N, Suga H, et al. Design and performance of a compact scanning transmission X-ray microscope at the Photon Factory. *Rev Sci Instrum*, 2016, 87: 013704
- 17 Medjoubi K, Leclercq N, Langlois F, et al. Development of fast, simultaneous and multi-technique scanning hard X-ray microscopy at Synchrotron Soleil. *J Synchrotron Radiat*, 2013, 20: 293–299
- 18 Kilcoyne A L D, Tyliczszak T, Steele W F, et al. Interferometer-controlled scanning transmission X-ray microscopes at the advanced light source. *J Synchrotron Radiat*, 2003, 10: 125–136
- 19 Odstreil M, Lebugle M, Lachat T, et al. Fast positioning for X-ray scanning microscopy by a combined motion of sample and beam-defining

- optics. *J Synchrotron Radiat*, 2019, 26: 504–509
- 20 Li P, Maiden A. Multi-slice ptychographic tomography. *Sci Rep*, 2018, 8: 2049
- 21 Gilles M A, Nashed Y S G, Du M, et al. 3D X-ray imaging of continuous objects beyond the depth of focus limit. *Optica*, 2018, 5: 1078–1086
- 22 Fan J, Sun Z, Wang Y, et al. Single-pulse enhanced coherent diffraction imaging of bacteria with an X-ray free-electron laser. *Sci Rep*, 2016, 6: 34008
- 23 Chapman H N. Serial femtosecond crystallography. *Synchrotron Radiat News*, 2015, 28: 20–24
- 24 Emma P, Akre R, Arthur J, et al. First lasing and operation of an ångström-wavelength free-electron laser. *Nat Photon*, 2010, 4: 641–647
- 25 Ishikawa T, Aoyagi H, Asaka T, et al. A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region. *Nat Photon*, 2012, 6: 540–544
- 26 Popmintchev T, Chen M C, Popmintchev D, et al. Bright coherent ultrahigh harmonics in the keV X-ray regime from mid-infrared femtosecond lasers. *Science*, 2012, 336: 1287–1291
- 27 Quiney H M, Nugent K A. Biomolecular imaging and electronic damage using X-ray free-electron lasers. *Nat Phys*, 2010, 7: 142–146
- 28 Seaberg M D, Zhang B, Gardner D F, et al. Tabletop nanometer extreme ultraviolet imaging in an extended reflection mode using coherent fresnel ptychography. *Optica*, 2014, 1: 39–44
- 29 Seaberg M D, Adams D E, Townsend E L, et al. Ultrahigh 22 nm resolution coherent diffractive imaging using a desktop 13 nm high harmonic source. *Opt Express*, 2011, 19: 22470–22479
- 30 Seibert M M, Ekeberg T, Maia F R N C, et al. Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser. *Nature*, 2011, 470: 78–81
- 31 Ekeberg T, Svenda M, Abergel C, et al. Three-dimensional reconstruction of the giant mimivirus particle with an X-ray free-electron laser. *Phys Rev Lett*, 2015, 114: 098102
- 32 Kimura T, Joti Y, Shibuya A, et al. Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction. *Nat Commun*, 2014, 5: 3052
- 33 Gallagher-Jones M, Bessho Y, Kim S, et al. Macromolecular structures probed by combining single-shot free-electron laser diffraction with synchrotron coherent X-Ray imaging. *Nat Commun*, 2014, 5: 3798
- 34 Hantke M F, Hasse D, Maia F R N C, et al. High-throughput imaging of heterogeneous cell organelles with an X-ray laser. *Nat Photon*, 2014, 8: 943–949
- 35 Tenboer J, Basu S, Zatsepin N, et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science*, 2014, 346: 1242–1246
- 36 Kern J, Alonso-Mori R, Tran R, et al. Simultaneous femtosecond X-ray spectroscopy and diffraction of photosystem II at room temperature. *Science*, 2013, 340: 491–495
- 37 Liu W, Wacker D, Gati C, et al. Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Science*, 2013, 342: 1521–1524
- 38 Bielecki J, Hantke M F, Daurer B J, et al. Electrospray sample injection for single-particle imaging with X-ray lasers. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav8801
- 39 Hantke M F, Bielecki J, Kulyk O, et al. Rayleigh-scattering microscopy for tracking and sizing nanoparticles in focused aerosol beams. *IUCrJ*, 2018, 5: 673–680
- 40 DePonte D P, Weierstall U, Schmidt K, et al. Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams. *J Phys D-Appl Phys*, 2008, 41: 195505

Coherent X-ray imaging technology

WU RuoNan, BIAN YuHan & XI Peng

Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Imaging of biological materials and cells with X-ray microscopy, which has high application potential, can break the diffraction limit barrier of traditional optical microscopy and exceed the transmission depth of electron microscopy. In this study, we introduce the examples of X-ray microscopy technology, such as transmission X-ray microscopy (TXM), small-angle X-ray scattering (SAXS), coherent X-ray diffraction imaging (CDI/CXDI), and X-ray holography. In addition, we demonstrate the combination of different technologies to achieve optimized imaging results such as the combination of STXM with CDI, the combination of scanning SAXS with ptychography, and the combination of X-ray microscopy with fluorescence imaging. Relevant improvements in rapid positioning, algorithms, X-ray sources, and sample preparation are also discussed.

X-ray microscopy, scanning X-ray diffraction microscopy, X-ray free electron laser, multi-slice ptychographic tomography

doi: [10.1360/SSV-2019-0112](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2019-0112)