

Подложки для мягкой рентгеновской микроскопии на основе Si_3N_4 мембран

© Д.Г. Реунов, Н.С. Гусев, М.С. Михайленко, Д.В. Петрова, И.В. Малышев, Н.И. Чхало

Институт физики микроструктур РАН,
607680 Нижний Новгород, Россия
e-mail: reunov_dima@ipmras.ru

Поступило в Редакцию 2 мая 2023 г.
В окончательной редакции 2 мая 2023 г.
Принято к публикации 2 мая 2023 г.

Экспериментально были получены мембраны из нитрида кремния в качестве подложек для биологических образцов, которые исследованы на микроскопе с рабочей длиной волны 13.8 nm. Полученные свободно висящие пленки имели размер до 1.5×1.5 mm, что позволило выбрать интересную для исследования область на образце порядка десятков — сотен микрон. Механическая прочность мембран удовлетворяет требованию, чтобы образцы не рвали мембраны и выдерживали транспортировку. Полученные мембраны имеют прозрачность более 40% в диапазоне „окна прозрачности воды“ (2.3–4.4 nm) и экстремальный ультрафиолет (13–15 nm).

Ключевые слова: мембраны Si_3N_4 , фотолитография, микроскопия мягкого рентгеновского излучения, экстремальная ультрафиолетовая микроскопия, корреляционная микроскопия.

DOI: 10.21883/JTF.2023.07.55765.105-23

Введение

Для мягкой рентгеновской микроскопии одну из ключевых ролей играет держатель образцов. Он должен обладать следующими параметрами: быть прозрачным в диапазоне 2.3–4.4 nm (микроскопия „окна прозрачности воды“ [1]) и пропускать экстремальный ультрафиолет (ЭУФ) (микроскопия в экстремальном ультрафиолете [2,3]), и быть стойким к ультрафиолету, чтобы в процессе работы на микроскопе держатель не разрушался. Также держатель должен быть механически прочным для нанесения на него образца и транспортировки [4]. На данный момент в мире используют три типа подложек для образцов в мягкой рентгеновской микроскопии:

- 1) поливинил-формальдегидные пленки с 20 nm пленкой углерода, которая наносится на медную сетку с разными размерами ячеек [3,5];
- 2) стеклянные капилляры размером 300×4 (20) μm [1,6];
- 3) свободно висящие мембраны из Si_3N_4 [2,7].

Мембраны из Si_3N_4 обладают несколькими преимуществами. Например, они более стойкие к УФ и ЭУФ излучению. Их рабочая поверхность больше, чем у стеклянного капилляра. Мембраны для микроскопии мягкого рентгеновского излучения можно делать большие, до 1.5 mm^2 , что позволяет выбрать интересную для исследования область на образце порядка десятков — сотен микрон.

Как видно из рис. 1, мембрана из нитрида кремния толщиной 90 nm отлично пропускает в диапазоне 2.3–4.4 nm и на длине волны 13.8 nm. Величину коэффициента пропускания можно варьировать. Например,

увеличив толщину, получим более прочную мембрану, но с меньшим коэффициентом пропускания.

Актуальные толщины коммерчески доступных мембран составляют от 10 до 1000 nm, при этом максимальный размер мембраны составляет 15×23 mm при толщинах от 30 nm [9].

Для вариации размеров мембраны нами была выбрана пленка толщиной 90 nm. На мембрану будут наноситься различные биологические образцы толщиной 5–10 μm и более, и мембрана не должна лопнуть под ними. Мы будем описывать методику изготовления свободно висящих мембран Si_3N_4 различных размеров для применения их в качестве держателей биологических

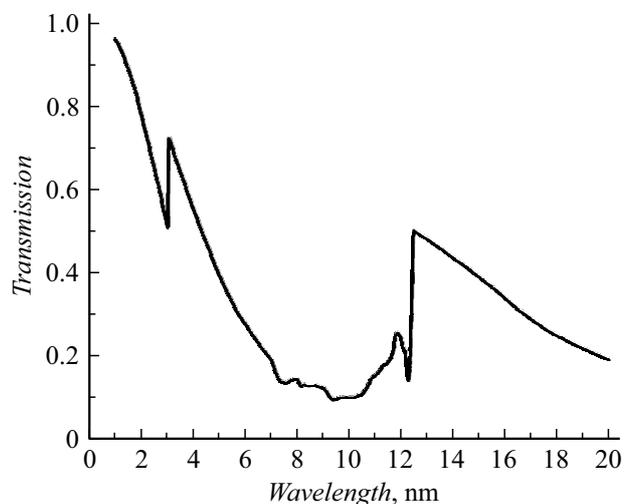


Рис. 1. Теоретическая зависимость коэффициента пропускания пленки Si_3N_4 толщиной 90 nm в диапазоне 1–20 nm [8].

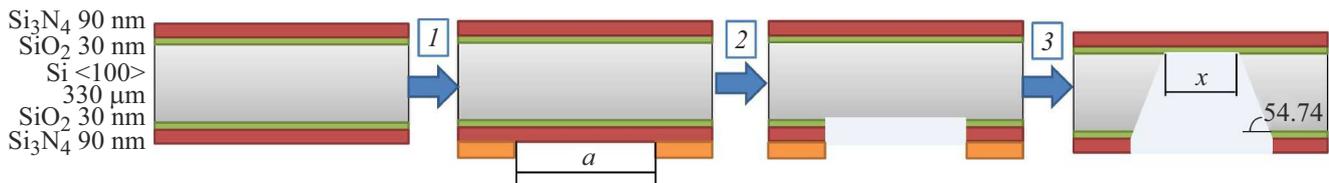


Рис. 2. Схема изготовления мембран Si_3N_4 . 1 — нанесение на подложку фоторезиста и создание технологического рисунка; 2 — удаление слоев Si_3N_4 и SiO_2 ионным травлением для последующего химического травления; 3 — смыв фоторезиста и химическое травление оставшегося слоя Si в два этапа.

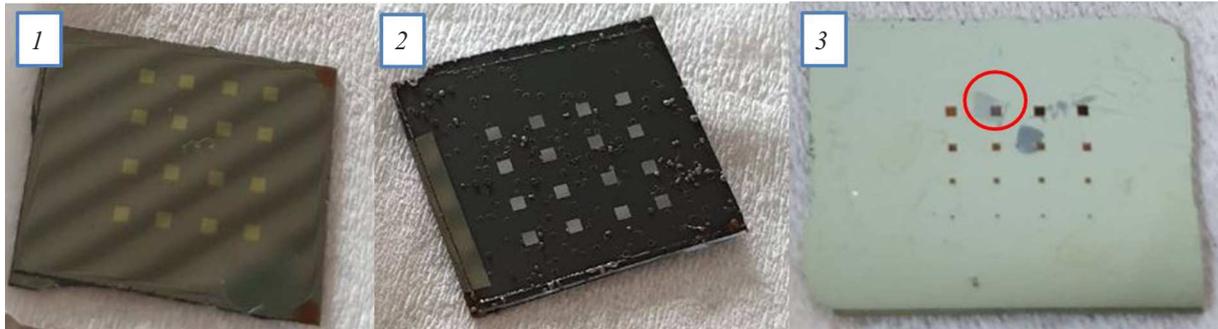


Рис. 3. Результаты некоторых этапов изготовления. 1 — фоторезист с технологическим рисунком; 2 — после ионного травления; 3 — финальные мембраны в пластине Si. Кругом выделен образец на мембране.

образцов для микроскопии мягкого рентгеновского излучения. Это является апробацией известной технологии, но с применением отечественного оборудования. Также это является импортозамещающей технологией изготовления подобных мембран, которые описаны во всех деталях. Разработанная технология станет основой при создании кювет для живых биологических образцов для исследований микроскопией мягкого рентгеновского излучения.

1. Методика изготовления свободно висящей мембраны Si_3N_4

Процесс изготовления таких мембран рассмотрен в литературе [10], но достаточно поверхностно. Мы опишем более детально. Сам процесс можно разделить на три этапа (рис. 2, 3).

Изначально берется коммерческая пластина Si с кристаллографической ориентацией $\langle 100 \rangle$ толщиной $330 \mu\text{m}$, на которую с обеих сторон нанесены тонкие пленки SiO_2 ($\sim 30 \text{ nm}$) и Si_3N_4 ($\sim 90 \text{ nm}$), далее „подложка“. На одну из сторон наносился фоторезист. Для получения слоя фоторезистивной маски использовался коммерчески доступный позитивный резист ФП-383.

Фоторезист наносили на подложку методом центрифугирования при скорости 3000 rpm. Время центрифугирования составляло 30–40 с. Далее подложку помещали в печь и выдерживали 1 h при 85°C . Изготовление маски под травление осуществлялось при помощи лазерного сканирующего УФ литографа Heidelberg instruments

μrg 101 [11]. Маска делалась в виде матрицы квадратов со стороной „a“ (рис. 2). После засветки резиста он проявлялся в УПФ-1Б.

Далее через маску производилось ионное травление слоя Si_3N_4 , SiO_2 и 100 nm Si. Для удаления слоев применялась технология ионно-пучкового травления [12]. Использовался технологический источник ускоренных ионов КЛАН-103М (НТК „Платар“ [13]) с накальным катодом и плоской ионно-оптической системой. Апертура — эллипс с полуосями 30 и 45 mm. В качестве газа был выбран Ar. Энергия ионов составила 800 eV , а плотность тока — 0.7 mA/cm^2 . Остаточное давление в камере перед процессом — $2 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}$, во время процесса травления — $1.3 \cdot 10^{-2} \text{ Pa}$. Контроль глубины травления осуществлялся с помощью образца–„свидетеля“, в качестве которого использовалась пластина Si_3N_4 , часть поверхности которой была закрыта маской. В результате травления образовывалась ступенька, которая измерялась на микроинтерферометре белого света TalySurf CCI 2000 [14].

Так как часть исследуемого образца покрыта фоторезистом, который может запекаться под действием ионного облучения, процесс травления подбирался таким образом, чтобы не перегреть подложку. Образец облучался в течение 5 s, после чего закрывался заслонкой для остывания на 25 s. Количество таких циклов открытия-закрытия заслонки подбиралось, исходя из скорости травления Si_3N_4 и необходимой величины съема материала. После чего резист смывался в ДМФА.

Далее происходило химическое травление слоя Si в 30% растворе КОН в два этапа. Первый этап — трав-

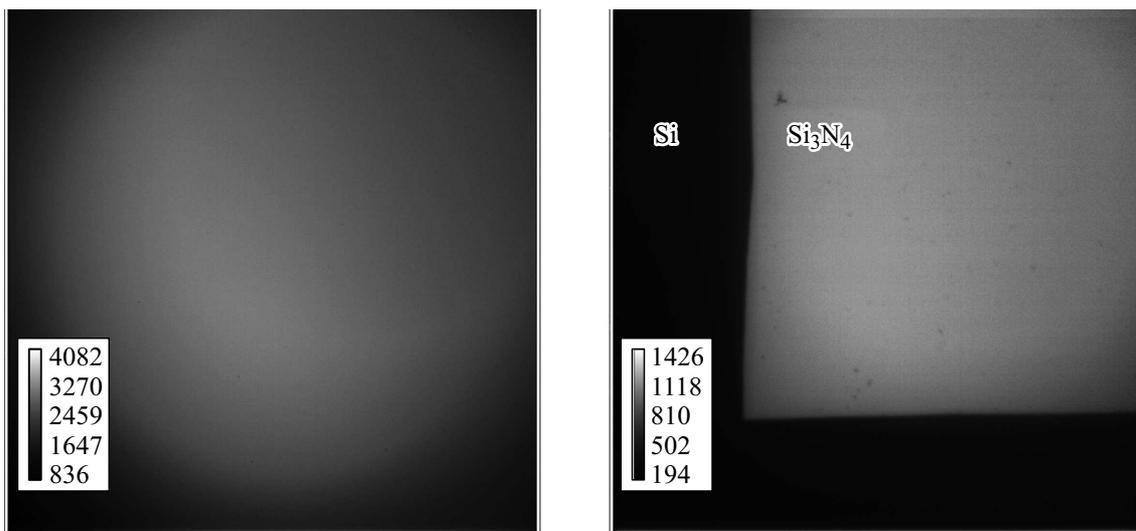


Рис. 4. Подсветка поля зрения микроскопа без мембраны (слева) и с мембраной (справа).

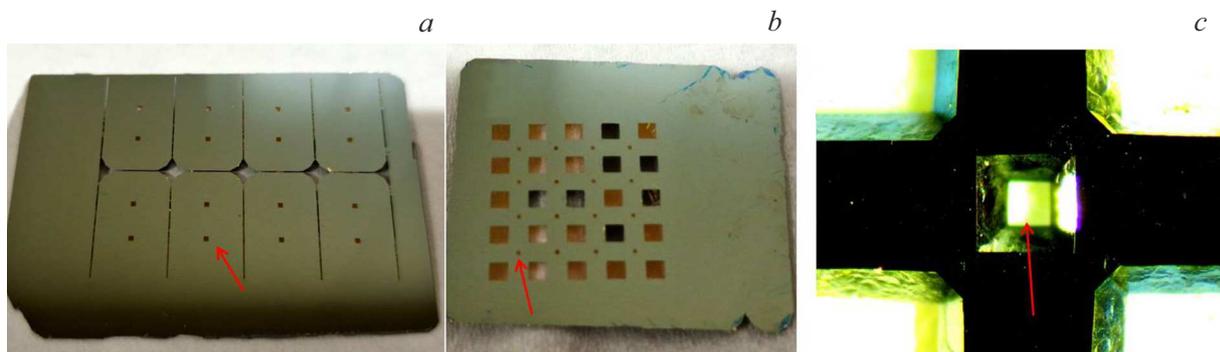


Рис. 5. Готовые мембраны после всех процессов изготовления при помощи фотошаблона для контактной литографии. Стрелками указаны сами мембраны. *a* — мембрана 0.5×0.5 mm; *b* — мембрана 0.1×0.1 mm; *c* — обратная сторона мембраны 0.1×0.1 mm.

ление в кипящем растворе для снятия основного слоя Si. Второй этап — травление остаточного слоя Si при комнатной температуре. Это необходимо, чтобы в процессе травления в кипящем растворе не порвать пленку Si_3N_4 . На поверхности Si, подвергающейся травлению, выделяется огромное количество пузырьков (водород), которые могут порвать мембрану.

В итоге получается квадратная мембрана со стороной квадрата „ x “ (рис. 2). Для получения необходимого размера мембраны „ x “ можно посчитать из геометрии сечения подложки размер „ a “ для маски. Известны толщина пластины и угол травления данного кристаллографического направления. В итоге получаем $a = x + 466$ [μm].

На рис. 4 приведены два изображения, полученные на микроскопе мягкого рентгеновского излучения (длина волны 13.84 nm) с оптической схемой на просвет [15]. На левом изображении показана подсветка поля зрения микроскопа без мембраны. В одной и той же области интенсивность без мембраны составила 2700 условных единиц, а с мембраной из Si_3N_4 — 1100 единиц при том же времени экспозиции. Интенсивность с мембраной

составила 41% от интенсивности без мембраны, что хорошо согласуется с теоретическим значением пропускания 90 nm Si_3N_4 в 44% (рис. 1).

Для ускорения производства Si_3N_4 -мембран заданной формы был изготовлен фотошаблон для контактной фотолитографии в центре проектирования и производства МВЦ в городе Нижний Новгород [16].

В фотошаблоне заложен рисунок для изготовления мембран для микроскопии мягкого рентгеновского излучения и оптической микроскопии (мембраны со стороной квадрата 500 и 1000 μm) и корреляционной микроскопии (мембраны со стороной квадрата 100 и 200 μm).

Процедура изготовления принципиально отличается только одним этапом: вместо лазерной сканирующей литографии используется контактная литография. А именно засветку позитивного фоторезиста ФП-383 проводили контактным методом через фотошаблон светом ультрафиолетовой лампы с длиной волны ≈ 450 nm и проявляли полученную маску в водном растворе стандартного проявителя УПФ-1Б, разведенного в соотношении 1 к 4.5 частей воды. Время удерживания образца

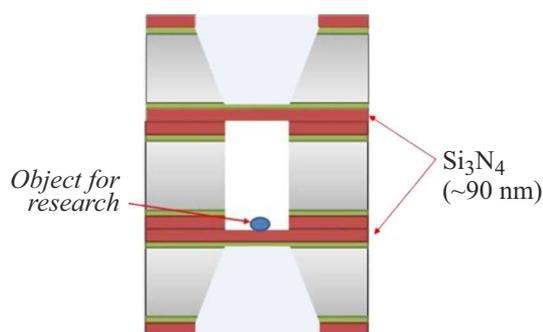


Рис. 6. Кювета для живых биологических образцов. Объект, указанный стрелкой, находится между двух мембран Si_3N_4 .

в растворе проявителя 45 с. После чего проводилось ионное травление и травление в KOH.

На рис. 5, а представлен конечный вариант пластины с мембраной Si_3N_4 , на которой можно выколоть по технологическим прорезам пластины по два окошка. В фотошаблоне есть два варианта таких пластин: с размером окошка $1 \times 1 \text{ mm}$ или $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$. Рис. 5, б демонстрирует другой вариант подложек, где большие квадраты представляют собой технологические отверстия для скола небольших квадратов. В фотошаблоне есть два варианта размера маленьких окошек: $0.1 \times 0.1 \text{ mm}$ и $0.2 \times 0.2 \text{ mm}$. Рис. 5, в показывает обратную сторону мембраны, где видны фаски, которые и были продуманы в фотошаблоне. Если выколоть окошко, то получится восьмигранный прямоугольник с описанной окружностью диаметром 3 мм, которая отлично подходит так же и для просвечивающей электронной микроскопии.

На эти мембраны можно наносить различные фиксированные биологические объекты для их изучения на ЭУФ микроскопе. Также на основе этих мембран можно изготовить кюветы для живых образцов для рентгеновской микроскопии „водного окна“. Важно соблюдать два критических параметра среды для жизни клеток — это температура и атмосферное давление. В рентгеновских микроскопах во всем мире используют тонкие стеклянные капилляры, которые наполняют водой, в которой содержится исследуемый объект. Это обусловлено тем, что на рентгеновских микроскопах производится угловая томография [17,18]. Предполагаемая кювета будет использована для z -томографии [15].

В литературе рассмотрено несколько вариантов составных Si_3N_4 -кювет. Например, в работе [19] была предложена кювета для контактной рентгеновской микроскопии. Мы предлагаем другое исполнение такой кюветы (рис. 6), чтобы в области, где находится живая клетка, оставалась среда для жизнедеятельности. В такой кювете образец будет находиться на одной из мембран Si_3N_4 , выше находится пластина с окном без мембраны и сверху она закрывается мембраной Si_3N_4 . Пластины будут склеены между собой. Таким образом, можно изучать биологические объекты в их нативном состоянии на

рентгеновском микроскопе и делать их z -томографию для восстановления трехмерной структуры [15].

Заключение

Разработана методика изготовления мембран из нитрида кремния с прозрачностью в области 13.84 нм на уровне 41% и в области „водного окна“ (2.3–4.4 нм) на уровне 60–70%. Мембраны используются в качестве держателей для фиксированных образцов и могут служить основой составных кювет для живых биологических объектов при использовании микроскопии мягкого рентгеновского излучения. Полученные мембраны были апробированы в качестве держателей образцов на микроскопе мягкого рентгеновского излучения.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 22-62-00068 и с использованием оборудования ЦКП „Физика и технологии микро- и наноструктур“ при ИФМ РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] V. Weinhardt, J. Chen, A.A. Ekman, J. Guo, S.G. Remesh, M. Hammel, G. McDermott, W. Chao, S. Oh, M.A. Le Gros, C.A. Larabell. *PLoS One*, **15** (1), e0227601 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227601>
- [2] A. Torrisi, P. Wachulak, Ł. Węgrzyński, T. Fok, A. Bartnik, T. Parkman, Š. Vondrová, J. Turňová, B.J. Jankiewicz, B. Bartosewicz, H. Fiedorowicz. *Microscopy*, **265** (2), 251 (2017). DOI: 10.1111/jmi.12494
- [3] T. Ejima, F. Ishida, H. Murata, M. Toyoda, T. Harada, T. Tsuru, T. Hatano, M. Yanagihara, M. Yamamoto, H. Mizutani. *Optics Express*, **18** (7), 7203 (2010). DOI: 10.1364/OE.18.007203
- [4] M. Sekimoto, H. Yoshihara, T. Ohkubo. *J. Vacuum Sci. Technol.*, **21** (4), 1017 (1982). DOI: 10.1116/1.571854
- [5] R. Carzaniga, M.C. Domart, L.M. Collinson, E. Duke. *Protoplasma*, **251**, 449 (2014). DOI: 10.1007/s00709-013-0583-y
- [6] D.Y. Parkinson, L.R. Epperly, G. McDermott, M.A. Le Gros, R.M. Boudreau, C.A. Larabell. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J., 2013), DOI: 10.1007/978-1-62703-137-0_25
- [7] M. Berglund, L. Rymell, M. Peuker, T. Wilhein, H.M. Hertz. *J. Microscopy*, **197** (3), 268 (2000). DOI: 10.1046/j.1365-2818.2000.00675.x
- [8] Электронный ресурс. Режим доступа: https://henke.lbl.gov/optical_constants/filter2.html
- [9] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://www.silson.com/product/silicon-nitride-membranes/>
- [10] J.P.S. DesOrmeaux, J.D. Winans, S.E. Wayson, T.R. Gaborski, T.S. Khire, C.C. Striemer, J.L. McGrath. *Nanoscale*, **6** (18), 10798 (2014). DOI: 10.1039/c4nr03070b

- [11] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://heidelberg-instruments.com/>
- [12] N.I. Chkhalo, I.A. Kaskov, I.V. Malyshev, M.S. Mikhaylenko, A.E. Pestov, V.N. Polkovnikov, I.G. Zabrodin. Precision Engineering, **48**, 338 (2017). DOI: 10.1016/j.precisioneng.2017.01.00
- [13] Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.platar.ru/P2R.html>
- [14] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://ndtpro.ru/product/beskontaktnyj-opticheskij-profilometr-talysurf-cci/>
- [15] I.V. Malyshev, D.G. Reunov, N.I. Chkhalo, M.N. Toropov, A.E. Pestov, V.N. Polkovnikov, N.N. Tsybin, A.Ya. Lopatin, A.K. Chernyshev, M.S. Mikhailenko, R.M. Smertin, R.S. Pleshkov, O.M. Shirokova. Optics Express, **30** (26), 47567 (2022). DOI: 10.1364/OE.475032
- [16] Электронный ресурс. Режим доступа: <https://mvc-nn.ru/contacts>
- [17] E. Fogelqvist, M. Kördel, V. Carannante, B. Önfelt, H.M. Hertz. Scientific Reports, **7**(1), 1, (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-13538-2
- [18] P.W. Wachulak, A. Torrisi, W. Krauze, A. Bartnik, J. Kostecki, M. Maisano, A.M. Sciortino, H. Fiedorowicz. Appl. Phys. B, **125**, 1 (2019). DOI: 10.1007/s00340-019-7183-2
- [19] R. Feder, J. Costa, P. Chaudhari, D. Sayre. Science, **212** (4501), 1398 (1981). DOI: 10.1126/science.7233227