

X射线自由电子激光单颗粒成像研究*

孙智斌^{1,2,3} 范家东¹ 江怀东^{1,†}

(1 上海科技大学物质科学与技术学院 上海 201210)

(2 美国SLAC国家加速器实验室 直线加速器相干光源 加州 94025)

(3 山东大学晶体材料国家重点实验室 济南 250100)

2018-06-01收到

† email: jianghd@shanghaitech.edu.cn

DOI: 10.7693/wl20180802

Single particle imaging with X-ray free electron lasers

SUN Zhi-Bin^{1,2,3} FAN Jia-Dong¹ JIANG Huai-Dong^{1,†}

(1 School of Physical Science & Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

(2 Linac Coherent Light Source, SLAC National Accelerator Laboratory, California 94025, USA)

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

摘要 具有超高亮度、超短脉冲、全相干特性的X射线自由电子激光(X-ray Free Electron Lasers, XFELs)的出现为超快时间研究与超微结构探索带来新的机遇,使得获取单分子、单颗粒原子分辨率图像及电影成为可能。随着德国FLASH、意大利FERMI、美国LCLS以及日本SACLA等装置的建成与投入使用,X射线自由电子激光已经进入了快速发展的阶段,一系列物理、化学、生物、材料科学领域的前沿研究成果不断涌现。为突破实验技术、工程设备及软件算法上的技术壁垒,相关科研机构通过国际合作,拟实现纳米颗粒、细菌、细胞、病毒、团簇及生物学大分子等单颗粒的原子分辨率成像。文章将聚焦单颗粒成像的发展历史、科学意义、研究背景、研究目标、研究规划、研究现状及世界各国的布局,并展望单颗粒成像未来的发展。

关键词 X射线自由电子激光,相干衍射成像,单颗粒成像,时间分辨成像

Abstract The emergence of ultra-intense, ultrafast, and coherent X-ray free electron lasers (FELs) offers opportunities for ultrafast time-scale studies and ultra-small structure determination, making it possible to acquire images and movies of single-molecules and single-particles at atomic resolution. With the completion and use of the FLASH, FERMI, LCLS, and SACLA facilities, X-ray FELs have entered a stage of rapid development, and a series of cutting-edge research results in the fields of physics, chemistry, biology, and materials science are emerging. To realize single particle imaging, research institutions are collaborating worldwide to overcome the technical barriers in experimental techniques, X-ray instrumentation and data analysis. They aim to achieve imaging of nanoparticles, bacteria, cells, viruses, clusters and biological macromolecules on the atomic scale. In this review we will give a brief introduction to the background, scientific significance, objectives, research roadmap, current status, and prospective future development of single particle imaging.

Keywords X-ray free electron laser, coherent diffraction imaging, single particle imaging, time-resolved imaging

* 国家自然科学基金(批准号: 31430031)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2014CB910401)、国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0504802)、国家留学基金管理委员会(批准号: 201606220148)资助项目

1 X射线自由电子激光与相干衍射成像

自1895年德国科学家伦琴(Wilhelm Conrad Röntgen)发现并命名X射线之时起,与之相关的研究及技术发展便一直是科学研究的重点与热点问题。X射线波长介于0.01—10 nm,穿透性良好,能与物质产生吸收、激发与散射等多种效应,因而被广泛应用于各研究领域。特别是在晶体学研究中,劳厄(Max von Laue)于1912年发现了X射线通过晶体后产生的衍射现象,极大地推动了现代科学技术的进步。随着对X射线研究的深入,高性能的X射线光源逐步出现。同步辐射光源具有高亮度、宽而连续分布的谱范围、高度偏振、良好的准直性、极小的光束截面积、脉冲时间结构及一定的空间相干性,因而广泛应用于X射线衍射、X射线发射谱及其精细结构、X射线吸收谱、俄歇电子能谱、光电子能谱、拉曼等谱学研究,并且在吸收衬度成像、相位衬度成

像、全息成像术及相干衍射成像(Coherent Diffraction Imaging, CDI)中具有重要应用。相关研究涉及物理学、化学、材料学、生物学、医学、地球科学、环境科学、农学及天文学等几乎所有学科领域。随着尖端科技的研究与发展,对于更高强度、超短脉冲、全相干的X射线光源的需求愈发急切。因此,对于峰值亮度超过同步辐射光源数十亿倍的X射线自由电子激光技术的研究与发展意义重大。

1.1 X射线自由电子激光

X射线自由电子激光的产生模式一般有自放大自发辐射模式(Self-amplified Spontaneous Emission, SASE)^[1]、谐波放大模式^[2, 3]、自种子型^[4]等。高增益X射线自由电子激光的产生装置一般包含电子枪(Electron Gun)、直线加速器(Linear Accelerator)及波荡器(Undulator)等主要组成部分。

目前,世界上运行及建设中的硬X射线自由电子激光装置均为自放大自发辐射类型,其产生的基本原理是直线加速器中的电子束被加速至接近光速,成为相对论电子,在波荡器作用下产生正弦运动路径,在运动轨迹切线方向产生同步辐射光,同步辐射光与电子束运动周期相同,于是得到相干叠加的光场,如图1(a)所示。由于它的工作介质是自由电子,因此称为“自由电子激光”。自由电子激光的亮度非常高,波段范围在远红外至硬X射线,且可通过改变电子能量、磁场周期和强度改变输出激光的波长。这种激光的特点是激光波长和脉冲结构可以根据需要进行设计,可实现大范围内连续调节。由于自由电子激光的峰值亮度极高、波长覆盖范围宽、连续可调谐范围广、飞秒脉冲长度和极好的相干性等特性,被广泛应用于各学科的前沿研究。例如,运用各种成像方法及谱学技术给电子自旋

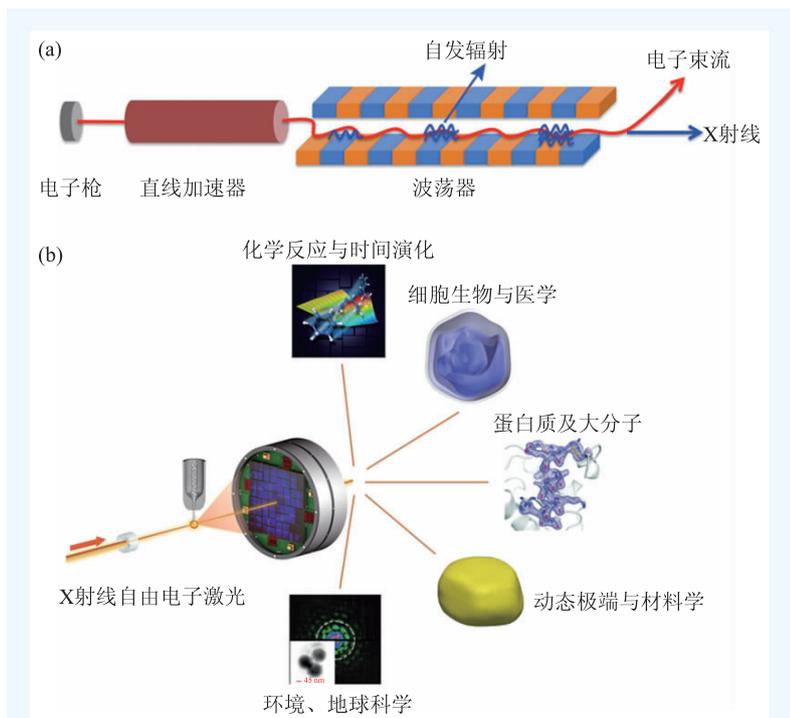


图1 X射线自由电子激光的原理及其应用 (a)X射线自由电子激光自放大自发辐射模式的原理示意图;(b)X射线自由电子激光在热点领域的研究应用简图(图(b)子图选用自参考文献[5—9],已获得修改再使用授权,版权属于The American Association for the Advancement of Science, 2012; The American Association for the Advancement of Science, 2013; Springer Nature, 2012; American Physical Society, 2015; American Physical Society, 2015)

态、化学键、化学动力学、催化化学、纳米材料微观结构、极端条件下材料性能研究、生物学大分子动态结构解析等热点问题(图 1(b))带来全新的突破。特别是借助自由电子激光的峰值功率、脉冲时间结构及同步的光学泵浦激光,可实现与时间演化、原子属性等瞬态、原子级别分辨率相关的研究。

基于自由电子激光的优异性能及其对基础学科发展的推动力和对科技创新的重大影响力,多个国家及组织积极投入 X 射线自由电子激光装置的建设。目前,建成并投入使用的 X 射线自由电子激光装置包括德国电子同步加速器实验室(Deutsches Elektronen-Synchrotron, DESY)所属的 FLASH 软 X 射线自由电子激光装置(Free-electron LASer in Hamburg, FLASH)^[10], 美国 SLAC 国家加速器实验室所属直线加速器相干光源(Linac Coherent Light Source, LCLS)^[11]、日本理化学研究所 SACL A 装置(SPring-8 Angstrom Compact free electron LASer, SACL A)^[12]、意大利 FERMI 软 X 射线自由电子激光装置(acronym for Free Electron laser Radiation for Multidisciplinary Investigations, FERMI)^[13]、欧洲 X 射线自由电子激光装置(European-XFEL)^[14]、韩国浦项自由电子激光装置(PAL-XFEL)^[15]。此外,瑞士自由电子激光装置(SwissFEL)^[16]正在调试阶段,美国 SLAC 国家加速器实验室所属的直线加速器相干光源二期(Linac Coherent Light Source II, LCLS-II)^[17]正在建设中。中国首个 X 射线自由电子激光装置,上海软 X 射线自由电子激光装置(Shanghai Soft X-ray Free Electron Laser, SXFEL)^[18]及束线站总体也正在紧张建设中,同时上海硬 X 射线自由电子激光装置(Shanghai High repetition rate XFEL aNd Extreme light facility, SHINE)^[19]项目已正式启动。各大装置分布图及简要参数见图 2。

1.2 相干衍射成像

新型光源的出现,能够极大地促进基础科学研究及工程应用的发展。“工欲善其事,必先利

其器”,与之相关的方法学研究布局需先行。结合同步辐射光源的研究现状与 X 射线自由电子激光的特性,相干衍射成像,作为一种无透镜成像方法学获得广大科学家的青睐,并成为当年推动美国 SLAC 国家加速器实验室直线加速器相干光源立项的主要科学问题。

在传统晶体学方法的基础上发展而来的相干衍射成像,理论分辨率仅受限于入射光波长及最大衍射角,可以实现非晶态样品的高分辨三维成像。该方法由 D. Sayer 在香农取样理论的基础上于 1952 年初步阐述^[20],于 1980 年左右提出^[21],并由加州大学洛杉矶分校 J. Miao 于 1999 年首次实现^[22]。不同于传统的 X 射线衍射技术,相干衍射成像采用相干光照射样品,探测器只能记录衍射强度而丢失相位信息,因此相干衍射成像技术存在经典的相位问题(Phase Problem)。借助于空间相干性优良、准直性好、通量高的第三代同步辐射光源,可获得非晶态样品的远场衍射图样,结合过度取样理论及相位恢复迭代算法,可重建样品内部的电子密度与外形信息。图像的空间分辨率高、衬度高,可实现原位、无损下的定量研究,已经在材料学、纳米技术与生物学中获得应用。

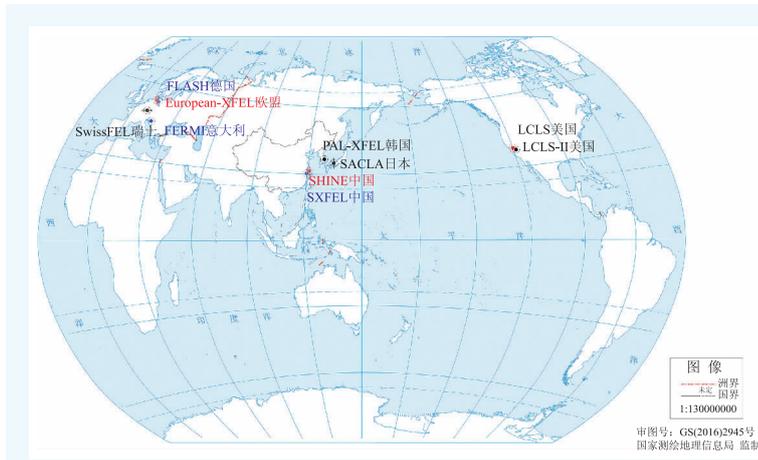
随着前瞻性研究及前沿技术的发展,研究者对成像的应用提出了更高的要求。成像的发展趋势已经从二维过渡到三维,形貌延伸到功能,静态升级到动态,单尺度拓展到多尺度,单模式映射到多模态的全新阶段。但是对于非生物类样品,基于同步辐射光源、高次谐波及光学激光的相干衍射成像,由于光通量、衍射效率、噪音及探测器限制,其分辨率难以突破 1 nm ^[23-25];生物类样品则因为受辐射损伤限制,其理论最高分辨率约为 10 nm ^[26]。在分辨率受技术瓶颈的限制下,功能性及后续的多模态跨尺度应用无法得到保障。因此, X 射线自由电子激光的高亮度、短脉冲及全相干的性质促使相干衍射成像的研究进入全新的阶段,不仅可以有效缓解辐照损伤问题并提升图像的空间分辨率,还可以将此成像方法的应用拓展至飞秒时间分辨领域,使得众多无法

采用成像手段研究的问题成为可能。

1.3 在材料学中的研究与应用

辐射对各类研究对象带来的损伤效应不可忽视, 俄歇电子、荧光等带来的光致发射及光致电离效应对样品内部电子结构造成破坏, 这些内

部吸收与发射过程的衰减周期一般在数十飞秒至上百飞秒^[27-29]。如何减弱甚至防止辐射损伤效应的发生, 成为各类光源特别是X射线自由电子激光研究领域的重点。2000年Janos Hajdu等人采用分子动力学模拟了溶菌酶在不同XFEL脉冲长度下的结构变化, 结果表明: 当XFEL脉冲为2 fs时, 溶菌酶分子结构保持不变; 而当脉冲长度超过10 fs时, 分子结构将发生较大变化^[30]。直到2006年, Henry Chapman及其团队借助德国DESY的FLASH装置, 成功实现了氮化硅自组装纳米结构的相干衍射成像实验, 在25 fs的脉冲长度及 $4 \times 10^{13} \text{ Wcm}^{-2}$ 强度下, 获取了无损伤、真实、完整的衍射信号^[31]。图3(a)表示样品在损伤前高达60000 K温度下的衍射图样, 经过相位恢复后的实空间图像分辨率达32 nm, 通过与实验前同一样品的扫描电子显



装置名称	机构	国家	光束线	X射线能量/eV	重复频率/Hz	脉冲长度/FWHM, fs	加速器能量/GeV	出光年份
FLASH	德国电子同步加速器实验室 (DESY)	德国	FLASH1	24-295	10	<30-200	0.35-1.25	2005
			FLASH2	14-310	$4 \times 10^3 \sim 10^6$	<10-200	0.4-1.25	2014
LCLS	SLAC 国家加速器实验室 (SLAC)	美国	硬X射线	2000-12800	120	50-250	6.7-16.9	2009
			软X射线	280-2000		70-400	2.5-6.7	
			短脉冲硬X射线	2000-12800		5.0-10	6.7-16.9	
			短脉冲软X射线	280-2000		6.7-20	2.5-6.7	
SACLA	理化学研究所(RIKEN)	日本	光束线3/光束线2	4000-20000	60	2-10	5.1-8.5	2011
FERMI	Elettra 同步辐射光源实验室 (Elettra Sincrotrone Trieste)	意大利	FEL-1	12-62	10	30-100	1-1.5	2011
			FEL-2	86.1-310		40-100	-	
PAL-XFEL	浦项加速器实验室 (PAL)	韩国	硬X射线光束线	2070-20700	60	5-100	4-10	2016
			软X射线光束线	275-1240			3.15	
SwissFEL	保罗谢尔研究所 (PSI)	瑞士	Aramis 光束线	1770-12400	100	0.2-20	2.1-5.8	2016
			Athos 光束线	248-1907				
European-XFEL	德国电子同步加速器实验室 (DESY)	德国	SASE1/SASE2	1990-30800	2.7×10^4	1-300	8.5/12.0/14.0/17.5	2017
			SASE3	240-4590				
SXFEL	中国科学院上海应用物理研究所 (SINAP)	中国	FEL1	124-620	50	30-1000	1.0-1.6	2017
			FEL2	400-1000				
LCLS-II	SLAC 国家加速器实验室 (SLAC)	美国	CuRF+HXU	1000-25000	120	1-500	15	2019
			SCRf+SXU	200-1300	10^6		4	
			SCRf+HXU	1000-5000			8	
			LCLS-II-HE	4000-13000			-	
SHINE	张江实验室 (Zhangjiang Lab)	中国	FEL-1	3000-15000	10^6	3-600	8	2024
			FEL-2	400-3000				
			FEL-3	10000-25000				

图2 世界范围内X射线自由电子激光装置的分布图及简要参数(蓝色: 软X射线自由电子激光装置; 黑色: 常规硬X射线自由电子激光装置; 红色: 低温超导高重复型硬X射线自由电子激光装置; 上述参数均来自各装置官方网站或最新会议报告)

显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 图像比较, 无明显结构变化及损伤。充分说明了在脉冲足够短的前提下, 可以在样品损伤前获得真实的衍射信号, 这就是著名的“Diffraction-before-Destruction”概念。这一概念的验证, 从实验上奠定了基于X射线自由电子激光 CDI 实验的可行性。

随后, 借助于不同的X射线自由电子激光装置, 研究者分别在时间分辨相干衍射成像、时间飞行质谱—成像联合应用、晶体形貌分析及三维成像新方法探索等几个方面取得了突破。图 3(b, c, i) 表示采用泵浦—探测 (pump—probe) 技术下的自组装纳米结构及金颗粒在泵浦激光激发下, 与探测的X射线自由电子激光在不同延迟时间 (delay-time) 下的动态反应, 分别揭示了自组装金纳米颗粒发生明显结构破坏的时间尺度与颗粒融化状态及颗粒内部应力的动态变化过程^[6, 33, 34]。

气溶胶颗粒是毒理学及大气污染防治研究的重要对象, 实现原位、海量单颗粒的空间形貌、化学组成的分析是一大难题。N. Loh 及 LCLS 科学家们在运用X射线自由电子激光相干衍射成像 (XFEL-CDI) 技术实现形貌及单颗粒分析的基础上, 联合采用时间飞行质谱仪 (Time-of-Flight Mass Spectroscopy), 有效地实现了原位下自由飞行状态气溶胶颗粒的形貌及化学组成分析^[7], 如图 3(d) 所示。因为X射线自由电子激光超强脉冲会对样品造成破坏, 无法采用类似同步辐射纳米 CT 成像方法中旋转样品实现三维成像研究。基于XFEL的三维成像, 一般采用可复制 (Re-producible, Identical)、等同 (Homogeneous) 结构的纳米颗粒或病毒颗粒, 收集千万张, 甚至更多空间取向随机分布的二维衍射图样, 通过空间取向定位组装为三维衍射图样, 最后通过相位恢复迭代算法恢复出颗粒的三维图

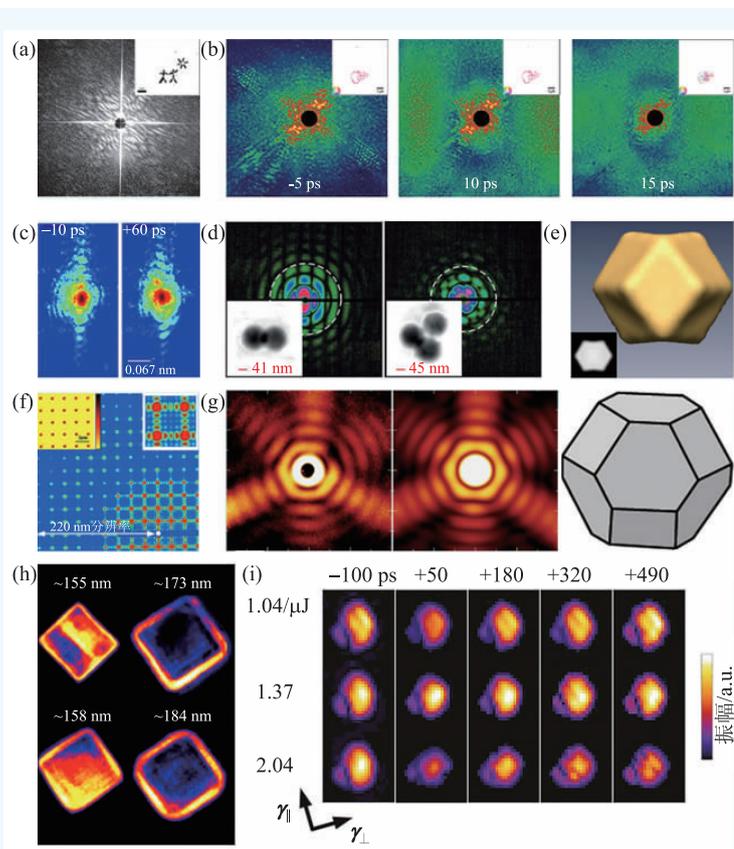


图3 X射线自由电子激光相干衍射成像在材料学中的应用(子图选用自参考文献[6, 7, 31—36], 已获得修改再使用授权, 版权属于 Springer Nature, 2006; Springer Nature, 2008; The American Association for the Advancement of Science, 2013; Springer Nature, 2012; Springer Nature, 2014; American Physical Society, 2010; Springer Nature, 2015; American Chemical Society, 2013; National Academy of Sciences, 2015)

像。J. Miao 与 H. Jiang 等利用晶体的空间点群及对称性, 将一个方向下的衍射图样通过对称操作, 获取分辨率高达 5.5 nm 的金纳米颗粒三维图像, 如图 3(e) 所示, 为基于XFEL的三维成像研究提供了新思路^[36]。图 3(f), (g), (h) 分别是对二维周期性结构、自由状态下的多面体纳米颗粒及立方体金银合金颗粒的相干衍射成像研究^[32, 35, 37]。以上成果表明, 对纳米颗粒形貌及内部电子密度分布, 自由状态下结晶状态的探索是相干衍射成像的一大目标。

1.4 在生物学中的研究与应用

对生物学研究对象进行结构与功能的探索, 如细胞、细菌、病毒及细胞器、生物学大分子颗

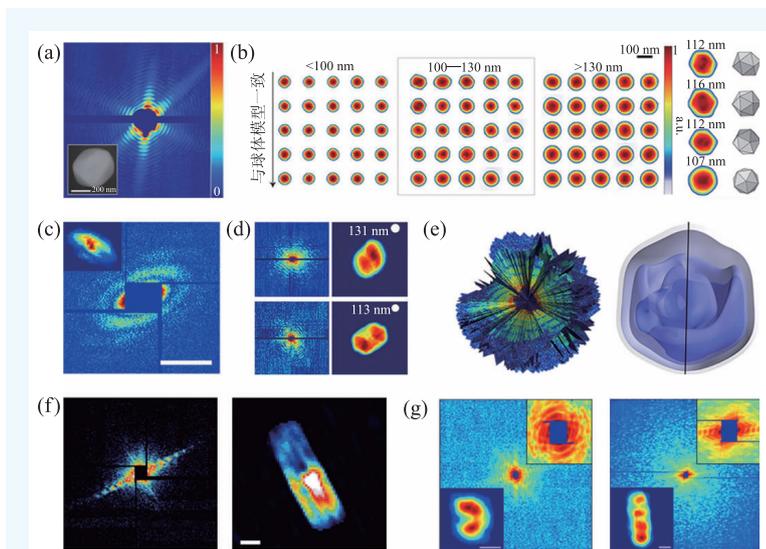


图4 X射线自由电子激光相干衍射成像在生物学中的应用(子图分别选自参考文献[8, 38—43], 已获得修改再使用授权, 版权属于 Springer Nature, 2011; Springer Nature, 2014; Springer Nature, 2014; Springer Nature, 2015; American Physical Society, 2015; Springer Nature, 2014; Springer Nature, 2016)

粒、蛋白质晶体及GPCR膜蛋白等是生物体结构与功能, 重大疾病与药物研发中重要的环节。不同于气溶胶、纳米颗粒及自组装纳米结构, 生物研究对象往往由C、H、O、N、P等低原子序数元素组成, 相干散射截面相对重原子序数的Au、Ag等较小, 衍射效率低。此外, 此类软材料、有机分子及生物材料耐受辐射损伤的能力较弱, 易发生辐射损伤, 从而限制了成像的分辨率与应用范围。因此, XFEL-CDI相较于采用同步辐射光源的相干衍射成像(Synchrotron-based CDI)更具有优势。2011年乌普萨拉大学的Janos Hajdu等人借助LCLS的X射线自由电子激光成功对米米病毒(Mimivirus)进行了相干衍射成像研究^[38], 如图4(a)所示。米米病毒是目前已知的最大尺寸的病毒, 病毒衣壳为直径约450 nm的伪二十面体, 连带外围纤毛, 颗粒大小约750 nm, 成像分辨率为32 nm。该研究克服了XFEL实验上的技术难题, 并在中心低频数据丢失较多的情况下成功进行了相位恢复, 为后续的研究带来了可借鉴的经验。

细胞的群体行为与单个细胞的个体行为研究是细胞生物学研究的一大热点。借助于XFEL脉冲特性, 单细胞高通量成像成为现实。2014年

Janos Hajdu等人采用那不勒斯盐生硫杆菌(*Halothiobacillus neapolitanus*)中具有多面体外形的羧酶体(Carboxysomes)作为测试样品, 获得了大量分辨率约为18.1 nm的二维图像^[39], 如图4(b)所示。在XFEL-CDI快速发展并受到重视的同时, 与Synchrotron-based CDI的联合研究, 也成为了研究者关注的重点。2014年C. Song研究组借助日本RIKEN Spring-8中心的SACLA与Spring-8两大装置, 实现了RNA颗粒的相干衍射成像研究, 如图4(c)所示。采用同步辐射探究RNA颗粒的三维结构, 并利用XFEL获取更高分辨率的二维图像^[40], 通过联合解析三维图像与高分辨二维图像, 使得研究区域的结构信息更为丰富。

活体细胞成像是生物学成像研究领域另一个受关注的热点问题。在XFEL-CDI研究中, 目前有两种方法实现活细胞成像: (1)采用喷射装置, 将细胞/细菌/病毒颗粒连同少量缓冲液喷射入XFEL飞秒脉冲传播的路径, 在颗粒失活前进行衍射成像, 获得真实存活条件下的颗粒结构; (2)采用双层氮化硅薄膜窗口, 制作“三明治夹层”结构, 将细胞/细菌/病毒颗粒连同少量缓冲液滴入夹层密封, 置于真空实验环境进行成像。图4(d)采用气态喷射装置(Aerosol Dynamic Lens Stacks)获得蓝藻(Cyanobacteria)的单颗粒衍射图样, 重建图像分辨率为33—46 nm^[41]。图4(f)采用双层氮化硅薄膜窗的方法封存乳酸细杆菌(*Microbacterium Lacticum*)^[42], 并采用荧光显微镜验证细胞活性, 成像分辨率约为28 nm。上述两种方法的尝试, 使得单细胞及群体细胞结构与行为的大数据研究成为现实, 使成像逐渐由形态、形貌向功能应用转变。此外, Janos Hajdu与Henry Chapman成功实现米米病毒的三维成像, 分辨率约125 nm^[8], 如图4(e)所示。与此同时, 为改善生物样品衍射效率低, 信噪比较差的情况, H. Jiang利用纳米金颗粒标定金黄色葡萄球菌(*Staphylo-*

coccus aureus), 使得纳米金颗粒与细菌信号共载, 有效提升了衍射图样的信噪比, 从而更有利于细菌图像的重建与分辨率的提升。如图4(g)分别表示无标定、有标定情形下衍射图样与对应实空间图像的信噪比^[43]。

2 基于X射线自由电子激光的单颗粒成像研究

从上述基于X射线自由电子激光的相干衍射成像在材料学及生物学的应用中可以看出, X射线成像的空间分辨率目前在数十纳米。然而, 理论上分辨率仅受限于入射的X射线波长, 可达原子级分辨率。理论与实验分辨率的巨大差别, 使得相干衍射成像在目前的研究应用中具有一定的局限性。与之相比, 冷冻电镜技术(Cryo-EM)的分辨率已突破3 Å并广泛应用于生物学大分子、蛋白质晶体结构解析等研究中, 推动了结构生物学、医药学等学科的发展^[44, 45], 从而获得了2017年诺贝尔化学奖^[46]。纵观冷冻电镜的发展历史, 我们可以发现它也经历了一定时期的技术积累。从这种科学与工程发展的规律中可以看出, 基于X射线自由电子激光的成像研究机遇与挑战并存。

2.1 单颗粒成像研究背景、目标及研究规划

为改变相干衍射成像领域的研究现状, 推动技术革命, 突破技术与工程的双重阻碍, 美国SLAC国家加速器实验室LCLS于2014年3月举办了针对性的研讨会, 聚焦X射线自由电子激光单颗粒成像技术^[47]。单颗粒成像的主要研究对象包括纳米颗粒、团簇、生物细胞/细菌/病毒、生物学大分子及蛋白质晶体颗粒等。实际上, XFEL-CDI技术在材料学及生物学中的应用大多属于单颗粒成像范畴。基于X射线自由电子激光的单颗粒成像是在相干衍射成像的基础上进一步凝练、发展而来的, 力求实现单颗粒的三维高分辨成像。在LCLS主导成立单颗粒成像合作小组

(Single Particle Imaging Initiative, SPI Initiative)之前, 单颗粒研究主要由世界各地的研究小组单独进行。成立SPI合作小组后, 所有实验数据与技术进展共享, 凝聚最有力的智慧与资源, 共同推进单颗粒成像技术的进步。截至本文撰写之时, 已有美国SLAC国家加速器实验室(SLAC)、斯坦福大学(Stanford Univ.)、瑞典乌普萨拉大学(Uppsala Univ.)、德国自由电子激光科学研究中心(CFEL)、德国电子同步加速器实验室(DESY)、欧洲X射线自由电子激光(European-XFEL)、汉堡大学(Univ. of Hamburg)、威斯康星大学密尔沃基分校(UWM)、康奈尔大学(Cornell Univ.)、加州大学伯克利分校(UC Berkeley)、劳伦斯伯克利国家实验室(LBNL)、劳伦斯利弗莫尔国家实验室(LLNL)、布鲁克海文国家实验室(BNL)、阿贡国家实验室(ANL)、亚利桑那州立大学(ASU)、澳大利亚拉筹伯大学(La Trobe Univ.)、新加坡国立大学(NUS)、韩国浦项科技大学(POSTECH)、韩国光州科技大学(GIST)、北京计算科学研究中心(CSRC)及上海科技大学(ShanghaiTech)等机构数百名科研人员参与其中, 较成立之初的21个国际研究机构范围更广。

SPI国际合作小组的主要目标是突破科学技术瓶颈与工程技术限制, 以水稻矮缩病毒(Rice Dwarf Virus, RDV)、大肠杆菌噬菌体PR772(Coli phage PR772)及MS2噬菌体病毒等颗粒为对象, 实现可复制、等同类样品的三维原子级分辨率成像, 国际合作小组设定的分辨率目标为5 Å。

SPI国际合作小组的主要研究规划、研究路线^[47]可简单归纳为以下7点:

- (1) 辐射损伤问题;
- (2) 完备的数值模拟系统;
- (3) 实验样品及制备问题;
- (4) 样品输运问题;
- (5) 实验中的噪音及杂乱散射问题;
- (6) 光束线与实验站的优化、光束诊断与表征;
- (7) 大数据收集、处理及相位恢复算法的发展。

SPI国际合作小组拟通过不同机构参与人员的协同努力, 解决以上核心问题, 最终达到5 Å

分辨率,并为后续动态构向变化、时间分辨成像及单分子成像研究奠定坚实的技术基础与实验经验。

2.2 世界范围的研究布局

美国 SLAC 国家加速器实验室所属的直线加速器相干光源(LCLS)作为世界上真实意义上的第一个 X 射线自由电子激光装置^[48],执行了绝大部分单颗粒成像实验,是基于 X 射线自由电子激光单颗粒成像研究的最重要机构。目前, LCLS 所属的 7 条实验站中相干 X 射线成像实验站(Coherent X-ray Imaging, CXI)和原子分子光学实验站(Atomic, Molecular & Optical Science, AMO)是执行 SPI 实验的场所。在 LCLS-II,低温超导加速器技术下的新型高重频 X 射线自由电子激光装置的建设方案中,韧 X 射线实验站(Tender X-ray Instrument, TXI)概念设计及初步设计立足 SPI 技术的推进及升级。

欧洲 X 射线自由电子激光装置(European-XFEL)作为世界上第一个面向用户开放的新型高重频装置,其单颗粒/串行晶体学实验站(Single Particles, Clusters, and Biomolecules & Serial Femtosecond Crystallography, SPB/SFX)设计与建设的主要任务之一便是单颗粒成像。因此,高重频的 SPB/SFX 将可能引领单颗粒成像新的研究路径与发展方向。欧洲 X 射线自由电子激光装置已于 2017 年 09 月向全世界用户开放,目前实验站提供的光子能量为固定值,于 2018 年初进行了初步的单颗粒成像实验,验证实验站硬件及软件系统的稳定性、可行性。

日本 SACLA 自由电子激光装置作为全世界第二个真实意义上的 X 射线自由电子激光装置^[49],自 2011 年面向用户开放以来, BL3/BL2 执行过多次相干衍射成像/单颗粒成像实验,有专用于 SPI 及 SFX 的实验腔体系统,如 MAXIC。韩国浦项自由电子激光(PAL-XFEL)的纳米晶体学与成像实验站(Nano Crystallography and Imaging, NCI)同样属于专门针对单颗粒成像及串行晶体学研究而

建设的实验站,目前已经向全世界用户开放,可执行单颗粒成像实验与串行晶体学实验。

在创新驱动发展战略的引领下,聚焦具有紧迫战略需求的重大领域和有望引领未来发展的战略制高点,以重大科技任务攻关和大型科技基础设施建设为主线,实现重大基础科学突破和关键核心技术发展,建设跨学科、综合性、多功能的国家实验室及打造具有全球影响力的科技创新中心。上海软 X 射线自由电子激光装置及硬 X 射线自由电子激光装置项目相继启动。上海软 X 射线自由电子激光装置中的相干衍射生物成像实验站便是采用相干衍射成像技术,对活细胞及单颗粒进行成像的多功能实验站,初步计划于 2019 年开始联调联试并逐步向全球用户开放。上海硬 X 射线自由电子激光装置第一批的 10 条实验站中,单分子/单颗粒相干衍射实验站(Coherent Diffraction End-station for Single Molecules and Particles, CDS)是直接对接欧洲 X 射线自由电子激光装置 SPB/SFX 实验站及美国 SLAC 国家加速器实验室 LCLS-II TXI 实验站的单颗粒成像多功能实验站,实验站设计分辨率优于 5 Å。科学目标是采用相干衍射成像技术及相应的硬 X 射线成像与谱学技术对单颗粒、单分子进行衍射与成像研究,并最终实现单颗粒体系的实时动态、原子分辨衍射成像。主要实验方法有相干衍射成像(Coherent Diffraction Imaging)、串行晶体学(Serial Femtosecond X-ray Crystallography)、X 射线互相关分析(X-ray Correlation Analysis)、波动 X 射线散射(Fluctuation X-ray Scattering)、泵浦探测(Pump-probe)、飞行全息成像(In-flight Holography)、荧光谱—飞行时间质谱—衍射成像联合研究(Fluorescence—Time-of-Flight Mass Spectroscopy—Diffraction Imaging)。初步预计 2025 年进行加速器—波荡器—光束线—实验站—辅助系统联调联试。

2.3 单颗粒成像研究现状

自 2014 年 12 月 SPI 国际合作小组成立至今,分别在 LCLS 装置中的 CXI 及 AMO 实验站执行了

多次实验，获取了大量原始数据。其中，在CXI实验站常用光子能量为5 keV，7 keV及10 keV；在AMO实验站常用光子能量为1200—1700 eV。实验示意简图及实验流程如图5所示，步骤包括：样品准备完成后进行各项表征；然后转移入样品运输装置；喷射入XFEL脉冲路径；产生相干衍射；图样由下游的像素面探测器获取；最后进行数据处理与相位恢复，获得高分辨的实空间图像。

SPI国际合作小组在过去3年的探索中，以水稻矮缩病毒、大肠杆菌噬菌体PR772及MS2噬菌体病毒等颗粒为测试样本，用以突破分辨率限制的研究。目前已经采用软X射线自由电子激光获取空间分辨率约10 nm的水稻矮缩病毒和大肠杆菌噬菌体PR772的三维结构。此外，尽管采用硬X射线自由电子激光获得了衍射信号达到6 Å的衍射图样，但由于用于三维重建的数据量需求巨大，所以暂时无法通过相位恢复重建出分辨率相当的实空间图像。目前，SPI成员分别采用流形嵌入法及X射线互相关分析法实现了PR772病毒颗粒9 nm分辨率的三维图像与动态构象变化(图6(a—c))^[50]，以及多层迭代相位恢复算法(Multitiered Iterative Phasing, MTIP)下的RDV病毒(图6(d))与PR772病毒颗粒(图6(e))的三维结构研究^[51]。此外，SPI小组采用国际合作组形式在*Scientific Data*杂志上发表两篇有关实验细节及实验数据描述的文章^[52, 53]，分别描述了采用CXI实验站硬X射线自由电子激光收集分辨率达6 Å的RDV病毒(图6(f))，采用AMO实验站软X射线自由电子激光收集分辨率可达10 nm的PR772病毒(图6(g))的主要实验细节。

除去上述已发表的可见成果，SPI国际合作小组从X射线的产生、传输、与物质相互作用、收集数据这些环节出发，从技术及工程设备方面对以下问题进行了研究：

- (1) X射线补偿镜(Offset Mirror)与平面镜对光源的影响；
- (2) KB聚焦镜的影响；
- (3) 实验腔体中光阑的影响；
- (4) 不同的样品运输装置对衍射背底的影响；
- (5) 不同X射线光子能量对实验的影响；

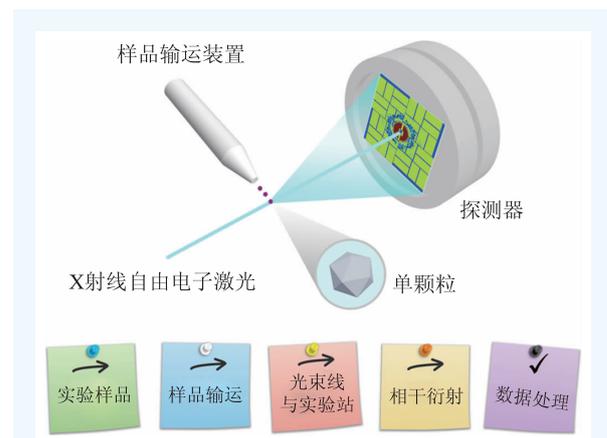


图5 单颗粒成像实验流程示意图

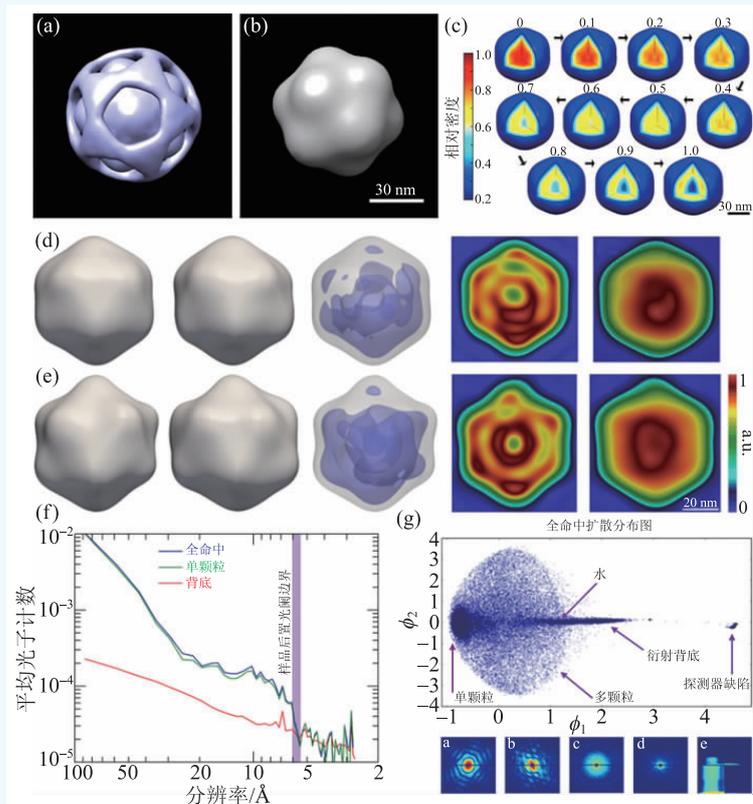


图6 SPI国际合作小组已取得的研究进展(子图分别选自参考文献[50—53]，已获得修改再使用授权，版权属于Springer Nature, 2017; American Physical Society, 2017; Springer Nature, 2016; Springer Nature, 2017)

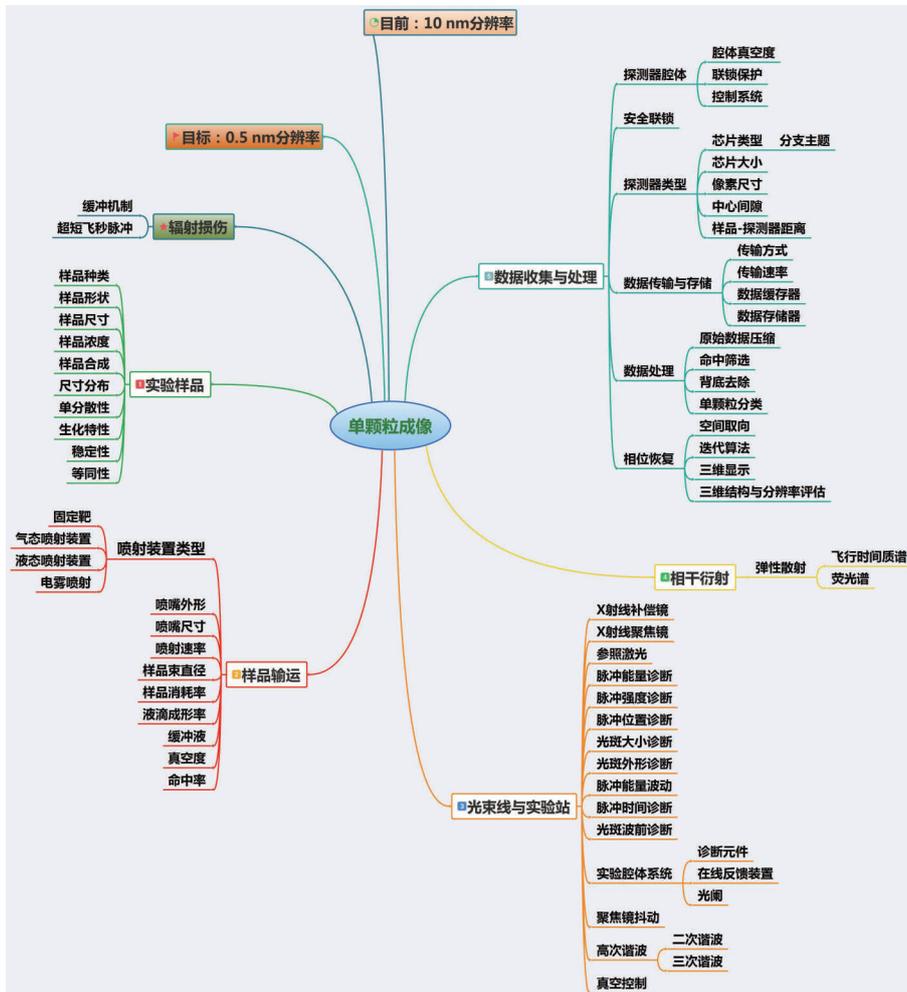


图7 单颗粒成像研究面临的技术与工程挑战思维导图

我们根据参与SPI合作研究的现状并综合相关实验经验,拟提出如图7所示的单颗粒研究思维导图。为实现预定的分辨率,辐射损伤问题是首先需要解决的瓶颈。当分辨率进一步突破至1 nm时,目前采用的数十飞秒长度的XFEL脉冲将不再适用,会带来严重的辐射损伤。但是,当使用低于10 fs长度的脉冲时,单脉冲光子数会大幅下降,会使衍射数据具有更低的信噪比。所以,辐射损伤问题将会是SPI继续发展的一个技术难题。

此外,实验样品的选择、合成与表征、样品运输的命中率将会决定实验的有效数据量,因此,实验中需根据现场反馈不断地进行参数优化。对于光束线与实验站,更多地关注在设备与光学元件的设计与优化上。而大数据的客观存在,特别是高重频的European-XFEL、LCLS-II及SHINE装置,也将会给数据的收集与处理带来极大挑战。如何从收集到最终的处理环节实现资源的最佳配置,利用机器学习和人工智能解放人力,实现数据的半自动甚至全自动处理将会是SPI推广至各学科研究应用的关键。以上所有因素构成了单颗粒面临的科学技术与工程设备的挑战。

- (6)不同探测器的响应与噪音;
- (7)样品后方光阑对噪音的改进;
- (8)数值模拟计算机软件的开发;
- (9)单颗粒筛选算法的开发;
- (10)机器学习及人工智能数据处理系统研发。

在今后的单颗粒成像研究中,SPI将向1 nm分辨率发起冲击,获取足够多的数据,以重建出实空间分辨率为1 nm的图像。从10 nm到1 nm的突破,将会又是一个对于基础技术的推动具有重大意义的跨越。

2.4 单颗粒成像面临的技术与工程挑战

纵观单颗粒成像的五大流程(图5),不难发现,SPI研究的规划路径与这些流程是一致的。

自1999年相干衍射成像首次实验成功以来,该实验技术经历了在材料学与生物学中的快速研究阶段。随后,布拉格相干衍射成像(Bragg

3 总结与展望

自1999年相干衍射成像首次实验成功以来,该实验技术经历了在材料学与生物学中的快速研究阶段。随后,布拉格相干衍射成像(Bragg

Coherent Diffraction Imaging, BCDI)、扫描相干衍射成像(Ptychography)、菲涅尔相干衍射成像(Fresnel Coherent Diffraction Imaging, FCDI)、反射相干衍射成像(Reflective Coherent Diffraction Imaging, RCDI)等快速发展,并借助光学激光、高次谐波、第三代同步辐射光源产生了多种概念。随着光源技术的进一步发展,衍射极限环(Diffraction Limited Storage Ring, DLSR)与X射线自由电子激光的出现给相干衍射成像技术带来了更大的机遇。为加速技术上的突破,美国SLAC国家加速器实验室直线加速器相干光源决定开展国际合作,成立SPI国际合作研究小组,从实验样品、样品运输、光束线与实验站、样品与物质的相互作用、数据收集与处理五大方面入手,解决技术与工程上的难题,实现单颗粒的原子级成像分辨率。经过约3年的努力,病毒颗粒的三维成像分辨已经由最初的125 nm突破至目前的10 nm,未来目标是获取可重构出空间分辨率为1 nm的衍射数据。从过去的研究轨迹及成果我们不难看出,这一开放性的合作,探索与技术革新进展巨大。随着European-XFEL的开放,

LCLS-II及SHINE的建设,SPI将逐渐向动态构象的变化,时间分辨演化、动态影像及单分子成像等更具挑战的方向发展。在信息化狂潮的当今世界,SPI研究将进一步秉持开放与包容的科学精神,开放软件包,算法与原始数据,拓展大数据研究,借助机器学习与人工智能,解放人力,推动技术的全自动化,使得更多的科研工作者参与到技术革新的研究中来,并最终将其应用到科学技术的各个领域。

致谢 感谢美国SLAC国家加速器实验室直线加速器相干光源(LCLS)硬X射线研究部主任Sébastien Boutet及单颗粒成像国际合作研究小组首席科学家Andrew Aquila的建议和帮助。感谢国家重大科技基础设施建设项目(活细胞结构与功能成像等线站工程,硬X射线自由电子激光装置)全体成员的协助。感谢美国能源部基础能源科学处,斯坦福大学,美国SLAC国家加速器实验室直线加速器相干光源科学研究与发展部的支持。

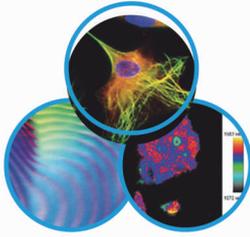
参考文献

- [1] McNeil B W J, Thompson N R. *Nature Photonics*, 2010, 4(12): 814
- [2] Huang Z, Kim K J. *Physical Review Special Topics-Accelerators and Beams*, 2007, 10(3): 034801
- [3] Xiang D, Stupakov G. *Physical Review Special Topics-Accelerators and Beams*, 2009, 12(3): 030702
- [4] Amann J, Berg W, Blank V *et al.* *Nature Photonics*, 2012, 6: 693
- [5] Boutet S, Lomb L, Williams G J *et al.* *Science*, 2012, 337(6092): 362
- [6] Clark J N, Beitra L, Xiong G *et al.* *Science*, 2013, 341(6141): 56
- [7] Loh N D, Hampton C Y, Martin A V *et al.* *Nature*, 2012, 486: 513
- [8] Ekeberg T, Svenda M, Abergel C *et al.* *Physical Review Letters*, 2015, 114(9): 098102
- [9] Miniti M P, Budarz J M, Kirrander A *et al.* *Physical Review Letters*, 2015, 114(25): 255501
- [10] Free-electron laser FLASH. <https://flash.desy.de> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [11] Linac Coherent Light Source. <https://lcls.slac.stanford.edu> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [12] SACLA XFEL. <http://xfel.riken.jp/eng/> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [13] FERMI lightsources. <https://www.elettra.trieste.it/lightsources/fermi.html> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [14] European XFEL. <https://www.xfel.eu> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [15] Pohang Accelerator Laboratory. <http://pal.postech.ac.kr/paleng/> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [16] SwissFEL. <https://www.psi.ch/swissfel/> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [17] LCLS-II. <https://lcls.slac.stanford.edu/lcls-ii> (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [18] Zhao Z, Wang D, Gu Q *et al.* *Applied Sciences*, 2017, 7(6): 607
- [19] Zhu Z, Zhao Z, Wang D *et al.* SCLF: AN 8-GEV CW SCRF LINAC-BASED X-RAY FEL FACILITY IN SHANGHAI. in *Proceedings of FEL2017*, 2017
- [20] Sayre D. *Acta. Crystallography*, 1952, 5: 843
- [21] Sayre D. in *Imaging Processes and Coherence in Physics*, Berlin: Springer, 1980



a HÜBNER Group company
cobolt.se

See things clearer with Cobolt



High Performance Lasers

- Single frequency
- UV-VIS-MIR
- CW & Q-switched
- Unprecedented reliability with HTCure™




DynaSense
北京鼎信优威光子科技有限公司
地址: 北京市西城区太平桥6号富力摩根中心B915室 电话: 010-8350 3853
网址: www.dyna-sense.com 邮件: info@dyna-sense.com



扫描官方微信, 获取更多信息

- [22] Miao J, Charalambous P, Kirz J *et al.* *Nature*, 1999, 400(6742):342
- [23] Chapman H N, Nugent K A. *Nature Photonics*, 2010, 4: 833
- [24] Miao J, Ishikawa T, Robinson I K *et al.* *Science*, 2015, 348(6234): 530
- [25] Miao J, Sandberg R L, Song C. *IEEE Xplore: IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2012, 18(1): 399
- [26] Howells M R, Beetz T, Chapman H N *et al.* *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2009, 170: 4
- [27] Garman E F, Weik M. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2013, 20(1): 1
- [28] Spence J C H. *Structural Dynamics*, 2017, 4(4): 044027
- [29] Young L, Kanter E P, Krässig B *et al.* *Nature*, 2010, 466: 56
- [30] Neutze R, Wouts R, Spoel D *et al.* *Nature*, 2000, 406: 752
- [31] Chapman H N, Barty A, Bogan M J *et al.* *Nature Physics*, 2006, 2(12): 839
- [32] Barke I, Hartmann H, Rupp D *et al.* *Nature Communications*, 2015, 6: 6187
- [33] Barty A, Boutet S, Bogan M J *et al.* *Nature Photonics*, 2008, 2(7): 415
- [34] Clark J N, Beitra L, Xiong G *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(24): 7444
- [35] Takahashi Y, Suzuki A, Zettsu N *et al.* *Nano Letters*, 2013, 13(12): 6028
- [36] Xu R, Jiang H, Song C *et al.* *Nature Communications*, 2014, 5: 4061
- [37] Mancuso A P, Schropp A, Reime B *et al.* *Physical Review Letters*, 2009, 102(3): 035502
- [38] Seibert M M, Ekeberg T, Maia F R N C *et al.* *Nature*, 2011, 470(7332): 78
- [39] Hantke M F, Hasse D, Maia F R N C *et al.* *Nature Photonics*, 2014, 8: 943
- [40] Gallagher-Jones M, Bessho Y, Kim S *et al.* *Nature Communications*, 2014, 5: 3798
- [41] van der Schot G, Svenda M, Maia F R N C *et al.* *Nature Communications*, 2015, 6: 5704
- [42] Kimura T, Joti Y, Shibuya A *et al.* *Nature Communications*, 2014, 5: 3052
- [43] Fan J, Sun Z, Wang Y *et al.* *Scientific Reports*, 2016, 6: 34008
- [44] Elmlund D, Elmlund H. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84(1): 499
- [45] Fernandez-Leiro R, Scheres S H W. *Nature*, 2016, 537(7620): 339
- [46] The Nobel Prize in Chemistry 2017. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/ (Access Date: 30 Jan. 2018)
- [47] Aquila A, Barty A, Bostedt C *et al.* *Structure Dynamics*, 2015, 2(4): 041701
- [48] Emma P, Akre R, Arthur J *et al.* *Nature Photonics*, 2010, 4: 641
- [49] Ishikawa T, Aoyagi H, Asaka T *et al.* *Nature Photonics*, 2012, 6(8): 540
- [50] Hosseinizadeh A, Mashayekhi G, Copperman J *et al.* *Nature Methods*, 2017, 14: 877
- [51] Kurta R P, Donatelli J J, Yoon C H *et al.* *Physical Review Letters*, 2017, 119(15): 158102
- [52] Munke A, Andreasson J, Aquila A *et al.* *Scientific Data*, 2016, 3: 160064
- [53] Reddy H K N, Yoon C H, Aquila A *et al.* *Scientific Data*, 2017, 4: 170079