

# 同步辐射 X 射线衍射装置 及其在结构生物学中的应用\*

潘国强<sup>†</sup> 范荣 徐朝银 王峰

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室 合肥 230029)

**摘要** 同步辐射源产生的 X 射线具有高通量、高准直性及波长连续可调等优点,应用于结构生物学将可以解决很多常规实验装置无法解决的问题. 文章介绍了同步辐射 X 射线衍射装置及其在结构生物学中的应用,蛋白质晶体学中相位问题的有关进展,以及国家同步辐射实验室(NSRL)二期工程 X 射线衍射与散射光束线、实验站的实验装置及最新的研究进展.

**关键词** 同步辐射 X 射线,蛋白质晶体学

## SYNCHROTRON RADIATION X-RAY DIFFRACTION FACILITY AT NSRL AND ITS APPLICATIONS IN MACROMOLECULAR CRYSTALLOGRAPHY

PAN Guo-Qiang<sup>†</sup> FAN Rong XU Chao-Yin WANG Feng

(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science & Technology of China, Hefei 230029, China)

**Abstract** Many unsolvable problems can be tackled when synchrotron radiation X-rays are applied with their superior advantages of high flux, high collimation, good polarization and tunable wavelength. We present an overview of our synchrotron radiation X-ray diffraction facility and its application in macromolecular crystallography. We also review the progress in solving the phase problem of protein crystals. Finally, we give a short description of the construction of the X-ray diffraction and scattering beamline and station, as part of our laboratory's Phase II project.

**Key words** synchrotron X-ray diffraction, protein crystallography

## 1 引言

分子水平上的结构生物学是 20 世纪后半叶发展最迅速的一门学科,也是当今国际上最前沿、最活跃的研究领域之一. 蛋白质分子的三维结构对于了解各种生命活动和过程起着关键作用,它不但对于基础研究,而且对于医药产业的开发有着极为重大的直接关系.

直到现在,测定包括蛋白质在内的生物大分子结构的最常用、最基本的方法是单晶 X 射线衍射法. 而同步辐射光源,由于其特有的高亮度、高准直性和光谱分布宽等优点,极大地促进了结构生物学的发展,并已成为研究生物大分子晶体结构的主要

手段.

最早应用同步辐射光源进行 X 射线衍射的是汉堡的 DESY 同步辐射实验室 Rosenbaum<sup>[1]</sup>于 1971 年报道了同步辐射小角衍射对肌肉研究的结果. 与此同时,不少科学家对利用同步辐射进行蛋白质晶体学研究的可行性作了讨论<sup>[2,3]</sup>,并在斯坦福的 SPEAR 上进行了一些早期的尝试性实验.

近一二十年来,国际上特别是欧、美、日各发达国家同步辐射光源发展很快,第一、第二代同步辐射光源稳定运行并不断改进,第三代同步辐射光源已

\* 国家同步辐射实验室二期工程项目

2002-07-19 收到初稿 2002-09-04 修回

<sup>†</sup> 通讯联系人. E-mail: gqpan@ustc.edu.cn

经投入运行和使用,而不论第一代、第二代,还是第三代同步辐射光源,都建有多条专用于生物大分子晶体学结构研究的光束线和实验站,结构生物学已经成为同步辐射应用中最重要研究领域之一。

下面将简单介绍我国国家同步辐射实验室 X 射线衍射装置的工作原理,实验技术及其在结构生物学中的实用。

## 2 同步辐射 X 射线衍射装置的工作原理

### 2.1 X 射线单色器

同步辐射光源引出的 X 射线的波长(能量)是连续分布的,而晶体衍射实验需要的是波长单一的单色光,因此需要在光路上加置单色装置——X 射线单色器。X 射线单色器通过衍射晶体选择 X 射线的波长:当同步辐射 X 射线以某一入射角入射到单色器晶体上时,只有满足布拉格方程( $2d \cdot \sin\theta = \lambda$ )的那个波长的 X 射线才能发生衍射。这样就可以通过调节单色器晶体的入射角度来选取 X 射线的波长。常用单色器单晶材料有硅、锗、石英等。X 射线单色器的种类很多,目前同步辐射常用的晶体单色器有:三角弯晶(固定波长)、双晶单色器(波长连续可调)及 Channel - Cut 单色器等。

### 2.2 X 射线反射镜

为了进一步提高同步辐射光的强度,如同常规光源一样,可以通过使用曲面镜进行聚焦。与光路平行和垂直方向的聚焦条件分别需满足下述透镜方程:

$$\frac{2}{R} = \frac{\sin\theta}{p} + \frac{\sin\theta}{q} \quad (\text{平行于光路}), \quad (1)$$

$$\frac{2\sin\theta}{R} = \frac{1}{p} + \frac{1}{q} \quad (\text{垂直于光路}),$$

其中  $R$  是柱面镜的曲率半径,  $\theta$  是掠入射角,  $p$  和  $q$  分别是光源到镜子和镜子到聚焦点的距离。镜子表面一般都镀一层重金属膜,利用其全反射特性增加镜子的反射率。当 X 射线的掠入射角小于全反射临界角  $\theta_c$  时,就会发生全反射。表 1 给出了一些常用的 X 射线镜子材料全反射的临界角  $\theta_c$ 。

表 1 常用的 X 射线镜子材料在波长  $\lambda = 0.154\text{nm}$  时的临界角  $\theta_c$

材料	石英	玻璃	镍	金	铂
$\theta_c/\text{mrad}$	5.1	4.1	7.42	10	10.5

重金属材料的全反射临界角值  $\theta_c$  高,有利于提高接受效率。另一方面, X 射线反射镜还可以起到抑

制高次谐波的作用,因为对于给定的掠射角  $\theta$ ,只有大于临界波长  $\lambda = \theta \sqrt{\pi/r_0 N_e}$  ( $N_e$  是材料的电子密度)的 X 射线才能有效地反射。

## 3 同步辐射 X 射线生物大分子晶体衍射实验技术和方法

与常规的转靶 X 射线源相比,同步辐射源产生的 X 射线具有高通量、高准直性以及波长连续可调等优点,应用于结构生物学将可以解决很多常规实验装置无法解决的问题。

### 3.1 用同步辐射光源进行生物大分子晶体衍射数据采集

生物大分子晶体对 X 射线的衍射能力相对于小分子晶体来说要弱得多,同步辐射光源具有高通量,可以使得晶体衍射强度提高若干个数量级。几乎在所有的情况下,同步辐射光源可以显著地提高晶体的衍射分辨率,数据的精度明显优于常规光源所收集的数据。某些生物大分子如人感冒病毒等晶体的 X 射线衍射数据只有使用同步辐射光源才有可能探测到。

生物大分子晶体耐辐射的能力很差,同步辐射光源的高通量可缩短晶体被 X 射线照射的时间,在每个晶体“死亡”之前就可以获得大量的衍射数据。

很多生物大分子如病毒等晶体的晶胞边长可达几十 nm 乃至上百 nm,使得衍射斑点的空间分辨率相对减小,这时需加大晶体和探测器之间的距离才能解决衍射斑点的重叠问题,而这样又不可避免地会造成 X 射线在传播过程中衰减的问题。同步辐射光源的高准直性、单色性可以使得衍射斑点的发散度明显减小,只要选用合适的探测器便有可能收集巨大晶胞的晶体的衍射数据。

要收集一个样品的完整数据往往需要经过几十甚至上百次的曝光,而利用同步辐射的高准直性,可通过晶体的移动而使一个晶体的不同部位依次受到照射,从而充分利用一个(或少数)晶体收集全套数据,提高晶体的利用效率,减少由于晶体个性的差异对数据质量带来的不良影响。这对于那些晶体生长十分困难,只有一个(或少数)可用的晶体而耐辐照寿命又很短的生物大分子晶体是极为有利的。

### 3.2 同步辐射在解生物大分子晶体相位中的应用

生物大分子衍射晶体学的目的是要得到分子的三维结构,它可以通过电子密度分布函数来表征,电

子密度的分布和大小分别对应分子中原子的位置和种类。

晶体对 X 射线的衍射可以用结构因子来表示。结构因子以复数形式表达,包含结构振幅  $|F_{hkl}|$  和相角  $\alpha_{hkl}$  两部分:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp[i\alpha_{hkl}], \quad (2)$$

其中  $hkl$  表征其衍射方向。晶体的电子密度函数  $\rho(xyz)$  与结构因子存在以下关系:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[i\alpha_{hkl}] \cdot \exp[-i2\pi(hx + ky + lz)], \quad (3)$$

也就是说如果知道了全部结构因子数据,就可以计算出晶体的电子密度函数。但从 X 射线衍射实验所得的只是各个方向的衍射强度数据,即结构振幅  $|F_{hkl}|$ , 而将相角  $\alpha_{hkl}$  “丢失”了。如何得到各个衍射的相角是晶体结构测定中的一大难题,通常称为晶体学的相角问题。

有多种途径可以解决相角问题。例如把重原子引进到由轻原子组成的结构中,以重原子作为标识原子来获得相位信息,这种方法叫重原子同晶置换法。如果结构中已经存在较重的原子,可使用反常散射法。如果已有的一个类似的生物大分子的晶体结构已经解出,就可以用分子置换法。此外,还有差值帕特森法、差值傅里叶法及直接法等。

多波长反常散射方法(MAD)最早由 Karle<sup>[2,3]</sup>, Hendrickson<sup>[4]</sup> 提出。目前,利用同步辐射光源波长连续可调的性质,这种方法已经发展成为解决相位问题的最通用、最有效的手段,可以通过直接测量天然含有或人工引入重原子的生物大分子晶体而得到衍射相角。

在处理生物大分子晶体衍射时一般使用经典理论,即认为原子中电子的束缚能很小,近似于自由电子。通常情况下这种假设对大多数轻原子来说是正确的,但对于重原子,当入射 X 射线的波长靠近吸收边时就不正确了。这时由于原子中的电子具有束缚能,其散射能力与自由电子略有差异,因此散射因子就有一个修正量,这种效应称为反常散射。

多波长反常散射方法就是利用这种反常散射效应,通过收集不同波长的衍射数据并计算相应衍射强度的差异来解决衍射中的相角问题。

虽然 MAD 在解决蛋白质晶体的相位问题中取得了重大成果,但这种实验方法仍有一些缺陷。首先由于 MAD 方法至少需要取三个不同波长,因此要得到一套完整的数据就需要更多的同步辐射用光时

间;由于蛋白质晶体易受辐照损伤,曝光时间延长就意味着需要更多的样品;为了增加 MAD 的信噪比,对实验所用的三个波长也有严格要求(以保证反常散射效果最明显),因而对同步辐射储存环的稳定性、光束线上单色器的稳定性和分辨率都提出了更高的要求。

单波长反常散射方法(OAS)正好在这两个方面弥补了 MAD 方法的不足。该方法只收集一套反常散射的数据,利用直接法(一种数学统计处理方法)来解决衍射相角问题。我国范海福院士、郝全博士等<sup>[5-7]</sup>的工作对这一领域的发展作出了重大贡献。

三光束衍射实验方法<sup>[8]</sup>是近年来新发展起来的另一种解决相位问题的方法。该方法利用  $\Psi$  扫描技术,通过二次衍射及其相互间的相干作用来计算、解决相角问题。由于其在物理学、化学、材料科学及生物大分子的晶体结构分析中有着深远的应用前景,世界各国同步辐射实验室开始建立专用光束线、实验站。例如,法国欧共体同步辐射装置(ESRF)上配有专用光束线和实验站( $\Psi$  衍射仪)ID22 进行三光束衍射,成功地将三光束衍射测定相角这一技术应用到生物大分子晶体结构测定。

## 4 合肥同步辐射实验室 X 射线衍射和散射实验站简介

如上所述,同步辐射光源的众多优点使其在生命科学,特别是结构生物学中的应用越来越受到重视。在已发表的新晶体结构中,应用同步辐射光源所占的比例不断增加<sup>[9]</sup>。我国的同步辐射事业从 20 世纪 70 年代开始,中国科学技术大学于 90 年代初建成一台 0.8GeV 的低能量的第二代同步辐射光源,称为国家同步辐射实验室(NSRL),并于 1992 年正式向用户提供使用。北京同步辐射装置(BSRF)建立于 90 年代初,相对于 NSRL,它的储存环能量较高,为 2.2GeV,适于在硬 X 射线领域开展研究。目前一条专用于生物大分子晶体结构分析的光束线与实验站正在 BSRF 建造及调试。下面重点介绍国家同步辐射实验室 X 射线衍射装置。

国家同步辐射实验室多用途 X 射线衍射与散射实验站于 NSRL 二期工程期间开始建造,其光源引自超导扭摆器。实验站以同步辐射专用的多圆 X 射线衍射仪和成像板系统作为关键实验设备,进行生物大分子晶体结构分析、各类样品的高分辨粉末及单晶衍射。

### 4.1 NSRL X 射线衍射与散射光束线

图 1 给出了 NSRL X 射线衍射与散射实验站的光束线各光学元件的排布. 双向可调光阑把光束线的水平接收角和垂直接收角规范为 3mrad 和 0.1mrad. 一块前置超环面聚焦镜以缩放系数  $M = 1$  将接收到的光束在垂直和水平两个方向上聚焦; 单色仪由  $(+N, -N)$  排列的两块 Si(111) 晶体构成, 通过联动机构调谐, 使连续光谱的入射光成为出口位置固定的单色光. 通过调节单色仪入射狭缝的宽度, 限制垂直接收角, 挡掉大部分杂散光, 以获得适当分辨本领的优质单色光.

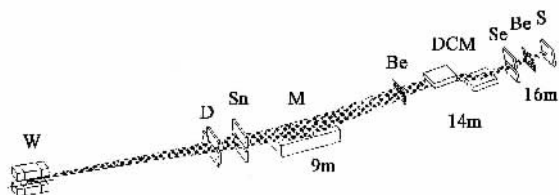


图 1 光束线中各光学元件的排布

(W 为扭摆磁铁, D 为双向可调光阑, Sn 为单色仪入射狭缝, M 为前置超环面聚焦镜, Be 为铍窗, DCM 为双晶单色仪, Se 为单色仪出射狭缝, S 为样品)

光束线设计指标和各光学元件结构参数为

光子能量可调范围	4.1—12.4 keV(1—3 Å)
光学系统的最大接受角( $H \times V$ )	$3 \times 0.1 \text{ mrad}^2$
光学系统的输出(样品上的光子数)	$> 2 \times 10^8$
系统的能量分辨率 $\Delta E/E$	$\sim 5 \times 10^{-4}$
样品上的光斑尺寸( $H \times V$ )	$\sim 4 \times 0.5 \text{ mm}^2$

#### 4.2 实验站主要设备

实验站的主要设备包括: 成像板探测器系统、衍射仪、样品冷却系统和数据处理设备.

●探测器系统主要采用德国 MarResearch 公司生产的 Mar345 成像板系统开展生物大分子晶体结构研究. 这是一种国际上通用的收集二维 X 射线信号的商品化探测系统.

●衍射仪采用  $\Psi$  衍射仪, 这是一种六圆衍射仪, 是进行  $\Psi$  扫描的必要设备.

●由于在同步辐射照射下生物大分子晶体样品通常容易损坏, 因此多使用冷却系统使样品局部降温, 以延长晶体的实验寿命. 在 NSRL 衍射与散射实验站使用的样品冷却系统为 Oxford Cryosystems 700, 这也是当前国际上同步辐射实验室通用的设备.

●数据处理系统为 SGI 公司生产的 O<sub>2</sub> 图形工作站.

图 2 是 X 射线衍射与散射光束线、实验站整体

排布图, 实验站的实验设备可根据需要在  $\Psi$  衍射仪与成像板探测器系统之间进行切换.

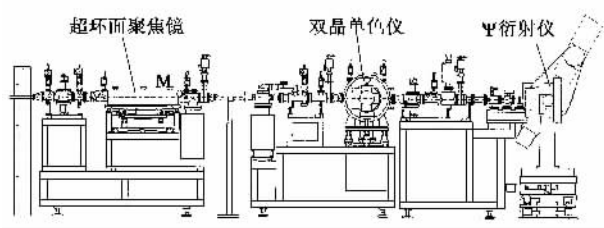


图 2 X 射线衍射与散射光束线、实验站整体排布图

#### 4.3 拟进行生物大分子晶体学领域的研究工作

NSRL 衍射与散射实验站主要在以下领域开展研究工作:

- 生物大分子晶体衍射数据采集;
- 单光束反常散射(OAS)解生物大分子的相角问题;
- 多光束 X 射线衍射方法直接测定生物大分子晶体的结构因子相角.

### 5 同步辐射用于生物大分子晶体结构研究的最新进展

人类基因组计划大规模测定 DNA 碱基序列的工作已基本完成, 国际上开始了继人类基因组计划之后新一轮大规模国际合作计划: 结构基因组计划——规模化地测定蛋白质、RNA 及其他生物大分子的三维结构.

近年来国外测定生物大分子的三维结构主要借助于同步辐射单晶体衍射技术, 在世界各同步辐射装置上建立了许多用于生物大分子结构测定的 X 射线衍射实验站. 美国四个主要的同步辐射实验室中就有 44 个; 欧洲同步辐射装置(ESRF)上已有的大分子晶体学实验站超过 10 个, 而且在不断增加新的实验站; 日本现大约有 20 个实验室涉及结构基因组研究. 第三代同步辐射光源 Spring-8 已于 1997 年 10 月建成, 其中有两束光束线为结构基因组研究专用. 同步辐射 X 射线衍射装置的发展使得生物大分子结构的测定能以前所未有的速度与精度进行. 例如, 1999 年细胞内合成蛋白质工厂的核糖体结构被测定出, 此项研究被美国 Science 列为当年科技十大进展之一, 其晶体结构就在位于美国加州 Berkeley 的同步辐射装置 Advanced Light Source 上的大分子实验站上完成的.

在我国 2002 年 6 月, 国家同步辐射实验室 X 射线衍射与散射实验站利用 Mar345 成像板探测系

