

## 用硬 X 射线自由电子激光解析复杂生物大分子的结构

2010年,美国斯坦福直线加速器中心(SLAC)的研究人员在 *Nature Photonics* 杂志上发文<sup>[1]</sup>,宣布世界上第一个硬 X 射线波段的自由电子激光装置正式投入使用. X 射线激光给整个“X 光科技”带来的影响,将不亚于上世纪可见光激光给光学带来的影响. 上世纪初诞生的 X 光科技使大量科学实验深入到原子层次,为物理、化学、材料科学以及生命科学等领域的许多重大突破提供了实验基础. 以 X 射线激光为基础的 21 世纪的 X 光科技,将在更广的范围、更深的层次、以更高的效率对相关学科的发展起更大的促进作用. 关于 X 射线激光, *Physics Today* 杂志已做了系列报道. 2011 年 4 月出版的 *Physics Today* 又就 X 射线激光最值得期待的应用领域——X 射线结构分析——所取得的重要进展做了专门报道. 全文主要内容如下:

X 射线晶体学是解析蛋白质或生物大分子结构的重要手段,该方法要求生长足够大的高质量单晶. 原因很简单,有机分子的 X 射线散射截面极小,周期性排列分子的散射相干叠加形成布拉格衍射才能产生足够好的实验数据. 晶体越大,衍射效应越明显,信噪比越高. 不幸的是,许多生物大分子特别是膜蛋白分子由于各种因素的制约很难长成足够大的晶体,有些甚至根本不能结晶.

可不可以避开这一约束? 美国 Uppsala 大学的 J. Hajdu 和他的同事们于 2000 年提出,利用硬 X 射线自由电子激光获取单个分子或者小团簇的衍射数据,并据此来解析其结构<sup>[2]</sup>. 根据他们的模拟演算,虽然生物分子会在几十飞秒内因为强射线辐照引起的库仑爆炸而解体,但如果 X 射线脉冲足够短,强度足够高,还是能在分子解体之前收集到含有足够结构信息的散射. SLAC 的线性加速器相干光源(LCLS)于 2009 年 9 月开始出光. 该装置产生周期性的激光脉冲,每个脉冲含将近  $10^{13}$  个光子,脉冲持续时间约 10fs,峰值功率密度达到  $10^{16}$  W/cm<sup>2</sup>. 3 个月后来,来自德国同步辐射(DESY)加速器、马普医学研究所、Arizona 州立大学和 Uppsala 大学的 80 多名科学家组成的国际团队,用能量为 1.8keV 的自由

电子激光进行了两个实验,验证了 J. Hajdu 的想法. 在第一个实验中,研究人员以 8.5 Å 分辨率的自由电子激光解析了光合作用膜蛋白复合物的结构,在电子密度图上可以看到其主要的结构特征. 另一个实验在同一时间段进行,研究人员以 32nm 的分辨率测量了一个病毒的结构. 这两个实验预示着我们向拍摄单个生物分子的原子级分辨动态影像方面迈出了关键性的一步.

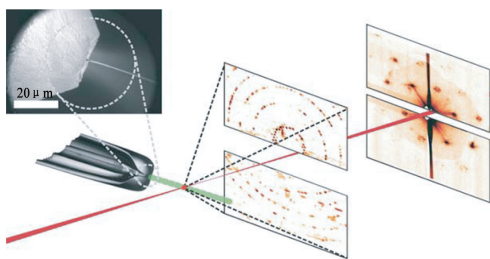


图1 蛋白质纳米晶的硬 X 射线自由电子激光衍射(一束含有蛋白质纳米晶的液滴射入真空腔中并与自由电子激光束相遇. 在每一次纳米晶体被 X 射线击中的瞬间,该晶体的取向是随机的,每一次击中都会使晶体爆炸,但在晶体解体前我们可以探测到足够强的 X 射线散射. 实验中前置和后置的 2 个 CCD 探测器分别记录高角度和低角度的衍射信号. 插图中的扫描电子显微镜图是实验中使用的喷嘴及喷出的液滴流)

早在 2006 年,SLAC 便开始论证 Hajdu 的想法,为此进行了一些必要的准备. Hajdu, H. Chapman(也是上述国际团队的一员)和他们的同事们,用 DESY 的 FLASH 装置产生的 25fs 激光脉冲,研究了氮化硅薄膜上的微米刻蚀图案. 虽然 DESY 实验用的 X 射线波长要长一些,功率也不如现在的高,但也能在刻蚀图案被破坏前得到足够好的成像信息(参见 *Physics Today*, 2007 年第 1 期第 19 页). 在上述实验中,固体薄膜被固定在光束线中,这一点对生物分子而言却很难做到. 研究人员研制了一种装置,将蛋白质纳米晶体或单颗粒病毒喷射到 X 射线激光脉冲束线中(见图 1). 纳米晶体与激光脉冲的每一次碰撞都会在探测器上产生一个二维布拉格衍射图案. 数小时内便能收集到几十万张衍射图案. 每张图案都是不同大小、形状和取向的纳米晶体的衍射投影. 在用晶体学指标化方法对衍射图案进行取向定位后,研究人员从 300 万张衍射图案中选取了 15000 张合成出高分辨的三维衍射图,其中

本栏目是经美国物理联合会(AIP)授权,与 *Physics Today* 合作的项目

的每一个布拉格衍射峰都是由很多个纳米晶体的贡献叠加而成的(见图 2)。

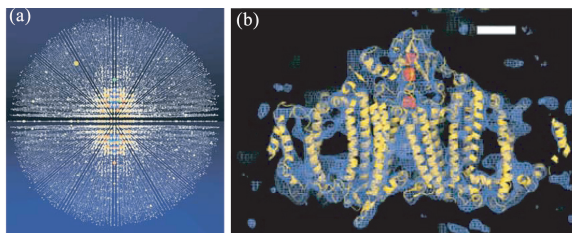


图 2 (a)用 15000 张蛋白质纳米晶体的单次衍射图合成得到的 X 射线衍射图案;(b)通过数据处理得到的该蛋白质的低分辨率电子密度图(所得电子密度分布(蓝色,见《物理》网刊彩图,下同)与已知的高分辨率结构(红色和黄色)基本符合.该高分辨结构是用传统大分子晶体学方法解析得到的,花费了研究人员 10 多年的时间,而蛋白质纳米晶却很容易生长)

蛋白质的实空间结构是通过倒易空间的衍射图案进行傅里叶变换得到的.傅里叶变换不仅需要衍射点的强度,还需要衍射点的相位信息.对于晶体而言,我们只能得到前者.对小晶体而言,相位信息并没有丢失,可以根据布拉格峰的强度以及布拉格峰之间的衍射强度,利用实空间与倒空间的双空间迭代算法来得到.本次实验所研究的光合作用膜蛋白是一个已知结构的蛋白质,该结构是用传统的晶体衍射方法解析得到的.作为一个原理验证性实验,研究人员并没有试图直接从衍射数据中解析出相位信息,而是从已知结构出发,调整蛋白质中原子的位置,直到收集到的衍射峰强度与计算出的衍射强度相匹配.

第二个实验是关于巨型病毒(名为 Mimivirus,按字面意思可理解为“酷似细菌的病毒”——译者注)的结构解析.该病毒的尺寸为  $0.75\mu\text{m}$ ,是已知的最大病毒,与最小细胞的尺寸相当.这么大的病毒对于冷冻电镜三维成像技术来说太大了(参见 *Physics Today*, 2008 年第 1 期第 48 页),而病毒壳体外面的原纤维又阻止了其结晶,排除了用晶体衍射法测定其结构的可能性.用硬 X 射线自由电子激光测量单个病毒的结构,可以避免染色、切片、冷冻或者其它样品准备过程带来的对病毒结构的损坏.

散射实验中 X 射线的利用率极低,超过 99.9% 的光子根本不会接触到样品,命中样品的光子中的大部分又被用来产生光电子.所幸自由电子激光的

亮度比现有的同步辐射光源还高 9 个量级,即使在有大量光子损失的情况下,每一幅衍射图案也有 200 万个光子,如图 3 所示.研究人员已经可以通过单个脉冲所产生的衍射图重构出病毒的二维投影图,尽管现在看来该实验的分辨率并不算高.对蛋白质纳米晶体而言,可以通过单个图案中的布拉格衍射峰来确定其取向.这为多个图像的综合处理带来方便.病毒的衍射图案是连续的,在低信噪比时,衍射图案的叠加处理很困难.改进实验仪器后,该研究小组在 2011 年 1 月收集到了更多的衍射图案,他们正在综合这些衍射图案以期以更高的分辨率解析病毒的全三维结构.

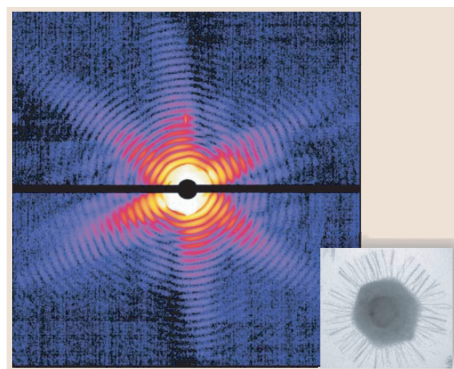


图 3 单个病毒的 X 射线单脉冲衍射图案(图案的对称性与该病毒壳体所具有的二十面体对称性符合,见插图中的切片电子显微镜照片)

自由电子激光的应用对于生物学家来说有巨大的吸引力.正如斯坦福大学的 A. Brunger 所说,“自由电子激光对结构生物学的影响将不亚于同步辐射光源被第一次引入该学科时所带来的影响——同步辐射光源已经帮助科学家们解析了很多获得大奖(指诺贝尔奖)的蛋白质结构”。

#### 参考文献

- [ 1 ] Emma E *et al.* *Nature Photonics*, 2010, 4:641
- [ 2 ] Neutze R *et al.* *Nature*, 2000, 406:752
- [ 3 ] Chapman H N *et al.* *Nature*, 2011, 470:73
- [ 4 ] Seibert M M *et al.* *Nature*, 2011, 470:78

(中国科学院物理研究所 李明 摘译自 Mark Wilson. *Physics Today*, 2011, 4:13, 原文详见 <http://ptonline.aip.org>)