

基于芯片技术的生物大分子晶体高效数据采集

李 冰^{1,2} 汪启胜^{1,3} 李敏军³ 郭豪杰^{1,2} 余 立^{1,2} 何建华^{1,3}

1(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2(中国科学院大学 北京 100049)

3(中国科学院上海高等研究院 上海 201210)

摘要 X射线晶体学技术目前仍然是解析生物大分子结构的最主要手段,获得尺寸足够大的大分子晶体仍然是晶体学技术的难点。小晶体相对于大晶体更容易获得,而且晶格堆积较好,但小晶体容易受到辐射损伤,即使在低温下进行数据采集也很难从一颗晶体获得完整的结构信息。利用激光光刻技术制作用于多颗晶体上样的芯片,实现高通量的多颗晶体衍射数据收集,将多套数据进行合并,获得无明显辐射损伤的生物大分子结构信息。石英芯片背景散射低,上样效率高。基于芯片的晶体上样技术为晶体学研究者提供了一种利用微聚焦光束线站进行小晶体衍射数据收集并获得无明显辐射损伤高质量衍射数据的高效手段。

关键词 X射线晶体学, 高通量的上样方法, 辐射损伤, 芯片

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2019.hjs.42.060101

Chip-based efficient data collection technology from multiple crystals

LI Bing^{1,2} WANG Qisheng^{1,3} LI Minjun³ GUO Haojie^{1,2} YU Li^{1,2} HE Jianhua^{1,3}

1(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

2(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

3(Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract [Background] X-ray crystallography is still the most important means of obtaining atomic resolution structure of biological macromolecules. Obtaining protein crystals of sufficient size is the bottleneck of crystallography. Small crystals are easier to obtain than large crystals, and lattice packing is better. But small crystals are susceptible to radiation damage, and it is difficult to obtain complete structural information from a crystal even when data collection is performed at low temperatures. [Purpose] This paper aims to propose a method for acquiring small crystal data based on chip techniques at a microfocus beam line station of synchrotron radiation light source. [Methods] First of all, the chip was fabricated by laser lithography technology, and crystal was able to be deposited in the groove of the chip. Then, high-throughput data collection for diffraction of multi-crystals on the chip was achieved on the chip, and collected multiple chips data sets were emerged to get structure information of biological macromolecules. Finally, the feasibility of chip-based sample delivery method was verified by using the lysozyme

国家重点研发计划(No.2017YFA0504901)、中国科学院青年创新促进会(No.2015213)资助

第一作者: 李冰, 女, 1990年出生, 2013年毕业于南华大学, 现为博士研究生, 研究领域为同步辐射技术

通信作者: 何建华, E-mail: hejianhua@sinap.ac.cn

收稿日期: 2019-04-10, 修回日期: 2019-04-24

Supported by National Key Research and Development Plan of China (No.2017YFA0504901), Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (No.2015213)

First author: LI Bing, female, born in 1990, graduated from University of South China in 2013, doctoral student, focusing on synchrotron technology

Corresponding author: HE Jianhua, E-mail: hejianhua@sinap.ac.cn

Received date: 2019-04-10, revised date: 2019-04-24

crystal at the microfocus beamline (BL18U1) of SSRF. **[Results]** The quartz chip has low background scattering and high sample delivery efficiency. The structure of lysozyme with high resolution of 0.139 nm was obtained by chip loading and data acquisition. **[Conclusions]** The chip-based polycrystalline data acquisition method can obtain complete biomacromolecule structural information without obvious radiation damage by merging multiple data sets.

Key words X-ray crystallography, High-throughput sample delivery method, Radiation damage, Chip

原子级别分辨率的生物大分子三维结构信息对基于结构的蛋白质功能研究和小分子药物设计至关重要。膜蛋白具有非常重要的生物学功能,尤其是G蛋白偶联受体(G protein Coupled Receptor, GPCR),它是非常重要的药物靶点,获得高分辨率GPCR膜蛋白结构对于新药的设计与研发非常有益。脂立方相(Lipid Cubic Phase, LCP)方法对获得高质量的膜蛋白晶体非常有效^[1-2],但是此方法生长的晶体尺寸往往较小。许多可溶性蛋白晶体通常也很难长大。许多晶体学研究者对利用小晶体进行蛋白结构解析有非常迫切的需求。

目前,自由电子激光与同步辐射微聚焦光束线站均可以利用小晶体进行结构解析。晶体的衍射强度取决于光通量密度和受X射线照射的单位晶格数即晶体大小。高亮度的光源有利于获得更高分辨率的结构,小的晶体由于衍射体积较小,信号强度较弱,分辨率也较低。通常提高衍射光强度来增加衍射信号强度,提高分辨率。比如利用高亮度的微聚焦光束线站进行小晶体衍射数据采集。但是,高亮度的光源在提高分辨率的同时也带来了辐射损伤的问题。辐射损伤分为整体辐射损伤和局部辐射损伤,整体辐射损伤反映在衍射数据层面,会导致分辨率下降;局部辐射损伤会导致晶体内的生物大分子的共价键,如二硫键,发生断裂^[3-5]。

自由电子激光由于其超短脉冲,能够在晶体损伤之前收集到无辐射损伤的衍射数据^[6]。自由电子激光串行飞秒晶体学(Serial Femtosecond crystallography, SFX)方法,利用基于GDVN(Gas Dynamic Virtual Nozzle)的液体喷射系统^[7-8]或者喷射晶体与脂立方相混合基质的LCP喷射装置^[9]将晶体连续输送至光路进行数据收集。相比于固定靶的方法,喷射装置样品消耗量巨大。

受到自由电子激光串行晶体学的启发,基于固定靶的串行晶体学方法被广泛用于同步辐射微小晶体数据采集^[10-14]。固定靶的方法上样效率高,样品被X光的命中率高,而且允许转动一定的角度,可以在一颗晶体上收集多张衍射图,大大减少了样品的消耗量。目前固定靶方法主要利用芯片^[10, 12-13, 15]或者薄膜^[16-21]作为衬底,通过将大分子晶体样品转移到或者原位生长在芯片或者薄膜上来达到上样

目的。

我们利用背景散射较小的石英玻璃作为芯片材料,设计了一种高通量的芯片固定靶串行上样方法,用于多颗晶体的数据收集。这一方法尤其适用于在微聚焦光束线站的微小晶体数据收集。通过对溶菌酶蛋白晶体的衍射数据收集与分析,我们发现该方法能有效避免辐射损伤对晶体衍射数据质量产生影响。

1 材料与方法

1.1 样品制备

测试样品采用溶菌酶(catalogue No. 62970; Sigma - Aldrich),溶菌酶是光束线站常用的测试样品,而且非常容易结晶,结构中含有四对二硫键,便于做辐射损伤分析。用于溶菌酶结晶的沉淀剂由0.2 mol·L⁻¹柠檬酸、0.2 mol·L⁻¹醋酸钠和8%(w/v)氯化钠组成,溶菌酶蛋白浓度采用25 mg·mL⁻¹。蛋白溶液与沉淀剂按1:2的比例混合,采用蒸汽扩散法结晶。约6 h后可以得到尺寸在10~60 μm的溶菌酶晶体。防冻液由20%的甘油和沉淀剂溶液组成。

1.2 基于芯片的上样装置

芯片的材质为石英玻璃,主要成分为二氧化硅,采用激光光刻的方法进行刻蚀,在200 μm厚石英玻璃片上得到宽度为50 μm、深度为50 μm的矩形槽,槽与槽之间的间隔也为50 μm,如图1(b)。芯片长14 mm、宽4 mm,光刻区域的长为9 mm、宽2.5 mm,图1(a)为芯片尺寸示意图。

芯片通过3D打印的树脂支架固定磁力底座上。3D打印支架下端带有螺纹,通过螺纹与磁力底座固定,如图1(c)所示。支架上有螺纹口,通过带有橡胶圈的紧固螺丝将芯片轻轻固定在支架上。因为芯片超薄易碎,所以不能用紧固螺丝完全固定,用橡皮泥辅助固定。利用移液枪将防冻液与晶体样品的混合溶液转移至芯片,小的晶体落在槽内,较大的晶体分布在槽的表面,如图1(b)所示。然后将芯片保存在液氮环境下备用。

1.3 数据收集

为了探究上海光源同步辐射蛋白质微晶体结构

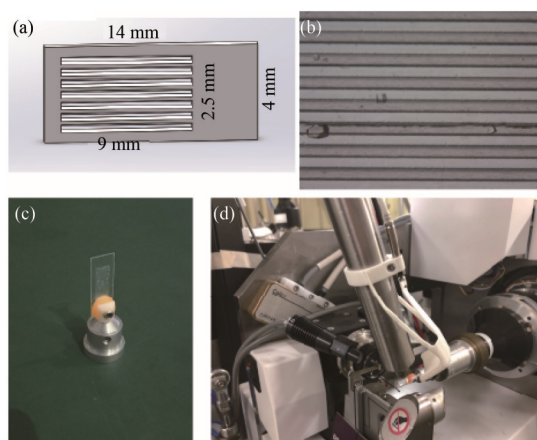


图1 基于芯片的晶体上样与数据采集系统
(a) 芯片尺寸示意图, (b) 显微镜下镶嵌在芯片的凹槽中的小晶体, (c) 固定于3D打印支架与磁力底座的芯片, (d) 芯片安装在测角头上用于同步辐射线站数据采集

Fig.1 Chip-based sample delivery and data collection system
(a) Schematic diagram of chip, (b) Sample of small crystal embedded in the groove of the chip, (c) Chip fixed on magnetic base by 3D printed holder, (d) Chip mounted on goniometer for data collection

光束线站 BL18U1 对晶体的辐射损伤效应, 采用常规尼龙环的上样方法, 将一颗尺寸为 $30\ \mu\text{m}$ 的小晶体在 BL18U1 的线站上用 $30\ \mu\text{m}$ 的光斑进行数据采集。BL18U1 的光通量为 $2 \times 10^{11}\ \text{phs} \cdot \text{s}^{-1}$, 数据采集时能量为 $12.6\ \text{keV}$ 。数据采集速度采用 1° 每秒每张, 一共收集了 1 200 张衍射图。

为了验证芯片方法进行数据采集的可行性, 在芯片上一次性放置几十颗晶体, 在微聚焦光束线站 BL18U 进行数据采集, 采用的光斑大小与能量均与上述常规方法一致。通过对晶体进行质量筛选, 选择了 10 颗晶体进行数据采集, 每颗晶体收集 30~60 张衍射图。

1.4 数据处理

常规方法收集的数据采用 HKL3000 数据处理软件进行指标化、积分与均一化。最高分辨率壳层确定原则为 $\langle I/\sigma(I) \rangle > 2$ 。利用芯片方法收集的数据采用 XDS^[22] 进行指标化, 采用 CCP4 软件包^[23] 中的 BLEND 程序^[24] 找出 10 套数据中的最佳数据组合进行数据合并, 然后积分与均一化。溶菌酶的结构解析采用 CCP4 软件包里的 Phaser^[25] 进行分子置换, 分子置换的搜索模型为 PDB 号为 4LTZ 的溶菌酶结构模型。结构的修正与优化采用 PHENIX 软件^[26] 与 Coot 软件^[27]。

2 结果与讨论

2.1 芯片背景散射分析

为了探究芯片的背景散射, 分别收集了空气的背景散射衍射图(图2(a))与加上芯片后的衍射图像(图2(b)), 并将两者做对照。在空气中的衍射图像与芯片的衍射图像上取同一区域(标注为 1 和 2), 查看其背景噪声。空气的背景噪声均值在 45 左右, 芯片的背景噪声在 100 左右。但是, 芯片衍射图在 $0.4\ \text{nm}$ 附近, 图2(b)标注为 3 的区域, 存在较高的背景, 背景噪声达 600 左右。

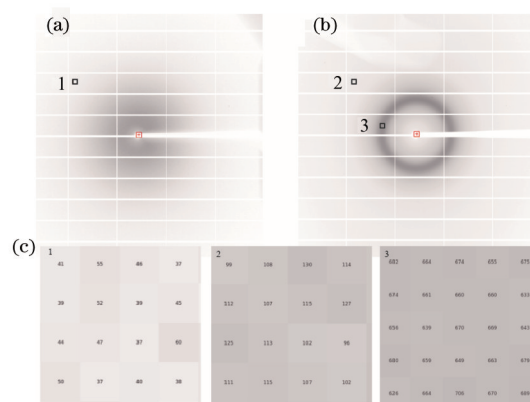


图2 空气(a)与石英芯片(b)的衍射图, 标注数字 1, 2, 3 的三个区域的背景噪声点(c)

Fig.2 The diffraction images of air (a) and quartz chip (b), and the background noise of area 1, area 2 and area 3 (c)

通过对芯片上收集的溶菌酶数据的分析比较, 在 $0.4\ \text{nm}$ 近噪声对数据质量影响不大, 低分辨率区域仍然具有较高的信噪比, 其值为 42.08。而且数据的完整度也不受影响, 仍然获得了 99.9% 的完整度。从整套数据来看, 该芯片的方法也能获得高质量的衍射数据。通过对多套溶菌酶数据收集, 获得 $0.139\ \text{nm}$ 的高分辨率。结果表明: 石英芯片具有较低的背景散射, 不会对晶体数据质量产生影响。且槽型形状有助于去除多余的母液, 减少由母液带来的背景散射。

2.2 辐射损伤

单颗溶菌酶蛋白晶体接受长时间 X 射线辐照所搜集的衍射数据被用来分析微聚焦光束线站对晶体辐射损伤的影响。单颗溶菌酶蛋白晶体每旋转 1° 所受 X 射线辐照曝光时间为 $1\ \text{s}$, 得到一张衍射图像, 累计收集 1 200 张晶体衍射图像。将 1 200 张衍射图分为 5 套数据, 分别为 1~60 张、270~330 张、570~630 张、870~930 张和 1 140~1 200 张。每套数据 60 张衍射图, 对每套数据用 HKL3000 进行处理, 每套数据的分辨率如图 3 柱形图所示。可以看到, 随着曝光

时间增加,晶体的分辨率逐渐下降,当曝光时间长达1 200 s时,晶体的最高分辨率由最初的0.139 nm下降至0.158 nm,整体下降0.019 nm。将每套数据的最高分辨率截至0.158 nm,得到0.158~0.161 nm分辨率壳层的信噪比数据如图3曲线。随着曝光时间增加,该分辨率壳层信噪比下降非常迅速,虽然曝光60 s与曝光300 s均得到0.139 nm的分辨率数据,但是整体信噪比在下降。整体辐射损伤导致分辨率下降,影响数据的信噪比。

通过进一步分析溶菌酶二硫键的电子密度随曝光时间累计增加而产生的衰减过程,可以微观地揭示蛋白质内部共价键所受X射线辐照损伤。在1 200 s的累计曝光时间内,选取前60 s、570~630 s、1 140~1 200 s的衍射图像,分别用来解析溶菌酶的三维结构。如图4所示,通过观察四组二硫键Cys6-Cys127、Cys6-Cys127、Cys6-Cys127和Cys6-Cys127的电子密度图,可以发现,随着曝光时间的增加, $F_o - F_c$ 为负值的电子密度逐渐加强。这意味着二硫键的电子密度逐渐衰减,分子内的共价键受X射线辐照被逐渐破坏,降低了生物大分子晶体衍射数据质量。

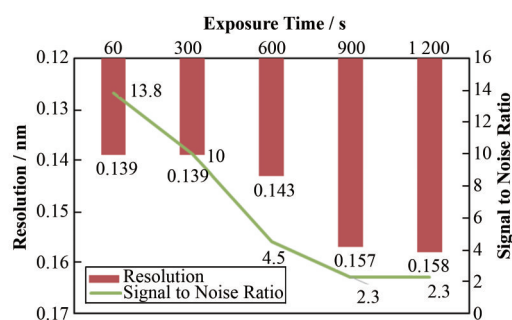


图3 曝光时间与分辨率和信噪比关系
Fig.3 Exposure time versus resolution and SNR (signal to noise ratio)

F_o 为负值的电子密度逐渐加强。这意味着二硫键的电子密度逐渐衰减,分子内的共价键受X射线辐照被逐渐破坏,降低了生物大分子晶体衍射数据质量。

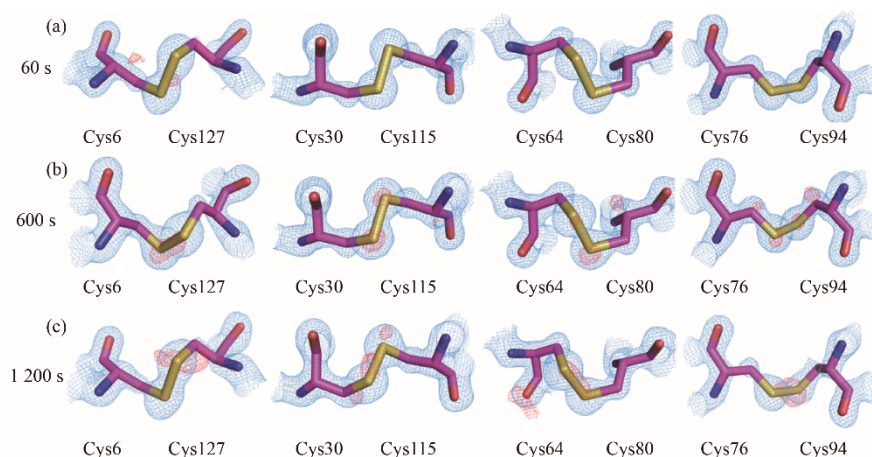


图4 溶菌酶四对二硫键时间分辨的辐射损伤图
Fig.4 Time-resolved radiation damage map of four pairs of disulfide bonds of lysozyme

2.3 基于芯片的多颗晶体数据收集

利用微聚焦光束线站进行小晶体数据收集时,利用多颗晶体收集数据,将多套基本无辐射损伤的数据进行合并,减少单颗晶体的曝光时间有助于提高数据信噪比,从而提高分辨率,同时也有利于减少局部辐射损伤。

将上百颗晶体置于芯片上仅需要10 min以内。在光束线站进行数据收集时,芯片仅需要对中一次,时间在5 min以内。通过对芯片上的晶体质量进行筛选,最后收集10套衍射数据耗时40 min。相比于常规方法,该方法无需捞晶体,可以避免人为因素对晶体造成机械损伤。该方法不使用机械手上样,节省换样品时间,能快速对多颗晶体进行质量筛选与

数据收集。从10套数据中选取了108张衍射图,获得了0.139 nm的高分辨率衍射数据。利用分子置换法获得了溶菌酶结构,其数据统计图如表1所示。 R_{work} 和 R_{free} 的值分别为17.85%和20.51%,信噪比为29.46。结果表明:利用芯片的方法能实现高效的晶体质量筛选与数据收集,并且能获得高质量的数据。

3 结语

此研究分析了在同步辐射高亮度的微聚焦光束线站进行衍射数据收集时,曝光时间与溶菌酶衍射数据质量的变化关系。提出一种基于芯片进行蛋白质晶体上样与多颗晶体数据收集的方法。晶体样品被嵌入在卡槽中,利于定位晶体。该方法上样效率高,

表1 溶菌酶数据收集与优化统计
Table 1 Data collection and refinement statistics for lysozyme

蛋白 Proteins	溶菌酶 Lysozyme
方法 Methods	芯片 Chip
数据收集 Data collection	
温度 Temperature / K	100
晶体数量 No. of crystals	10
衍射图张数 No. of images	108
空间群 Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2
晶胞参数 Unit cell	
a, b, c / nm	7.869, 7.869, 3.693
$\alpha=\beta=\gamma$ / (°)	90
波长 Wavelength / nm	0.097 89
分辨率 Resolution / nm	5.0~0.139
完整度 Completeness / %	100 (100)
R 因子 R_{merge} / %	10.2 (48.2)
信噪比 $\langle I/\sigma(I) \rangle$	29.46 (3.13)
冗余度 Redundancy	7.2 (6.4)
优化 Refinement	
分辨率 Resolution / nm	2.222~0.139
R 因子/ R 自由因子 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ / %	17.85/20.51
原子个数 No. of atoms	
蛋白 Protein	126
配体/离子 Ligand/ion	0
水 Water	192
B 因子 B -factors / nm ²	
整体 Overall	0.194 5
蛋白 Protein	0.177 1
离子 Ion	0
水 Water	28.50
均方根差 R.M.S. deviations	
键长 Bond lengths / nm	0.002 6
键角 Bond angles / (°)	4.778
拉氏图 Ramachandran plot	
基本吻合 Most favored / %	97.64
允许 Allowed / %	2.36
不允许 Disallowed / %	0

无需使用机械手,能用测角仪快速将晶体移动至光路。可以让研究者低温环境下进行小晶体数据收集,并获得高质量无辐射损伤的衍射数据。为晶体学研究者利用同步辐射微聚焦光束线站进行生物大分子小尺寸晶体数据收集提供了一种高通量的数据收集方法。

参考文献

- Cherezov V. Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies[J]. Current Opinion
- Caffrey M. A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes[J]. Acta Crystallogr F Structure Biology Communications, 2015, **71**(Pt 1): 3–18. DOI: 10.1107/S2053230X14026843.
- Garman E F. Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?[J]. Acta Crystallogr D Biological Crystallography, 2010, **66** (Pt 4): 339–351. DOI: 10.1107/S0907444910008656.
- Bury C, Garman E F, Ginn H M, *et al.* Radiation damage to nucleoprotein complexes in macromolecular crystallography[J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2015, **22**(2): 213 – 224. DOI: 10.1107 / S1600577514026289.
- Garman E F, Weik M. Radiation damage to macromolecules: kill or cure?[J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2015, **22**(2): 195 – 200. DOI: 10.1107 / S160057751500380X.
- Neutze R, Wouts R, van der Spoel D, *et al.* Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses[J]. Nature, 2000, **406**(6797): 752 – 757. DOI: 10.1038 / 35021099.
- DePonte D, Weierstall U, Schmidt K, *et al.* Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2008, **41**(19): 195505. DOI: 10.1088/0022-3727/41/19/195505.
- Chapman H N, Fromme P, Barty A, *et al.* Femtosecond X-ray protein nanocrystallography[J]. Nature, 2011, **470** (7332): 73–77. DOI: 10.1038/nature09750.
- Weierstall U, James D, Wang C, *et al.* Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography[J]. Nature Communications, 2014, **5**: 3309. DOI: 10.1038/ncomms4309.
- Roedig P, Vartiainen I, Duman R, *et al.* A micro-patterned silicon chip as sample holder for macromolecular crystallography experiments with minimal background scattering[J]. Scientific Reports, 2015, **5**: 10451. DOI: 10.1038/srep10451.
- Roedig P, Ginn H M, Pakendorf T, *et al.* High-speed fixed-target serial virus crystallography[J]. Nature Methods, 2017, **14**(8): 805 – 810. DOI: 10.1038 / nmeth. 4335.
- Roedig P, Duman R, Sanchez-Weatherby J, *et al.* Room-temperature macromolecular crystallography using a

- micro-patterned silicon chip with minimal background scattering[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2016, **49** (Pt 3): 968–975. DOI: 10.1107/S1600576716006348.
- 13 Murray T D, Lyubimov A Y, Ogata C M, *et al.* A high-transparency, micro-patternable chip for X-ray diffraction analysis of microcrystals under native growth conditions [J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2015, **71**(Pt 10): 1987 – 1997. DOI: 10.1107/S1399004715015011.
 - 14 Mueller C, Marx A, Epp S W, *et al.* Fixed target matrix for femtosecond time-resolved and in situ serial micro-crystallography[J]. *Structural Dynamics*, 2015, **2**(5): 054302. DOI: 10.1063/1.4928706.
 - 15 Heymann M, Opatthalage A, Wierman J L, *et al.* Erratum: room-temperature serial crystallography using a kinetically optimized microfluidic device for protein crystallization and on-chip X-ray diffraction. Corrigendum [J]. *IUCrJ*, 2015, **2**(Pt 5): 601. DOI: 10.1107 / S205225251501492X.
 - 16 Axford D, Aller P, Sanchez-Weatherby J, *et al.* Applications of thin-film sandwich crystallization platforms[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2016, **72**(Pt 4): 313–319. DOI: 10.1107/S2053230X16004386.
 - 17 Huang C Y, Olieric V, Howe N, *et al.* In situ serial crystallography for rapid de novo membrane protein structure determination[J]. *Communications Biology*, 2018, **1**: 124. DOI: 10.1038/s42003-018-0123-6.
 - 18 Huang C Y, Olieric V, Ma P, *et al.* In meso in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins at cryogenic temperatures[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2016, **72**(Pt 1): 93 – 112. DOI: 10.1107/S2059798315021683.
 - 19 Huang C Y, Olieric V, Ma P, *et al.* In meso in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2015, **71**(Pt 6): 1238 – 1256. DOI: 10.1107/S1399004715005210.
 - 20 Broecker J, Morizumi T, Ou W L, *et al.* High-throughput in situ X-ray screening of and data collection from protein crystals at room temperature and under cryogenic conditions[J]. *Nature Protocols*, 2018, **13**(2): 260 – 292. DOI: 10.1038/nprot.2017.135.
 - 21 Li B, Huang S, Pan Q Y, *et al.* New design for multi-crystal data collection at SSRF[J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2018, **29**(2): 21. DOI: 10.1007/s41365-018-0357-5.
 - 22 Kabsch W. Xds[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, **66**(2): 125 – 132. DOI: 10.1107/S090744490804362X.
 - 23 Collaborative C P. The CCP4 suite: programs for protein crystallography[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1994, **50**(Pt 5): 760. DOI: 10.1107/s0907444994003112.
 - 24 Foadi J, Aller P, Alguel Y, *et al.* Clustering procedures for the optimal selection of data sets from multiple crystals in macromolecular crystallography[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2013, **69**(8): 1617 – 1632. DOI: 10.1107 / S0907444913012274.
 - 25 McCoy A J, Grosse-Kunstleve R W, Adams P D, *et al.* Phaser crystallographic software[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2007, **40**(4): 658 – 674. DOI: 10.1107 / s0021889807021206.
 - 26 Adams P, Grosse-Kunstleve R W, Hung L W. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2002, **58**(11): 1948–1954. DOI: 10.1107/S0907444902016657.
 - 27 Emsley P C K. Coot: model-building tools for molecular graphics[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2004, **60**(12): 2126–2132. DOI: 10.1107/ S0907444904019158.