

同步辐射串行晶体学静电纺丝上样实验技术

陈建樵^{1,2} 汪启胜^{1,2} 李冰^{1,2} 周欢¹ 崔莹¹ 孙波¹ 王志军¹ 何建华¹

1 (中国科学院上海应用物理研究所 张江园区 上海 201204)

2 (中国科学院大学 北京 100049)

摘要 串行晶体学作为一种解析蛋白质晶体结构的新方法,因其拥有室温采集、辐射损伤低、时间分辨等优势而得到迅速发展。早期发展于自由电子激光的串行飞秒晶体学已成功实现了蛋白质微小晶体结构的解析。为了引入串行晶体学的技术优势,充分发挥第三代同步辐射的丰富资源 and 特点,基于上海光源 BL17U1 生物大分子线站,我们对串行晶体学上样方法进行了理论和实验研究,解决了静电纺丝上样方式在同步辐射上应用的难题,用溶菌酶微小晶体论证了其可行性;同时探讨了基于同步辐射的串行晶体学在毫秒时间尺度上的发展潜力,为光束线技术升级提供参考。

关键词 串行晶体学, 同步辐射, 静电纺丝, 室温数据采集, 蛋白质微晶

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2017.hjs.40.080102

Electrospinning sample delivery for serial crystallography using synchrotron radiation

CHEN Jianqiao^{1,2} WANG Qisheng^{1,2} LI Bing^{1,2} ZHOU Huan¹ CUI Ying¹
SUN Bo¹ WANG Zhijun¹ HE Jianhua¹

1(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Zhangjiang Campus, Shanghai 201204, China)

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

Abstract Background: As a novel approach to solve the protein structure, serial femtosecond crystallography (SFX) has been developed rapidly owing to the advantages of the room-temperature data collection, lower radiation damage and time-resolved study. The first X-ray free-electron laser (XFEL) based SFX experiment has offered a new method to structure determination of protein microcrystals successfully. **Purpose:** The aim is to introduce SFX into the widely-available third-generation synchrotron radiation (SR). **Methods:** The electrospinning sample delivery system is a potential method to be applied on SR. The theoretical and experimental researches on electrospinning were studied using BL17U1 beamline in Shanghai synchrotron radiation facility (SSRF). **Results:** A microjet containing microcrystals was produced from the liquid meniscus and controlled by an electrostatic field. The air ionization problem disturbing electrospinning in SR experiment was solved by providing vacuum condition and coaxial electrospinning technique. Using lysozyme microcrystals as a model sample, the feasibility of electrospinning was demonstrated. **Conclusion:** It is shown that the serial crystallography on millisecond time scale is suitable for SR, which provides a reference for the future beamline upgrading.

Key words Serial crystallography, Synchrotron radiation, Electrospinning, Room-temperature data collection, Protein microcrystal

中国科学院战略性先导科技专项(B类)(No.XDB08030101)、中国科学院青年创新促进会(No.2015213)、国家自然科学基金(No.U1632126)资助
第一作者: 陈建樵, 男, 1992年出生, 2014年毕业于四川大学, 现为硕士研究生, 从事同步辐射晶体学相关研究

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

收稿日期: 2017-04-11, 修回日期: 2017-04-28

Supported by Strategic Priority Research Programmes (B) of Chinese Academy of Sciences (No.XDB08030101), Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (No.2015213), National Natural Science Foundation of China (No.U1632126)

First author: CHEN Jianqiao, male, born in 1992, graduated from Sichuan University in 2014, master student, focusing on synchrotron crystallography

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

Received date: 2017-04-11, accepted date: 2017-04-28

自 20 世纪 70 年代以来, 同步辐射光源的应用极大地促进了结构生物学的发展。蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 的统计显示, 所测定的蛋白质结构总量中有 90% 是利用 X 射线晶体衍射方法解析的。然而, 基于同步辐射的 X 射线晶体学方法时常受到辐射损伤和蛋白质晶体尺寸的限制, 因此通常利用液氮提供 100 K 的低温环境来增强蛋白质晶体的辐射耐受能力。相对于室温条件, 这可以使得样品的辐射剂量限制提高 30 倍, 典型地约为 30 MGy^[1]。通常, 同步辐射 X 射线晶体学实验所用的晶体尺寸一般大于 1 000 μm^3 , 因而面对微米级蛋白质晶体时, 传统的实验技术将面临严峻的考验。

2011 年, Chapman 等^[2]首次利用基于 X 射线自由电子激光(X-ray Free Electron Laser, XFEL)的串行飞秒晶体学(Serial Femtosecond crystallography, SFX)方法实现了 Photosystem I 200 nm–2 μm 的微小晶体在室温下的衍射数据收集。该方法对晶体尺寸的要求从几十微米降至 1 μm , 甚至更小; 且由于 XFEL 的飞秒级脉冲, 探测设备在样品损伤之前能够收集足够的衍射信号, 即“损坏前衍射(Diffraction-before-destruction)”, 从而更好地解决了辐射损伤问题。串行晶体学方法的特点在于每颗晶体随机取向地照射一张静态衍射图, 再利用蒙特卡罗积分方法解析大量晶体的衍射数据, 因此样品消耗量较大, 需要配套设计高效稳定的样品输送装置, 目前广泛应用的上样装置有 GDVN (Gas Dynamic Virtual Nozzle)、LCP jet (Lipidic Cubic Phase)、MESH (Microfluidic Electrokinetic Sample Holder) 等^[3–5]。

目前世界上先进的第三代同步辐射光源超过 20 多台, 而能开展 SFX 实验的自由电子激光装置仅有不到 5 台。若将这种串行晶体学的样品输送方法应用于传统的同步辐射 X 射线晶体学, 将突破其面临的难以解析微小晶体结构的瓶颈, 从而提高同步辐射的应用效率, 充分发挥其作用, 因此开展同步辐射串行晶体学 (Serial Synchrotron crystallography, SSX) 研究具有重要意义。结合同步辐射自身特点, 目前已开展研究微流体芯片^[6]、网格薄片等固定微小晶体的上样方式^[7], 用于微小晶体的室温数据采集, 但这种固定式上样法样品处理繁琐。而 SSX 也可采用 SFX 更适用的约束流动式上样法实现室温下持续输运含有微小晶体的细流到曝光区域, 目前 LCP jet 和毛细管(capillary)上样方式已成功验证了 SSX 在同步辐射毫秒级曝光下解析室温微小晶体结构的可行性^[1,8]。本文将着重探讨另外一种约束流动式上样法——采取静电纺丝原理

形成微小射流来输运微小晶体的静电纺丝上样法, 在上海光源 BL17U1 线站首次开展并解决了其在同步辐射上的实现方法和应用难题, 论证其可行性及发展前景。

1 静电纺丝上样装置简介

静电纺丝原理是利用静电场对带极化电荷的液滴表面施加静电力以克服液面张力, 形成圆锥形液面即泰勒锥, 并在液滴尖端产生微米级及以下的细小射流, 在纳米纤维等领域得到广泛应用。

基于 BL17U1 线站现有设备, 我们对静电纺丝上样装置进行兼容性设计, 其主要有观测系统、真空系统、静电控制系统及样品输送系统, 见图 1。

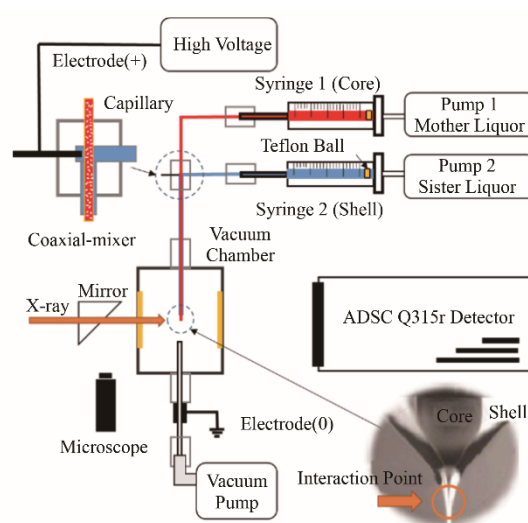


图 1 静电纺丝上样装置示意图
Fig.1 Schematic of the electrospinning sample delivery system.

观测系统兼容于上海光源 BL17U1 线站测角仪平台, 显微镜通过光束同轴的反射镜观察纺丝现象, 使用 BluIce 可视化界面进行纺丝射流的定位, 电荷耦合元件 (Charge Coupled Device, CCD) 探测器型号为 ADSC Q315r; 真空系统由不锈钢钢管连接照射区绝缘真空罩和外部真空腔, 外部真空腔连接真空泵 (机械泵和分子泵) 以及真空测量仪, 真空罩两侧的通光窗由聚酰亚胺(kapton)膜密封, 以降低 X 射线的衰减程度; 静电控制系统是在 Coaxial-Mixer 处的四通管一端连接直流高压电源的正极, 内部的子液与其接触而带正电荷, 同时将连接真空罩的空心不锈钢钢管接地, 使得毛细管端口的子液与其垂直方向间距 3–5 mm 的钢管间形成静电场, 其强度由高压电源调整; 样品输送系统使用两个 0.1 mL Hamilton 注射器分别存储母液和子液样品, 其中母液是含有蛋白质微小晶体的原生长溶液, 子液是具

有一定导电性的粘稠溶液,后端的两台微流体泵(极限流量 $0.01 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) 各自控制两类溶液的流量,样品经注射器端口的连通管(美国, IDEX Health & Science 公司)可连接不同口径($5\text{--}540 \mu\text{m}$)的毛细管(美国 Molex 公司),并在四通管 Coaxial-Mixer 内实现两类溶液的同轴流动,大大缓解了接口堵塞的问题。

2 影响因素

2.1 静电纺丝形成

静电纺丝的形成主要由溶液性质(导电性 K 、质量密度 ρ 、粘度 η 、表面张力 γ)、环境变量(介电常数 ϵ 、静电场分布 E)及操作参数(流量 Q 、施加电压 V)决定,其理论模型如图 2 所示^[9]。本实验主要考虑静电纺丝形成的射流半径 R 和流速 v ,以及稳定长度 L 。静电纺丝的射流口径决定了微小晶体尺寸的适用范围和 X 射线打击位置,可控制在微米级以下,与喷嘴距离 Z 的关系见式(1)^[10];射流的流量对应不同半径的流速,影响晶体的曝光时间和命中概率;稳定射流随着长度的增加而变细,达到一定长度时细流内部的电荷排斥力会导致射流不稳定或破裂成分散的小液滴,这对 SFX 的飞秒时间脉冲有潜在价值,但对于同步辐射光束的时间尺度而言,一定长度的稳定射流更适合作为曝光区域。

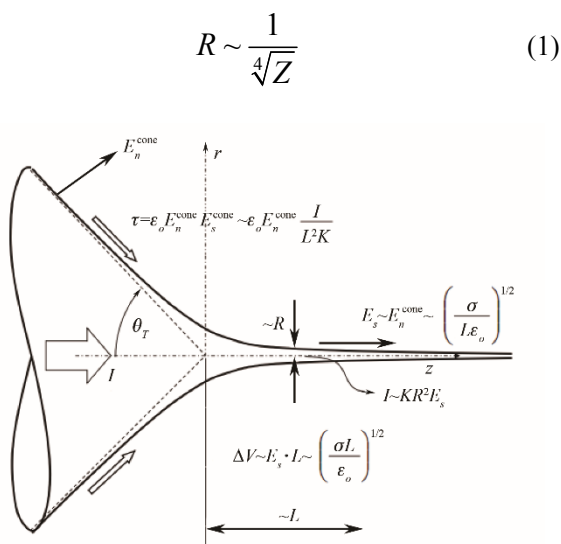


图 2 静电纺丝形成示意图
Fig.2 Sketch of electrospinning forming.

2.2 电压与流量控制

为了控制静电纺丝形成满足要求的稳定射流,根据静电纺丝理论,需要提供一个临界初始流量 $Q_{\min}$ (由溶液的性质决定);控制电压 V 在一定范围

内存在自我反馈调节机制以达到稳定;当电压超出控制范围而不能实现稳定射流时,需再调节流量 Q 、溶液性质或电极间的距离 Y 。

本实验直流高压电源控制范围在 $0\text{--}5\,000 \text{ V}$,以体积分数 30%丙三醇溶液为测试样品,采用内径 $100 \mu\text{m}$ 的毛细管,离接地端不锈钢管口间距为 3 mm ,研究了在 $0.2\text{--}1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流量内达到稳定射流的电压范围。由于导电端离端口有一定距离不能真实反映两电极端的电场强度,因此以电源读数为依据,如图 3 所示在电压升高的过程中,液滴的滴落频率加快,当达到临界电压值 $V_{\min}$ 时液面扰动消失而开始在尖端出现稳定射流;继续升高电压,圆锥液面高度降低但仍保持稳定;直到最高电压 $V_{\max}$ 时开始再次出现不稳定现象;虽再反向降低电压至滴落现象出现,其临界电压值 $V_{\min}$ 因稳定弛豫现象而比之前的值降低了 $100\text{--}200 \text{ V}$,但为了保证更好稳定性而取更小范围的控制电压域。由图 4 可知,在静电纺丝的低流量区域,随着流量增加,控制电压阈值增大且稳定范围略微扩大;同时由于丙三醇溶液导电性较差,可适当添加质量浓度 1% NaCl 以增强溶液导电性,同时有利于扩展最低流量的限制。

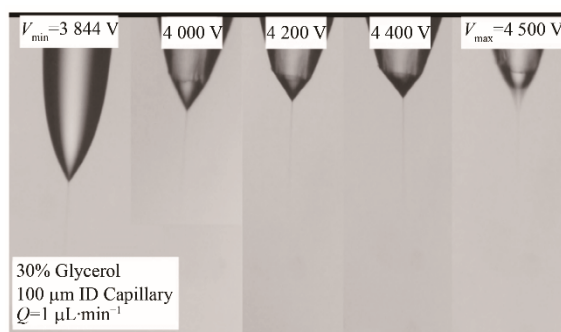


图 3 高压上升过程中的稳定射流
Fig.3 Stable electrospinning with the increasing of voltage.

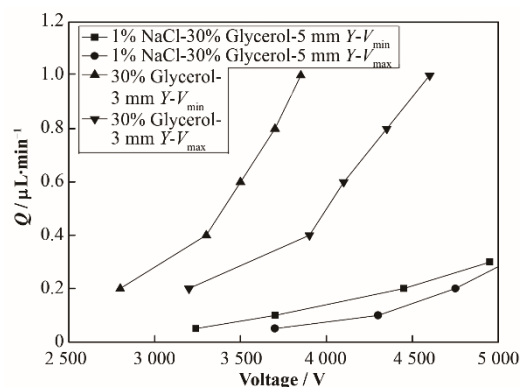


图 4 稳定射流在 $0.1\text{--}1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流量下的电压控制范围
Fig.4 Voltage range for stable electrospinning at $0.1\text{--}1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate.

除电压控制外, 流量控制也是静电纺丝应用的关键控制变量, 在 SFX 中类似的 MESH 方法已实现了 $0.14\text{--}3.1\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流量控制^[6], 这意味着样品的消耗量更少、命中效率更高以及适用的微晶尺寸更小, 因此实现静电纺丝上样系统的流量控制具有重要的实用价值。流量控制范围除了受到电压和溶液性质的影响外, 还与毛细管口径有一定关系。然而只追求更低的流量并不适合于同步辐射串行晶体学, 因为更低的流量会导致静电纺丝半径变小而流速加快, 使得微晶曝光时间缩短, 在同步辐射光通量不增加的情况下, 获取的衍射点强度满足不了要求。因此, 静电纺丝在同步辐射应用的关键是需要满足射流半径要求的前提下降低流量, 而 LCP 上样和毛细管上样能实现同步辐射的应用实质也在于它们能在低流量下依靠管壁和高粘度 LCP 的约束, 获取与毛细管口径相当的射流 (典型的 $100\ \mu\text{m}$), 以至于流速可减缓到微米每毫秒, 从而匹配探测器的毫秒曝光时间, 因此控制射流速度才是电压和流量控制的主要选择依据。

2.3 辐射剂量与流速

微小晶体的辐射剂量可由 RADD0SE-3D 软件按照不同的晶体参数、线站光束参数及曝光时间计算^[11]。以微晶样品尺寸 $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}\times 30\ \mu\text{m}$ 为示例, BL17U1 的光通量 $3.8\times 10^{12}\ \text{s}^{-1}$ ($12.4\ \text{keV}$, $240\ \text{mA}$), 聚焦光束尺寸为 $67\ \mu\text{m}\times 23\ \mu\text{m}$ ($H\times V$)^[12], 在晶体无角度偏转的理想情况下以室温 $3\ \text{MGy}\cdot\text{nm}^{-1}$ 辐射剂量为限制, 则最长曝光时间可为 $0.72\ \text{s}$ 。那么晶体的流速在光斑 $50\ \mu\text{m}$ 照射下至少需达到 $0.069\ \mu\text{m}\cdot\text{ms}^{-1}$, 显然静电纺丝流速远大于此。

对于射流的速度选择主要依据探测器的有效采集时间 T 内只出现一粒晶体的概率, 这由光斑尺度 H 、晶体尺度 S 、晶体富集度 M 以及射流半径 R 决定。无论 LCP、毛细管还是静电纺丝等约束流动方式均可简化为如图 5 所示的射流照射理想模型。假定射流半径 R 范围在 $S/2\text{--}S$, 只允许一粒晶体通过射流横截面, 则相关实验参数关系见式(2)。其中: W 代表两粒晶体间的平均间隔距离; v 表示射流速度; X 代表探测器有效时间内实际采集范围; P_1 代表探测器在有效时间范围只获取一颗晶体衍射数据的概率见式(3), 当晶体间距满足一定概率分布函数 $f(w)$ 时则概率如式(4)。对于静电纺丝射流的半径会随着长度增加而减小, 则 R 由初始位置 Z_1 到结束位置 Z_2 的加权平均取值如式(5); 晶体尺度 S 由晶体体积对应的理想球体直径取值。

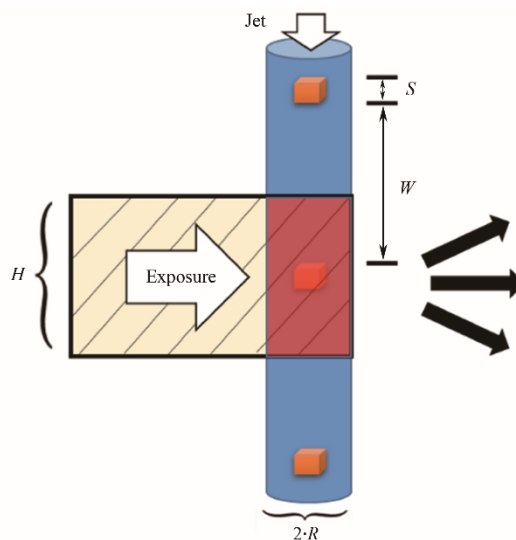


图 5 理想射流照射模型
Fig.5 Ideal model for crystal hitting.

$$\begin{cases} W = \frac{1}{\pi MR^2} - S \\ v = \frac{Q}{\pi R^2} \\ X = vT + H \end{cases} \quad (2)$$

$$P_1 = \begin{cases} \frac{S+X}{S+W} & (0 < X < W) \\ \frac{2W+S-X}{S+W} & (W < X < 2W+S) \end{cases} \quad (3)$$

$$P_1 = \frac{S+X}{S+W} \int_X^{+\infty} f(w)dw + \frac{2W+S-X}{S+W} \int_{\frac{X-S}{2}}^X f(w)dw \quad (4)$$

$$R \sim \frac{\int_{Z_1}^{Z_2} 0.25z^{-1.25}dz}{Z_1 - Z_2} \quad (5)$$

以晶体尺度 S 为 $20\ \mu\text{m}$ 为例, 流量范围 $0.1\text{--}3\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 下, 不同变量参数条件下晶体最长曝光时间 $T_{\max}$ 与流量间的关系见图 6(a), 可知其主要受到光斑尺寸和射流半径的影响。照射概率 P_1 与流量间的关系见图 6(b), 其受到的影响因素较多, 其中晶体富集度对照射概率影响起主要作用, 可作为重要的控制变量来提高命中概率。

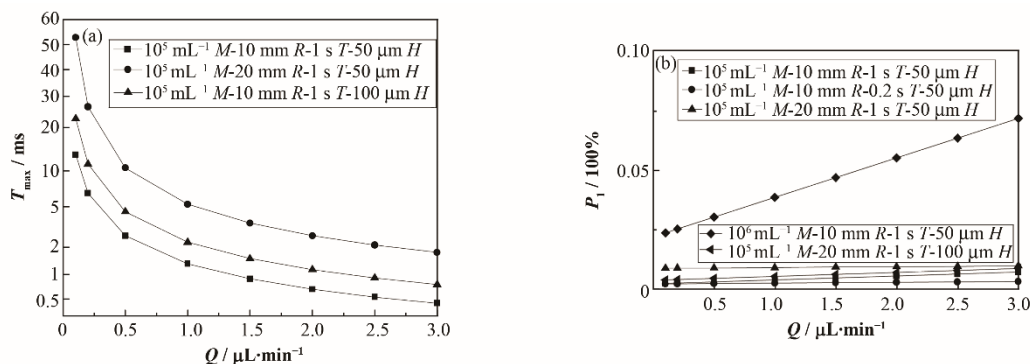


图6 不同条件下晶体最长曝光时间(a)、固有照射概率(b)与流量的关系
Fig.6 Maximum expose time (a) and intrinsic probability of hits (b) related to flow rate in different conditions.

2.4 真空与子液

静电纺丝在同步辐射上应用的最大困难在于高强度的X射线对空气等介质的电离作用严重干扰了静电纺丝所需的静电场分布,导致液滴尖端的射流失败^[7],参见图7。虽然可以通过衰减光通量和减小光斑尺寸来降低干扰,但同时也降低了衍射数据质量。因此,我们考虑通过提供真空环境(10^{-2} Pa)形成射流以消除干扰。然而水溶液样品在真空中易蒸发而凝结,且高盐度的母液在喷口处会沉淀而堵塞,导致静电纺丝的形成不稳定。为解决这些问题,本文参考同轴静电纺丝原理,配置不易蒸发的外层子液来形成静电纺丝从而保护射流中心的母液,例如常见的丙三醇、甲基丙二醇(2-Methyl-1,3-Propanediol, MPD)、聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)等实验溶剂;并且中心区的母液样品可无需带高压和添加调节剂,这使得母液可以保持样品原始生长环境,又避免了静电荷对晶体的潜在影响。

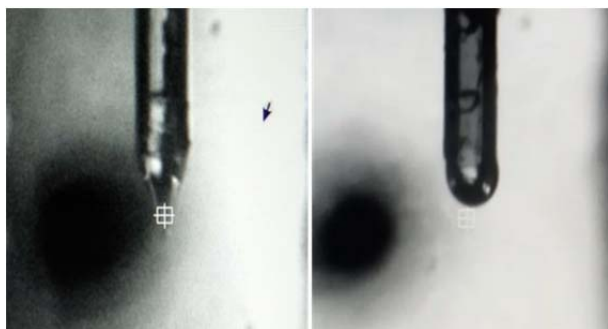


图7 静电纺丝在空气电离干扰下的变化
Fig.7 Change of electrospinning disturbed by air ionization.

子液的选择原则在于液体的粘性和可用性。首先考虑其是否能抵抗低真空,其次考虑是否与母液兼容。由于在喷口处两相流混合的时间由溶液性质

和流速等决定,因此可以在子液中添加反应物以进行不同时间尺度的结构动力学研究,这是同轴射流的一个潜在应用。其中MPD是一种理想的选择,这类溶液对附着在毛细管尖端的糖类或盐类沉淀的防护效果较佳;在流速增加情况下,高粘度的丙三醇和PEG溶液与MPD相比,保护效果是较差的;油脂类须考虑其脱气现象以及对后端真空组件的影响^[13]。

实验时采用的母液含15% NaCl,在真空中快速脱水而形成沉淀,丙三醇常作为晶体生长的沉淀剂和同步辐射晶体学中的晶体样品冷冻保护剂,并有实验观察到25%–40%丙三醇在低真空中能产生稳定的电纺丝^[14],故采取在低浓度盐溶液中添加30%丙三醇作为外层子液。

2.5 样品准备

实验样品采用SFX方法学研究常用的溶菌酶晶体作为标准样品,以便实验结果对比。将高纯度的溶菌酶($40\,000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)配置成浓度 $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,并添加 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸;母液的配制为 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸、6% PEG6000、质量浓度15% NaCl、pH 3.4。采用悬滴法结晶,液滴中蛋白溶液与母液的比例为1.5:0.5,结晶板置于 4°C 环境中,12 h后即可得到大量尺寸均匀的溶菌酶微晶样品^[15],典型尺寸是 $10 \mu\text{m}\times 10 \mu\text{m}\times 30 \mu\text{m}$,如图8所示。

根据子液的选择原则,制备的溶菌酶样品采取含有质量浓度1% NaCl和体积分数30%丙三醇的溶液作为子液,稳定时间范围在2 h,电压控制在3 000–5 000 V。该样品能在样品传输系统中长时间保持均匀性而不易在管内沉淀,对于易沉淀的样品则需额外增加摇摆仪。

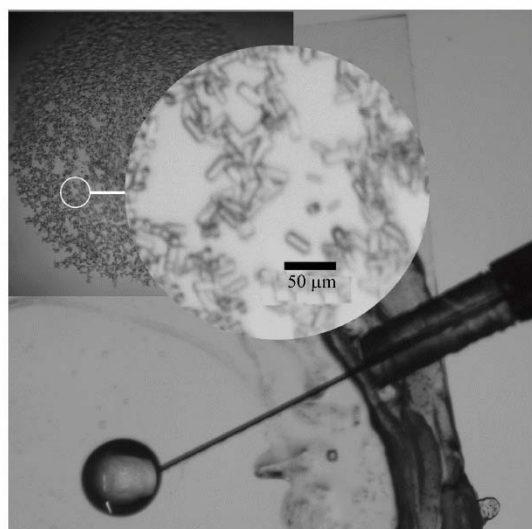


图 8 溶菌酶微小晶体样品
Fig.8 Microcrystals of lysozyme.

2.6 操作流程

样品的提取操作：首先将悬滴法生长的小液滴收集到小管中，可进一步过滤掉大颗粒的晶体，防止堵塞，本实验样品尺度均小于 $100\ \mu\text{m}$ 可不必此操作；然后按 $10^6\ \text{mL}^{-1}$ 的富集度要求，吸取上层清液或添加下槽母液，然后用 $0.1\ \text{mL}$ 的注射器直接一次吸取晶体溶液并安装在微流体泵上。在操作过程中应尽量保证样品溶液中不存留小气泡，以防阻隔子液的导电性和干扰射流的稳定。同时将配制好的子液安装在第二台微流体泵上。

连接和密封好各接口后，采用机械真空泵进行抽真空并达到稳定真空度 $10^2\ \text{Pa}$ 作为实验条件即可，也可进一步使用分子泵，以达到效果更好的超低真空要求($10^{-2}\ \text{Pa}$)。然后将导通电压设置为 $3\ 000\ \text{V}$ ，同时开启子液泵 $0.2\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ，待子液开始聚集时加大电压以实现稳定的静电纺丝，再开启样品泵 $0.2\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。前期毛细管和连接部位内的残留空气会持续产生气泡，待气泡消失稳定后在 BluIce 操作界面中确定打击位置，设置光斑大小和曝光时间，开始持续收集衍射图。如果衍射点未被观测到，则调节流量和电压来减少子液流速或增加母液流速来保证射流稳定，以获取衍射图。

2.7 实验结果

在光斑 $50\ \mu\text{m}\times 50\ \mu\text{m}$ 和曝光时间 $1\ \text{s}$ 的条件下，采用静电纺丝方法连续收集多套衍射图，并通过 BL17U1 线站上的 SpotFinder 和 ADXV 软件对衍射图的有效衍射点进行初步筛选和识别，先用 SpotFinder 初步筛选了其中 750 张连续收集的衍射

图，衍射点强度下限(spot intensity cut)设置为 40，其统计的衍射点总数统计分布如图 9 所示。总数在 300 以下的衍射图中大部分被识别的衍射点为探测器等外在因素影响下产生的干扰点，在同一位置连续重复出现，视为无效；而对衍射点总数 500 以上的衍射图的视为有效衍射，共有 8 张，故有效击中率在 1%左右。对其它多组数据进行相同处理，结果保持一致。进而用 ADXV 识别衍射点，其中参数 Min I/Sigma 值为 5，Min Spot Spacing 值为 6，对筛选出的原始衍射图进行衍射点识别，示例见图 10，单张衍射图所识别的衍射点数量在 20–30，其中存在一部分探测器噪点，空气散射和探测器本底造成的背景像素点计数在 50–70，整个衍射点的强度较弱，范围较小，不能采用现有软件进行指标化，需进一步提高信噪比和软件处理能力。

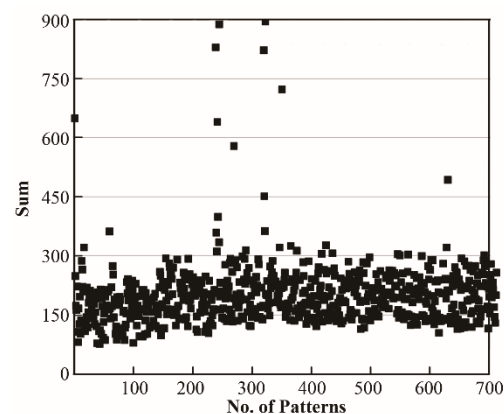


图 9 750 张衍射图的衍射点总数统计分布(静电纺丝)
Fig.9 Statistical distribution for sum of the screened diffraction points from 750 diffraction patterns (by electrospinning).

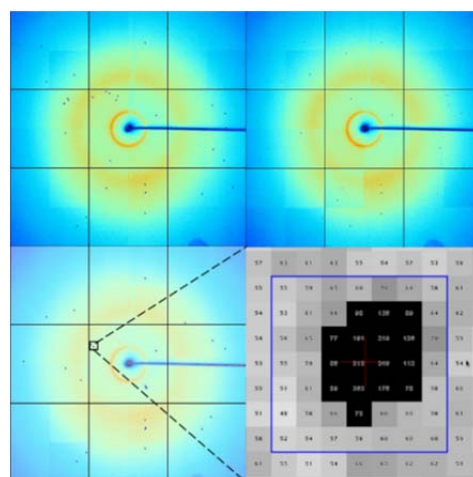


图 10 ADXV 筛选的有效衍射点示例
Fig.10 Paradigm of the selected diffraction pattern by ADXV.

同时，本实验采用了毛细管上样方式对同一批晶体样品进行对比实验。毛细管内径 $100\ \mu\text{m}$ ，在曝

光时间 1 s、光斑尺寸 100 μm 、光强不加衰减、流量 0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下连续采集衍射数据。采用相同的 ADXV 衍射点强度参数识别并统计了其中 500 张衍射图中衍射点，其总数分布结果如图 11 所示，其中 17 张为有效衍射图，但存在同一衍射图包含多颗晶体衍射点的情况，其原始衍射图识别点示例见图 12，部分衍射图可通过软件进行指标化，可分辨出溶菌酶的 P4 空间群。与静电纺丝相比，其背景强度更大，但识别的衍射点数量更多，主要由于其流速相对静电纺丝慢了 2–3 个量级，较好匹配了现有实验装置的曝光时间和探测器采集的有效时间。

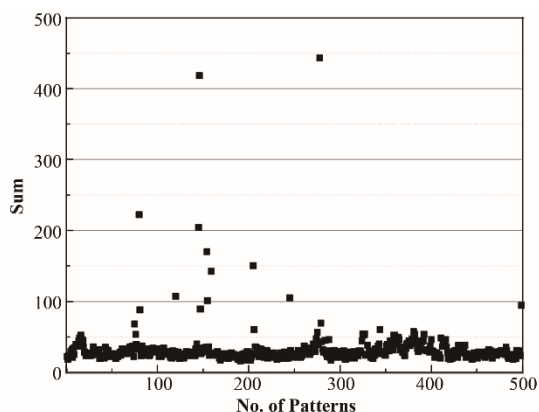


图 11 500 张衍射图的衍射点总数统计分布（毛细管）
Fig.11 Statistical distribution for sum of the screened diffraction points from 500 diffraction patterns (by capillary).

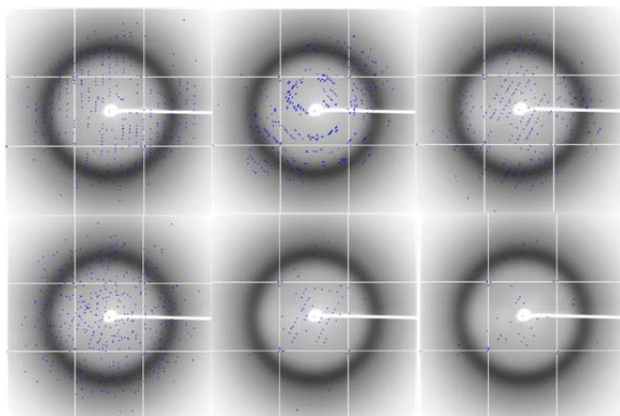


图 12 毛细管上样获得的有效衍射图示例
Fig.12 Paradigm of the selected diffraction pattern by capillary sample delivery.

通常 SFX 实验数据的后处理需要应用 CrystFEL 软件^[16]对几千张可用衍射图进行有效衍射点的筛选识别、合并和解析。由于我们实验采用的探测器有效采集时间为 0.2 s，并存在 0.95 s 的读出时间，因此相邻照射间存在 2 s 的时间间隔，严重影响击中效率并造成样品的大量浪费。假定按 1% 有效命中率，一套有效的数据至少需要 100 000 张衍射图，实验需持续 55.6 h，样品消耗量 662.4 μL 。

此外，在毫秒级时间曝光下，衍射点强度降低，与背景之间的信噪比减小而不易分辨。与毛细管上样方式的实验结果比较表明静电纺丝在速度降低两三个量级后，可能获得更多更强的衍射点，但由于最低流量和射流半径的限制，不易匹配现有探测器曝光时间；且更快的流速允许样品在曝光时间内旋转的角度更小，理论上比旋转法产生的衍射点更弱。

本实验验证了静电纺丝在同步辐射上进行串行晶体学实验的可行性，但由于现有条件的限制，击中效率及衍射图质量都有待提高。未来探测器在性能上的提升（读出速度降至毫秒级）及光斑尺寸的进一步减小，将会提高击中效率和有效衍射；通过增强光通量密度，采取真空腔以减小空气散射减少背景，可提高信噪比，使得较弱的衍射点强度增大更易识别，有利于实现更短的曝光时间和更高的命中效率，从而匹配静电纺丝射流较快的速度，缩短实验时间，减少样品消耗量，这对于实现在毫秒级及以下时间范围的、基于同步辐射的串行晶体学实验具有重要意义。

3 结语

本实验探讨了静电纺丝上样法的不同影响因素，尤其是溶液性质、电压与流量控制；并结合上海光源 BL17U1 线站平台特点，以溶菌酶为测试样品，利用同轴纺丝和加装真空腔的方式克服了 X 射线空气电离对其影响，验证了静电纺丝应用于同步辐射串行晶体学的可行性，为未来在上海光源上利用串行晶体学新方法开展蛋白质微晶体结构研究积累了经验，也为将来开展基于自由电子激光装置的串行晶体学研究提供了技术储备。

对比于同步辐射串行晶体学其它上样方法，静电纺丝除拥有串行晶体学的室温采集和辐射损伤小的特点外，其较大的流量控制范围 0.1–3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 能满足 10 nm–10 μm 较大范围的微小晶体；真空环境避免了空气电离的干扰，而采用同轴纺丝不仅克服真空和高压对晶体的影响，且能保持样品原生环境，扩大了该方法对高要求样品的适用范围，并具有在子液中添加反应剂来研究蛋白结构动力学的潜力；此外，与 LCP 和毛细管相比，该方法有更小的衍射背景，尽管流速较快，但随着探测器的性能提升和光通量的增强，可以弥补对低流速的要求以提升命中效率和减少实验时间。当然，由于该方法影响因素较多，没有固定参考标准和方案以适应不同条件微小晶体要求，对真空环境下稳定射流控制时间需进一步提高，静电纺丝上样装置仍然需要进一步改良和完善。

面对未来同步辐射更高强度更小光斑的发展趋势, 以及探测器性能的突破, 同步辐射串行晶体学将在结构生物学上发挥更重要的作用。

致谢 感谢西北工业大学尹大川教授课题组对本实验的支持与帮助。

参考文献

- 1 Stellato F, Oberthur D, Liang M N, *et al.* Room-temperature macromolecular serial crystallography using synchrotron radiation[J]. *International Union of Crystallography Journal*, 2014, **1**(6): 204–212. DOI: 10.1107/S2052252514010070.
- 2 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.
- 3 Deponte D P, 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.
- 4 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.
- 5 Sierra R G, Laksmono H, Kern J, *et al.* Nanoflow electrospinning serial femtosecond crystallography[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2012, **68**(11): 1584–1587. DOI: 10.1107/S0907444912038152.
- 6 Heymann M, Opatthalage A, Wierman J L, *et al.* Room-temperature serial crystallography using a kinetically optimized microfluidic device for protein crystallization and on-chip X-ray diffraction[J]. *International Union of Crystallography Journal*, 2014, **1**(5): 349–360. DOI: 10.1107/s2052252514016960.
- 7 Chavas L M G, Gumprecht L, Chapman H N. Possibilities for serial femtosecond crystallography sample delivery at future light sources[J]. *Structural Dynamics*, 2015, **2**(4): 041709. DOI: 10.1063/1.4921220.
- 8 Nogly P, James D, Wang D, *et al.* Lipidic cubic phase serial millisecond crystallography using synchrotron radiation[J]. *International Union of Crystallography Journal*, 2015, **2**(2): 168–176. DOI: 10.1107/S2052252514026487.
- 9 Ganan-calvo A M, Montanero J M. Revision of capillary cone-jet physics: electrospray and flow focusing[J]. *Physical Review E*, 2009, **79**(6): 066305. DOI: 10.1103/PhysRevE.79.066305.
- 10 Shin Y M, Hohman M M, Brenner M P, *et al.* Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities[J]. *Polymer*, 2001, **42**(25): 9955–9967. DOI: 10.1016/S0032-3861(01)00540-7.
- 11 Zeldin O B, Gerstel M, Garman E F. RADDOS-3D: time- and space-resolved modelling of dose in macromolecular crystallography[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2013, **46**(4): 1225–1230. DOI: 10.1107/S0021889813011461.
- 12 Wang Q S, Yu F, Huang S, *et al.* The macromolecular crystallography beamline of SSRF[J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2015, **26**(1): 010102. DOI: 10.13538/j.1001-8042/nst.26.010102.
- 13 Sierra R G, Gati C, Laksmono H, *et al.* Concentric-flow electrokinetic injector enables serial crystallography of ribosome and photosystem II[J]. *Nature Methods*, 2015, **13**(1): 59–62. DOI: 10.1038/nmeth.3667.
- 14 Ku B K, Kim S S. Electrohydrodynamic spraying characteristics of glycerol solutions in vacuum[J]. *Journal of Electrostatics*, 2003, **57**(2): 109–128. DOI: 10.1016/S0304-3886(02)00106-7.
- 15 Falkner J C, Al-somali A M, Jamison J A, *et al.* Generation of size-controlled, submicrometer protein crystals[J]. *Chemistry of Materials*, 2005, **17**(10): 2679–2686. DOI: 10.1021/cm047924w.
- 16 White T A, Kirian R A, Martin A V, *et al.* CrystFEL: a software suite for snapshot serial crystallography[J]. *Journal of Applied Crystallography*, 2012, **45**(2): 335–341. DOI: 10.1107/S0021889812002312.