

國家同步輻射研究中心高效能蛋白質結晶學設施之發展現況

Current Status of Crystallography Beamlines and End Stations at NSRRC

趙俊雄、簡玉成

Chun-Hsiung Chao, Yuch-Cheng Jean

蛋白質結晶學是鑑定生物分子三度空間結構的最有力工具之一，配合同步輻射光的高亮度及能量可調性，可以大幅提昇生物分子的結構鑑定速度，足以滿足基因體學及藥物設計等需要大量分子結構資料等研究的需求。為此，國家同步輻射研究中心特別興建兩座高效能蛋白質結晶學光束線，其中一座為針對未知蛋白質結構解析用途，能量範圍從 6.5 至 19 仟電子伏特 (keV) 之多波長異常繞射 (MAD) 光束線，另一座為供晶體篩選、藥物設計以及高解析度結構分析用，能量為 12 至 14 仟電子伏特之單色光 (mono) 光束線。使用最成熟可靠的光束線技術，配備最先進的面積偵測器系統、高速高效能的計算及網路環境、自動化的樣本裝卸系統，及友善的數據收集與控制系統，MAD 光束線一年約可收集 800 組 MAD 數據，單色光光束線一年約可收集 1200 組高解析度數據。

Protein crystallography is one of the most powerful and dominant tools to determine the three-dimensional structures of biological macromolecules today. In order to increase the rate of crystal structure determination, the highly brilliant and easily tunable synchrotron radiation (SR) X-ray source is essential to meet the needs of abundant structural information for studying structural genomics and structural-based drug designs. To satisfy these requirements, the National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC) has constructed two dedicated Synchrotron Radiation Protein Crystallography Facility (SPXF) high-throughput beamlines for structural genomics research. One of the beamlines will be a multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) beamline with energy tunability from 6.5 keV to 19 keV for unknown structure determinations, and the other will be a monochromatic (mono) beamline with energy from 12 keV to 14 keV for crystal screening, drug design and high-resolution structure studies. The well-developed light source technique, advanced area detectors, high-efficient computing and network environments, automatic crystal sample changing and centering, and user-friendly data collection and control systems will produce 800 MAD data set per year for MAD beamline and 1200 useful data sets per year for mono beamline.

一、前言

DNA 序列決定了組成蛋白質的氨基酸鏈，而鏈的摺疊方式則決定了蛋白質的結構。基因解碼的一個重要目的就是要了解基因產物 (大部分是蛋白質) 的功能^(1,2)。結構基因體學採用蛋白質結晶學來決定蛋白質的立體結構，以期了解蛋白質的功能。由於整個基因體的產物數量龐大，結構基因體學必須能夠在一定時間內，決定足夠數量的蛋白質結構。蛋白質結晶學設施在這樣龐大的計畫中，必須能夠提供精確度很高的數據，數據收集的速度也必須夠快，而多波長異常吸收繞射 (multi-wavelength anomalous diffraction, MAD) 實驗⁽³⁻⁶⁾ 更是必須要具備的能力。

隸屬於國家科學委員會基因體醫學國家型計畫⁽⁷⁾ 的同步輻射蛋白質結晶學設施 (SPXF)，為一座高效能蛋白質結晶學實驗站，擁有晶體篩選、數據收集以及結構分析的能力。不論是 MAD 實驗、SAD 實驗或是傳統繞射實驗，都可以在較短的時間內完成，完全滿足了結構基因體學的需求。

SPXF 依功能可區分為三個重要部分，以下分別介紹。

二、SPXF 簡介

1. 超導增頻磁鐵

SMPW⁽⁸⁾ (super multi pole wiggler) 磁鐵擁有 28 個磁極，磁場強度為 2.3 T (tesla) (圖 1)，產生的光源可供三條光束線使用。傳統 1.2 T 磁鐵可將同步

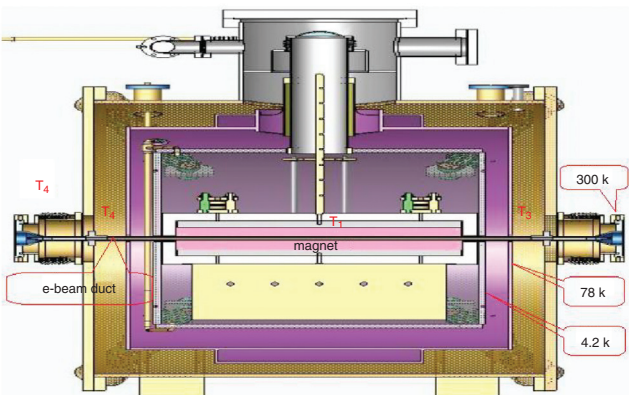


圖 1.28 極、2.3 T 超導增頻磁鐵。

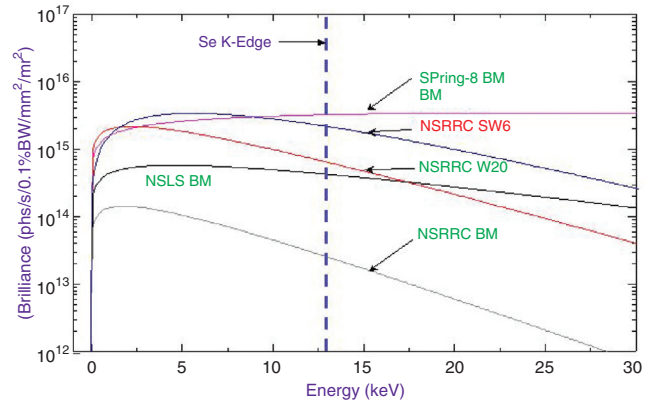


圖 2. SMPW 光源輝度圖譜。

輻射臨界能量提高到 2.14 keV，超導磁鐵則可提高至 4.82 keV，所產生的 X 光能量可達 19 keV，光亮度超過 10^{15} phs/s/0.1% $(\Delta\lambda/\lambda)$ /mm²，效能接近世界上其他第三代同步輻射 X 光光源 (圖 2)。

2. 光束線

同步輻射光由增頻磁鐵產生後，就會通過一條充滿光學元件以及各種裝置的通道，也就是所謂的光束線。這些光學元件以及裝置的目的主要有：(1) 降低電磁波攜帶的熱量、(2) 改變光的方向、(3) 改變光的散度、(4) 改變光的波長分布，以及 (5) 改變光的空間分布。

SPXF 擁有兩條高效能光束線，其中一條為 MAD 光束線，另外一條則為單光光束線。

(1) MAD 光束線 (13B1)

光束線能量範圍為 6–19 keV，涵蓋大部分重要的重原子吸收能量，非常適合多波長異常繞射實驗。

光束線本身包含一個準直鏡 (collimating mirror)、一個雙晶單光器 (double crystal monochromator) 以及一個水平聚焦鏡⁽⁹⁻¹¹⁾ (focusing mirror) (圖 3 及圖 4)。

準直鏡是一個塗佈銠⁽¹²⁾ 元素 (Rh，吸收邊為 23.22 keV) 的圓柱鏡，目的是把原來發散的光轉變為平行光。同步輻射光在垂直電子軌道的平面上之張角為 $2/\gamma$ ，其中，

$$\gamma = \frac{E}{m_e c^2}$$

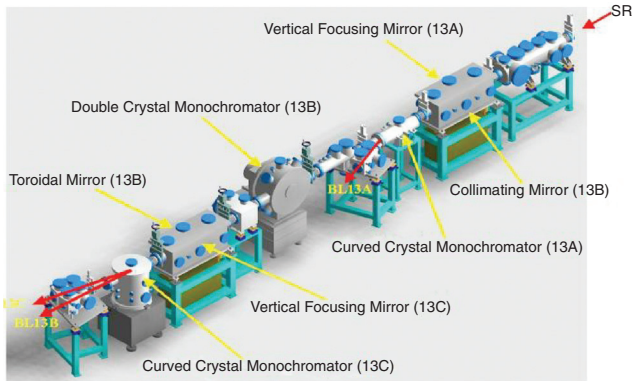


圖 3. 高效能蛋白質結晶學光束線。

E 為儲存環電子能量， m_e 為電子靜止質量， c 為光速 ($m_e c^2 = 0.51 \text{ MeV}$)。國家同步輻射研究中心同步輻射光的垂直張角約為 0.68 mrad 。

由於圓柱鏡只有一個曲率半徑，因此只能改變垂直 (或水平) 方向的散度。13B1 的準直鏡除了可以消除垂直張角之外，還具有過濾高能量電磁波的能力。

同步輻射光的波長範圍很廣 (見圖 2)，必須先轉變成單一波長的光才能進行繞射實驗。得到單一波長的方法很多，其中一種是利用完美單晶 (例如矽或鍺單晶) 在特定方向產生繞射光。根據布拉格繞射定律：

$$2d \sin\theta = \lambda$$

因為 d 固定，只要改變光入射晶體的角度 θ ，就可以得到不同波長的光。為了不讓繞射光的方向以及位置隨著晶體的旋轉而改變，我們使用了第二塊晶體 (與第一塊同樣的單晶)，這塊晶體在旋轉過程中始終與第一塊晶體平行，因此經過單光器的 X 光可以保持固定的方向以及位置，缺點是會損失一些

光通量。BL-13B 使用的雙晶單光器⁽¹³⁻¹⁶⁾ 使用矽單晶以及 (1, 1, 1) 繞射面來產生單色光。單色光能量解析度約為 2.2×10^{-4} 。

單光器產生的單色光在垂直電子軌道面的方向是平行光，但是在水平方向的散度很大 (3 mrad)，因此需要再用一面鏡子來聚焦。BL-13B 的聚焦鏡是鍍銻的橢圓面鏡，這面聚焦鏡擁有兩個曲率半徑，可以同時改變垂直以及水平方向的光散度。聚焦鏡的物距/像距比為 $2:1$ ^(17,18)。

(2) 單色光光束線 (13C1)

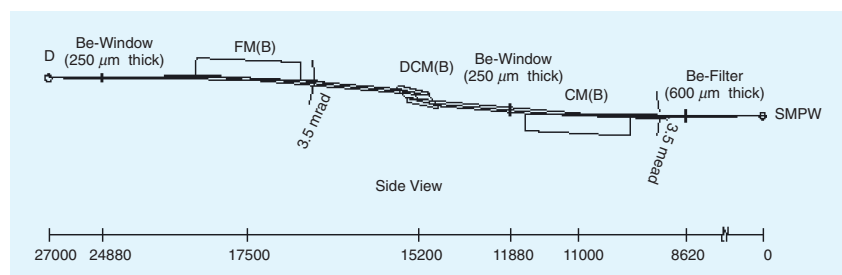
光束線能量固定，有三種能量可供選擇，分別為 12.4 keV 、 12.7 keV 及 13.4 keV 。適合高解析度繞射實驗，以及硒 (Se) 和溴 (Br) 的 SAD 實驗^(19,20)。光束線組成元件包括一個垂直聚焦鏡以及一個彎曲晶體單光器 (asymmetric-cut curved crystal monochromator, ACCM)⁽²¹⁾。單光器同時也具有水平聚焦功能。

3. 實驗站

X 光由光束線通過鉍窗進入實驗站，經過一些可以定義光大小的狹縫組或是準直器，打擊到樣品 (如蛋白質晶體) 上，產生繞射光，最後被 X 光偵測器吸收。

由於 X 光的空氣吸收率與能量有關，能量越低，被吸收的就越厲害，因此實驗站內的第一個裝置是一段可以抽真空或是充入其他氣體 (如氬氣) 的管路 (front end)，除了可降低空氣吸收外，也可以降低/隔絕空氣散射，減少 X 光偵測器上接收到的背景量。接著是狹縫組或是準直器，以及光束線檢測裝置，通常是使用氣體離子腔 (ion chamber) 來偵測光通量。

圖 4. BL-13B1 光束線。



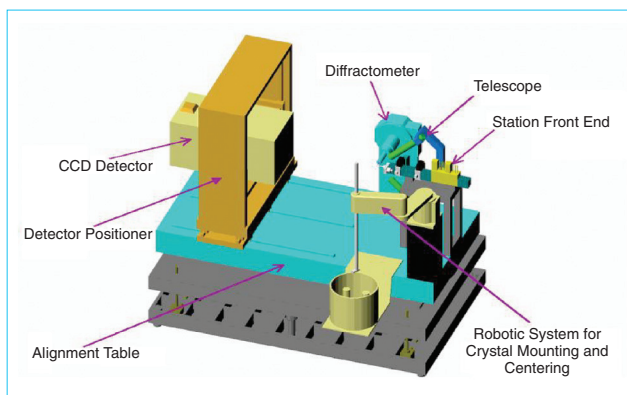


圖 5. SPXF 實驗站。

蛋白質晶體在受到輻射照射時，分子間的鍵結會因為受熱或是受到自由基撞擊而斷裂，造成輻射傷害。為了延長晶體的壽命，在實驗過程中，需要利用低溫的乾燥氣體 (如低溫氮氣) 不斷的冷卻晶體。SPXF 實驗站採用日本 Rigaku/MSK 製造的 XStream-2000 冷凍設備，吸附除去空氣中的水氣及氧氣，並壓縮空氣中的氮氣到接近液態氮的溫度，透過噴嘴吹到晶體上。

實驗站中最重要的部分之一是繞射儀 (diffractometer)，包括一個或多個不同旋轉方向的軸，可以讓晶體在空間中自由旋轉。另外一個重要的部分則是 X 光偵測器 (X-ray detector)，可以縱向 (沿著光的方向) 以及橫向移動 (沿著水平以及垂直方向)。繞射儀以及偵測器之間的關係，在實驗過程中必須保持剛性，因此還需要一個穩定性很高的實驗桌 (alignment table)。現代的自動化實驗站還配備一個可以自動裝配晶體的機械手臂 (robotic system for crystal mounting and centering)。圖 3 為 SPXF 實驗站示意圖。SPXF 的繞射儀皆採用德國 Huber 單軸高解析度繞射儀，實驗桌材質為大理石，可隔絕震動，以及減少桌上設備移動所造成的變形量。

(1) MAD 實驗站

樣本位置距離光源 27 公尺，當 X 光能量為 12.65 keV 時，樣本位置的光通總量為 4×10^{12} phs/s/0.1% $(\Delta\lambda/\lambda)$ ，與 ray tracing 的計算結果相當。樣本位置光通量與能量的關係請見圖 6，樣本位置

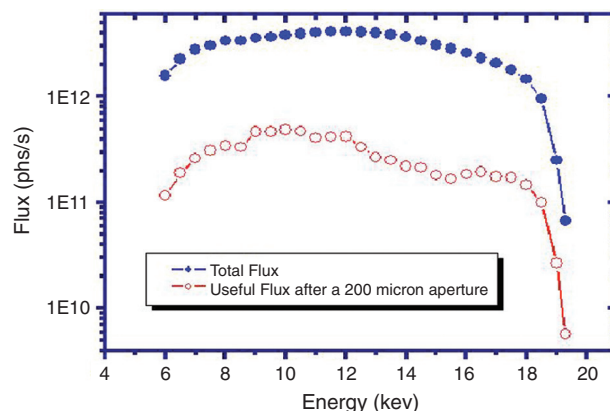


圖 6. 樣本位置光通量與能量的關係。藍線為光通總量，紅線代表通過 200 μm 針孔的可用光通量。

光外形請見圖 7。

X 光偵測器採用美國 ADSC 公司出產的 Quantum315 電荷耦合 (charge-coupled device) 面積偵測器。這個偵測器具有正方形的表面，可用範圍為 315 mm \times 315 mm，讀取速度 < 2 s，於採購當時堪稱為全世界面積最大、讀取速度最快的 X 光偵測器。

(2) 高解析度繞射實驗站

樣本位置距離光源 21.75 公尺，使用的 X 光偵測器為美國 ADSC 公司出產的 Quantum210 電荷耦合面積偵測器，可用面積為 210 mm \times 210 mm，讀取速度 < 2 s。本實驗站與光束線正進行試俾工作，預計於 2006 年開放使用。

4. 電腦網路系統

由於光源強度強，因此使用者可以在更短的時間內收到大量的數據，密集的資料傳輸加上繁重的電腦運算工作，電腦網路系統的好壞會嚴重影響到實驗站整體的效能。

SPXF 實驗站使用六部 sgi 雙 CPUs Octane2 工作站，提供圖形使用者介面，執行光束線以及實驗站控制軟體；四部 sgi 四 CPUs Origin 350 工作站負責執行各項服務；一部 8 CPUs Origin 3800 伺服器，執行資料分析、3-D 繪圖以及結構鑑定工作；以及一部 2 TB 磁碟陣列。檔案系統使用 sgi CXFS

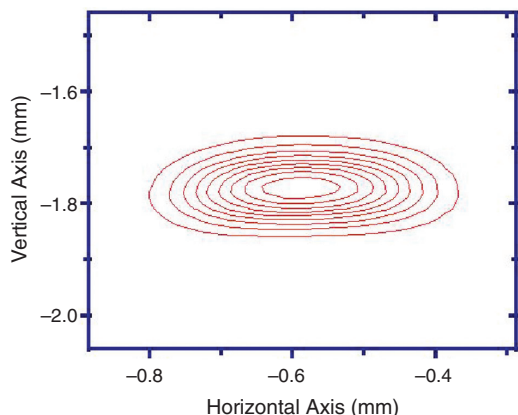


圖 7. 樣本位置光強度在水平及垂直的等強分布圖。水平方向大小為 $650 \mu\text{m}$ ，垂直方向大小為 $300 \mu\text{m}$ 。

(clustered XFS)，叢集中的工作站則透過 SAN (storage area network) 架構存取磁碟陣列中的資料。

SAN 使用 SCSI 協定透過光纖存取硬碟上的資料，與其他網路磁碟架構 (如 NAS) 比起來，有更高的穩定性、更好的可靠性，以及更好的傳輸品質。CXFS 則提供了即時的檔案共享，叢集上的使用者可以在任何時間得到並處理他們想要的檔案。整個叢集檔案系統提供的資料處理速度超過其他傳統的方法，例如 NFS 和 FTP，解決了龐大系統下檔案共享的許多問題。

5. 控制以及分析軟體

我們選擇由美國史丹佛大學所研發的 BLU-ICE/DCS 軟體⁽²²⁾ 作為實驗控制介面。BLU-ICE/DCS 是一個整合性軟體，透過單一使用者介面可控制光束線以及實驗站上所有的硬體，可減輕使用者的學習負擔。這套軟體採用分散式架構，各元件之間使用的是訊息傳輸協定，而不是傳統的伺服/客戶協定，因此即使使用者將控制介面關閉，也不會導致實驗工作停頓。此外，BLU-ICE (BLU-ICE/DCS 系統的圖形使用者介面) 可以在網路上的任何地方執行，很適合使用在遠距合作的計畫中，例如在美國芝加哥大學的研究者可以透過安裝在她的電腦上的 BLU-ICE 即時監看，甚至控制目前正在同步輻射中心進行的實驗。

實驗資料的分析是蛋白質結晶學繞射實驗進行當中極為重要的一個步驟。透過資料分析，使用者可以決定是否要繼續進行實驗、修改實驗參數、或是更換到下一個實驗計畫。分析實驗資料的軟體並不多，常用的有美國 HKL 公司⁽²³⁾ 出品的 HKL 以及 HKL2000、英國的自由軟體 Mosflm、日本 Rigaku/MSK 的 CrystalClear 等等。有鑒於國人的使用習慣，SPXF 使用 HKL 以及 HKL2000 來分析實驗資料。

6. 用戶支援

對外來的使用者而言，同步輻射中心是一個既陌生又不友善的地方，在這裡他們不僅要儘快的熟悉環境，還要不停的工作，以免重要的實驗還沒做完，時間就用完了。遇到問題時，更是要能夠立刻就解決，因此壓力頗大，甚至大部分時間裡，研究人員的心力都花在與研究無關的事情上。這時候，如果有熟悉同步輻射各種設施的人員幫忙，會讓整個實驗的進行更有效率。

用戶支援是國家同步輻射研究中心蛋白質繞射小組的重要工作之一 (另外一個工作是維護並改進實驗設備)，目前成員為 6 人，其中 3 人為資深人員，並有 3 名新進人員正在接受訓練。3 名資深人員從儀器設備到實驗資料的分析可說是駕輕就熟，也是整個蛋白質結晶學核心設施計畫成功的重要因素。

三、未來發展

光源光度強，再加上讀取速度快、產生影像龐大的偵測器，使得繞射實驗本身所佔用的時間遠小於其他例行工作，例如樣品裝配、樣品位置調整 (讓樣品位於 X 光的中心)，以及決定實驗參數所花費的時間。為了讓實驗站產生最好的使用效率，所有的例行工作都應該盡量自動化，也就是所有動作都由軟體以及硬體自動完成，而不需要人為操作。

SPXF 預計於今年開放樣品裝配及樣品位置調整自動化，以及實驗中自動取得螢光光譜、自動調整實驗桌以取得最佳 X 光光通量等自動化工作。而晶體自動篩選以及決定實驗參數的專家系統目前

正在研發當中，希望在不久的將來就能正式上線服務。自動化是高效能結構基因體計畫非常重要的一部分，也是國家同步輻射研究中心蛋白質繞射小組研究發展的重心。

參考文獻

1. S.-H. Kim, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, Suppl: 643 (1998)
 2. D. Baker and A. Sali, *Science*, **294**, 93 (2001)
 3. W. A. Hendrickson, J. L. Smith, and S. Sheriff, *Methods Enzymol.*, **115**, 41 (1985).
 4. W. A. Hendrickson, *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.*, **21**, 11 (1985).
 5. W. A. Hendrickson, *Science*, **254**, 51 (1991).
 6. J. Karle, *International Journal of Quantum Chemistry, Quantum Biology Symposium 7*, 357 (1980).
 7. NRPGM could be reached at the following site:
<http://genmed.sinica.edu.tw>
 8. C. S. Hwang, *et al*, *SRRC internal report*.
 9. Z. Hussain, E. Umbach, and D. A. Shirly, *Nucl. Instrum. Methods*, **A195**, 115 (1982).
 10. M. J. Van Der Hoek, W. Werner, and P. Van Zuylen, *Nucl. Instrum. Methods*, **A246**, 190 (1986).
 11. H. A. Padmore, A. C. Thompson, and F. Jun, *Nucl. Instrum. Methods*, **467**, 650 (2001).
 12. A. I. Mahan, *J. Opt. Soc. Am.*, **46**, 913 (1956).
 13. J. Feldhaus, *SPIE*, **733**, 242 (1986).
 14. C. J. Sparks, *BNL Report 20740* (1979).
 15. R. Tatchyn and I. Lindau, *SPIE*, **315**, 44 (1981).
 16. J. R. Helliwell, *Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation*, Cambridge University Press, Cambridge (1992).
 17. T. E. Dann, *et al*, *SRRC Internal Report SRRC/RBM/IM/94-07* (1994).
 18. H. Padmore, *Internal ALS Note* (2000).
 19. B. C. Wang, *Methods Enzymol.*, **115**, 90 (1985).
 20. C. Yang, J. W. Pflugrath, D. A. Courville, C. N. Stence, and J. D. Ferrara, *Acta Cryst.*, **D59**, 1943 (2003).
 21. M. Sanchez del Rio and F. Cerrina, *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 936 (1992).
 22. <http://smb.slac.stanford.edu/public/research/developments/blu-ice/>
 23. <http://www.hkl-xray.com/>
-

- 趙俊雄先生為國立清華大學物理博士，現任國家同步輻射研究中心助研究員。
- 簡玉成先生為淡江大學化學博士，現任國家同步輻射研究中心副研究員。
- Chun-Hsiung Chao received his Ph.D. in physical from National Tsing Hua University. He is currently an assistant scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Yuch-Cheng Jean received his Ph.D. in chemistry from Tamkang University. He is currently an associate scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.