

文章编号: 1004-0374(2009)01-0028-07

同步辐射方法在生命科学中的应用

黄 胜, 何建华*

(中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

摘 要: 同步辐射方法在生命科学研究中有着十分重要的应用。上海光源是我国建造的第三个第三代同步辐射装置, 本文结合上海光源首批建造的光束线站, 介绍了几类同步辐射实验方法在生命科学中的应用。

关键词: 同步辐射; 上海光源; 生命科学

中图分类号: 0657.39; Q-331 文献标识码: A

The application of synchrotron radiation methods in life sciences

HUANG Sheng, HE Jian-hua*

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

Abstract: Synchrotron radiation techniques have been widely used in the research of life sciences. Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF) is the third generation synchrotron radiation source under construction in China. Phase I beamlines at SSRF have been constructing, it and their applications in life sciences have been briefly introduced in this article.

Key words: synchrotron radiation; SSRF; life science

同步辐射装置是利用电子在磁场中做加速运动产生同步辐射光的大型科学实验装置。同步辐射光波段很宽, 可以覆盖从远红外到 X 光的宽广范围, 是探测微观物质结构的强有力工具。目前世界上的同步辐射装置总数已经达到 69 个, 主要分布在美国、欧洲以及日本, 仅美国就有 18 个同步辐射装置(数据来源于<http://www.lightsources.org/cms/>)。而中国目前仅有三个同步辐射装置, 它们分别是北京同步辐射装置、合肥同步辐射装置以及正在建造的海上同步辐射装置。北京同步辐射装置是第一代同步辐射装置, 它的主要用途是进行高能物理实验, 每年仅有 2—3 个月的时间用于同步辐射。合肥同步辐射装置是第二代同步辐射光源, 电子加速器能量较低, 为 800MeV, 主要用于产生真空紫外波段同步辐射。上海同步辐射装置是我国在建的第一个具有世界先进水平的第三代同步辐射装置, 其主要参数见表 1。

同步辐射在生命科学中的应用涵盖很多方面, 包括结构分子生物学、微生物学、药理学、细胞

表1 上海光源参数表

Energy	3.5GeV
Circumference	432m
Lattice	DBA
Number of Cells	20
Straight Sections	4×12m, 16×6.50m
Current	200—300mA
Emittance	3.9 nm-rad
Lifetime	>10hrs (Top-up injection available later)
Beam position stability	<±10% (<±3μm)

生物学、生物医学等等。从分子水平研究生命科学是目前生命科学研究的热点。利用生物大分子晶体学的方法来解析生物大分子的三维空间结构, 并由三维空间结构来研究其功能就是目前生命科学研究的重点方向。在同步辐射装置上也还有许多其他方法或者可以用做生物大分子晶体学方法的补充, 或

收稿日期: 2009-02-15

*通讯作者: hejh@sinap.ac.cn

者可以单独进行生物大分子结构与功能的研究, 如 X 射线小角散射法可以测定低分辨的大分子结构, 结合高分辨的晶体学数据就可以得到蛋白质分子的精细结构, 而且小角散射法还可以单独用来测定蛋白质分子在溶液状态时的分子外形。而利用 EXAFS 法, 结合晶体学方法测定的分子结构, 可以更精确地测定蛋白质中所含金属元素的价态、键长等信息, 其键长测定精度可达 0.1 \AA 以上。其他方面比如软 X 射线谱学显微技术可以研究自然状态下的细胞结构和功能关系等等。总之, 同步辐射装置作为一个大型的科学实验装置, 可以为生命科学提供多种多样的实验方法和研究手段, 是生命科学的一个重要的研究平台。

1 应用于生命科学研究的同步辐射实验方法

应用于生命科学研究的同步辐射实验方法主要是通过构成生命体的物质对 X 光的散射及吸收等相互作用来进行科学研究。散射有两种类型: 一种是特殊的散射, 即包括衍射和衍射成像; 另一种是一般的散射, 包括小角散射、广角散射、漫散射、磁散射、非弹性散射、散射(折射)成像等等。吸收主要包括利用吸收谱、吸收成像以及吸收效应、光致发射等等方法。

1.1 生物大分子晶体学 生物大分子晶体学是目前从分子水平研究生命科学的主要方法之一。它主要是利用生物大分子晶体对 X 光的衍射来进行生物大分子的三维结构研究。自从 20 世纪 60 年代血红蛋白结构被解析出来至今已经有将近 60 年的历史。随着同步辐射技术的发展, 生物大分子晶体学取得了极大的发展。高亮度的同步辐射 X 光能够从很小的大分子晶体采集足够的高质量衍射数据来进行三维结构解析, 极大地加强了生物大分子晶体学的研

究功能。同时利用同步辐射能量可调的独特优点, 发展出来的反常散射法更是大大提高了生物大分子晶体学三维结构解析的成功率。

要得到生物大分子的三维空间结构, 首先要对所研究的目标生物大分子进行分离纯化, 然后再结晶, 得到合适的晶体样品后才能到同步辐射光源来进行生物大分子晶体学衍射实验。通过生物大分子晶体的衍射实验, 采集其衍射图, 从而获得生物大分子晶体每个倒易空间点的结构振幅, 再用各种方法解得其相位, 根据结构振幅及相位就可以得到结构因子, 然后通过傅立叶变化就可以解析出生物大分子的三维空间结构。

目前通用的衍射数据采集方法是单轴旋转法, 即生物大分子晶体样品沿一个轴旋转, 同时使用面探测器记录不同旋转角度(一般每旋转 1° 采集一幅衍射图)的衍射图(图 1)。从记录到的晶体衍射数据, 还不能直接得到晶体的三维结构, 需要先确定衍射相位。目前解相位的方法主要有三种: 分子置换法(MR)^[1]、反常散射法(MAD, SAD)^[2,3]及同晶置换法^[4]。不同的相位解析方法对衍射数据的要求不同。同晶置换法由于使用浸泡法制备高同晶型晶体较为困难且费时费力, 已经较少使用。分子置换法和同晶置换法对 X 光能量分辨率的要求都不高。多波长反常散射法因为需要在反常散射原子吸收边附近以相差几个电子伏特的能量分别采集两套数据, 对能量分辨率的要求较高($\sim 10^{-4}$)。因此能够进行多波长反常散射实验的实验站都能够进行其他类型的实验。

1.2 X 射线吸收精细结构谱学(XAFS) 当入射原子上的 X 光能量高于原子内壳层电子的跃迁能量时, 就会有一定几率将原子内壳层电子激发到高能状态, 此

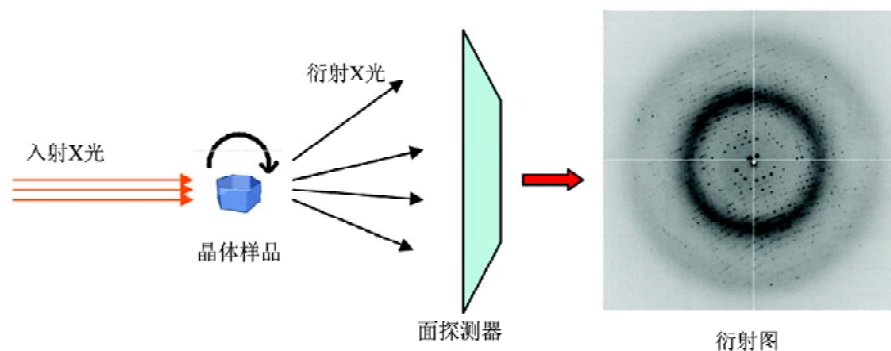


图1 旋转法采集衍射数据

时内壳层就会有空位,高壳层电子会向下跃迁以降低能量而达到稳定状态,两个壳层能量之差以荧光的形式散出,利用这种光电效应的方法就是X射线吸收精细结构谱(XAFS)谱学(图2)。它是随着同步辐射装置的发展而成熟起来且用途十分广泛的实验技术,是研究物质结构非常重要的方法之一^[5]。该技术的主要特点是能够在固态、液态等多种条件下研究原子(或离子)的近邻结构和电子结构。

X射线吸收精细结构谱学在生命科学中的应用(BioXAS)主要是进行金属蛋白的研究^[6,7]。金属蛋白中所含的金属一般都具有重要的作用,大概有30%的蛋白中含有金属元素,30%—50%的酶蛋白中含有金属。BioXAS可以研究生物大分子中的金属原子周围的精细结构信息,能够准确地确定金属蛋白中金属离子的价态、金属离子与配体(ligand)结合的配位数、键长及配体识别等,其键长测定精度可达0.1Å以上,比用晶体学方法测量要高出一个数量级,是修正晶体学测量误差及精化晶体结构模型的重要补充信息,可为蛋白质功能阐述提供较为直接的信息。BioXAFS还能获取反应中间态结构信息,这些中间态往往无法或很难通过结晶的方法来研究^[8]。此外极化EXAFS测量可以获得键角信息。X射线吸收精细结构谱学的实验方法主要包括透射法和荧光法。透射法通常选用电离室作为探测器。用光强响应函数相同的两个电离室分别探测入射光强和透射光强,入射光强的波动便很容易消除。透射法适用于高浓度的样品。当样品浓度比较低时,比如蛋白质溶液样品,此时XAFS信号比较低,可以采取测量荧光信号,由于荧光信号与吸收系数成比例,由此也能得到XAFS谱。测量荧光信号主要是利用高能量分辨率的多元固体探测器。

1.3 X射线小角散射(SAXS) X射线小角散射是指发生在原光束附近小角度范围内($0 \leq 2\theta \leq 3-5^\circ$)的电子相干散射现象,起源于样品内部电子密度的均方起伏。根据相干散射强度曲线,可获得颗粒的形状信息,其结构尺度为1—1000nm。针对蛋白质结构研究,小角散射实验方法的一个重要优点是可以直接在溶液中测量小角散射谱,以此来得到蛋白质分子或复合物分子的结构信息,将其与晶体学数据相结合可以对晶体结构进行验证、修正及研究蛋白质分子结构中柔性部位的结构等^[9-11],这就可以避免复杂艰巨的复合物结晶过程,同时我们得到的还是蛋白质或复合物分子处于自然状态时的结构,更利于研究结构与功能的关系^[12]。X射线小角散射法在生命科学中的另外一个重要应用是时间分辨的动态过程研究。一是蛋白质折叠的动力学研究,目前的SAXS技术已经能够在亚毫秒的量级上观察蛋白质结构的运动过程^[13],以及在各种不同的温度和压力下蛋白质的折叠和去折叠过程,这些研究将有助于理解蛋白质折叠机理和设计蛋白质结构;二是两个蛋白质形成复合体的动力学过程;三是蛋白质动态组装的过程研究;四是细胞膜中膜蛋白的动态过程研究,包括膜蛋白之间的相互作用机理以及膜蛋白动力学过程、膜蛋白/磷脂双分子层之间的相互作用和动力学特性、膜运输的分子机理及其与信号传递的关系等;五是利用相干散射研究蛋白质体系中的慢平衡和非平衡动力学过程。

X射线小角散射实验方法是在原光束小角度范围内测量散射X光强度。测量的主要设备一般是面探测器,如成像板或者CCD等。

1.4 X射线微探针与软X射线谱学显微 硬X射线微探针主要是利用微聚焦系统,将高亮度的同步辐

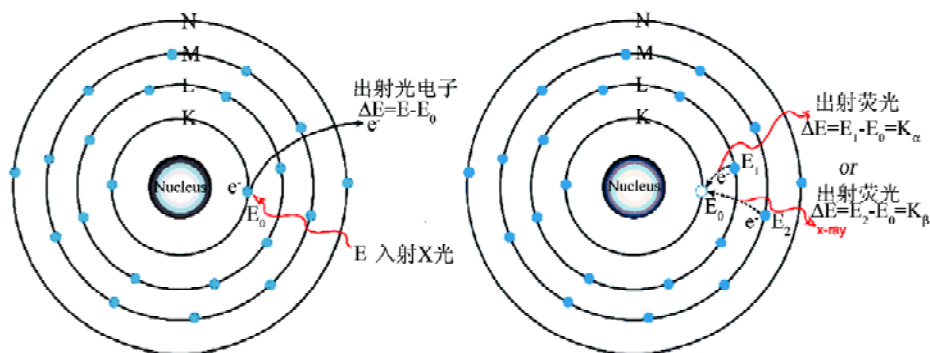


图2 左图示意当入射X光能量很高时,会将原子内壳层电子激发出去而留下一个空位;右图示意当内壳层出现空位时,高壳层电子就会向下跃迁以降低系统能量,此时就发出荧光,荧光的能量是高壳层与低壳层能量之差

射 X 光聚焦成微米光束来进行科学研究。同步辐射上的微束 X 光斑具有极高的亮度以及很小的光斑尺寸, 利用能量可调的单色 X 射线微束 ($<2\mu\text{m}$), 配备先进的探测系统, X 射线微束系统可以在细胞水平上开展微束 X 射线荧光分析 ($\mu\text{-XRF}$)、微束 X 射线谱学 ($\mu\text{-XAFS}$) 以及微束 X 射线衍射 ($\mu\text{-XRD}$) 和微束成像实验研究, 具备原位分析样品的元素组分、化学特性、物质结构及其二维分布的能力。

软 X 射线谱学显微技术结合了扫描透射 X 射线显微术 (STXM) 的几十个纳米的高空间分辨和近边吸收精细结构谱学 (NEXAFS) 的高化学态分辨能力, 与电子显微术、TXM 相比样品辐射损伤相对较小, 可以在介观尺度研究固体、液体、软物质 (如水凝胶) 等多种形态的物质。利用“水窗”波段 (波长 $\lambda=23-44\text{\AA}$) 的软 X 光对水的高穿透性特点, 软 X 射线谱学显微技术可以研究自然状态下的细胞结构和功能关系, 以及具有一定活性的生物样品的结构与元素空间分布^[15-17]等。

1.5 X 射线成像 X 射线成像主要是利用生物组织对 X 射线吸收与透过率的不同来测量生物组织的结构。比较常用的方法包括同轴相衬成像及显微 CT 等。相衬成像类似于传统的透照术。它无需额外的光学元件, 对入射光纵向相干性的要求较低, 只是对横向相干性有较高的要求。这种方法利用了 X 射线的位相信息, 相比于传统的吸收成像可以对软组织得到较高的衬度和空间分辨率, 在生物医学应用中具有很大的应用前景。在同步辐射装置上, 硬 X 射线位度相衬成像技术已经成为国际上成像领域的一个研究热点, 在医学诊断、生物和材料研究等领域有显著的优越性, 极具推广应用的潜力。这些可能的应用包括: 探测生物组织中的微细结构, 为乳腺癌或其他肿瘤的早期诊断提供依据; 探测已加工的食物中的有害物质; 观察具有高分辨率和高图像衬度的生物样品图像, 推动生物医学和病理学的实验研究等等。X 射线显微断层成像 ($\mu\text{-CT}$) 的原理类似于众所周知的医用 CT。当 $\mu\text{-CT}$ 应用于物体成像时, 通过旋转样品垂直于光束方向的角度, 记录一系列的投影像 (通常 1000 幅以上)。然后对这些图像进行重构, 就可以得到原始物体的 3D 像。同步辐射能提供高通量的单色光, 这使得高空间分辨、快速、低剂量的 $\mu\text{-CT}$ 成为可能^[14]。

2 上海光源首批光束线站及生命科学应用

在上海光源首批光束线站中, 生物大分子晶体

学线站、X 射线吸收谱学线站、X 射线小角散射线站、X 射线成像线站、X 射线微束线站以及软 X 射线谱学显微线站可以在生命科学中有所应用, 而其中生物大分子晶体学光束线站是专门用于蛋白质晶体结构测定的线站。

2.1 生物大分子晶体学光束线站 生物大分子晶体学光束线站位于上海光源储存环第 17 单元直线节引出端口, 简称 BL17U 1。根据用户的要求, 其研究目标主要针对生物大分子复合物结构、膜蛋白结构等, 也能支撑开展面向结构基因组学的高通量蛋白质结构以及新药物研发相关的结构研究等。

同步辐射光源的优越性在于它的高亮度及能量可调性, 特别是对于生物大分子晶体学的研究来说, 高亮度及能量可调性尤其重要: 因为蛋白质的晶体一般体积较小, 有序度也比较低, 其衍射能力比较弱, 需要高亮度的光源才能够较短时间内采集到高分辨的衍射数据。同时对于多波长反常散射法的实验, 波长的可调性也是必需的。因此, 我们采用了真空内的小间隙波荡器作为光源。波荡器的周期数为 25, 其最小磁隙为 6mm, 磁隙调节范围为 6-12mm, 波荡器辐射最高亮度接近 $10^{19}\text{phs}/\text{mm}^2/\text{mrad}^2/\text{s}$, 可以保证能量调节范围在 5-18keV 之间。经过光束线单色化和聚焦处理, 样品处光斑尺寸约为 $130\times 40\mu\text{m}^2$, 光子通量可达到 $3\times 10^{12}\text{phs}/\text{s}$, 其技术指标居国际先进水平之列。

生物大分子晶体学实验站目前配备了一台 Rayonix 公司的 mx225 CCD 探测器, 与 mx225 探测器相配套的是一台 MarDTB 系统 (图 3), 包括用于探测器定位平移台、用于晶体转动旋转轴、用于限定光斑大小的精密狭缝、用于记录光强的电离室及用



图3 BL17U生物大分子晶体学实验站

于控制曝光时间的快门等。此外 MarDTB 还包括一个用于安装样品的简易机器人。探测器与样品之间的距离可在 80 — 400mm 之间调节。在旋转仪的顶端连接一个电机驱动的 X-Y-Z 平台,支持 click-to-center 操作,用于晶体位置调节。为了降低蛋白质晶体样品被高强度的 X 射线照射造成的辐射损伤,实验站还配备了样品低温冷却装置, Cryostream700, 温度最低可以达到 80 K。为了存储海量的晶体衍射数据,实验站还专门配备了一台大容量的光纤通道磁盘阵列,从 CCD 探测器采集到数据将通过网络直接存储到磁盘阵列上。同时为了方便用户在采集数据的同时在线处理数据,还在实验站配备了数台高性能数据处理计算机,另外还专门建立了一个数据处理室,为那些已经完成实验,方便用户进行数据处理(图 4)。目前 BL17U 实验站的设备已经能较好地满足常规蛋白质晶体衍射数据采集的要求。

上海光源光束线控制统一采用的是 EPICS (experimental physics and industrial control system, <http://www.aps.anl.gov/epics>) 系统。所有的电机驱动器都是由 EPICS 系统控制。而 BL17U 1 将采用美国 SSRL 光源生物大分子组开发的 DCS/Blu-Ice 控制系统来进行控制。DCS (distributed control system) [18, 19] 是一套用于设备控制及数据获取的一个软件包,它把各种功能块分解成三层,这三层之间通过网络通讯。第一层是各种客户端,即 Blu-Ice 图形用户界面;第一层与第二层以分布式控制服务器(distributed control system server, DCSS)相连,用于进行各种

实验控制、实时更新各种实验状态及把各种命令传送到第三层。第三层是分布式硬件服务器(distributed hardware server, DHS), 这层是提供一个 DCSS 与光束线及实验站内各种设备控制器之间通讯的一个接口。第三层还可以作为与别的控制系统进行通信的接口,比如在 BL17U 光束线上用的是 EPICS 控制系统,DCS 控制系统提供了一个与 EPICS 进行通信的接口 epicsgw。通过三层架构使得 DCS 控制系统有很高的稳定性及安全性。Blu-Ice 图形用户界面提供了包括衍射数据的采集、荧光谱扫描、光束线上的部件控制、能量调节等等各种控制功能,用户可以通过 Blu-Ice 来完成全部的蛋白质晶体学实验,工作人员可以通过 Blu-Ice 来完成全部的光束线调试等工作。BL17U 控制结构见图 4。

生物大分子晶体学光束线站的性能的一个重要方面是自动化水平,但是由于上海光源一期工程建在实验站方面的预算有限,该实验站没有配备样品自动化系统。目前商业化的自动上样机器人已经比较成熟,现已提出计划对实验站进行升级改造,增加自动上样装置,提高实验效率。此外,在实现了自动化数据采集之后,还将尝试发展远程实验系统,即用户将样品准备好,使用邮寄等方法将样品送到上海光源,通过网络远程操作进行实验。采用远程实验可望大大节省用户在衍射数据采集上的花费的时间和费用。

除了光束线的硬件及软件方面的发展,实验方法也是未来发展的一个主要方向。目前除了分子置



图 4 BL17U 数据存储及处理系统

换法, 利用硒原子反常散射信号解相位是最常用的方法^[20], 但是这种方法需要花费大量时间去进行硒原子替代硫原子的过程, 而且有些蛋白很难甚至无法进行硒代。因此使用蛋白质分子天然含有的硫元素作为反常散射原子来解相位就具有非常美妙的前景^[21, 22]。要利用硫原子的反常散射信号来解相位的一个关键难题是硫原子的反常散射信号很弱。硫原子的吸收边位于 5.02Å, 在此波长下的反常散射信号最强, 但是利用这样低能量的 X 光来采集衍射信号非常困难, 一方面因为吸收强造成蛋白质受到的辐射损伤很大, 另一方面长波长时所能采集的衍射数据分辨率非常低。为了保证能够从晶体样品上采集足够的数据并且有较强的反常散射信号, 通常选择 1.5 – 3Å 的波长。为了减少空气散射及吸收对衍射谱的影响, 需要在样品和探测器之间建立低吸收通道, 比如充氦气或者采用低真空通道。其他还有诸如减少晶体上附着的液体(主要是防冻液)以及去除纤维环以减少这些液体对 X 光的散射对数据质量的影响等等。除了硫的反常散射法的发展外, 还有很多其他的结构解析实验方法也需要加以发展, 比如超大晶胞的晶体数据采集、超高分辨率数据采集等, 以满足不同的实验需求。

2.2 其他光束线站及其在生命科学中的应用 除了生物大分子晶体学光束线站在生命科学中的应用外, 上海光源首批建设的其他光束线站有很多也可以在生命科学的研究中有着广泛的应用。下面将对这些光束线进行简要介绍。

上海光源 XAFS 光束线(BL14W1)采用多极扭摆器作为光源, XAFS 光束线的能量调节范围在 4 – 50keV, 样品处光通量可达到 $10^{12} - 10^{13}$ phs/s, 能够开展高灵敏度谱学研究。高光子通量对于金属蛋白质样品尤其重要, 因为蛋白质一般都含有大量的溶液, 金属原子与蛋白质分子和溶液分子相比, 其中占到比重极小, 仅在 $10^{-4} - 10^{-5}$ 范围内。因此必须采用荧光模式来测量 XAFS 谱。XAFS 光束线还具备了开展时间分辨实验的能力。利用 QXAFS (快速扫描) 方法, 可以开展秒级或亚秒级的时间分辨实验研究, 如对酶的催化反应中间过程的研究, 利用晶体学方法得到的结构难以了解催化机理, 但是利用时间分辨的 XAFS 方法, 可以得到金属酶蛋白质催化过程中金属元素位置、电子结构的实时变化, 更有利于人们了解酶的催化过程^[23]。

X 射线小角散射光束线站(BL16B1)采用弯铁作

为光源, 其能量覆盖范围为 5 – 20keV, 可以开展秒级和亚秒级的时间分辨实验, 研究蛋白质及复合物在溶液中的结构及结构变化信息, 如研究蛋白质折叠过程^[13]。由于受弯铁光源性质的限制, 光源亮度和光束发散无法达到很高的水平, 该线站只能研究尺度适中的生物大分子体系($<100\text{nm}$), 也难以开展低浓度样品实验研究和快时间分辨实验研究。已计划建造用于蛋白质科学研究的高性能小角散射线站, 以充分满足用户需求。硬 X 射线微聚焦光束线(BL15U1)采用高亮度真空室内波荡器作为光源, 可以在实验站得到高通量、能量可调(4 – 20keV)的单色 X 射线微束, 空间分辨可达到微米至亚微米级, 元素分析的灵敏度可达到 ppb 级。利用该实验站可以开展微束 X 射线荧光分析($\mu\text{-XRF}$)、微束 X 射线谱学($\mu\text{-XAFS}$)以及和微束成像实验研究, 用于研究细胞内的金属元素分布、化学价态与结构成像, 以及微生物、植物根须的微量元素分析研究等。

软 X 射线谱学显微光束线站(BL08U1)采用可调制极化波荡器作为光源, 覆盖水窗波段及钠、镁、铝等轻金属元素 K 吸收边, 主要用于开展亚微米及纳米尺度样品的软 X 射线谱学与显微研究, 其空间分辨可达到 30 – 50nm, 是细胞与细胞器结构研究的有力手段。

X 射线成像光束线站(BL13W1)采用多级扭摆器作为辐射光源, 能量覆盖范围为 8 – 72keV, 采用不聚焦方式, 可以得到宽的光束($\sim 50\text{mm}$), 主要用于生物软组织及低 Z 材料的低剂量、无损、高分辨、动态、三维成像研究, 也非常适合于小动物成像研究。

3 小结

生命科学为解决人类社会所面临的健康、食物、能源、生态、环境等重大问题提供了强有力的基础支撑, 是 21 世纪最重要的学科研究方向之一。同步辐射技术方法在生命科学中有着非常广泛的应用, 可以为生命科学研究提供一个强大的实验平台。上海光源是我国建造的第三个先进的第三代同步辐射装置。预期上海光源首批光束线站将在我国生命科学研究中发挥重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Lattman E. Use of the rotation and translation functions. *Methods Enzymol*, 1985, 115: 55-77
- [2] Hendrickson WA, Teeter MM. Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous

- scattering of sulphur. *Nature*, 1981 290: 107-13
- [3] Hendrickson WA. Maturation of MAD phasing for the determination of macromolecular structures. *J Synchrotron Rad*, 1999, 6: 845-51
- [4] Watenpauth KD. Overview of isomorphous replacement phasing. *Methods Enzymol*, 1985, 115: 3-15
- [5] Von Bordwehr RS. A history of X-ray absorption fine structure. *Ann Phys Fr*, 1989, 14: 377-466
- [6] Ascone I, Fourme R, Hasnains S. Introductory overview: X-ray absorption spectroscopy and structural genomics. *J Synchrotron Rad*, 2003, 10: 1-3
- [7] Ascone I, Meyer-Klaucke W, Murphy L. Experimental aspects of biological X-ray absorption spectroscopy. *J Synchrotron Rad*, 2003, 10: 16-22
- [8] Dar H, Haumann M. X-ray absorption spectroscopy to watch catalysis by metalloenzymes: status and perspectives discussed for the water-splitting manganese complex of photosynthesis. *J Synchrotron Rad*, 2003, 10: 76-85
- [9] Svergun D, Barberato C, Koch MHJ. CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Appl Crystallogr*, 1999, 28: 768-73
- [10] Konarev PV, Petoukhov MV, Svergun DI. MASSHA - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *J Appl Cryst*, 2001, 34: 527-32
- [11] Petoukhov MV, Svergun DI. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J*, 2005, 89: 1237-50
- [12] Svergun DI, Koch MHJ. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 565-660
- [13] Pollack L, Tate MW, Darnton NC, et al. Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small-angle x-ray scattering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10115-7
- [14] Momose A, Takeda T, Itai Y, et al. Phase-contrast X-ray computed tomography for observing biological soft tissues. *Nat Med*, 1996, 2: 473-5
- [15] Ade H, Zhang X, Cameron S, et al. Chemical contrast in X-ray microscopy and spatially resolved XANES spectroscopy of organic specimens. *Science*, 1992, 258: 972-5
- [16] Kinyangi J, Solomon D, Liang B. Nanoscale biogeochemical complexity of the organomineral assemblage in soil: application of STXM microscopy and C 1s-NEXAFS spectroscopy. *Soil Sci Soc Am J*, 2006, 70: 1708-18
- [17] Myneni SCB. Soft X-ray spectroscopy and spectromicroscopy studies of organic molecules in the environment. *Revi Mineral Geochem*, 2002, 49: 485-579
- [18] McPhillips TM, McPhillips SE, Chiu AE, et al. Blu-Ice and the distributed control system: software for data acquisition and instrument control at macromolecular crystallography beamlines. *J Synchrotron Rad*, 2002, 9: 401-6
- [19] Soltis SM, Cohen AE, Deacon A, et al. New paradigm for macromolecular crystallography experiments at SSRL: automated crystal screening and remote data collection. *Acta Cryst*, 2008, D64: 1210-21
- [20] Hendrickson WA, Horton JR, LeMaster DM. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J*, 1990, 9(5): 1665-72
- [21] Ramagopal UA, Dauter M, Dauter Z. Phasing on anomalous signal of sulfurs: what is the limit? *Acta Cryst*, 2003, D59: 1020-7
- [22] Cianci M, Helliwell JR, Atsuo Suzuki. The interdependence of wavelength, redundancy and dose in sulfur SAD experiments. *Acta Cryst*, 2008, D64: 1196-209
- [23] Wang Q, Hanson HC, Frenkel AI. Solving the structure of reaction intermediates by time-resolved synchrotron x-ray absorption spectroscopy. *J Chem Phys*, 2008, 129: 234502