



串行晶体学样品输运方法概述*

李凌昊 李冰** 翁祖谦**

(上海科技大学大科学中心, 上海 201210)

摘要 样品输运方法是实现X射线自由电子激光串行飞秒晶体学研究的关键步骤之一。串行飞秒晶体学能够有效地捕捉到生物分子的超快动态过程,如蛋白质构象变化和化学反应中间态等。它对于科学家更好地理解生物分子的结构和功能,揭示生命活动的机制,以及为药物研发和生物工程等领域提供重要的技术手段具有重要意义。在自由电子激光装置进行实验时,将样品输送至与自由电子激光脉冲相互作用区域是非常关键的。而选择合适的上样方法对于样品的消耗量和实验效率起着决定性作用,也是实验成功与否的一个重要因素。本文综述了目前串行晶体学样品输运方法的最新研究进展和未来发展方向。同时介绍了常用的样品输运方法及其适用范围,旨在为从事串行晶体学领域研究的科学家提供借鉴和参考。通过选择合适的样品输运方法,能够提高实验效率,减少样品消耗,并为研究者在生物大分子结构生物学研究方面开辟新的可能性。

关键词 X射线自由电子激光, 串行晶体学, 结构生物学, 液流样品输运方法, 固定靶

中图分类号 O7, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0379

X射线自由电子激光(X-ray free-electron lasers, XFEL)是基于直线加速器的最新一代的X射线光源,相比于同步辐射光源具备超高亮度、超短脉冲、全相干等特点。其峰值亮度是同步辐射的 10^9 倍,可以直接利用纳米晶体衍射解析复杂生物大分子^[1-2]或化学小分子结构^[3-4]。XFEL的脉冲宽度比同步辐射短3个数量级,能够在生物大分子被辐射破坏前获取有效衍射数据^[5]。此外, XFEL的飞秒脉冲还可以用于捕捉生物分子在亚皮秒时间尺度的动态结构变化,捕获生物大分子在反应链上的构象中间体,并以原子级的空间分辨率对其结构进行表征^[6-9]。

时间分辨X射线串行飞秒晶体学(time-resolved serial femtosecond crystallography, TRSFX)是自由电子激光在结构生物学中的重要应用之一。它为我们提供了观察生物体内大分子结构和动力学过程的新方法,如视紫红质结构的光响应细节^[6, 10-11]、一氧化碳肌红蛋白配体解离时的运动过程^[12]、光系统II光合作用过程的中间态^[7, 13-14]、光驱动光敏黄蛋白顺反异构化过程^[15]、氯离子泵浦视紫质动力学过程^[16]等,对于理解生

物大分子如蛋白质、酶等的功能机制具有重要意义,对于基于结构的药物研发起到了重要推动作用。串行样品输运方法的发展对自由电子激光串行飞秒晶体学实验,尤其是TRSFX以及纳米晶体学实验具有非常重要的意义,能够提高实验效率、减小样品辐射损伤、获得连续时间序列的结构信息,并突破晶体大小限制,实现了更准确的结构分析。串行晶体学上样方法的发展极大地推动了TRSFX以及纳米晶体学的研究。

第三代同步辐射晶体学线站和自由电子激光串行晶体学线站在样品输运方式和制备方法上存在很多不同之处。第三代同步辐射X射线晶体学采用旋转晶体法,通过照射晶体来记录旋转过程中的布拉格峰位置。通常仅用一颗晶体就能获得用于结构解析的完整数据,但是由于其旋转特性,很难用在fs至ms的快速时间分辨实验上。在最新的第四代同步辐射装置上,如ESRF-EBS ID29线站的主要方

* 科技部重点研发计划(2021YFA1500600)资助项目。

** 通讯联系人。

李冰 Tel: 17321359330, E-mail: libing1@shanghaitech.edu.cn

翁祖谦 Tel: 13917660235, E-mail: wengzq@shanghaitech.edu.cn

收稿日期: 2023-09-26, 接受日期: 2023-12-26

法学为时间分辨串行晶体学,其主要目标就是研究时间分辨的晶体结构,虽然其关注的时间尺度与自由电子激光不同,但上样方法也为串行上样的方式。由于XFEL超强的脉冲能量,串行晶体学实验一颗晶体只能获得一张衍射图就会被损坏,因此需要连续更新晶体样品。为了匹配XFEL的重复频率以及提高样品传输效率,样品输运装置需要高速、高精度地输运样品,以尽量确保每个脉冲都与样品

相互作用。为了获得足够的衍射图并得到晶体结构,自由电子激光串行晶体学实验通常需要数百微克至数百毫克生物大分子晶体样品(表1)。串行晶体学实验如此大量微晶体的制备方法与传统晶体学样品制备所采用的蒸汽扩散法不同,蒸汽扩散方法制备的晶体尺寸大,数量较少。串行晶体学微晶制备常采用自由界面扩散法(free interface diffusion, FID)或分批结晶的方法^[17-19]。

Table 1 Parameters for serial crystallography liquid sample delivery methods
表1 串行晶体学液体样品输运方法参数

液体输运	射流或液滴直径	样品溶液管道	流量	流速/(m·s ⁻¹)	样品消耗量	适用环境	
	/μm	直径/μm	/(μl·min ⁻¹)		/mg	真空	大气
GDVN	<5	40~75	1~20	10~100	10~100	√	√
DFFN	2~5	40	1~10	10~100	10.8	√	√
Mix-GDVN	0.536	20~60	2.4	≤160	—	√	√
HVEs	40~80	40~80	0.01~2	~0.002	<0.5	×	√
MESH	亚微米~几微米	50~100	0.14~3.1	—	0.140	√	√
压电驱动液滴喷嘴	80	80	0.5@30 Hz	匹配30 Hz XFEL脉冲	<1	×	√
ADE	50~200	50~200	3.3@10 Hz	匹配120 Hz XFEL脉冲	<1	×	√

GDVN: 鞘层气体约束聚焦喷嘴 (gas dynamic virtual nozzle); DFFN: 双流聚焦喷嘴 (double flow-focusing nozzle); Mix-GDVN: 混合注入鞘层气体约束聚焦喷嘴 (mix-and-extrude gas dynamic virtual nozzle); HVEs: 高黏度液体喷嘴 (high-viscosity extruders); MESH: 静电纺丝喷嘴 (microfluidic electrokinetic sample holder); ADE: 声学液滴喷嘴 (acoustic drop ejection)。

串行飞秒晶体学(serial femtosecond crystallography, SFX)样品输运要求在相互作用区域能有效更新样品,样品的更新速度需要考虑自由电子激光的重复频率、库伦爆炸的影响以及在泵浦探测实验时还需考虑激光的光斑尺寸。2009年美国国家加速器实验室SLAC建成了第一条硬XFEL直线加速器相干光源(linac coherent light source, LCLS),其冲重复频率为120 Hz,脉冲间隔8.3 ms。2017年,第一个高重频自由电子激光European XFEL建成,其脉冲重复频率最高可达4.5 MHz,相邻的两个脉冲时间间隔仅220 ns。正在建设中的第二代直线加速器相干光源(linac coherent light source II, LCLS-II)、上海硬X射线自由电子激光装置(Shanghai High repetition rate XFEL and Extreme light facility, SHINE)等最高重复频率可达1 MHz,脉冲间隔1 μs。高重频的自由电子激光给样品传输带来了新的挑战,样品需在1 μs或220 ns的时间间隔完成样品更新。XFEL脉冲打在样品微射流上会导致超声压力波的产生与传播^[20],将产生库伦爆炸而形成一个大于XFEL光斑尺寸的爆炸区域^[21]。样品更新需覆盖库伦爆炸影响区域的大小。在激光激发时间分辨实验中,为

了避免样品被反复激发,样品的更新距离需大于激光光斑影响距离。样品传输方案的选择还需要考虑实验站的样品环境,目前的串行晶体学线站包括真空样品环境、氦气样品环境、大气环境,为了降低空气带来的背景散射,串行晶体学实验站的样品环境通常为真空或者氦气环境,但脂质立方相(lipidic cubic phase, LCP)介质不能用于真空环境,在真空环境温度降低且容易脱水导致LCP相变^[22]。

自由电子激光的样品输运方式主要包括液体喷射的方式与固定靶的样品输运方式,不同的实验站使用的上样方法可相互借鉴,甚至可以完全一致,如液体喷射方式中的液滴方法可以用于串行晶体学^[23]、单颗粒成像、谱学^[24]等,超薄扁平液流可用于软X射线谱学,也可用于串行晶体学^[25-26]。本文将介绍目前自由电子激光串行晶体学实验站样品环境的基本配置,主要介绍国内外串行晶体学实验站样品传输系统及所用到的上样方法,分析其适用范围以及优缺点,为从事结构生物学的研究人员在XFEL进行串行晶体学实验选择合适的上样方法提供参考。

1 串行晶体学线站样品输运系统

国际上, 包含串行晶体学方法的自由电子激光实验站包括美国的 LCLS CXI^[27]、MFX^[28] 和 XPP^[29] 实验站, 欧洲的 European XFEL SPB/SFX^[30], 日本的 SACLA BL3^[31-32], 韩国的 PAL-XFEL NCI^[33], 瑞士的 SwissFEL Alvra Prime^[34] 与 SwissFEL Bernina MX^[35]。此外, 上海目前正在建设的 SHINE SFX 实验站也将成为该领域的重要一

员。串行晶体学线站的主要设备有光学聚焦系统提供几微米或几百纳米的光斑、大的面探测器、泵浦激光系统、样品输运设备、真空或氦气的样品环境。SwissFEL Bernina MX 和 LCLS MFX 实验站配置低温环境、机械手、衍射仪等与同步辐射生物大分子晶体学线站相似的配置, 主要针对固定靶的串行晶体学。国际上串行晶体学实验装置的配置如表 2 所示。

Table 2 Basic configuration of international serial crystallography experimental stations

表2 国际上串行晶体学实验站基本配置

实验站	主要光学参数	关键设备	方法学	样品输运方法
LCLS CXI	能量范围 5~11 keV; 能量 1~4 mJ; 脉宽 5~200 fs; 重频 120 Hz; 光斑尺寸 10, 1, 0.1 μm	CSPAD 2.3M	CXI	空气动力学透镜气溶胶注射器
		CSPAD 140k	SFX	GDVN
		泵浦激光		HVE 真空固定靶
LCLS MFX	能量范围 5~25 keV; 能量 1~4 mJ; 脉宽 30~100 fs; 重频 120 Hz; 光斑尺寸 2~500 μm	机械手	SFX	固定靶 (常温、低温)
		衍射仪	SAXS	GDVN
		温湿度控制器	WAXS	LCP
		epix10K-2.1M Rayonix340-XFEL 泵浦激光	XES	MESH HVE
SACLA BL3-MAXIC & DAPHNIS	能量范围 4~20 keV; 能量 0.5 mJ@10keV; 脉宽 2~10 fs; 重频 60 Hz; 光斑尺寸 1~5 μm	MPCCD 4M	CXI	固定靶
		泵浦激光	纳米晶体学	柔性液体喷射器
			超快泵浦探测	空气动力学透镜气溶胶注射器
PAL-XFEL NCI	能量范围 2.2~15 keV; 能量 ~1 mJ; 脉宽 ~25 fs; 重频 30 Hz; 光斑尺寸 5 μm	Jungfrau 4M Rayonix MX225-HS 泵浦激光	SFX	GDVN
				带循环系统液流喷嘴
			CXI	单颗粒溶液注射器 PSD
			SFX	GDVN
SwissFEL Alvra Prime	能量范围 2~12.4 keV; 能量 0.2~1.4 mJ; 脉宽 2~20 fs; 重频 100 Hz; 光斑尺寸 1.5 μm	Jungfrau 16M Jungfrau 4M Von Hamos 谱仪 泵浦激光	XAS	HVE
				固定靶
			SFX	GDVN
			XDS	HVE
SwissFEL Bernina MX	能量范围 2~12.4 keV; 能量 0.2~1.4 mJ; 脉宽 2~20 fs; 重频 100 Hz; 光斑尺寸 2~20 μm	Jungfrau 16M 衍射仪 机械手	XAS	Liquid flat Sheet
			XES	圆柱形射流
				固定靶
			SFX	固定靶
European-XFEL SPB/SFX	能量范围 3~16 keV; 能量 1~5 mJ; 脉宽 <100 fs; 重频 4.5 MHz; 光斑尺寸 0.1, 1 μm	AGIPD 4M	CXI	空气动力学透镜气溶胶注射器
		AGIPD1M	SFX	GDVN
		泵浦激光		DFFN
				HVE
				固定靶

CXI: 相干X射线成像 (coherent X-ray imaging); SAXS: 小角X射线散射 (small angle X-ray scattering); WAXS: 广角X射线散射 (wide angle X-ray scattering); XES: X射线发射光谱 (X-ray emission spectroscopy); XAS: X射线吸收光谱 (X-ray absorption spectroscopy); XDS: X射线衍射光谱 (X-ray diffraction spectroscopy)。

自由电子激光串行晶体学实验站的样品传输是通过各类液体样品注射器实现的, 如鞘层气体约束聚焦喷嘴 (gas dynamic virtual nozzle, GDVN)^[36-37]、混合注入鞘层气体约束聚焦虚拟喷嘴 (mix-and-extrude GDVN, Mix-GDVN)^[38-39]、双流聚焦喷嘴 (double flow-focusing nozzle, DFFN)^[40-41]、高黏度液体喷嘴 (high-viscosity extruder, HVE)^[42-44]、静电纺丝喷嘴 (microfluidic electrokinetic sample holder, MESH)^[45-46]、声学液滴喷嘴 (acoustic drop ejection, ADE) 或者压电驱动喷嘴产生液体的方法^[47-48]、液滴喷嘴结合传送带的方法 (drop-on-tape, DOT)^[24] 等, 或固定靶的方式^[49] 将晶体样品传输至与 XFEL 相互作用区域。液体输运系统的原理如图 1 所示, 通过高效液相色谱 (HPLC) 上的蠕动泵驱动水溶液进入样品存储器, 水溶液推动样品存储器中的活塞挤压样品溶液进入样品输运管路, 最终通过喷嘴喷出到达与 XFEL 相互作用区域。传样杆的一端通过 M9 的螺纹或者适配器连接样品注射器, 一端可接入气路管道与样品溶液管道。这些气路管道与样品溶液管道可通过传样杆的中心, 最终与样品注射器对应的管路相连。

以 European XFEL SPB/SFX 为例, 介绍串行晶体学样品传输系统的需求以及设计方案。European XFEL SPB/SFX 晶体样品传输采用的是鞘层气体约

束聚焦动态虚拟喷嘴 GDVN 生成直径 300 nm~20 μm 的含晶体样品液流, GDVN 方法是指液体从喷嘴出来一般会散开, 在液体喷流外围环绕一层气体便能加以约束, 同时能缩小液流的直径。GDVN 方法需要用到气体对射流聚焦, SPB/SFX 的样品传输系统的设计采用差分抽气系统保护样品腔真空免受 GDVN 的气体及液体负荷的影响, 使得样品传输系统能够与高真空系统兼容。更换喷嘴时, 将喷嘴杆缩回到真空阀后面, 可以在不破坏腔室真空的情况下进行拆卸。此外, 还设计了漏斗型的注入杆接收器, 方便引导传样杆进入与 XFEL 相互作用区域。运动控制方面, 传样杆部分采用 XYZ 机械手, 差动泵保护罩运动采用六足位移台, 用于射流与 XFEL 的对准。液流观测采用一个共轴显微镜和一个侧视显微镜。侧视显微镜可与高速相机相连, 结合激光照明系统, 通过对单帧图像的两次曝光可以测量液体样品流速, 详细设计见 Mancuso 等^[50-51] 的对 SBP/SFX 的介绍。

2 液体样品输运方法

2.1 纳微米晶体样品的制备与表征

微晶体在串行晶体学时间分辨实验中起着关键作用, 使用激光激发的时间分辨实验要求激光能够穿透整个晶体^[52], 使用化学混合作为触发器时, 晶体的尺寸决定了扩散时间, 因此是确定反应启动条件的关键参数, 并且对于获得较高的时间分辨率也非常重要^[39]。在时间分辨串行晶体学实验中, 通过控制微晶体的尺寸和分布, 可以确保晶体在光激发或化学混合触发条件下具有一致的反应启动条件^[19]。制备均匀的纳米和微米晶体的方法主要有以下几种。a. FID 法: 一种通过叠加两种溶液, 将高浓度的沉淀剂添加到低浓度的蛋白质溶液, 形成界面以实现高浓度混合的方法, 晶体生长在高浓度的蛋白质溶液和沉淀剂溶液之间的界面上^[17]。b. 种晶方法 (seeding): 是通过控制种子的浓度来获得所需尺寸范围的晶体, 结合粉碎和过滤技术, 将大块晶体破碎成晶核, 加入生长晶体的溶液中, 控制条件, 可以得到尺寸、形状比较一致的小晶体^[19]。c. 批处理结晶: 这是一项物质晶体生长技术, 其特点在于先行确定物质在特定条件下的成核特性, 包括了解其在特定组分浓度、pH 值和温度等参数下的结晶行为。在实际操作中, 若初始结晶条件不适宜于批量生产, 则需要细致调整上述参数, 如通过改变溶液中的成分浓度、调节 pH 值或

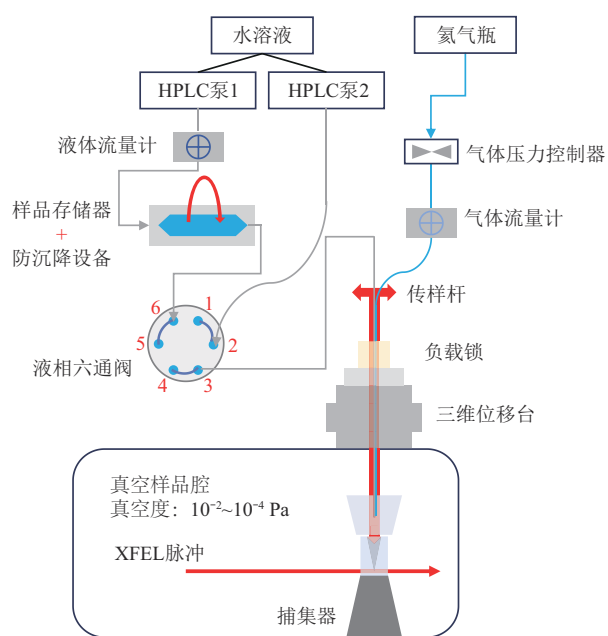


Fig. 1 Schematic diagram of SFX liquid sample delivery principle

图1 SFX液体样品输运原理示意图

改变温度控制,以寻找和确定适合大规模结晶生长的最优条件^[53]。对于小晶体的表征,可以采用二阶非线性光学成像(second-order nonlinear imaging of chiral crystals, SONICC)来验证样品中是否存在蛋白质晶体,采用纳米颗粒跟踪分析和动态光散射来测量晶体的尺寸。

2.2 基于气体聚焦的液流输运方法

串行晶体学液体样品输运主要追求的是高样品传输效率、低样品消耗量以及射流稳定性。高样品传输效率、低样品消耗量要求样品传输速度与自由电子激光脉冲相匹配,产生样品射流尺寸与晶体尺寸相匹配或稍小于晶体尺寸,这样可以减少晶体溶液带来的背景散射,且减少多个晶体共同作用形成的衍射。自由电子激光串行晶体学线站的光斑尺寸仅仅只有几个微米或是几百纳米,因此对射流稳定性的要求很高,射流稳定性越好,样品的命中率越高。SFX早期实验采用传统的直壁柱形Rayleigh射流喷嘴,由于其射流较粗约10~100 μm ,流量0.4~7 ml/min,射流速度约100 m/s,导致样品浪费严重,且比较容易导致样品堵塞,该方法被气动虚拟喷嘴GDVN^[36, 54-56]完全取代。GDVN通过气体对样品射流聚焦,产生的射流直径约几百纳米至几微米之间,样品流量约1~20 $\mu\text{l/min}$ (图2a)。相比Rayleigh射流喷嘴能有效减少样品堵塞和降低样品消耗,且射流粗细与晶体尺寸以及光斑相匹配,能有效减少溶液带来的背景散射。GDVN是FEL上SFX实验方法的标准上样方法,基本每一个FEL装置的晶体学线站都配置该样品输运方法,自由电子激光第一个串行晶体学实验^[55]及第一个高分辨率数据^[56]的获得就是使用GDVN注射器。GDVN的流速一般在10~100 m/s,European XFEL的脉冲间隔最短为220 ns, LCLS-II和SHINE的脉冲间隔均为1 ms,目前仅GDVN能满足高重频自由电子激光的样品输运速度要求。在GDVN的基础上,Oberthuer等^[40, 57]设计了DFFN(double flow focusing nozzle)喷嘴,内部液体射流被同轴更快

的外部液体射流聚焦,该外层射流本身又被更外层的气体聚焦(图2b)。DFFN射流相比于GDVN具备更好的稳定性与更少的样品消耗。在混合注入的时间分辨实验中,混合注入喷嘴Mix-GDVN是常用的一种上样方式,该喷嘴也是基于气体聚焦,在GDVN喷嘴改造,将蛋白酶晶体与底物预先混合,通过混合时间与混合后样品到达相互作用区域所需时间来控制时间延迟,通过气体聚焦混合后的

溶液进行样品输运(图2c)。王丁杰等^[57]设计了第一个混合注入喷嘴,采用同轴液体流动结构混合两种液体,然后使用气体聚焦机构形成连续的薄液体射流,用于时间分辨纳米晶体学,同时确定瞬态的结构和化学动力学机制。Knoška等^[58]采用双光子3D打印混合注入喷嘴,该喷嘴流速最高可达160 m/s,射流尺寸可达亚微米量级,已成功用于European XFEL SPB/SFX混合注入时间分辨实验。双光子3D打印技术可实现GDVN、Mix-GDVN、HVE、MESH等液体喷嘴高精度量产,European XFEL的样品环境研究小组公布了这些喷头的3D模型及设计参数^[59]。

2.3 高黏度液体喷射装置

对于脉冲重复频率在120 Hz以内的XFEL, GDVN输运方法的样品消耗量较大,通常将样品嵌入黏性基质中采用高黏度样品输运喷嘴HVE进行传输。由于高黏度样品挤出需要极大的压力(约2 000~10 000 psi),需要通过增加液流管道直径来减小对挤出压力的要求,因此HVE喷嘴的样品管道直径通常较大,约50~100 μm ,样品流速约0.01~2 $\mu\text{l/min}$ ^[42, 44](图2d)。高黏度的样品在传输过程中容易发生卷曲,与GDVN类似,HVE通常采用氦气或者氮气作为同轴的鞘气保护来保持样品射流的准直性,但该鞘气不对样品射流起聚焦作用。HVE的样品存储器离喷嘴出口很近,通过HPLC上的蠕动泵驱动水溶液挤压活塞驱动高黏度的晶体溶液从喷嘴管道喷出。根据哈根-泊肃叶方程,样品在管道中的传输距离越短,所需的挤出压力越小。

膜蛋白样品常采用LCP生长晶体,Weierstall等^[42]设计了LCP高黏度样品喷嘴,可用于XFEL或同步辐射串行晶体学膜蛋白样品输运。采用LCP高黏度样品喷嘴可以将生长在LCP内的蛋白晶体像挤牙膏的方式缓慢挤压出10~50 μm 直径的射流,LCP流速1~300 nl/min,其样品消耗量仅GDVN的1/20(图2d)。为了降低空气带来的背景散射,串行晶体学实验站的样品环境通常为真空或者氦气环境,但LCP介质不能用于真空环境,在真空环境温度降低且容易脱水导致LCP相变^[22]。高黏度液体喷嘴所使用的运载晶体的黏性注射基质除LCP外还包括高分子质量的聚环氧乙烷^[60](PEO)、油脂^[61]、凡士林^[62]、琼脂糖^[63]、透明质酸^[64]以及羧甲基纤维素钠和Pluronic F-127新型水凝胶材料^[65]等。油脂、凡士林等基质会带来较强的背景

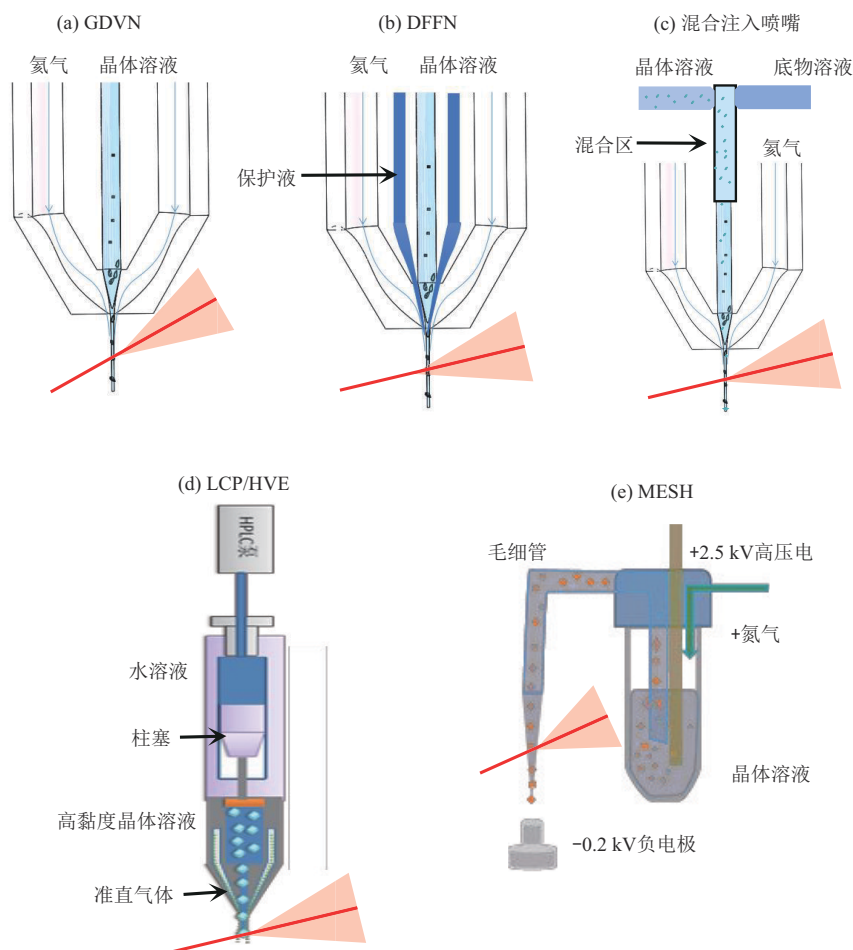


Fig. 2 Various types of liquid jet in serial crystallography

图2 串行晶体学各类型液流喷嘴

(a) 气体聚焦喷嘴 (GDVN), (b) 双流聚焦喷嘴 (DFFN), (c) 混合注入气体聚焦喷嘴 (MixGDVN), (d) 高黏度液体喷嘴 (HVE), (e) 静电纺丝喷嘴 (MESH)。

散射, 而一些亲水基质如琼脂糖、透明质酸、PEO, 相比于LCP、凡士林, 显示出较低的背景散射。其中PEO黏度小, 流体的直径可以从最初的50 μm 减小到约20 μm , 进一步降低了散射背景。

2.4 静电纺丝

静电纺丝喷射器MESH以及同轴的静电纺丝喷射器CoMESH应用于串行晶体学样品传输最早由Sierra等^[46, 66]提出, 是一种可以提供低流速的样品输运方法, 适用于液体和中等黏度的载体介质。通过向晶体溶液样品施加2 000~5 000 V的高电压, 由于电势的作用, 极化的液体表面变形形成泰勒锥, 进而发展成一个细长的液体流 (图2e)。MESH方法流量非常低, 大约为0.14~3.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。与其他注射方法相比, 可以使用更大的毛细管尺寸如75~100 μm , 甚至更大, 从而减轻堵塞问题。MESH方

法在自由电子激光上已成功用于解析牛细胞色素氧化酶 (bCcO) 高分辨的蛋白质结构^[67], 用于时间分辨实验, 如研究光系统II催化反应过程中的结构变化^[14], 也可用于纳米晶体学实验, 如解析天然杀虫剂细菌毒素BinAB纳米晶体结构^[2]。除了在串行晶体学中的应用, MESH也可用于单颗粒成像实验^[68]以及软X射线谱学实验^[69]。

2.5 微液滴喷射技术

GDVN样品输运方法样品消耗较大, 射流为连续射流, 会造成XFEL两个脉冲间隔区域的样品的浪费。HVE方法由于射流直径大, 样品基质会带来较大的背景散射, 微液滴喷射方法良好的解决了这些缺点。通过压电^[23]或者超声^[70]驱动的液滴喷嘴将蛋白质微晶溶解缓冲液喷射成为脉冲液滴 (图3a, b), 并在时间和空间上进行控制, 以便与

30 Hz、60 Hz或120 Hz的XFEL脉冲同步。液滴的大小可以控制在50~200 μm 。在匹配30 Hz的脉冲下，压电驱动液滴喷射方法样品消耗量为0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，样品使用量 $<1\text{ mg}$ [23]。在这种样品输送方法中，微晶可以脉冲式引入，与连续样品输送相比可以减少样品消耗。由于该方法不需要油脂等添加剂，背景噪音低于黏性介质的背景噪音。

ADE方法和传送带组合成DOT系统（图3c），可以为泵浦-探测测量提供更高的灵活性，该方法能够研究各种瞬态反应中间体。不仅适用于晶体学

研究，还可以与X射线发射光谱学等补充技术结合，实现对金属酶的全局结构和化学性质的同时测量，Fuller等 [24] 在对光系统II的Kok循环进行的研究中证明了这一点，同时收集了来自水解Mn簇的衍射数据和发射光谱。Ibrahim等 [13] 采用DOT方法，得到了光系统II在S2到S3过渡过程中衍射和Mn的X射线发射光谱（XES）的数据，揭示了在光系统II的S2到S3过渡过程中发生的一系列反应过程，对于深入理解光合作用的机理具有重要的意义。

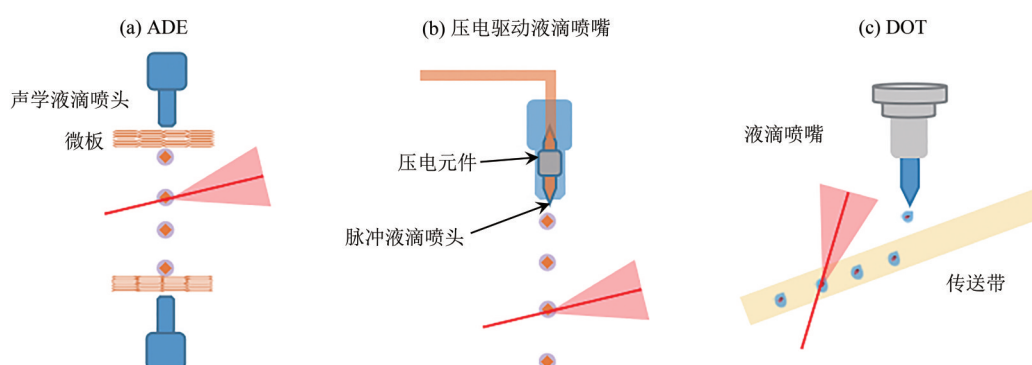


Fig. 3 Illustrates schematic diagrams of three serial crystallographic droplet delivery methods

图3 串行晶体学液滴输运方法示意图

(a) 声学液滴喷嘴 (ADE), (b) 压电驱动液滴喷嘴, (c) 液滴方法结合传送带输运方法 (DOT)。

2.6 液流表征

目前，采用高速相机测量液流速度具有一定局限性，高速相机的测速极限取决于射流直径与快门时间。工业相机的快门时间最低可达156 ns，能够测量流速小于40 m/s的液体流动。如果采用频闪激光（脉宽在10~50 ns之间），则可以测量流速高达200 m/s的液流。具体的测量原理是在测量过程中，使用高亮度的频闪激光作为照明源，并设置适当的脉冲间隔。相机在每一帧图像中记录多次（例如两次）液滴的位置。通过观察液滴在两个连续脉冲之间的位移来计算液滴的移动距离。同时记录频闪激光的脉冲间隔 (Δt)。通过计算液滴移动距离 (Δd) 与 Δt 之比，即 $\Delta d/\Delta t$ ，就可以获得液流速度 [21, 71]。可以使用共轴显微镜或侧视显微镜来测量液流的直径和稳定长度。

3 固定靶

固定靶的方法主要是将晶体固定在具有周期性阵列结构的芯片，如周期性的孔洞 [72-73] 或者矩形

槽 [74] 的芯片，或者无序分布在支撑薄膜上 [75-77]（图4a）。基于同步辐射的串行晶体学方法通常在大气环境下采集数据，芯片通常被固定在衍射仪的磁力底座上 [78] 或者高精度的3D位移平台 [79-80]，采用扫描的方式收集数据。采用未封闭的上样芯片收集数据时，为了防止晶体脱水，会采用湿度控制系统来保障晶体在数据采集过程中一直处于湿润的活性状态，从而保障晶体的质量 [81-82]。芯片的制作通常采用光刻和刻蚀等微纳加工技术，存在加工价格昂贵、易碎等缺点，这一定程度上限制了芯片在自由电子激光串行晶体学中的使用。而且硅芯片可能会被强的X光或XFEL脉冲损坏，在某些角度会呈现较强的衍射信号。为了寻找便宜的晶体支撑材料，人们把目光投向了薄膜。常用的薄膜材料包括麦拉膜 [83]、尼龙膜 [84]、石墨烯 [85]、康普顿膜 [75, 86]、环烯烃共聚物COC膜 [87]，以及聚碳酸酯薄膜 [88] 等。基于薄膜的固定靶装置，晶体能原位生长在薄膜三明治结构中 [77, 89]，晶体位置通常任意排列，在数据收集之前通常会通过显微镜或者

紫外荧光成像自动识别晶体位置, 然后沿着识别到的晶体位置进行扫描。除了基于衍射仪的数据收集固定靶装置 (图 4c), 自由电子激光串行晶体学实验站通常采用真空环境, 采用高精度电机的 3D 扫描平台或者六足位移台作为固定靶的运动扫描机构 (图 4b)。电机扫描移动过程应该与自由电子激光脉冲相匹配, 目前固定靶的方法只能与脉冲频率小于 1 000 Hz 的自由电子激光脉冲相匹配^[90]。固定靶的方法适用于样品量少的蛋白质晶体, 目前也是自由电子激光串行晶体学线站的常用上样方法。

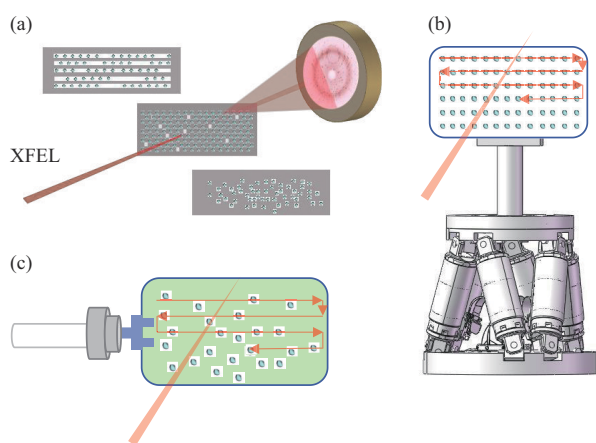


Fig. 4 Illustrates schematic diagrams of fixed target method

图4 串行晶体学固定靶方法示意图

(a) 晶体样品在芯片或者薄膜固定靶中周期性排布或者随意的排布方式, (b) 同步辐射或自由电子激光基于衍射仪的固定靶数据采集方式, (c) 自由电子激光真空环境下基于六足位移台的固定靶数据采集方式。

4 总结与展望

随着高重复频率自由电子激光的不断发展、探测器技术的进步以及用户实验需求的特殊性, 串行晶体学样品输运方法在持续创新与优化, 旨在提高样品输送效率、降低样品消耗量, 并获得更高的时间分辨率。其中, 气体聚焦 GDVN 方法使得射流变得更小, 从而提高了样品输送效率, DFFN 进一步改进了 GDVN 的参数空间, 提高了射流的稳定性。然而, 对于某些系统来说, GDVN 仍然会导致样品消耗过高。因此, 开发了低流速的 MESH 和改进的 coMESH 注射方法, 利用静电纺丝原理将射流直径以及流速变得更小。同时, 研究人员还探索了黏度较高的介质喷嘴 HVE, 以进一步减少样品消

耗量, 并为基于 LCP 生长的膜蛋白晶体结构解析提供有力工具。为了解决连续液流带来的样品消耗问题, 开发了与 FEL 重复频率相匹配的液滴注射系统, 从而实现更低的样品消耗率。利用激光脉冲激发 XFEL 脉冲捕获蛋白质晶体中的动态变化, 以获得其不同时间点的结构信息, 已经成为时间分辨晶体学研究的主流方法。混合注入喷嘴 MixGDVN 的出现为研究生物大分子晶体与底物的中间体结构和毫秒级反应过程的时间分辨研究提供了有力的工具。目前, 超薄液膜技术主要用于软 X 射线谱学研究, 在串行晶体学中也显示出潜力。为了提高命中率和减少样品消耗, 固定靶方法成为了同步辐射串行晶体学以及样品量极少的其他串行晶体学实验的最佳选择, 但仍需进一步提高样品传输效率, 以实现与更高自由电子激光重频的匹配。

随着 3D 打印技术的不断发展, 双光子 3D 打印技术实现了惊人的打印精度, 可达到 50 nm。此外, GDVN、Mix-GDVN、DFFN 和 HVE 等液流喷嘴也能够采用双光子 3D 打印技术进行打印。通过结合数值模拟技术, 可以对 3D 喷嘴的结构进行优化, 从而显著提高喷嘴结构的可重复性, 并使得射流性能更为出色。未来, 实验站进样方法将与用户的实验需求深度融合, 进一步提高实验效率, 从而带来更好的实验体验。

参 考 文 献

- [1] Tetreau G, Sawaya M R, De Zitter E, *et al.* De novo determination of mosquitocidal Cry11Aa and Cry11Ba structures from naturally-occurring nanocrystals. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4376
- [2] Colletier J P, Sawaya M R, Gingery M, *et al.* De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. *Nature*, 2016, **539**(7627): 43-47
- [3] Schriber E A, Paley D W, Bolotovskiy R, *et al.* Chemical crystallography by serial femtosecond X-ray diffraction. *Nature*, 2022, **601**(7893): 360-365
- [4] Aleksich M, Paley D W, Schriber E A, *et al.* XFEL microcrystallography of self-assembling silver n-alkanethiolates. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(31): 17042-17055
- [5] Neutze R, Wouts R, Van Der Spoel D, *et al.* Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 2000, **406**(6797): 752-757
- [6] Gruhl T, Weinert T, Rodrigues M J, *et al.* Ultrafast structural changes direct the first molecular events of vision. *Nature*, 2023, **615**(7954): 939-944
- [7] Bhowmick A, Hussein R, Bogacz I, *et al.* Structural evidence for intermediates during O₂ formation in photosystem II. *Nature*, 2023, **617**(7961): 629-636

- [8] De Wijn R, Melo D V M, Koua F H M, *et al.* Potential of time-resolved serial femtosecond crystallography using high repetition rate XFEL sources. *Appl Sci*, 2022, **12**(5): 2551
- [9] Tosha T, Nomura T, Nishida T, *et al.* Capturing an initial intermediate during the P450_{nor} enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 1585-1589
- [10] Nogly P, Weinert T, James D, *et al.* Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond X-ray laser. *Science*, 2018, **361**(6398): eaat0094
- [11] Nass Kovacs G, Colletier J P, Grünbein M L, *et al.* Three-dimensional view of ultrafast dynamics in photoexcited bacteriorhodopsin. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3177
- [12] Barends T R M, Foucar L, Ardevol A, *et al.* Direct observation of ultrafast collective motions in CO myoglobin upon ligand dissociation. *Science*, 2015, **350**(6259): 445-450
- [13] Ibrahim M, Fransson T, Chatterjee R, *et al.* Untangling the sequence of events during the S2→S3 transition in photosystem II and implications for the water oxidation mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(23): 12624-12635
- [14] Kern J, Tran R, Alonso-Mori R, *et al.* Taking snapshots of photosynthetic water oxidation using femtosecond X-ray diffraction and spectroscopy. *Nat Commun*, 2014, **5**(1): 4371-4371
- [15] Pande K, Hutchison C D M, Groenhof G, *et al.* Femtosecond structural dynamics drives the trans/cis isomerization in photoactive yellow protein. *Science*, 2016, **352**(6286): 725-729
- [16] Yun J H, Li X, Yue J, *et al.* Early-stage dynamics of chloride ion-pumping rhodopsin revealed by a femtosecond X-ray laser. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(13): e2020486118
- [17] Kupitz C, Grotjohann I, Conrad C E, *et al.* Microcrystallization techniques for serial femtosecond crystallography using photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as a model system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, **369**(1647): 20130316
- [18] Lee D B, Kim J-M, Seok J H, *et al.* Supersaturation-controlled microcrystallization and visualization analysis for serial femtosecond crystallography. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 2541
- [19] Shoeman R L, Hartmann E, Schlichting I. Growing and making nano- and microcrystals. *Nat Protoc*, 2022, **18**(3): 854-882
- [20] Blaj G, Liang M, Aquila A L, *et al.* Generation of high-intensity ultrasound through shock propagation in liquid jets. *Phys Rev Fluids*, 2019, **4**(4): 043401
- [21] Stan C A, Milathianaki D, Laksmo H, *et al.* Liquid explosions induced by X-ray laser pulses. *Nat Phys*, 2016, **12**(10): 966-971
- [22] Wells D J, Berntsen P, Balaur E, *et al.* Observations of phase changes in monoolein during high viscous injection. *J Synchrotron Radiat*, 2022, **29**(3): 602-614
- [23] Mafuné F, Miyajima K, Tono K, *et al.* Microcrystal delivery by pulsed liquid droplet for serial femtosecond crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, **72**(4): 520-523
- [24] Fuller F D, Gul S, Chatterjee R, *et al.* Drop-on-demand sample delivery for studying biocatalysts in action at X-ray free-electron lasers. *Nat Methods*, 2017, **14**(4): 443-449
- [25] Hoffman D J, Van Driel T B, Kroll T, *et al.* Microfluidic liquid sheets as large-area targets for high repetition XFELs. *Front Mol Biosci*, 2022, **9**: 1048932
- [26] Koralek J D, Kim J B, Bruza P, *et al.* Generation and characterization of ultrathin free-flowing liquid sheets. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1353
- [27] Liang M, Williams G J, Messerschmidt M, *et al.* The coherent X-ray imaging instrument at the Linac Coherent Light Source. *J Synchrotron Radiat*, 2015, **22**(3): 514-519
- [28] Boutet S, Cohen A E, Wakatsuki S. The new macromolecular femtosecond crystallography (MFX) instrument at LCLS. *Synchrotron Radiat News*, 2016, **29**(1): 23-28
- [29] Chollet M, Alonso-Mori R, Cammarata M, *et al.* The X-ray Pump-Probe instrument at the Linac Coherent Light Source. *J Synchrotron Radiat*, 2015, **22**(3): 503-507
- [30] Mancuso A P, Aquila A, Batchelor L, *et al.* The single particles, clusters and biomolecules and serial femtosecond crystallography instrument of the European XFEL: initial installation. *J Synchrotron Radiat*, 2019, **26**(3): 660-676
- [31] Tono K, Togashi T, Inubushi Y, *et al.* Beamline, experimental stations and photon beam diagnostics for the hard X-ray free electron laser of SACLA. *New J Phys*, 2013, **15**(8): 83035-21
- [32] Tono K, Nango E, Sugahara M, *et al.* Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser. *J Synchrotron Radiat*, 2015, **22**(3): 532-537
- [33] Park J, Kim S, Kim S, *et al.* Multifarious injection chamber for molecular structure study (MICOSS) system: development and application for serial femtosecond crystallography at Pohang Accelerator Laboratory X-ray Free-Electron Laser. *J Synchrotron Radiat*, 2018, **25**(2): 323-328
- [34] Ingold G, Rittmann J, Beaud P, *et al.* SwissFEL instrument ESB femtosecond pump-probe diffraction and scattering. *AIP Conf Proc*, 2016, **1741**(1): 030039
- [35] Ingold G, Abela R, Arrell C, *et al.* Experimental station Bernina at SwissFEL: condensed matter physics on femtosecond time scales investigated by X-ray diffraction and spectroscopic methods. *J Synchrotron Radiat*, 2019, **26**(3): 874-886
- [36] DePonte D, Weierstall U, Schmidt K, *et al.* Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams. *J Phys D Appl Phys*, 2008, **41**(19): 195505
- [37] Beyerlein K R, Adriano L, Heymann M, *et al.* Ceramic micro-injection molded nozzles for serial femtosecond crystallography sample delivery. *Rev Sci Instrum*, 2015, **86**(12): 125104
- [38] Calvey G D, Katz A M, Pollack L. Microfluidic mixing injector holder enables routine structural enzymology measurements with mix-and-inject serial crystallography using X-ray free electron lasers. *Anal Chem*, 2019, **91**(11): 7139-7144
- [39] Schmidt M. Mix and inject: reaction initiation by diffusion for time-resolved macromolecular crystallography. *Adv Cond Matter Phys*, 2013, **2013**: 167276

- [40] Oberthuer D, Knoska J, Wiedorn M O, *et al.* Double-flow focused liquid injector for efficient serial femtosecond crystallography. *Sci Rep*, 2017, **7**: 44628
- [41] Doppler D, Rabbani M T, Letrun R, *et al.* Co-flow injection for serial crystallography at X-ray free-electron lasers. *J Appl Crystallogr*, 2022, **55**(Pt 1): 1-13
- [42] Weierstall U, James D, Wang C, *et al.* Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3309
- [43] Berntsen P, Hadian Jazi M, Kusel M, *et al.* The serial millisecond crystallography instrument at the Australian Synchrotron incorporating the “Lipidico” injector. *Rev Sci Instrum*, 2019, **90**(8): 085110
- [44] Shimazu Y, Tono K, Tanaka T, *et al.* High-viscosity sample-injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure. *J Appl Crystallogr*, 2019, **52**(Pt 6): 1280-1288
- [45] Sierra R G, Laksmono H, Kern J, *et al.* Nanoflow electrospinning serial femtosecond crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, **68**(Pt 11): 1584-1587
- [46] Sierra R G, Gati C, Laksmono H, *et al.* Concentric-flow electrokinetic injector enables serial crystallography of ribosome and photosystem II. *Nat Methods*, 2016, **13**(1): 59-62
- [47] Roessler C G, Agarwal R, Allaire M, *et al.* Acoustic injectors for Drop-On-Demand serial femtosecond crystallography. *Structure*, 2016, **24**(4): 631-640
- [48] Mafune F, Miyajima K, Tono K, *et al.* Microcrystal delivery by pulsed liquid droplet for serial femtosecond crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, **72**(Pt 4): 520-523
- [49] Hunter M S, Segelke B, Messerschmidt M, *et al.* Fixed-target protein serial microcrystallography with an X-ray free electron laser. *Sci Rep*, 2014, **4**: 6026
- [50] Schulz J, Bielecki J, Doak R B, *et al.* A versatile liquid-jet setup for the European XFEL. *J Synchrotron Radiat*, 2019, **26**(Pt 2): 339-345
- [51] Mancuso A P, Aquila A, Batchelor L, *et al.* The single particles, clusters and biomolecules and serial femtosecond crystallography instrument of the European XFEL: initial installation. *J Synchrotron Radiat*, 2019, **26**(Pt 3): 660-676
- [52] Grünbein M L, Stricker M, Nass Kovacs G, *et al.* Illumination guidelines for ultrafast pump-probe experiments by serial femtosecond crystallography. *Nat Methods*, 2020, **17**(7): 681-684
- [53] Beale J H, Bolton R, Marshall S A, *et al.* Successful sample preparation for serial crystallography experiments. *J Appl Crystallogr*, 2019, **52**(6): 1385-1396
- [54] Gañán-Calvo A M. Generation of steady liquid microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas streams. *Phys Rev Lett*, 1998, **80**(2): 285-288
- [55] Chapman H N, Fromme P, Barty A, *et al.* Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 2011, **470**(7332): 73-77
- [56] Boutet S, Lomb L, Williams G J, *et al.* High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science*, 2012, **337**(6092): 362-364
- [57] Wang D, Weierstall U, Pollack L, *et al.* Double-focusing mixing jet for XFEL study of chemical kinetics. *J Synchrotron Radiat*, 2014, **21**(Pt 6): 1364-1366
- [58] Knoška J, Adriano L, Awel S, *et al.* Ultracompact 3D microfluidics for time-resolved structural biology. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 657
- [59] Vakili M, Bielecki J, Knoska J, *et al.* 3D printed devices and infrastructure for liquid sample delivery at the European XFEL. *J Synchrotron Radiat*, 2022, **29**(Pt 2): 331-346
- [60] Martin-Garcia J M, Conrad C E, Nelson G, *et al.* Serial millisecond crystallography of membrane and soluble protein microcrystals using synchrotron radiation. *IUCrJ*, 2017, **4**(4): 439-454
- [61] Sugahara M, Mizohata E, Nango E, *et al.* Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography. *Nat Methods*, 2015, **12**(1): 61-63
- [62] Botha S, Nass K, Barends T R M, *et al.* Room-temperature serial crystallography at synchrotron X-ray sources using slowly flowing free-standing high-viscosity microstreams. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2015, **71**(2): 387-397
- [63] Conrad C E, Basu S, James D, *et al.* A novel inert crystal delivery medium for serial femtosecond crystallography. *IUCrJ*, 2015, **2**(4): 421-430
- [64] Sugahara M, Song C, Suzuki M, *et al.* Oil-free hyaluronic acid matrix for serial femtosecond crystallography. *Sci Rep*, 2016, **6**(1): 24484
- [65] Kovacsova G, Grunbein M L, Kloos M, *et al.* Viscous hydrophilic injection matrices for serial crystallography. *IUCrJ*, 2017, **4**(Pt 4): 400-410
- [66] Sierra R G, Laksmono H, Kern J, *et al.* Nanoflow electrospinning serial femtosecond crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, **68**(11): 1584-1587
- [67] Ishigami I, Sierra R, Su Z, *et al.* Structural basis for functional properties of cytochrome c oxidase. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2023.03.20.530986
- [68] Mall A, Ayyer K. Holographic single-particle imaging for weakly scattering, heterogeneous nanoscale objects. *Phys Rev Appl*, 2023, **19**(5): 054027
- [69] Kroll T, Kern J, Kubin M, *et al.* X-ray absorption spectroscopy using a self-seeded soft X-ray free-electron laser. *Opt Express*, 2016, **24**(20): 22469-22480
- [70] Roessler Christian G, Agarwal R, Allaire M, *et al.* Acoustic injectors for Drop-On-Demand serial femtosecond crystallography. *Structure*, 2016, **24**(4): 631-640
- [71] Knoška J, Adriano L, Awel S, *et al.* Ultracompact 3D microfluidics for time-resolved structural biology. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 657
- [72] Zarrine-Afsar A, Barends T R M, Müller C, *et al.* Crystallography on a chip. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, **68**(3): 321-323
- [73] Norton-Baker B, Mehrabi P, Boger J, *et al.* A simple vapor-diffusion method enables protein crystallization inside the HARE

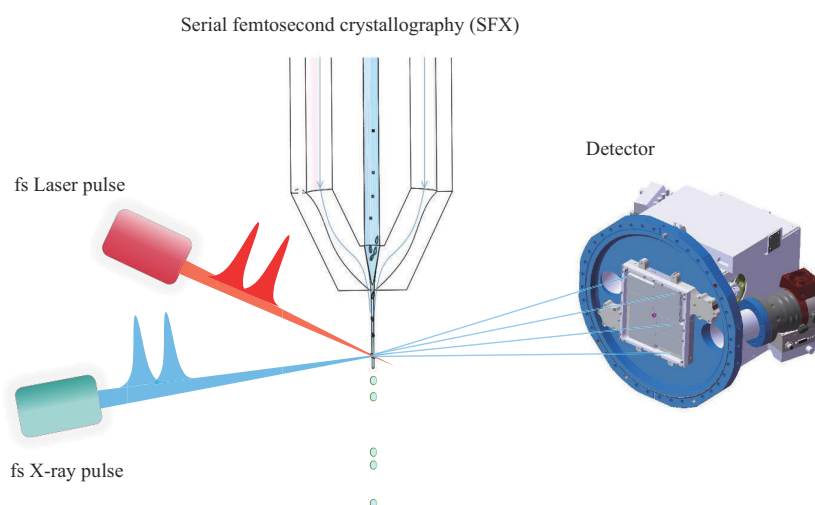
- serial crystallography chip. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2021, **77**(6): 820-834
- [74] Li B, Wang Q, Li M, *et al.* Chip-based efficient data collection technology from multiple crystals. *Nuclear Techniques*, 2019, **42**(6): 1-6
- [75] Li B, Huang S, Pan Q Y, *et al.* New design for multi-crystal data collection at SSRF. *Nucl Sci Tech*, 2018, **29**(2): 48-56
- [76] 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. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, **72**(1): 93-112
- [77] Huang C Y, Olieric V, Howe N, *et al.* *In situ* serial crystallography for rapid *de novo* membrane protein structure determination. *Commun Biol*, 2018, **1**(1): 124
- [78] Huang C Y, Meier N, Caffrey M, *et al.* 3D-printed holders for in meso in situ fixed-target serial X-ray crystallography. *J Appl Crystallogr*, 2020, **53**(3): 854-859
- [79] Ebrahim A, Appleby M V, Axford D, *et al.* Resolving polymorphs and radiation-driven effects in microcrystals using fixed-target serial synchrotron crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2018, **75**(2): 151-159
- [80] Sherrell D A, Lavens A, Wilamowski M, *et al.* Fixed-target serial crystallography at the Structural Biology Center. *J Synchrotron Radiat*, 2022, **29**(5): 1141-1151
- [81] Sanchez-Weatherby J, Bowler M W, Huet J, *et al.* Improving diffraction by humidity control: a novel device compatible with X-ray beamlines. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009, **65**(12): 1237-1246
- [82] Roedig P, Vartiainen I, Duman R, *et al.* A micro-patterned silicon chip as sample holder for macromolecular crystallography experiments with minimal background scattering. *Sci Rep*, 2015, **5**(1): 10451
- [83] Mueller C, Marx A, Epp S W, *et al.* Fixed target matrix for femtosecond time-resolved and *in situ* serial micro-crystallography. *Struct Dyn*, 2015, **2**(5): 054302
- [84] Lee D, Back S, Park J, *et al.* Nylon mesh-based sample holder for fixed-target serial femtosecond crystallography. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 6971
- [85] Sui S, Wang Y, Kolewe K W, *et al.* Graphene-based microfluidics for serial crystallography. *Lab Chip*, 2016, **16**(16): 3082-3096
- [86] Illava G, Jayne R, Finke A D, *et al.* Integrated sample-handling and mounting system for fixed-target serial synchrotron crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2021, **77**(5): 628-644
- [87] Karpik A, Martiel I, Kristiansen P M, *et al.* Fabrication of ultrathin suspended polymer membranes as supports for serial protein crystallography. *Micro and Nano Engineering*, 2020, **7**: 100053
- [88] Baxter E L, Aguila L, Alonso-Mori R, *et al.* High-density grids for efficient data collection from multiple crystals. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, **72**(1): 2-11
- [89] Huang C Y, Olieric V, Caffrey M, *et al.* In Meso *In Situ* Serial X-Ray Crystallography (IMISX): a protocol for membrane protein structure determination at the Swiss Light Source. *Methods Mol Biol*, 2020, **2127**: 293-319
- [90] Tolstikova A, Levantino M, Yefanov O, *et al.* 1 kHz fixed-target serial crystallography using a multilayer monochromator and an integrating pixel detector. *IUCrJ*, 2019, **6**(5): 927-937

Overview of Sample Delivery Methods for Serial Crystallography*

LI Ling-Hao, LI Bing**, WENG Tsu-Chien**

(Center for Transformative Science, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

Graphical abstract



Abstract The sample delivery method is one of the key steps in implementing serial femtosecond crystallography research using X-ray free-electron lasers. Serial femtosecond crystallography can effectively capture the ultrafast dynamic processes of biological molecules, such as protein conformational changes and intermediate states in chemical reactions. It is of great significance for scientists to better understand the structure and function of biological molecules, reveal the mechanisms of life activities, and provide important technical means for drug development and biotechnology. When conducting experiments at X-ray free-electron laser beamline station, it is crucial to transport the samples to the region where it interacts with the free-electron laser pulses. The choice of suitable sample delivery method plays a decisive role in the sample consumption and experimental efficiency, and it is also an important factor for the success or failure of the experiment. This article reviews the latest research progress and future development directions of sample delivery methods in serial crystallography. It also introduces commonly used sample delivery methods and their applicable ranges, aiming to provide reference and guidance for scientists engaged in serial crystallography research. The sample transport methods of free electron lasers mainly include liquid injection and fixed target sample transport. The liquid injection method is achieved through various liquid sample injectors. The aqueous solution is driven by a

* This work was supported by a grant from the Ministry of Science and Technology of China (2021YFA1500600).

** Corresponding author.

LI Bing. Tel: 86-17321359330, E-mail: libing1@shanghaitech.edu.cn

WENG Tsu-Chien. Tel: 86-13917660235, E-mail: wengzq@shanghaitech.edu.cn

Received: September 26, 2023 Accepted: December 26, 2023

peristaltic pump on high performance liquid chromatography (HPLC) into a sample storage, and the aqueous solution pushes the piston in the sample storage to extrude the sample solution into the sample transport pipeline, and finally sprays it out through the nozzle to reach the XFEL interaction region. For micro-nano crystals, 3 preparation methods are introduced, including free interface diffusion method, seeding method, and batch crystallization, and characterization methods are also introduced. For the requirements of high sample transmission efficiency and low sample consumption, a gas-based liquid flow transport method is introduced, which is based on the principle of focusing the sample jet by coaxial gas to form a jet with a small diameter and fast flow rate. At the same time, the extended double flow focusing nozzle and mixed injection nozzle are briefly described. For samples in viscous media, a high viscosity liquid injection device is introduced, and the advantages and disadvantages of different media are explained and exemplified. In addition, the principle and example of electrostatic spinning injector and piezoelectric driven droplet injection technology applied to low-velocity serial crystallography experiments are also introduced. For the above liquid injection methods, a characterization method using a coaxial microscope or side-view microscope to measure the diameter and stable length of the liquid flow is introduced. Compared with the liquid injection method, the fixed target method is to fix the crystal on a support chip with a periodic array structure, and collect data through scanning. The working principle, sample environment, support materials, *etc.* of the fixed target method are briefly introduced in the article. With the advancement and development of technologies such as free electron lasers and detectors, various sampling methods for serial crystallography are constantly being innovated and optimized. By selecting appropriate sample delivery methods, it will be possible to improve experimental efficiency, reduce sample consumption, and open up new possibilities for researchers in the field of structural biology of biomacromolecules.

Key words X-ray free-electron lasers, serial crystallography, structural biology, liquid sample delivery methods, fixed target

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0379