

微蛋白質結晶學的新利器 (TPS 07A)

TPS 07A 建造團隊
國家同步輻射研究中心 實驗設施組

概要介紹

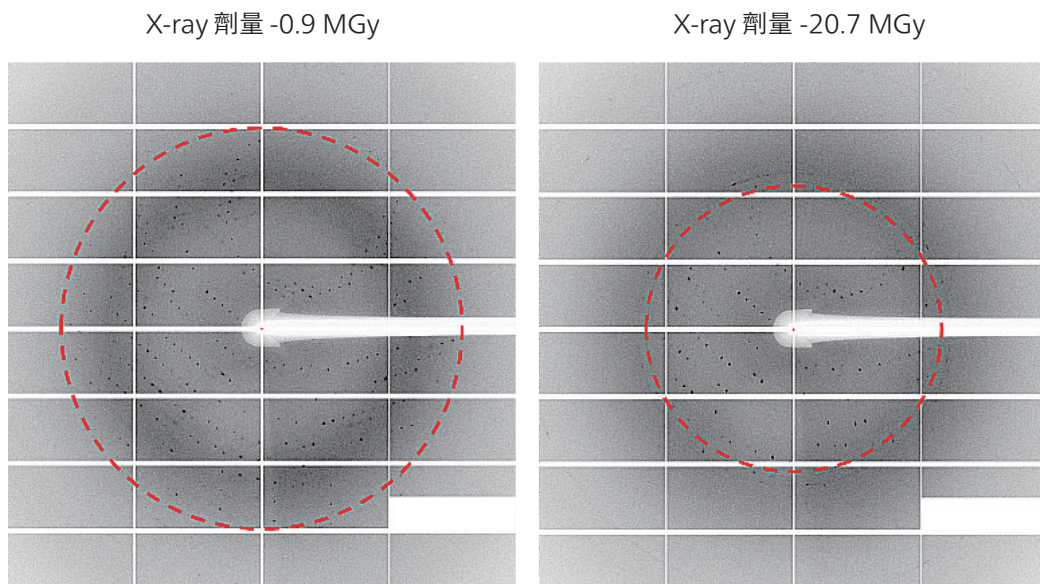
結構生物學先進的實驗方法不但加速生命科學的研究，也促進許多生物醫學的應用。這些先進方法中，以同步輻射為基礎的 X 光蛋白質結晶學仍是解析生物巨分子結構最具優勢的實驗技術之一。目前儲存在蛋白質數據庫 (protein data bank) 的所有生物結構中有 80% 皆使用此法，過去 25 年也有 7 座諾貝爾獎頒給使用此技術的學者專家。除了具有重要的學術價值外，受惠於高度自動化的關係，藥廠的使用需求也日益增加。

此核心設施自 2006 年開放以來，在設施建造、營運及管理上有足夠的能力及經驗，已累積眾多國內外用戶群。近年來，許多用戶群對於「高挑戰性蛋白質」的研究課題，如病毒蛋白 (單位晶胞大、繞射訊號重疊嚴重不易分析) 和膜蛋白 (晶體尺寸小、繞射訊號微弱難以量測)，也開始躍躍欲試。然而，受限於台灣光源 (TLS) 的亮度不足，無法收集到足夠解析之繞射數據。2017 年 1 月，台灣光子源 (TPS) 蛋白質微結晶學光束線 (TPS 05A) 正式啟用，也順利從單位晶胞大的病毒晶體 (最長軸為 731.0 Å) 成功收集到可分析之繞射數據，但是對於超微晶體仍有困難。另一方面，儘管膜蛋白僅佔人類基因的 30%，但因其重要之生物特性而佔所有藥物標靶的 60% 以上。有鑑於此，2021 下半年加入的微聚焦蛋白質結晶學光束線 (TPS 07A)，就是專門優化給如膜蛋白這類尺寸超小的微晶體 (micro-crystal) 使用。

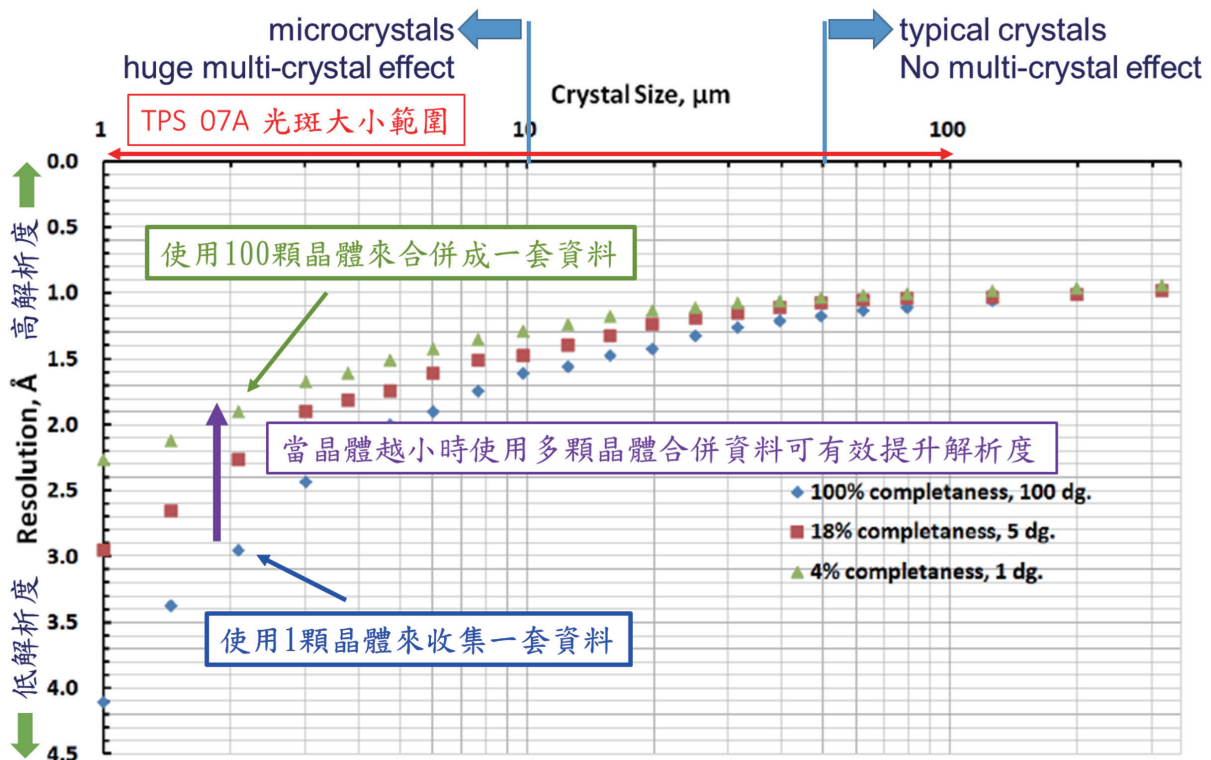
光束線設計與考量

針對微晶體的數據收集其最大困境就是繞射訊號微弱，為了大幅增強繞射訊號，光束線在設計上便著重在以下三點，分別為光斑面積小 (當光斑面積符合晶體尺寸時可降低背景散射，避免天生微弱的訊號淹沒於背景之中)、光通量密度高 (增加每單位可用的光子數使訊號變強)、光束位置穩定性高 (使微晶體一直在 X 光照射範圍)。因此，相較於 TPS 05A 之光學設計，TPS 07A 為了達到上述需求且同時考量到本身光束線長度與實驗站空間之配置，首次採用水平方向兩段式聚焦的設計。經過實測，於樣本位置目前可達最小光斑為 $2.2 \times 2.0 \mu\text{m}^2$ (水平 x 垂直)，而光通量約為 1.0×10^{12} photons/sec。此數據與全世界類似的微聚焦光束線比較都有相同的水準。

然而，光斑面積小加上光通量密度高確實解決上述問題，但卻伴隨著嚴重輻射傷害的副作用，造成繞射訊號迅速地由外圍消失 (高解析度區域) (圖一)，大幅減損資料品質導致最終無法使用。設計高光通量密度規格的原意是提高訊號強度，最終卻讓訊號如曇花一現般的消失。為解決此問題，實驗站利用數據收集策略，實驗方法跳脫以往僅使用單顆晶體來完成所有數據的收集需求，改為一顆微晶體只收集部分資料 (partial dataset)，而在嚴重輻射傷害發生前，便捨棄已照射的晶體改收下一顆新鮮的微晶體，最終合併多套部分資料後能產生一組品質高且數據完整的資



圖一 因為輻射傷害的影響，造成高解析度的訊號消失。



圖二 此模擬結果說明透過眾多微晶體合併成一套數據，可提升數據品質。團隊實測結果也與模擬結果吻合，解析度確實會提高。此外，TPS 07A 所提供的光斑範圍，讓用戶可根據本身之晶體來選擇不同的數據收集策略。
(資料來源：https://www.ccp4.ac.uk/schools/DLS-2015/course_material.php)

料集 (圖二)。然而由於每顆晶體之間通常有所差異，繞射資料未必能直接合併，或合併後反而導致資料品質變差，因此實務上需收集數十至數百顆晶體的部分資料，再利用軟體進行集群分析 (cluster analysis)，挑選出其中值得合併的組合進而得到最好的結果。這引發了對實驗站規格的新需求，如何運送數百顆晶體至繞射儀上進行數據收集變成一個需要考量的問題。新的機器人系統 ISARA 可同時儲存 464 顆晶體，且 20 秒即可更換一個樣品，滿足頻繁更換樣品的需求。高偵率的面積偵測器 (EIGER2 X 16M) 提高數據收集速度搭配高光通量的光源特性進一步縮短整體數據收集時間至合理範圍。實驗站將面對比以往更高流量產出的實驗數據，需要更快速的運算資源、大頻寬的即時傳輸以及大量的儲存空間，皆列入實驗站電腦運算需求。種種考量與設備支援，最終使得 TPS 07A 成為可由微晶體樣品中收集出有用繞射數據的實驗站。

結語

研發團隊面對全世界蛋白質光束線發展趨勢及使用者實際需求，建造出兩座高性能且互補性強的實驗站，除皆具有高通量實驗 (high-throughput experiment) 的能力外，另有各自特色，如專門優化給晶體單位晶胞大 (例：病毒晶體) 的 TPS 05A 和專門優化給微晶體 (例：膜蛋白晶體) 的 TPS 07A。因此，使用者可根據本身的實驗需求選擇適當的光束線。總體來說，此兩大生力軍加入，對台灣產學研界的用戶，不論基礎研究、挑戰性課題或生醫新藥之發展都能注入一股全新的研發能量。

