



X射线自由电子激光及其在超快结构动力学研究中的应用

刘欣慰¹, 刘海广^{2*}, 张文凯^{1*}

1. 北京师范大学物理学系, 应用光学北京市重点实验室, 北京 100875;

2. 北京计算科学研究中心复杂系统研究部, 北京 100193

*联系人, 刘海广, E-mail: hgliu@csrc.ac.cn; 张文凯, E-mail: wkzhang@bnu.edu.cn

收稿日期: 2022-02-15; 接受日期: 2022-04-21; 网络出版日期: 2022-06-10

国家自然科学基金(编号: U2032112, U1930402, 31971136)资助项目

摘要 微观尺度的超快动力学研究主要关注电子和原子核的动态过程, 对测量方法的时空分辨率有非常高的要求. 近年来迅速发展的X射线自由电子激光(X-ray Free Electron Laser, XFEL)具有飞秒脉冲、高亮度、全相干等特点, 为超快动力学研究提供了亟需的装置, 已经在物理、材料、化学和生命科学等领域取得了一系列革命性突破. 本文结合实际应用体系, 介绍了基于XFEL探测超快动力学的三类主要方法, 即X射线吸收/发射光谱、非晶态样品的X射线散射和晶体样品的X射线衍射. 除了探测装置, 超快动力学研究还需要高效的泵浦方法才能更好地启动结构演化, 然后再与XFEL检测方法紧密结合, 从而观测体系高时空分辨的超快动力学过程, 帮助研究人员全面理解该动力学过程的微观机制. 对于生物大分子, 尤其是感光分子体系, 基于XFEL的超快动力学研究为揭示其超快动力学过程和分子机制提供了新的思路和线索.

关键词 X射线自由电子激光, 超快动力学, 泵浦-探测, 时间分辨技术

PACS: 41.60.Cr, 87.15.ht, 87.64.Gb, 61.05.C-

1 引言

许多微观尺度的变化过程都非常快, 比如电子转移发生在飞秒时间尺度, 原子核的运动可以在皮秒时间尺度引起显著的位置变化. 为了研究这些超快变化过程, 研究人员开发了基于脉冲激光的超快光学方法, 能够在短至飞秒甚至阿秒时间尺度“实时跟踪”微观世界中电子的移动和原子核位置的变化. 然而, 传统意义

上的超快光学方法的直接应用局限于对小分子体系的结构变化研究, 这主要是因为传统的光学方法依赖光子频率和强度的变化, 推测电子和振动跃迁等信息. 因此, 从超快动力学研究的开端, 研究人员就一直在尝试利用X射线或电子脉冲来代替长波激光脉冲, 以便观测原子分辨率的空间结构变化. 一般来说, 紫外、可见及红外等波段激光脉冲可以通过共振腔产生, 但是如何产生超强超短的飞秒X射线脉冲在技术

引用格式: 刘欣慰, 刘海广, 张文凯. X射线自由电子激光及其在超快结构动力学研究中的应用. 中国科学: 物理学 力学 天文学, 2022, 52: 270013
Liu X W, Liu H G, Zhang W K. X-ray free-electron lasers and their applications in ultrafast structural dynamics research (in Chinese). Sci Sin-Phys Mech Astron, 2022, 52: 270013, doi: [10.1360/SSPMA-2022-0047](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2022-0047)

和工程方面是巨大的挑战. 近年来, 研究人员在飞秒电子脉冲领域取得了很大进展, 并迅速将其应用于超快电子散射、衍射和显微镜等技术^[1-6]. 在飞秒电子脉冲的基础上, 飞秒X射线激光脉冲的产生给超快动力学领域带来了质的飞跃. 本文将重点介绍X射线自由电子激光器(X-ray Free Electron Laser, XFEL)产生的飞秒X射线激光脉冲及其在超快结构动力学研究中的应用, 读者也可以参考超快结构动力学的其他相关综述文献^[7].

首先, 要有光. 2005年投入使用的FLASH^[8]和2009年出光的LCLS^[9]分别标志着软XFEL和硬XFEL时代的开始. 特别是硬XFEL产生的飞秒X射线脉冲具有两个明显的优点: 原子尺度的空间分辨率和飞秒尺度的时间分辨率. 这为研究人员在原子尺度上研究飞秒超快结构动力学过程提供了前所未有的技术手段. XFEL的出现不仅提高了现有超快X射线实验方法的研究能力, 而且使一些新的实验方法(比如突破辐射剂量限制)成为可能. 因此, 近年来, 超快X射线科学出现了井喷式的发展^[10-14].

迄今为止, 全球共有3个软XFEL装置和5个硬XFEL装置为用户提供X射线脉冲. 此外, 许多国家正在建设或筹建XFEL装置以满足更多的实验需求. 在过去的十多年中, 研究人员发展了多种基于XFEL的飞秒X射线实验方法, 这些方法已广泛应用于物理、化学、材料和生命科学领域. 其中, 动力学研究中最常用的方法是通过诸如可见光波段的飞秒激光脉冲激发样品, 进而利用X射线在不同时间尺度下跟踪固态、液态和气态等情况下样品的微观结构动力学过程. 本文将主要介绍基于XFEL的飞秒X射线技术的最新进展及其在超快结构动力学研究中的应用.

在介绍XFEL的基本原理和飞秒X射线时间分辨技术之后, 我们将结合实际应用体系重点介绍基于XFEL探测超快结构动力学的三类主要方法, 即X射线吸收/发射光谱、非晶态样品的X射线散射和晶体样品的X射线衍射.

2 XFEL基本原理

不同于传统激光器, 基于电子加速器和周期性振荡磁场阵列的自由电子激光(Free Electron Laser, FEL)没有增益介质, 也不需要粒子数反转. 直线加速

器发射的电子脉冲性能更佳, 所以大多数FEL装置使用的是直线加速器. 由于电子束在磁场中的运动模式接近自由电子, 所以这类激光器被称为自由电子激光器. FEL通过直线加速器获得接近光速的电子束, 再通过周期性振荡的磁场将其动能转换为光子能量来获得高亮度的相干激光脉冲. 这种方式产生的FEL波长可以覆盖从远红外到X射线波段的宽广范围, 并且FEL波长可以根据装置特性在其允许的能量范围内连续可调, FEL谐振波长 λ_R 由下列公式给出:

$$\lambda_R = \frac{\lambda_U}{2\gamma^2} \left(1 + \frac{K^2}{2} \right), \quad (1)$$

$$K \propto B_U \lambda_U, \quad (2)$$

其中 K 是波荡器参数, λ_U 和 B_U 分别是波荡器磁场周期和强度, γ 是相对论电子的共振能量, 可以通过调节电子能量、磁场周期和强度等装置参数来改变输出的FEL波长^[15]. 此外, FEL的脉冲结构也可以根据需求进行设计.

按照光场通过波荡器所获得的增益, 可将FEL分为低增益和高增益FEL装置. 振荡器型FEL的波荡器较短, 是典型的低增益FEL装置, 在波荡器两端放置反射镜使光场多次与电子束相互作用并持续获得增益, 直至饱和输出. 由于缺乏适用于真空紫外及更短波长的反射镜材料, 振荡器型FEL多用于太赫兹(THz)和红外波段. 高增益FEL装置一般包含电子枪、直线加速器及波荡器等组成部分^[16-19], 电子束单次通过足够长的波荡器使得光场振幅不断增大直至饱和输出.

目前, 世界上运行及在建的XFEL装置主要有两种: 自放大自发辐射(Self-Amplified Spontaneous Emission, SASE)和外种子型. 事实上, 同步辐射光源通过一定技术手段也可以产生飞秒X射线, 但是光通量一般都很低, 而SASE产生的飞秒X射线则具有很高的通量. SASE产生X射线的原理与同步辐射装置的相似, 即高能电子通过周期性振荡的磁场产生辐射. 由于电子脉冲的特性以及储存环和波荡器的限制, 同步辐射光源产生的X射线的脉冲宽度通常为50–100 ps. 虽然研究人员能够利用激光电子切片方案和低 α 模式获得100 fs的X射线, 但要以光子通量的巨大损失为代价. 脉冲宽度和光子通量的限制可以通过将直线加速器与改进的波荡器阵列相结合来解决, 这就是自由电子激光. 如图1所示, 利用直线加速器将电子束加速至接近光速, 然后

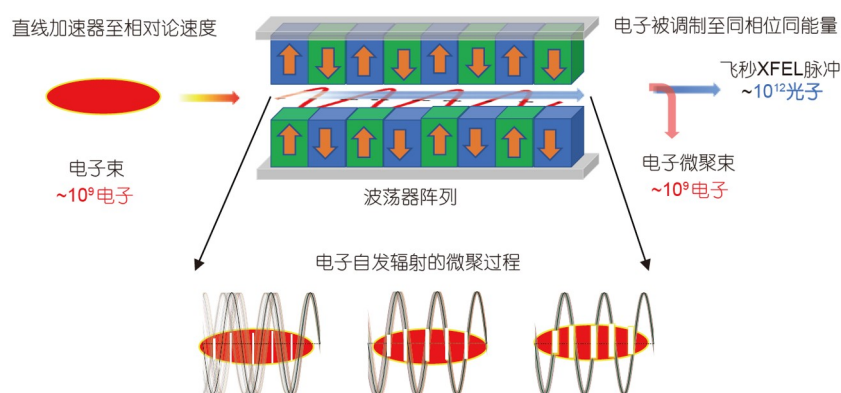


图 1 (网络版彩图) X射线自由电子激光装置示意图. 电子束被直线加速器加速到接近光速, 并且压缩到百飞秒以内, 然后在周期性振荡的波荡器阵列作用下以近似正弦轨迹运动, 并在电子束运动的切线方向产生自发辐射. 沿着电子束运动方向的自发辐射能在波荡器中与其前方电子束持续耦合增强相干性, 在足够长的波荡器内形成微聚束, 发射出全相干的XFEL脉冲. 单个XFEL脉冲包含的光子数与同步辐射设施一秒钟发射的光子数接近, 但是由于脉冲宽度在飞秒量级, 其峰值亮度比同步辐射提升了接近10个数量级

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of an X-ray free electron laser instrument. Electron pulses are accelerated by a linear accelerator to reach relativity speeds, then these electrons will pass through a long undulator array with alternating magnetic fields. Through the coupling with the external magnetic fields and the radiated electromagnetic fields due to the electron oscillation in the transverse plane, pulsed electrons are further sliced into thin layers (which is called microbunching). As a result, electrons oscillate in the same phase and frequency, and such motion produces ultrabright X-ray laser pulses. Each single XFEL pulse contains comparable number of X-ray photons as emitted by a synchrotron in a period of 1 s, yet XFEL is 10 orders of magnitude higher in terms of brilliance due to the femtosecond pulse nature.

该电子束以相对论速度在周期性横向磁场(波荡器)作用下以近似正弦轨迹运动, 并在电子束运动的切线方向产生自发辐射, 自发辐射初始阶段亮度很低且电子束内电子辐射单纯是与外加磁场相互作用导致的非相干辐射; 沿着电子束运动方向的自发辐射在波荡器中与其前方电子持续耦合增强相干性, 具体来说, 电子束在波荡器中通过与自发辐射场作用产生微聚束; 能量密度更高的微聚束又反过来有针对性地放大对应波长的辐射, 从而形成正反馈加强自发辐射直到系统达到饱和状态, 发射出超高亮度的X射线激光. 如前文所述, SASE模式的XFEL的优点是输出波长连续可调, 并且结构简单; 缺点是其中心波长(主导波长)和脉冲能量的抖动都较大, 并且所产生的辐射在不同波段之间仅具有部分相干性. 为了改善高增益XFEL的相干性, 研究人员尝试引入自种子和外种子来实现受激XFEL辐射.

顾名思义, 自种子是指将自发辐射作为种子激光, 具体实现方案是把SASE的波荡器分为两段并用单色器隔开, 第一段输出的电磁辐射通过单色器后变成全相干的X射线, 将其作为种子激光在第二段波荡器中获得增益直到饱和输出^[20,21]. 相比SASE模式, 引入自

种子可以获得更好的时间相干性、有效减小光谱带宽, 但仍存在能量抖动大的缺点^[22]. 而外种子是指将飞秒激光的高次谐波作为种子光与电子束相互作用产生X射线脉冲, 据此提出了高增益高次谐波型XFEL (High Gain Harmonic Generation, HGHG)^[23]. HGHG模式主要包含作为调制段的短波荡器、色散段和作为辐射段的长波荡器, 先通过种子激光和电子束在短波荡器中的相互作用对电子束施加能量调制, 电子束通过色散段时能量调制转变为空间调制, 其密度分布含有高次谐波分量, 然后通过种子激光高次谐波分量共振的长波荡器放大并输出相干辐射. 与SASE模式相比, HGHG辐射光场是全相干的、带宽更窄、中心波长和能量更稳定的, 但受限于单级的谐波转换次数, HGHG型FEL适用于真空紫外波段^[24]. 为了将输出光向X射线波段进一步推进, 可以级联HGHG, 将每级辐射段输出的较短波长辐射作为下一级的种子. 意大利FERMI软X射线自由电子激光于2013年实现两级级联HGHG出光, 是种子型XFEL^[22]. 但是级联HGHG目前产生的X射线还主要局限在软X射线波段, 并且该技术提供的光子通量有限^[25,26]. 为了提高谐波转换效率, Stupakov^[27]提出了回声型谐波产生技术(Echo-Enabled

Harmonic Generation, EEHG), 双调制段波荡器回声机制使得在引入较小的能量调制时电子束也能有丰富的高次谐波分量, 可以将外种子型自由电子激光推向更短波长. 尽管EEHG有能力产生波长更短的辐射, 但在产生超高次谐波时有电子束品质退化的问题^[19,27].

由于XFEL卓越的性能及其在基础科学领域和科技创新方面的广泛应用, 多个科技强国已经积极开展XFEL装置的建设(表1). 目前, 建成并投入使用的XFEL装置包括德国电子同步加速器实验室DESY的FLASH软X射线自由电子激光装置(FLASH)^[8]、美国SLAC国家加速器中心实验室的直线加速器相干光源(LCLS)^[9]、日本理化学研究所的SACLA装置(SACLA)^[28]、意大利FERMI软X射线自由电子激光装置(FERMI)^[29]、欧洲X射线自由电子激光装置(European-XFEL)^[30]、韩国浦项自由电子激光装置(PAL-XFEL)^[31]、瑞士自由电子激光装置(SwissFEL)^[32]以及上海软X射线自由电子激光装置(SXFEL)^[33]. 除此之外, 更多的XFEL在建设或者规划中, 例如美国直线加速器相干光源二期装置(LCLS-II)^[34]. 在这个领域, 早在20世纪80年代杨振宁先生就提出建设中国的FEL装置, 但是由于经济和技术上的困难, 我国实施了逐步建设FEL的方案. 在1993年建成了中红外波段的北京自由电子激光装置(BFEL), 率先在亚洲实现了饱和出光. 在2009年建成了上海深紫外自由电子激光(SDUV-

FEL), 实现了EEHG放大出光^[35].

鉴于国外FEL装置的快速发展以及国内科学界的迫切需求, 自2014年以来, 国家大力支持FEL装置的建设, 并取得了丰硕的成果. 极紫外波段的大连相干光源(DCLS)和成都高平均功率太赫兹自由电子激光装置(CTFEL)于2017年相继建成, 上海软X射线自由电子激光装置(SXFEL)于2017年出光^[33], 上海高重复频率硬X射线自由电子激光装置(SHINE)也于2018年4月破土动工^[36]. 目前国际上XFEL装置的光子能量范围和主要参数如表1所示. 这些装置的建成和综合应用, 将极大地推动超快X射线探测技术的发展, 也标志着我国超快X射线研究即将进入一个新时代.

3 XFEL脉冲诊断技术

超短超亮的XFEL脉冲使得人们能够在原子尺度上观测飞秒分辨率超快过程. 由于当前X射线探测器无法达到飞秒时间的响应, 绝大多数飞秒时间分辨测量需要利用“泵浦-探测”的方法进行, 包括激光泵浦-XFEL探测、XFEL泵浦-激光探测、XFEL泵浦-XFEL探测等(文中激光如无特殊说明, 则特指从红外到紫外波段的激光). 本文主要介绍最常用的激光泵浦-XFEL探测方法, 该方法首先利用飞秒激光脉冲泵浦样品, 使其进入激发态并启动后续动力学演化, 然后利用延迟

表 1 国际上各XFEL装置的主要参数, 包括目前已经建设完成并投入使用的3个软XFEL装置和5个硬XFEL装置以及正在建设的美国直线加速器相干光源二期装置(LCLS-II)和上海高重复频率硬X射线自由电子激光装置(SHINE). 表格根据文献^[19]进行修改和补充

Table 1 The main parameters of XFEL instruments in the world, including three soft XFEL instruments and five hard XFEL instruments which have been constructed and put into operation, linac coherent light source II (LCLS-II) and Shanghai high repetition rate XFEL and extreme light facility (SHINE) are under construction. The table was modified and supplemented according to ref. ^[19]

装置名称	装置地点	加速器类型	电子束能量 (GeV)	光子能量范围 (keV)	脉冲长度 (fs)
FLASH	德国	L波段超导	1.25	0.014–0.31	10–200
LCLS	美国	S波段常温	16.9	0.28–12.8	5–400
SACLA	日本	C波段常温	8	4–20	2–10
FERMI	意大利	S波段常温	1.5	0.012–0.31	30–100
PAL-XFEL	韩国	S波段常温	10	0.275–20.7	5–100
SwissFEL	瑞士	C波段常温	5.8	0.248–12.4	0.2–20
European-XFEL	德国	L波段超导	17.5	0.24–30.8	1–300
SXFEL	中国	C波段常温	1.6	0.124–1	30–1000
LCLS-II	美国	L波段超导	15	0.2–25	1–500
SHINE	中国	L波段超导	8	0.4–25	3–600

的飞秒X射线脉冲探测样品在泵浦激光影响下的超快结构变化。

在“泵浦-探测”方法中要获得飞秒时间分辨率不仅需要飞秒激光脉冲和飞秒X射线脉冲, 还需要将泵浦和探测脉冲之间的同步控制在飞秒时间精度内。目前, XFEL主要由SASE模式产生, 由于SASE过程具有随机性, 产生的XFEL脉冲的到达时间和时间宽度等信息存在无法忽略的涨落和抖动, 会对“泵浦-探测”实验的数据分析造成严重影响。以激光泵浦-XFEL探测实验为例, 激光脉冲和XFEL脉冲之间的时间抖动幅度最高可以达到数百飞秒。如果没有关于泵浦和探测脉冲之间精确的延迟信息, 以及脉冲宽度或时间结构信息, “泵浦-探测”实验的时间分辨率和实验效果会大大降低。为了更好地分析动力学过程, 我们需要同步并测量XFEL脉冲相对于激光泵浦脉冲的到达时间以及XFEL脉冲宽度或时间结构信息。正因如此, 这些信息也是表征和评价XFEL光源的品质及稳定性的重要参考指标。

研究人员首先通过测量X射线和电子的时间关联函数确定了X射线脉冲的时间宽度^[37]。近年来, 研究人员主要采用THz调制法来测量X射线脉冲的时间宽度^[38]。该方法利用THz脉冲电场调制XFEL激发气体样品产生的光电子能谱, 使能谱发生偏移和展宽, 通过对谱偏移和展宽的解析计算可获得XFEL脉冲宽度、相对泵浦激光的延迟时间甚至XFEL脉冲的完整时间轮廓。激光脉冲时间的同步性通常由同步、诊断、矫正三个部分逐步提高精度。首先通过受激射频电场相位采样来获得电子束相对于直线加速器的相对到达时间, 触发泵浦激光进而使其在发射时间上获得同步。然而, 由于XFEL的驱动激光器和实验的泵浦激光器不是同一个激光装置, 并且一般相距很远(100–3000 m), 因此, 在实验终端站的样品处泵浦激光脉冲和XFEL脉冲很难实现精确同步。SASE过程的随机性也导致其产生的X射线脉冲时间抖动对实验要求的精准同步形成了巨大的技术挑战。因此, 研究人员选择通过测量XFEL脉冲相对于泵浦激光脉冲到达时间来进行修正。Gahl等人^[39]在FLASH建立了一个基于空间编码的时间同步诊断工具, 通过测量超快X射线脉冲引起碲化镉对光反射率的变化获得XFEL脉冲与泵浦激光脉冲到达的时间差, 该工具可以在后续数据分析中将系统的时间分辨率提高到飞秒量级。Bionta等人^[40]提出了一种

基于单脉冲自相关仪(Single-Shot Autocorrelator)原理的光谱编码方法, 该方法通过宽带超连续光将氮化硅薄膜上不同位置的单个X射线脉冲的延迟时间映射到光谱空间。该方法实现了超短激光脉冲与X射线脉冲相对到达时间的单脉冲测量, 并将时间延迟的误差控制在25 fs以内。Hartmann等人^[41]利用脉冲宽度约为3 fs的X射线光源, 测量了XFEL脉冲和激光脉冲之间的时间延迟, 并进一步将时间延迟的误差范围控制在10 fs以内。以上方法都是基于XFEL脉冲引起的半导体材料自由载流子密度增大所导致的反射或透射率的变化, 不同之处在于空间编码方法利用了XFEL脉冲波前到达样品表面的时间差^[42], 而光谱编码利用了宽带超连续光的脉冲时间啁啾。然而, 由于SASE模式产生的每一发XFEL脉冲的强度和形状都不同, 在高时间分辨率实验中需要测量和泵浦激光脉冲同步的每一发XFEL脉冲的时间特征。研究人员发现利用光学激光驱动的单循环THz脉冲进行飞秒时间分辨光电子能谱测量可以获得完整的XFEL时间特征, 该方法可以覆盖从极紫外(XUV)到硬X射线较宽的能量范围, 脉宽测量范围从10到100 fs^[43–45]。目前最先进的XFEL脉冲宽度诊断技术是基于横向偏转腔(X-Tcav)的诊断技术, 脉冲时间宽度分辨率可以到1 fs^[46]。脉冲宽度诊断技术、时间同步技术和时间同步诊断技术的不断进步是飞秒X射线技术发展和应用的基础。只有实现了更高精度的时间同步, 我们才能探测更短更快的过程。在此基础上, 基于“泵浦-探测”方法的飞秒X射线技术成为以原子分辨率和飞秒时间分辨率研究超快结构动力学的最有力工具之一。这些实验方法的发展和应用已经在各学科领域产生了大量有影响的成果, 并催生了一系列新发现。本文下面几节将结合实际应用体系重点介绍基于XFEL探测超快结构动力学的三类主要方法, 即X射线吸收/发射光谱、非晶态样品的X射线散射和晶体样品的X射线衍射。尽管这几种方法探测的信号有所差别, 基于XFEL的飞秒X射线光谱和散射/衍射的实验装置可以用图2所示的示意图统一表示。

4 基于XFEL的飞秒X射线光谱方法 and 应用

X射线光谱主要分为如下三类: X射线吸收光谱(X-ray Absorption Spectroscopy, XAS)、X射线发射光谱(X-ray Emission Spectroscopy, XES)和共振非弹性X

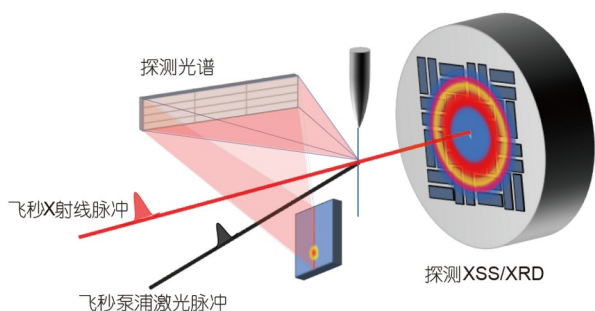


图 2 (网络版彩图)基于XFEL的飞秒X射线光谱和散射/衍射的实验装置示意图。黑色和红色脉冲分别代表泵浦激光和XFEL脉冲,脉冲时间宽度均为飞秒量级。XFEL脉冲正前方的二维面阵探测器可以用于散射/衍射信号的检测,XFEL脉冲侧面90°方向的装置可以用来测量光谱信号,通过调整两个脉冲之间的延迟时间就可以利用这些方法探测样品的动态行为

Figure 2 (Color online) Schematic diagram of experimental setup used to probe femtosecond X-ray spectroscopy and scattering/diffraction based on XFEL. The black and red pulses represent the pump laser and XFEL pulse, respectively, and their pulse durations are both on the order of femtoseconds. A two-dimensional plane array detector which is directly in front of the XFEL pulse can be used to detect the scattering or diffraction signals, and there is a device in the lateral direction of the XFEL pulse that can be used for the measurement of spectral signals. These methods are used to detect the dynamic behaviors of the sample by adjusting the delay time between the two pulses.

射线散射(Resonant Inelastic X-ray Scattering, RIXS)。本节首先简要介绍超快X射线光谱技术的基本原理,之后介绍它们在超快结构动力学研究中的应用。X射线吸收光谱(XAS)是探测原子内层电子吸收X射线光子而跃迁到外层未占据轨道或电离的光谱。该吸收过程基本遵守偶极子选择定则,以3d过渡金属为例,K吸收边是从1s轨道到4p轨道的跃迁,L吸收边对应于2p轨道到3d轨道的跃迁。X射线吸收光谱具有元素选择性和位点结构对称性,可用来侦测元素价态、电子和结构性质、自旋、电荷和轨道自由度等信息,已广泛应用于表征能源材料的电子结构,或探测化学反应的中间产物以揭示其机理。

以能量区分,软X射线(~ 250 eV – ~ 2 keV)对表面的化学环境变化非常灵敏,适合探测样品表面化学键的变化。硬X射线(> 5 keV)适合检测样品的整体变化,可利用元素的特征吸收边来做元素分析。在吸收边能量前后 ~ 40 eV以内的吸收光谱称为X射线近边结构(X-ray Absorption Near-Edge Structure, XANES),在吸收边能量 ~ 50 eV之外的吸收光谱称为拓展边X射线精细结构(Extended X-ray Absorption Fine-Structure, EX-

AFS)。XANES常用于探测吸收原子位点周围的几何结构图像,给出关于局域键合的信息,如键角、原子的氧化态等。EXAFS则包含有关吸收原子位点周围临近原子的键距、种类与数量等信息。相对于X射线衍射(X-ray Diffraction, XRD)能给出样品的长程有序结构信息,EXAFS提供的是原子的局域结构信息,包括热和结构序以及第一配位壳层的配位数信息,可为生物样品和无机样品(包括有序和无序材料)提供结构信息。基于XFEL的飞秒XAS是在飞秒时间尺度下研究电子和核结构的最可靠的方法。另外,利用XFEL的单脉冲光子数和单脉冲超大带宽,有望发展单脉冲的高效XAS^[47]。为了充分利用XFEL的高通量,Deng等人^[47]提出一种新的方案,通过大带宽的XFEL脉冲提高XAS的测量效率,同时还能够与X射线磁性圆二色谱(X-ray Magnetic Circular Dichroism, XMCD)联用,测量磁性材料中某种元素的吸收边附近圆偏振光吸收信号差异。飞秒XAS的独特性质,使其成为了研究化学反应过程中物质结构动力学和材料内部特性的重要手段。

当原子内层的电子吸收X射线跃迁至连续态并电离后,留下的电子空穴可以通过两种过程衰减:一是俄歇效应(Auger Effect),即高能级电子填充内层空穴并使得处于其他能级上的电子发射,该过程中没有光子能量的释放;另一种过程则会发射X射线,在位于高能级的电子向下填充原子内核的电子空穴的过程中,多余的能量以光子的形式被发射出来,实验上可以探测这些光子获得X射线发射光谱(XES)。因此,XES反映了占据轨道的信息,与XAS互补。再次以3d过渡金属为例,XES能够检测3d轨道中的不成对电子,能进一步提供特定原子的轨道劈裂以及自旋和氧化态等信息,对XAS获得的信息作进一步补充。综上,X射线吸收过程将原子中电子激发至高能态,同时会在原子轨道上产生一个空穴;而在X射线发射过程中,这个空穴会被处于更高能级的电子填充,同时发射X射线光子。因此,XES可以比XAS提供更多关于样品的电子状态信息,美中不足的是XES光谱的信号强度比XAS弱得多。因此,人们发展了很多的检测装置来探测XES信号,例如罗兰圈、Von Hamos构型等。其中,可以同时测量整个发射光谱的Von Hamos构型更适用于基于XFEL的超快动力学研究。

根据入射光子的能量,XES可以进一步分为非共振X射线发射光谱(Non-Resonant X-ray Emission Spec-

troscopy, NXES)和共振X射线发射光谱(Resonant X-ray Emission Spectroscopy, RXES). 通过选择入射X射线光子的能量使其与测量体系中的特定元素的X射线吸收边重合并因此产生共振, 入射光子能量的一部分被转移到测量体系中, 使得RXES过程中的光子输入和光子输出能量彼此不同时, 就会产生RIXS. 在RIXS中, 入射光子的能量和其中一个电子跃迁的能量以相同的能量共振, 可以极大地增强非弹性散射截面, 有时可以将信号提高多个数量级. RIXS是研究物质电子结构的强有力诊断技术, 是目前唯一能全面探测各类电子激发且具有元素分辨能力的先进手段^[48]. RIXS同时结合了XAS和XES, 是一种光进光出过程, 可以探测已占据和未占据轨道的电子状态, 提供原子自旋、电荷和轨道自由度等电子和结构信息. 但是, 在RIXS测量中通常需要使用单色仪从宽带非相干的XFEL中选择窄频带的X射线来实现共振激发, 导致RIXS的信号通常极小, 其对光源品质和光谱仪也有着非常苛刻的要求^[49]. 基于XFEL的“泵浦-探测”技术, 飞秒X射线光谱是在飞秒时间尺度下研究各种体系电子结构的最可靠的方法, 但飞秒RIXS技术目前还非常具有挑战性. Kimberg等人^[50]提出了一种基于随机光谱的替代方法, 该方法使用XFEL脉冲的全部带宽, 在该方法中, XFEL辐射的有限光谱相干性决定了其能量分辨率, 并且可以通过透射光谱的协方差分析获得高分辨率的受激RIXS光谱. 目前, 飞秒X射线光谱技术已被广泛应用于许多科学领域, 如化学、物理、生物学、材料科学、环境科学和地质学. 下面将通过一些例子简要介绍飞秒X射线光谱的应用.

飞秒XAS在研究过渡金属配合物激发态的电子和结构特性方面发挥了非常重要的作用, 过渡金属配合物中的电荷转移态(MLCT)在光催化或光伏过程中具有非常显著的影响. Lemke等人^[51]首先利用XFEL进行了高质量的飞秒XAS实验, 利用飞秒时间分辨X射线吸收近边光谱(XANES)确定出多联吡啶亚铁配合物的自旋交叉过程的时间常数不超过160 fs. Miller等人^[52]利用飞秒偏振XANES研究了维生素B12(氰钴胺)水溶液中光激发态的结构变化过程. 最近, Harlang等人^[53]将长寿命的³MLCT态铁配合物用作与二氧化钛(TiO₂)相连的光敏剂. 他们利用飞秒XAS、电子顺磁共振、瞬态太赫兹光谱和量子化学计算等多种方法, 研究发现通过注入³MLCT状态的铁配合物在TiO₂的导带中产

生量子产率为92%的光电子. Öström等人^[54]利用飞秒XAS研究了固体催化剂催化一氧化碳的氧化过程中形成过渡态的过程, 获得了电子排布在飞秒时间尺度的变化, 观测到过渡态中化学键形成的信号. Dell’Angela等人^[55]利用飞秒XAS和飞秒XES研究了CO分子在Ru(0001)表面的光催化断键过程的中间态, 即一种由在加热过程中没有克服解吸势垒的分子形成的状态, 并且键合强度低于化学吸附状态.

XES光谱的信号强度比XAS弱得多, 导致飞秒XES光谱的发展相对缓慢, 但是近些年取得了很大进展. Zhang等人^[56]利用基于XFEL的飞秒XES完整地跟踪了多联吡啶亚铁配合物电子激发态的超快弛豫动力学过程, 首次发现电荷转移态在200 fs内从低自旋态经过配位场三重态中间态最后弛豫到高自旋的配位场五重态, 这是在超快自旋交叉过程中配位场三重态中间态存在的第一个直接的实验证据. 基于这个动力学机理, Zhang等人^[57,58]推测调整配位场三重态和电荷转移态的相对能量关系能改变电荷转移态的弛豫动力学, 并通过系统研究一系列混合配体亚铁配合物的激发态弛豫过程, 将其电荷转移态的寿命提高了两个数量级, 从而为低成本的铁基过渡金属配合光敏化剂的研究指出了新方向.

结构-动力学-功能关系是生物学的核心, 蛋白质结构变化一般都与特定功能相关. 对于亚铁血红蛋白, 血红素的拱起与血红蛋白和肌红蛋白的呼吸功能有关. 细胞色素C是人体中重要的电子传递蛋白. 细胞色素C通过调节血红素铁与甲硫氨酸之间的结合, 在电子传输和细胞凋亡中起着关键作用. 在其亚铁形式中, 亚铁细胞色素C在光激发时经历配体释放和拱起, 但三价铁形式的铁细胞色素C在光激发时并不释放远端配体, 而是通过热弛豫返回基态. Mara等人^[59]利用飞秒XAS和XES成功探测到光诱导下, 亚铁细胞色素C中Fe-S键在飞秒时间尺度的断裂和重组(如图3(a)所示), 展现了生物系统如何利用化学键的熵状态来调节其化学功能. Bacellar等人^[60]利用飞秒XES和XANES证实了三价铁细胞色素C的光循环完全是由于之间的级联铁离子的激发自旋状态, 导致三价铁血红素发生拱起(如图3(b)所示). 他们还认为这种模式在广泛多样的三价铁血红蛋白中很常见, 从而引发了此类蛋白质中穹顶的生物学相关性的问题.

Wernet等人^[61]和Kunnus等人^[62]利用基于XFEL的

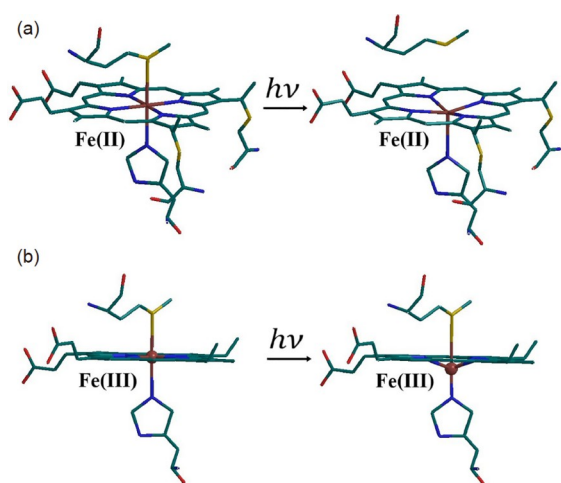


图 3 (网络版彩图)利用飞秒X射线光谱和溶液散射研究细胞色素C的光激发结构动力学. (a) 亚铁细胞色素C在光激发后会发生Fe-S键断裂并引起铁血红素发生拱起; (b) 三价铁形式的铁细胞色素C在光激发时会导致三价铁血红素发生拱起(Fe-S键不会断开), 并通过热弛豫返回基态. 图片修改自文献[59,60]

Figure 3 (Color online) Photoexcited structural dynamics of cytochrome C were researched by femtosecond X-ray spectroscopy and solution scattering. (a) Ferrous cytochrome C undergoes the break of Fe-S bond and doming of ferrous heme; (b) ferric cytochrome C causes the ferric heme to undergo doming (the Fe-S bond does not break) upon photoexcitation, and returns to the ground state via thermal relaxation. The picture was modified according to refs. [59,60].

软X射线飞秒RIXS研究了五羰基铁在乙醇溶液中的光解, 并跟踪了其复杂的激发态动力学过程. 他们的工作显示了超快RIXS技术在研究过渡金属配合物的结构动力学方面的巨大潜力. 过渡金属配合物非常适用于研究基本的化学反应过程以及太阳能转化过程. 研究人员利用基于XFEL的软X射线飞秒RIXS研究了光激发态六氰基铁配合物的弛豫动力学过程^[63-65]. Ismail等人^[66]首次进行了固态材料的飞秒瞬态RIXS实验, 展示了使用飞秒RIXS研究固态材料的光激发态动力学的可能性. 由于光子通量和XFEL机时的限制, 目前只能开展少量的软X射线飞秒RIXS实验, 硬X射线飞秒RIXS实验还有待全面发展. Lu等人^[49]研究了SASE中固有的XFEL抖动对RIXS测量的影响, 他们发现只有不到2%的XFEL脉冲能产生有效的信号, 从而无法在保持时间和能量分辨率的同时获得足够高的信噪比. 这些限制将在高重复频率XFEL (接近MHz)建成后得到改善, 高重复频率XFEL将推动飞秒硬X射线RIXS实验的开展. 随着XFEL的不断进步, 未来的飞秒RIXS将

能够应用于研究更为广泛的体系中的超快电子及结构动力学过程.

5 基于XFEL的飞秒XRD方法和应用

5.1 飞秒X射线衍射

当X射线和待测样品中的原子碰撞时, X射线会被原子核周围的电子散射. 如果样品是具有周期性原子结构的晶体, 则会发生X射线衍射(XRD), 该衍射图案与样品中的周期性原子结构之间存在很强的关系. 对X射线衍射图谱进行分析之后可以得到其三维电子密度模型, 进而确定晶体中原子的位置信息以及化学键、有序程度等信息, 从而反映晶体的真实结构. 衍射峰的位置可用于确定晶胞的形状和大小, 而衍射峰的强度可用于确定晶胞内的原子位置和原子序数. 在过去的100多年中, XRD是确定晶体的原子和分子结构最常用的技术, 并被广泛用于很多科学领域的研究中. 研究人员可以利用XRD方法测定原子的位置、化学键的长度和类型以及各种材料在原子尺度的差异等. 研究人员还利用XRD方法揭示了许多生物大分子的结构和功能, 包括蛋白质、DNA等. 得益于XFEL的发展, 基于“泵浦-探测”技术的飞秒XRD可以在飞秒时间尺度上分析晶体微观结构的超快变化, 是研究晶体结构变化的重要方法. 下面将通过一些例子简要介绍飞秒XRD在相对简单的结构研究中的应用, 对于复杂生物大分子的应用将在下一节单独介绍.

纳米颗粒在催化、光学器件等方面都有关键应用, 研究单个纳米颗粒的动力学特性对于了解它们的作用机理非常重要. Clark等人^[67]利用基于XFEL的飞秒XRD方法, 探测了单个金纳米晶体受800 nm近红外光激发后的动态结构变化, 通过布拉格相干衍射成像获得了不同延迟时间下单个金纳米晶体内部变形场的高分辨率(皮米)实空间图像. 材料在高压条件下的特性在高能量密度物理、地球和行星科学、航空航天工程和材料科学等领域发挥着重要作用, 了解材料在高压下微观结构的超快演化是理解高压条件下材料性质的关键. Milathianaki等人^[68]用激光将烧蚀驱动压缩波作用于多晶铜, 随后用基于XFEL的XRD方法测量了晶格演化, 以10 ps的延迟间隔拍摄了材料内应变状态的晶格级电影. 实验揭示了铜在峰值法向弹性应力为73 GPa和应变率为 10^9 /s条件下对激光冲击压缩波的响

应, 探测到了弹性状态到塑性状态的演变, 数据与数百万原子的分子动力学模拟结果吻合得很好. Sellberg等人^[69]首次用飞秒XRD对水在227 K的相图区域的结构进行直接探测, 观测到了微米尺寸液滴中的液态水结构. 这个实验的时间分辨成像没有使用“泵浦-探测”技术, 而是通过改变液滴在真空中传播的时间, 探测水的液固相变动态过程, 该发现对于解释水在227 K温度附近的异常热力学性质具有重要意义.

飞秒XRD还可以应用在具有新涌现性质的强关联材料研究领域, Mankowsky等人^[70]通过中红外泵浦脉冲在 $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{6.5}$ 中诱导非平衡相, 并通过时间分辨XRD捕捉到结构变化. 驱动场模式和材料光学声子模式的强耦合导致超导体结构发生变化, 具体表现为双层内的距离增加, 双层之间的距离减小, 平面内O–Cu–O键屈曲的各向异性变化, 微小位移强烈地影响了电子结构, 面内电子结构的 $d_{(x^2-y^2)}$ 特性可能有利于超导性. 最近, 在铁电超晶格中实现了由电极化构成的拓扑结构, Li等人^[71]用太赫兹场激发100 nm厚的 $(\text{PbTiO}_3)_{16}/(\text{SrTiO}_3)_{16}$ 超晶格, 结合飞秒XRD测量, 观察到了铁电极化涡旋特有的超快集体动力学. 通过测量XRD强度随延迟时间的变化曲线, 分析得到了0.3–0.4 THz范围内的高频模式, 和0.08 THz附近的低频模式. 在低频区可以通过热致应变进行频率调谐(图4), 并且极化涡旋振荡模式的横向尺寸在纳米量级, 此项研究结果表明

有望通过缩小太赫兹半导体器件尺寸, 实现电场驱动的高速、高密度数据处理和存储.

XFEL可以提供卓越的单脉冲XRD信噪比, 因此能够以单脉冲的方式探测不可逆过程的超快结构动力学. Gorkhover等人^[72]用近红外泵浦脉冲对半径为15–30 nm的单个氩团簇样品加热, 形成非平衡纳米等离子体, 再探测样品在延迟时间从飞秒到皮秒时间范围的X射线衍射信号, 以飞秒时间分辨率和纳米空间分辨率对非平衡纳米等离子体扩展至真空的超快结构动力学过程进行了成像研究. 未来, 随着XFEL的不断发展, 飞秒XRD将能够以前所未有的方式揭示物理、化学、生物和材料科学领域中的未知现象. 在本节接下来的部分, 我们将简要讨论与XRD原理相似的X射线溶液散射(X-ray Solution Scattering, XSS).

5.2 飞秒X射线溶液散射(XSS)

许多生物和化学反应都发生在溶液中, 且样品不以晶体形态存在, 因此无法通过XRD研究其结构动力学过程. 近年来, XFEL的发展促成了飞秒XSS技术的诞生, 并成为研究溶液中超快结构动力学最有效的工具. Kim等人^[73]首次用飞秒XSS探索了一种金多聚体 $[\text{Au}(\text{CN})_2]_n$ 中金原子间共价键的成键过程. 在多聚体中, 金原子通过范德华力弱结合, 在激光作用下电子从反键轨道激发到成键轨道, 最终导致金原子之间形

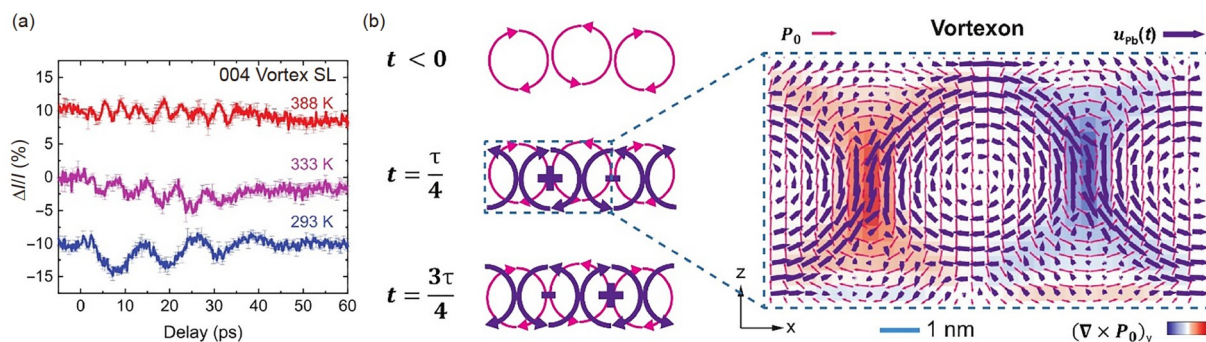


图4 (网络版彩图)利用飞秒XRD研究铁电极化涡旋特有的超快集体动力学. (a) 不同温度下涡旋结构的004超晶格的归一化衍射强度的动力学变化, 误差线显示标准误差; (b) 涡旋子(原子位移涡旋, 紫色圆圈)在其振荡周期 τ 期间的出现和演化, 与静态极化涡旋(洋红色圆圈)重叠. +和–是涡旋涡量的符号, 会发生动态反转. 右图为虚线框区域的放大视图, 在 t 等于 $\tau/4$ 处涡旋模式的每个晶胞中计算出静态极化(洋红色箭头)和铅阳离子位移(紫色箭头). 图片来自文献^[71]. Copyright©2021 Springer Nature

Figure 4 (Color online) Ultrafast collective dynamics unique to ferroelectric polar vortices were studied by femtosecond XRD. (a) Normalized dynamic changes of diffraction intensity of 004-superlattice (SL) peaks of vortex structures at various temperatures, and the error bars show the standard errors; (b) emergence and evolution of the vortexon (atomic displacement vortices, purple circles) during its oscillation period τ , that is overlaid with the static polarization vortices (magenta circles). + and –, are the signs of vortexon vorticity, which reverse dynamically. The picture on the right is a zoomed-in view of the region of the dashed box, presenting the calculated static polarization (magenta arrows) and lead-cation displacement (purple arrows) in each unit cell of the vortexon mode at $t = \tau/4$. The picture is from ref. ^[71]. Copyright©2021 Springer Nature.

成共价键. 根据差分散射信号峰值位置可以确定“金-金”共价键的形成过程, 弱结合的 $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ 被光激发后, 在200 fs时间内由弯曲结构转变为线性结构, “金-金”距离继续减小并在10 ps以内形成了“金-金”共价键, 反应还会进一步形成四聚体, 最终弛豫到弱结合的初始结构. 最近, 该团队进一步利用飞秒XSS跟踪了光诱导键形成过程中从基态到激发态振动波包的实时轨迹, 并发现三聚体的两个“金-金”共价键是不同时刻形成的^[74].

飞秒XSS技术除了用于准确确定物质结构、追踪反应过程外, 还能研究溶质和溶剂间的相互作用, 这对于研究分子光催化剂的反应机理和反应路径具有重要意义. 十二羰基三铱是一种过渡金属羰基化合物, 可用作光催化剂、光驱动合成反应的前驱体和结构单元. 基于同步辐射的皮秒XSS技术已经被用于研究 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ 受400 nm光激发后的动力学过程, 证实反应物会失去CO配体并形成中间产物 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{10}(\mu\text{-CO})$ 和 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{10}$. 而超快红外光谱结果表明有两种反应机制, 除了失去CO配体外, 金属-金属键断裂会形成 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{11}(\mu\text{-CO})^*$. 由于前者时间分辨率不够, 后者缺乏结构敏感性, 这两种方法都无法直接观察到光激发后反应物的初期结构变化. Kong等人^[75]利用飞秒XSS技术测量了 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ 环己烷溶液受400 nm光激发后不同时间延迟下的散射信号, 直接观察到在100 fs时只发生金属-金属键断裂过程, 产生 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{11}(\mu\text{-CO})^*$, 并在皮秒时间尺度上失去CO配体形成其他的反应中间体, 最后再结合CO配体回到初始状态, 为 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ 光解提供了完整的反应机理. van Driel等人^[76]结合飞秒XSS和分子动力学模拟, 研究了 $[\text{Ir}(\text{dimen})_4]^{2+}$ 体系受光激发后的分子结构动力学和溶剂化动力学, 其中分子结构变化包括Ir-Ir键收缩、N-Ir-Ir-N二面角扭转, 溶剂化动力学包括反应初期铱原子与乙腈溶剂的甲基脱溶, 随后乙腈分子旋转和平移使其羰基与铱原子配位两个过程. 该实验为催化活性位点铱原子周围的溶剂化动力学提供了可靠的表征, 并证明飞秒XSS用于研究光催化动力学的可行性.

飞秒XSS测得的溶液散射信号中不仅有溶质分子的贡献, 而且包含造成背景干扰的溶剂散射信号. 差分散射信号不完全由结构变化引起, 也有部分来自溶剂热效应. 泵浦光会优先激发跃迁偶极矩方向和激光偏振方向平行的分子, 因此, 与溶质分子结构变化相关

的信号是各向异性的, 而溶剂热效应引起的信号是各向同性的. Haldrup等人^[77]以小于100 fs的时间分辨率研究了 Pt_2POP_4 在光激发后的结构动力学过程, 并从差分散射信号中分离出各向异性成分, 以排除溶剂的干扰. Pt_2POP_4 被395 nm的脉冲光非共振激发到激发态较低振动能级, 从而可以忽略激发态的相干振动力学, 直接单独追踪基态的相干振动力学. 与结构变化相关的差分散射信号表现出周期为0.28 ps、衰减时间为2.2 ps的明显振荡行为, 与基态的Pt-Pt距离振荡周期一致, 这表明非共振激发XRD是直接研究基态结构动力学的可行方法.

相比于飞秒X射线光谱, 飞秒XSS技术可以更直接地观测到键长变化, 但是受制于溶液环境, 溶剂散射信号会造成强烈的干扰, 另外溶质-溶剂相互作用和溶剂的热效应也会增加散射信号的复杂性. 在同一个“泵浦-探测”实验中, 光谱和散射信号的测量可以同时进行(图2), 获得互相补充的信息, 因此, 近年来研究人员通过两种技术的联用获得了很多进展.

5.3 飞秒X射线光谱和XSS技术联用

飞秒XES或XAS与飞秒XSS的联用是XFEL研究超快动力学研究中的常见模式, 目前设计建造的XFEL实验线站都具有同时测量光谱和衍射/散射数据的能力. 最近, Gaffney^[78]总结了飞秒XES与XSS技术联用在过渡金属铁配合物研究中的进展, 其中XES用来测量金属中心的电荷和自旋状态, XSS用来测量金属-配体键长的变化. 两者联用可以更清晰地阐明溶液中的化学和生物样品的超快结构动力学过程.

多联吡啶亚铁配合物是研究光诱导超快自旋交叉过程的模型体系, 可以通过光驱动实现从低自旋电子态到高自旋电子态的转变. 第4节提到Zhang等人^[56]通过飞秒XES实验证实了该超快自旋交叉过程不是从 $^3\text{MLCT}$ 态直接弛豫到 ^5MC 态, 中间还经过了 ^3MC 态. 近来, Kjær等人^[79]利用飞秒XES和XSS联用对其进行了进一步的研究, 飞秒XES高分辨光谱在7054 eV处清晰地显示了 ^3MC 激发态特征. 同时, 测得的XSS差分信号反映了与电子激发态变化相关的金属-配体键长的变化, 在低 Q 值(对应小散射角)区域的负差分信号表明了金属-配体键变长, 证实了自旋交叉伴随着分子的膨胀. Kunnus等人^[80]通过飞秒XES和XSS联用研究, 发现最初的光激发光敏剂 $[\text{Fe}(\text{bmip})_2]^{2+}$ 的 MLCT^* 态以

(110 ± 10) fs的时间常数衰减, 其中 $40\% \pm 10\%$ 弛豫到 ^3MC 态, $60\% \pm 10\%$ 弛豫到 $^3\text{MLCT}$ 态, 随后这两个态分别以(1.5 ± 0.5)和(9 ± 1) ps的时间常数弛豫到基态. XES和XSS差分信号都显示出周期为278 fs的同相振荡, 通过XSS差分信号全局分析确定了这种振荡来自 ^3MC 激发态中铁-配体键长的变化.

Biasin等人^[81]应用飞秒XES和XSS联用方法研究了水溶液中混合价态双金属 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{III}}$ 的光诱导激发态动力学, 结合非平衡分子动力学模拟对实验结果进行分析, 发现MMCT态的寿命为(62 ± 10) fs. 差分XSS信号在低 Q 值处为负值是由于溶质与附近水分子间的氢键伸长, 引起第一溶剂化层的相干平动, 振幅约为0.1 Å, 振荡频率与电子背向散射时间相关, 在120–200波数范围. 这表明通过对电子态敏感的XES和对键长敏感的XSS的联用, 可以直接观察到分子内电子转移与溶质-溶剂相互作用的耦合. 亚铁细胞色素C中血红素铁与甲硫氨酸硫基之间的Fe–S键的解离是细胞色素C从电子转移蛋白转化为过氧化物酶的关键步骤, Reinhard等人^[82]通过飞秒XES和XSS联用研究了Fe–S键解离的机理. 飞秒KβXES光谱确定形成了 ^3MC 中间态, 并以87 fs的寿命衰减到 ^5MC 态. 结合电子态变化和XSS差分信号特征得到结论, ^3MC 激发态的形成触发了Fe–S键解离(图3(a)).

Shelby等人^[83]利用飞秒XAS和XSS联用, 研究了肌红蛋白中的亚铁血红素与一氧化碳解离过程中的局部和整体结构变化. 改变泵浦光和X射线探测脉冲的相对偏振方向以收集XAS信号, 结合计算阐明了CO解离路径以及铁从低自旋态到高自旋态的转变. 同时测量的XSS信号不仅对活性位点周围的结构变化敏感, 而且能展现整个蛋白质的构象变化, 实验结果表明局部结构变化引发了蛋白质体积膨胀(如图5所示). 这项研究对于理解小分子底物与酶内部的金属活性中心的相互作用具有重要意义.

6 XFEL在生物大分子动力学研究中的应用

6.1 XFEL应用于生物大分子成像的特点和优势

用超高亮度的XFEL飞秒脉冲研究生物大分子的结构和动力学是驱动XFEL建设的一个重要科学应用, 可以追溯到2000年Neutze等人^[84]的理论模拟研究工作. 常规的晶体衍射方法是将生物分子生长为足够大

的晶体, 把散射信号聚集到符合相干增强条件的位置, 即布拉格衍射点, 这样有助于把晶体的衍射信号与溶液的散射信号分离(注意, 生物大分子需要在水环境下才能维持其特有的三维空间结构). 生物大分子(比如蛋白质)依赖分子间的静电力、范德华力等相对弱的相互作用形成规则排列的晶体, 对蛋白质分子的结构单一性有很高的要求, 因此主要局限于对刚体结构域的研究. 除此以外, 电子吸收X射线会导致电离, 破坏分子结构和晶体堆叠的稳定性, 因此常规晶体衍射实验通常在液氮的低温条件下(~ 100 K)进行. Neutze等人^[84]考虑了X射线的电离效应, 应用分子动力学模拟的方法研究电离之后原子核之间库仑力导致的分子结构变化. 模拟的结果表明, 如果在若干飞秒之内完成测量, 就可以得到“损伤前”的分子结构信息, 从理论上提出了全新的“损伤前探测”实验模式. 令人鼓舞的是, 这种方法为单分子结构测定奠定了理论基础, 从而可以克服结晶的困难和局限. 为了得到更强的信号, 实验要求把尽可能多的X射线光子压缩在飞秒激光脉冲, 而XFEL正好能够提供所需的高亮度X射线激光脉冲. “损伤前探测”的方法在软XFEL装置FLASH成功通过实验论证和测试^[85], 坚定了美国能源部建设硬XFEL装置的决心. 在2009年LCLS建成并发射硬X射线激光脉冲之后的第一批实验中, 有两个实验在X射线成像研究领域具有里程碑意义. 一个是对单个Mimivirus病毒颗粒的全相干衍射成像^[86], 另一个是对光合作用系统复合物微米晶体的串行晶体衍射信号的测量^[87]. 这两个工作的成果于2011年在*Nature*同期发表, 给结构生物学领域带来了全新方法. Mimivirus单颗粒单发衍射成像的信号达到30 nm分辨率, 也是世界上首次用单发X射线脉冲收集的病毒颗粒信号. 然而, 接下来几年, XFEL单颗粒成像一直受限于实验方法和信号强度, 直到2015年才完成了一个3D模型的结果, 并且分辨率也差强人意(大约100 nm)^[88]. 鉴于XFEL单颗粒全相干成像的挑战性, LCLS牵头成立了一个国际合作团队(Single Particle Imaging Initiative)^[89], 集中资源和力量研究一两个模式系统, 最终收集了大量一种名为PR772的感染大肠杆菌病毒的单颗粒衍射图像, 并且将数据共享给全世界的研究人员^[90]. 从这组数据中, 多个研究团队成功重构了优于10 nm分辨率的模型, 甚至分析出病毒的结构变化^[91–93]. 尽管如此, 这一分辨率和当前迅猛发展的冷冻电子显微镜单颗粒成像还相距甚

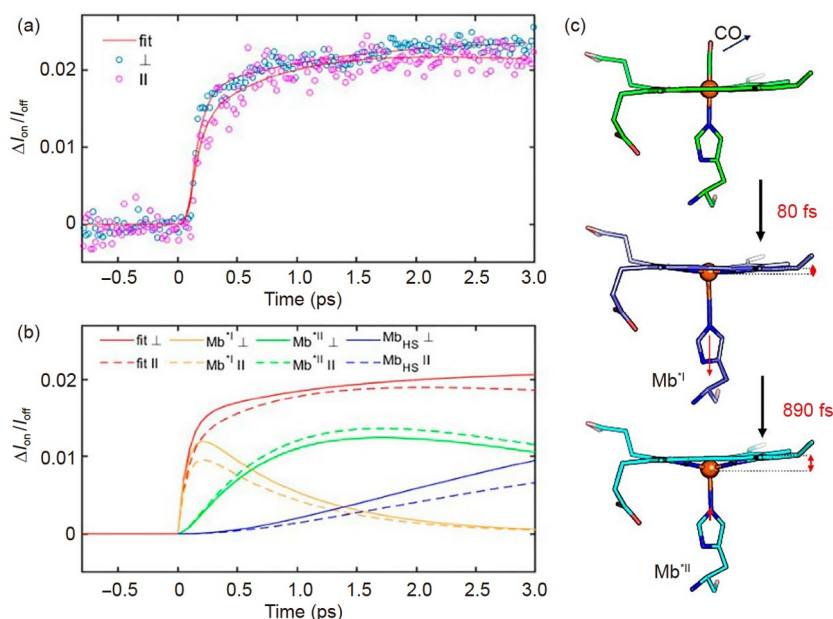


图 5 (网络版彩图) 飞秒XAS和XSS联用研究肌红蛋白中的亚铁血红素与一氧化碳解离过程中的结构变化过程. (a) 垂直(蓝色圆圈)和平行(红色圆圈)偏振的XAS在7123 eV处的动力学及其对应的利用三步顺序模型进行全局拟合的动力学曲线(实线); (b) 垂直(实线)和平行(虚线)偏振的每个物种的拟合分量的动力学曲线; (c) CO光解后血红素松弛的超快结构变化. 在80 fs时间尺度下CO离去、剩余部分分子发生系间窜越、Fe向血红素平面外产生一个小位移, 同时Fe-NHis键伸长. 在890 fs时间尺度下Fe-Np键继续伸长、血红素拱起, 并且Fe进一步向血红素平面外位移. 图片来自文献[83]. Copyright©2021 PNAS

Figure 5 (Color online) Using femtosecond XAS and XSS simultaneously to investigate the structural changes of iron(II)-heme during dissociation of CO from it in myoglobin. (a) Dynamics of perpendicularly (blue circles) and parallel (red circles) polarized XAS at 7123 eV and their corresponding dynamic curves (solid) obtained by global fits to a three-step sequential model; (b) components of the fits from each species for the perpendicular (solid) and parallel (dashed) polarizations; (c) mechanism of heme relaxation following photodissociation of CO. The 80-fs component is attributable to CO loss, intersystem crossing in the remaining parts, a small displacement of Fe out of heme plane, and elongation of Fe-NHis bond. The 890-fs component is due to the expansion of Fe-Np bonds, heme doming, and further Fe out-of-plane plane displacement. The picture is from ref. [83]. Copyright©2021 PNAS.

远, XFEL单颗粒全相干成像需要长久的发展才能得出更高分辨率的结构模型. XFEL单颗粒全相干成像方法在单细胞或者大病毒颗粒的形貌研究领域还是有不可替代的优势, 不过这不是本文关注的重点, 有兴趣的读者可以参考相关文献.

XFEL在单颗粒成像领域的发展虽然暂时受阻, 但是基于XFEL的串行晶体衍射方法取得了一系列令人瞩目的成果, 激励研究人员持续发掘XFEL晶体衍射方法的潜力. 虽然2011年解析的光系统I复合物的结构分辨率只有8 Å左右, 但是2012年Boutet等人^[94]应用XFEL串行晶体衍射方法成功解析了溶菌酶蛋白的原子分辨率结构, 证实该方法在高分辨率结构研究领域的应用价值. 截至2021年11月8日, 在蛋白质结构数据库Protein Data Bank (PDB)搜索XFEL关键词会出现351个生物大分子的结构, 随着越来越多的XFEL装置投入使用, 会有更多的生物大分子结构通过串行晶体

衍射的方法得到解析. XFEL串行晶体衍射方法突破了传统晶体学实验的辐射损伤限制, 通过在极短时间内聚集大量的X射线光子照射目标, 在辐射损伤效应展现之前完成对样品的测量. 这种实验模式能够从微米甚至亚微米尺寸的晶体获得原子分辨率的信号, 相比同步辐射光源有大幅提升. 另外, 由于每个晶体只被X射线曝光一次, 所以不需要低温保护, 实验可以在室温条件下进行. 基于同样原因, 大量晶体需要依次被输送到X射线焦点处进行衍射测量, 保证了晶体的完整性和一致性, 也为本文重点介绍的时间分辨动力学研究奠定了基础.

6.2 时间分辨串行晶体学

在没有输入的能量驱动的情况下, 分子体系停留在平衡态. 根据热力学定律, 单个分子在绝大多数时间处于最低能量的基态; 在大量分子组成的系综层面

就是在任何时刻大多数分子都处于基态。“泵浦”的目的就是将分子从基态激发,从而启动与分子功能相关的动力学演化.对生物大分子的泵浦方法有很多种,包括光脉冲、温度、酸碱性和与底物分子溶液快速混合等.其中,光脉冲激发具有“快速、同时、均匀”这三个重要特征,是目前泵浦实验中应用最多的方法,但是光脉冲泵浦方法的局限在于所研究的体系需要天然对光敏感或者通过生物工程改造实现感光.根据研究体系的特点确定了泵浦方法之后,时间分辨串行晶体学的实验就可以通过控制“泵浦”和“探测”之间的时间间隔来测量泵浦之后分子在指定时刻的结构信息,将多个时刻测量的结构串联在一起得出分子电影来重现分子在行使功能过程中的结构演化.

虽然时间分辨串行晶体学的实验原理简朴,实验数据的分析却非常复杂,这主要是由泵浦方法的效率以及生物大分子结构演化速率的多样性导致的.具体的数据分析方法可以参考文献[95,96],此处仅对数据分析的难点进行简要总结.首先,对样品分子晶体的泵浦不能保证所有的分子都被激发,成功进入预期的结构演化进程.比如,用激光脉冲作为泵浦方法,需要考虑分子对不同波长的激光吸收效率,也要选择适宜的激光能量密度.泵浦激光的波长可以根据基态吸收光谱,在吸收峰附近择优确定;有些情况需要考虑激发态的吸收光谱,接近基态吸收峰并且远离激发态吸收峰.高能量密度的激光脉冲可能会引入意想不到的效应,比如热效应提升了温度或者导致多光子吸收的非线性激发等.为了降低这些副作用,激光脉冲的能量需要调整到合理的范围,通常不能实现对样品100%激发.这样就导致晶体中的分子一部分处于基态,另一部分开始结构演化,而晶体衍射信号是二者按照比例叠加的效果.然而,这还是最简单的情况,由于蛋白质分子结构演化速率的差异,随着激发产生的结构演化时间延长,分子结构在探测时刻的多样性就越来越高(类似马拉松比赛中某一时刻选手们在赛道上的位置差异,刚出发时刻差异小,随着比赛进行,选手在赛道上的位置差异越来越大),给后期的数据分析和结构解析带来很多挑战.

回到对分子样品的激发,即使应用短脉冲作为泵浦方法,每个脉冲包含的光子被吸收的时间也会有所差别,主要由激光脉冲的时间长度所决定,比如,纳秒激光脉冲引发的反应起点时间不确定性也为纳秒.同

理,探测脉冲的时间展宽也会带来类似的不确定性.在研究超快动力学的实验中,要求测量的时间延迟更短,所以要用短脉冲(比如飞秒激光)进行泵浦和探测.对于更长时间尺度的结构变化,泵浦激光可以用纳秒脉冲,但是短脉冲更利于产生均匀、同时的激发效果.值得指出的是,飞秒XFEL脉冲不仅仅是为了更好的时间分辨,更是前文所述的“损伤前探测”实验模式的必要条件.这种实验模式能够测量非常小的晶体样品,而这些小晶体由于具有更高比例的分子位于晶体表层,易于收到泵浦信号从而被成功激发.同步辐射的X射线传统晶体衍射方法受辐射损伤的局限,需要更大的晶体才能获得同样信噪比的衍射信号,会导致更多位于晶体内部的分子就不能被有效激发.

基于XFEL的时间分辨串行晶体学已经在多个生物大分子体系的研究中取得了瞩目的进展.在此,我们挑选出有代表性的体系介绍这些成果对生物学功能的分子机理研究的重要意义.有兴趣的读者可以参考Orville^[97]的综述文章,其中详尽地总结了这方面的进展,列举了从2018年1月到2020年5月期间,应用XFEL开展的时间分辨串行晶体学研究成果.

6.3 基于XFEL时间分辨晶体学在生物大分子动力学研究领域的应用

作为泵浦的方法,激光脉冲和微流混合已经产生了实际的研究成果.在这部分,我们结合具体的生物分子系统,介绍基于XFEL的时间分辨晶体学研究的进展.

6.3.1 光活性黄蛋白

光活性黄蛋白(Photoactive Yellow Protein, PYP)是一个被广泛研究的模式分子体系,在细菌感光应激运动过程中担任重要角色^[98].PYP的感光能力主要来自与其结合的发光团分子,对香豆酸(p-Coumaric Acid, pCA).根据时间分辨瞬态吸收光谱数据的分析结果,pCa在光照之后会发生“顺式到反式”(Trans-To-Cis)的异构化反应(图6(a)).在XFEL时代之前,研究人员已经应用最先进的同步辐射X射线光源研究PYP的结构变化.其中有代表性的工作是Jung等人^[99]利用ESRF和APS的特殊结构X射线脉冲,得到100 ps分辨率的结构变化.虽然ESRF和APS的特殊脉冲装置已经优化了单个100 ps的X射线脉冲的光子通量,大幅提高了同步辐

广XFEL时间分辨研究奠定了坚实的基础. 2021年, Ourmazd和Schmidt团队^[102]基于机器学习方法对结构演化的高维空间进行流型分析, 从2016年的实验数据中发掘出更多的结构信息, 重构了飞秒分辨率的结构演化动力学. 2020年, Pandey等人^[103]使用最高重复频率达到兆赫兹的欧洲XFEL光源对PYP进行了时间分辨的实验研究. 为了避免辐射损伤和泵浦激光污染, 基于这种超高重复频率的XFEL光源的“泵浦-探测”时间分辨晶体衍射实验对喷射装置的流速提出了更高的要求. Pandey等人的PYP晶体溶液在液体喷流装置的出

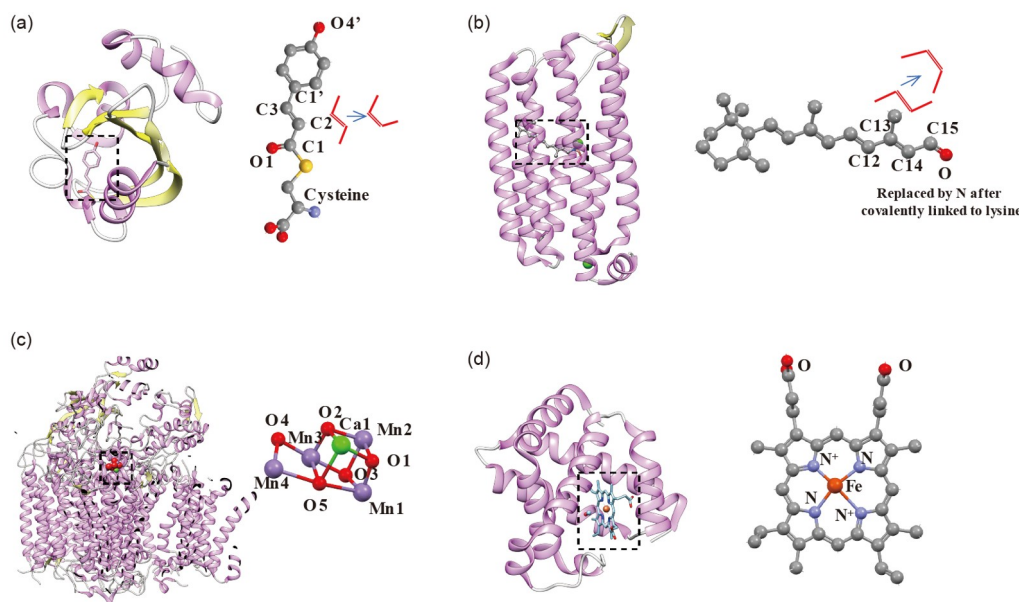


图 6 (网络版彩图)感光蛋白质分子与主要的活性中心分子。(a) 光活性黄蛋白(PYP)与香豆酸(pCA)的基态结构。黑色虚线框位置是感光分子香豆酸在PYP分子内部的位置((b)–(d)类似)。香豆酸被蓝光激发之后会发生异构化, 右图红线所示的双键从反式变为顺式, 从而引发周围氨基酸位置变化, 并通过分子地震的方式引发整体结构变化。(b) 氯离子转运视紫红质蛋白Nm-R3与视黄醛分子(retinal)的基态结构。虚线框内绿色圆球代表的是待运输的氯离子, 在黑暗状态下束缚在视黄醛分子的席夫碱附近。视黄醛分子与Nm-R3的赖氨酸形成共价键, 被光子激发之后, 视黄醛发生如图所示的异构化, 并且将原子间的应力传递到Nm-R3, 辅助氯离子进入细胞。(c) 光合作用水分II与亚铁血红素(OEC)。OEC携带的锰元素的X射线发射光谱信号受到其价态的影响可以提供间接结构信息。(d) 肌红蛋白分子与亚铁血红素(Heme)。Heme结合的铁可以吸引氧气或者一氧化碳分子, 并且受到光照的影响, 光泵浦-X射线探测的时间分辨晶体学的方法可以用于研究分子释放的动力学。

Figure 6 (Color online) Photosensitive proteins and their photoactive centers. (a) Photoactive yellow protein (PYP) and the pCA structures in dark (ground) state. The location of pCA within PYP molecule is indicated by the dashed box (similarly in (b)–(d), the location of other photoactive components are indicated using the boxes). The pCA undergoes a *trans-cis* isomerization upon blue light excitation, as depicted using red lines on the right. The isomerization induces the rearrangement of nearby amino acids and the impact spreads to the whole protein in an earthquake-like shock wave. (b) The ground state structure of the light-driven chloride ion pumping rhodopsin (Nm-R3) and the photoactive retinal molecule. The chloride ion is shown as a green sphere, which is stabilized by a hydrogen bonding network to a location next to the Schiff base in the dark state. The retinal is covalently bonded to the Lysine-235 of Nm-R3. After absorbing one photon, retinal transits to 13-*cis* configuration from the all-*trans* configuration in the dark state. The retinal isomerization drives conformational changes of Nm-R3 to pump chloride ions into bacterial cells. (c) Photosystem II and the oxygen-evolution complex (OEC). X-ray absorption spectrum of the Manganese (Mn) is sensitive to its oxidation state, so that the time-resolved XAS can be combined with time-resolved crystallography to reveal structure and kinetics information during water splitting process. (d) Myoglobin protein and the Heme group. The iron bound to Heme can associate with O₂ or CO molecules, and the states can be regulated by light illumination. Light-pump and X-ray probe time-resolved crystallography method has been applied to study the light-triggered molecule releasing.

口位置的流速达到30 m/s. 用高重频XFEL光源的巨大优势在于缩短实验时间, 测量一组完备的衍射信号理论上可以在几分钟之内完成, 极大提高实验效率. 这些结果对于研究超快的生物化学具有重要意义.

6.3.2 视紫红质蛋白: 光驱动离子泵

视紫红质蛋白(Rhodopsin)属于跨膜蛋白分子, 主体是七个嵌在细胞膜的螺旋二级结构组成的桶状拓扑结构, 功能包括跨膜离子运输, 传导膜外信号调节细胞行为等^[104]. 感光分子视黄醛(Retinal)结合在Rhodopsin蛋白的一个跨膜螺旋上(通常属于第七个螺旋, 例如如图6(b)). Retinal在光照时吸收光子, 引发构型的异构化, 并驱动与之相连的蛋白分子的结构演化, 实现相应的生物学功能. 研究最广泛的一类视紫红质蛋白源自细菌, 被称为菌视紫红质蛋白(Bacteriorhodopsin, BR)^[105]. 在一个光循环周期内, BR通过视黄醛分子吸收光子, 驱动结构演化, 完成氢离子(质子)从细胞内向细胞外的运输, 之后回到初始状态. 利用XFEL装置开展的一系列实验研究成果揭示了这个光循环过程中的动力学过程中多个关键时间节点的原子分辨率结构^[106]. 其中, 视黄醛分子的异构化在激光脉冲泵浦之后1 ps之内已经完成了全反式(All-Trans)到13-顺式(13-cis)的转化, 之后再弛豫到稳定构型^[107]. 高分辨率的电子密度差异图清晰展示了异构化前后视黄醛分子近邻的原子位置变化, 揭示视黄醛、氨基酸和水分子高度协调的动力学变化. 通过分析蛋白质分子结构以及重要氨基酸(比如高度保守位置-85, 89, 96序列号-的DTD模体: D即天冬氨酸aspartic acid, T即苏氨酸Threonine)的局部化学环境, 可以推测被运输质子的运动路径. 时间分辨瞬态吸收光谱的分析结果显示BR的光循环在15–20 ms时间内完成一个周期: 在基态BR分子中, 质子吸附在视黄醛分子与赖氨酸结合位置的席夫碱(携带一个质子), 在光激发之后由于视黄醛分子的异构化导致该质子从席夫碱脱离, 被附近D85接收, 之后5 ms内释放到细胞外的溶液中(具体的传递路线还不清晰); 而在光照之后15–20 ms的时间内, 一个新的质子从细胞内通过D96又传递给席夫碱, 视黄醛分子恢复全反式构型, BR分子回到基态, 准备下一轮光驱动的结构演化. 由于BR是跨膜蛋白质分子, 其特殊的生理环境给生长高品质大晶体造成了巨大的挑战; 而XFEL可以通过微米尺寸甚至更小的晶体获得高分

辨的衍射信号, 这是应用XFEL进行时间分辨结构研究的基石.

虽然对BR的研究取得了巨大的成功, 但是质子(以及氢原子)对X射线的散射截面非常小, 导致X射线衍射实验不能直接观察到被运输的质子的位置. 这个缺失的信息可以通过对另外两类视紫红质蛋白(Nonlabens Marinus Rhodopsin 3, Nm-R3和Krokinobacter Eikastus Rhodopsin 2, KR2)的研究得到补充. 和BR类似, 这两类视紫红质蛋白也通过席夫碱共价键与视黄醛分子相连, 通过视黄醛吸收光子引起的异构化驱动蛋白质结构演化, 不同之处是Nm-R3运输的是氯离子(因此也被称为ClR), KR2运输的是钠离子. 氯离子和钠离子对X射线都有很强的散射, 因此可以通过晶体衍射信号观测到相应的离子位置. 2021年, Yun等人^[108]利用LCLS装置开展的时间分辨晶体衍射实验结果展示了Nm-R3在光激发后1–100 ps之间的动力学过程, 观测到视黄醛变为13-cis构型之后, 氯离子脱离席夫碱以及周围其他氨基酸形成的氢键网络的束缚, 通过扩散的方式被苏氨酸T102吸引. 氯离子在Nm-R3分子中“脱离-扩散”的运动与预期氯离子随席夫碱翻转的动力学相反. 假想运动模型认为, 由于质子化的席夫碱对带负电的氯离子有静电吸引力, 根据基态结构推测的结果是氯离子会被拉到视黄醛分子靠近细胞内一侧. 氯离子出乎意料的反向运动很有可能是由于超快的Retinal异构化过程(亚皮秒尺度)导致蛋白质和氯离子来不及做出响应, 即由于两种运动的时间尺度分离导致的结果. 根据视黄醛分子Retinal异构化前后的结构进行的分子动力学模拟结果与实验观测数据一致, 即暗状态的分子结构显示氯离子被氢键网络束缚在席夫碱附近; 视黄醛分子异构化之后(13-cis构型), 氢键网络重组, 氯离子被释放到一个相对大的空腔. 钠离子在KR2中的运输也通过类似的方法进行了系统的研究, 由于钠离子与质子化的席夫碱都带正电, 与BR中的水分子或者Nm-R3中的氯离子不同, 钠离子与席夫碱结合的状态只是运输过程中的一个瞬时结构. Sko-pintsev等人^[109]解析了光激发之后飞秒到毫秒时刻的高分辨结构, 再次验证了视黄醛被光激发的异构化是亚皮秒尺度的超快动力学过程, 异构化导致席夫碱的质子脱离, 并且通过与量子力学计算的结果进行比较, 推断KR2在激发1 ms以内吸附溶液中的钠离子. BR, Nm-R3和KR2代表了三种视紫红质蛋白, 虽然蛋白质

序列信息差异比较大, 高度相似的七次跨膜螺旋拓扑结构以及共同的视黄醛分子显示了趋同进化的结果. 更有意思的是, 这些视紫红质蛋白可以通过突变一个或者几个氨基酸改变运输的离子类型^[110-112], 有望成为光遗传学的分子载体. 除了Rhodopsin本身的生物学意义, 在太阳能转化的能源研究和医疗健康领域也有巨大应用前景.

6.3.3 光系统II蛋白: 地球大气中氧气的制造过程

地球大气中的氧气主要归功于24亿年前出现的光合作用蛋白分子系统. 藻类和植物中的光合作用系统利用太阳能把水和二氧化碳转化为有机物和氧气^[113]. 第二类光合作用系统(简称光系统II)通过依次吸收四个光子, 完成著名的Kok循环(暗状态 $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_1$), 将水分子裂解为电子、质子和氧气^[114]. 电子和质子被用于生命活动中的其他的化学反应, 氧气则被释放到空气中. 作为如此重要的蛋白质, 光系统II的Kok循环过程一直都是重要的研究内容, 也是最早应用XFEL进行时间分辨结构研究的体系之一. 然而, 光系统II是一个蛋白分子复合物, 包含20个蛋白亚基分子, 其晶体的生长非常困难, 是高分辨率结构确定的瓶颈. 由于XFEL可以从小晶体获得更高分辨率的衍射信号, 在优化晶体样品的基础上, 多个科研团队应用XFEL开展了时间分辨串行晶体衍射实验研究. 叶绿素是光系统II的感光分子, 而水解反应与析氧复合体(Oxygen-Evolution Complex, OEC, Mn_4CaO_5)更加紧密相关(图6(c)). 2014年, Kupitz等人^[115]利用LCLS的飞秒XFEL脉冲与527 nm的泵浦脉冲测量了暗状态 S_1 和双脉冲激发导致的 S_3 的两个结构, 对应5.0和5.5 Å分辨率的电荷密度图. 通过对比光系统II蛋白包含的析氧复合体(OEC)附近的电荷密度, 作者推断析氧复合体在两次光照之后发生了结构变化, 其中一个锰原子远离了金属集团的中心位置. 受电荷密度图分辨率的限制, 该团队结合量子化学的计算结果对实验数据进行了解读. 2020年, Ibrahim等人^[116]测量了两侧光脉冲激发之后从微秒到毫秒时间尺度的几个时间点对应的结构信息, 也观测到金属集团以及附近氨基酸的位置变化. 析氧复合体包含四个锰元素在Kok循环中的氧化价态随着光子吸收和电子脱离而变化. X射线发射光谱正好可以用于测量锰元素在泵浦前后的电子结构信息, 因此Bergmann团队^[117]发展了基于XFEL同时探

测X射线衍射信号和X射线发射光谱的方法. 利用这种联用方法, Kern等人^[118]探测了光系统II蛋白的晶体衍射信号和X射线发射光谱, 发现XFEL的飞秒脉冲测量过程中析氧复合体的电子结构在室温条件下没有被破坏(当然XFEL脉冲曝光之后由于库仑作用, 晶体样品遭到破坏而不能再次测量). 2018年, Kern等人^[119]又应用SFX-XES联用的方法, 进一步研究了光系统II在裂解水过程中的中间态. 2019年, Shen团队^[120]通过改进晶体品质获得了更高的分辨率结构, 解析了Kok循环的暗状态 S_1 , 中间态 S_2 和 S_3 的结构并进行了比较分析, 发现 S_2 态出现的水分子通路以及 S_3 态中水分子与析氧复合体的结合, 展现出光系统II在水分子传递、质子释放、氧气合成过程中高度协调的运动过程.

6.3.4 肌红蛋白(Myoglobin)与氧气/一氧化碳的解离

氧气对于大部分生命体具有不可替代的地位, 肌红蛋白是重要的“氧气运输工”^[121]. 除了能够与氧气分子(O_2)结合以外, 肌红蛋白还能够与其他具有生理功能的分子结合, 比如一氧化碳(CO)和一氧化氮(NO)等. 和血红蛋白(Hemoglobin)类似, 肌红蛋白通过一个特殊的功能团(血红素Heme)实现与这些小分子的结合(图6(d)). 在肌红蛋白不与任何分子结合的情况下, Heme的铁离子偏离Heme平面, 形成类似一个穹顶的构型; 而 O_2 /CO/NO这些分子与铁离子的结合会填充铁离子的外围电子轨道, 从而得到一个稳定的平面Heme构型. 有趣的是, 这些分子与Heme的分离可以通过激光改变 π - π 键进行调控, 因此可以利用“可见光泵浦-X射线探测”的方法研究与Heme集团相关的超快动力学过程. 2015年, Barends等人^[122]利用LCLS装置, 首次直接观测到532 nm的飞秒激光脉冲引发的CO与肌红蛋白的分离, 以及引起的贯穿整个肌红蛋白分子的高度协调的结构演化. 出乎意料的是, 这种大规模的结构变化竟然在光激发之后500 fs的时间尺度内就出现了, 意味着CO的释放引发的能量转移以极快的速度传播. 同年, Levantino等人^[123]也应用LCLS通过小角散射和大角散射的方法观测到光照之后100 ps以内肌红蛋白的形变, 并且通过量化分析得出3.6 ps周期的减幅振荡. 利用铁元素的特有的X射线吸收光谱, Kinschel等人^[124]利用SACLA测量了铁元素的X射线发射光谱信息, 分析了肌红蛋白与一氧化氮在光激发之后的分离结合过程中的自旋交换动力学.

6.3.5 “混合-扩散”泵浦模式应用于蛋白酶的催化反应研究

自然界中天然感光蛋白所占比例并不多, 大部分蛋白质是在细胞内部和生物体内部, 不能也不需要对外光产生响应. 具有催化作用的蛋白酶分子需要与底物分子结合之后才启动相应的化学反应, 因此“混合-扩散”的泵浦方法有更广泛的应用场景. 然而, 这种泵浦方法在同时性和有效性方面不能与激光脉冲泵浦相比. 比如, “混合-扩散”的时间通常受扩散速度的制约需要接近毫秒(现有方法很难突破微秒尺度), 因此反应启动的时间差异造成的中间态结构多样性给数据解读带来了更多的挑战; 蛋白酶与反应底物的结合又是一个随机过程, 所以泵浦的效率不能保障, 需要使用过饱和的底物浓度. 尽管对蛋白酶的研究受到实验方法的局限, 但是蛋白酶的反应周期通常是在毫秒和秒这个量级, 因此可以用晶体衍射的方法捕捉催化反应中间态的结构变化(严格来讲, 这不属于化学意义上的超快动力学; 对于生物体系, 依然可以认为是很快的结构变化). 应用XFEL串行晶体衍射的方法, 研究人员在“混合-扩散”泵浦研究领域已经取得了很好的进展. 2016年, Stagno等人^[125]利用“混合-喷流”方法将配体分子与核糖开关分子(Riboswitch)的晶体混合, 启动核糖开关的催化反应, 成功解析了配体分子与核糖开关分子结合前后以及一个结合过程中的复合物结构, 观察到显著的结构变化. 这些结构变化甚至引起了晶体空间群的转变, 凸显微小晶体在研究生物分子结构变化的优势. Ishigami等人^[126]对细胞色素 c 氧化酶(Cytochrome c Oxidase, CcO)进行了结构研究, 利用吸收光谱信号作为指导, 将大量氧气混合到含有CcO晶体溶液之中后, 实验解析了CcO蛋白在催化过程中的中间态结构, 观察到Heme侧链的旋转以及相关氢键的变化. 2019年, Dasgupta等人^[127]通过这种实验方法确定了异氰水合酶(Isocyanide Hydratase)在催化过程中由于共价键和氢键网络变化引发的结构变化, 并且通过氨基酸突变实验为理论模型提供了支持. 虽然酶催化过程相对缓慢, 泵浦和探测的时间延迟可以通过调整混合位置与探测位置之间的距离以及样品的流速得到很好的控制, 进而应用高重复频率的XFEL装置(比如欧洲XFEL)开展时间分辨串行晶体衍射实验研究. 2021年, Pandey等人^[128]利用欧洲XFEL测量了 β 内酰胺

酶(β -Lactamase)与底物分子(头孢曲松钠, Ceftriaxone; 舒巴坦, Sulbactam)混合之后不同时刻(5–66 ms)的衍射信号. 通过晶体衍射信号重构的电子密度显示了底物分子在蛋白分子结合位置附近的动态过程. 实验过程中数据收集的频率达到564 kHz, 而样品的流速大约26.5 m/s. 这个实验以及对PYP分子的时间分辨晶体衍射实验展示了用高重复频率XFEL装置研究生物大分子动力学的潜力.

7 结论和展望

XFEL的高亮度全相干飞秒脉冲促进了高时空分辨率超快动力学的研究, 拓展了对物质和分子的认知. 本文总结了XFEL的原理和特性, 结合实际体系, 介绍了XFEL在超快动力学研究领域的应用和一系列突破性进展. 虽然作者力求覆盖物理、化学、生物等多种学科, 但是由于篇幅和作者研究领域的局限, 所列工作会有侧重, 对其他领域的重要进展难免有所遗漏, 读者可以参考最近相关领域的精彩综述作为补充.

值得指出的是, XFEL还属于新方法, 更大的潜力还有待进一步发掘, 作者希望本文所述方法能够启发新的思路, 科研人员可结合自己的研究课题特点进行发散思考, 拓展已有方法, 发展新方法. 本文主要介绍了基于XFEL的“泵浦-探测”中最常用的激光泵浦-XFEL探测方法. 实验上还可以将单个XFEL脉冲分成两个脉冲, 进而开展XFEL泵浦-XFEL探测研究. 更进一步, 研究人员通过调制波荡器获得双色脉冲, 利用X射线波长的差别对两个脉冲的信号进行特异性识别分析^[129–133]. 最近欧洲XFEL的Jahnke等人^[134]使用高亮度XFEL脉冲观测到飞秒时间尺度内水分子由于X射线辐照导致的电离过程, 充分利用了XFEL超高亮度脉冲特性, 通过测量水分子被第一个光子激发之后吸收第二个光子的特征信号, 与第一性原理动力学模拟结合, 重构水分子电离的超快过程. 实际上, 电、热、磁等手段都可以作为“泵浦”方法驱动动力学演化过程, XFEL作为探测工具, 对实验测得信号的处理流程与激光泵浦-XFEL探测实验的分析基本一致.

XFEL装置的进步促进了结构和动力学的研究, 同时也带来了数据分析方面的挑战. 一方面, 高重复频率的XFEL脉冲可以产生大量的实验数据; 另一方面, 实验数据中夹杂着大量噪音信号. 实验数据收集的速率

远远高于同步辐射装置, 需要匹配超级计算机集群才能够及时分析实验数据, 并为后续实验提供反馈. 具有并行计算能力的超算集群是XFEL设施的标准配置, 尽管如此, 实时反馈往往基于初步的数据分析结果. 因此, 还需要开发更加先进高效的数据分析方法, 真正实现高通量实验数据的实时分析, 帮助提高实验效率. 百万赫兹重复频率的实验测量数据可能需要在探测器模块加装智能筛选和预处理功能, 否则必然遭遇数据传输瓶颈. 基于人工智能方法的图像识别和信号处理方法应该有潜在的应用, 值得研发团队密切关注.

在信号的解读方面, 时间分辨实验需要与其他方法进行整合. 小分子体系具有相对简单的结构, 可以通过实验数据直接勾画出动力学变化过程. 对于复杂的分子体系(比如生物大分子), 仅依赖光谱或者散射强度信号不足以直接反推结构信息, 就需要从其他方法获得额外的信息. 三维傅里叶空间的晶体衍射信号通常可以唯一确定地重构三维实空间的电子密度信号. 然而, 在时间分辨的动力学研究中, 晶体衍射实验也面临信息不足的问题, 这正是前文论述的“泵浦”之后多构象共存导致的信号叠加带来的对数据解读的挑战. 计算模型和动力学模拟在这方面提供了有力的支撑, 在多个实验研究中都展示了其重要性. 可以预期,

在将来的动力学研究中, 计算机仿真模拟的角色不可或缺.

为了能够推广XFEL在超快动力学研究领域的应用, 还有两个缺陷需要尽快弥补: 一个是稀缺的XFEL装置, 另一个是实验样品的用量需求. XFEL装置在技术和经费方面都有巨大的要求, 导致目前能够供研究人员使用的设施屈指可数. 因此, 只有降低XFEL设施建设和维护方面的技术和经费门槛, 才能提供更多的实验设施. 紧凑型XFEL装置的研究已经取得一定进展, 光子通量能够初步达到光谱实验研究的需求, 这是一个好的开端^[135,136]. 实验样品方面的消耗主要是“泵浦”技术导致的不必要的浪费, 比如泵浦激光的光斑过大, 导致需要快速将上一个泵浦脉冲激发的样品全部移出泵浦和探测区域, 以全新的样品替代. 如果能够进一步改进泵浦方法, 或者研发出有效的“按需上样”(Delivery-On-Demand)方法^[137-139], 就可以极大地降低样品的损耗, 降低实验难度和节约资源.

综上所述, XFEL作为一种新的研究工具, 在超快动力学(以及一般意义的动力学)研究领域有巨大潜力和广阔的应用. 随着各项配套和辅助方法(比如“泵浦”、数据分析、模型建立等)逐步改进, 可以预见在不久的将来会涌现出更多的突破性研究进展.

参考文献

- 1 Zewail A H. 4D ultrafast electron diffraction, crystallography, and microscopy. *Annu Rev Phys Chem*, 2006, 57: 65–103
- 2 Sciaini G, Miller R J D. Femtosecond electron diffraction: Heralding the era of atomically resolved dynamics. *Rep Prog Phys*, 2011, 74: 096101
- 3 Weathersby S P, Brown G, Centurion M, et al. Mega-electron-volt ultrafast electron diffraction at SLAC National Accelerator Laboratory. *Rev Sci Instrum*, 2015, 86: 073702
- 4 Zewail A H, Thomas J M. 4D Electron Microscopy: Imaging in Space and Time. London: World Scientific, 2009
- 5 Zewail A H. Four-dimensional electron microscopy. *Science*, 2010, 328: 187–193
- 6 Cheng Y, Zong A, Li J, et al. Light-induced dimension crossover dictated by excitonic correlations. *Nat Commun*, 2022, 13: 963, arXiv: 2202.09668
- 7 Sciaini G. Recent advances in ultrafast structural techniques. *Appl Sci*, 2019, 9: 1427
- 8 Ackermann W, Asova G, Ayvazyan V, et al. Operation of a free-electron laser from the extreme ultraviolet to the water window. *Nat Photon*, 2007, 1: 336–342
- 9 Emma P, Akre R, Arthur J, et al. First lasing and operation of an ångström-wavelength free-electron laser. *Nat Photon*, 2010, 4: 641–647
- 10 Bostedt C, Boutet S, Fritz D M, et al. Linac coherent light source: The first five years. *Rev Mod Phys*, 2016, 88: 015007
- 11 Zhang W K, Kong Q Y, Weng Z Q. Applications of femtosecond X-ray techniques in chemistry and energy materials science (in Chinese). *Physics*, 2018, 47: 504–514 [张文凯, 孔庆宇, 翁祖谦. X射线自由电子激光在化学与能源材料科学中的应用. *物理*, 2018, 47: 504–514]
- 12 Huang N, Deng H, Liu B, et al. Features and futures of X-ray free-electron lasers. *Innovation*, 2021, 2: 100097
- 13 Abela R, Beaud P, van Bokhoven J A, et al. Perspective: Opportunities for ultrafast science at SwissFEL. *Struct Dyn*, 2017, 4: 061602
- 14 Rossbach J, Schneider J R, Wurth W. 10 years of pioneering X-ray science at the free-electron laser FLASH at DESY. *Phys Rep*, 2019, 808: 1–

- 15 Pellegrini C. X-ray free-electron lasers: From dreams to reality. *Phys Scr*, 2016, T169: 014004
- 16 McNeil B W J, Thompson N R. X-ray free-electron lasers. *Nat Photon*, 2010, 4: 814–821
- 17 Pellegrini C, Marinelli A, Reiche S. The physics of X-ray free-electron lasers. *Rev Mod Phys*, 2016, 88: 1–55
- 18 Schoenlein R, Elsaesser T, Holldack K, et al. Recent advances in ultrafast X-ray sources. *Phil Trans R Soc A*, 2019, 377: 20180384
- 19 Zhao Z T, Feng C. X-ray free-electron lasers (in Chinese). *Physics*, 2018, 47: 481–490 [赵振堂, 冯超. X射线自由电子激光. *物理*, 2018, 47: 481–490]
- 20 Geloni G, Kocharyan V, Saldin E. A novel self-seeding scheme for hard X-ray FELs. *J Modern Opt*, 2011, 58: 1391–1403
- 21 Amann J, Berg W, Blank V, et al. Demonstration of self-seeding in a hard-X-ray free-electron laser. *Nat Photon*, 2012, 6: 693–698
- 22 Allaria E, Castronovo D, Cinquegrana P, et al. Two-stage seeded soft-X-ray free-electron laser. *Nat Photon*, 2013, 7: 913–918
- 23 Yu L H, Ben-Zvi I. High-gain harmonic generation of soft X-rays with the “fresh bunch” technique. *Nucl Instrum Method Phys Res Sect A*, 1997, 393: 96–99
- 24 Wu J, Yu L H. Coherent hard X-ray production by cascading stages of high gain harmonic generation. *Nucl Instrum Method Phys Res Sect A*, 2001, 475: 104–111
- 25 Yu L H, Babzien M, Ben-Zvi I, et al. High-gain harmonic-generation free-electron laser. *Science*, 2000, 289: 932–934
- 26 Huang Z, Kim K J. Review of X-ray free-electron laser theory. *Phys Rev ST Accel Beams*, 2007, 10: 034801
- 27 Stupakov G. Using the beam-echo effect for generation of short-wavelength radiation. *Phys Rev Lett*, 2009, 102: 074801
- 28 Ishikawa T, Aoyagi H, Asaka T, et al. A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region. *Nat Photon*, 2012, 6: 540–544
- 29 Allaria E, Appio R, Badano L, et al. Highly coherent and stable pulses from the FERMI seeded free-electron laser in the extreme ultraviolet. *Nat Photon*, 2012, 6: 699–704
- 30 Decking W, Abeghyan S, Abramian P, et al. A MHz-repetition-rate hard X-ray free-electron laser driven by a superconducting linear accelerator. *Nat Photon*, 2020, 14: 391–397
- 31 Kang H S, Min C K, Heo H, et al. Hard X-ray free-electron laser with femtosecond-scale timing jitter. *Nat Photon*, 2017, 11: 708–713
- 32 Prat E, Abela R, Aiba M, et al. A compact and cost-effective hard X-ray free-electron laser driven by a high-brightness and low-energy electron beam. *Nat Photon*, 2020, 14: 748–754
- 33 Zhao Z, Wang D, Gu Q, et al. SXFEL: A soft X-ray free electron laser in China. *Synchrotron Radiat News*, 2017, 30: 29–33
- 34 Galayda J N. The LCLS-II: A high power upgrade to the LCLS. In: *Proceedings of the 9th International Particle Accelerator Conference*. Vancouver: JACoW, 2018. 18–23
- 35 Zhao Z T, Wang D, Chen J H, et al. First lasing of an echo-enabled harmonic generation free-electron laser. *Nat Photon*, 2012, 6: 360–363
- 36 Zhao X, Zhang W K. X-ray free-electron lasers: theory, actuality and applications (in Chinese). *Mod Phys*, 2019, 31: 47–52 [赵璇, 张文凯. X射线自由电子激光: 原理、现状及应用. *现代物理知识*, 2019, 31: 47–52]
- 37 Ding Y, Decker F J, Emma P, et al. Femtosecond X-ray pulse characterization in free-electron lasers using a cross-correlation technique. *Phys Rev Lett*, 2012, 109: 1–5
- 38 Frühling U, Wieland M, Gensch M, et al. Single-shot terahertz-field-driven X-ray streak camera. *Nat Photon*, 2009, 3: 523–528
- 39 Gahl C, Azima A, Beye M, et al. A femtosecond X-ray/optical cross-correlator. *Nat Photon*, 2008, 2: 165–169
- 40 Bionta M R, Lemke H T, Cryan J P, et al. Spectral encoding of X-ray/optical relative delay. *Opt Express*, 2011, 19: 21855
- 41 Hartmann N, Helml W, Galler A, et al. Sub-femtosecond precision measurement of relative X-ray arrival time for free-electron lasers. *Nat Photon*, 2014, 8: 706–709
- 42 Harmand M, Coffee R, Bionta M R, et al. Achieving few-femtosecond time-sorting at hard X-ray free-electron lasers. *Nat Photon*, 2013, 7: 215–218
- 43 Grguraš I, Maier A R, Behrens C, et al. Ultrafast X-ray pulse characterization at free-electron lasers. *Nat Photon*, 2012, 6: 852–857
- 44 Schulz S, Grguraš I, Behrens C, et al. Femtosecond all-optical synchronization of an X-ray free-electron laser. *Nat Commun*, 2015, 6: 1
- 45 Kazansky A K, Sazhina I P, Kabachnik N M. Fast retrieval of temporal characteristics of FEL pulses using streaking by THz field. *Opt Express*, 2019, 27: 12939
- 46 Osterhoff J. Beam diagnostics challenges in plasma wakefield acceleration. In: *Proceedings of the 5th International Beam Instrumentation Conference*. Barcelona: JACoW, 2016. 2–18

- 47 Deng B, Yan J, Zhang Q, et al. Proposal of X-ray absorption spectroscopy and magnetic circular dichroism using broadband free-electron lasers. *J Synchrotron Rad*, 2019, 26: 1–10
- 48 Glatzel P, Bergmann U. High resolution 1s core hole X-ray spectroscopy in 3d transition metal complexes—Electronic and structural information. *Coord Chem Rev*, 2005, 249: 65–95
- 49 Lu H, Gauthier A, Hepting M, et al. Time-resolved RIXS experiment with pulse-by-pulse parallel readout data collection using X-ray free electron laser. *Sci Rep*, 2020, 10: 22226
- 50 Kimberg V, Rohringer N. Stochastic stimulated electronic X-ray Raman spectroscopy. *Struct Dyn*, 2016, 3: 034101
- 51 Lemke H T, Bressler C, Chen L X, et al. Femtosecond X-ray absorption spectroscopy at a hard X-ray free electron laser: Application to spin crossover dynamics. *J Phys Chem A*, 2013, 117: 735–740
- 52 Miller N A, Deb A, Alonso-Mori R, et al. Polarized XANES monitors femtosecond structural evolution of photoexcited vitamin B₁₂. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 1894–1899
- 53 Harlang T C B, Liu Y, Gordivska O, et al. Iron sensitizer converts light to electrons with 92% yield. *Nat Chem*, 2015, 7: 883–889
- 54 Öström H, Öberg H, Xin H, et al. Probing the transition state region in catalytic CO oxidation on Ru. *Science*, 2015, 347: 978–982
- 55 Dell’Angela M, Anniyev T, Beye M, et al. Real-time observation of surface bond breaking with an X-ray laser. *Science*, 2013, 339: 1302–1305
- 56 Zhang W K, Alonso-Mori R, Bergmann U, et al. Tracking excited-state charge and spin dynamics in iron coordination complexes. *Nature*, 2014, 509: 345–348
- 57 Zhang W K, Kjær K S, Alonso-Mori R, et al. Manipulating charge transfer excited state relaxation and spin crossover in iron coordination complexes with ligand substitution. *Chem Sci*, 2016, 8: 515–523
- 58 Zhang W K, Gaffney K J. Mechanistic studies of photoinduced spin crossover and electron transfer in inorganic complexes. *Acc Chem Res*, 2015, 48: 1140–1148
- 59 Mara M W, Hadt R G, Reinhard M E, et al. Metalloprotein entatic control of ligand-metal bonds quantified by ultrafast X-ray spectroscopy. *Science*, 2017, 356: 1276–1280
- 60 Bacellar C, Kinschel D, Mancini G F, et al. Spin cascade and doming in ferric hemes: Femtosecond X-ray absorption and X-ray emission studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 21914–21920
- 61 Wernet P, Kunnus K, Josefsson I, et al. Orbital-specific mapping of the ligand exchange dynamics of Fe(CO)₅ in solution. *Nature*, 2015, 520: 78–81
- 62 Kunnus K, Josefsson I, Rajkovic I, et al. Identification of the dominant photochemical pathways and mechanistic insights to the ultrafast ligand exchange of Fe(CO)₅ to Fe(CO)₄EtOH. *Struct Dyn*, 2016, 3: 043204
- 63 Kunnus K, Zhang W, Delcey M G, et al. Viewing the valence electronic structure of ferric and ferrous hexacyanide in solution from the Fe and cyanide perspectives. *J Phys Chem B*, 2016, 120: 7182–7194
- 64 Jay R M, Norell J, Eckert S, et al. Disentangling transient charge density and metal-ligand covalency in photoexcited ferricyanide with femtosecond resonant inelastic soft X-ray scattering. *J Phys Chem Lett*, 2018, 9: 3538–3543
- 65 Norell J, Jay R M, Hantschmann M, et al. Fingerprints of electronic, spin and structural dynamics from resonant inelastic soft X-ray scattering in transient photo-chemical species. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20: 7243–7253
- 66 Ismail A S M, Uemura Y, Park S H, et al. Direct observation of the electronic states of photoexcited hematite with ultrafast 2p3d X-ray absorption spectroscopy and resonant inelastic X-ray scattering. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22: 2685–2692
- 67 Clark J N, Beitra L, Xiong G, et al. Ultrafast three-dimensional imaging of lattice dynamics in individual gold nanocrystals. *Science*, 2013, 341: 56–59
- 68 Milathianaki D, Boutet S, Williams G J, et al. Femtosecond visualization of lattice dynamics in shock-compressed matter. *Science*, 2013, 342: 220–223
- 69 Sellberg J A, Huang C, McQueen T A, et al. Ultrafast X-ray probing of water structure below the homogeneous ice nucleation temperature. *Nature*, 2014, 510: 381–384
- 70 Mankowsky R, Subedi A, Först M, et al. Nonlinear lattice dynamics as a basis for enhanced superconductivity in YBa₂Cu₃O_{6.5}. *Nature*, 2014, 516: 71–73, arXiv: 1405.2266
- 71 Li Q, Stoica V A, Paściak M, et al. Subterahertz collective dynamics of polar vortices. *Nature*, 2021, 592: 376–380, arXiv: 2102.05746
- 72 Gorkhover T, Schorb S, Coffee R, et al. Femtosecond and nanometre visualization of structural dynamics in superheated nanoparticles. *Nat*

- Photon*, 2016, 10: 93–97
- 73 Kim K H, Kim J G, Nozawa S, et al. Direct observation of bond formation in solution with femtosecond X-ray scattering. *Nature*, 2015, 518: 385–389
- 74 Kim J G, Nozawa S, Kim H, et al. Mapping the emergence of molecular vibrations mediating bond formation. *Nature*, 2020, 582: 520–524
- 75 Kong Q Y, Laursen M G, Haldrup K, et al. Initial metal–metal bond breakage detected by fs X-ray scattering in the photolysis of $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ in cyclohexane at 400 nm. *Photochem Photobiol Sci*, 2019, 18: 319–327
- 76 van Driel T B, Kjær K S, Hartsock R W, et al. Atomistic characterization of the active-site solvation dynamics of a model photocatalyst. *Nat Commun*, 2016, 7: 13678
- 77 Haldrup K, Levi G, Biasin E, et al. Ultrafast X-ray scattering measurements of coherent structural dynamics on the ground-state potential energy surface of a diplatinum molecule. *Phys Rev Lett*, 2019, 122: 63001
- 78 Gaffney K J. Capturing photochemical and photophysical transformations in iron complexes with ultrafast X-ray spectroscopy and scattering. *Chem Sci*, 2021, 12: 8010–8025
- 79 Kjær K S, van Driel T B, Harlang T C B, et al. Finding intersections between electronic excited state potential energy surfaces with simultaneous ultrafast X-ray scattering and spectroscopy. *Chem Sci*, 2019, 10: 5749–5760
- 80 Kunnus K, Vacher M, Harlang T C B, et al. Vibrational wavepacket dynamics in Fe carbene photosensitizer determined with femtosecond X-ray emission and scattering. *Nat Commun*, 2020, 11: 634, arXiv: 1910.13099
- 81 Biasin E, Fox Z W, Andersen A, et al. Direct observation of coherent femtosecond solvent reorganization coupled to intramolecular electron transfer. *Nat Chem*, 2021, 13: 343–349
- 82 Reinhard M E, Mara M W, Kroll T, et al. Short-lived metal-centered excited state initiates iron-methionine photodissociation in ferrous cytochrome *c*. *Nat Commun*, 2021, 12: 1086
- 83 Shelby M L, Wildman A, Hayes D, et al. Interplays of electron and nuclear motions along CO dissociation trajectory in myoglobin revealed by ultrafast X-rays and quantum dynamics calculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: 1
- 84 Neutze R, Wouts R, van der Spoel D, et al. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 2000, 406: 752–757
- 85 Chapman H N, Barty A, Bogan M J, et al. Femtosecond diffractive imaging with a soft-X-ray free-electron laser. *Nat Phys*, 2006, 2: 839–843, arXiv: physics/0610044
- 86 Seibert M M, Ekeberg T, Maia F R N C, et al. Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser. *Nature*, 2011, 470: 78–81
- 87 Chapman H N, Fromme P, Barty A, et al. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 2011, 470: 73–77
- 88 Ekeberg T, Svenda M, Abergel C, et al. Three-dimensional reconstruction of the giant mimivirus particle with an X-ray free-electron laser. *Phys Rev Lett*, 2015, 114: 098102
- 89 Aquila A, Barty A, Bostedt C, et al. The linac coherent light source single particle imaging road map. *Struct Dyn*, 2015, 2: 041701
- 90 Reddy H K N, Yoon C H, Aquila A, et al. Coherent soft X-ray diffraction imaging of coliphage PR772 at the Linac coherent light source. *Sci Data*, 2017, 4: 170079
- 91 Shi Y, Yin K, Tai X, et al. Evaluation of the performance of classification algorithms for XFEL single-particle imaging data. *IUCrJ*, 2019, 6: 331–340
- 92 Hosseinizadeh A, Mashayekhi G, Copperman J, et al. Conformational landscape of a virus by single-particle X-ray scattering. *Nat Methods*, 2017, 14: 877–881
- 93 Rose M, Bobkov S, Ayyer K, et al. Single-particle imaging without symmetry constraints at an X-ray free-electron laser. *IUCrJ*, 2018, 5: 727–736
- 94 Boutet S, Lomb L, Williams G J, et al. High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science*, 2012, 337: 362–364
- 95 Liu H G. Making molecular movies with X-ray free electron lasers (in Chinese). *Physics*, 2021, 50: 620–629 [刘海广. 用X射线自由电子激光拍摄分子电影. *物理*, 2021, 50: 620–629]
- 96 Colletier J-P, Schirò G, Weik M. Time-resolved serial femtosecond crystallography, towards molecular movies of biomolecules in action. In: Boutet S, Fromme P, Hunter M S, eds. *X-ray Free Electron Lasers*. Cham: Springer, 2018. 331–356
- 97 Orville A M. Recent results in time resolved serial femtosecond crystallography at XFELs. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 65: 193–208
- 98 Hellingwerf K J, Hendriks J, Gensch T. Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein: Will this “yellow lab” bring us where

we want to go? *J Phys Chem A*, 2003, 107: 1082–1094

- 99 Jung Y O, Lee J H, Kim J, et al. Volume-conserving *trans-cis* isomerization pathways in photoactive yellow protein visualized by picosecond X-ray crystallography. *Nat Chem*, 2013, 5: 212–220
- 100 Tenboer J, Basu S, Zatsepin N, et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science*, 2014, 346: 1242–1246
- 101 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: 725–729
- 102 Hosseinizadeh A, Breckwoldt N, Fung R, et al. Few-fs resolution of a photoactive protein traversing a conical intersection. *Nature*, 2021, 599: 697–701
- 103 Pandey S, Bean R, Sato T, et al. Time-resolved serial femtosecond crystallography at the European XFEL. *Nat Methods*, 2020, 17: 73–78
- 104 Sharma A K, Spudich J L, Doolittle W F. Microbial rhodopsins: Functional versatility and genetic mobility. *Trends MicroBiol*, 2006, 14: 463–469
- 105 Lanyi J K. Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66: 665–688
- 106 Wickstrand C, Nogly P, Nango E, et al. Bacteriorhodopsin: Structural insights revealed using X-ray lasers and synchrotron radiation. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 59–83
- 107 Nogly P, Weinert T, James D, et al. Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond X-ray laser. *Science*, 2018, 361: eaat0094
- 108 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: e2020486118
- 109 Skopintsev P, Ehrenberg D, Weinert T, et al. Femtosecond-to-millisecond structural changes in a light-driven sodium pump. *Nature*, 2020, 583: 314–318
- 110 Sasaki J, Brown L S, Chon Y S, et al. Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump. *Science*, 1995, 269: 73–75
- 111 Hasemi T, Kikukawa T, Kamo N, et al. Characterization of a cyanobacterial chloride-pumping rhodopsin and its conversion into a proton pump. *J Biol Chem*, 2016, 291: 355–362
- 112 Yun J H, Park J H, Jin Z, et al. Structure-based functional modification study of a cyanobacterial chloride pump for transporting multiple anions. *J Mol Biol*, 2020, 432: 5273–5286
- 113 Vinyard D J, Ananyev G M, Charles Dismukes G. Photosystem II: The reaction center of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 577–606
- 114 Kok B, Forbush B, McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution—I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol*, 1970, 11: 457–475
- 115 Kupitz C, Basu S, Grotjohann I, et al. Serial time-resolved crystallography of photosystem II using a femtosecond X-ray laser. *Nature*, 2014, 513: 261–265
- 116 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: 12624–12635
- 117 Alonso-Mori R, Kern J, Gildea R J, et al. Energy-dispersive X-ray emission spectroscopy using an X-ray free-electron laser in a shot-by-shot mode. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 19103–19107
- 118 Kern J, Alonso-Mori R, Tran R, et al. Simultaneous femtosecond X-ray spectroscopy and diffraction of photosystem II at room temperature. *Science*, 2013, 340: 491–495
- 119 Kern J, Chatterjee R, Young I D, et al. Structures of the intermediates of Kok’s photosynthetic water oxidation clock. *Nature*, 2018, 563: 421–425
- 120 Suga M, Akita F, Yamashita K, et al. An oxyl/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an X-ray free-electron laser. *Science*, 2019, 366: 334–338
- 121 Kendrew J C, Dickerson R E, Strandberg B E, et al. Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å. resolution. *Nature*, 1960, 185: 422–427
- 122 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: 445–450

- 123 Levantino M, Schirò G, Lemke H T, et al. Ultrafast myoglobin structural dynamics observed with an X-ray free-electron laser. *Nat Commun*, 2015, 6: 1–6
- 124 Kinschel D, Bacellar C, Cannelli O, et al. Femtosecond X-ray emission study of the spin cross-over dynamics in haem proteins. *Nat Commun*, 2020, 11: 4145, arXiv: [2005.05598](https://arxiv.org/abs/2005.05598)
- 125 Stagno J R, Liu Y, Bhandari Y R, et al. Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography. *Nature*, 2017, 541: 242–246
- 126 Ishigami I, Zatsepin N A, Hikita M, et al. Crystal structure of CO-bound cytochrome *c* oxidase determined by serial femtosecond X-ray crystallography at room temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 8011–8016
- 127 Dasgupta M, Budday D, de Oliveira S H P, et al. Mix-and-inject XFEL crystallography reveals gated conformational dynamics during enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 25634–25640
- 128 Pandey S, Calvey G, Katz A M, et al. Observation of substrate diffusion and ligand binding in enzyme crystals using high-repetition-rate mix-and-inject serial crystallography. *IUCrJ*, 2021, 8: 878–895
- 129 Castagna J C, Murphy B, Bozek J, et al. X-ray split and delay system for soft X-rays at LCLS. *J Phys-Conf Ser*, 2013, 425: 152021
- 130 Hara T, Inubushi Y, Katayama T, et al. Two-colour hard X-ray free-electron laser with wide tunability. *Nat Commun*, 2013, 4: 2919
- 131 Marinelli A, Ratner D, Lutman A A, et al. High-intensity double-pulse X-ray free-electron laser. *Nat Commun*, 2015, 6: 1–6
- 132 Lutman A A, Coffee R, Ding Y, et al. Experimental demonstration of femtosecond two-color X-ray free-electron lasers. *Phys Rev Lett*, 2013, 110: 1–5
- 133 Gorgisyan I, Ischebeck R, Erny C, et al. THz streak camera method for synchronous arrival time measurement of two-color hard X-ray FEL pulses. *Opt Express*, 2017, 25: 2080
- 134 Jahnke T, Guillemin R, Inhester L, et al. Inner-shell-ionization-induced femtosecond structural dynamics of water molecules imaged at an X-ray free-electron laser. *Phys Rev X*, 2021, 11: 041044
- 135 Graves W S, Chen J P J, Fromme P, et al. ASU compact XFEL. In: Proceedings of the 38th International Free-Electron Laser Conference. Santa Fe: JACoW, 2017. 225–228
- 136 Rosenzweig J B, Majernik N, Robles R R, et al. An ultra-compact X-ray free-electron laser. *New J Phys*, 2020, 22: 093067, arXiv: [2003.06083](https://arxiv.org/abs/2003.06083)
- 137 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: 443–449
- 138 Martiel I, Müller-Werkmeister H M, Cohen A E. Strategies for sample delivery for femtosecond crystallography. *Acta Crystlogr D Struct Biol*, 2019, 75: 160–177
- 139 Zhao F Z, Zhang B, Yan E K, et al. A guide to sample delivery systems for serial crystallography. *FEBS J*, 2019, 286: 4402–4417

X-ray free-electron lasers and their applications in ultrafast structural dynamics research

LIU XinWei¹, LIU HaiGuang^{2*} & ZHANG WenKai^{1*}

¹ *Department of Physics and Applied Optics Beijing Area Major Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;*

² *Complex Systems Division, Beijing Computational Science Research Center, Beijing 100193, China*

Advanced experimental methods with high spatial-temporal resolutions are essential for ultrafast dynamics at microscopic scales, primarily focusing on the movements of individual electrons or nuclei. The rapid development of X-ray free-electron lasers (XFELs) has created a new foundation for ultrafast dynamics research by offering fully coherent ultrabright femtosecond X-ray pulses. The cutting-edge technology developed around the XFELs has enabled revolutionary breakthroughs in multiple disciplines in the past decade. X-ray emission/absorption spectroscopy, X-ray scattering, and X-ray crystallography have quickly adapted to the XFEL facilities, investigating high-resolution structure and dynamics. In this review, the principles of the above three characterization techniques are summarized with the associated applications. Together with effective pumping methods triggering dynamics or reactions, time-resolved information can be measured at XFELs using the “pump-probe” approach. The development of the XFEL-based time-resolved methods is particularly significant for light-sensitive macromolecules. Novel insights into the structural dynamics are being gathered for a comprehensive understanding of the detailed process and its underlying molecular mechanism.

X-ray free electron laser, ultrafast dynamics, pump-probe, time-resolved technique

PACS: 41.60.Cr, 87.15.ht, 87.64.Gb, 61.05.C-

doi: [10.1360/SSPMA-2022-0047](https://doi.org/10.1360/SSPMA-2022-0047)