

# 蛋白质分子的溶液三维结构测定

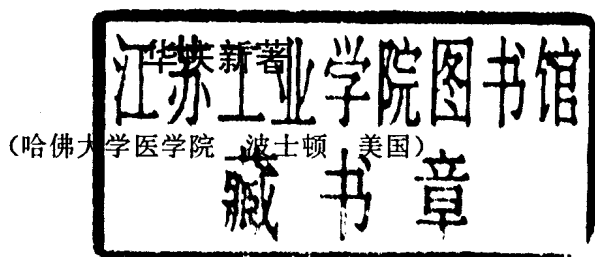
## ——多维核磁共振方法



华庆新 著  
湖南师范大学出版社

# 蛋白质分子的溶液三维结构测定

——多维核磁共振方法



湖南师范大学出版社

【湘】新登字 011 号

蛋白质分子的溶液三维结构测定  
——多维核磁共振方法

华庆新 著

责任编辑 冯冠鹏

湖南师范大学出版社出版发行

(长沙市岳麓山)

湖南省新华书店经销 湖南大学印刷厂印刷

850×1168 32开 5印张 126千字

1995年3月第1版 1995年3月第1次印刷

印数：1—1000册

ISBN7-81031-408-4/Q·009

定价：6.80元

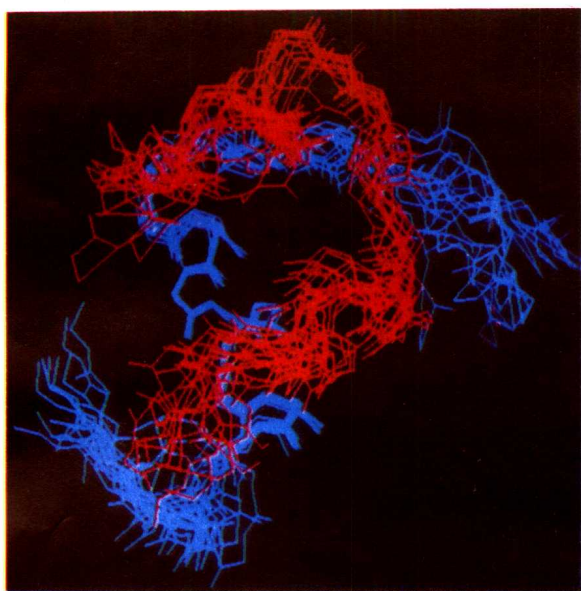


图 1(C)

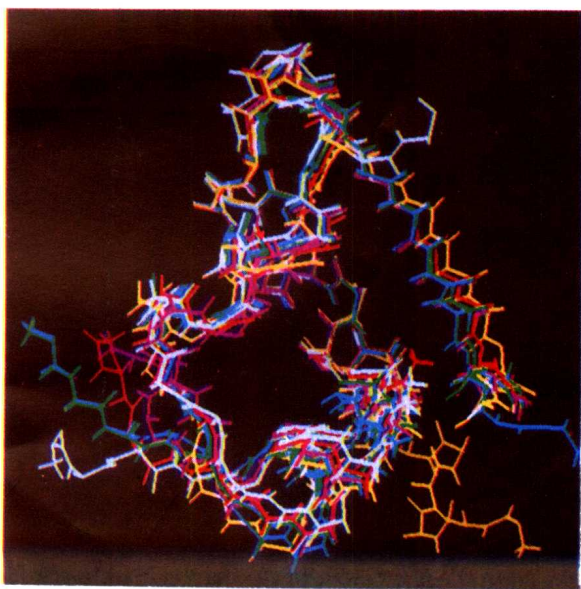


图 1(D)

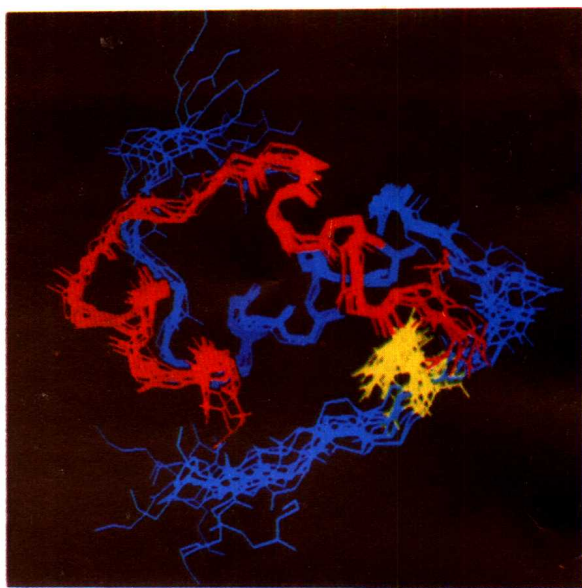


图 27(C)

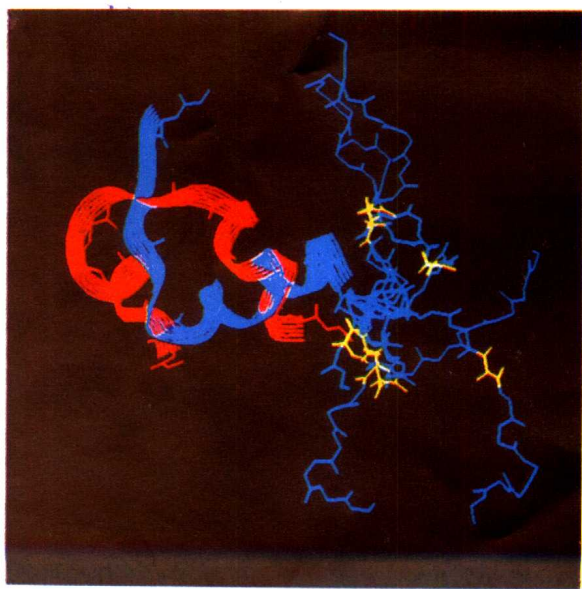


图 27(D)

## 内容提要

在近 10 年来,同核和异核多维核磁共振已成为在溶液中测定 300 个残基以下的蛋白质结构的有效方法,精度相当于  $2\sim 2.5\text{\AA}$  分辨率的晶体结构。核磁共振测定可在接近生理条件的溶液中完成,因而不受蛋白质能否结晶的影响。目前,多维核磁共振已成为与 X-射线晶体学相互补充、不可或缺的重要方法。

本书介绍了核磁共振方法:如从核磁共振的基本原理、特性参数,  $^1\text{H}$  一维、二维、三维谱,异核 ( $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ ) 二维、三维、四维谱,直到如何用核磁共振数据及计算机程序构建蛋白质溶液三维结构模型,最后讨论了目前多维核磁共振的应用局限,及在蛋白质 — 蛋白质、蛋白质 — 核酸相互作用、蛋白质折叠研究、药物设计等方面的应用前景。

## 前 言

多维核磁共振技术(NMR)是过去十年中迅速崛起的测定蛋白质、核酸等生物大分子溶液三维结构的最重要方法。由于它可在接近生理条件的溶液中测定,已成为与 X-射线晶体学相互补充、不可或缺的手段。对研究蛋白质折叠、蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸相互作用,以至对药物设计、蛋白质设计都有重大影响。

本书简要介绍了核磁原理, $^1\text{H}$  一维、二维、三维谱, $^{13}\text{C}$  或  $^{15}\text{N}$  异核二维、三维、四维谱,以及如何由核磁数据构建蛋白质溶液三维结构模型,介绍了直至 1993 年底发表的某些核磁新技术,是为广大生物学工作者、研究生提供的一本入门参考书。

作者感谢 K. Wüthrich 以及 M. A. Weiss 教授的帮助。

作者衷心感谢所有关心、支持、帮助我的朋友。

华庆新

1994. 11 于芝加哥

# 目 录

|                                             |      |
|---------------------------------------------|------|
| 序 言.....                                    | (1)  |
| 第一章 常规 $^1\text{H}$ 一维谱:核磁共振原理与参数 .....     | (5)  |
| 第一节 核磁共振(NMR)现象 .....                       | (5)  |
| 第二节 NMR 的七个主要特性参数 .....                     | (8)  |
| 第三节 脉冲傅里叶变换与谱仪概述 .....                      | (22) |
| 第二章 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 同核二维谱 ..... | (29) |
| 第一节 二维相关谱(或化学位移相关谱 COSY) .....              | (29) |
| 第二节 接力相干转移谱(RCT)及全相关谱<br>(TOCSY).....       | (36) |
| 第三节 核欧佛豪斯二维谱(NOESY).....                    | (40) |
| 第四节 ROESY:旋转坐标系中的 NOESY 谱 .....             | (43) |
| 第五节 共振峰识别:沿主肽链作序列共振峰识别.....                 | (44) |
| 第三章 由核磁数据构建蛋白质溶液三维结构模型 .....                | (52) |
| 第一节 蛋白质有序二级结构的核磁共振分析 .....                  | (52) |
| 第二节 立体专一共振峰识别 .....                         | (54) |
| 第三节 距离几何计算(DG):建立三级结构粗模型 ..                 | (58) |
| 第四节 制约分子动力学计算(RMD):结构精化 .....               | (65) |
| 第四章 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 同核三维谱 ..... | (67) |
| 第一节 同核三维谱简述·NOESY-TOCSY 3D 谱 ..             | (67) |
| 第二节 TOCSY-NOESY 3D 谱 .....                  | (71) |
| 第三节 NOESY-NOESY 3D 谱 .....                  | (74) |
| 第五章 异核二维谱 .....                             | (76) |
| 第一节 异核谱简介 .....                             | (76) |
| 第二节 HMQC 及其相关的异核二维谱 .....                   | (77) |
| 第三节 异核编辑二维谱(又称异核滤波二维谱) .....                | (85) |

|                                                                      |       |
|----------------------------------------------------------------------|-------|
| 第六章 异核三维谱 .....                                                      | (89)  |
| 第一节 异核三维谱概述 .....                                                    | (89)  |
| 第二节 双共振异核三维谱 .....                                                   | (93)  |
| 第三节 三共振异核三维谱 .....                                                   | (105) |
| 第四节 以异核二维及三维谱测定耦合常数 .....                                            | (116) |
| 第七章 异核四维谱 .....                                                      | (121) |
| 第一节 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 编辑 NOESY 四维谱 .....                 | (122) |
| 第二节 $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 编辑 NOESY 四维谱 .....                 | (123) |
| 第三节 脉冲梯度场技术及其改进的 $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 编辑<br>NOESY 四维谱 ..... | (125) |
| 第四节 用作谱峰识别的异核四维谱 .....                                               | (129) |
| 结语 以 NMR 测定蛋白质溶液结构的发展前景 .....                                        | (135) |

## 序 言

1991年诺贝尔化学奖经过反复审议,最终授予了瑞士联邦理工学院(ETH)的 R. Ernst 教授,以表彰他在核磁共振(NMR)技术发展上的卓越贡献<sup>[1,2]</sup>。人们记得,早在1952年由于发现核磁共振现象,诺贝尔奖已授予 E. M. Purcell 和 F. Bloch。一般说,诺贝尔奖很少授予实验技术的发现和改进,而同一实验技术竟然两次获诺贝尔奖,就更属罕见。R. Ernst 对核磁共振技术发展有两方面突出贡献。首先,在60年代他引入了脉冲傅里叶技术,代替了以往的连续波测定,为 NMR 在此后30年的一系列重大发展奠定了基础。随后,他又于70年代中期发展出二维核磁共振方法,给 NMR 在化学、生物、医学、药理学及生物高技术研究带来了革命性变革。由于他与 ETH 另一教授 K. Wüthrich 的合作,核磁共振方法已用于测定蛋白质、核酸等生物大分子的溶液三级结构,给出每个原子的确切坐标位置。此后,三维、四维核磁共振,同核及异核核磁技术的发展也日新月异。到1992年中,以多维核磁方法已解析出上百个蛋白质的溶液三维结构,其中分子量最大的为157个氨基酸残基<sup>[3]</sup>。以多维核磁方法可测定蛋白质分子的折叠及与抑制剂、配体、受体结合的状况;以脉冲标记法结合核磁测定,还可测定蛋白质折叠过程中的瞬时中间物。此外,NMR 还可测定蛋白质—核酸相互作用以及在生物膜上的蛋白质与磷脂的相互作用。由于多维 NMR 技术可测定生物大分子结构,使蛋白质结构—功能—运动的研究深入到分子水平。加上蛋白质工程技术的发展,使人们定向设计高效、低毒的药物分子的梦想成为现实。

说到生物分子结构测定,人们当然会想到 X-晶体衍射分析。作为一种新兴的技术,NMR 方法解析蛋白质溶液结构,其精度目前最高可达到 1.5 Å 分辨率。为了比较分析这两种方法解析出的

蛋白质结构的异同,有两家实验室相约同时以 X-衍射法及 NMR 法分别测定同一蛋白质  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂(Tendamistat)的晶体及溶液结构。解析过程中,互不通气。在分别解出其结构后作仔细的分析比较<sup>[4]</sup>,发现二者总体看来极其相似,特别是蛋白质分子内部;而其主要不同点在于分子表面。单个晶体分子结构的高精度,并不代表蛋白质分子表面的运动性(Mobility)。正如不同晶型的胰岛素晶体结构,虽有大体相仿的主链结构,其侧链排布在分子表面区段,特别是伸展肽段和环圈区段(Loop)有所不同<sup>[5]</sup>。有些晶体结构之间的区别,与一组 NMR 溶液结构中所见差别相仿或者更大些。以 Tendamistat 为例,在 69 个残基区段结构所得的方均根差对 X-方法为 1.05 Å,而 NMR 法则为 0.85 Å。事实上蛋白质表面活性区应更具运动性,在蛋白质分子识别时结合区段的结构应更柔韧可变。而核磁共振能检测并将其运动性特征化,正是它突出的优点之一。笔者以 NMR 法测定了去五肽胰岛素(DPI)的溶液结构,并与中国科学院生物物理研究所梁栋材教授所测 1.5 Å 分辨率的晶体分子作了比较<sup>[6,7]</sup>。结果表明,NMR 所测 DPI 的溶液结构总体而言,与晶体结构一致。A 链有两段  $\alpha$ -螺旋,B 链中段有较长的一段  $\alpha$ -螺旋,随后接着是一段  $\beta$  回折,使 DPI 的 B 链 C 端折回,而靠近 B 链中段区域形成疏水核心部分,如图 1 所示。其不同点在于,NMR 所测结构中,虽仍保有这三段螺旋,但每段螺旋都可当作刚体,在溶液中有位移;其相对位置也不像单个 DPI 晶体结构那样确定;且 B 链 N 端肽段伸展于溶液中摆动。由此,我们推论 DPI 在溶液中可能为部分折叠的融球模型(Molten-globule)。稍后,我们又以六种不同的生物物理方法:激光照射的光化学动力学核偏振(Photo-CIDNP)、差热扫描(DSC)、圆二色谱(CD)、<sup>1</sup>H 化学位移、酰胺质子峰在重水中的慢交换实验以及荧光标记方法,测定 DPI 的溶液结构,结果证实了融球模型的假设<sup>[8]</sup>。总体说来,迄今以 NMR 方法测得的蛋白质分子溶液结构,很少发

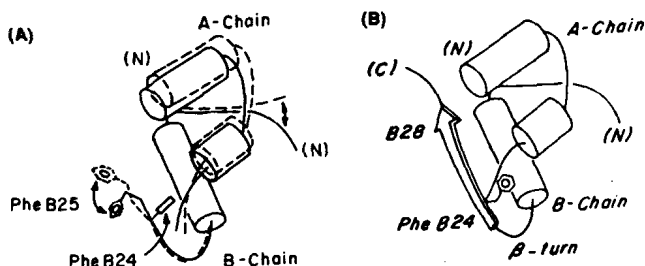


图1 (A)DPI 晶体结构(实线)与 NMR 所测溶液结构(虚线)模型(圆柱代表  $\alpha$ -螺旋)。(B)以 NMR 测定的天然胰岛素溶液结构模型(条带箭头代表  $\beta$ -折叠)。(C)一组(14 个)DPI 的 NMR 溶液结构, A 链为红色, B 链为蓝色, 只显示主链结构。按 B 链中段螺旋(B9-B19)的主链原子位置作最小二乘叠合。(D)一组不同晶型的胰岛素晶体结构, 亦只显示主链结构。其中, 二锌胰岛素分子 I 为绿色, 分子 II 为蓝色; 四锌胰岛素分子 I 为红色, 分子 II 为黄色; 去五肽胰岛素分子为白色; 立方胰岛素分子呈紫色。六个分子结构亦按 B9-B19 的主链位置作最小二乘叠合。(C、D 见彩页)

现与晶体结构有很大差异, 而所发现的差异亦都有其一定生物学意义。而正由于 NMR 可测定不同溶液条件(pH、温度、离子强度、缓冲液、不同有机溶剂等)的分子溶液结构, 可加入不同配基, 可比较天然与变性分子结构, 比较野生型与突变体分子结构, 可测定难以结晶的蛋白质分子, 特别是它能测定分子不同部位的动力学行为等优点, 因而它已成为与 X-衍射法互为补充、不可或缺的重要技术。

目前常用 500 兆赫(MHz)或 600 兆赫的 NMR 谱仪, 二者分辨率不相上下, 但 600 兆赫仪信噪比增加不少。现在市场上亦开始有 750 兆赫 NMR 谱仪, 灵敏度与分辨率都有很大提高。三共振探头、脉冲梯度场探头、大容量及微量探头的设计与使用, 使异核三维、四维谱测定, 使低浓度蛋白测定及无畸变水峰抑制成为现实。

作为相对年轻的技术,NMR 还将有日新月异的发展。

本书将以生物学工作者为对象,介绍如何以多维核磁共振方法测定、解析蛋白质分子的溶液三维结构。拟从一维核磁共振方法开始,逐一介绍 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  同核二维谱,同核三维谱,异核二维、三维、四维谱的解析方法,以及构建蛋白质分子三维结构的距离几何(DG)、分子动力学精化处理方法(RMD)。

核磁成像技术(NMR-image 或 NMR-CT),是核磁共振应用研究的另一大分枝。它与 X-射线断层扫描技术一样,可无损伤地观察人、动物的整体器官内部结构,在医学研究中极其重要。本书不拟涉及。

# 第一章 常规 $^1\text{H}$ 一维谱:核磁共振原理与参数

## 第一节 核磁共振现象

凡核磁矩不为零的原子核,在外加静磁场中发生能级裂分,共振吸收另一特定频率的射频电磁场能量的现象,即为核磁共振。

以最简单的氢核( $^1\text{H}$ )为例,其自旋  $I=1/2$ ,在静磁场  $H_0$  中,

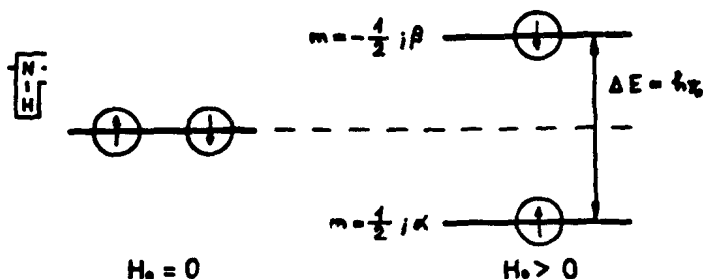


图2 能级裂分图。左为未加外磁场;右为加静磁场  $H_0$  后的核磁矩能级裂分。

可有顺磁场和逆磁场两种取向。如图2所示。顺磁场的 $^1\text{H}$ 核居较低能态,逆磁场的 $^1\text{H}$ 核居较高能态。二者能级差

$$\Delta E = \gamma \hbar H_0$$

其中,  $\gamma$  为回磁比,即旋磁比。  $\hbar = h/2\pi$ ,  $h$  为普朗克常数。上式也可写为拉莫尔进动圆频率  $\omega = \gamma H_0$ 。

根据量子力学的选择定则,只有当  $\Delta M = 0, \pm 1$  时,粒子才会发生跃迁( $M$  为磁量子数,  $M = I, I-1, \dots, -I$ )。当外加一与静

磁场  $H_0$  垂直的射频电磁场  $H_1$ , 使其频率满足  $h\nu = \gamma h H_0$  时, 低能态核吸收外加射频场能量而跃迁至高能态。在早期连续波实验中, 可固定  $H_0$ , 改变  $\nu$  (扫频法); 也可固定  $\nu$ , 改变  $H_0$  (扫场法) 来满足共振条件。各原子核  $\gamma$  值不同, 就有不同的共振条件。对于质子,  $\nu = 4.26 \times 10^3 H_0$ , 当外磁场在  $10^4 \sim 10^5$  高斯范围时, 电磁波频率为几十至几百兆赫, 处于无线电射频波段, 故核磁共振波谱学又称射频波谱学。对一台 500 兆赫的谱仪而言, 其超导磁体场强为 11.7 Tesla (即  $11.7 \times 10^4$  高斯)。500 兆赫是指  $^1\text{H}$  的共振频率; 若换用  $^{13}\text{C}$  探头, 则射频频率为 125.7 兆赫; 若用  $^{15}\text{N}$  探头, 则为 50 兆赫。

在不同能态上的粒子数分布遵循玻尔兹曼分布规律, 即  $N_1/N_2 = e^{-\Delta E/KT}$  ( $K$  为玻尔兹曼常数,  $T$  为绝对温度,  $N_1$ 、 $N_2$  分别为在高、低能级的粒子数)。在常温下, 对质子而言,  $N_1/N_2$  在  $10^{-5}$  数量级。当发生核磁共振时, 电磁场能量被核系统部分吸收而减小, 高低能态粒子数之差改变。粒子由低能级跃迁至高能级后, 通过弛豫机制 (自旋—晶格弛豫和自旋—自旋弛豫) 放出能量, 又回到低能态。由此不断吸收射频场能量, 才有持续的核磁共振信号。若射频场太强, 弛豫饱和, 则观察不到核磁吸收信号。

生物体中的  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^{31}\text{P}$  等元素, 其核自旋量子数不为零, 都可有核磁共振信号。表 1 列出生物学测定常见核磁参数。

表 1 某些同位素核的性质

| Isotope<br>$I=1/2$ | $\gamma \times 10^{-7}$<br>(rad $T^{-1}S^{-1}$ ) | $\nu$ at 11.74T <sup>a</sup><br>(MHz) | Natural<br>Abundance (%) | Sensitivity          |                      |
|--------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
|                    |                                                  |                                       |                          | Rel. <sup>a</sup>    | Abs. <sup>b</sup>    |
| $^1\text{H}$       | 26.75                                            | 500.0                                 | 99.98                    | 1.00                 | 1.00                 |
| $^{13}\text{C}$    | 6.73                                             | 125.7                                 | 1.11                     | $1.6 \times 10^{-2}$ | $1.8 \times 10^{-4}$ |
| $^{15}\text{N}$    | -2.71                                            | 50.7                                  | 0.37                     | $1.0 \times 10^{-3}$ | $3.8 \times 10^{-6}$ |
| $^{31}\text{P}$    | 10.83                                            | 202.4                                 | 100                      | $6.6 \times 10^{-2}$ | $6.6 \times 10^{-2}$ |

a. 等量核的相对灵敏度。

b. 绝对灵敏度, 即相对灵敏度与天然丰度的乘积。

(11.74T 的磁场, 对应于 500 兆赫的谱仪)

在分子生物学中,NMR 主要是用 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{31}\text{P}$  谱,其中 $^1\text{H}$  谱发展最早。由于氢核在生物分子中广泛存在,质子又占氢同位素的 99.98%,加之氢核灵敏度最高,所以 $^1\text{H}$  谱应用最广。其缺点是生物分子的天然溶剂是水,水的质子峰常掩盖观察峰,因此发展了许多特殊技术来抑制水峰。另外,生物分子中含氢的基团很多,易使谱线重叠而难以解析,在测蛋白质、核酸等生物大分子时更是如此。这几年新发展的多维 NMR 及异核 NMR 技术,可克服谱线重叠的问题。氢的另一同位素氘( $^2\text{H}$ ),核磁灵敏度低,在测 $^1\text{H}$  谱时观察不到。

碳与氢同是生物体内极重要的元素。但普通的 $^{12}\text{C}$ ,核自旋为零,只有 $^{13}\text{C}$  才有核磁信号,而 $^{13}\text{C}$  只占生物体内全部碳的 1.1%,其相对灵敏度为 1.6%。因此,天然丰度的 $^{13}\text{C}$  谱,比同一样品的 $^1\text{H}$  谱信噪比低很多。但其优点是化学位移拓展宽,可达 200ppm,约为 $^1\text{H}$  谱的 20 倍。其谱线尖,分辨好。由于特定 $^{13}\text{C}$  标记或分子全标记技术,也由于可以间接法测定与 $^{13}\text{C}$  单键键合质子的技术发展,异核 ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) 二维、三维、四维谱已被广泛用于生物大分子结构测定。

$^{15}\text{N}$  核的天然丰度仅为 0.37%,相对灵敏度低。但氨基酸残基的酰胺质子 $^1\text{H}_\text{N}$ ,在蛋白质的 NMR 图谱解析中至关重要。其化学位移宽达 90ppm,分辨亦较好。在以蛋白工程法生产的蛋白质分子,可加入 $^{15}\text{N}$  全标记的氨基酸,让大肠杆菌工作,得到 $^{15}\text{N}$  全标记的酰胺基;或可只加入一种、几种 $^{15}\text{N}$  标记的氨基酸,而生长出只有这一种或几种 $^{15}\text{N}$  标记氨基酸的蛋白质。目前,异核 ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) 二维、三维、四维谱也已被广泛应用。

$^{31}\text{P}$  的灵敏度相对于 $^1\text{H}$  谱是 6%。生物分子中,核酸、磷脂和重要的核苷酸分子如 ATP、CAMP 等都含磷。以 $^{31}\text{P}$  谱研究这些分子的结构和功能,都可得到大量信息; $^{31}\text{P}$  还可用来作观察分子环境变化的探针。在膜蛋白的研究中,在观察动物或人体活细胞、活

组织、活器官时,常采用 $^{31}\text{P}$ 谱。近年来,在蛋白质-核酸研究中,也常用( $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ )异核二维、三维谱。

## 第二节 NMR 的七个主要特性参数

### 一、化学位移 $\sigma$

如前所述,若所测分子的所有  $^1\text{H}$  都在同一共振频率产生吸收信号,则此分子只有一个质子峰。但所幸同一分子的不同氢原子处于不同的化学环境,也即处于不完全相同的电磁微环境中,因此在各有差异的频率给出共振峰。共振峰按频率的展开,则成为常规的核磁共振一维谱。而谱峰的不同频率位置,也就是各谱峰的化学位移。

实际上,按照楞次定律,原子核周围的电子,在外加恒定静磁场时,由于感应作用将产生一个对抗外磁场的附加磁场,从而使此核实际所受到的磁场小于外加磁场。这就是磁屏蔽效应,如图 3(A)所示。此外,每一原子核周围都各有不同的原子核存在,也就有不同的磁的微环境。图 3(B)、(C)表示核 2 相对于核 1 有不同的位置,其实受磁场大小,亦受核 1 与核 2 之间距离及它们相对于静磁场的方位的影响。因此,每一核实受局部磁场,既受其自身的对抗磁场影响,又受周围磁环境亦即化学环境的影响。NMR 之所以能测定分子结构,亦源出于此。一般说,无规卷曲的蛋白给出 NMR 谱峰重叠严重,而具有有序二级结构的蛋白质的一维谱有较好色散,即谱峰在频率轴上展开较宽,重叠较少。一般蛋白质  $^1\text{H}$  谱谱峰,都在  $0\sim 10\text{ppm}$  范围,个别的会扩展到  $-1\text{ppm}$  或者  $11\text{ppm}$ 。

化学位移一般取相对值表征,即  $\delta = \frac{H_{\text{实测}} - H_{\text{标准}}}{H_{\text{标准}}} \times 10^6$ 。其单位为 ppm,即  $10^{-6}$ 。图 4 为缬氨酸 Val 的  $^1\text{H}$  谱化学位移和谱线积分。