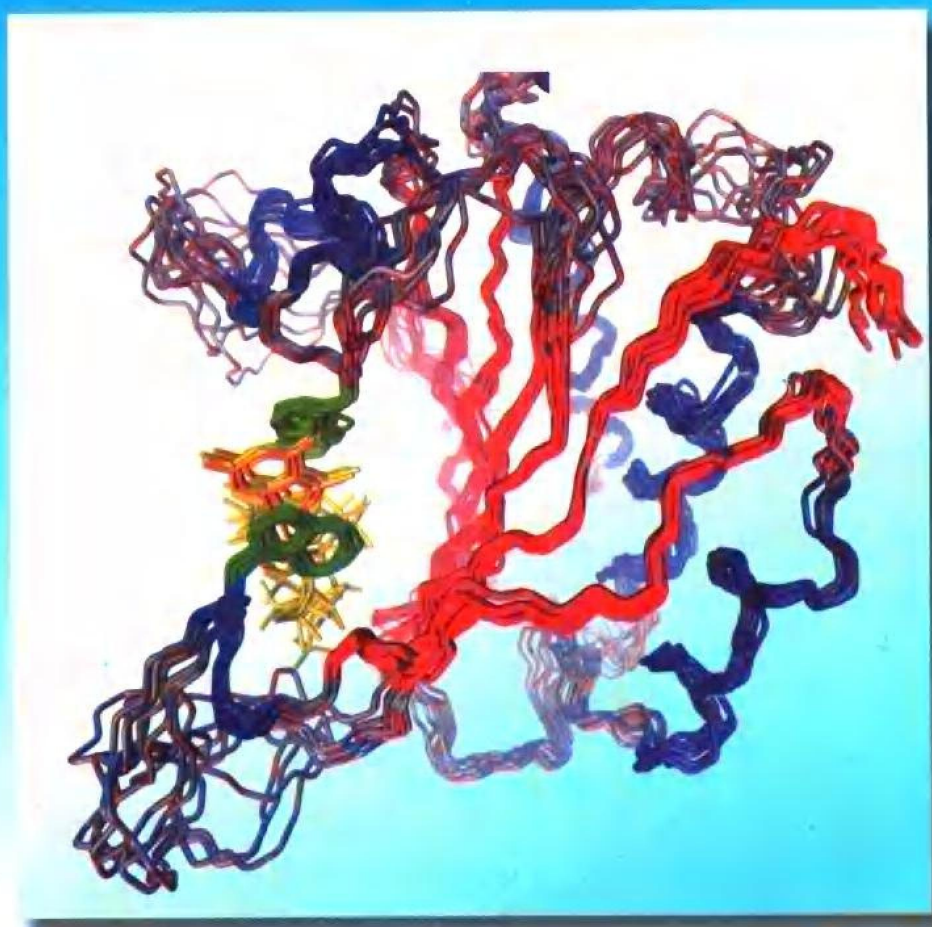


生物大分子

多维核磁共振

夏佑林 吴季辉 刘琴 施蕴渝 编著



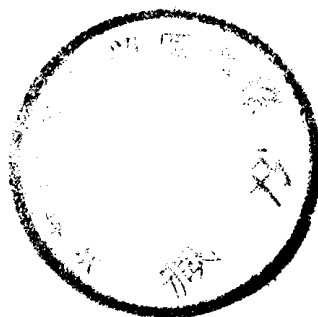
中国科学技术大学出版社

Q77
X2

V8/27/25

生物大分子多维核磁共振

夏佑林 吴季辉 刘 琴 施蕴渝 编著



中国科学技术大学出版社



A0293138

内 容 提 要

核磁共振波谱学是研究分子结构及其相互作用的有力工具。本书介绍多维核磁共振波谱学基本原理及其在结构生物学中的应用。

全书分十三章。内容包括核磁共振基本理论、一维多脉冲实验、二维 NMR 基本原理、蛋白质结构测定、蛋白质的稳定同位素标记、三维四维 NMR 波谱、蛋白质折叠、酶反应机理研究、核酸和糖的结构测定、各种选择性实验、膜和膜蛋白的固态 NMR 结构研究及核磁共振成像。在讲述核磁共振基本原理的同时,介绍了多维核磁共振波谱学在生物学特别是结构生物学中的应用。

本书可作为研究生的教材和大专院校高年级学生及教师的教学参考书,也可供从事核磁共振波谱研究的化学、物理、生物、医学等方面的科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物大分子多维核磁共振/夏佑林等编著. —合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999.6
ISBN 7-312-01028-8

I. 生... II. 夏... III. 核磁共振谱法-应用-生物结构, 大分子-研究 IV. Q71-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第00446号

中国科学技术大学出版社出版发行
(安徽省合肥市金寨路96号, 邮编: 230026)
中国科学技术大学印刷厂印刷
全国新华书店经销

开本: 787 × 1092/16 印张: 23.5 字数: 557千

1999年6月第一版 1999年6月第一次印刷

印数: 1—2000册

ISBN 7-312-01028-8/Q · 23 定价: 35.00元

前 言

结构生物学是以生物大分子的结构、动力学及其与功能的关系为基础来阐明生命现象的科学。在自然科学自身发展和新兴产业发展两种驱动力的交互作用下，结构生物学已成为生命科学研究的前沿领域和热点，它与细胞生物学、神经生物学、免疫学、遗传学、发育生物学等学科密切相关。

如果说生物大分子空间结构的测定已经有了40年的历史，那么今天的结构生物学已经完全超越了单纯的空间结构测定本身，瞄准了生物大分子的功能，瞄准了那些与功能紧密联系在一起的生物大分子复合物的结构，如酶与底物、激素与受体、DNA与其结合蛋白，以及更为复杂的大分子组装体，如细胞骨架的微管系统、细菌鞭毛、核小体、核糖体、细胞表面受体等。

结构生物学作为近年来兴起的一门新兴学科，是一门交叉性极强的学科，它的发展既是生命科学中生物化学、分子生物学、分子生物物理学等学科发展的必然结果，又与数学、物理学、化学、计算机科学有着极为密切的关系。结构生物学既是基础理论研究，又有很强的应用前景，它是新兴生物产业和生物高技术应用研究，如蛋白质工程、药物分子设计、新型疫苗和抗体设计等的重要基础。

核磁共振波谱学是结构生物学研究的重要手段之一。近二十年来核磁共振波谱技术得到飞速的发展。核磁共振技术上的许多重要进展都与结构生物学密切相关。

本教材是在中国科学技术大学生命科学学院二十多年来，在教学和科研的基础上，并参考了国内外有关论著编写出来的，适合于研究生、本科生的学习，也可供有关专业人员参考。由于时间匆忙，难免有错误和不完善之处，有待进一步改进。

本书参考的主要书目有：J.N.S. Evans. *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford university press, 1995; J.C.K.Roberts. *NMR of Macromolecules*. Oxford university press, 1993; Wuthrich Kurt. *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley, New York. 1986; R.R. Ernst., G.Bodenhausen, A. Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*, 1987; 裘祖文, 裴奉奎. *核磁共振波谱*. 科学出版社, 1989年; 华庆新. *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, 1995年。在此我们对这些作者表示衷心地感谢。

编者

1998年4月

缩略词及单位换算表

这里给出本书常用的一些符号所代表的意义及常用单位ppm等的换算

NMR nuclear magnetic resonance	核磁共振
rf或RF radio frequency	射频
NOE	核Overhauser增强或核Overhauser效应
TOE	截断了的NOE, 类似于瞬态NOE
2D NMR	二维核磁共振
3D NMR	三维核磁共振
COSY2D	相关谱
DQF-COSY	双量子滤波COSY
Relay	接力相关谱
TOCSY	全相关谱
NOESY	二维NOE谱
HMQC	异核多量子相关谱
HSQC	异核单量子相关谱
ppm	化学位移单位, 为百万分之一, 即 10^{-6}
G或Gs(高斯)	磁感应强度, $1\text{Gs} \cong 10^{-4}\text{T}$ (特[斯拉])

目 录

前言.....	(i)
缩略词及单位换算表.....	(x)
第一章 引 言.....	(1)
第二章 NMR基本理论	(5)
2.1 NMR基础.....	(5)
一、NMR现象	(5)
二、矢量模型.....	(7)
三、积算符.....	(9)
四、弛 豫.....	(11)
五、自旋回波.....	(12)
六、NOE	(14)
七、偶极耦合.....	(16)
八、化学位移.....	(17)
九、自旋耦合.....	(18)
2.2 固体高分辨技术.....	(20)
一、核自旋相互作用.....	(20)
二、魔角旋转(MAS).....	(25)
三、强功率质子去耦.....	(28)
四、交叉极化(CP).....	(29)
2.3 动力学.....	(31)
一、NMR的时间尺度	(31)
二、慢交换和快交换.....	(32)
三、速率常数测量.....	(33)
四、饱和转移.....	(35)
五、2D交换谱.....	(35)
2.4 NMR弛豫的Model-Free 方法	(36)
一、偶极弛豫.....	(36)
二、Model-Free方法.....	(37)
第三章 一维多脉冲实验.....	(39)
3.1 PFT-NMR的量子力学处理.....	(39)
一、磁矩的进动及旋转坐标系.....	(39)

二、单脉冲响应的密度算符处理.....	(40)
三、自旋裂分的量子力学算符处理.....	(41)
3.2 J 调制自旋回波	(42)
3.3 INEPT实验.....	(45)
一、简单的INEPT实验	(45)
二、重聚INEPT实验	(47)
三、INEPT ⁺	(49)
3.4 DEPT实验	(49)
第四章 二维NMR基本原理	(52)
4.1 引 言	(52)
4.2 2D NMR的FT及线型	(55)
一、2D NMR的FT	(55)
二、获得纯吸收信号的途径.....	(56)
4.3 二维 J 谱	(59)
一、异核2D- J 谱.....	(59)
二、同核二维 J 谱.....	(65)
4.4 异核化学位移相关谱	(66)
一、单量子异核位移相关谱.....	(66)
二、宽带同核去耦的异核位移相关谱.....	(69)
三、异核多量子相干实验(HMQC).....	(71)
四、异核编辑二维谱.....	(72)
4.5 同核化学位移相关谱	(77)
一、相敏COSY	(77)
二、幅度COSY	(82)
三、DQF-COSY	(85)
四、同核Relay相关谱	(87)
五、TOCSY	(89)
六、NOESY	(93)
七、ROESY	(97)
八、同核相关谱谱形总结及实验设置.....	(99)
4.6 相干转移路径的选择及应用	(101)
一、相干转移路径的选择.....	(101)
二、2D NMR实验中的相位循环.....	(104)
4.7 二维谱中的假峰(Artifacts)	(107)
一、 t_1 噪声的来源.....	(107)
二、2D- J 谱中的幻影或鬼峰(Phantom or Ghost).....	(108)
三、DQF-COSY的假峰.....	(110)
四、幅度COSY中的假峰.....	(113)

五、ROESY中的假峰	(115)
第五章 蛋白质结构测定	(118)
5.1 残基自旋系统的识别	(120)
5.2 通过 ^1H - ^1H 欧沃豪斯效应的顺序识别.....	(126)
5.3 确定二级结构单元.....	(129)
5.4 化学位移与二级结构单元的关系	(133)
一、二级结构位移.....	(134)
二、化学位移标志(CSI)和二级结构单元的快速识别方法.....	(136)
5.5 分子动力学模拟(三级结构的测定).....	(138)
一、距离几何计算(DG).....	(140)
二、结构优化.....	(142)
5.6 牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI)的低分辨率结构.....	(146)
第六章 蛋白质的稳定同位素标记	(151)
6.1 蛋白质标记的应用	(153)
6.2 标记方式.....	(153)
6.3 标记方法.....	(155)
一、 ^{15}N 和/或 ^{13}C 同位素标记.. ..	(155)
二、同位素 ^2H 或 ^3H 标记(氘代或质子化).....	(156)
第七章 三维四维NMR波谱及其应用	(160)
7.1 多维NMR的基本原理.....	(161)
一、多维NMR的扩展及关系.	(161)
二、3D和4D实验的实验方面的考虑.....	(162)
7.2 同核3D谱.....	(165)
一、3D NOESY-TOCSY实验.....	(166)
二、3D TOCSY-NOESY	(179)
三、3D NOESY-NOESY实验.....	(181)
7.3 异核3D谱	(184)
一、异核3D NMR波谱的自旋系统识别.....	(184)
二、利用NOE的顺序识别	(193)
三、通过分解较好的单键和双键 J 耦合的序列识别.....	(195)
四、别的一些有用的异核3D实验.....	(198)
7.4 异核4D谱	(201)
一、4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 编辑的NOESY实验.	(202)
二、4D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 编辑的NOESY实验.....	(204)
7.5 白细胞介素1 β (IL-1 β)的高分辨率结构.....	(208)
第八章 蛋白质的折叠	(210)
8.1 热去折叠	(210)

8.2	氢交换.....	(211)
8.3	去折叠态的结构和动力学特征.....	(213)
8.4	折叠中间物的氢交换标记——pH竞争法.....	(215)
8.5	折叠中间物的氢交换标记——pH脉冲法.....	(216)
8.6	蛋白质折叠的NMR研究实例.....	(218)
8.7	展望.....	(220)
第九章	酶反应机理研究.....	(221)
9.1	适于NMR研究的酶的类型.....	(221)
9.2	酶复合物的共振峰线宽.....	(222)
9.3	酶-抑制剂复合物..	(223)
9.4	酶-底物/中间体复合物的直接观测..	(223)
	一、低温酶学.....	(223)
	二、时间分辨固体NMR.....	(224)
9.5	转移NOE.....	(225)
9.6	酶反应的立体化学.....	(227)
	一、用 ^{18}O 作同位素标记.....	(228)
	二、用 ^{17}O 作同位素标记.....	(229)
	三、用 ^2H 作同位素标记.....	(229)
9.7	活体中的酶.....	(232)
	一、代谢途径的研究——生物合成MRN.....	(232)
	二、代谢流量测定和活体酶动力学.....	(234)
9.8	酶的NMR研究实例.....	(237)
	一、 α -蛋白水解酶.....	(237)
	二、糜蛋白酶和胰蛋白酶.....	(239)
	三、木瓜蛋白酶.....	(244)
	四、丙酮酸激酶.....	(245)
	五、碱性磷酸酯酶.....	(246)
	六、核糖核酸酶.....	(248)
	七、磷酸丙糖异构酶.....	(249)
第十章	核酸和糖的结构测定.....	(252)
10.1	寡聚核苷酸的结构.....	(253)
	一、质子自旋系统的识别.....	(253)
	二、通过 ^1H - ^{31}P 耦合关系进行核糖质子和磷原子的顺序识别.....	(255)
	三、碱基质子的顺序识别.....	(255)
	四、耦合常数.....	(260)
	五、亚胺质子交换速率.....	(262)
	六、核酸的同位素标记.....	(262)

七、DNA的固态NMR.....	(263)
八、2D NMR测定核酸的三级结构.....	(265)
10.2 DNA结构实例..	(266)
10.3 药物-DNA相互作用	(267)
10.4 蛋白质-DNA相互作用.....	(268)
10.5 RNA结构实例..	(270)
10.6 糖的结构研究.....	(272)
一、谱峰识别.....	(272)
二、识别实例.....	(274)
三、约束条件的建立.....	(277)
四、与分子运动相关的NMR参数	(278)
五、从NMR数据到分子模型.....	(279)
第十一章 各种选择性实验.....	(280)
11.1 选择性脉冲傅里叶变换实验.....	(280)
一、预饱和水峰抑制.....	(281)
二、WEFT和SUPERWEFT..	(282)
三、2-1-4脉冲.....	(284)
四、二项式系数脉冲序列.....	(285)
五、WATERGATE.....	(285)
六、选择性激发.....	(286)
11.2 使用软脉冲的一维实验.....	(292)
一、1D COSY.....	(292)
二、1D Relay	(293)
三、1D TOCSY.....	(293)
四、1D NOESY	(294)
五、1D ROESY.....	(294)
11.3 脉冲场梯度增强的1D选择性实验.....	(295)
一、PFG 1D选择性COSY和选择性Relay.....	(295)
二、PFG 1D选择性ROESY和选择性NOESY..	(297)
三、PFG 1D选择性的TOCSY实验..	(300)
四、PFG 1D选择性HMQC和HMQC-TOCSY.....	(301)
11.4 半选择性的3D谱.....	(303)
一、PFG脉冲梯度场选择的准3D实验.....	(303)
二、半选择性3D NOESY-TOCSY实验	(305)
三、半选择性的3D TOCSY-NOESY实验.....	(307)
第十二章 膜和膜蛋白的NMR研究..	(308)
12.1 磷脂和糖脂的多核NMR.....	(309)

一、磷脂样品制备.....	(309)
二、磷脂动力学研究.....	(310)
三、糖脂的多核NMR	(312)
12.2 微胞中的蛋白质的NMR结构研究.....	(312)
一、样品制备.....	(312)
二、结构研究.....	(314)
12.3 微胞和双层膜样品的溶液和固态NMR研究.....	(314)
一、多维溶液NMR研究..	(314)
二、固态NMR研究	(315)
三、外壳蛋白的膜结合形式模型.....	(316)
12.4 膜蛋白的结构.....	(316)
一、蛋白质-膜相互作用对脂双层的影响	(317)
二、短杆菌肽 A.....	(318)
三、在脂双层中的螺旋多肽.....	(320)
四、Magainin抗菌肽(antibioti cpeptides)	(320)
五、血型糖蛋白(glycophorin)A的跨膜区..	(321)
六、细菌视紫红质(bacteriorhodopsin).....	(321)
12.5 固态生物大分子的核间距测量.....	(321)
一、偶极-偶极相互作用	(322)
二、同核偶极-偶极耦合的恢复	(323)
三、异核偶极-偶极耦合的恢复	(328)
四、应 用.....	(331)
第十三章 核磁共振成像.....	(337)
13.1 引 言	(337)
13.2 核磁共振成像原理.....	(338)
一、连续点扫描技术(sequential point techniques).....	(338)
二、连续线扫描技术(sequential line techniques).....	(339)
三、连续面扫描技术(sequential plane techniques).....	(340)
13.3 核磁共振成像在医学上的应用.....	(345)
一、弛豫时间增强图像(T_1 weighted image or T_2 weighted image).....	(346)
二、弛豫时间图像(T_1 image or T_2 image).....	(346)
三、血液流动测量(flow measurement).....	(346)
四、化学位移成像(chemical shift imaging).....	(347)
五、多核成像(multinuclear imaging).....	(347)
六、微成像(NMR microscopic imaging).....	(347)
13.4 核磁共振成像的新进展——快速成像和功能成像).....	(347)
一、Instascan method.....	(347)
二、FLASH(fast low angle shot MR)	(348)

三、脑功能成像(functional MRI)	(348)
附 录	(351)
一、NMR研究常用核的物理常数	(351)
二、生物研究中常用核的化学位移范围.....	(352)
三、标量耦合常数的典型范围.....	(353)
四、20种常见氨基酸残基在无规卷曲肽段中的 ^1H 的化学位移.....	(354)
五、20种常见氨基酸残基在无规卷曲肽段中的 ^{13}C 的化学位移	(355)
六、20种常见氨基酸残基在无规卷曲肽段中的 ^{15}N 及氨基 ^1H 的化学位移.....	(356)
七、核磁共振实验中一些常用的溶剂.. ..	(357)
八、密度算符.....	(358)
参考文献	(363)

第一章 引言

核磁共振 (nuclear magnetic resonance, 缩写为NMR), 是指核磁矩不为零的核, 在外磁场的作用下, 核自旋能级发生塞曼分裂 (Zeeman splitting), 共振吸收某一特定频率的射频 (radio frequency, 缩写为rf或RF) 辐射的物理过程。由于塞曼分裂的大小与分子的化学结构有密切的关系, 因而NMR能提供有关化学结构及分子动力学的信息, 成为分子结构解析的一个有力工具。

NMR 从发现到发展, 直到今天的广泛应用, 不过五十余年的历史, 却有着非常惊人的成就, 已经获得两次诺贝尔奖, 而且还在不断的发展中。尤其是现在用多核、多维核磁共振方法来确定生物大分子的三维空间构象更为引人注目。

核磁共振波谱学技术用于生物学问题开始于这个方法出现之后的十年。1954年Jacobson, Anderson和Amol企图通过观察水中质子信号的增宽及面积减小, 测量DNA的水化, 尽管以后的研究证明这种测量的结果并不能清楚地说明DNA的水化, 但是他们的报告还是引起了人们的兴趣, 开始把核磁共振作为生物学研究的一个工具。1956年Jardetzky和Wetz将 ^{23}Na 共振的四极矩增宽用于研究在含有螯合剂、蛋白质、红血细胞的溶液中离子的结合。在这同一年Bdeblad, Bhar及Lindstrom企图测量人红血细胞中水的交换速度。第一个核磁共振波谱技术成功地直接观察到生物高分子

的是Saunders, Wishnia及Kirkwood, 他们于1957年报道了40MHz的核糖核酸酶 ^1H NMR谱, 如图1.1所示。与图1.1相对照, 图1.2给出了在现代的NMR谱仪上测得的溶菌酶的750MHz ^1H 谱, 它可提供非常丰富的信息。也是在1957年Davidson和Gold首先指出顺磁离子和高分子的结合可以通过它们对水分子的弛豫时间的影响而加以研究。酶反应的立体化学可以在产物的核磁共振谱上得到反映这点首先由Farrar, Gutowsky, Albarty和Miller发现。1959年Cohn报道了第一个ADP和ATP的 ^{31}P 谱, 并指出 Mg^{2+} 主要是结合在 α 和 β 磷上, 而不是在 γ 磷上。随着1964年第一台超导磁场核磁共振谱仪投入商品生产, 以及近年来二维核磁共振波谱技术的发展, 使得核磁共振波谱技术在生物学中得到了越来越广泛的应用。到1969年为止, 讨论核磁共振在生物学中的应用的文

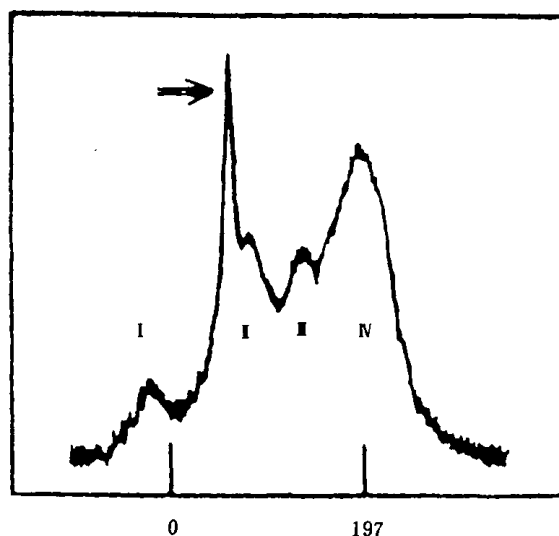


图 1.1 核糖核酸酶的第一张 40MHz ^1H NMR 谱

这个数就接近6000篇。生物体中几乎所有组分，包括氨基酸，核苷，糖，寡聚肽，多肽，寡聚核苷酸，多核苷酸，蛋白质，tRNA，mRNA，DNA，磷脂和多糖都得到研究。从中可以得到如下信息：生物高分子在溶液中的构象及构象变化，同源结构的比较，晶体结构和溶液结构的比较，分子相互作用的细节，反应速率和交换速率。还可用来研究分子动力学，包括分子内的基团运动，以及生物膜的流动性。核磁共振也可用来研究细胞和活组织。

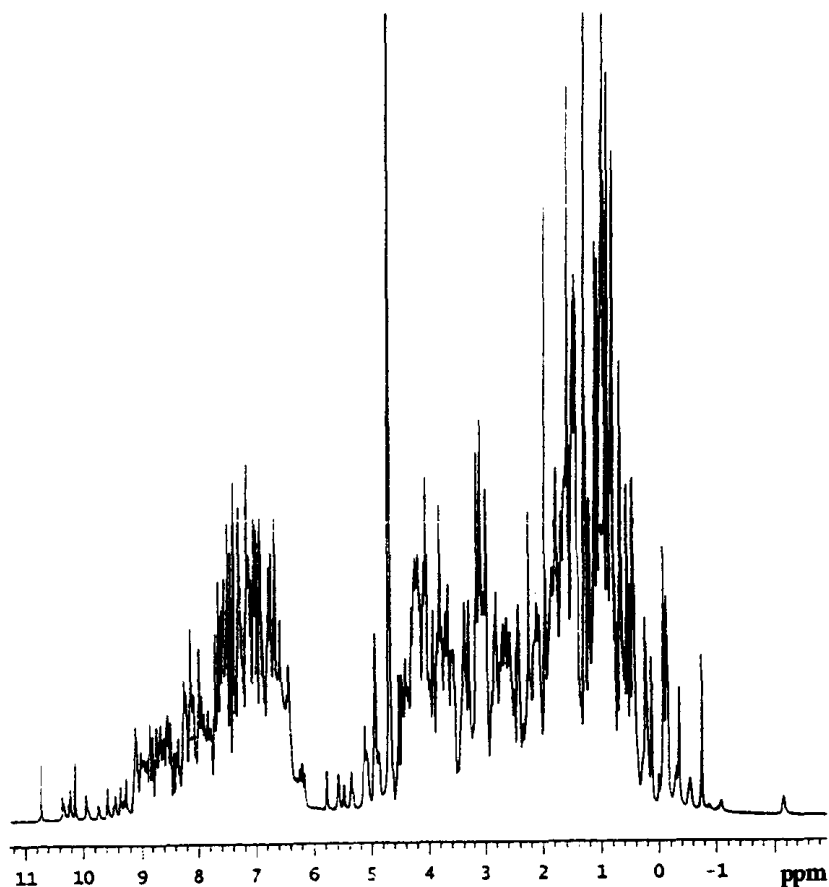


图 1.2 溶菌酶的 750MHz ^1H NMR 谱

多维NMR方法研究蛋白质的溶液构象的工作开始于80年代初。在1982年，发表在 *Journal of Molecular Biology* 155卷上的连续四篇文章(Wuthrich *et al.*, 1982; Billeter *et al.*, 1982; Wagner *et al.*, 1982; Wider *et al.*, 1982)确立了同核二维NMR谱研究蛋白质的溶液构象的标准方法。由此一系列分子量小于1万的蛋白质的溶液构象得到了测定，其中经典的例子是 α -淀粉酶抑制剂Tendamistat的构象测定。2D NMR方法得到的Tendamistat的溶液构象和晶体结构总体上极其相似。对于69个残基区段，X-射线晶体衍射法得到的主链原子的均方根偏差(RMSD)为0.105nm，而NMR法为0.085nm。主要的不同在蛋白质的表面，因为相对于晶体结构，溶液中的蛋白质分子的表面活性区域更具有运动性，而NMR能检测

并描述这种运动性，这正是NMR突出的优点之一。

在多年的发展中，2D NMR方法的改进使得对蛋白质的结构测定的精确度大大提高。在确定直到100个残基的蛋白质的结构方面，2D NMR方法可与分辨率为0.20nm~0.25nm的X-射线结构相比拟。然而，对于大于100个残基的蛋白，通常的2D NMR方法不再能成功地应用。近年来，根据 ^{15}N 和 ^{13}C 具有很大化学位移离散和大的 J 耦合常数这一特点，所发展出的 ^{15}N 和 ^{13}C 同位素标记异核多维谱方法已经成为当前的潮流，所能解析的蛋白质的分子量也不断增大。异核3D和4D NMR，能克服由于这些蛋白的大分子量而导致的对2D NMR方法带来的限制。目前3D和4D NMR方法能确定大于150个残基的蛋白质的高分辨率空间结构。

迄今为止，X-射线晶体衍射是阐明生物大分子空间结构最主要的技术，它可以提供在原子分辨率下有关蛋白质和核酸片断空间结构最完整的信息，它为分子生物学的发展作出了重大贡献。但是这一技术也有其固有的局限性：

(1) 要求样品必须是晶体，但并非所有样品都易于结晶，且晶体状态并非生理状态；

(2) 尽管X-射线晶体衍射测到的温度因子可以反应分子柔性，但不能反映生物大分子动态变化的快慢。

多少年来人们一直致力于寻求测定生物大分子溶液构象的方法，红外光谱，紫外光谱，CD，荧光光谱，激光拉曼光谱都可以提供生物大分子溶液构象方面的信息。但是其中任何一种方法所得的结果都不可和X-射线晶体衍射的结果相比拟。多维核磁共振波谱技术的发展提供这方面的可能性。今天将多维NMR和计算机分子动力学模拟方法相结合已有可能不依赖于X-射线晶体衍射独立测定分子量在两万以下的蛋白质和核酸片断在溶液中的三维空间结构，而且用多维NMR方法确定生物大分子的空间构象具有其独特的优点：

(1) 可以不破坏生物高分子的结构(包括空间结构)，在天然状态下对样品进行探测。

NMR是核自旋体系的微弱作用结果，不影响分子的化学结构和性质，没有辐射损伤，因此可以在天然状态下对样品进行测量。

(2) 能够用来研究生物高分子在溶液中的空间结构和功能的关系。

生物高分子发挥生物功能都是在溶液中或界面上，结晶有可能改变生物样品的天然状态。NMR方法不需要样品结晶。因此NMR成为研究溶液状态和膜界面条件下分子的构象和动力学的一种重要方法。

(3) 能够用来研究生物样品中的动态行为。

近年来在蛋白质和核酸等生物高分子中都发现了分子内基团的纳秒量级的运动，这就改变了以往人们认为蛋白质和核酸在结构上是静止的这种观点。这种运动可能有着重要的生物学意义。核磁共振技术可用来对这种运动进行探测，也可用来探测生物膜的流动性。

(4) 和其他研究生物大分子溶液构象的光谱方法相比，核磁共振具有可观察个别基团行为的特点。

用同核及异核多维NMR波谱来确定生物大分子的空间构象的方法，虽然历史较短，却已在生物化学、生物物理、分子生物学、医药学及生物计算技术等多种领域里发挥着巨大作用。随着90年代科学技术突飞猛进的发展，NMR必将有更多更大的改进，为人类作

出它自己的应有的贡献。

当然NMR方法也有其固有的困难:

(1) 核自旋的Zeeman裂分很小, 使得NMR实验灵敏度非常低。为了提高信号灵敏度, 需要的样品量很大, 蛋白质溶液构象测定一般要求样品有毫摩尔量级的浓度。

(2) 分子的运动相关时间 τ_c 随分子量增大而增大, 从而导致谱线增宽, 使谱图分辨困难。同时自旋扩散现象明显, 破坏了NOE强度与距离的对应关系。这给NMR方法的应用施加了一个分子量的上限。

(3) 用异核多维谱解决分辨率的问题, 实验中的多步相关转移又会降低灵敏度。由于 ^{15}N 和 ^{13}C 是稀核, 需要同位素标记, 而生物大分子的标记非常昂贵。

(4) 谱图的识别要手工完成, 耗时且易出错。典型蛋白质样品的谱图中有近千个共振峰, 这一问题尤为突出。

第二章 NMR基本理论

这一章介绍NMR的基本理论。NMR现象的理论处理有经典力学的矢量模型方法，也有量子力学的密度算符方法。矢量模型，对于简单的实验非常有用，但若理解一些复杂的1D多脉冲实验和多维NMR实验就得掌握密度算符方法。在处理耦合体系时，遇到乘积算符(product operator, 简称积算符)。乘积算符在演算时，直接明了，我们必须掌握并能熟练地运用它。本章除了介绍基本理论外，还将介绍固体高分辨技术和自旋动力学。

2.1 NMR基础

一、 NMR现象

NMR产生于核自旋的量子力学特性。具有自旋的核具有自旋角动量，因而具有磁矩。在外磁场的作用下，核自旋具有一定的能量。核自旋 I 可取整数或半整数值，即0, 1/2, 1, 3/2, ..., 如表2.1-1所示。

表2.1-1 核自旋 I 与质量数和原子序数的关系

质量数	原子序数	核自旋 I
奇数	偶数或奇数	(半整数)
偶数	偶数	0
偶数	奇数	1, 2, 3 ... (非零整数)

只有核自旋不为零的核才可产生NMR现象，由于 ^{12}C 或 ^{16}O 的核自旋 $I = 0$ ，因此它们并不产生NMR信号。核磁矩(μ)由下式给出

$$\mu = \gamma \hbar I \quad (2.1-1)$$

旋磁比 γ 是比例常数，在给定的外磁场中它确定核的共振频率。生物NMR感兴趣的核及其物理参数列于附录中。在外磁场中，自旋为 I 的核具有 $2I+1$ 个可能的取向。自旋角动量的取向由磁量子数 m_I 决定，而磁量子数可以有 $2I+1$ 个取值，即 $-I, -I+1, \dots, I-1, I$ (如自旋为3/2的核，其磁量子数 $m_I = 3/2, 1/2, -1/2, -3/2$)，因而自旋角动量有 $2I+1$ 个可能的取向，可以把一个自旋为1/2的核看作一个小磁棒，当它处在外磁场中时具有一定的能量，而且能量的大小随磁场的取向变化。能量是量子化的，对于自旋为1/2的核，其自旋具有两个可能的取值，这对应于 $m_I = \pm 1/2$ ，即对应于小磁棒平行或反平行于外磁场的两种取向。我们将可看到，NMR的吸收是在所加射频(radio frequency, 缩写为rf或RF)场照射下核自旋在两能级间跃迁的结果。

虽然我们知道NMR是核自旋的量子特征，但我们可以按照经典力学来描述核自旋在