



北京大学  
PEKING UNIVERSITY



北京核磁共振中心  
Beijing NMR Center, Peking University

# 生物高分子蛋白质的核磁共振技术表征

李红卫

北京大学北京核磁共振中心

2019-12-11



# 个人简介

- 2011年北京大學北京核磁共振中心博士毕业后留校工作，主要从事生物大分子核磁共振研究方法开发与应用方面工作。

北京大學北京核磁共振中心，由**国家大型仪器中心核磁平台**和**国家重大科技基础设施核磁平台**构成，目前有包括从全国最高场950MHz到常规测试400MHz共10台核磁共振仪。网址：<https://bnmrc.pku.edu.cn/>





## 内容概述

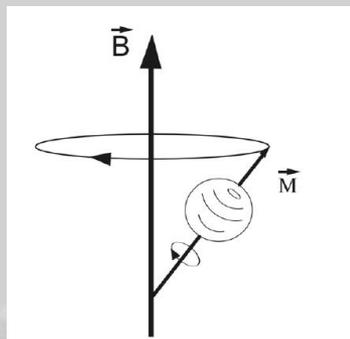
- 核磁共振技术基本原理
- 蛋白质在空间和时间上的核磁共振表征
- 硫氰酸酶分子的表征



基本条件：  
稳定磁场 $B_0$



信号产生：  
原子核进动频率



$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

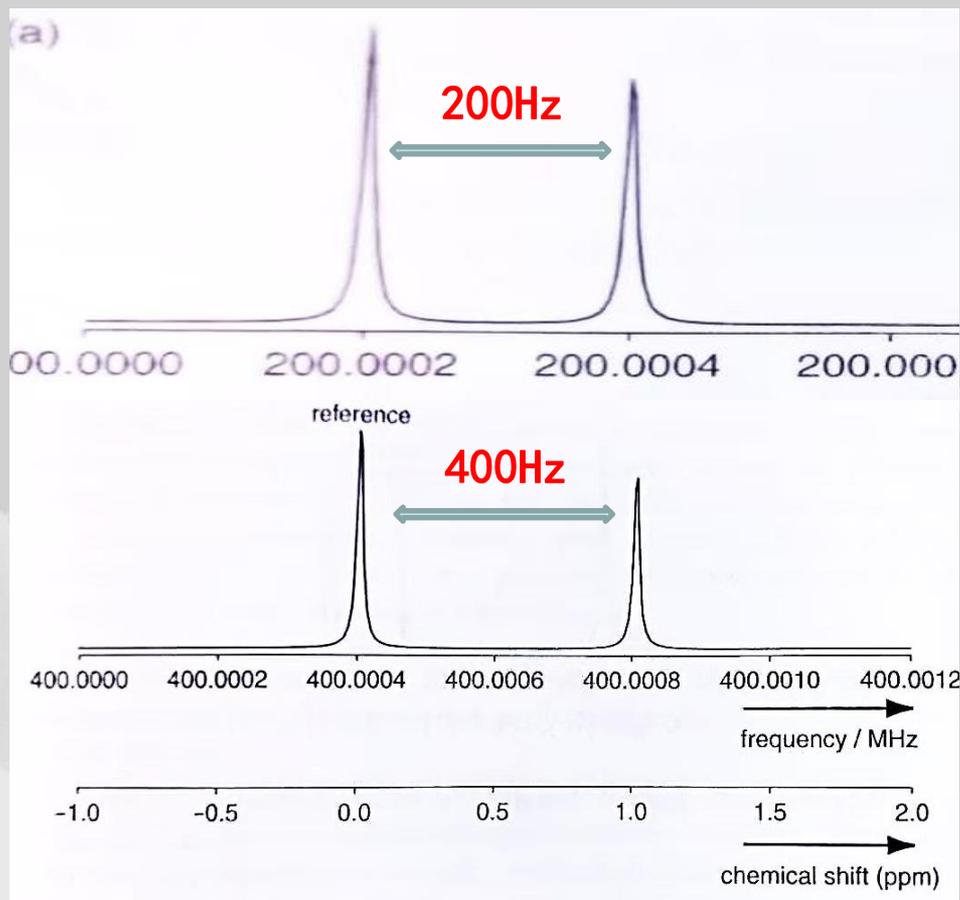
# 核 磁 共 振

检测对象：自旋量子数 $I$ 不为0

自旋量子数 ( $I$ )	示例
半整数 (1/2, 3/2...)	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$
整数 (1, 2, ...)	$^2\text{D}$ , $^{14}\text{N}$

- $\gamma$ : 旋磁比, 与不同原子核的性质相关;
- $\nu$ : 进动频率;
- $B_0$ : 磁场强度;

# 化学位移和分辨率



$$\nu_{real} = \frac{\gamma B_{eff}}{2\pi}$$

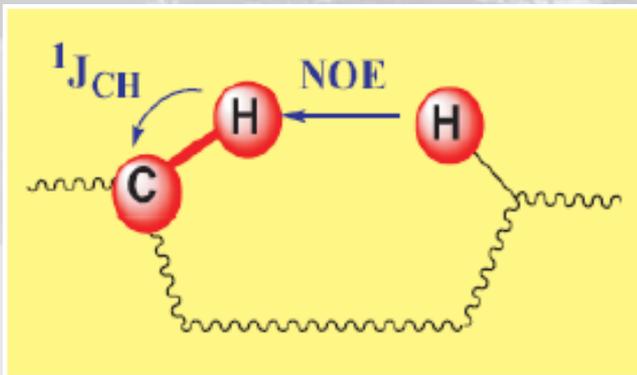
$$\delta(ppm) = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{BF1}} \times 10^6$$

场强越高，分辨率越高，可以有效的通过增加场强提高高分子化合物信号的分辨率



# J耦合和NOE效应

- J耦合：自旋-自旋通过化学键的相互作用  
反映分子中原子通过化学键连接的信息
- NOE效应：空间距离相近的自旋之间的相互作用  
反映了分子中原子空间距离信息



利用J耦合设计实验得到分子的化学位移归属信息；  
利用NOE效应设计实验得到分子的空间结构信息。



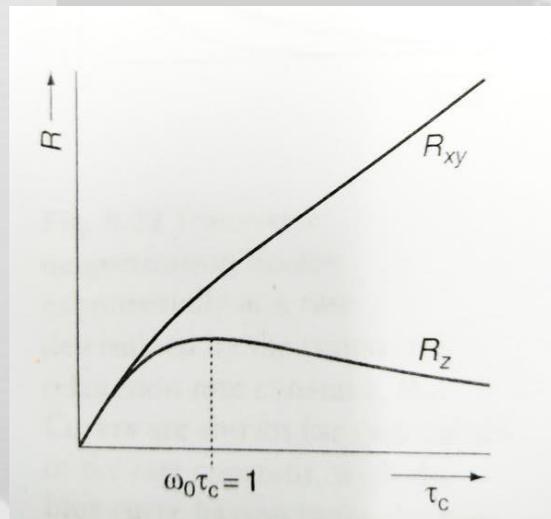
# 纵向弛豫速率与横向弛豫速率

$R_z(R_1)$ : 纵向弛豫速率, 反映自旋与磁场环境的能量交换过程

$R_z$ 大, 纵向信号恢复平衡态越快

$R_{xy}(R_2)$ : 横向弛豫速率, 反映自旋与自旋之间的能量交换过程

$R_{xy}$ 大, 横向信号恢复平衡态越快, 信号衰减快

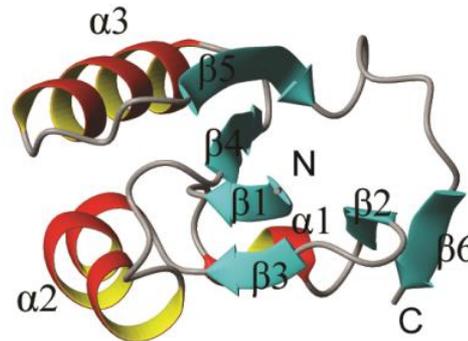
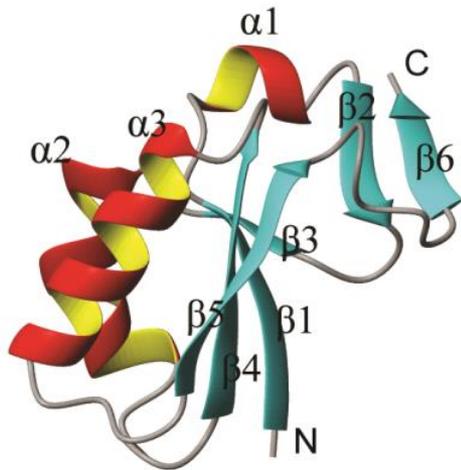
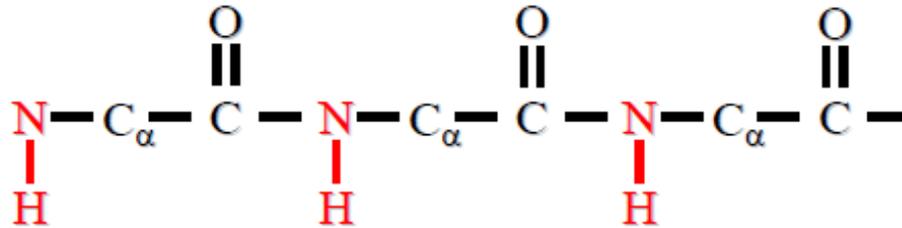


弛豫速率通过  $\tau_c$  与分子运动性质相关联, 从而可以用来测定分子的运动性质

$\omega_0$ : 拉莫尔频率;  $\tau_c$ : 旋转运动相关时间与分子量正相关;

# 蛋白质结构表征

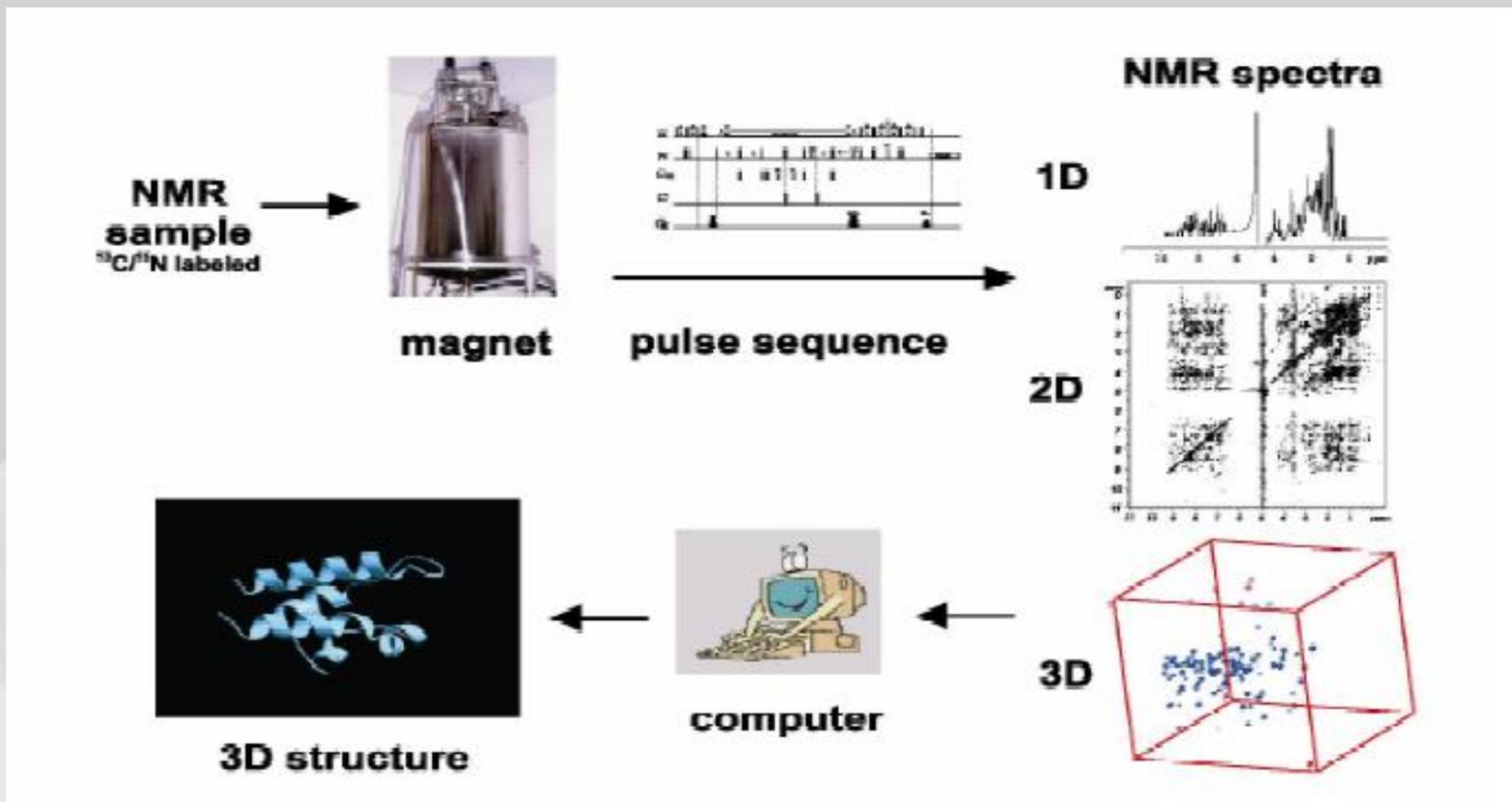
...NNILVV-----C<sub>9</sub>-----V<sub>10</sub>-----G<sub>11</sub>-----NICRSP...



蛋白质高分子  
具有一、二、  
三和四级结构



# 蛋白质结构的核磁共振表征





# 核磁共振样品制备

- 非标记样品
- $^{15}\text{N}$ 标记样品
- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 双标样品
- $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 三标样品
- 特殊氨基酸标记

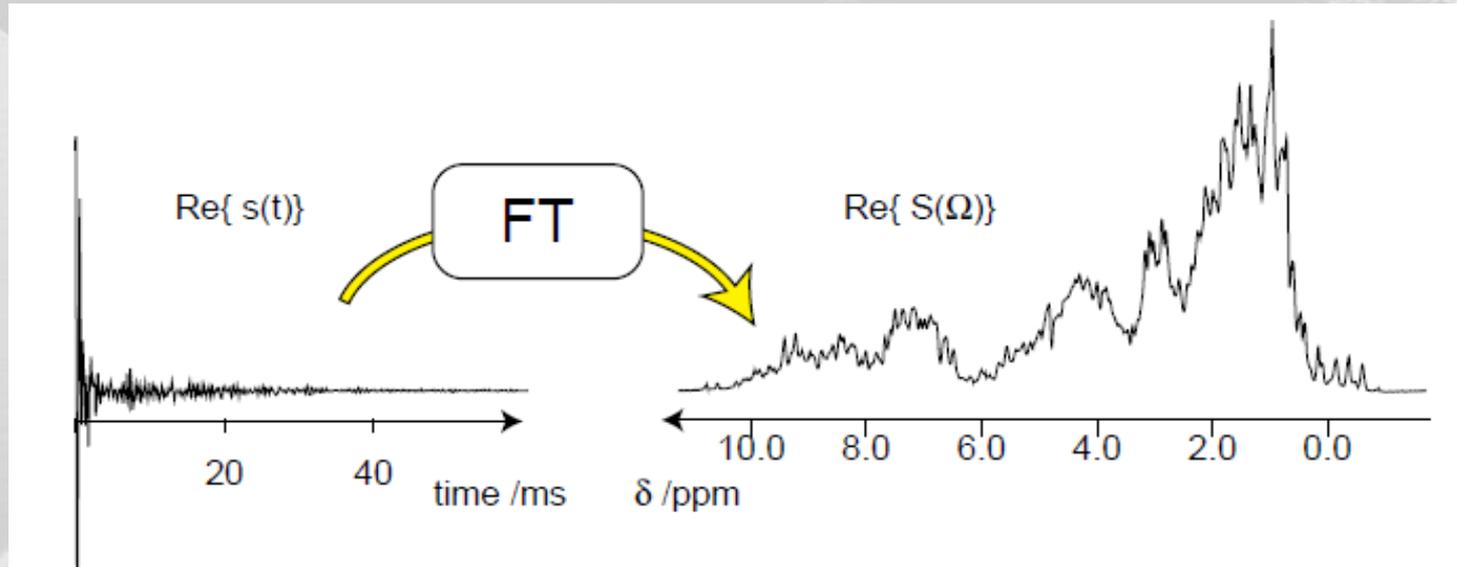


样品浓度 $>0.5\text{mM}$ 缓冲溶液,  $\text{pH}<7.5$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , DSS;  
蛋白酶抑制剂以及其他添加剂



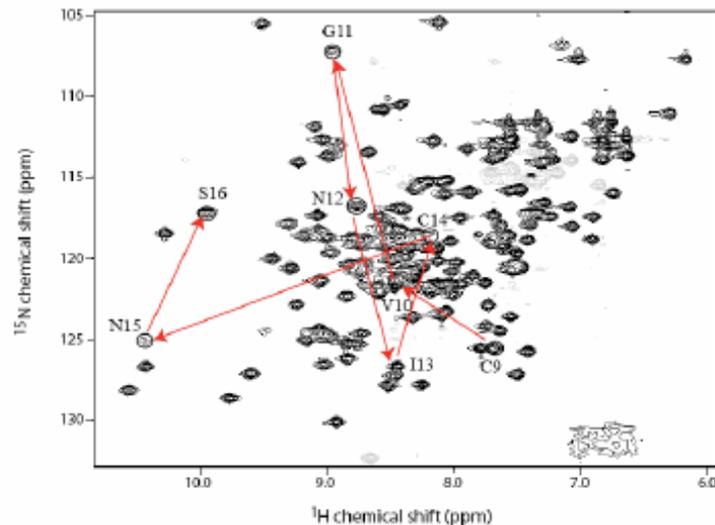
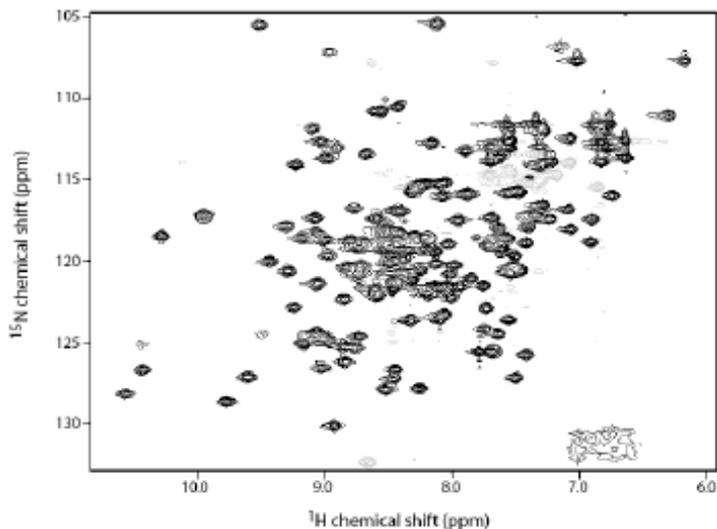
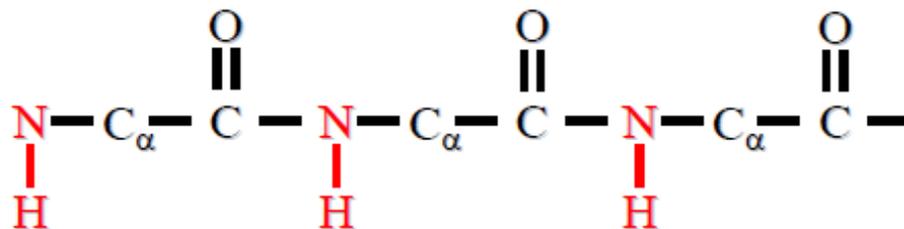
# 数据采集和处理

- 设置实验采集一维、二维、三维甚至四维的核磁共振谱图，并将谱图根据需求进行处理。



# 主链化学位移归属

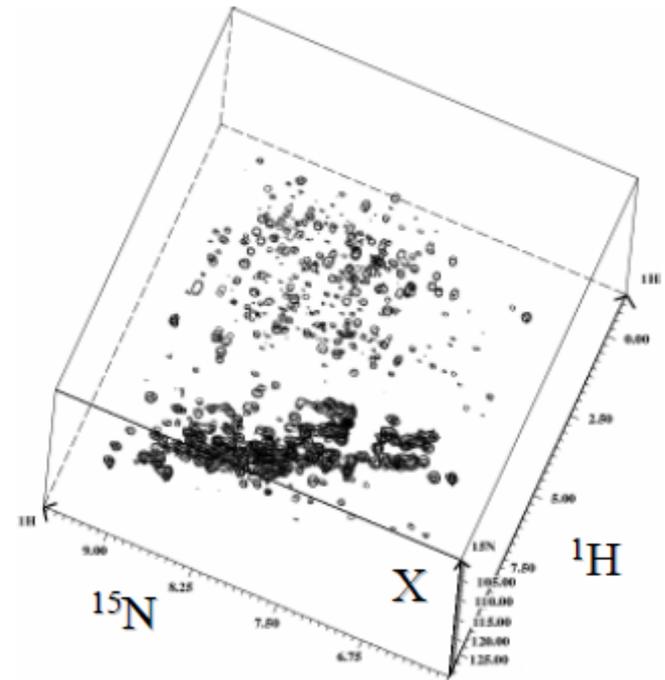
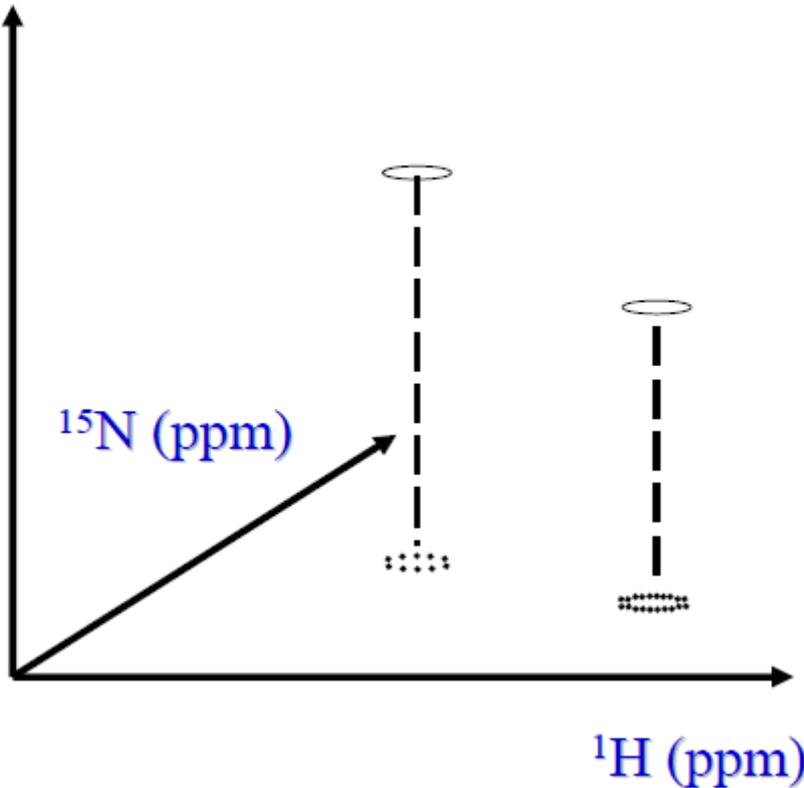
...NNILVV-----C<sub>9</sub>-----V<sub>10</sub>-----G<sub>11</sub>-----NICRSP...





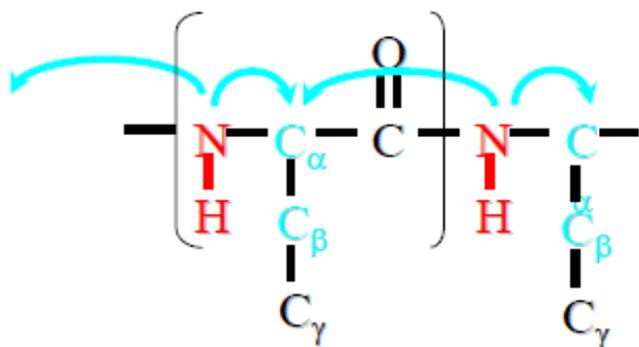
# 三维三共振实验

whatever nucleus X (ppm)

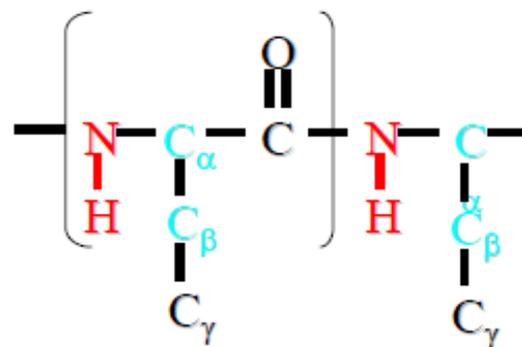




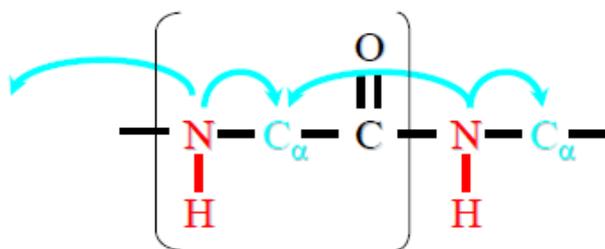
### 3D-HNCACB



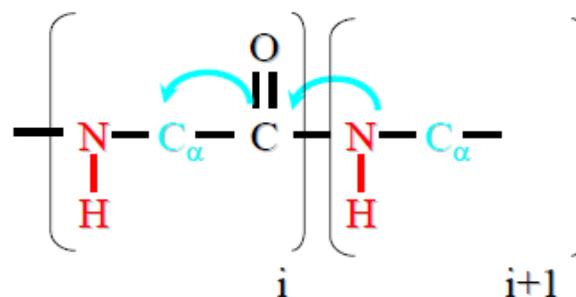
### 3D-CBCA(CO)NH

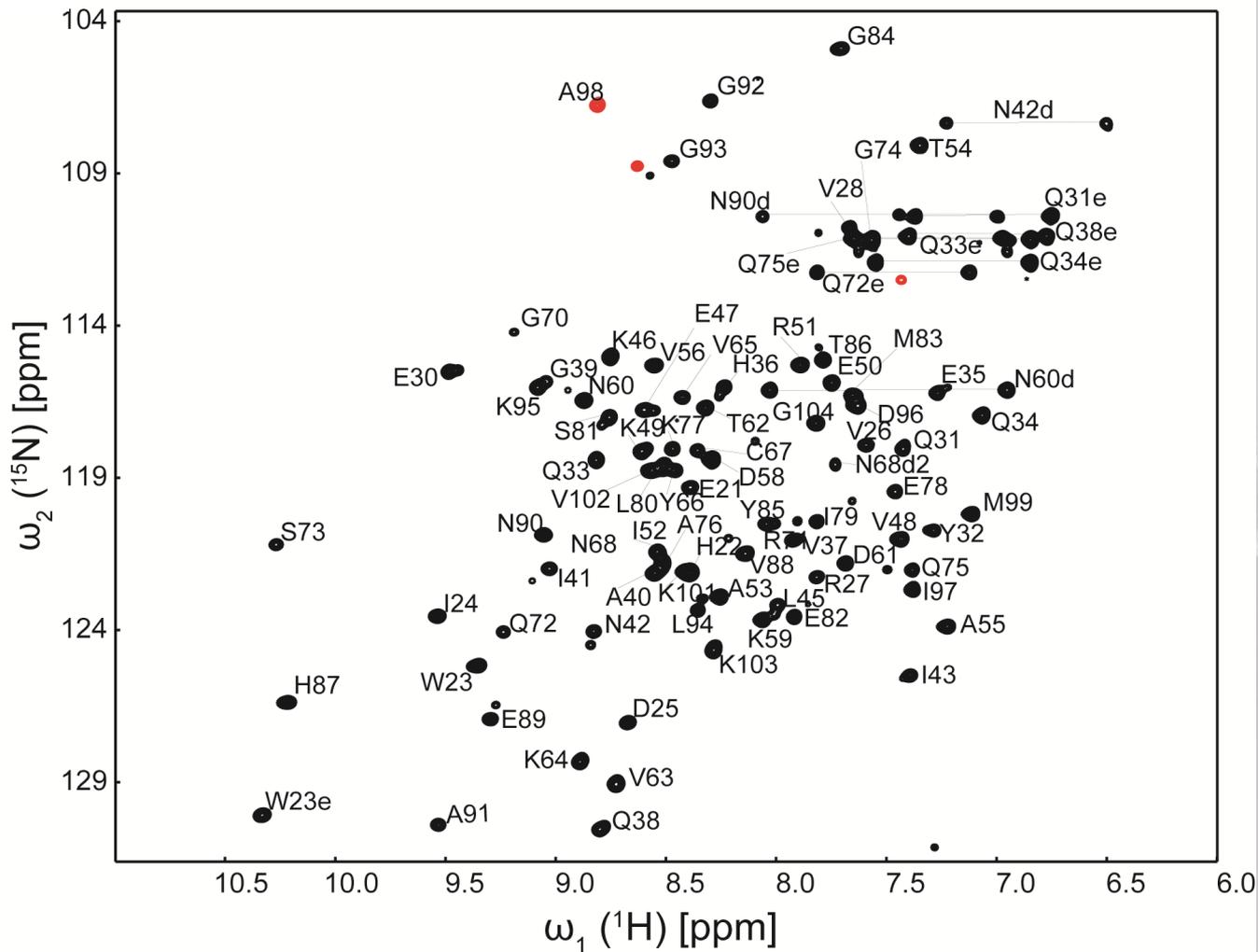


### 3D-HNCA

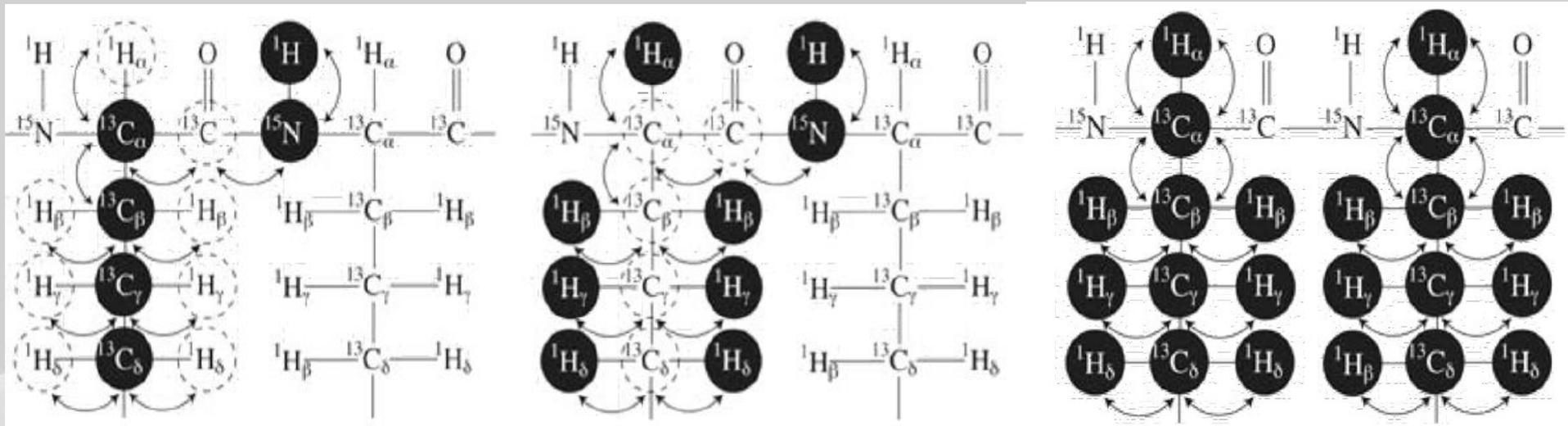


### 3D-HN(CO)CA





# 侧链化学位移归属

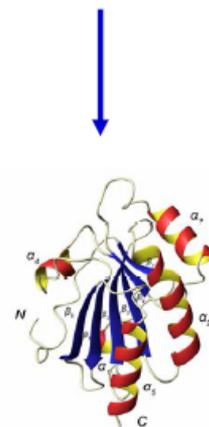
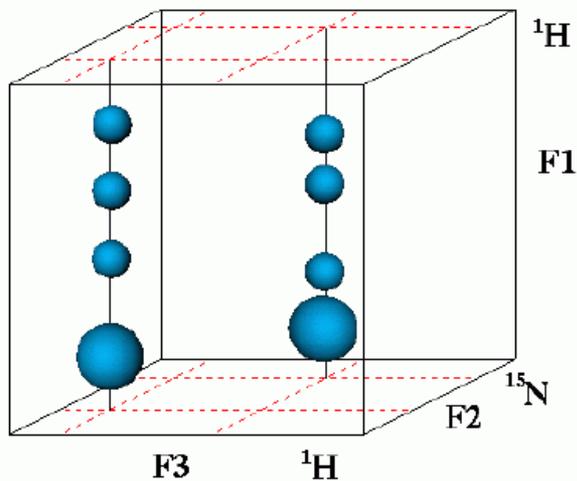
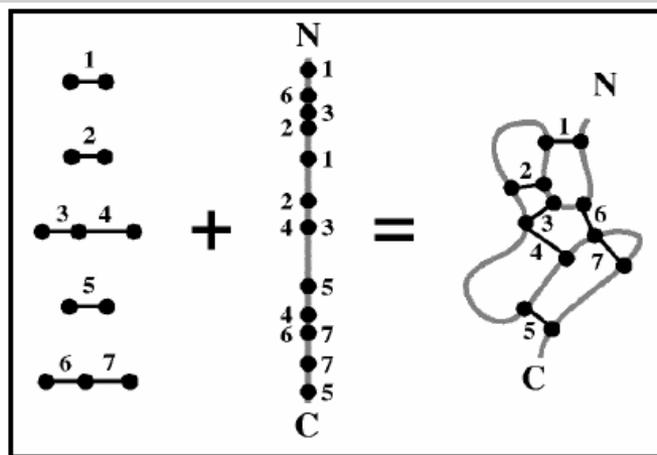
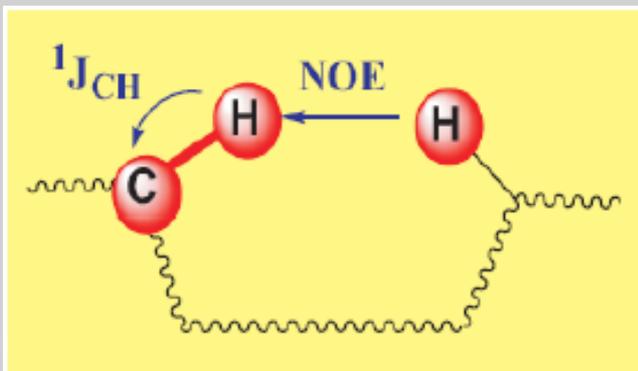


3D-(C)CONH

3D-H(C)CONH

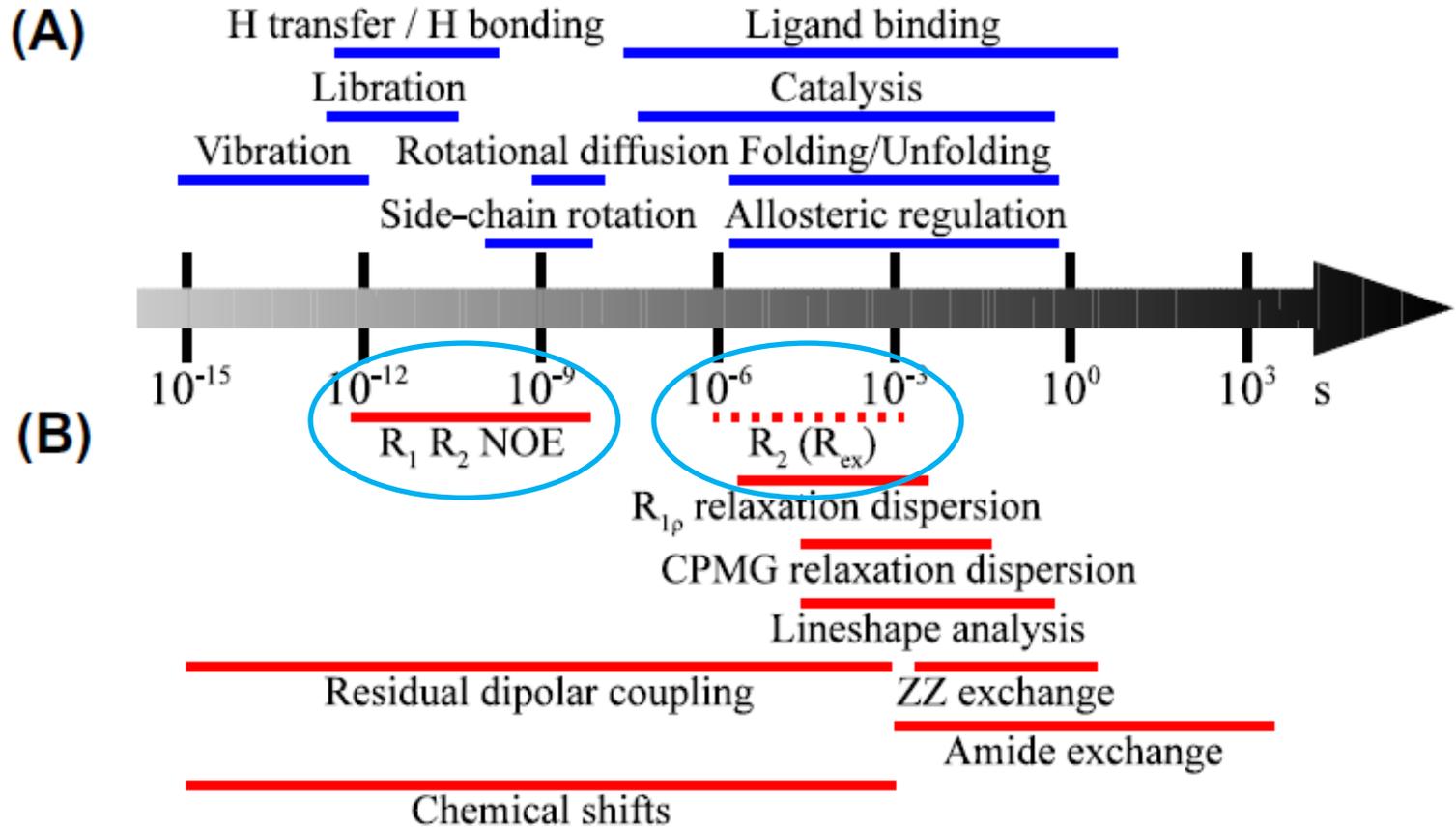
3D-COSY和TOCSY

# 空间结构表征



3D-NOESY

# 蛋白质运动性质表征





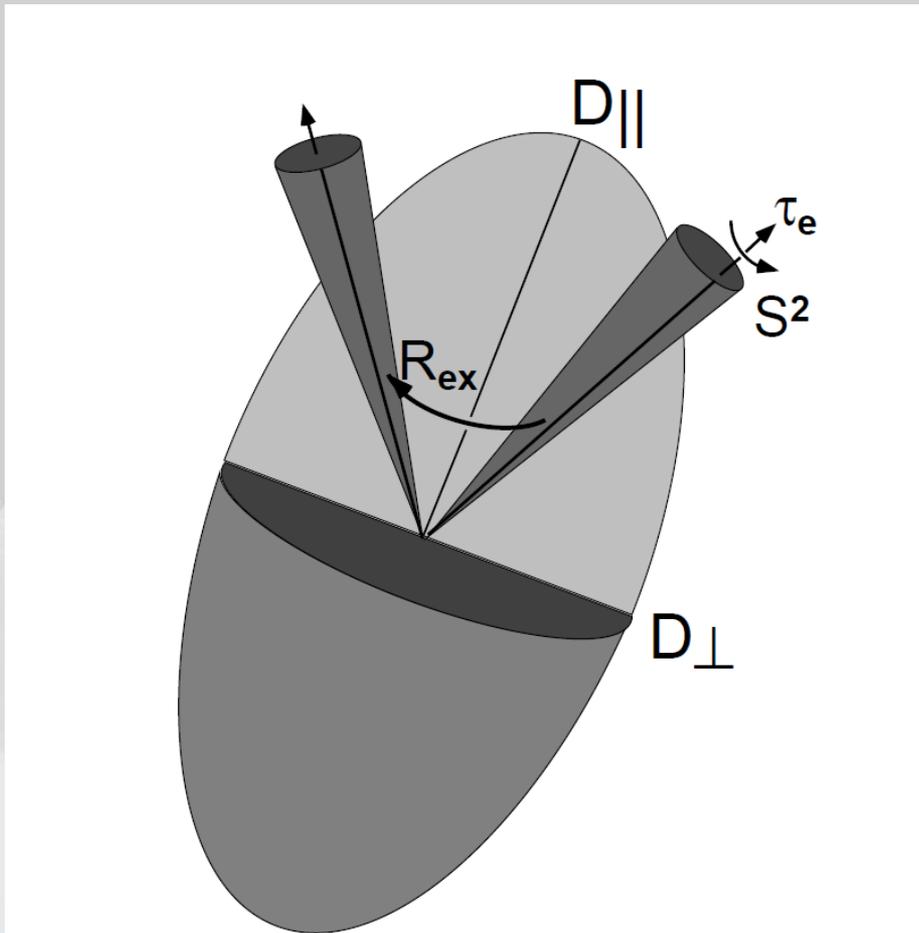
# $R_1$ , $R_2$ 和稳态NOE数据与分子运动

$$R_1 = d[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + cJ(\omega_N)$$

$$R_2^0 = \frac{d}{2} [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \\ + \frac{c}{6} [4J(0) + 3J(\omega_N)]$$

$$NOE = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \frac{d}{R_1} [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)]$$

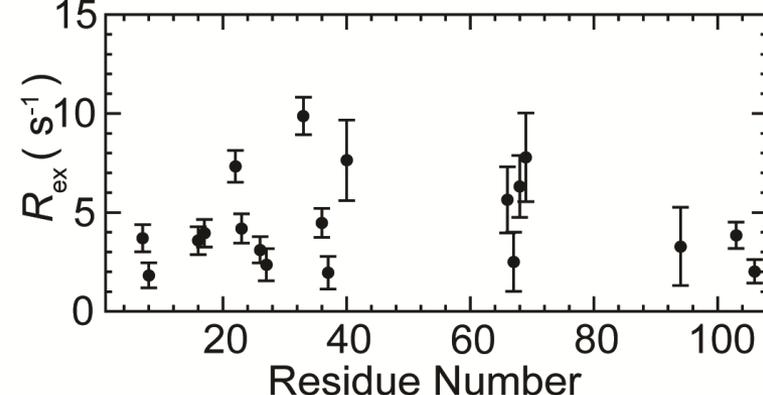
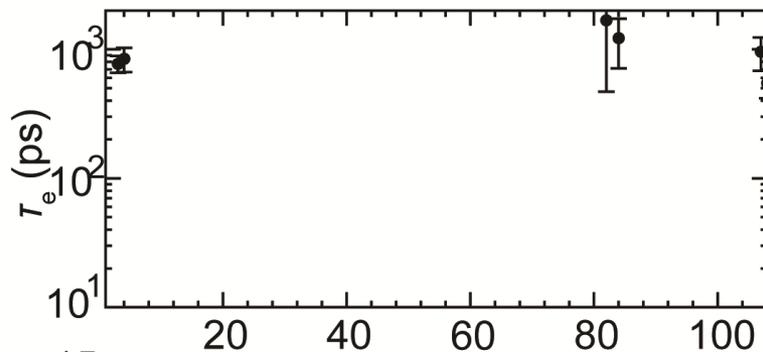
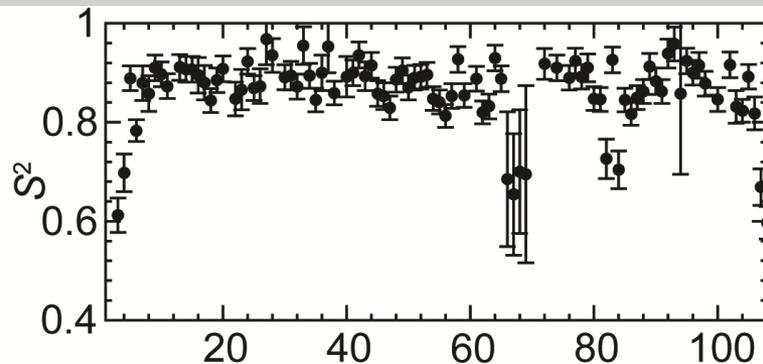
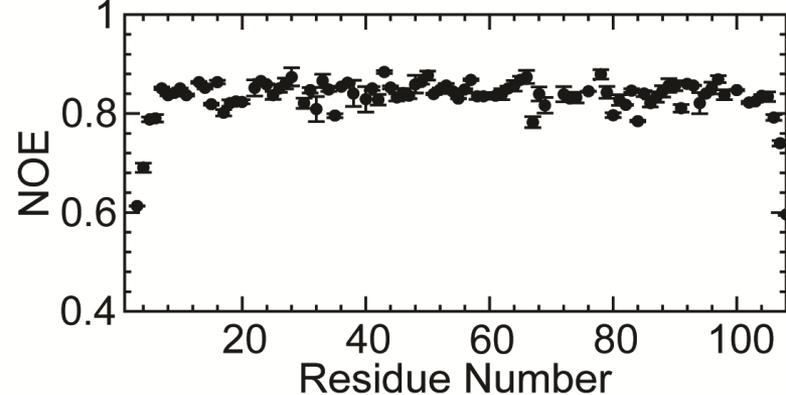
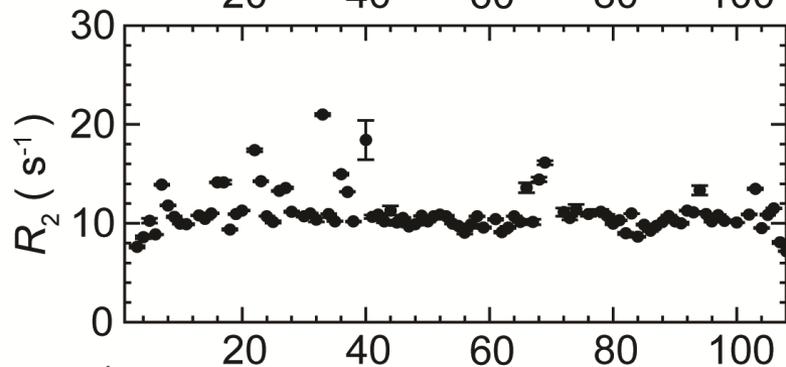
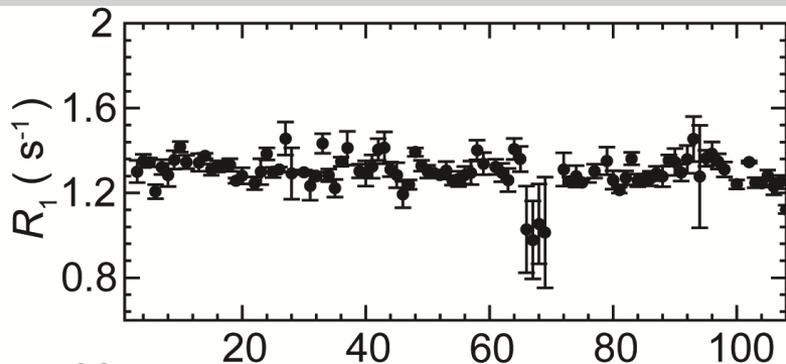
# Model-Free理论方法



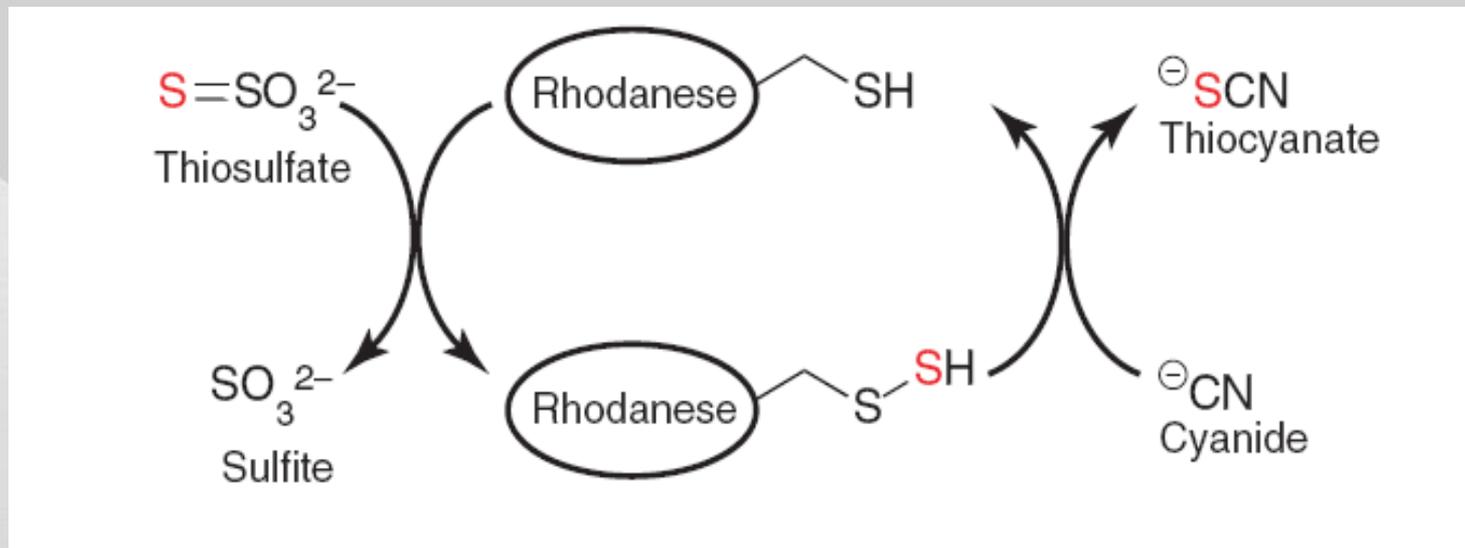
能够提取出比弛豫速率更具物理含义的参数,  $S^2$ ,  $\tau_e$  和  $R_{ex}$ ;

$S^2$  and  $\tau_e$ 反映了整体受限制情况;

$R_{ex}$ 是微妙到毫秒时间尺度的运动, 与蛋白质行使功能的时间尺度一致

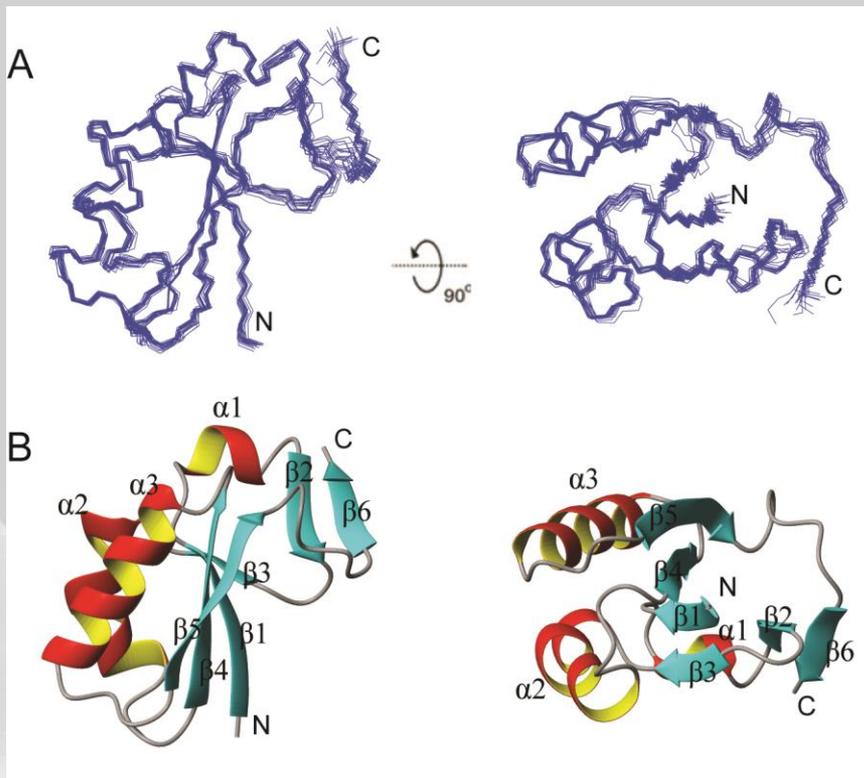


# 硫氰酸酶分子的结构与运动性表征

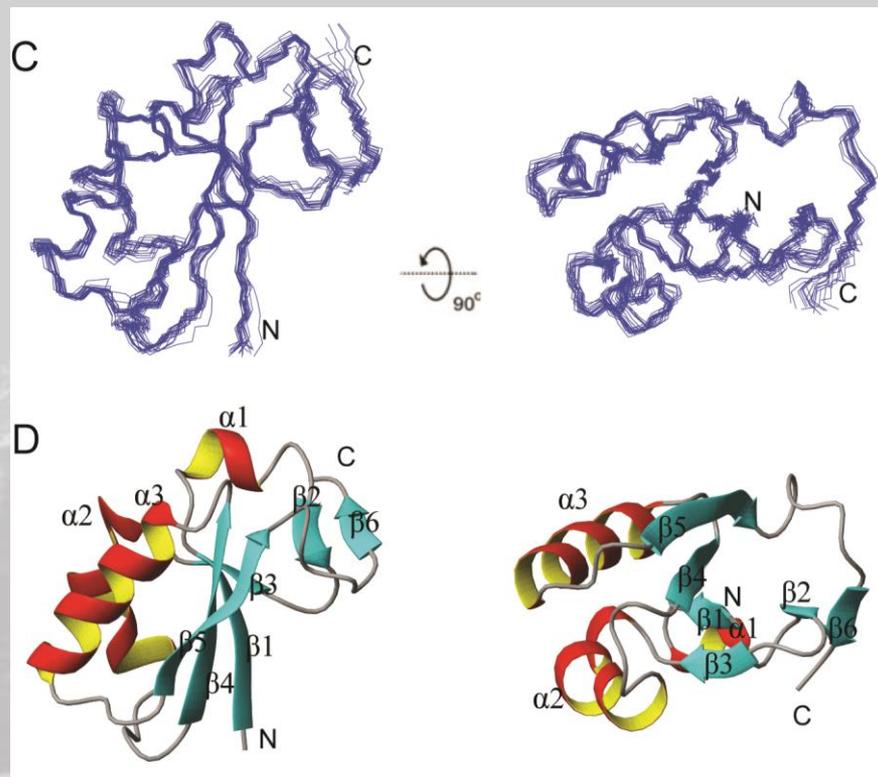




# PspE与其过硫化物结构表征

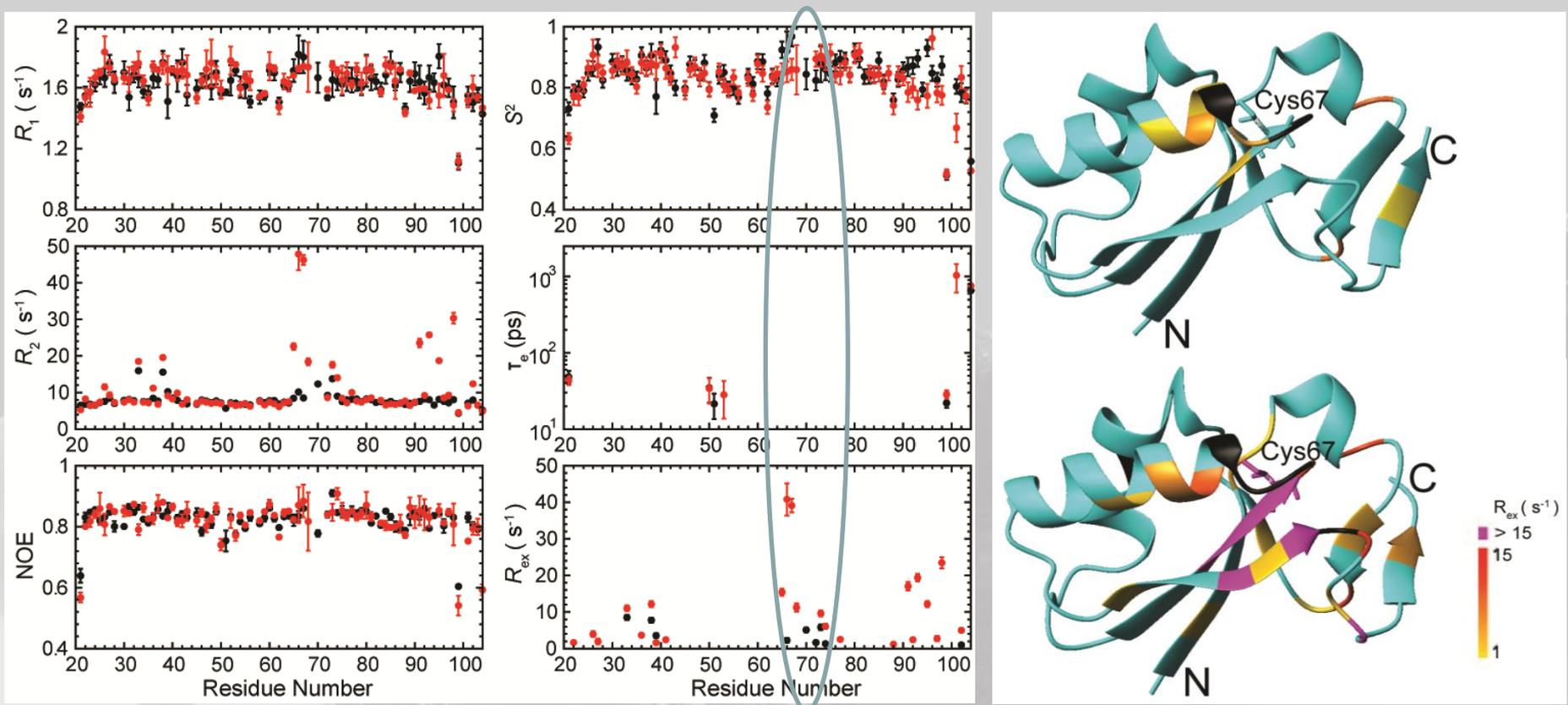


*PspE*



*PspE-S*

# PspE与其过硫化物运动性质表征





北京大學

PEKING UNIVERSITY



北京核磁共振中心

Beijing NMR Center, Peking University

谢谢大家！