



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年北京大学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。

北京大学北京核磁共振中心, 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

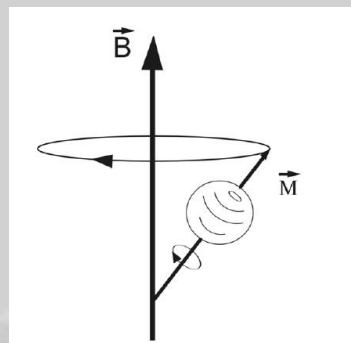
- 核磁共振技术基本原理
- 蛋白质在空间和时间上的核磁共振表征
- 硫氰酸酶分子的表征



基本条件：
稳定磁场 B_0



信号产生：
原子核进动频率



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

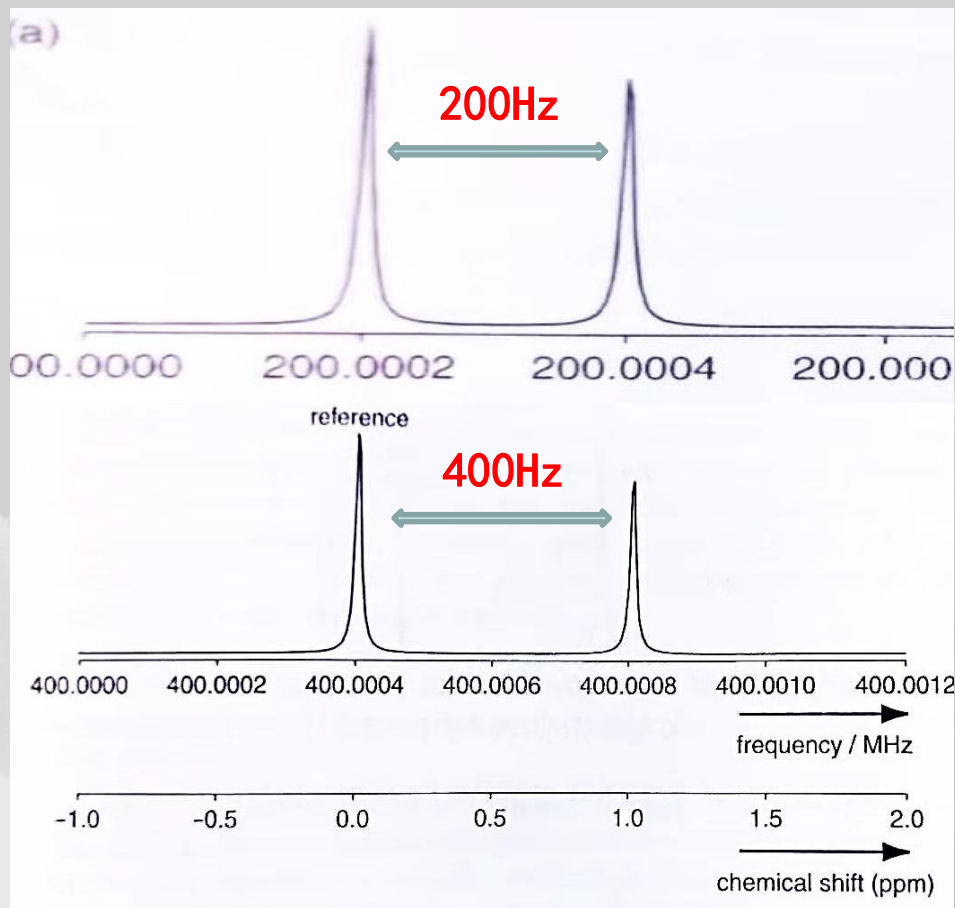
核 磁 共 振

检测对象：自旋量子数 I 不为0

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

- γ : 旋磁比, 与不同原子核的性质相关;
- ν : 进动频率;
- B_0 : 磁场强度;

化学位移和分辨率



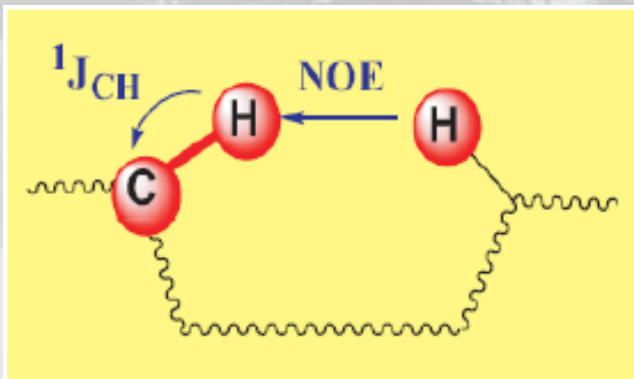
$$\nu_{real} = \frac{\gamma B_{eff}}{2\pi}$$

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

场强越高，分辨率越高，可以有效地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。



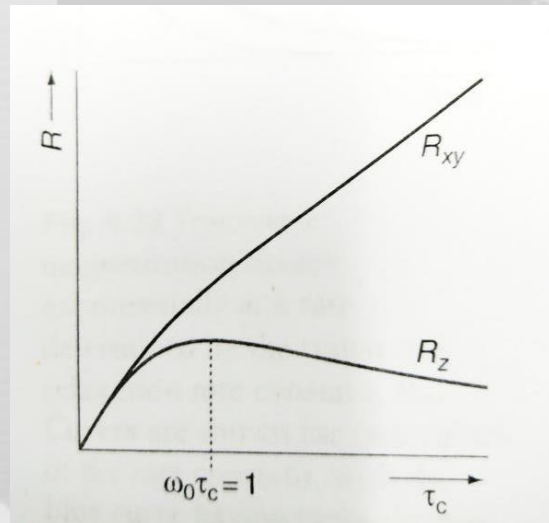
纵向弛豫速率与横向弛豫速率

$R_z(R_1)$: 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

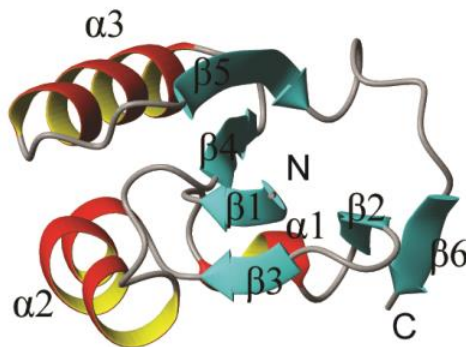
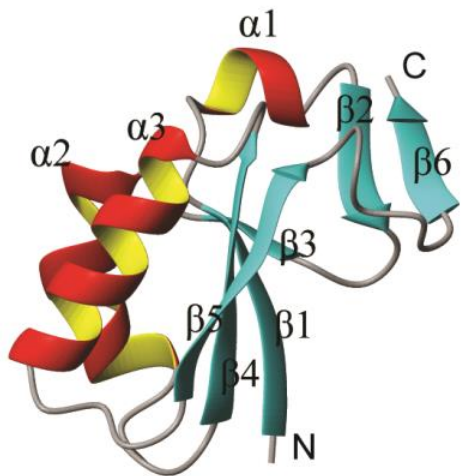
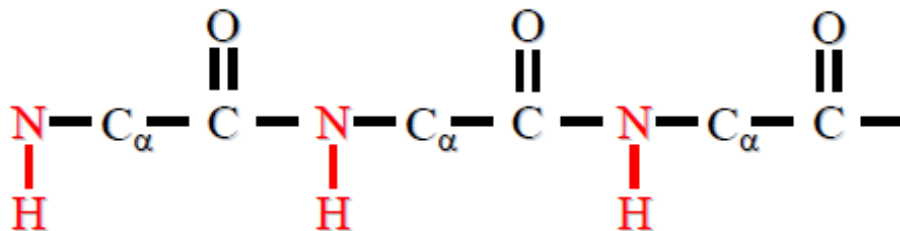


弛豫速率通过 τ_c 与分子运动性质相关联, 从而可以用来测定分子的运动性质

ω_0 : 拉莫尔频率; τ_c : 旋转运动相关时间
与分子量正相关;

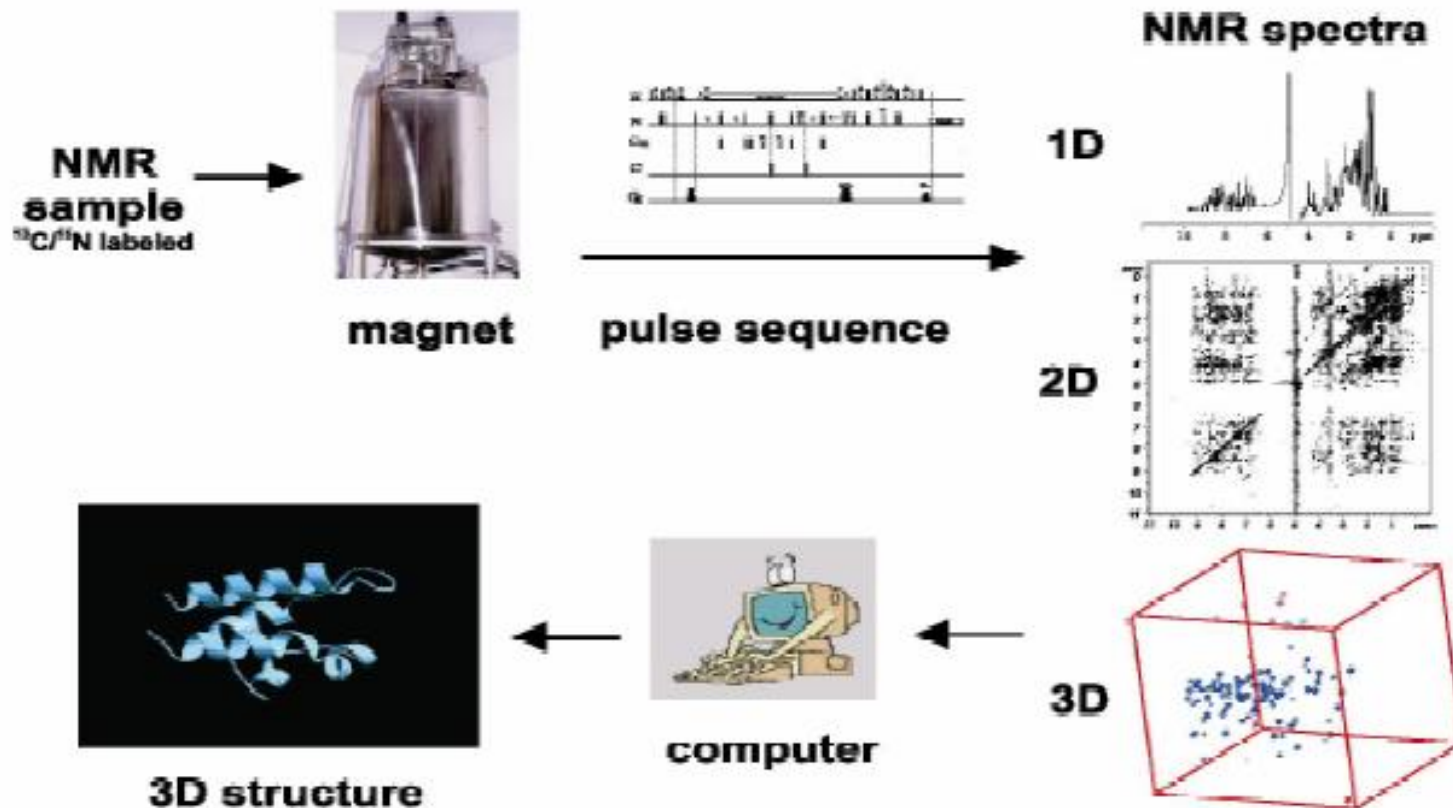
蛋白质结构表征

...NNILVV-----C₉-----V₁₀-----G₁₁-----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}N 标记样品
- ^{13}C , ^{15}N 双标样品
- ^2H , ^{13}C , ^{15}N 三标样品
- 特殊氨基酸标记

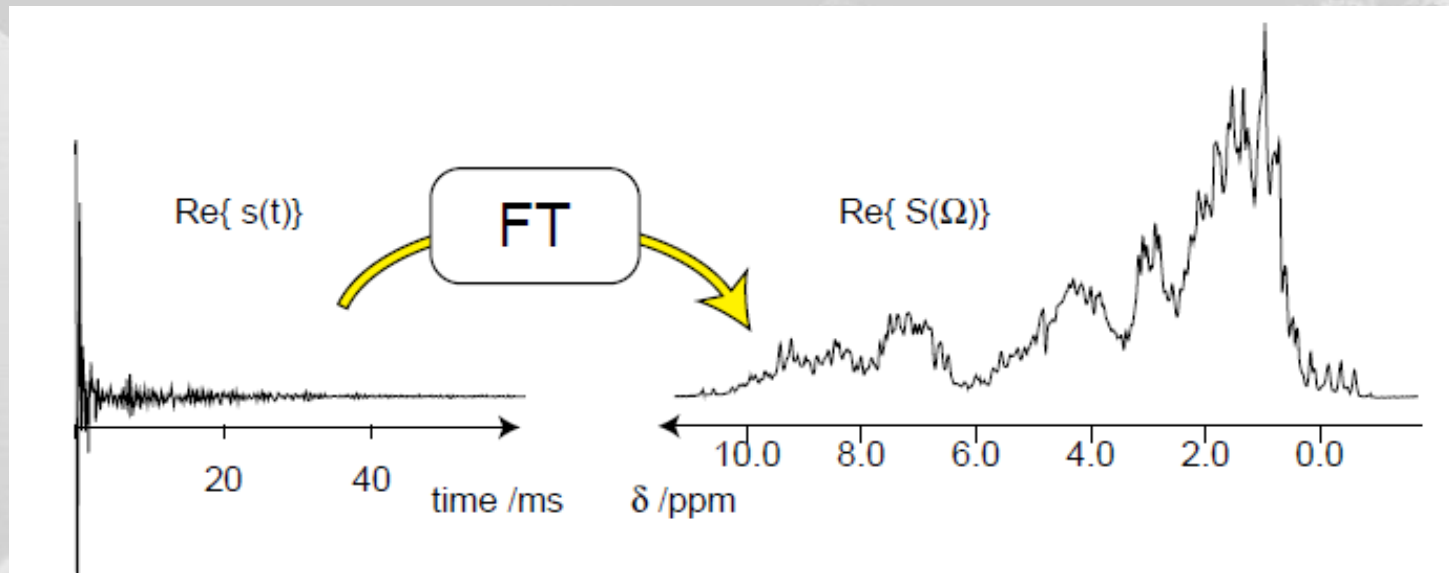


样品浓度 $>0.5\text{mM}$ 缓冲溶液, $\text{pH}<7.5$, D_2O , DSS;
蛋白酶抑制剂以及其他添加剂



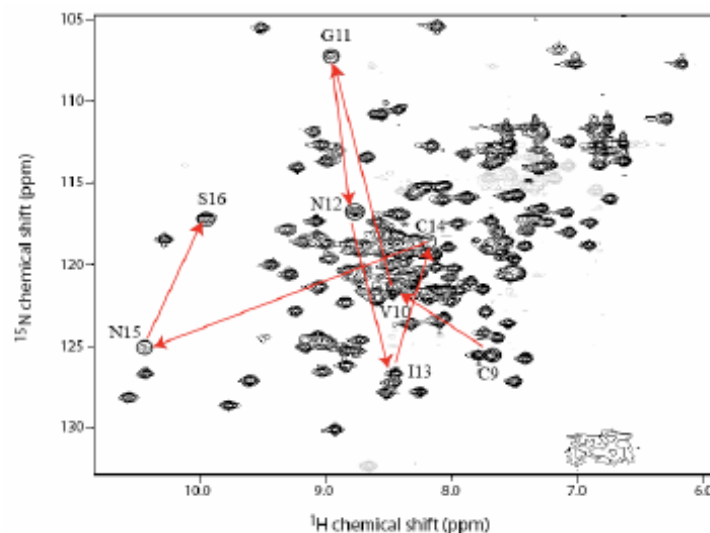
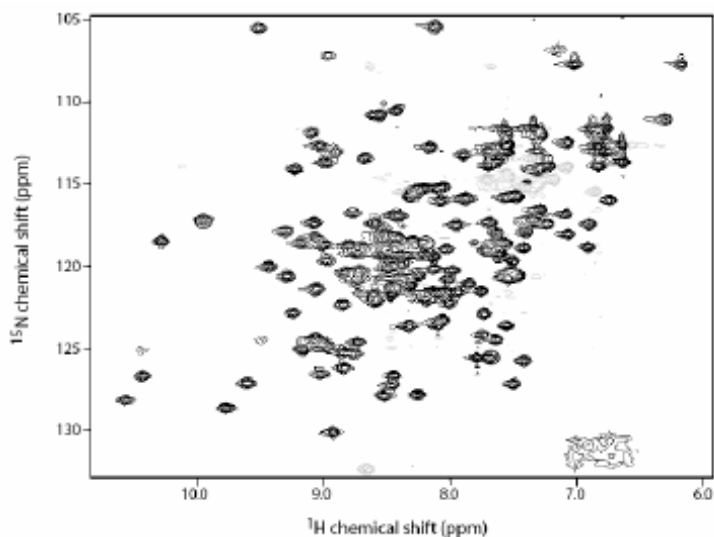
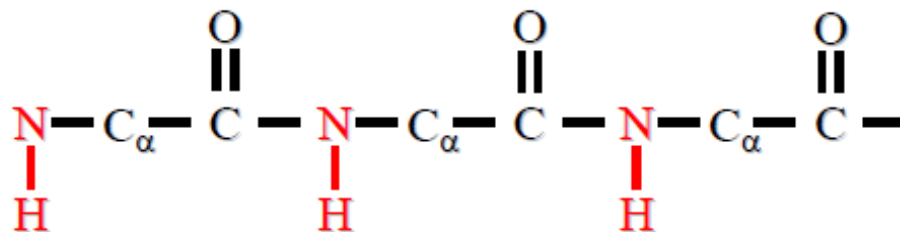
数据采集和处理

- 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。



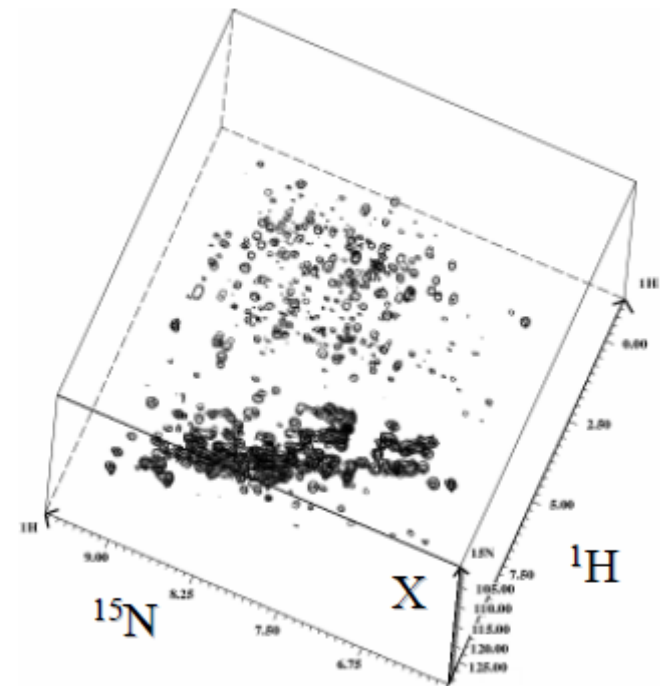
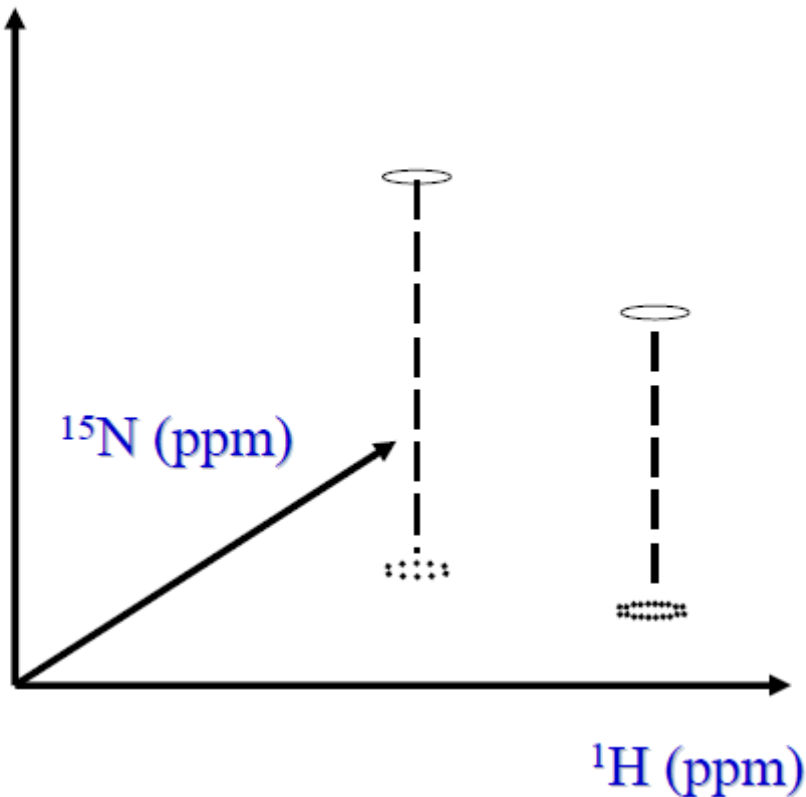
主链化学位移归属

...NNILVV-----C₉-----V₁₀-----G₁₁-----NICRSP...

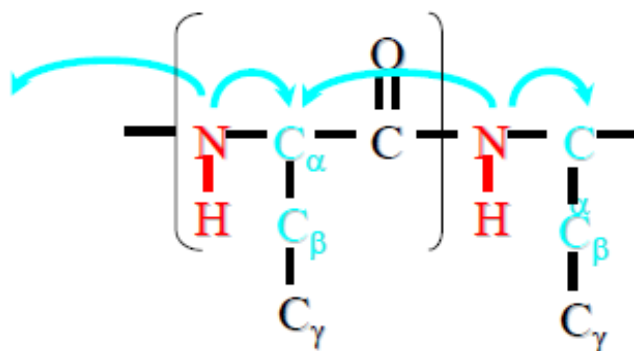


三维三共振实验

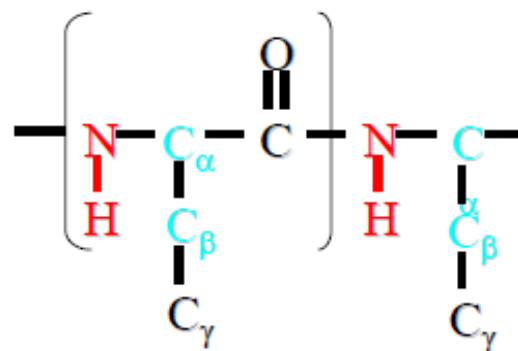
whatever nucleus X (ppm)



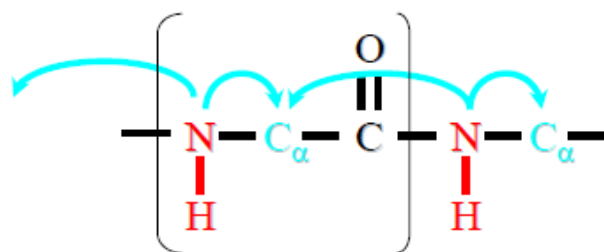
3D-HNCACB



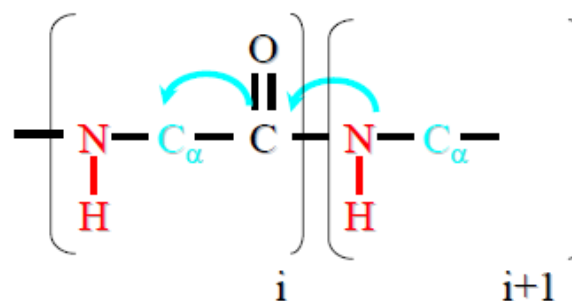
3D-CBCA(CO)NH

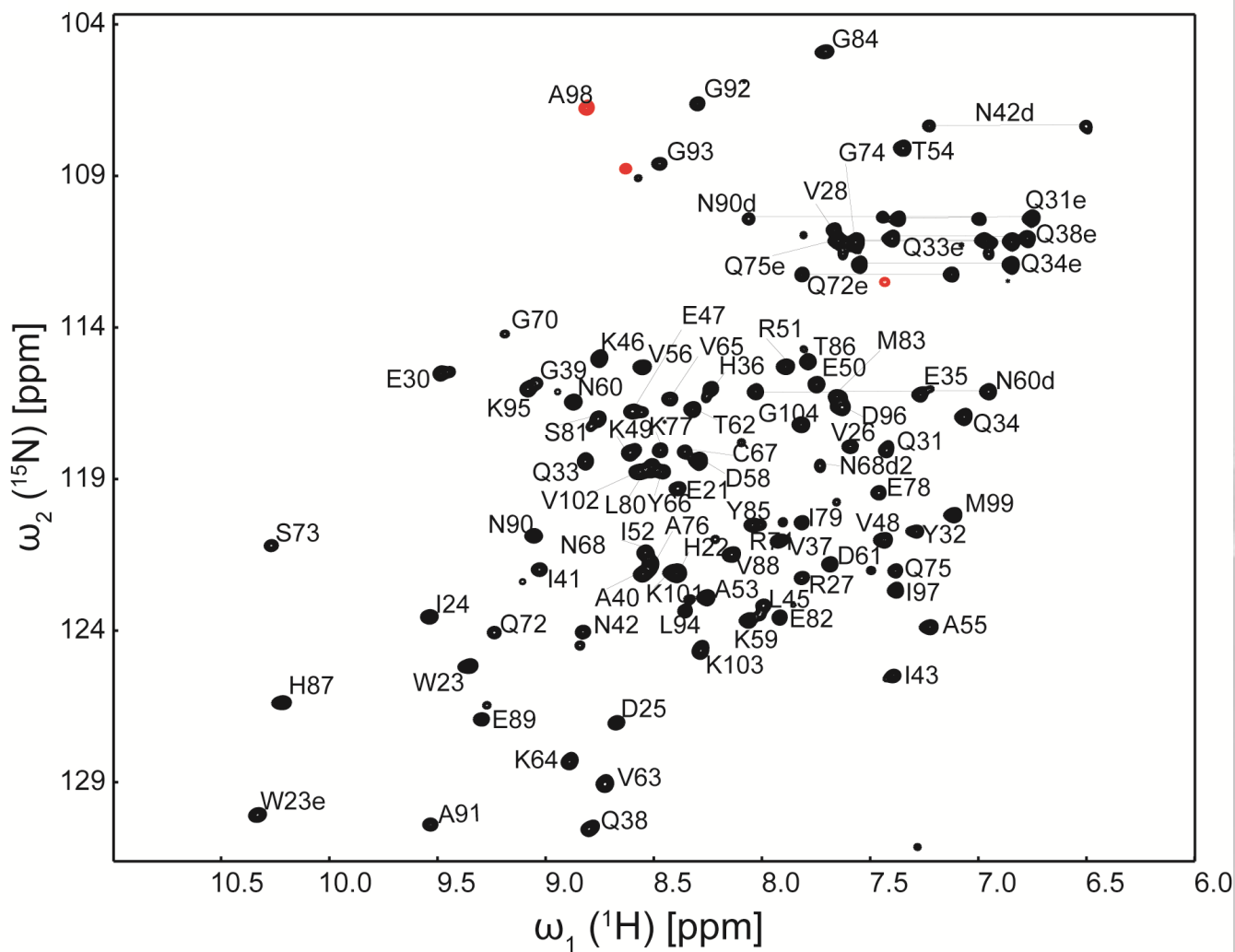


3D-HNCA

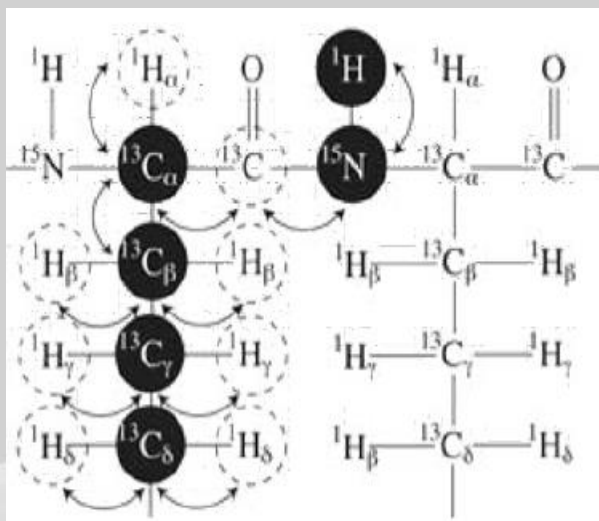


3D-HN(CO)CA

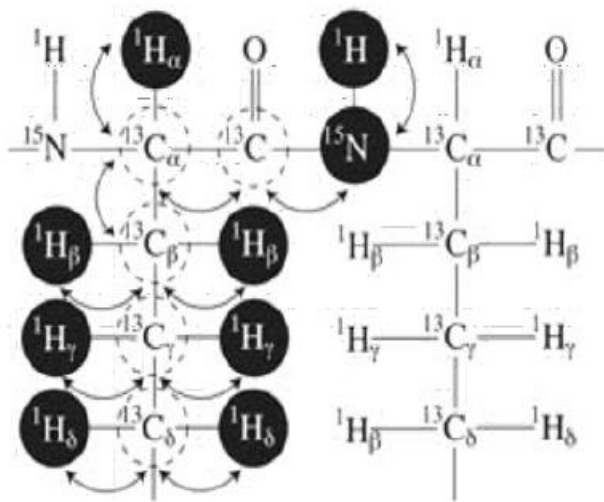




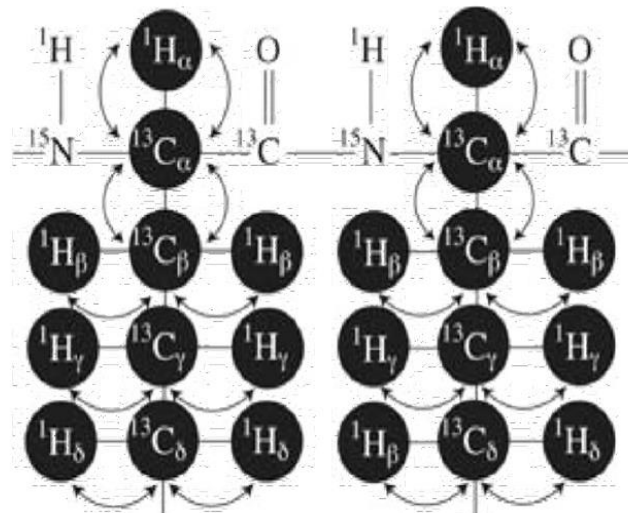
侧链化学位移归属



3D-(C)CONH

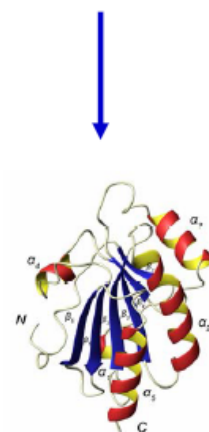
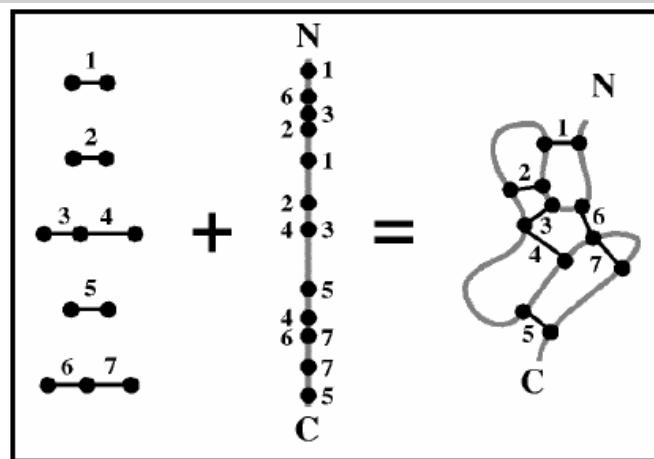
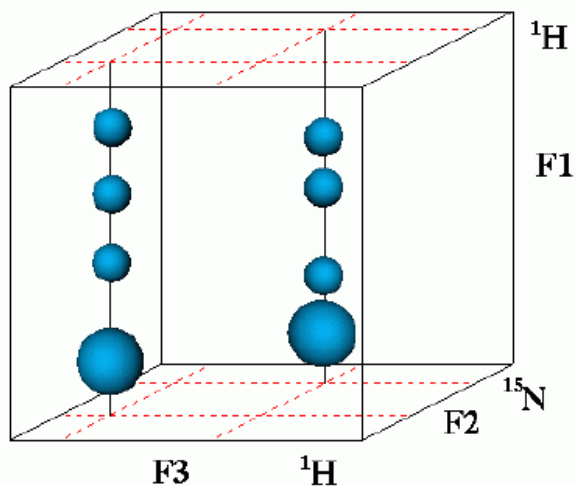
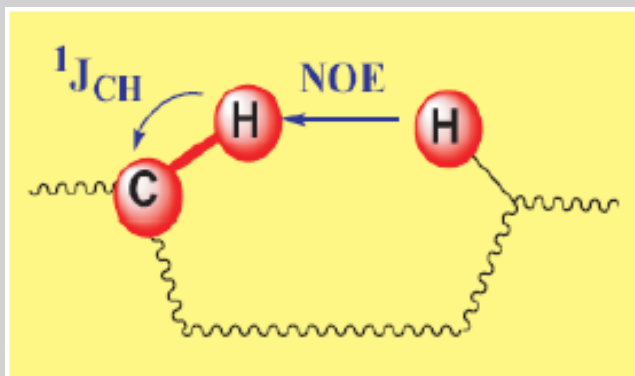


3D-H(C)CONH



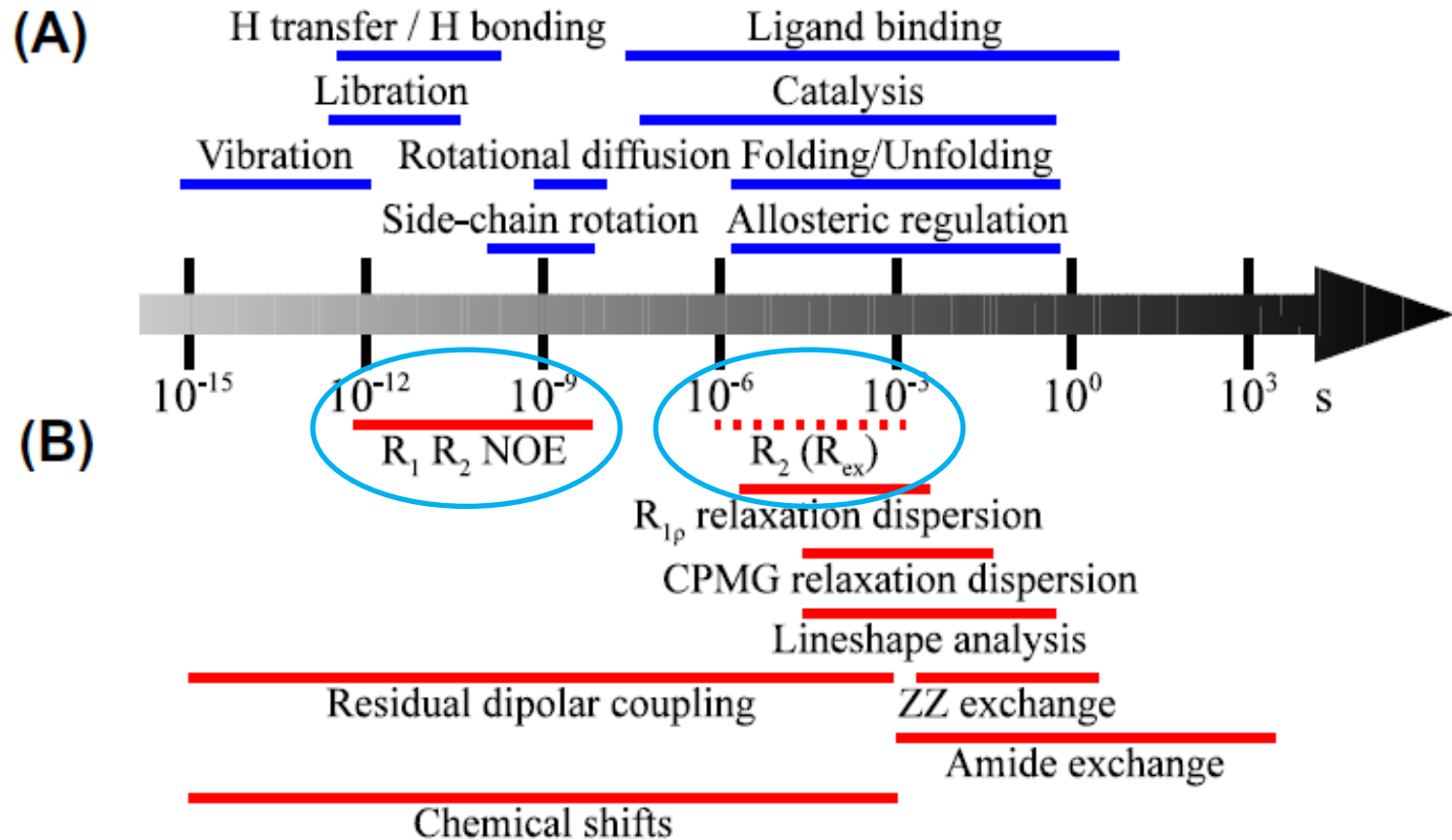
3D-COSY和TOCSY

空间结构表征



3D-NOESY

蛋白质运动性质表征





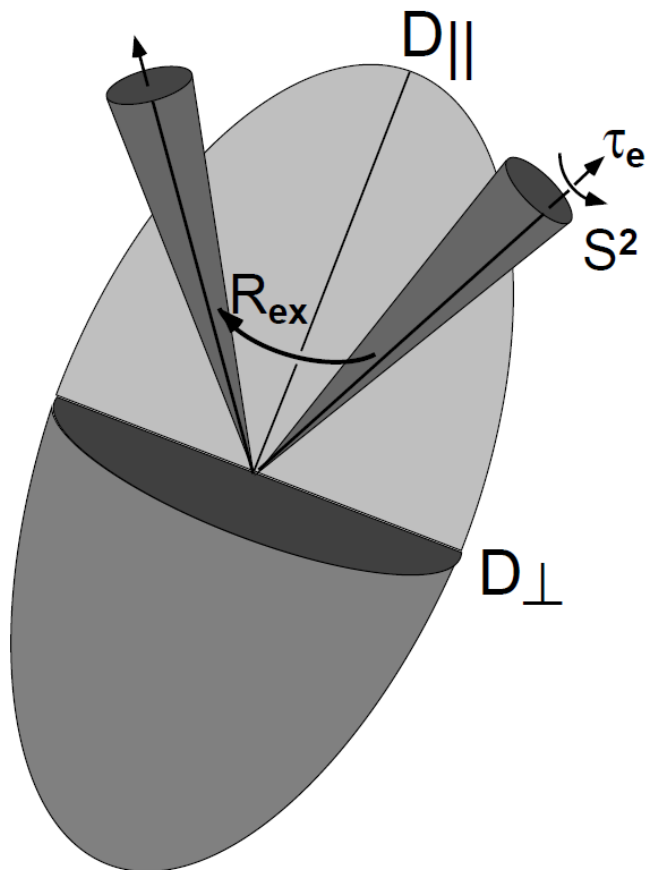
R_1 , R_2 和稳态NOE数据与分子运动

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

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

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

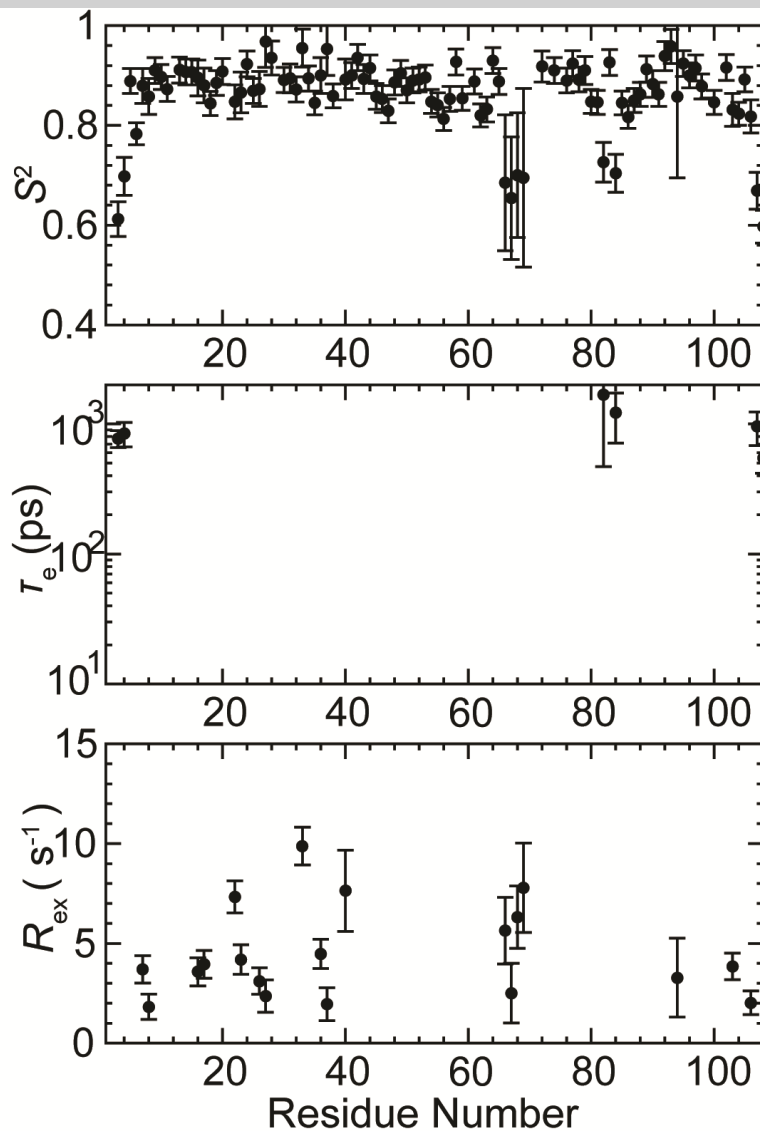
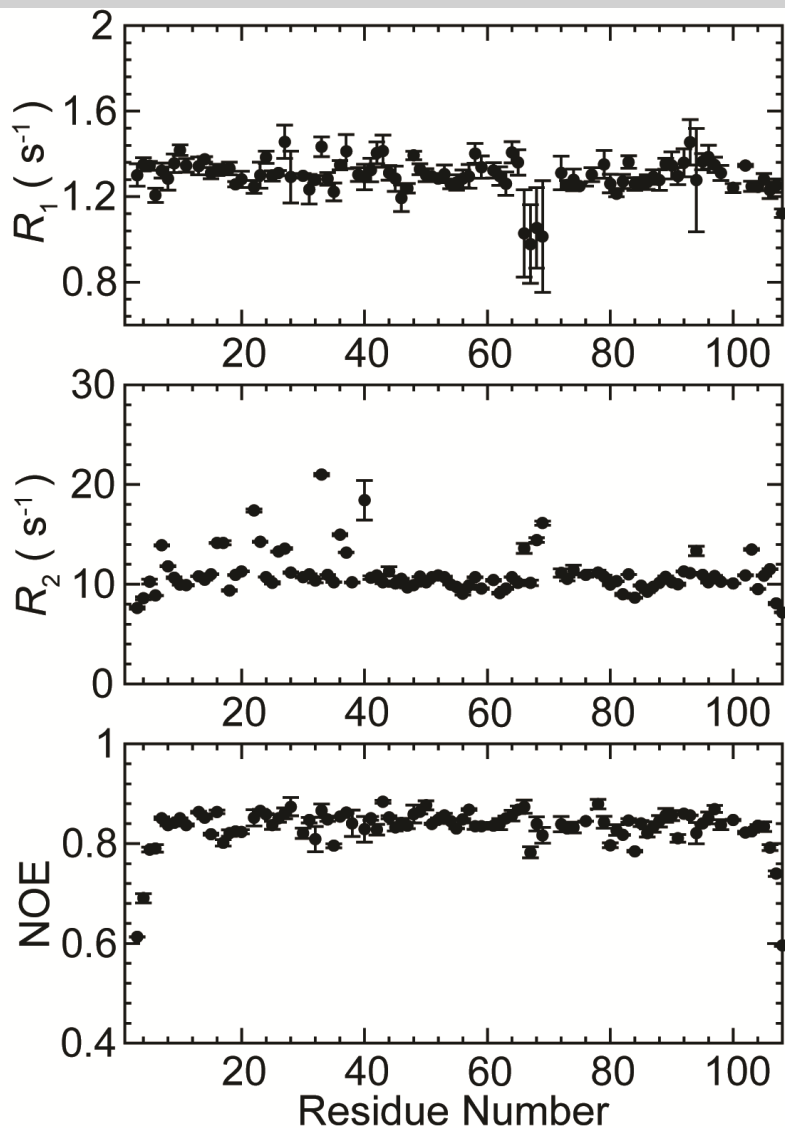
Model-Free理论方法



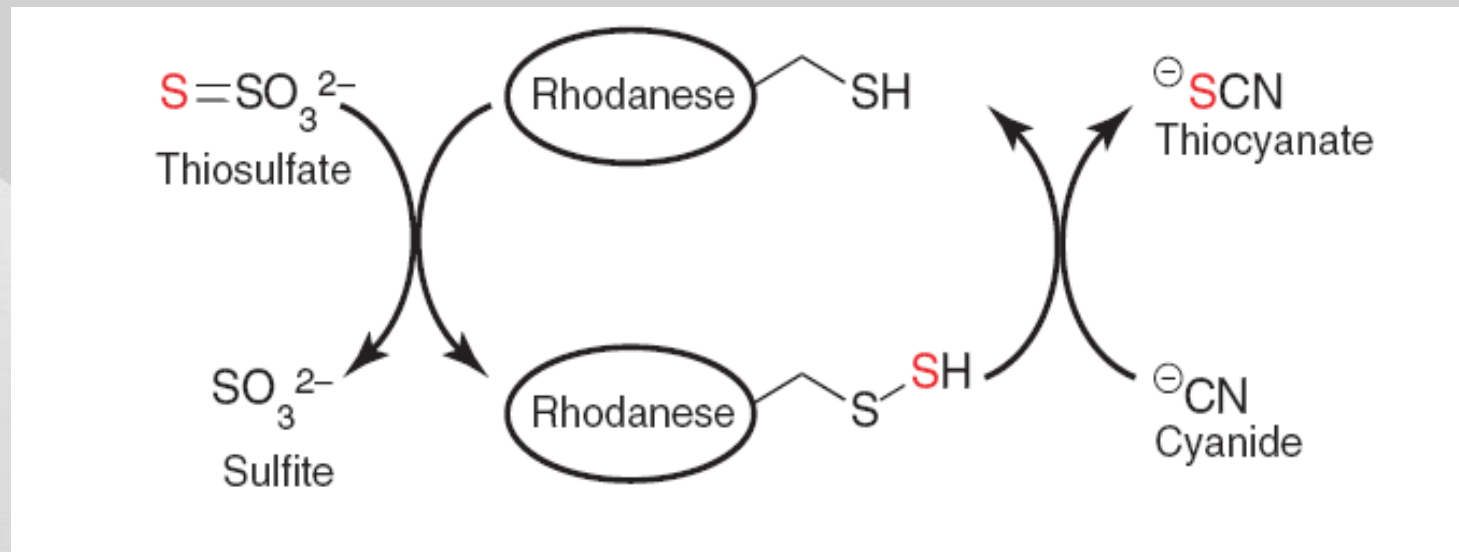
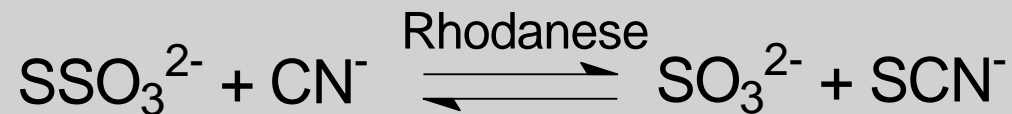
能够提取出比弛豫速率更具物理含义的参数, S^2 , τ_e 和 R_{ex} ;

S^2 and τ_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

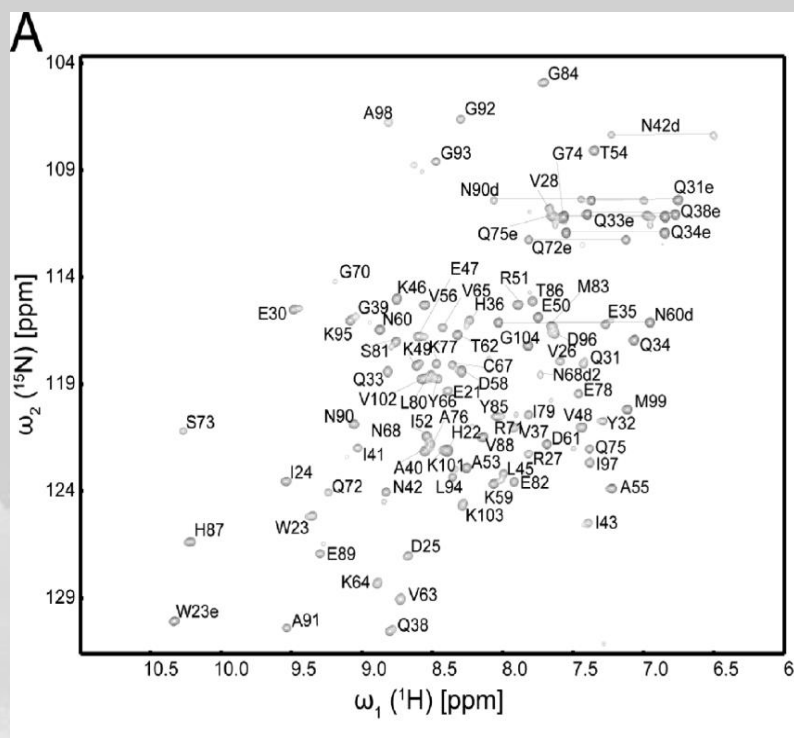


硫氰酸酶分子的结构与运动性表征

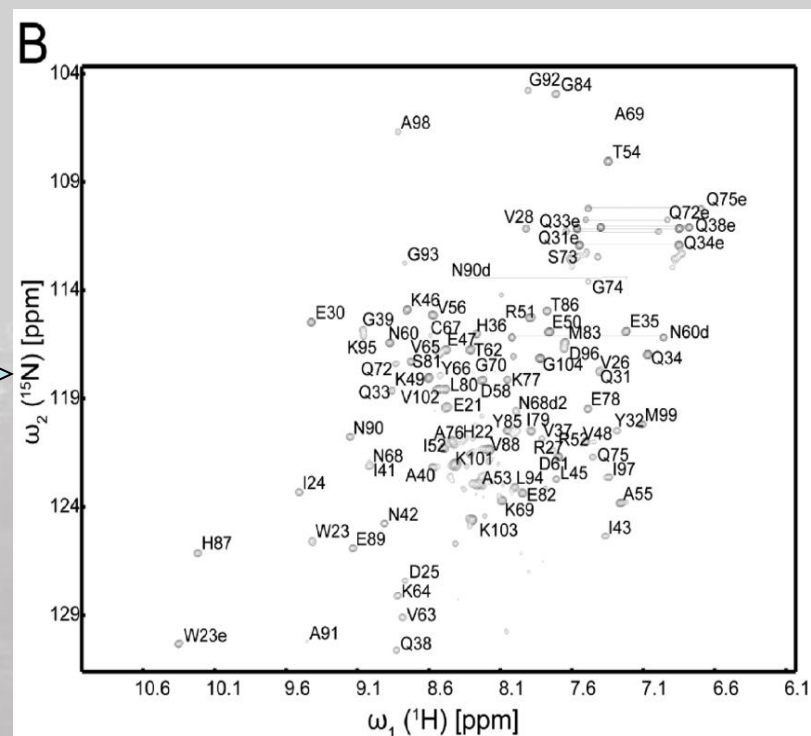
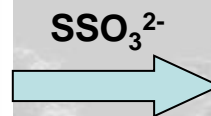




硫氰酸酶PspE与 SSO_3^{2-}

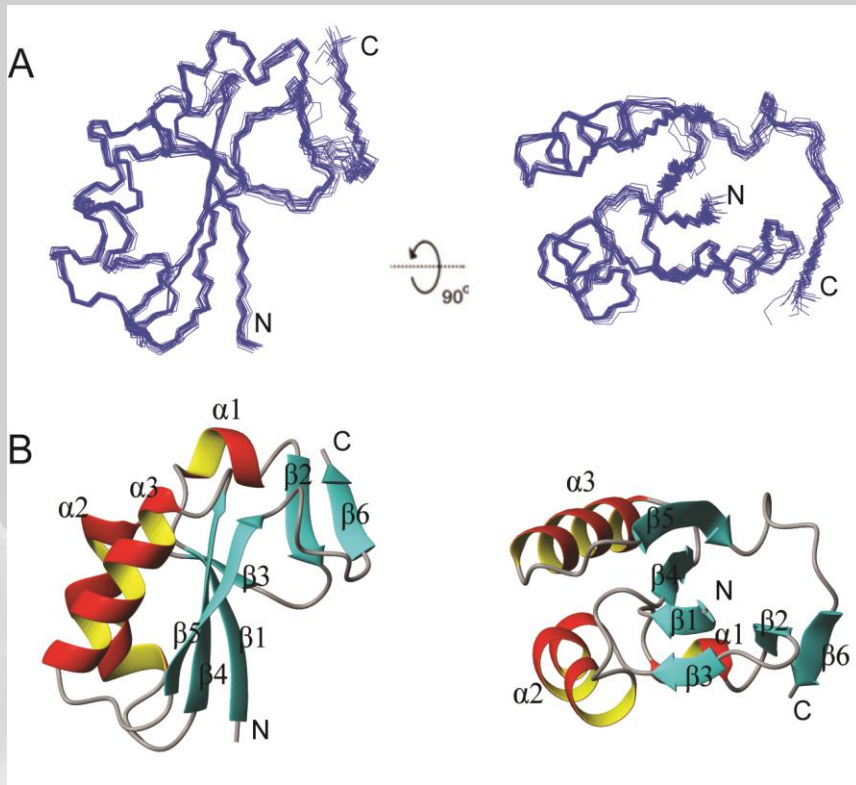


PspE

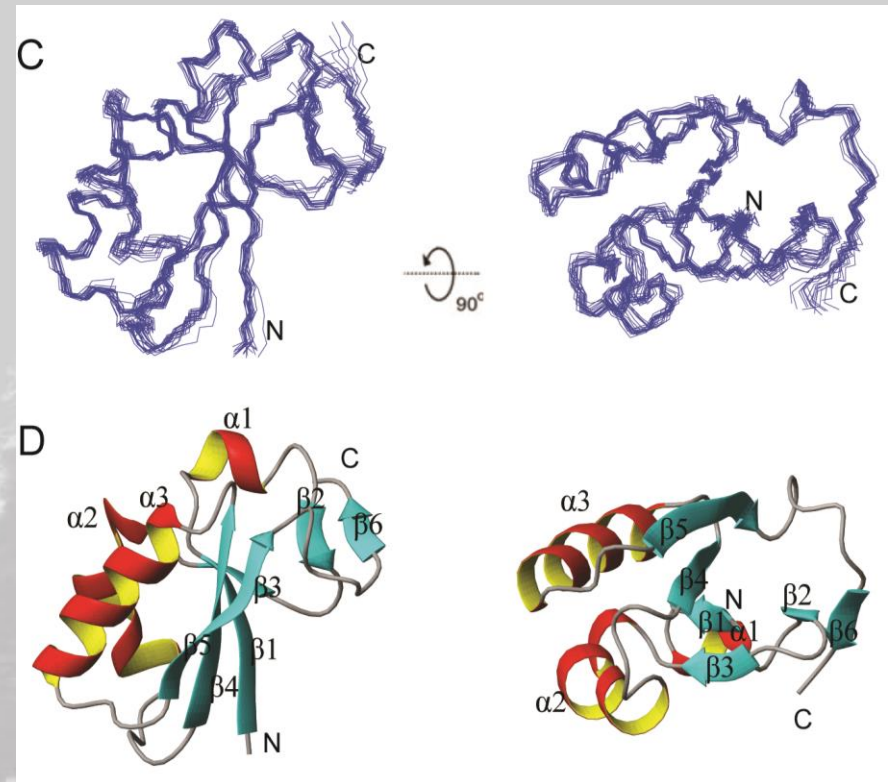


PspE过硫化物

PspE与其过硫化物结构表征



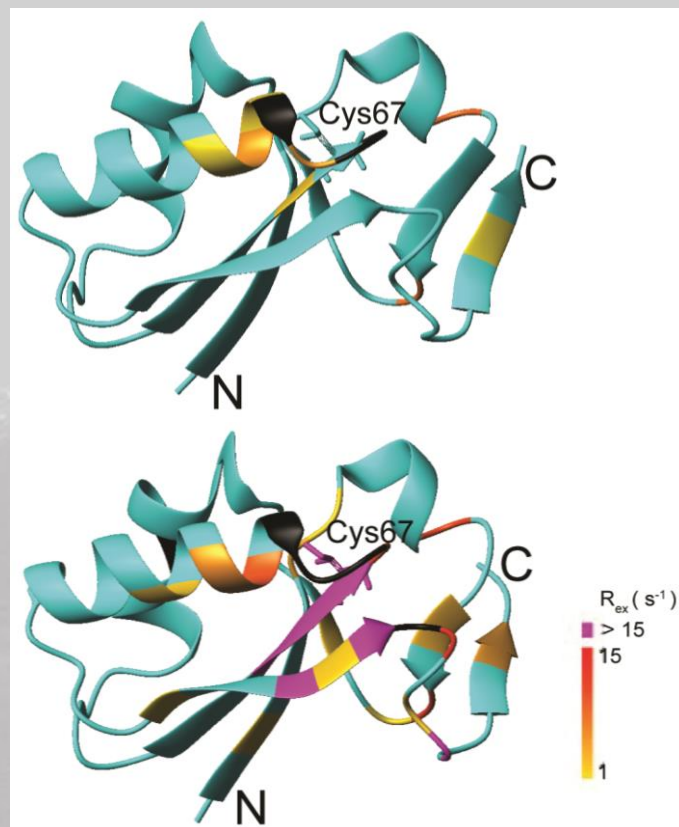
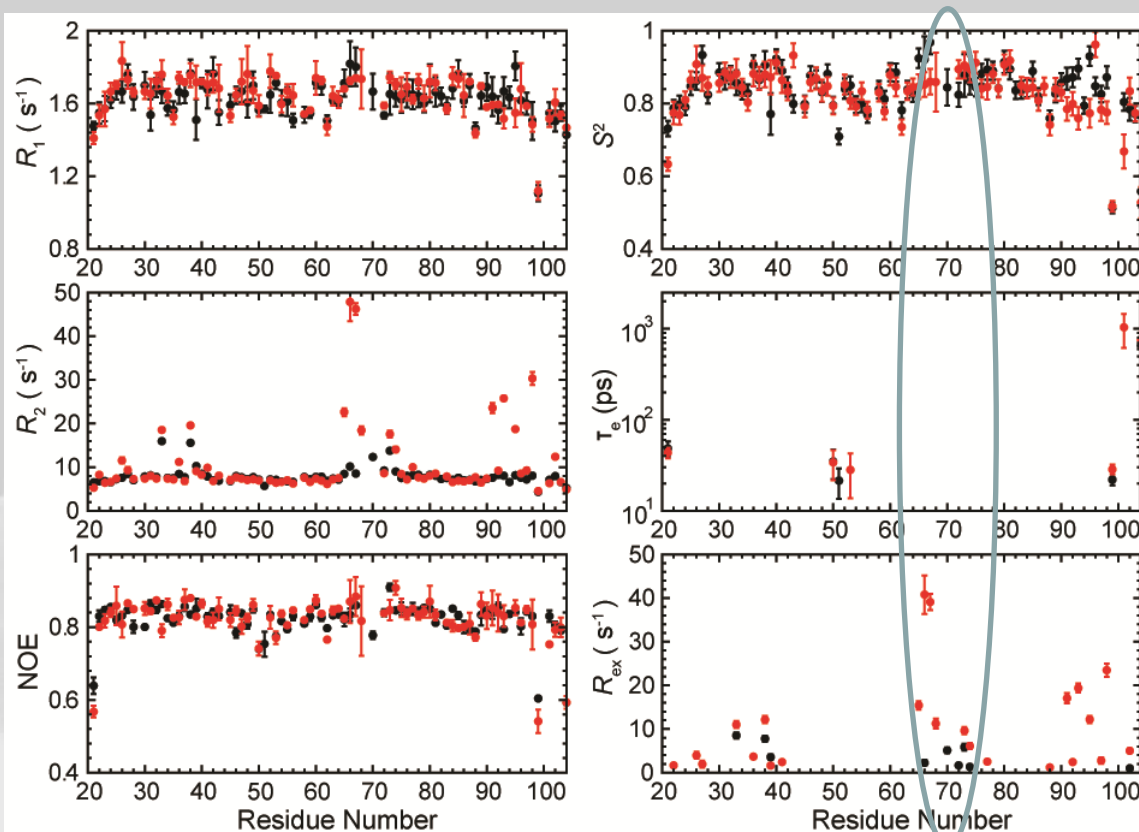
PspE



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！