

利用核磁共振光譜學探討蛋白質的結構、動性及功能

黃太煌

中研院生科所

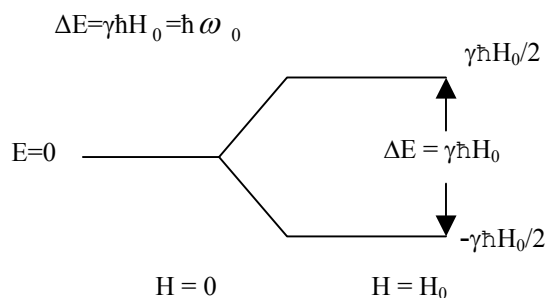
E-mail : bmthh@ibms.sinica.edu.tw

核磁共振的發展史,是科學研究的最好範例,在多次的山窮水盡中,發現了每次的柳岸花明。從 Pauli 核子自旋的假設,經 Estermann 和 Rabi 以 Stern-Gerlach 實驗設施證實其存在,到 Purcell 及 Bloch 在 1945 年以共振法測定核子自旋,真正的打開了核磁共振的大門。一般人將 1945 年當做是核磁共振的誕生年代,這往後的 15 年是核磁共振理論發展的黃金時代。核子自旋與周遭因素之間的交互作用理論,核磁弛緩原理以及化學位移現象都是這一段期間建立及發現的。六十年代最大發展,應屬於 Ernst 及 Anderson 將傅力葉轉換原理應用到核磁共振上,六十年代末期,一般人認為核磁共振理論研究已進入死胡同。這一思想在七十年代開始很快的就被固態核磁共振的快速發展及生醫方面的應用所淹沒。Jeneer 二維共振的理論,及核磁影像的構想也都在七十年代提出,而在八十年代才發展成熟。醫院裡開始使用磁振造影儀(MRI),生化學家也真正能以核磁共振光譜學法,來決定生化巨分子在水溶液中的結構。當然在這發展過程中超導磁鐵技術的進步,電腦速度的高速成長,磁碟容量擴大等都有決定性的影響。另外新理論的發展,如乘績運算子(product operator)的普遍運用,也促進核磁共振技術的發

展。半個世紀以來,核磁共振由一物理學家好奇探索的現象,而成為生、醫、理、工等各領域裡廣泛應用,甚至於是不可或缺的先進技術。它的成就,又一次的證實基礎科學研究的重要性。

I. 核磁共振的基本原理：

自然界存在的同位素中約有一半具有核子自旋,在探討生化巨分子較重要的包括 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 及 ^{31}P 。這些原子核皆具 $I=1/2$ 的核子自旋,因此每原子核皆擁有磁偶矩 $\mu=\gamma\hbar I$, 式中 γ 為迴轉磁性比(gyromagnetic ratio)。 γ 隨不同原子核而有不同, $\gamma(^1\text{H})$ 為 $4.2577 \text{ KH}_z/\text{G}$, 這些原子核放置於磁場 H_0 中將分佔於具 $-\gamma\hbar H_0/2$ 及 $\gamma\hbar H_0/2$ 兩能層中,此二能層之能量差為：



以上式子稱為拉莫爾方程式(Larmor equation),而 $\omega_0 = \gamma H_0$ 稱為拉莫爾頻率,亦即核子自旋在磁場 H_0 下之共振頻率,此頻率隨原子

核種類及磁場之高低而異，目前市面上買得到的最高核磁共振級的磁鐵磁場為 21 萬高斯(21Telsla) 在此磁場下質子之共振頻率為 900MHz。

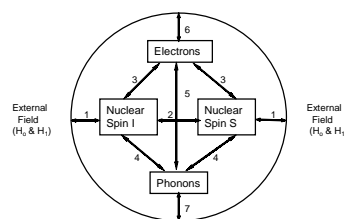
□. 核磁共振之基本作用：

自旋與外交加磁場之交互作用即為 Zeeman interaction。由於外圍環繞電子之屏障，核子自旋所感受的磁場小於外加的磁場，此外核自旋也和鄰近的核子自旋、電子自旋及晶格間有交互作用，於是核磁共振所測得的共振光譜已不只是測量某同位素原子核迴旋磁性常數，更重要的是自旋已成為一個探頭，可用以探測週遭環境的變化。圖一描述核子自旋和週遭交互作用七種可能性。核磁共振光譜反應出核子自旋(□)與外在磁場交互作用的結果，外在的磁場包括外加靜磁場(H₀)及振動磁場(H₁)和核子自旋周遭核子及電子造成的局部磁場(local field)。這些交互作用，可以下列的核子自旋總位能方程式表式(H)：

$$H = H_Z + H_{RF} + H_{CS} + H_D + H_Q + H_J \quad (1)$$

H_Z 是所謂的 Zeeman 作用，它是 I 和外在靜磁場 H₀ 的交互作用。H_{RF} 是 I 和外在振動磁場 H₁ 的交互作用。H_{CS} 代表化學位移方向性作用

(chemical shift anisotropic interaction)。它是因為環



圖一. 基本核磁共振交互作用

- 1. Zeeman Interaction of spins; 2. Direct spin interaction.
- 3. Nuclear spin-electron interaction via indirect spin interaction
- 3-5: Indirect spin lattice interaction via electrons.
- 3-6: Shielding and polarization of nuclear spins by electrons.
- 4: Direct spin-lattice interaction;
- 4-7: Coupling on nuclear spins to sound fields etc.

繞核子旋轉的電子與外加磁場的交互作用，使得核子自旋所承受的磁場不一樣，以致其共振頻率也就不一樣。且因外圍環繞的電子分佈並不均勻，核子自旋所感受到的磁場，也就隨化學鍵與外加磁場方向之間的夾角而定。H_D 代表核子自旋磁偶矩 - 磁偶矩之間的交互作用 (dipolar interaction)。H_Q 則為核子四極矩作用 (nuclear quadrupolar interaction)。它的來源是因環繞核子旋轉的電子雲作非圓球狀分佈所造成電場梯度與核子自旋的交互作用，只有 I□1 的核子自旋，方具有核子四極矩作用。H_J 係因自旋-自旋耦合 (spin-spin coupling)(又稱 J-耦合)的方向性造成。

表 1 列出各種交互作用在二萬三千高斯磁場下的數值範圍。在上述交互作用中 H_Z, H_{RF} 與 H_{CS} 皆與磁場強度成正比。而

表1. 各種作用能值表 (Hamiltonian, Hz)。

		$\mathcal{H}_i = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{CS} + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_Q$				
液態	NMR	10 ⁸	10 ³ ~10 ⁴	10~10 ²	0	0
固態	NMR	10 ⁸	10 ³ ~10 ⁴	10~10 ²	5×10 ⁴	10 ⁵ ~10 ⁶

H_D, H_Q, H_J 與磁場強度無關。所有作用中，只有 H_D 的大小與鄰近自旋間的距離三次方成反比。除 H_Z 及 H_{RF} 外，這些作用皆具方向性，且這些方向性與化學鍵的方向有密切的關係。在水溶液中，當分子的運動速率大於這些作用的大小，則這些作用也就失去了方向性。我們所能測得的只是它們的平均值。 H_D 及 H_Q 平均值為零，因此在水溶液 H_D 及 H_Q 不存在。(註： H_D 不存在只代表在光譜線上看不到它的作用。核子自旋相互之間，仍可藉由 H_D 交換能量，影響相互之間的光譜線強度。這就是所謂的 nuclear Overhauser effect, NOE)。 H_{CS} 之平均值則不等於零，而為一常數，稱之為化學位移(chemical shift)。同樣的 H_J 平均值稱為 J-偶合係數(J-coupling constant)。

兩核子自旋之間的磁偶矩交互作用具對稱性，是所有作用中最容易分析的。以兩個孤立的核子自旋，或在單晶或同向樣品(single crystal or oriented sample)的磁偶矩對為例，磁偶矩的交互作用，使得原先的一根光譜線，分裂為二根，此對線(doublet)之間的頻率差， $\Delta\nu_D$ ，可以下列式表示：

$$\Delta\nu_D = \frac{\gamma_1\gamma_2h}{4R^3}(3\cos^2\theta - 1) = \Delta\nu_{11}(3\cos^2\theta - 1) \quad (2)$$

θ 是外加磁場向與連接兩核子之向量間夾角。 γ 是迴轉磁比(gyromagnetic ratio)， R 是兩核子之間的距離， h 為普朗克常數。對特定的自旋對而言，方程式中唯一變數是磁場方向與連接兩核子之向量夾角。 $\Delta\nu_{11}$ 則為磁偶矩作用的最大值。

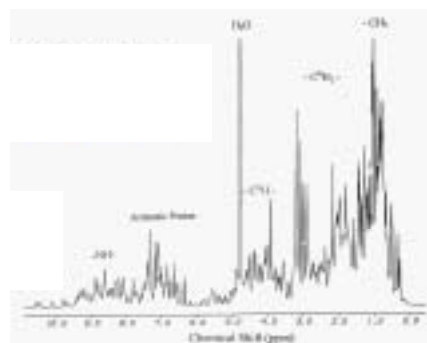
III. 核磁共振的基本參數：

1. 共振線強度：

共振線面積和樣品之濃度成正比，同一化合物之不同共振線之面積則和該功能基具有之核子自旋數成正比。

2. 化學位移：

一核子自旋之共振頻率，因其化學結構而異，圖二顯示牛蛙卵核糖核酸酶之質子共振光譜，不同功能基之共振位置也已標定在圖上，圖上可見不同官能基之共振位置不一，且不同胺基酸之同一種官能基之共振頻率亦非完全相同，而有一定範圍，由這些許的差別，讓我們可以標定不同胺基酸之所有核子自旋共振頻率(化學位移)。



圖二. 牛蛙卵核糖核酸分解酶 一維核磁共振光譜

3. J-偶合(J-Coupling)：

核子自旋可經由化學鍵產生偶合現象，譬如 1H_N 之質子可和鄰接的 C_α 質子經由 $^1H_N-^1H_\alpha$ 產生三鍵偶合($^3J_{HN\alpha}$)。其偶合之大小，因羰基面之双面角而異，數值約為 4-12Hz 之間，因此測定 $^3J_{HN\alpha}$ 可間接的測得羰基面之双面角 ϕ 。

4. 核子歐豪效應 (Nuclear Overhauser Effect, NOE)：

NOE 係核子自旋，藉由磁偶矩之交互作用而產生磁性轉移之現象。NOE 之大小和兩核子自旋之距離六次元成反比，同時也受核子自旋本身動性之影響，因此測定 σ_{ij} 可測定質子間之距離。

5. 核子自旋弛緩時間 (Relaxation time) :

核子自旋和晶格而互換能量，而失磁性，此在 Z 一方向之磁性弛緩現象稱之為自旋-晶格弛緩(Spin-Lattice relaxation, T1)。此外自旋與自旋間相互作用，導致在 x-y 平面上失去磁性相位同步性的現象稱之為自旋-自旋弛緩(Spin-Spin relaxation, T2)。T₁ 及 T₂ 之大小，主要受到巨分子本身動性之影響，因此測定 T₁ 及 T₂ 可間接算出巨分子之動性(Dynamics)。

IV. 蛋白質結構的特徵：

蛋白質是 20 種 L 型胺基酸串聯而成，每一胺基酸有其特定的 -NH-C-C-? 架。骨架在空間

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \downarrow \\ \text{NH}-\text{C}-\text{C}-? \\ | \\ \text{R} \end{array}$$

上的折疊，而形作蛋白質的結構。由於不同胺基酸邊鏈各異，也相對的影響其骨架結構。因此蛋白質的結構又可區分為骨架結構及邊鏈的結構。骨架結構決定蛋白質立體空間的摺疊，而邊鏈的結構，決定蛋白質的特定功能。骨架的結構又可分為四層次：一級結構指蛋白質胺基酸的序列。二級結構指蛋白質片斷之特殊規則排列。目前發現有三種主要的規則式樣，即 α -螺旋(α -helix)， β -摺片(β -sheet)及轉折(turn)。不符合此三種式樣的

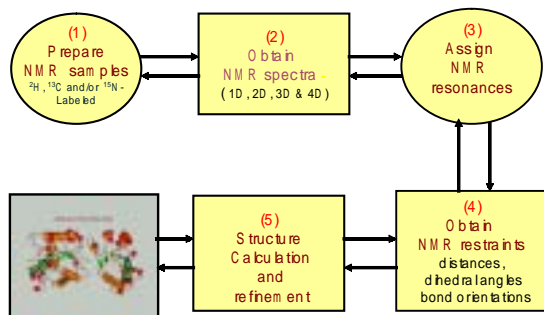
結構則統稱為零散線圈(coil)。“三級結構”則指整個蛋白質單鏈的三度空間折疊。有些蛋白質是由多鏈組成的。每一單鏈有其特定的三級結構。所有單鏈的三級結構，又組合而成一“四級結構”。

蛋白質結構的另一特點是每一胺基酸的 N_i-H 鍵都與前一固胺基酸的，C_{i-1}=O 鍵及 (CO)_{i-1}-C _{α} 鍵共平面，而形成一胜面(圖三)。而每一蛋白質的骨架結構，又可以串聯而成胜面來表示。因此，只要能準確地決定每一胜面在空間上的方向，也就能決定蛋白質骨架的結構。當然，另一種決定蛋白質骨架結構的方法，是測得每一原子的立體座標。這是液態核磁共振，決定蛋白質在液體中結構的方法。理上此法可以完整的決定蛋白質在固態中的結構，但實際上卻非最適合的方法。目前最有效的方法是二法一齊用。決定胜面的方向，以決定骨架的摺疊，再以定點距離測定方法，決定蛋白質邊鏈的結構，或者是骨架中某部份的結構，以此兩互補的方法，同時應用，才能決定完整的蛋白質結構。



圖三. 蛋白質骨架胜肽平面結構圖

V. 蛋白質結構之決定：



圖四. 決定蛋白質結構步驟

圖四列出利用核磁共振法決定生化巨分子之步驟如下：

1. 樣品之取得：

核磁共振之最大優點是它可以直接決定純化的蛋白質在水溶液中結構。所需樣品量約 0.4 毫升濃度 1mM，以分子量為一萬道爾頓之蛋白質，其重量約為 4 毫克，另一需求為蛋白質必須以 ^{13}C 及 ^{15}N 標定，因 ^{13}C 在自然界中含量為 1.1%， ^{15}N 為 0.1%，因此為了取得 ^{13}C 及 ^{15}N 標定之蛋白質，首先必須將蛋白質的基因結構植入大腸桿菌，然後將大腸桿菌培養於含 ^{13}C 之葡萄糖及 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 中。

2. 光譜之取得：

由於蛋白質光譜相當複雜，為求增加解析度及靈敏度，光譜必須在高磁場下取得，一般至少在 500MHz 以上之光譜儀才足以勝任，此外仍須考慮以下因素：

- a. 選擇性測定特定作用：在核子自旋系統中，多重作用同時存在，使得光譜過度複雜，在單一實驗必須壓抑大部份之作用，而只選擇性觀察其中一種作用，如 NOE, J-Coupling 或 dipolar effect。

b. 間接測定靈敏度低的核子自旋： ^{13}C 及 ^{15}N

之靈敏度為 ^1H 之 1.6% 及 0.1%，欲測得這些低靈敏度之核子自旋，一般皆利用 J-Coupling 將其磁性轉移到 ^1H ，作間接之測定，以提高靈敏度。

c. 多維核磁共振光譜：一個分子量為一萬之小

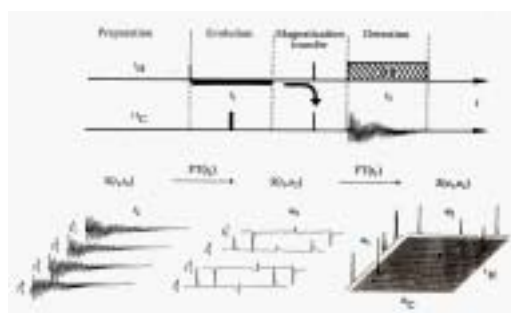
蛋白質，其 ^1H 數在 500 個以上，一般一維共振光譜線重疊非常嚴重，無法分辨，必須在二維及多維光譜上方能有足夠之解釋度，加以分辨所有光譜線，及進一步標定所有光譜線。

d. 水光譜線之壓抑：溶液中水之 ^1H 濃度為

110M，而蛋白質之樣品濃度為 1mM，之間相差 10^5 ，假如實驗時不壓抑水之信息，則蛋白質之信息將無法偵測，這是所謂的 Dynamic Range 的問題。

3. 脈沖系列之設計：

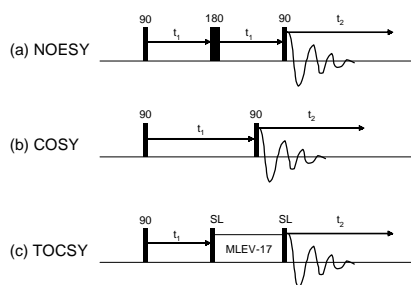
核磁共振之發展日新月異，近年來許多相當聰明的脈沖系列已被發展出來，解決以上所提的種種問題，圖五顯示二維光譜之基本示意圖，此



圖五. 二維核磁共振原理

脈沖系列所得之光譜為異核關聯光譜 (Heteronuclear Correlated Spectrum, HETCOR)。以 ^1H 和 ^{13}C 為例子，在 ^1H 和 ^{13}C 到平衡狀況

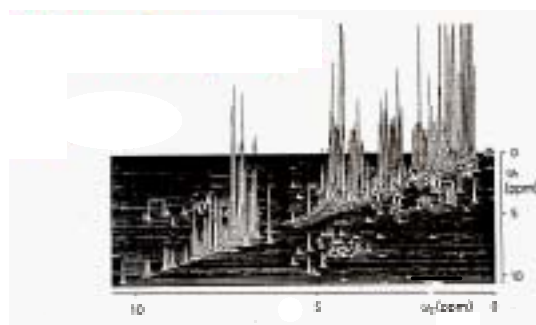
後(預備期)首先以一 90° 之脈沖將 ^1H 翻轉到 x - y 平面上,讓 ^1H 之核子自旋在此平面上自然演化 t_1 時間,且在 $\frac{1}{2} t_1$ 時,注入 ^{13}C 之 180° 脈沖,以消除 ^1H - ^{13}C 之耦合,且為 ^1H 之演化期,接著讓 ^1H - ^{13}C 耦合在一起,以將 ^1H 磁性轉化到 ^{13}C 核子自旋上,此為磁性轉換期,接下來為 ^{13}C 之偵測期,偵得之信息加以傅利葉轉換後,即為 ^{13}C 之一維光譜,如此實驗,重複多次,每次增加固定量之 t_1 , 自 0 to $n t_1$, 則此二系列之信號,作兩次傅利葉轉換後,即為 ^1H - ^{13}C 關聯的二維異核光譜,此光譜第一度空間為 ^1H 而第二度空間為 ^{13}C , 譜上只有 ^1H - ^{13}C 耦合之核子自旋才能顯現出來,至於單獨之 ^{13}C , 如 $-C=O$ 則不能顯現出。



圖六. 同核二維核磁共振脈沖系列

圖六為一組同核二維脈沖系列,實驗結果之二維光譜鳥瞰圖如圖七所示,其對角線為一般的一維光譜,而其非對角線上之交叉峰(Cross peak)之強度,顯示縱座標及橫座標所示化學位移之兩共振線交互作用之大小,如實驗為 NOESY,圖六(a),則非對角線上之交叉峰代表相對之兩共振線距離相距在 6\AA 內,交叉峰之強度亦可用以計算相對應兩核子自旋之距離,依此類推,如光譜為

COSY, 圖六(b)或 TOCSY, 圖六(c), 則非對角線之線峰之存在代表相對兩核子自旋以共價鍵結合在一起(COSY 及 TOCSY)或相隔 2-4 個共價鍵(TOCSY), COSY 及 TOCSY 之光譜亦可用來標定共振線。



圖七. 二維核磁共振原理

圖八為另一系列之標準異核多維光譜,圖八(a)顯示蛋白質骨架上核子自旋間之耦合常數,藉由這些耦合現象,可將磁性隨意的移轉,圖六(b)為 HNC0 異核三維脈沖系列。圖八(c)為三維 HNCA 脈沖系列,此兩系列所得為 ^1H - ^{15}N - ^{13}C 三維光譜。磁性自 $^1\text{H}^N$ 先傳到 ^{15}N 再傳到 ^{13}CO 或 $^{13}\text{C}_\alpha$ 因此可偵測鍵結合在一起的 $^1\text{H}^N$, $^{15}\text{N}^H$ 及 ^{15}CO 或 $^{13}\text{C}_\alpha$ 。藉此可完整標定骨架之 $^1\text{H}^N$, $^{15}\text{N}^H$ 及 ^{15}CO 或 $^{13}\text{C}_\alpha$ 共振線。依此類推利用圖六這一組實驗可完整標定所有骨架之共振線。

Magnetization transfer pathway:

$^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{15}\text{N}$ Chemical shift evolution
 $\rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CS evolution
 $\rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ Detection

圖八. 異核三維核磁共振脈沖系列



4. 結構限制條件(Structural Restraints) :

核磁共振光譜法可取得以下結構的限制：

a) 距離 :

兩核子自旋之間的距離，可由 NOESY 上取得，理論上交叉峰之強度與距離之關係可用數學式子表示，然因蛋白質上的原子並非固定不動，因此難以量化，一般將之區分為強、中、弱、很弱四種，其相對應之距離限制則設定為 1.8-2.5Å, 1.8-3.5Å, 1.8-4.5Å, 1.8-5.5Å。這樣之限制在結構計算上雖稍寬鬆，但數百或數千個這些稍寬之限制同時存在時，彌補了寬鬆的缺點。

b) 雙面角(Dihedral angle) :

蛋白質骨架羧基面間之夾角可用兩雙面角 ϕ 及 ψ 來表示(圖三)，其中 ϕ 角可由 $^1\text{H}^N$ 及 $^1\text{H}_\alpha$ 之 J-Coupling 求得，其關係稱之為 Karplus equation。

$$^3J_{HN\alpha} = 6.4\cos^2(\phi - 60^\circ) - 1.4\cos(\phi - 60^\circ) + 1.9 \quad (3)$$

$^3J_{HN\alpha}$ 可由 COSY 或 HNHA 實驗測得，此外邊鏈之夾角也可由邊鏈間之 J-偶出。

c) 氫鍵(Hydrogen bond) :

蛋白質結構之二級結構 α -螺旋或 β -平板可利用 NMR 光譜線之化學位移指示 (Chemical Shift Indices, CSI) 測得，由於這些二級結構主要靠羧基骨架 NH 及 C=O 氫鍵之形成而得以穩定存在，由 CSI 及特殊 NOE 圖樣判定為某種二級結構之區段結構可用氫鍵加以限制。

d) 殘存磁偶矩(Residual dipolar coupling) :

兩核子自旋之間的磁偶矩交互作用具方向性，其關係如方程式(2)所示。以 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 為例，其 $\Delta\nu_D \sim 40\text{KHz}$ ，但一般蛋白質在水溶液中快速旋轉，其磁偶矩交互作用時間平均值為零，也就失去方向性。假如在水溶液中，加入能成液晶之介質，使蛋白質之轉動受到方向的限制，則這些磁偶矩之時間平均不再為零，此即為殘存磁偶矩，其數值大約為原數值之 0.1%，在蛋白質結構研究上最有用的偶矩為骨架上之 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha - ^{13}\text{C}=\text{O}$ ，及 $^{15}\text{N} - ^{13}\text{C}$ 。測得這些磁偶矩後，可用方程式(2)算出它們和磁場間之夾角，以決定羧基平面之相對方向。因殘存磁偶矩量得之方向以磁場為參考方向，因此為長程之規律，相反的 NOE 及雙面角皆屬短程規律性，利用短程規律性算出之結構，常有長程規律失真現象，利用殘存磁偶矩可消除這些顧慮。

5. 結構之計算 :

結構計算的第一步，是以正確之鍵長建構欲決定結構蛋白質之起始結構，外加以 NMR 取得之結構限制，利用計量矩陣距離幾何運算(metric matrix distance geometry)配合分子動態(Molecular

dynamics)及模擬焠熄(Simulated annealing)方法，計算出最符合結構限制且能量最低之結構。分子之能量包括下列項目：

$$E_{total} = E_{bond} + E_{dih} + E_{improper} + E_{VDW} + E_{dih} + E_{NOE} + E_{RDC} + \dots \quad (4)$$

其中

$$E_{bond} = \sum k_b (b - b_0)^2 \text{ 爲化學鍵能}$$

$$E_{dih} = \sum k_\phi (\phi - \phi_0)^2 + \sum k_\psi (\psi - \psi_0)^2 \text{ 雙} \\ \text{爲面角相關能量}$$

$$E_{improper} = \sum k_{improper} (\omega - \omega_0)^2 \text{ 爲} \text{ 平面變形} \\ \text{能}$$

E_{VDW} 能 van der Waals 作用能，一般以 Lennard - Jones 位能表示

$$E_{NOE} = \sum k_{NOE} (r - r_0)^2 \text{ 爲 NOE 差別之處罰位} \\ \text{能(Penalty potential)}$$

$$E_{RDC} = \sum k_{RDC} (\theta - \theta_0)^2 \text{ 爲殘餘磁偶矩處罰} \\ \text{位能}$$

通常利用一組的結構限制會利用不同之起始結構重覆計算 50-100 個結構，選取其中不違背結構限制且能量最低之 20 個結構加以進一步之分析，且計算出平均結構，加以能量最小化後，作為代表結構，圖九為 20 個牛蛙卵核糖核酸分解酶骨架結



圖九. 20個牛蛙卵核糖核酸分解酶

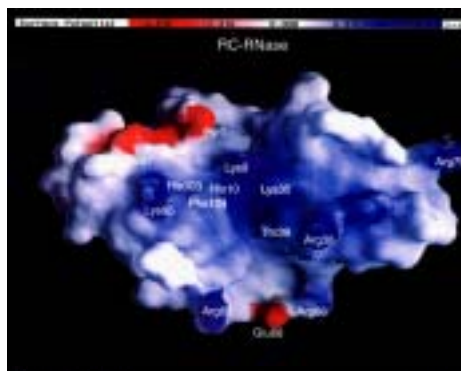
骨架

構之重疊圖，NMR 結構之最大特色為部份重疊相當好，但部份則很鬆散，鬆散部份通常為較具動態之部份。

6. 結構之分析：

a) 蛋白質電性分佈：

圖十顯示牛蛙卵核糖核酸分解酶表面電性之分佈，白色為不帶電部份，紅色為帶負電區域，藍色為帶正電區域，從此圖可以正確的判斷藍色凹下部份為和帶負電之核糖核酸(RNA)之結合區。圖 9 顯示在此區域內之活性中心相關胺基酸之結構，不同顏色表示不同核糖核酸酶，由於這些胺基酸排列之些許差異造成其功能上之差異，並可用以作為理性藥物設計之藍圖。



圖十. 牛蛙卵核糖核酸分解酶

b) 蛋白質之動性：

蛋白質分子在生理狀況下，內部的部份屬於動態狀況，這些動態影響蛋白質功能甚巨，核磁共振法為探討蛋白質動性之最佳方法，蛋白質的動性可由分析 ^{15}N 核子自旋—晶格弛緩時間(Spin-Lattice relaxation time, T_1)，核子自旋—自旋弛緩時間(Spin-Spin relaxation time, T_2)及 ^1H - ^{15}N 之 NOE(XNOE)

取得。 T_1 , T_2 及 XNOE 與動性之關係如下所

示：

$$\frac{1}{T_1} = (d^2/4) [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + C^2 J(\omega_N)$$

$$\frac{1}{T_2} = (d^2/8) [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + (C^2/6) [4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex} \quad (5)$$

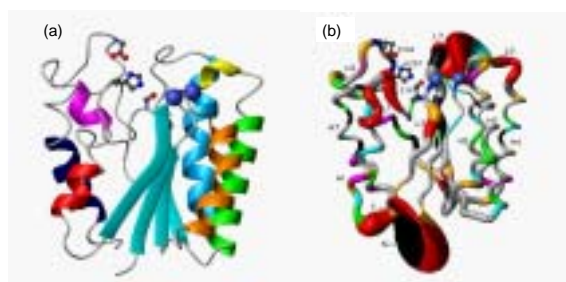
$$XNOE = 1 + (d^2/4)(r_H/r_N)$$

$$[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] T_1$$

式中： d 為與磁偶矩相關常數， c 為與化學位移方向性相關常數 $J(\omega)$ 則為光譜密度函數(Spectral density function)。此函數之形式隨動性之模式而變，如假設蛋白質分子為一堅硬體(rigid body)，且部份結構可作快速內部獨立運轉，則 $J(\omega)$ 可簡化成以下形成：

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_m}{1 + (\omega \tau_m)^2} + \frac{(1 - S_f^2) \tau_f'}{1 + (\omega \tau_f')^2} + \frac{(S_f^2 - S^2) \tau_s'}{1 + (\omega \tau_s')^2} \right] \quad (6)$$

式中 S 為規律常數(Order parameter)($0 \leq S \leq 1$)， $S=1$ 代表該點無動性， $S=0$ 則表示該點作快速無方向性之運轉。 τ_m 為分子整體旋轉之關連時時間(Overall correlation time)， S_f 為內部運動轉之規律常數， τ_f' 為內部快速運轉之關聯時間， τ_s' 為緩慢的內部運轉關聯時間，因此由 T_1 ， T_2 及 XNOE 數據可算出各核子自旋之多種運動相關參數，圖十一(a)顯示大腸桿菌硫酯酶之靜態結構，圖十一(b)顯示大腸桿菌硫酯酶之骨架 ^{15}N 之規律常數， S 。(b)中管子之中心位置為蛋白質骨架之位置，管子之粗細與 S 成反比，此圖顯示大腸桿菌硫酯酶之活性中心具高度動態，此動態與其催化能力及受子之專一性之間有直接之關連。



圖十一。(a)大腸桿菌硫酯酶；
(b)骨架 ^{15}N 之規律常數， S 。

□. 結論：

後基因體時代的來臨也掀開了蛋白質體學研究時代的序幕，探討蛋白質的結構是今後生命科學研究的主要課題，核磁共振光譜學在這方面研究的重要性更為突出，為了加強此方面之研究，特別在國家基因體醫學計劃項下規劃成立高磁場液態核磁共振核心設施，添購多台 800MHz 及 600MHz 核磁共振光譜儀，並裝備低溫超導探頭，以增加其靈敏度，相信在這些儀器相繼安裝運轉後，台灣的生化巨分子核磁共振研究將可更上層樓。由於核磁共振光譜學理論對學生物學生較為艱深，此一領域卻也成生物物理學家的天堂。

VII. 參考資料：

1. Abragam, A. (1961). *The Principles of Nuclear Magnetism*, Chap. VIII pp. 164-322, Clarendon Press, Oxford, UK.
2. Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G. & Skelton, N. J. (1996). *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice*, Academic Press, San Diego.

3. Chang, C. F., Chen, C. P., Chen, Y. C., Hom, K., Huang, R. F. & Huang, T. H. (1998). The Solution Structure of a cytotoxic Ribonuclease from the Oocytes of *Rana catesbeina* (Bullfrog). *J. Mol. Biol.* **283**, 231-244.
4. Huang, Y. T., Liaw, Y. C., Gorbatyuk, V. Y. & Huang, T.-h. (2001). Backbone dynamics of *Escherichia coli* thioesterase/protease I: Evidence of a flexible active-site environment for a serine proease. *J. Mol. Biol.* **307**, 1075-1090.
5. Lin, T. H., Chen, C. P., Huang, R. F., Lee, Y. L., Shaw, J. F. & Huang, T. H. (1998). Multinuclear NMR resonance assignments and the secondary structure of *Escherichia coli* thioesterase/ protease I: A member of a new subclass of lipolytic enzymes. *J. Biomol. NMR*, **11**, 363-380. *J. Biomol. NMR* **11**, 363-380.
6. Wuthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley Interscience, New York.
7. 科儀新知第五卷第一期民國七十二年七月 17-33.
8. 科儀新知第十五卷第六期民國八十年六月