利用核磁共振技术表征生物大分子的动态特性

牛晓刚^{1,2}, 金长文^{1,2,3*}

1. 北京核磁共振中心, 北京 100871

2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

3. 北京分子科学国家研究中心, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: changwen@pku.edu.cn

收稿日期: 2020-06-17; 接受日期: 2020-07-27; 网络版发表日期: 2020-09-14

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0501201)资助项目

摘要 生物大分子的结构是其生物功能的基础。在生命活动中, 生物大分子处于不断运动中, 同时其构象存在化学交换, 因此研究生物大分子的动态特性对于深入理解其结构与功能的关系是十分必要的。液体核磁共振技术可以在原子水平对生物大分子不同位点的动态特性同时进行表征, 能够覆盖从皮秒到秒甚至更慢的时间尺度, 具有其他研究手段不可比拟的优越性。近年来新技术和新方法的发展使核磁共振技术可以研究更大分子量和更加复杂体系的动态特性, 特别是可以研究其他技术方法难以观测到的低丰度激发态。本文介绍了利用核磁共振技术研究生物大分子动态特性的主要方法和近期的一些研究进展。

关键词 核磁共振, 蛋白质, 动力学, 构象交换

1 引言

自20世纪50年代肌红蛋白晶体结构获得解析以来, 人们通过X射线晶体衍射技术、核磁共振技术以及近年来迅猛发展的冷冻电镜技术解析了越来越多的蛋白质及其复合物的三维结构。通过对这些结构的分析, 人们对生物大分子的结构、酶作用的活性位点、蛋白质与蛋白质相互作用等有了更深入的了解。但是, 随着研究的深入, 人们同时认识到仅仅依赖于静态结构并不足以解释蛋白质在生理过程中的作用机理。这是因为解析得到的三维空间结构是静态结构, 然而蛋白质分子在生物体中却始终在不断运动, 其构象也处于变换的过程中, 并通过构象的变换执行不同的生物

功能^[1~3]。这些构象的变换包括蛋白质主链的波动、侧链芳环的快速翻转、不同结构域的相对运动、寡聚体的结构域交换等, 覆盖了从皮秒到秒的时间尺度^[4~7]。

核磁共振技术是目前唯一既可以用来研究皮秒到秒的时间尺度范围, 又可以通过同位素标记和多维实验提供某一具体氨基酸残基位点运动情况的一种研究手段。目前, 人们已经发展了一系列核磁共振的实验方法来研究不同时间尺度上生物大分子的动态特性, 如自旋弛豫实验(纵向弛豫速率 R_1 、横向弛豫速率 R_2 、异核稳态NOE等)^[8,9]、弛豫扩散(CPMG relaxation dispersion, $R_{1\rho}$ dispersion)^[10~12]、化学交换饱和和转移(chemical exchange saturation transfer, CEST)^[13]、残余偶极耦合(residual dipolar coupling, RDC)^[14,15]、顺磁弛豫

引用格式: Niu X, Jin C. Biomolecular dynamic properties probed by solution NMR. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1375–1383, doi: [10.1360/SSC-2020-0101](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0101)

增强(paramagnetic relaxation enhancement, PRE)^[16]等。每种实验方法都有其适用的时间尺度范围, 如自旋弛豫实验主要适于研究皮秒到纳秒范围的动态特性, 弛豫扩散实验主要适于研究微秒到毫秒范围的动态特性, CEST实验适于研究毫秒到秒范围的动态特性等。本文介绍了液体核磁共振技术研究生物大分子动态特性的主要方法及最新的研究进展。

2 生物大分子动态特性研究的主要方法

20世纪90年代以来, 通过二维异核液体核磁共振技术对蛋白质进行多位点动态特性研究的方法得到了极大的发展。尤其是近20年来, 一系列新技术的出现, 使液体核磁共振技术能够研究蛋白质运动中低丰度的, 甚至不可直接观测的构象。这是其他实验技术难以做到的。以下简要介绍了生物大分子动态特性研究的4种主要方法。

2.1 自旋弛豫实验

自旋弛豫实验主要是研究蛋白质主链的¹⁵N原子的弛豫特征, 一般通过测量¹⁵N的纵向弛豫速率 R_1 、横向弛豫速率 R_2 和 $\{^1\text{H}\}$ -¹⁵N异核稳态NOE^[8], 再利用Model-free方法^[17,18]或者约化谱密度函数映射的方法^[19,20]对实验数据进行分析。但是无论采取哪一种数据分析方法, 得到的结果都主要反映了蛋白质在皮秒纳秒时间尺度的运动情况, 而对蛋白质在微秒到毫秒时间尺度的运动情况却无法提供详细的信息且有很大的可能会低估。而这是与蛋白质功能联系最密切的一个时间尺度, 很多蛋白质的重要功能如配体的结合与释放、蛋白质的折叠、别构效应和酶的催化过程等都发生在这一时间尺度上。为了更好地研究蛋白质在微秒到毫秒尺度上的动态特性, 近些年来发展出了弛豫扩散和CEST技术。

2.2 弛豫扩散实验

蛋白质的构象交换往往发生在微秒到毫秒时间尺度上, 弛豫扩散实验就是在这—时间尺度上研究蛋白质动态特性的主要方法之一。在最简单的两态模型假设中, 蛋白质存在两个构象状态A和B, 并且二者之间存在交换, 其交换过程可以表示为

其中 k_{AB} 和 k_{BA} 分别为正向和反向的速率, 两态之间的交换速率为 $k_{\text{ex}}=k_{\text{AB}}+k_{\text{BA}}$ 。由于A和B状态下蛋白质的构象不同, 必然有部分残基在这两个状态下处于不同的化学环境中, 因此具有不同的化学位移。对这部分残基, 将其A和B状态下的化学位移分别用拉莫尔频率标记为 ω_{A} 和 ω_{B} , 它们之间的化学位移差则为 $\Delta\omega=\omega_{\text{A}}-\omega_{\text{B}}$ ^[21]。

CPMG RD实验(CPMG relaxation dispersion)是由一串CPMG自旋回波脉冲序列($\tau_{\text{CP}}-180^\circ-\tau_{\text{CP}}$)所组成(图1(a)), 其中 180° 脉冲的间隔时间 τ_{CP} 的长短不同会导致构象交换对表观测得的横向弛豫速率 R_2^{eff} 具有不同程度的影响^[10,11]。通过改变 τ_{CP} 的长度采集一系列谱图, 得到不同 τ_{CP} 对应的 R_2^{eff} 值, 再根据式(1)对其进行拟合, 可以得到交换的速率 k_{ex} , 两态各占的比例 p_{A} 、 p_{B} 和化学位移的差的绝对值 $|\Delta\omega|$ (图1(b))^[22]。CPMG RD实验通常用于检测交换速率在 $200\sim 2000\text{ s}^{-1}$ 范围内的构象交换。

$$R_2(1/\tau_{\text{CP}}) = \frac{1}{2} \left[R_{2\text{A}}^0 + R_{2\text{B}}^0 + k_{\text{ex}} - \frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \cosh^{-1} [D_+ \cosh(\eta_+) - D_- \cosh(\eta_-)] \right]$$

$$D_{\pm} = \frac{1}{2} \left[\pm 1 + \frac{\psi + 2\Delta\omega^2}{(\psi^2 + \xi^2)^{1/2}} \right]$$

$$\eta_{\pm} = \frac{\tau_{\text{CP}}}{\sqrt{2}} [\pm \psi + (\psi^2 + \xi^2)^{1/2}]^{1/2}$$

$$\psi = (R_{2\text{A}}^0 - R_{2\text{B}}^0 - p_{\text{A}} k_{\text{ex}} + p_{\text{B}} k_{\text{ex}})^2 - \Delta\omega^2 + 4p_{\text{A}} p_{\text{B}} k_{\text{ex}}^2$$

$$\xi = 2\Delta\omega (R_{2\text{A}}^0 - R_{2\text{B}}^0 - p_{\text{A}} k_{\text{ex}} + p_{\text{B}} k_{\text{ex}})$$
(1)

另外一种基于 $R_{1\rho}$ 的弛豫扩散实验被称为 $R_{1\rho}$ dispersion。 $R_{1\rho}$ 实验是通过外加一个射频场, 将自旋锁定在一个强度为 ω_{e} 的有效场方向上, 并在该有效场的旋转坐标系中观测自旋的弛豫情况。该弛豫速率决定于有效场的大小、方向以及构象交换的动力学参数($p_{\text{A}}p_{\text{B}}$ 、 $|\Delta\omega|$ 和 k_{ex})^[12]。通过变换有效场的大小和方向, 可以像CPMG RD实验一样得到一系列随有效场变化的弛豫速率 $R_{1\rho}$ 的数值, 并由数据拟合得到构象交换的参数。 $R_{1\rho}$ 实验可以测量交换速率更快的构象交换过程,

图 1 (a) CPMG RD实验中的自旋回波脉冲; (b) 对实验数据利用式(1)进行数据拟合(网络版彩图)

Figure 1 (a) Spin echo pulses in CPMG experiments; (b) CPMG data fitting using eq. (1) (color online).

其检测范围大约在 $1000\sim 50000\text{ s}^{-1}$.

2.3 化学交换饱和和转移实验

上述弛豫扩散实验是通过测量构象交换对横向弛豫速率的影响来研究蛋白质运动的, CEST则是将低丰度激发态构象的信息通过化学交换饱和和转移的方式传递给高丰度基态构象并加以放大, 使前者得以被检测. 如图2(a)所示, 假设蛋白质存在两个相互交换的构象状态, 分别称为A和B, 其中A是基态, B是激发态. 对于蛋白质上的某个特定的 ^{15}N 自旋, 其在A和B状态下具有不同的化学位移, 分别表示为 ω_A 和 ω_B . 其中, A态下的信号可以进行直接观测, 而由于B构象丰度很低, B态下的信号难以直接观测. 在 ^{15}N CEST实验中(图2(b)), ^{15}N 核的自旋保持在纵向, 通过在横向施加一个持续时间为 T_{EX} 的弱磁场 B_1 对特定频率的信号进行饱和, 其激发频率在 ^{15}N 的化学位移范围内以一定的步长连续变化. 与此同时, 我们对基态构象对应的 ^{15}N 信号进行观测: 当 B_1 的激发频率远离 ω_A 和 ω_B 时, 该自旋基态构象的信号不受影响; 当 B_1 的激发频率与化学位移 ω_A 重合时, 可以观测到基态构象A的信号因饱和而发生明显减弱; 当 B_1 的激发频率与化学位移 ω_B 重合时, 由于A和B之间存在交换, 则由于化学交换饱和和转移现象导致A态的信号也发生减弱. 因此, 对于两态交换的情形, 在CEST实验结果中能够观测到两个位置出现信号减弱, 最明显的一处对应A态, 另一处对应B态(图2(c)).

图 2 ^{15}N CEST实验原理与实验数据拟合. (a) 两态(A和B)交换模型下, ^{15}N 自旋的一维谱. (b) ^{15}N CEST实验的脉冲示意图. (c) 基态 ^{15}N 信号的强度变化和实验数据拟合. 图中 I_0 表示为未加弱磁场 B_1 时基态 ^{15}N 信号的强度, I 表示加了持续时间为 T_{EX} 的弱磁场 B_1 后基态 ^{15}N 信号的强度. 红色和蓝色代表不同弱磁场 B_1 强度下采集的两组数据(网络版彩图)

Figure 2 Theory of ^{15}N CEST and data fitting. (a) Spectrum of a ^{15}N spin exchanging between states A and B. (b) A schematic pulses sequence of ^{15}N CEST. (c) A representative intensity profile of a spin in state A with the change of B_1 offset. I and I_0 are the peak intensities of the ^{15}N spin in state A with and without the application of the B_1 field. Red and blue represent data collected under different B_1 field strengths (color online).

对观测结果进行数据拟合, 可以获得构象交换相关的动力学参数(p_A 、 p_B 、 k_{ex} 、 $\Delta\omega$)^[13].

CEST实验适合研究交换速率在 $20\sim 200\text{ s}^{-1}$ 的构象交换. 相比CPMG RD实验, CEST实验更适合于研究比较慢的构象交换, 并且可以精确地给出激发态化学位移信息. 另外, 相比于测量时自旋处于横向的CPMG RD实验, CEST实验观测时 ^{15}N 自旋处于纵向, 所以也更适合研究分子量大的蛋白质. 分子量大的蛋白质具有较快的横向弛豫速率, 在CPMG实验中会由于信号衰减快而导致谱图的信噪比较差, 进而影响结果的准确性.

将CEST和CPMG RD实验结合使用, 可以覆盖交换速率在 $20\sim 2000\text{ s}^{-1}$ 范围内的构象交换运动. 除了主链的 ^{15}N 原子以外, CEST和CPMG RD实验还可以应用于 H_N 、 C_α 、 CO 、 C_β 和侧链甲基 ^{13}C 等自旋系统^[23~35]. 此外还可以在蛋白质的特定位点进行 ^{19}F 标记, 进行 ^{19}F

的CEST和CPMG RD实验^[36,37]。这些不同标记方法和测量对象的选择为研究不同蛋白质的构象交换提供了有效的手段。例如,对于分子量在40 kDa以上的蛋白质,由于主链原子弛豫时间比较短,常用的主链¹⁵N CEST和CPMG RD实验可能无法得到比较准确的结果。在这种情况下,可以选择对弛豫衰减比较慢的甲基¹³C自旋进行表征。对于无法进行常规主链和侧链谱峰指认的蛋白,还可以采用选择性标记的方法研究特定位点上的构象交换。

传统的CEST和CPMG实验都是采用二维谱方式来进行数据采集的,这样可以得到目标蛋白质中所有氨基酸的运动情况。对某些特定的蛋白质体系,研究者感兴趣的仅仅是与功能密切相关的少数重要氨基酸残基,而采集整套的二维谱则需要占用大量的实验时间。另外,处在构象交换运动中的氨基酸往往具有较快的横向弛豫速率,导致其核磁共振信号较弱,需要增加累加次数来获得较高质量的数据。在这种情况下,如果采用常规的二维核磁共振方法,可能使实验时间过长,甚至达到无法接受的程度。

针对以上缺陷,本课题组对传统的CPMG RD和CEST实验的脉冲进行了改进,引入Hartmann-Hahn极化转移传递代替传统实验脉冲中的INEPT传递^[38],可以通过设置极化转移中连续波的频率来实现对特定氨基酸残基信号的激发和传递。将二维核磁实验转换成一维,从而极大地压缩了实验时间。同时,由于该方法在进行数据采集时不需要在间接维进行演化标记,使得整个脉冲时间缩短,减少了信号衰减,在同样的采样时间中可以较大幅度地提高信号的灵敏度(约3~4倍以上),从而获得高质量的实验数据^[39]。此外,针对二维谱上谱峰重叠比较严重的区域,我们开发了基于Hartmann-Hahn极化转移的选择性二维实验,通过选择¹H和¹⁵N两个维度中一小部分化学位移范围内的信号,做一个局部的二维核磁共振谱。由于间接维的谱宽很窄,因此只需要采集6~8个复数点即可实现间接维标记,相比常规二维实验可以节省大量时间,并克服谱图重叠的问题。以上方法也可以应用于C_α、C_β以及甲基侧链¹³C自旋的构象交换研究。

2.4 其他用于蛋白质动态特性研究的核磁实验方法

除了上述方法外,还有很多其他的核磁实验方法

可以用于蛋白质动态特性的研究。例如在ZZ-exchange实验中,通过在间接维标记和直接维采样模块之间插入一段混合时间,可以检测交换速率大约在1~10 s⁻¹量级的构象交换运动^[40]。在残余偶极耦合(RDC)实验中,RDC值对化学键的空间角度的变化极其敏感,而化学键的相对空间角度又与整个大分子的结构和运动密切相关,通过测量RDC的值可以分析蛋白质大分子的运动特征^[41]。此外,顺磁弛豫增强(PRE)效应对空间距离的变化非常敏感,分析PRE实验的结果也可以得到蛋白质大分子动态结构变化的情况^[42]。理论上,RDC与PRE实验所涵盖的运动时间尺度包括了从皮秒到秒的时间尺度,但其应用目前还受到较多的局限。首先是样品的制备,RDC实验需要把蛋白质样品放到合适的液晶介质里,PRE实验则需要给蛋白质在合适的位置标记顺磁探针,这就限制了这两种方法可以应用的蛋白质范围。其次是RDC和PRE实验的数据分析依赖于精确的蛋白质三维结构模型,无法像CEST和CPMG RD实验一样直接得到蛋白质构象交换的动力学信息。

3 生物大分子动态特性的研究进展

近10多年来,随着核磁共振技术的飞速发展,人们运用核磁共振技术对许多重要生物大分子进行了动态结构研究,揭示了生物大分子动态特性与生物功能之间的关系。以下结合国际上及本课题组最近相关的研究工作,介绍了4个研究生物大分子动态特性及其与功能关系的实例。

3.1 天然无结构蛋白的相互作用

天然无结构蛋白(intrinsically disordered proteins, IDP)是指在生理条件下没有稳定结构的一类蛋白质。许多天然无结构蛋白在自由状态下没有结构,但在与相互作用的其他蛋白或配体结合后会形成一定的二级或三级结构^[43,44]。在这个过程中,相互作用如何诱导天然无结构蛋白发生折叠的分子机制尚不清楚。核磁共振动态结构检测方法在研究这类问题时具有先天的优势,并在近年来广泛得到应用。

Wright研究组^[45]在2007年利用CPMG RD等实验方法对CREB蛋白的磷酸化激酶诱导激活结构域pKID与KIX结构域的结合过程进行了研究。pKID在自由状态下是无结构的,与KIX结合后会形成两端α螺旋的结

构. 他们对不同结合比例下的pKID进行了 ^{15}N CPMG RD实验, 发现自由态的pKID不存在构象交换, 加入KIX后则开始出现构象交换现象. 不同结合比例下的CPMG RD数据无法用两态模型(式(2))解释, 但可以用三态模型(式(3))解释. 这说明pKID与KIX的结合过程符合诱导契合(induce-fit)模型, 即在结合过程中pKID先部分折叠形成一个中间体, 最后与KIX完全结合后再形成稳定的结构.

Free (F) Intermediate (I) Bound (B)

2015年, 该研究组对另一个天然无结构蛋白c-Myb与KIX结构域的相互作用进行了研究, 发现c-Myb与KIX结合时采用了完全不同的机制. c-Myb的N端在自由态时就有很强的 α 螺旋形成倾向, 结合机制更符合构象选择(conformation selection)模型, 而其C端则没有形成 α 螺旋的倾向, 在结合时采用了诱导契合模型. 这一结果说明天然无结构蛋白自身形成二级结构的倾向性决定了其采用的结合模式^[46].

3.2 条件性无结构蛋白质的折叠与功能的关系

肠道细菌膜间质HdeA蛋白是一类抗酸分子伴侣, 在酸胁迫条件下行使保护底物蛋白、防止其聚沉的功能. HdeA蛋白在中性条件下是具有良好折叠的二聚体形式, 但没有活性; 在酸性条件下则开始发生去折叠并获得分子伴侣活性^[47-49].

为了研究酸诱导的去折叠过程与分子伴侣功能活化之间的联系, 本课题组对HdeA蛋白在酸性条件下的构象进行了研究, 发现在pH低于2.0时, HdeA会发生大部分去折叠, 并暴露出两个疏水片段. 进一步在不同pH下对HdeA进行 ^{15}N CEST实验测定(图3), 结果显示尽管在pH ≥ 3.0 的条件下HdeA主要呈现良好折叠的状态, 但三个敏感结构区从pH 3.5开始就出现了低丰度的去折叠态信号. 随着pH的降低(从pH 3.5到2.5), 去折叠态的比例逐渐升高, 其寿命也逐渐加长, 直到HdeA蛋白完全变为无结构的状态.

上述动态结构研究为我们提供了一个HdeA的分

图3 HdeA蛋白V49残基在环境为pH 3.5、3.0、2.5下的 ^{15}N CEST实验曲线. 数据拟合结果显示去折叠激发态的比例分别为0.3%、0.9%和5.9%, 寿命依次为2、4.6和15 ms (网络版彩图)

Figure 3 ^{15}N CEST profiles of HdeA V49 at pH 3.5, 3.0 and 2.5. The population of the excited unfolded state is 0.3%, 0.9% and 5.9%, and its lifetime is 2, 4.6 and 15 ms, respectively (color online).

步激活机制模型(图4). 在中性条件下, HdeA具有完整的三级结构, 两个疏水性的底物结合位点被保护, 因此不具有活性; 当pH降低, 3个对pH敏感的结构区域开始变得不稳定, 出现了去折叠的激发态构象, 并导致两个疏水片段的逐步暴露; 当pH降低至2以下, 整个蛋白完全去折叠, 活性最大化. 这一结果说明对于条件性无结构蛋白HdeA来说, 其去折叠过程中蛋白质构象的动态变化对于分子伴侣活性的调控具有重要作用^[50].

3.3 酶的催化

砷酸还原酶(ArsC)在生物体的砷解毒系统中发挥重要作用. 枯草芽孢杆菌的ArsC蛋白催化五价砷还原为三价砷, 其自身被上游偶联的硫氧还原蛋白(Trx)还原并再生^[51]. 本课题组^[52-54]在过去的研究中解析了ArsC蛋白及其复合物的一系列三维空间结构, 提出了ArsC催化砷还原和自身活性再生的分子机理. 在此基础上, 进一步利用CPMG RD和CEST等实验方法对级联催化反应中不同状态下的ArsC和Trx蛋白进行了动态特性的研究^[55]. 结果表明, ArsC蛋白在反应过程中的不同阶段具有复杂的构象交换运动(图5(a)), 其中, 无论是具有催化活性的还原态, 或是短暂存在的反应中间态, ArsC活性中心附近的氨基酸残基表现出的构象交换无法用简单的两态模型解释, 而涉及3种或4种以上的构象状态, 需要用更复杂的模型加以描述. 由于这些构象交换过程覆盖了从 10 s^{-1} 到 3000 s^{-1} 的时间范围, 单独使用CPMG RD或者CEST实验无法完整地研究其结构的动态特征. 因此, 我们采用了 ^{15}N CPMG

图4 HdeA的分步激活机制。浅蓝和深蓝部分表示与底物相互作用的两个疏水片段I和II。标记a、b、c的是对环境pH变化敏感的3个区域^[50] (网络版彩图)

Figure 4 Multistep activation mechanism of HdeA. The two hydrophobic binding patches (I, II) are colored light blue and deep blue. The three pH-sensitive regions are named a, b and c ^[50] (color online).

RD和CEST联用的方式实现了对ArsC蛋白复杂动态结构的精确表征,并绘制了ArsC在催化反应不同阶段的能量景观图(图5)。结果表明,ArsC蛋白内部不同结构区域之间的运动耦合以及ArsC与Trx蛋白之间的运动耦合,是推动催化反应向下一阶段进行的关键,揭示了蛋白质动态特性对于酶催化反应的重要作用。

3.4 核酸的动力学研究

近些年的研究表明,非编码RNA在生命过程中起了非常重要的作用,因此对RNA的结构研究越来越受

图5 ArsC蛋白质动态特性在酶催化反应中的重要作用。(a) ArsC和Trx蛋白在催化反应不同阶段的动态结构。彩色小球表示有构象交换的残基,同种颜色表示处在相同的运动过程中,数字表示构象交换的速率。(b) ArsC在催化反应过程中的能量景观图。G代表基态,E代表激发态(网络版彩图)

Figure 5 Importance of ArsC dynamic properties in enzyme catalysis. (a) Protein dynamics of ArsC and Trx in different stages of the catalytic reaction. Colored balls represent the residues under conformational exchange, and each color represents a distinct exchange process. (b) The energy landscape of ArsC in different reaction stages. G and E represent the ground state and the excited state, respectively (color online).

到重视。核磁共振方法在这方面发挥了重要作用,接近1/2的RNA结构是采用核磁共振方法解析的^[56]。为了进一步理解RNA结构与功能的关系,也需要对其进行动态特性的研究。

对RNA进行动态特性的研究基本采用蛋白质研究中对应的实验方法,同时根据RNA的性质做相应的改进。各种方法适用的时间尺度也与蛋白质研究一致^[57]。2013年,Zhang研究组^[58]将CEST实验和 $R_{1\rho}$ dispersion实验改进后用于核糖开关RNA的动态特性研究,发现其存在一个构象交换速率在 100 s^{-1} 左右的激

发态构象。

目前, 对于RNA的核磁共振研究还处于起步阶段, 相关的成果研究相对较少。未来需要更多的研究来揭示RNA动态结构和功能的关系。

4 总结

随着新的技术和方法的不断发展, 液体核磁共振技术在研究生物大分子动态特性方面越来越体现出独特的优势。尤其是近些年来发展完善的弛豫扩散和

CEST等技术, 使得研究生物大分子的构象交换以及检测低丰度的激发态构象等成为可能。核磁共振技术的这一优越性可以帮助我们从小分子水平阐明生物大分子的动态结构与生物学功能的关系, 并随着技术的进一步发展, 实现在更多复杂生物大分子体系中的应用。为了更好地表征复杂生物大分子的动态结构, 核磁共振技术需要与X射线晶体学、冷冻电镜、X射线小角散射以及动力学模拟计算等方法结合起来, 通过不同技术的优势互补, 使研究人员能更好地在原子水平上研究生物大分子的动态特性和作用机理。

参考文献

- 1 Henzler-Wildman K, Kern D. *Nature*, 2007, 450: 964–972
- 2 Baldwin AJ, Kay LE. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 808–814
- 3 Alderson TR, Kay LE. *Curr Opin Struct Biol*, 2020, 60: 39–49
- 4 Lisi GP, Patrick Loria J. *Prog Nucl Magn Reson Spectr*, 2016, 92–93: 1–17
- 5 Wright PE, Dyson HJ. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 18–29
- 6 Smock RG, Gierasch LM. *Science*, 2009, 324: 198–203
- 7 Motlagh HN, Wrabl JO, Li J, Hilser VJ. *Nature*, 2014, 508: 331–339
- 8 Fischer MWF, Majumdar A, Zwietering ERP. *Prog Nucl Magn Reson Spectr*, 1998, 33: 207–272
- 9 Jarymowycz VA, Stone MJ. *Chem Rev*, 2006, 106: 1624–1671
- 10 Loria JP, Rance M, Palmer AG. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 2331–2332
- 11 Tollinger M, Skrynnikov NR, Mulder FAA, Forman-Kay JD, Kay LE. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 11341–11352
- 12 Palmer AG, Massi F. *Chem Rev*, 2006, 106: 1700–1719
- 13 Vallurupalli P, Bouvignies G, Kay LE. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8148–8161
- 14 Tjandra N, Bax A. *Science*, 1997, 278: 1111–1114
- 15 Tolman JR, Flanagan JM, Kennedy MA, Prestegard JH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9279–9283
- 16 Clore GM, Tang C, Iwahara J. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 603–616
- 17 Lipari G, Szabo A. *J Am Chem Soc*, 1982, 104: 4559–4570
- 18 Lipari G, Szabo A. *J Am Chem Soc*, 1982, 104: 4546–4559
- 19 Farrow NA, Zhang O, Forman-Kay JD, Kay LE. *Biochemistry*, 1995, 34: 868–878
- 20 Farrow NA, Zhang O, Szabo A, Torchia DA, Kay LE. *J Biomol NMR*, 1995, 6: 153–162
- 21 Palmer AG, 3rd, Kroenke CD, Loria JP. *Methods Enzymol*, 2001, 339: 204–238
- 22 Carver JP, Richards RE. *J Magn Reson*, 1972, 6: 89–105
- 23 Vallurupalli P, Sekhar A, Yuwen T, Kay LE. *J Biomol NMR*, 2017, 67: 243–271
- 24 Yuwen T, Huang R, Kay LE. *J Biomol NMR*, 2017, 68: 215–224
- 25 Long D, Sekhar A, Kay LE. *J Biomol NMR*, 2014, 60: 203–208
- 26 Sekhar A, Rosenzweig R, Bouvignies G, Kay LE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2794–E2801
- 27 Bouvignies G, Vallurupalli P, Kay LE. *J Mol Biol*, 2014, 426: 763–774
- 28 Vallurupalli P, Kay LE. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 4156–4159
- 29 Yuwen T, Sekhar A, Kay LE. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 6122–6125
- 30 Yuwen T, Vallurupalli P, Kay LE. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 11490–11494
- 31 Yuwen T, Huang R, Vallurupalli P, Kay LE. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 6250–6254

- 32 Gopalan AB, Yuwen T, Kay LE, Vallurupalli P. *J Biomol NMR*, 2018, 72: 79–91
- 33 Raum HN, Dreydoppel M, Weininger U. *J Biomol NMR*, 2018, 72: 105–114
- 34 Hansen DF, Vallurupalli P, Lundström P, Neudecker P, Kay LE. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 2667–2675
- 35 Vallurupalli P, Flemming Hansen D, Kay LE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11766–11771
- 36 Aramini JM, Hamilton K, Ma LC, Swapna GVT, Leonard PG, Ladbury JE, Krug RM, Montelione GT. *Structure*, 2014, 22: 515–525
- 37 Gao J, Liang E, Ma R, Li F, Liu Y, Liu J, Jiang L, Li C, Dai H, Wu J, Su X, He W, Ruan K. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 12982–12986
- 38 Pelupessy P, Chiarparin E. *Concepts Magn Reson*, 2000, 12: 103–124
- 39 Niu X, Ding J, Zhang W, Li Q, Hu Y, Jin C. *J Magn Reson*, 2018, 293: 47–55
- 40 Farrow NA, Zhang O, Forman-Kay JD, Kay LE. *J Biomol NMR*, 1994, 4: 727–734
- 41 Salmon L, Blackledge M. *Rep Prog Phys*, 2015, 78: 126601
- 42 Clore GM. *Methods Enzymol*, 2015, 564: 485–497
- 43 Toth-Petroczy A, Palmedo P, Ingraham J, Hopf TA, Berger B, Sander C, Marks DS. *Cell*, 2016, 167: 158–170.e12
- 44 Tompa P. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37: 509–516
- 45 Sugase K, Dyson HJ, Wright PE. *Nature*, 2007, 447: 1021–1025
- 46 Arai M, Sugase K, Dyson HJ, Wright PE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 9614–9619
- 47 Hong W, Jiao W, Hu J, Zhang J, Liu C, Fu X, Shen D, Xia B, Chang Z. *J Biol Chem*, 2005, 280: 27029–27034
- 48 Yang F, Gustafson KR, Boyd MR, Wlodawer A. *Nat Struct Mol Biol*, 1998, 5: 763–764
- 49 Yu XC, Yang C, Ding J, Niu X, Hu Y, Jin C. *Biochemistry*, 2017, 56: 5748–5757
- 50 Yu XC, Hu Y, Ding J, Li H, Jin C. *J Biol Chem*, 2019, 294: 3192–3206
- 51 Messens J, Silver S. *J Mol Biol*, 2006, 362: 1–17
- 52 Li Y, Hu Y, Zhang X, Xu H, Lescop E, Xia B, Jin C. *J Biol Chem*, 2007, 282: 11078–11083
- 53 Hu C, Yu C, Liu Y, Hou X, Liu X, Hu Y, Jin C. *J Biol Chem*, 2015, 290: 22262–22273
- 54 Yu C, Xia B, Jin C. *Biomol NMR Assign*, 2011, 5: 85–87
- 55 Zhang W, Niu X, Ding J, Hu Y, Jin C. *Sci Rep*, 2018, 8: 15448
- 56 Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, Schwalbe H. *ChemBioChem*, 2003, 4: 936–962
- 57 Marušič M, Schlagnitweit J, Petzold K. *ChemBioChem*, 2019, 20: 2685–2710
- 58 Zhao B, Hansen AL, Zhang Q. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 20–23

Biomolecular dynamic properties probed by solution NMR

Xiaogang Niu^{1,2}, Changwen Jin^{1,2,3*}

¹ Beijing Nuclear Magnetic Resonance Center, Beijing 100871, China

² College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

³ Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Beijing 100871, China

*Corresponding author (email: changwen@pku.edu.cn)

Abstract: Functions of biomolecules such as proteins and nucleic acids depend on their structures. However, these biomolecules are highly dynamic during biological processes and often interconvert among multiple conformations. Analyses of biomolecular dynamics are essential for a deep understanding of their structure-function relationship. Solution NMR method has unique advantages in analyzing the dynamic properties of biomolecules at the atomic level, while at the same time capturing the dynamic processes ranging from pico-second to second timescales, which is difficult for other biophysical techniques. In particular, recent progress in solution NMR made it more convenient to investigate the sparsely-populated, invisible conformational state. Herein, we summarized some commonly used NMR techniques in the studies of biomolecular dynamics and discuss a few examples of their applications.

Keywords: NMR, protein, dynamics, conformation exchange

doi: [10.1360/SSC-2020-0101](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0101)