

虽然形式上还相像,但是物理意义却大不相同。在时间反演时物理系统已经变为它的镜像体系了。手性分子的时空偶合特征不但影响了它们耗散部分,也影响了它们的非耗散部分。从这里我们看到微观分子的不对称性对宏观世界的时间不可逆性是有关系的。

除此之外,一般 H 定理对两种分子镜像系统都成立的,即

$$\frac{ds^r}{dt} \geq 0 \quad \frac{ds^s}{dt} \geq 0 \quad (22)$$

但熵产率的时间反演性质却有了新的内容,即

$$\sigma^r = -\sigma^s$$

$$\sigma^s = -\sigma^r$$

两个镜像系统熵产率是不一样的,这里就有一个有趣味的推论:对应一个不对称外场,两个镜像系统有着不同的熵产率,一个大于,一个小于它的消旋系。相对地说,两个系统有不同的时间箭头。从这个意义上看,分子手性可能对进行的自然选择机理的探讨提供了一个线索。

参 考 文 献

- [1] Byk, A.: *Z. Phys. Chem.*, **49**, 641, 1904.
Cotton, A.: *Ann. Chim. Phys.*, **8**, 347, 1896.
Drude, P.: *Lehrbuch der Optik*, Kap. 6, 1900.
Karagunis, G. and Drikos, G.: *Z. Phys. Chem.*, **26**, 428, 1934.
Kuhn, W. and Braum, E.: *Naturwiss.*, **17**, 227, 1929.
Kuhn, W. and Knopf, E.: *Naturwiss.*, **18**, 183, 1930a.
Kuhn, W. and Knopf, E.: *Z. Phys. Chem.*, **7**, 292, 1930b.

- van't Hoff, J. H.: *Die Lagerung der Atom in Raume*. 2nd ed. 1894.
[2] Goldschmidt, V. M.: *New Biology*, **12**, 97, 1952.
Scheifst, H.: In *"Von Unbelebten zum Lebendigen"*. Becher et al. 1956.
Schwab, G. M., Rost, F. and Rugolph, L.: *Kolloid Z.*, **68**, 197, 1934.
[3] Landolt, H.: *Ber. Dt. Chem. Ges.*, **29**, 2404, 1896.
Jungfleisch, E.: *Bull. Soc. Chim. Paris*, **41**, 222, 1884.
Kipping, F. S. and Pope, J., *Nature*, **59**, 53, 1898.
Havinga, E.: *Biochem. Biophys. Acta*, **13**, 171, 1954.
Schlenk, W.: *Angew. Chem.*, **67**, 762, 1955.
Morowitz, H. J.: *J. Theor. Biol.*, **25**, 491, 1969.
[4] Vester, F., Ulbricht, T. L. V. and Krauch, H.: *Naturwiss.*, **46**, 68, 1959.
Ulbricht, T. L. V.: *Quart. Rev.*, **13**, 48, 1959.
Ulbricht, T. L. V. and Vester, F.: *Tetrahedron*, **28**, 629, 1962.
Yamagata, Y.: *J. Theor. Biol.*, **11**, 495, 1966.
Garay, A. S.: *Nature*, **219**, 338, 1968.
[5] Frank, F. C.: *Biochem. Biophys. Acta*, **11**, 495, 1953.
Iwamoto, K. and Seno, M.: *J. Chem. Phys.*, **70**, 5858, 1979.
[6] Zocher, H. and Torok, C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, **39**, 681, 1953.
[7] Xu, J. H. and Ding, D. F.: *Paper being submitted to Scientia Sinica*, 1980.
[8] Condon, E. U.: *Rev. Mod. Phys.*, **9**, 432, 1937.
Condon, E. U., Altar, W. and Eyring, H.: *J. Chem. Phys.*, **5**, 753, 1937.
Moseowitz, A.: *Adv. Chem. Phys.*, **4**, 67, 1962.
[9] Rosenfeld, L.: *Z. Physik.*, **52**, 161, 1928.
[10] Zwanzig, R.: *Phys. Rev.*, **124**, 983, 1961.
Mori, H.: *Prog. Theor. Phys.*, **33**, 423, 1965.
[11] Prigogine, I. et al.: *Chem. Scripta*, **4**, 5, 1973.

[本文于1980年8月23日收到]

核磁共振及其在分子生物学中的应用(一)

华 庆 新

(中国科学院生物物理研究所)

近十几年来,由于超导磁体、快速傅里叶变换技术的迅速发展,核磁共振(NMR)的灵敏度提高了二十倍,场强提高了四倍。1979年美国卡内基-梅隆大学已研制成14.1万高斯场强的

600 MHz NMR 仪。核磁共振在分子生物学、生物物理学、生物化学等领域已得到广泛应用,取得了显著成绩。核磁共振与X射线分析已成为研究生物大分子结构的两项不可或缺的重要

技术。据统计^[1], NMR 在分子生物学蛋白质、氨基酸方面的研究文献, 由 1971 年到 1977 年数量增加了四倍; 现在每年都有几百篇文献。1977 年 5 月英国生物物理学会专题讨论了核磁共振在生物学中的应用, 引起了广泛重视。因此, 了解并掌握核磁共振的基本原理, 主要特性参数及其在分子生物学中的应用, 对从事分子生物学、生物物理学的科研工作者尤为迫切。本文试就此作一简略介绍。

一、原理及仪器

核磁矩不为零的原子核, 在静磁场中都可发生能级的分裂。以最简单的氢核为例, 其自旋 $I = \frac{1}{2}$, 在静磁场 H_0 中, 可有顺磁场和逆磁场两种取向。顺磁场的 ^1H 核居较低能态, 逆磁场的 ^1H 核居较高能态。二者能级差

$$\Delta E = r\hbar H_0,$$

其中 r 为回磁比即磁旋比, $\hbar = h/2\pi$, h 为普朗克常数。

根据量子力学的选择定则, 只有当 $\Delta M = 0, \pm 1$ 时, 粒子才会发生跃迁 (M 为磁量子数。 $M = I, I - 1 \cdots -I$)。当外加一与静磁场 H_0 垂直的射频场 H_1 , 使其频率满足 $h\nu = r\hbar H_0$ 时, 低能态核吸收外加射频场的能量跃迁至高能态。所谓核磁共振现象, 就是原子核在外磁场作用下, 产生能级分裂, 然后吸收射频电磁场的能量, 发生磁能级间的共振跃迁。可固定 H_0 , 改变 ν (扫频法); 也可固定 ν , 改变 H_0 (扫场法) 来满足共振条件。各原子核 r 值不同, 就有不同的共振条件。对于质子, $\nu = 4.26 \times 10^3$, H_0 当外磁场在 10^4 — 10^5 高斯范围时, 电磁波频率为几十至几百兆赫, 处于无线电射频波段, 故核磁共振波谱学又称射频波谱学。

在不同能态上的粒子数分布遵循玻尔兹曼分布规律, 即 $\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$ (K 为玻尔兹曼常数, T 为绝对温度)。在常温下, 对质子而言, N_1/N_2 在 10^{-3} 数量级。当发生核磁共振时, 电磁场能量被核系统部分吸收而减小, 高低能态粒子数

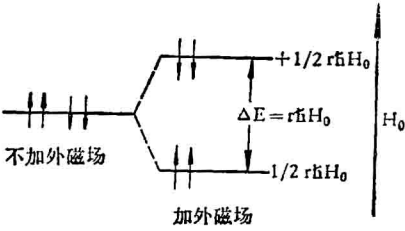


图 1 $I = \frac{1}{2}$ 的核在磁场中的能级分裂

之差改变。粒子由低能级跃迁到高能级后, 通过弛豫机构(自旋-晶格弛豫和自旋-自旋弛豫)放出能量, 又回到低能态。由此不断吸收射频场能量, 才有持续的核磁共振信号。若射频场太强, 弛豫饱和, 则观察不到核磁吸收信号。

生物体中的 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{14}N 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 等元素, 其核自旋量子数不为零, 都可有核磁共振信号。详见表 1。

表 1 某些核的核磁性质

核	自旋 ($\hbar$ 为单位)	10^4 高斯场 强时的射 频频率 (MHz)	天然丰度 (%)	相对灵 敏度
^1H	$\frac{1}{2}$	425.8	100	1
^2H	1	65.4	1.5×10^{-2}	9.7×10^{-3}
^{13}C	$\frac{1}{2}$	107.1	1.1	1.6×10^{-2}
^{14}N	1	30.8	99.4	1.0×10^{-3}
^{17}O	$-\frac{5}{2}$	57.6	3.7×10^{-2}	2.9×10^{-2}
^{19}F	$\frac{1}{2}$	400.1	100	0.83
^{23}Na	$\frac{3}{2}$	112.6	100	9.3×10^{-2}
^{31}P	$\frac{1}{2}$	172.4	100	6.6×10^{-2}

除高分辨 ^1H 谱外, 近年来 ^{13}C 谱、 ^{31}P 谱、 ^{19}F 谱在分子生物学中的应用, 都有很大进展, NMR 技术在生物大分子结构功能的研究中, 有三个突出的优点: 一是可在溶液中观察, 符合生物体的常态; 二是可在生理条件下, 深入到分子水平以至单个原子或基团的水平, 进行动态

观察,追踪观察对象的新陈代谢过程动力学变化;三是射频的长波穿透性无甚损伤,这就为医学诊断开辟了一种非破坏性检测的手段。利用自旋成像技术,观察活组织内的质子密度,犹如X光透视,而无X光的损伤。

目前的谱仪有两大类。一类是连续波核磁共振仪(CW-NMR)。它是采用连续的射频场,加到探头的样品线圈上。核磁共振信号即负载于射频振荡上,经高频放大及混频,得一负载有核磁信号的中频振荡。检波、去中频后,剩一负载着NMR信号的声频振荡。再经声频相敏检波去声频,得一直流慢变化之NMR信号,可在示波器上观察或加到记录器上记录。另一类是脉冲傅里叶核磁共振仪(PFT-NMR)。它是采用强而持续时间短的射频脉冲,作用到探头的样品线圈上。由于原子核磁化强度进行自由运动,在接收线圈中感应出一个随时间衰减的射频信号,即自由感应衰减信号(FID)。此信号负载在射频振荡上,经分时接收,射频放大,相敏检波等,得到低频的FID信号。经模数转换器变为数字信号,在计算机内累加和傅氏变换,时间域的函数FID就变为频率域的函数,又得到通常连续波方式所得的NMR信号,可在示波器上显示或由记录器记录。1965年W. Cooley和W. Tykey提出快速傅里叶变换方法后,PFT-NMR才能实际应用,得以迅速发展,其灵敏度比同样场强的CW-NMR高得多。

由核磁原理可知,场强越高,核的能级分裂越大,高低能级粒子数之差越大,即核磁共振吸收信号越强。近年来,利用超导磁体,可得到很高场强。目前PFT-NMR仪相对分辨率为 10^{-2} — 10^{-10} ,绝对分辨率为0.1—0.3Hz,最低可测0.2mM浓度的生物样品。虽然灵敏度低于顺磁共振、荧光光谱等,但其固有的突出优点已完全弥补其弱点,在生物学领域得到广泛应用。

在分子生物学中,NMR主要是用 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P 、 ^{19}F 谱,其中 ^1H 谱发展最早。由于氢核在生物分子中广泛存在,质子又占氢同位素的99.98%,此外氢核灵敏度最高,所以 ^1H 谱应用最广。其缺点是生物分子的天然溶剂是水,水

的质子峰常掩盖观察峰。另外生物分子中含氢的基团太多,易使谱线重迭而难以解析,在测酶、蛋白质、核酸等生物大分子时更是如此。虽然氢谱的解析比较困难,目前仍是最常用的核磁波谱。

碳与氢同是生物体内极重要的元素。但普通的 ^{12}C ,核自旋为零,只有 ^{13}C 才有核磁信号,而 ^{13}C 只占生物体内全部碳的1.1%,其相对灵敏度为1.6%。因此,天然丰度的 ^{13}C 谱,比同样样品的质子谱的信噪比低几千倍。直到有了PFT-NMR仪, ^{13}C 才有实用价值。其优点是化学位移宽,达200ppm。谱线尖,分辨好。由于特定 ^{13}C 标记技术的应用,使 ^{13}C 谱在近年来有很快发展^[2,3]。

^{31}P 的灵敏度相对于 ^1H 谱是6%。生物分子中,核酸、磷脂和重要的核苷酸分子如ATP、cAMP等都含磷。以 ^{31}P 谱研究这些分子的结构与功能,都可得到大量信息; ^{31}P 还可用来作观察分子环境变化的异核探针。近年来,在活组织中使用 ^{31}P 谱,还发现了磷代谢的一种新的中间产物^[4]。

^{19}F 在生物体中并不存在。但是 ^{19}F 的灵敏度仅次于 ^1H ,其共振频率紧靠 ^1H 核。因此,绝大多数 ^1H 谱仪,特别是连续波谱仪都可测 ^{19}F 。可将 ^{19}F 与酶共价连结,如以 ^{19}F 试剂修饰兔肌GAPDH的活性中心,以 ^{19}F NMR观察、追踪酶与配体、与底物的结合情况^[5]。也可以将 ^{19}F 引入底物分子进行观察。

随着技术的发展,其它核的NMR,也日益增多。

二、主要特性参数

NMR有五个主要特性参数:化学位移、谱线宽度、谱线强度(积分高度)、偶合常数和弛豫时间。

1. 化学位移 δ 原子核周围的电子,在外加恒定磁场时由于感应作用将产生一个反对外加磁场的附加磁场,从而使此核实际所受到作用磁场减弱。此外每一个原子核周围都各有不同的原子核存在,也就有不同的磁的微环境。这

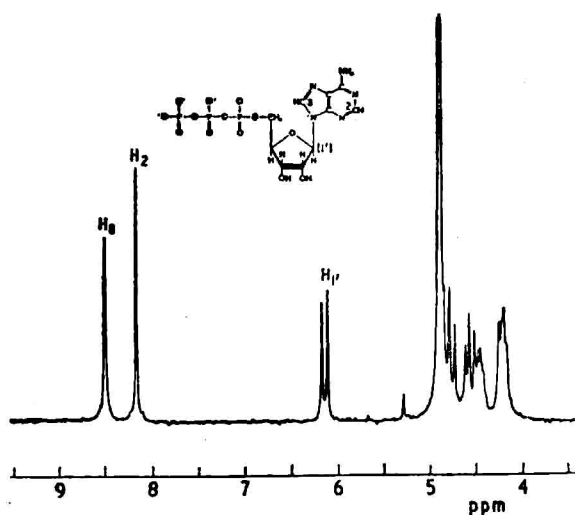


图2 30mM ATP 在 99.8% D₂O 中的 90 MHz ¹H NMR 谱

每个谱峰都有特定的化学位移值和一定强度。腺嘌呤的 H₈ 和 H₂ 是单峰，而核糖的 H_{1'} 因与 H_{2'} 偶合成双峰。由于有不同的弛豫时间，H₂ 和 H₈ 的线宽亦不同。这里，H_{1'} 至 H_{5'} 的分辨和识别较困难。4.8 ppm 处的很强的共振是样品中残存的 HDO 引起的。

相当于此核除感受静磁场 H₀ 外，还有一附加磁场。顺磁物质，有顺磁屏蔽作用；抗磁物质，有抗磁屏蔽作用。因此，同种原子核在不同的化合物中，或同种原子核虽在同一化合物中，但化学环境不同，都会有不同的实受磁场，也就有不同位置的谱线出现，使谱线有精细结构。这就是核磁共振的化学位移。化学位移一般取相对值表征，即 $\delta = \frac{H_{\text{实际}} - H_{\text{标准}}}{H_{\text{标准}}} \times 10^6$ 。其单位为 ppm，即 10⁻⁶。

对 ¹H 谱，常用标准样品为四甲基硅烷 (TMS) 或 2,2-二甲基-2 或-5-硅代戊烷磺酸钠 (DSS)。其屏蔽作用很强，在最高场有一强的尖峰。定义其化学位移为零，在其低场区的化学位移为正值。如 ¹H 100 MHz 谱仪，若峰相对于标准位移了 200H_z，即 $\delta = 2.0\text{ppm}$ 。对 ¹³C 谱，常用 CS₂ 为标准；对 ³¹P，常用无机正磷酸为标准，其高场区为正；对 ¹⁹F 谱，常用三氟乙酸作标准。

在生物样品中利用化学位移微扰，可知其结构信息。有三种效应：

(1) 环流效应 生物分子常有含大 π 电子云的多元环。如蛋白质中的 Phe, His, Tyr、

Trp 等。核酸中的嘌呤嘧啶和核糖五元环。此外，还有血红素的卟啉环、一些辅酶的烟酰胺环、异咯嗪环等。原子核处于环平面的上方，与处于其一侧，有不同的磁环境。这种环状分子形成的大 π 电子云，在磁场中的流动产生附加磁场，对样品核的化学位移产生影响，称之为化学位移的环流效应。Bovey^[6] 计算出质子于苯环外不同位置所引起的化学位移变化，如图 3。又

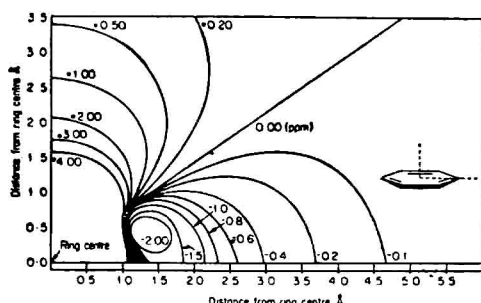


图3 苯环的环流使氢原子产生屏蔽位移值的轮廓图
Z 方向垂直于苯环平面， ρ 方向在碳原子平面上。

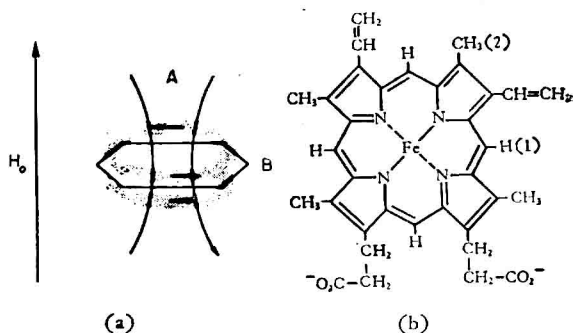
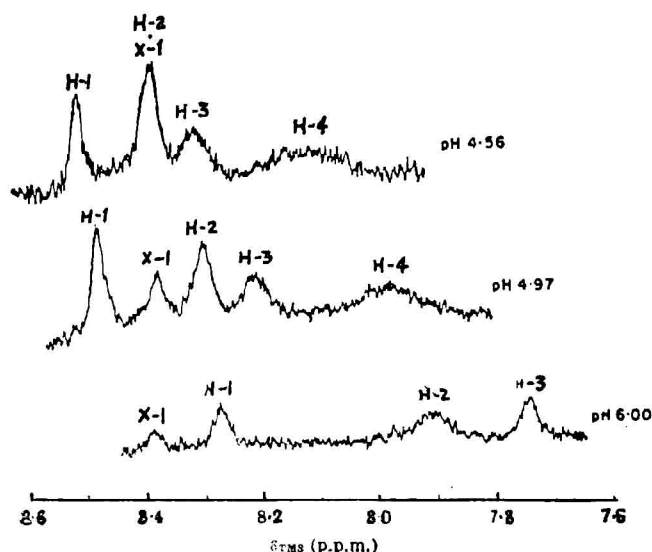


图 4

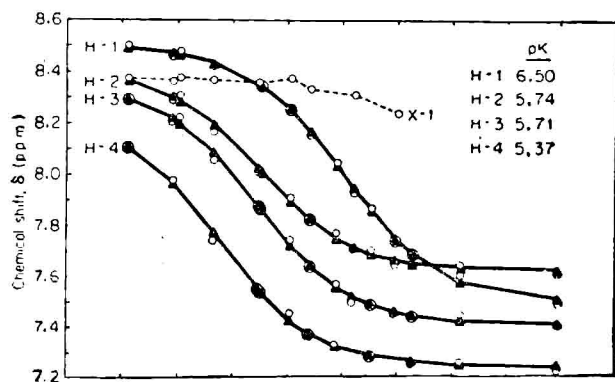
(a) 对 π 体系外加磁场 H₀ 后，电子运动的强抗磁效应。A 位处的甲基，受环流效应的强烈屏蔽，向高场位移 2ppm。(b) 血红素基团。当外加磁场垂直于环平面时，环外侧质子和基团将受强烈的去屏蔽作用。这些效应还必须加上铁原子的顺磁位移。

如，在血红素的卟啉环的里面和外侧的质子化学位移之差，可达 12ppm，见图 4。在生物 NMR 中，环流位移的高场屏蔽极其重要，常可探知被观察核与环的相对位置，从而了解其溶液构象。

(2) 顺磁离子效应 溶液中如有 Mn⁺⁺、Mg⁺⁺、Zn⁺⁺ 及 Fe⁺⁺⁺ 等顺磁金属离子，则对周围核的化学位移有很大影响。重要的生物分子的活性中心常需有这些金属离子。可用 NMR 观察有无顺磁离子时的化学位移，以了解活性



(a)



(b)

图5 葡萄球菌核酸酶的不同 His 残基的 pK 值
(a) pH 4.56, pH 4.97 和 pH 6.00 时的低场共振谱。
(b) 四个 His 共振的滴定曲线。

部位的结构功能关系。

(3) 化学位移的 pH 滴定效应 在不同 pH 时, 各基团的解离情况不同, 化学位移就有变化。在不同 pH, 以各峰的化学位移对 pH 作图, 即可得滴定曲线(图 5)。NMR 化学位移滴定的优点, 是可测知大分子中同一残基的不同解离状态(如图 5 中, 四个 His 的不同 pK 值), 可知某一基团的解离态, 这是其它方法所不能比拟的。

2. 线宽 根据核磁共振原理, 理论上谱线宽度应为无限窄。但是, 由于粒子在某能级的寿命 Δt , 与其能级宽度 ΔE , 必须符合海森堡测不准关系, 即 $\Delta E \cdot \Delta t \geq \hbar$ 。因此, 只要粒子

在某能级停留的时间不是无穷大, 则总有一定能级宽度。核磁共振时, 亦必有一定谱线宽度。此外, 由于磁场的不均匀, 在扫场时, 原子核先后发生共振, 由于共振频率的分散, 也导致谱线加宽。再者, 被测核受周围核产生的局部磁场的作用, 也要引起谱线的偶极加宽。粒子靠近时, 偶极作用强, 相互交换能量, 使停留在高能级上的平均寿命减小, 则谱线也加宽。所以固态原子核由于很靠近, 线宽可达 10—20 高斯; 而液态线宽则为 10^{-4} 高斯。生物样品都是液态, 由于谱线窄、峰高、分辨好, 可作定性定量分析。谱线宽度对洛伦兹线型(峰形高而窄), 一般以半高宽度 $\Delta\nu \frac{1}{2}$ 表示; 对高斯线

型(峰形矮而宽), 一般以斜率最大处的宽度表示。液体高分辨谱均用前者。

3. 谱线强度 在基线稳定时, 各峰的强度与参与共振的粒子数成正比。用计算机积分, 则得谱峰面积。由各峰积分曲线高度之比, 可知各种核的相对数量。称量各峰下记录纸的重量进行比较, 也是一种简便方法。

由图 6 可见, C_6H_5- , $-CH_2-$, $-CH_3$ 三峰强度比为 5:2:3。若谱线简单, 峰形都是标准洛伦兹型, 由各峰高度之比, 亦可知其相对强度。

4. 偶合常数与超精细结构 前已述及, 谱

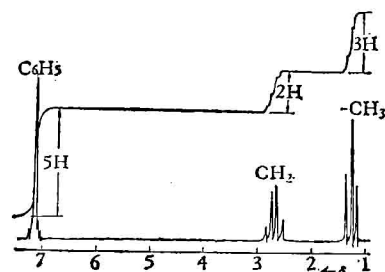


图6 乙基苯 CH_3CH_2- 苯

(10% CCl_4 溶液) 100MHz ^1H NMR 谱

线加宽的一个重要原因, 是偶极-偶极相互作用, 即自旋偶合。由于被测核与相邻核自旋磁

矩的耦合引起谱线的进一步分裂,称为自旋裂分或超精细结构。如图6, $-\text{CH}_3$ 基团的质子峰,受 $-\text{CH}_2-$ 基团上两个质子的影响分裂为三重峰。这是因为 $-\text{CH}_2-$ 的两个质子在磁场中的取向可以有四种可能: $\uparrow\uparrow; \uparrow\downarrow; \downarrow\uparrow; \downarrow\downarrow$ 。每种取向对 $-\text{CH}_3$ 的质子都有一定附加磁场,产生一个小峰。第二、三种取向对 $-\text{CH}_3$ 质子的影响是等价的。因而 $-\text{CH}_3$ 的质子谱成为强度比为

1:2:1 的三重峰。可以推论,对 $I = \frac{1}{2}$ 的同类核,自旋偶合作用引起的峰数为 $2nI + 1$ 即 $(n + 1)$ 个峰;各峰强度之比是对称的,符合二项式系数公式,即

$n = 1$	1:1
$n = 2$	1:2:1
$n = 3$	1:3:3:1
$n = 4$	1:4:6:4:1
...	

自旋偶合作用的强弱,由偶合常数 J 表征。 J 越大,偶合作用强,超精细分裂的峰相距越远。由自旋偶合引起的自旋裂分产生的新峰,与化学位移所形成的峰不同。化学位移随外磁场增强而加大。自旋裂分形成的峰间距与外磁场无关,且各峰间距相等即 $J_{ab} = J_{ba}$,两核偶合引起对方谱线分裂的大小相等。多个核的相互偶合,常使谱线极其复杂而难以解析。一般对 AB、AB₂、AX、ABC、ABM、ABX 系统的 ^1H 谱解析,可见梁晓天教授的著述^[7]。不仅在同类核间有自旋偶合,在不同核间也有异核偶合。常以一种双共振方法,即自旋去偶法,比较去偶图谱与不去偶图谱,从中得出有关信息。若记为 $^3\text{P}-\{\text{H}\}$,即表示对 ^1H 核去偶,记录 ^3P 谱。

偶合常数 J 是 NMR 的极重要参数。它较直观,由谱线分裂的峰间距可直接量测。它与分子的特定结构有关,即与键数、键的性质、成键核的数量和自旋,溶液构象的不同比例都有关系。自旋偶合的两个核,相距越大,所隔键数越多,偶合作用越弱, J 越小。一般相隔三个键以上,称远程偶合,可忽略不计。重原子核间的偶合,比轻原子核间偶合强。 J 的大小与取

代基及核的电荷密度有关,与偶合核的二面角有关。后者常用来测知溶液构象(详见第三节)。 $\text{H}-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{H}$ 质子的偶合常数与二面角的关系见图7。经 Kopple 修正的 Karplus 经验公式为:

$$J = 11.0 \cos^2 \phi - 1.4 \cos \phi + 1.6 \sin^2 \phi$$

由图谱测知偶合常数大小,即可算出偶合核所夹的二面角。

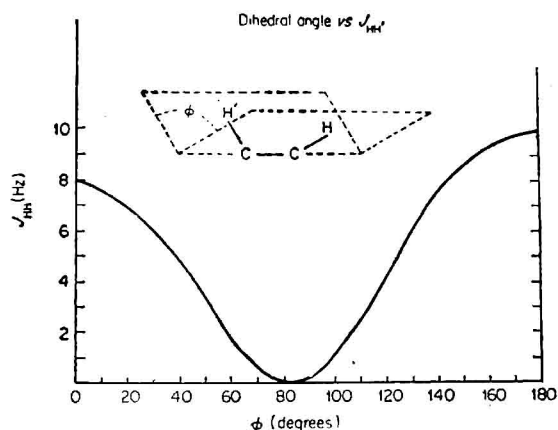


图7 二面角 ϕ 与偶合常数 $J_{\text{HH}'}$ 的关系 (Karplus 公式)

5. 弛豫时间: (1) 自旋-晶格弛豫, 即纵向弛豫, 是高能级原子核将其多余能量交给周围晶格(介质), 以热能形式耗散, 而返回低能级。弛豫强弱以弛豫时间 T_1 表示, 即能量减少为 $\frac{1}{e}$ 所需的时间。常用 PFT-NMR 的翻转回复方法, 即所谓 $(180^\circ-\tau-90^\circ)$ 脉冲程序测定 T_1 (τ 为两个脉冲的间隔时间, 即脉冲延迟)。先对体系加一个 180° 脉冲(即选择适当的射频脉冲强度和宽度, 使核磁化强度 M_0 在外磁场中的取向翻转 180°), 则磁化强度翻转成 $-M_0$, 若经过 T_1 时间, 可回到 Z 轴原方向。再加一个 90° 脉冲, 正好可观测。在一系列不同时间间隔 τ 后, 用 90° 脉冲监测。随 τ 的增加, M 是可变的, 由负值经过零, 到其原来位置。若选取 τ 值, 使 M 经过零, 则 $\tau = 0.69 T_1$ ^[8]。图8为 RNase¹³C 谱的 T_1 测定, 其优点是可测知每一基团或某一核的 T_1 。不同的峰, 在不同延迟时间 τ 经过零强度, 由此可知每一峰的弛豫时间。

(2) 自旋-自旋弛豫即横向弛豫 处于高

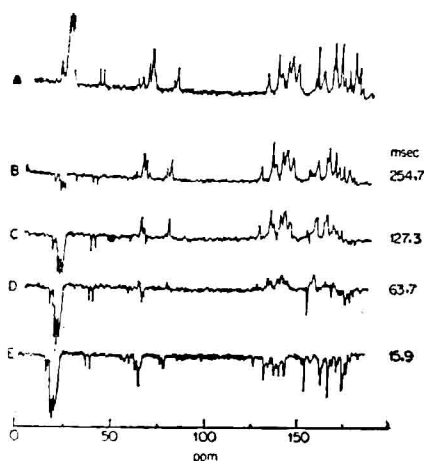


图8 一组部分弛豫的RNase的天然丰度 ^{13}C NMR谱
15 mM pH 2.12, 在 $180^\circ-\tau-90^\circ$ 程序
中的 τ 值在图侧, A为正常谱线。

能级的核将多余能量交给另一等同原子核, 自己跳回低能级。虽然体系总能量未变, 但参与共振的核在能级的寿命减小。其弛豫时间以 T_2 表示。由于磁场不均匀引起的谱线加宽, 比自旋-自旋的作用强。在测定 T_2 时, 常以自旋回波法去除磁场不均匀的影响。在PFT-NMR中, 常用 $(90^\circ-\tau-180^\circ-\tau)$ 脉冲程序测定 T_2 。自旋体系在加上 90° 脉冲后, 产生FID信号。其衰减速度取决于磁场不均匀性和 T_2 的总和。经延迟时间 τ 后, 再加 180° 脉冲; 再经时间 τ , 出现第二个核感应信号, 即自旋回波信号, 其幅度仅决定于 T_2 。改变 τ , 可得到几个不同的自旋回波, 由此可知 T_2 。由于 T_2 的测定较困难, 而 $T_2 \leq T_1$, 常可由线宽粗略估计 T_2 。即

$$T_2 = \frac{1}{\pi \Delta \nu_{1/2}}$$

$\Delta \nu_{1/2}$ 为峰的半宽度。

在生物NMR中, 由于生物体系一般都是水溶液, 作 ^1H 谱时, 在4.8 ppm处有一极高水峰, 常遮盖左右谱峰。目前有三种消除水峰的方法: 一为重氢交换。以高纯度 D_2O (一般为99.8%以上), 将样品溶解后冰冻干燥, 再重复一次。由于 ^2H 核几乎无核磁共振信号, 故只有残存的HDO信号, 能得到较满意的结果。二是快速脉冲法。因一般样品的弛豫时间比HDO快, 用 $(180^\circ-\tau-90^\circ)$ 程序, 选择适当的 τ 值, 在

90° 监测脉冲后, 使HDO的磁化强度为零, 可使水峰减为原来的四分之一。三是选择性饱和。在两个FID信号中间, 以一定功率的射频照射HDO峰, 使水的质子饱和。在水弛豫之前, 加上观察用脉冲, 则水峰信号被大大减弱。此法效果较好。

作生物样品 ^1H 谱时, 一般用5毫米直径的样品管需0.4毫升样品, 累加30分钟。目前最低可测0.2 mM浓度。而 ^{31}P 、 ^{13}C 谱, 用20毫米的样品管, 约需15毫升样品, 累加几小时。 ^{31}P 谱最低可测0.5 mM, ^{13}C 谱最低可测1~2 mM。样品体积的要求, 主要是使样品在磁场均匀区有3厘米的高度。若用带聚四氟乙烯塞子的特制样品管(有球形空隙), 则样品量还可减少到0.1毫升以下(测 ^1H 谱)。对蛋白质样品, 浓度常以百分浓度表示, 如20毫克/毫升, 相当于分子量20,000的蛋白质, 浓度为1 mM。对分子量为15,000的蛋白质, 测 ^1H 谱需20毫克样品, 累加15分钟; 测 ^{13}C 谱需2克样品, 累加20小时。

核磁波谱的识别, 特别是大分子识别比较复杂。一般先要识别某峰是大分子的哪个化学单位(如对蛋白质, 是Ala的峰, 还是Val的? 对核酸, 是什么碱基的峰?) 然后再确定这是序列中的第几个残基(如有三个Ala, 确定是哪个Ala的信号)。常用的识别谱线的化学方法, 包括化学修饰、同位素取代、pH滴定和顺磁探针法。多肽、蛋白质、核苷酸、核酸、磷脂膜和完整生物组织的谱线识别的一般方法, 可见I.D. Compbell的著述^[1]。其基本原理都是用各种手段微扰谱线, 以至使之消失。由谱线及其参数的变化, 可知是何基团或核。此外, 不同种属的蛋白质样品的比较研究, 也可帮助谱线的识别。

待续

参 考 文 献

- [1] Rattle, H. W. E.: *Amino-acids, Peptides and Proteins*, 10, 1977.
- [2] Allerhand, A.: *Methods In Emzymology*, 61, 1979.
- [3] Howarth, D. W. et al.: *Progress in NMR Spec-*

- troscopy, Vol. 12, part I, 1978.
- [4] Burt, C. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2584, 1976.
- [5] Bode, J. et al.: *Biochemistry*, **14**, 1153, 1975.
- [6] Bovey, F. A.: *J. Chem. Phys.*, **29**, 1012, 1958.
- [7] 梁晓天:《核磁共振—高分辨氢谱的解析和应用》, 1976年。

- [8] Knowles, P. K. et al.: *Magnetic Resonance of Biomolecules*, 1976.
- [9] Campbell, I. D.: *Methods of Biochemistry Analysis*, Vol. 25, 1978.

[本文于1980年5月8日收到]

关于提前召开第四次全国生物化学学术会议 暨第一次代表大会的通知

中国生物化学会常务理事会于2月17日在上海举行。会议决定在今年11月底至12月初提前召开第四次全国生物化学学术会议,并同时举行代表大会。现将有关事项通知如下:

一、会议主要议程:学术交流;选举新理事。

二、征集论文范围:到1981年6月为止尚未在公开发刊物上发表过的有关生物化学研究领域的工作报告。论文可以自投,也可以由地方学会和有关单位推荐。

三、论文要求:一千字以内的论文摘要一式两份(另附全文一式两份,供审稿用;字数不限)。会议前,拟编印论文摘要汇编,因此摘要不能附图,字迹务必清楚。

四、征文截止日期:6月30日(以邮戳为准)。

五、论文投寄地点:

1. 北京、东北、华北、西北地区:寄北京,中关村,生物物理研究所转《生物化学与生物物理进展》编辑室。

2. 上海及其他地区,寄上海岳阳路,生物化学研究所转《生物化学与生物物理学报》编辑室。

六、两点说明:1. 原定今年举行的“异常血红蛋白及其他分子病”、“糖的生化”和“生化教学”三个会议,不再单独举行,其有关内容将在第四次全国生物化学学术会议期间,安排专题小组活动。2. 参加会议正式代表限本会会员。代表名额分配,以及会议日期、地点将另行通知。

中国生物化学会

1981年2月

投稿注意事项

一、文稿力求简明扼要,深入浅出。综述、专论稿件,一般勿超过8000字;研究报告等一般勿超过4000字(图表所占篇幅折合字数,包括在内);工作简报及经验交流等,一般勿超过2000字。

二、附图要用绘图纸描绘清楚。图中文字、符号用铅印字贴好,或用铅笔注明。照片要层次清晰。附图和照片位置要在文稿中标出。图表注意挑选,尽量将次要的删减。

三、综述、专论的参考文献,一般勿超过20条;研

究工作报告的参考文献,一般勿超过10条。不公开发表的资料请勿引用。外文文献请用印刷体书写或打字。

四、来稿一式两份,以便由两位审稿人同时审阅,缩短审稿时间。

五、研究报告请附单位推荐信。

六、本刊自1981年对国外发行。来稿请附英文篇名及作者姓名汉语拼音。