

# 核磁共振方法研究膜蛋白三维结构的进展

石攀, 田长麟

(中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027)

**摘要:**膜蛋白是一类在生命活动中非常重要的蛋白,但是膜蛋白三维结构的研究远远落后于水溶性蛋白。核磁共振方法由于不需要膜蛋白的晶体制备,使得该方法日益成为膜蛋白结构解析的主力。对不同的膜蛋白样品制备方法,有几种不同的核磁共振方法来进行膜蛋白的结构研究。其中液体核磁方法针对膜蛋白/去污剂胶束和膜蛋白/饼状胶束样品,并已经成功解析了多个膜蛋白结构;静态取向固体核磁共振方法针对具有均一取向的膜蛋白/饼状胶束样品和膜蛋白/磷脂双分子层样品,也成功获得了许多膜蛋白的结构信息;魔角旋转固体核磁共振方法针对膜蛋白/磷脂双分子层样品,也在发展中,并尝试着进行膜蛋白三维结构研究。

**关键词:**膜蛋白;液体核磁共振;魔角旋转固体核磁共振;静态取向固体核磁共振

中图分类号: Q73 文献标识码: A

## Progress of membrane protein structural studies using nuclear magnetic resonance

SHI Pan, TIAN Chang-lin

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Membrane proteins play vital roles in maintaining cells proper function, but structural studies of membrane proteins lag far behind water soluble proteins. Because it is unnecessary to prepare crystals of membrane proteins, nuclear magnetic resonance (NMR) is coming to play an increasingly important role in membrane protein structural studies. Several NMR methods can be applied for different states of membrane protein samples. Solution NMR is used to study membrane protein in detergent micelles or in low q bicelles, and several membrane proteins' structures have been solved using solution NMR. Static oriented solid state NMR can be applied for uniformly oriented membrane proteins in high q bicelles or in lipid bilayers. Methods of magic angle spinning (MAS) solid state NMR are also under development to solve membrane protein structures in lipid bilayers.

**Key words:** membrane protein; solution NMR (nuclear magnetic resonance); magic angle spinning solid state NMR; static oriented solid state NMR

收稿日期: 2008-06-28; 修回日期: 2008-07-10

基金项目: 中国高技术研究发展(863)计划(2006AA02A321)资助。

作者简介: 石攀, 女, 1985年生, 硕士生。研究方向: 液体核磁共振, 膜蛋白结构研究。E-mail: lhsp1985@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 田长麟, 博士/教授, 中国科学院“百人计划”入选者, 2003年于美国佛罗里达州立大学获分子生物物理博士学位, 2003~2006年在美国Vanderbilt大学结构生物学中心从事博士后研究, 2006年入选中国科学院“百人计划”, 并被聘为中国科学技术大学教授。主要从事应用液体核磁共振方法进行人类疾病相关的膜蛋白结构与功能方面的研究。在Journal of Magnetic Resonance, Biochemistry, Protein Science, J. Am. Chem. Soc.等著名学术期刊上发表论文多篇。E-mail: cltian@ustc.edu.cn

## 0 引言

细胞作为生命活动的基本结构和功能单位,其内部的不同细胞器或功能分区以及细胞与外界环境的隔离与交流(包括物质、信息和能量交流)主要通过细胞膜来完成.细胞膜结构包括细胞质膜和细胞器膜(如线粒体膜、内质网膜、高尔基体膜、核膜等等),其主要组成为脂类、胆固醇、蛋白质以及修饰脂类、蛋白质的糖类分子.其中,细胞膜上的脂类是支撑、维系膜结构的主要成分,在细胞与外界环境、细胞内细胞器之间行使空间分隔,同时以磷脂双分子层的二维“流动镶嵌”模型为细胞膜上的蛋白质——膜蛋白,提供功能平台.

膜蛋白是生物膜功能的主要执行者,能有效参与细胞的能量交换,信息识别与传递以及物质转运.按照膜蛋白在细胞膜的不同位置可以分为外周膜蛋白(peripheral membrane protein)和内在膜蛋白(integral membrane protein).其中外周膜蛋白只是在细胞膜表面存在;而内在膜蛋白能至少一次穿过细胞膜的磷脂双分子层,又称为跨膜蛋白.和水溶性蛋白不同,跨膜蛋白通常具有非常单一的二级结构,其二级结构组成了除了随机结构(random loop)之外,主要由一个或多个 $\alpha$ 螺旋( $\alpha$ -helix)或 $\beta$ 折叠形成的 $\beta$ 桶状结构( $\beta$ -barrel)组成.包括原核生物、真核生物以及人类的基因组结果表明,编码内在膜蛋白或跨膜蛋白的基因占整个基因组的20%~35%<sup>[1]</sup>.

膜蛋白对于维持细胞结构、功能十分重要,因此许多细胞功能的异常来源于膜蛋白的缺失、突变和结构异常.同时,由于膜蛋白,特别是细胞质膜蛋白位于细胞的最外层,并在细胞和外界环境、细胞与细胞之间的信息识别、物质交流及转运中起着不可替代的作用,目前在制药公司的药物靶点蛋白中,超过60%小分子药物化合物的靶点蛋白是膜蛋白.长期以来,膜蛋白一直是结构研究主要关注的热点.

但是,到2008年3月底为止,在蛋白质结构数据库(Protein DataBank, PDB)中,仅有356个膜蛋白结构得到了解析.如果排除同源蛋白的结构,具有特异折叠的膜蛋白的结构只有155个,其中来源于人类的膜蛋白解构只有6个(White SH, [http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html)).这个数字在目前PDB中所列出的已经解析的46 109个蛋白三维结构中([www.pdb.org](http://www.pdb.org))占有几乎可以忽略的比例( $356/46\ 109=0.77\%$ ,

$6/46\ 109=0.013\%$ ).这充分表明膜蛋白结构研究,特别是高等生物(如人类)膜蛋白结构解析的挑战性和严峻现实.其主要原因在于膜蛋白具有许多不同于水溶性蛋白的特性,主要表现在以下几个方面:

(I)在膜蛋白/去污剂胶束三维结构研究过程中,很难模拟膜蛋白行使正常功能时所需要的磷脂双分子层环境.虽然去污剂胶束常用来模拟膜蛋白的磷脂的双分子层环境,但是去污剂胶束不能完全替代磷脂双分子层.

(II)膜蛋白含有许多高疏水性的氨基酸,这使得膜蛋白的高效表达、纯化和样品制备非常困难.

(III)膜蛋白的部分结构在细胞膜内,而另一部分结构则在细胞膜外,与水相环境直接接触.这使得膜蛋白的不同区域具有不同的柔性和动力学特性.

目前,主要应用来解析蛋白质三维结构的方法有X射线晶体学、核磁共振以及低温冷冻电镜方法.这些方法在研究膜蛋白三维结构时都具有不同的困难和挑战.X射线晶体学是解析蛋白质三维结构的主要方法,但是由于很难获得膜蛋白/磷脂复合物,或者膜蛋白/去污剂复合物的稳定、高质量的晶体,使得这种方法具有非常高的不确定性.冷冻电镜技术方法能直接研究膜蛋白在磷脂双分子层中的三维结构,但是该方法目前只能获得较低分辨率的膜蛋白三维结构,进一步的技术发展仍然在进行中.核磁共振方法由于不需要制备膜蛋白晶体样品,同时能获得高分辨率的蛋白质三维结构信息而使得该方法日益成为解决膜蛋白结构的主要手段之一.而在应用核磁共振方法研究膜蛋白三维结构时,多种不同的核磁方法能用来研究膜蛋白在不同环境下的三维结构,同时,还能研究膜蛋白在不同时间尺度下的动力学特性.

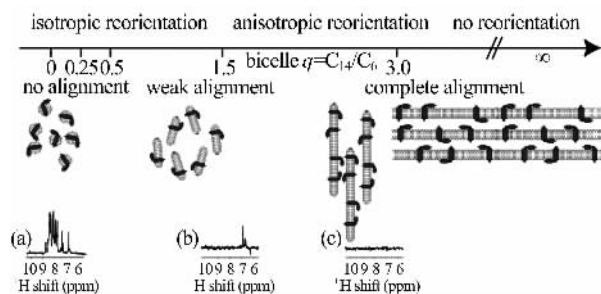
应用于膜蛋白结构研究的核磁方法主要有液体核磁共振、固体核磁共振方法.其中液体核磁共振方法主要针对膜蛋白/去污剂胶束复合物(应用去污剂胶束来模拟膜蛋白的磷脂双分子层环境);固体核磁共振方法则应用于膜蛋白/磷脂复合物.在应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构时,又有两种不同的方法:魔角旋转(magic angle spinning, MAS)和静态取向(static oriented).这两种固体核磁共振方法应用不同的手段,获取不同的结构信息,但是都能应用来进行膜蛋白在磷脂中的结构研究.

# 1 应用核磁共振方法进行膜蛋白结构研究

在生理状态下,膜蛋白存在于磷脂双分子层中,其疏水部分和磷脂分子的疏水尾巴进行紧密接触。在膜蛋白的样品制备过程中,包括膜蛋白的纯化和核磁共振样品准备,通常应用去污剂来模拟磷脂双分子层的环境,包括内部的疏水部分和外周的亲水部分(图 1(a));同时,应用去污剂纯化出来的膜蛋白还可以重组装回磷脂环境中,使膜蛋白基本恢复到生理环境下。去污剂胶束分子量较小,当膜蛋白和去污剂形成复合物时,复合物的分子量大约比膜蛋白分子量增加 30~40 kDa。但是,由于去污剂胶束的球状结构(图 1(b)),有些膜蛋白的膜表面部分失去了与磷脂分子之间的相互作用,使得有些较大的膜蛋白的结构发生变化<sup>[2]</sup>。磷脂分子由于含有两个疏水尾巴(图 1(c)),使得磷脂分子非常容易形成双分子层结构。但是,磷脂双分子层的超大型结构使得膜蛋白样品很难操作。将不同疏水链长度的磷脂分子按照不同的摩尔比混合在一起,在一定的条件下能形成一种饼状的磷脂双分子层结构——饼状胶束(Bicelle)<sup>[3,4]</sup>,其中短链磷脂分子的浓度的不同能形成大小可以控制的饼状胶束(图 1(d))。当短链磷脂分子浓度非常小时,磷脂分子会形成两端无限延伸的二维磷脂双分子层结构(图 1(e))。膜蛋白在不同的样品条件下具有不同的动力学性质,相应地就可

以应用不同的核磁共振方法研究膜蛋白的三维结构。

核磁共振方法非常适用于蛋白质三维结构的研究。蛋白质中的氢核( $^1\text{H}$ ),或具有自旋量子数  $s=1/2$  的 $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ 核在磁场条件下所检测得到的化学位移对该原子核在空间环境的变化非常敏感,从而使该原子核的化学位移具有一定的展开跨度(dispersity)。通常一个核磁共振信号来自于一个原子核,而该信号峰的峰宽则能反映整个蛋白质分子运动的相关时间,或者蛋白质分子中所对应的那个原子核的局部运动状况。在应用核磁共振方法研究膜蛋白三维结构时,不同的膜蛋白样品制备方式使得样品具有不同的动力学特性,特别是样品的旋转相关时间(rotational correlation time)。



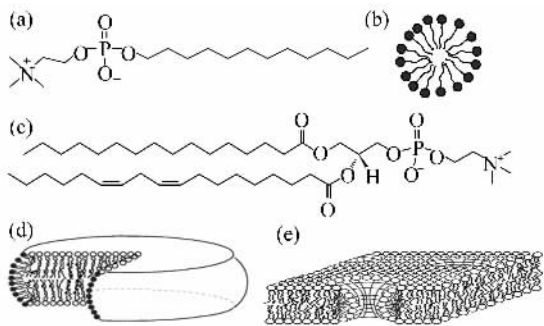
(a)膜蛋白在去污剂胶束中的一维 $^1\text{H}$ 谱;  
(b)膜蛋白在饼状胶束(Bicelle)中的一维 $^1\text{H}$ 谱;  
(c)膜蛋白在高浓度长链磷脂分子样品中的光谱  
参数  $q$  指的是样品中双链磷脂分子  
14 碳长链/6 碳短链或单链去污剂的摩尔比值

图 2 不同的膜蛋白样品制备方法导致不同的相关时间以及不同的核磁共振信号<sup>[5]</sup>

Fig. 2 Different sample preparations can lead to different correlation time and different signals of membrane proteins

由于膜蛋白/去污剂胶束复合物具有较小的分子量,加上去污剂胶束的球状结构使得该样品具有各向同性的运动,这样,该样品可以直接应用液体核磁共振方法进行三维结构研究,并能获得高分辨率的核磁共振光谱(图 2(a))。同时,由于样品的各向同性运动,在应用液体核磁共振方法研究膜蛋白的三维结构时,只能收集膜蛋白的原子核之间的距离信息,而失去了化学键与磁场方向之间的空间取向信息。当应用膜蛋白/饼状胶束复合物时,由于饼状胶束在磁场作用下具有一定的取向趋势,该样品的运动具有一定的各向异性。

当短链磷脂分子浓度较高时,饼状胶束仍然维持较小的分子量,在液体核磁共振条件下仍然可以



(a)带有亲水性头结构和单个疏水性尾巴的去污剂分子(detergent);  
(b)多个去污剂分子自发聚集形成胶束(Micelle);  
(c)带有亲水性头结构和两个疏水性尾巴的磷脂分子(phospholipid);  
(d)由长链磷脂分子和短链磷脂分子形成的饼状胶束(Bicelle);  
(e)含有大量长链磷脂分子,同时仅含少量(或不)短链磷脂分子所组成的磷脂双分子层结构(lipid bilayer)

图 1 应用于膜蛋白结构研究的去污剂和磷脂分子

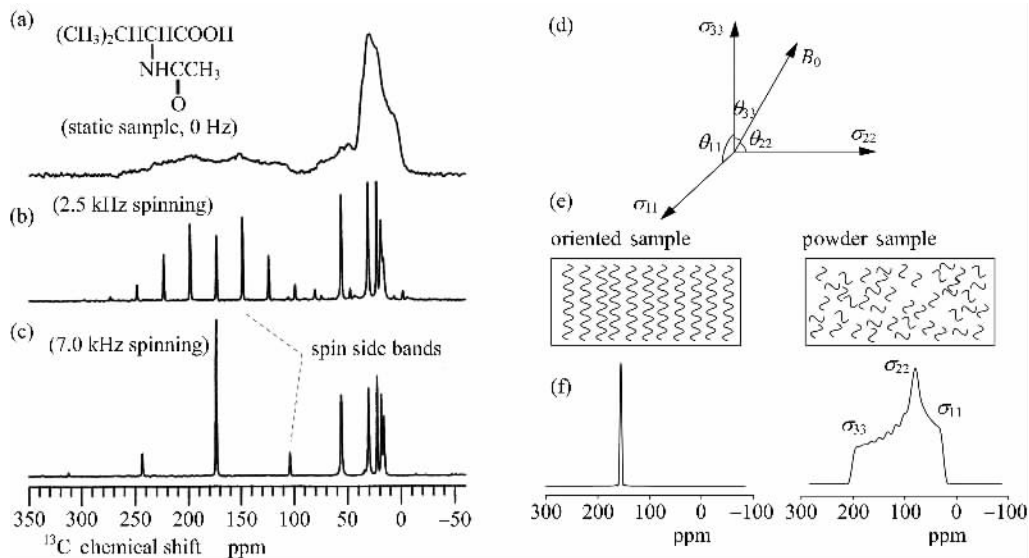
Fig. 1 Detergents and Lipids used in membrane protein structure studies

获得一些膜蛋白的核磁信号,能进一步研究膜蛋白的三维结构(图 2(b)).当短链磷脂分子浓度逐渐降低,而饼状胶束分子量越来越大时,膜蛋白/饼状胶束复合物在磁场中能够形成均一取向,导致具有相同的磷脂双分子层法线方向(法线方向与磁场方向垂直),存在于饼状胶束中的膜蛋白相应地也具有相同取向的排列而具有非常强的各向异性.此时,由于样品很难进行空间上的全维平均,获得的核磁共振光谱具有非常大的线宽(图 2(c)),而适用于应用固体核磁共振方法获得蛋白样品的取向结构信息,研究该状态下的膜蛋白结构的方法称为静态取向固体核磁共振方法(static oriented solid state NMR)<sup>[6~8]</sup>.

当膜蛋白样品中的短链磷脂分子进一步减少时,膜蛋白样品恢复到接近于生理状态下的磷脂双分子层环境,样品具有非常小的运动自由度.在磁场情况下原子核具有非常强的化学位移各向异性(chemical shift anisotropy, CSA)和原子核之间的直接偶极耦合(dipolar coupling, DC),直接导致核磁共振光谱中信号的塌陷,峰形变宽甚至消失(图 3(a)).为了获得较好的核磁共振光谱,在固体核磁共

振方法中,通常将样品与磁场方向成  $54.7^\circ$ ,并进行高速旋转,以提高膜蛋白的运动性,这样能获得较高分辨率的各向同性的核磁共振光谱(图 3(b)),并进行膜蛋白的结构研究.该方法称为魔角旋转固体核磁共振方法(MAS-SSNMR).同时,还可以通过将膜蛋白/磷脂样品铺在玻璃板上,应用玻璃板的平面效应传递给磷脂双分子层取向信息而制备均一取向的膜蛋白固体核磁样品,从而使得样品从粉末状轴对称光谱转变为较高分辨率的单一取向信号(图 3(e,f)).该样品同样可以应用静态取向固体核磁共振方法(static oriented SSNMR)研究膜蛋白的三维结构.

显然,不同的样品状态能应用不同的核磁共振方法来研究膜蛋白三维结构.不同方法因所涉及的理论和所碰到的问题都不一样因而获得不同的发展和应用.目前,通常应用液体核磁共振方法研究分子量较小的膜蛋白( $<25$  kDa)在去污剂胶束中的膜蛋白结构,已有少数报道关于膜蛋白在低  $q$  值饼状胶束中的结构研究进展<sup>[2,9,10]</sup>.固体核磁共振方法,包括魔角旋转和静态取向两种方法,均可以应用来研究高  $q$  值饼状胶束,或磷脂双分子层中的膜蛋白三



(a) 固体样品在核磁条件下的各向异性光谱; (b) 固体样品在魔角旋转条件下获得高分辨率的各向同性的谱线(其中均匀分布的小峰为卫星侧峰, spin side band, SSB); (c) 提高样品的魔角旋转速度能有效提高谱线的质量并减小卫星侧峰的信号; (d) 各向异性情况下自旋核的化学位移张量分布, 其中  $B_0$  为磁场方向; (e) 具有均一取向样品和具有粉末样(powder pattern)随机取向样品的示意图; (f) 具有均一取向样品所获得的高分辨率光谱和粉末样品所获得的各向异性光谱

图 3 固体核磁共振样品的较宽峰形可以通过提供高速的魔角旋转或制备均一取向的样品来获得高分辨率的固体核磁信号

Fig. 3 High resolution solid state NMR signal can be achieved through high speed sample spinning at magic angle or uniformly aligned sample preparation

维结构。

## 2 膜蛋白样品的制备

高质量、高产量的样品制备,是进行蛋白质三维结构研究的前提。在应用不同的核磁共振方法研究膜蛋白的三维结构时,需要制备不同的膜蛋白样品。无论何种样品制备方法,都不可避免需要至少毫克级的高纯度的膜蛋白样品。在核磁样品中除了膜蛋白之外,还包含有去污剂或磷脂分子,这样,膜蛋白的<sup>1</sup>H 信号将和去污剂/磷脂中的<sup>1</sup>H 信号相重叠而很难获得只含有膜蛋白的<sup>1</sup>H 信号的核磁共振光谱。在实验过程中,需要采用含<sup>13</sup>C 和/或<sup>15</sup>N 标记的膜蛋白,再依靠核磁共振同位素过滤脉冲序列特异性获得膜蛋白的信号,并进一步进行膜蛋白的结构研究。而目前较为经济、可行的膜蛋白制备过程中,只有大肠杆菌表达体系能制备具有<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 标记的高产量膜蛋白。

由于膜蛋白含有非常多的疏水氨基酸,膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达往往导致膜蛋白积聚而形成包涵体,使得膜蛋白很难形成正确的折叠。有些膜蛋白包涵体能够应用变/复性方法重新折叠,但是,很难保证重折叠后的膜蛋白能恢复到正确折叠并具有正常的功能。因此,通常需要将膜蛋白表达在大肠杆菌的细胞膜上,通过大肠杆菌内部的折叠机制和细胞膜环境维持一些原核生物来源的膜蛋白的正确折叠。由于真核生物来源的膜蛋白与大肠杆菌中的蛋白折叠机制的不相匹配,目前只有少数报道真核生物来源的膜蛋白在大肠杆菌细胞膜上的高效表达<sup>[11]</sup>。

在获得膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达后,无论是包涵体表达还是细胞膜表达,在膜蛋白的纯化过程中,都需要应用去污剂帮助膜蛋白避免形成积聚并沉淀<sup>[12]</sup>。在制备应用于液体核磁共振实验的样品时,还需要选择合适的去污剂以维持膜蛋白的正确折叠<sup>[13,14]</sup>。因此,去污剂筛选是膜蛋白纯化和样品制备(特别是应用于液体核磁共振实验)过程中非常重要的一环<sup>[15]</sup>。

按照去污剂的亲水头结构的性质来分,去污剂能分为不带电、电中性(既带正电荷,又带负电荷)和带正电、带负电的四种去污剂。不同的去污剂对不同的蛋白质具有不同的稳定或破坏作用。以下为膜蛋白纯化或液体核磁共振研究中常用的几种去污剂:

去污剂/(mM)	电性	分子量	CMC
CHAPS	电中性	615	6~10
$\beta$ -decylMaltoside (DM)	不带电	483	2
$\beta$ -dodecylMaltoside (DDM)	不带电	511	0.2
$\beta$ -octylGlucoside (OG)	不带电	292	19~25
dodecylphosphocholine (DPC)	电中性	352	1.5
Lyso-Myristoyl-PC (LMPC)	电中性	496	0.004
Lyso-Myristoyl-PG (LMPG)	带负电	478	0.2~3
Lauryl dimethylamineoxide	电中性	229	2
Sodium dodecylsulfate (SDS)	带负电	288	1~7

【注】以上数据均从 Anatrace 公司网页(www.anatrace.com)获得

在制备膜蛋白/饼状胶束(小  $q$  值)复合物时,通常应用长链磷脂分子 DMPC (di-myristoyl-phosphoatidyl-choline)和短链磷脂分子 DHPC (di-hexyl-phosphatidyl-choline)以不同的  $q$  值来制备膜蛋白样品。 $q$  值较小的饼状胶束样品由于分子量较小而具有较短的相关时间,使得膜蛋白/饼状胶束复合物能应用于液体核磁共振分析。

在制备膜蛋白/饼状胶束(大  $q$  值)和膜蛋白/磷脂双分子层样品时,需要将膜蛋白从去污剂胶束中重组装到磷脂双分子层中。具有较大临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)的去污剂(如 OG)常常应用来制备膜蛋白,并通过透析方法将膜蛋白从去污剂中转移,重组装到磷脂分子中<sup>[16~18]</sup>。而去污剂分子(OG)则通过透析膜内外的浓度差异从样品中除去。组装好的膜蛋白/磷脂双分子层样品可以直接装入魔角旋转固体核磁共振样品转子(spinning rotor)中,进行固体核磁实验,以获得各向同性的核磁共振光谱。在应用静态取向固体核磁共振方法时,膜蛋白/饼状胶束样品需要在磁场条件下通过不同的温度变化循环来诱导膜蛋白/饼状胶束形成均一取向;而膜蛋白/磷脂双分子层样品需要将重组装好的膜蛋白样品铺在玻璃板上并维持一定的水化湿度(hydration level),通过玻璃板的平面传递均一取向并维持磷脂双分子层的法线方向与玻璃板的法线方向重合<sup>[19~21]</sup>。这样,具有均一取向的样品在磁场中所获得的光谱就含有大量的膜蛋白的取向结构信息,能应用来研究膜蛋白的三维结构<sup>[7,8,22,23]</sup>。

## 3 应用液体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构

在水溶性蛋白三维结构研究中,液体核磁共振

和 X 射线晶体衍射并列成为主要方法,并解析了其中大约 1/7 的蛋白三维结构(www. pdb. org). 但是,由于核磁共振方法自身理论上的原因,这种方法目前在解析分子量较小的蛋白质时非常可靠,而在解析分子量超过 30 kDa 的蛋白质三维结构时,需要较长的时间. 近 10 年来,随着许多新的核磁共振方法的发展,特别是 TROSY 脉冲序列<sup>[24]</sup>和低温探头的发明,应用液体核磁共振方法解析 80 kDa 以下的蛋白质结构已经成为可能. 这为应用液体核磁共振方法解析膜蛋白的三维结构打下了坚实的基础.

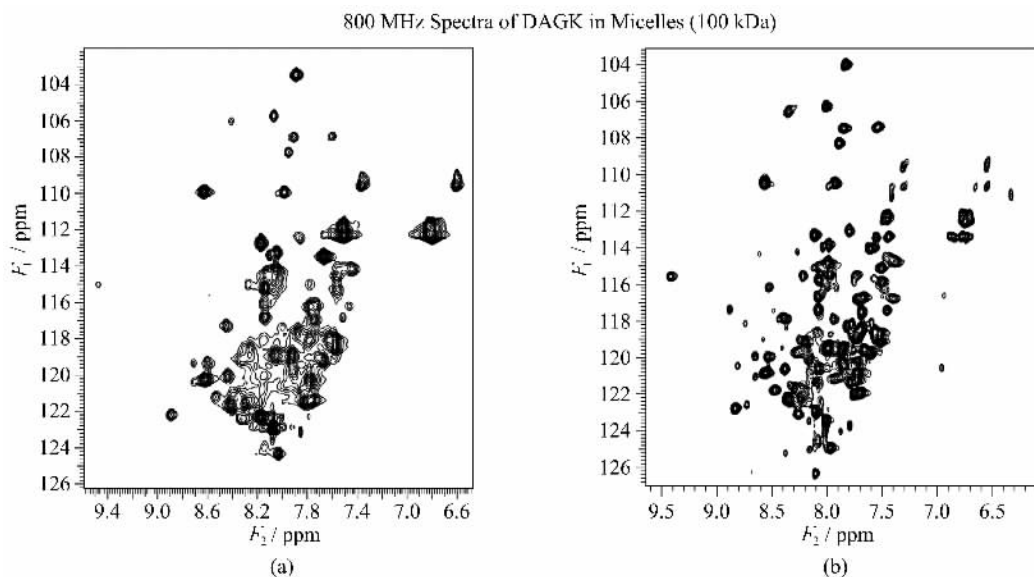
在应用液体核磁共振方法解析膜蛋白结构时,膜蛋白必须被去污剂胶束所包被,以模拟膜蛋白的磷脂双分子层的双亲环境(膜外亲水,膜内亲油/疏水). 由于去污剂胶束的存在,使得液体核磁共振研究环境下的膜蛋白分子量在其自身分子量的基础上增加了去污剂胶束的分子量. 这样,膜蛋白/去污剂复合物的分子量普遍要超过 40 kDa,而通常状况下的分子量相当于 80~100 kDa. 这样,基于 TROSY 的脉冲序列成为膜蛋白三维结构解析的必要条件,而且能显著提高膜蛋白光谱的分辨率和信噪比(图 4). 但是,由于高浓度的电中性或带电荷的去污剂的存在而提高了样品体系的离子强度,所以能显著提高水溶性蛋白信噪比的低温探头技术在膜蛋白液体

核磁共振研究中并没有太大的贡献<sup>[25,26]</sup>.

在应用液体核磁共振方法进行水溶性蛋白的结构研究中,距离结构信息 NOE(nuclear overhauser effect)是主要收集的结构约束信息. 但是,在膜蛋白液体核磁共振结构研究中,由于大量的非氘代的去污剂的甲基/亚甲基氢核的存在,严重干扰膜蛋白的长距离 NOE 信息的收集,使得单纯依靠 NOE 很难直接计算得到膜蛋白的三维结构. 这就需要获得其他长程结构信息,例如能提供取向信息的残余偶极耦合(residual dipolar coupling, RDC)<sup>[28,29]</sup>和依赖于顺磁弛豫增强(paramagnetic relaxation enhancement, PRE)<sup>[30]</sup>的长距离结构信息. 更多的提供膜蛋白结构约束信息的方法仍然在发展当中,包括膜蛋白的甲基<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 而其他<sup>12</sup>C/<sup>2</sup>H 标记的 Leu, Ile, Val 和相关的甲基氢核之间的 NOE 收集方法<sup>[31,32]</sup>.

目前,应用液体核磁共振已经解析了多个膜蛋白结构(图 5),而且越来越多的膜蛋白结构解析在各个实验室中也取得了非常突出的进展.

在膜蛋白/去污剂胶束系统中,由于去污剂胶束的球形结构,使得许多膜蛋白中能 and 磷脂双分子层表面相结合的膜外区域失去了空间依托,因而有报道指出膜蛋白的跨膜结构发生了可以检测到的空间



其中,DAGK 是一个具有三次跨膜的三聚体膜蛋白(三聚体则共有九次跨膜螺旋),其 DAGK/DPC 复合物具有大约 100 kDa 的分子量  
图 4 应用 HSQC(heteronuclear single quantum correlation)(a)和 TROSY(transverse relaxation optimized spectroscopy)(b)

方法获得的 DAGK 蛋白/DPC 去污剂胶束样品的<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 二维相关谱的比较<sup>[27]</sup>

Fig. 4 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N two dimensional correlatoin spectra comparison of DAGK/DPC sample using HSQC or TROSY pulse sequences

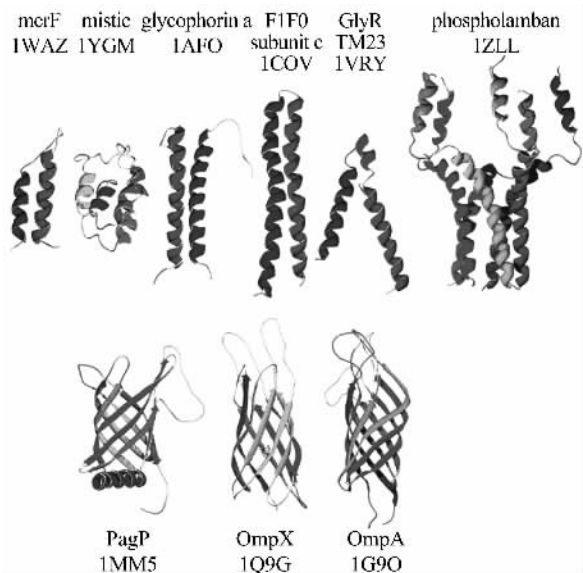


图 5 应用液体核磁共振方法所解析的膜蛋白/去污剂胶束中的膜蛋白三维结构. 其中每一个结构的注解包括该膜蛋白的名字和相应的 PDB 编号<sup>[27]</sup>

Fig. 5 Three dimensional membrane protein structures in detergent micelles determined using solution NMR

结构变化<sup>[2]</sup>. 因此, 去污剂胶束并不是一个十分理想的磷脂双分子层的模拟物, 能提供磷脂双分子层结构的低  $q$  值饼状胶束引起了新的关注, 并将逐步发展成为一种新的能解析膜蛋白三维结构的模拟环境.

#### 4 应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构

应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构主要针对膜蛋白/高  $q$  值饼状胶束或膜蛋白/磷脂双分子层复合物. 在这种非常近似于膜蛋白生理环境的情况下, 膜蛋白能维持非常稳定的正确折叠. 由于膜蛋白在这种环境下具有非常有限的转动运动 (rotational motion), 特别是缺乏各向同性的运动, 使得这一类样品非常适合于应用固体核磁共振方法进行膜蛋白的三维结构研究. 在固体核磁共振方法中, 由于样品已经是固体, 这样, 液体核磁共振实验中的分子量的限制就不再是主要的限制因素了, 理论上可以进行无穷大的分子的结构研究. 但是, 由于核磁共振方法是一种灵敏度不高的物理方法, 并且核磁共振探头中样品管的体积有限, 以及膜蛋白样品中的大多数组分为磷脂分子, 使得固体核磁共振方法仍然只能关注较小分子的结构研究. 同时, 由于

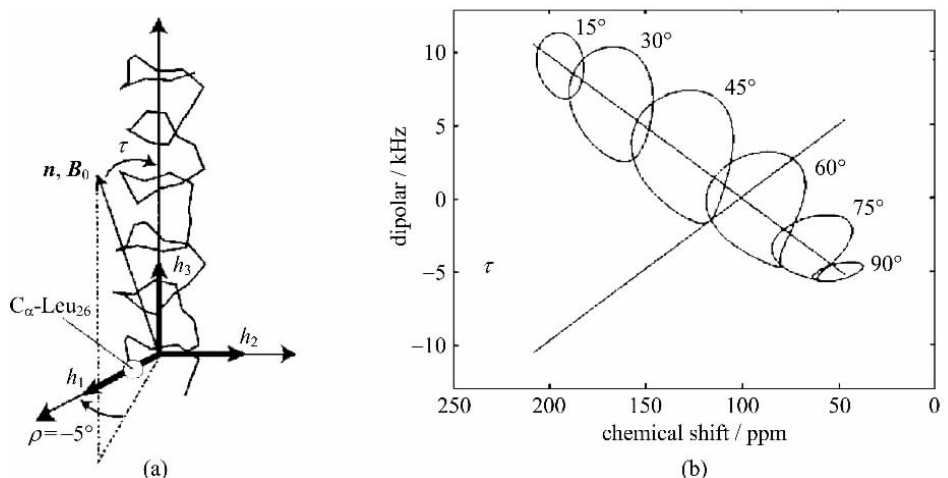
在固体样品中存在非常强的偶极耦合 (dipolar coupling), 在核磁信号收集时往往需要很强的去耦脉冲 (decoupling pulse) 来获得具有较好分辨率的核磁信号. 在固体样品中缺少分子内部运动, 而且其中水的含量较为有限, 在强功率的去耦信号下, 固体样品非常容易过热而造成膜蛋白样品的不稳定甚至变性<sup>[33]</sup>. 针对这一问题, 人们发明并发展了一种新的利用交叉电场屏蔽设计的双通道、双线圈的低电场固体核磁探头 (low E probe)<sup>[34]</sup>, 能有效降低因为高去耦功率带来的膜蛋白样品的不稳定, 大大提高了应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构的可操作性.

在静态均一取向固体核磁共振方法中, 可以应用膜蛋白/高  $q$  值饼状胶束在磁场中的诱导取向, 也可以应用超薄玻璃板 ( $\sim 0.1$  mm) 来机械性传递均一取向. 在应用这两种方法研究由跨膜螺旋组成的膜蛋白或跨膜多肽的三维结构时, 人们发现跨膜螺旋中每一个氨基酸的核磁信号与该跨膜螺旋在磷脂双分子层中的倾角 (tilt angle), 或者跨膜螺旋与磁场强度之间的倾角具有非常直接的相关性, 并称之为 PISA 轮 (PISA wheel)<sup>[35]</sup>. 在该方法中, 具有不同倾角的跨膜螺旋各个氨基酸的主干  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  信号在 ( $^{15}\text{N}$  化学位移)  $\sim$  ( $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  偶极耦合) 的二维相关谱中所对应在不同的位置, 并且相邻的氨基酸的信号还具有  $100^\circ$  的转动角度差异 (rotational angle) (图 6). 应用这种方法, 能直接归属出跨膜螺旋中的每一个氨基酸的核磁信号, 还能直接获取每一个肽平面在磁场下的取向信息, 并由此计算出该跨膜螺旋的三维结构. 在这个方法的基础上, Opella 实验组还进一步发展了偶极波 (dipolar wave) 方法<sup>[36, 37]</sup>, 帮助进行膜蛋白的信号归属和结构信息的获取.

应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构时, 由于固体样品非常慢的转动运动 (rotational motion), 所获得的固体核磁共振光谱具有非常宽的谱线. 目前主要有两种固体核磁共振方法能有效提高固体核磁共振信号的分辨率 (resolution): 静态均一取向方法 (static uniform orientation) 和魔角旋转方法 (magic angle spinning).

应用静态均一取向固体核磁共振方法, 目前已经有多个膜蛋白结构或跨膜多肽结构得到了解析 (图 7).

应用魔角旋转方法进行膜蛋白的结构研究, 目



(a) 跨膜螺旋轴线方向与磁场方向  $B_0$  之间的角度定义为  $\tau$   
 (b) 跨膜螺旋上氨基酸对应的信号组成一个轮状分布, 并随着不同倾角而该轮状分布在光谱中的位置不一样

图 6 静态均一取向固体核磁共振方法中, 跨膜螺旋在磁场中的不同倾角与该螺旋上各个氨基酸所对应的二维光谱信号之间的关系<sup>[35]</sup>.

Fig. 6 Correlation between position/pattern of two dimensional spectrum and tilt angle of a transmembrane helix and amino acid residues in the helix, using uniformly aligned solid state NMR method

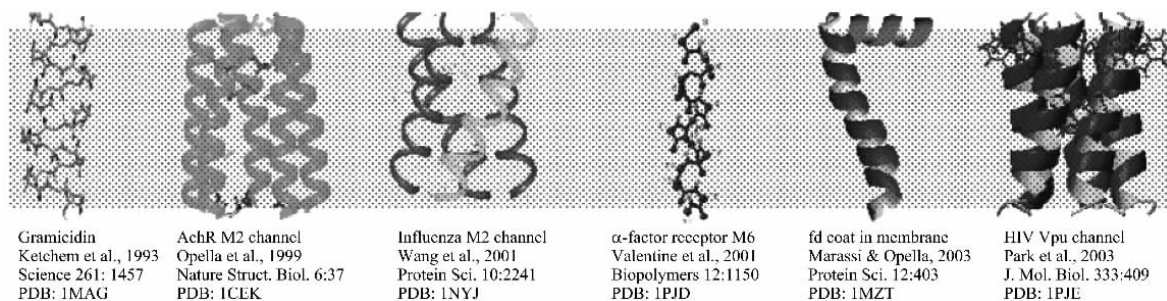


图 7 应用静态均一取向固体核磁共振方法所解析的膜蛋白或跨膜螺旋的三维结构<sup>[5]</sup>  
 其中每一个结构的 PDB 编号列在每一个结构下方

Fig. 7 Three dimensional structures of membrane protein or transmembrane helices determined using static, uniformly oriented solid state NMR method

前还停留在方法发展方面. 由于这种方法应用粉末样品, 并将样品管放置在与磁场方向成  $54.7^\circ$  的位置上并提供高速的围绕样品转子轴线进行的高速旋转, 以消除固体核磁样品中的直接导致宽线宽信号的直接偶极耦合 (direct dipolar coupling, DD) 和化学位移各向异性 (chemical shift anisotropy, CSA) 等相互作用. 因此, 这种方法在消除 DD 和 CSA 的同时, 也将固体样品所拥有的距离信息, 取向信息消灭殆尽, 使得应用魔角旋转方法很难应用来获得直接应用于膜蛋白三维结构解析的结构信息.

最初的魔角旋转固体核磁方法应用主要是通过

同位素标记膜蛋白中具有相互作用的两个氨基酸, 应用 REDOR (rotational echo double resonance)<sup>[38]</sup> 或 TEDOR (transferred echo double resonance)<sup>[38]</sup> 方法来找回这两个位点之间的偶极耦合, 并测量两个位点之间的相互距离. 这种方法严重依赖样品的特异性标记, 而很难使之得到广泛应用. 随着固体核磁方法的进一步发展, 特别是 RFDR (radio frequency driven recoupling) 和 SD (spin diffusion) 等方法的应用, de Groot 实验室已经成功应用固体核磁共振方法解析了水溶性蛋白 SH3 的三维结构<sup>[39]</sup>. 这种方法无疑能直接应用来解析膜蛋白的三维结构, 因为在固体环境下, 膜蛋白和水溶性蛋



白的差别非常小. 目前, 多个实验室正在尝试发展各种实验技术, 使魔角旋转这种方法能直接应用于解析膜蛋白在磷脂双分子层环境下的三维结构<sup>[40~42]</sup>.

## 5 核磁共振方法研究膜蛋白三维结构的前景展望

随着膜蛋白三维结构的研究得到日益增多的关注, 同时, 越来越多的实验室涉足这一领域, 新的方法, 包括核磁共振方法的发明和发展将进一步推进膜蛋白三维结构的研究.

在膜蛋白样品制备方面, 更多的经验积累将极大推进人们对膜蛋白与不同去污剂, 不同的磷脂之间的相互作用的理解, 将避免尝试一些不利于膜蛋白稳定结构的去污剂, 大大加快正确去污剂筛选的速度. 同时, 液体核磁共振波谱学方面的发展, 特别是目前正在进行的<sup>13</sup>C 直接检测<sup>[43]</sup>、长程 NOE 信息收集等方法的发展<sup>[44,45]</sup>, 将有力提高应用液体核磁共振方法解析膜蛋白结构的精密程度. 此外, 最近正在发展的应用化学位移和结构计算直接相结合的 CS-Rosetta 方法<sup>[46]</sup>, 如果被证明确实有效、可靠的话, 将极大缩短膜蛋白结构解析所需的时间并节约大量的人力和财力.

应用固体核磁共振方法研究膜蛋白三维结构, 特别是应用魔角旋转方法近几年来发展飞速, 最近发展的蛋白多晶样品在解析水溶性蛋白方面已经取得了非常快的进展<sup>[47]</sup>, 相关方法也许有望能应用到膜蛋白中来. 特别是在细菌表达中发现形成的膜蛋白杆状晶体<sup>[48,49]</sup>, 也许能提高膜蛋白样品的质量并获得高质量的结构信息. 在应用静态均一取向固体核磁共振方法中, 由于长期以来主要应用<sup>13</sup>C 和/或<sup>15</sup>N 等低旋磁比的原子核通道作为检测通道, 目前正在发展的直接应用<sup>1</sup>H 通道作为检测通道<sup>[50,51]</sup>, 同时辅以高效率的同核去耦(homo-nuclear decoupling)方法也许能大大提高应用该方法的信号灵敏度, 并加快膜蛋白的三维结构研究.

总而言之, 虽然经过 20 多年的发展, 目前应用核磁共振方法解析膜蛋白三维结构从方法学上尚有许多需要改进的地方, 所幸膜蛋白三维结构的研究正开始进入高速发展阶段. 希望核磁共振方法能在膜蛋白结构研究过程中做更多, 更大的贡献!

## 参考文献(References)

- [1] Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms[J]. *Protein Sci*, 1998, 4: 1 029-1 038.
- [2] Chou J J, Kaufman J D, Stahl S J, et al. Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 Env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 11: 2 450-2 451.
- [3] Al-Hashimi H M, Valafar H, Terrell M, et al. Variation of molecular alignment as a means of resolving orientational ambiguities in protein structures from dipolar couplings[J]. *J Magn Reson*, 2000, 2: 402-406.
- [4] Ottiger M, Bax A. Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules [J]. *J Biomol NMR*, 1998, 3: 361-372.
- [5] Opella S J, Marassi F M. Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy[J]. *Chem Rev*, 2004, 8: 3 587-3 606.
- [6] Nicholson L K, Moll F, Mixon T E, et al. Solid-state <sup>15</sup>N NMR of oriented lipid bilayer bound gramicidin A' [J]. *Biochemistry*, 1987, 21: 6 621-6 626.
- [7] Ketchum R, Roux B, Cross T. High-resolution polypeptide structure in a lamellar phase lipid environment from solid state NMR derived orientational constraints [J]. *Structure*, 1997, 12: 1 655-1 669.
- [8] Quine J R, Brennen M T, Cross T A. Protein structural analysis from solid-state NMR-derived orientational constraints [J]. *Biophys J*, 1997, 5: 2 342-2 348.
- [9] Poget S F, Girvin M E. Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics; small is beautiful, but sometimes bigger is better[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 12: 3 098-3 106.
- [10] Poget S F, Cahill S M, Girvin M E. Isotropic bicelles stabilize the functional form of a small multidrug-resistance pump for NMR structural studies[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(9): 2 432-2 433.
- [11] Tucker J, Grishammer R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*[J]. *Biochem J*, 1996, 891-899.
- [12] Tian C, Karra M D, Ellis C D, et al. Membrane protein preparation for TROSY NMR screening[J]. *Methods Enzymol*, 2005, 321-334.
- [13] Tian C, Vanoye C G, Kang C, et al. Preparation,

- functional characterization, and NMR studies of human KCNE1, a voltage-gated potassium channel accessory subunit associated with deafness and long QT syndrome[J]. *Biochemistry*, 2007, 41: 11 459-11 472.
- [14] Tian C, Breyer R M, Kim H J, et al. Solution NMR spectroscopy of the human vasopressin V2 receptor, a G protein-coupled receptor[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 22: 8 010-8 011.
- [15] Sanders C R, Oxenoid K. Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1-2: 129-145.
- [16] Rigaud J L, Pitard B, Levy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 3: 223-246.
- [17] Angrand M, Briolay A, Ronzon F, et al. Detergent-mediated reconstitution of a glycosyl-phosphatidylinositol-protein into liposomes[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 1: 168-176.
- [18] Knol J, Sjollem K, Poolman B. Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins[J]. *Biochemistry*, 1998, 46: 16 410-16 415.
- [19] Moll F, 3rd Cross T A. Optimizing and characterizing alignment of oriented lipid bilayers containing gramicidin D[J]. *Biophys J*, 1990, 2: 351-362.
- [20] LoGrasso P V, Moll F, 3rd Cross T A. Solvent history dependence of gramicidin A conformations in hydrated lipid bilayers [J]. *Biophys J*, 1988, 2: 259-267.
- [21] Tian C, Tobler K, Lamb R A, et al. Expression and initial structural insights from solid-state NMR of the M2 proton channel from influenza A virus [J]. *Biochemistry*, 2002, 37: 11 294-11 300.
- [22] Quine J R, Cross T A. Protein Structure in Anisotropic Environments; Unique Structural Fold from Orientational Constrains [J]. *Concepts in Magnetic Resonance*, 2000, 2: 71-82.
- [23] Quine J R, Cross T A, Chapman M S, et al. Mathematical aspects of protein structure determination with NMR orientational restraints[J]. *Bull Math Biol*, 2004, 6: 1 705-1 730.
- [24] Pervushin K, Riek R, Wider G, et al. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 23: 12 366-12 371.
- [25] Voehler M W, Collier G, Young J K, et al. Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry[J]. *J Magn Reson*, 2006, 1: 102-109.
- [26] Kelly A E, Ou H D, Withers R, et al. Low-conductivity buffers for high-sensitivity NMR measurements[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 40: 12 013-12 019.
- [27] Sanders C R, Sonnichsen F. Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges[J]. *Magn Reson Chem*, 2006, S24-40.
- [28] Dosset P, Hus J C, Marion D, et al. A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings[J]. *J Biomol NMR*, 2001, 3: 223-231.
- [29] Valafar H, Prestegard J H. REDCAT: a residual dipolar coupling analysis tool [J]. *J Magn Reson*, 2004, 2: 228-241.
- [30] Battiste J L, Wagner G. Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear overhauser effect data[J]. *Biochemistry*, 2000, 18: 5 355-5 365.
- [31] Tugarinov V, Kay L E. An isotope labeling strategy for methyl TROSY spectroscopy[J]. *J Biomol NMR*, 2004, 2: 165-172.
- [32] Tugarinov V, Kay L E. Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 45: 13 868-13 878.
- [33] Li C, Mo Y, Hu J, et al. Analysis of RF heating and sample stability in aligned static solid-state NMR spectroscopy[J]. *J Magn Reson*, 2006, 1: 51-57.
- [34] Gor'kov P L, Chekmenev E Y, Fu R, et al. A large volume flat coil probe for oriented membrane proteins [J]. *J Magn Reson*, 2006, 1: 9-20.
- [35] Wang J, Denny J, Tian C, et al. Imaging membrane protein helical wheels[J]. *J Magn Reson*, 2000, 1: 162-167.
- [36] Mesleh M F, Veglia G, DeSilva T M, et al. Dipolar waves as NMR maps of protein structure[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 16: 4 206-4 207.
- [37] Mesleh M F, Opella S J. Dipolar Waves as NMR maps of helices in proteins[J]. *J Magn Reson*, 2003, 2: 288-299.
- [38] Schaefer J. REDOR-determined distances from heterospins to clusters of  $^{13}\text{C}$  labels [J]. *J Magn Reson*, 1999, 1: 272-275.
- [39] Castellani F, van Rossum B, Diehl A, et al. Structure

- of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy[J]. *Nature*, 2002, 6: 911-98-102.
- [40] Li Y, Kijac A Z, Sligar S G, et al. Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy[J]. *Biophys J*, 2006, 10: 3: 819-3: 828.
- [41] Lorch M, Fahem S, Kaiser C, et al. How to prepare membrane proteins for solid-state NMR: A case study on the alpha-helical integral membrane protein diacylglycerol kinase from *E. coli*. *Chembiochem*, 2005, 9: 1: 693-1: 700.
- [42] Bechinger B, Aisenbrey C, Bertani P. The alignment, structure and dynamics of membrane-associated polypeptides by solid-state NMR spectroscopy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1-2: 190-204.
- [43] Shimba N, Kovacs H, Stern A S, et al. Optimization of  $^{13}\text{C}$  direct detection NMR methods[J]. *J Biomol NMR*, 2004, 2: 175-179.
- [44] Bertini I, Felli I C, Kummerle R, et al.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  NOESY: A constructive use of  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  spin-diffusion [J]. *J Biomol NMR*, 2004, 3: 245-251.
- [45] Tugarinov V, Kay L E, Ibraghimov I, et al. High-resolution four-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NOE spectroscopy using methyl-TROSY, sparse data acquisition, and multidimensional decomposition[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 8: 2: 767-2: 775.
- [46] Shen Y, Lange O, Delaglio F, et al. Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 12: 4: 685-4: 690.
- [47] Morcombe C R, Paulson E K, Gaponenko V, et al.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correlation spectroscopy of nanocrystalline proteins[J]. *J Biomol NMR*, 2005, 3: 217-230.
- [48] Lefman J, Zhang P, Hirai T, et al. Three-dimensional electron microscopic imaging of membrane invaginations in *Escherichia coli* overproducing the chemotaxis receptor Tsr[J]. *J Bacteriol*, 2004, 15: 5: 052-5: 061.
- [49] Elmes M L, Scraba D G, Weiner J H. Isolation and characterization of the tubular organelles induced by fumarate reductase overproduction in *Escherichia coli* [J]. *J Gen Microbiol*, 1986, 1: 429-1: 439.
- [50] Reif B, Griffin R G.  $^1\text{H}$  detected  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  correlation spectroscopy in rotating solids[J]. *J Magn Reson*, 2003, 1: 78-83.
- [51] Zhou D H, Shah G, Cormos M, et al. Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz magic-angle spinning[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 38: 11: 791-11: 801.