

台灣超高磁場液態核磁共振核心簡介 及其在基因體醫學之應用

Taiwan Ultra High-Field Solution NMR Core Facility and Applications in Genomic Medicine

黃太煌、張七鳳、吳文晉

Tai-huang Huang, Chi-Fon Chang, Wen-Jin Wu

核磁共振光譜學是應用最廣泛、最重要的物理技術，其應用範圍涵蓋物質定性、化學分子的結構鑑定、生理的新陳代謝、生化巨分子的結構動性與功能以及磁振造影等，它已成為生、醫、理、工各領域研究及應用不可或缺的先進技術。本文針對台灣設置於中央研究院生物醫學科學研究所最先進的高磁場液態核磁共振核心 (HFNMRC) 之最近發展作一簡單介紹，該中心開放全國有需求的學術及產業界使用，提供各項技術服務及諮詢。

NMR spectroscopy is perhaps the most versatile and most important physical technique. Its applications encompass material characterization, chemical structure determination, metabolism, biomacromolecular structure dynamics and function, and MRI *etc.* It has become an indispensable advanced tool in biomedicine, natural science, and engineering. Here we briefly introduce the recent developments in ultra high-field solution NMR at the High Field NMR Center (HFNMRC) at Academia Sinica. HFNMRC is open to all qualified users from academic and industry alike in Taiwan.

一、高磁場核磁共振核心架構及設備

高磁場核磁共振核心 (High Field Nuclear Magnetic Resonance Center, HFNMRC) 於民國九十一年成立，屬於行政院國家科學委員會「基因體醫學國家型科技計畫之核心設施」(The National Core Facilities of the National Research Program for Genomics Medicine, NRPGM)，旨在建立最先進的高磁場核磁共振設備，來支援基因體國家型科技計畫之推動。由於高磁場核磁共振光譜儀不僅設備昂

貴，維護費用亦非常可觀，國內一般個人實驗室不太可能獨立設置並維護，因此建立一個公開共用的高磁場核磁共振核心設施，乃推動結構基因體學，及進一步提昇台灣生化巨分子核磁共振研究的根本需求。高磁場核磁共振核心之服務目標為：(1) 提供最先進高磁場液態核磁共振設備，以有時效及低限制性的支援結構基因體學、結構生物學及生醫製藥相關研發活動；(2) 提供高水準技術支援，促進國內核磁共振研究；及 (3) 發展結構基因體相關之核磁共振新方法與技術。

核磁共振儀	¹ H 共振頻率	主要探頭名稱	特點
AV500	500 MHz	CRYO_TXI-Z CRYO_QNP-Z	三核低溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) 四核低溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ³¹ P, ¹⁹ F)
AVIII600	600 MHz	CRYO_TCI-Z	三核低溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N)
AV600	600 MHz	CRYO_TCI-Z	三核低溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N)
AV600*	600 MHz	TXI-Z QXI-Z BBO	三核室溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) 四核室溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N, ³¹ P) 多核室溫探頭
AV800	800 MHz	CRYO_TXI-Z TXI-Z	三核低溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N) 三核室溫探頭 (¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N)

* 此設備置於中央研究院化學所

高磁場核磁共振核心成立至今硬體設施方面已陸續更新，並添購最先進的核磁共振設備。目前核心共有五台核磁共振儀，分別為一台 800 MHz、三台 600 MHz 及一台 500 MHz (圖 1)。其中有四組核磁共振儀配置超低溫探頭 (cryo probe)，如表 1 所列。今年底將增添一台 850 MHz 超高磁場核磁共振儀。超低溫探頭的設計是利用低溫氦氣將探頭之無線電波線圈 (RF coil) 冷卻至平均 25 K，前置放大器 (preamplifier) 冷卻至約 77 K，但是樣品的溫度仍可以保持在實驗所需的溫度。因為處於低溫，所以可大幅降低線圈及前置放大器因熱所產生之熱噪信號 (thermal noise)，故利用超低溫探頭取得的核磁共振訊噪比 (signal to noise ratio) 相較於一般探頭可提高許多。對溶於有機溶劑的樣品而言，其靈敏度約可增加為四倍，水溶液的樣品訊號則平

均約可增加二至三倍，因此超低溫探頭可以更迅速地完成實驗，並提高偵測微量樣品的可能性。

高磁場核磁共振核心所有儀器除了接受全國各學術研究單位申請服務外，也開放服務產業界。舉凡使用申請辦法、服務收費標準、活動公告、儀器預約使用、實驗方法、數據分析軟體及結構計算軟體等資訊皆可於核心網頁取得 (<http://www.nmr.sinica.edu.tw>)。除了維持核心正常運作及一般服務外，亦不定期舉辦免費教育訓練課程及推廣活動：基礎課程幫助入門者瞭解核磁共振基本知識，並安排上機熟悉基本操作；進階課程則介紹最先進的實驗技術或應用軟體；舉辦或協辦國內及國際性核磁共振相關研討會、研習會，邀請國際知名人士來訪。此外，由數位碩士及博士組成的核心服務團隊非常樂意參與合作研究工作，提供高水準技術支

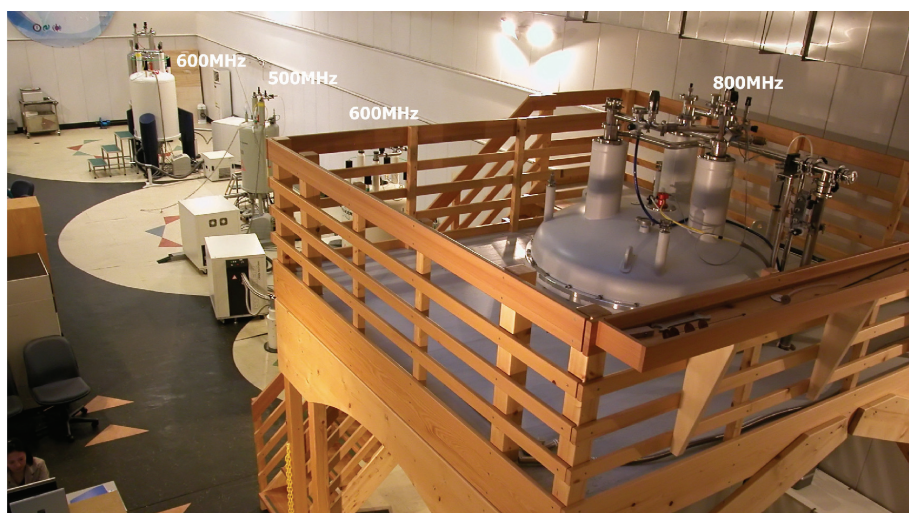


圖 1. 高磁場核磁共振核心 (中央研究院生物醫學科學研究所 B2)。

援，期能共同達成推動國內核磁共振研究之目標。核心服務團隊亦著力於發展核磁共振相關之新方法與技術，例如引進最新的脈衝系列、發展電腦輔助光譜自動標定程式以加速分析⁽¹⁾，以及建造磁場循環載運梭⁽²⁾，以進一步研究分子動性等。

二、核磁共振新方法與技術研發—快速蒐集高維度核磁共振數據的方法

近幾年來有幾種快速蒐集高維度核磁共振數據的方法被提出來，例如 GFT-NMR⁽³⁾、投影重建 (projection reconstruction, PR-NMR)⁽⁴⁾、單一次掃描二維光譜技術⁽⁵⁾、filter diagonalization 方法⁽⁶⁾、Hadamard 光譜技術⁽⁷⁾ 及自動化投影圖譜法 (automatic projection spectroscopy, APSY)⁽⁸⁾。其中 GFT-NMR、PR-NMR 及 APSY 屬於「縮維度」方法，也就是說三維、四維甚至十維的光譜可以用低維度二維光譜法蒐集後，重建出其原始之高維度圖譜 (APSY 除外，它並不重建高維度光譜，而是產生含有關聯性的高維度光譜峰列表)。例如一個三維 HNCA 實驗，傳統方法獨立蒐集 48 個 H-N 個二維光譜，另外獨立蒐集 96 個 H-C 個二維圖譜 (¹H、¹³C、¹⁵N)，最後再以三維傅立葉轉換出三維的頻率圖譜，這個傳統方法耗時，往往需要十幾個小時至幾天的時間。以上簡介之縮維度快速數據蒐集法則可大幅縮短蒐集多維核磁共振圖譜所需時間 (數十倍)。本中心近幾年來著重於投影重建法 (projection reconstruction) 的技術發展及其運用，以下簡單介紹其方法原理。基於篇幅限制，數學操作請參考文獻 4。

以三維 HNCA 光譜為例，一個三維 HNCA 可以只用三個二維光譜來重建：一個二維 H-C 光譜面、一個二維 H-N 光譜面以及一個斜角 H-CN 光譜面。在投影重建法上，C 與 N 在間接維度上的化學位移演化同時發生，傳統方法則是化學位移演化個別發生。那該如何將光譜重建呢？這利用到電腦斷層掃描上的投影重建技術。假設我們看一個三維 HNCA 上某一個 N-H 的 ¹H 質子頻率 (例如 8.6 ppm)，現在我們切出一個二維 C、N 面，設想現在 F₁ 軸上有三個 ¹⁵N 頻率點，另外在 F₂ 軸有三個 ¹³C 頻率點。如圖 2(a) 所示，可以重建一個暫時性的

二維平面圖譜：由 F₁ 軸及 F₂ 軸的三個頻率點各自向內延伸投射，並只保留其交集點之量值。但並不是每一個交集點都是真正的交互連結峰 (經由共價鍵連結傳導的才是真的)，假的交互連結峰則可以藉由斜角投射面的訊息去除。如在圖 2(b) 所示，一個二維斜角投射面可以藉由共振斜角頻率的反投射得來，此圖中兩個斜角共振頻率反投射出兩條平行的「斜線峰」。將 (b) 中的平行斜線峰與 (a) 重疊，並比較其強度大小值，只有在交叉的地方其強度數值才予以保留。假的交互峰因此被剔除，只有真正的交互峰被保留 (如圖 2(c) 所示)。

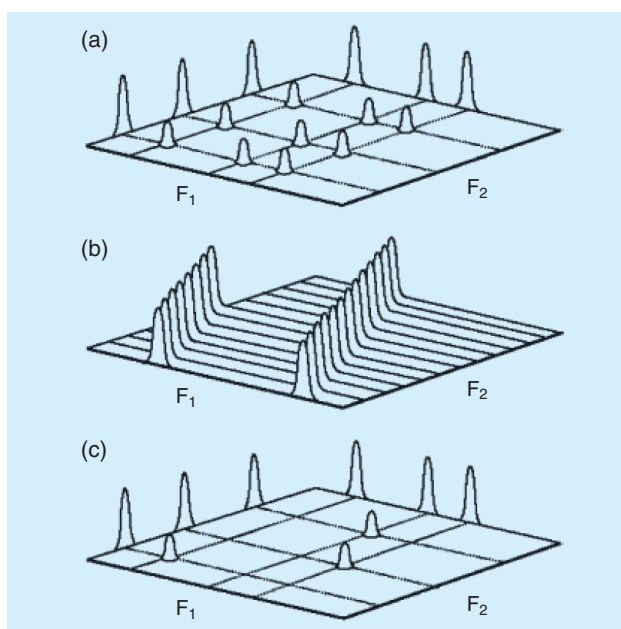


圖 2. 投影重建核磁共振法原理。(a) 一個暫時性的二維平面光譜可以由 F₁ 軸及 F₂ 軸的頻率點各自延伸，並取其交集點，但並不是每一交集點都是真正的交互連結峰，假的交互連結峰可以藉由斜角投射面的訊息去除。(b) 二維斜角投射面可以藉由共振斜角頻率的反投射得來，此圖中兩個斜角共振頻率反投射出兩條平行的「斜線峰」。(c) 將 (b) 中的平行斜線峰與 (a) 重疊，並比較其強度值，只有在交叉地方其強度數值才予以保留。假的交互峰因此被剔除，只有真正的交互峰被保留。(圖轉載自下文: E. Kupce and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6429 (2004)).

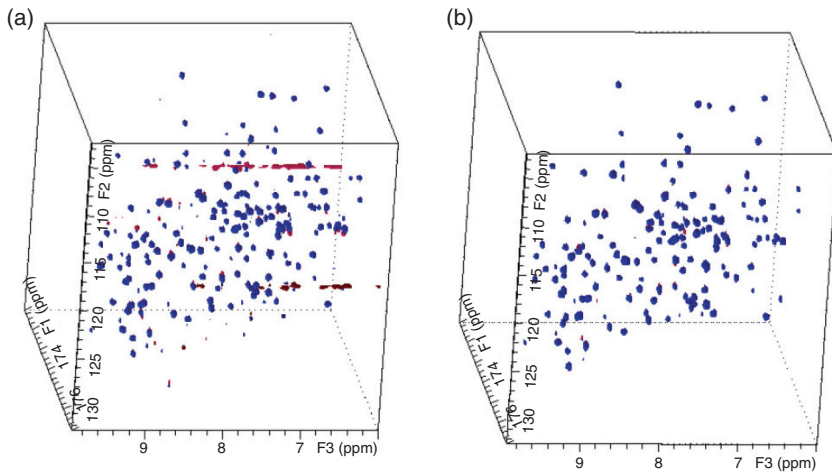


圖 3。

(a) 傳統三維 TROSY-HNCO 圖譜，數據蒐集時間：11 小時 37 分鐘。
 (b) 投影重建三維 TROSY-HNCO 圖譜，數據蒐集時間為 51 分鐘，此圖由 0°、90°、±10° 及 ±40° 斜角二維圖譜重建。樣品：[60% ^2H], ^{13}C , ^{15}N -Pol X (20 kDa)，但樣品溫度在攝氏 4° 其有效分子量如同一個 36 kDa 蛋白質 (感謝中央研究院生物化學研究所蘇美堅博士提供樣品)。

當光譜複雜度 (重疊性) 增高時，可另外蒐集數個不同角度的斜角二維光譜，以增高解析度。此方法原理如同我們在數一個房間裡面的人數一樣，當有人被擋住，我們會斜一個角度去數可能被擋到的人，人愈多，需要歪頭側身去數的角度愈多，但是通常不會多到需要整個教室橫的、直的各走一趟來數人數。(中小分子量蛋白質的多維相關性光譜大多為不連續性，所以也不需要 ^{13}C 及 ^{15}N 軸各仔仔細一步一步傳統式地探索後才得知各頻率峰的位置)。快速數據蒐集法可在數分鐘內蒐集三維關聯性圖譜 (圖 3)，這對於不穩定的蛋白質將有極大幫助，低濃度樣品則可以用更多的掃描次數 (number of scans) 蒐集，另外可空出核磁共振儀的時間給更多使用者，或是花多些時間在蒐集 NOESY 數據上。

三、核磁共振在生物巨分子方面之應用範例

1. 塵蟎過敏原的結構及相關疾病藥物之研發⁽⁹⁾

塵蟎過敏原為引發過敏性疾病的第二號兇手，在熱帶及亞熱帶它是頭號戰犯。而且塵蟎無所不在，又無季節性，因此人們很難避免它的肆虐。現已在 *Blomia tropicalis* 這一株塵蟎發現 30 種過敏原，其中最重要的是 Blo t 5。在台灣 90% 的氣喘病人及鼻黏膜炎病人對 Blo t 5 具陽性反應。Blo t 5 係功能未知的塵蟎蛋白質。我們利用核磁共振的方法解出其三維結構，發現其結構為具三條螺旋的螺旋柱 (圖 4(a)、(b))⁽⁹⁾；更進一步利用飽和磁性傳輸及化學位移擾動技術 (圖 4(c)) 找出 Blo t 5 和單株

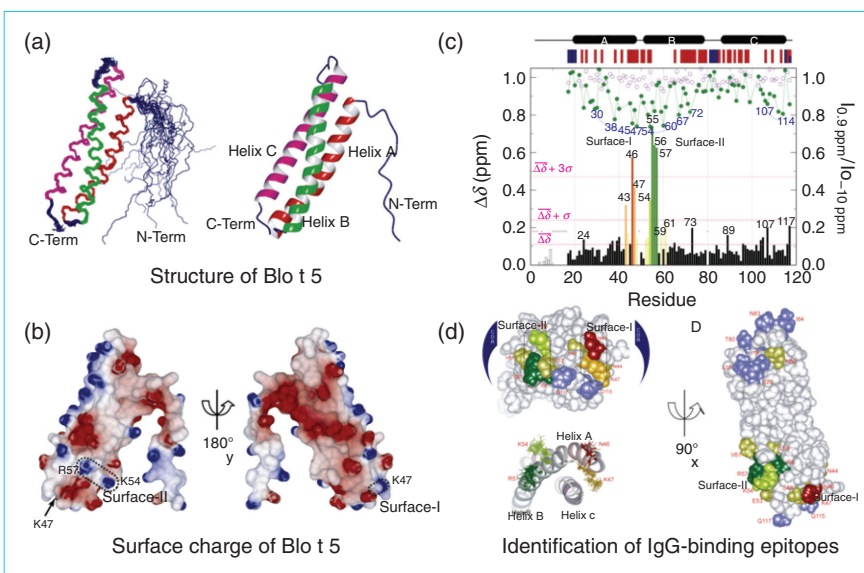
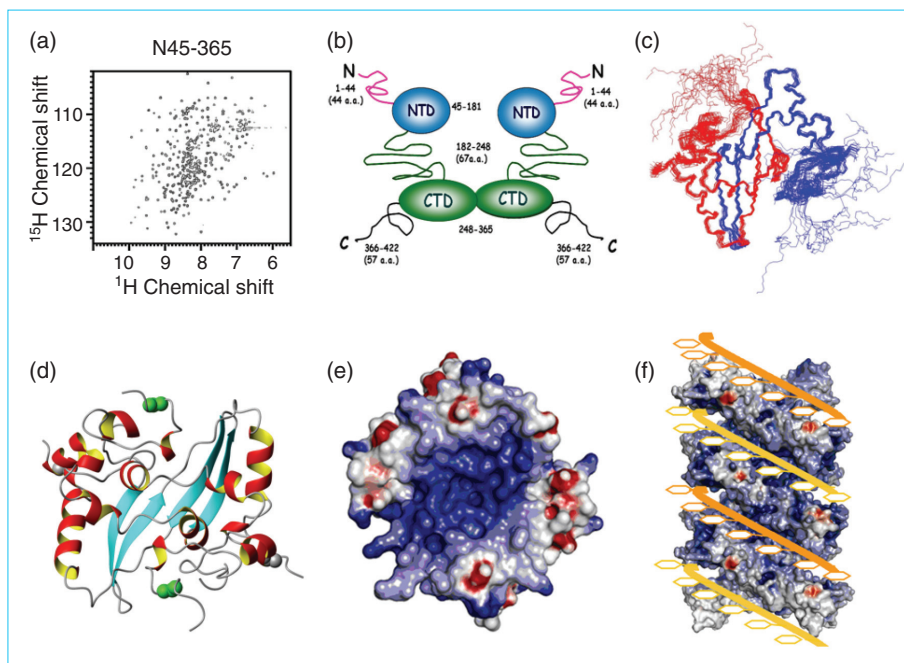


圖 4。

(a) Blo t 5 過敏原 NMR 結構；(b) Blo t 5 過敏原結構表面電荷示意圖：紅色為負電區，藍色為正電區；(c) Blo t 5 過敏原-mAb 4A7 單株抗體結合區 (surface-I, surface-II) 的標定；(d) Blo t 5 過敏原-mAb 4A7 單株抗體結合區示意圖⁽⁹⁾。

圖 5.

(a) NP⁴⁵⁻³⁶⁵ 的 ¹H-¹⁵N 異核二維圖譜。蛋白質雙體分子量大約七萬道耳吞；(b) NP 整體構形示意圖；(c) CTD 的 NMR 結構；(d) CTD 的 NMR 雙體結構彩帶示意圖；(e) CTD 結構表面電荷示意圖；(f) NP-RNA 核酸蛋白體螺旋結構模型。彩帶代表 RNA，環代表鹼基⁽¹⁰⁻¹³⁾。



抗體 mAb 4A7 的結合區乃位於底端的兩塊區域 (圖 4(d))。更利用磁性弛緩技術算出單株抗體結合區具較高之動性，目前本實驗室正積極以所取得之結構及動性資訊為基礎，設計不同的定點突變蛋白，以期找到合適的低過敏性過敏原，作為治療 Blo t 5 引起過敏疾病的藥物。

2. 嚴重急性呼吸道症冠狀病毒 (SARS CoV) 核蓋蛋白 (Nuclear Capsid Protein, NCP) 包裹機制的探討^(10,11)

SARS CoV NP 係宿主被感染後表現量最多的蛋白，它包裹病毒的基因體核酸而形成核酸蛋白體。NP 係一強過敏原，且能和宿主的多個蛋白質作用，而影響宿主的功能。我們利用核磁共振方法，檢驗多個 NP 片斷的 ¹H-¹⁵N 異核二維圖譜 (圖 5(a))，證實 NP 具有兩段結構體，前後及中間則夾雜三段不具結構的胜肽 (圖 5(b))⁽¹⁰⁾。更進一步地利用立體矩陣同位素標定法 (stereo array isotope labeling, SAIL)⁽¹¹⁾ 解出其 C-端結構片斷 (CTD) 水溶液中的結構 (圖 5(c))⁽¹²⁾，發現 CTD 形成區塊交叉雙體 (圖 5(d))，其中心有一片帶正電區，並證明此為 RNA 結合區域 (圖 5(e))。也同時利用 X 光繞射法解出 CTD 的結構⁽¹²⁾，其結構和 NMR 結構相同，

然而蛋白質在晶體中排列成螺旋型，且其表面電性分配圖顯示螺旋槽帶正電，此正電區胺基酸和由 NMR 測得之 RNA 結合區吻合。因此我們提出以下的 SARS 冠狀病毒核酸蛋白體結構模型 (圖 5(f))。 (1) NP 雙體和 RNA 結合。 (2) 結合在 RNA 上的 NP 可在 RNA 鏈上滑行。當多個 NP 相碰在一起，將形成短 RNP 螺旋體，而 RNA 則包裹在此螺旋體之溝槽，環繞 CTD 螺旋。 (3) 多個短 RNP 螺旋體重組而形成全長的 RNP 螺旋體，以上模型有待更多的實驗證明。

四、結論

由於分子愈大，將造成譜線變寬、訊號靈敏度降低的困擾，所以過去利用核磁共振技術決定之蛋白質結構分子量大都小於兩萬道耳吞。然而近年來高磁場及低溫探頭等硬體發展大幅提高核磁共振訊號靈敏度及解析度，又應用於生物分子的核磁共振實驗方法亦不斷突破，使核磁共振探討的極限推高至分子量約十萬道耳吞的生物巨分子。利用 TROSY 原理的脈衝程式可標定巨大蛋白質之骨架及支鍊；利用殘餘偶極耦合 (residual dipolar coupling) 及立體矩陣同位素標定法技術，更可以

決定巨大蛋白質分子結構；利用維度分享概念減少維度來提高圖譜蒐集效率，除了可以節省蒐集圖譜所需的時間外，對於穩定性較差的樣品而言，更是不可或缺的新技術。超高磁場核磁共振核心成立至今以服務為前題，致力協助研究人員解決實驗技術之限制，提供國內學者及產業界高品質及方便的尖端液態核磁共振設施，服務品質及成果是國內核磁共振領域有目共睹的，歡迎國內學者及產業界同仁多加利用。

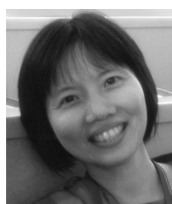
參考文獻

1. K.-P. Wu, J.-M. Chang, J.-B. Chen, C.-F. Chang, W.-J. Wu, T.-H. Huang, T.-Y. Sung, and W.-L. Hsu, *Journal of Computational Biology*, **13**, 229 (2006).
2. A. G. Redfield, *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 753 (2003).
3. S. Kim and T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1386 (2003).
4. E. Kupce and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6429 (2004).
5. L. Frydman, T. Scherf, and A. Lupulescu, *PNAS*, **99**, 15858 (2002).
6. J. Chen, V. A. Mandelshtam, and A. J. Shaka, *J Magn Reson.*, **146**, 363 (2000).
7. E. Kupce and R. Freeman, *J. Magn. Resonance*, **163**, 56 (2003).
8. S. Hiller, F. Fiorito, K. Wüthrich, and G. Wider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10876 (2005).
9. M. T. Naik, C. F. Chang, I. C. Kuo, C. C. H. Kung, K. Y. Chua, and T. H. Huang, *Structure*, **16**, 125 (2008).
10. C. K. Chang, S. C. Sue, T. H. Yu, C. M. Hsieh, C. K. Tsai, Y. C. Chiang, S. J. Lee, H. H. Hsiao, W. J. Wu, W. L. Chang, C. H. Lin, and T.-h. Huang, *J. Biomed. Sci.*, **13**, 59 (2006).
11. M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, and P. Güntert, *Nature*, **440**, 52 (2006).
12. M. Takeda, C.-k. Chang, T. Ikeya, G. tert, P., Y.-h. Chang, Y.-l. Hsu, T.-h. Huang, and M. Kainosho, *Journal of Molecular Biology*, **380**, 608 (2008).
13. C. Y. Chen, C. K. Chang, Y. W. Chang, S. C. Sue, H. I. Bai, L. Riag, C. D. Hsiao, and T.-h. Huang, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1075 (2007).



黃太煌先生為美國布蘭迪斯大學物理博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所特聘研究員暨基因體醫學國家型計畫超高磁場液態核磁共振中心主任。

Tai-huang Huang received his Ph.D. in physics from Brandeis University, USA. He is currently a distinguished research fellow in the Institute of Biomedical Sciences and the director of the High Field NMR Center of the National Research Program for Genomic Medicine.



張七鳳小姐為美國俄亥俄州立大學生物物理博士，現任中央研究院基因體研究中心研究副技師暨基因體醫學國家型計畫超高磁場液態核磁共振中心經理。

Chi-Fon Chang received her Ph.D. in biophysics from the Ohio State University, USA. She is currently an associate research specialist in the Genomic Research Center at Academia Sinica and a manager of the High Field NMR Center of the National Research Program for Genomic Medicine.



吳文晉先生為美國紐約州立大學石溪分校化學博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所研究助技師暨基因體醫學國家型計畫超高磁場液態核磁共振中心技術研發。

Wen-Jin Wu received his Ph.D. in chemistry from the State University of New York at Stony Brook, USA. He is an assistant research specialist in the Institute of Biomedical Sciences in Academia Sinica and a technical staff member of the High Field NMR Center of the National Research Program for Genomic Medicine.