

# 生物巨分子核磁共振技術之發展簡介

## Introduction of Progress in NMR Techniques for Large Biomolecules

黃信炘、林英智

Shing-Jong Huang, Ying-Chih Lin

經過數十年在實驗技術與硬體設備的進步與發展，核磁共振 (NMR) 光譜學已成為研究生物巨分子不可或缺的重要工具之一。本文旨在簡介最近在實驗技術上的重要進展，如用以提升巨大生物分子 (> 50 kDa) 的光譜靈敏度與解析度，及蛋白質結構優化等技術。除此之外，傳統多維 NMR 實驗是非常冗長而耗時的，此為核磁共振相關技術最大的缺點，故本文亦簡介最近在快速多維核磁共振實驗技術方面的發展。

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, extensively and successfully employed in many fields, has become one of the most important tools for studying biological macromolecules with the remarkable progress in both experimental techniques and hardware improvement in the past decades. This article briefly introduces recent significant progress in experimental techniques capable of improving sensitivity and resolution of spectra for very large biomolecules (> 50 kDa) and refinement of protein structures. In addition, conventional experiments of multidimensional NMR are very time-consuming to achieve well-resolved spectra. Recent advance of experiment techniques for shortening days-long acquisition time is also mentioned.

### 一、前言

自 1957 年第一張蛋白質核磁共振光譜發表以來<sup>(1)</sup>，核磁共振光譜學已逐漸發展成研究生物巨分子重要的研究工具。核磁共振可觀測生物分子各組成核種之局部環境及交互作用，進而分析該分子的結構、構形 (conformation) 與動態 (dynamics) 等重要特性。隨著相關科技的進步，核磁共振儀器所仰賴的超高場超導磁鐵亦越來越穩定，尺寸也越來越小 (如圖 1 與 2 所示)，對建築空間的要求也不再如

此嚴苛，所以世界上各研究單位 800 MHz 以上的核磁共振儀已越來越普遍。雖然到目前為止，大部分生物分子的結構是由 X 光繞射解析而得，但以核磁共振技術分析生物巨分子並不需要單晶，而是可研究其於生理狀態下之動態及交互作用等等，故核磁共振在生物巨分子的相關研究中，與 X 光繞射技術互補且不可或缺。

以核磁共振光譜學而言，光譜中個別訊號的完整解析與歸屬乃研究分析的先決條件。隨著生物分子的分子量與複雜度之增加，所應用的核磁共振技





圖 1. 德國 Bruker 公司生產之 18.8 Tesla 超屏蔽超導磁鐵 (取自磊崙科技公司)。



圖 2. 美國 Varian 公司生產之 18.8 Tesla 超屏蔽超導磁鐵 (取自美商亞洲瓦里安科技台灣分公司)。

術亦隨之改變<sup>(2)</sup>。在研究分子量小的蛋白質時，利用同核相關二維光譜的方法，即可有效地解析氫核的訊號，此方法可分為基於化學鍵  $J$  耦合 ( $J$ -coupling) 相關的 [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-COSY 及空間距離相關的 [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ]-NOESY。前者可觀測三個化學鍵內的相關性，而後者則可觀測空間相關性 (0.5 nm 以內)。藉由這些技術已能針對分子量小於 10 kDa 的蛋白質進行研究與結構分析。對於更大的生物分子，訊號的嚴重重疊及峰寬變寬導致無法進行完整的訊號歸屬。

$^{13}\text{C}$  與  $^{15}\text{N}$  同位素標註 (labeling) 及三維 (three-dimensional) 核磁共振技術的發展，可將訊號分散於不同核種 (如  $^{15}\text{N}$ ) 的頻率維度，以解決訊號重疊的問題，並可研究分子量達 30 kDa 的蛋白質。 $^2\text{H}$  同位素標註可減緩橫向弛豫 (transverse relaxation) 速率，故以核磁共振技術研究蛋白質的分子量限制增至 50 kDa。1997 年以後，核磁共振技術最重要的進展之一，便是利用交互相關弛豫 (cross-correlated relaxation) 增進橫向弛豫時間與極性轉移 (polarization transfer) 效率，前者為橫向弛豫優化光譜 (transverse relaxation-optimized spectroscopy, TROSY)<sup>(3)</sup>，後者則為交互相關弛豫增益極性轉移

(cross-correlated relaxation enhanced polarization transfer, CRINEPT)<sup>(4)</sup>。這些技術開啟核磁共振技術研究生物巨分子 (> 100 kDa) 的序幕<sup>(5)</sup>。

蛋白質的三維結構分析需要利用 NOESY 的實驗找到距離小於 0.5 nm 的距離限制條件 (distance constraints)，以找到最低能量之結構。近來殘餘偶極耦合 (residual dipolar coupling) 技術的發展<sup>(6,7)</sup>，能提供整體蛋白質的各核間向量之夾角關係，使蛋白質結構的判定更為精確。

傳統多維核磁共振實驗通常需要花費相當長的時間才能得到具足夠解析度的光譜，且實驗時間隨維度次方增加，此乃核磁共振實驗最常受限的問題。有關快速多維核磁共振的實驗技術目前也有明顯的發展<sup>(8,9)</sup>。

## 二、TROSY 與 CRINEPT 技術

在生物巨分子的  $J$ -耦合之核自旋 ( $I$  與  $S-1/2$ ) 的系統， $T_2$  或橫向弛豫時間主要決定於個別核所受之異向性 (anisotropic) 的偶極-偶極耦合及化學位移異向性 (chemical shift anisotropy) 作用。此兩種作用具有相同的階 (rank)，故當兩者的時間相依

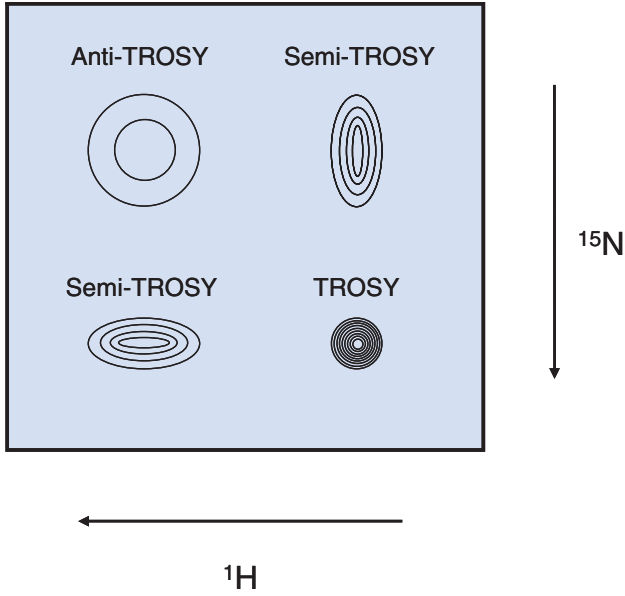


圖 3. 無去耦之  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  異核相關二維光譜即會呈現四個不同的共振峰示意圖。

性 (time-dependence) 相關時，則產生交互相關弛豫機制，導致在單量子光譜中，核自旋 ( $S$ ) 的每一個多重線子線 (multiplet component) 會有不同的橫向弛豫速率。以一個二核自旋 ( $I$  與  $S=1/2$ ) 的系統為例，根據半經典弛豫理論自旋  $S$  單量子躍遷 (single-transition) 弛豫可表示為<sup>(10)</sup>

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \langle S_{12}^{\pm} \rangle \\ \langle S_{34}^{\pm} \rangle \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \pm i\omega_S^{12} + R_{1212} + \frac{1}{T_{2S}} + \frac{1}{T_{1I}} & 3(P^2 - \delta_I^2)J(\omega_I) - \frac{1}{2T_{1I}} \\ 3(P^2 - \delta_I^2)J(\omega_I) - 2\frac{1}{T_{1I}} & \pm i\omega_S^{34} + R_{3434} + \frac{1}{T_{2S}} + \frac{1}{2T_{1I}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \langle S_{12}^{\pm} \rangle \\ \langle S_{34}^{\pm} \rangle \end{bmatrix} \quad (1)$$

其中  $S_{12}^{\pm}$  與  $S_{34}^{\pm}$  分別為標準能階圖 (energy-level diagram) 的  $1 \rightarrow 2$  及  $3 \rightarrow 4$  躍遷的單躍遷運算子 (single-transition operators)，

$$\begin{aligned} S_{12}^{\pm} &= \frac{1}{2} S^{\pm} + I_z S^{\pm}, \\ S_{34}^{\pm} &= \frac{1}{2} S^{\pm} - I_z S^{\pm} \end{aligned} \quad (2)$$

$\omega_S$  與  $\omega_I$  分別為  $S$  與  $I$  自旋的 Larmor 頻率，而  $\omega_S^{12} = \omega_S + \pi J_{IS}$ ， $\omega_S^{34} = \omega_S - \pi J_{IS}$ 。 $T_{2S}$  與  $T_{1I}$  則分別為與偶極-偶極耦合及化學位移異向性作用無關之  $S$  自旋的橫向弛豫及  $I$  自旋的縱向弛豫。

$$p = \frac{1}{2\sqrt{2}} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r_{IS}^3}, \quad \delta_{S,I} = \frac{1}{3\sqrt{2}} \gamma_{S,I} B_0 \Delta\sigma_{S,I} \quad (3)$$

$\gamma_{I,S}$  為  $I$  與  $S$  自旋的旋磁比， $r_{IS}$  為  $S$  與  $I$  核自旋的距離， $\Delta\sigma_{S,I}$  分別為  $S$  與  $I$  自旋軸對稱 (axially symmetric) 化學位移張量的軸方向 (axial) 與垂直方向 (perpendicular) 主分量 (principal component) 之差。 $R_{1212}$  與  $R_{3434}$  則分別為  $S$  二重線 (doublet) 子線的橫向弛豫速率。

$$\begin{aligned} R_{1212} &= (p - \delta_S)^2 (4J(0) + 3J(\omega_S)) \\ &\quad + p^2 (J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)) \\ &\quad + 3\delta_I^2 J(\omega_I) \\ R_{3434} &= (p + \delta_S)^2 (4J(0) + 3J(\omega_S)) \\ &\quad + p^2 (J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)) \\ &\quad + 3\delta_I^2 J(\omega_I) \end{aligned} \quad (4)$$

$J(\omega)$  為譜密度函數 (spectral density function)

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{5[1 + (\tau_c\omega)^2]} \quad (5)$$

$\tau_c$  為轉動相關時間 (rotational correlation time)。生物巨分子的運動較慢，通常式 (4) 中的貢獻主要來自  $J(0)$ 。顯而易見地，當磁場強度足夠時，導致  $p \approx \delta_S$ ，在  $\omega_S^{12}$  的共振峰之橫向弛豫速率會明顯減慢。同理，以  $I$  自旋二重線的其中一子線 ( $\omega_I^{\pm}$ ) 亦會具有較慢的橫向弛豫速率。故無去耦之  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  異核相關二維光譜即會呈現四個不同的共振峰，如圖 3 所示。TROSY 的技術即是利用脈衝序列的設計，使訊號演化 (evolution)、混合 (mixing) 及接收 (acquisition) 都運用在弛豫最慢的共振峰 (即 TROSY 訊號) 上，不僅可增加光譜的解析度，亦可增加演化與混合的時間，有利於多維核磁共振實



驗。儘管 TROSY 技術並非將所有的核自旋極性轉化成接收訊號，導致訊號較弱，但是較慢的弛豫速率 (即較窄峰寬) 能有效地補償，甚至得到較高的訊噪比。在脈衝序列設計上與過去二維光譜 (如 HSQC) 的差別，僅在於省去去耦 (decoupling) 的 180 度反轉脈衝，以及使用選擇 TROSY 訊號的極性轉移或激發方法<sup>(3,5)</sup>。目前 TROSY 不僅可以應用於 [<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H] 相關實驗，亦可應用於芳香基<sup>(11)</sup>、甲基<sup>(12)</sup> 及亞甲基<sup>(13)</sup> 的 [<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H] 系統。

除 TROSY 技術可應用交互相關弛豫機制，以有效窄化峰寬，並提高多維光譜的解析度，吾人亦可應用該機制提供極性轉移路徑。傳統 INEPT 是利用  $J$  耦合作用使同相同調 (in-phase coherence)  $I_x$ ，演化成反相同調 (anti-phase coherence)  $I_yS_z$ ，再以 90 度脈衝使其轉變成  $S$  自旋的反相同調  $I_xS_y$ ，以達成極性轉移。橫向弛豫機制會造成演化過程中的同調減弱，減低極性轉移的效率。在生物巨分子的系統中，容易因較快的橫向弛豫速率，導致較差極性轉移效率，而增加光譜接收的困難度。由式 (1) 與 (2) 可知，偶極-偶極耦合與化學位移異向性作用之交互相關弛豫機制，亦可由同相同調誘發成反相同調。考慮  $J$ -耦合之核自旋 ( $I$  與  $S=1/2$ ) 的系統，若以同相同調  $I_x$  為起始，在去除  $J$ -耦合的情形下，則在  $T$  時間後，反相同調  $I_xS_z$  之演化可近似地表示為<sup>(4)</sup>

$$\langle 2I_xS_z \rangle(T) = \sinh(R_C T) \exp(-R_I T) \langle I_x \rangle(0) \quad (6)$$

其中

$$R_I = \frac{2}{5} \left[ \frac{2}{9} (\gamma_I B_0 \Delta \sigma_I)^2 + \frac{1}{2} \left( \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{\gamma_{IS}^3} \right)^2 \right] \tau_C + \frac{1}{2T_{IS}} + \frac{1}{T_{2I}} \quad (7)$$

$$R_C = \frac{4}{15} (\gamma_I B_0 \Delta \sigma_I) \left( \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{\gamma_{IS}^3} \right) \tau_C \quad (8)$$

由此反相同調來達成極性轉移的技術稱之為交互相關弛豫誘發弛豫轉移 (cross correlation relaxation

induced polarization transfer, CRIPT)<sup>(4)</sup>。由式 (6) 可知，最佳轉移時間與  $\tau_C$  成反比關係，隨不同分子大小而改變。這與一般 INEPT 方法不同，其反相同調  $I_yS_z$  的演化為

$$\langle 2I_{yx}S_z \rangle(T) = \sin(\pi J_{IS} T) \exp(-R_I T) \langle I_x \rangle(0) \quad (9)$$

其最佳轉移時間與  $J_{IS}$  成反比，與分子大小較無關。圖 4(b) 所示為在 750 MHz 核磁共振儀中，各種極性轉移技術之最佳效率隨  $\tau_C$  改變的比較。當  $\tau_C$  小於 100 ns 時，INEPT 的最佳轉移效率明顯較 CRIPT 的最佳轉移效率為高。但隨著  $\tau_C$  的增加，INEPT 的最佳轉移效率快速地遞減，而 CRIPT 的最佳轉移效率卻與  $\tau_C$  無關。當  $\tau_C$  超過 100 ns 時，CRIPT 逐漸變得比 INEPT 更有效率。CRIPT 的最

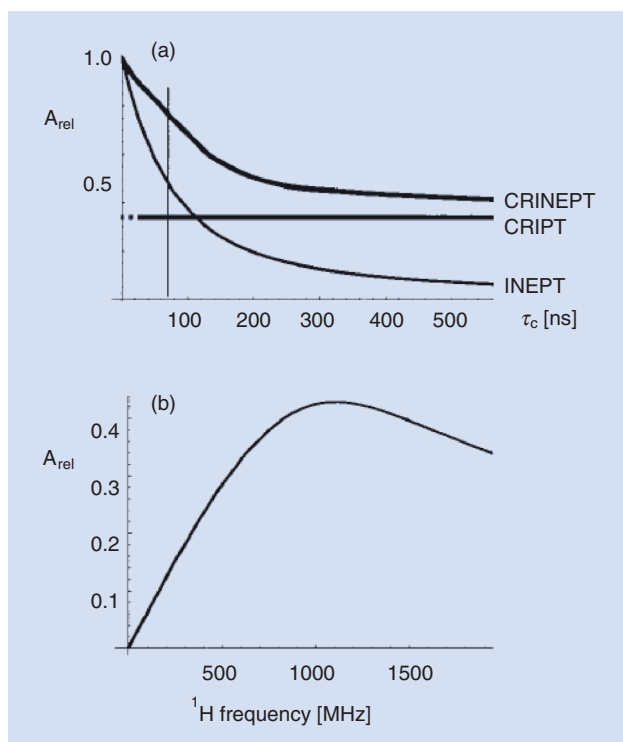


圖 4. (a) <sup>1</sup>H 頻率為 750 MHz 時，CRIPT、INEPT 及 CRINEPT 的最佳相對極性轉移效率隨分子之轉動相關時間之變化圖。(b)  $\beta$ -sheet 的 <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 系統，CRIPT 最大極性轉移效率隨磁場強度的變化情形<sup>(4)</sup>。

佳轉移效率亦與磁場強度有關。以全  $^{15}\text{N}$  與  $^2\text{H}$  標誌之蛋白質中  $\beta$ -sheet 的  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  系統為例，最佳的 CRIPT 轉移效率會發生於  $^1\text{H}$  的 Larmor 頻率約為 1 GHz 時，如圖 4(a) 所示。脈衝序列上，CRIPT 與 INEPT 的差異僅在於省去 S 核自旋的 180 度脈衝，以及 I 核第二個 90 度脈衝的相位。CRIPT 與 INEPT 技術可進一步結合，以增加極性轉移效率，此技術則為交互相關弛豫增益極性轉移 (cross-correlation relaxation enhanced polarization transfer, CRINEPT)<sup>(4)</sup>。CRINEPT 技術是在 I 自旋反相同調產生的過程中，將 I 自旋的 180 度反轉脈衝亦省去，使交互相關弛豫與 J 耦合作用同時進行，則  $I_x S_z$  與  $I_y S_z$  隨時間 T 的變化即為

$$\begin{aligned}\langle 2I_x S_z \rangle(T) &= A_{1I} \langle I_x \rangle(0) & (10) \\ &= \cos(\pi J_{IS} T) \sinh(R_C T) \exp(-R_I T) \langle I_x \rangle(0) \\ \langle 2I_y S_z \rangle(T) &= A_{2I} \langle I_x \rangle(0) \\ &= \sin(\pi J_{IS} T) \cosh(R_C T) \exp(-R_I T) \langle I_x \rangle(0)\end{aligned}$$

分別為反相磁矩 (antiphase magnetization) 的 x 與 y 分量。因此，反相磁矩的絕對值  $A_I$  即為

$$A_I = \sqrt{A_{1I}^2 + A_{2I}^2} \quad (11)$$

當  $\tau_c$  值小時，即分子運動快速時， $R_C$  值亦偏低，大部分的極性轉移貢獻來自於 INEPT。反之， $R_C$  值偏高，CRIPT 則成為主要的極性轉移貢獻。如圖 4(b) 所示，CRINEPT 的極性轉移效率都是優於 INEPT 與 CRIPT。然而，由於反相同調產生的過程中缺少 I 核自旋的 180 度反轉脈衝，所以其化學位移演化亦會造成訊號的損失。

TROSY、CRIPT 與 CRINEPT 等技術，以及高場磁體與冷溫探頭 (cryoprobe or coldprobe) 等發展，使核磁共振光譜不再侷限於較小的生物分子研究，而具備研究生物巨分子如蛋白質、核酸 (nucleic acids) 及其複合物 (complexes) 之能力，其對生物巨分子相關之研究領域的影響是顯而易見的。目前已報導利用核磁共振技術研究之生物巨分子的最大分子量已達 900 kDa<sup>(5, 14-15)</sup>。

### 三、殘餘偶極耦合技術

液態核磁共振光譜中，由於分子的快速且等向性的運動，核自旋所受之異向性作用 (包括偶極耦合、化學位移異向性及電四極矩作用 (electric quadrupole interaction)) 常不易於光譜上直接觀察，而需要經由弛豫研究或 NOE (nuclear Overhauser effect) 實驗才能觀察。一般這些異向性作用多應用於固態核磁共振光譜學，以獲得結構資訊。考慮空間中一對 I 與 S-1/2 核自旋系統，其偶極 Hamiltonian 中影響不同能態分裂 (splitting) 的部分可表示為<sup>(16)</sup>

$$H_d = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2\pi r_{IS}^3} (3\cos^2 \theta_{IS} - 1) I_z S_z \quad (12)$$

其中  $\theta_{IS}$  為兩核間向量與磁場方向的夾角，其所產生之共振峰分裂  $\Delta\nu$  為

$$\Delta\nu = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2\pi r_{IS}^3} (3\cos^2 \theta_{IS} - 1) \quad (13)$$

通常液態分子共振峰的偶極耦合分裂為式 (13) 之所有位向的時間平均，即

$$\langle \Delta\nu \rangle = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{\pi r_{IS}^3} \left\langle \frac{(3\cos^2 \theta_{IS}(t) - 1)}{2} \right\rangle \quad (14)$$

等向性運動的情形下，偶極耦合分裂會因各方向的機會均等而平均為零，但如果等向性運動的條件遭到破壞，即各方向的機會不均等，則其偶極耦合分裂即不再為零，且可由光譜上直接觀測，此即為殘餘偶極耦合。

若選擇一特定分子座標 (molecular frame)，核間向量之單位向量在此座標中可表示為  $(\zeta_x, \zeta_y, \zeta_z)$ ，磁場方向之單位向量可表示為  $(\xi_x, \xi_y, \xi_z)$ 。考慮分子內結構不變，則式 (14) 之時間平均值項可表示為<sup>(17)</sup>

$$\begin{aligned}\left\langle \frac{(3\cos^2 \theta - 1)}{2} \right\rangle &= \frac{3}{2} \left\langle (\cos \zeta_x \cos \xi_x + \cos \zeta_y \cos \xi_y + \cos \zeta_z \cos \xi_z)^2 \right\rangle - 1 \\ &= \frac{3}{2} [c_x^2 \langle C_x^2 \rangle + c_y^2 \langle C_y^2 \rangle + c_z^2 \langle C_z^2 \rangle + 2c_x c_y \langle C_x C_y \rangle \\ &\quad + 2c_x c_z \langle C_x C_z \rangle + 2c_y c_z \langle C_y C_z \rangle] - \frac{1}{2} \quad (15)\end{aligned}$$

式中  $c_i$  與  $C_i$  分別為  $\cos\zeta_i$  與  $\cos\xi_i$ 。由於分子運動只會影響磁場與分子座標的相對關係，所以只有  $C_i$  的部分需要取平均值。吾人可以一個取向張量 (alignment tensor)  $\mathbf{A}$  來描述：

$$A_{kl} = \frac{3}{2} \langle \cos\zeta_k \cos\xi_l \rangle - \frac{1}{2} \delta_{kl} \quad (16)$$

此張量為對稱且零對角元素和 (traceless)。式 (14) 則可表示為

$$\langle \Delta\nu \rangle = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{\pi r_{IS}^3} \sum_{kl} A_{kl} \cos\zeta_k \cos\xi_l \quad (17)$$

由前述之特性，可選定一特定分子座標，即主軸系統 (principal axis system)，使取向張量的非對角線元素 (non-diagonal elements) 為零，只剩下非零值的對角線元素  $A_{xx}$ 、 $A_{yy}$  與  $A_{zz}$ ，三軸順序通常是取  $|A_{zz}| \geq |A_{yy}| \geq |A_{xx}|$ 。式 (17) 可進一步整理為

$$\begin{aligned} \langle \Delta\nu \rangle &= -D \sum_{kl} A_{kl} \cos\zeta_k \cos\xi_l \quad (18) \\ &= -D \sum_{i=x,y,z} A_{ii} \cos^2 \zeta_i \\ &= -D [A_{zz} \cos^2 \theta + A_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \phi] \\ &= -D \left[ A_a \left( \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) + \frac{1}{2} A_r \sin^2 \theta \cos 2\phi \right] \end{aligned}$$

其中

$$D = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{\pi r_{IS}^3} \quad (19)$$

( $\theta$ ,  $\phi$ ) 為核間向量在分子座標內的極座標， $A_a = A_{zz}$  為取向張量的軸分量 (axial component)，而  $A_r = (A_{xx} - A_{yy})$  則為取向張量的斜方分量 (rhombic component)。因此欲決定取向張量需先決定五個未知值，即  $A_a$ 、 $A_r$  及描述分子座標位向的三個尤拉角 (Euler angle)。

殘餘偶極耦合技術首先需使生物分子的運動呈異向性，才能觀察偶極作用。然而以  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  鍵結為例，式 (19) 中的  $D$  值高達  $-24$  kHz (如圖 5 所

示)。若取向程度高或分子的轉動相關時間受到影響，光譜會因峰變寬、重疊或太複雜，而難以觀察殘餘偶極作用。因此一般而言只需誘發適當的取向程度 ( $10^{-3} - 10^{-4}$ )，使觀測之殘餘偶極耦合作用值約為  $5 - 15$  Hz。目前誘發生物分子的取向性大多採用兩種方法，一種方法是利用生物分子本身磁化率的異向性，使其在磁場中較易有特定取向。大多數分子在磁場中都會自然地因本身磁性的異向性而有取向性，只是程度很低 ( $\sim 10^{-5}$ )。若生物分子中有重複、相似位向且具有異向性磁化率的結構主體，如核酸分子雙螺旋 DNA 或 RNA，則在磁場中其分子取向程度會較明顯<sup>(18, 19)</sup>。此外，生物分子若含有原血紅素 (heme) 等具異向性磁化率的順磁性 (paramagnetic) 物質，其在磁場中取向程度亦會較明顯<sup>(20)</sup>。受限於生物分子的特性，這種方法目前並無法廣泛地應用，近來已有一些研究報導是將順磁性離子接上生物分子，產生足夠的取向性，以測得其結構與動態訊息<sup>(7)</sup>。

另一種方法則是將取向介質 (alignment medium) 加入生物分子溶液。最早被應用以產生異向性溶液的體系是由兩種不同鏈長的磷酸酯，如 dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) 與 dihexanoyl-phosphatidylcholine (DHPC) 所組成的盤狀 (disc-like) 雙元微胞 (bicelle)<sup>(6)</sup>，此微胞的液晶指向 (liquid crystal director) 會自發地與磁場垂直，並藉由空間障礙或靜電力效應，而產生取向性排列。此取向介質適用之實驗條件為  $35 - 45$  °C 及 pH 值約 6.5，大

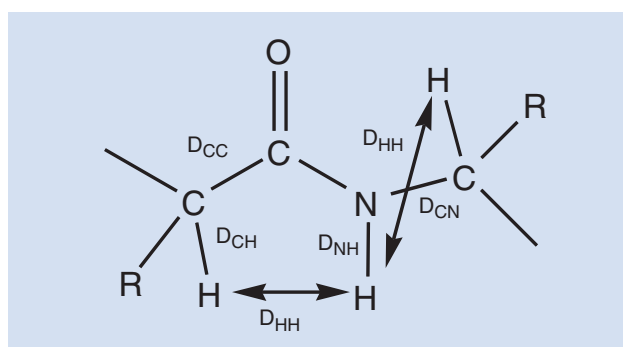


圖 5. 胜肽 (peptide) 鍵結中各式靜態偶極耦合常數之示意圖。 $D_{CH} = 47.9$  kHz、 $D_{CC} = 4.9$  kHz、 $D_{NH} = -24$  kHz、 $D_{CN} = -2.0$  kHz、 $D_{HH} = 10 - 22$  kHz<sup>(42)</sup>。

部分的蛋白質在此條件下並不穩定。目前已可藉由改良的方法以調控適當的實驗條件，如將羧基酯 (carboxy-ester) 鍵置換為醚鍵結，以避免酸鹼條件下所引起的水解<sup>(21)</sup>。或加入第三種成分如 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)，以改變其相轉變溫度等<sup>(22)</sup>。此外，由 dilauryl phosphatidylcholine (DLPC) 及 3-(cholamidopropyl) dimethylammonio-2-hydroxyl-1-popane sulfonate (CHAPSO) 所組成的雙元微胞，其液晶態可穩定存在於較廣的溫度範圍，適用需於低溫下進行實驗的蛋白質<sup>(22)</sup>。由 1,2-di-O-dodecyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DIDPC) 及 CHAPSO 所組成的混合溶液體系則適用於酸性的實驗條件<sup>(24)</sup>。目前常用的取向介質還有纖維狀病毒 (filamentous viruses)<sup>(25, 26)</sup>、噬菌調理素 (bacteriorhodopsin) 膜蛋白的紫膜 (purple membrane fragment)<sup>(27, 28)</sup> 及聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel) 等<sup>(29, 30)</sup>。

取向介質的應用，除需注意前述取向性程度之控制，以及避免影響生物分子的轉動相關時間外，亦應注意其與蛋白質溶液混合後，需保有其取向性等特性，且不會產生相分離的問題，其亦不能與蛋白質有化學反應，或影響蛋白質立體結構，更不能與蛋白質發生聚集的效應。

殘餘偶極耦合作用在光譜上所造成的分裂影響，會與  $J$  耦合作用分裂結合，而成為一個綜合的耦合作用分裂，所以兩個互相耦合的  $I$  及  $S-1/2$  核，在異向性環境中所量測到的分裂  $T_{IS}$ ，將會等於在等向性環境下所量測之  $J$  耦合分裂  $J_{IS}$ ，與殘

餘偶極耦合作用分裂  $D_{IS}$  之總合，即

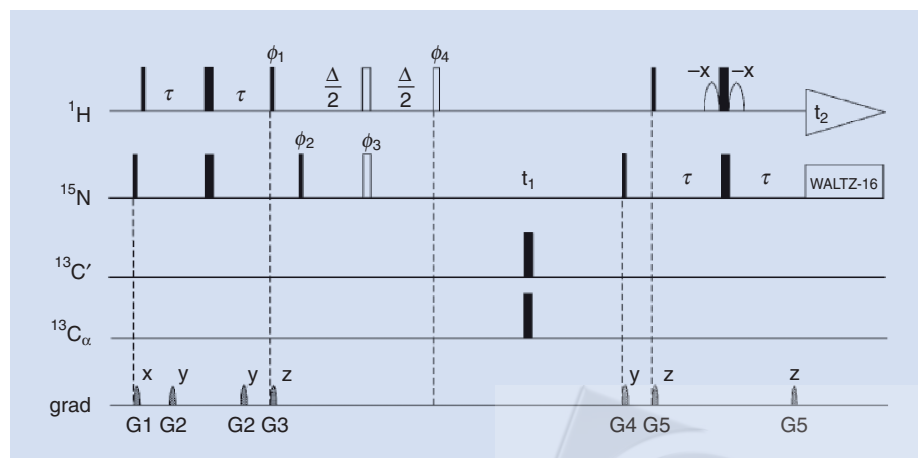
$$T_{IS} = J_{IS} + D_{IS} \quad (20)$$

蛋白質分子中，殘餘偶極耦合作用的量測，多以單一鍵結間隔的  $\text{NH}$ 、 $\text{C}_\alpha\text{H}_\alpha$ 、 $\text{C}_\alpha\text{C}'$  與  $\text{C}'\text{N}$ ，以及兩鍵結間隔的  $\text{H}^{\text{N}}\text{C}'$  為對象，單一鍵結間隔的偶極耦合作用因原子間距固定，且偶極耦合作用值較大，而較容易分析。殘餘偶極耦合作用的量測方法大多利用改良的質子耦合異核單量子相關光譜技術，如  $^1\text{H}$ -coupled  $^{15}\text{N}$ -HSQC 及  $^{13}\text{C}$ -HSQC 等。此種方法會因耦合分裂導致峰形的重疊與複雜的光譜，為消除此問題，可利用  $J$  耦合調諧方法<sup>(31)</sup>，藉由共振峰的強度 ( $I$ ) 因耦合作用而隨演化時間 ( $2\Delta$ ) 的變化求得  $T_{IS}$ ，即

$$I(2\Delta) = I_0 \cos(2\pi T_{IS}) e^{-2\Delta/T_2} \quad (21)$$

另亦可利用異核單量子相關光譜實驗的自旋狀態選擇性之特性，進行 IPAP (in-phase anti-phase) 的實驗<sup>(32)</sup>(如圖 6 所示之脈衝序列)，即將耦合所造成之同相與反相二重線子線，分別採集在二光譜上，再以光譜之相加及相減，分別得到高場 (upfield) 與低場 (downfield) 的子線，量測其分裂。對於分子量大的蛋白質，則需引入前述之 TROSY 技術，以得到較長的橫向弛豫時間，俾利較長的演化時間，以及較好的光譜品質。若共振峰太擁擠時，則可再應用  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  三維實驗技術，如 HNCOC、

圖 6. IPAP- $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC 的脈衝序列示意圖。細與寬的方柱分別表示 90 與 180 度脈衝，空心方柱則為採集反相光譜 (anti-phase spectrum) 時才使用的脈衝<sup>(32)</sup>。



HN(CO)CA 及 (HA)CA(CO)NH 等<sup>(5, 33-43)</sup>。

應用殘餘偶極耦合資訊進一步分析蛋白質結構前，需先求得取向張量的五個未知值  $A_a$ 、 $A_r$ ，及描述分子座標位向的三個尤拉角。若已知蛋白質結構，或已知部分結構，則可利用五個以上量測，所得之殘餘偶極耦合作用，結合已知之蛋白質結構資訊以求得取向張量。對於未知之蛋白質結構，則需要綜合各偶極耦合作用資訊，以其不同磁旋比將之正則化 (normalization)，並以正則化之耦合作用繪製柱狀圖 (histogram)，而得其分布，再由此殘餘偶極耦合作用的分布中分析求得  $A_a$  與  $A_r$ 。至於描述分子座標位向的三個尤拉角則無法求得，在結構計算過程中仍為變數 (float)。

殘餘偶極耦合作用量測常用於蛋白質的結構優化，即利用殘餘偶極耦合作用量測，形成約束條件，以合併於結構計算中，可用以判斷未發現或歸屬的 NOE 交互峰及各種數據之間可能的矛盾，進而優化蛋白質結構<sup>(7, 44)</sup>。此外，已有報導顯示，在缺乏 NOE 數據的情形之下，亦可利用殘餘偶極耦合作用的數據來決定蛋白質的結構<sup>(7, 44-46)</sup>，如 GB1 (B1 domain of streptococcal protein G)、BAF (monomer of the barrier-to-auto-regulation factor) 及 CVN (cyanovirin-N)。

#### 四、快速多維核磁共振技術

二維核磁共振光譜技術早已大量應用於提供同核或異核之間的鍵結或空間相關性，隨著生物分子之分子量與複雜度的增加，三維或更多維的核磁共振光譜，理論上，可以提供更高的解析度及相關性關係。以傳統的核磁共振技術而言，欲採集一張  $N$  維光譜，必須對  $N-1$  維的間接取樣時域，以等間距取樣點組合，分別採集一維自由誘發衰退訊號 (FID)，再以  $N$  個不同時域之傅立葉變換 (Fourier transform) 以得光譜。若每一間接取樣時域維度需  $m$  個取樣點，且考慮正交檢測 (quadrature detection) 的需求，則需採集  $(2m)^{N-1}$  組 FIDs，顯示隨著維度的增加，實驗的時間將呈指數成長，變得冗長且不可行。因此新穎而快速的訊號收集程序，成為高維度實驗所不可或缺的技术。

最早提出之縮短實驗時間的概念為減少維度 (reduced dimensionality, RD)<sup>(47-49)</sup>，是應用徑向取樣 (radial sampling) 的觀念，將兩間接取樣時域的演化時間設定為正比相關，即  $t_1 = \alpha t_2$ 。此方法所得，即為原光譜在頻率空間中  $\omega_1 = \alpha \omega_2$  平面之投影光譜。光譜分析則須解方程式，以求得各訊號的真實頻率。實驗時間則因維度由  $N$  減為  $N-1$ ，而大幅縮短。基於 RD 的概念， $N$  維核磁共振實驗可藉由共同演化時間的方法 (如  $t = t_1 = t_2 = t_3 \dots$ )，轉換成數個二維投影光譜實驗。其對  $t$  進行之傅立葉轉換後的所得頻率，為共同演化核種之化學位移之線性組合，即  $\omega = \omega_1 \pm \omega_2 \pm \omega_3 \dots$ ，而非真實化學位移。光譜分析時，則由上述之頻率合與差之子光譜 (sum and difference subspectra) 求得真實化學位移，此技術稱為 GFT NMR<sup>(50-53)</sup>。

另一種類似的技術則稱為投影重組法 (projection reconstruction NMR, PR NMR)<sup>(54, 55)</sup>，觀念上，PR NMR 與 GFT NMR 最大差異是在演化時間的相關性，PR NMR 演化時間上的設定為  $t = \alpha_1 t_1 = \alpha_2 t_2 = \alpha_3 t_3 \dots$ ，使其所得之光譜為在頻率空間中轉動若干角度之平面投影，GFT NMR 做法則可視為轉動  $45^\circ$  的平面投影。由於是任意角度之平面投影，其頻率的化學位移組相比 GFT NMR 更為複雜，需引入轉動角度的三角函數。PR NMR 通常先取得正交投影光譜，即  $0^\circ$  及  $90^\circ$  的平面投影光譜，由此光譜初步建構多維之暫定光譜，再採集適當轉動角度之平面投影光譜 (tilted projection)，利用重組演算法 (reconstruction algorithm) 保留真實交互峰 (cross peak)，抑制假峰，若仍有不易分析之處，則再採集另一轉動角度之平面投影光譜，直到完整且清晰的多維光譜重組完成。

重組演算法一般有兩種：較低值重組演算法 (lower-value reconstruction algorithm)<sup>(9, 49, 56, 57)</sup> 及加成重組演算法 (additive reconstruction algorithm)<sup>(9, 49, 58)</sup>。前者用於訊號靈敏度高的實驗，後者則用於較低靈敏度 (marginal sensitivity) 的實驗。前者的做法是將正交投影光譜及轉動角度之平面投影光譜數據，進行反投影 (back projection) 於多維頻率空間中，產生彼此交錯的平行交互峰脊 (ridge)，最後僅取其頻率空間中較低訊號強度為最後光譜之訊號強度，如

此可消除互不重疊之峰脊，而保留峰脊互相重疊之部分，即為真實交互峰。由於此法僅取較低訊號強度為最後訊號強度，訊號強度並不隨投影光譜的增加而增加，對基平面 (baseplane) 噪音的消除並不明顯，故僅適用於訊號靈敏度高的實驗，且不宜採集過多之投影光譜。

加成重組演算法則是將反投影所產生之交錯平行峰脊於頻率空間中加成，交互峰的強度會隨著投影光譜的數目增加而成正比增加。在傳統的方法中，若遇到訊號靈敏度低的實驗，需增加重複採集訊號次數，以得到足夠的訊號強度。就應用加成重組演算法的 PR NMR 技術而言，增加投影光譜的數目反而較增加重複採集訊號次數的效果更好。加成重組演算法最大的缺點，就是容易在間接檢測維的平面 (如  $F_1F_2$  平面) 產生假訊號。除上述兩種決定型 (deterministic) 重組演算法外，另有一類統計重組法，乃利用光譜模式合配來求得重組之光譜。其方法包含迭代最小平方方法 (iterative least-square method) 及極大熵方法 (maximum entropy method) 等<sup>(59)</sup>。此類方法需要大量的計算，雖然所得的光譜沒有噪音的存在，但卻容易使微弱訊號消失，不如決定型重組法可靠。GFT NMR 與 PR NMR 的投影光譜採集皆與傳統二維實驗技術相同，採用等間距取樣時間點，所以傅立葉轉換等光譜處理皆與傳統演算法無異，僅在最後的重組完整多維光譜上需要額外的數據處理，因此相較其它方法更容易使用。值得注意的是，對於訊號靈敏度高或尚可的樣品，即所謂取樣時間控制的情形 (sampling limited regime)，GFT NMR 與 PR NMR 可有效地縮短實驗時間，但對於訊號靈敏度極低的樣品，即所謂靈敏度控制的情形 (sensitivity limited regime)，這些技術並無法提供任何加速實驗的效果。

如前所述，多維實驗所需的時間與每個間接檢測維度的取樣點數有關，以傳統等間距取樣方法的觀點，根據 Nyquist 原理所得光譜的頻率範圍與取樣點間距成反比，也就是光譜所需頻率範圍大時 (如高磁場的  $^{13}\text{C}$  與  $^{15}\text{N}$  譜)，則取樣點間距需縮短。然而，光譜的數位解析度 (digital resolution) 卻與總取樣時間成正相關，表示若要採集大頻率範圍且高解析度的光譜，取樣點數與實驗時間將明顯增加。此外，在取樣過程中，起始端的訊號對光譜訊

噪比之貢獻，亦較末端的訊號明顯。為了減少取樣點數，且達到適當之解析度與訊噪比，一般可用線性預測 (linear prediction, LP) 來延伸取樣訊號<sup>(60)</sup>。目前 LP 技術已廣泛應用於二維與三維光譜處理程序中，以消除由取樣截斷造成的假訊號 (truncation artifact)，但此技術亦可能產生假的共振峰及頻率偏移的問題<sup>(61)</sup>。

另一個方法則是將取樣程序改成非等間距取樣。非等距取樣法目前亦分為兩種，一種是不完全線性取樣點 (incomplete linear grid)，其取樣點皆等間距取樣點相同，只是隨取樣過程前進，越來越多取樣點被捨去。另一種則是完全非線性取樣點，即取樣點之時間座標在時域中為任意值。前述兩種方法皆無法應用傳統傅立葉演算法得到光譜，需要尋求新的演算法。極大熵度法是最早被提出來的方法<sup>(62)</sup>，其過程需要大量的計算，對於多維光譜而言，將需要極長的運算時間。另一種方法是應用 Lagrange 內插法，由非等間距取樣之數據，演算出等間距取樣之數據，便可採用傳統傅立葉演算法得到光譜<sup>(63)</sup>。此方法只能應用於單一非等間距取樣之間接檢測維度，所以只能應用於二維光譜或前述之二維投影光譜實驗。最近，一種直接計算光譜的演算法已被提出，其多維傅立葉轉換程序是以一次積分完成<sup>(64)</sup>，而非如傳統程序採多次一維轉換程序。以二維光譜實驗為例，若其訊號可表示為

$$s(t_1, t_2) = \exp(i\Omega_1 t_1) \exp(j\Omega_2 t_2) \quad (22)$$

則其傅立葉轉換可表示成一離散積分程序：

$$S(\omega_1, \omega_2) = \sum_{t_1=0}^{t_1 \max} \sum_{t_2=0}^{t_2 \max} \exp(-i\omega_1 t_1) f(t_1, t_2) \exp(-j\omega_2 t_2) w(t_1, t_2) \quad (23)$$

其中  $w(t_1, t_2)$  為權函數。利用取樣時間點，以三角形元素分割時域，則上述之積分程序可表示為

$$S(\omega_1, \omega_2) = \sum_{n=1}^{\text{n.o.t.}} \Delta_{pqr}^n \frac{1}{3} \left[ \exp(-i\omega_1 t_1^p) s(t_1^p, t_2^p) \exp(-j\omega_2 t_2^p) \right. \\ \left. + \exp(-i\omega_1 t_1^q) s(t_1^q, t_2^q) \exp(-j\omega_2 t_2^q) \right. \\ \left. + \exp(-i\omega_1 t_1^r) s(t_1^r, t_2^r) \exp(-j\omega_2 t_2^r) \right] \quad (24)$$

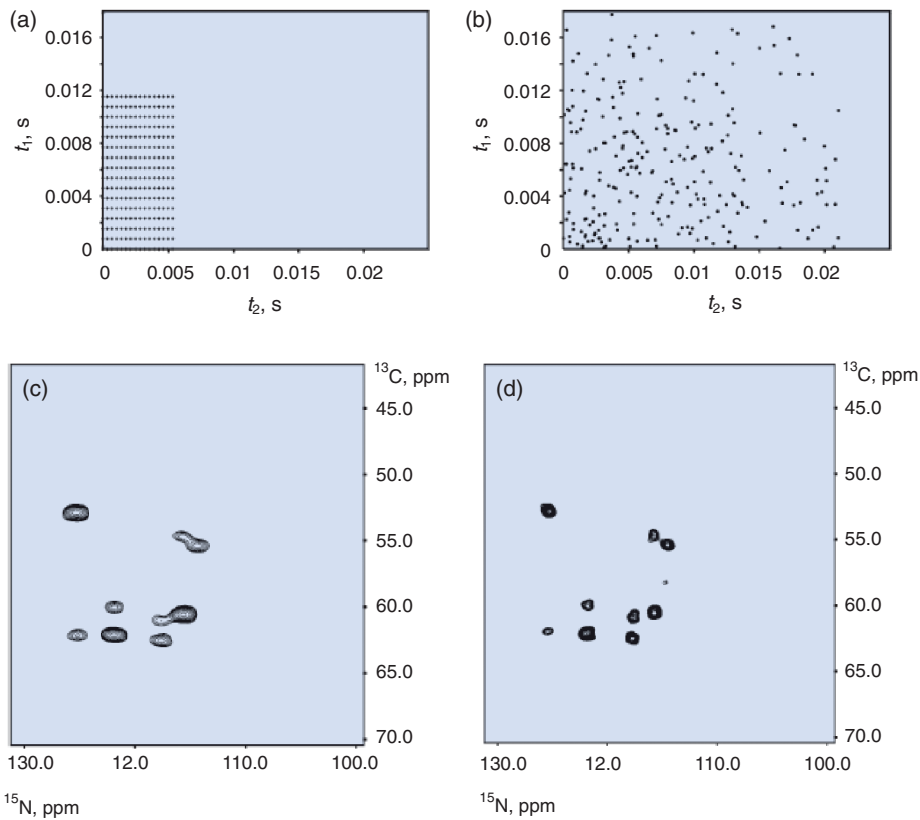


圖 7. 三維 HNCA 的  $F_1/F_2$  投影光譜圖， $\omega_3(^1\text{H}) = 7.84$  ppm，(a) 與 (c) 為傳統線性  $t_1/t_2$  採樣點的時域分布圖及其轉換後的光譜圖，(b) 與 (d) 為隨機  $t_1/t_2$  採樣點的時域分布圖及其轉換後的光譜圖。樣品為 1.5 mM  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -double labeled human ubiquitin in 9:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ，pH 為 4.5，溫度為 298 K<sup>(64)</sup>。

其中 n.o.t. 表示三角形元素的總數， $p$ 、 $q$  與  $r$  為三角形素的頂點， $\Delta^n pqr$  則反映第  $n$  個三角形之權函數與面積。此方法最大的優點即是應用至任意維度實驗，計算量少而快速，且不需要任何假設，即可進行數據處理程序。圖 7 即為利用傳統線性採樣點與隨機採樣點之三維 HNCA 之時域分布圖與所得光譜之比較。

## 五、總結

隨著儀器硬體，如高磁場強度與冷溫探頭，以及前述實驗方法之進步與發展，生物分子的核磁共振研究領域能有更多的策略，以研究分子量更大 (> 50 kDa) 的巨分子，提供更精確的結構資訊，及更有效率地運用儀器硬體等，對生物巨分子的研究領域必能提供更多的機會與方法。

## 參考文獻

1. M. Saunders, A. Wishnia, and J.G. Kirkwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3289 (1957).
2. G. Wider, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **32**, 193 (1997).
3. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366 (1997).
4. R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4918 (1999).
5. G. Zhu and X. Yao, *Proc. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **52**, 49 (2008).
6. N. Tjandra and A. Bax, *Science*, **278**, 1111 (1997).
7. M. Blackledge, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **46**, 23 (2005).
8. K. Kazimierczuk, M. Misiak, A. Zawadzka, and W. Koźmiński, *Polimery*, **52**, 736 (2007).
9. E. Kupce and R. Freeman, *Prog. Magn. Nucl. Reson. Spectrosc.*, **52**, 22 (2008).
10. M. Goldman, *J. Magn. Reson.*, **60**, 437 (1984).
11. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6394 (1998).
12. K. Pervushin and B. Vögeli, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9566 (2003).
13. E. E. Miclet, D. C. Jr. Williams, G. M. Clore, D. L. Bryce, J. Boisbouvier, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10560 (2004).
14. A. G. Tzakos, C. R. R. Grace, P. J. Lukavsky, and R. Riek, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **35**, 319 (2006).
15. K. Wüthrich, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 492 (1998).
16. R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimension*, New

- York, Oxford Univ. Press (1987).
17. A. Bax, G. Kontaxis, and N. Tjandra, *Methods in Enzymology*, **339**, 127 (2001).
  18. H. C. Kung, K. Y. Wang, I. Goljer, and P. H. Bolton, *J. Magn. Reson.*, **109**, 323 (1995).
  19. N. Tjandra, J. Omichinski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, and A. Bax, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 732 (1997).
  20. L. Banci, I. Bertini, J. G. Huber, C. Luchinat, and A. Rosato, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12903 (1998).
  21. M. Ottiger and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **13**, 187 (1999).
  22. M. Ottiger and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **12**, 361 (1998).
  23. H. Wang, M. Eberstadt, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, and S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR*, **12**, 443 (1998).
  24. S. Cavagnero, H. J. Dyson, and P. E. Wright, *J. Biomol. NMR*, **13**, 387 (1999).
  25. M. R. Hansen, L. Müller, and A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1065 (1998).
  26. G. M. Clore, M. R. Starich, and A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10571 (1998).
  27. H. J. Sass, F. Cordier, A. Hoffmann, M. Rogowski, A. Cousin, J. G. Omichinski, H. Löwen, and S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2047 (1999).
  28. B. W. Koenig, J. S. Hu, M. Ottiger, S. Bose, R. W. Hendler, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1385 (1999).
  29. R. Tycko, F. Blanco, and Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9340 (2000).
  30. J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, and S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR*, **18**, 303 (2000).
  31. N. Tjandra, S. Grzesiek, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6264 (1996).
  32. M. Ottiger, F. Delaglio, and A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **131**, 373 (1998).
  33. D. W. Yang, R. A. Venters, G. A. Mueller, W. Y. Choy, and L. E. Kay, *J. Biomol. NMR*, **14**, 333 (1999).
  34. P. Permi, P. R. Rosevear, and A. Annala, *J. Biomol. NMR*, **17**, 43 (2000).
  35. B. Luy and J. P. Marino, *J. Magn. Reson.*, **163**, 92 (2003).
  36. F. Cordier, A. J. Dingley, and S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR*, **13**, 175 (1999).
  37. P. Permi, S. Heikkinen, I. Kilpelainen, and A. Annala, *J. Magn. Reson.*, **140**, 32 (1999).
  38. P. Permi and A. Annala, *J. Biomol. NMR*, **16**, 221 (2000).
  39. B. Brutscher, *J. Magn. Reson.*, **151**, 332 (2001).
  40. J. Boisbouvier, D. L. Bryce, E. O'Neil-Cabello, E. P. Nikonowicz, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **30**, 287 (2004).
  41. C. P. Jaroniec, J. Boisbouvier, I. Tworowska, E. P. Nikonowicz, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **31**, 231 (2005).
  42. V. Vijayan and M. Zweckstetter, *J. Magn. Reson.*, **174**, 245 (2005).
  43. T. Eliseo, M. Gallo, R. Melis, M. Paci, R. Bazzo, and D. O. Cicero, *Spectrosc. -Int. J.*, **20**, 153 (2006).
  44. E. Brunner, *Concepts Magn. Reson.*, **13**, 238 (2001).
  45. G. M. Clore, M. R. Starich, C. A. Bewley, M. L. Cai, and J. Kuszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6513 (1999).
  46. E. de Alba and N. Tjandra, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **40**, 175 (2002).
  47. T. Szyperski, G. Wider, J. H. Bushweller, and K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, **3**, 127 (1993).
  48. T. Szyperski, G. Wider, J. H. Buschweller, and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9307 (1993).
  49. R. Freeman and E. Kupče, *Concepts Magn. Reson.*, **23A**, 63 (2004).
  50. K. Ding and A. Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, **156**, 262 (2002).
  51. S. Kim and T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1385 (2003).
  52. S. Kim and T. Szyperski, *J. Biomol. NMR*, **28**, 117 (2004).
  53. W. Kozminski and I. Zhukov, *J. Biomol. NMR*, **26**, 157 (2003).
  54. E. Kupče and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13958 (2003).
  55. B. E. Coggins, R. A. Venters, and P. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11562 (2005).
  56. R. Baumann, G. Wider, R. R. Ernst, and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.*, **44**, 402 (1981).
  57. I. McIntyre, X. L. Wu, and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, **87**, 194 (1990).
  58. R. Freeman and E. Kupče, *J. Biomol. NMR*, **27**, 101 (2003).
  59. J. W. Joon, S. Goddard, E. Kupče, and R. Freeman, *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 197 (2006).
  60. J. Tang and J. R. Morris, *J. Magn. Reson.*, **78**, 23 (1988).
  61. A. S. Stern, K. B. Li, and J. C. Hoch, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1982 (2002).
  62. J. C. J. Barna, E. D. Laue, M. R. Mayger, J. Skilling, and S. J. P. Worrall, *J. Magn. Reson.*, **73**, 69 (1987).
  63. D. Marion, *J. Biomol. NMR*, **32**, 141 (2005).
  64. K. Kazimierczuk, A. Zawadzka, W. Koźmiński, and I. Zhukov, *J. Biomol. NMR*, **36**, 157 (2006).
- 
- 黃信炘先生為國立清華大學化學工程博士，現任國立台灣大學化學系博士後研究員。
  - 林英智先生為美國加州大學洛杉磯校區化學博士，現任國立台灣大學化學系教授。
  - Shing-Jong Huang received his Ph.D. in chemical engineering from National Tsing Hua University. He is currently a postdoctoral researcher in the Department of Chemistry at National Taiwan University.
  - Ying-Chih Lin received his Ph.D. in chemistry from University of California, Los Angeles, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Taiwan University.

