

技术与方法

Watergate 技术在 DNA 上的应用*

吴季辉 康 青 夏佑林 施蕴渝

(中国科学技术大学生命科学学院, 结构生物学开放研究实验室, 合肥 230026)

摘要 比较了 Watergate 和其他几种不同的压水峰方法, 结果表明 Watergate 是效果较好, 实验上容易实现的水峰抑制方法. 用 Watergate-NOESY 及 Watergate-TOCSY, 完成了转录因子 E2F 所识别的 DNA 双链片段 d (5'-TTTCGCGC) • d (3'-AAAGCGCG) 中大部分 G, C 碱基上可交换质子的归属.

关键词 NMR, Watergate, 水峰抑制, DNA, E2F

学科分类号 Q633

在生物大分子的 NMR 实验中, 水峰抑制是个关键的问题, 因为可交换质子对生物大分子的结构计算非常重要, 而研究可交换质子必须在水溶液中记谱. 已经发展出许多抑制水峰的技术^[1], 其中最简单也最实用的是预饱和技术. 但由于 DNA 等核酸中的可交换质子特别是亚氨基质子与水的交换速率较蛋白质中酰胺质子的交换速率高出几个数量级^[2], 由于饱和转移的缘故在预饱和和水峰的同时也将这些可交换质子饱和, 故预饱和技术不适于 DNA 等. 在 DNA 的核磁实验中可以用反转-恢复法, ¹³³¹ 等选择激发技术, 将水峰置于零激发区域, 但效果并不理想, 而且有效脉冲角及信号强度和相位依赖化学位移, 增加了调相的困难. 近年来, 随着核磁谱仪技术的发展, 引进了梯度探头. 利用磁场梯度对不同相干阶的核磁信号的不同相散及聚焦作用已经发展出一系列的脉冲序列^[3]. Watergate 技术也是利用磁场梯度适合于进行水峰抑制的一种方法^[4].

我们在研究细胞转录因子 E2F 与 DNA 的相互作用时, 合成了 E2F 所识别的 DNA 双链片段 d (5'-dTTTCGCGC) • d (3'-dAAAGCGCG), 本文报告利用 Watergate 技术识别碱基上氨基, 亚氨基质子的结果.

1 材料与方法

1.1 核磁样品

含 3.5 mmol/L DNA 片段 (DNA 合成仪合成, HPLC 分离纯化), 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaN₃, 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.8, 溶于 D₂O 或 90% H₂O/10% D₂O. 用

2, 2-二甲基-2-硅-5-戊磺酸 (2, 2-dimethyl-2-sila-5-pentanesulfonate, DSS) 作为内标. DNA 两条单链溶解后经升温至 65 °C, 退火处理以保证双链配对. 记谱温度未指明者均为 300 K.

1.2 仪器

所有核磁实验均在本实验室的 Bruker DMX-500 核磁共振谱仪上进行, 使用带梯度线圈的三核探头.

1.3 压水峰脉冲序列

1.3.1 反转-恢复法 即 11 序列: 90_x-d-90_{-x}, 激发频率选在水峰中心, 实验中 d 取 70 μs.

1.3.2 带相移的反转-恢复法: 90_G-d-90₀, 激发频率可以偏离水峰位置, 第一个 90 度脉冲将磁化向量倒向 xy 平面, 在 d 间隔中水峰信号进动一个角度, 被与之正交的第二个 90 度脉冲倒回 z 轴, 也可以实现零激发.

1.3.3 Watergate 脉冲序列: 第一个 90 度脉冲将磁化向量倒向 xy 平面, 在第一个梯度脉冲的作用下产生相散, 随后加水峰的选择性 90 度脉冲, 非选择性 180 度硬脉冲, 及另一个水峰的选择性 90 度脉冲, 如图 1 所示. 对水峰信号而言, 总的脉冲角度为 90-180+90=0, 随后的梯度脉冲继续产生相散作用, 从而起到抑制水峰的作用. 而对其他远离水峰的信号而言, 相散后的磁化向量受到 180 度脉冲的作用, 改变原来的进动相位, 故第二个梯

* 中国科学院重点项目“生命过程中重要蛋白质和核酸的结构生物学研究”(J-6-07) 资助及中国科学院九五重大项目“蛋白质功能三维结构基础”特别支持.

收稿日期: 1998-03-27, 修回日期: 1998-06-19

度脉冲起到聚焦作用, 因而可以检测到信号. 这里水峰选择 90 度脉冲宽度取 2.5 ms, 相位在实验中细调, 梯度脉冲为 Gauss 型脉冲, 宽度取 2 ms, 梯度强度为 30 G/cm.

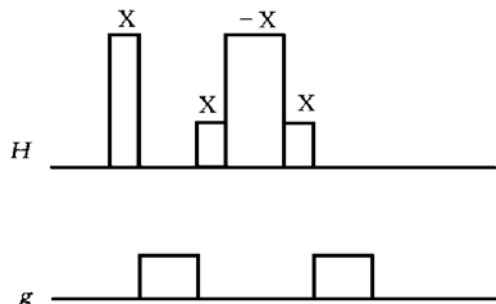


图 1 Watergate 脉冲序列

1.4 二维谱实验

1.4.1 NOESY: 用 Watergate 序列或 11 序列取代通常的 NOESY 的最后一个 90 度脉冲, 并修改相应的相循环.

1.4.2 TOCSY: 在通常的 TOCSY 或 Clear TOCSY 的最后加上 Watergate 序列 (不带第一个 90 度脉冲), 并使其相位与 TOCSY 中 Spin-lock 脉冲前后的 Trim 脉冲的相位保持正交.

1.5 谱峰归属方法

按照 DNA 同核谱峰识别的一般途径用 PROSA 和 XEASY 程序进行^[5].

2 结果与讨论

2.1 几种水峰抑制方法的一维谱比较

图 2 显示用不同的水峰抑制方法记录的 DNA 一维谱. 反转-恢复法可以看到亚氨基质子 ($\delta = 12.5 \sim 13.5$), 但由于激发曲线不均一, 谱峰的强度及相位与化学位移有关. 减小脉冲间隔 d 可使激发曲线趋于平缓, 谱峰的强度趋于一致, 但由于斜率减小, 对水峰的抑制效果也下降. 带相移的反

转-恢复法不必将激发频率置于水峰处, 可以减小谱宽, 增加分辨率, 但对激发曲线没有影响. 用 Watergate 记录的谱上, 在水峰附近的信号也被抑制, 但其他的信号强度和相位没有明显的畸变. 水峰附近的信号为糖环上的质子, 可通过重水谱辨认, 况且其他抑制方法中 (图 2b, c, d) 这些信号同样看不到, 因此 Watergate 技术对记录 DNA 的一维谱不失为一种较好的方法.

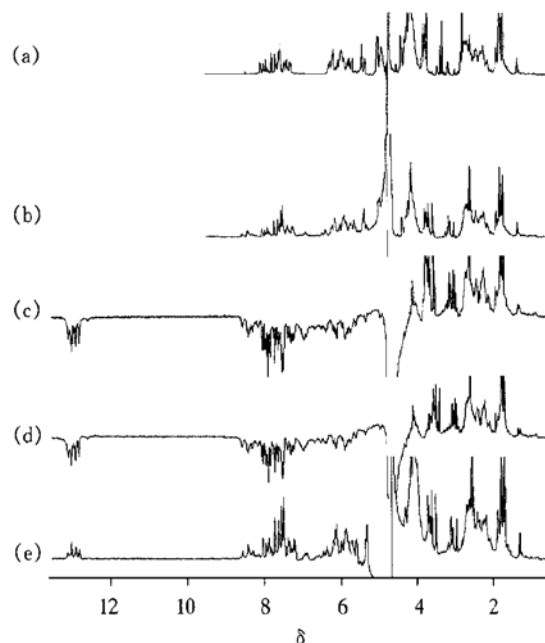


图 2 不同方法记录的 DNA 一维谱之比较

(a) D_2O , 预饱和; (b) H_2O , 预饱和; (c) H_2O , 反转-恢复法; (d) H_2O , 带相移的反转-恢复法; (e) H_2O , Watergate 序列.

2.2 几种水峰抑制方法的二维谱比较

如果说在一维谱上用反转-恢复法或带相移的反转-恢复法还可记录到可用的谱, 那么在记录二维谱时就不是这样的. 图 3 比较了结合带相移的反转-恢复法的 NOESY 和 Watergate-NOESY 中水峰

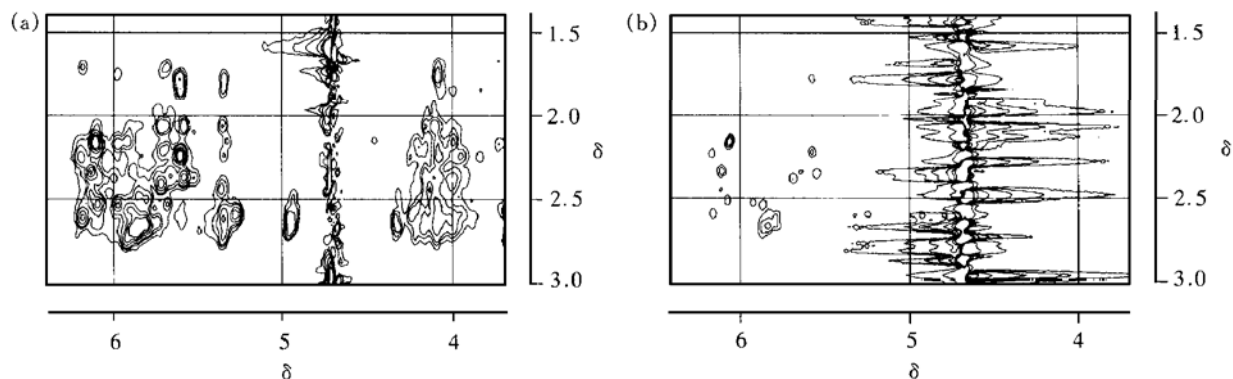


图 3 Watergate-NOESY (a) 和带相移的反转-恢复法-NOESY (b) 的比较显示水峰附近的 t_1 噪声及信号抑制

附近的区域, 可以看出前者的 t_1 噪声极大, 而且水峰附近的信号大部分被抑制, 这是因为反转-恢复法对水峰的选择抑制不太强, 这在一维谱上还可接受, 但如此大的残余水峰信号伴随的涨落在二维谱上必然表现为明显的 t_1 噪声. Watergate-NOESY 全谱的质量已经接近普通重水中记录的 NOESY 谱.

Watergate 方法还可方便地同 TOCSY 结合. 这里要注意的是 Watergate 中的 180 度脉冲及水峰选择 90 度脉冲的相位必须同 TOCSY 中的 trim 脉冲的相位正交, 这是因为 trim 脉冲对磁化向量起自旋锁定的作用, 因此 Watergate 中的脉冲只有与之正交, 才能使磁化向量翻转, 这样前后二个梯度脉冲的作用才能抵消.

我们还试过 Watergate 同 DQF-COSY 的结合, 但效果不佳. 这是因为在 NOESY 及 TOCSY 中最后的有用信号只有一个方向, 而 DQF-COSY 的检测信号包含正交的二个分量, 这样 Watergate 总要抑制掉其中的一个, 难以得到正常的相敏谱. 看来对 DQF-COSY 宜以梯度场选择相干传递途径的方法抑制水峰 (因为水峰不能产生双量子信号). 但对于 NOESY 及 TOCSY 用 Watergate 还是很合适的, 同其他的梯度脉冲方法比较, Watergate 的实验参数调节比较简单, 在一维谱调节的参数可以直接移植到二维谱上使用. 而且由于它不影响信号的相干传递途径, 故不存在通常用梯度场选择相干传递途径时由于只能选择一半的途径导致信号衰减的缺点.

2.3 DNA 片段可交换质子的识别与归属

整个 DNA 片段谱峰的识别、归属及结构计算将另文发表. 重水 NOESY 谱显示该样品在溶液中大致属于 B-DNA. H_2O 中 NOESY 及 TOCSY 谱上可认出大部分可交换质子的交叉峰. 一般而言, 质子参与氢键形成时化学位移向低场移动, 在我们的结果 (表 1) 中, 大多数 NH_2 确实都有两个化学位移, 一个在 6.4 和 6.9 之间, 另一个在 8.0 至 8.5 之间, 同文献报道的符合. 对于 G, 只能看到一个化学位移, 这是由于 G 中氨基即便处在 GC 碱基对中, 也可能沿着 C-N 轴翻转^[5]. 需要说明的是, 在我们的条件下 (300K) 无法看到三个碱基 T 上的亚氨基质子, 这可能是因为连续的 AT 对使得双链结合不紧而容易解开, 不形成氢键的可交换质子更容易同水交换, 因而失去大部分信号. 降低温度可以在一维谱上看到部分信号, 但仍很弱, 而

且峰很宽, 表明交换仍然很快. 在同样条件下记录的 NOESY 上仍然看不到相应的交叉峰, 因而对结构计算起不了作用. A 上氨基的认证有赖于 T 上亚氨基, 故也无法确定.

表 1 GC 对可交换质子的化学位移

碱基	可交换质子 δ	
C4	$NH_2 = 6.905, 8.581$	
G5	$NH_2 = 6.907$	$NH = 12.910$
C6	$NH_2 = 6.389, 8.322$	
G7		$NH = 13.110$
C8	$NH_2 = 6.372, 8.246$	
G9	$NH_2 = 6.780$	$NH = 12.944$
C10	$NH_2 = 6.479, 8.439$	
G11	$NH_2 = 6.908$	$NH = 13.014$
C12	$NH_2 = 6.395, 8.402$	
G13	$NH_2 = 6.400$	$NH = 12.815$

致谢 感谢 Peter Güntert 博士和 Kurt Wüthrich 教授为我们提供了 PROSA 程序和 XEASY 程序.

参 考 文 献

- 1 Frenkiel T A. Instrumentation and pulse sequences. In: Roberts G C K, eds. NMR of Macromolecules. New York: Oxford University Press, 1993. 53~ 56
- 2 Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York: Wiley, 1986, 24
- 3 James K, Robin T C, Adrian L D, *et al.* Pulsed-field gradients: theory and practice. In: Thomas L, eds. Methods in Enzymology, 239. San Diego: Academic Press, 1994. 145~ 207
- 4 Piotto M, Saudek V, Sklenar V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR Spectroscopy of aqueous solutions. J Biomol NMR, 1992, 2 (6): 661~ 665
- 5 Sybrex S W, Margret M W, Cornelis W H. NMR of nucleic acids: from spectrum to structure. In: Roberts G C K, eds. NMR of Macromolecules. New York: Oxford University Press, 1993. 243~ 251

The Application of Watergate Technique in DNA.

WU Ji-Hui, KANG Qing, XIA You-Lin, SHI Yur-Yu (School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract The comparison of Watergate technique and other solvent suppression methods showed that Watergate technique is easy to realize and can give low t_1 noise spectrum. With Watergate-NOESY and Watergate-TOCSY, the assignment of most labile protons of G, C in dsDNA fragment d (5'-TTTCGCGC) • d (3'-AAAGCGCG), which can be recognized by the transcription factor E2F, was made.

Key words NMR, Watergate, water peak suppression, DNA, E2F