



SZAKDOLGOZAT

*Szilárd állapotú fehérjék hőmérsékletfüggő
dinamikája az NMR-spektrumuk tükrében*

Ágner Dorina

Témavezető: Bokor Mónika
Tudományos főmunkatárs
MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont
Kísérleti Szilárdtest-fizikai Osztály
Konzulens: Simon Ferenc
Egyetemi tanár
BME Fizika Tanszék

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

2016

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Bokor Mónikának és Simon Ferencnek a témavezetést, a türelmet, és a sok segítséget a mérésekben és a dolgozat elkészítésében. Továbbá köszönöm Tompa Kálmánnak, hogy segített a téma megértésében, és mindig motivált. Köszönöm Iván Dávidnak a segítségét. Köszönöm Karsa Anitának, hogy sokat tanulhattam tőle.

Köszönöm családomnak és páromnak, hogy mindenben számíthattam és számíthatok támogatásukra.

A munkát a Magyar Tudományos Akadémia támogatta az MTA-BME Lendület Spintronikai Kutatócsoport (PROSPIN) révén.

Témakiírás

A fehérjék dinamikai leírása segítséget ad az életfolyamatokban is szerepet játszó jelenségek mélyebb megismerésében. Ide tartozik a különböző típusú fehérjéknél a víznek a fehérjedinamikában betöltött szerepének alaposabb megértése. A víz nélkülözhetetlen a fehérjék élő szervezetben történő működéséhez. A tapasztalatok szerint a különböző víztartalmú, szilárd halmazállapotú fehérjék ^1H NMR-spektrumában alacsony hőmérsékleten (kb. 200 K) megjelenik egy mozgási-keskenyedett spektrumkomponens is. Ennek az eredete, vagyis hogy a fehérjemolekula és a jelenlévő vízmolekulák dinamikája hogyan járul hozzá, még nem kellőképpen tisztázott. Megértése azonban egyes betegségek molekuláris szintű leírásában is segítséget nyújthat. A kérdés tisztázásához jellemzően kis mennyiségű (néhány mg) fehérjén végzett, hőmérsékletfüggő NMR mérések szükségesek. A pontos és stabil hőmérséklet-szabályozás ennél elengedhetetlen kísérleti feltétel. A jelentkező feladatai:

- Az NMR mérőfejnél a mintatér stabil hőmérséklet-szabályozásának technikai megvalósítása a 180 K – 330 K hőmérséklettartományban.
- A mintatérben történő hőmérséklet kellő pontosságú mérésének megoldása.
- A szilárd halmazállapotú fehérjék ^1H NMR jelének precíz méréséhez szükséges mintavételezési sűrűséget biztosító egység beüzemelése.
- Kiválasztott fehérjéken hőmérsékletfüggő ^1H NMR-spektrumok felvétele és dinamikai elemzése.

Önállósági nyilatkozat

Alulírott Ágner Dorina a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem fizika BSc szakos hallgatója kijelentem, hogy ezt a szakdolgozatot meg nem engedett segédeszközök nélkül, önállóan, a témavezetőim irányításával készítettem, és csak a megadott forrásokat használtam fel.

Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból vettem, a forrás megadásával jelöltem.

Budapest, 2016. május 30.

aláírás

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	4
1. Bevezetés és motiváció	5
2. Elméleti és technikai háttér	6
2.1. Az NMR-spektroszkópia alapjai	6
2.2. FID mérése és alakja	7
2.3. Fundamentális hőmérséklet	9
2.4. A momentumok módszere	10
2.5. Hidrogén mozgékonyság	11
3. Kísérleti technikák	12
3.1. NMR spektrométer	12
3.2. Mintaelőkészítés, minták	12
4. Hőmérséklet-szabályozó rendszer	15
5. Eredmények és értelmezésük	16
5.1. Tömegmérések	16
5.2. NMR mérések	16
6. Összefoglalás	28
Irodalomjegyzék	30

1. Bevezetés és motiváció

A fehérjék működésének megértése molekuláris szinten az egyik legjobb módja az élet megértésének [1], hiszen az élő szervezetek működésében a fehérjék a sejtekben lejátszódó összes folyamatban részt vesznek, például a sejt életbentartásában, a sejtben belüli transzportfolyamatok lebonyolításában, illetve a sejt és környezete közötti információáramlás megvalósításában. Éppen ezért, a fehérjekutatás a modern orvosi és biológiai kutatások élvonalában helyezkedik el.

A fehérjekutatás számára rendelkezésre álló módszerek közül az NMR-spektroszkópia kiemelkedik. Ennek oka, hogy az NMR-spektroszkópia a molekulák szerkezetének és a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatának rendkívül hatékony és sokoldalúan alkalmazható eszköze [2]. A módszer kidolgozásáért kapta Kurt Wütrich a 2002-es kémiai Nobel díjat [3].

Az elmúlt időszakban egyre gyakrabban alkalmazzák a széles jelű ^1H NMR-spektroszkópiát az alacsony víztartalmú biológiai minták, illetve élelmiszer vizsgálatára, a molekuláris mozgások és a mintákban lévő víz állapotának tanulmányozására [4].

A kutatócsoport, melynek munkájában részt vettem, liofilizált fehérjék és fehérje vizes oldatok molekuláris szintű kísérleti kutatásával foglalkozik. A csoport célja a vizsgált rendszerek dinamikai jellemzése. Munkánk során széles jelű ^1H NMR méréseket végeztünk, mellyel különböző víztartalmú, de szilárd fázisú fehérjeminták hőmérsékletfüggő dinamikáját tanulmányoztuk. A vizsgált fehérje a lizozim volt, ami egy globuláris ("rendezett") fehérjestandardnak számít a területen.

A vízmolekulák mozgékonyságának meghatározása érdekében vizsgáltuk a mintákban lévő protonok mozgékonyságára jellemző különböző paraméterek hőmérsékletfüggését. Célunk volt a víztartalom roncsolásmentes meghatározása is ^1H NMR mérések segítségével, ellenőrzésképpen a minták relatív víztartalmát tömegmérésekkel határoztuk meg.

A dolgozatban bemutatjuk az NMR-spektroszkópia alapjait, a mérések és a kiértékelés során felhasznált módszereket, valamint a kísérleti eredményeinket és az első közelítésű értelmezésüket.

2. Elméleti és technikai háttér

2.1. Az NMR-spektroszkópia alapjai

Az NMR-spektroszkópiát (*magmágneses rezonancia spektroszkópia*) napjainkban széles körben alkalmazzák fizikai, kémiai, biológiai és orvosi területeken, például gyógyszerkutatásra vagy orvosi célú képalkotásra.

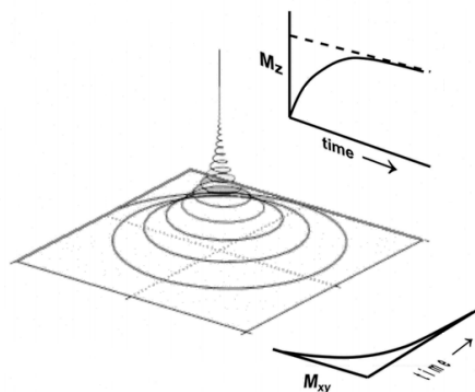
A módszer lényege, hogy a mintát egy nagy statikus mágneses térbe (B_0) helyezve, a benne található NMR aktív magok mágneses momentumai a B_0 tér körül Larmor-precessziót fognak végezni. Ennek körfrekvenciája: $\omega_L = \gamma B_0$, ahol γ az ún. giromágneses faktor, ami az adott magra jellemző. Ez utóbbi irodalmi értéke ^1H -re: $\gamma = 2\pi * 42,576 \text{ MHz/T}$.

A mágneses rezonancia keltéséhez egy, B_0 -nál sokkal kisebb, állandó nagyságú mágneses teret (B_1) alkalmazunk, melyet a fenti Larmor-frekvenciával forgatunk a B_0 irányára merőleges síkban. Egy NMR aktív magon, a B_1 tér által kiváltott forgatónyomaték járulékok a magok Larmor-precessziójával szinkronban történő forgatásának köszönhetően összeadódnak, így kibillentik a mágneses momentumot az egyensúlyi helyzetéből. A magspinek kimozdulásának szöge a B_1 tér hajtásának időbeli hosszától függ.

A gerjesztés után egy lassabb relaxáció következik, amit detektálni tudunk. A mágnesezettség vektor mozgását az ún. Bloch-egyenletek (1) írják le [5]. T_1 és T_2 azokat a relaxációs időket jelentik, melyek szerint a mágnesezettség vektora relaxál a z , illetve az $x - y$ irányú egyensúlyi értékeihez. Ezen relaxációs folyamatokat szemlélteti az 1. ábra.

$$\begin{aligned}\frac{\partial M_z(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \\ \frac{\partial M_x(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_x - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{\partial M_y(t)}{\partial t} &= \gamma(M(t) \times B(t))_y - \frac{M_y(t)}{T_2}\end{aligned}\tag{1}$$

A B_1 teret egy, a mintát körülvevő szolenoid tekercs váltakozó feszültségével keltjük, úgy, hogy B_1 merőleges legyen a B_0 tér irányára (z irány). Később kizárólag az $x - y$ síkban tudjuk detektálni a gerjesztett mágneses momentum vektor megfelelő vetületeit (de megfelelő pulzussorozatokkal gerjesztve a mintát detektálni tudjuk a z irányú komponens is). A detektálás azért lehetséges, mert a magspinek forgása a tekercsben Larmor-frekvenciával oszcilláló, ezért váltakozó feszültségű jelet indukál a tekercsben, ennek az amplitúdóját mérjük. A gerjesztés után a mágneses momentum vektor az egyensúlyi helyzetébe relaxál, amely folyamat az előző, pulzusszerű gerjesztésnél sokkal hosszabb ideig tart.



1. ábra. A mágneszettség vektor relaxációja (a B_0 tér párhuzamos a z tengellyel) [6]

A mintát különböző hosszúságú pulzusokkal vagy pulzussorozatokkal gerjesztve, majd a relaxációt figyelve, információkat szerezhetünk például a magok sűrűségéről az anyagban, a környezetükről és a szomszédos kötésekről.

2.2. FID mérése és alakja

Az ún. FID jel (*Free induction decay*) mérésekor egy 90° -os pulzussal gerjesztjük a mintát, majd magára hagyjuk. A pulzus végén a spinek a B_0 térrel merőleges helyzetbe kerülnek, így az $x - y$ irányú komponens T_2 relaxációs idejű exponenciális relaxációját mérhetjük. A mérésből kapott exponenciálisan lecsengő jel oszcillációkat tartalmaz, amennyiben a detektálás frekvenciája nem egyezik meg a mágneses tér jellemző Larmor frekvenciával (offrezonáns). Ha a B_0 mágneses tér inhomogén, a különböző magspinek dekoherenssé válnak, az emiatt módosuló relaxációs időt (az ún. reverzibilis relaxációs időt) jelölik T_2^* -gal.

Szilárd fázisúnak tekintett fehérje minták ^1H NMR jele magasabb hőmérsékleten két viszonylag jól megkülönböztethető lecsengési idejű jelből, illetve spektrumuk két különböző szélességű komponensből áll. Ennek oka, hogy ekkor a mintában szempontunkból merevnek tekinthető¹ (csak lassú mozgásokat végző) és mozgékony állapotban lévő protonok is jelen vannak, melyek NMR jelét együttesen mérjük. Szilárd anyagok gyorsan lecsengő (széles spektrumú), folyékony halmazállapotúak pedig hosszabb idő alatt lecsengő (keskeny spektrumú) jelkomponenst adnak [7].

A FID amplitúdója és a spektrum alatti terület egyenesen arányos a jelet, illetve a

¹A továbbiakban ezekre a ^1H -ekre merevként fogunk hivatkozni, de fontos, hogy ezek a többi protonhoz képest jóval lassabb mozgást végeznek, de nem merevek.

spektrumot adó atommagok számával.

A különböző összetevők meghatározására, vagyis a mért FID jelek illesztésére több módszer is létezik. A mozgékony protonok jele általában leírható egy vagy két nyújtott exponenciális függvény segítségével (2), esetünkben Gauss görbékkel [4]:

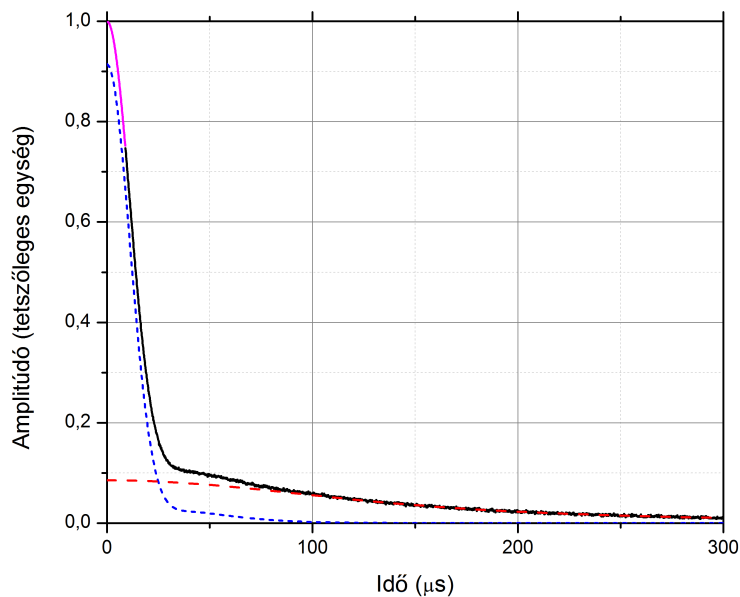
$$F_G(t) = A_G e^{-(at)^c}, \quad (2)$$

ahol A_G az amplitúdó, a egy konstans (az időállandó reciproka), c pedig a kitevő, esetünkben $c = 2$ (Gauss görbe). Ez a komponens csak magasabb hőmérsékleteken van jelen (kb. 240 K felett).

A merev protonokból származó jel ennél bonyolultabb, megfigyelhető benne egy kisebb oszcilláció, az ún. lebegés. A görbe többnyire leírható az ún. Abragam függvénnyel, ami egy *sinc* függvény és egy Gauss görbe szorzata [4]:

$$F_{Ab}(t) = A_{Ab} e^{-b^2 t^2} \frac{\sin(dt)}{(dt)}, \quad (3)$$

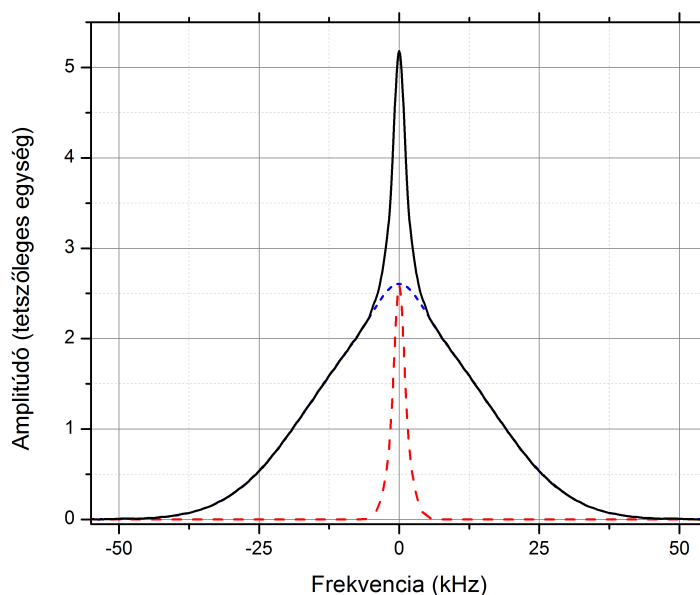
ahol A_{Ab} az amplitúdó, b és d pedig az időállandók reciprocai.



2. ábra. Egy magas hőmérsékleten (295,5 K-en) mért FID (fekete) és különböző komponensei: kék a merev, piros pedig a mozgékony állapotban lévő protonokból származik. Rózsaszínnel ábrázoltuk az extrapolált pontokat. A ^1H NMR méréseket polikristályos lizozimon, 82,4 MHz-en végeztük.

Esetünkben a merev protonokból kapott jelet egy Abragam és egy rövid időállandójú (gyorsan lecsengő) Gauss függvény szuperpozíciója írja le megfelelően. A mért FID pedig leírható a fenti összefüggések összegeként, amint azt a 2. ábra is szemlélteti. A méréseknek van holtideje, a hiányzó pontokat az illesztések alapján pótoltuk. A holtidő jellemzően $6 - 8 \mu\text{s}$ volt.

A mért jelből Fourier-transzformációval előállítható a frekvencia spektrum (3. ábra, fekete görbe), az így kapott görbén is jól látható a korábban említett kettősség. Az ábrán láthatóak a különböző komponensek Fourier-transzformáltjai is.



3. ábra. A 2. ábrán látható mért jel (fekete) és a különböző komponenseinek frekvencia spektruma: kék a merev, piros pedig a mozgékony állapotban lévő protonokból származik.

2.3. Fundamentális hőmérséklet

Ha bármilyen mért pontokra analitikus függvényeket szeretnénk illeszteni, vagy egy adott görbe alatti területet akarunk kiszámolni, akkor célszerű a tengelyeket azonos dimenziójúaknak, vagy dimenzió nélküli mennyiségeknek választani. Az általunk elvégzett mérések esetén erre a célra alkalmas a fundamentális, illetve a normált fundamentális hőmérsékleti skála [8]. Az első az energiaegységekben mért hőmérsékleti skála:

$$T_f = R \cdot T \quad (4)$$

ahol $R = 8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet Kelvin egységeiben, ekkor T_f -et SI rendszerben kapjuk meg, mértékegysége J/mol lesz. Amennyiben normáljuk az előbbi mennyiséget a jég olvadáspontjára, egy dimenziótlan mennyiséget kapunk, a normált fundamentális hőmérsékletet [8]:

$$T_{fn} = \frac{R \cdot T}{R \cdot 273,15} = \frac{T}{273,15} \quad (5)$$

Az adott körülmények között végbemenő molekuláris mozgásra vonatkozó potenciál-gát a víz olvadáshőjére normált fundamentális hőmérséklet, ami a következő összefüggéssel adható meg:

$$V_0 = c \cdot T_f \quad (6)$$

itt c egy dimenziótlan szám, melyet úgy határozhatunk meg, hogy a fenti egyenletet a jégre alkalmazzuk, a jég olvadáshője $6,02 \text{ kJ/mol}$, ebből $c = \frac{V_{\text{jég}}}{273,15} = 2,65$. V_0 mértékegysége kJ/mol [8].

2.4. A momentumok módszere

Ez a rész a [9]-es hivatkozás alapján készült.

Egy polikristályos anyagmintában egy proton-pár közötti dipoláris kölcsönhatás széles NMR-spektrumot eredményez. A helyzet bonyolult, ha több kölcsönható atommag van jelen, mert ekkor a spektrum nem írható le kvantummechanikai módszerekkel. Megoldást nyújt a problémára a Van Vleck által kidolgozott momentumok módszere [10], ugyanis ennek segítségével fontos információk szerezhetők a mintáról.

Egy $f(\omega)$ függvény ω_0 pont körüli n -edik momentumának definíciója:

$$M_n = \frac{\int_0^\infty (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega},$$

ahol $f(\omega)$ a spektrum (a mágneses indukciónak megfelelő a körfrekvencia függvényében), $M_0 = \int_0^\infty f(\omega) d\omega$ nulladik momentum pedig a függvény alatti területet adja meg. M_2 mértékegysége T^2 .

Az M_4/M_2^2 hányados jellemzi a spektrum alakját, értéke Gauss-függvény esetén 3, Lorentz függvényénél pedig 4.

A momentumok módszerének sok előnye van, melyből néhány:

- a fenti definíció alapján egyszerűen számolható: görbe alatti területek meghatározásával,

- nagyon érzékeny az atomok közötti távolságok nagyságára szilárd testekben,
- utalhat a minta szerkezetére,
- segít a mozgás tanulmányozásakor: a momentumok lecsökkennek, amikor megindul egy mozgás.

A második momentumot közvetlenül az illesztett függvény paramétereiből is ki lehet számolni², az eredmény az előző módszerével azonos.

2.5. Hidrogén mozgékonyság

A hidrogén mozgékonyság (HM) egy rendparaméter, melyet az alábbi, (7)-es összefüggés alapján lehet kiszámolni [11]:

$$HM^x(T) = \frac{M_2(RL) - M_2^x(T)}{M_2(RL)}, \quad (7)$$

ahol $M_2(RL)$ a merev rács állapotban mért második momentum (alacsony hőmérsékleten), $M_2(T)$ egy adott T hőmérsékleten mért ^1H NMR-spektrum, vagy spektrumkomponens második momentuma, x pedig a komponensre utal (lehet t - "teljes", sz - "széles" vagy k - "keskeny") [12].

HM a proton-proton párok mozgásáról vagy éppen mozdulatlanságáról ad információt, az összes hidrogén pár átlagos mozgékonyságára jellemző mennyiség. Értéke nulla és egy közötti dimenziótlanszám, ahol $HM = 0$ a teljesen merev, $HM = 1$ pedig a nagyon mozgékony, folyadékszerű állapotot jelenti [8, 13]. Amennyiben a spektrum több komponensre bontható, a rájuk vonatkozó különböző mozgékonyság-értékek is meghatározhatóak.

HM értéke függ a hőmérséklettől, a minta molekuláris szerkezetétől, illetve folyadékok esetén a környezet kémiai tulajdonságaitól is [12].

²Ez részletesebben például a [4]-es referenciában van leírva.

3. Kísérleti technikák

3.1. NMR spektrométer

A méréseket egy Bruker AVANCE III (82,4 MHz-es elektromágnes, a frekvencia stabilitása jobb volt, mint $\pm 10^{-6}$) spektrométerrel végeztük. A műszer az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontban található.

Minden esetben ^1H NMR méréseket végeztünk, szilárdnak tekinthető fehérjemintákon. Ehhez gyors mintavételezésre volt szükség, hiszen a kapott jelek időben jóval gyorsabban lecsengenek, mint a folyékony minták esetén. A frekvencia spektrumban a szilárd állapotú minták széles jelet adnak, ezért nevezzük az ilyen méréseket "széles jelű" NMR-spektroszkópiának.

A hőmérsékletet nyílt körű Janis kriosztáttal szabályoztuk, a tartomány, amiben mérünk 230 K-tól 294 K-ig terjedt, a hőmérséklet bizonytalansága kisebb volt, mint ± 1 °C.

3.2. Mintaelőkészítés, minták

A mérések során két különböző fehérjemintát vizsgáltunk. A minták az L7651-es sorszámú csirke tojásfehérje lizozimot tartalmazzák (gyártó: Sigma-Aldrich), a pontos víztartalmukat, illetve pontos tisztaságukat nem ismerjük. A termékleírás szerint a minta fehérjetartalma ≥ 90 %, emellett ≈ 10 %-ban vizet és sókat tartalmaz, például nátrium-acetátot és nátrium-kloridot [14].

Egy időben készítettük el a két mintát, az elsőt lezártuk, így egy "száraz" fehérje mintát kaptunk. A másikat viszont páradús környezetbe helyeztük (hűtőszekrénybe, kb. 5 °C-ra) és hagytuk két hétig, hogy magába szívjon valamennyi vizet. A megkötött vízmennyiséget az előkészítés során egy nagy pontosságú (a bizonytalansága ± 50 μg volt) analitikai mérleggel határoztuk meg. Tömegméréssel, illetve az NMR mérésekkel is csak a relatív víztartalmat tudtuk mérni.

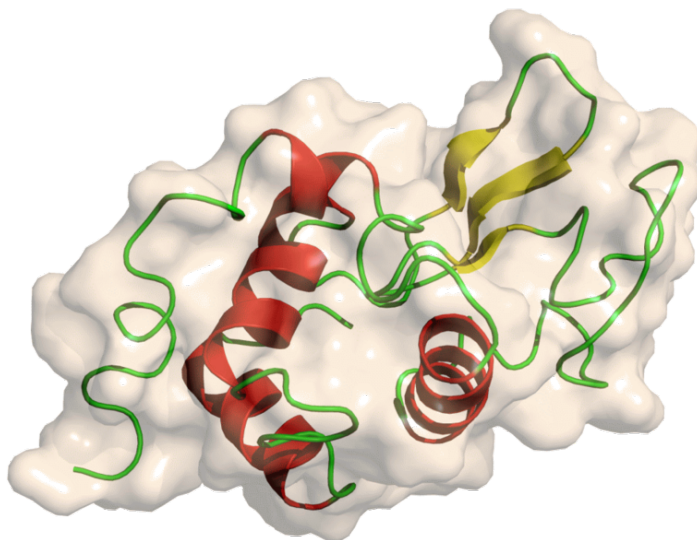
Az előkészítés során törekedtünk arra, hogy elkerüljük az edények falára tapadó minta okozta anyagvesztést, illetve mérési hibákat, ezért a lehető legkevesebbszer mozgattuk a fehérjét, illetve mindig az edényekkel együtt mértünk (az edények tömegét ismerve).

Lizozim

A lizozim egy enzim, a 4. ábra a térszerkezetét mutatja be. Nagy mennyiségben található meg a tojásfehérjében, az első lizozim enzimet is ennek vizsgálata során fedezték fel (Alexander Fleming, 1922-ben [15]). Ezen felül jelen van a testnedvekben, például a könnyben, a nyálban és az anyatejben, illetve egyes állatokban és növényekben is. Az általunk használt lizozim a csirke tojásfehérje lizozim volt.

A lizozimnak antibakteriális és fungicid tulajdonságai vannak és széleskörűen használják mind biokémiai, mind gyógyszerészeti alkalmazásokban. Ez utóbbi területen kiterjedten használják gram-pozitív baktériumok elpusztítására, valamint meglévő immunvédelem támogatására bakteriális fertőzések legyőzésében. Antibakteriális tulajdonságai miatt a lizozim az élelmiszeriparban is hasznosítható az élelmiszerek megromlásának megelőzésére.

A mérések szempontjából fontos tulajdonsága, hogy egy globuláris, vagyis rendezett fehérje. Ez azért fontos, mert a rendezetlen, illetve a rendezett fehérjék különböző módon viselkednek. Fontos még megjegyezni, hogy a mintákban lévő víz mennyisége kevesebb, mint amennyi a fehérje funkcióinak elvégzéséhez szükséges lenne.



4. ábra. A lizozim enzim térszerkezete [16]

Adamantán

Ha a mért NMR jelből szeretnénk meghatározni a fehérjeminta hidrogéntartalmát, alkalmaznunk kell egy standardot. Meghatározott tömegű adamantánban ismert mennyiségű ^1H van jelen, így ha azonos hőmérsékleten és azonos körülmények között megmérjük az adamantán, és a vizsgálandó fehérje ^1H NMR jelének amplitúdóját, tudni fogjuk, hogy egy protonhoz mekkora jel tartozik. Ebből a mintában lévő protonok száma meghatározható. Az adamantán és a lizozim néhány tulajdonsága a 1. táblázatban látható.

A mérések során egy 42,5 mg-os adamantán mintát vizsgáltunk.

	Lizozim	Adamantán
Relatív molekulatömeg (g/mol)	14307	136,24
^1H tartalom (db/molekula)	961 ³	16
	129 aminosavból áll	Összegképlete: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$

1. táblázat. Az adamantán és a lizozim számunkra fontos tulajdonságai

³Amennyiben egyik funkciós csoportja sem adott le, illetve vett fel hidrogént.

4. Hőmérséklet-szabályozó rendszer

Ahhoz, hogy széles jelű NMR méréseket tudjunk elvégezni a BME Fizika tanszékén található Bruker Avance DRX 400-as spektrométerrel, szükséges volt néhány apróbb fejlesztést elvégezni. A hőmérséklet-szabályozó rendszer összeállítását Karsa Anita végezte, melynek pontos leírása az ő diplomamunkájában olvasható részletesen [17].

Feladatunk volt a hőmérséklet-szabályozó rendszer stabilizálása, a hőmérséklet kellő pontosságú mérésének megvalósítása, valamint a széles jelű ^1H NMR mérésekhez szükséges mintavételezési sűrűséget biztosító egység beüzemelése is.

A sűrű mintavételezéshez kizárólag a Topspin mérőprogramban kellett bizonyos paramétereket átállítani. Az így beállított legkisebb lehetséges mintavételezés sűrűsége $0,2\ \mu\text{s}$, a mérés holtideje pedig kb. $6 - 8\ \mu\text{s}$ lett.

A hőmérséklet pontosabb méréséhez közelebb vittük a hőmérőt a mintatartóhoz, a távolság kb. $0,5\ \text{cm}$ volt. Ez a távolság csak bizonyos mértékig csökkenthető, ugyanis zavarhatja a mérést, ha a hőmérő a tekercshez túl közel helyezkedik el. A továbbiakban célszerű lenne megoldani, hogy a hőmérsékletet a mintatartó alatt, és felett is meghatározhassuk, hiszen a minta hűtését nitrogén gáz áramoltatásával oldjuk meg, így nem biztos, hogy pontosan ugyanakkora a hőmérséklet a mérőfej különböző pontjain.

A használt nitrogén tartályból egy fém csövön, egy fűtőszállal ellátott és egy fűtőszál nélküli kvarccsőven megy keresztül a gáz, mire a mintatartóhoz ér. A hőmérséklet stabilizálásához ezek érintkezési pontjait javítottuk teflon szalag segítségével, az esetleges szivárgások elkerülésének érdekében. A hőveszteség csökkentéséhez pedig a fém csövet szigeteltük.

A fenti módosítások elvégzése lehetővé tette, hogy széles jelű NMR méréseket végezzünk a spektrométerrel (kb. $190\ \text{K}$ és $310\ \text{K}$ közötti hőmérsékleten), valamint a hőmérséklet-szabályozás stabilabb és pontosabb lett (hibája kevesebb, mint $\pm 1\ ^\circ\text{C}$). Ennek ellenére az alábbi méréseket az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontban végeztük, egyéb technikai problémák miatt, melyek megoldása még folyamatban van.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1. Tömegmérések

A tömegméréseket a már korábban említett nagy pontosságú mérleggel végeztük el, melynek pontossága $\pm 50 \mu\text{g}$ volt. Az alábbi táblázat a vizsgált minták tömegét tartalmazza.

	száraz	nedvesített
A minta tömege szárazon (mg)	30,17	46,21
Hozzáadott víz (mg)	0	0,12
Az abszorbeált víz és a kiindulási tömeg aránya		$2,62 \cdot 10^{-3}$

2. táblázat. A vizsgált fehérjeminták és a nedvesített mintához hozzáadott víz tömege.

Minden mérést többször megismételtünk (legalább háromszor), a feltüntetett értékek ezek átlagai. A mérleg bizonytalanságát (az adatok hibáját) a mért adatok szórásából becsültük meg. Az átlagos szórás $22 \mu\text{g}$, a legnagyobb $61 \mu\text{g}$ volt, de ezen kívül mindegyik a becsült hibaértéken ($\pm 50 \mu\text{g}$) belül volt.

5.2. NMR mérések

Mért jelek és spektrumuk a hőmérséklet függvényében

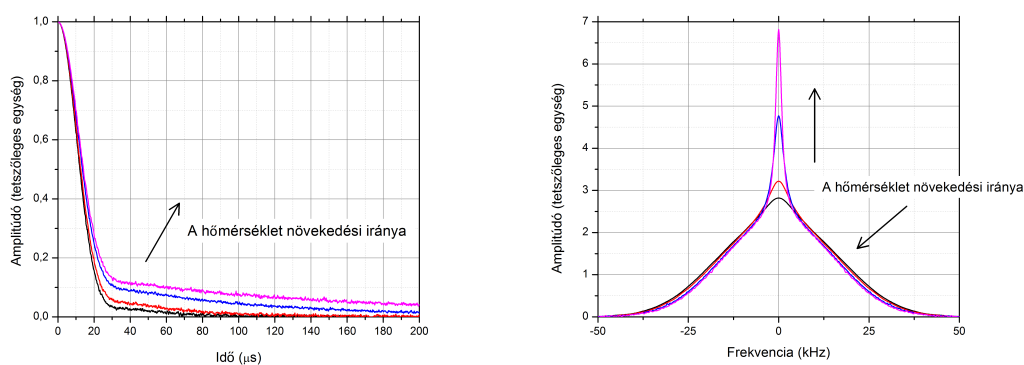
Az 5. ábrán a mért FID jelek (azonos amplitúdóra normálva), illetve ezek Fourier-transzformáltjai (a spektrumok alatti terület azonos) láthatóak különböző hőmérsékleteken. A felső görbék a száraz, az alsók pedig a nedvesített mintán végzett mérésekből származnak.

A bal oldali ábrákon (FID jelek) jól látható, hogy a görbéken a lassabban lecsengő komponens aránya a hőmérséklettel nő, a spektrumokról pedig leolvasható, hogy a spektrum a hőmérséklet növekedésével keskenyedik (ezt a félértékszélesség-grafikon is mutatja, 10. ábra). Megállapíthatjuk, hogy a mintában lévő összes proton átlagosan mozgékonyabb lesz magasabb hőmérsékleten. A minták a legalacsonyabb hőmérsékleteken még csak merev protonokat tartalmaznak, a piros (száraz: $-28,4^\circ\text{C}$ és nedvesített: $-26,1^\circ\text{C}$) spektrumokon látható először a mozgékony protonokra jellemző keskenyebb komponens, ami a hőmérséklet növekedésével egyre számottevőbb.

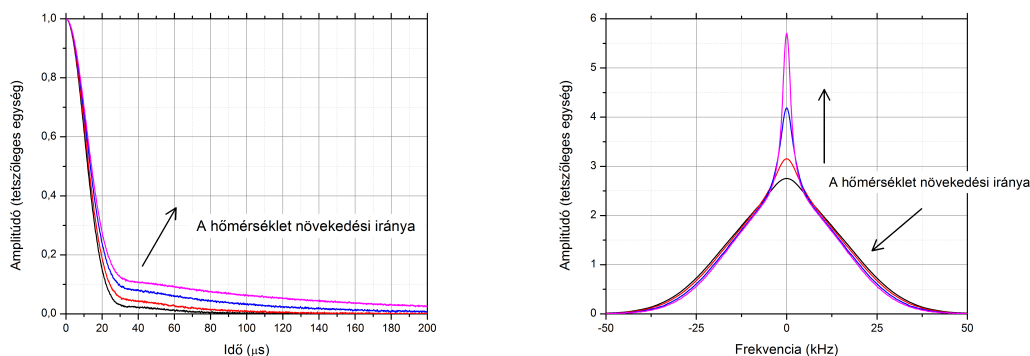
A különböző mintákra kapott görbéket összehasonlítva látható, hogy a FID jelek gyorsan lecsengő komponense (illetve a spektrumok széles komponense) nagyon hasonlóan viselkedik a két minta esetén. A különbség a keskeny spektrumkomponensben van (nagy

időállandójú FID jel), mégpedig a száraz minta esetén ezek keskenyebbek, a FID jel lassabban cseng le. A keskeny spektrumkomponens területe (illetve a hozzá tartozó ^1H -atomok mennyisége) is változik mindkét fehérjemintában, a növekvő hőmérséklettel nő. Számszerűen az időállandók a 9. ábrán, a spektrum-szélességek pedig a 10. ábrán figyelhetők meg.

Száraz minta:



Nedvesített minta:



5. ábra. FID jelek néhány különböző hőmérsékleten mérve (bal), illetve a jelek Fourier-transzformáltjai, ugyanezek a hőmérsékleteken (jobb). A felső görbék a száraz, az alsók pedig a nedvesített mintán végzett mérésekből származnak. Az ábrákon feltüntettük a hőmérséklet növekedésének irányát (a pontos hőmérsékletértékeket a 3. táblázat tartalmazza). A ^1H NMR méréseket polikristályos lizozimon, 82,4 MHz-en végeztük.

Az ábrázolt hőmérsékletek:

Minta	Fekete	Piros	Kék	Rózsaszín
Száraz	-43,7 °C	-28,4 °C	1,7 °C	20,6 °C
Nedvesített	-42,2 °C	-26,1 °C	1,4 °C	22,4 °C

3. táblázat. Az 5. ábrán feltüntetett görbék mérési hőmérsékletei.

Oladási diagram

Az ún. oladási diagramon (OD, 6. ábra) ábrázoljuk a normált fundamentális hőmérséklet függvényében a teljes mért FID amplitúdójára normálva a mozgékony protonok jelének amplitúdóját (n).

Egy adott hőmérsékleten megmozduló ^1H mennyisége kapcsolatban van az annak megfelelő energián felszakadó kötések számával, így a potenciálgátak és eloszlásuk meghatározható. Amennyiben feltesszük, hogy a keskeny komponens a vízmolekuláktól származik, az oladási diagrammon lévő n változásából meghatározható a megmozduló vízmolekulák száma. Amennyiben az OD-re egyenes illeszthető, annak meredeksége megadja a derivált értékét [1].

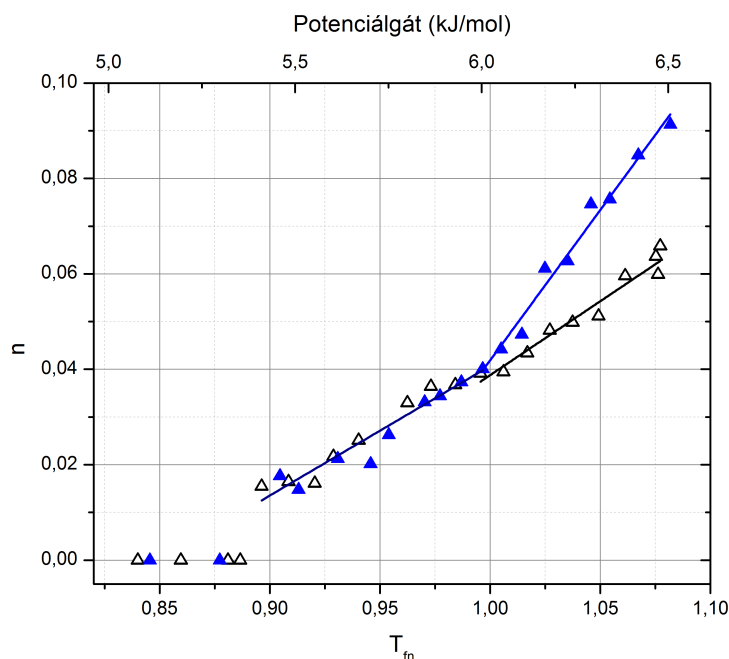
A továbbiakban vizsgáljuk az oladási diagrammot (6. ábra), hiszen fontos jellemző, hogy adott minta esetén a keskeny komponens hányad része a teljes FID jelnek. A mozgékony komponens megjelenésének hőmérséklete a két mintánál: $-28,4\text{ }^\circ\text{C}$ (száraz) és $-26,1\text{ }^\circ\text{C}$ (nedvesített). Érdekes, hogy a különböző nedvességtartalmú mintákon ez a hőmérséklet közel azonos, azonban ehhez hozzátartozik, hogy a nedvesített mintánál ritkábban vannak a mérési pontok ebben az érdekes hőmérséklettartományban, ezért lehet, hogy már alacsonyabb hőmérsékleten is megjelenik a keskeny komponens, csak nincs ott mérési pontunk.

A grafikonon látható, hogy a két minta kb. $0\text{ }^\circ\text{C}$ -ig nagyon hasonlóan viselkedik, a pontok közel egy egyenesen vannak, viszont a $0\text{ }^\circ\text{C}$ feletti hőmérsékleten a két görbe szétválik. A jelenséget magyarázza, hogy a nedvesített mintában több víz van jelen, ami $0\text{ }^\circ\text{C}$ felett másképp kezd el viselkedni, mint alacsonyabb hőmérsékleten.

A grafikonon ábrázolt mennyiségek tömegegységre vonatkoznak, a tapasztalt különbség a nedvesített mintában a fehérje által felszívott vízből adódik. Ezt biztosan állíthatjuk, hiszen a tömegmérések során igazoltuk, hogy a nedvesített mintában több víz található. Itt fontos megjegyezni, hogy a mintaelőkészítés során csak vizet juttattunk a mintába, egyéb szennyezőket nem.

A potenciálgát értékek mindig megadják, hogy a jelkülönbségnek megfelelő protonmennyiség valamilyen mozgásának elindításához mennyi energia szükséges. Ahogy n értéke nő, úgy egyre több proton mozdul meg a mintában, ez a mozgás lehet translációs vagy rotációs jellegű.

A töréspont feletti, illetve alatti hőmérséklettartomány pontjaira egyeneseket illesztünk, a kapott paramétereket a 4. táblázat tartalmazza. A $0\text{ }^\circ\text{C}$ alatti pontokra összesen egyet, a magasabb hőmérsékletekre pedig külön-külön egy-egy egyenest illesztettünk. Az egyeneseket a 6. ábrán ábrázoltuk.



6. ábra. Olvadási diagram; a nedvesített (kék) és a száraz (fekete) mintán mért FID jelek mozgékony komponensei a teljes jelamplitúdóra normálva, a normált fundamentális hőmérséklet függvényében. A grafikonon feltüntettük a potenciálgát értékét is.

Az, hogy a pontokra egyeneseket lehet illeszteni azt jelenti, hogy egységnyi hőmérsékletváltozás alatt mindig ugyanannyi hidrogén kezd el mozogni. A potenciálgát értékek pedig megadják, hogy ezen ^1H -ek megmozdításához mennyi energiára volt szükség, vagyis mennyi volt azok kötési energiája.

Minta		Érték	Hiba
Száraz ($0\text{ }^\circ\text{C}$ felett)	Tengelymetszet	-0,271	0,027
	Meredekség	0,310	0,026
Nedves ($0\text{ }^\circ\text{C}$ felett)	Tengelymetszet	-0,589	0,034
	Meredekség	0,630	0,032
Mindkettő ($0\text{ }^\circ\text{C}$ alatt)	Tengelymetszet	-0,231	0,019
	Meredekség	0,272	0,020

4. táblázat. Az olvadási diagram $0\text{ }^\circ\text{C}$ feletti pontjaira illesztett egyenesek paraméterei

A hőmérsékletértékek, melyeken a mozgékony komponens megjelent, illetve az ezeknek megfelelő küszöbenergiák az alábbi táblázatban láthatóak. Korábban a lizozim vizes oldatán is készültek mérések (nem publikált eredmények), így összehasonlíthatjuk a je-

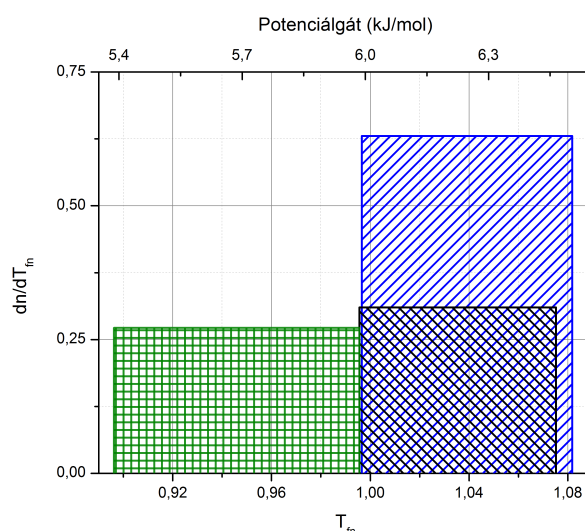
lenlegieket az akkor kapott értékekkel. Az oldat koncentrációja 50 mg/ml volt.

Elmondható, hogy oldat esetén jóval kevesebb energia is elég, hogy a mintában található vízmolekulák mozogni kezdjenek. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy nagyobb mennyiségű víz gyengébben kötődik a fehérjemolekulákhoz, ezért kisebb energia is elegendő ahhoz, hogy meg tudjanak mozdulni.

A 7. ábra az olvadási diagramra illesztett egyenesek deriváltjait tartalmazza.

	Száraz	Nedvesített	Oldat
Hőmérséklet	-28,4 °C	-26,1 °C ⁴	-80 °C
Energia (kJ/mol)	5,39	5,28	4,25

5. táblázat. A mozgékony komponens megjelenési hőmérséklete, illetve az ehhez tartozó energia értékek. A jelenleg vizsgált minták esetén kapott mennyiségek nagyon közel vannak egymáshoz. Feltüntettük a vizes oldatok esetén mért értékeket is.



7. ábra. Az olvadási diagramra illesztett egyenesek deriváltjai a normált fundamentális hőmérséklet és a potenciálgát függvényében. A fekete a száraz mintán mért, a kék a nedvesen, a zöld pedig a 0 °C alatt, mindkét minta értékein mért pontokból származik. Az illesztés paraméterei a 4. táblázatban láthatóak.

⁴Ezen a hőmérsékleten már biztos, hogy van mozgékony komponens, viszont előfordulhat, hogy ennél alacsonyabb hőmérsékleten is látható már, csak ott nincs mérési pontunk.

Tömegkülönbség meghatározása az NMR paramétereiből

A számolások során azt a feltételezést tettük, hogy a mozgékony jelkomponens kizárólag vízmolekuláktól származik.

Mivel a minták tömege nem volt azonos, így az NMR mérésekből közvetlenül, a tömeg ismerete nélkül nem lehet meghatározni a nedves mintában felszívott víz tömegét, hiszen a mért amplitúdók arányosak azon protonok számával, melyek a jelet adják, így függenek a minta tömegétől.

Az adamantanon mért FID alapján tudjuk, hogy az egy mol protonból származó jelamplitúdó 265000 tetszőleges egység. Ebből meghatároztuk, hogy egy gramm fehérjemintában hány mol proton van jelen (6. táblázat, "mol proton/1g" oszlop). Az adamantan mintán szobahőmérsékleten végeztünk ^1H NMR mérést, így a fehérjeminták amplitúdóértékeit is ezen a hőmérsékleten mért adatokból vettük, ez 22 °C volt. Feltételeztük, hogy szobahőmérsékleten már az összes víz mozgékony.

Az olvadási diagramról (6. ábra) leolvashatjuk, hogy szobahőmérsékleten mekkora volt a mozgékony komponens aránya a teljes jelhez viszonyítva, ez a 6. táblázat "n" oszlopában látható.

A víz moláris tömegét (18,015 g/mol), illetve az előző mennyiségeket felhasználva meghatározható, hogy egy gramm mintában hány gramm víz, illetve fehérje található ("m_{H₂O}/1g" és "m_{fehérje}/1g" oszlopok). Itt kihasználtuk azokat a feltételezéseket, hogy a keskeny komponens csak a vízmolekuláktól származik, illetve, hogy szobahőmérsékleten az összes vízmolekula mozgékony állapotban van.

Minta	mol proton/1g	n	m _{H₂O} /1g	m _{fehérje} /1g	m _{H₂O} /m _{fehérje}
Száraz	$6,75 \cdot 10^{-2}$	$6,32 \cdot 10^{-2}$	$3,85 \cdot 10^{-2}$	0,962	$4 \cdot 10^{-2}$
Nedves	$6,68 \cdot 10^{-2}$	$9,15 \cdot 10^{-2}$	$5,51 \cdot 10^{-2}$	0,945	$5,83 \cdot 10^{-2}$
Különbség:					$1,83 \cdot 10^{-2}$
Az abszorbeált víz kiindulási tömeghez viszonyított aránya:					$1,76 \cdot 10^{-2}$

6. táblázat. Az abszorbeált víz kiindulási tömeghez viszonyított arányának számolása a mért FID jelekből.

Kiszámoltuk a víz fehérjéhez képest vett arányát mindkét minta esetén (a széles jelnek megfelelő tömegre normálva). Az arányok különbségéből számolható az abszorbeált víz kiindulási tömeghez viszonyított aránya. Ez utóbbit össze tudjuk hasonlítani a tömegmérésből származó értékkel (7. táblázat).

	Az abszorbeált víz kiindulási tömeghez viszonyított aránya
Tömegmérés	$2,62 \cdot 10^{-3}$
NMR mérés	$1,76 \cdot 10^{-2}$

7. táblázat. Az NMR és a tömegmérésből kapott értékek.

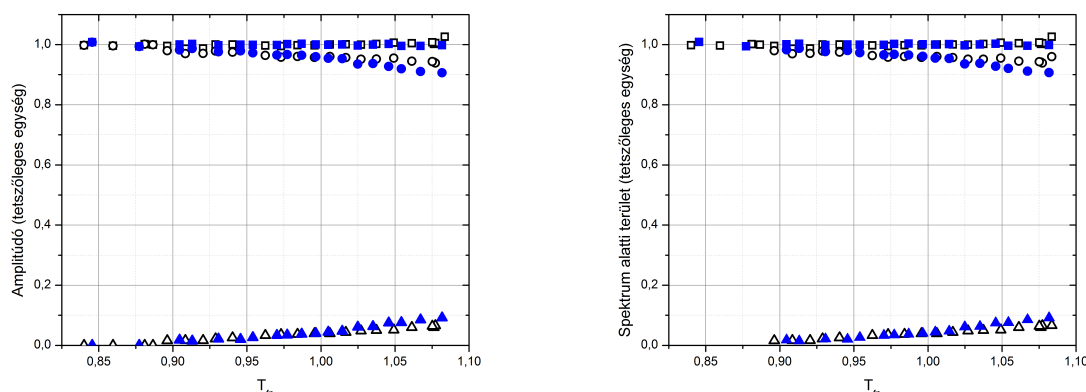
Látható, hogy sokkal kevesebb vizet abszorbeált a fehérje a tömegmérés alapján, mint az NMR mérésből kapott a keskeny komponensek alapján. Ebből arra következtethetünk, hogy a keskeny komponens nem csak víz volt, hanem a jelhez más, hasonlóan mozgékony molekularészletekben lévő ^1H atomok is hozzájárulnak. Tehát az NMR mérésből történő számolásnál a kiinduló feltételezésünk, miszerint a keskeny komponens csak vízmolekulák jeléből származik, nem igaz.

A továbbiakban még több, eltérő nedvességtartalmú fehérjemintán szükséges majd tömeg, illetve ^1H NMR méréseket elvégezni, hogy jobban megérthessük a víz szerepét az NMR-spektrumban. Ez azonban túlmutat a jelen dolgozat keretein.

Az illesztett paraméterek vizsgálata

Függvényillesztések segítségével meghatároztuk a FID jelek amplitúdóját, illetve a spektrumok alatti területeket is kiszámoltuk. A különböző komponensekre ezek az értékek a 8. ábrán láthatóak. A kétféle módszerrel kapott adatok mérési hibán belül megegyeznek. A pontokat a teljes jelen mért értékek átlagával normáltuk.

A nedves mintában 0 °C felett a keskeny komponens aránya megnőtt a széles komponens arányának rovására.



8. ábra. A FID jelek amplitúdói (bal) és a spektrum alatti területek (jobb) a normált fundamentális hőmérséklet függvényében, a pontokat a összamplitúdóra, illetve az összterületre normáltuk. A száraz minta adatait feketével, a nedvesét pedig kékkel jelöltük. A grafikonok tartalmazzák a teljes (négyzetek) mintából, valamint a széles (körök) és a keskeny (háromszögek) komponensekből származó adatokat is. A függvényillesztések alapján az amplitúdóértékek hibája kevesebb, mint $\pm 2,5\%$.

Az illesztések és mérések helyességét mutatja az a tény, hogy a mért jelek összamplitúdója közel konstans (ahogy azt a fenti ábrák jól mutatják), hiszen a mintában a protonok mennyisége nem változott, csupán azok dinamikai állapota.

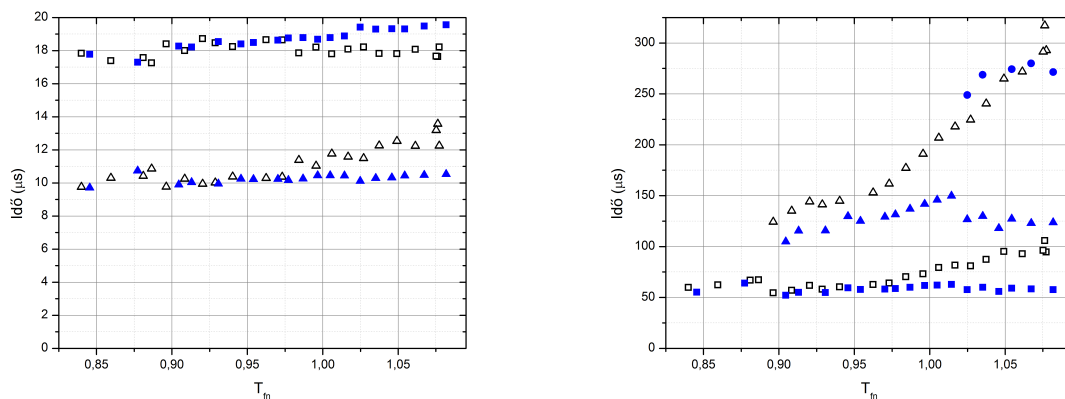
Az illesztett függvények időállandóinak segítségével ellenőrizhetjük, hogy megfelelő függvényeket használtunk-e a görbék leírására. A 9. ábrán ezek az időállandók láthatóak: a bal oldali ábrán az Abgram-függvény illesztéséből kaptak, a jobb oldalin pedig a Gauss-függvényéből, mindkét minta esetén. Az időállandók nagysága utalhat a protonok mozgékonyására: minnél nagyobb a t , annál mozgékonyabbak a protonok.

Láthatóan mindkét minta esetén az Abgram-függvény egyik időállandója körülbelül hőmérsékletfüggetlen, a másik pedig a hőmérséklettel nő, viszont ez a növekedés egyik esetben sem egy nagyobb ugrás. Az időállandók növekedéséből arra lehet következtetni,

hogy a széles spektrumkomponenst adó hidrogénatomok is egyre mozgékonyabbak lesznek a növekvő hőmérséklettel. (Az időállandó növekszik, a neki megfelelő spektrumkomponens keskenyedik.)

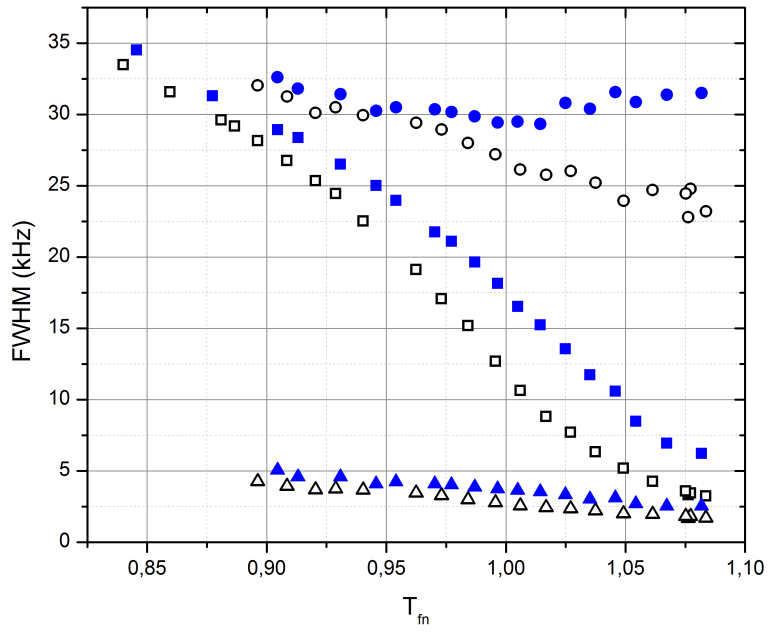
A Gauss-függvények esetén a nedvesített minta adataiban 6,8 °C-on látható ugrás azért van jelen, mert azon a hőmérsékleten lehetett először második, hosszú időállandójú exponenciális komponenst illeszteni. Ez a komponens valószínűleg már alacsonyabb hőmérsékleten is jelen van, ekkor a kék háromszögekkel jelölt időállandók egy egyenesen lennének.

Ahogy az az 5. ábrán is látható, a száraz mintán mért FID jelek magasabb hőmérsékleten (amikor már jelen van a mozgékony komponens is) lassabban csengenek le, mint a nedves mintán mértek, ez azt jelenti, hogy az előbbiben lévő protonok mozgékonyabbak. Ennek oka még nem ismert, további méréseket igényel.



9. ábra. A bal oldali grafikon az Abragam-függvény időállandóit, a jobb oldali pedig a Gauss-függvényekét tartalmazza, a normált fundamentális hőmérséklet függvényében. A száraz minta adatait feketével, a nedvesét pedig kékkel jelöltük. A függvényillesztések alapján az időállandók hibája $\pm 1\%$.

Az alábbi grafikon a spektrumok félértékszélesség-értékeit (FWHM - *Full Width at Half Maximum*) tartalmazza a normált fundamentális hőmérséklet függvényében. Ahogy azt már korábban is említettük, a 10. ábráról is leolvasható, hogy a teljes mintán mért spektrumok a hőmérséklet növekedésével egyre keskenyebbek (négyzetek). A száraz minta (feketével jelölve) spektrumai, illetve ennek komponensei mindig keskenyebbek, mint a nedves mintán kapott görbék.

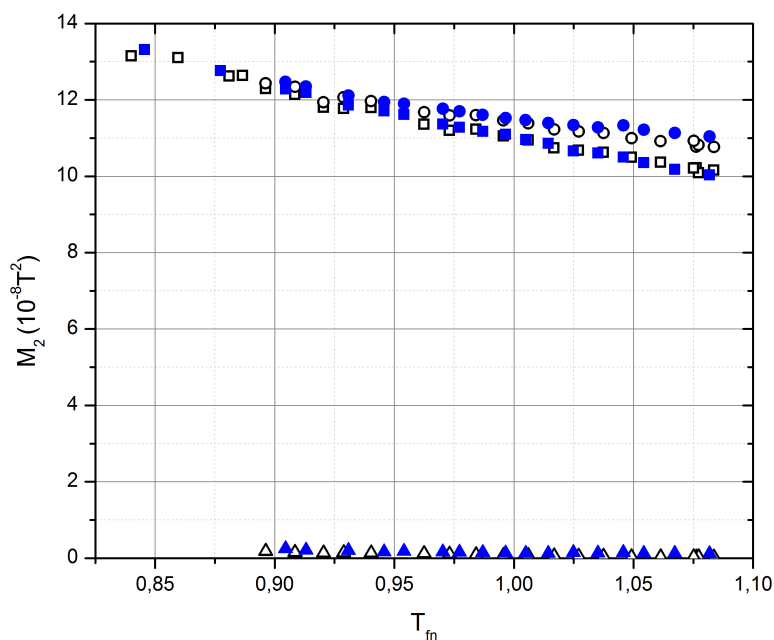


10. ábra. A félértékszélesség-értékek a normált fundamentális hőmérséklet függvényében. A grafikonok tartalmazzák a teljes (négyzetek) mintából, valamint a széles (körök) és a keskeny (háromszögek) komponensekből származó adatokat is. A száraz minta spektrumainak félértékszélességeit feketével, a nedvesét pedig késsel jelöltük.

Második momentum, mozgékonyság

A 2.4-es és 2.5-ös fejezetek alapján kiszámoltuk a spektrumok második momentumát, illetve a mintákban lévő hidrogének mozgékonyság paramétereit is. Ez utóbbi kiszámolásakor a merev állapotban mért második momentum értéke $M_2(RL) = 21,1 \cdot 10^{-8} \text{ T}^2$ volt, amely egy korábbi mérésből (nem publikált eredmények) származik, és a lizozim 4,4 K-en mért második momentuma.

A második momentum lecsökken, amikor megindul egy mozgás a mintában. A 11. ábrán megfigyelhető, hogy a két vizsgált mintára a teljes jelre vonatkozó második momentum (M_2^t , négyzetek) értékek közel egy egyenesre esnek (mindkettő azonos ütemben változik), de a széles, illetve a keskeny jelkomponens második momentumai (M_2^{sz} és M_2^k) különböző meredekségűek a száraz és a nedvesített fehérjék esetén. A nedves minta egyes komponenseinek második momentuma lassabb ütemben (kisebb meredekséggel) csökken.



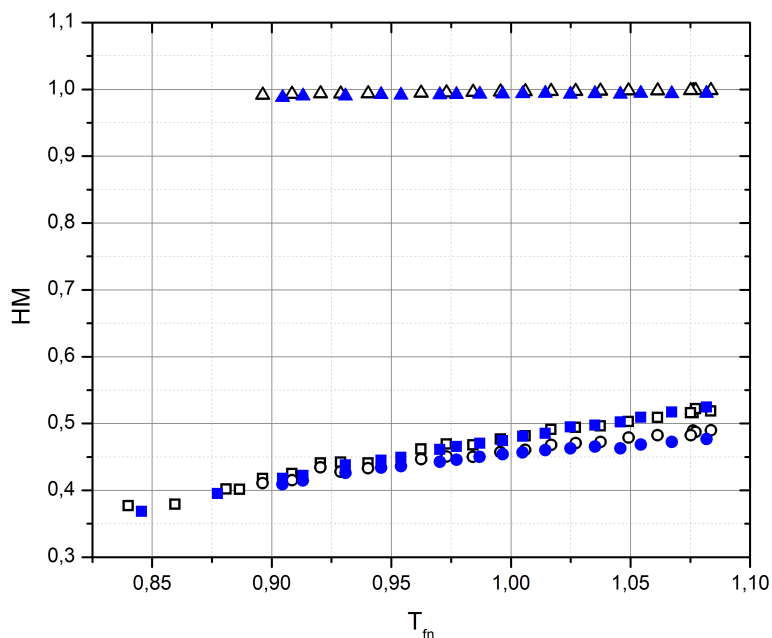
11. ábra. A mért második momentum értékek a normált fundamentális hőmérséklet függvényében. A fekete pontok a száraz, a kékek a nedves mintán mért értékek. A grafikon tartalmazza a teljes (négyzetek) mintából, valamint a széles (körök) és a keskeny (háromszögek) komponensekből származó adatokat is.

A hidrogén mozgékonyság értéke 1, ha az adott proton nagyon mozgékony, folyadékszerű állapotban van, és 0, ha merev. A 12. ábrán látható, hogy az eddig mozgékonynak

tekintett komponens HM paramétere minden hőmérsékleten közel 1, tehát a vizsgált protonok valóban mozgékonyak. A teljes minta esetén pedig HM a hőmérséklettel nő.

A merevnek tekintett komponens esetén HM értéke nem 0, tehát a protonok nem teljesen merev állapotban vannak. Ez nem meglepő, hiszen a 2.2-es fejezetben leírtak szerint ezek a protonok lassú mozgásokat végeznek, de az általunk végzett vizsgálatok szempontjából merevnek tekinthetők, a keskeny komponenst adó hidrogénatomok mozgékonyaságához képest.

A teljes mintára számolt HM értékek itt is egy egyenesen vannak, de a száraz mintában lévő protonok az egyes komponensek esetén ezen görbék szerint is mozgékonyabbak, mint a nedvesítettben lévőek. Ennek oka egyelőre nem ismert, de egy érdekes kérdés a további vizsgálatok szempontjából.



12. ábra. A számolt hidrogén mozgékonyaság paraméterek. A száraz minta adatait feketével, a nedvesét pedig kézzel jelöltük.

6. Összefoglalás

A munkánk során hőmérsékletfüggő, széles jelű ^1H NMR méréseket végeztünk különböző nedvességtartalmú fehérjemintákon, a vizsgált fehérje a csirke tojásfehérjéből származó liofilizált lizozim volt. A mérést egy ismeretlen víztartalmú száraz, valamint egy hasonló, nedvesített mintán végeztük, ez utóbbi páradús környezetben ismert mennyiségű vizet szívott magába. A minták tömegét egy nagy pontosságú analitikus mérleggel határoztuk meg. A vizsgált hőmérséklettartomány 230 K-től 294 K-ig terjedt.

Meghatároztuk, hogy adott minta esetén a mozgékony protonokhoz tartozó keskeny komponens hányad része a teljes FID jelnek, vagyis felvettük az olvadási diagramot. Ezen látható volt, hogy a különböző mintákból származó pontok $0\text{ }^\circ\text{C}$ -ig egy egyenesre esnek, vagyis a ^1H atomok, melyekből származnak, **hasonlóan viselkednek**. Magasabb hőmérsékleteken viszont a két görbe szétválk, ezt magyarázza, hogy a nedvesített mintában **több víz** van jelen, ami $0\text{ }^\circ\text{C}$ felett **másképp kezd el viselkedni**, mint alacsonyabb hőmérsékleten. A pontokra illesztett egyenesek meredeksége megadja, hogy **egységnyi hőmérsékletváltozás** hatására mennyi **proton kezd el mozogni** a mintában.

Ezen kívül az olvadási diagram, a fehérjemintákon és az adamantánon mért jelamplitúdók segítségével kiszámoltuk, hogy mennyi az abszorbeált víz kiindulási tömeghez viszonyított aránya a nedvesített mintában. A számolások során azzal a feltételezéssel éltünk, hogy az olvadási diagramon látható mozgékony komponens kizárólag a vízmolekuláktól származik. A kapott paramétert össze tudtuk hasonlítani a tömegmérések során mért értékekkel. Eredményül azt kaptuk, hogy sokkal kevesebb vizet abszorbeált a fehérje a tömegmérés alapján, mint az NMR mérésből kapott a keskeny komponensek alapján. Ebből arra következtethetünk, hogy a keskeny komponens nem csak víz volt, hanem a jelhez más hasonlóan mozgékony molekularészletekben lévő ^1H atomok is hozzájárulnak. Tehát az NMR mérésből történő számolásnál a kiinduló feltételezésünk, miszerint a keskeny komponens csak vízmolekulák jeléből származik, nem igaz.

Továbbá a kiértékelés során vizsgáltuk a mért FID jelekre illesztett függvények paramétereit, a spektrumok alatti területeket, illetve ezek félértékszélességét, a spektrumok második momentumait és az ezekből számolt hidrogén mozgékonyság rendparaméterét. Ezek mind azt mutatták, hogy a szárazabb mintában lévő protonok mozgékonyabbak, vagyis a nedvesebb mintában lévő ^1H -ek kötöttebb állapotban vannak. Ennek oka egyelőre nem ismert, de egy érdekes téma, vizsgálata további méréseket igényel.

További méréseket tervezünk a fentiektől eltérő nedvességtartalmú, hasonló fehérjemintákon. Továbbra is célunk a vízmolekulák mozgékonyságának vizsgálata, illetve egy megfelelő módszer kidolgozása az ^1H NMR mérések segítségével történő roncsolásmentes víztartalom-meghatározáshoz.

Irodalomjegyzék

- [1] K. Tompa, M. Bokor, T. Verebélyi, and P. Tompa. Water rotation barriers on protein molecular surfaces. *Chemical Physics* 448, 15-25, 2015.
- [2] Demeter Á. Az NMR-spektroszkópia alkalmazási lehetőségei a gyógyszertervezésben. *Magyar Tudomány* 11, 1380-1389, 2000 november.
- [3] Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 19 May 2016. The Nobel Prize in Chemistry 2002.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/.
- [4] W. Derbyshire, M. van den Bosch, D. van Dusschoten, W. MacNaughtan, I.A. Farhat, M.A. Hemminga, and J.R. Mitchell. Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solutions. *Journal of Magnetic Resonance* 168, 278 - 283, 2004.
- [5] A. Abragam. *Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford University Press, Oxford, England, 1961.
- [6] <http://mri-q.com/bloch-equations.html>, Letöltve: 2016. május.
- [7] P. S. Belton. NMR studies of hydration in low water content biopolymer systems. *Magn. Reson. Chem.* 49, S127-S132, 2011.
- [8] Tompa K. Molekuláris mozgások fehérjékben. Második rész. Mérföldkövek és jövőkép-vázlatok. *Természet Világa* (2015. augusztus), 356-360, 2015.
- [9] J. W. Hennel and J. Klinowski. Fundamentals of Nuclear Magnetic Resonance. *Longman Scientific & Technical*, 217-220, 1993.
- [10] J. H. Van Vleck. The dipolar broadening of magnetic resonance lines in crystals. *Phys. Rev.* 74, 1168-1183, 1948.
- [11] Tompa K. Molekuláris mozgások fehérjékben. Első rész. Történelem jelenidőben. *Természet Világa* (2015. július), 302-306, 2015.
- [12] K. Tompa, M. Bokor, Kyou-Hoon Han, and P. Tompa. Hydrogen skeleton, mobility and protein architecture. *Intrinsically Disordered Proteins, 1: 82-91, DOI: 10.4161/idp.25767*, 2013.

- [13] K.Tompa, M. Bokor, D. Iván, D. Kovács, T. Verebélyi, and P. Tompa. Hydrogen mobility and protein-water interaction in solid proteins. *To be published*, 2016.
- [14] Sigma-Aldrich. Lysozyme from chicken egg white.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l7651?lang=hu®ion=HU>.
- [15] Nobel Media AB 2014. Web. 12 May 2016. Nobelprize.org. Sir Alexander Fleming - Biographical .
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html.
- [16] *<http://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme>*, Letöltve: 2016. május.
- [17] Karsa A. *^{23}Na and ^{35}Cl NMR of saline solutions*. 2014.