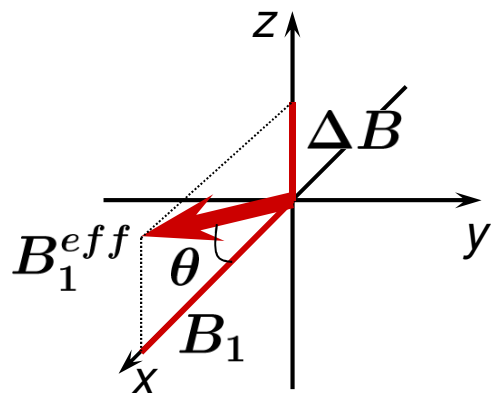


Off-resonance efekty



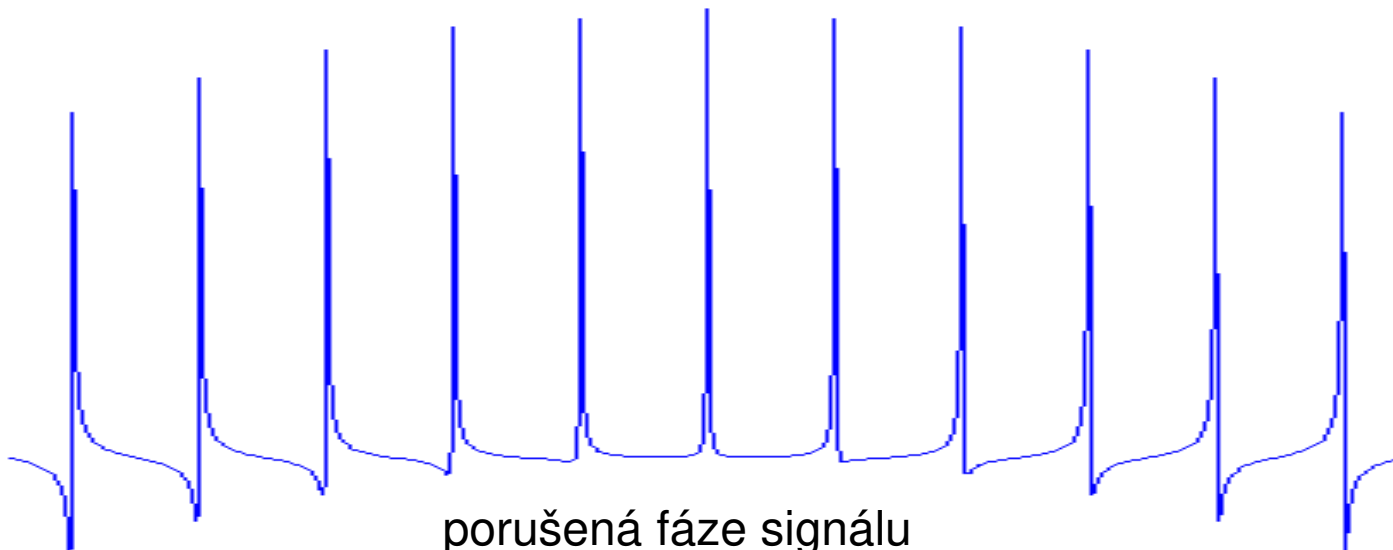
- efektivní rf pole je vychýlené z roviny xy
- úhel vychýlení závisí na offsetu / chem. posunu a na amplitudě pulsu

$$\tan \theta = \frac{\Delta B}{B_1} = \frac{\Delta \Omega}{\omega_1}$$

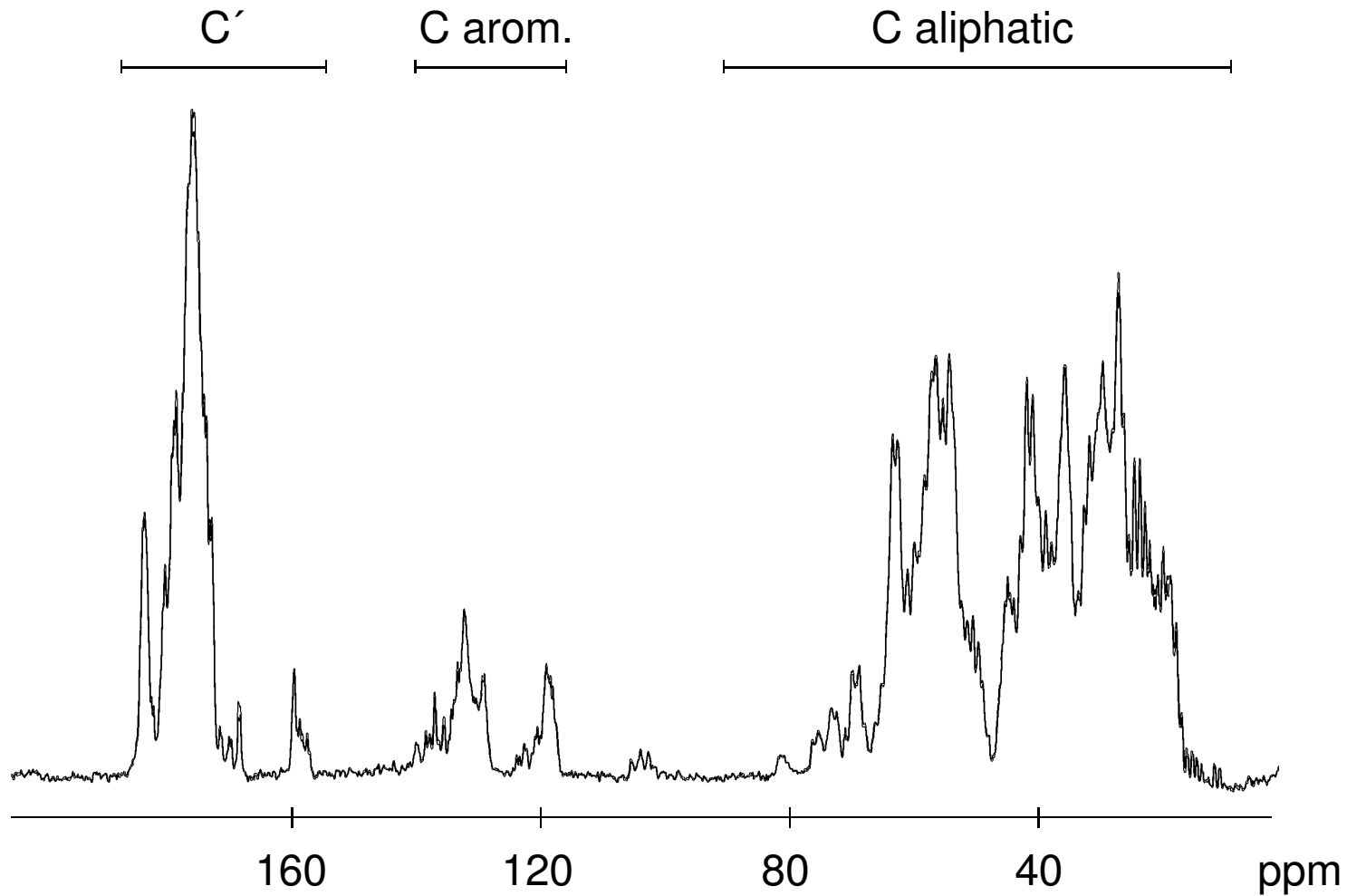
Experiment:

$$\frac{\Delta \Omega}{\omega_1}$$

-1.0 -0.8 -0.6 -0.4 -0.2 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0



Uhlíkové spektrum proteinu



signály karbonylů a alifatických uhlíků dobře separované

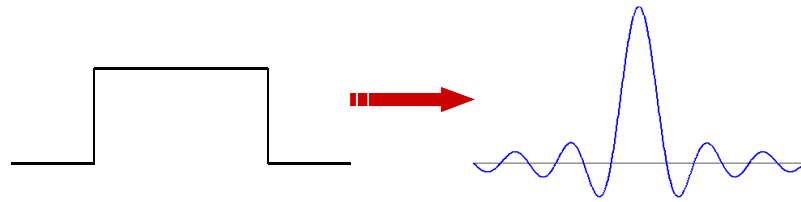


lze s nimi manipulovat odděleně pomocí selektivních pulsů

Selektivní tvarované pulsy

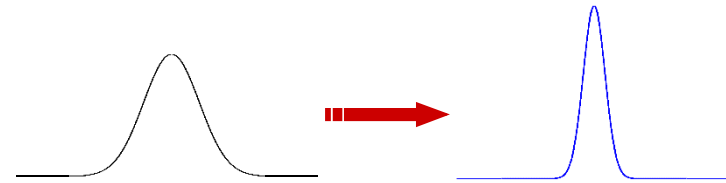
pravoúhlý puls

excitační profil

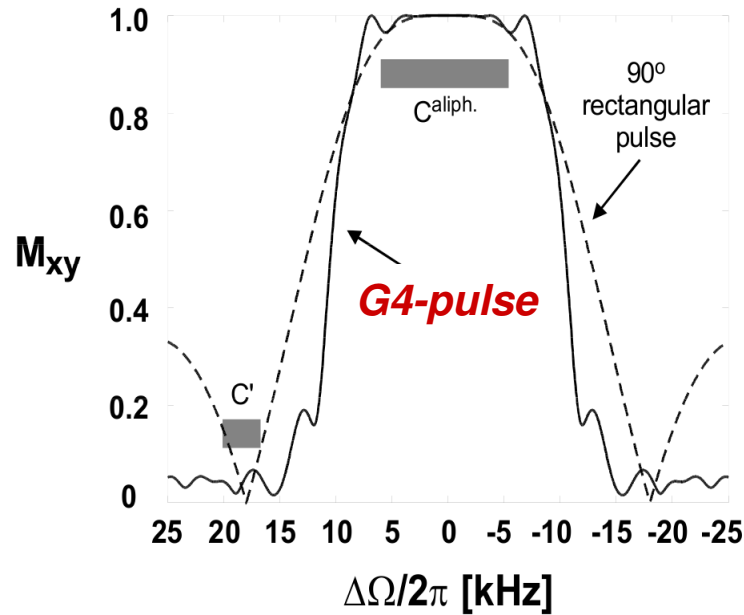


tvarovaný puls

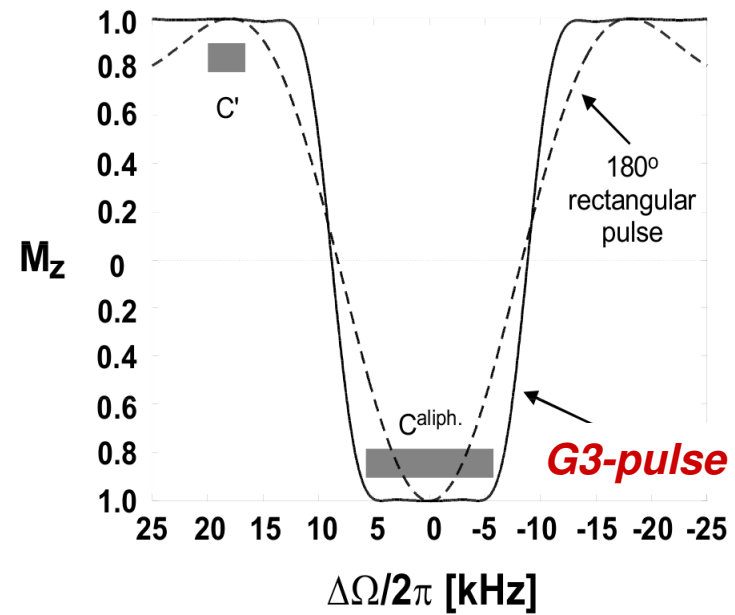
excitační profil



Selective excitation



Selective inversion



Selektivní tvarované pulsy

pulsy optimalizované pro daný účel:

selektivní excitace

Gaussian
(90° / 270°)



E-BURP



G4



Q5



selektivní inverze a refokusace

I-BURP



RE-BURP



G3



Q3



adiabatická inverze

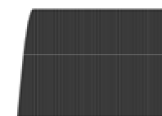
**Hyperbolic
secant**



WURST



CHIRP



References (shaped pulses and band-selective decoupling):

JMR (1991) 93, 93; Chem. Phys. Lett. (1990) 165, 469; JMR (1992) 97, 135;

JMR (1992) 100, 604; JMR (1993) A102, 364; JMR (1995) A115, 273; JMR (1996) A118, 299 .

Potlačení signálu vody

Signál H₂O je 10⁴× až 10⁵ × intenzivnější než odezva proteinu

nelze použít D₂O – chemická výměna amidických vodíků

Problémy

- dynamický rozsah přijímače
- radiační tlumení ⇒ nepřehledná odezva na rf puls

Metody řešení (vybrané)

- presaturace vodíků vody
- spin-lockové nebo gradientní čistící pulsy, WATERGATE
- water-flip-back pulsy

přetrvající problém – potlačení signálů kolem vody (H α)

Potlačení vody - presaturace

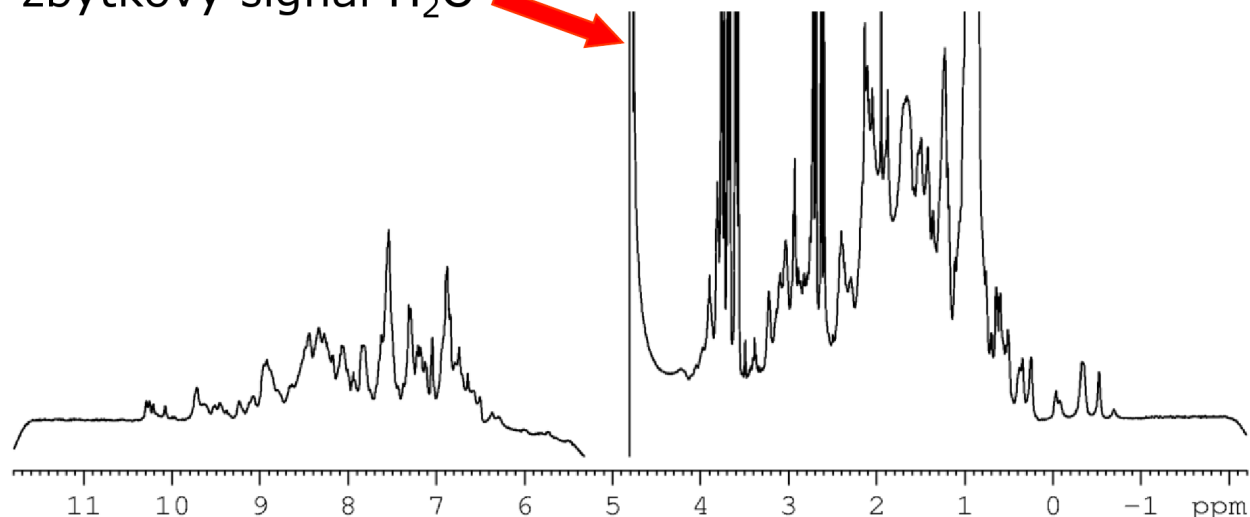


během relaxační doby ozařujeme signál vody slabým rf polem

1-2 s

amplituda 50 Hz

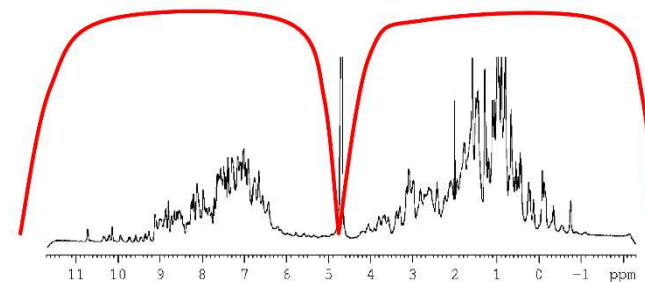
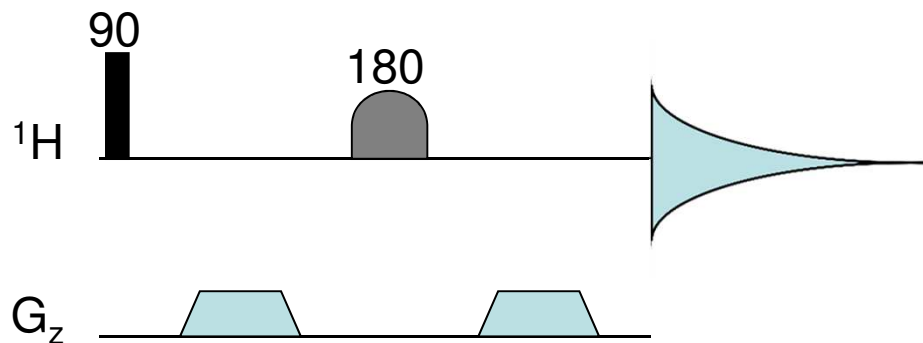
zbytkový signál H₂O



saturation vodíků vody

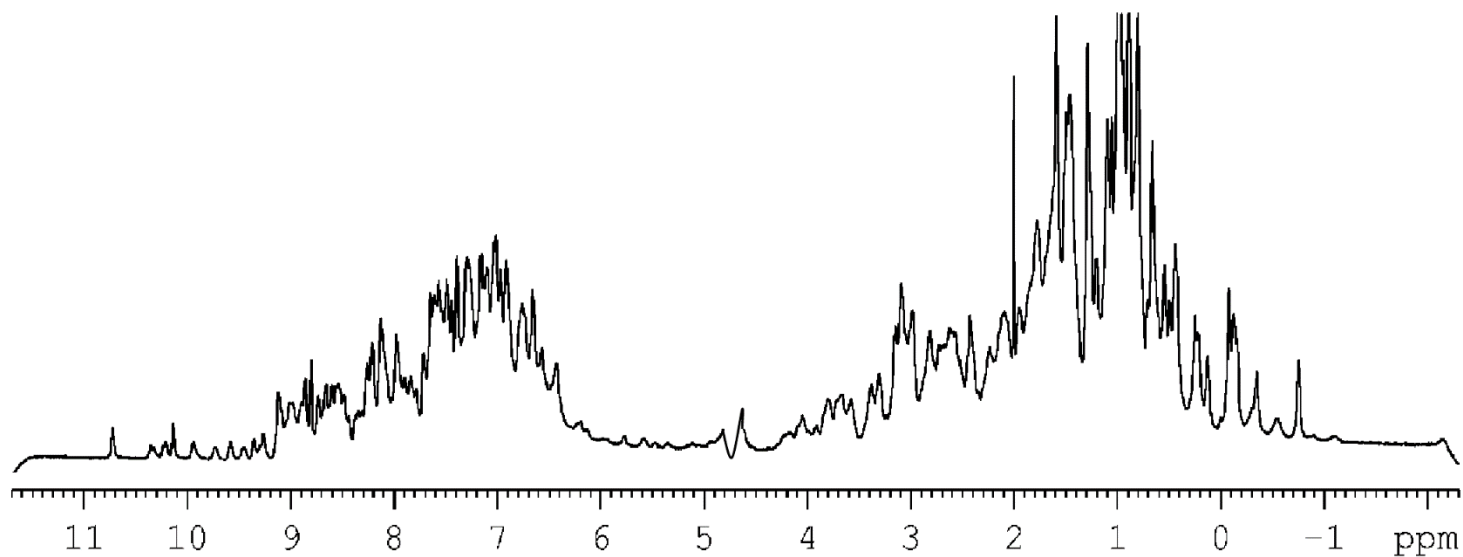
Problém: přenos saturace na amidické vodíky
(pH)

Potlačení vody - WATERGATE



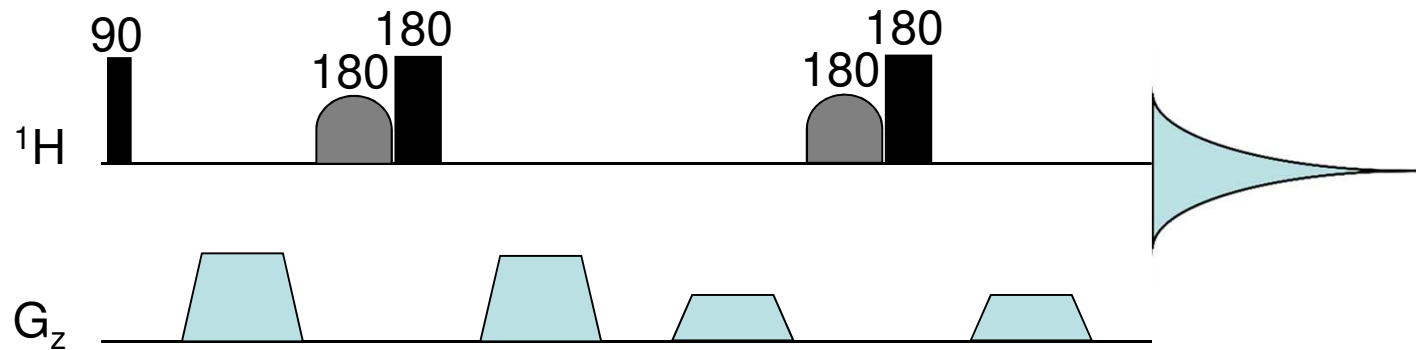
gradientní echo se selektivním 180° pulsem

180° pro vše kromě vody

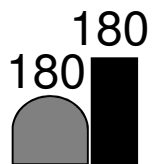


Problém: mohou přetrvávat efekty radiačního tlumení

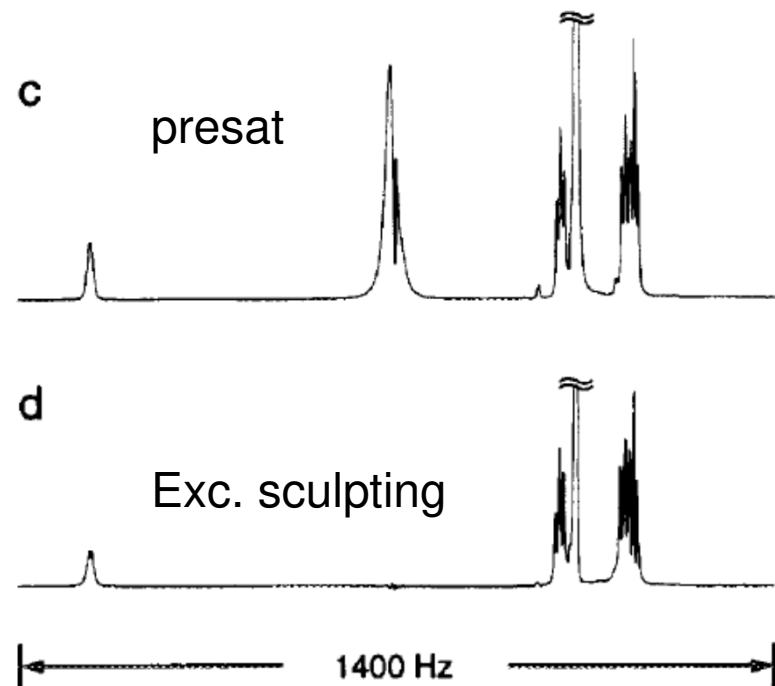
Potlačení vody – Excitation Sculpting



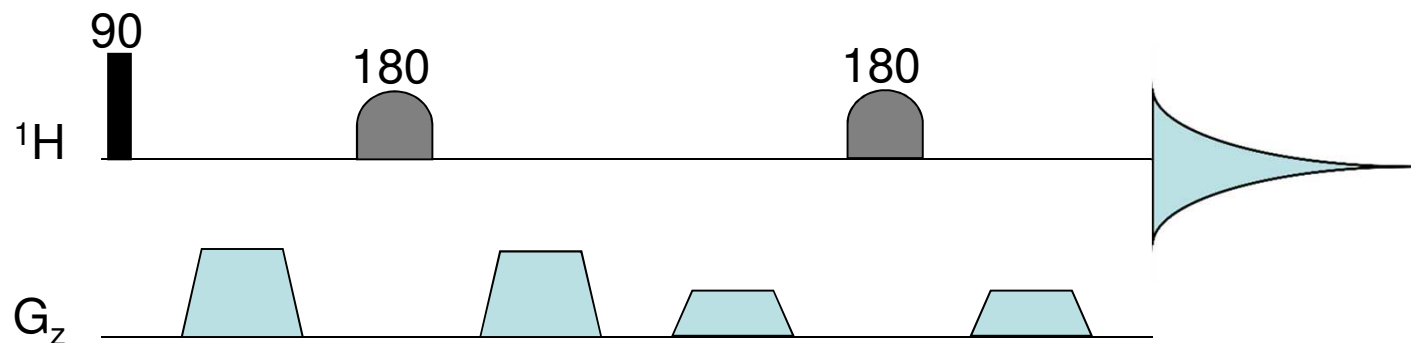
2 gradientní echa
s libovolnou sekvencí



H_2O selektivní
neselektivní



Excitation Sculpting - selektivní excitace

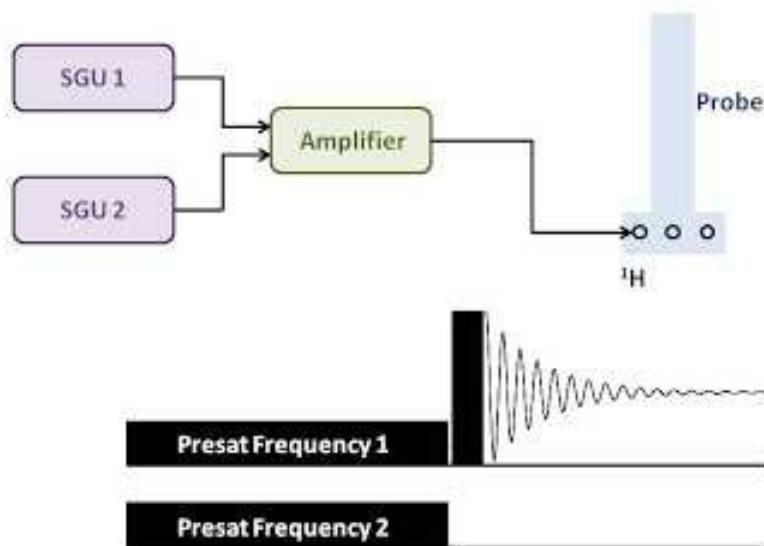


2 gradientní echa
se selektivním pulsem

Potlačení více signálů

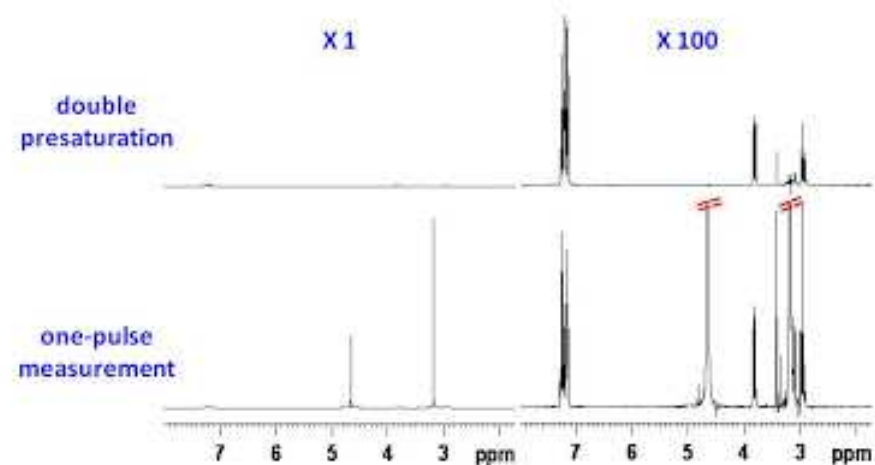
- Multifrekvenční presaturace
- Excitation sculpting

Double Presaturation

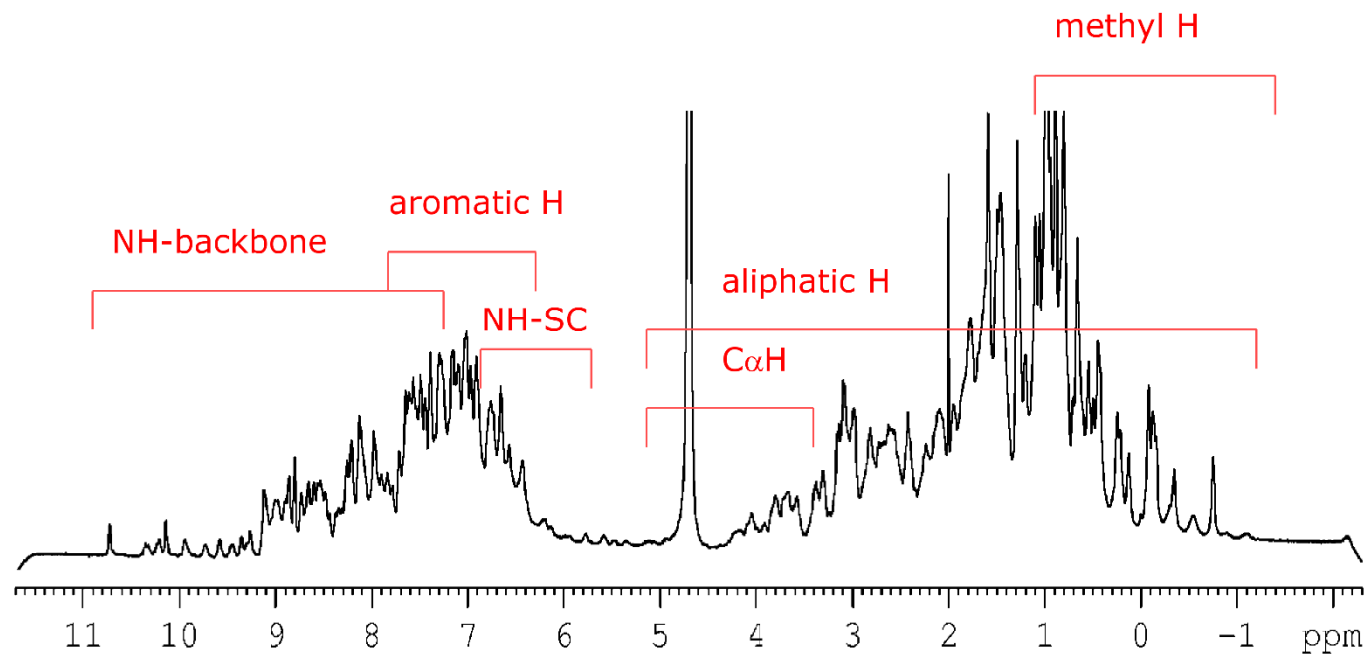


Double Presaturation

300 MHz ^1H NMR Spectra of Phenyl Alanine in D_2O contaminated with methanol



Vícerozměrná NMR spektra

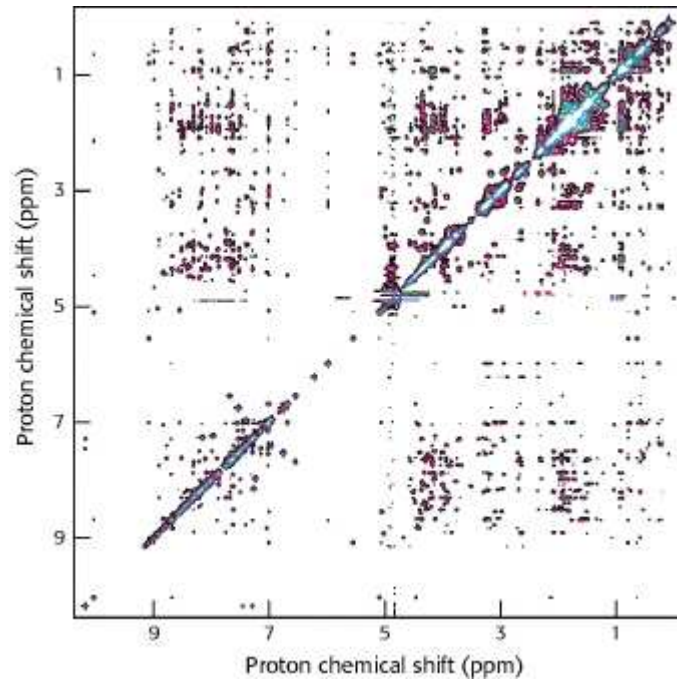


kuřecí lysozym (129 AA, 14.6 kDa)

- zjednodušení spekter „zředěním“ informace do více dimenzí
- zdůraznění/detekce interakcí mezi spiny

Vícerozměrná NMR spektra

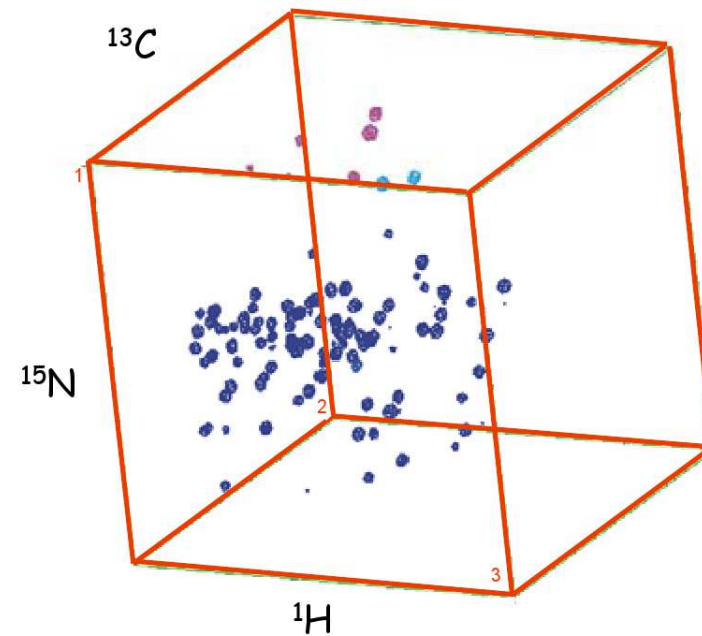
NOESY



blížkost v prostoru

strukturní parametry

HNCA

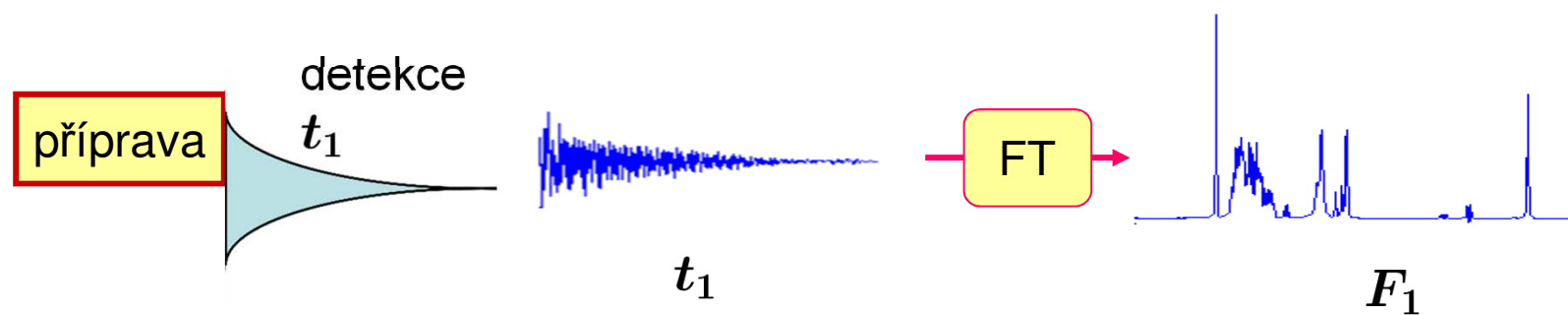


korelace po vazbách

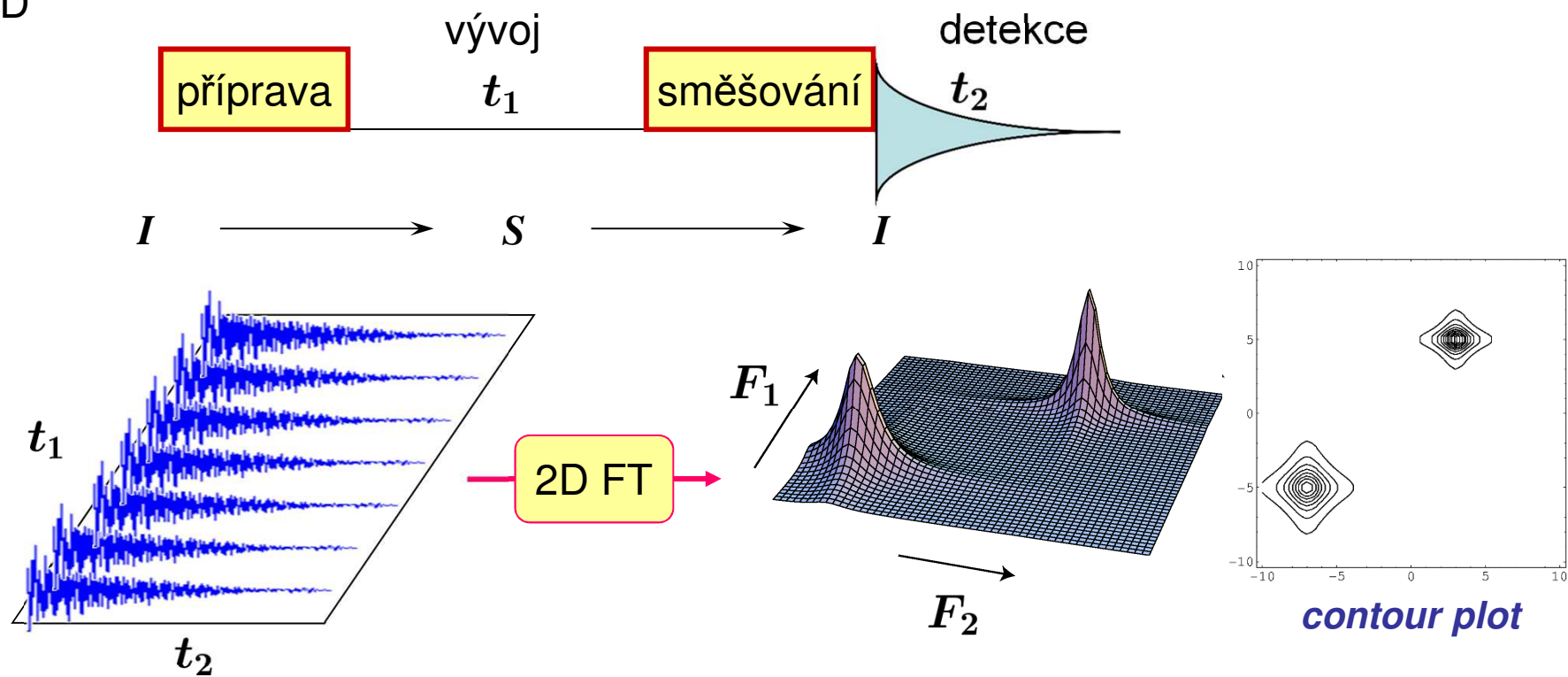
přiřazení signálů

Princip nD NMR

1D

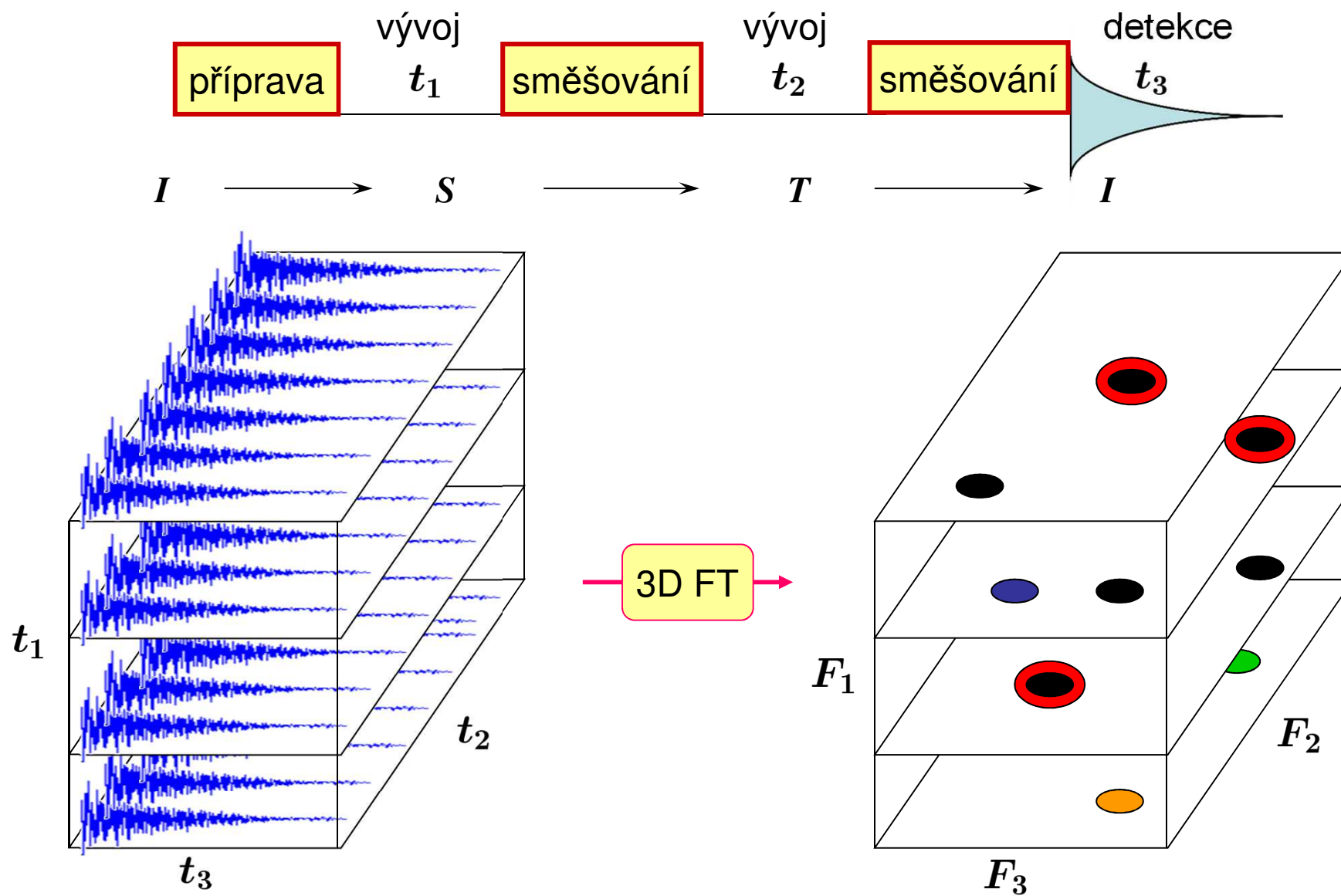


2D



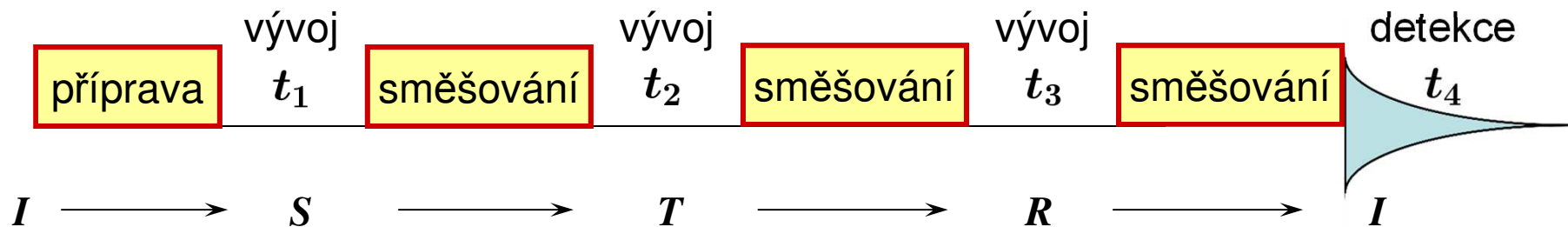
Princip nD NMR

3D

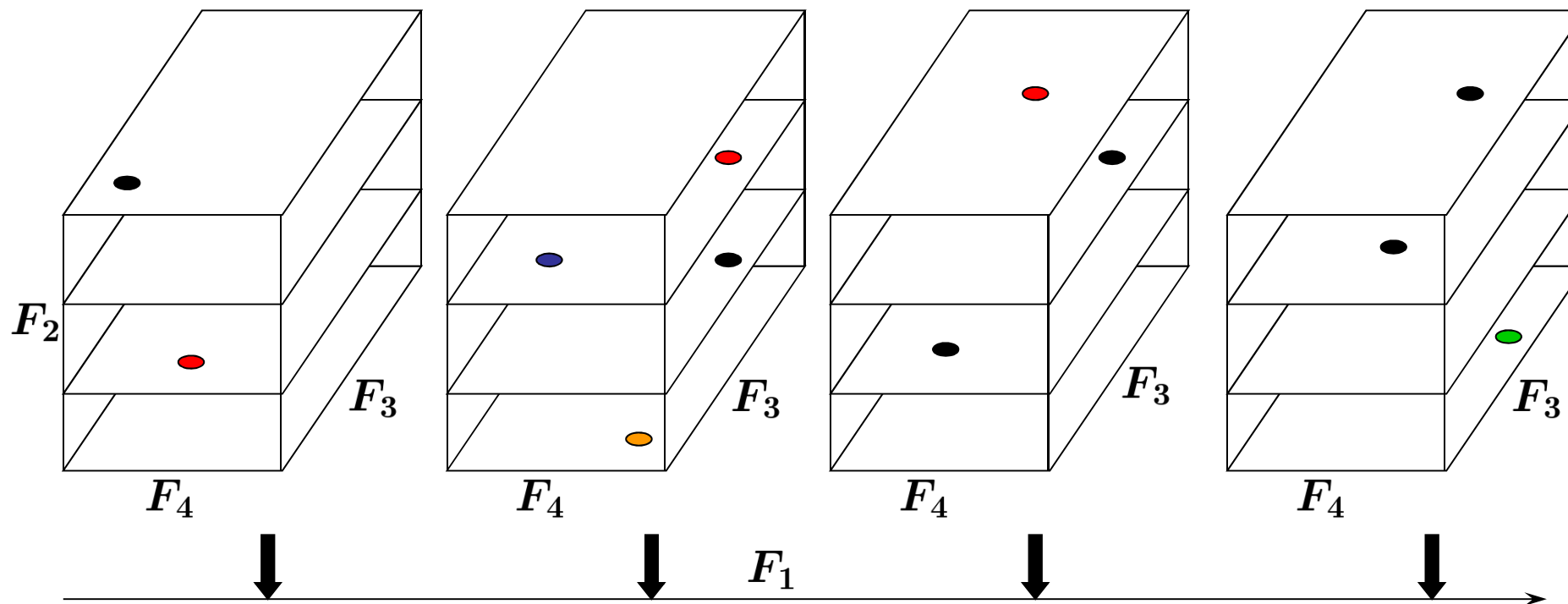


Princip nD NMR

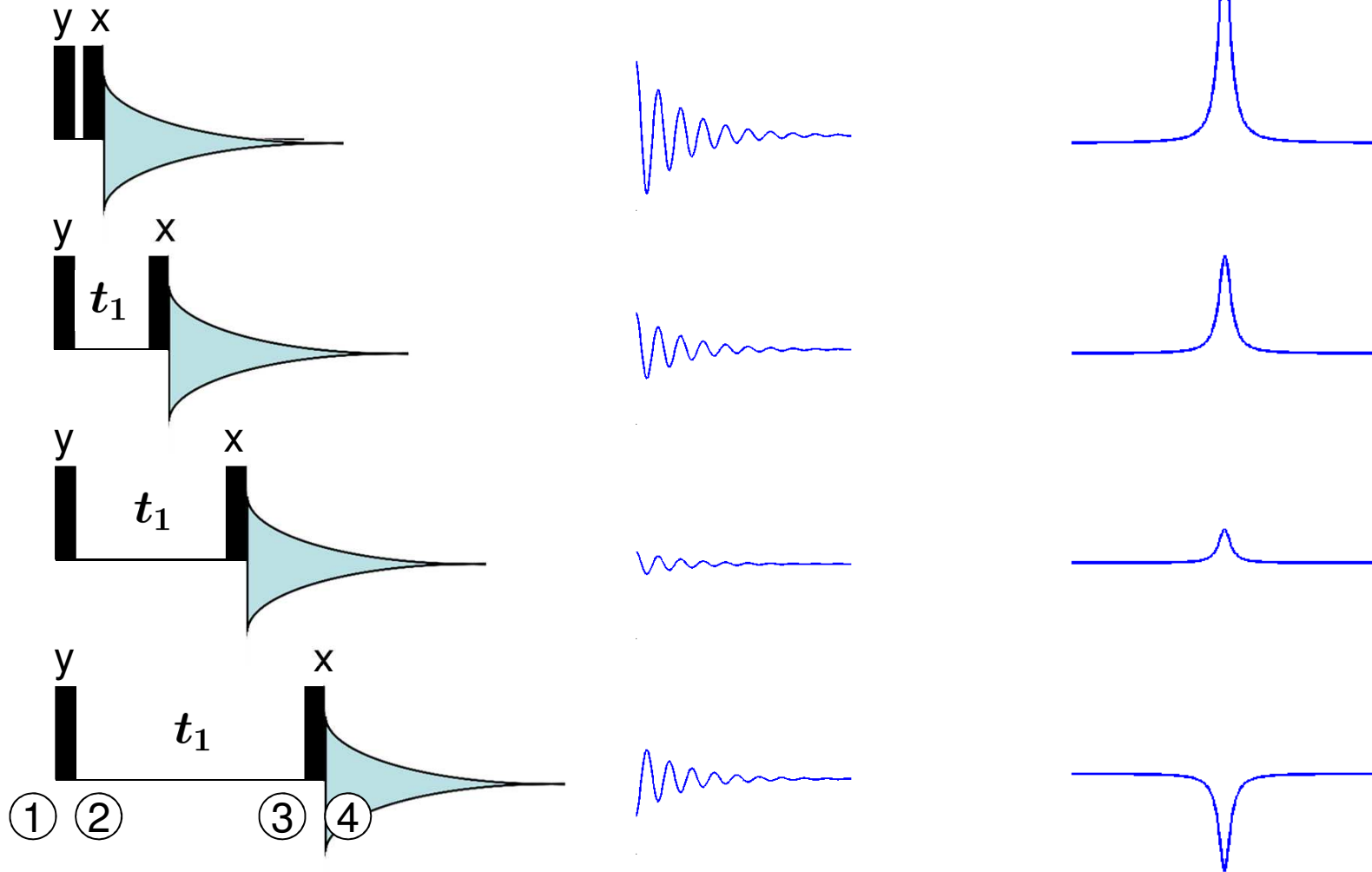
4D



4D FT

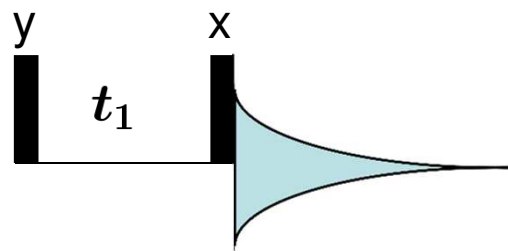


2D COSY experiment

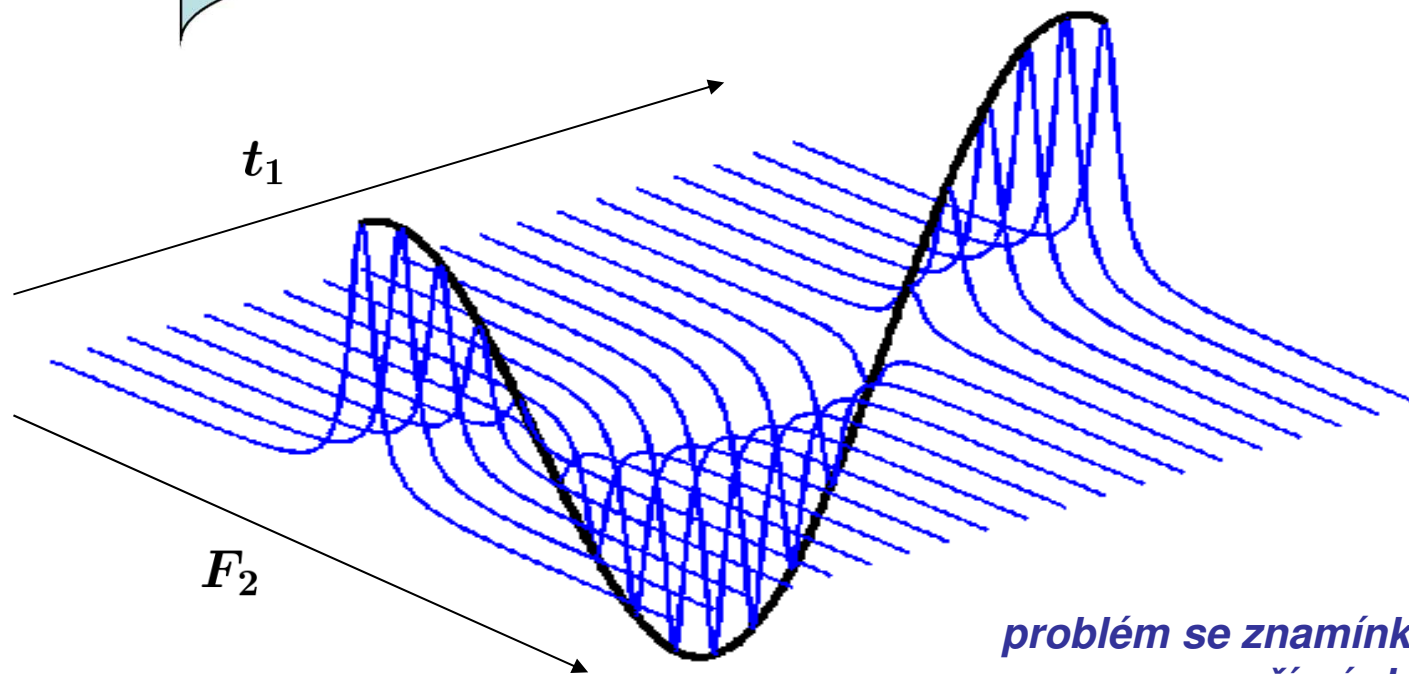


$$\begin{array}{ccccccc}
 I_z & \longrightarrow & I_x & \longrightarrow & I_x \cos \omega_I t_1 + I_y \sin \omega_I t_1 & \longrightarrow & I_x \cos \omega_I t_1 + \cancel{I_z \sin \omega_I t_1} \\
 \textcircled{1} & & \textcircled{2} & & \textcircled{3} & & \textcircled{4}
 \end{array}$$

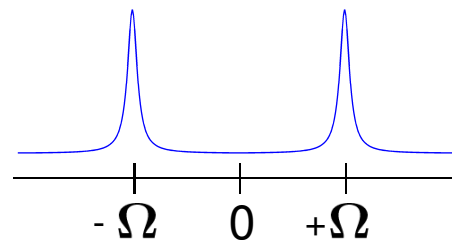
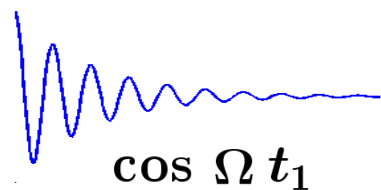
2D COSY experiment



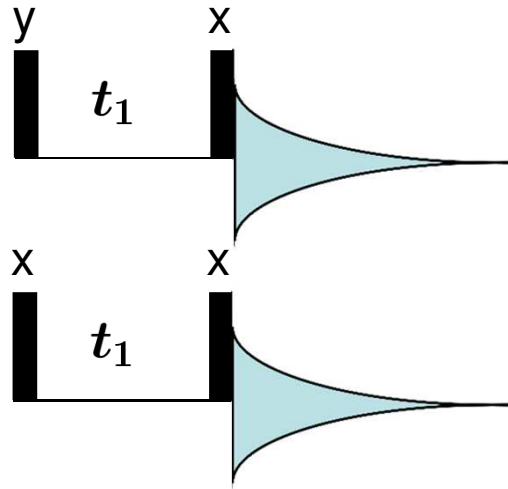
$$I_x \cos \omega_I t_1$$



*problém se znamínkem frekvence
v nepřímé doméně*



Kvadrurní detekce ve 2D



$$\dots \rightarrow I_x \cos \omega_I t_1 + I_z \sin \omega_I t_1$$

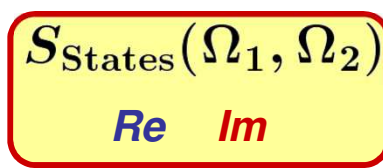
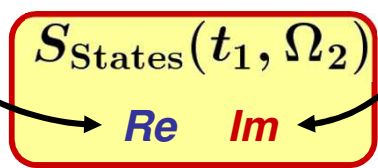
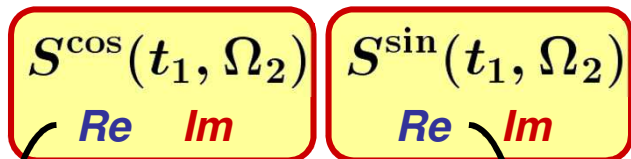
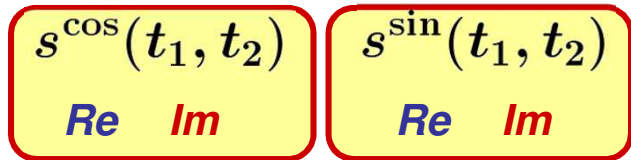
kosínová složka

$$I_z \rightarrow -I_y \rightarrow -I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 \rightarrow$$

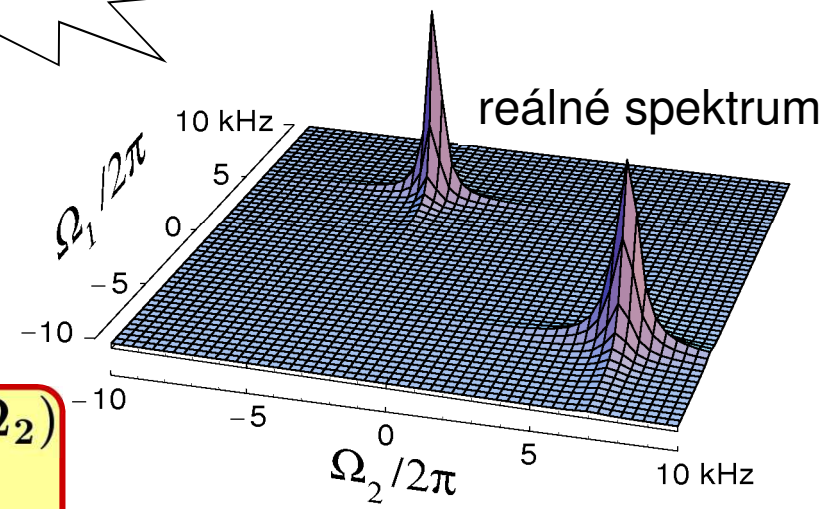
$$\rightarrow -I_z \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1$$

sínová složka

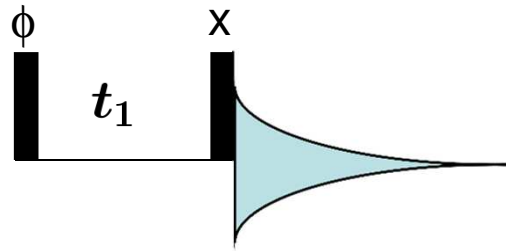
STATEsova procedura



pro jedno t_1
měříme DVA fidy



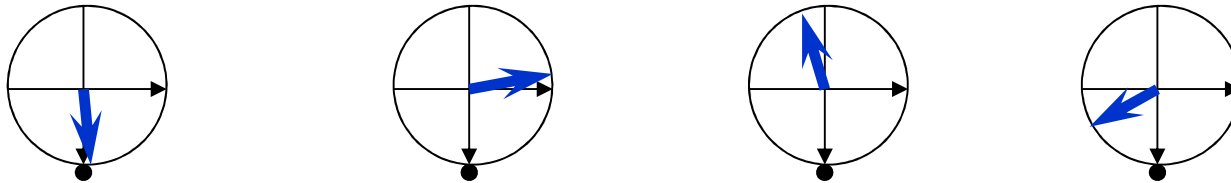
Kvadrurní detekce ve 2D



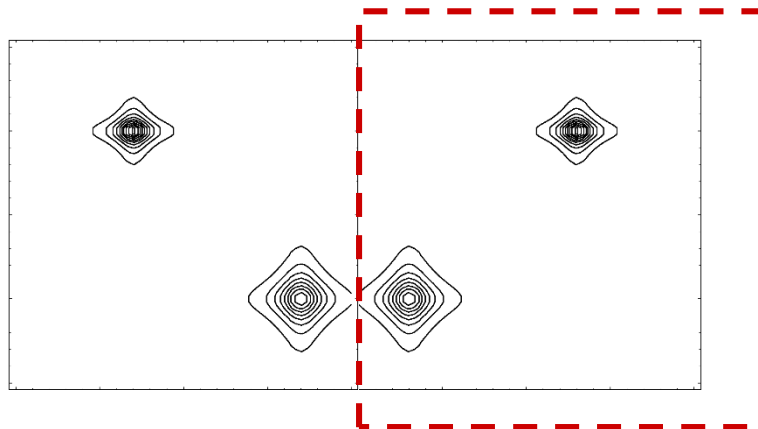
TPPI procedura

$$\phi = y, -x, -y, x$$

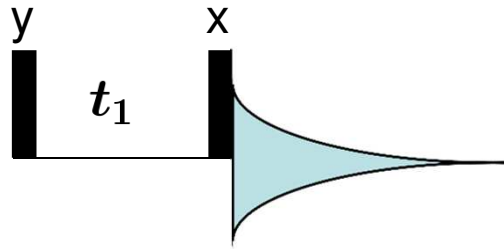
- *nastavit SW na dvojnásobek požadované hodnoty*
- *s každým novým t_1 současně inkrementovat fázi*



- ⇒ frekvence otáčení se efektivně jeví jako zvětšená o 1/2 SW
- ⇒ po jednoduché FT vzít pravou polovinu spektra



COSY



$$I_z \xrightarrow{90_y} I_x \xrightarrow{\text{chem. posuv}} I_x \cos \Omega_I t_1 + I_y \sin \Omega_I t_1 \xrightarrow{J \text{ vazba}}$$

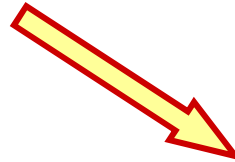
$$I_x \cos \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 + 2I_y S_z \cos \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1 + I_y \sin \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 - 2I_x S_z \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

$\xrightarrow{90_x}$

$$I_x \cos \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 - 2I_z S_y \cos \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1 + I_z \sin \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 + 2I_x S_y \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$



$$I_x \frac{1}{2} [\cos(\Omega_I - \pi J)t_1 + \cos(\Omega_I + \pi J)t_1]$$



$$2I_z S_y \frac{1}{2} [\sin(\Omega_I - \pi J)t_1 - \sin(\Omega_I + \pi J)t_1]$$

F_2 : Ω_I *inphase dublet, disperzní*

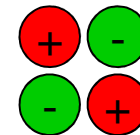
Ω_S *antiphase dublet, absorpční*

F_1 : Ω_I *inphase dublet, disperzní*

Ω_I *antiphase dublet, absorpční*

diagonální pík

krospík



podmínky měření a zpracování dat \Rightarrow ztráta rozlišení ve spektru