T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D_2O ORTAMINA EKLENEN PROTEİN VE ENZİMLERİN KİMYASAL KAYMASININ 400 MHz NMR İLE İNCELENMESİ

Ayşen DELİBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZİK ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2012

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ayşen DELİBAŞ tarafından yapılan "D_2O Ortamına Eklenen Protein ve Enzimlerin Kimyasal Kaymasının 400 MHz NMR ile İncelenmesi." konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Fizik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali YILMAZ

Üye : Doç. Dr. Mahmut TOĞRUL

Üye : Yrd. Doç. Dr. F.Şadan ULAK

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 18/06/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

29/06/2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışma süresince, beni yönlendiren ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Fatma Şadan ULAK ’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Ali YILMAZ ve Arş.Gör.Bilgin ZENGİN ’e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……...…….. I

İÇİNDEKİLER…… II

ÖZET……...…… IV

ABSTRACT…….. V

ÇİZELGE LİSTESİ.…… VI

ŞEKİL LİSTESİ...……VII

1. GİRİŞ……..... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ……..…… 3

2.1. Önceki Çalışmalar……..…… 3

2.2. Manyetik Rezonansın Temel Teorisi..…… 7

2.2.1. Dış Alanda Enerji Seviyeleri……. 7

2.2.2. Magnetik Alanda İzole Edilen Bir Çekirdeğin Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu…….. 9

2.2.3. Bir Spin Sisteminin Soğurduğu Enerji……..... 11

2.2.4. Spin-Örgü Durulma Mekanizması…… 14

2.3. Kimyasal Kaymanın Esas Kuramı……. 17

3. MATERYAL ve METOD……..... 23

3.1. Materyal…… 23

3.2. Örneklerin Hazırlanması…… 23

3.2.1. Sucrose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması……. 23

3.2.2. Pepsin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması…….. 23

3.2.3. Maltose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması……..... 23

3.2.4. BSA İçeren Çözeltilerin Hazırlanması…… 23

3.3. Kimyasal Kaymanın Ölçülmesi……..... 23

3.4. Kimyasal Kaymaların Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi……..... 24

3.5. Çözeltilerden Elde Edilen Pikler…… 24

4. ARAŞTIRMA BULGULARI……..... 29

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..... 63

6. KAYNAKLAR……..... 65

ÖZGEÇMİŞ……..... 69

ÖZET

D_2O ORTAMINA EKLENEN PROTEİN VE ENZİMLERİN KİMYASAL KAYMASININ 400 MHZ NMR İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşen DELİBAŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Protein ve enzim çözeltilerinin NMR T_1 (spin-örgü) ve T_2 (spin-spin) durulma zamanları 1960'lı yıllardan beri incelenmektedir. Durulma mekanizmaları için birçok yaklaşım kullanılmıştır. Kullanılan yaklaşımlardan biri serbest su molekülleri ile bağlı su molekülleri arasındaki kimyasal değiş-tokuş olayı olmaktadır.

Bu çalışmada sucrose, maltose, pepsin ve BSA eklenen D_2O çözeltilerinin kimyasal kaymaları, eklenen madde konsantrasyonuna karşı incelendi. Kimyasal kaymalar, konsantrasyonla düzensiz (bazen artan, bazen azalan) değişmektedir. Bu nedenle kimyasal kaymaların konsantrasyonla etkilendiği sonucuna varılmıştır. Ancak etkilenme lineer olmadığı için, proton kimyasal değiş-tokuşu hızlı değildir.

Anahtar Kelimeler: NMR, T1 ve T2 Durulmaları ve Kimyasal Kayma

ABSTRACT

STUDYING CHEMICAL SHIFT OF WATER IN PROTEIN AND ENZYME SOLUTIONS WITH D_2O BY 400MHZ NMR

MSc THESIS

Ayşen DELİBAŞ

DEPARTMENT OF PHYSICS
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2012

NMR T_1(spin-lattice) and T_2(spin-spin) relaxation times in protein and enzyme solutions have been studied since 1960's. Many approackes have been used for explaining the relaxation mechanisms. One of them is the chemical exchange of protons between free water and water bound te solids.

In this study, chemical shifts of the D_2O solutions, to which sucrose, maltose, pepsin and BSA were added, were studied versus concentration fo added substancer. Chemical shifts of materials were disadaly changed by concentration. They have a negative or positive slope to a certain concentration. Then the slope bicomes suddenly reversed. For this reason. There is no requlary linear dependence on the concentration and in turn There is no fast chemical Exchange between free and bound phoses.

Keywords: NMR, T1 and T2 Relaxations, Chemical shift

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 4.1.	Sucrose için 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4g/ml ve 0,5g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri	30
Çizelge 4.2.	Pepsin için 0,02g/ml, 0,04g/ml, 0,06g/ml, 0,08g/ml ve 0,1g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri	31
Çizelge 4.3.	Maltose için 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4g/ml ve 0,5g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri	32
Çizelge 4.4.	BSA için 0,04g/ml, 0,08g/ml, 0,12g/ml, 0,16g/ml ve 0,2g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri	32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No **Sayfa**

Şekil 2.1. Spini 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki Zeeman yarılması 8

Şekil 2.2. $\vec{\mu}$ Çekirdek magnetik momentinin H_o alanı etrafındaki presesyon hareketi 10

Şekil 2.3. Magnetik rezonansın oluşumu 11

Şekil 2.4. Spin kuantum sayısı $^1/_2$ olan bir sistemin H_o alanın uygulanması durumunda spinlerin yönelimi 12

Şekil 2.5. Spin sistemi ile örgü arasındaki ısısal etkileşme 14

Şekil 2.6. Spin-örgü etkileşmesi ile yeniden oluşan geçişler 15

Şekil 3.1. Sucrose çözeltilerinden elde edilen pikler 25

Şekil 3.2. Pepsin çözeltilerinden elde edilen pikler 26

Şekil 3.3. Maltose çözeltilerinden elde edilen pikler 27

Şekil 3.4. BSA çözeltilerinden elde edilen pikler 28

Şekil 4.1. Sucrose'un 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 33

Şekil 4.2. Sucrose'un 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 33

Şekil 4.3. Sucrose'un 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 34

Şekil 4.4. Sucrose'un 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 34

Şekil 4.5. Sucrose'un 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 35

Şekil 4.6. Sucrose'un 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 35

Şekil 4.7. Sucrose'un 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 36

Şekil 4.8. Sucrose'un 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 36

Şekil 4.9. Sucrose'un 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 37

Şekil 4.10. Sucrose'un10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 37

Şekil 4.11. Sucrose'un 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 38

Şekil 4.12. Sucrose'un 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 38

Şekil 4.13. Sucrose'un 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 39

Şekil 4.14. Sucrose'un 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 39

Şekil 4.15. Sucrose'un 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 40

Şekil 4.16. Sucrose'un 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 40

Şekil 4.17. Sucrose'un 17. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 41

Şekil 4.18. Pepsin'in 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 41

Şekil 4.19. Pepsin'in 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 42

Şekil 4.20. Pepsin'in 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 42

Şekil 4.21. Pepsin'in 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 43

Şekil 4.22. Pepsin'in 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 43

Şekil 4.23. Pepsin'in 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 44

Şekil 4.24. Pepsin'in 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 44

Şekil 4.25. Pepsin'in 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 45

Şekil 4.26. Pepsin'in 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 45

Şekil 4.27. Pepsin'in 10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 46

Şekil 4.28. Pepsin'in 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 46

Şekil 4.29. Pepsin'in 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 47

Şekil 4.30. Pepsin'in 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 47

Şekil 4.31. Pepsin'in 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 48

Şekil 4.32. Pepsin'in 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 48

Şekil 4.33. Pepsin'in 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 49

Şekil 4.34. Maltose'un 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 50

Şekil 4.35. Maltose'un 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 50

Şekil 4.36. Maltose'un 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 51

Şekil 4.37. Maltose'un 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 51

Şekil 4.38. Maltose'un 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 52

Şekil 4.39. Maltose'un 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 52

Şekil 4.40. Maltose'un 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 52

Şekil 4.41. Maltose'un 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 53

Şekil 4.42. Maltose'un 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 53

Şekil 4.43. Maltose'un 10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 54

Şekil 4.44. Maltose'un 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 54

Şekil 4.45. Maltose'un 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 55

Şekil 4.46. Maltose'un 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 55

Şekil 4.47. Maltose'un 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 56

Şekil 4.48. Maltose'un 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 56

Şekil 4.49. Maltose'un 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 57

Şekil 4.50. Maltose'un 17. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 57

Şekil 4.51. Maltose'un 18. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 58

Şekil 4.52. Maltose'un 19. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 58

Şekil 4.53. Maltose'un 20. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 59

Şekil 4.54. Maltose'un 21. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 59

Şekil 4.55. Maltose'un 22. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 60

Şekil 4.56. BSA çözeltisinin 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 61

Şekil 4.57. BSA çözeltisinin 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği 61

ÖZET

D_2O ORTAMINA EKLENEN PROTEİN VE ENZİMLERİN KİMYASAL KAYMASININ 400 MHZ NMR İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşen DELİBAŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Protein ve enzim çözeltilerinin NMR T_1 (spin-örgü) ve T_2 (spin-spin) durulma zamanları 1960'lı yıllardan beri incelenmektedir. Durulma mekanizmaları için birçok yaklaşım kullanılmıştır. Kullanılan yaklaşımlardan biri serbest su molekülleri ile bağlı su molekülleri arasındaki kimyasal değiş-tokuş olayı olmaktadır.

Bu çalışmada sucrose, maltose, pepsin ve BSA eklenen D_2O çözeltilerinin kimyasal kaymaları, eklenen madde konsantrasyonuna karşı incelendi. Kimyasal kaymalar, konsantrasyonla düzensiz (bazen artan, bazen azalan) değişmektedir. Bu nedenle kimyasal kaymaların konsantrasyonla etkilendiği sonucuna varılmıştır. Ancak etkilenme lineer olmadığı için, proton kimyasal değiş-tokuşu hızlı değildir.

Anahtar Kelimeler: NMR, T1 ve T2 Durulmaları ve Kimyasal Kayma

ABSTRACT

STUDYING CHEMICAL SHIFT OF WATER IN PROTEIN AND ENZYME SOLUTIONS WITH D_2O BY 400MHZ NMR

MSc THESIS

Ayşen DELİBAŞ

DEPARTMENT OF PHYSICS
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2012

NMR T_1(spin-lattice) and T_2(spin-spin) relaxation times in protein and enzyme solutions have been studied since 1960's. Many approackes have been used for explaining the relaxation mechanisms. One of them is the chemical exchange of protons between free water and water bound te solids.

In this study, chemical shifts of the D_2O solutions, to which sucrose, maltose, pepsin and BSA were added, were studied versus concentration fo added substancer. Chemical shifts of materials were disadaly changed by concentration. They have a negative or positive slope to a certain concentration. Then the slope bicomes suddenly reversed. For this reason. There is no requlary linear dependence on the concentration and in turn There is no fast chemical Exchange between free and bound phoses.

Keywords: NMR, T1 and T2 Relaxations, Chemical shift

1.GİRİŞ

Nükleer Manyetik Rezonans olayı 1946 yılında Zavoiski tarafından bulunmuştur. Bu olay başlangıçta su, alkol gibi saf maddelere uygulanmıştır. Daha sonraki zamanlarda saf maddelerin içine iyon katılarak incelemeler yapılmıştır (Bloembergen ve ark. 1947, Gurowsky ve Mc Call 1953, Solomon ve Bloembergen 1956, Hackleman ve Hubbord 1963, Pendred ve ark. 1966). 1950'li yılların sonuna doğru ortama protein ve enzimler de eklenmiştir. Protein ve enzimler suda çözündüğü için bu tip deneyler için su ortamı çözücü olarak kullanılmıştır (Gurowsky ve Sanka 1953, Pearson ve ark. 1960). Pür çözeltilerdeki sinyaller, o zamanki spektrometrelerin ayırma gücüne bağlı olarak incelenebilir. Bugün bu tip çözeltilerin sinyallerini daha iyi ayıran spektrometreler geliştirilmiştir. Ancak sulu protein ya da enzim çözeltilerinde, su iki fazda bulunmaktadır: suyun bir kısmı çözücü ortamda serbest fazdadır. Küçük bir kısmı ise proteine bağlıdır (Nolle ve Morgan 1957, Bernheim ve ark. 1959, Danskiewich ve ark. 1963). Gerek o zamanın NMR spektrometreleri, gerekse günümüz NMR spektrometreleri bağlı ve serbest suyun sinyallerini birbirinden ayıramamaktadır.

Bağlı ve serbest suyun sinyalleri birbirinden ayrıştırılmadığı için; suyun bu iki çevre arasında gidiş gelişi için teoriler türetilmiştir. Bu teorilere göre su, tek sinyal alınması durumunda, bu iki çevre arasında hızlıca gidip gelmektedir. Bu nedenle her iki çevredeki suyun kimyasal kaymaları yerine ortalama bir kimyasal kayma geçmekte ve bu ortalama kaymadaki sinyal elde edilmektedir (Hansen 2000, Luo ve ark. 2010). Eğer su bu iki çevre arasında yavaş gidip gelseydi, iki ayrı sinyal elde edecektik ve bu durumda her bir fazın kimyasal kaymasını ve rölaksasyonunu ayrı ayrı bulabilecektik. Bu durum sulu protein çözeltileri için söz konusu değildir.

Protein ya da enzim çözeltilerindeki suyun iki farklı çevre arasında hızlı değiş-tokuş yaptığına, bu nedenle iki kimyasal çevre arasında gidip geldiğine ve ortalama bir kimyasal çevrede bulunduğuna dair bir çok çalışma vardır (Koenig ve Schillinger 1969, Eley ve ark. 1974, Oakes 1975, Grösch ve Noack 1976, Hallenga ve ark. 1976). Bu olgunun teorisi de birçok çalışma ile verilmiştir (Edzes ve Samulski 1978, Fullerton ve ark. 1986, Zimmerman ve Brittin 1957, Hori ve ark. 2002). Ancak bu tip çalışmalar 400 MHz NMR ile yapılmamıştır. Biz protein ve enzim çözeltilerindeki suyun kimyasal kaymasını 400 MHz NMR ile incelenmesini bu nedenle seçtik. Bu amaca ulaşmak için

de sucrose, pepsin, maltose, BSA protein ve enzim çözeltilerindeki suyun T_1 ve T_2 durulma zamanlarının ve sinyallerdeki kimyasal kaymanın protein konsantrasyonlarına bağlı olarak incelemeyi ele aldık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Önceki Çalışmalar

Suda çözünen ovalbüminin T_1 durulma zamanını azalttığını bulmuşlar ve bunun bir kısım bağlı su moleküllerinin ilgi zamanının artışından kaynaklandığını ifade etmişler.

Proton spin –örgü durulma zamanlarını (T_1) , 20 ^{0}Cde , 3,2881 Gauss 'luk magnetik alanda ,Carr-Purcell ve Meiboom spin-eko tekniği ile ölçmüşlerdir. Ölçme sonucunda elde ettikleri sonuçların

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1w}} + KC \qquad (2.1)$$

denklemine uyduğunu göstermişlerdir (Yani ,durulma zamanına karşı konsantrasyonun lineer olarak artığını göstermişler). Hazırlanan ovalbümin çözeltisinde üç tip proton vardır; 1- Serbest suyun protonları. 2- Proteine dönmesiz bağlı suyun protonları . 3- Protein protonları çok kısa sürede rölakse olduklarından gözlenemiyor ve ihmal ediliyor. Sadece ,serbest suyun protonları ve proteine dönmesiz bağlı su protonları kalır. Çözelti içerisinde yer alan serbest suyun protonları ve proteine dönmesiz bağlı su protonları arasında;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} \qquad (2.2)$$

denklemine uyan hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğunu göstermişlerdir. Burada P_a: serbest uyun olasılığı ve P_b ise proteine dönmesiz bağlı suyun olasılığıdır. Ovalbümin ve yumurta akı için 1 gr başına düşen su miktarı ve τ ilgi zamanı değerlerini sırasıyla w = 1,6.10^{-2} , τ =1,03.10^{-8} sn ve w = 1,97.10^{-2} , τ =1,2.10^{-8} sn olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlar (proteine dönmesiz bağlı su miktarı için), Buchanan ve arkadaşları tarafından daha önce bulunan sonuçlarla uyumlu olduğunu görmüşlerdir (Danskiewich ve ark. 1963)

pH, konsantrasyon ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak diamagnetik protein apotransferinin çözeltileri içindeki çözücü protonların magnetik spin-örgü durulma oranı $1/T_1$'in magnetik alana bağlılığının ölçümleri yapılmış ve incelenmiştir. Bu

çalışma da, su moleküllerinin dönmesiz bağlı olması gerekmediğini, protein molekülüne göre sabit geometriye sahip bir eksen etrafında dönmelerinin sınırlanmasının kafi olduğunu belirtmişlerdir. Deney ölçümleri;1000 Oe aşağısındaki magnetik alan verileri için, puls magnetik alan tekniği kullanılarak , 1 kOe ile 12 kOe arasındaki magnetik alan verileri içinde 90° -180° spin- echo puls metodu ile elde etmişlerdir.

Magnetik alan artırılmasıyla birlikte $1 / T_1$ 'in monoton bir şekilde azaldığı görülmüş. Magnetik alan ile $1 / T_1$ 'in değişimi Nükleer magnetik rölaksasyon dağılımı olarak gösterilmiş. Sabit bir r_{pp} mesafesinde etkileşen bir proton çiftinin rölaksasyon oranı:

$$\frac{1}{T_{1pp}} = \frac{3h^2\gamma^4}{10r_{pp}^6}\left[\frac{\tau_c}{1+ w^2\,\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4w^2\,\tau_c}\right] \qquad (2.3)$$

denklemi ile verilir. Burada $w=2\pi\upsilon$, γ = w /H' dir. Bu denklem proteine dönmesiz bağlı su molekülleri için geçerli olduğu varsayılır. Bu durum için ilgi zamanı:

$\tau_c = \frac{4\pi\,\eta_0\,a^3}{3kt} \cong\doteq 2\,.\,10^{-7}$ sn olarak bulunmuştur.

Burada a: protein molekülünün hidrodinamik yarıçapı , η_0 çözücünün viskozitesidir. Proteine dönmesiz bağlı olmayan fakat proteine göre sabit bir eksen etrafında serbest olarak dönecek şekilde bağlı olan bir proton çifti için;

$$\frac{1}{T_{1pp}} = \left[\frac{3Cos^2\propto -1}{2}\right]^2 \left[\frac{1}{T_{1pp}}\right]_{irrot} \qquad (2.4)$$

olarak önerilmiştir.

Teori; Danskiewich ve arkadaşları , Coputa ve arkadaşlarının modelleri için küresel olmayan proteinlerin durumuna genelleştirildi. Bu nedenle bu teori onlarınkinden daha geçerli ve geniştir. Bu teori, kendi kendine protein ile değiş-tokuş yapan protonun durumuna ve dönmesiz bağlı su moleküllerinin durumuna uygulanabilir. Bütün bunlara ilaveten, proteinin yakınında yapışık bir su bölgesinin olduğunu ve hareketi bulk su ile karşılaştırıldığında daha yavaş, proteinlerinkinden ise daha hızlı olduğunu ve moleküllerin τ_c ilgi zamanlarının proteinin takla adımı süresinden hayli kısa olduğunu ileri sürmüşlerdir. Protein etkisinde bulunan çözücü

protonların τ_c ilgi zamanının 3.10^{-12} sn' den 3.10^{-7} sn' ye arttığını görmüşler. Bunun yanında proteine bağlı küçük sayıdaki su moleküllerinin her durumda çözücü protonlarının $1 / T_1'$ ini artırdığını da ifade etmişlerdir(Koenig ve Schilinger 1969).

Sulu bovine albümin çözeltilerinde NMR rölaksasyonu adlı çalışmalarında ,su proton durulma zamanlarını , bovine plazma albüminin sulu çözeltilerinde ve çeşitli maddelerin (NaH_2PO_4, NaC, LiBr ve LiCl) ilvesi ile kimyasal olarak değiştirilmiş bovine serum albüminin değişik formlarında ölçmüşler. Proteinlerin sulu çözeltilerindeki su proton magnetik durulma zamanlarının , temelde protein hidrasyonu ile ilgili bilgiyi sağlayabildiğini ifade etmişlerdir. Blicharska ve arkadaşlarının "suyun durulmasına değiş-tokuş yapmayan protein protonları ile su protonlarının etkileşmesinin yol açtığı" ifadesi desteklenmiştir. Bu çalışmada denature tuzları içeren bovine plazma albüminli çözeltileri rölaksasyon oranlarını ölçtükten sonra , onların spin difüzyon mekanizması ile uyumlu olup olmadığını tartışmışlardır.

Ölçülen proton durulma oranlarını proton konsantrasyonun lineer bir fonksiyonu olarak değiştiğini bulmuşlar ve gözlenen durulma oranlarının da;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^0} + R_i C \qquad (2.5)$$

ifadesiyle verilebileceğini belirtmişlerdir. Burada ,i=1,2 , T_1^0; saf suyun başlangıçtaki durulma zamanı, C; protein konsantrasyonu ve R_i; protein konsantrasyon miktarı ile üretilen rölaksasyon oranı artması (tuzun ilavesiyle ve proteinin kimyasal değişmesiyle tesir edilebilir) dır (Eley ve ark. 1974).

Sulu bovine serum albümin çözeltilerinde su akıcılığının NMR rölaksasyon incelenmesi adlı çalışmada biyolojik sistemlerdeki suyun durumunun ;bulk (serbest) su , dönerek bağlı su , dönmeden bağlı su, düzenli ya da buz gibi olmak üzere ayrı fazlarda bulunabileceğine dair çok sayıda araştırmacının görüşü yer almıştır. Ölçümleri, albüminin hem doğal hem de denature durumu için farklı konsantrasyonlarda, farklı sıcaklıklarda ve pH değerlerinde frekansa bağlı olarak gerçekleştirmişlerdir. Doğal protein çözeltilerinin sıcaklığını 0 °C ile 30 °C arasında sınırlarken denature protein ise , örneği yaklaşık 80 °C de 5 dakika ısıtmak suretiyle elde etmişlerdir. Hesaplanan τ_i ve N_i (τ_i: i. Faz ile ilgili katsayıdır. N_i :birim hacimde bulunan i. Fazdaki protonların sayısı olmak üzere) değerlerinden , proteinin çevresinde tümü serbest , ötelemesi

engellenmiş ve dönerek bağlı su olarak adlandırılan en az üç tip su tabakasının bulunabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çevrelere ait τ ilgi zamanlarını da sırasıyla ; τ_s=10^{-10} sn , $\tau_{öe}$= 10^{-9} ve τ_{db} = 10^{-8} sn olarak bulmuşlardır. Bu tabakalar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğu varsayılarak durulma oranının (a:protein protonları, b:hidrasyonlu su protonları, c: serbest su protonları olmak üzere)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} + \frac{P_c}{T_{1c}} \tag{2.6}$$

şeklinde verilebileceğini ifade etmişlerdir. Dönerek bağlı durumdaki proton mesafesini 1,52 A° ve ötelemece engellenmiş durum için proton mesafesini 1,79 A° olarak almışlardır (Grösch ve Noack 1976).

Biyofiziğin temelini oluşturan çalışmada, dikkate değer MRI farklı aşamaları rapor edilmiş, yüksek alan içinden MRI insan beyninin çalışması, daha fazla nicel görüntü analizi ve daha fazla nabız sıklığının geliştiği görülmüştür. Araştırmanın sonuna doğru; bovine serum albumin (BSA) kullanılarak sudaki hidrojen rezonans sıklığı bir sistem modeli olarak araştırılmıştır. İki farklı mekanizma, bir sudaki hidrojen rezonans sıklığındaki değişimi vurguladığını desteklemiştir. Magnetik alan içinde etki altına alınan değişim proteinlerin toplanması, düşük sıklık bir değişime neden olmuş ve bu olay suyun kimyasal değişimi , çevresel ve belirgin kimyasal arasında değişimi gibi olmuştur. Suyun hacmi ve protein bileşimi, serbestçe değişimin proteinleri üstünde olması yüksek sıcaklıkta değişime neden olmuştur. 37 ^{0}C'de değişim etkilerinin genişliği, yarısı kolay etkilenen etki altındadır(Luo ve ark. 2010).

Bu çalışmada, kimyasal kaymanın izotop etkileri ve proteinlerin içindeki izotopların çözülümü yeniden gözden geçirilip ilgili durum oluşmuştur. İzotop etkilerine neden olan proteinleri meydana getiren etkilerin hareketleri ve ^{13}C ve ^{15}N birleşimi ile H_2O-D_2O karışımının etkileridir. Bu yapısal odaklanmadır. Bu yapıya bağlı olarak izotop etki şöyle olduğu görülmüştür: Paramagnetik proteinlerin içinde Equilibrium izotop etkileri kimyasal kaymaları kısaca tartışılmış, düzenli kullanılan ^{13}C ve ^{15}N belirlenen pk değerleridir. İzotop etkilerinin hesaplamaları gösterir ki her iki geleneksel durum ve yeni tip izotop etkileri paramagnetik proteinlerin içinde gözlemlenmiştir(Hansen 2000).

2.2. Manyetik Rezonansın Temel Teorisi

2.2.1. Dış Alanda Enerji Seviyeleri

Rezonans olayını açıklamak için basit bir kuantum mekaniksel sistem ele alalım. İzole edilmiş tek bir spinin (magnetik momenti $\vec{\mu}$) $\vec{H}$ gibi statik bir magnetik alan ile karşılıklı etkileşmesini düşünelim $\vec{H}$ magnetic alanın uygulamasıyla ortaya çıkan etkileşme enerjisi

$$E= -\vec{\mu} . \vec{H}$$

$$E= -\mu . H_o . \cos\theta \qquad (2.7)$$

ifadesi ile verilir. Bu etkileşmeyi gösteren basit kuantum mekaniksel hamiltonyen operatörü

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu} . \vec{H} \qquad (2.8)$$

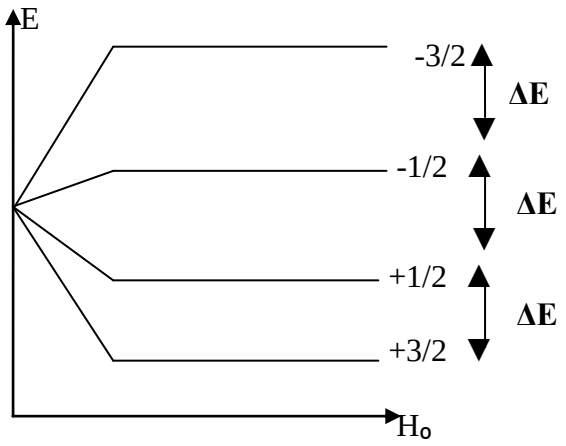
olur. Eğer H alanı z - ve denklem ($\mu = \gamma \hbar I$) denklemi (2.8) de yerine yazılırsa

$$\mathcal{H} = - \gamma \hbar I_z H_o \qquad (2.9)$$

bulunur. Bu hamiltonyen operatörünün öz değerleri, Iz'nin öz değerlerinin ($\gamma \hbar H_o$) katlarıdır. Buradan, sistem için mümkün olan enerji değerleri

$$E= -\gamma \hbar H_o m \qquad (m = I, I - 1,\ldots\ldots, -1) \qquad (2.10)$$

dir. Spini I = 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki enerji düzeyleri şekil 1.1'de görülmektedir. Burada m'nin alacağı değerler 2 I +1, yani dört tanedir. m → + 3/2, +1/2, -1/2, -3/2 bu enerji seviyeleri arasındaki uzaklık ($\gamma \hbar H_o$)'dır ve hepsi eş aralıklıdır.



Şekil 2.1. Spini 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki Zeeman yarılması.

NMR' de uygun frekansta elektromagnetik enerji ile bu enerji düzeyleri arasındaki rezonans geçişleri oluşturulur. Sadece kesikli enerji düzeyleri mümkün olduğundan bu düzeyler arasındaki geçişler $h\upsilon_o$ veya bunun katları kadar kuantum enerjisinin soğurulması veya yayınlanmasına karşı gelir.

Genellikle sadece ardı ardına enerji düzeyleri arasında geçişler olur. Ardı ardına geçişlerle ilgili geçiş kuralı $\Delta m = \pm 1$'dir. Rezonans düzeyleri arasındaki;

$$\Delta E = -\gamma \hbar H_o \qquad (2.11)$$

enerji farkına eşit w_o frekansında radyo frekans ışınlaması yapılarak elde edilir.

Bu durumda;

$$\hbar w_o = \Delta E = -\gamma \hbar H_o \qquad (2.12)$$

Eşitliğinden rezonans şartı;

$$\left| w_o \right| = \gamma H_o \qquad (2.13)$$

elde edilir. Rezonans frekansı ile magnetik alan arasındaki bağıntıyı veren bu eşitlik NMR' ın temel eşitliğidir ve Larmor eşitliği olarak bilinir.

Görüldüğü gibi rezonans şartı sadece ilgili çekirdeğe ve alanın büyüklüğüne bağlıdır. Rezonans şartında, h Planck sabiti yer almadığı için bu sonuç klasik bir rezonans olayı olarak düşünülebilir.

2.2.2. Magnetik Alanda İzole Edilen Bir Çekirdeğin Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu

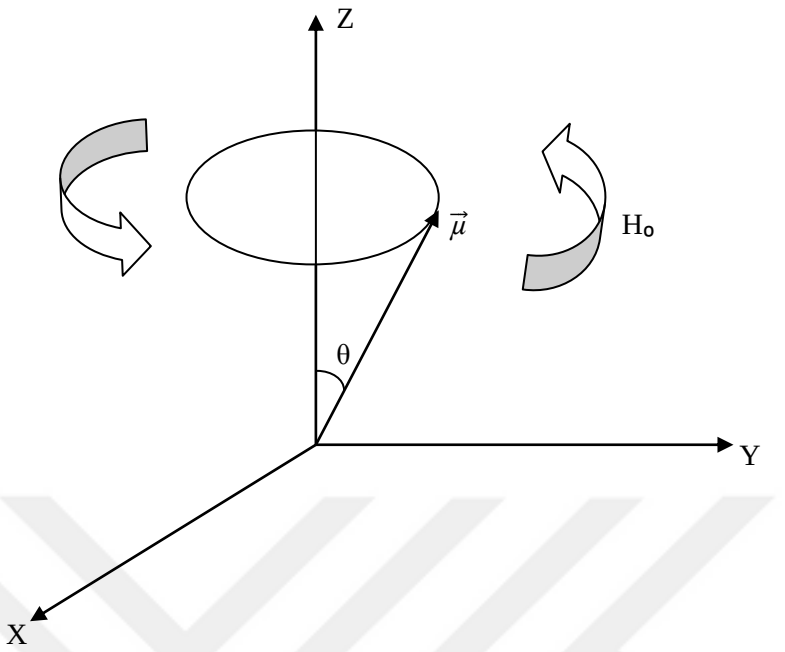
Rezonans olayının fiziksel özelliklerini anlamak için bir $\vec{H}$ magnetik alanındaki $\vec{\mu}$ magnetik momentini düşünelim. Magnetik moment

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{H} \qquad (2.14)$$

ile verilen bir torkun etkisinde kalacaktır. Bu tork, momenti alan doğrultusunda yöneltmeye çalışır. Çekirdeğin spin hareketi ve açısal momentum ile tork arasındaki

$$(d\vec{L} / d t) = \vec{\tau} \qquad (2.15)$$

bağıntısından, sonuçtaki hareket basit bir yönelim değil, ama çekirdek dönme ekseninin uygulanan alan etrafında dönmesi şeklindedir. Şekil 2.2'de görülen bu harekete presesyon denir.

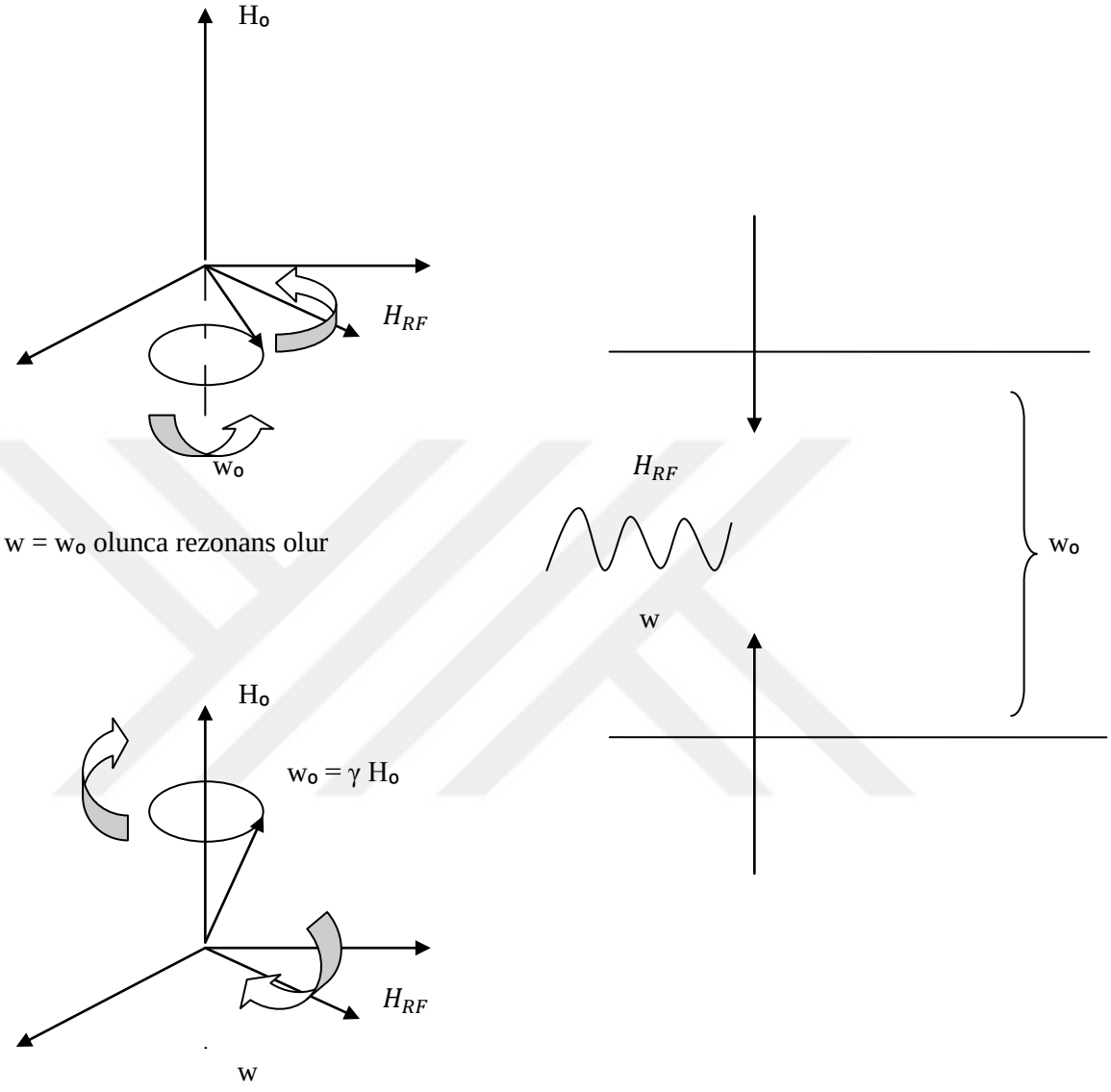


Şekil 2.2. $\overrightarrow{\mu}$ Çekirdek magnetik momentinin H_o alanı etrafındaki presesyon hareketi

Şimdi bir çekirdek spinin H_o'a göre yönelimini değiştirmek için magnetik alan vektörü $\overrightarrow{H}$'ye dik olan bir düzlemde dairesel olarak polarize olmuş bir $\overrightarrow{H_1}$ radyo frekans alanı uygulanır (şekil 2.3). Radyo frekans alanı da magnetik momente

$$\overrightarrow{\tau_{(1)}} = \overrightarrow{\mu} \times \overrightarrow{H_1} \qquad (2.16)$$

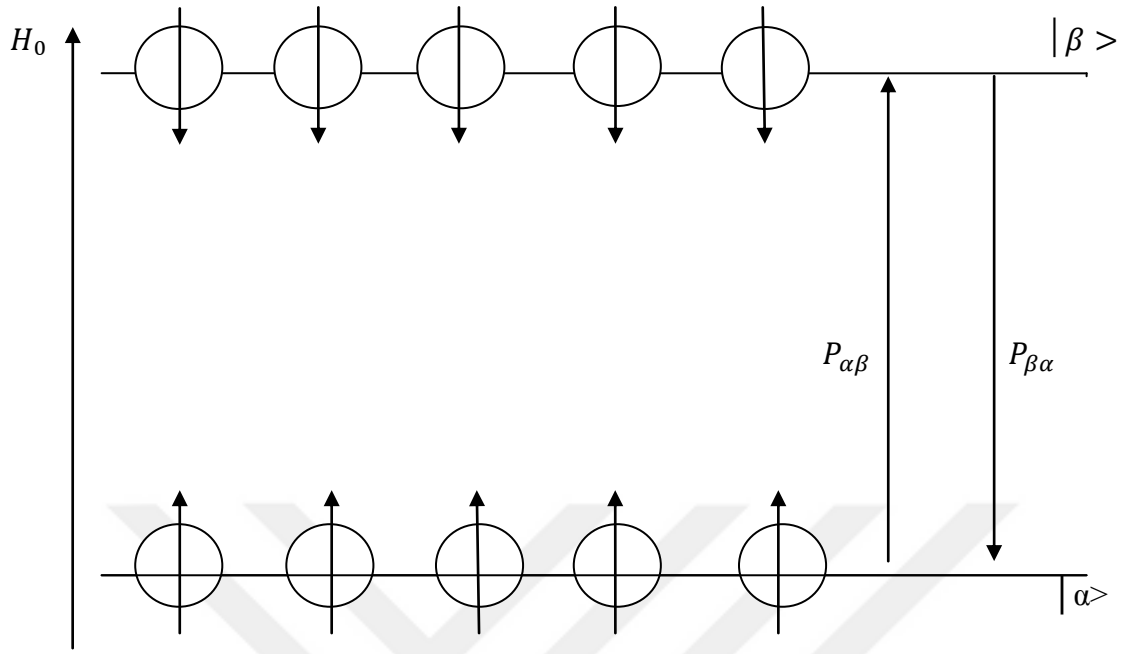
ile verilen bir tork uygulayacaktır. $\overrightarrow{H_1}$ alanı durgun ve şiddeti büyük ise bu alan $\overrightarrow{H}$'e ekleneceğinden net etki yine bileşke alan etrafında presesyon olacaktır. Bununla birlikte eğer $\overrightarrow{H_1}$'in büyüklüğü $\overrightarrow{H}$ 'den çok daha küçük olacak şekilde seçilir ve $\overrightarrow{H}$ etrafında döndürülecek olursa ortaya çıkan tork , $\overrightarrow{H_1}$ alanının spin ile aynı açısal hız ve yönde döndüğü durum hariç ihmal edilebilir olacaktır. Bu durumda , $\overrightarrow{\tau_{(1)}}$ sabit bir değere sahip olduğundan $\overrightarrow{\mu}$ dipolü $w_1 = \gamma H_1 << w_o$ frekansında $\overrightarrow{H_1}$ etrafında presesyon hareketi yapar. $\overrightarrow{H_1}$ 'in sürekli olarak uygulanması ise $\overrightarrow{H}$ ile belirlenen enerji düzeyleri arasında geçişlere neden olur.



Şekil 2.3. Magnetik rezonansın oluşumu

2.2.3. Bir Spin Sisteminin Soğurduğu Enerji

Şimdi, rezonans olayının gözlendiği magnetik sistem ,spin kuantum sayısı ½ olan yalıtılmış bir sistem olsun. Bir sistemde magnetik rezonansı oluşturan spinlerin dışındaki yapıya örgü denir ve katı, sıvı ya da gaz olabilir. Böyle bir sistem üzerinde büyüklüğü H_o olan bir magnetik alan uygulandığı zaman spin sistemi şekil 2.4 'de görülen biçimde bir yönelme gösterir.



Şekil 2.4. Spin kuantum sayısı $^1/_2$ olan bir sistemin H_o alanın uygulanması durumunda spinlerin yönelimi

Magnetik alanla aynı yöndeki yönelme $|\alpha>$ düzeyi ve bu düzeydeki spin sayısı Nα magnetik alanla zıt yöndeki yönelme $|\beta>$ düzeyi ve bu düzeydeki spin sayısı N_β olsun. N_α ve N_β arasındaki ilişki,

$$N_\alpha \ / \ N_\beta = e^{(E\alpha - E_\beta)} \quad kT \qquad (2.17)$$

Boltzmann-maxwell bağıntısı ile belirlenir. Burada Eα ve E_β sırasıyla $|\alpha>$ ve $|\beta>$ düzeylerine karşı gelen enerji değerleri ,T mutlak sıcaklık ve k'da Boltzmann sabitidir. Sistemde ısısal denge kurulduğunda $N_\alpha > N_\beta$ olduğu bir gerçektir. Bu durumdaki spin sistemine, frekansı sistemin doğal frekansı ile uyum içinde olabilecek bir dış etken uygulansın. Bu dış etken $|\alpha>$ ve $|\beta>$ düzeyleri arasında, olasılıkları $P\alpha_\beta$ ve $P_\beta\alpha$ olan, geçişleri oluşturacağı için düzeylerdeki spin topluluğunda bir değişme beklenir.

$$dN_\alpha / dt = N_\beta P_{\beta\alpha} - N_\alpha P_{\alpha\beta} \qquad (2.18)$$

$dN_\beta/dt = N_\alpha \ P_{\alpha\beta} - N_\beta \ P_{\beta\alpha}$ (2.19)

Yani bir dt süresi içinde $|\alpha>$ düzeyindeki spin topluluğunun değişimi, $|\alpha>$ düzeyine gelen spin sayısı ile $|\alpha>$düzeyinden giden spin sayısının farkı kadardır. Magnetic rezonansta (2.18) ve (2.19) eşitlikleri spin değişim denklemleri olarak bilinir.

Spin sistemindeki toplam spin sayısı $N=N_\alpha+N_\beta$ herhangi bir anda düzeyler arasındaki spin farkı $n=N_\alpha-N_\beta$ ve $P_{\alpha\beta}=P_{\beta\alpha}=P$ ise ,denk. (2.18) ya da denk. (2.19) dan elde edilir ve bunun çözümü

$dn/dt = -2Pn$ (2.20)

$n = n_o \ e^{-2Pt}$ (2.21)

olarak bulunur. Burada n_o , t=0 anında iken düzeyler arasındaki spin farkıdır. Geçiş olasılığı P olan bir tek spinin dış etkenden bu geçiş sırasında soğuracağı enerji, düzeyler arasındaki enerji farkı $\Delta E = E_\alpha - E_\beta$ ya bağlı olarak $P\Delta E$ dir. $|\alpha>$ düzeyinde N_α tane spin olduğuna gore bu düzeydeki spinler $P.\Delta E.N_\alpha$ kadar enerji soğurabileceklerdir. Dış etkenden soğrulan enerjinin değişim hızı:

$dE/dt = \Delta E \ N_\alpha \ P_{\alpha\beta} - \Delta E \ N_\beta \ P_{\beta\alpha}$ (2.22)

olacak (2.22) eşitliğini, (2.21) eşitliğini kullanarak

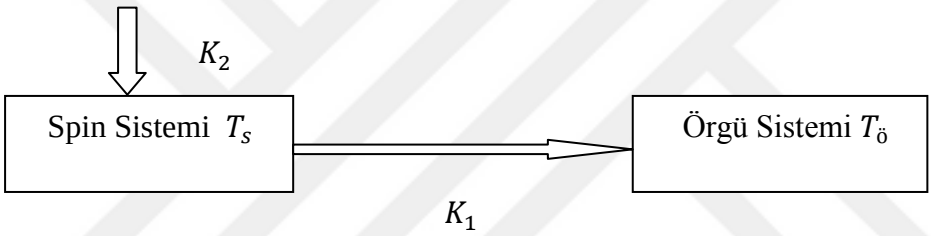
$dE/dt = \Delta E P \ n_o \ e^{-2Pt}$ (2.23)

şeklinde yazılabilir. Bu eşitlik gösteriyor ki, dış etkende soğrulan enerjinin zamana göre değişimi, düzeyler arasındaki spin sayısı farkına bağlıdır ve bu bağlılık üstel azalan bir fonksiyon şeklindedir. Yani başlangıçta düzeyler arasında n_o spin farkı olan yalıtılmış bir spin sisteminde dış etken zamanla bu spin farkını sıfıra götürür. Buna bağlı olarak dış etkenden soğrulan enerji de sıfıra yaklaşır. Belli bir sure sonar spin sistemi dış etkenden enerji soğuramaz duruma gelir, magnetik rezonans durur. Fiziksel olarak örgüden yalıtılmış bir spin sistemi olamayacağı için magnetik rezonansın durma olasılığı spin- örgü etkileşmesi denen başka bir mekanizma ile ortadan kalkar.(Aydın 2000)

2.2.4. Spin-Örgü Durulma Mekanizması

Yalıtılmış spin sistemi dış etkenden enerji soğurduğu zaman spin sisteminin sıcaklığı başlangıçtaki sıcaklığına göre artar. Yani başlangıçta örgü ile ortak bir $T_{ö}$ sıcaklığında olan spin sistemi dış etkenden enerji soğurarak yeni bir T_s sıcaklığına ulaşır. Belli bir süre sonra $T_s >> T_{ö}$ olacağı için düzeyler arasında spin topluluğu farkı sıfıra yaklaşır. Yani magnetik rezonans durur.

Şimdi spin sistemi ile örgü arasında bir ısısal etkileşme olduğunu varsayalım bu durumda spin sisteminden örgü sistemine doğru bir ısı akışı doğar(şekil 2.5) ve spin sistemi enerji kaybeder. Spin sisteminin kaybettiği (örgü sistemine aktardığı)enerji dış etkenin uyguladığı enerji

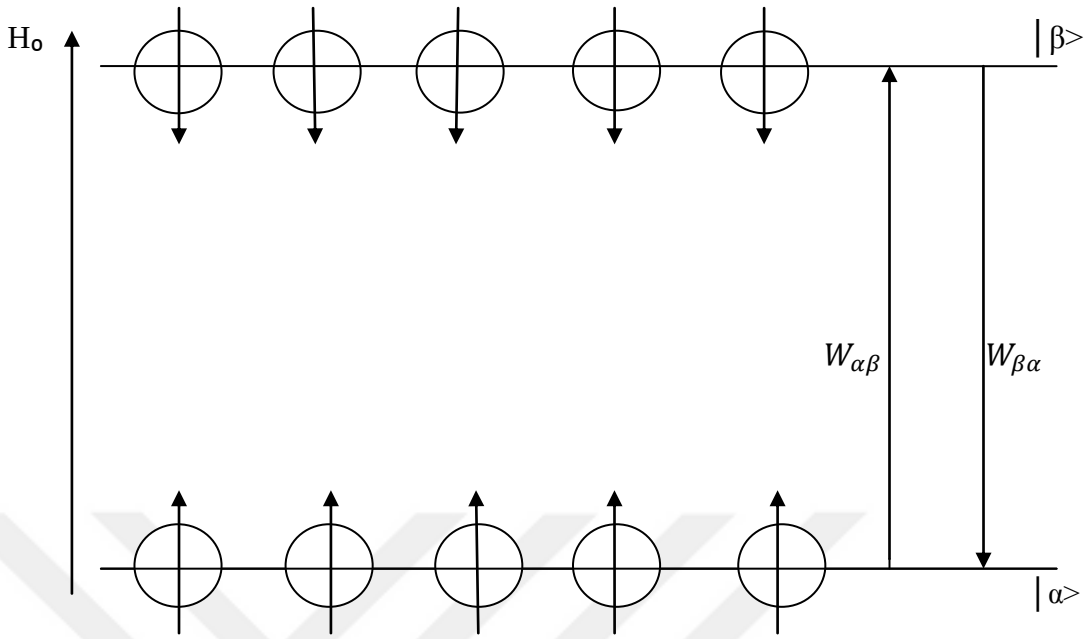


Şekil 2.5. Spin sistemi ile örgü arasındaki ısısal etkileşme

$$dE / dt = K_1 \, k \, (T_s - T_{ö}) \qquad (2.24)$$

ile belirlenir. Burada k Boltzmann sabit ve 1/sn biriminde olan K_1 de ısı akışı sabitidir. K_1' in 1 / sn olması onun 1 / T_1 şeklinde yazılabileceğini gösterir. Böylece elde edilen T_1 ,spin –örgü durulma zamanı olarak tanımlanır ve spin sistemiyle örgü sistemi arasındaki ısı iletişim olayının bir ölçüsüdür.(2.24) eşitliği uyarınca spin sisteminden örgü sistemine ısı akışı $T_s = T_{ö}$ oluncaya değin sürer ve $T_s = T_{ö}$ olunca toplam system ısısal denge durumuna ulaşır.

Sonuç olarak dış etken uygulanmadığı zaman spin- örgü etkileşmesi ile enerji kaybına uğrayan spin sisteminde yeniden geçişler oluşur (şekil.2.5)



Şekil 2.6. Spin-örgü etkileşmesi ile yeniden oluşan geçişler

|α> düzeyinde |β> düzeyine geçiş olasılığı W α_β ve ters yöndeki de $W_\beta\alpha$ ise düzeyler arasındaki spin değişim denklemleri,

$$dN_\alpha / dt = N_\beta W_{\beta\alpha} - N_\alpha W_{\alpha\beta} \quad (2.25)$$

$$dN_\beta / dt = N_\alpha W_{\alpha\beta} - N_\beta W_{\beta\alpha} \quad (2.26)$$

yazılabilir ve $N = N_\alpha + N_\beta$, $n = N_\alpha - N_\beta$ alınarak yeniden yazılır. Burada

$$dn / dt = (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) [N(W_{\beta\alpha} - W_{\alpha\beta}) / (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) - n]$$

$$W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha} = 1/T_1$$

$$n_o = N (W_{\beta\alpha} - W_{\alpha\beta}) / (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha})$$

tanımları yapılırsa:

$$dn / dt = (n_o - n) / T_1 \quad (2.27)$$

ve buradan da

$$n = n_o (1 - e^{t/T_1}) \quad (2.28)$$

bulunur. Burada n_o, ısısal denge durumunda düzeyler arasındaki spin farkıdır. T_1 zaman birimindedir ve toplam sistemin denge durumuna yaklaşması için geçen süredir. O halde magnetik rezonansın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan düzeyler arasındaki spin topluluğu farkı (2.20) ve (2.27) eşitliklerinin toplamları şeklinde olmalıdır:

$$dn / dt = - 2pn + (n_o - n) / T_1 \quad (2.29)$$

Kararlı duruma ulaşıldığında **dn / dt = 0** olacağından düzeyler arasındaki spin farkı:

$$n = n_o / (1+ 2PT_1) \quad (2.30)$$

ve soğurulan enerji değişimi de

$$dE /dt = \Delta E n_o P / (1 + 2P T_1) \quad (2.31)$$

olacaktır. Bu son bağıntı $2PT_1$'in alacağı değere gore farklı sonuçlar doğurur.

1. $2PT_1 << 1$ olsun. Bu durumda denklem (2.30) dan $n \cong n_o$ ve denklem (2.31) den; $dE / dt \cong \Delta E n_o P$ olur.

2. $2PT_1 >> 1$ olsun. Bu durumda da $n \cong n_o /2PT_1$ ve $dE / dt \cong \Delta E n_o / 2T_1$ olur.

Dış etkenden uygulanan enerji ne denli artarsa artsın spin sisteminin soğurduğu enerji artmaz, sabit kalır. Bu duruma magnetik rezonansta doyma durumu denir.

Doyma durumu başka bir şekilde de incelenebilir. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi dış etkenden spin sistemine uygulanan enerji hızı K_2 olsun. K_1' i de spin sisteminden örgü sistemine aktarılan enerji hızı olarak tanımlanmıştı.

$K_2 << K_1 = 1 / T_1$ olduğu sürece spin sistemi enerji fazlalığını kolay bir şekilde örgüye aktarabilir. Bunun sonucu olarak $T_s \cong T_{ö}$ için düzeyler arasında $n \neq 0$ olacak biçimde bir spin topluluğu farkı oluşur. Öte yandan $K_2 = K_1 = 1 / T_1$ ise spin sistemi

enerji fazlalığını örgüye etkin bir şekilde aktaramaz. Bunun sonucu olarak spin sisteminin sıcaklığı başlangıçtaki sıcaklığına göre artar. ($T_s > T_{ö}$) ve düzeyler arasındaki spin topluluğu doyma durumuna gelir. Çok kısa T_1 spin-örgü durulma zamanına sahip olan sistemlerde doyma durumu çabucak gerçekleşir.

T_1 spin-örgü durulma zamanı başka bir yaklaşımla da tanımlanabilir. Magnetik rezonansta spin sistemi aynı anda hem dıştan uygulanan kuvvetli bir H_o magnetik alanı ve hem de dış etken olarak tanımladığımız H_o'a dik düzlem de sistemin doğal frekansına eşit bir frekansta titreşim hareketi yapan $\overrightarrow{H_1}$ alanı etkisinde kalır. Spin sistemi belirli bir süre sonra H_o etrafında bir presesyon hareketi yapar. Eğer H_1 alanı magnetik sistem üzerinden kaldırılırsa magnetik momentler H_o doğrultusuna yaklaşarak presesyon hareketini sürdürürler ve belirli süre sonra tamamen H_o doğrultusunu alırlar. İşte bu süreye spin-örgü durulma yada boyuna durulma adı verilir.

2.3. Kimyasal Kaymanın Esas Kuramı

Kimyasal kaymalar, çekirdeğin elektronla ve elektronun uygulanan H_o magnetik alanı ile aynı zamanda etkileşmeleri sonucu doğar. Genel kuram Ramsey tarafından verilmiştir ama biz hesapları iki kısma ayıran biraz farklı bir inceleme sunacağız. (1) Dış alanın molekülde oluşturduğu elektrik akımlarının belirlenmesi (2) bu akımların çekirdekte oluşturduğu magnetik alanların hesaplanması. Kuramı bir tek elektron için işleyeceğiz. Elektronun Hamiltonyenini gözönüne alarak başlayalım. Magnetik alanları incelemek için iki vektör potansiyeli A_o ve $A_ç$ leri tanımlıyoruz, bunlardan biri magnetik alan H_o'a öteki ise çekirdek yüzünden oluşan $H_ç$'ye karşılık gelen A_o ve A_n cinsinden

$$H_o = \nabla \times A_o$$

$$H_ç = \nabla \times A_ç \qquad (2.32)$$

alanlarına sahibiz. İyi bilindiği üzere verilen alanı doğuracak birden fazla vektör potansiyeli vardır. Yani

$H = \nabla \times A$ ise yeni bir vektör potansiyeli $A' = A + \nabla \phi$ (burada ϕ herhangi bir skaler fonksiyondur) aynı alanı verecektir, çünkü herhangi bir fonksiyonun gradiyentinin

rotasyoneli sıfırdır. A' dan A''ya dönüşüm, bir ayar dönüşümü diye adlandırılır. Herhangi bir hesaplamada fiziksel sonucun, ayar seçiminden bağımsız olduğundan emin olmalıyız yani fiziksel sonuçlar ayarla değişmez. Magnetik alanın etkisi Schrödinger denklemine h/i ∇ yerine (h/i) $\nabla - (q/c)$ A koymakla elde edilir, burada q parçacığın yüküdür (q, parçacığın yükünün işaretine bağlı olarak, pozitif veya negatiftir).

Buna göre Hamiltonyen

$$\mathcal{H} = -\frac{1}{2m}\left(p - \frac{q}{c}A\right)^2 + V \qquad (2.33)$$

olur, burada p ≡ (h/i) ∇ dır. Eğer farklı bir ayar A′ = A + $\nabla\phi$ (r) kullanılırsa yeni çözüm ψ', eski çözüm ψ ye bir üniter dönüşümle bağlıdır:

$$\psi' = \psi_e + (iq/hc)\,\phi(r) \qquad (2.34)$$

Eğer (h/i) ∇' nin beklenen değerleri olan (ψ; (h/i) $\nabla\ \psi$) ve (ψ'; (h/i) $\nabla\ \psi'$) yi karşılaştırırsak eşit olmadıklarını görürüz. Bundan ötürü herhangi fiziksel gözlenebilirin ayar seçiminden bağımsız olması gereği, (h/i) ∇' nın mv momentum operatörü olmayacağını gösteriyor. mv için operatör ayarla değişmeyen
(h/i) $\nabla -$ v(q/c) A dır. Yani

$$(\psi', \left[\frac{h}{i}\nabla - \frac{q}{c}A\right]\psi') = (\psi, \left[\frac{h}{i}\nabla - \frac{q}{c}A\right]\psi) \qquad (2.35)$$

dir. Aynı şekilde açısal momentum operatörü r x mv

$$r \times \left(\frac{h}{i}\nabla - \frac{q}{c}A\right)$$

dir. mv ve p $\left(=\frac{h}{i}\nabla\right)$ arasındaki fark klasik mekanikte bulunmuştur. Bu yüzden Lagranjyen L cinsinden kanonik momentum p_x , in tanımı $\partial L/\partial\dot{x}$ dir. Oysaki Lineer

momentumun x bileşeni $m\dot{x}$'dir. Bir magnetik alan olduğunda $p_x = m\dot{x} + [(q/c)\mathrm{A_x}]$ bulunur.

Bizim için büyük önemi olacak bir nicelik akım yoğunluğu j(r) dediğimiz niceliktir ve aşağıdaki gibi

$$\mathrm{j(r)} = \frac{q}{2m}\frac{h}{i}\left[\psi^*\nabla\psi - \psi\nabla\psi^*\right] - \frac{q^2}{mc}A\,\psi^*\psi \qquad (2.36)$$

tanımlanır. j(r)'nin bir vektör fonksiyonu olduğunu ve gerçel olduğunu söyleyelim (yani sanal kısmı sıfırdır). Onu, kuantum mekaniksel olasılık akımı ile q'nün çarpımı olarak anlıyoruz. Önce ψ ve A yı, sonra ψ' ve A′ yü kullanarak yapılan açık inceleme, j(r)'nin ayarla değişmediğini gösterir. Bundan başka ψ'nin zamana bağlı Schrödinger denkleminin bir çözümü olduğunu varsayarsak

$$\mathrm{p} = \mathrm{q}\,\psi^*\psi \text{ olmak üzere } \mathrm{divj(r)} + \frac{\partial p}{\partial t} = 0 \qquad (2.37)$$

olduğu gösterilebilir. Yani j klasik süreklilik denklemini sağlıyor. Duraklı durumlar için $\psi^*\psi$ zamandan bağımsızdır ve divj = 0 dır. j daha çok klasik akım yoğunluğu gibi davranır. Kısaca göreceğimiz gibi böyle bir açıklama kimyasal kaymaları incelemek için çok yararlıdır.

Öyleyse iki magnetik alanın etkisinde olan elektronumuzun Hamiltonyeni

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2m}\left(p - \frac{q}{c}A_o - \frac{q}{c}A_{ç}\right)^2 + V \qquad (2.38)$$

dir, burada V açısal momentumu yok eden alanlar da dahil bütün potansiyel enerjiyi temsil ediyor. Şimdi

$$\pi = p - \frac{q}{c}A_o \qquad (2.39a)$$

eşitliğiyle bir π niceliği tanımlamak uygundur. p ve A_o Hemityen operatörler olduklarından π de Hermitiktir. O zaman Denk. (2.39)

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2m}\,\pi^2 - \frac{q}{2mc}\left(\pi.A_{ç} + A_{ç}.\pi\right) + \frac{q^2}{2mc^2}A^2{}_{ç} + V \qquad (2.39b)$$

olur. $A_{ç}$'yi

$$A_{ç} = \frac{\mu\, x\, r}{r^3} \qquad (2.40)$$

olarak seçeceğiz, burada μ çekirdek momentidir, çünkü $A_ç$ vektör potansiyeli bir dipolün alanını doğurur. μ elektron momentleri ile karşılaştırıldığında küçük olduğundan onu bir açılım değişkeni olarak kullanabilmeyi umuyor ve bunun sonucu olarak da $A_ç$ lineer terimi ile karşılaştırıldığında $A^2{}_ç$ terimini bırakıyoruz. O zaman

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2m}\,\pi^2 + V - \frac{q}{2mc}\left(\pi.A_{ç} + A_{ç}.\pi\right) \qquad (2.41)$$

elde ederiz. Çekirdek etkileşimi yoksa $(1/2m)\,\pi^2 + V$ durgun bir alan içindeki elektronun Hamiltonyenidir. Birinci mertebeden pertürbasyon kullanarak enerji hesaplarken $A_ç$'yi ihtiva eden terimi pertürbasyon olarak inceleyeceğiz.

V potansiyeli ve H_o durgun alanı etkisinde bir elektron probleminin tam çözüm dalga fonksiyonu ψ olan bir durumun enerjisinde birinci mertebeden değişikliği inceleyelim. Enerjinin pertürbasyonu E_{pert}

$$E_{pert} = -\frac{q}{2mc}\int \psi^*\left(\pi.A_{ç} + A_{ç}.\pi\right)\psi\, d\tau \qquad (2.42)$$

dir ve burada integral elektronun koordinatları cinsindendir. (Aslında $A_ç$, operatör olarak düşünülmesi gereken μ'nün bir fonksiyonudur. Öyleyse çekirdeksel spinle ilgilenildiği sürece E_{pert} bir operatör olacaktır. Onu çekirdek spin Hamiltonyenine ekliyoruz.)

π'nin Hermityen operatör olması olgusundan Denk.(2.42)'i yeniden, basitçe

$$E_{pert} = -\frac{q}{2mc}\int A_{ç}.\left[(\pi\,\psi)^*\psi + \psi^*\pi\,\psi\,\right] d\tau \qquad (2.43)$$

olarak yazarız. Fakat π'nin Denk.(2.39)'le verilen tanımını ve Denk.(2.36)'deki akım yoğunluğunu kullanarak

$$\frac{q}{2m}\,[\psi(\pi\,\psi)^{*}+\,\psi^{*}\pi\,\psi]=\frac{q}{2m}\,\frac{h}{i}\,[\psi^{*}\nabla\,\psi-\,\psi\,\nabla\,\psi^{*}]-\frac{q^{2}}{mc}\,A_{o}\,\psi^{*}\psi$$
$$=\mathrm{J_o(r)} \qquad (2.44)$$

yazabiliriz, J_o (r) durgun alan varken akan akım yoğunluğudur. Yani J_o , V ve H_o etkisinde bir elektron için hesaplanan akım yoğunluğudur (fakat çekirdek için değil). Bundan ötürü

$$\mathrm{E}_{pert}=-\,\frac{1}{c}\int A_{ç}.\,\mathrm{J_o(r)}\,d\tau \qquad (2.45)$$

dir. Ayrıca belirtmek istersek bu formül bize δA değişiminden önceki j(r) akımı cinsinden vektör potansiyelinde δA değişimine eşlik eden alandaki değişme sonucu enerjideki δE değişikliğinin genel ifadesini veriyor:

$$\delta E=-\,\frac{1}{c}\int \delta A\,.\,\mathrm{j(r)}\;\,d\tau \qquad (2.46)$$

Eğer şimdi

$$A_{ç}=\frac{\mu\;x\;r}{r^{3}} \qquad (2.47)$$

koyarsak

$$\mathrm{E}_{pert}=-\,\frac{1}{c}\int\frac{\mu\;x\;r}{r^{3}}\;\;\mathrm{J_o(r)}\,d\tau$$
$$=-\,\mu\,.\left[\frac{1}{\mathrm{c}}\int\frac{\mathrm{r\;x\;j_o(r)}}{\mathrm{r^{3}}}\;\;d\tau\right]$$
$$=-\,\mu\,.\,\mathcal{H}\;\;\text{(magnetik alan)} \qquad (2.48)$$

elde ederiz. Burada, önceden söylediğimiz gibi μ gerçekten γhl operatörüdür fakat j_o(r) basit olarak konumun bir vektör fonksiyonudur. j_o(r)'nin , durgun alanın vektör potansiyeli A_o' dan bağımsız olduğunu akılda tutmak önemlidir. Denk(2.48) şekil

olarak bir μ magnetik momentinin bir $j_o(r)$ akım yoğunluğu ile klasik etkileşmesine özdeştir, çünkü köşeli parantezler içindeki nicelik akım yüzünden oluşan H alanıdır.

Bu, elektronların M magnetik momenti ifadesine çok büyük bir benzerlik gösterir:

$$M = \frac{1}{2c} \int r \times j_o(r) \quad d\tau \tag{2.49}$$

Denklem (2.48) kimyasal kayma olgusunu içeriyor. Eğer $j_o(r)$'yi bilseydik çekirdekte oluşan magnetik alanı hesaplayabilirdik. Aslında kimyasal kaymalar kuramının iki kısmı olduğunu görebiliriz: (1) akım yoğunluğu j(r) nin bulunması (2) $j_o(r)$ bilindiğinde Denk. (2.48) ile verilen integralin hesaplanması. Son kısım tamamen klasiktir ve çoklu kutuplar açılımı gibi hallerde karşılaşılır. Öyleyse göz önüne alınan çekirdekten uzakta bir atom üzerine akımların etkisi çoğu zaman yaklaşık olarak bir magnetik iki kutuplu momenti gibi düşünülür.

Genel olarak $j_o(r)$ akımı durgun H_o alanının varlığı yüzünden aktığından ilk ilkelerden $j_o(r)$ nin tayini, bir elektrostatik ve bir durgun alan etkisinde kalan bir elektronun kuantum mekaniksel probleminin çözümünü içerir. Öte yandan bazı hallerde $j_o(r)$ nin uzaysal şekli tahmin edilebilir ve büyüklüğünü tayin etmek için de ölçülen magnetik alınganlık kullanılabilir. Bu yöntem halkadaki deneysel (veya kuramsal) magnetik momentlerle uyuşma veren benzen gibi çeşitli halka bileşiklerde protonların kimyasal kaymalarını açıklamak için kullanılmıştır. Bunun karşıtı olarak problem ters çevrilebilir ve ölçülen kimyasal kaymalar atomların, moleküllerin veya bağların magnetik alınganlıkları üzerine bilgi edinmek için kullanılabilir. Bundan başka yakındaki akımlar özellikle küçük olmadıkça Denk.(2.48)deki integralde bulunan $1/r^3$ çarpanından ötürü kimyasal kaymaların yakın çevredeki akımlara duyarlı olduğunu görebiliriz. Örneğin, flor atomları ile karşılaştırıldığında protonların kimyasal kaymalarının küçük olmasını, protonlara yakın akımların flora nazaran çok küçük olmasının sonucu olduğunu kısaca göreceğiz. Denk (2.48) ve (2.49) kimyasal kayma veya alınganlık deneyini dış alan tarafından molekülde indüklenen akımlar hakkında ne ölçtüğünü kısaca anlatıyor.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan proteinler, enzimler ve deuterium oxide (D2O) çözücüsü Sigma' dan satın alındı. Bozulmayı önlemek için, bu materyaller ölçme anları dışında buzdolabında tutuldu.

3.2. Örneklerin Hazırlanması

3.2.1.Sucrose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D2O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan sucrose enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, kimyasal kaymanın ölçümünde kullanıldı.

3.2.2.Pepsin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D2O çözücüsüne, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g, 0.10g miktarlarında tartılan pepsin enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, kimyasal kaymanın ölçümünde kullanıldı.

3.2.3.Maltose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D2O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan maltose enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, kimyasal kaymanın ölçümünde kullanıldı.

3.2.4.BSA İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D2O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan BSA proteini eklenerek değişik konsantrasyonlarda protein çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, kimyasal kaymanın ölçümünde kullanıldı.

3.3. Kimyasal Kaymanın Ölçülmesi

1ml saf D2O çözücüsü ortamında, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler 5mm çaplı NMR tüplerine konulmuştur. Sucrose ,Pepsin, BSA, Maltose çözeltilerinin kimyasal kaymaları 400 MHz AVANCE BRUKER NMR

spektrometresiyle yapılmıştır. Kimyasal kaymalar; kursör, her bir pik için en tepeye konularak ölçüldü.

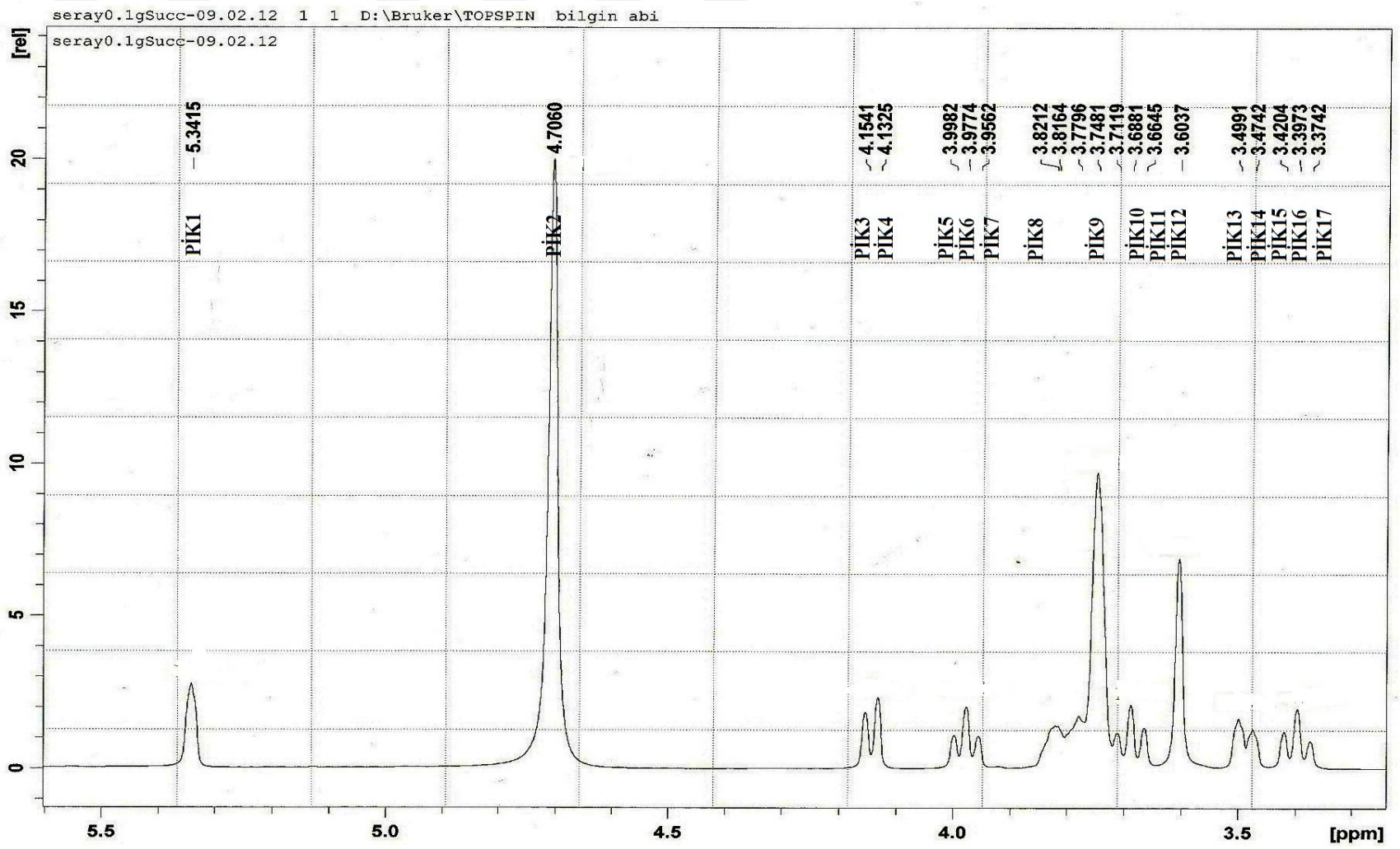
3.4. Kimyasal Kaymaların Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi

Bütün çözeltilerin kimyasal kaymaları 298 K için ölçüldü. Bu sıcaklık değeri Bruker 400MHz NMR spektrometresinin otomatik sıcaklık kontrol sistemi ile sağlandı.

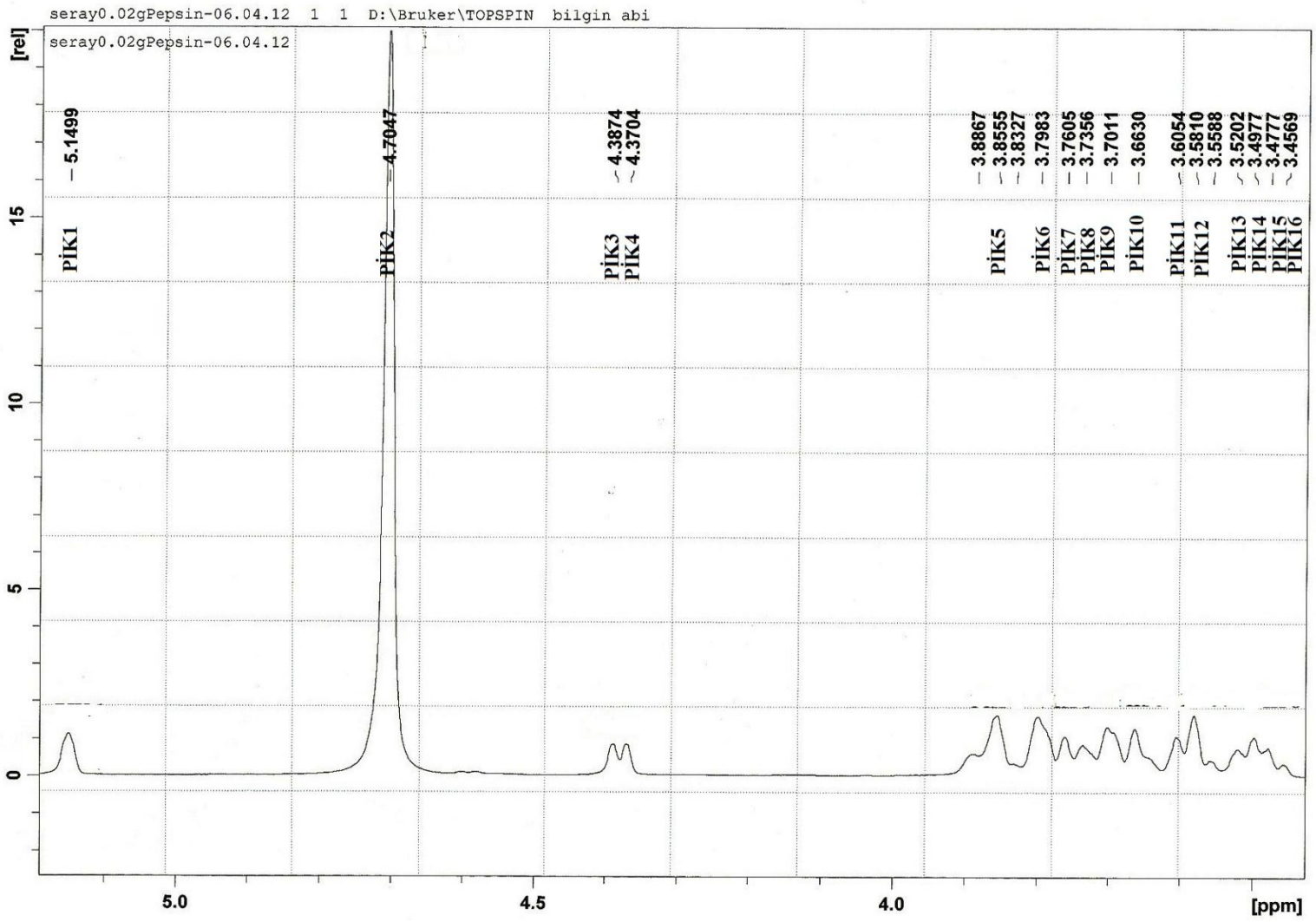
3.5. Çözeltilerden Elde Edilen Pikler

Sucrose, pepsin, maltose ve BSA çözeltilerinden elde edilen pikler sırası ile şekil 3.1.-3.4.'de verilmiştir.

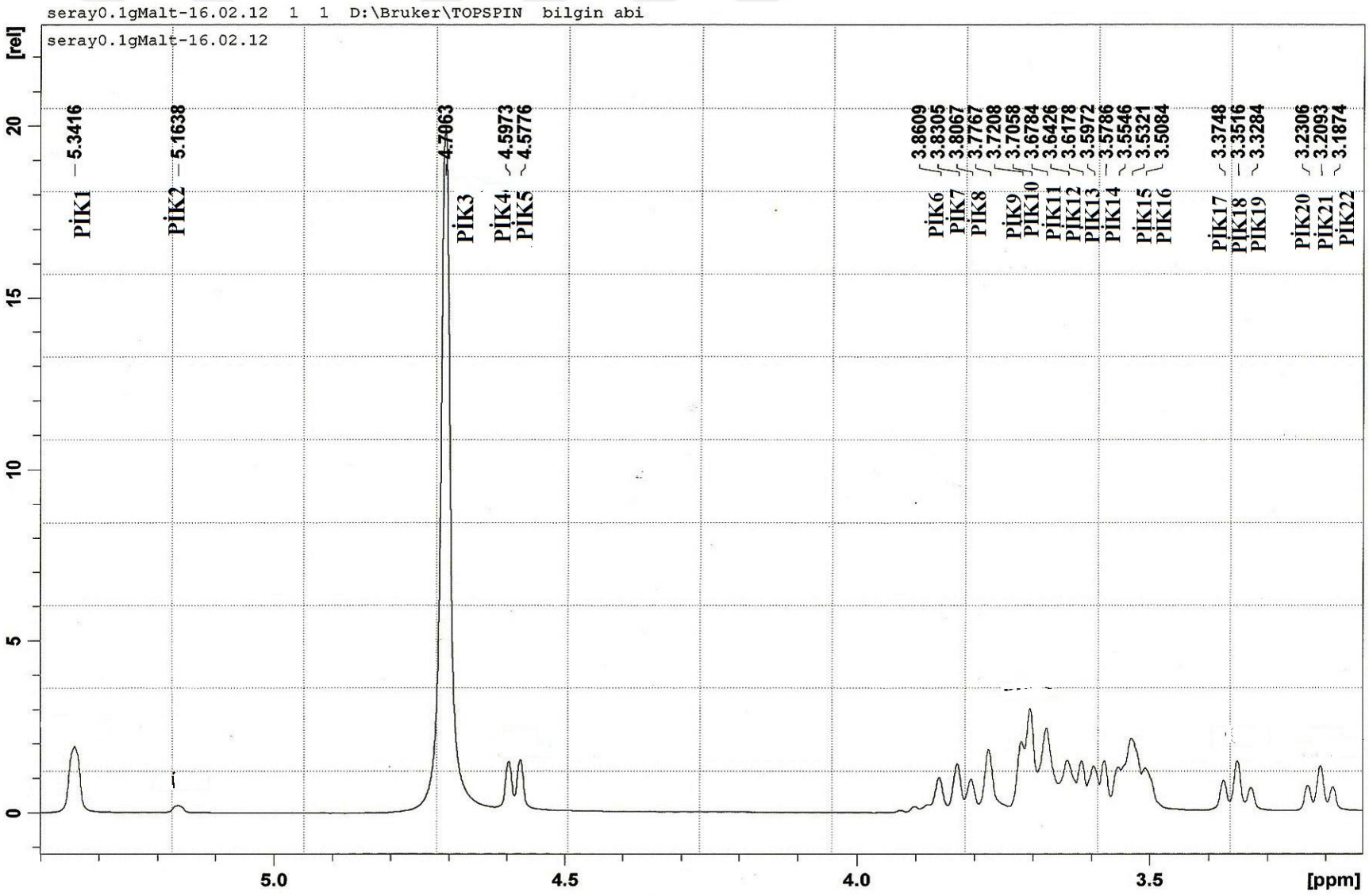
Bu maddelerin piklerini kimliklendirmek olanaklı olmadı. Kimliklendirmeyi daha sonraki çalışmalara bırakarak, her bir maddenin piklerini, azalan kimyasal kayma değerlerine göre numaralandırdık.



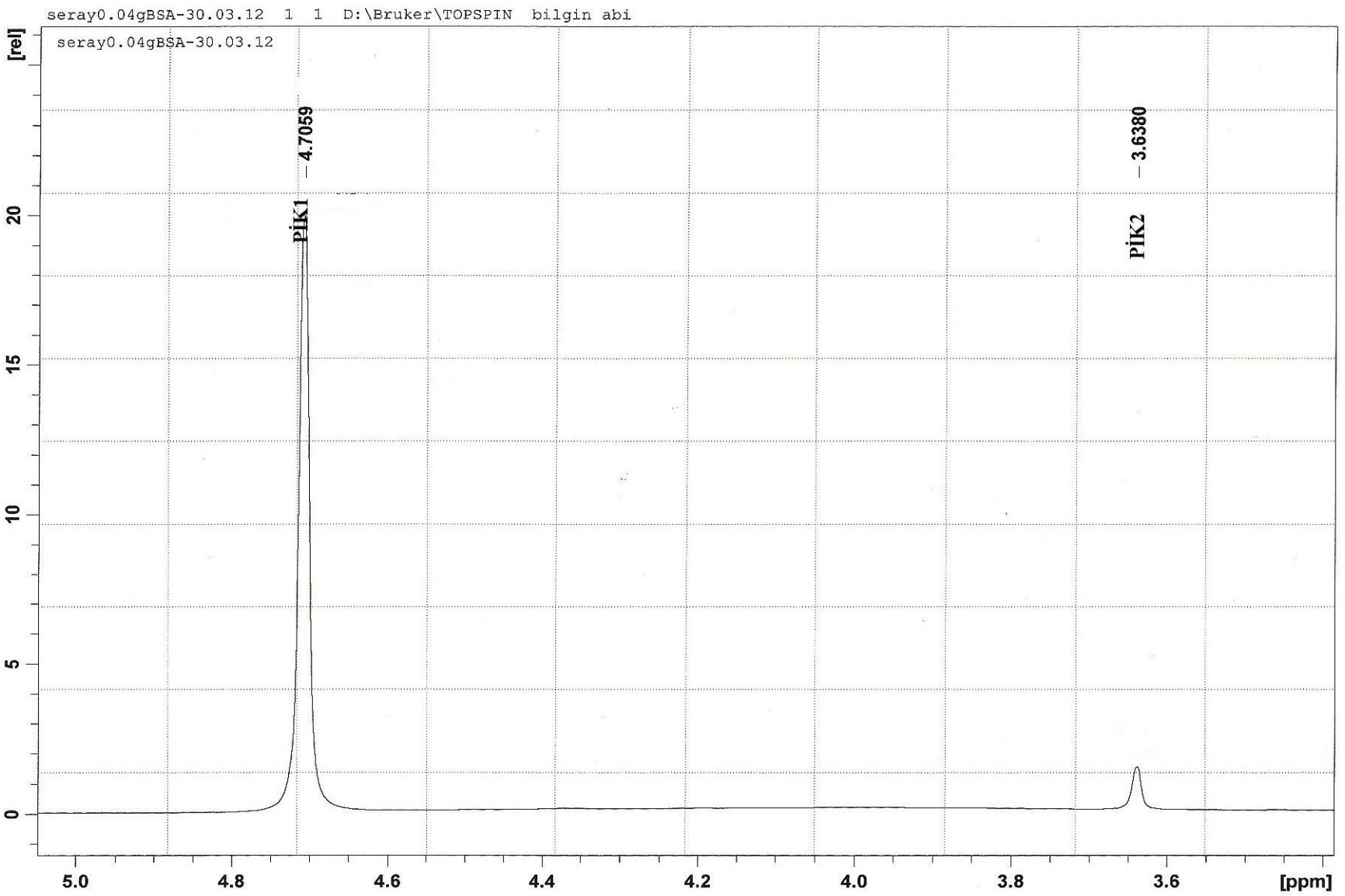
Şekil 3.1. Sucrose çözeltilerinden elde edilen pikler



Şekil 3.2. Pepsin çözeltilerinden elde edilen pikler



Şekil 3.3. Maltose çözeltilerinden elde edilen pikler



Şekil 3.4. BSA çözeltilerinden elde edilen pikler

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

Sucrose için 0,1g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml ve 0,5 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Sucrose için 0,1g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml ve 0,5 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değişim grafikleri Şekil 4.1.- 4.17.'de verilmiştir.

Pepsin için 0,02g/ml, 0,04g/ml, 0,06g/ml, 0,08g/ml ve 0,1g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Pepsin için 0,02g/ml, 0,04g/ml, 0,06g/ml, 0,08g/ml ve 0,1g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değişim grafikleri Şekil 4.18.- 4.33.'de verilmiştir.

Maltose için 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4g/ml ve 0,5g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Maltose için 0,1g/ml, 0,2g/ml, 0,3g/ml, 0,4g/ml ve 0,5g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değişim grafikleri Şekil 4.34 - 4.55.'de verilmiştir.

BSA için 0,04g/ml, 0,08g/ml, 0,12g/ml, 0,16g/ml ve 0,20g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

BSA için 0,04g/ml, 0,08g/ml, 0,12g/ml, 0,16g/ml ve 0,20g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değişim grafikleri Şekil 4.56.- 4.57.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sucrose için 0,1g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml ve 0,5 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri

Kons.	Pik1(ppm)	Pik2(ppm)	Pik3(ppm)	Pik4(ppm)	Pik5(ppm)	Pik6(ppm)	Pik7(ppm)	Pik8(ppm)	Pik9(ppm)	Pik10(ppm)	Pik11(ppm)
0,1g/ml	5,3415	4,706	4,1541	4,1325	3,9982	3,9774	3,9562	3,8212	3,7481	3,6881	3,6645
0,2 g/ml	5,3405	4,7044	4,1523	4,1308	3,9946	3,974	3,953	3,8216	3,7465	3,6867	3,6632
0,3 g/ml	5,3378	4,6998	4,1496	4,1284	3,9914	3,9709	3,9505	3,8198	3,7439	3,6847	3,6614
0,4 g/ml	5,3496	4,7128	4,161	4,1411	4,0008	3,9817	3,9615	3,8323	3,7562	3,6969	3,674
0,5 g/ml	5,3466	4,7093	4,1593	4,1379	3,9387	3,9781	3,957	3,8286	3,7531	3,6949	3,6714

Kons.	Pik12(ppm)	Pik13(ppm)	Pik14(ppm)	Pik15(ppm)	Pik16(ppm)	Pik17(ppm)
0,1g/ml	3,6037	3,4991	3,4742	3,4204	3,3973	3,3742
0,2 g/ml	3,6023	3,5001	3,4754	3,4189	3,396	3,3732
0,3 g/ml	3,6001	3,4984	3,4737	3,4166	3,3939	3,3716
0,4 g/ml	3,6126	3,5109	3,4865	3,4278	3,4059	3,384
0,5 g/ml	3,6099	3,5088	3,4845	3,4264	3,4038	3,3812

Çizelge 4.2. Pepsin için 0,02g/ml, 0,04 g/ml, 0,06 g/ml, 0,08 g/ml ve 0,1 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri

Kons.	Pik1(ppm)	Pik2(ppm)	Pik3(ppm)	Pik4(ppm)	Pik5(ppm)	Pik6(ppm)	Pik7(ppm)	Pik8(ppm)	Pik9(ppm)	Pik10(ppm)	Pik11(ppm)
0,02g/ml	5,1499	4,7047	4,3874	4,3704	3,8555	3,7983	3,7605	3,7356	3,7011	3,663	3,6054
0,04 g/ml	5,155	4,7051	4,3905	4,3714	3,8596	3,8006	3,7633	3,7387	3,7035	3,6655	3,6062
0,06 g/ml	5,149	4,7043	4,3837	4,3648	3,8532	3,7953	3,7573	3,7326	3,6987	3,6603	3,6024
0,08 g/ml	5,1502	4,7048	4,3867	4,3676	3,8536	3,7977	3,7594	3,7355	3,6992	3,6614	3,6017
0,1 g/ml	5,1432	4,7048	4,3785	4,3594	3,8488	3,7897	3,7521	3,7277	3,6918	3,6547	3,5938

Kons.	Pik12(ppm)	Pik13(ppm)	Pik14(ppm)	Pik15(ppm)	Pik16(ppm)
0,02g/ml	3,581	3,5202	3,4977	3,4777	3,4569
0,04 g/ml	3,5823	3,5258	3,5014	3,4808	3,4578
0,06 g/ml	3,5784	3,5198	3,4949	3,4749	3,4509
0,08 g/ml	3,5791	3,5212	3,4967	3,4757	3,4542
0,1 g/ml	3,5726	3,5128	3,4836	3,4698	3,4459

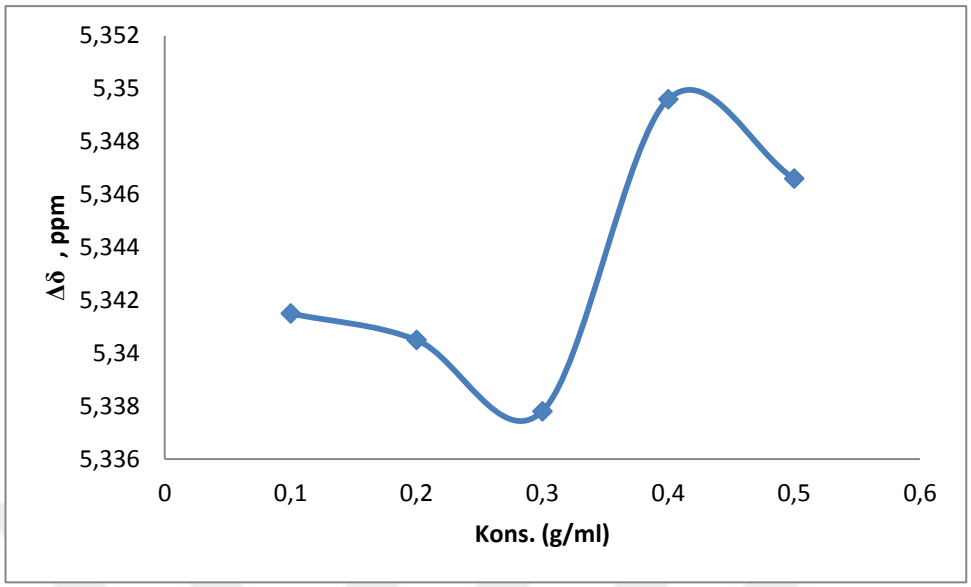
Çizelge 4.3. Maltose için 0,1g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml ve 0,5 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri

Kons.	Pik1(ppm)	Pik2(ppm)	Pik3(ppm)	Pik4(ppm)	Pik5(ppm)	Pik6(ppm)	Pik7(ppm)	Pik8(ppm)	Pik9(ppm)	Pik10(ppm)	Pik11(ppm)
0,1g/ml	5,3416	5,1638	4,7063	4,5973	4,5776	3,8305	3,8067	3,7757	3,7058	3,6784	3,6426
0,2 g/ml	5,3424	5,1692	4,7071	4,6008	4,5811	3,8331	3,8099	3,7798	3,7091	3,6821	3,6434
0,3 g/ml	5,3453	5,1764	4,7091	4,6098	4,59	3,8402	3,8177	3,7875	3,7165	3,6894	3,6515
0,4 g/ml	5,3477	5,1825	4,7113	4,6125	4,5929	3,8409	3,8209	3,7907	3,7195	3,6925	3,6523
0,5 g/ml	5,3393	5,1783	4,7029	4,6058	4,5862	3,8354	3,814	3,7837	3,7126	3,685	3,6434

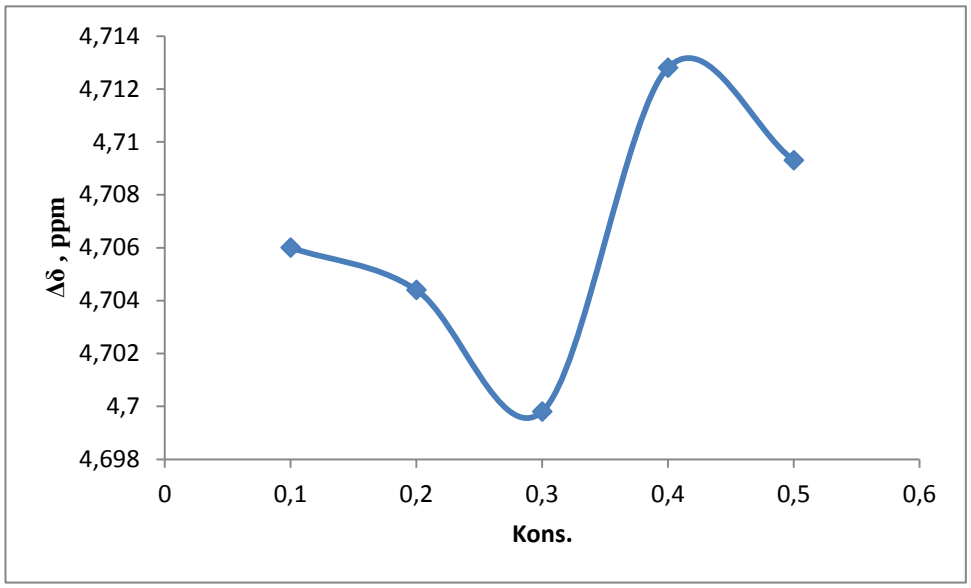
Kons.	Pik12(ppm)	Pik13(ppm)	Pik14(ppm)	Pik15(ppm)	Pik16(ppm)	Pik17(ppm)	Pik18(ppm)	Pik19(ppm)	Pik20(ppm)	Pik21(ppm)	Pik22(ppm)
0,1g/ml	3,6178	3,5972	3,5786	3,5321	3,5084	3,3748	3,3516	3,3284	3,2306	3,2093	3,1874
0,2 g/ml	3,6197	3,6005	3,5801	3,5342	3,5124	3,3779	3,3547	3,3315	3,2351	3,2141	3,1919
0,3 g/ml	3,6286	3,6066	3,587	3,5448	3,5217	3,386	3,3626	3,3395	3,245	3,2233	3,2018
0,4 g/ml	3,6306	3,6092	3,5882	3,5466	3,5244	3,3884	3,3652	3,342	3,2486	3,2275	3,2057
0,5 g/ml	3,6238	3,6018	3,5796	3,5424	3,5198	3,3814	3,3583	3,3352	3,2431	3,222	3,2001

Çizelge 4.4. BSA için 0,04g/ml, 0,08 g/ml, 0,12 g/ml, 0,16 g/ml ve 0,2 g/ml konsantrasyonlarındaki piklerin kimyasal kayma değerleri

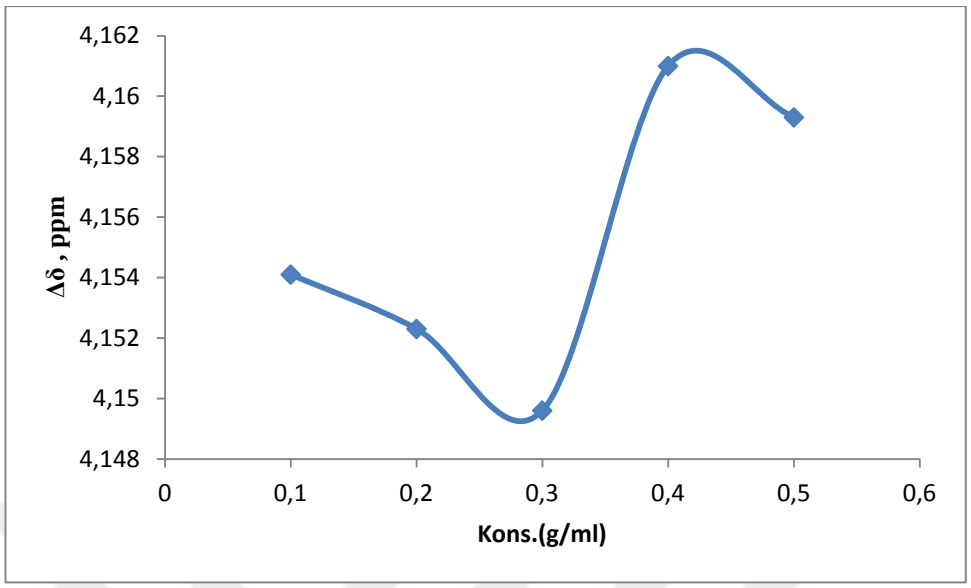
Kons.	Pik1(ppm)	Pik2(ppm)
0,04g/ml	4,7059	3,638
0,08 g/ml	4,7071	3,6292
0,12 g/ml	4,7083	3,6292
0,16 g/ml	4,7117	3,6355
0,2 g/ml	4,7183	3,6414



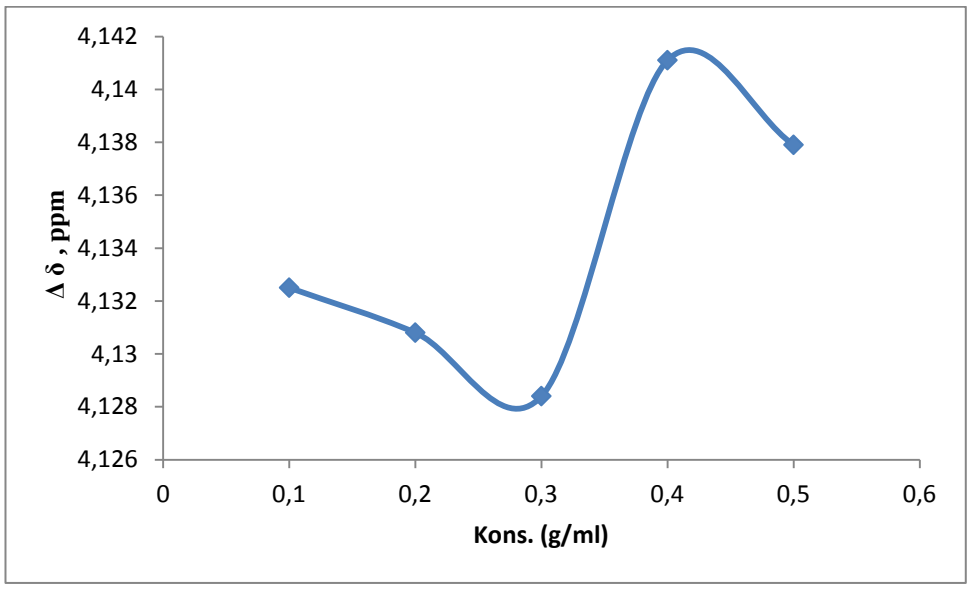
Şekil 4.1. Sucrose'un 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



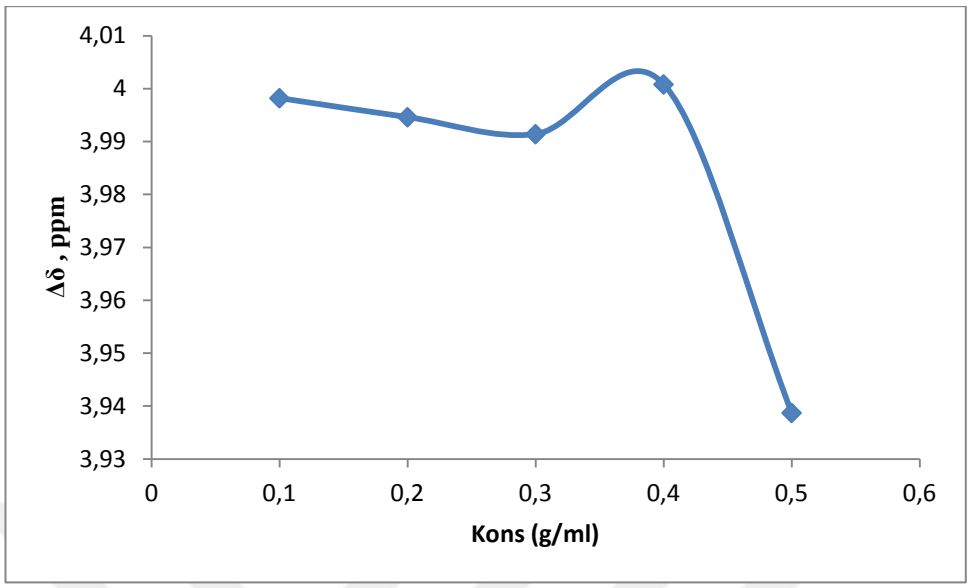
Şekil 4.2. Sucrose'un 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



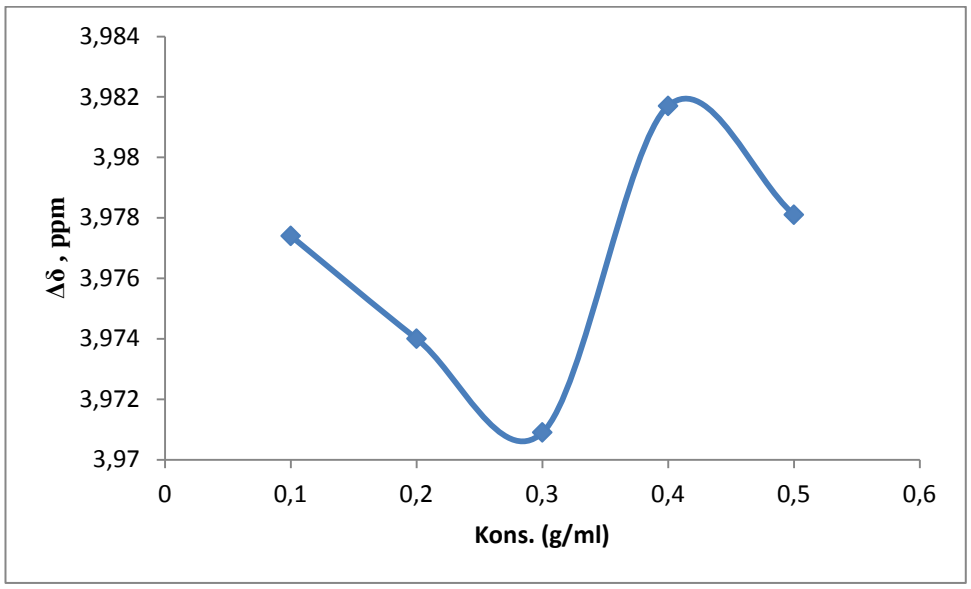
Şekil 4.3. Sucrose'un 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



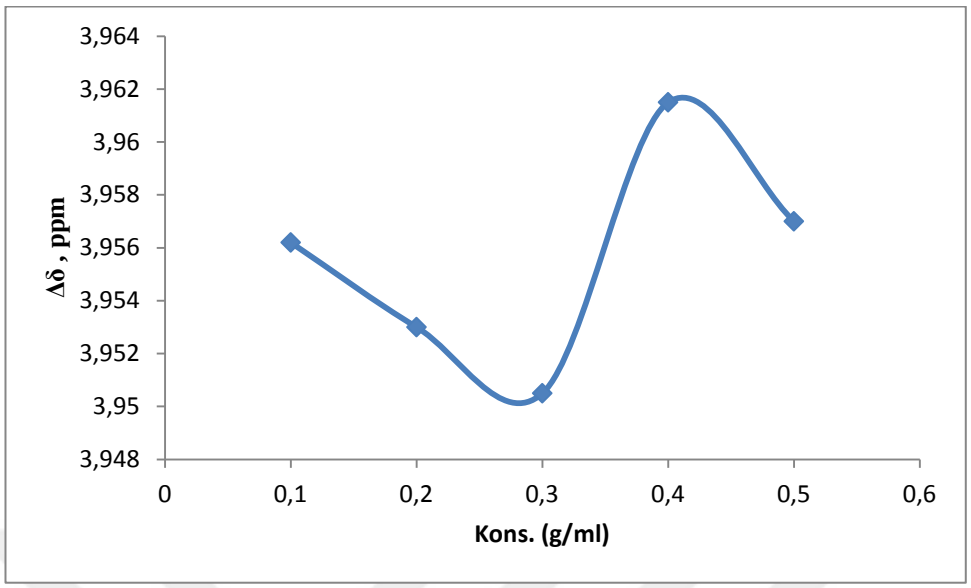
Şekil 4.4. Sucrose'un 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



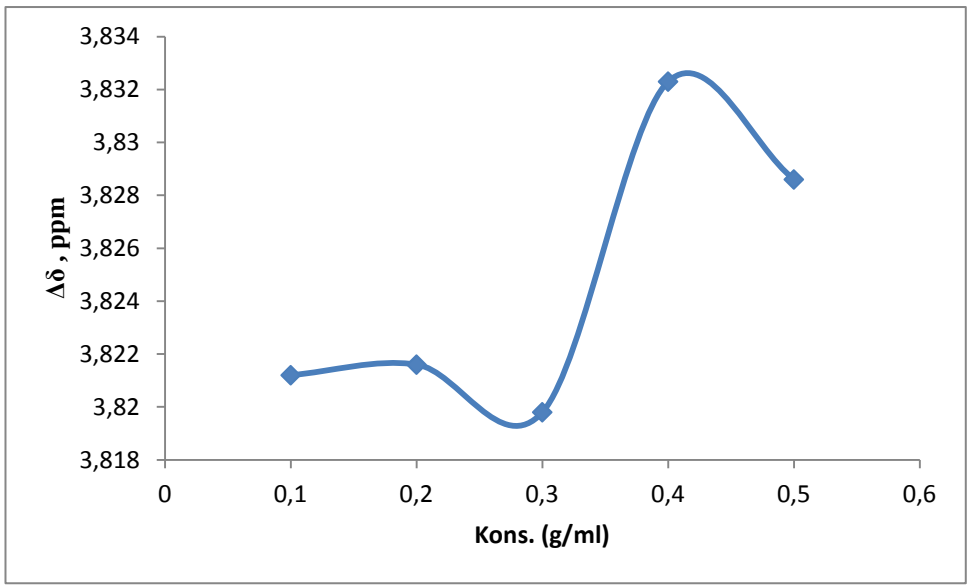
Şekil 4.5. Sucrose'un 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



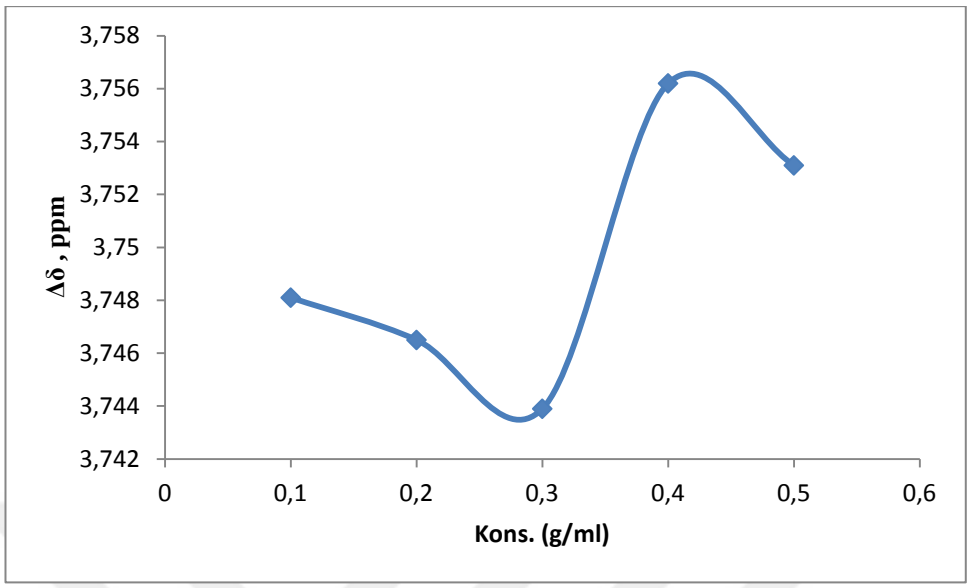
Şekil 4.6. Sucrose'un 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



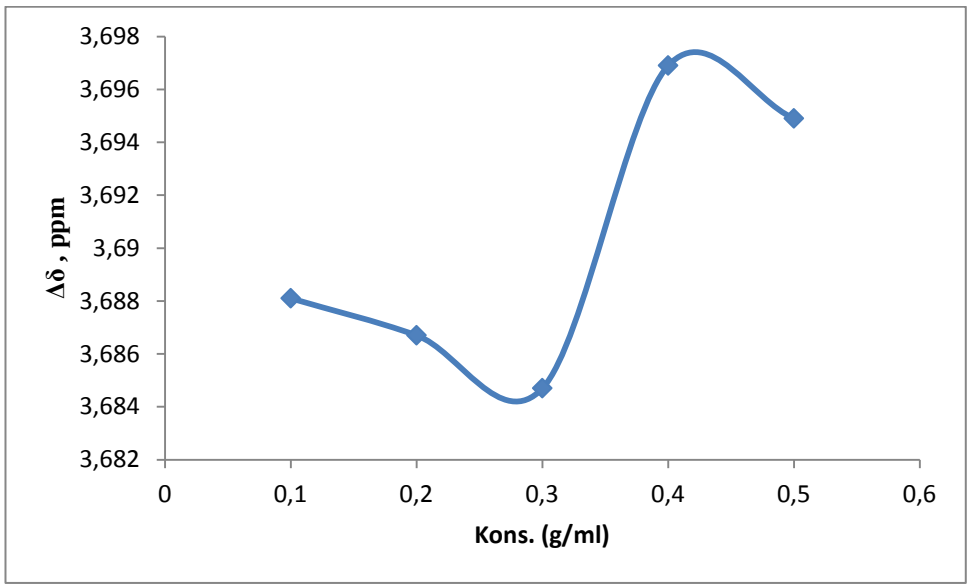
Şekil 4.7. Sucrose'un 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



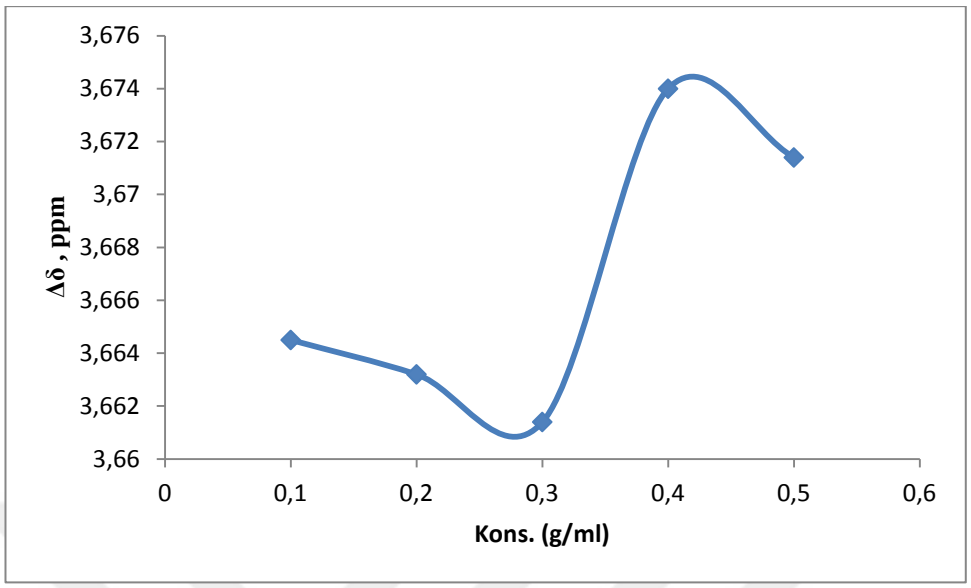
Şekil 4.8. Sucrose'un 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



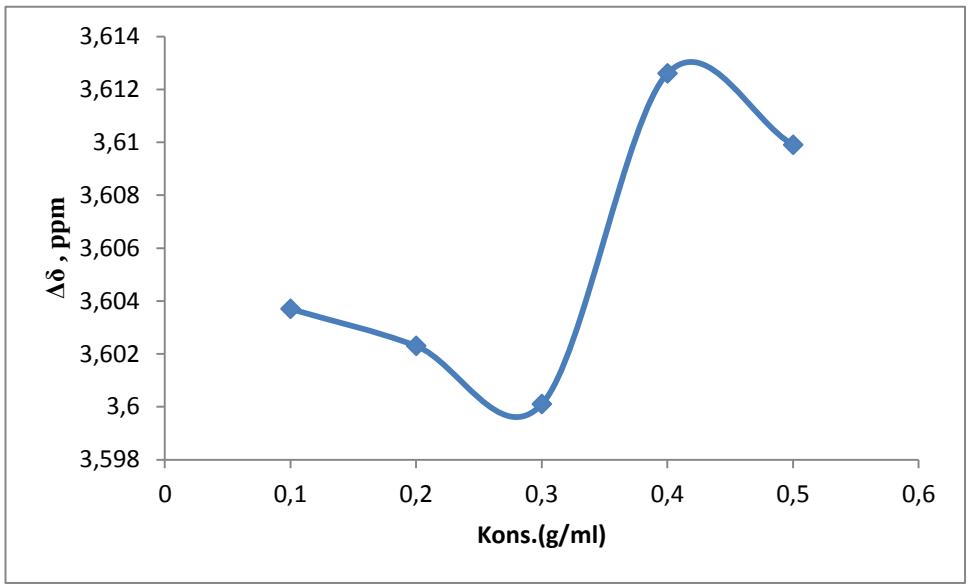
Şekil 4.9. Sucrose'un 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



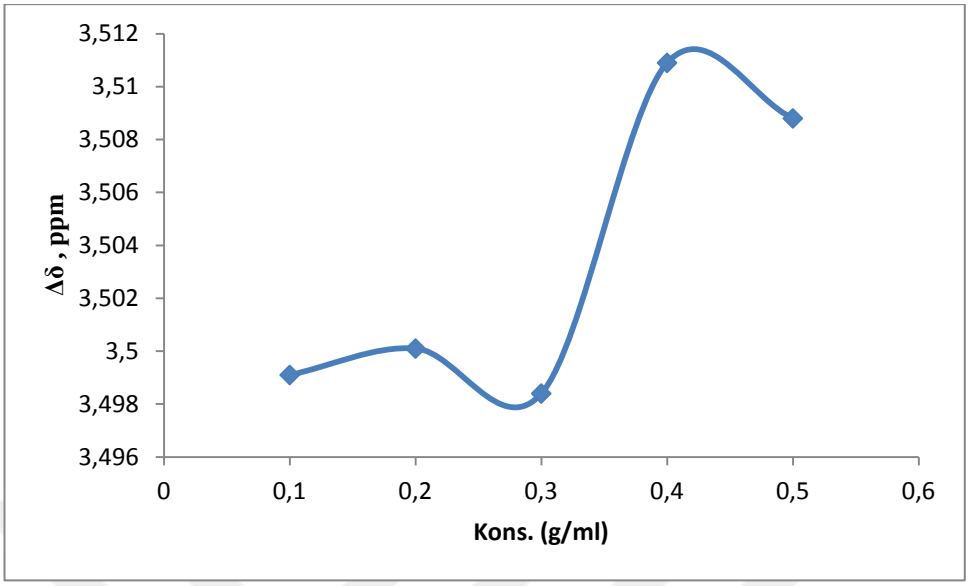
Şekil 4.10. Sucrose'un10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



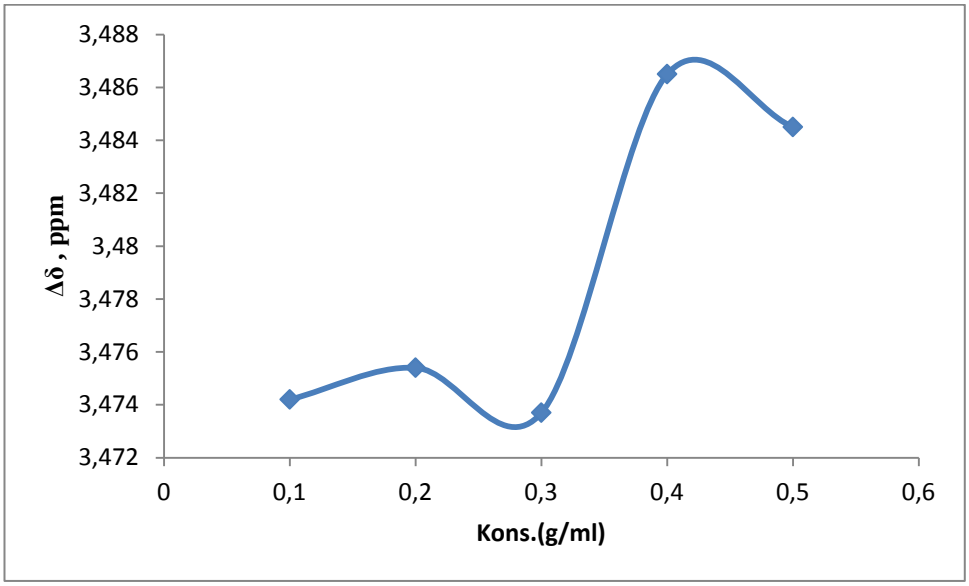
Şekil 4.11. Sucrose'un 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



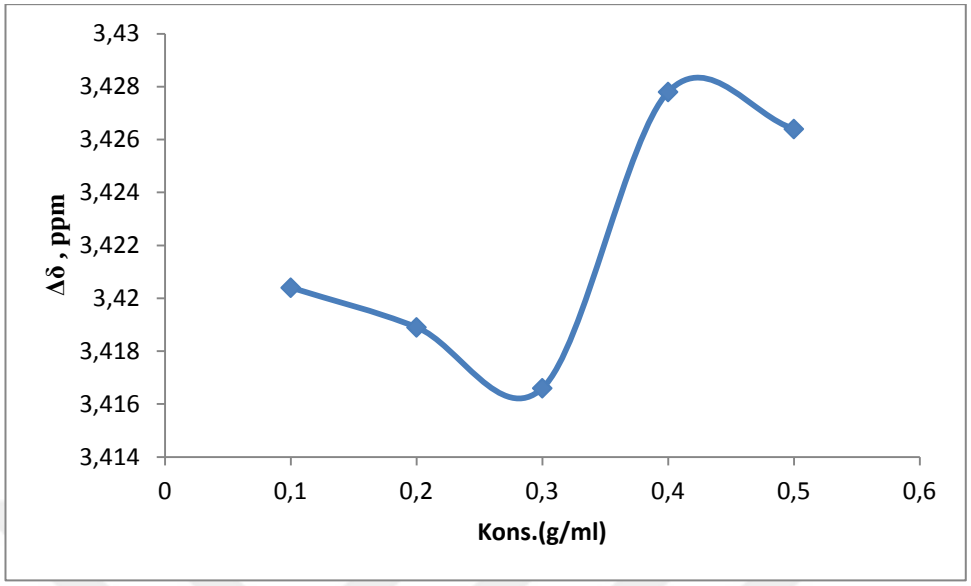
Şekil 4.12. Sucrose'un 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



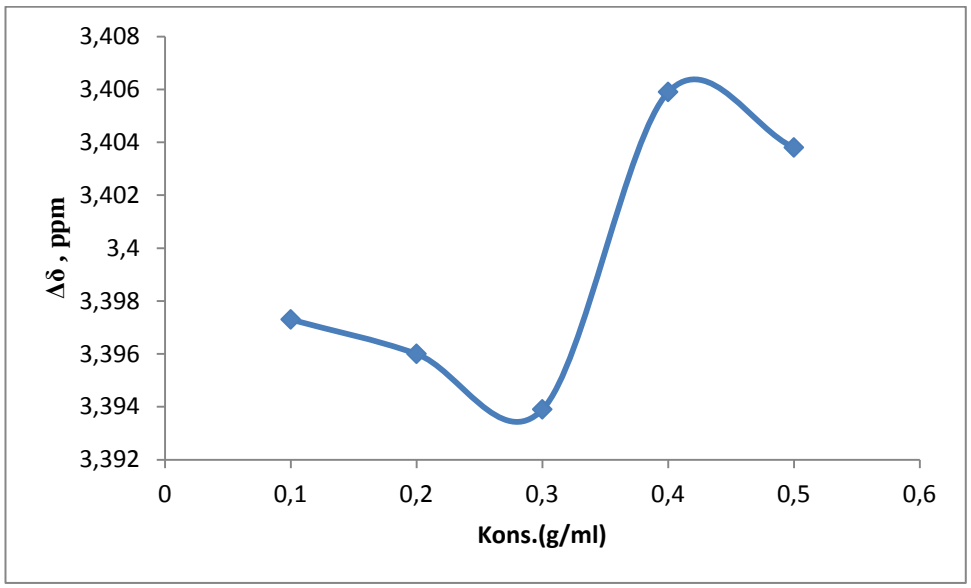
Şekil 4.13. Sucrose'un 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



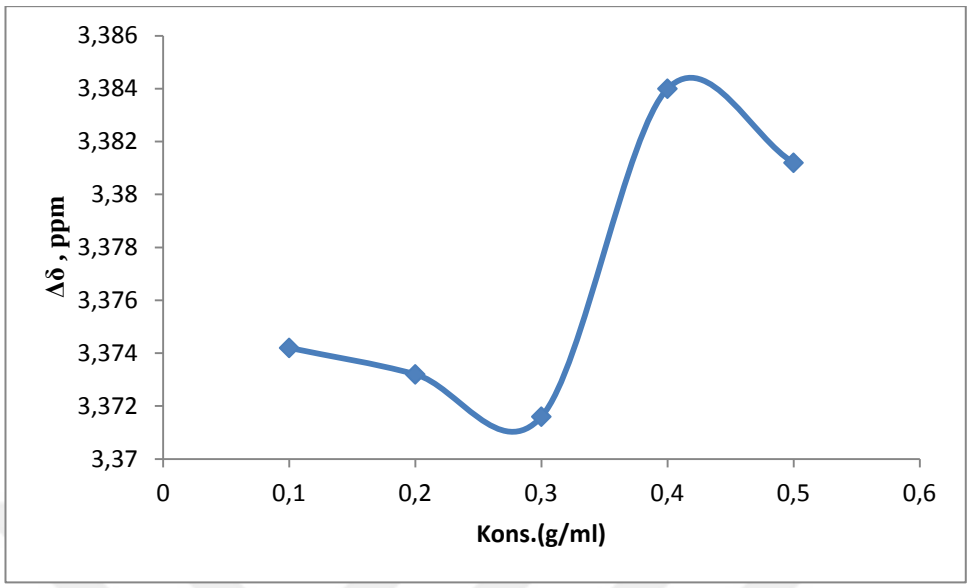
Şekil 4.14. Sucrose'un 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



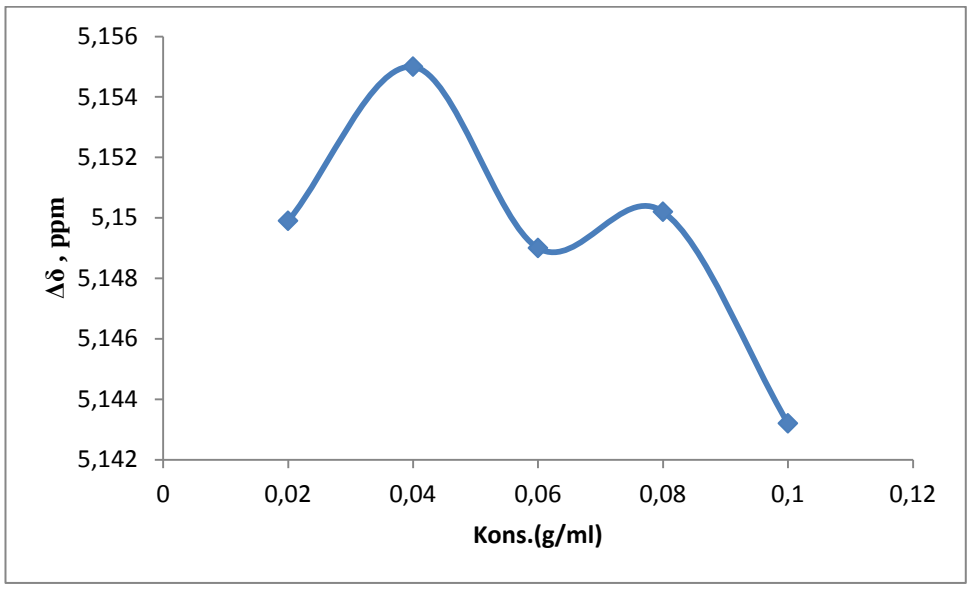
Şekil 4.15. Sucrose'un 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



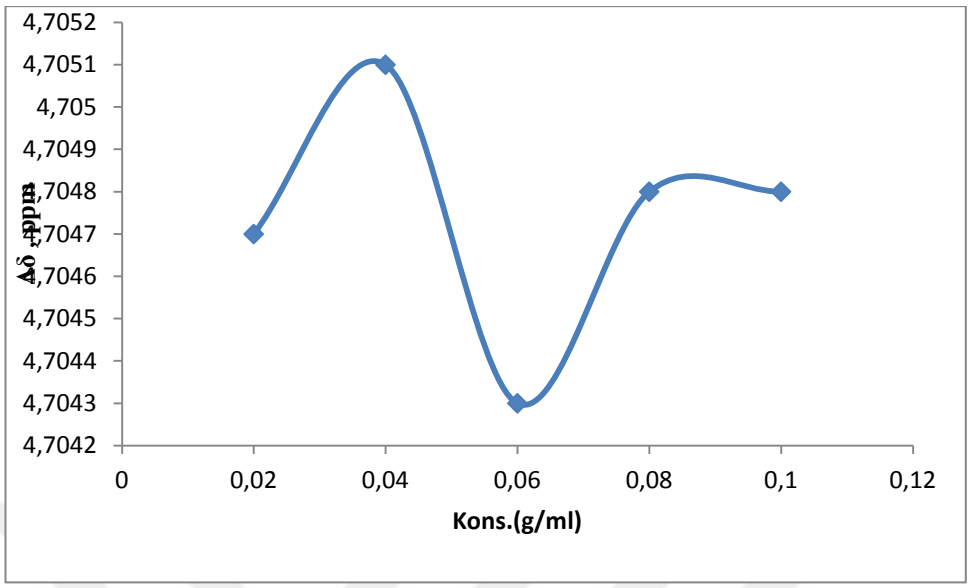
Şekil 4.16. Sucrose'un 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



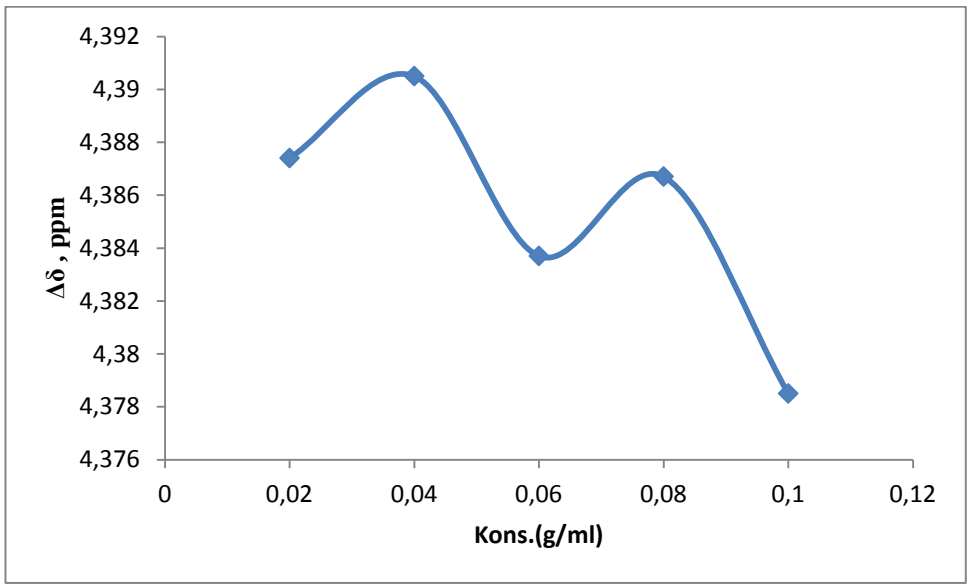
Şekil 4.17. Sucrose'un 17. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



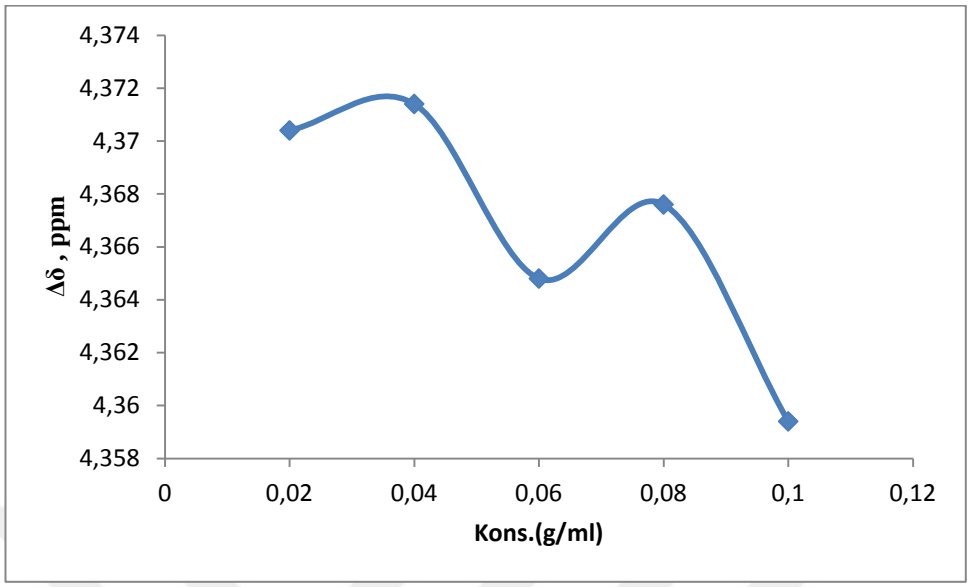
Şekil 4.18. Pepsin'in 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



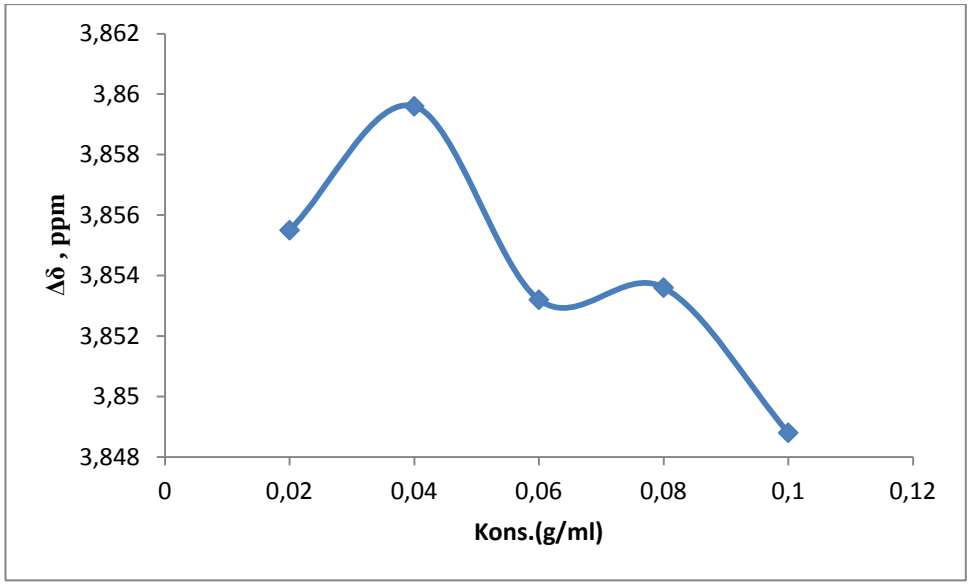
Şekil 4.19. Pepsin'in 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



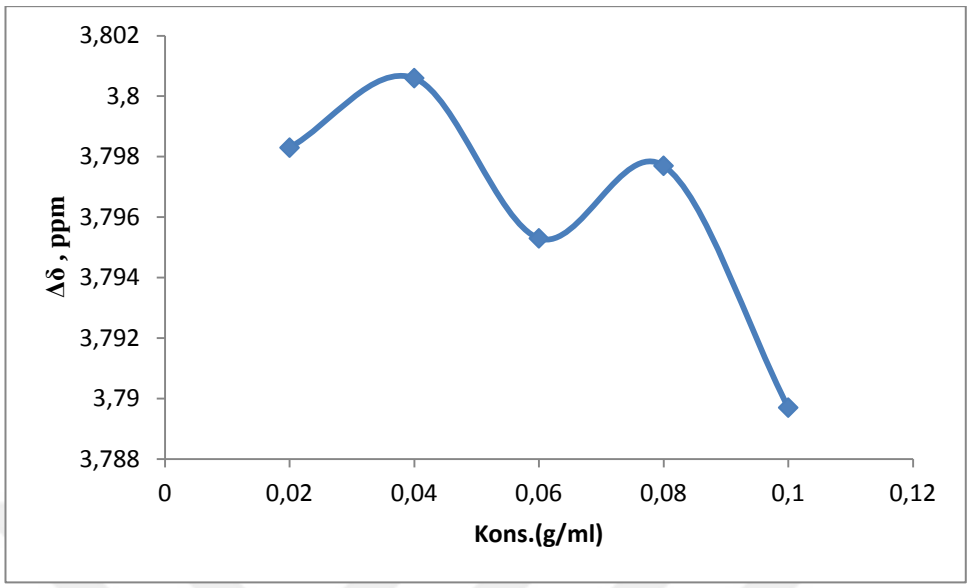
Şekil 4.20. Pepsin'in 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



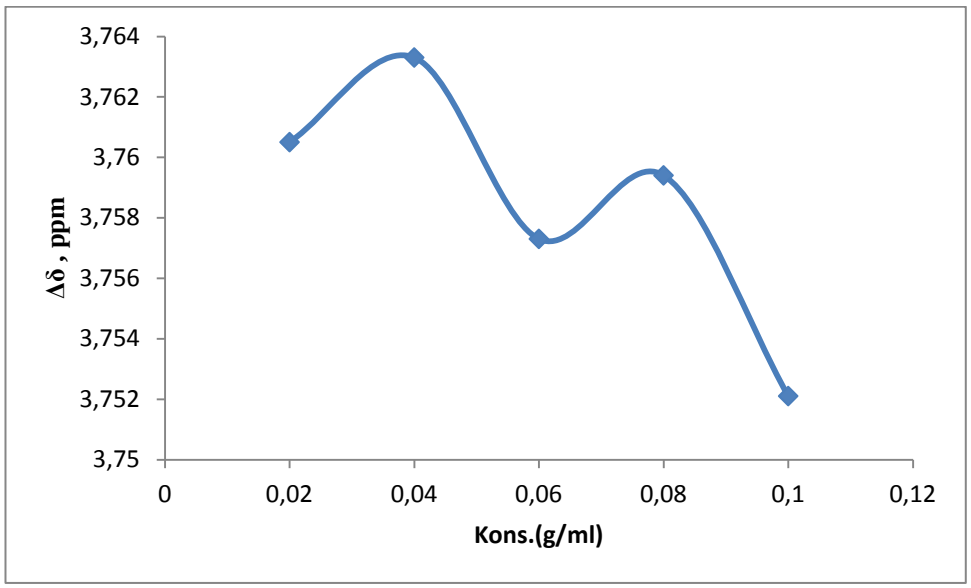
Şekil 4.21. Pepsin'in 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



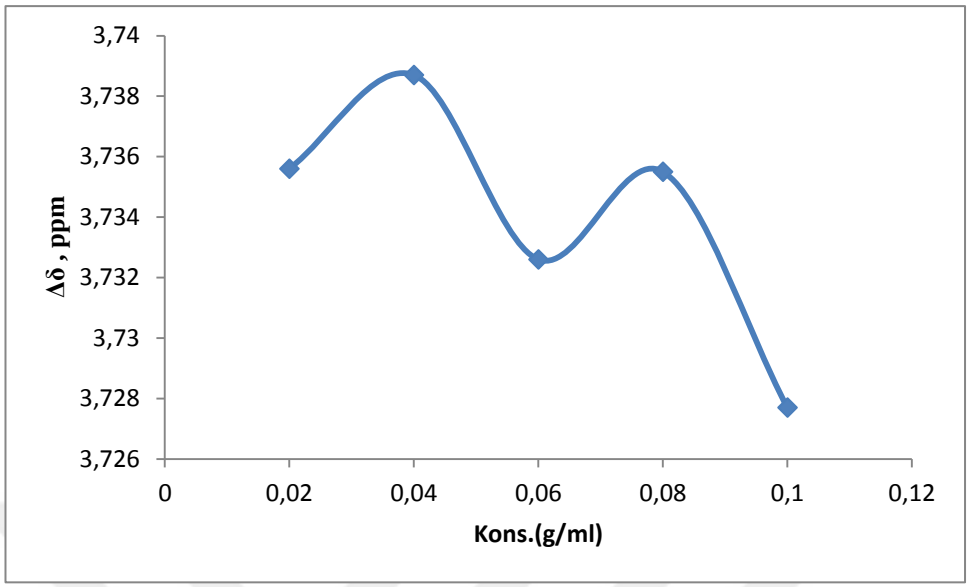
Şekil 4.22. Pepsin'in 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



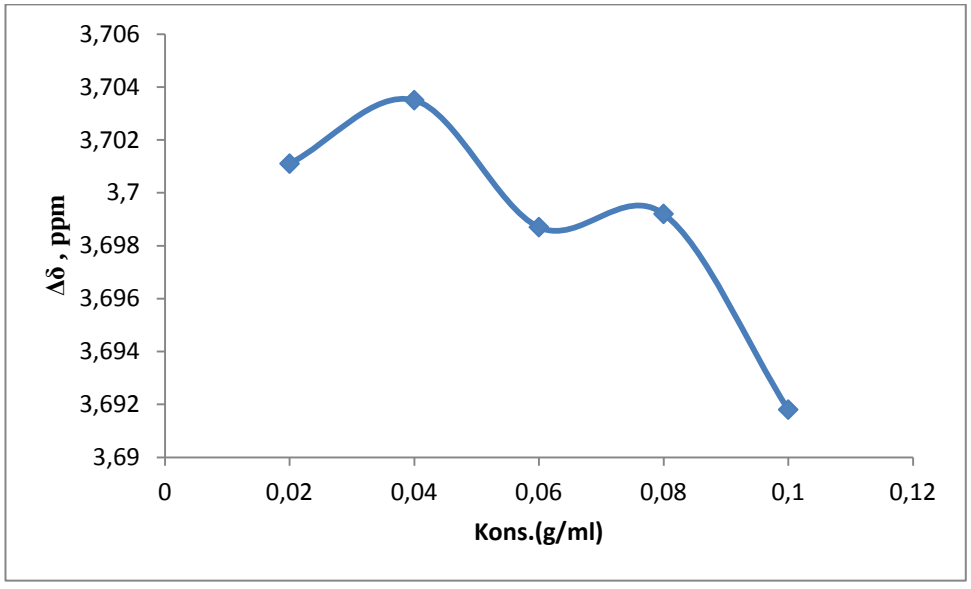
Şekil 4.23. Pepsin'in 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



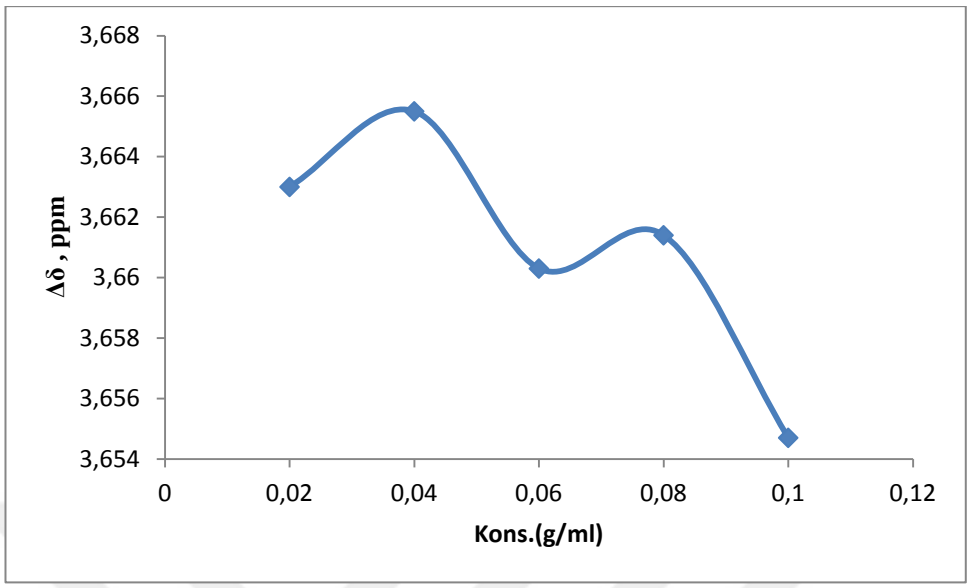
Şekil 4.24. Pepsin'in 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



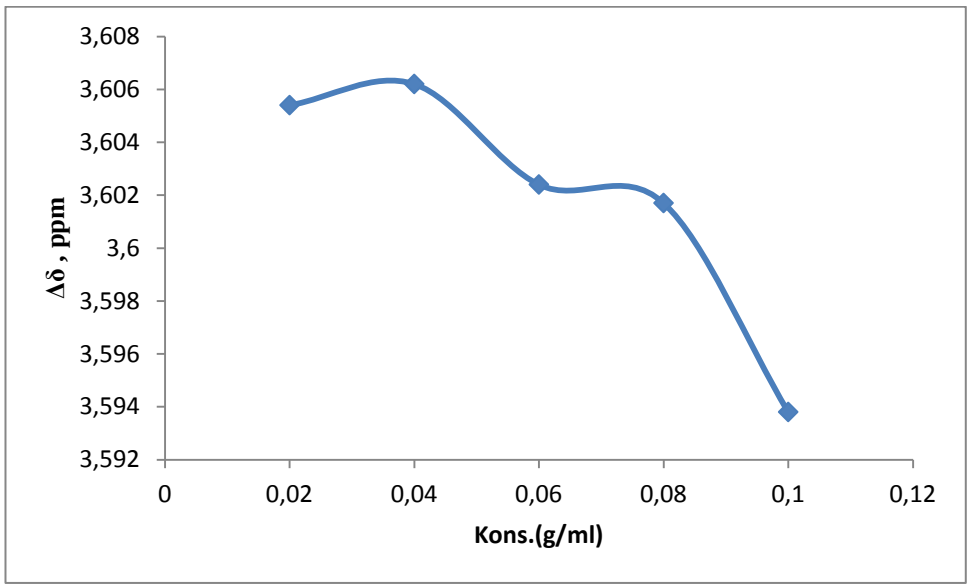
Şekil 4.25. Pepsin'in 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



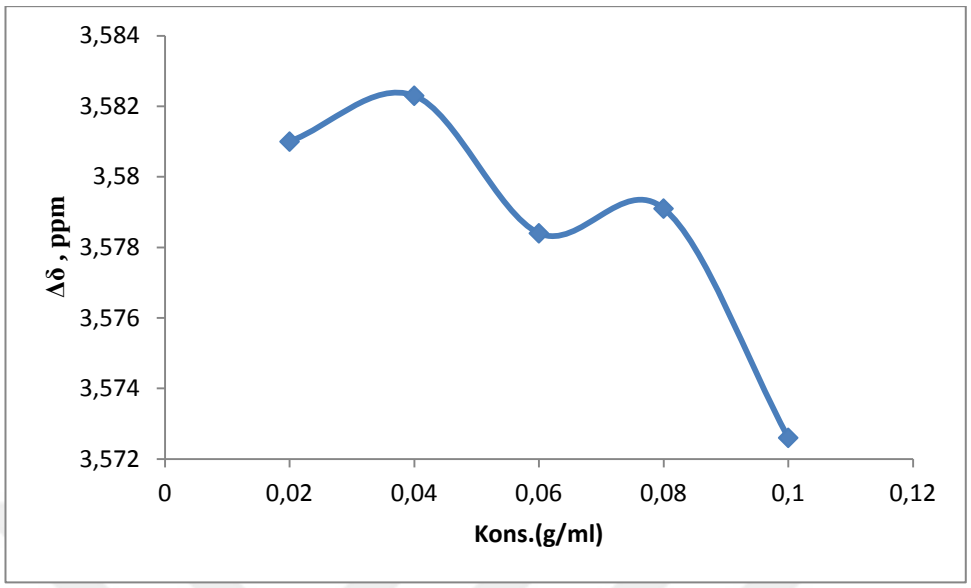
Şekil 4.26. Pepsin'in 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



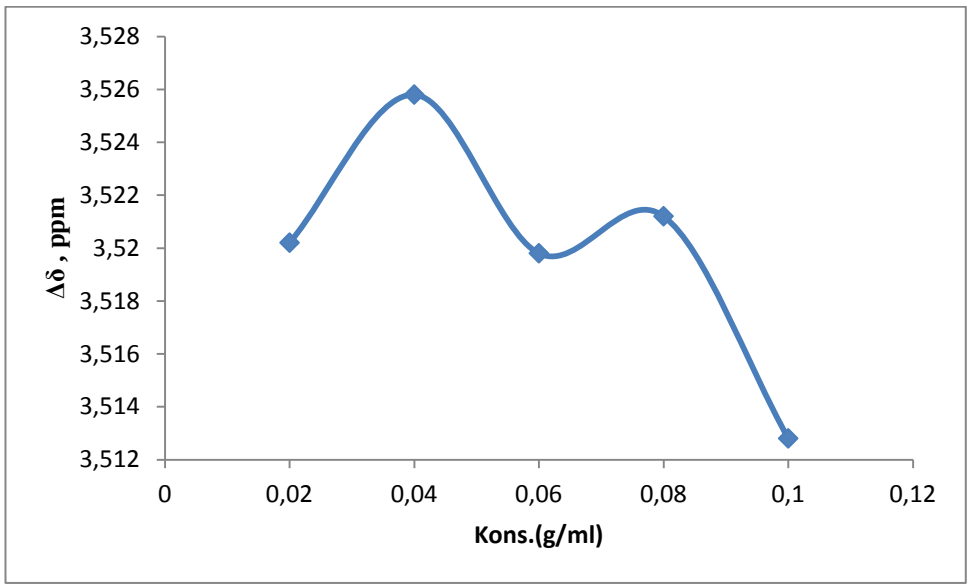
Şekil 4.27. Pepsin'in 10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



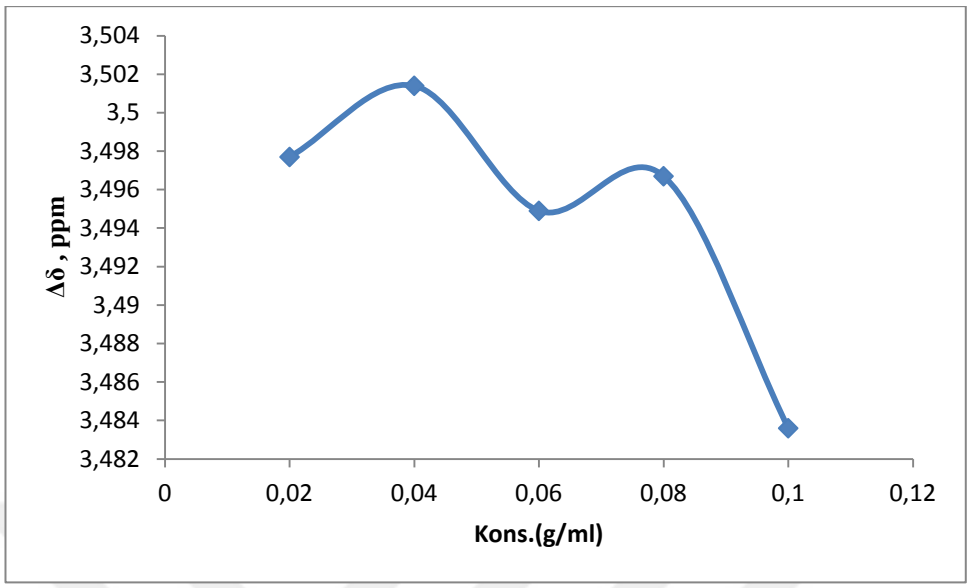
Şekil 4.28. Pepsin'in 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



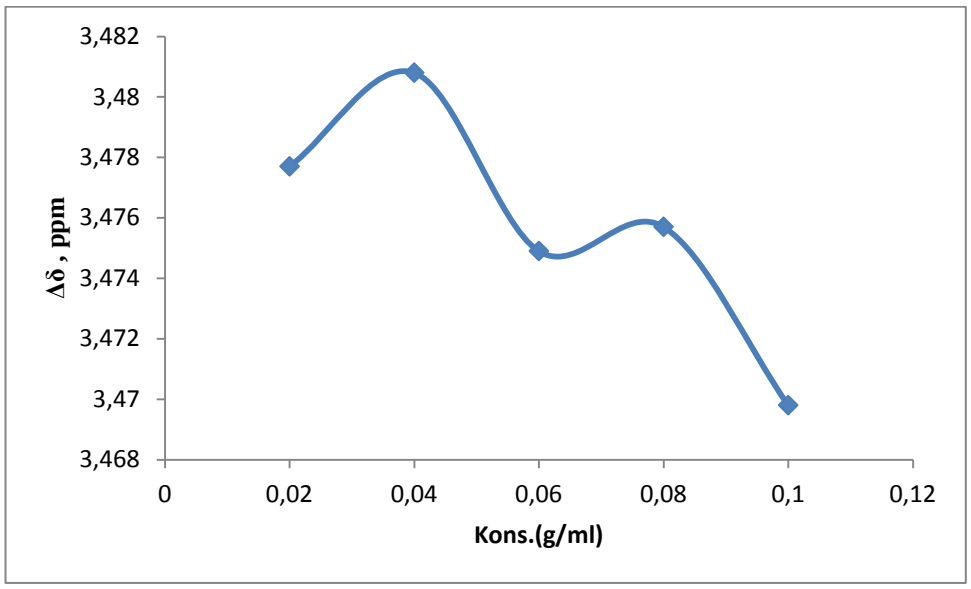
Şekil 4.29. Pepsin'in 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



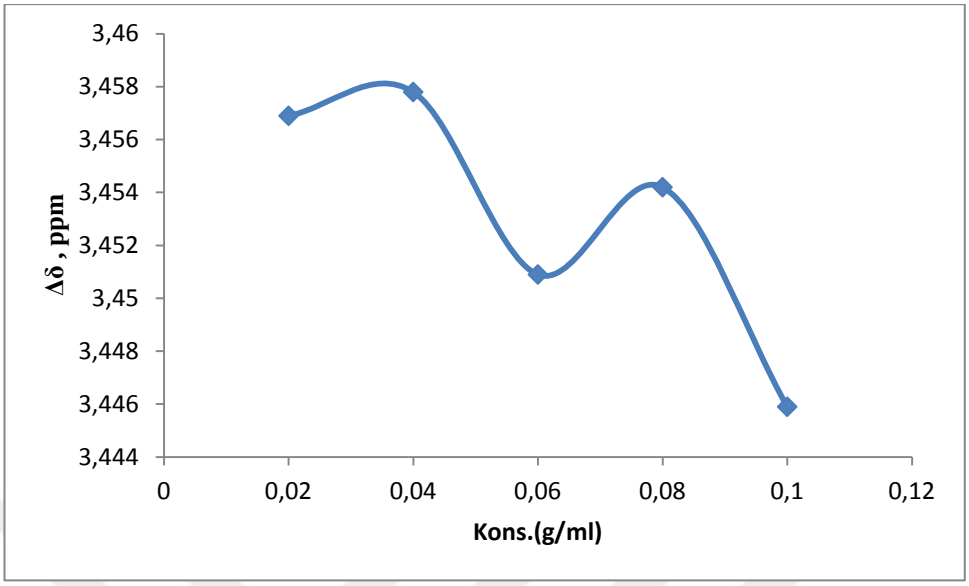
Şekil 4.30. Pepsin'in 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



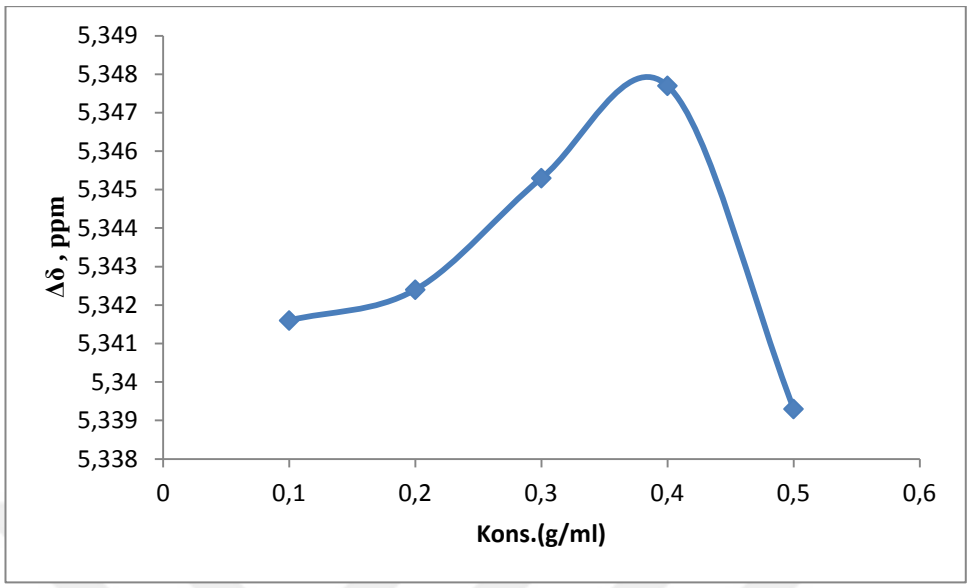
Şekil 4.31. Pepsin'in 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



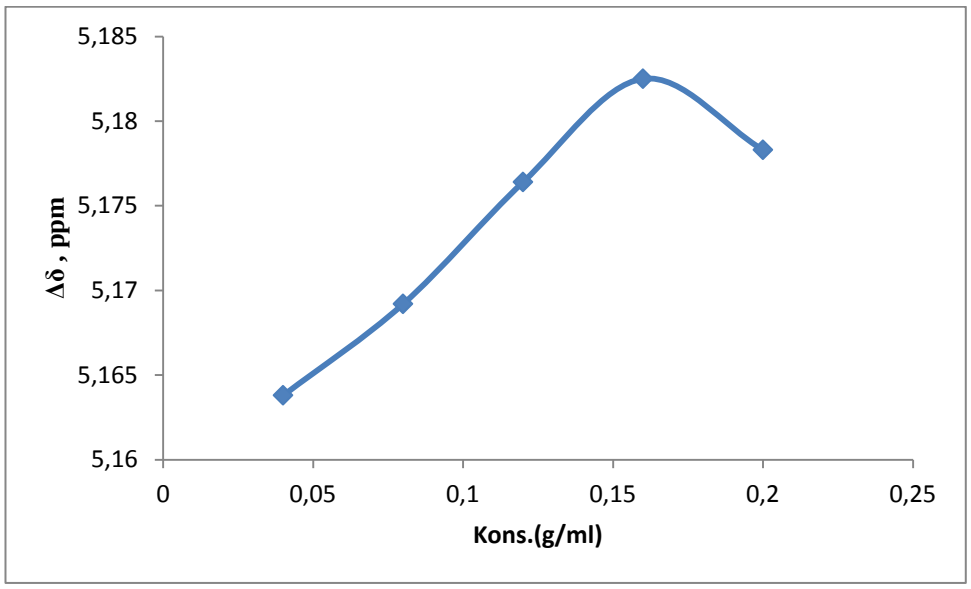
Şekil 4.32. Pepsin'in 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



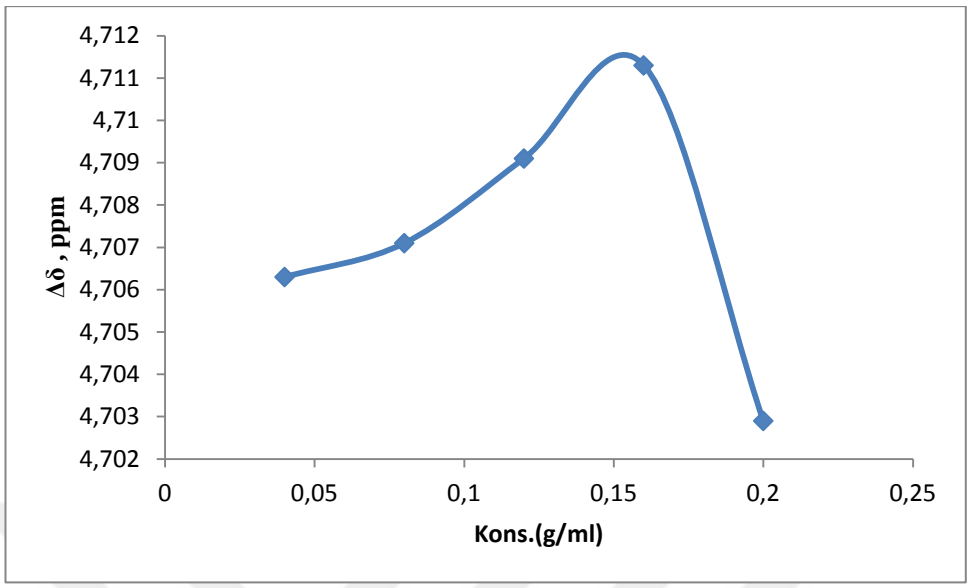
Şekil 4.33. Pepsin'in 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



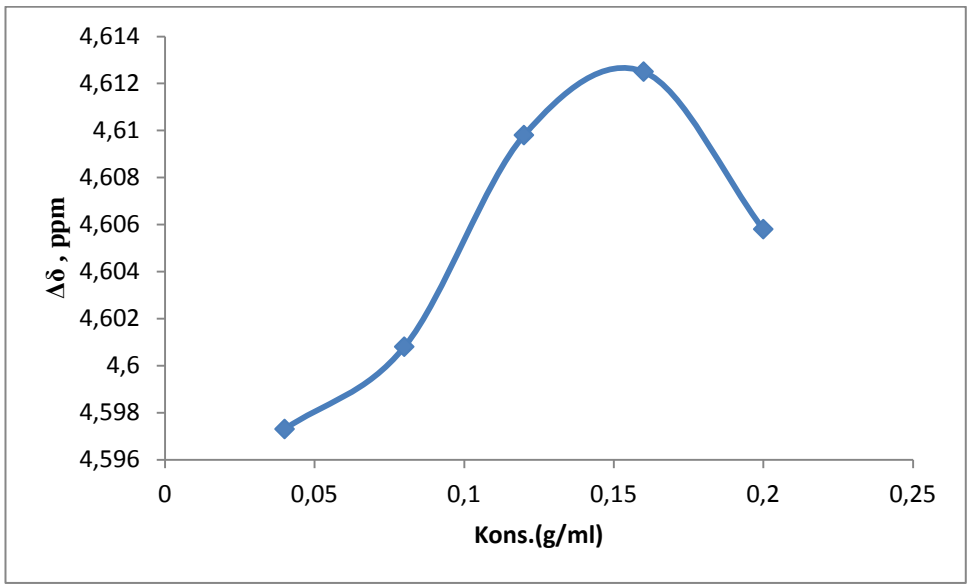
Şekil 4.34. Maltose'un 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



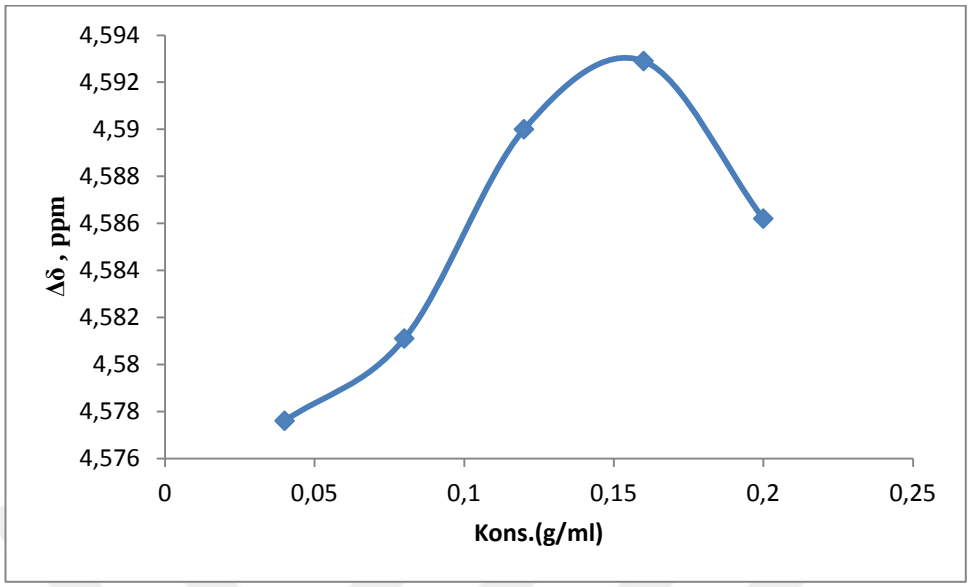
Şekil 4.35. Maltose'un 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



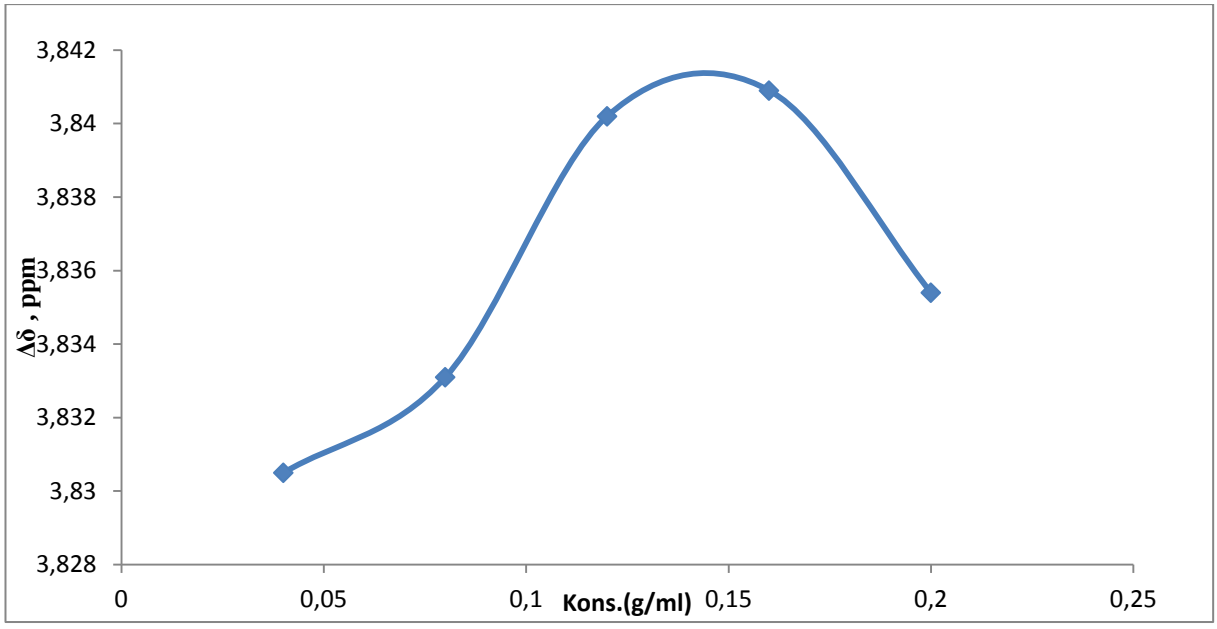
Şekil 4.36. Maltose'un 3. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



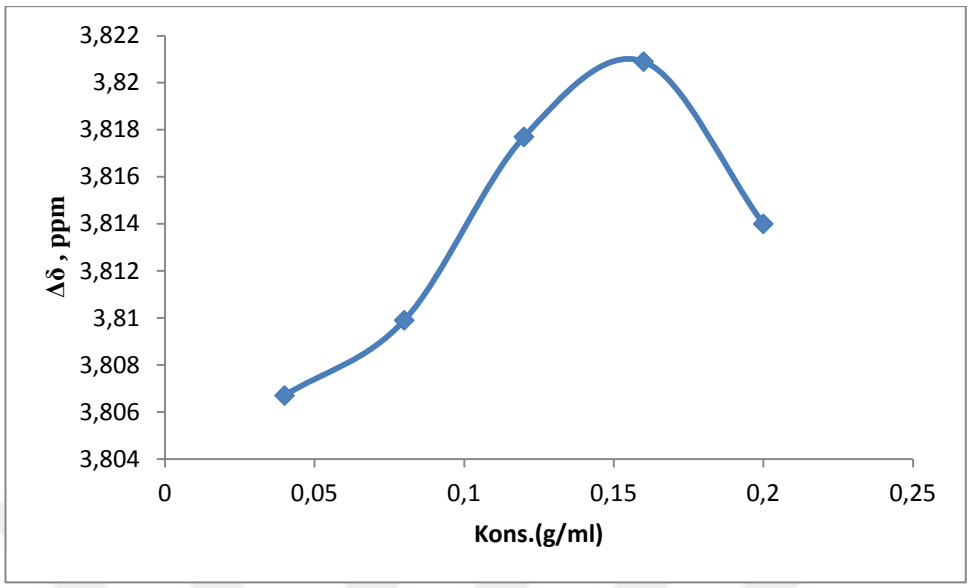
Şekil 4.37. Maltose'un 4. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



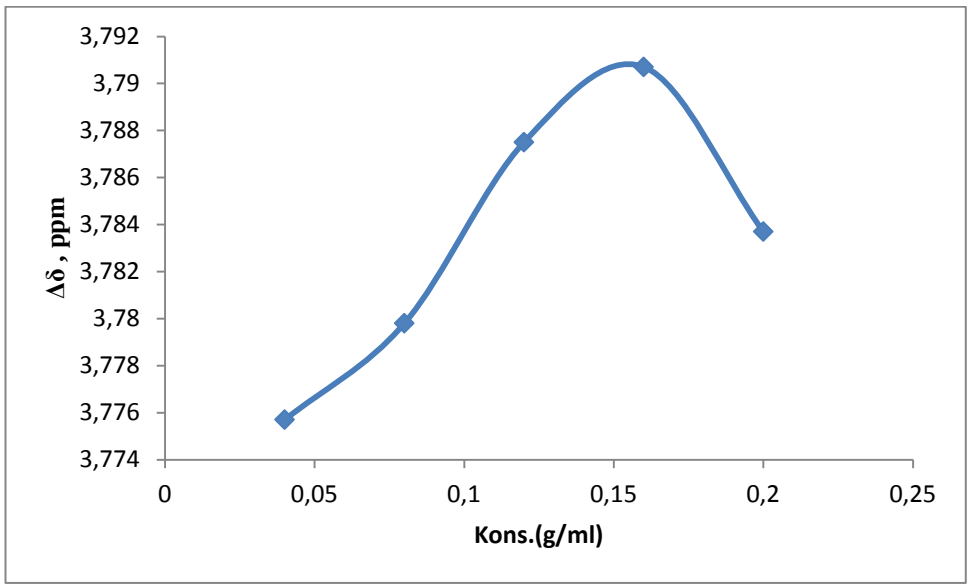
Şekil 4.38. Maltose'un 5. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



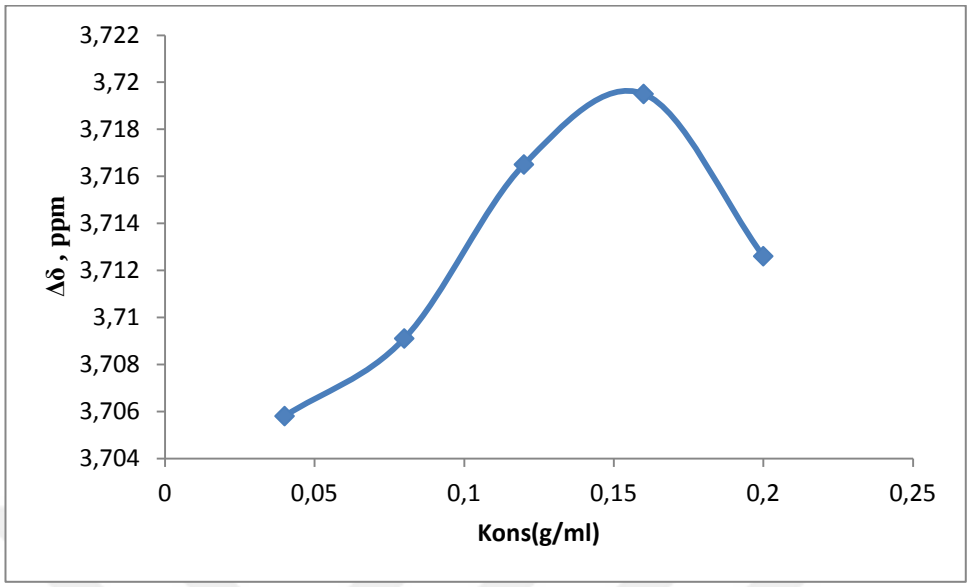
Şekil 4.39. Maltose'un 6. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



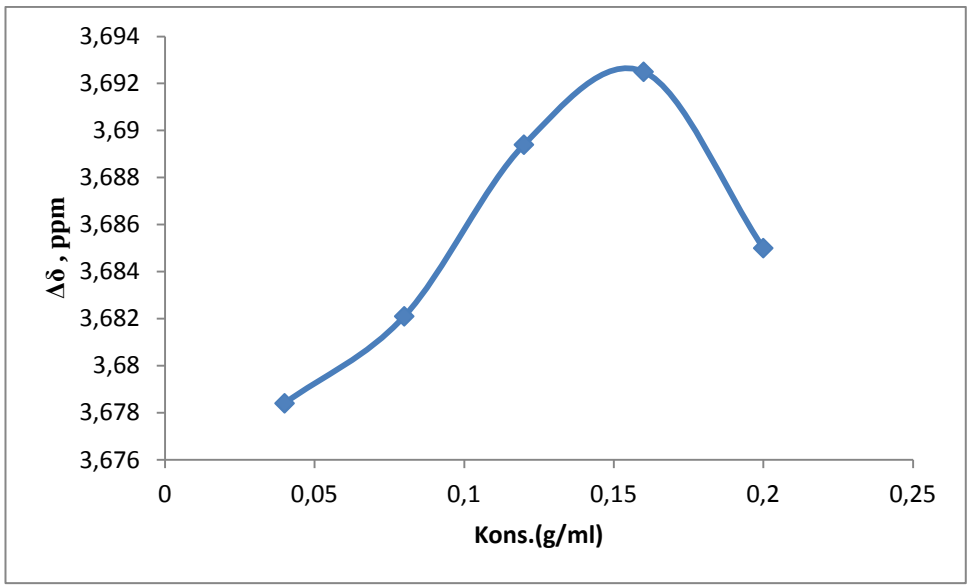
Şekil 4.40. Maltose'un 7. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



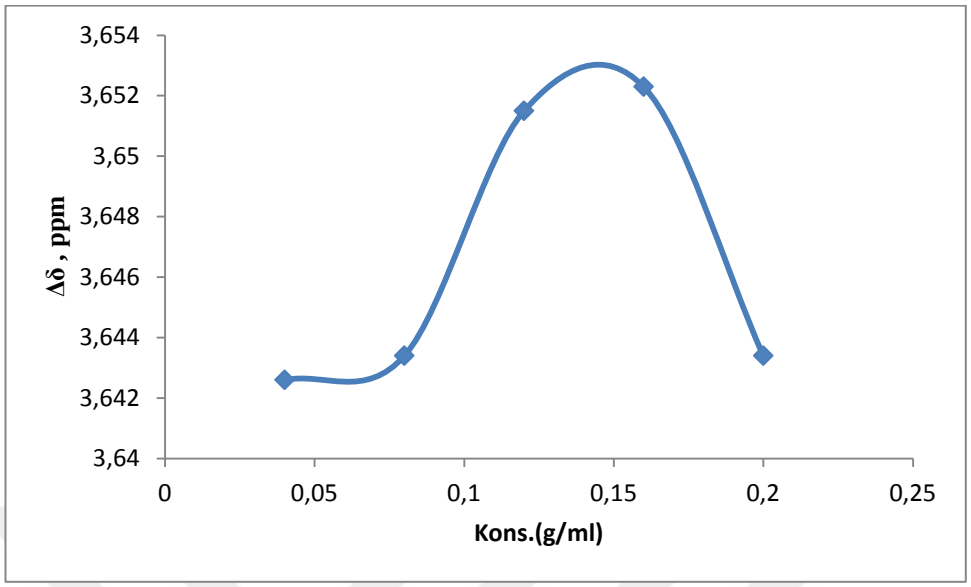
Şekil 4.41. Maltose'un 8. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



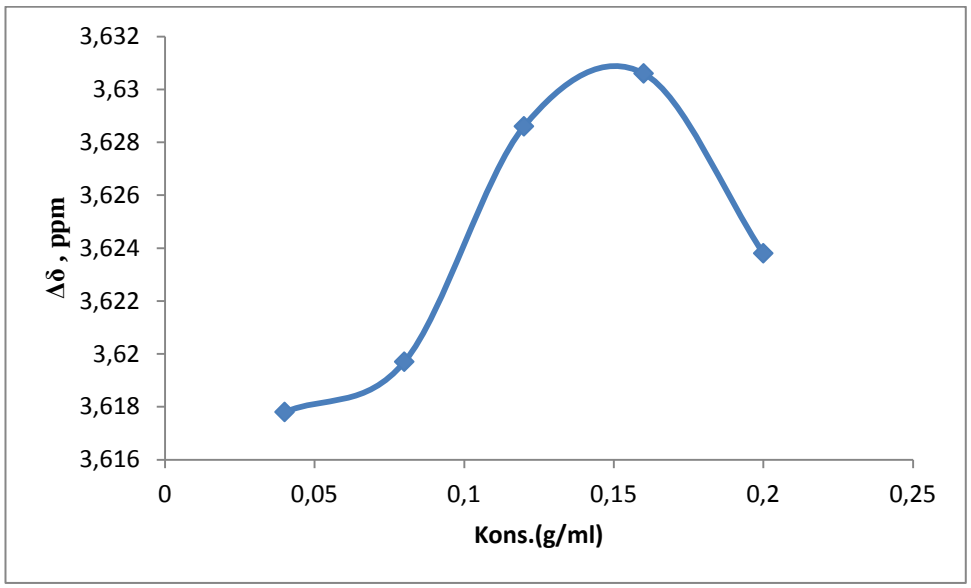
Şekil 4.42. Maltose'un 9. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



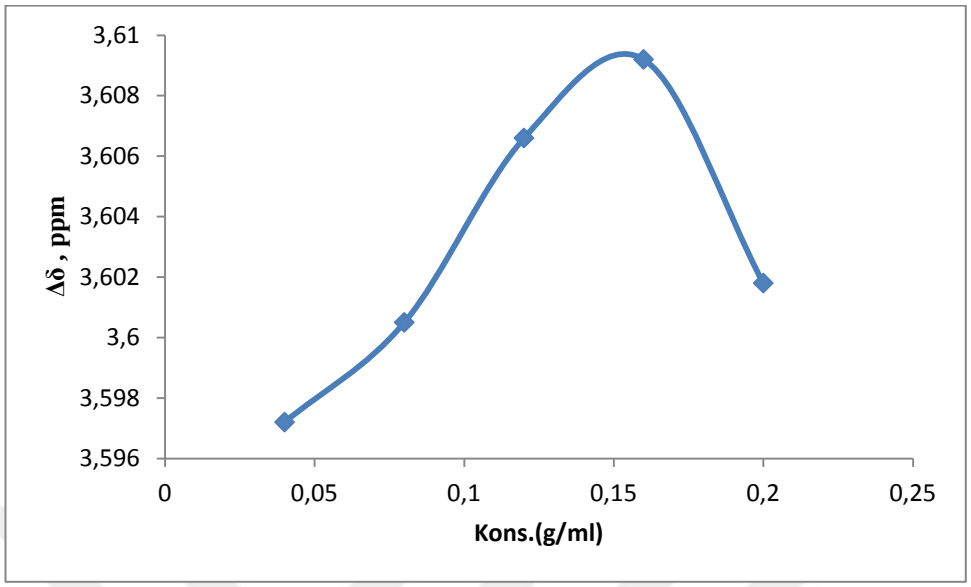
Şekil 4.43. Maltose'un 10. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



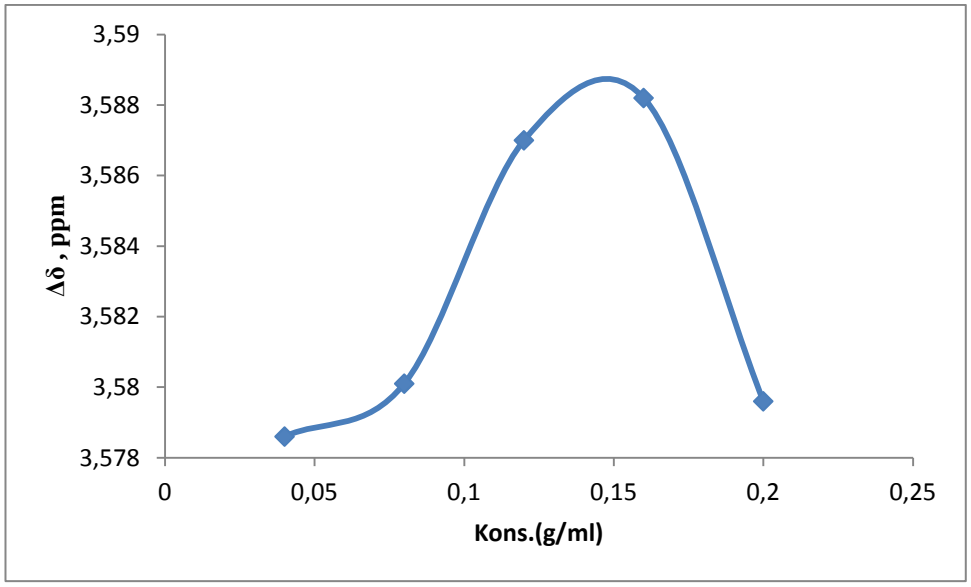
Şekil 4.44. Maltose'un 11. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



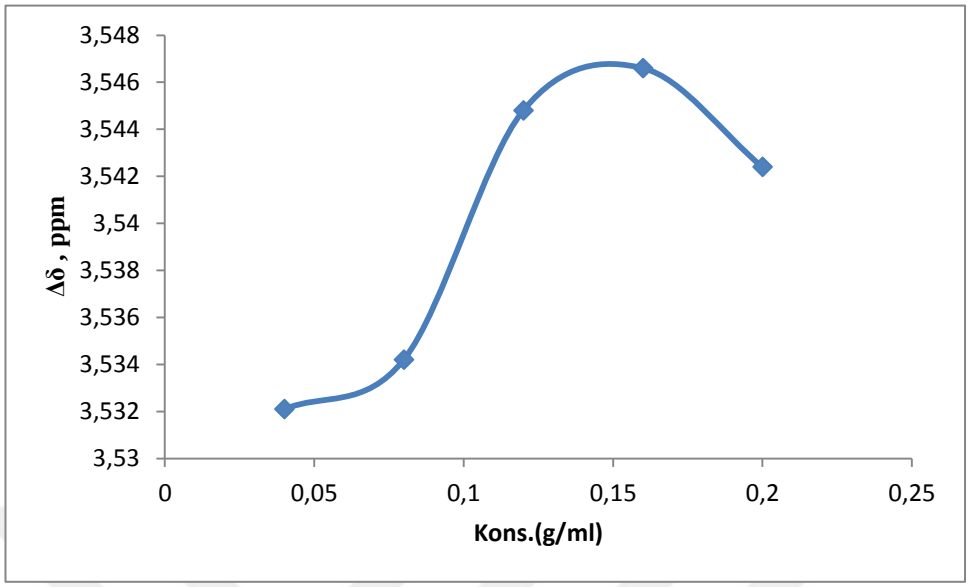
Şekil 4.45. Maltose'un 12. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



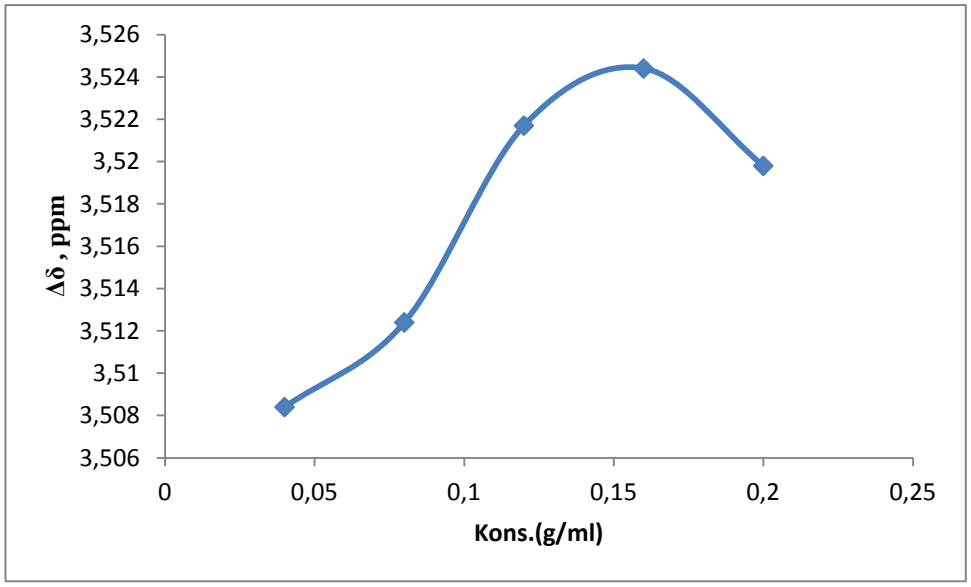
Şekil 4.46. Maltose'un 13. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



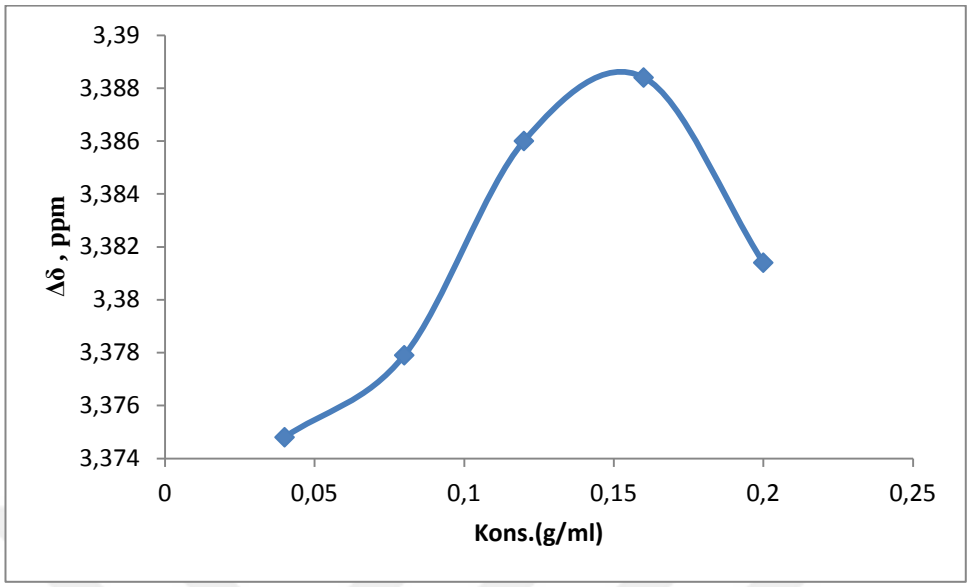
Şekil 4.47. Maltose'un 14. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



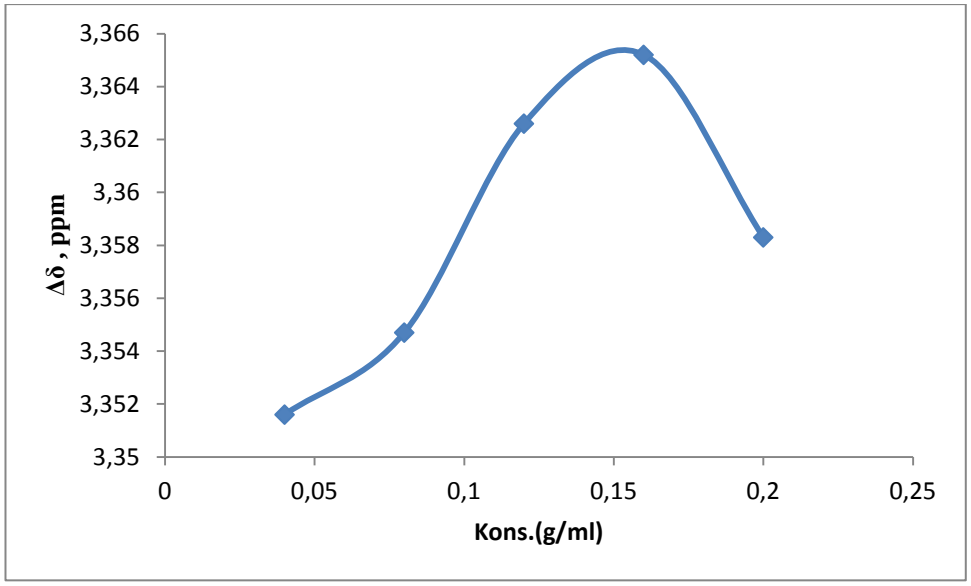
Şekil 4.48. Maltose'un 15. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



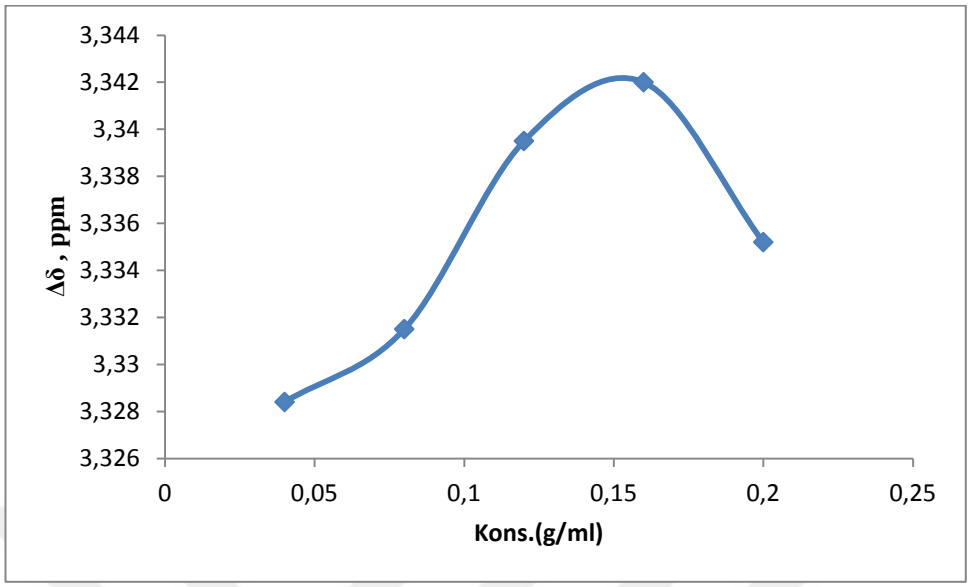
Şekil 4.49. Maltose'un 16. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



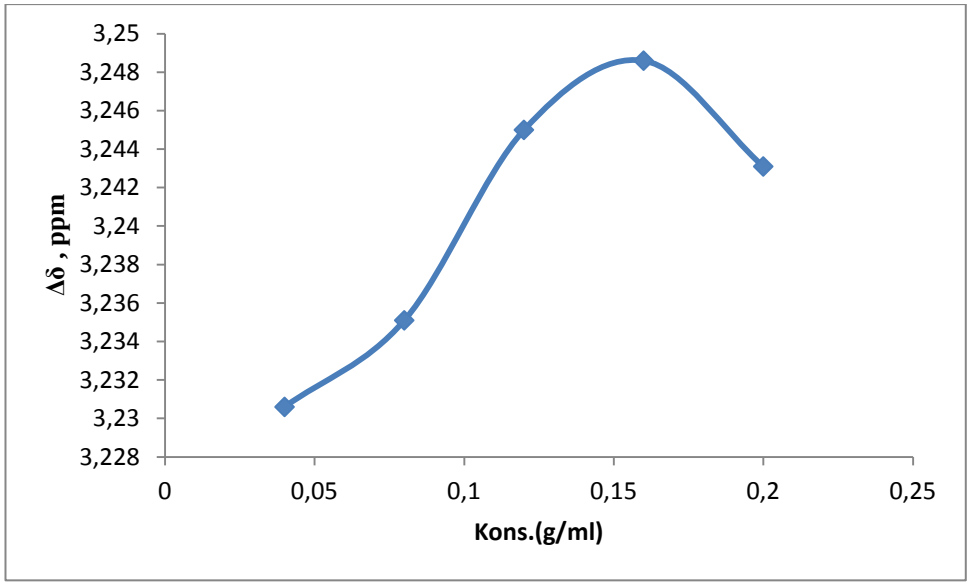
Şekil 4.50. Maltose'un 17. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



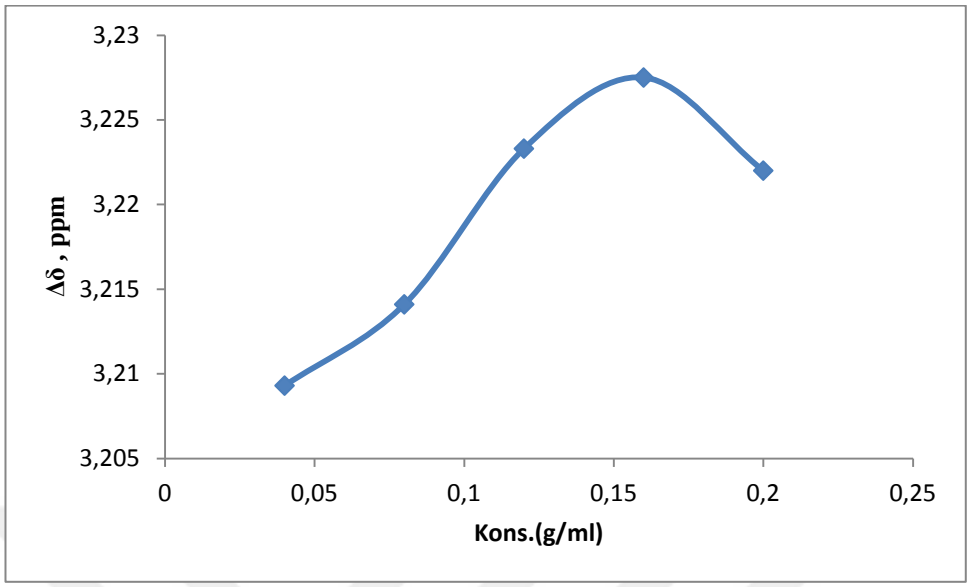
Şekil 4.51. Maltose'un 18. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



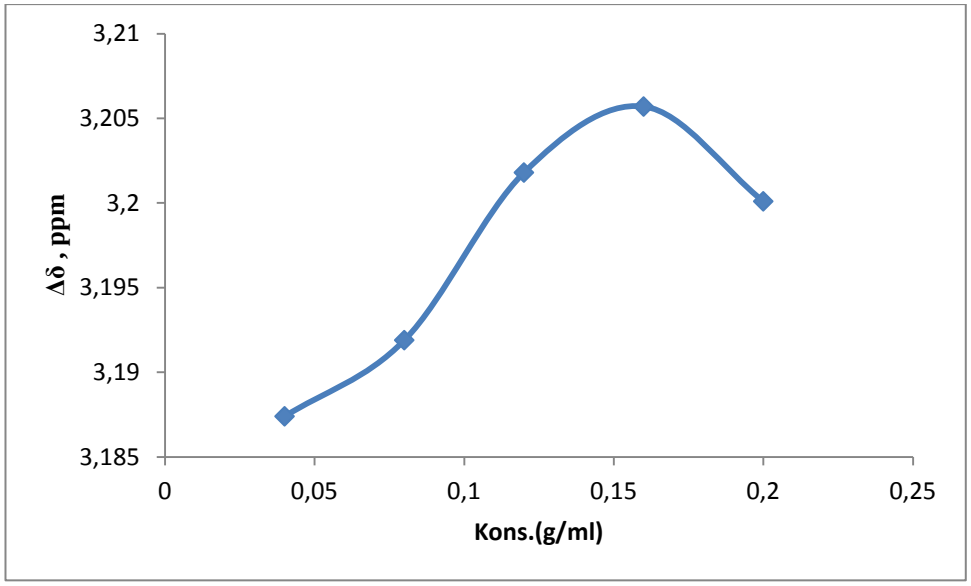
Şekil 4.52. Maltose'un 19. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



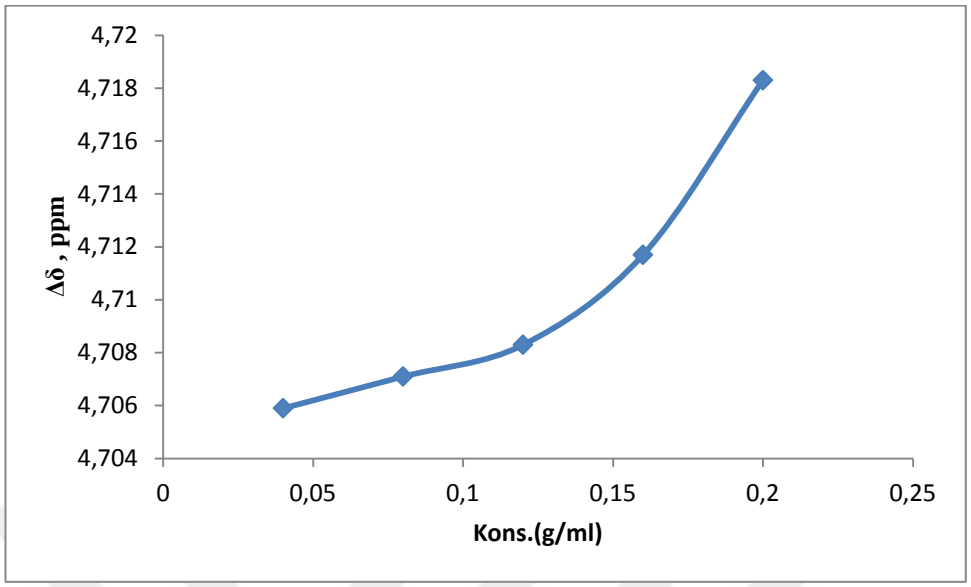
Şekil 4.53. Maltose'un 20. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



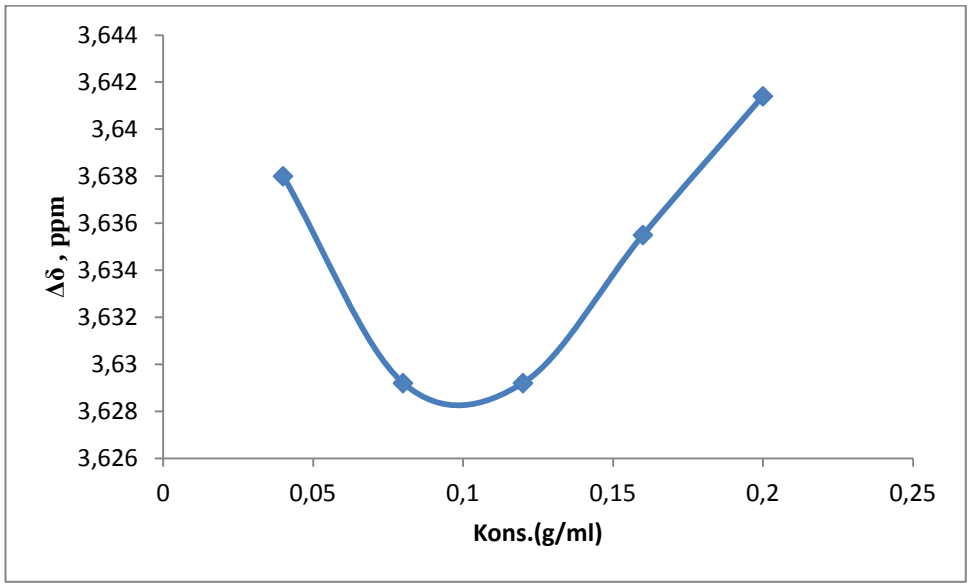
Şekil 4.54. Maltose'un 21. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



Şekil 4.55. Maltose'un 22. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



Şekil 4.56. BSA çözeltisinin 1. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği



Şekil 4.57. BSA çözeltisinin 2. piki için konsantrasyona bağlı kimyasal kayma değişim grafiği

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada sucrose, pepsin, maltose ve BSA protein ve enzim çözeltilerindeki suyun kimyasal kayması protein konsantrasyonlarına bağlı olarak incelenmiştir.

Hızlı kimyasal değiş-tokuş durumunda gözlenen sinyalin kimyasal kayması

$$\delta_{ort} = P_s\delta_s + P_b\delta_b \tag{5.1}$$

şeklinde yazılır(Jardetzky ve Roberts 1981).

Diğer yandan $P_s + P_b = 1$ ya da $P_s = 1 - P_b$ yazılır. Bu eşitlik denklem (5.1)' e yerleştirilirse

$$\delta_{ort} = (1 - P_b)\,\delta_s + P_b\delta_b$$

$$\delta_{ort} = \delta_s - P_b\delta_S + P_b\delta_b$$

$$\delta_{ort} = \delta_s + (\delta_b - \delta_S)P_b$$

$$\delta_{ort} = \delta_s + (\delta_b - \delta_S)C.k$$

$$\delta_{ort} = \delta_s + [(\delta_b - \delta_S).k\,]C \tag{5.2}$$

haline gelir. Burada C protein konsantrasyonu olmaktadır.

BSA'nın 1.pikinin kimyasal kayması lineer çıktığına göre su protonu bağlı ve serbest faz arasında hızlı gidip gelmektedir. Bu önceki çalışmalarla da uyumludur(Haward ve Smakes 2005, Oıda 1986).

Diğer piklere gelince proton bu maddelerde bağlı ve serbest faz arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş yapmamaktadır. Eğer hızlı kimyasal değiş-tokuş yapmış olsaydı ilişkinin üsteki formüldeki gibi lineer olması gerekirdi. Bu eğrileri hızlı kimyasal değiş-tokuşa göre yorumlamak istersek, sukrose için 0,3 g/ml'ye kadar bir lineer ilişki bundan sonra başka bir lineer ilişki düşünülebilir. İlk bölgedeki konsantrasyonla lineer azalış mantıklı olmamaktadır. Bu nedenle 0,3 g/ml'den sonra ki artış belki hızlı kimyasal değiş-tokuşa uyabilir.

Maltose için belli bir konsantrasyona kadar lineer artıyor görülmektedir. Sanki hızlı kimyasal değiş-tokuş gözlemlenmektedir. Ama daha sonra bu hızlı kimyasal değiş-tokuş olayı ortadan kalkıyor gibi görünmektedir.

Global olarak bakarsak diğer pikler için hızlı kimyasal değiş-tokuş yok gibidir. Fakat bazı bölgelerin belli konsantrasyonlarında var olduğu gözlemlenebiliyor. (Harris ve ark. 1996, Hori ve ark. 2002, Kato ve ark. 2007, Pearson ve ark. 1997, Wishart ve ark. 1991)

Sonuç olarak, BSA dışında, kimyasal kaymalar konsantrasyonla düzensiz değişmektedir. Bu nedenle BSA dışındaki maddelerin kimyasal kaymaları konsantrasyondan etkilendiği ancak bu etkilenmenin lineer olmadığı sonucuna varılmıştır. Etkilenme lineer olmadığı için, BSA dışındaki maddeler için proton kimyasal değiş-tokuşu hızlı değildir.

6. KAYNAKLAR

Apaydın, F. 1996. Manyetik Rezonans Temel İlkeler Deney Düzenekleri Ölçüm Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 20, 72, 268-271

Aydın, M. 2000. Protein çözeltilerinin NMR T_1'i için önerilmiş T_1 Durulma Memanizmalarının karışlaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü , Diyarbakır

Bernheim, R.A., Brown, T.H., Gurowsky, H.S. and Woessner, D.E. 1959. Temperature Dependence of Proton Relaxation Times in Aqueous Solutions of Paramagnetic Ions. The Journal of Chemical Physics, 30, 4

Bloembergen, N., Purcell, E.M. and R.V 1947. Pound Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. Nature,160, 475.

Danskiewich, O.K., Hennel, J.W.,Lubas, B., 1963. Proton magnetic relaxation and protein hydration. Nature, 200:1006, 1007.

Eley, D.D. ,Hey, M.J. and Ward, A.J.I., 1974. Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Augeous Bovine Albumin Solutions. J.Chem.Soc. Faraday Transact. I, 5:1106-1113

Grösch, L. and Noack, F., 1976. NMR Relaxation İnvestigation of Mobility in Aqueous Bovine Serum Albumin solutions. Biochimicia et Biopysica Acta, 1945:218-232

Gurowsky, H.S., and Mc Call, D.W. 1953. Nuclear Magnetic Resonance Multiplets in Liquids. The Journal of Chemical Physics, 21, 2

Gurowsky, H.S. and Sanka, A. 1953. Dissociation, Chemical Exchange and Proton Magnetic Resonance in some Aqueous Electrolytes. The Journal of Chemical Physics, 21, 10

Hackleman, William R. and Hubbord, Paul S. 1963. Nuclear Magnetic Relaxation and diffusion in Diffusion SF. The Journal of Chemical Physics, 39, 10

Hansen, P.E. 2000. Isotope effects on chemical shifts of proteins and peptides. Mag. Reson. Chem.,38: 1-10

Harris, R., Patel, S.U., Sadler, P.J. and Viles, J.H. 1996. Observation of Albumin Resonances in Proton Nuclear Magnetic Resonane Spectra of Human Blood Plasma: N-Terminal Assignment Aided by Use of Modified Recombinant Albumin. Analyst, 121:913-922

Haward, M.J. and Smakes, C.M. 2005. NMR Analysis of synthetic Human Serum Albumin α – Helix 28 Indentifies Structural Distotion upon Amodari Modification. The Journal of Biological Chemistiry, 280 (24):22582-22589

Hori, S., Yamauchi, K., Kuroki, S. and Ando, I. 2002. Proton NMR Chemical Shift Behavior of Hydrogen-Bonded Amide Proton of Glycine-Containing Peptides and Polypeptides as Studied by ab initio MO Calculation. International Journal of Molecular Sciences, 3:907-913

Jardetzky O. And Roberts G.C.K. 1981. NMR in Molecular Biology. Academic Press, Inc.London, England, 118

Kato, H., Feng, H. And Boi, Y. 2007. The Folding Pathway of Lysozyme:The High-resolution Structure and Folding of a Hidden Intermediate. J.Mol.Biol., 365:870-880

Koenig, S.H. and Schillinger, W.E. 1969. Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solution. J. Biol. Chem., 244 (12): 3283-3289.

Luo, J., He, X., Andre' d'Avignon, D., Ackerman, J.J.H. and Yablonskiy, D.A. 2010. Protein-Induced Water H MR Frequency Shifts: Contributions from Magnetic Susceptibility and Exchange. J Magn Reson, 202 (1):102

Nolle, A.W. and Morgan, L.O. 1957. Frequency Dependence of Proton Spin Relaxation in Aqueous Solutions of Paramagnetic Ions. The Journal of Chemical Physics, 26, 3

Oıda, T. 1986. ^{1}H-NMR Study on the Interactions of Human Serum Albumin with Free Fatty Acid. J.Biochem., 100:1533-1542

Pearson, J.G., Le, H., Sanders, L.K., Godbout, N., Havlin, R.H. and Oldfield, E. 1997. Predicting Chemical Shifts in Proteins: Structure Refirement of Voline Residues by Using ab Inittio and emprical Geometry Optimizations. J.Am.Chem.Soc., 119:11941-11950

Pearson, R.G., Palmer,J., Anderson, M.M. and Allred, A.L. 1960. Exchange Reactions in Complex Ions by NMR. Zeitschrift fur Electrochemie, Bd 64, Nr 1

Pendred, T.L., Pritchard A.M., and Rrichards, R.E. 1966. Spin-Lattice Relaxation Times of Protons in some organic compounds. Inorg Phys. Theor. (A) 1009-1012

Solomon, I., and Bloembergen, N. 1956. Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. The Journal of Chemical Physics, 25, 2

Wishart, D. S., Sykes, B. D. and Richards, F. M. 1991. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. Journal of Molecular Biology, 222:311-333

Zimmerman, J. R. and Brittin, W. E. 1957. Nuclear Magnetic Resonance Studies in Multiple phase systems: Lifetime of a Water Molecule in an Adsorbing Phase on Silica Gel., (61):1328-1331

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Manisa'da tamamladım. 1998 yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fizik Öğretmenliği Bölümünü kazandım ve 2003 yılında mezun oldum. 2009-2010 Eğitim-Öğretim yılında Dicle Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalında Yüksek lisans Eğitimine başladım. Halen Milli Eğitim Bakanlığı'nda Fizik Öğretmeni olarak görev yapmaktayım.