



# PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

**Biofizyka molekularna**

**Przypisanie sygnałów NMR łańcucha głównego białka  
ubikwityny z wykorzystaniem eksperymentów  
potrójnego rezonansu (PBdZ38)**

**mgr Michał Górka**



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



## Cel ćwiczenia

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR - *nuclear magnetic resonance*) jest wszechstronną techniką badawczą umożliwiającą badanie różnorodnych fizycznych i chemicznych właściwości atomów i cząsteczek chemicznych. Metoda ta jest powszechnie stosowana do badania struktury i dynamiki cząsteczek organicznych w roztworach (*solution-state NMR*) i jest drugą, po dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, najczęściej stosowaną metodą wyznaczania struktury przestrzennej makrocząsteczek biologicznych. Możliwość badania konformacji makrocząsteczek w roztworze oznacza, że stosując spektroskopię NMR badać można cząsteczki nie tworzące kryształów, jak wiele peptydów czy małych białek, a także tzw. białka natywnie nieustrukturyzowane (*IDPs - intrinsically disordered proteins*), będących coraz częstszym obiektem badań biofizycznych.

Niezależnie od celu badań (wyznaczenie struktury, badania dynamiki czy wiązania innych cząsteczek chemicznych) pierwszym etapem w badaniach techniką NMR jest zazwyczaj uzyskanie tzw. przypisania sygnałów (*signal assignment*), to jest znalezienia dla poszczególnych sygnałów (*peaks*) na widmie odpowiadających im układów spinowych, tj. grup jąder w cząsteczce. Jakikolwiek błąd w przypisaniu sygnałów mogą prowadzić do wyciągnięcia błędnych wniosków z dalszych badań. Ponieważ wykonanie przypisania sygnałów dla tak dużych cząsteczek chemicznych jak białka jest złożonym problemem opracowano bogatą metodologię jego wykonywania oraz opracowano wiele wyspecjalizowanych eksperymentów. Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z tą metodologią przez samodzielne wykonanie przypisania sygnałów dla małego globularnego białka ubikwityny (76 aminokwasów, 8.6 kDa) z zastosowaniem tzw. eksperymentów potrójnego rezonansu (*triple resonance*) – wielowymiarowych widm rejestrowanych dla znakowanych izotopowo (minimum  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ) białek. Eksperymenty takie stanowią podstawowe narzędzie współczesnej spektroskopii NMR białek.

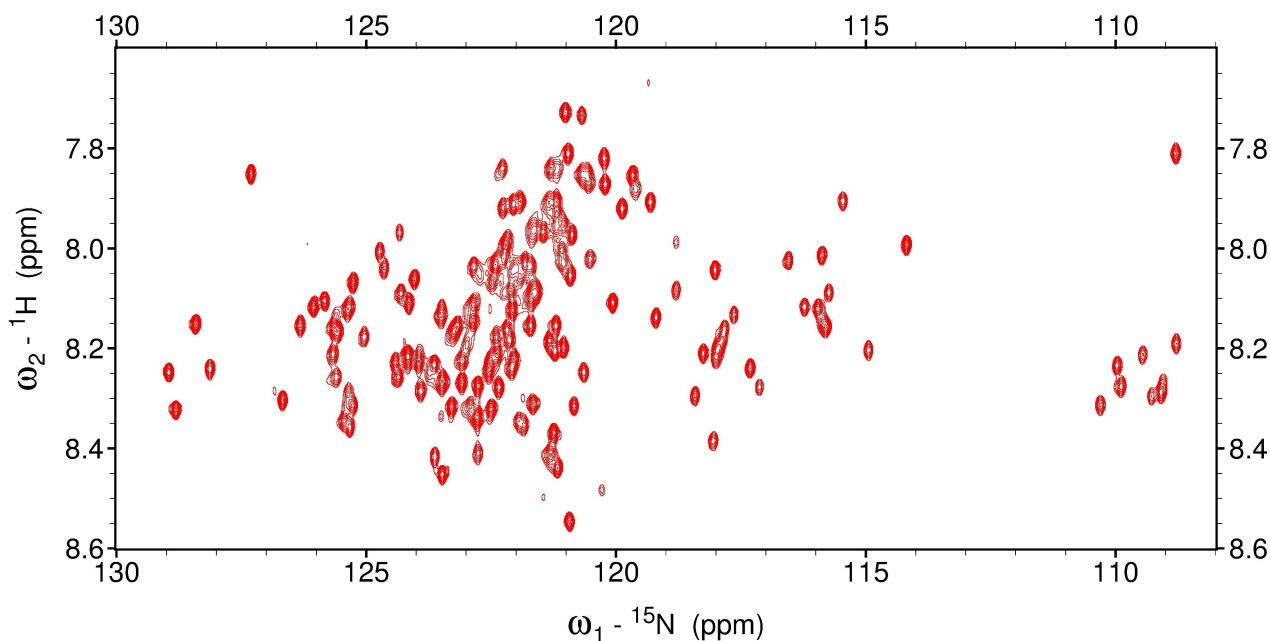
## Wstęp

### Podstawy

Teoretyczny opis zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego oraz jednowymiarowej spektroskopii NMR przedstawiony został na wykładzie „Spektroskopia molekularna” oraz w zebranej na końcu opisu literaturze. Wielowymiarowe eksperymenty NMR opierają się na precyzyjnym sterowaniu ewolucją czasową stanu badanego układu i do ich pełnego opisu niezbędne jest zastosowanie metod mechaniki kwantowej układów złożonych. Dla zrozumienia, jakie informacje uzyskać można przez analizę zarejestrowanych widm wystarczający powinien być jednak uproszczony opis fenomenologiczny. Będzie on tutaj ograniczony do spektroskopii impulsowej, w stanie ciekłym, jąder o spinie  $\frac{1}{2}$  i poruszał wyłącznie zagadnienia bezpośrednio związane z wykonywanymi w ramach ćwiczenia eksperymentami.

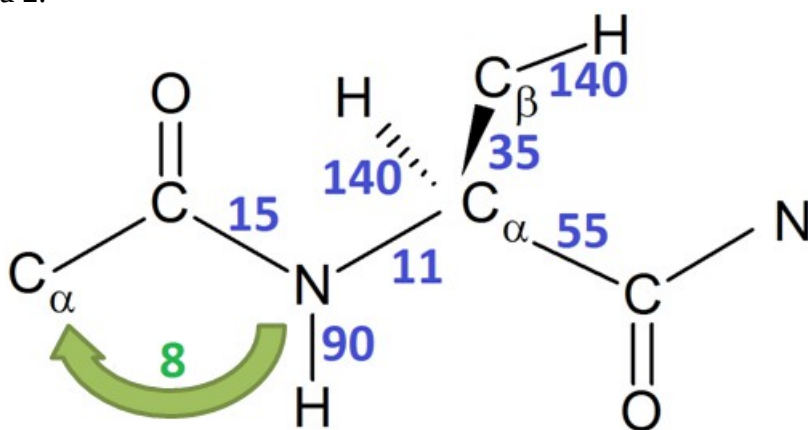
Każdemu jądro o spinie  $\frac{1}{2}$  przypisać można parametr nazywany przesunięciem chemicznym  $\delta$  (liczbę rzeczywistą). Trzeba przy tym pamiętać, że poszczególne izotopy (wodór-1, węgiel-13...) mają osobne skale przesunięć chemicznych. Uzyskanie z badań NMR informacji o strukturze i dynamice cząsteczek uwarunkowane jest możliwością uzyskania tzw. przypisania przesunięć chemicznych (*resonance assignment*), czyli określenia przesunięcia chemicznego poszczególnych jąder danej cząsteczki, z dokładnością do ich położenia w jej strukturze chemicznej.

By móc przystąpić do przypisywania przesunięć chemicznych musimy mieć możliwość określenia, jakie przesunięcia chemiczne występują w cząsteczce. Precyzja pomiaru widm jednowymiarowych jest skończona, podobnie jak szerokość obserwowanych na nich sygnałów. Z uwagi na to, dla dużych cząsteczek, w szczególności białek, na widmach jednowymiarowych zazwyczaj nie udaje się wyodrębnić sygnałów od poszczególnych jąder. Rozwiązaniem tego problemu jest rejestracja widm wielowymiarowych, która przynosi dwa skutki. Po pierwsze sygnały na takich widmach pochodzą od kilku jąder (2 dla widm dwuwymiarowych, 3 dla trójwymiarowych...) i n-tki (pary, trójki) liczb mają większą szansę różnić się od siebie niż pojedyncze liczby. Po drugie odpowiednio projektując eksperyment można ograniczyć liczbę sygnałów na widmie. Dla przykładu na widmie  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (Rys. 1) pojawiają się wyłącznie sygnały od grup NH (w jednym wymiarze przesunięcie chemiczne protonu, w drugim azotu), choć na jednowymiarowym widmie protonowym w tym samym obszarze występować mogą sygnały zarówno od protonów z grup NH, jak i z pierścieni aromatycznych (np. z grup bocznych aminokwasów białka).



Rys. 1 Dwuwymiarowe widmo  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC białka ERD14 (185 reszt aminokwasowych).

Obok przesunięć chemicznych drugim ważnym typem parametrów są stałe sprzężenia skalarnego  $J$  między parami jąder. Ich wartości (w Hercach) są miarą siły oddziaływania między spinami, wykorzystywanego m. in. do przeprowadzania eksperymentów wielowymiarowych. Ponieważ duży wpływ na wielkości stałych sprzężenia ma liczba wiązań chemicznych dzieląca jądra w górnym indeksie umieszcza się ich odległość ( $^1J$  dla bezpośrednio połączonych jąder,  $^2J$  między protonami z tej samej grupy  $\text{CH}_2\dots$ ). W przypadku białek wartości stałych  $^1J$  i  $^2J$  są podobne w każdym aminokwasie i w znacznej mierze niezależne od ich pozycji w białku oraz jego konformacji przestrzennej. Wartości stałych sprzężeń w łańcuchu głównym białka nie zależą też od typu aminokwasu. Typowe wartości stałych sprzężeń w łańcuchu głównym białka przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2 Typowe wartości stałych sprzężeń (w Hz) przez jedno wiązanie i stałej sprzężenia przez dwa wiązania  $^2J_{\text{N-CA}}$  w białkach. Dla sprzężeń przez dwa i więcej wiązań nie pokazanych na rysunku wartość bezwzględna stałej sprzężenia nie przekracza 4 Hz.

### ***Eksperymenty wielowymiarowe***

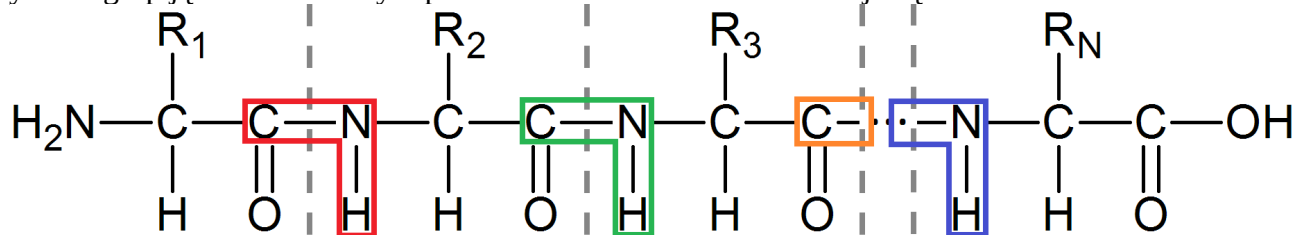
Proste eksperymenty wielowymiarowe opierają się na następującym schemacie: wzbudzone jest jądro  $N_1$ , następnie wzbudzenie przenoszone jest przez jądra (o spinie  $\frac{1}{2}$ )  $N_2$  do  $N_n$  i podlega detekcji na jądrze  $N_n$ . Zbiór kolejnych jąder, przez które przenoszone jest wzbudzenie określa się mianem przepływu koherencji (*coherence transfer*), a przenoszenie wzbudzenia nazywane jest przeniesieniem polaryzacji. Projektując eksperyment NMR można wybrać, dla których spośród jąder od  $N_1$  do  $N_{n-1}$  rejestrowane będą przesunięcia chemiczne (dla  $N_n$  zawsze rejestrowane), to jest określić wymiarowość eksperymentu. Zwiększanie wymiarowości eksperymentów, podobnie jak przedłużanie ścieżki przepływu koherencji, zazwyczaj pociąga za sobą utratę czułości wynikowego widma i wydłuża czas potrzebny na jego rejestrację. Z przyczyn praktycznych jądra  $N_1$  i  $N_n$  to prawie zawsze protony, silnie oddziałujące z zewnętrznym polem magnetycznym. Czas potrzebny na przeniesienie polaryzacji jest proporcjonalny do odwrotności stałej sprzężenia między jądrami i z uwagi na konkurencję z innymi (niepożądanymi w danychi eksperymentcie) przepływami koherencji przeniesienia wykonuje się między parami jąder o wysokich (minimum kilka Hz) stałych sprzężenia  $J$ . W praktyce oznacza to pary jąder bezpośrednio połączonych wiązaniami chemicznymi. W przypadku białek wyjątek stanowi przeniesienie polaryzacji między azotami amidowymi, a węglami  $\alpha$  – stałe sprzężenie dla pary jąder z tej samej reszty aminokwasowej i pary (azot z  $i$ -tej reszty, węgiel  $\alpha$  z reszty  $i-1$ ) mają zbliżoną wartość (11 i 8 Hz) i wykorzystanie takiego przeniesienia prowadzi do rozdzielenia się sygnałów na widmie, połączonego z obniżeniem jego czułości.

### ***Nazewnictwo eksperymentów wielowymiarowych***

Najprostszy sposób konstrukcji nazwy wielowymiarowego eksperymentu NMR polega na zapisaniu symboli kolejnych typów jąder, przez które przekazywana jest polaryzacja, zaczynając od jądra wzbudzanego, a kończąc na jądrze dla którego prowadzona jest detekcja sygnału. W przypadku białek głównymi typami jąder są: N (azot amidowy), CA (węgiel  $\alpha$ ), HA (proton  $\alpha$ ), CB (węgiel  $\beta$ ), HB (proton  $\beta$ ), CO (węgiel karbonylowy) i HN (wodór amidowy). Fragmenty HNN i NNH skracane są do odpowiednio HN i NH. Jeżeli dla danego jądra przesunięcie chemiczne nie jest rejestrowane jego symbol umieszcza się w nawiasie. W przypadku protonów (analogicznie dla węgli)  $\alpha$  i  $\beta$  czasami rejestruje się ich przesunięcia chemiczne w jednym wymiarze eksperymentu i zapis HBHA (odpowiednio CBCA) odpowiada tylko jednemu wymiarowi eksperymentu. Jeżeli przepływ koherencji ma charakter symetryczny względem środkowego jądra (np. 3D (HN)CONH), to powtarzający się fragment pomija się (tu: 3D HNCO).

### ***Układy spinowe i przypisanie przesunięć chemicznych***

Grupy jąder odpowiadających poszczególnym sygnałom na widmach wielowymiarowych nazywa się układami spinowymi (spin systems). Najprostsza strategia wykonania przypisania przesunięć chemicznych polega na rejestracji pary eksperymentów w których cząsteczka chemiczna dzielona jest na rozłączne układy spinowe (przykład dla 3D HNCO na rysunku 3). Jeżeli układy z dwóch eksperymentów częściowo się nakładają porównując odpowiednie przesunięcia chemiczne możliwe jest ustalenie kolejności występowania poszczególnych układów spinowych w cząsteczce. Grupy układów spinowych o znanej kolejności nazywane są łańcuchami (*chains*). Jeżeli łańcuchy te będą dostatecznie długie i/lub uzyskamy dodatkowe informacje o układach spinowych (np. że dany układ spinowy odpowiada jądom z reszty alaniny) powinno to umożliwić przypisanie układów spinowych do grup jąder o określonym położeniu w strukturze chemicznej cząsteczki.



Rys. 3 Układy spinowe (różne kolory) odpowiadające poszczególnym sygnałom widocznym na widmie 3D HNCO.

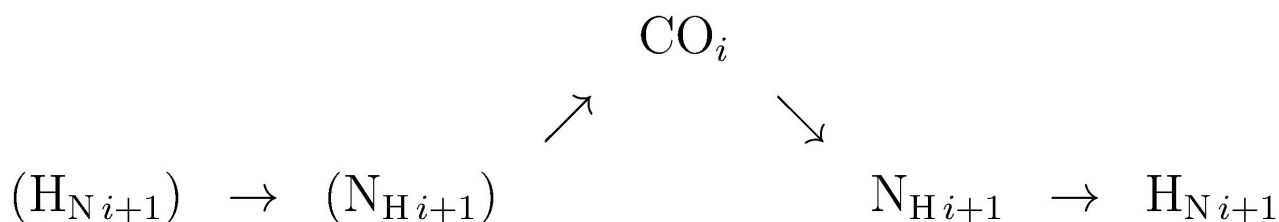
#### **Przegląd eksperymentów wykorzystanych w ćwiczeniu**

Indeksy na przepływach koherencji określają względną numerację reszt aminokwasowych z których pochodzą poszczególne jądra.

- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC

Prostym przykładem eksperymentu wielowymiarowego jest najpowszechniej rejestrowany dla białek dwuwymiarowy eksperyment  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*). Wzbudzane są tu protony amidowe, polaryzacja przenoszona jest na połączony z protonem wiązaniem chemicznym atom azotu, a następnie z powrotem na proton, po czym rejestrowany jest sygnał. Każda reszta aminokwasowa (z wyjątkiem prolin, dla których brak protonów amidowych i N-końcowej grupy aminowej, która może dać dwa sygnały) daje jeden sygnał na tym widmie (dodatkowo pojawiają się sygnały z grup NH łańcuchów bocznych). Z uwagi na powyższe jest to podstawowe widmo pozwalające na określenie jakości próbki. Śledząc zmiany położenia sygnałów na tym widmie bada się między innymi stabilność konformacji białka (w zależności od temperatury czy składu buforu) czy wiązanie innych cząsteczek.

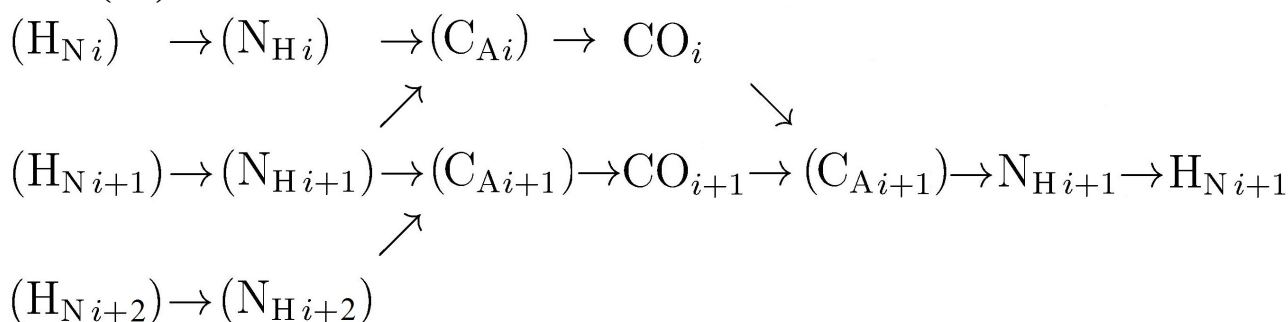
- 3D HNCO



Rys. 4 Przepływ koherencji w eksperymencie 3D HNCO.

Jest to najbardziej czuły spośród eksperymentów „potrójnego rezonansu”. Z przepływu koherencji (rys. 4) wynika, że dzieli on łańcuch główny białka na rozłączne układy spinowe, z nie więcej niż jednym układem na resztę aminokwasową. Z uwagi na brak protonów amidowych w prolinie układ który zawierałby węgiel karbonylowy reszty poprzedzającej prolinę i azot proliny nie występuje na widmie.

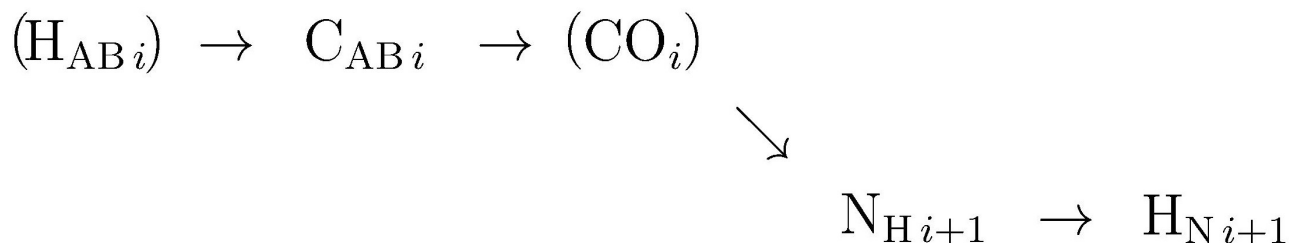
- 3D HN(CA)CO



Rys. 5 Przepływ koherencji w eksperymencie 3D HN(CA)CO.

Z uwagi na wykorzystanie przeniesienia polaryzacji N-CA (rys. 5) na widmie pojawiają się dwa zestawy sygnałów – pierwszy taki sam jak na widmie 3D HNCO (sygnały możemy znaleźć przez nałożenie na siebie obu widm), drugi inny. Łącznie z 3D HNCO dla danej pary NH otrzymujemy informacje o przesunięciach chemicznych węgla karbonylowych zarówno z własnej reszty aminokwasowej, jak i poprzedzającej. Sama taka informacja nie wystarcza do ustawienia układów spinowych w łańcuchy, ale może stanowić ważne uzupełnienie informacji z opisanych poniżej eksperymentów i/lub umożliwić weryfikację otrzymanych łańcuchów.

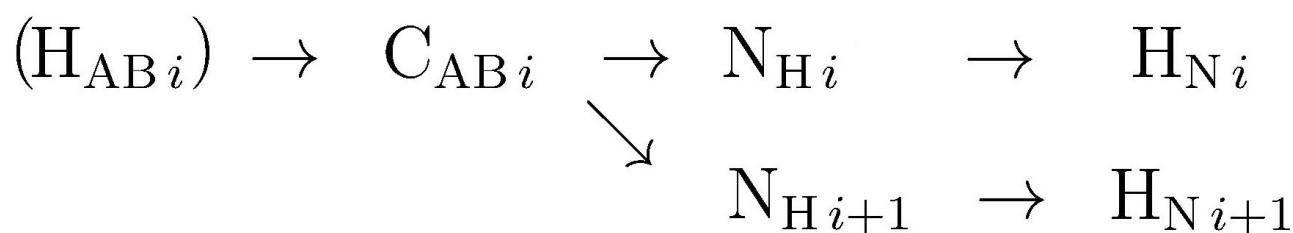
- 3D (HBHA)CBCA(CO)NH



Rys. 6 Przepływ koherencji w eksperymencie 3D (HBHA)CBCA(CO)NH.

Na widmach takich widać dwa zestawy sygnałów, odpowiadających trójkom  $\text{C}_{\text{A}i}\text{-H}_{\text{N}i+1}\text{-N}_{\text{H}i+1}$  i  $\text{C}_{\text{B}i}\text{-H}_{\text{N}i+1}\text{-N}_{\text{H}i+1}$ . W literaturze często nazywa się ten eksperyment 3D CBCA(CO)NH.

- 3D (HBHA)CBCANH



Rys. 7 Przepływ koherencji w eksperymencie 3D (HBHA)CBCANH.

Jak wynika z przepływu koherencji (rys. 7) na widmie tym wystąpią cztery zestawy sygnałów – dwa takie same jak na 3D (HBHA)CBCA(CO)NH (można je rozpoznać przez nałożenie widm) oraz zestawy  $C_{A\ i}-H_{N\ i}-N_{H\ i}$  i  $C_{B\ i}-H_{N\ i}-N_{H\ i}$ . Sygnały od CB i CA mają na tym widmie przeciwne znaki. Łącznie z widmem 3D (HBHA)CBCA(CO)NH eksperyment ten dostarcza informacji o przesunięciach chemicznych węgla  $\alpha$  i  $\beta$  z danej reszty aminokwasowej i reszty poprzedzającej, co zazwyczaj pozwala na ustawienie układów spinowych w łańcuchy. Brak sygnałów od węgla  $\beta$  dla danego układu spinowego wraz z wyraźnie niższymi wartościami przesunięć chemicznych węgla  $\alpha$  pozwala właściwie jednoznacznie zidentyfikować glicyny. Charakterystyczne wartości przesunięć chemicznych węgla  $\beta$  pozwalają zazwyczaj na zidentyfikowanie także reszt seryny i treoniny oraz alaniny. Razem z łańcuchami układów spinowych może to wystarczyć do wykonania przypisania przesunięć chemicznych. Eksperyment określany jest też mianem 3D CBCANH.

## Przebieg ćwiczenia

**Tydzień pierwszy** - rejestracja widm i zapoznanie się z programami do ich analizy

### Dzień 1.

Po zapoznaniu się ze spektrometrem i zasadami pracy z nim:



1. Próbkę umieścić w turbince (*spinner*) i po wyśrodkowaniu słupa cieczy na wysokości odpowiadającej środkowi cewki odbiorczej sondy wprowadzić razem z turbinką do spektrometru.
2. Zestroić kanał protonowy sondy i sprawdzić strojenie kanałów dla azotu i węgla.
3. Włączyć układ utrzymujący stałą wartość pola magnetycznego w czasie (tzw. układ locku) i ustawić jego parametry (moc impulsu, wzmocnienie sygnału, poprawka fazowa).
4. Zwiększyć homogenność pola magnetycznego wewnątrz próbki przez zmiany napięć w cewkach pomocniczych spektrometru (tzw. shimowanie).
5. Przeprowadzić kalibrację impulsu protonowego przez znalezienie czasu trwania impulsu obracającego sygnał wody o 360 stopni.
6. Zarejestrować widmo 2D 1H, 15N HSQC. Ustalić poprawki fazowe i zakres spektralny dla eksperymentów 3D.
7. Zarejestrować płaszczyznę 1H-13C eksperymentu 3D HNCQ. Określić zakresy spektralne dla eksperymentów 3D.
8. Przygotować rejestrację eksperymentu 3D HNCQ tak, by zakończył się przed początkiem kolejnego dnia pracowni.

### **Dzień 2.**

1. Zarejestrować płaszczyznę 13C-1H eksperymentu 3D (HBHA)CBCA(CO)NH. Określić zakresy spektralne dla eksperymentów 3D.
2. Przygotować rejestrację eksperymentu 3D HN(CA)CO tak, by zakończyła się przed początkiem kolejnego dnia pracowni.
3. Zarejestrowane widmo 3D HNCQ poddać transformacji Fouriera i zapisać w formacie programu Sparky.
4. Zapoznać się z działaniem programu do analizy widm wielowymiarowych Sparky.

### **Dzień 3.**

1. Przygotować rejestrację eksperymentów 3D (HBHA)CBCA(CO)NH i 3D (HBHA)CBCANH tak, by zakończyły się przed początkiem kolejnego dnia pracowni. Uwzględnić należy dostępny czas pracy aparatury i wymogi co do rozdzielczości i czułości eksperymentów.
2. Zarejestrowane widmo 3D HN(CA)CO poddać transformacji Fouriera i zapisać w formacie programu Sparky.
3. Zapoznać się z praktyką pracy z kilkoma powiązаныmi widmami w programie Sparky.
4. Zapoznać się ze sposobem tworzenia dwuwymiarowych wycinków widm wysokowymiarowych (strip plots) oraz wykorzystywania ich do ustawienia układów spinowych w łańcuchy w programie Sparky.

**Tydzień drugi** - Wykonanie przypisania przesunięć chemicznych oraz przygotowanie opisu.

### **Dzień 4.**

1. Zarejestrowane widma poddać transformacji Fouriera i zapisać w formacie programu Sparky.  
Korzystając z programu Sparky:
2. Przygotować listę układów spinowych (N-H) na podstawie widma 3D HNCQ.
3. Korzystając z powyższej listy znaleźć sygnały na widmach 3D HN(CA)CO, 3D (HBHA)CBCA(CO)NH i 3D (HBHA)CBCANH. Oglądając odpowiednie wycinki widm sprawdzić czy lista sygnałów nie zawiera błędów.
4. Ustalić typy aminokwasów (dokładnie lub co do grupy) dla poszczególnych układów spinowych korzystając z informacji a przesunięciach chemicznych węgla alfa i beta.

## **Dzień 5.**

1. Wykonać ustawienie sekwencyjne dla jak największej liczby układów spinowych metodą strip-plot z wykorzystaniem widm 3D (HBHA)CBCA(CO)NH i 3D (HBHA)CBCANH. W przypadkach wątpliwych skorzystać dodatkowo z widm 3D HNCO i 3D HN(CA)CO.
2. Wykonać przypisanie układów spinowych do konkretnych pozycji w łańcuchu aminokwasowym na podstawie łańcuchów układów spinowych i informacji o typach aminokwasów.
3. Uzupełnić brakujące przypisania przez analizę informacji o nieprzypisanych układach spinowych i resztach aminokwasowych, dla których nie przypisano układów spinowych.

## **Dzień 6.**

1. Napisać/dokończyć raport z ćwiczenia.

## **Raport z wykonanego ćwiczenia**

Opis końcowy powinien mieć układ typowy dla raportu z badań doświadczalnych, w szczególności zawierać winien:

- streszczenie,
- krótki wstęp teoretyczny,
- opis wykorzystanej aparatury, badanego białka oraz przeprowadzonych eksperymentów (liczby punktów, szerokości spektralne) i sposobu przetwarzania danych (funkcje ważące),
- opracowanie uzyskanych danych, które zawierać powinno informacje o tym, jakie przesunięcia chemiczne (typ, ilość) udało się przypisać i ewentualnie o nieprzypisanych przesunięciach z komentarzem, co do możliwych przyczyn braku przypisań i sposobu, w jaki można by je uzyskać. W pracy znaleźć się powinna ilustracja widma  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC z naniesionymi przypisaniami. Należy skomentować przydatność poszczególnych widm dla procesu przypisania sygnałów (czy występowało nakładanie się sygnałów, czy pochodzące z nich informacje wystarczały do wykonania przypisania, czy niezbędne było wykorzystanie wszystkich widm...). Określić, czy informacje z różnych widm były ze sobą spójne oraz czy przypisane przesunięcia chemiczne odbiegają od wartości typowych dla poszczególnych typów aminokwasów.

## **Kolokwium wstępne**

Przystąpienie do wykonywania ćwiczenia uwarunkowane jest zaliczeniem kolokwium wstępnego, przeprowadzonego w formie określonej przez osobę prowadzącą ćwiczenie. Osoby przystępujące do ćwiczenia powinny zapoznać się z podaną na końcu niniejszego opisu literaturą. Na kolokwium pojawić się mogą następujące zagadnienia:

- Izotopy o spinie  $\frac{1}{2}$  (w stanie podstawowym) ważnych biologicznie pierwiastków oraz ich abundancja naturalna.
- Spiny w (zewnętrznym) polu magnetycznym. Zjawisko rezonansu magnetycznego, współczynnik żyromagnetyczny.
- Ekranowanie jąder i pole efektywne. Definicja przesunięcia chemicznego  $\delta$  i powód wprowadzenia tej wielkości.
- Oddziaływania między spinami w cząsteczce. Stała sprzężenia J. Struktura subtelna widm i

multiplety.

- Jakościowy opis czynników wpływających na wygląd widma NMR na przykładzie prostego związku organicznego (np. etanol).
- Pojęcie transformaty Fouriera i jej wykorzystanie w spektroskopii NMR.
- Powody dla których rejestruje się widma dwu(i więcej)wymiarowe. Informacje dostarczane przez widma korelacyjne (np. COSY) i oparte o efekt Overhausera (NOESY).
- Struktura chemiczna białek, ogólne informacje o budowie poszczególnych aminokwasów.

## Literatura

Podstawowa:

- Podrozdziały 3.7 i 6.2 z  
David Sheehan *Physical Biochemistry. Principles and Applications. Second Edition.* Wiley-Blackwell, 2009
- Rozdziały J1 i J2 (opis implementacji eksperymentów wielowymiarowych - zastosowane impulsy - nie jest istotny) z  
Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai i Joseph Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function,* Cambridge University Press, 2007
- Materiały o spektroskopii NMR w cieczech z  
Peter Atkins *Chemia Fizyczna* PWN (lub w oryginale - OUP) dowolne wydanie

Uzupełniająca/rozszerzająca:

- Rozdział J3 z  
Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai i Joseph Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function*, Cambridge University Press, 2007  
(Opis wykorzystania spektroskopii NMR do badania struktury i dynamiki białek i kwasów nukleinowych)
- Kazimierczuk, K., Misiak, M., Stanek, J., Zawadzka-Kazimierczuk, A. i Koźmiński, W. (2012). *Generalized Fourier transform for non-uniform sampled data*. W *Novel Sampling Approaches in Higher Dimensional NMR* (strony 79-124). Springer Berlin Heidelberg.  
(Głównie przetwarzanie danych, czyli od zmierzonego sygnału do widma. Także prezentacja sposobu uzyskiwania widm o wysokiej wymiarowości i/lub rozdzielczości przez zastosowanie próbkowania niejednorodnego.)
- James Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy* Wiley, 2013  
(Dość przystępny opis teorii spektroskopii NMR na poziomie podstawowym, trzeba jednak uważać na odmienne niż przyjęte w fizyce wykorzystanie terminologii z zakresu mechaniki kwantowej - w szczególności pojęć stanu czystego i mieszanego oraz macierzy gęstości i zredukowanej macierzy gęstości.)