

AFINITNÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

VĚRA PACÁKOVÁ^a, KAREL ŠTULÍK^a,
SILVIE HUBENÁ^a a MARIE TICHÁ^b

^aKatedra analytické chemie, ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, e-mail: pacáková@natur.cuni.cz

Došlo dne: 10.VI.1999

Klíčová slova: afinitní kapilární elektroforéza, stanovení rovnovážných konstant, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Principy afinitní elektroforézy
3. Analýza rovnovážných směsí
4. Analýza založená na změně mobility
5. Požadavky na systém pro afinitní kapilární elektroforézu
6. Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze
 - 6.1. Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení
 - 6.2. Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení
7. Příklady použití afinitní kapilární elektroforézy
8. Závěr

1. Úvod

Současný pokrok v biologických vědách závisí do značné míry na vývoji nových moderních analytických separačních metod, jako jsou chromatografické a elektroforetické metody. Elektroforetické metody se využívají v biochemickém výzkumu již několik desítek let. Jejich výpovědní schopnost je vysoká, protože jsou založeny na důležitých charakteristikách biomolekul, jako jsou molekulová hmotnost a elektrický náboj. Metody, které využívají bioafinitní princip, mají další výhodu v tom, že se v nich uplatňuje snad vůbec nejvýznamnější vlastnost biomolekul, tj. specifické rozpoznávání, které tvoří základ všech vysoce selektivních biologických procesů. Aplikace elektroforézy ke studiu specifických interakcí vedla ke vzniku řady technik, které nesou obecný název „afinitní elektroforéza“, např.¹⁻³

Význam a rozsah aplikací elektroforetických metod značně vzrostl nedávným rozvinutím a komercializací kapilární elektroforézy (CE). Vysoká citlivost, vynikající rozlišovací schopnost, rychlost analýzy a dobrá přesnost stanovení, malý objem vzorků potřebný pro analýzu, nízká spotřeba reagensů a rozsáhlé možnosti automatizace jsou hlavní výhody CE ve srovnání např. s elektroforézou ve vrstvě nebo sloupci gelu. Kapilární elektroforéza, které je věnována řada monografií (např.⁴⁻⁶), se obvykle provádí v homogenním roztoku (kapilár-

ní zónová elektroforéza, CZE), avšak je možné využít kapilár naplněných gelem (kapilární gelová elektroforéza, CGE) nebo chromatografickou stacionární fází (kapilární elektrochromatografie, CEC). Afinitní elektroforéza v kapiláře se nazývá afinitní kapilární elektroforéza (ACE) a je využívána jak pro analytické účely, tak ke studiu molekulárních interakcí (viz přehledy⁷⁻¹⁸).

2. Principy afinitní elektroforézy

Dvě molekuly A a B, které mají různou elektroforetickou pohyblivost (μ_A , μ_B), vytvářejí komplex AB, jehož pohyblivost μ_{AB} se liší od pohyblivostí molekul A a B (v důsledku různého poměru náboje k hmotnosti),



kde k_{on} je rychlostní konstanta pro tvorbu komplexu a k_{off} je rychlostní konstanta pro jeho disociaci.

Existují v podstatě dva způsoby provádění ACE (cit.⁹):

1. Obě složky A i B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE),
2. jedna ze složek je imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu (CGE) či na chromatografickém nosiči (CEC).

Metodu CZE (ad 1) můžeme aplikovat dvěma různými způsoby v závislosti na rychlosti rozpadu vzniklého komplexu AB. Pokud je disociace komplexu AB pomalá vzhledem k době analýzy, můžeme v CZE přímo detegovat komplex. Analyzuje se vzorek, který obsahuje rovnovážnou směs receptoru a ligandu (analýza rovnovážných směsí). Pokud je disociace komplexu AB rychlá, komplex nelze detegovat. Komplexotvorné reakce však ovlivňují elektroforetické pohyblivosti interagujících složek (analýza založená na změně elektroforetických pohyblivostí).

Pohyblivost komplexu leží obvykle mezi pohyblivostmi složek A a B. Pokud je však jedna ze složek nerozpustná nebo imobilizovaná, pak pohyblivost komplexu je nulová. V případě interakcí proteinů s ligandy je změna náboje ligandu hlavním zdrojem změny pohyblivosti komplexu, protože změna molekulové hmotnosti je zanedbatelná.

Techniky prováděné v homogenním roztoku jsou nejrozšířenější, protože jsou aplikovatelné na široký rozsah analytů i separačních podmínek. Jsou použitelné za předpokladu, že tvorbou komplexu dojde k měřitelné změně pohyblivosti migrujících částic. V tomto případě lze určit vazebné konstanty vznikajících komplexů buď z měření posunů migračních časů nebo na základě zjištění koncentrací složek komplexu. Pokud separace volných složek od komplexu není dostatečná (separační faktor $R > 1$), nelze tuto techniku použít.

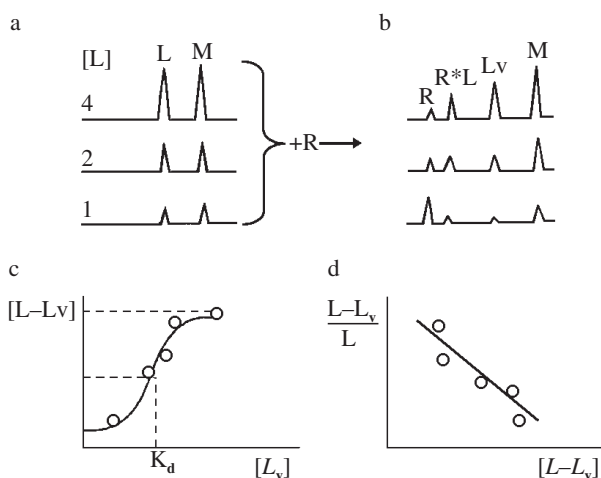
Techniky využívající imobilizovaných ligandů mají výhody i nevýhody⁹: Výhodou je, že interakce probíhají s maximální účinností. To však přináší i nevýhodu v tom, že

koncentrace aktivních molekul po imobilizaci je velmi nízká a tedy obtížně stanovitelná. Dále může dojít k pozměnění procesu rozpoznávání v důsledku imobilizace. Může být také obtížné regenerovat povrch s imobilizovaným ligandem, aniž by došlo ke snížení aktivity a koncentrace imobilizovaného materiálu.

3. Analýza rovnovážných směsí

Analýza rovnovážných směsí je vhodná pro systémy s pomalou kinetikou, což je většina systémů s vysokou afinitou. Oddělení komplexu od rovnovážné směsi a jeho detekce je nejprůběžnějším důkazem molekulárních interakcí mezi složkami. Koncentrace komplexu během analýzy klesá v důsledku disociace; proto jsou výhodné krátké doby analýzy, kterých se v CE běžně dosahuje. V tomto případě je CE pouze prostředkem, jak separovat a kvantifikovat volné a vázané molekuly.

Ligand a receptor, přítomné ve vzorku v různých poměrech, jsou po ekvilibraci separovány v CE systému a píky odpovídající volnému a vázanému ligandu vyhodnoceny. Třebaže koncentrace komplexu během CE analýzy klesá, koncentrace původních složek A a B se během analýzy nemění, protože jsou od komplexu separovány, nemohou se tudíž zúčastnit opětovné tvorby komplexu a reprezentují rovnovážné koncentrace. Rovnovážné konstanty a stechiometrie vazebné interakce se určí ze závislosti koncentrace vázaného ligandu $[L - L_v]$ na koncentraci volného ligandu $[L_v]$ či na celkové koncentraci ligandu $[L]$ nebo z poměru koncentrací vázaného



Obr. 1. Princip stanovení vazebných konstant na základě CE analýzy rovnovážných směsí (podle práce⁹); a – generace dat pro kalibrační křivku (závislost plochy píků na koncentraci ligandu L ; M – značkovací (marker), b – CE analýza rovnovážné směsi různých koncentrací ligandu $[L]$ s fixní koncentrací receptoru R ; vzorky byly ekvilibrovány před CE analýzou (R – receptor, $R*L$ – komplex, L_v – volný ligand, c – vyhodnocení dat – přímé vazebné křivky, z koncentrace $[L_v]$ se určí koncentrace vázaného ligandu, $[L - L_v]$, a ze závislosti této koncentrace na koncentraci L_v se určí K_D jako L_v v polovině saturace, d – Scatchardova závislost poměru koncentrací vázaného ligandu k volnému ligandu na koncentraci volného ligandu. Směrnice této závislosti je $1/K_D$

a volného ligandu $[L - L_v/L_v]$ jako funkce koncentrace vázaného ligandu $L - L_v$ (obr. 1)⁹. Podobný postup se používá i v jiných měřeních, např. ve vylučovací chromatografii, ale výhodou ACE metody je, že receptor nemusí být čistý a dále že ligand a receptor nemusí mít rozdílnou velikost. Dobu potřebnou pro ustálení rovnováhy lze snadno zjistit z opakovaných analýz, což umožňuje malá spotřeba vzorku. Sycením jedné složky druhou složkou (titrantem) se zjistí stechiometrie komplexu. Nasycení se pozná buď tím, že pík komplexu dosáhne maximální konstantní hodnoty, nebo se objeví pík titrantu. Pokud má molekula více vazebných míst, jako např. protilátky, pak se postupně nasycení jednotlivých míst projeví serií píků příslušných komplexů a tím získáme další cennou informaci o stechiometrii jednotlivých vazeb^{19,20}.

Tuto metodu lze použít jen tehdy, když disociace komplexu je v průběhu CE analýzy zanedbatelná²¹. Je-li povolena 10 % disociace komplexu během CE analýzy, pak rychlostní konstanta k_{off} musí být menší než $0,105 t$, kde t je doba potřebná k separaci komplexu od receptoru²². Tuto techniku však lze využít i pro slabé interakce, pokud se použije frontální nebo vakantní technika^{14,23-27}. Technika vakantní afinitní chromatografie spočívá v naplnění kapiláry směsí pufru, ligandu i receptoru (koncentrace jedné složky, např. ligandu, je fixní, zatímco koncentrace druhé složky, receptoru, se mění). Poté se nadávkuje malý objem pufru a vloží se napětí. Vyhodnocují se plochy negativních (vakantních) píků, které odpovídají jednak volnému ligandu, jednak jeho komplexu s receptorem. K určení vazebných konstant lze též využít posunu migračních časů vakantních píků. Při frontální technice se kapilára naplní pufrům a pak se nadávkuje velký objem vzorku, který obsahuje ligand a receptor v rovnováze. Za předpokladu, že mobilita ligandu a komplexu je přibližně stejná, ale liší se od mobility receptoru, kterým je např. léčivo, migruje volný receptor v důsledku odlišné mobility ze zóny vzorku a jeho koncentrace se určí z výšky zóny.

Další omezení použitelnosti této techniky představuje poměrně nízká citlivost UV fotometrické detekce, daná krátkou dráhou paprsku. Pro silně interagující složky je koncentrace volného ligandu velmi nízká a tedy obtížně stanovitelná. Tento problém se většinou řeší použitím fluorescenční detekce buzené laserem²⁸⁻³⁶ (LIF).

Základním požadavkem je dostatečná separace ligandu od komplexu. Pokud se pohyblivost komplexu liší jen velmi málo od pohyblivosti jedné ze složek, lze komplex detegovat na základě vymizení píku jedné ze složek při saturaci a jeho opětovném objevení po nasycení všech vazebných míst³⁷⁻⁴⁰. Další možností je označit jednu ze složek fluoroforem a detegovat technikou LIF (cit.³¹).

4. Analýza založená na změně mobilit

Nízkoafinitní (nestabilní) komplexy s krátkým poločasem je možné charakterizovat pomocí CE na základě změny pohyblivosti jedné ze složek v důsledku multiasociačních a disociačních reakcí v roztoku. Při tomto postupu je receptor přítomen ve vzorku a ligand v nosném elektrolytu. Jedná se o období klasické afinitní chromatografie, avšak v ACE je snazší kontrolovat koncentraci ligandu. Podmínka pro použití této metody je, aby kinetika tvorby komplexů byla rychlá ve srovnání s dobou analýzy. Převrácená hodnota rychlostní kon-

stanty disociace komplexu, $1/k_{\text{off}}$ musí být mnohem nižší než migrační doba receptoru a poločas rozpadu komplexu, vyjádřený jako $\ln 2/k_{\text{off}}$ musí být menší než 1 % migračního času^{3,41}. Pokud jsou tyto podmínky splněny, můžeme tuto techniku považovat za rovnovážnou. Pokud však je stabilita komplexu vysoká, pak počet následných rovnováh mezi receptorem a ligandem ustavených v kapiláře během analýzy je nízký a pík dávkované složky je široký a rozmytý¹⁸. Rychlostní konstanty vazebných reakcí mohou být určeny analýzou elučních profilů pík^{42,43}.

Provádíme-li elektroforézu složky A v roztoku B, pak elektroforetická pohyblivost složky A se v okamžicích disociace a asociace diskontinuálně mění mezi hodnotami μ_A a μ_{AB} a pozorovaná pohyblivost μ složky A je pak váženým průměrem časových intervalů, po něž se pohybuje jako volná molekula a jako komplex AB. Pokud α_{AB} je doba, po kterou existuje komplex AB, pak je pohyblivost μ dána vztahem^{7,9}

$$\mu = (1 - \alpha_{AB}) \mu_A + \alpha_{AB} \mu_{AB} \quad (2)$$

Tuto rovnici můžeme přepsat ve formě

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} \alpha_{AB} \quad (3)$$

kde $\Delta\mu = \mu - \mu_A$ je pozorovaná změna pohyblivosti složky A v přítomnosti B a $\Delta\mu_{\text{max}} = \mu_{AB} - \mu_A$ je maximální změna pohyblivosti A v přítomnosti B při nekonečném zředění neboli rozdíl pohyblivostí volné složky A a komplexu AB. Protože α_{AB} můžeme vyjádřit jako molární zlomek,

$$\alpha_{AB} = [AB] / ([A] + [AB]) \quad (4)$$

který souvisí s rovnovážnou konstantou K_d

$$K_d = [A][B] / [AB] \quad (5)$$

vztahem

$$\mu_{AB} = [B] / (K_d + [B]) \quad (6)$$

Ize pro změnu pohyblivosti $\Delta\mu$ odvodit rovnici (7),

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} [B] / (K_d + [B]) \quad (7)$$

Veličiny $\Delta\mu_{\text{max}}$ a K_d lze určit nelineární regresní analýzou změřených hodnot $\Delta\mu$ při různé koncentraci B. Na základě analogie s rovnicí Michaelise a Mentenové pro kinetiku enzymů lze použít řadu linearizovaných závislostí, např. $\Delta\mu = F(\Delta\mu / [B])$, podle rovnice (8)

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{max}} - K_d (\Delta\mu / [B]) \quad (8)$$

Změna pohyblivosti se zjistí z experimentálních proměnných

$$\Delta\mu = L_D/E \{ (1/t_m - 1/t_0) - (1/t'_m - 1/t'_0) \} = (L_D/E) \cdot \Delta(1/t_m) \quad (9)$$

takže dostaneme

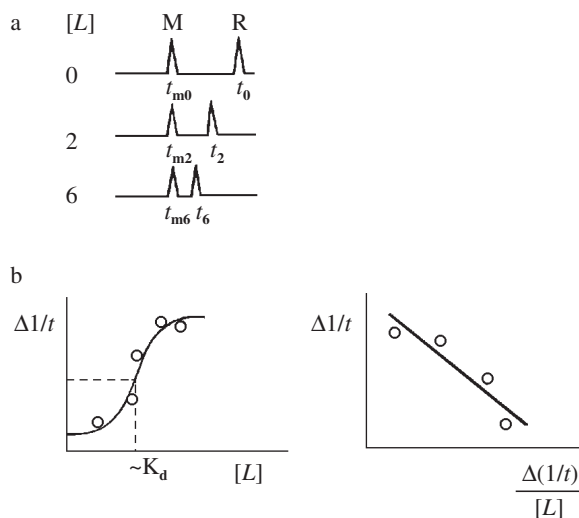
$$\Delta(1/t_m) = \Delta(1/t_m)_{\text{max}} - K_D \Delta(1/t_m)/[B] \quad (10)$$

kde t_m a t_0 jsou migrační časy složky A a značkovače (markeru) elektroosmotického toku (EOF) za nepřítomnosti složky B v nosném elektrolytu a t'_m a t'_0 jsou tyto časy za přítomnosti složky B, L_D je délka kapiláry k detektoru, E je intenzita elektrického pole.

Rovnovážné konstanty se experimentálně stanoví takto: Kapilára se naplní pufr, který obsahuje jednu ze složek, např. ligand (A). Stejný pufr, avšak bez ligandu, se použije v elektrodových nádobkách. Dávkuje se roztok druhé složky, receptoru (B), a měří se jeho mobilita při různé koncentraci ligandu. Rovnovážná konstanta se určí na základě rovnice (7–10) (viz⁹ a obr. 2). Pokud má ligand menší pohyblivost než receptor, musí být obsažen v pufru u anody. Rozhodnutí, která složka bude přítomna ve vzorku a která v pufru, závisí na dostupnosti interagujících látek a relativní snadnosti pozorování změn pohyblivosti. Rozpusťme-li v základním elektrolytu vysokomolekulární složku, pak zaznamenáme největší změnu pohyblivosti u nízkomolekulární složky. Proto studují-li se interakce proteinů s léčivými, pak je třeba rozpustit protein v základním elektrolytu⁴¹. Jsou-li interakce receptoru s ligandem slabé, je vhodné snížit pohyblivost ligandu např. tím, že ho kovalentně navážeme na gel, který vytvoříme v kapiláře⁴⁴.

Studované koncentrace se volí tak, aby jejich numerické hodnoty byly srovnatelné s hodnotou disociační konstanty a koncentrační rozsah byl dostatečně široký pro přesné stanovení. V případě proteinů jako receptorů postačuje rozsah koncentrací 0,1 až 0,5 mg·ml⁻¹ pro UV detekci při 214 nm (cit.⁷). Dávkovaný objem receptoru je řádově v nl a tím i množství spotřebovaného ligandu je zanedbatelné. Ustavení rovnováhy po nadávkování je rychlé, pokud je koncentrace ligandu vysoká ve srovnání s koncentrací receptoru.

Metodu lze použít za těchto podmínek: reakce musí být dostatečně rychlá, vazebná stechiometrie 1:1 a koncentrace receptoru musí být mnohem nižší než koncentrace ligandu



Obr. 2. Princip stanovení vazebných konstant na základě měření změn pohyblivosti (upraveno podle práce⁹); a – CE analýza receptoru v elektrolytu, který obsahuje různé koncentrace ligandu (M – značkovač, t_{m0} , t_{m2} , t_{m6} jsou migrační časy značkovače M a t_0 , t_2 , t_6 jsou migrační časy receptoru R při různé koncentraci ligandu [L], b – vyhodnocení dat na základě rov. (10)

(méně než $0,1 \times K_D^{45}$), avšak jeho absolutní koncentrace nemusí být známa (stanovení nízkých koncentrací, např. proteinů, je obtížný úkol). Dále se předpokládá, že vazebná místa jsou homogenní a rovnoměrně distribuována, že nedochází k interakci s vnitřními stěnami kapiláry a vložené napětí neovlivňuje tvorbu komplexu.

Metoda stanovení rovnovážných konstant založená na měření změn pohyblivosti má výhodu v tom, že vzorek nemusí být čistý, což je zvláště významné, je-li ligand nestálý a tvoří neaktivní produkty. Lze tak stanovit současně afinitní konstanty isoenzymů. Přesnost stanovení změn mobility závisí na stabilitě komplexu vzhledem k době separace. Lze postihnout i změny v mobilitě proteinů, které se liší o jediný elementární náboj.

5. Požadavky na systém pro afinitní kapilární elektroforézu

Vzhledem k tomu, že molekulární interakce závisí na teplotě, je nutné v ACE termostatovat separační kapiláry a při kvantitativní práci (stanovení rovnovážných konstant) používat kapiláry dostatečně dlouhé, aby délka části, která není termostatována, byla zanedbatelná vůči celkové délce kapiláry.

Vliv elektrického pole na molekulární interakce je zanedbatelný, jak bylo potvrzeno např. v pracích^{18,46}.

Významný je vliv adsorpce. Stěny kapiláry, které jsou negativně nabitě při pH vyšším než ca 2, obsahují aktivní místa pro adsorpci pozitivně nabitých molekul, např. některých proteinů. Adsorpci lze omezit prací při extrémních hodnotách pH (cit.⁴⁷⁻⁵¹), avšak tyto podmínky nevyhovují pro ACE. Pro tyto účely je nejvhodnější modifikace vnitřních stěn kapiláry např. silanizací nebo filmem vhodného polymeru^{53,54}. Pro separaci pozitivně nabitých proteinů byly doporučeny kationogenní polymerní filmy⁵⁵.

Vnitřní objem kapiláry a dávkované množství vzorku jsou zhruba tisíckrát nižší v CE než v HPLC nebo při elektroforéze v gelové vrstvě. Meze detekce při UV fotometrickém měření se pohybují pro proteiny kolem absolutního množství 0,1 až 1 ng, což pro CE aplikace představuje koncentraci 0,1 až 1 mg.ml⁻¹. Citlivost detekce lze zvýšit použitím fluorescenčního detektoru s laserovou excitací²⁸⁻³⁶ (LIF), při níž se jedna z interagujících složek označí fluoroforem. Meze detekce jsou zhruba o 3 řády nižší než při UV spektrofotometrické detekci.

Koncentrace nosných elektrolytů používaná v CE je obecně výrazně nižší než koncentrace solí ve fyziologickém roztoku. Vyšší koncentrace nosného elektrolytu je tolerována při nižším separačním napětí. Doporučené pufr⁷ pro ACE jsou např. 0,1 M tricin, 0,2 M glycin, 50 mM taurin nebo 0,5 M trimethylamoniumpropylsulfonát.

6. Imunitní stanovení založená na kapilární elektroforéze

ACE je alternativní metodou k existujícím imunitním stanovením. Její výhody spočívají v možnosti oddělit volné protilátky od komplexu i látek přítomných ve vzorku, v možnosti současně stanovit více látek, např. drogy i jejich metabolity, v kratší době analýzy ve srovnání s imunitními

testy na pevné fázi a snížené ceně analýzy dané malými objemy dávkovaných vzorků (ca nl). Citlivá LIF detekce je umožněna označením antigenu, buď fluoroforem nebo enzymaticky, např. alkalickou fosfatou ve spojení s fluorogenním substrátem (fluoresceindifosfátem). V některých případech však takto zvýšená citlivost nepostačuje, např. při stanovení estradiolu a hCG proteinu, kde je vyžadováno určení koncentrací nižších než 10⁻¹² M (cit.¹⁷). Nevýhodou ACE je možnost sorpce analytů na stěny kapiláry a nižší produktivita (max 20 vzorků/hodinu). Kompetitivní imunitní stanovení jsou běžnější než přímá stanovení.

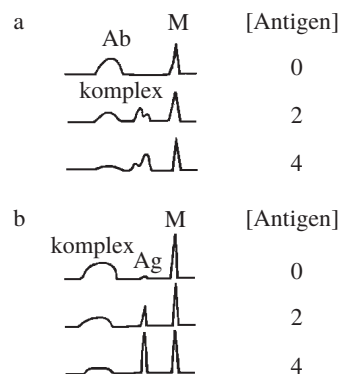
6.1. Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení

Nekompetitivní stanovení spočívá v přidání velkého přebytku protilátky nebo jejího fragmentu, Ab*, označených fluoroforem nebo enzymaticky, ke vzorku, aby bylo zajištěno, že veškerý antigen, Ag, přítomný ve vzorku, interaguje s protilátkou, část Ab* zůstává volná¹⁷:



Po proběhlé interakci (inkubaci) se část vzorku nadávkuje do CE kapiláry, separuje se komplex [AbAg]* od nadbytku Ab* a detegují se obě složky pomocí LIF (viz⁹ obr. 3a). Při vazbě značených protilátek na antigen dochází k významné změně jejich elektroforetické pohyblivosti.

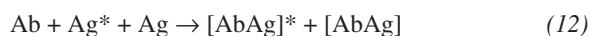
Příklady využití ACE k přímému imunitnímu stanovení jsou v literatuře zatím ojedinělé a není prokázána její výhodnost ve srovnání s běžným uspořádáním. Hlavní problém těchto stanovení je heterogenita značených protilátek nebo jejich fragmentů, která má za následek řadu píků v elektroferogramu. Příprava a čištění fragmentů z monoklonálních protilátek nejsou snadné, avšak aplikace genového inženýrství může tento problém vyřešit a rozšířit použitelnost této metody.



Obr. 3. Princip přímého a kompetitivního imunitního stanovení pomocí CE s LIF (adaptováno z práce⁹); a – přímé stanovení, protilátka značená fluoroforem, Ab a fluoreskující značkovací M, jsou přidány k roztoku, který obsahuje neznačený antigen Ag ve zvyšující se koncentraci. Dva píky komplexu jsou důsledkem mono- a divalentní protilátky; b – nepřímé (kompetitivní) stanovení, antigen značený fluoroforem je smíchán s rostoucím množstvím protilátky Ab, která vytěsňuje FITC-Ag z komplexu Ag-FITC-Ag. Měří se plocha píky značeného Ag, která je úměrná množství neznačeného Ag

6.2. Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení

Při této metodě se vzorek, který obsahuje neznačený antigen Ag v přítomnosti matrice, inkubuje s protilátkou (antisérem) Ab a značeným antigenem Ag* (nebo jeho fragmentem)¹⁷,



Během inkubace soutěží Ag* s Ag přítomným ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky Ab. Po ustavení rovnováhy se dávkuje alikvot směsi do CE systému s LIF detekcí, kde se oddělí volný Ag* od komplexu [AbAg]*. Výška nebo plocha píku volného Ag* a [AbAg]* nebo jejich poměr jsou úměrné obsahu antigenu v původním vzorku (viz⁹ obr. 3b). Kalibrační křivky jsou nelineární; ke stanovení se používá pouze lineární úsek. Důležité je správně zvolit koncentrace [Ag*] + [Ag], aby ležely v lineární části kalibrační křivky.

Kompetitivnímu imunitnímu stanovení se dává přednost před přímým stanovením tehdy, když je obtížné separovat volnou protilátku od komplexu (nelze tudíž použít přímé stanovení). Tento případ nastává u nízkomolekulárních protilátek, např. peptidů, které významně neovlivňují pohyblivost komplexu [AbAg]*.

Hlavní výhody CE při kompetitivním imunitním stanovení jsou vysoká citlivost⁵⁰ (mez detekce 0,1 nM), malé množství vzorku potřebné k analýze (méně než amol), možnost analyzovat několik analytů současně⁵¹ a vysoká přesnost stanovení. Vzhledem k tomu, že postačí stanovit pouze značený antigen, lze zjednodušit CE separaci a zkrátit dobu analýzy^{52,56} až na 0,5 až 1 min. Rovněž není nutné používat elektroforeticky čisté protilátky; polyklonální protilátky byly použity v řadě případů^{51,53,54,56,57}. Miniaturizace CE systému s umístěním celého přístroje na mikročip je zřejmě jedním z trendů budoucnosti⁵⁶.

7. Příklady použití ACE

Do ACE jsou v současné době zahrnovány všechny separace, při nichž se využívá selektivních interakcí. V tomto širokém pojetí sem patří všechny selektivní interakce s aditivou, přítomnými v elektrolytu, tedy i chirální separace, které však nejsou zahrnuty v tomto přehledném článku. Informace o separaci enantiomerů lze nalézt např. v práci¹¹.

ACE se především využívá ke stanovení vazebných konstant (viz např.^{46,58-61}). Nejvíce se studují léčiva^{11,14,62-66} a jejich interakce s proteiny nebo glykoproteiny. Významná část aplikací se týká peptidů^{59,67-69} a studia interakcí s lektiny⁷⁰. Vybrané příklady studovaných interakcí jsou uvedeny v tab. I.

8. Závěr

ACE je vhodnou komplementární separační metodou k afinitní HPLC a lze předpokládat, že ji bude v řadě případů postupně nahrazovat pro svou vysokou separační účinnost, rychlost analýzy, nízké nároky na množství vzorku a tím i podstatně nižší náklady na analýzu. Lze proto očekávat další

Tabulka I
Molekulové interakce studované v ACE

Protein, peptid ^a	Ligand	Citace
<i>Proteiny jako selektory</i>		
BSA	Warfarin	24
BSA	Ibuprofen, Flurbiprofen, Ketoprofen	80
BSA	tryptofan	44
BSA	Leucovorin	72,84
BSA	izomery porfyrinu	93
BSA	DNP – deriváty aminokyselin	85
HSA	tryptofan	87
HSA	Oxazepam, temazepam	89
HSA	Warfarin	24
AGP	DNP – deriváty aminokyselin	85
AGP	Clorprenalin	90
Avidin	Warfarin, Flurbiprofen, Ibuprofen, Ketoprofen, Leucovorin	92
Kasein	DNP – deriváty aminokyselin	85
Celobiohydrolasa	Metprolol, Alprenol, Atenolol	94
Konalbumin	Trimetochinol	90
Ovomukoid	Chlorpheniramin, Tolperison, Pindolol, Arotinolol	90
<i>Lektiny</i>		
<i>Lens culinaris</i> , <i>Ricinus communis</i> aggl. <i>Glycine soja</i>	disacharidy	70
Concanavalin A	monosacharidy	76
<i>Ricinus communis</i> aggl., <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Glycine soja</i>	laktobionová kyselina	96
<i>Lotus tetragonolobus</i>	L-fukoso-1-fosfát	75
<i>Pisum sativum</i>	neutrální sacharidy	74
<i>Proteiny vázající heparin</i>		
Fibronektin	heparin	12
Heparin vázající proteiny růstového faktoru fibroplastů	heparin, heparan sulfát	68
Fragmenty serového proteinu amyloid P	heparin	77
Laktoferrin	heparin	78
Antithrombin III, leukocytární proteinasová inhibitor	heparin	102
<i>Protilátka – antigen</i>		
Ab 4B10	Hapten H6A	27
mAb-antifosfoserin	fosfitin	33
Ab-anti-beta-endorfin	tryptické štěpy beta-endorfinu	101
mAb-antifosfotyrosin	fosfotyrosin	18
mAb-antiHSA	HSA	20
Fragmenty mAb-anticyklosporin	Cyklosporin	95
mAb-antiDNP	ligandy obsahující 2,4-dinitrofenylové substituenty	103

Tabulka I – pokračování

Protein, peptid ^a	Ligand	Citace
<i>Proteiny vázající biotin</i>		
Actinavidin	biotin	86, 104
Streptavidin	biotin	20
<i>Protein – specifický ligand</i>		
IgG	protein G	31
IgG	protein A	105
C-reaktivní protein	fosforylcholin	82, 91
Trypsin	inhibitory trypsinu	37
Chymotrypsin	a chymotrypsinu	
Vancomycin	D-Ala-D-Ala-peptidy	13,46,71, 73,88, 106-108
Karbonhydrasa	arylsulfonamidy	13,46,79, 81,106
<i>Proteiny vázající Ca²⁺</i>		
Calmoduli, Parvalbumin, karboanhydrasa	Ca ²⁺	83

^aAb – protilátka, mAb – monoklonální protilátka, BSA – hovězí serový albumin, HSA – lidský serový albumin, AGP – kyselý α_1 -glykoprotein

rozvoj kapilárních elektromigračních metod, zejména jejich spojení on-line s hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí při určování struktury biologicky aktivních látek. Lze očekávat další vývoj nových separačních medií zvyšujících účinnost a selektivitu separací, zdokonalování detekčních metod a další miniaturizaci. Miniaturizace, které se dosahuje v CE, je velmi vhodná pro studium interakcí ve velmi malých objemech, které se blíží objemu buněk. Elektroforéza na čipu je slibnou alternativou pro miniaturizaci CE (cit.^{56,97}). Nově používaná separační média v ACE jsou vtištěné polymery (imprinting polymers), které dovolují přípravu materiálu požadované afinity⁹⁸. Další zvýšení citlivosti fluorescenční detekce bude možné dosáhnout laserovými diodami, které jsou menší a často účinnější než ostatní lasery⁹⁹. Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda bude mít nezastupitelné místo v ACE^{100,101}.

ACE metoda diskutovaná v tomto článku je použitelná pro určení disociačních konstant relativně stabilních komplexů nebo naopak komplexů vznikajících na základě rychlé vazebné reakce pomocí metod diskutovaných výše, tj. analýzy rovnovážné směsi a analýzy založené na změně mobility. Metoda ACE je aplikovatelná pro reakce, jejichž disociační rychlostní konstanty jsou menší než 0,001 a větší než 0,1 s⁻¹ (cit.^{7,9}). Uvnitř tohoto rozsahu jsou stanovení problematická a vyžadují vývoj alternativních technik.

Hodnoty K_d určené ACE metodou jsou v dobré shodě s výsledky získanými jinými metodami. Relativní směrodatná odchylka pro 5 měření byla 10 % u přístrojů s manuálním řízením a 6 % s automatickou kontrolou^{74,76}. Právě rovnovážné konstanty jsou získány pouze tehdy, když jsou obě výše uvedené metody měření kombinovány, tj. receptor přítomný ve

vzorku je předem equilibrován s ligandem a poté jsou stanoveny rovnovážné konstanty na základě měření mobilit interagujících složek.

Autoři děkují Fondu rozvoje vysokých škol za poskytnutí grantu č. 1707/99.

LITERATURA

1. Takeo K: *Electrophoresis* 5, 187 (1984).
2. Takeo K.: *J. Chromatogr. A* 698, 89 (1995).
3. Hořejší V., Tichá M.: *J. Chromatogr.* 376, 49 (1986).
4. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1992.
5. Foret F., Křivánková L., Boček P.: *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH, Weinheim 1993.
6. Camilleri P. (Ed.): *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton 1998.
7. Shimura K., Kasai K.: *Anal. Biochem.* 251, 1 (1997).
8. Rippel G., Corstjens H., Billiet H. A. H., Frank J.: *Electrophoresis* 18, 2175 (1997).
9. Heegaard N. H. H., Nilsson S., Guzman N. A.: *J. Chromatogr. B* 715, 29 (1998).
10. Lloyd D. K., Aubry A.-F., De Lorenzi E.: *J. Chromatogr. A* 792, 349 (1997).
11. Rundlett K. L., Armstrong D. A.: *Electrophoresis* 18, 2194 (1997).
12. Liu J., Abid A., Hail M. E., Lee M. S., Hangeland L., Zein N.: *Analyst* 123, 1455 (1998).
13. Colton I. L., Carbeck J. D., Rao J., Whitesides G. M.: *Electrophoresis* 19, 367 (1998).
14. Bush M. H. A., Corels L. B., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 777, 311 (1997).
15. Takeo K.: *J. Chromatogr. A* 698, 89 (1997).
16. Nakamura K., Takeo K.: *J. Chromatogr.* 715, 125 (1998).
17. Schmalzing D., Nashaben W.: *Electrophoresis* 18, 2184 (1997).
18. Heegaard N. H. H.: *J. Chromatogr. A* 680, 405 (1994).
19. Nielsen R. G., Rickard E. C., Santa P. F., Sharknas D. A., Sittampalam G. S.: *J. Chromatogr.* 539 177 (1991).
20. Chu Y.-H., Lees W. J., Stassinopoulos A., Walsh C. T.: *Biochemistry* 33, 10616 (1994).
21. Fried M. G.: *Electrophoresis* 10, 366 (1989).
22. Hulme E. C., Birdsall N. J. M., v knize: *Receptor-ligand Interactions* (Hulme E. C., ed.), str. 63. Oxford University Press, Oxford 1993.
23. Erim F. B., Kraak J. C.: *J. Chromatogr. B* 710, 205 (1998).
24. Bush M. H. A., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 775, 315 (1997).
25. Kraak J. C., Busch S., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 608, 257 (1992).
26. Shibukawa A., Yoshimoto Y., Ohara T., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 616 (1994).
27. Busch M. H. A., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H., Meekel A. A. P., Resmini M.: *J. Chromatogr.* 774, 195 (1996).
28. Chen J. W., Cohen A. S., Karger B. L.: *J. Chromatogr.* 559, 295 (1991).
29. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S. M., Driver D. A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B., Nielsen P. E.: *Nature* 365, 566 (1993).

30. Chen D. Y., Adelhelm K., Cheng X. L., Dovici N. J.: *Analyst* 119, 349 (1994).
31. Reif O.-W., Lausch R., Scheber T., Freitag R.: *Anal. Chem.* 66, 4027 (1994).
32. Xian J., Harrington M. G., Davison E. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 86 (1996).
33. Lin S., Hsiao I. Y., Hsu S. M.: *Anal. Biochem.* 254, 9 (1997).
34. Chen E.-T. A., Sternberg J. C.: *Electrophoresis* 15, 13 (1994).
35. Gasmann E., Kuo J. E., Zare R. N.: *Science* 230, 813 (1985).
36. Gordon M. J., Huang X., Pentoney S. L., Zare R. N.: *Science* 242, 224 (1988).
37. Arentoft A. M., Frokiaer H., Michaelsen S., Sorensen H., Sorensen S.: *J. Chromatogr. A* 652, 189 (1993).
38. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *Anal. Chem.* 64, 2479 (1992).
39. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1923 (1993).
40. Thomas C. V., Cater A. C., Wheeler J. J.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1903 (1993).
41. Chu Y.-H., Avila L. Z., Gao J., Whitesides G. M.: *Acc. Chem. Res.* 28, 461 (1995).
42. Matoušek V., Hořejší J.: *J. Chromatogr.* 245, 271 (1982).
43. Avila L. Z., Chu Y.-H., Blossy E.-C., Whitesides G. M.: *J. Med. Chem.* 36, 126 (1993).
44. Birnbaum S., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 64, 2872 (1992).
45. Lim W. A., Sauer R. T., Lander A. D.: *Methods Enzymol.* 208, 196 (1991).
46. Kawaoka J., Gomez F. A.: *J. Chromatogr. B* 715, 203 (1998).
47. Pacáková V., Štulík K., Hau P. T., Jelínek I., Vinš I., Sýkora D.: *J. Chromatogr.* 700, 187 (1995).
48. Pacáková V., Pechancová J., Štulík K.: *J. Chromatogr. B* 681, 47 (1996).
49. Pacáková V., Pechancová J., Štulík K.: *J. High Resol. Chromatogr.* 18, 582 (1995).
50. Chen F.-T. A., Pentoney S. L., Jr.: *J. Chromatogr. A* 680, 425 (1994).
51. Chen F.-T. A., Evengelista R. A.: *Clin. Chem.* 40, 1891 (1994).
52. Schultz N. M., Huang L., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 67, 924 (1995).
53. Schmalzing D., Nashabech W., Fuchs M.: *Clin. Chem.* 41, 1403 (1995).
54. Schmalzing D., Nashabech W., Yao X.-W., Mahtre R., Regnier F. E., Afeyan N. B., Fuchs M.: *Anal. Chem.* 67, 606 (1995).
55. Towns J. K., Regnier E. F.: *J. Chromatogr.* 516, 69 (1990).
56. Koutný L. B., Schmalzing D., Taylor T. A., Fuchs M.: *Anal. Chem.* 68, 18 (1996).
57. Steinmann L., Čáslavská J., Thorman W.: *Electrophoresis* 16, 1912 (1995).
58. Amini A., Westerlund D.: *Anal. Chem.* 70, 1430 (1998).
59. Dunayevskiy Y. M., Lyubbarskaya Y. V., Chu Y. H.: *J. Med. Chem.* 41, 1201 (1998).
60. Mammen M., Colton I. J., Carbeck J. D., Bradley R., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 69, 2165 (1997).
61. Bose S., Yang J., Hage D. S.: *J. Chromatogr. B* 697, 77 (1997).
62. Schwartz M. A., Raith K., Dongowski G., Neubert R. H. H.: *J. Chromatogr. A* 809, 219 (1998).
63. Dongowski G., Schnorrenberger B., Platzer B.: *Int. J. Pharm.* 158, 99 (1997).
64. Hage D. S., Tweed S. A.: *J. Chromatogr. B* 699, 499 (1997).
65. Schwarz M. A., Raith K., Ruttinger H. H., Dongowski G., Neubert R. H. H.: *J. Chromatogr. A* 781, 377 (1997).
66. Shibukawa A., Yoshimoto Y., Ohara T., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 616 (1994).
67. Heegaard N. H. H., Hansen B. E., Svejgaard A., Fugger L. H.: *J. Chromatogr. A* 781, 91 (1997).
68. VanderNoot V. A., Hileman R. E., Dordick J. S., Linhardt R. J.: *Electrophoresis* 19, 437 (1998).
69. Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 19, 442 (1998).
70. Taga A., Yabusako Y., Kitano A., Honda S.: *Electrophoresis* 19, 2645 (1998).
71. Chu Y.-H., Whitesides G. M.: *J. Org. Chem.* 57, 3524 (1992).
72. Barker G. E., Rosso P., Hartwick R. A.: *Anal. Chem.* 64, 3024 (1992).
73. Godall D. M.: *Biochem. Soc. Trans.* 21, 125 (1993).
74. Shimura K., Kasai K.: *J. Biochem.* 120, 1146 (1996).
75. Khun R., Frei R., Christen M.: *Anal. Chem.* 218, 131 (1994).
76. Shimura K., Kasai K.: *Anal. Biochem.* 227, 186 (1995).
77. Heegaard N. H. H., Mortensen H. D., Roepstorff P.: *J. Chromatogr. A* 717, 83 (1995).
78. Heegaard N. H. H., Brimmes J.: *Electrophoresis* 17, 1916 (1996).
79. Bergenhem N.: *J. Chromatogr. B* 684, 289 (1996).
80. Sun P., Hoops A., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr. B* 661, 335 (1994).
81. Gomez F. A., Avila L. Z., Chu Y.-H., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 66, 1785 (1994).
82. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *J. Immunol. Meth.* 166, 103 (1993).
83. Kajiwara H., Hirano H., Oono K.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* 22, 263 (1991).
84. Sun P., Barker G., Hartwick R. A., Grinberg N., Kaliszan R.: *J. Chromatogr. A* 652, 247 (1994).
85. Wistuba D., Diebold H., Schurig V.: *J. Microcol. Sep.* 7, 17 (1995).
86. Okun V. M., Bilitewski U.: *Electrophoresis* 17, 1627 (1996).
87. Yung J., Hage D. S.: *Anal. Chem.* 66, 2719 (1994).
88. Liu J., Volk K. J., Lee M. S., Pucci M.: *Anal. Chem.* 66, 2412 (1994).
89. Lloyd D. K., Li S., Ryan P.: *J. Chromatogr. A* 694, 285 (1995).
90. Tanaka Y., Terabe S.: *Chromatographia* 44, 119, (1997).
91. Nadeau K., Nadler S. G., Saulnier M., Tepper M. A., Walsh C. T.: *Biochemistry* 33, 2561 (1994).
92. Tanaka Y., Matsubara N., Terabe S.: *Electrophoresis* 15, 848 (1994).
93. Barker G. E., Horvath W. J., Huie C. W., Hartwick R. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 2089 (1993).
94. Ljunberg H., Nilsson S.: *J. Liq. Chromatogr.* 18, 3685 (1995).
95. Phillips T. M., Chmielinska J. J.: *Biomed. Chromatogr.* 8, 242 (1994).

96. Honda S., Taga A., Suzuki S., Kakehi K.: *J. Chromatogr.* 597, 377 (1992).
97. Harrison D. J., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C. S., Manz A.: *Science* 261, 895 (1993).
98. Nilsson K., Lindell J., Norrloew O., Sellergren B.: *J. Chromatogr. A* 680, 57 (1994).
99. Imasaka T., Ishibashi N.: *Anal. Chem.* 62, 363A (1990).
100. Cheng C. C., Chu Y. H.: *Am. Lab.* 30, 79 (1998).
101. Lyubarskaya Y. V., Dunayevskiy Y. M., Vouros P., Karger B. L.: *Anal. Chem.* 69, 3008 (1997).
102. Wu X., Linhardt R. J.: *Electrophoresis* 19, 2650 (1998).
103. Mammen M., Gomez F. A., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 67, 3526 (1995).
104. Okun V. M.: *Electrophoresis* 19, 427 (1998).
105. Lausch R., Reif O. W., Riechel P., Scheper T.: *Electrophoresis* 16, 636 (1995).
106. Gomez F. A., Mirkovich J. N., Dominguez V. M., Liu K. W., Macies D. M.: *J. Chromatogr. A* 727, 291 (1996).
107. LeTouneau D. L., Allen N. E.: *Anal. Biochem.* 246, 62 (1997).
108. Rao J., Whitesides G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 10286 (1997).

V. Pacáková^a, K. Štulík^a, S. Hubená^a, and M. Tichá^b
(^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague):
Affinity Capillary Electrophoresis

Affinity capillary electrophoresis (ACE) is reviewed with emphasis on determination of the binding constants. The requirements for the CE system are discussed. CE-based immunoassays (both competitive and non-competitive) are summarized and examples of ACE are described.

INFORMACE

**pro zájemce o studium v doktorském studijním programu, obor lékařská chemie a biochemie,
na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci ve školním roce 2000/2001**

Předseda oborové rady pro obor lékařská chemie a biochemie informuje absolventy lékařských, farmaceutických a přírodovědeckých fakult o možnosti zahájení tříletého prezenčního studia v doktorském studijním programu v oboru:

lékařská chemie a biochemie

Náměty experimentální práce v rámci studia jsou orientovány do experimentální toxikologie, zahrnují studium účinků a metabolismu xenobiotik na buněčné úrovni a jejich interakcí se subcelulárními strukturami.

Případní zájemci o studium kontaktujte
Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc.
Tel: 068 / 563 23 01, FAX: 068 / 563 29 66, e-mail: vilim@tunw.upol.cz