

STUDIUM ENZYMOVÝCH REAKCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU V ON-LINE USPOŘÁDÁNÍ

ROMAN ŘEMÍNEK, MARTA ZEISBERGEROVÁ
a ZDENĚK GLATZ

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta a Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
romik@mail.muni.cz

Došlo 19.3.13, přijato 29.5.13.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, on-line metoda, enzymová aktivita, kinetika enzymové reakce, inhibice enzymové reakce, elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza, difuze

Obsah

1. Úvod
2. On-line metody studia enzymových reakcí pomocí kapilární elektroforézy
 - 2.1. Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza
 - 2.1.1. Kontinuální mód
 - 2.1.2. Zonální mód
 - 2.2. Techniky založené na difuzi
 - 2.2.1. Techniky založené na podélné difuzi
 - 2.2.2. Techniky založené na příčné difuzi
3. Závěr

1. Úvod

Enzymy, působící jako biologické katalyzátory chemických reakcí, hrají klíčovou úlohu při procesech udržování homeostázy, růstu, vývoje, rozmnožování, i ochrany všech organismů včetně člověka. Z tohoto důvodu představuje studium jejich vlastností jeden z nejčastějších cílů biochemie a biologie¹. Stanovení katalyzované přeměny substrátu při těchto studiích poskytuje informace jak o aktivitě studovaného enzymu, a tedy nepřímo o jeho koncentraci, tak i o kinetice probíhající reakce.

Kromě tradičních radiometrických, spektrofotometrických, fluorescenčních a separačních metod založených na vysoce účinné kapalinové chromatografii^{2,3} se v posledních dvou desetiletích prosazují metody využívající separaci a detekci produktů, event. i substrátů, enzymové reakce pomocí kapilární elektroforézy (capillary electrophoresis, CE)⁴. CE představuje vhodnou techniku pro stanovení enzymové aktivity zejména díky minimální spotřebě vzorku, vysoce účinným separacím a možnosti

analýzy komplexních vzorků i s relativně vysokou koncentrací proteinů. Navíc lze tuto separační techniku spojit se spektrofotometrickou, fluorescenční, elektrochemickou, chemiluminiscenční nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Analýzy v rámci studia enzymových reakcí s využitím CE mohou být na základě časové a prostorové posloupnosti nejdůležitějších fází provedeny ve dvou základních uspořádáních. V tradičním tzv. off-line uspořádání je enzymová reakce inkubována v reakční nádobce – zkumavce či mikrozskumavce, a CE slouží pouze pro separaci jejich produktů, a případně i substrátů. Při vlastním experimentu je průběh enzymové reakce sledován buď průběžně opakovaným dávkováním reakční směsi do CE systému v určitých časových intervalech, nebo jejím jednorázovým nadávkováním až po zastavení enzymové reakce denaturací. Hlavní výhodou tohoto přístupu představuje tvorba homogenní reakční směsi vycházející z turbulentního míchání uvnitř zkumavky. V celém jejím objemu je tak rozložení koncentrací enzymu a všech reaktantů rovnoměrné a reakce probíhá stejnou rychlostí. Stanovení reakčních podmínek včetně doby inkubace a koncentrací enzymu a substrátu, tedy veličin potřebných pro následné výpočty kinetických parametrů charakterizujících studovanou reakci, je díky tomu nenáročné. Ve druhém tzv. on-line uspořádání slouží křemenná kapilára nejen jako separační kolona, ale také jako reakční prostředí. Všechny kroky stanovení od postupného nadávkování a smíchání enzymu a reaktantů, přes inkubaci až k separaci reakční směsi, detekci a kvantifikaci produktů a případně substrátů jsou tak integrovány do jedné plně automatizované analýzy probíhající uvnitř CE systému. Oproti off-line metodám, při kterých je kvůli zaručení opakovatelnosti pipetování třeba připravit reakční směs v minimálním objemu desítek mikrolitrů, umožňuje inkubace enzymových reakcí uvnitř kapiláry snížení spotřeby roztoků enzymu a reaktantů o dva až tři řády⁵. I v případě, kdy nejsou celé jejich alikvoty během stanovení využity, jejich spotřeba klesá s faktorem rovnajícím se počtu provedených analýz. To hraje významnou úlohu zejména při analýzách vysokého počtu vzorků využívajících drahé enzymy a reaktanty, jako je tomu například při testování stability kandidátních látek vůči působení lidských biotransformačních enzymů v rámci vývoje nových léčiv. Plná automatizace navíc snižuje riziko experimentální chyby na minimum.

Pro úplnost je ještě nutné uvést, že v literatuře se lze setkat i s třetí variantou tzv. post-kapilárního uspořádání, v němž vlastní enzymové reakci předchází separace enzymu pomocí CE (cit.^{6,7}). Toho lze s výhodou využít zejména při stanovení aktivity izoenzymů. Pro praktickou aplikaci je nutné CE systém modifikovat zabudováním reaktoru na konec separační kapiláry, do kterého jsou poté přiváděny substráty dané enzymové reakce, a dodatečného de-

tektoru. Zatímco první, klasicky umístěný UV detektor zaznamenává průběh samotné CE analýzy, druhý zařazený za reaktorem deteguje vznikající produkty. K rozšíření tohoto přístupu však nikdy nedošlo, neboť uvedená modifikace není kompatibilní s konstrukcí komerčně dostupných CE systémů.

2. On-line metody studia enzymových reakcí pomocí kapilární elektroforézy

Z výše uvedeného vyplývá, že on-line metody využívající CE představují zajímavou alternativu ke klasickým přístupům studia enzymových reakcí. Podle způsobu zavedení enzymu a reaktantů do kapiláry lze rozlišit dvě základní uspořádání. Zatímco tzv. homogenní uspořádání odpovídá výše uvedenému postupu, kdy všechny složky reakční směsi jsou do kapiláry nadávkovány ve formě roztoků, v tzv. heterogenním uspořádání je enzym imobilizován na nosiči nebo vnitřní stěně kapiláry (immobilized enzyme reactors, IMER). Jelikož rozsah této problematiky přesahuje rámec tohoto sdělení, IMER zde nebudou diskutovány. Případným zájemcům lze doporučit přehledové články, které se zevrubně touto problematikou zabývají^{8–11}.

Stanovení enzymové aktivity v roztoku je vhodnější, neboť nehrozí ovlivnění vlastností studovaného enzymu vlastní imobilizací. Přes nepopiratelné výhody jsou však on-line metody v homogenním uspořádání dosud využívány pouze v prostředí výzkumných laboratoří. Donedávna představovala hlavní překážku jeho využití v reálných aplikacích absence univerzální techniky umožňující efektivní promíchání jednotlivých složek reakční směsi uvnitř kapiláry. Na základě použitého principu lze postupy řešící tuto slabinu rozdělit na techniky založené na rozdílech elektroforetických mobilit enzymu a jednotlivých reaktantů a na techniky založené na difuzi.

2.1. Elektroforetický zprostředkovaná mikroanalýza

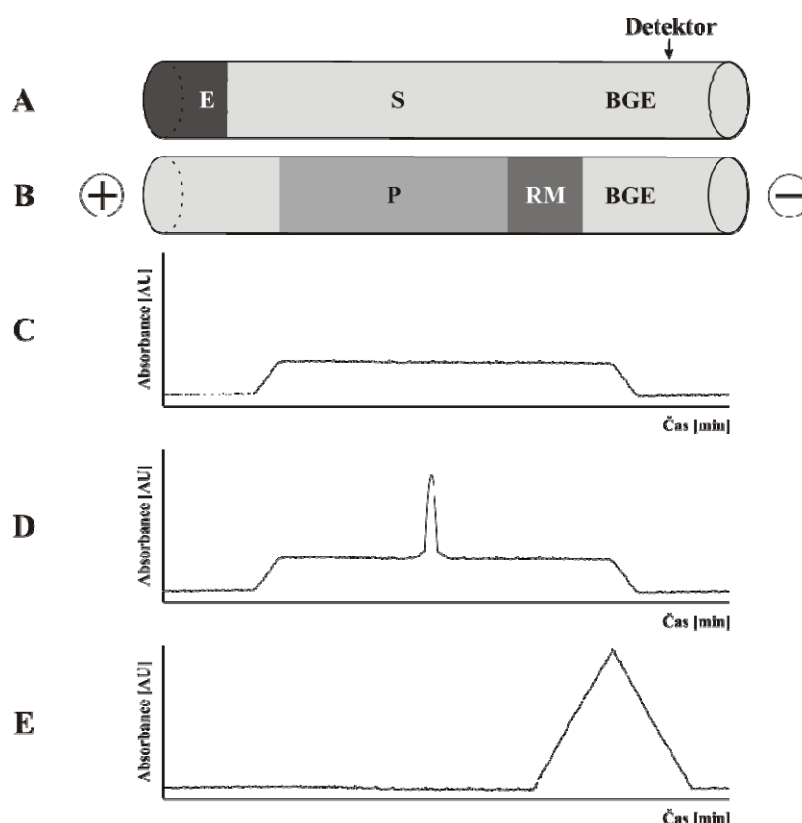
Historicky první on-line stanovení enzymové aktivity pomocí CE publikovali Bao a Regnier v roce 1992 (cit.¹²). K důkazu funkčnosti navrženého postupu provedli studii, při které určovali aktivitu modelového enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy sledováním produkce redukované formy nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) vznikajícího při oxidaci glukosa-6-fosfátu. Během vlastní analýzy byla kapilára nejprve naplněna základním elektrolytem (background electrolyte, BGE) tvořeným pufrům, který obsahoval nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺) a substrát – glukosa-6-fosfát. Po hydrodynamickém nadávkování krátké zóny enzymu bylo aplikováno napětí, přičemž díky rozdílným rychlostem migrace jednotlivých složek reakční směsi došlo k jejich promíchání a spuštění enzymatické reakce. V článku publikovaném o rok později byl stejnými autory představen teoreticko-matematický koncept této techniky již pod názvem elektroforetický zprostředkovaná mikroanalýza (electrophoretically mediated microanalysis, EMMA)¹³. V průběhu

následujícího vývoje byly představeny dva základní módy EMMA, které se liší způsobem interakce mezi enzymem a reaktanty, jež představuje především substrát, na základě konkrétních reakčních podmínek a cíle studie mohou dále zahrnovat např. i koenzymy, případně inhibitor.

2.1.1. Kontinuální mód

Tento mód EMMA byl využit ve výše uvedené průlomové práci, kterou publikovali Bao a Regnier¹². V principu je kapilára nejprve naplněna roztokem substrátu nebo enzymu, který slouží i jako BGE. Obvykle se jedná o substrát, neboť následně hydrodynamické nebo elektroforetické nadávkování úzké zóny enzymu minimalizuje jeho spotřebu a snižuje riziko ztráty opakovatelnosti stanovení v důsledku postupného pokrytí vnitřní stěny kapiláry proteiny (obr. 1A). Jelikož jsou při aplikaci napětí oba konce kapiláry ponořeny do vzorkových nádobek obsahujících BGE se substrátem, není nutné určit, která ze složek reakční směsi má vyšší elektroforetickou mobilitu. Jen v teoretickém případě rovnosti elektroforetických mobilit enzymu a jeho substrátu by po aplikaci napětí nedošlo k jejich promíchání. Po celou dobu migrace zóny enzymu uvnitř kapiláry pak vzniká produkt reakce (obr. 1B), jenž ve výsledném elektroforegramu tvoří dlouhé plató (obr. 1C). V případě studia pomalé enzymové reakce lze citlivost metody zvýšit pomocí tzv. amplifikace při nulovém potenciálu, kdy je v průběhu analýzy na určitou dobu vypnuto aplikované napětí. Pohyb zóny enzymu v kapiláře se tak zastaví a dochází k akumulaci produktu reakce. Po opětovném zapnutí napětí analýza probíhá jako u klasického kontinuálního módu EMMA. Zóna akumulovaného produktu ve výsledku tvoří pík na vrcholku plata (obr. 1D). Výhodou tohoto módu představuje kromě snadného provedení a robustnosti zejména jeho citlivost. Přestože tento mód není kvůli problematickému vyhodnocení výsledných elektroforegramů vhodný pro kinetické studie, lze jej s výhodou využít u analýz, u kterých je požadováno dosažení maximální rychlosti reakce, jako např. při analýze velice zředěných roztoků enzymů. Ve studii, kterou provedli Yeung a spol., bylo možné pomocí kontinuálního módu EMMA s amplifikací při nulovém potenciálu a laserově indukovanou fluorescenční detekcí (LIF) detegovat jednotlivé molekuly enzymu laktátdehydrogenasy¹⁴.

Specifický případ kontinuálního módu představuje technika s dávkováním druhé složky reakční směsi pomocí pohyblivého rozhraní, který jako první představili Harmon a spol.¹⁵. V této studii byla kapilára naplněna BGE obsahujícím leucinaminopeptidasu a na její vstupní konec byla umístěna vzorková nádobka s roztokem substrátu – Leu-*p*-nitroanilidu, který má vyšší elektroforetickou mobilitu, a tudíž po aplikaci napětí migroval roztokem enzymu v kapiláře. Relativně velký objem výsledné reakční směsi vedl k dosažení vysokých výtěžků produktu – *p*-nitroanilinu. V porovnání s kontinuálním módem se zonálním dávkováním druhé složky reakční směsi tak aplikace tohoto uspořádání obecně umožňuje dosažení až o jeden řád vyšší koncentrační citlivosti (obr. 1E).



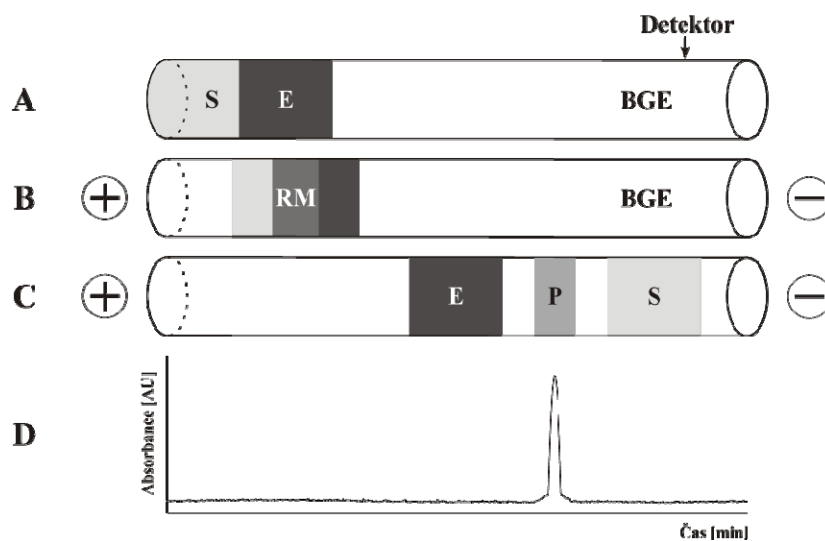
Obr. 1. **Kontinuální mód EMMA (elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza).** (A) Na začátku analýzy je do kapiláry, která byla předem naplněna základním elektrolytem (BGE) obsahujícím substrát (S), dávkována úzká zóna enzymu (E). (B) Díky různé rychlosti migrace E a S dochází po aplikaci napětí k jejich promíchání, vzniku reakční směsi (RM) a tvorbě produktu (P). Model typického elektroforegramu získaného během analýzy v (C) kontinuálním módu EMMA, (D) s amplifikací při nulovém potenciálu a (E) dávkováním druhého reaktantu pohyblivým rozhraním

2.1.2. Zonální mód

V zonálním módu EMMA jsou do kapiláry, která byla předem naplněna BGE, postupně dávkovány pouze krátké zóny roztoků jednotlivých složek reakční směsi (obr. 2A)¹⁶. Ty jsou dávkovány v pořadí podle jejich stoupajících elektroforetických mobilit tak, že po aplikaci napětí rychleji se pohybující reakční partner proniká do zóny pomalejšího a tvoří reakční směs (obr. 2B). Ta je vzápětí na základě rozdílné rychlosti migrace enzymu a substrátu opět rozseparována, čímž dochází k ukončení reakce (obr. 2C). Jelikož ke vzniku produktu reakce dochází pouze během relativně krátkého promíchání všech složek reakční směsi, délka jeho zóny je omezená a ve výsledném elektroforegramu tvoří pik, který lze vyhodnocovat za použití běžného CE softwaru (obr. 2D). V případě studia pomalých enzymových reakcí lze dobu inkubace prodloužit pomocí již zmíněné amplifikace při nulovém potenciálu. Oproti kontinuálnímu módu EMMA je však jeho využití komplikovanější, neboť napětí je nutné vypnout přesně v okamžiku, kdy se zóny enzymu a všech reaktantů překrývají. K tomuto účelu byly vytvořeny výpočetní postupy a matematické modely umožňující určení napětí a času potřebných pro ideální překrytí všech složek reakční smě-

si, u nichž byly předem stanoveny rychlosti migrace^{13,17–19}.

Úspěšné zavedení dosud představených technik EMMA vyžaduje, aby byly nalezeny podmínky, zejména pak pH a složení BGE, jež jsou vhodné jak pro inkubaci studované enzymové reakce, tak i pro separaci získaných reakčních produktů. Taková situace je však spíše výjimkou než pravidlem. Proto Van Schepdael a spol. zavedli kombinaci techniky EMMA s částečným plněním kapiláry²⁰. V principu se jedná o zonální mód EMMA, kdy jsou do kapiláry, která byla předem naplněna BGE vhodným pro separaci reakčních produktů, nadávkovány zóny enzymu a reaktantů připravené v inkubačním pufru, který je optimální pro danou enzymovou reakci. Autoři uvedené studie takto stanovovali aktivitu aminoxidasy z hovězí plasmy. Enzym a modelový substrát fenylmethylamin byly připraveny v inkubačním 30 mM fosfátovém pufru (pH 7,4). K separaci produktu, benzaldehydu, od zbytku reakční směsi byla použita micelární elektrokinetická chromatografie, separační pufr tak tvořil 30 mM fosfátový pufr (pH 7,4) obsahující 15 mM SDS. V rámci dávkování byla před zóny enzymu a substrátu do kapiláry nadávkována zóna inkubačního pufru zabraňující průniku SDS do reakční směsi a ovlivnění aktivity enzymu.



Obr. 2. Zonální mód EMMA. (A) V tomto uspořádání jsou do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (BGE) dávkovány pouze úzké zóny enzymu (E) a substrátu (S) podle jejich rostoucích elektroforetických mobilit. (B) V uvedeném příkladu tak po aplikaci napětí rychleji migrující S proniká do zóny E a tvoří reakční směs (RM). (C) Analogicky díky různé rychlosti migrace dochází k separaci E a S, a tedy i ukončení enzymové reakce. (D) Úzká zóna produktu (P) ve výsledném elektroforegramu tvoří pik

Specifický případ zonálního módu EMMA představuje tzv. elektroinjekční analýza (electroinjection analysis, EIA), jejíž první realizaci publikovali Andreev a spol.²¹. V tomto případě jsou enzym a substrát dávkovány do opačných konců kapiláry tak, že po aplikaci napětí začnou migrovat proti sobě. Oproti klasickému uspořádání tak při dávkování v EIA nehrozí vzájemná kontaminace roztoků ve vzorkových nádobkách. Přestože autoři v uvedené studii provedli pouze speciální analýzu Fe^{3+} iontů za využití kyseliny sulfosalicylové jakožto chelatačního činidla, EIA je v principu aplikovatelná i pro studium enzymových reakcí.

Hlavní výhodou zonálního módu EMMA při stanovení enzymové aktivity je zejména vytvoření homogenní reakční směsi s konstantními koncentracemi enzymu a reaktantů, u kterých navíc nedochází k ředění. Zejména proto představuje tento mód nejčastěji využívané on-line uspořádání pro studium enzymových reakcí pomocí CE. S úspěchem byly realizovány kvalitativní, kinetické a inhibiční studie a screeniny inhibitorů a substrátové specifity studovaných enzymů. Metody založené na EMMA byly využity nejen v kapilárním formátu, ale i na čipu. Neméně významnou oblast představují i studie chemických reakcí a použití EMMA k derivatizaci analytů. Například Koval a spol. použili on-line derivatizaci D-serinu k jeho detekci a k následnému stanovení aktivity enzymu – serinové racemasy²². Pro případné zájemce lze doporučit přehledové články, které se zevrubně zabývají aplikacemi EMMA^{23–28}.

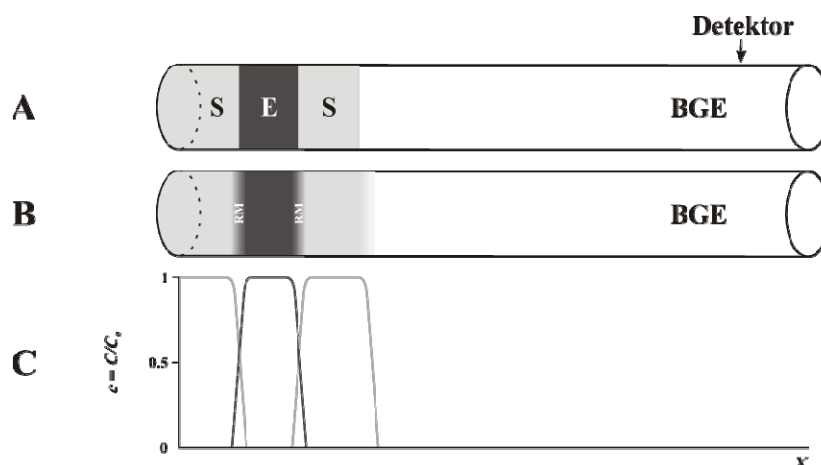
2.2. Techniky založené na difuzi

Nutnost složitější optimalizace míchání enzymu

a reaktantů u metody EMMA vedla k hledání nové univerzálnější techniky. Výsledkem bylo zavedení metod založených na prosté difuzi. Jelikož je difuze vlastní všem molekulám, techniky na ní založené umožňují míchání enzymu a reaktantů bez ohledu na jejich náboj a hodnotu elektroforetické mobility, a tedy i jednoduché změny ve složení reakční směsi. Na základě orientace rozhraní mezi zónami enzymu a reaktantů vůči ose kapiláry lze rozlišit techniky využívající míchání podélnou anebo příčnou difuzí.

2.2.1. Metody založené na podélné difuzi

Přestože metody založené na podélné difuzi (v anglicky psané literatuře uváděné jako at-inlet techniques) někdy bývají řazeny mezi specifické varianty zonálního módu EMMA, k vytvoření reakční směsi je u nich využíván zcela jiný princip. Van Schepdael a spol.²⁹, kteří tuto techniku využili poprvé pro stanovení aktivity peptidyl-dipeptidasy A, dávkovali do kapiláry enzym a substrát v sendvičovém uspořádání, tj. zóna enzymu byla obklopena dvěma zónami modelového substrátu představovaného tripeptidem hippuryl-L-histidyl-L-leucinem (obr. 3A). Reakční směs se poté tvořila na příčných rozhraních díky difuznímu přechodu molekul enzymu a substrátu do sousední zóny (obr. 3B). Reakce byla ukončena separací složek reakční směsi po aplikaci napětí. Výsledné hodnoty Michaelisovy konstanty (K_M) byly vypočítány na základě kvantifikace produktu – kyseliny hippurové. Přestože se v době jejího představení jednalo o jedinou univerzální on-line techniku využívající CE, je nutné konstatovat, že k jejímu výraznějšímu rozšíření nedošlo. Důvod se skrývá především ve velice omezené účinnosti míchání a následné nízké citlivosti metody. Kvadratický vztah mezi dobou difuze a vzdáleností popsany Einsteinovou rovnicí ukazu-

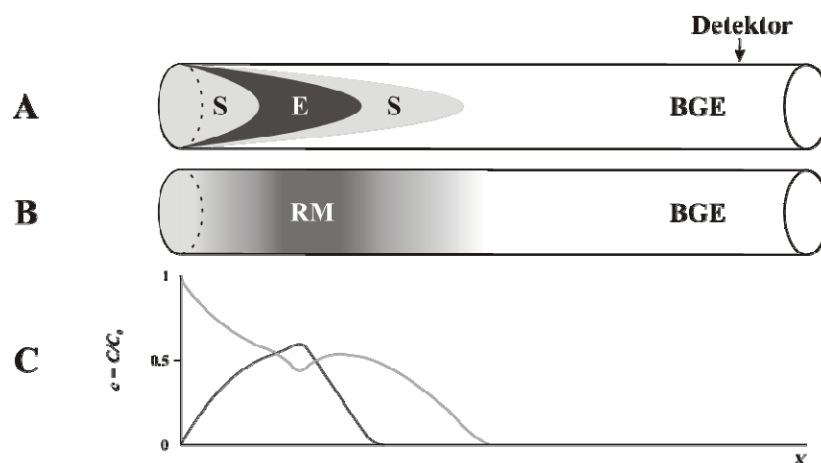


Obr. 3. **Míchání reaktantů podélnou difuzí.** (A) Analýza začíná nadávkováním úzkých zón substrátu (S) a enzymu (E) v sendvičovém uspořádání do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (BGE). (B) Reakční směs (RM) se posléze formuje díky difuzi molekul E a S přes příčná rozhraní mezi jednotlivými zónami. (C) Model závislosti bezrozměrné koncentrace (c) stanovené jako poměr mezi aktuální koncentrací reaktantu v kapiláře (C) a jeho počáteční koncentrací v nadávkovaném roztoku (C_0) na vzdálenosti od konce kapiláry (x) odhaluje, že distribuce reaktantů v RM není rovnoměrná

je, že difuze probíhá velice rychle na krátké vzdálenosti, například malá molekula s difuzním koeficientem $1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ projde do vzdálenosti $30 \text{ } \mu\text{m}$ za méně než 5 s, avšak do vzdálenosti 3 mm, tedy přibližně délky zóny nadávkované do kapiláry o průměru $50 \text{ } \mu\text{m}$ během 5 s tlakem 5 kPa, až za 750 hodin. Vytvořená reakční směs proto zaujímá pouze zlomek dávkovaného objemu enzymu. Navíc není homogenní (obr. 3C). Nerovnoměrné rozložení koncentrací enzymu a reaktantů způsobuje, že enzymová reakce v různých místech reakční směsi probíhá různou rychlostí, což značně komplikuje výpočty hodnot kinetických parametrů.

2.2.2. Metody založené na příčné difuzi

Techniku míchání reakční směsi pomocí difuze přes podélná rozhraní dávkovaných zón představili Krylov a spol.³⁰. Tento přístup (v anglicky psané literatuře označovaný jako transverse diffusion of laminar flow profiles, TDLFP) je založen na využití jevu popsaného Hagen-Poiseuilleovým zákonem. Ten říká, že díky působení tření rychlost toku kapaliny klesá s druhou mocninou rostoucí vzdálenosti od středu kapiláry. Výsledkem hydrodynamického dávkování tak je zóna, jejíž čelo má parabolický profil. Při následném dávkování proto do sebe sousední zóny postupně pronikají a tvoří mezi sebou podélná roz-



Obr. 4. **Míchání reaktantů příčnou difuzí.** (A) V tomto uspořádání jsou úzké zóny substrátu (S) a enzymu (E) do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (BGE) dávkovány vysokým tlakem. Ve výsledku tak mají parabolický profil s převážně podélnými rozhraními. (B) Reakční směs (RM) je poté tvořena příčnou difuzí molekul S a E. (C) Výsledná RM není homogenní, jak znázorňuje model závislosti koncentrace S a E na vzdálenosti od konce kapiláry

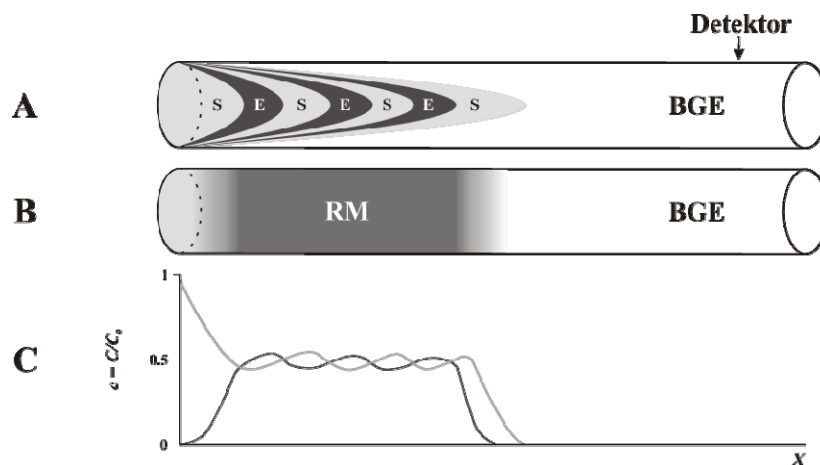
hraní, jež mají relativně velký povrch (obr. 4A). Reakční směs je pak převážně tvořena příčnou difuzí (obr. 4B). K ukončení reakce dochází opět aplikací separačního napětí. Kromě univerzální aplikovatelnosti, která byla demonstrována provedením on-line stanovení enzymové aktivity a lyzování celých buněk při chemické cytometrii³¹, se tato technika navíc vyznačuje i vyšší rychlostí míchání, neboť molekuly jednotlivých složek reakční směsi musí difundovat maximálně do vzdálenosti rovné poloměru kapiláry. Tu jsou i makromolekuly enzymu schopny překonat během jednotek minut. Oproti technice využívající k míchání enzymu a reaktantů podélnou difuzi, TDLFP vede k promíchání celého objemu nadávkované zóny enzymu, a tedy i zvýšení citlivosti stanovení. Nehomogenost výsledné reakční směsi je však pro oba přístupy společná (obr. 4C). Krylov a spol. z tohoto důvodu vytvořili počítačový model, který umožňuje spočítat koncentrační gradienty jednotlivých složek reakční směsi a následně stanovit kinetické a inhibiční parametry studované reakce^{31–33}. Aby jej však bylo možné použít, je nejprve nutné stanovit hodnoty difuzních koeficientů enzymu a všech reaktantů a viskozit jejich roztoků. Navíc nerovnoměrné rozložení jednotlivých složek reakční směsi a přítomnost oblastí s vysokou koncentrací enzymu vede k systematickému nadhodnocování výsledných kinetických a inhibičních parametrů. Ovlivněny jsou zejména hodnoty koncentrace inhibitoru, při níž dochází k 50% poklesu aktivity sledovaného enzymu (IC_{50}). Ty mohou být kvůli nerovnoměrnému promíchání reakční směsi nadhodnoceny oproti referenční hodnotě získané off-line stanovením pomocí CE více než 10krát (cit.³⁴). Proto TDLFP není vhodná pro studie, v nichž je analyzován vysoký počet vzorků anebo je kladen důraz na správnost výsledků.

Řemínek a spol.³⁵ představili metodu založenou na TDLFP, v níž úpravou dávkovací procedury dokázali pře-

konat hlavní nedostatky výše popsaného, původního přístupu. V principu jsou do kapiláry střídavě dávkovány 4 zóny substrátu a 3 zóny enzymu (obr. 5A). V porovnání s původním jednoduchým sendvičovým uspořádáním TDLFP, tento přístup umožňuje dosažení rovnoměrné distribuce enzymu a reaktantů v téměř celém objemu reakční směsi (obr. 5C). Aplikovatelnost navržené metody byla potvrzena studií, ve které byly stanoveny základní kinetické a inhibiční parametry systému tvořeného farmakologicky významným cytochromem P450 isoformou 2C9, modelovým substrátem diklofenakem a inhibitorem sulfafenazolem. Matematické modelování potvrdilo předpoklad rovnoměrného rozložení enzymu a reaktantů. Stanovené zdánlivé hodnoty K_M , Hillova koeficientu, inhibiční konstanty a IC_{50} odpovídaly hodnotám uvedeným v literatuře, které byly určeny jinými metodami. Dané uspořádání tak představuje univerzální techniku, která může být po optimalizaci inkubačních a separačních podmínek využita ke kinetickým a inhibičním studiím prakticky jakéhokoli enzymu. Metodu lze navíc snadno přenést do multikapilárního systému a využít při analýzách vysokého množství vzorků, jako např. při uvažovaném stanovení stability kandidátních látek vůči lidským biotransformačním enzymům v rámci časných fází vývoje nových léčiv.

3. Závěr

Během dvou desetiletí vývoje bylo představeno množství technik umožňujících míchání jednotlivě dávkovaného enzymu a reaktantů uvnitř separační kapiláry v rámci on-line stanovení enzymové aktivity pomocí CE. Díky různým principům a vlastnostem lze mezi nimi vybrat vhodnou techniku pro studium prakticky všech enzy-



Obr. 5. Optimalizované míchání reaktantů příčnou difuzí. (A) Analýza je zahájena opakovaným dávkováním úzkých zón substrátu (S) a enzymu (E) do kapiláry, která byla předem naplněna základním elektrolytem (BGE). (B) Difuze molekul S a E přes podélná rozhraní mezi jednotlivými zónami vede k rychlému vytvoření reakční směsi (RM). (C) Díky využití opakujících se zón je rozložení S a E rovnoměrné, a tedy enzymová reakce probíhá prakticky stejnou rychlostí ve většině objemu výsledné RM

mových systémů. Jelikož se v současné době při studiu vlastností enzymů stále více prosazuje trend zvyšování počtu analyzovaných vzorků se současnou minimalizací spotřebovaného množství enzymu a reaktantů, lze předpokládat, že případné zavedení on-line metod na multikapilárních CE systémech bude do budoucna stále více vyhledávanou cestou.

Práce vznikla za finanční podpory grantu GA ČR P206/10/0057 a Středoevropského technologického institutu – CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

LITERATURA

- Bergmeyer H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim 1983.
- Deyl Z., Tagliaro F., Mikšik I.: *J. Chromatogr.*, B 656, 3 (1994).
- Eisenthal R., Danson M. J. (ed.): *Enzyme Assays: A Practical Approach*. Oxford University Press Inc., New York 2002.
- Glatz Z.: *J. Chromatogr.*, B 841, 23 (2006).
- Regnier F. E., Patterson D. H., Harmon B. J.: *Trends Anal. Chem.* 14, 177 (1995).
- Emmer A., Roeraade J.: *J. Chromatogr.*, A 662, 375 (1994).
- Emmer A., Roeraade J.: *Chromatographia* 39, 271 (1994).
- Bao J. J., Fujima J. M., Danielson N. D.: *J. Chromatogr.*, B 699, 481 (1997).
- Křenková J., Foret F.: *Electrophoresis* 25, 3550 (2004).
- Urban P. L., Goodall D. M., Bruce N. C.: *Biotechnol. Adv.* 24, 42 (2006).
- Asanomi Y., Yamaguchi H., Miyazaki M., Maeda H.: *Molecules* 16, 6041 (2011).
- Bao J., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 608, 217 (1992).
- Harmon B. J., Patterson D. H., Regnier F. E.: *Anal. Chem.* 65, 2655 (1993).
- Xue Q., Yeung E. S.: *Nature* 373, 681 (1995).
- Harmon B. J., Leesong I., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.*, A 726, 193 (1996).
- Saevels J., Van Schepdael A., Hoogmartens J.: *Electrophoresis* 17, 1222 (1996).
- Harmon B. J., Leesong I., Regnier F. E.: *Anal. Chem.* 66, 3797 (1994).
- Patterson D. H., Harmon B. J., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.*, A 732, 119 (1996).
- Stahl J. W., Catherman A. D., Sampath R. K., Senviratne C. A., Strein T. G.: *Electrophoresis* 32, 1492 (2011).
- Van Dyck S., Van Schepdael A., Hoogmartens J.: *Electrophoresis* 22, 1436 (2001).
- Andreev V. P., Kamenev A. G., Popov N. S.: *Talanta* 43, 909 (1996).
- Koval D., Jirásková J., Stříšovský K., Konvalinka J., Kašička V.: *Electrophoresis* 27, 2558 (2006).
- Van Dyck S., Kaale E., Nováková S., Glatz Z., Hoogmartens J., Van Schepdael A.: *Electrophoresis* 24, 3868 (2003).
- Nováková S., Van Dyck S., Van Schepdael A., Hoogmartens J., Glatz Z.: *J. Chromatogr.*, A 1032, 173 (2004).
- Zhang J., Hoogmartens J., Van Schepdael A.: *Electrophoresis* 27, 35 (2006).
- Zhang J., Hoogmartens J., Van Schepdael A.: *Electrophoresis* 29, 56 (2008).
- Zhang J., Hoogmartens J., Van Schepdael A.: *Electrophoresis* 31, 65 (2010).
- Fan Y., Scriba G. K. E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 1076 (2010).
- Van Dyck S., Vissers S., Van Schepdael A., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.*, A 986, 303 (2003).
- Okhonin V., Liu X., Krylov S. N.: *Anal. Chem.* 77, 5925 (2005).
- Krylova S. M., Okhonin V., Evenhuis C. J., Krylov S. N.: *Trends Anal. Chem.* 28, 987 (2009).
- Okhonin V., Wong E., Krylov S. N.: *Anal. Chem.* 80, 7482 (2008).
- Krylova S. M., Okhonin V., Evenhuis C. J., Krylov S. N.: *J. Sep. Sci.* 32, 742 (2009).
- Wong E., Okhonin V., Berezovski M. V., Nozaki T., Waldmann H., Alexandrov K., Krylov S. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11862 (2008).
- Řemínek R., Zeisbergerová M., Langmajerová M., Glatz Z.: *Electrophoresis* 34, 2705 (2013).

R. Řemínek, M. Zeisbergerová, and Z. Glatz
(*Department of Biochemistry, Faculty of Science and Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno*): **Study of Enzymatic Reactions by On-line Capillary Electrophoresis**

This review deals with techniques of mixing enzymes and reactants in on-line determination of enzyme activity by capillary electrophoresis. The on-line methods, principles and applications in microanalysis and techniques based on transverse and longitudinal diffusion are discussed. Trends of future development of the field are outlined.