

## NOVÉ SMĚRY VE STUDIU BIOMOLEKULÁRNÍCH INTERAKCÍ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

LENKA MICHALCOVÁ a ZDENĚK GLATZ

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
glatz@chemi.muni.cz

Došlo 9.10.15, přijato 8.12.15.

**Klíčová slova:** kapilární elektroforéza, biomolekulární interakce, frontální analýza, afinitní kapilární elektroforéza, Hummel-Dreyerova metoda, vakantní pík, vakantní afinitní elektroforéza

### Obsah

1. Úvod
2. Metody využívané ke studiu biomolekulárních interakcí
3. Kapilární elektroforéza
  - 3.1. Metody s krátkou zónou vzorku
    - 3.1.1. Zónová migrace
    - 3.1.2. Afinitní kapilární elektroforéza
    - 3.1.3. Hummel-Dreyerova metoda
    - 3.1.4. Metoda vakantního píku a vakantní afinitní kapilární elektroforéza
  - 3.2. Metody s dlouhou zónou vzorku
  - 3.3. Kinetické módy kapilární elektroforézy
  - 3.4. Kapilární elektroforéza s imobilizovaným interakčním partnerem
4. Závěr

### 1. Úvod

Biomolekulární interakce jsou důležitou součástí všech biologických procesů, mezi které lze řadit nejen klasické interakce substrát-enzym, kofaktor-enzym, antigen-protilátka či ligand-receptor, ale i komplexnější děje, jako jsou přenosy nervových signálů, regulace a průběh transkripce a translace, či aktivace komplexních enzymových procesů. V současné době je kladen důraz na pochopení těchto interakcí z hlediska jejich mechanismu a síly vazby. Oba tyto parametry totiž ovlivňují konečný výsledek celého procesu, takže důkladná charakterizace jeho jednotlivých kroků včetně příslušných interakcí je nezbytná pro další využití a aplikace – jako jsou např. vývoj nových léčiv při porozumění interakce léčivo transportní protein, receptor či cílový enzym, případně vývoj moderních imunochemických metod<sup>1–3</sup>. Neustálý rozvoj metod

vhodných pro studium biomolekulárních interakcí je proto nezbytný a nesmírně důležitý. V této práci, která navazuje na dřívější práci Pacákové a spol.<sup>4</sup>, jsou představeny nejnovější metody, které se využívají ke studiu interakcí moderní separační metodou – kapilární elektroforézou.

### 2. Metody využívané ke studiu biomolekulárních interakcí

Jednoduchou reverzibilní reakci se stechiometrií 1:1, kdy molekuly S a L vytvářejí komplex SL, lze vyjádřit pomocí rovnice (1):



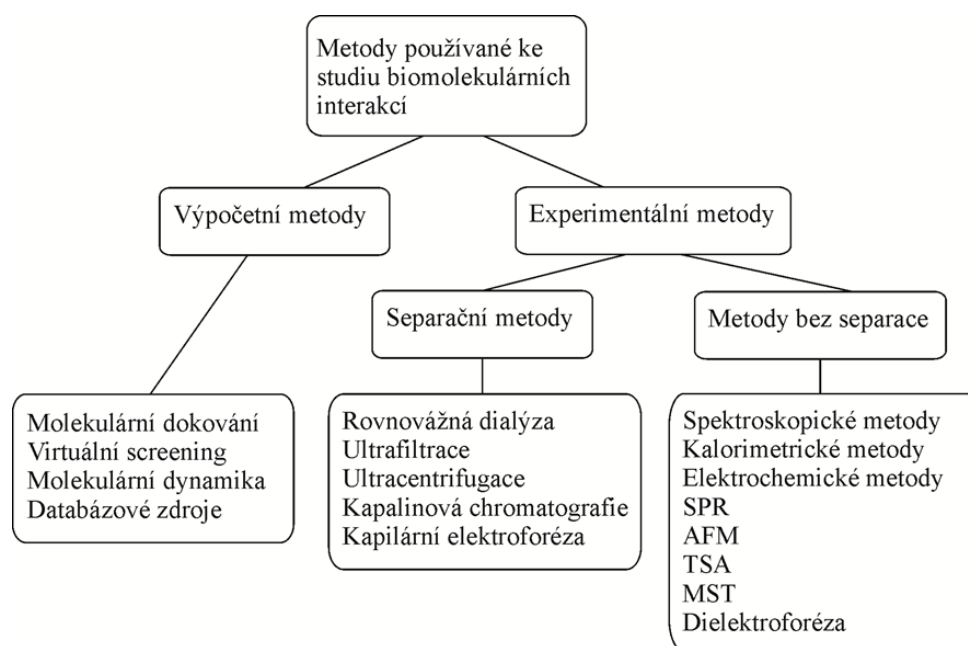
kde  $k_{\text{on}}$  je rychlostní konstanta tvorby komplexu a  $k_{\text{off}}$  je rychlostní konstanta disociace komplexu. Rovnovážnou vazebnou konstantu ( $K_b$ ), resp. disociační konstantu ( $K_d$ ) pak lze definovat pomocí rovnice (2):

$$K_b = \frac{[SL]}{[S][L]} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{1}{K_d} \quad (2)$$

Charakterizace interakce jako takové zahrnuje její ověření a stanovení některých kvantitativních ukazatelů, jako jsou právě  $K_b$ ,  $K_d$ ,  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  a počet vazných míst ( $n_i$ )<sup>4–7</sup>. Tyto kvantitativní parametry lze stanovit nejrůznějšími metodami, které je možné dělit dle různých kritérií (obr. 1).

Primárně se tyto metody dělí na výpočetní (počítačové, teoretické, virtuální) a experimentální. Výpočetní metody založené na počítačovém modelování nejběžněji využívají přístupů, jako jsou molekulární dokování, virtuální screening, molekulární dynamika a kombinace s databázovými zdroji. Výhodou těchto přístupů, ve srovnání s experimentálními metodami, je jejich relativně nízká cena, avšak nedostatkem je ještě stále menší přesnost. V ideálním případě je vhodné oba přístupy jak výpočetní, tak experimentální kombinovat<sup>8–12</sup>.

Experimentální metody lze dělit podle toho, zda využívají nebo nevyužívají separace volné a vázané složky interakčních partnerů<sup>2,3,13</sup>. Mezi neseparační metody tak patří široká škála spektroskopických metod – UV-VIS spektroskopie, fluorimetrie, nukleární magnetická rezonance, optická rotační disperze, cirkulární dichroismus, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, Ramanova spektroskopie, a hmotnostní spektrometrie (MS), kalorimetrické metody – diferenční skenovací a izotermální titrační kalorimetrie, elektrochemické metody, metoda excitace povrchových plasmonů (SPR), mikro-



Obr. 1. Rozdělení možných přístupů při studiu interakcí

skopie atomárních sil (AFM), metoda termálního posunu (TSA), termoforéza v malém měřítku (MST) a dielektroforéza<sup>2,14–21</sup>. Mezi separační metody lze zařadit rovnovážnou dialýzu, ultrafiltraci, ultracentrifugaci, kapalinovou chromatografii na tenké vrstvě či kolonovou, a v neposlední řadě i elektroforézu jak v planárním, tak i kapilárním uspořádání<sup>22–24</sup>, MS přitom může být podle daného experimentu řazena i mezi separační metody. Výhodou těchto metod může být detekce jednotlivých interagujících partnerů a/nebo komplexu separátně, což eliminuje rušení signálů způsobené maticí vzorku. U konvenčních metod, jako je např. dialýza, ultrafiltrace, ultracentrifugace, chromatografie a planární elektroforéza se vyskytuje řada omezujících faktorů, jako je objemový posun, Donnanův efekt, nespecifická adsorpce, únik interakčních partnerů přes membránu, dlouhá časová náročnost, velké objemy vzorku, relativně vysoké koncentrace interakčních partnerů či vysoké požadavky na jejich čistotu, stejně tak se lze setkat s chybami v důsledku sedimentace či zpětné difuze a viskozity<sup>24</sup>.

### 3. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) oplývá řadou výhod, ale najdou se u ní, jakožto u jiných metod, i nevýhody. V každém případě, od roku 1992, kdy bylo poprvé zaznamenáno její použití ke studiu interakce ligand-receptor, se tato metoda stala poměrně hojně využívanou metodou pro stanovení vazebných parametrů<sup>25–30</sup>.

Výhodami CE obecně jsou vysoká účinnost, nízká spotřeba vzorku a reagensů, rychlost analýz a možnost

automatizace. Při studiu interakcí pomocí CE, na rozdíl od jiných technik, lze zvláště vyzdvihnout možnost interakce ve volném roztoku případně i za fyziologických podmínek, bez imobilizace a značení některého z interakčních partnerů<sup>2,31</sup>. Nicméně, CE má také své nevýhody, mezi které patří např. riziko adsorpce proteinů na stěnu separační kapiláry a nízké detekční limity, zejména u běžně používaných UV-VIS detektorů. Využitím detekce pomocí laserově indukované fluorescence lze citlivost výrazně zvýšit, avšak přirozenou fluorescenci vykazuje jen omezený počet molekul. Proto je nutná derivatizace, která však může ovlivnit vazebnou interakci<sup>32</sup>. Další variantou, jak zvýšit citlivost, je využití MS detekce, u které jsou však nezbytné MS-kompatibilní podmínky<sup>33–36</sup>.

Ke studiu interakcí ve volném roztoku lze využít řadu metod založených na CE. Výpočet  $K_b$  ze série CE experimentů je prováděn buď na základě změny elektroforetické mobility ( $\Delta\mu$ ) nebo na základě koncentrace vázané a volné složky<sup>5–7</sup>. Jednoduchým dělením dle délky zóny nadávkovaného vzorku lze metody dělit na krátkozonné a dlouhozonné. Mezi krátkozonné metody patří zónová migrace (CZE), afinitní kapilární elektroforéza (ACE), metoda Hummel-Dreyer (HD), metoda vakantního píku (VP) a vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE). Ke druhé skupině patří metody frontální, tj. kapilární elektroforéza-frontální analýza (CE-FA) a kontinuální frontální analýza (FACCE). Nejrozšířenějšími přístupy vzhledem k jejich jednoduchosti, spolehlivosti a univerzálnosti jsou ACE a CE-FA, proto budou diskutovány ve větším rozsahu. Základní informace ke všem výše zmíněným metodám jsou shrnuty v tab. I a II, jejich charakteristické záznamy získané metodou CE jsou uvedeny v tab. III.

Tabulka I  
Souhrnné informace ke krátkozonným metodám kapilární elektroforézy ve volném roztoku

Parametr	CZE	ACE	HD	VP	VACE	
Základní elektrolyt	BGE	BGE + S / BGE + L	BGE + S / BGE + L	BGE + S + L	BGE + S + L	
Vzorek	S + L	L / S	L / S	BGE	BGE	
Hodnotící parametry	plocha píku [L <sub>volné</sub> ]	$\Delta\mu$	plocha píku [L <sub>vázané</sub> ]	plocha píku [L <sub>volné</sub> ]	$\Delta\mu$	
Získané informace	$K_{b1}, n_1, K_{b2}, n_2$	$K_b$	$K_{b1}, n_1, K_{b2}, n_2$	$K_{b1}, n_1, K_{b2}, n_2$	S-vakance $K_b$	L-vakance $K_{b1}, n_1, K_{b2}, n_2$
Podmínky	$\mu_L \neq \mu_S, \mu_{SL}$	$\mu_{SL} \neq \mu_L$	$\mu_{SL} = \mu_S$	$\mu_{SL} = \mu_S$	$\mu_{SL} \neq \mu_S$	$\mu_{SL} \neq \mu_L$
Pozitiva	nevyžaduje purifikované vzorky snadno zjistitelné procento vazby stechiometrická informace vícenásobné rovnováhy	nevyžaduje purifikované vzorky snadno zjistitelné procento vazby separace enantiomerů	nevyžaduje purifikované vzorky snadno zjistitelné procento vazby stechiometrická informace vícenásobné rovnováhy	nevyžaduje purifikované vzorky snadno zjistitelné procento vazby	nevyžaduje purifikované vzorky vhodné pro slabě rozpustné vzorky	
Negativa	disociace komplexu	pouze stechiometrie 1:1	zdlouhavá a náročná kalibrace	velká spotřeba interakčních partnerů nízká citlivost či saturace detektoru – absorpce BGE	velká spotřeba interakčních partnerů nízká citlivost či saturace detektoru – při slabě/silné absorpci BGE těžko zjistitelné procento vazby	
Vazebná kinetika	pomalá	rychlá	rychlá	rychlá	rychlá	
Kalibrace	externí		externí / interní	interní		

Ke stanovení vazebných parametrů lze využít i dalších metod založených na CE, které nelze přímo zařadit do předešlého systému. Jednou z možností jsou metody patřící do skupiny kinetické kapilární elektroforézy (KCE). V této kategorii metod lze nalézt krátkozonné i dlouhózonné metody, metody obsahující v základním elektrolytu (BGE) aditivum, tj. alespoň jednoho z interakčních partnerů – molekuly S/L některé varianty dokonce neobsahují v anodové/katodové elektrodové nádobce stejný roztok<sup>37</sup>. Dalšími možnými variantami, kde ale stanovení neprobíhá ve volném roztoku, protože ligand je imobilizovaný v gelu nebo na stacionární fázi, je stanovení afinitní kapilární gelovou elektroforézou (CGE) či afinitní kapilární elektrochromatografií (CEC). Obě tyto metody lze z předešlého hlediska zařadit do krátkozonných<sup>38–40</sup>.

### 3.1. Metody s krátkou zónou vzorku

Metody patřící do této skupiny se vyznačují dávkováním krátké zóny vzorku. Z určitého hlediska jsou tyto metody podobné, v jiných kritériích se zcela liší. Všechny tyto metody jsou prováděny ve volném roztoku a dle rych-

losti vazebné kinetiky je lze využít pro stanovení interakcí, jak s pomalou kinetikou, kdy lze komplex alespoň částečně detegovat, tak s kinetikou rychlou, při níž komplex nelze detegovat jako entitu.

#### 3.1.1. Zónová migrace

CZE je vhodná pro popis interakcí s pomalou kinetikou. Vyznačuje se tím, že směs interagujících partnerů S a L je analyzována v čistém BGE bez aditiv. Vzhledem k pomalé kinetice, tj. pomalé disociaci komplexu vůči době analýzy, je detegován přímo vzniklý komplex (tab. III – CZE). Rovnovážné směsi molekul S a L v různých poměrech jsou po ustálení rovnováhy separovány v CE systému. Z ploch píků odpovídající volné a vázané složce jsou následně vypočteny hodnoty  $K_b$  a  $n_i$ . Výhodou je, že molekuly S a L nemusí mít rozdílnou velikost a nemusí se vyskytovat ani jako čisté látky. Tuto metodu lze použít jen tehdy, je-li disociace komplexu v průběhu CE analýzy zanedbatelná, tj. je do 10 % (cit.<sup>5,41</sup>).

#### 3.1.2. Afinitní kapilární elektroforéza

Při ACE, popisující rychlou kinetiku, je kapilára naplněna BGE obsahujícím jednoho z interakčních partnerů (S/

Tabulka II

Souhrnné informace k dlouhozonným metodám kapilární elektroforézy ve volném roztoku

Parametr	CE-FA	FACCE
Základní elektrolyt	BGE	BGE
Vzorek	S + L	S + L
Hodnotící parametry	výška plata [ $L_{\text{volné}}$ ]	výška plata [ $L_{\text{volné}}$ ]
Získané informace	$K_{b1}$ , $n_1$ , $K_{b2}$ , $n_2$	$K_{b1}$ , $n_1$ , $K_{b2}$ , $n_2$
Podmínky	$\mu_{\text{SL}} = \mu_{\text{S}}$ $\mu_{\text{L}} \neq \mu_{\text{S}}, \mu_{\text{SL}}$	$\mu_{\text{SL}} = \mu_{\text{S}}$ $\mu_{\text{L}} > \mu_{\text{SL}}$
Pozitiva	snadno zjistitelné procento vazby stechiometrická informace vícenásobné rovnováhy nízká spotřeba vzorku	snadno zjistitelné procento vazby stechiometrická informace vícenásobné rovnováhy
Negativa		vyšší spotřeba vzorku nižší limity detekce
Vazebná kinetika	pomalá rychlá	pomalá rychlá
Kalibrace	externí	externí

L) v různých koncentracích a malé množství vzorku obsahujícího v konstantní koncentraci druhého interakčního partnera (L/S) je dávkováno do kapiláry.  $K_b$  je vypočtena na základě  $\Delta\mu$  nadávkovaného partnera v důsledku opakujících se vícenásobných asociačních a disociačních reakcí s interakčním partnerem obsaženým v BGE. Charakteristický posun v migračních časech, který je projevem  $\Delta\mu$ , je zobrazen v tab. III – ACE. Podmínky pro použití této metody jsou, aby kinetika tvorby komplexu SL ve srovnání s dobou analýzy byla rychlá, vazebná stochiometrie byla 1:1 a použité koncentrace molekul S a L se výrazně lišily (10  $\mu\text{M}$  vs. 0,4 mM)<sup>2,5,42</sup>. Pokud nastane situace, kdy stabilita vzniklého komplexu SL je vysoká, jsou detegovány široké a rozmyté píky. To je způsobeno nízkým počtem následných rovnováh mezi interakčními partnery během analýzy v kapiláře. V tomto případě lze rovnovážné konstanty určit analýzou elučních profilů píků pomocí přístupu KCE – viz níže<sup>43</sup>. Nastane-li naopak varianta, že interakce mezi partnery jsou slabé, je vhodné snížit pohyblivost ligandu např. imobilizací v gelu nebo na stacionární fázi (CGE, CEC) atd. – viz níže<sup>44</sup>. Další možnou variantou je prohodit umístění interagujících partnerů – ten který byl součástí BGE, bude dávkován jako vzorek, a naopak. Při studiu interakcí makromolekul s malými ligandy jako např. protein-léčivo, může dojít k tomu, že  $\Delta\mu$  bude téměř nepozorovatelný, proto uspořádání, v němž je makromolekula dávkována jako vzorek do kapiláry naplněné BGE obsahující malý ligand jako aditivum, nebude vhodné<sup>45,46</sup>. Při optimalizaci se volí studované koncentrace tak, aby jejich numerické hodnoty byly srovnatelné s hodnotou  $K_d$  a koncentrační rozsah byl zároveň dostatečně široký pro přesné stanovení. Je tedy obtížné získat správnou hodnotu

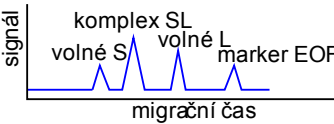
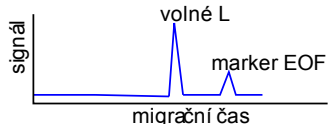

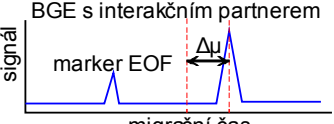
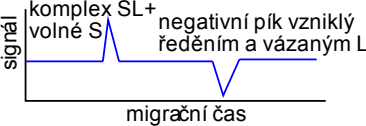
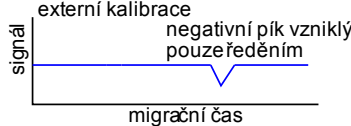
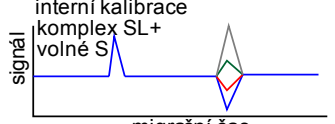
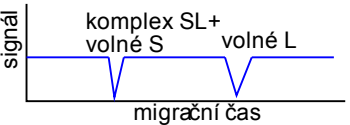
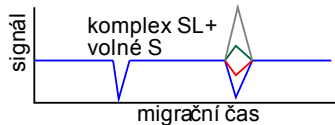
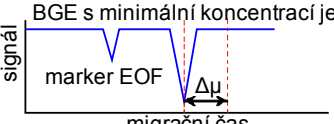
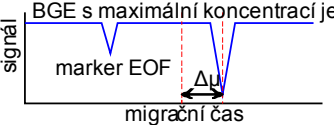
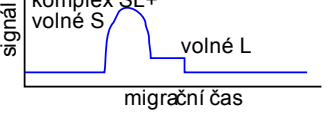
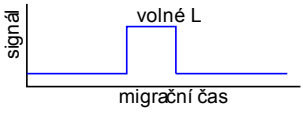
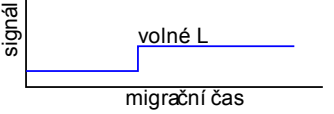
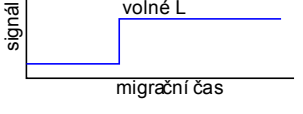
pro afinitní systémy s  $K_b > 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . ACE dále neposkytuje informaci o reakční stochiometrii a není schopna stanovit vícenásobné rovnováhy<sup>5</sup>. Výhodné je však využít ACE ke screeningu, protože pro jednu molekulu obsaženou v BGE lze otestovat zároveň i několik interagujících molekul obsažených ve vzorku<sup>47</sup>. Tento přístup je obzvláště ceněným, je-li problémem nedostatek vstupního materiálu. Kromě toho, ACE nevyžaduje pro analýzy purifikované vzorky, což je velkou výhodou, dále je-li vzorek nestálý a tvoří neaktivní produkty. ACE také nepotřebuje přesnou hodnotu koncentrace a může být analyzována přímo racemická směs látek či izoenzymy<sup>5,48</sup>. V odborné literatuře se lze setkat s nejrůznějšími variantami ACE – např. s ACE s částečným plněním kapiláry, s několikanásobným dávkováním vzorku a s průtočným částečným plněním kapiláry (Partial filling CAE, Multiple-step sample and ligand-injection CAE, Flow-through partial filling CAE)<sup>6,49–53</sup>.

### 3.1.3. Hummel-Dreyerova metoda

Metoda HD využívá stejného experimentálního uspořádání, jako metoda ACE, tzn. kapilára je naplněna BGE obsahujícím jednoho z interakčních partnerů (většinou se jedná o menší molekulu z interakčního páru; pro srozumitelnější vysvětlení budeme v tomto případě hovořit o molekule L) v různých koncentracích a malé množství vzorku, tedy molekula S, je dávkována do kapiláry.  $K_b$  je vypočtena na základě plochy negativního píku, který odpovídá koncentraci vázané složky. Tento pík vzniká v důsledku průchodu vzorku (S) kapilárou naplněnou BGE obsahující molekuly L. Pozitivní pík náleží komplexu SL a volným molekulám S. Charakteristický záznam lze nalézt v tab. III – HD. Mezi nesporné výhody HD patří možnost jednodu-

Tabulka III

Charakteristické elektroferogramy pro metody kapilární elektroforézy ve volném roztoku

Metoda	Záznam z měření	Záznam z kalibrace
CZE		
ACE	<p>BGE bez interakčního partnera</p> 	
	<p>BGE s interakčním partnerem</p> 	
HD		<p>externí kalibrace</p> 
		<p>interní kalibrace</p>  <p>přechod z negativního do pozitivního píku pomocí postupných přidavků složky L</p>
VP		 <p>přechod z negativního do pozitivního píku pomocí postupných přidavků složky L</p>
VACE	<p>BGE s minimální koncentrací jednoho z partnerů</p> 	
	<p>BGE s maximální koncentrací jednoho z partnerů</p> 	
CE-FA		
FACCE		

chého stanovení vícenásobných rovnováh, stechiometrie vazby, procenta vazby a navíc nevyžaduje vysoce purifikované vzorky. Nevýhodou jsou zdlouhavé a složité kalibrační postupy, které lze provádět ve dvou formátech – interní a externí kalibrace (tab. III – HD).

Při interní kalibraci je analyzována série vzorků s konstantní koncentrací složky S a zvyšující se koncentrací složky L, která je zároveň obsažena jako aditivum o konstantní koncentraci v BGE. Charakteristický negativní pík v tomto případě postupně mizí a dochází k objevení pozitivního píku, v témže migračním čase. Jednoduchou interpolací lze získat koncentraci vázané složky L, která odpovídá právě nulové základní linii při přechodu z negativního do pozitivního píku. Externí kalibrace je ve své podstatě o něco jednodušší než kalibrace interní. Vychází z předpokladu, že negativní pík vzniká dvěma hlavními způsoby: *i*) interakcí a *ii*) ředěním při dávkování vzorku do kapiláry. Proto se negativní pík vzorku koriguje na negativní pík čistého BGE, čímž je zaručeno, že příspěvek je dán pouze interakcí. O obou variantách, tj. jak externí<sup>5,46,54–56</sup>, tak interní kalibraci<sup>5,46,57–59</sup>, je možno nalézt podrobnější informace v řadě monografií.

#### 3.1.4. Metoda vakantního píku a vakantní afinitní kapilární elektroforéza

Metody VP a VACE využívají naprosto stejného experimentálního uspořádání, kdy je kapilára naplněna BGE obsahující směs S a L, a dává se malé množství čistého BGE. V obou případech jsou koncentrace jedné složky v BGE konstantní a druhá variabilní (pro lepší představu S – konstantní, L – variabilní). Na elektroferogramu (tab. III – VP, VACE) jsou zaznamenány dva negativní píky. Jeden z negativních píků odpovídá vzniklému komplexu SL a volné složce prvního interakčního partnera, druhý pak odpovídá volné složce druhého interakčního partnera.

Hodnotícím parametrem pro výpočet  $K_b$  u VP je plocha negativního píku, která odpovídá pouze volné složce. Kvantifikaci lze provést interní kalibrací, kdy do kapiláry obsahující směs interakčních partnerů S a L je dávkován BGE s postupně se zvyšující koncentrací partnera L (variabilní složka BGE) – negativní pík postupně přechází do pozitivního, stejně jako u HD metody. Menší přesnost a větší rozptyl v experimentálních datech vyžaduje větší počet opakování. Nevýhodou je i poměrně velká spotřeba interakčních partnerů, obsažených v BGE, ve srovnání s dalšími CE metodami. Důležitá je volba BGE z hlediska absorpce, při nízké se setkáváme se slabou citlivostí, při silné dochází k saturaci detektoru. Výhodou je, že metoda nevyžaduje vysoce purifikované vzorky a relativně snadno lze zjistit procento vazby<sup>2,42,60,61</sup>.

Hodnotícím kritériem u VACE, stejně jako u ACE, je  $\Delta\mu$  vakantního píku. Výhodou této metody, na rozdíl od ACE, je možnost získat  $n_i$ . VACE lze provádět přitom dvěma způsoby, buď je koncentrace složky L v BGE konstantní a koncentrace složky S je variabilní anebo naopak, koncentrace S je konstantní a koncentrace L je variabilní. Podle toho je hodnocen posun L-vakance a nebo S-vakance. Nevýhody jsou srovnatelné s VP metodou

a navíc není až tak jednoduché zjistit procento vazby. Metoda nevyžaduje purifikované vzorky, je dobře využitelná pro slabě rozpustné ligandy ve vodném prostředí<sup>5,42,62</sup>, a je vhodná pro stanovení rozsahu kompetitivních vazeb<sup>63</sup>.

#### 3.2. Metody s dlouhou zónou vzorku

Metody CE-FA a FACCE jsou charakteristické relativně dlouhou zónou nadávkovaného vzorku, který vždy obsahuje rovnovážnou směs interakčních partnerů. Doporučené nadávkované množství je více jak 5 % z objemu kapiláry, většinou se pohybuje v rozmezí 5–20 % (cit.<sup>5,64–69</sup>). Díky dlouhé zóně vzorku dochází k tomu, že vzniklé plato, které odpovídá volné složce, je stabilní a není ovlivněno změnami migračního času a změnami elektroosmotického toku (EOF)<sup>31</sup>. Podmínkou těchto metod je, že  $\mu$  jedné ze složek se rovná  $\mu$  komplexu SL (cit.<sup>70</sup>). Během FACCE je dávkován vzorek rovnovážné směsi kontinuálně, z čehož vyplývá další z podmínek použitelnosti této metody –  $\mu$  variabilní složky musí být menší než  $\mu$  konstantní složky. V obou případech (CE-FA, FACCE) je hodnotícím kritériem výška vzniklého platu volné složky (tab. III – CE-FA, FACCE) a její koncentrace je následně odečtena z kalibrační přímky. Obě popsané metody poskytují informaci o  $K_b$  a  $n_i$ . Mezi výhody těchto metod patří zejména schopnost vypořádat se s vícenásobnými rovnováhami, charakterizovat reakční stechiometrii, možnost stanovit konstanty v systémech s rychlou i pomalou kinetikou. Další předností je jejich dostatečná robustnost a možnost jednoduchého stanovení procenta vazby<sup>2,5,31</sup>. U CE-FA je poměrně nízká spotřeba vzorku, zatímco u FACCE je díky kontinuálnímu dávkování vzorku spotřeba výrazně vyšší. Dalším negativem FACCE, oproti klasické CE-FA, je nižší citlivost detekce<sup>59,71–75</sup>.

#### 3.3. Kinetické módy kapilární elektroforézy

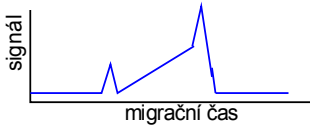
KCE pro stanovení  $k_{on}$  a  $k_{off}$  poprvé použil profesor Krylov se svou skupinou v roce 2002 (cit.<sup>76</sup>). Od té doby bylo publikováno několik variant KCE a lze je definovat jako metody, které poskytují nejen informaci o hodnotách rovnovážných konstant  $K_b$  a  $K_d$ , ale i o rychlostních konstantách  $k_{on}$  a  $k_{off}$ . K vyhodnocování těchto metod, ve srovnání s klasickými afinitními metodami, je nutné použít složitější matematické přístupy a hodnotícími parametry jsou pozice a tvar píku. Experimentální uspořádání je variabilní, bližší informace o kinetických módech lze najít v řadě publikací<sup>37,76–79</sup>. V tab. IV jsou shrnuty základní informace k jedné z kinetických metod – nerovnovážné kapilární elektroforéze rovnovážných směsí (NECEEM, Non-Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures).

#### 3.4. Kapilární elektroforéza s imobilizovaným interakčním partnerem

Důvodů, proč využít tyto varianty, je hned několik a byly již zmíněny výše. Interakčního partnera lze imobilizovat

Tabulka IV

Základní informace k nerovnovážné kapilární elektroforéze analyzující rovnovážnou směs

Metoda	Základní elektrolyt	Vzorek	Hodnotící parametry	Získané informace	Podmínky	Typický záznam
NECEEM	BGE	S + L	Plocha píku, migrační čas	$K_b, K_d, k_{on}, k_{off}$	$\mu_L \neq \mu_S$	

zovat v gelu, jde tedy o stanovení pomocí afinitní CGE, nebo na stacionární fázi, kdy se jedná o afinitní CEC. Tyto varianty sice neprobíhají ve volném roztoku, což může způsobovat řadu nevýhod, jako jsou změna vazebných vlastností díky imobilizaci, špatně kontrolovatelná koncentrace vázané složky, což také v konečném důsledku znamená obtížnou přípravu gelů či stacionárních fází s různou koncentrací navázaného partnera a v neposlední řadě s obtížným promýváním kapiláry, regenerací povrchu a stabilitou navázané složky. Avšak výhodou těchto přístupů je spotřeba velmi malého množství imobilizovaného interakčního partnera<sup>80</sup>.

#### 4. Závěr

Během posledních let bylo představeno mnoho metod založených na CE umožňujících stanovit vazebné parametry interakce. Díky různým principům a vlastnostem lze mezi nimi vybrat vhodnou metodu pro studium prakticky všech možných vazebných parametrů (velikost molekul, počty vazebných míst, vazebné i kinetické konstanty). Jelikož se v současné době při studiu interakcí stále více uplatňuje trend kombinace nejrůznějších metod a zvyšování počtu analyzovaných vzorků se současnou minimalizací spotřebovaného materiálu, lze předpokládat, že CE bude i do budoucna využívánou metodou pro stanovení těchto parametrů. V následujícím období lze očekávat rozvoj převážně CE metod využívajících elektroforetické čipy, kde ve srovnání s klasickou CE, jsou analýzy podstatně rychlejší, s výrazně nižšími nároky na množství spotřebovaného materiálu a tím se i podstatně snižují náklady na analýzu.

*Práce vznikla za finanční podpory grantu GA ČR P206/12/G014.*

#### Seznam zkratk

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
AFM	mikroskopie atomárních sil
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CE-FA	kapilární elektroforéza - frontální analýza
DEP	dielektroforéza
EOF	elektroosmotický tok

FACCE	kapilární elektroforéza - kontinuální frontální analýza
HD	Hummel-Dreyerova metoda
$K_b$	rovnovážná vazebná konstanta
KCE	kinetická kapilární elektroforéza
$K_d$	rovnovážná disociační konstanta
$k_{off}$	rychlostní konstanta disociace komplexu
$k_{on}$	rychlostní konstanta tvorby komplexu
MS	hmotnostní spektrometrie
MST	termoforéza v malém měřítku
NECEEM	nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí
$n_i$	počet vazných míst
SPR	metoda excitace povrchových plasmonů
TSA	metoda termálního posunu
VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza
VP	metoda vakantního píku
$\mu$	elektroforetická mobilita

#### LITERATURA

- Zheng X., Li Z., Beeram S., Podariu M., Matsuda R., Pfaunmiller E. L., White C. I. II, Carter N., Hage D. S.: *J. Chromatogr. B* 968, 49 (2014).
- Vuignier K., Schappler J., Veuthey J. L., Carrupt P. A., Martel S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 53 (2010).
- He X. Y., Ding Y. S., Li D. Z., Lin B. C.: *Electrophoresis* 25, 697 (2004).
- Pacáková V., Štulík K., Hubená S., Tichá M.: *Chem. Listy* 94, 97 (2000).
- Busch M. H. A., Carels L. B., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 777, 311 (1997).
- Tanaka Y., Terabe S.: *J. Chromatogr. B* 768, 81 (2002).
- Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 721, 173 (1996).
- Aguiar A. C. C., da Rocha E. M. M., de Souza N. B., Franca T. C. C., Krettli A. U.: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 831 (2012).
- Parenti M. D., Rastelli G.: *Biotechnol. Adv.* 30, 244 (2012).
- Oprea T. I., Matter H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 349 (2004).
- Alonso H., Bliznyuk A. A., Gready J. E.: *Med. Res.*

- Rev. 26, 531 (2006).
12. Cornell W., Nam K.: *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 844 (2009).
  13. Gilson M. K., Zhou H. X.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 21 (2007).
  14. Chen D. D., Wu Q., Wang J., Wang Q., Qiao H.: *Spectrochim. Acta A* 135, 511 (2015).
  15. Shu Y., Xue W. W., Xu X. Y., Jia Z. M., Yao X. J., Liu S. W., Liu L. H.: *Food Chem.* 173, 31 (2015).
  16. Siligardi G., Hussain R., Patching S. G., Phillips-Jones M. K.: *BBA-Biomembranes* 1838, 34 (2014).
  17. Baek S. H., Chang W.-J., Baek J.-Y., Yoon D. S., Bashir R. L., Sang W.: *Anal. Chem.* 81, 7737 (2009).
  18. Willemsen O. H., Snel M. M. E., Cambi A., Greve J., De Grooth B. G., Figdor C. G.: *Biophys. J.* 79, 3267 (2000).
  19. Jerabek-Willemsen M., Andre T., Wanner R., Roth H. M., Duhr S., Baaske P., Breitsprecher D.: *J. Mol. Struct.* 1077, 101 (2014).
  20. Timmer C. M., Michmerhuizen N. L., Witte A. B., Van Winkle M., Zhou D. J., Sinniah K.: *J. Phys. Chem. B* 118, 1784 (2014).
  21. Rogez-Florent T., Duhamel L., Goossens L., Six P., Drucbert A. S., Depreux P., Danze P. M., Landy D., Goossens J. F., Foulon C.: *J. Mol. Recognit.* 27, 46 (2014).
  22. Vuignier K., Guillaume D., Veuthey J. L., Carrupt P. A., Schappler J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74, 205 (2013).
  23. Trnková L., Boušová I., Staňková V., Dršata J.: *J. Mol. Struct.* 985, 243 (2011).
  24. Liu Z. S., Li F. M., Huang Y. S.: *Biomed. Chromatogr.* 13, 262 (1999).
  25. Carpenter J. L., Camilleri P., Dhanak D., Goodall D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 11, 804 (1992).
  26. Heegaard N. H. H., Robey F. A.: *Anal. Chem.* 64, 2479 (1992).
  27. Honda S., Taga A., Suzuki K., Suzuki S., Kakehi K.: *J. Chromatogr.* 597, 377 (1992).
  28. Chu Y. H., Whitesides G. M.: *J. Org. Chem.* 57, 3524 (1992).
  29. Chu Y. H., Avila L. Z., Biebuyck H. A., Whitesides G. M.: *J. Med. Chem.* 35, 2915 (1992).
  30. Kraak J. C., Busch S., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 608, 257 (1992).
  31. Ostergaard J., Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 24, 2903 (2003).
  32. Pedersen J. T., Ostergaard J., Houen G., Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* 29, 1723 (2008).
  33. Vuignier K., Veuthey J. L., Carrupt P. A., Schappler J.: *Electrophoresis* 33, 3306 (2012).
  34. Ossipov K., Scaffidi-Domianello Y. Y., Seregina I. F., Galanski M., Keppler B. K., Timerbaev A. R., Bolshov M. A.: *J. Inorg. Biochem.* 137, 40 (2014).
  35. Abd El-Hady D., Albishri H. M.: *J. Chromatogr. B* 911, 180 (2012).
  36. Mironov G. G., Logie J., Okhonin V., Renaud J. B., Mayer P. M., Berezovski M. V.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 1232 (2012).
  37. Galievsky V. A., Stasheuski A. S., Krylov S. N.: *Anal. Chem.* 87, 157 (2015).
  38. Kašička, V., Wilson I. D. (ed.): *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, Oxford 2007.
  39. Lipponen K., Liu Y., Stege P. W., Oorni K., Kovanen P. T., Riekkola M. L.: *Anal. Biochem.* 424, 71 (2012).
  40. Davila-El Rassi G. M., Mitchum J. A., Escobar M. C., Rayas-Duarte P., El Rassi Z.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26, 2465 (2003).
  41. Heegaard N. H. H., Nilsson S., Guzman N. A.: *J. Chromatogr. B* 715, 29 (1998).
  42. Busch M. H. A., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 777, 329 (1997).
  43. Avila L. Z., Chu Y. H., Blossey E. C., Whitesides G. M.: *J. Med. Chem.* 36, 126 (1993).
  44. Birnbaum S., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 64, 2872 (1992).
  45. Zhang Y. T., Xu M. T., Du M., Zhou F. M.: *Electrophoresis* 28, 1839 (2007).
  46. Michalcová L., Glatz Z.: *J. Sep. Sci.* 38, 325 (2015).
  47. Zhang L.-W., Wang K., Zhang X.-X.: *Anal. Chim. Acta* 603, 101 (2007).
  48. El-Hady D., Kuehne S., El-Maali N., Waetzig, H.: *J. Pharmaceut. Biomed.* 52, 232 (2010).
  49. Mito E., Gomez F. A.: *Chromatographia* 50, 689 (1999).
  50. Kaddis J., Mito E., Heintz J., Plazas A., Gomez F. A.: *Electrophoresis* 24, 1105 (2003).
  51. Růžička M., Čížková M., Jirásek M., Teplý F., Koval D., Kašička V.: *J. Chromatogr. A* 1349, 116 (2014).
  52. Zavaleta J., Chinchilla D. B., Ramirez A., Pao A., Martinez K., Nilapwar S., Ladbury J. E., Mallik S., Gomez F. A.: *Talanta* 71, 192 (2007).
  53. Amundsen L. K., Siren H.: *Electrophoresis* 28, 3737 (2007).
  54. Yan W. Y., Colyer C. L.: *J. Chromatogr. A* 1135, 115 (2006).
  55. Quaglia M. G., Bossu E., Dell'Aquila C., Guidotti M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1033(1997).
  56. Donati E., Polcaro C. M.: *J. Sep. Sci.* 29, 2853 (2006).
  57. Rudnev A. V., Aleksenko S. S., Semenova O., Hartinger C. G., Timerbaev A. R., Keppler B. K.: *J. Sep. Sci.* 28, 121 (2005).
  58. Oravcová J., Sojková D., Lindner W.: *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 682, 349 (1996).
  59. Gao J. Y., Dubin P. L., Muhoberac B. B.: *Anal. Chem.* 69, 2945 (1997).
  60. Hage D. S., Tweed S. A.: *J. Chromatogr. B* 699, 499 (1997).
  61. Berger G., Girault G.: *J. Chromatogr. B* 797, 51 (2003).
  62. Busch M. H. A., Boelens H. F. M., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 775, 313 (1997).
  63. Erim F. B., Kraak J. C.: *J. Chromatogr. B* 710, 205 (1998).
  64. Zhao P., Zhu G., Zhang W., Zhang L., Liang Z., Zhang Y.: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 257 (2009).



65. Lu Q.-H., Ba C.-D., Chen D.-Y.: *J. Pharmaceut. Biomed.* *47*, 888 (2008).
66. Vuignier K., Schappler J., Veuthey J. L., Carrupt P. A., Martel S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *53*, 1288 (2010).
67. Ostergaard J., Heegaard N. H. H.: *Electrophoresis* *27*, 2590 (2006).
68. Chen Z., Weber S. G.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* *27*, 738 (2008).
69. Ohnishi T., Mohamed N. A. L., Shibukawa A., Kuroda Y., Nakagawa T., El Gizawy S., Askal H. F., El Kommos M. E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *27*, 607 (2002).
70. Winzor D. J.: *Anal. Biochem.* *383*, 1 (2008).
71. Sisavath N., Leclercq L., Le Saux T., Oukacine F., Cottet H.: *J. Chromatogr. A* *1289*, 127 (2013).
72. Hashidzume A., Shimomachi T., Sato T.: *Int. J. Anal. Chem.* *2011*, 1.
73. Mrestani Y., Hammitzch M., Neubert R. H. H.: *Chromatographia* *69*, 1321 (2009).
74. Hattori T., Kimura K., Seyrek E., Dubin P. L.: *Anal. Biochem.* *295*, 158 (2001).
75. Hattori T., Hallberg R., Dubin P. L.: *Langmuir* *16*, 9738 (2000).
76. Berezovski M., Krylov S. N.: *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 13674 (2002).
77. Petrov A., Okhonin V., Berezovski M., Krylov S. N.: *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 17104 (2005).
78. Okhonin V., Petrov A. P., Berezovski M., Krylov S. N.: *Anal. Chem.* *78*, 4803 (2006).
79. Krylov S. N.: *J. Biomol. Screen.* *11*, 115 (2006).
80. Berthod A., Rodriguez M., Armstrong D. W.: *Electrophoresis* *23*, 847 (2002).

**L. Michalcová and Z. Glatz** (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*):  
**New Directions in the Study of Biomolecular Interactions by Capillary Electrophoresis**

This review provides an overview of electrophoretic techniques used for the determination of the binding parameters such as the binding constant and the number of binding sites. Various approaches based on CE are described. It focuses on the experimental arrangement of methods and on possible results obtained by them. Emphasis is laid also on the advantages of CE and the comparison of individual approaches.