

# On-line techniky kapilární elektroforézy

C9320 Metody biochemického výzkumu - laboratorní cvičení

Vlastnosti enzymů a enzymatické reakce představují nejčastěji studované oblasti v biochemii. Pro tyto studie lze s výhodou využít metody kapilární elektroforézy, které kromě vysoké separační účinnosti, širokého spektra aplikací a malé spotřeby vzorku nabízí i možnost provedení enzymové reakce přímo uvnitř kapiláry s následnou separací a detekcí reakčních produktů, tedy tzv. on-line analýzy. Tato úloha přináší praktické seznámení s on-line analýzami v kapilární elektroforéze se zaměřením na porovnání různých principů míchání jednotlivých složek reakční směsi uvnitř kapiláry.

## Princip úlohy

### Kapilární elektroforéza (CE)

Metody CE využívají k separaci jednotlivých složek vzorku pohyb nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Směr tohoto pohybu je dán celkovým nábojem částice, rychlost roste s intenzitou aplikovaného elektrického pole a elektroforetickou mobilitou analytu. Ta v daném prostředí roste s celkovým nábojem molekuly a klesá s odporem kladeným okolním prostředím, který závisí na viskozitě prostředí a velikosti molekuly. Prostředí kapiláry s průměrem v řádu desítek  $\mu\text{m}$  zaručuje, že nedochází k opětovnému promíchání separovaných látek konvektivním prouděním. Tavený křemen, ze kterého je stěna kapiláry vyrobena, navíc obsahuje silanolové skupiny  $\text{SiO}^-$ , stojící tvorbou nabitě dvojvrstvy s kationy z roztoku u vzniku elektroosmotického toku (EOF). Při tomto elektrokinetickém jevu dochází vlivem pohybu solvatovaných kationů k toku celého objemu kapaliny v kapiláře směrem ke katodě. Skutečná (efektivní) mobilita látky je poté dána součtem vlastní elektroforetické mobility analytu a elektroforetické mobility EOF. V případě, že mobilita EOF je vyšší než mobilita anionů migrujících proti směru EOF, lze detektorem umístěným na katodickém konci kapiláry během jedné analýzy detekovat jak kationy, tak i aniony a neutrální látky. Neutrální látky, které migrují rychlostí EOF, však tvoří jednu společnou zónu. Tento nedostatek základního zonálního módu CE řeší micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). U tohoto módu CE je do základního elektrolytu přidán detergent tvořící micely tzv. pseudostacionární fáze. Neutrální látky se poté separují na základě rozdílů v čase, po který migrují uvnitř a vně micel detergentu. Právě MEKC s micelami dodecylsulfátu sodného (SDS) bude využita k separacím v tomto cvičení.

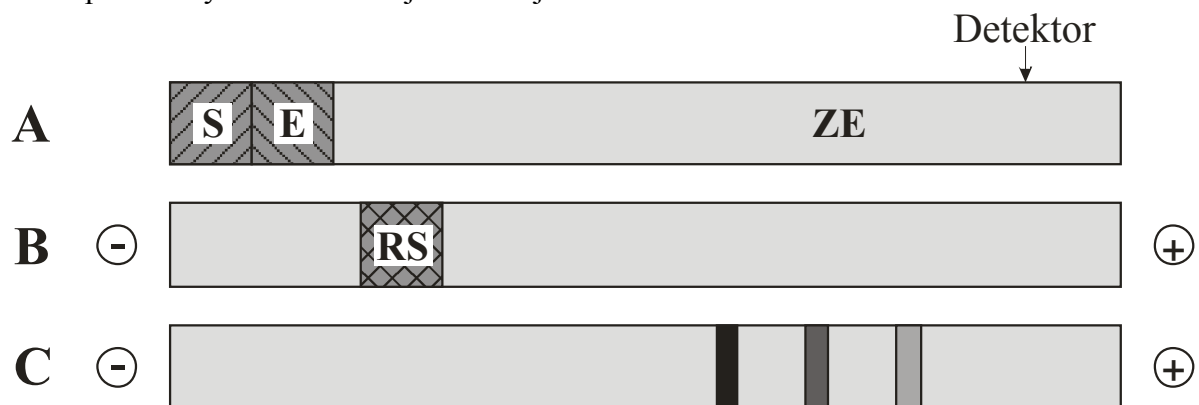
Mezi hlavní výhody CE metod se řadí malá spotřeba vzorku (jednotky nl) a dalších chemikálií, vysoká separační účinnost, široký rozsah aplikací (s CE lze separovat jednoduché ionty i celé buňky) a vysoká míra automatizace analýz.

Křemennou kapiláru lze navíc využít nejen k separaci vzorku, ale také jako nano-reaktor, uvnitř kterého mohou být provedeny chemické nebo enzymatické reakce. Základní otázku on-line metod (metody, u nichž analyt vzniká, je separován a detekován v rámci jedné analýzy) představuje promíchání jednotlivých složek reakční směsi v prostoru kapiláry. Existují tři základní přístupy k řešení této otázky:

1. Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA)
2. Míchání příčnou difuzí
3. Míchání podélnou difuzí

## 1. EMMA

Princip techniky EMMA shrnuje následující schéma:

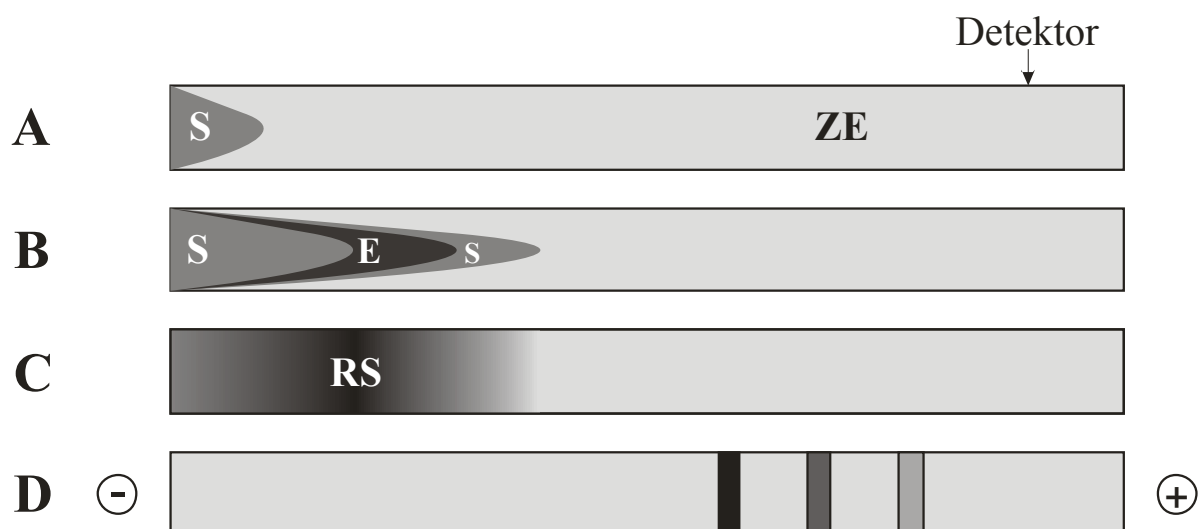


(A) Na počátku analýzy jsou do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (ZE) nadávkovány zóny jednotlivých složek reakční směsi podle rostoucích elektroforetických mobilit, zde enzym (E) s nižší a substrát (S) s vyšší elektroforetickou mobilitou. (B) Po aplikaci napětí začínají složky směsi migrovat, rychlejší molekuly S prostupují zónu E a tvoří reakční směs (RS). V tuto chvíli lze napětí vypnout a nechat naakumulovat dostatek produktu reakce. (C) Reakce je ukončena rozseparováním RS opětovnou aplikací napětí, kdy jednotlivé analyty jsou detekovány v detekčním okně.

Hlavní výhodou techniky EMMA je teoretická možnost úplného překrytí jednotlivých zón, kdy je získána dokonale homogenní reakční směs. V praktických aplikacích je však tento systém silně závislý na přesné přípravě základního elektrolytu, neboť rozdíly v jeho složení vedou k neúplnému překrytí jednotlivých zón a k odchýlkám v množství získaných produktů reakce. Další slabinou techniky EMMA je její nepraktičnost pro reakční směsi složené z více jak dvou látek a pro systémy využívající rozdílný inkubační pufr a základní elektrolyt.

## 2. Míchání příčnou difuzí

Princip systému založeného na míchání příčnou difuzí, který představil tým prof. Krylova je popsán na následujícím schématu:

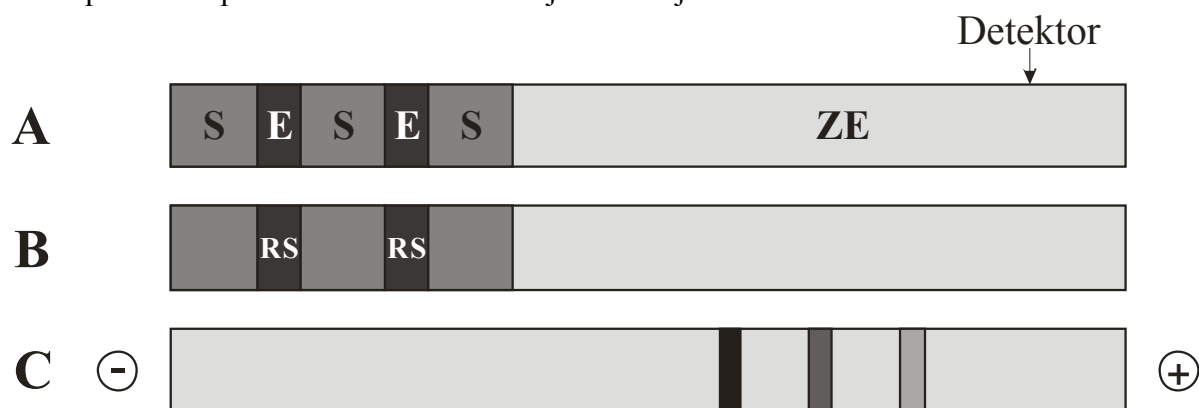


(A) Míchání příčnou difuzí vychází z hydrodynamického profilu zóny nadávkované vysokým tlakem. V uvedeném systému je nejprve do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (ZE) nadávkován substrát (S). (B) Poté enzym (E) a opět substrát, kdy poslední zóna je dávkována stejně dlouhou dobu, jako obě předcházející dohromady. To zaručuje další zvýraznění parabolického profilu a zvýšení převážně podélných rozhraní mezi jednotlivými zónami. (C) Díky relativně velkým plochám podélných rozhraní dochází k rychlému promíchání jednotlivých zón příčnou difuzí a vzniku reakční směsi (RS). Díky malému průměru trvá i prostup makromolekul ze středu kapiláry k jejím stěnám řádově minuty. (D) Reakce je ukončena aplikací napětí, kdy jednotlivé složky reakční směsi včetně produktu jsou detekovány v detekčním okně.

Hlavní výhodou tohoto přístupu představuje univerzální charakter difuze, který zaručuje aplikovatelnost systému i při změně složení reakční směsi. Relativně velké plochy podélných rozhraní navíc zaručují rychlé promíchání. Slabinou tohoto uspořádání však je nehomogenita reakční směsi, kdy koncentrace enzymu a substrátu se v závislosti na pozici v kapiláře liší. Pro kinetické studie je poté nutné tyto koncentrační rozhraní stanovit.

### 3. Míchání podélnou difuzí

Princip míchání podélnou difuzí znázorňuje následující schéma:

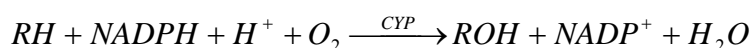


(A) Na počátku analýzy jsou jednotlivé složky reakční směsi, zde enzym (E) a substrát (S), nadávkovány do kapiláry předem naplněné základním elektrolytem (ZE) jako série zón. (B) K přechodu substrátu do zóny enzymu dochází podélnou difuzí přes příčná rozhraní, která jsou rovná díky dávkování velmi nízkým tlakem. Jelikož molekulová hmotnost enzymu omezuje jeho difuzi, lze jeho pohyb zanedbat a uvažovat stejný objem reakční směsi (RS) jako byl objem nadávkovaného enzymu. (C) Reakce je ukončena aplikací napětí, kdy jednotlivé složky reakční směsi včetně produktu jsou detekovány v detekčním okně.

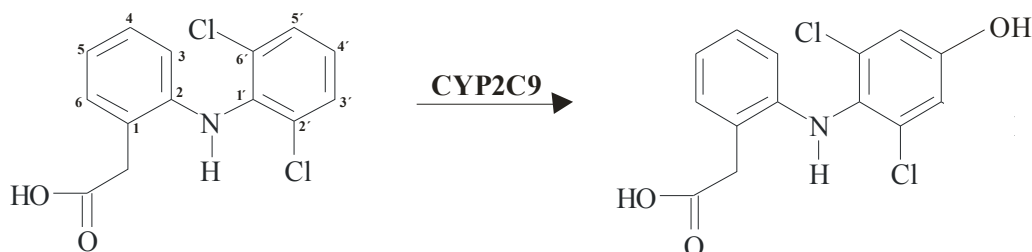
Promíchání jednotlivých složek podélnou difuzí je oproti předchozímu způsobu výhodné zejména díky jednoduchému definování výsledné reakční směsi, kdy při použití úzkých zón enzymu dojde v řádu minut k prostupu substrátem a tvorbě homogenní směsi. Slabinu systému představuje malá plocha rozhraní zón a omezená délka zón enzymu.

### Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9)

Cytochromy P450 představují početnou skupinu hem-thiolátových enzymů zodpovědných za ochranu organismu před cizími chemickými látkami. Jejich obecnou funkci popisuje následující rovnice:



Zavedení –OH skupiny zvyšuje polaritu molekuly substrátu RH a usnadňuje její vyloučení z organismu. Z pohledu člověka jsou CYP významné kvůli své funkci při metabolismu léčiv. Isoforma 2C9 se podílí na metabolických přeměnách přibližně 10 % běžně předepisovaných léků. Pro studium aktivity CYP2C9 lze s výhodou využít specifickou hydroxylaci nesteroidního antirevmatika diklofenaku do polohy 4':



Produkt reakce 4'-hydroxydiklofenak lze sledovat pomocí UV-VIS detektoru v jeho absorpčních maximech o vlnové délce 200 a 260 nm.

## Praktická část

### 1. Hydroxylace diklofenaku off-line

#### Chemikálie:

inkubační pufr (50 mM fosfátový pufr pH = 7,4 s přidavkem 5,1 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,1 mM KCl)

separační pufr (18 mM fosfátový 18 mM borátový pufr pH = 8,6)

SDS

0,1 mM roztok NaOH

300 μM roztok diklofenaku

300 nM roztok CYP2C9

6 mM roztok NADPH

#### Postup:

Navážku SDS pro přípravu 55 mM základního elektrolytu rozpusťte v odměrné baňce separačním pufrům, doplňte po rysku a poté roztok přefiltrujte a nechte 5 min odplynit v ultrazvukové lázni.

Ve dvou vialkách smíchejte po 50 μl roztoku diklofenaku a 50 μl roztoku CYP2C9. Směsi nechte 5 min preinkubovat při 37 °C a rychlosti třepání 450 rpm. Poté k první přidejte 50 μl roztoku NADPH a ke druhé 50 μl inkubačního pufru, rychle promíchejte a nechte reagovat 10 min při teplotě 37 °C a rychlosti třepání 450 rpm. Reakci ukončete zmražením vzorku při -70 °C. Do skleněných vialek odpipetujte po 1 ml vody, NaOH a 3 × základního elektrolytu. Pod dohledem obsluhy spusťte přístroj, nahrajte metodu C\_Dc.M a vložte vialky do zásobníku. Vzorky rychle rozmrazte ponořením do teplé vody, promíchejte a nechte 5 min centrifugovat při 13400 rpm. Poté do vzorkových vialek odeberte po 50 μl supernatantu, vialky vložte do zásobníku přístroje a spusťte analýzu.

Při použité metodě je kapilára s efektivní délkou 56 cm nejprve 1 min promyta roztokem NaOH, 1 min vodou a 3 min základním elektrolytem. Poté je aplikací tlaku 50 mbar po 4 s nadávkován vzorek. Separace probíhá vložení napětí 17,5 kV při teplotě 37 °C. 4'-hydroxydiklofenak je detekován při vlnové délce 200 a 260 nm. Nakonec je kapilára opět promyta 1 min vodou, čímž je připravena na další analýzu.

#### Vyhodnocení:

U záznamu analýzy blanku určete podle migračního času a spektra pík diklofenaku. Záznam poté srovnajte se záznamem analýzy celé inkubační směsi a určete pík 4'-hydroxydiklofenaku. Porovnejte záznamy pořízené při vlnové délce 200 a 260 nm.

## 2. Hydroxylace diklofenaku on-line

### 2.1. Míchání příčnou difuzí

#### Chemikálie:

inkubační pufr (50 mM fosfátový pufr pH = 7,4 s přidavkem 5,1 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,1 mM KCl)  
základní elektrolyt (55 mM SDS připravené v 18 mM fosfátovém 18 mM borátovém pufru  
pH = 8,6)

1 M roztok NaOH

1 M roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

300 μM roztok diklofenaku

300 nM roztok CYP2C9

6 mM roztok NADPH

#### Postup:

Ve vialce smíchejte 50 μl roztoku diklofenaku a 50 μl roztoku CYP2C9. 30 μl směsi odpipetujte do kónické vialky. Do druhé kónické vialky odpipetujte 30 μl roztoku NADPH. Obě vzorkové vialky nechte 5 min třepat při 37 °C a 450 rpm. Do skleněných vialek odpipetujte po 1 ml roztoku H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml roztoku NaOH, 3 × vody, 4 × základního elektrolytu a 2 × inkubačního pufru. Pod dohledem obsluhy spusťte přístroj, nahrajte metodu C\_1.M, vložte všechny vialky do zásobníku a spusťte analýzu.

Při použité metodě je kapilára s efektivní délkou 56 cm nejprve 5 min promyta základním elektrolytem. Poté je aplikací tlaku 30 mbar postupně dávkován roztok NADPH (5 s), směsi diklofenaku a CYP2C9 (8 s) a opět roztoku NADPH (13 s). Směs je inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Separace probíhá vložení napětí 17,5 kV. 4'-hydroxydiklofenak je detekován při vlnové délce 200 a 260 nm. Protože byl do kapiláry dávkován roztok proteinů, závěrečné promývání obsahuje jak silnou kyselinu, tak i koncentrovaný hydroxid.

#### Vyhodnocení:

V záznamu analýzy určete píky diklofenaku a 4'-hydroxydiklofenaku. Porovnejte získaný záznam s analýzou produktů hydroxylace diklofenaku off-line.

## 2.2. Míchání podélnou difuzí

### Chemikálie:

inkubační pufr (50 mM fosfátový pufr pH = 7,4 s přidavkem 5,1 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,1 mM KCl)  
základní elektrolyt (55 mM SDS připravené v 18 mM fosfátovém 18 mM borátovém pufru  
pH = 8,6)

1 M roztok NaOH

1 M roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

300 μM roztok diklofenaku

300 nM roztok CYP2C9

6 mM roztok NADPH

### Postup:

Ve vialce smíchejte 50 μl roztoku diklofenaku a 50 μl roztoku CYP2C9. 30 μl směsi odpipetujte do kónické vialky. Do druhé kónické vialky odpipetujte 30 μl roztoku NADPH. Obě vzorkové vialky nechte 5 min třepat při 37 °C a 450 rpm. Do skleněných vialek odpipetujte po 1 ml roztoku H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml roztoku NaOH, 3 × vody, 4 × základního elektrolytu a 2 × inkubačního pufru. Pod dohledem obsluhy spusťte přístroj, nahrajte metodu C\_2.M, vložte všechny vialky do zásobníku a spusťte analýzu.

Při použité metodě je kapilára s efektivní délkou 56 cm nejprve 5 min promyta základním elektrolytem. Poté je aplikací tlaku 5 mbar postupně dávkován roztok NADPH (15 s), směsi diklofenaku a CYP2C9 (10 s), roztoku NADPH (10 s), směsi diklofenaku a CYP2C9 (10 s), roztoku NADPH (10 s), směsi diklofenaku a CYP2C9 (10 s) a roztoku NADPH (15 s). Směs je inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Separace probíhá vložení napětí 17,5 kV. 4'-hydroxydiklofenak je detekován při vlnové délce 200 a 260 nm. Protože byl do kapiláry dávkován roztok proteinů, závěrečné promývání obsahuje jak silnou kyselinu, tak i koncentrovaný hydroxid.

### Vyhodnocení:

V záznamu analýzy určete píky diklofenaku a 4'-hydroxydiklofenaku. Porovnejte získaný záznam s předcházející analýzou a analýzou produktů hydroxylace diklofenaku off-line. Vysvětlíte pozorované rozdíly v plochách píků 4'-hydroxydiklofenaku.