



Využití kapilární elektroforézy při studiu enzymů

Zdeněk Glatz

Ústav biochemie,
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita

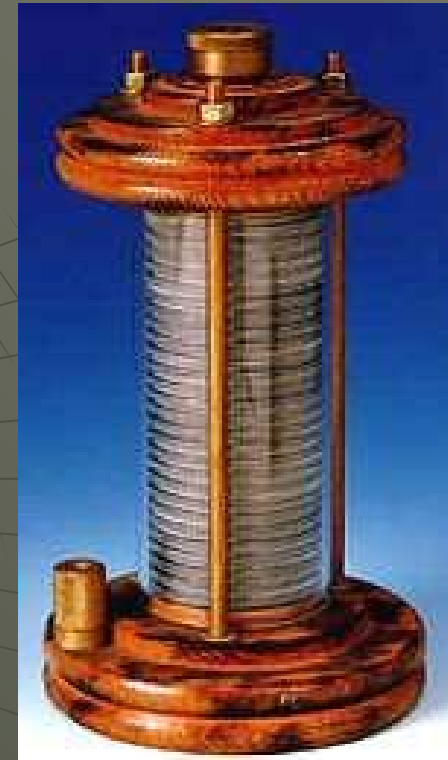
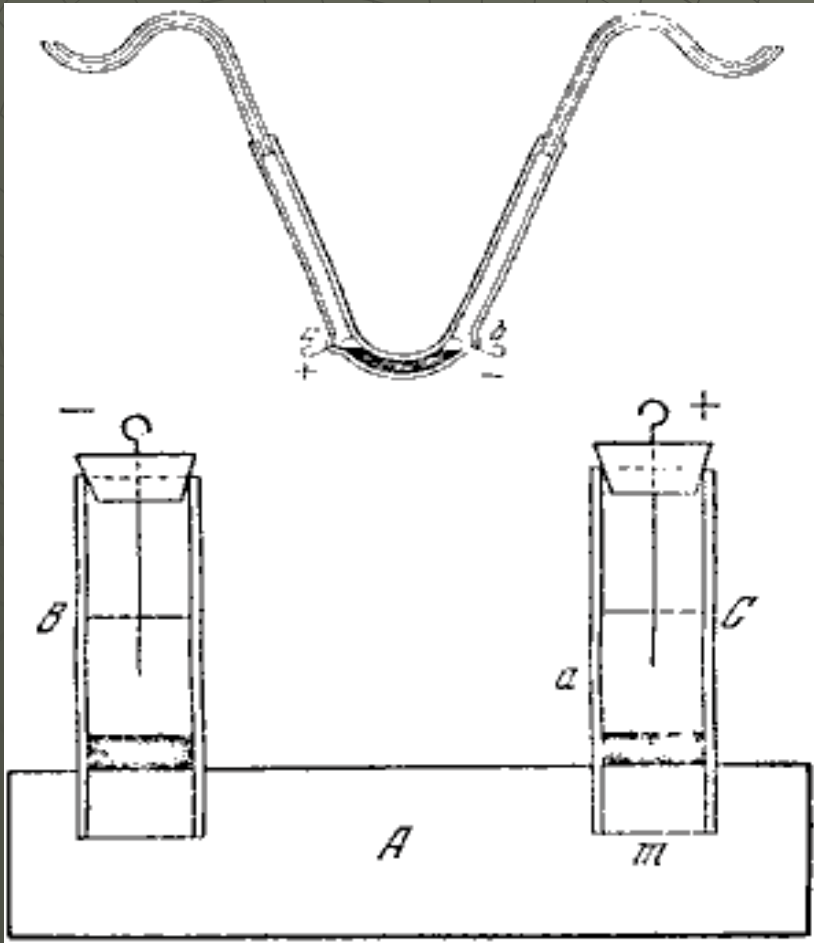
ELEKTROFORÉZA

- ◆ **Elektroforéza** je soubor **separačních metod**, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli.

Frederic Reuss

(1807)

Katoforéza



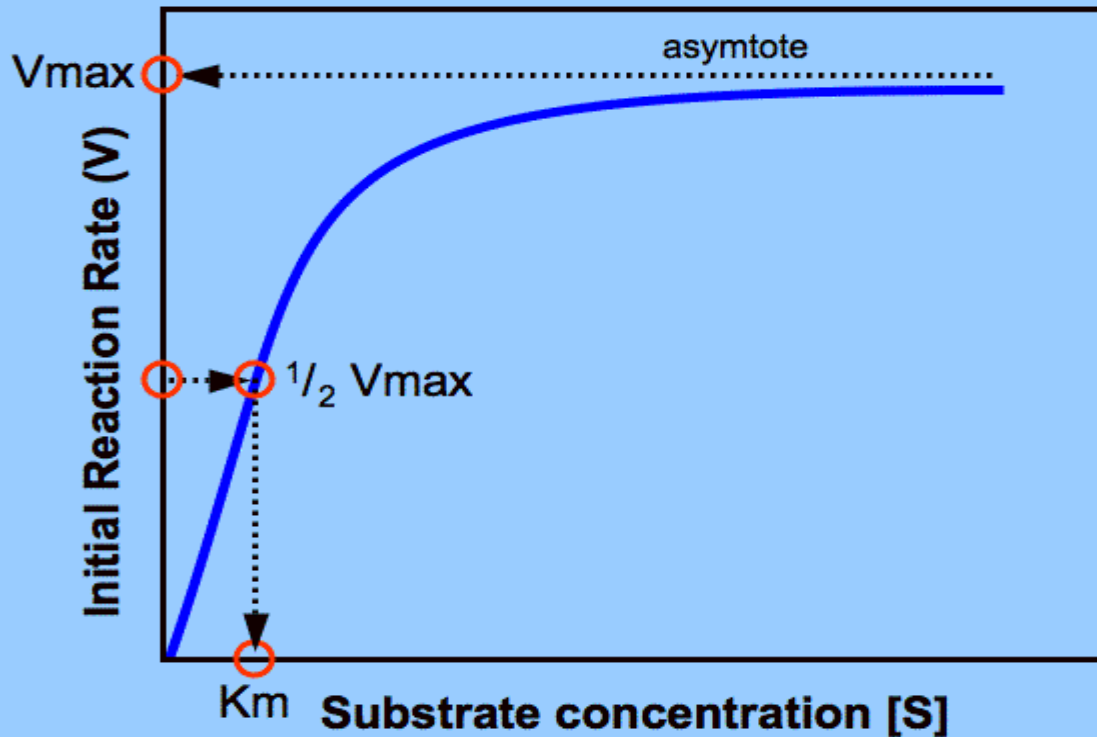
Elektroforéza

(1909)

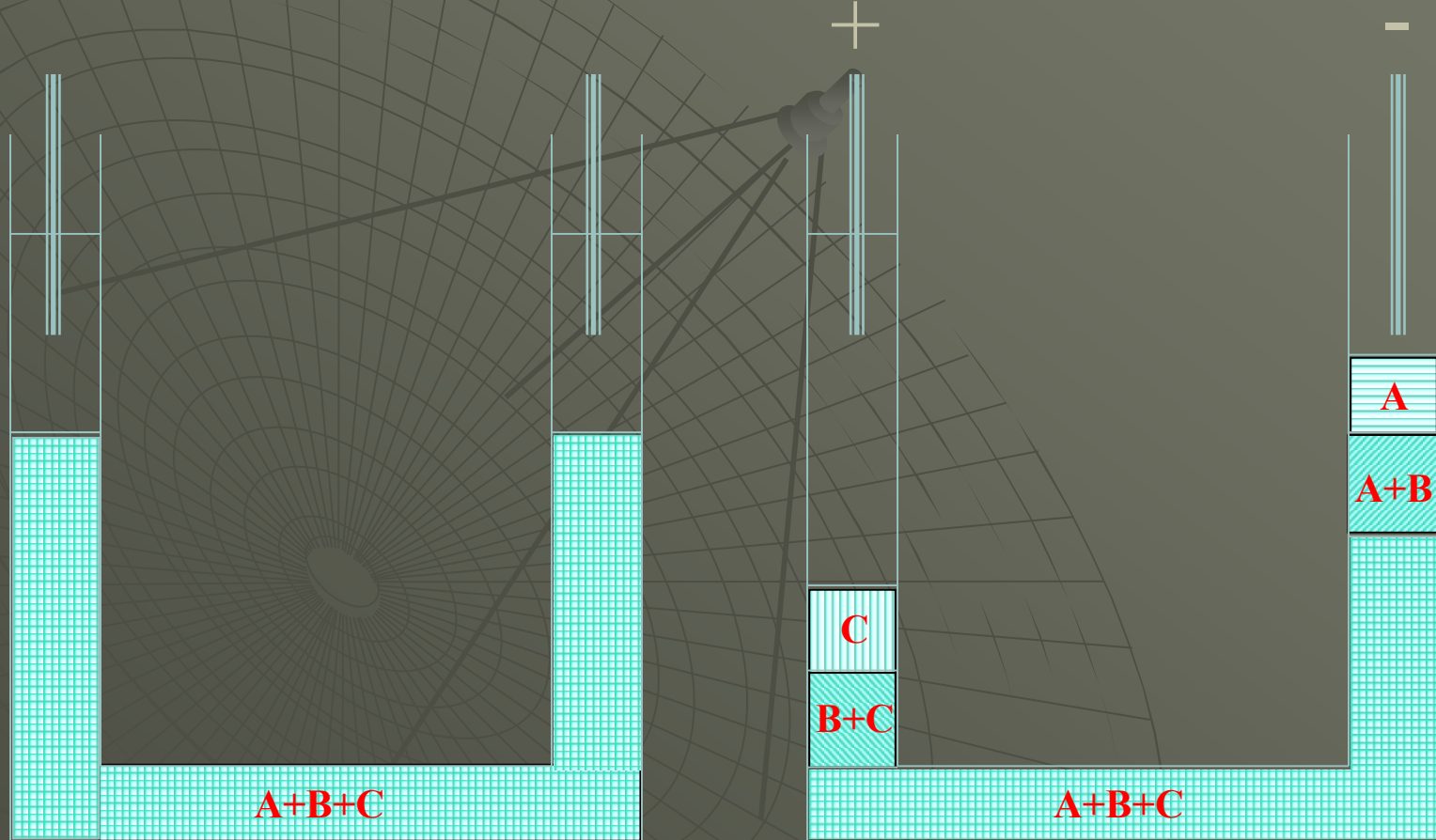
Leonor Michaelis

Michaelis Menten Plot

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



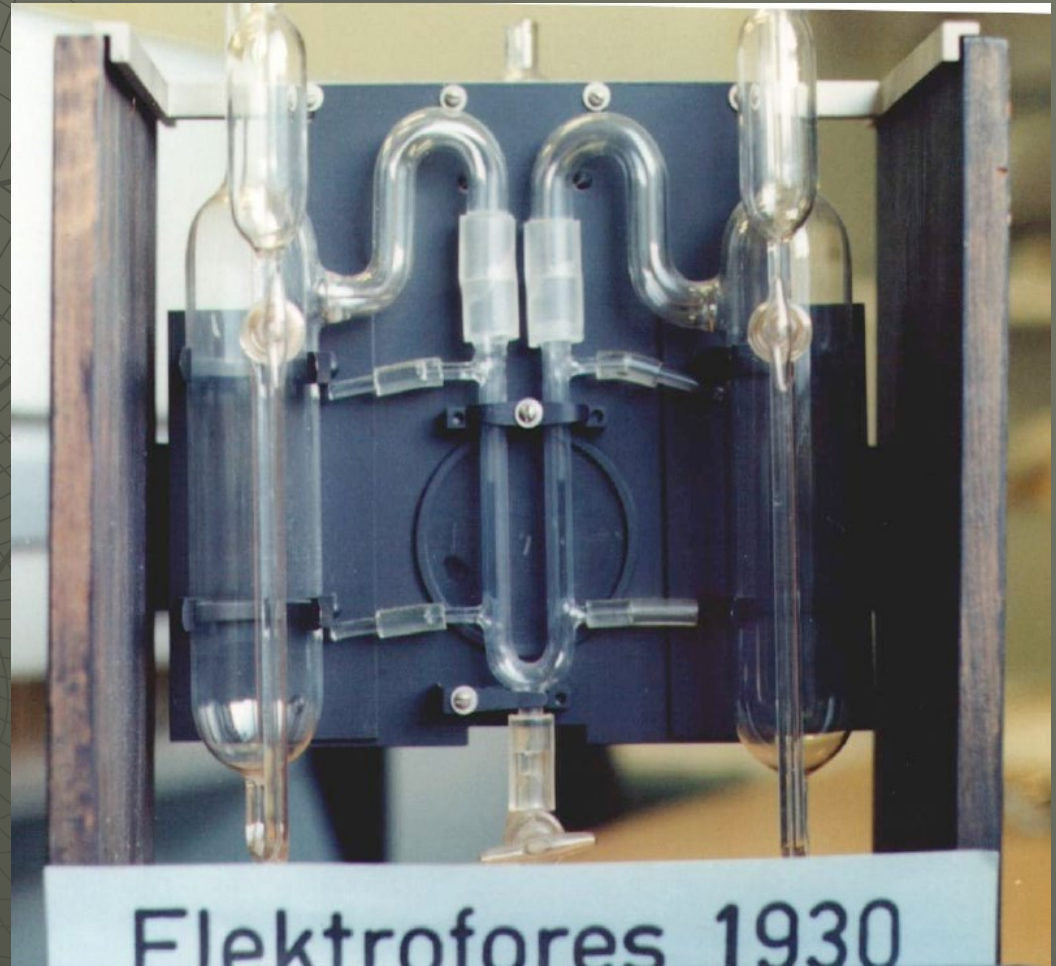
Volná elektroforéza (1925)



$$\mu_A > \mu_B > \mu_C$$

Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)



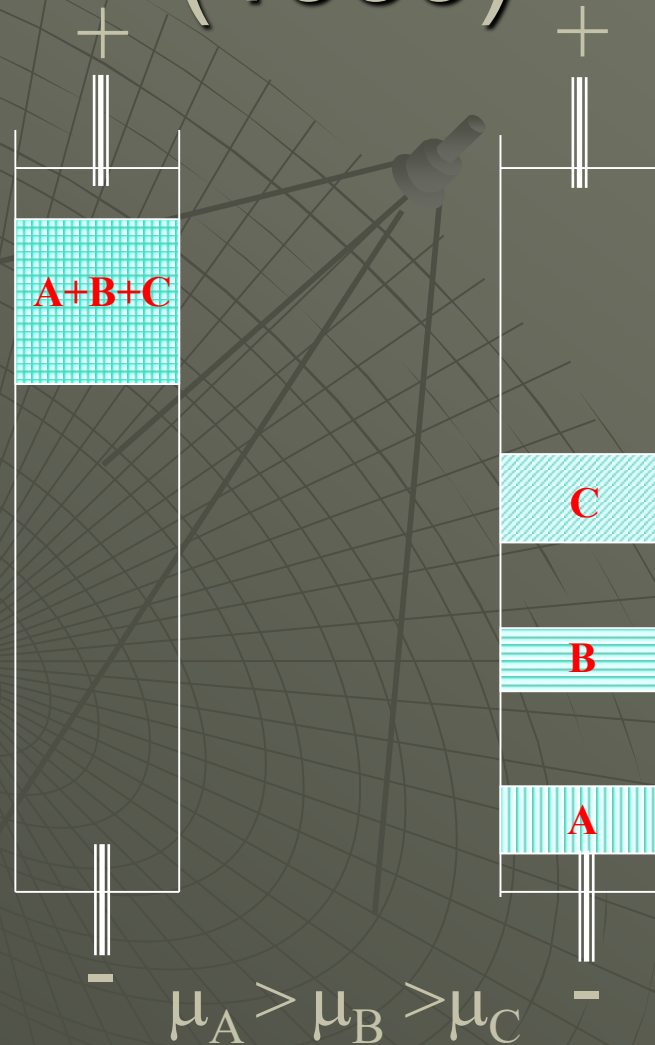
Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)

Nobelova cena 1948



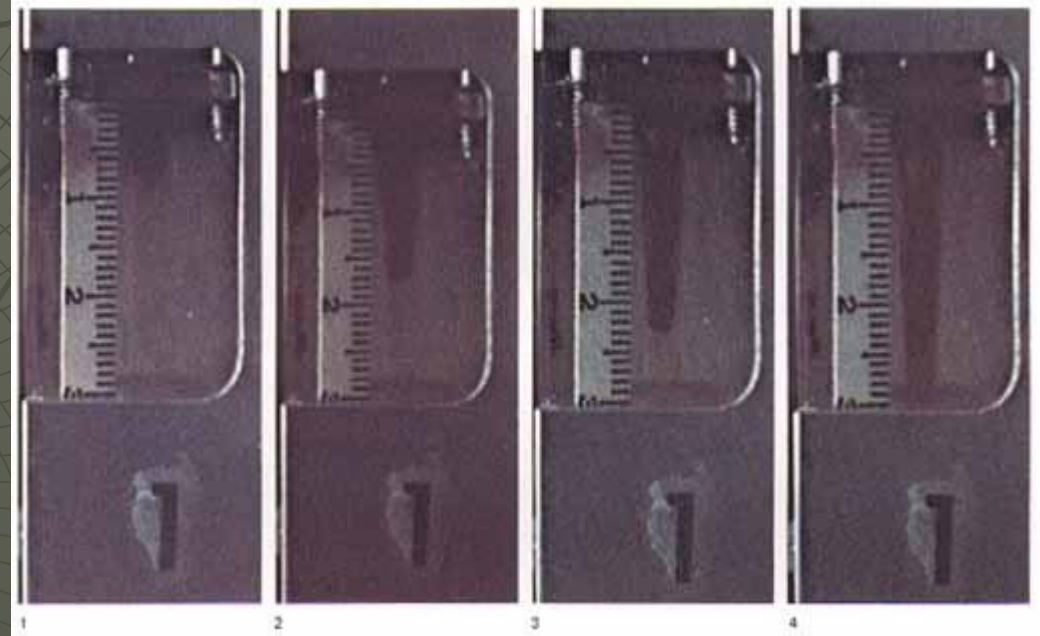
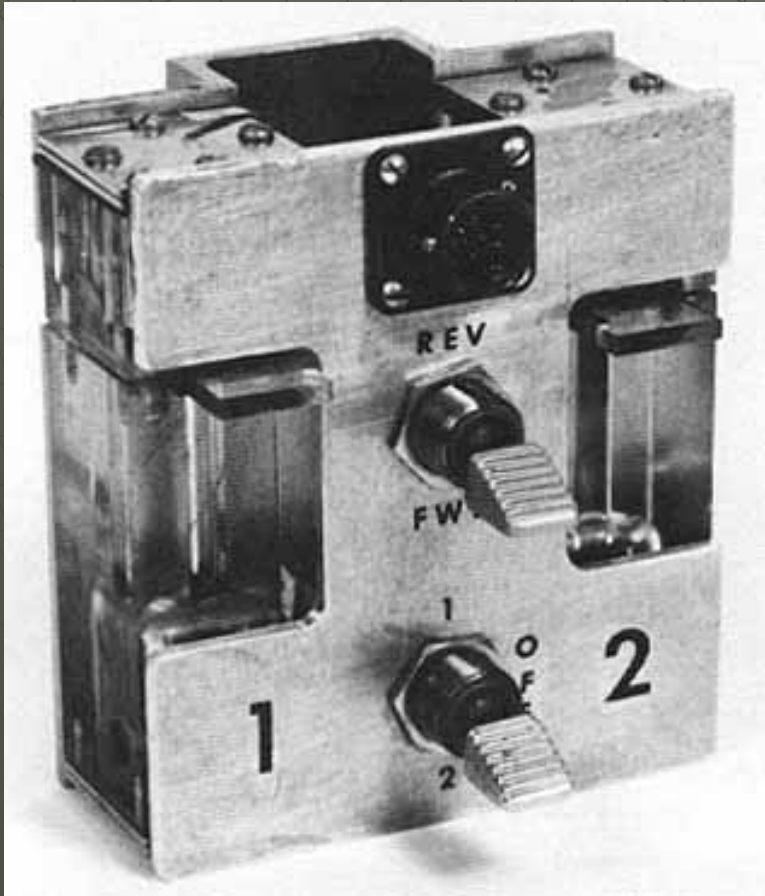
Zónová elektroforéza (1939)



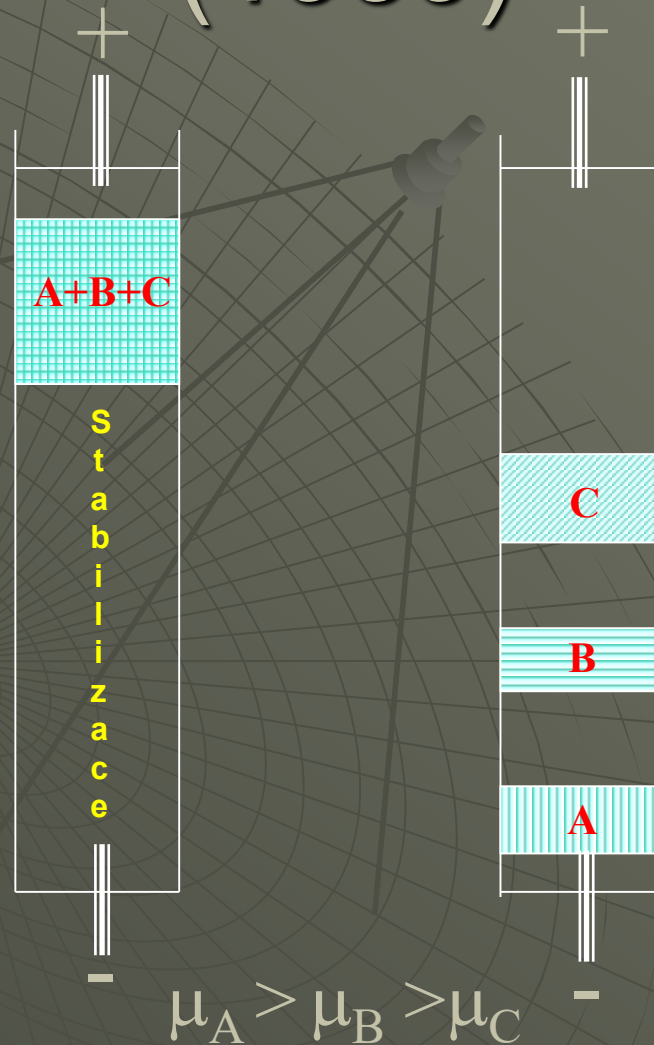
Skylab



Skylab



Zónová elektroforéza (1939)



Stabilizace

- ◆ Porézní media - pory

Porézní media

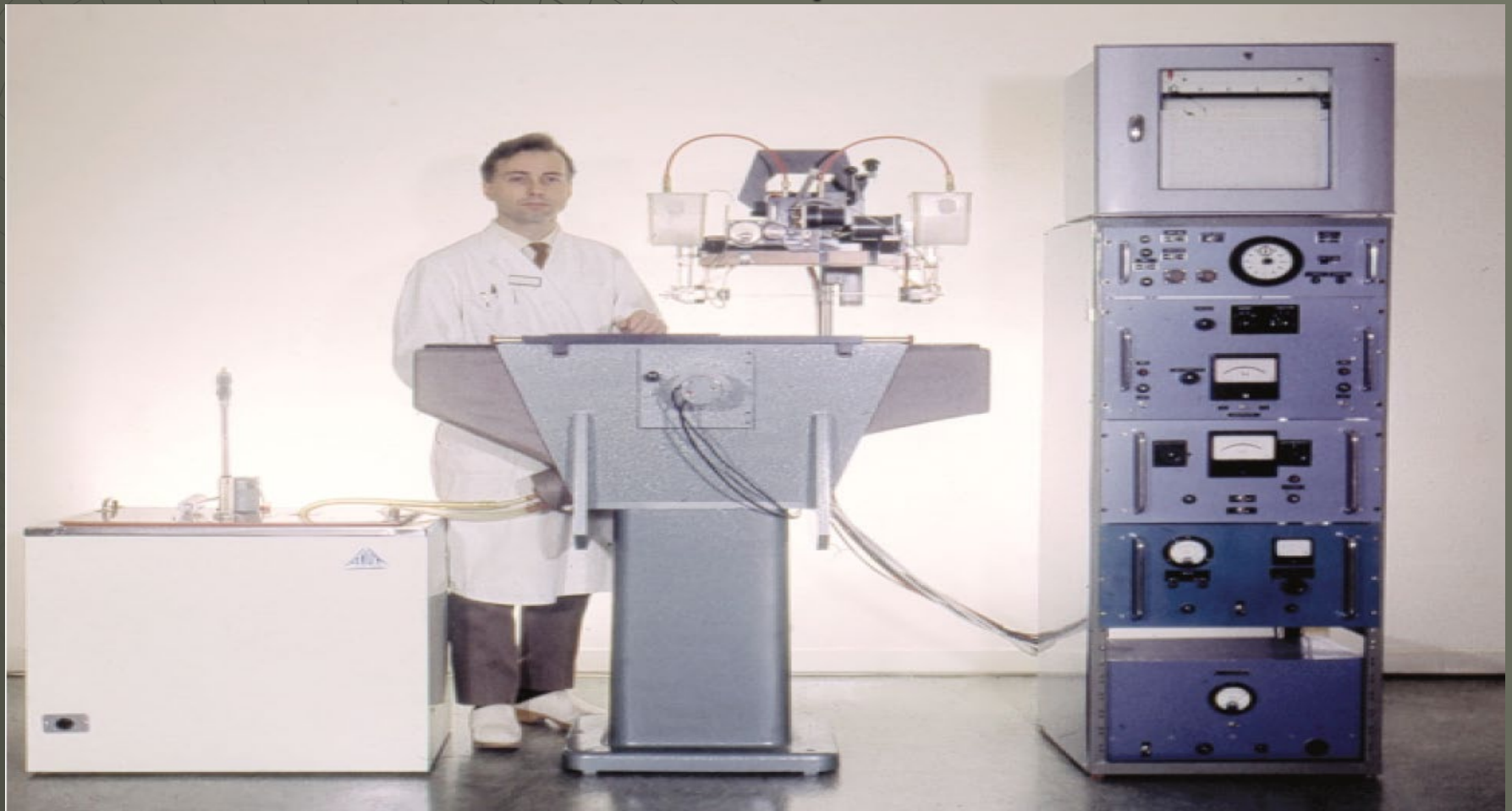
- ◆ 1939 *Papír*
- ◆ 1950 *Agarový gel*
- ◆ 1955 *Škrobový gel*
- ◆ 1957 *Acetát celulosy*
- ◆ **1959 Polyakrylamidový gel**
- ◆ 1979 *Agarosový gel*

Stabilizace

- ◆ Porézní media - pory
- ◆ Kapilára-stěna kapiláry

Kapilární elektroforéza

1967 - Hjerten
3 mm kapilára



Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová
75 μm kapilára

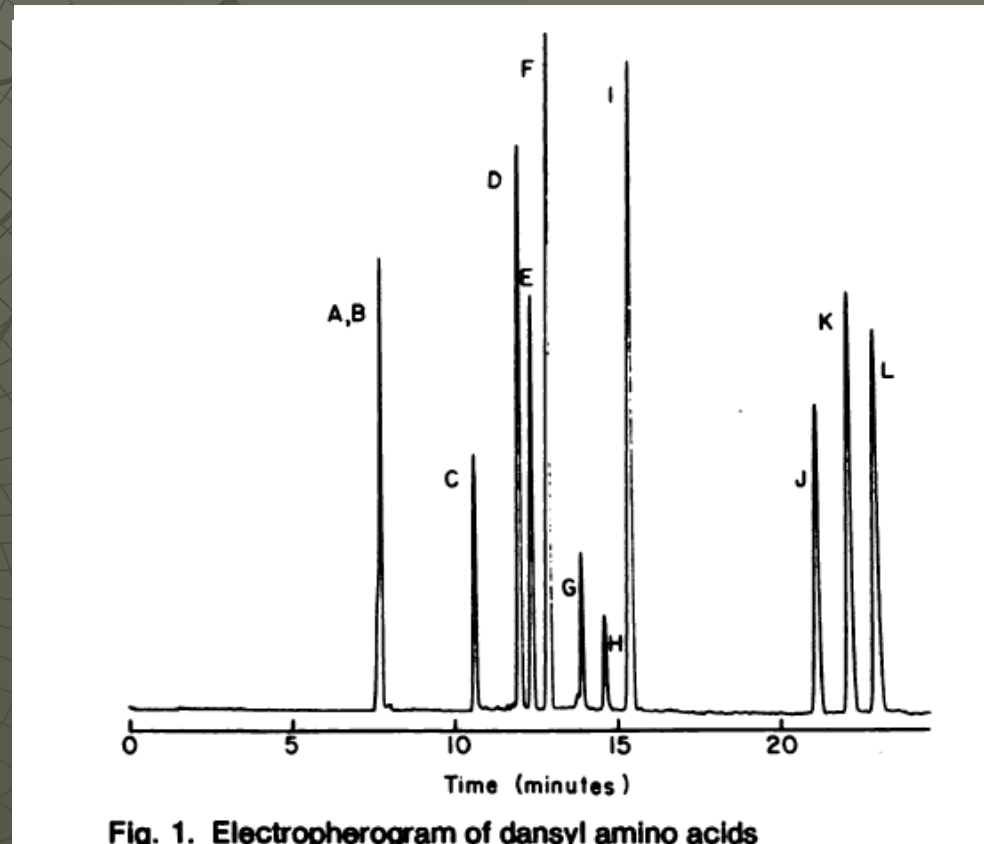
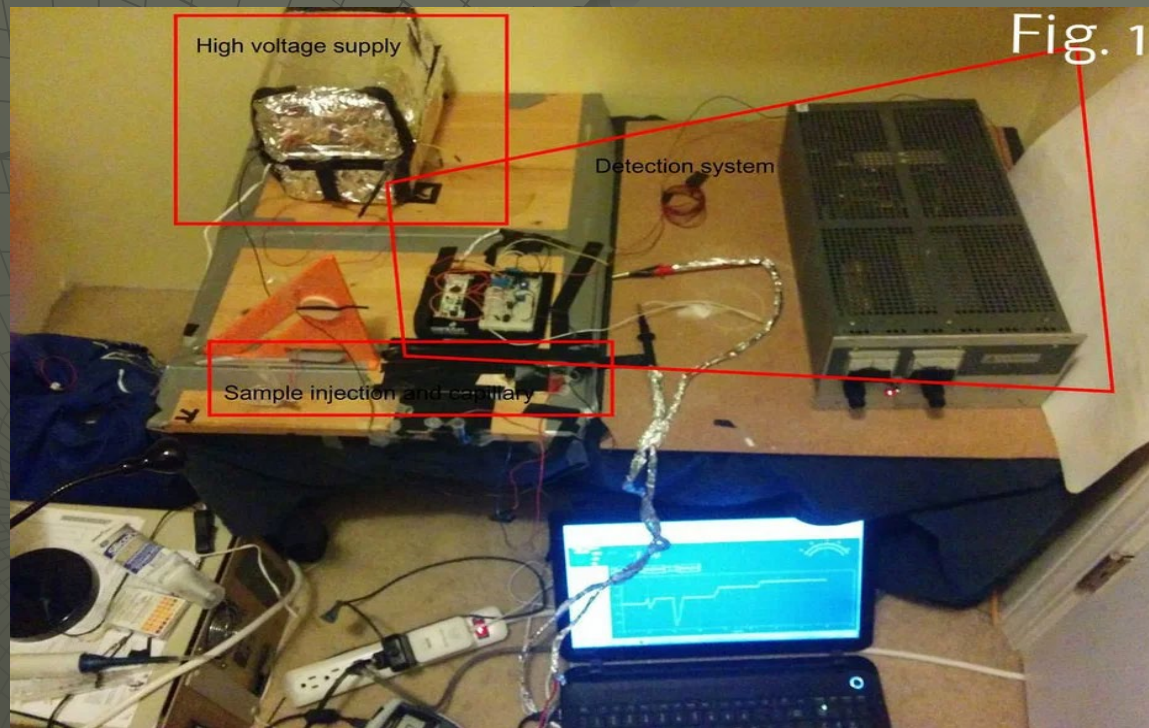


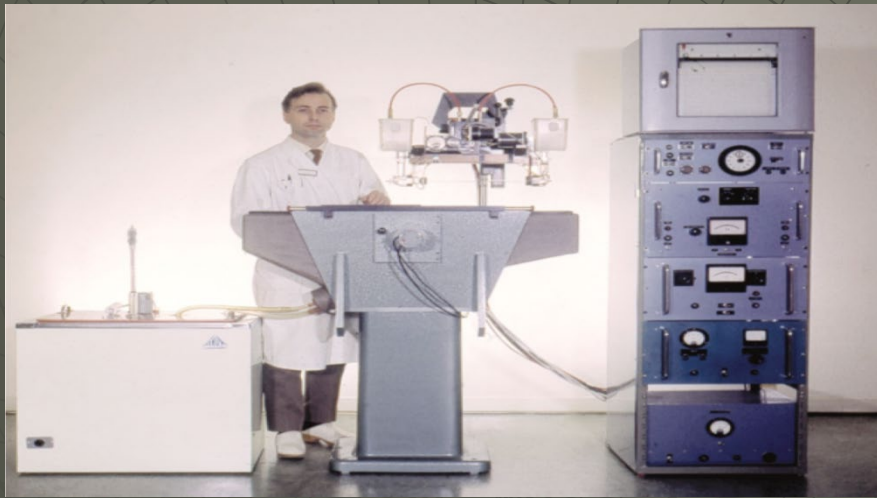
Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

Laboratory made CE



Beckman 1987



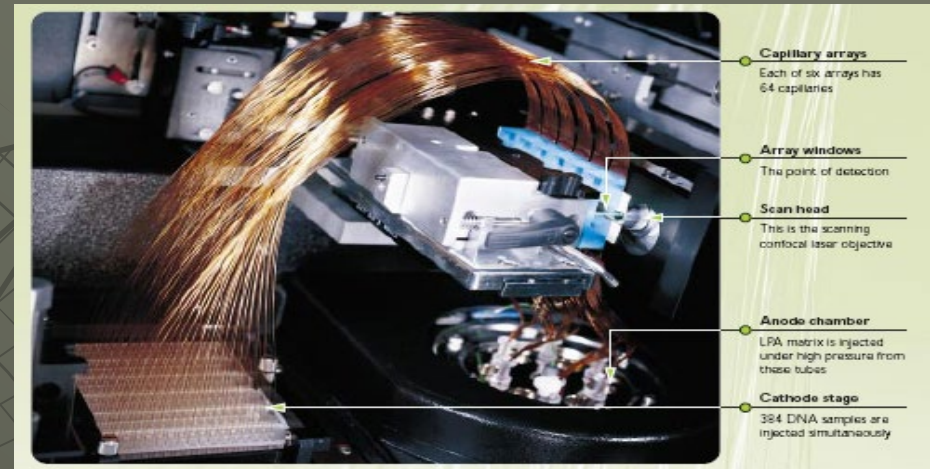


1989- 2003 Projekt lidského genomu

Paralelní sekvencování



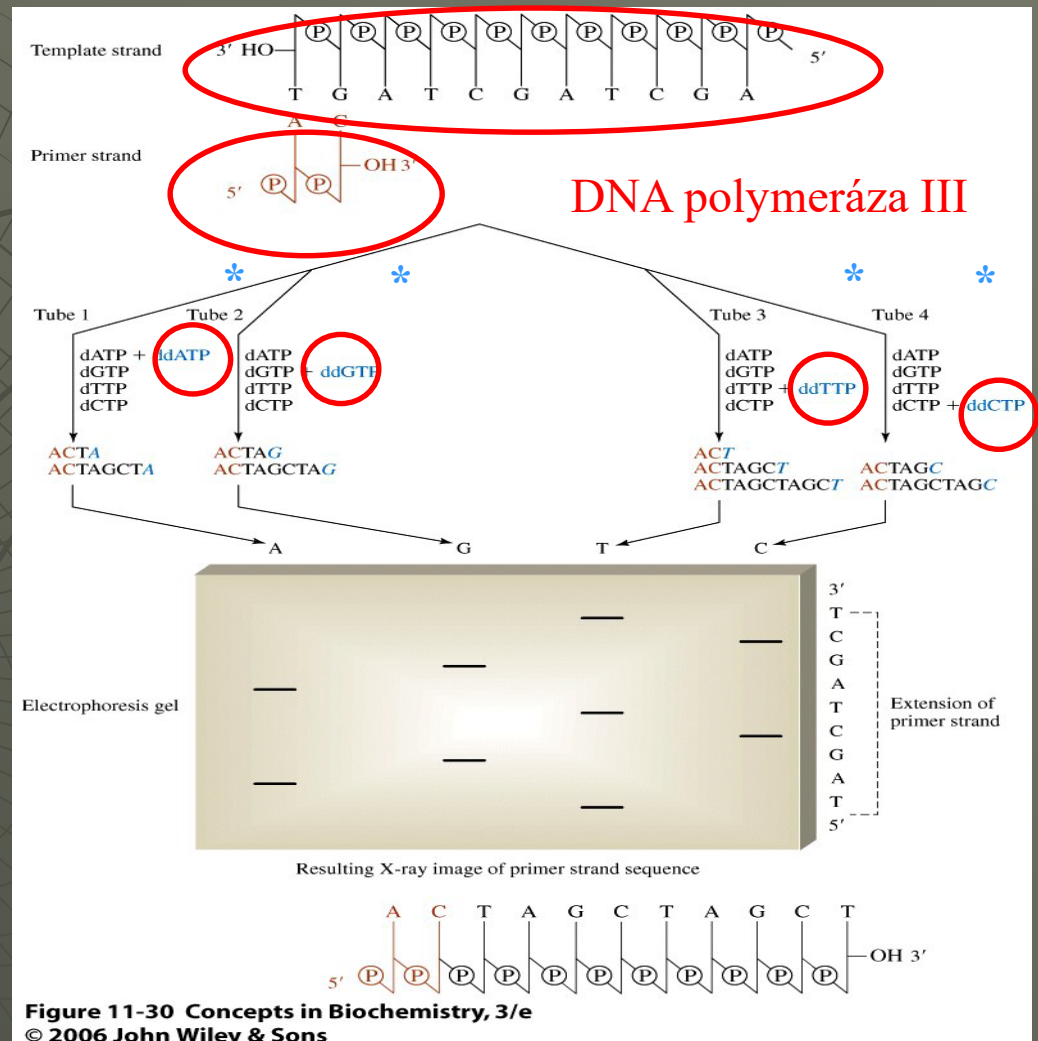
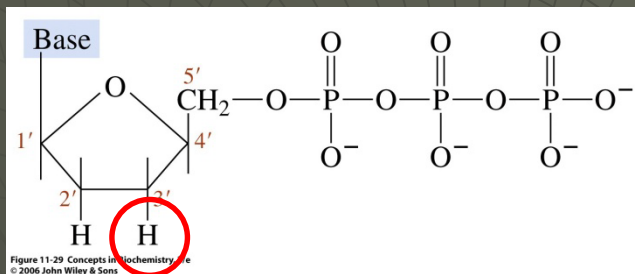
Automatizace



300 sekvenátorů



Sangerova enzymová metoda sekvenace DNA





Proč enzymy ?

Enzymy – molekulární stroje



Enzymy – molekulární stroje



Rychlostní konstanta :

- Bez katalýzy - $0,23 \text{ s}^{-1}$
- Pt - $1,3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$
- Enzym - katalasa - $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Enzymy – molekulární stroje

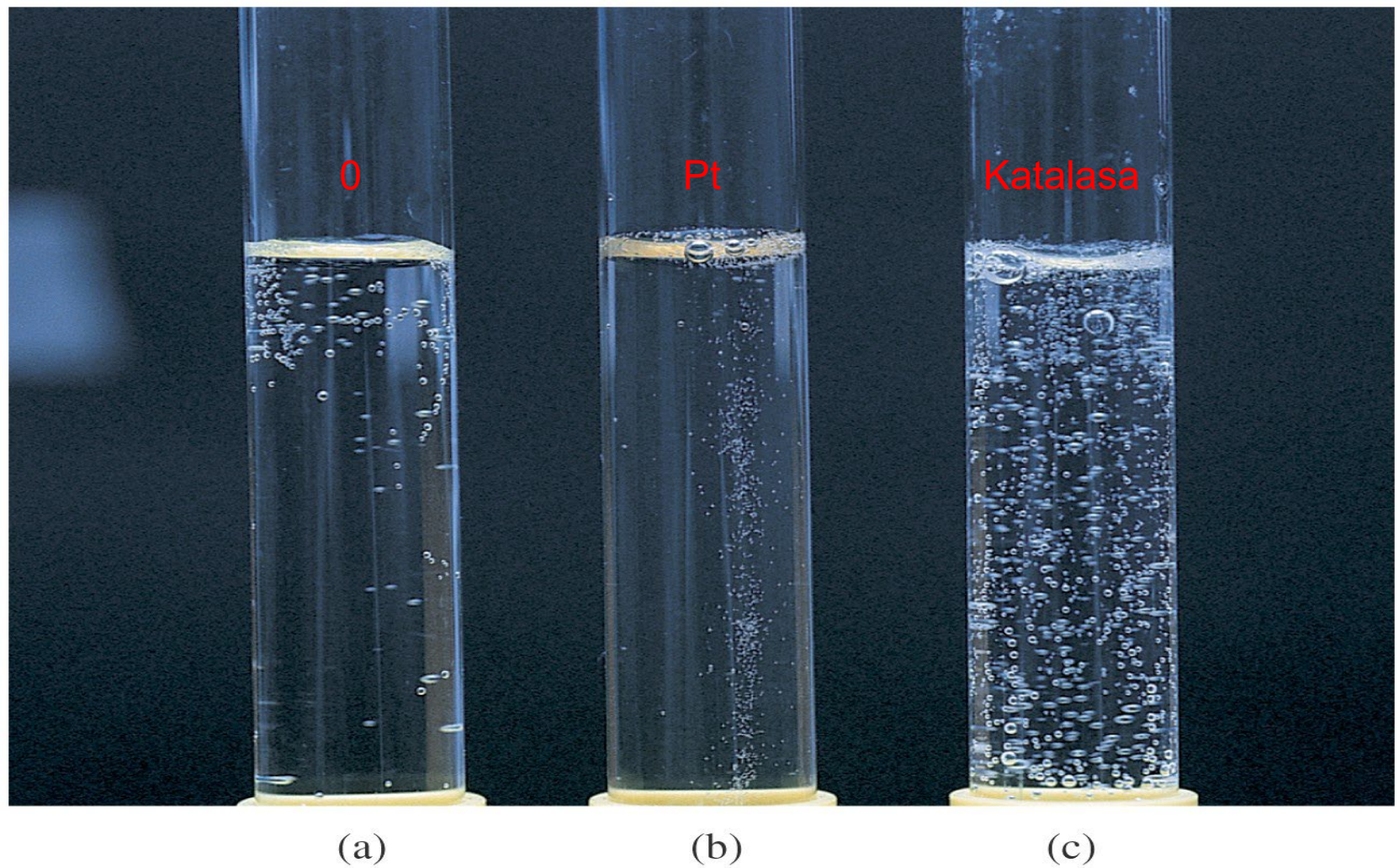


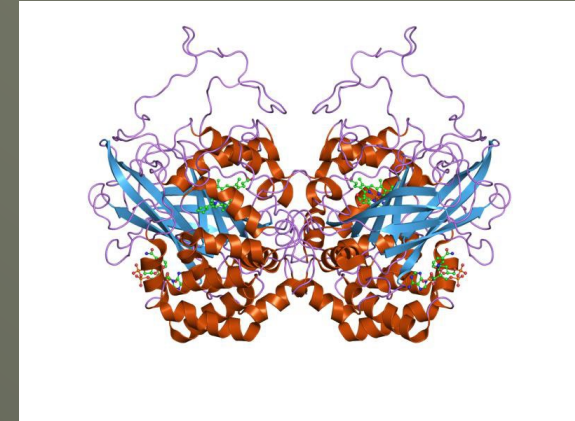
Figure 5-1 Concepts in Biochemistry, 3/e

Enzymy – molekulární stroje

Katalasa



Číslo přeměny 40 000 000



1 molekula enzymu přemění
40 000 000 molekul substrátu za 1 s

Enzymy – stanovení koncentrace

Escherichia coli



3 000 bílkovin

Homo sapiens



25 000 bílkovin

Koncentrace ↔ Katalytická aktivita

↓ Substrát



Produkt ↑

Stanovení aktivity enzymů

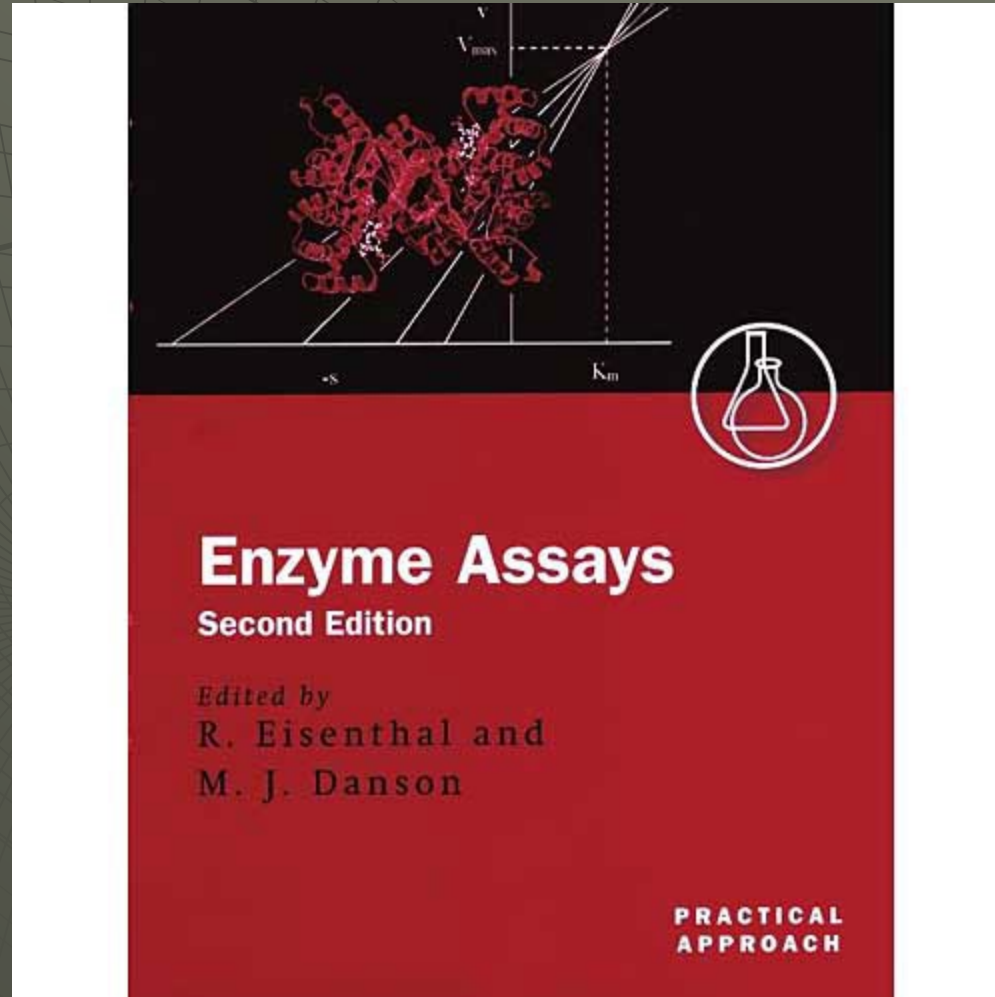
- *Biochemie*
- *Molekulární biologie*
- *Klinická diagnostika*
- *Farmakologie – vývoj léčiv*
- *Biotechnologické procesy*
- *Bioanalytická chemie*

Metody používané pro stanovení aktivity enzymů

- ◆ Spektrofotometrické
- ◆ Spektrofluorimetrické
- ◆ Elektrochemické
- ◆ Radiochemické
- ◆ Separální – HPLC, GC, **CE**

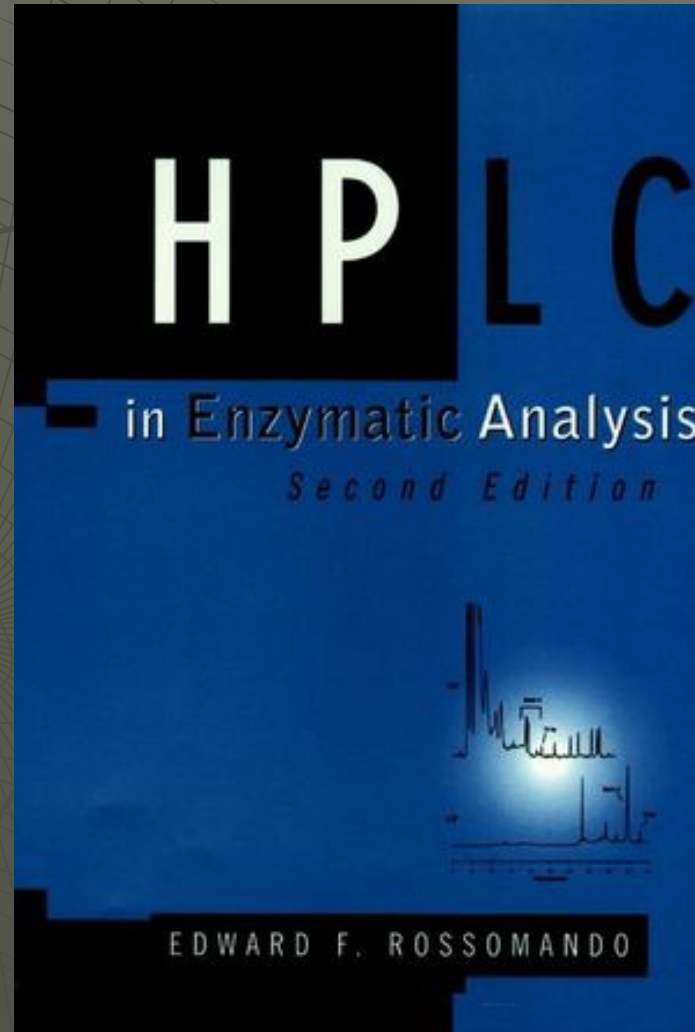
Enzyme Assays

R. Eisingthal and M.J. Danson



HPLC in Enzymatic Analysis

E.F. Rossomando





Proč enzymy a CE ?

Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**

nabité i neutrální látky

nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,
CIEF, CIP
NACE, MEEKC,
CGE, ChCE



CEC

Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace
- ◆ Vysoké rozlišení a účinnost separací
- ◆ Malá spotřeba vzorku (nl)
- ◆ Rychlost analýzy (minuty)
- ◆ Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů (10 ml den)

Výhody CE

Kapilára jako reakční prostor

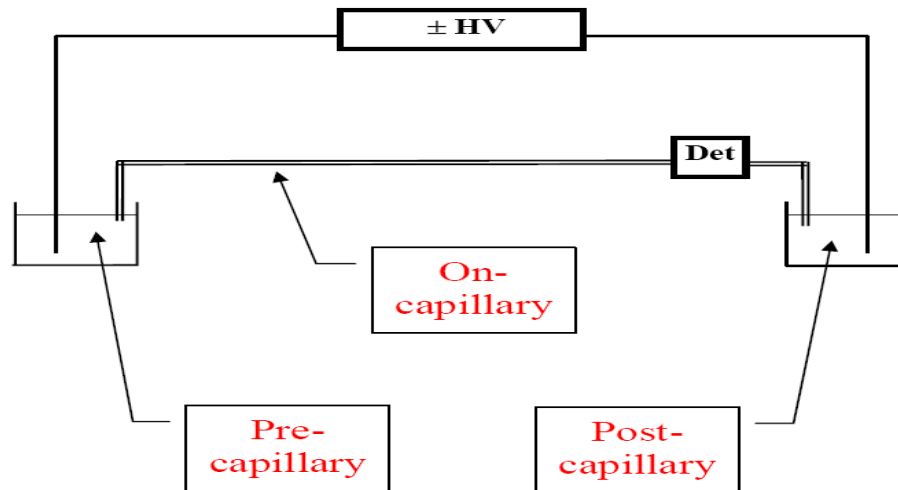
Studium enzymových reakcí pomocí CE

- „Pre-capillary“

- „On-capillary“

- „Post-capillary“

HOMOGENNÍ

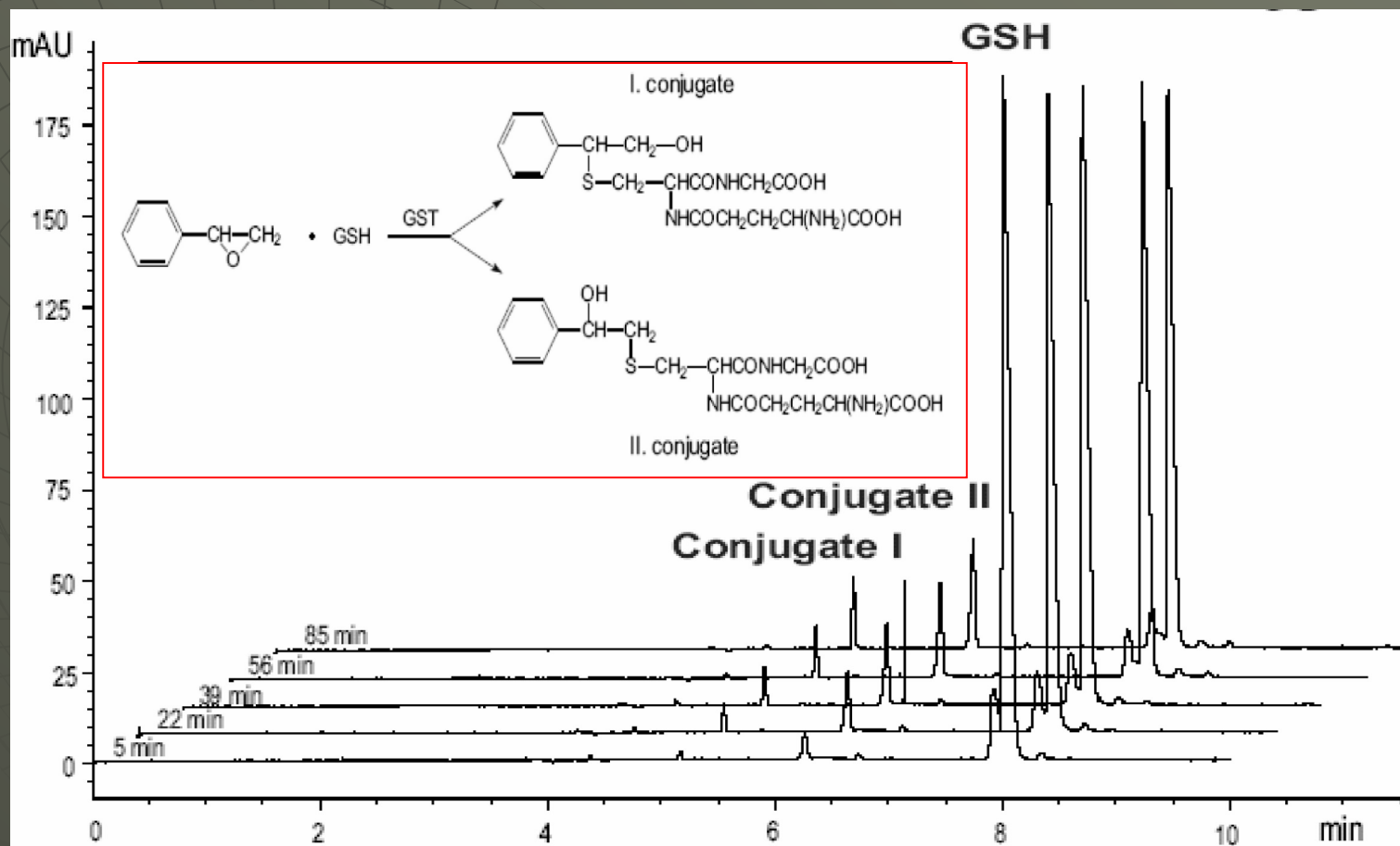


Studium enzymových reakcí pomocí CE

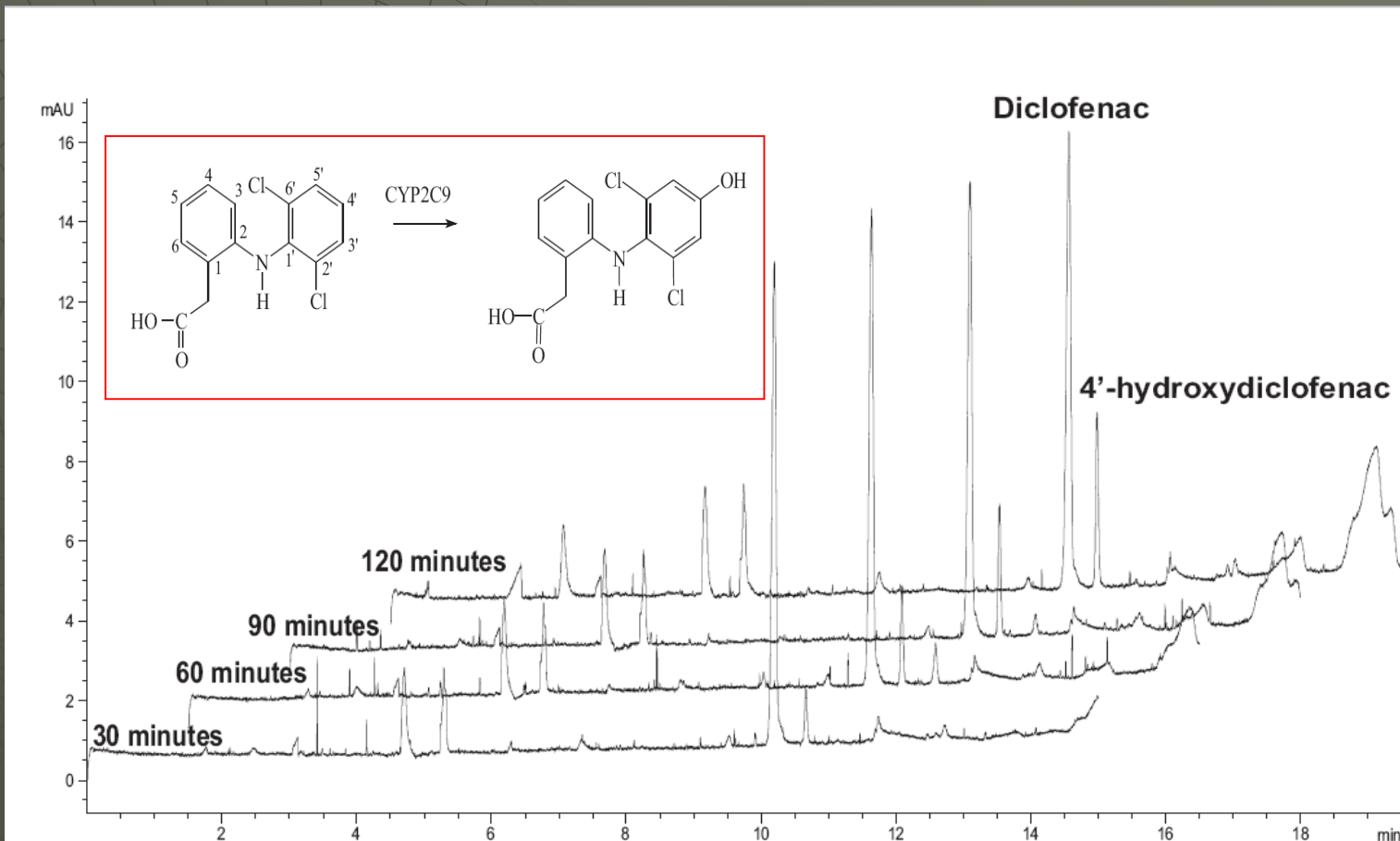
▪ „Pre-capillary“ provedení :

- kapilára je používána pouze pro separaci a detekci
- nutná manipulace mezi enzymovou reakcí a separací

Kinetické stanovení glutathion S-transferasa



„End point“ stanovení cytochrom P450 2C9



Studium enzymových reakcí pomocí CE

▪ „On-capillary“ provedení :

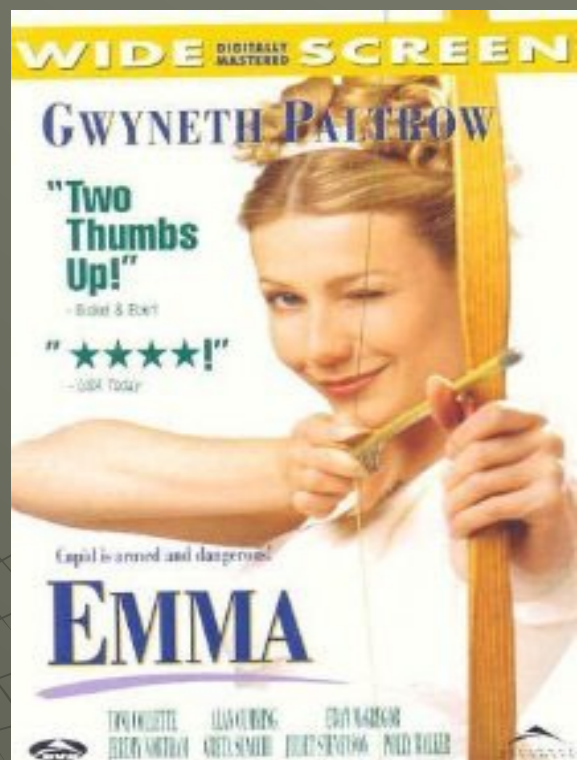
- kapilára je navíc využita i jako reakční prostředí
- stanovení je automatizováno – dávkování, smísení, inkubace, separace, detekce \Rightarrow CE

Elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza

Electrophoretically **M**ediated **M**icro**A**nalysis **EMMA**

J. Bao, F.E. Regnier, J. Chromatogr. 608, 217 (1992).

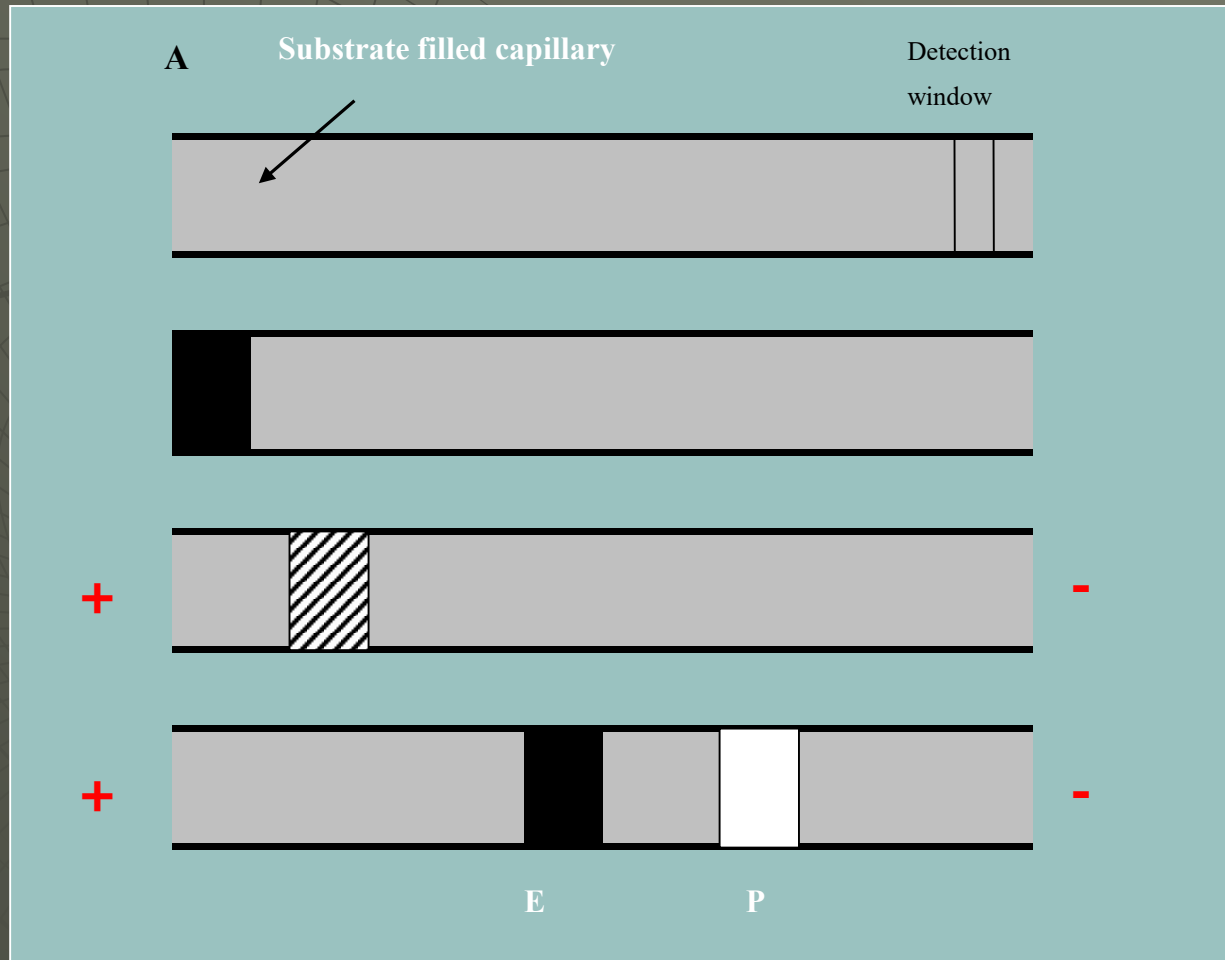
rozdílná elektroforetická **mobilita** enzymu a jeho substrátu(ů)
pro vyvolání reakce **přímo** v kapiláře



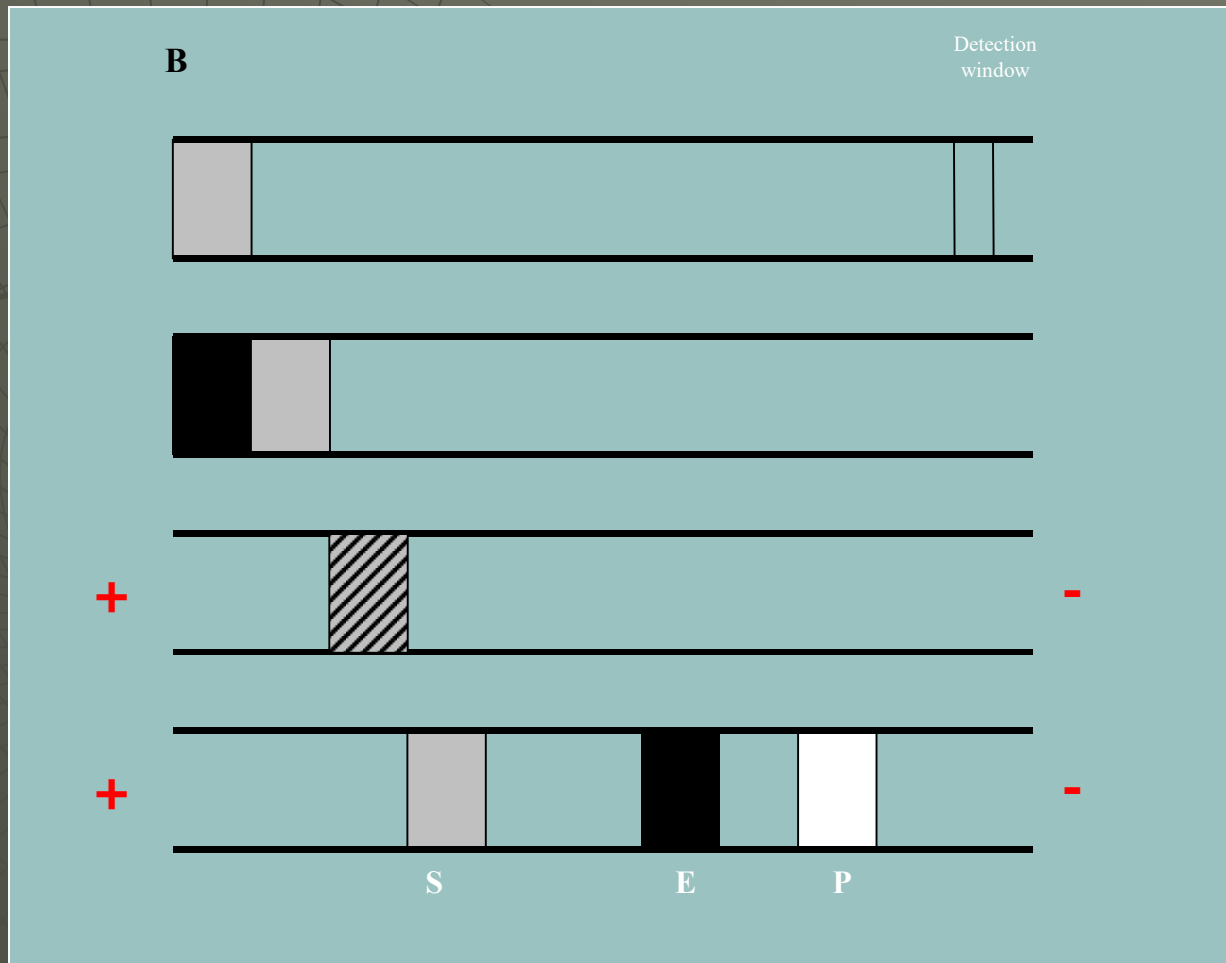
Cestovní kancelář

EMMA

EMMA - kontinuální mód



EMMA – zonální mód



EMMA – zonální mód

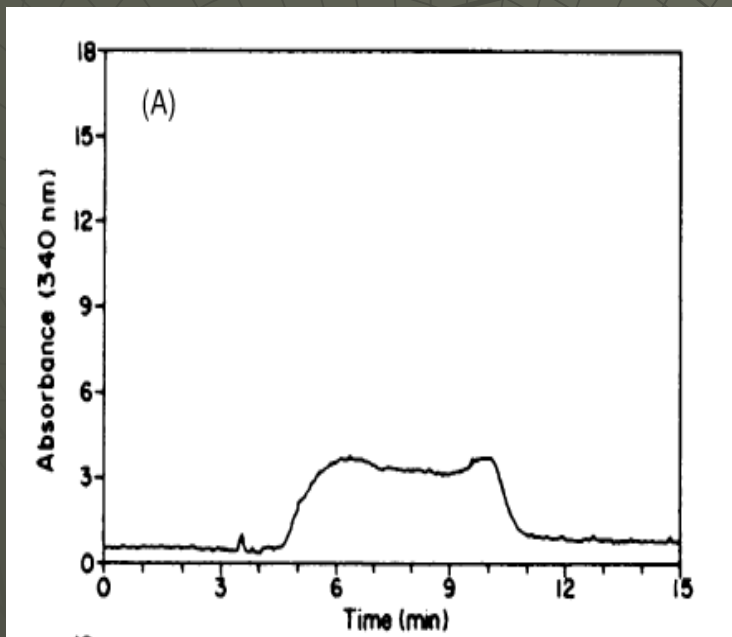
Výhody :

- Menší spotřeba vzorků – enzym, substráty, inhibitory
- Vyhodnocování

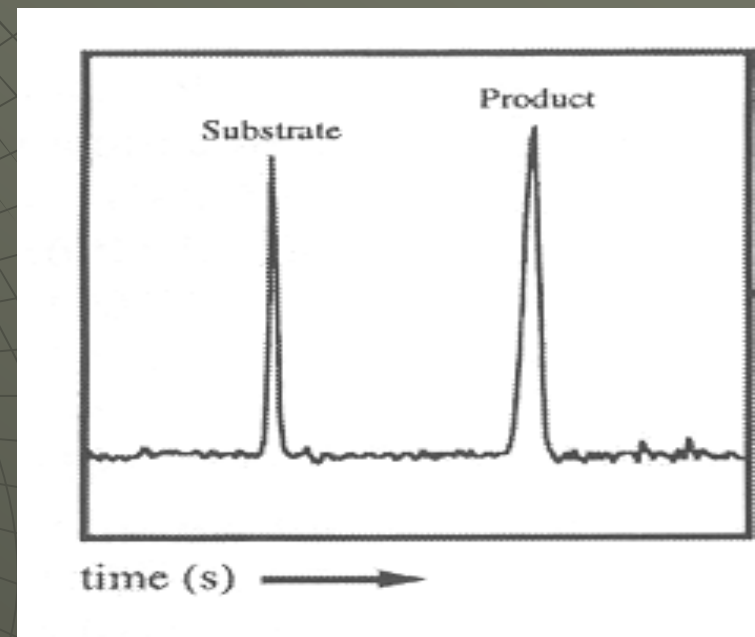
EMMA – vyhodnocení



Kontinuální mód



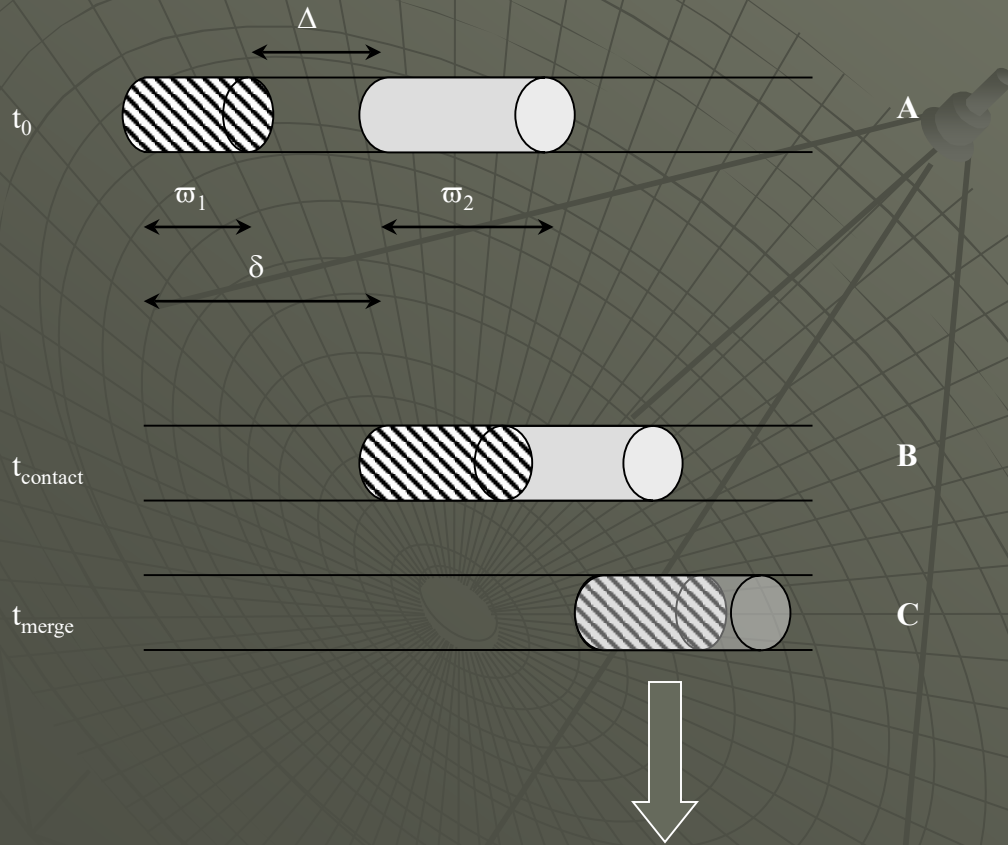
Zonální mód



B.J. Harmon et al., J. Chromatogr. A 726, 193 (1996).

E.S. Kwak et al., Anal. Chim. Acta 397, 183 (1999).

EMMA – zonální mód



$$t_{\text{reaction}} = \frac{\varpi_1 + \varpi_2}{\Delta \mu_{EP} E}$$

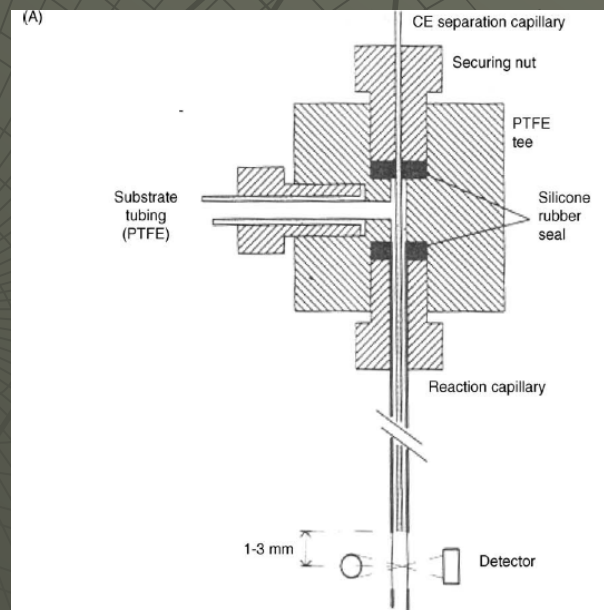
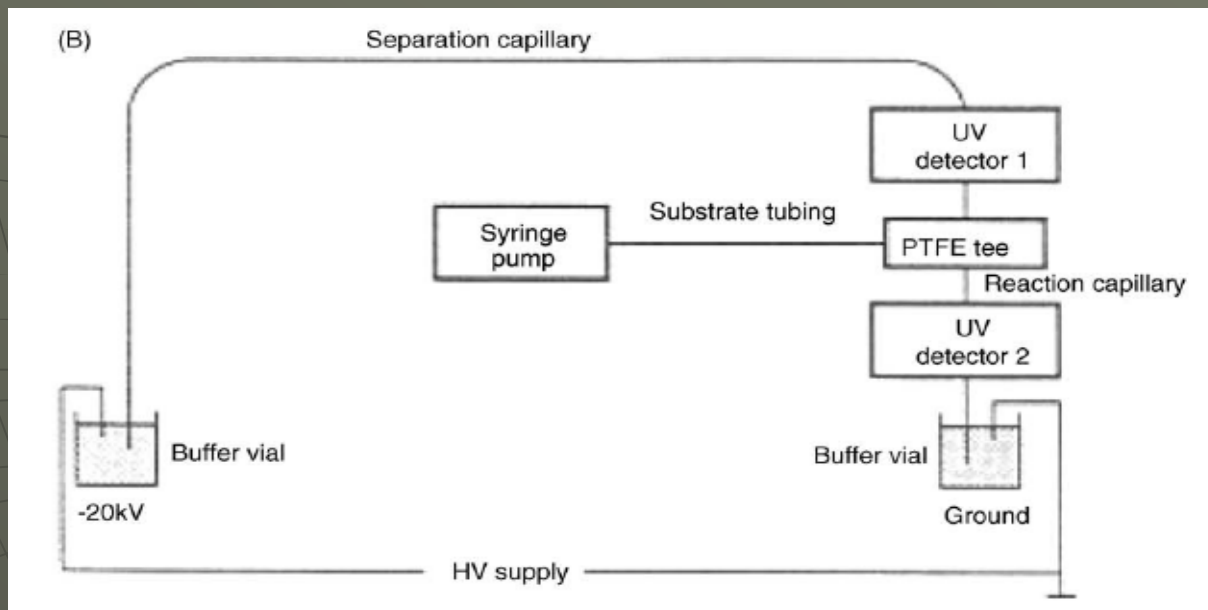
$$t_{\text{merge}} = \frac{\delta}{\Delta \mu_{EP} E}$$

vypnutí el. napětí: “zero potential amplification”

Studium enzymových reakcí pomocí CE

▪ „Post-capillary“ provedení :

- vzorek je nejprve separován pomocí CE, na konci kapiláry je reaktor, kde probíhá enzymová reakce
- uvedenou variantu nelze použít u komerčních CE zařízení

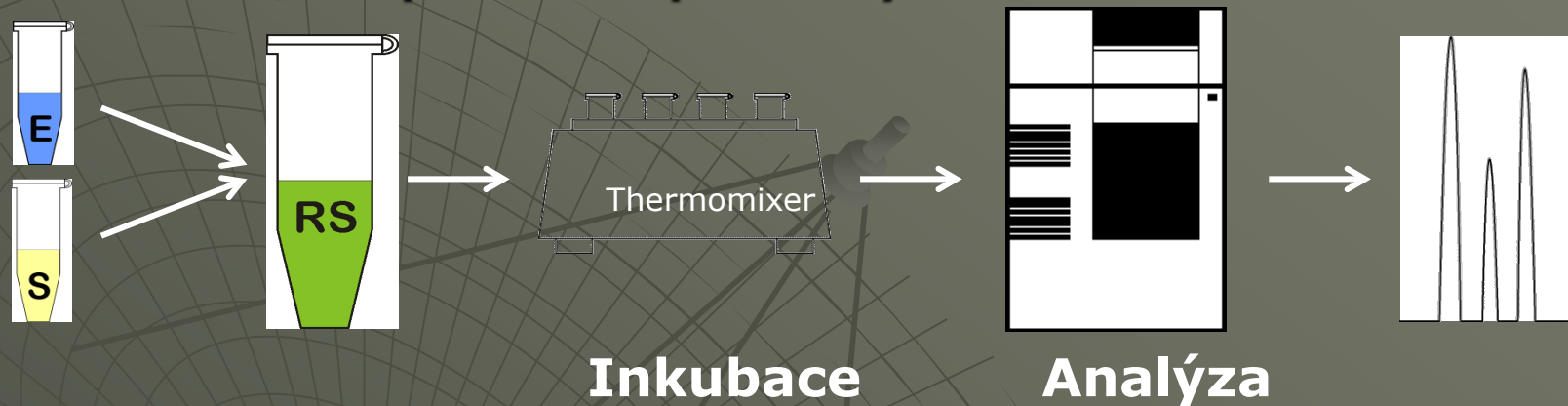


The background features a faint, light-colored grid pattern on a dark gray background. A pipette tip is positioned in the upper right quadrant, with a thin line extending from it towards the center of the grid.

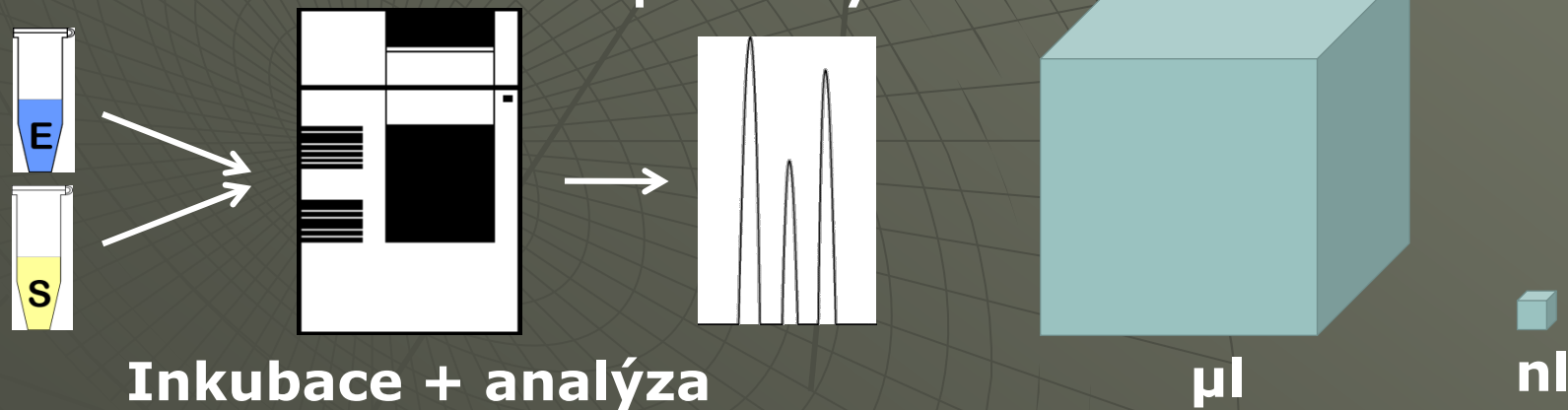
Studium enzymů pomocí CE ?

(pre-capillary versus on-capillary)

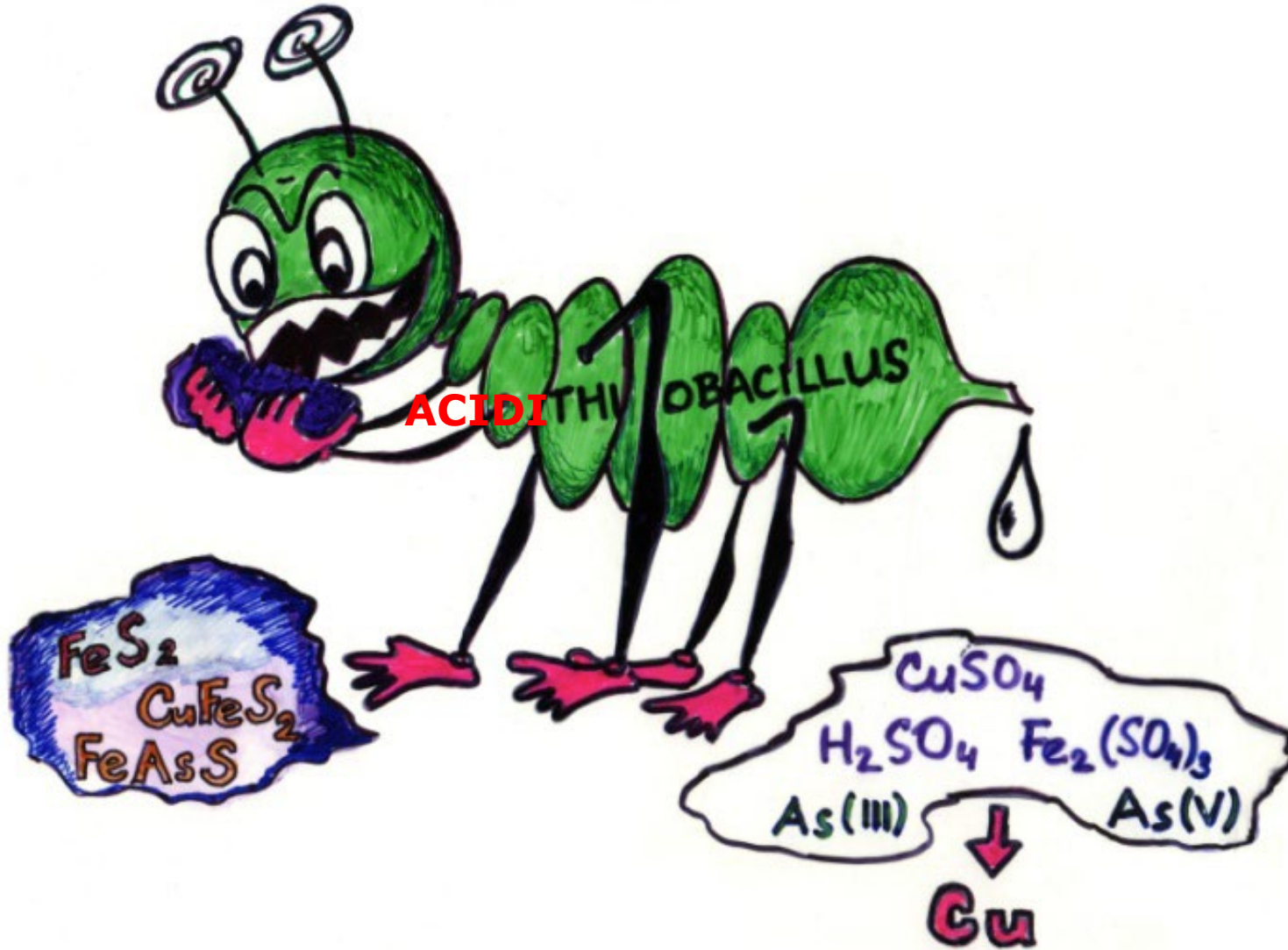
Off-line – pre-capillary



On-line – on-capillary



Rhodospirillum rubrum



How

Acid

cellae

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

Volba separačních podmínek



0.1 mM TTAB - 15 mM borát pH 9.0
blízká mobilita CN⁻, SCN⁻
vysoká koncentrace CN⁻ v reakční směsi



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

Volba separačních podmínek



100 mM β -alanin - HCl, pH 3.5

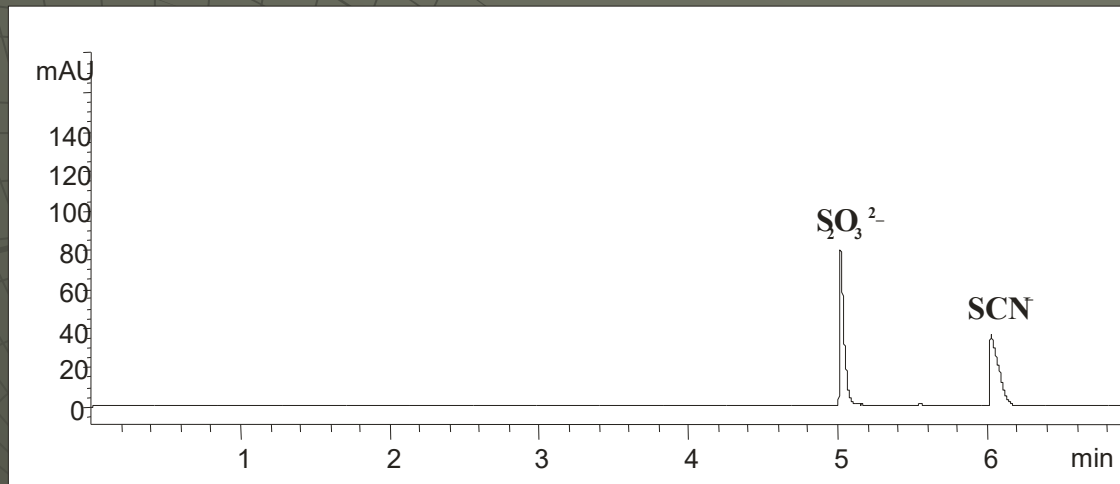
nizký EOF

CN⁻ = HCN



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

Analýza standardů



Kapilára: křemenná, vnitřní průměr 75 μm ,
celková délka 64.5 cm, efektivní
délka 56 cm

Dávkování : 50 mbar/6s

Separční napětí: 18 kV (negativní polarita)

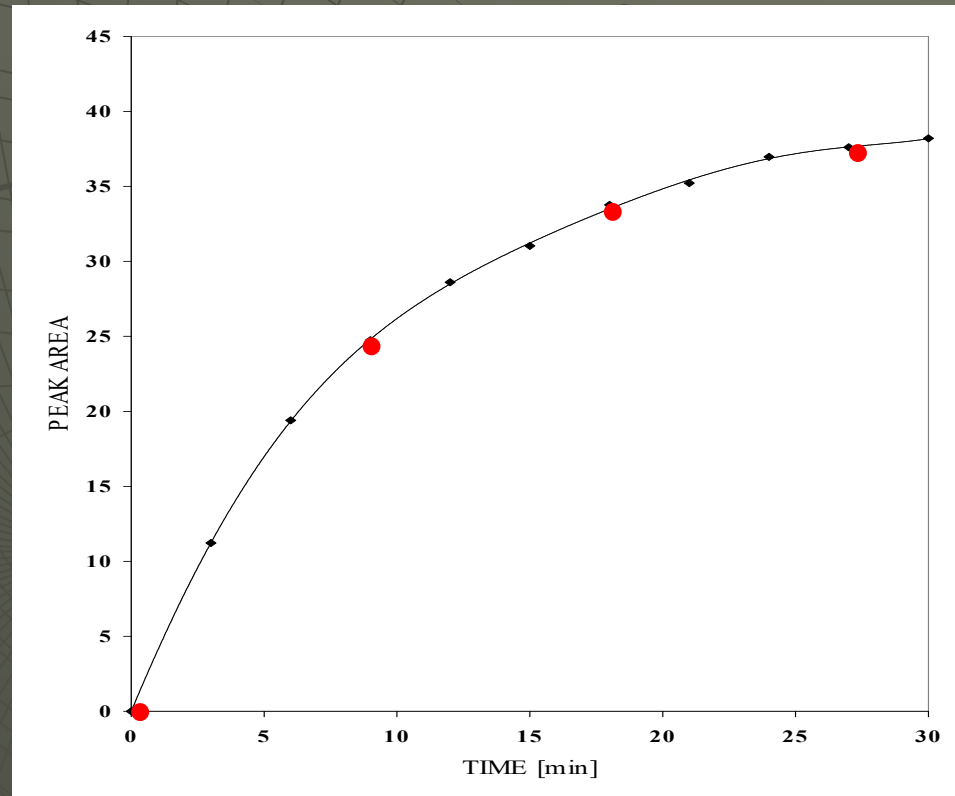
Teplota kapiláry: $25 \pm 0,1$ °C

Detekce: $\lambda = 200$ nm (šířka pásu 20 nm)

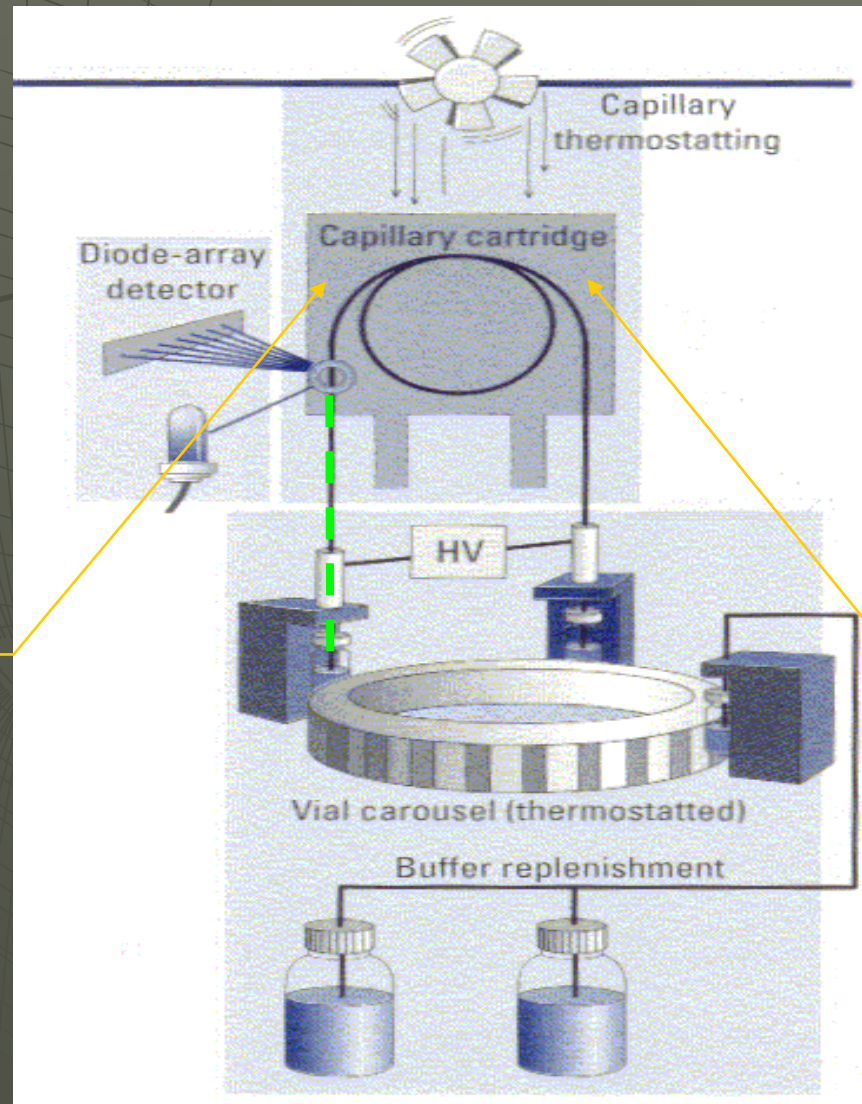
Vzorek : 1 mM $S_2O_3^{2-}$, 1 mM SCN^- , 25 mM CN^-
v 25 mM HEPES pufru (pH 8.5)

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

Stanovení aktivity kineticky



rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity Dávkování

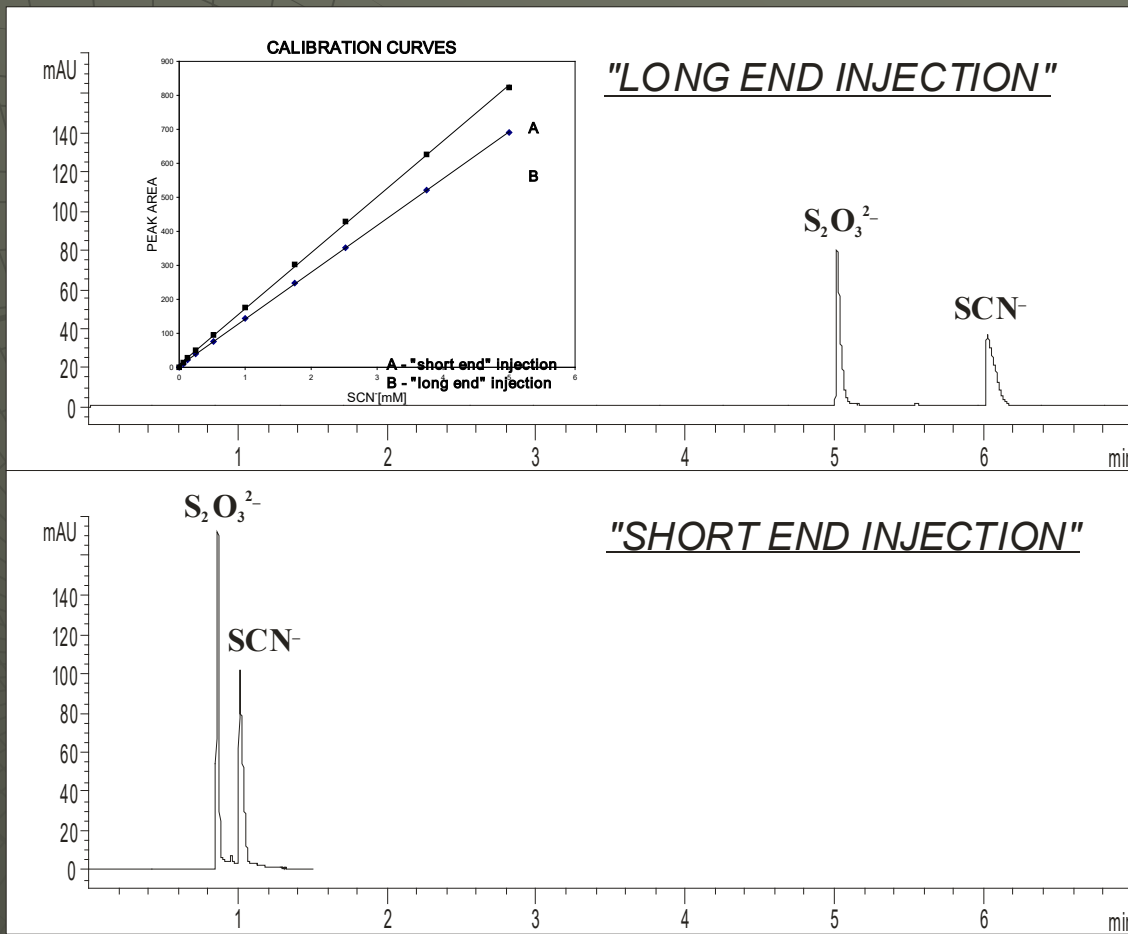


Short-end
8.5 cm

Long-end
33.5 cm

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

„Short end“ *versus* „Long end injection“



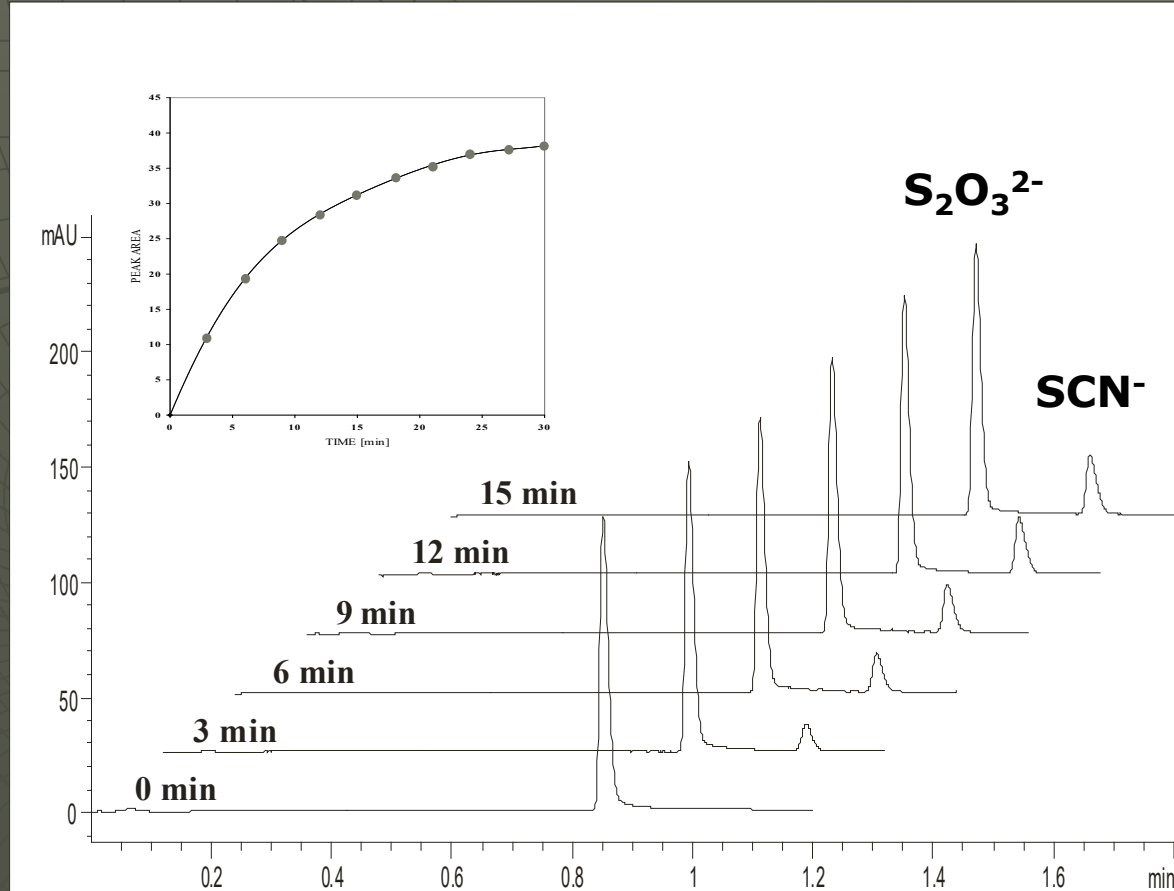
rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

„Short end“ *versus* „Long end injection“

	Short-end injection	Long-end injection
Doba analýzy	1.5 min	7 min
Přesnost migračních časů (n=10)	0.11 %	0.04 %
Přesnost plochy píků (n=10)	0.33 %	0.82 %
Linearita	50 - 5000 μM	50 - 5000 μM
Korelační koeficient	0.9993	0.9998
Limit detekce	2.5 μM	5 μM

rhodanasa – pre-capillary stanovení aktivity

Stanovení aktivity



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Volba separačních parametrů

Stejný pufr použít jak pro enzymovou reakci,
tak pro separaci produktů

pH optimum rhodanasy: 8.5



BGE pH 8.5 – (nepokrytá kapilára, PVA – pokrytá kapilára)



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Volba separačních parametrů

Separace anorganických aniontů ($S_2O_3^{2-}$, SCN^-)
probíhá nejlépe při **nízkém pH** základního elektrolytu
⇒ eliminace EOF

pH optimum rhodanasy: 8.5

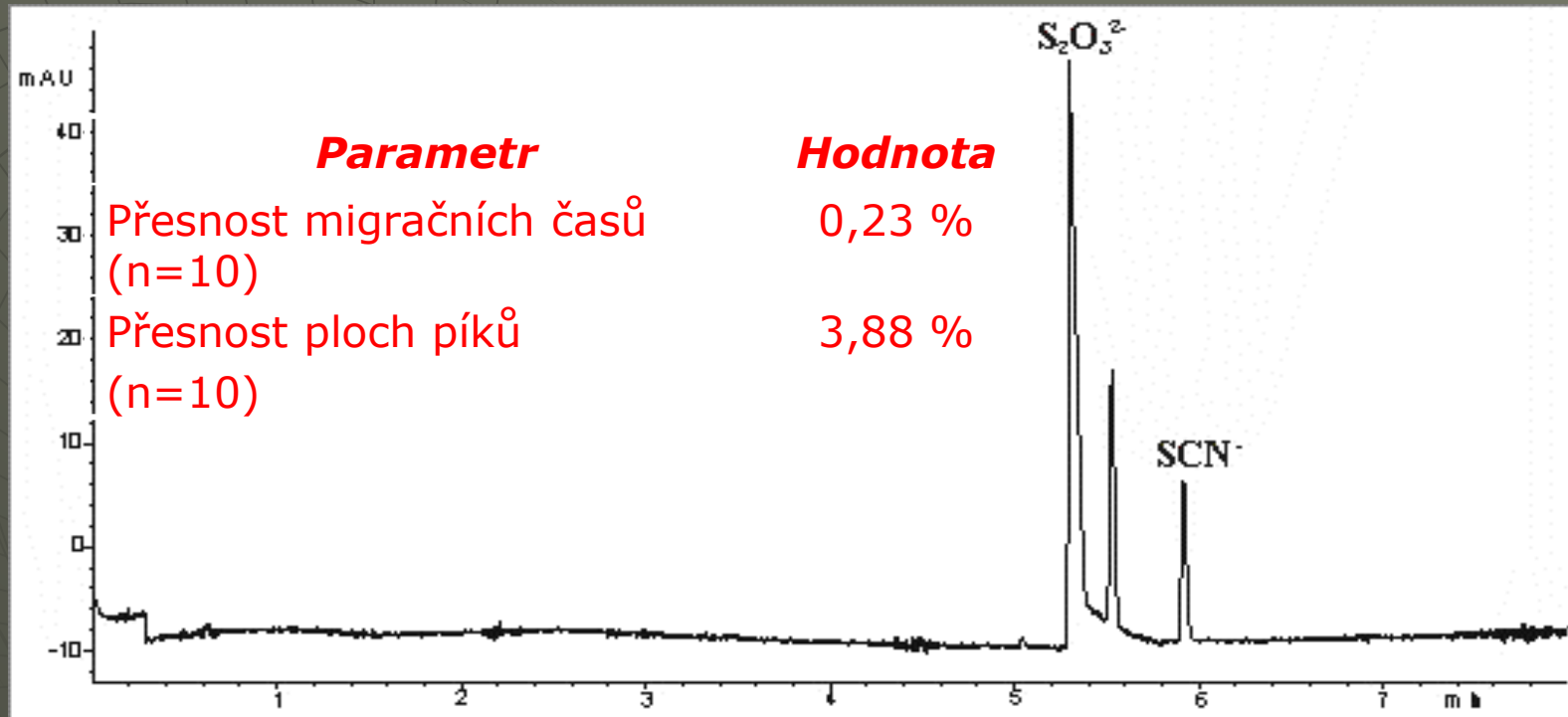


Kombinace metody EMMA s "partial filling technique"



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Dávkovací a separační parametry



25 mM HEPES
(pH 8,5)

Substráty v 25 mM
HEPES (pH 8,5)

Rhodanasa v 25 mM
HEPES (pH 8,5)

25 mM HEPES
(pH 8,5)



+

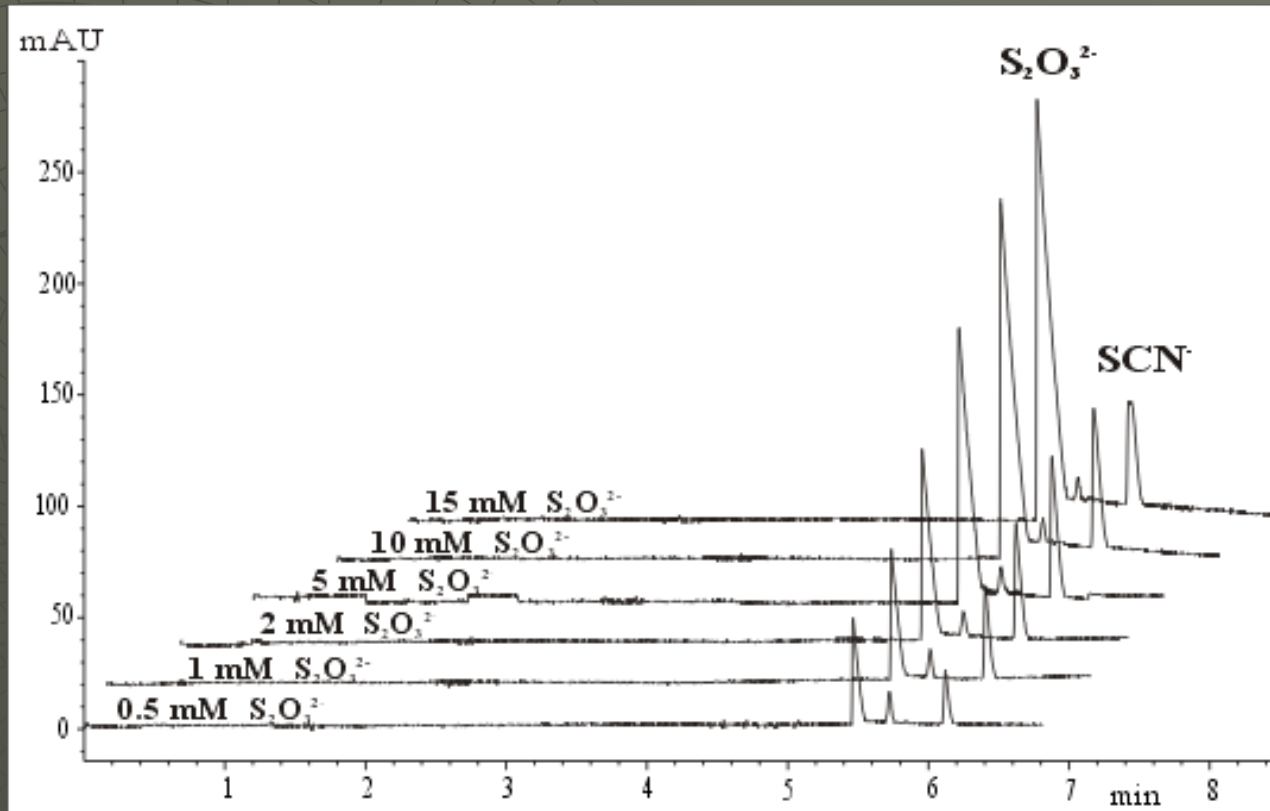
nástřik
vzorku

Separační napětí
18 kV (negativní polarita)

Detekce
200 nm

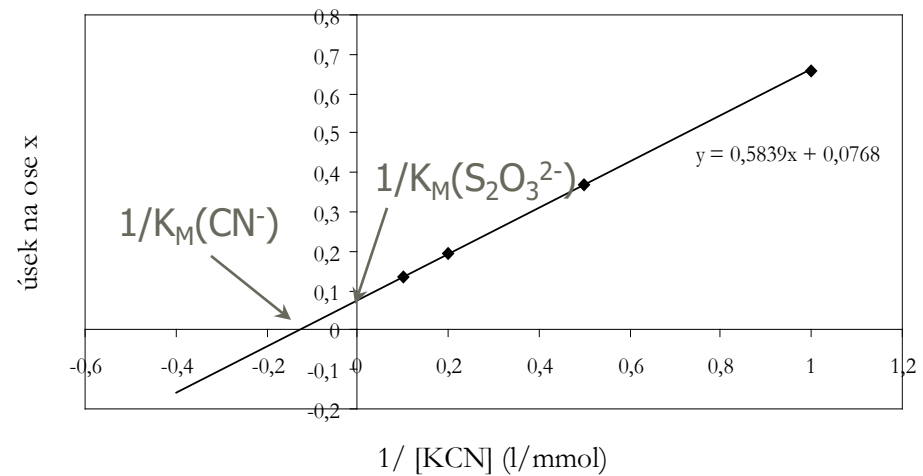
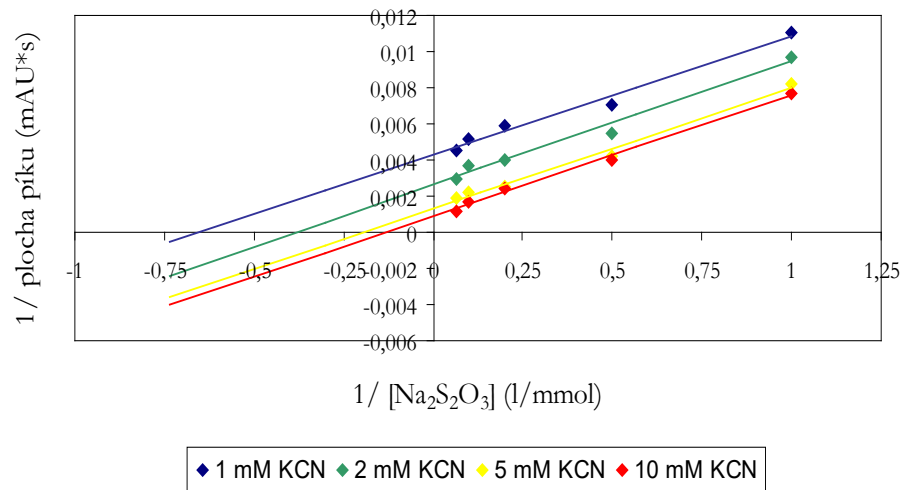
rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Stanovení Michaelisových konstant K_m



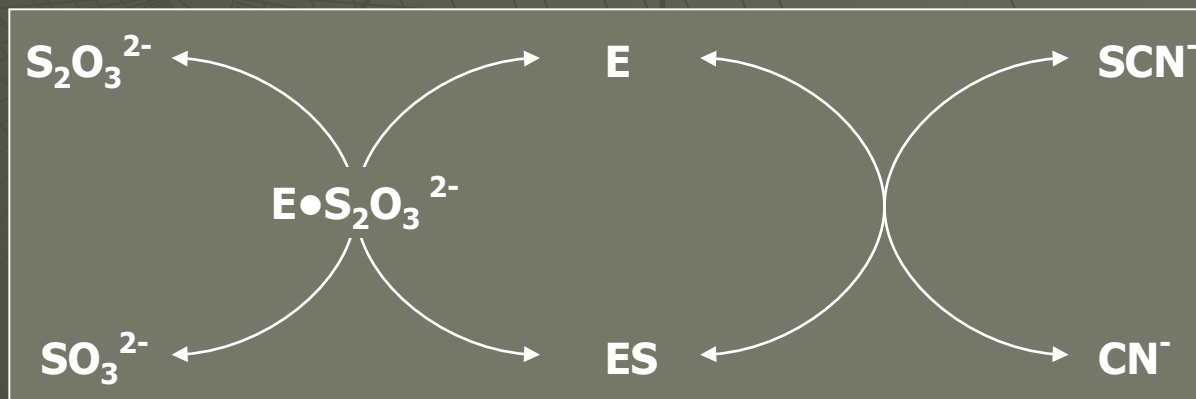
rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Stanovení Michaelisových konstant K_M



$$K_M(\text{CN}^-) = 7.60 \text{ mM}$$

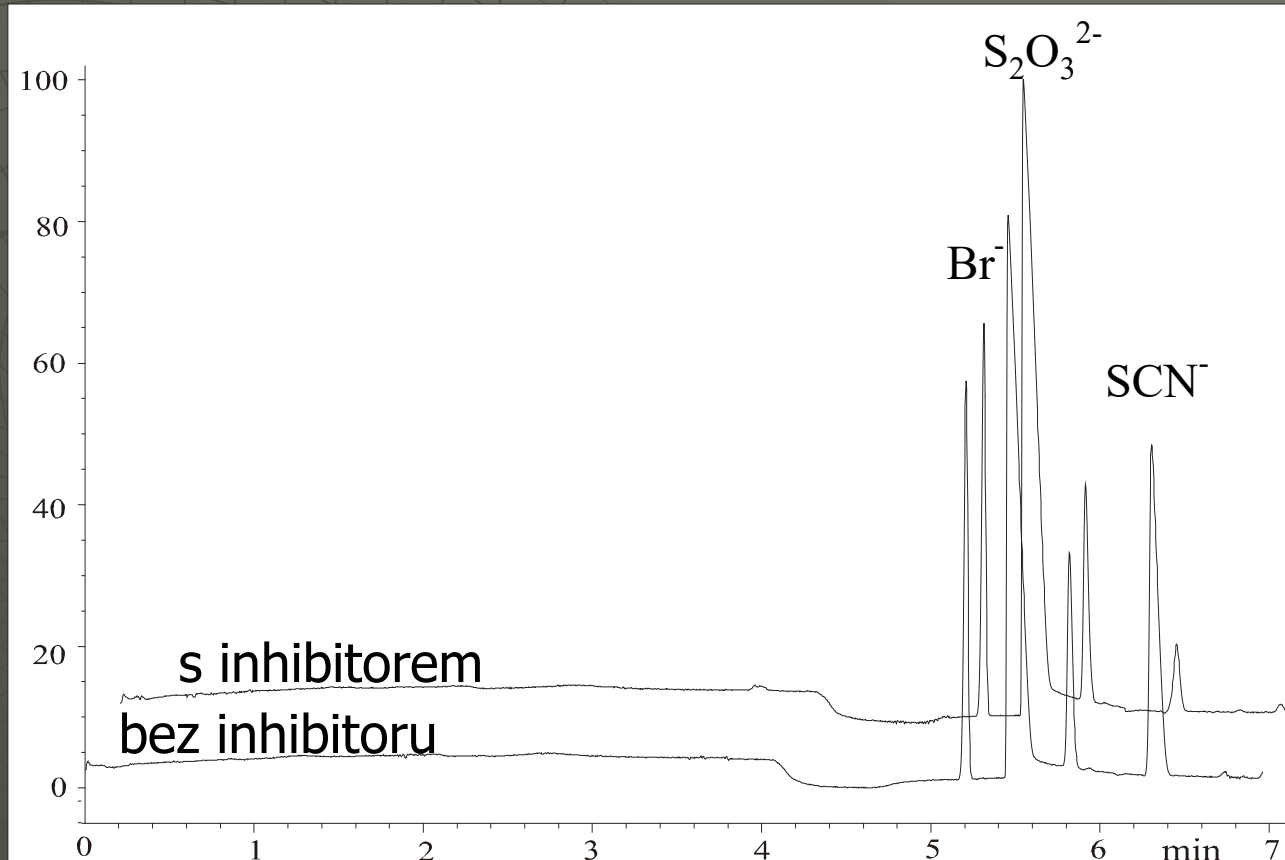
$$K_M(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 13.02 \text{ mM}$$



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Inhibice rhodanasy 2-oxoglutarátem

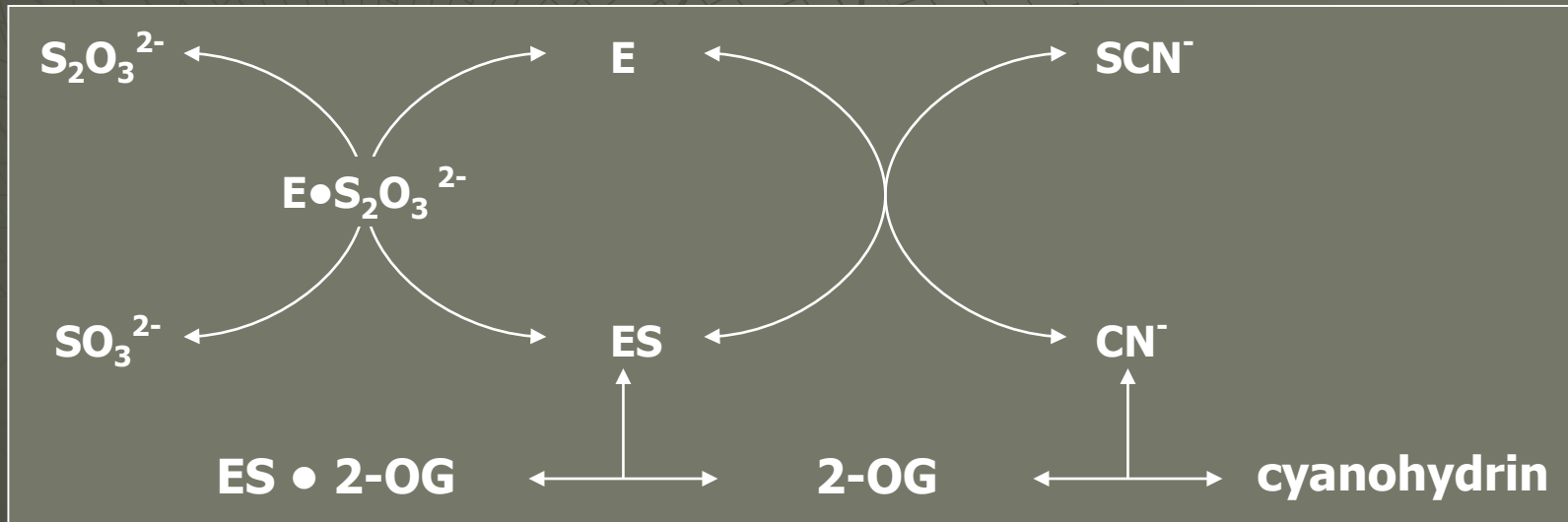
(inhibitor přidán do zóny substrátů)



rhodanasa – EMMA stanovení kinet. parametrů

Diagnostika typu inhibice

	2-OG K_I (mM)	inhibice
$S_2O_3^{2-}$	1.40	akompetitivní
CN^-	3.62×10^{-1}	kompetitivní



Haloalkandehalogenasa (EC 3.8.1.5)



- Odbourávání halogenovaných derivátů uhlovodíků
- Enantioselektivní organické syntézy

haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

Volba separačních podmínek



100 mM β -alanin - HCl, pH 3.5

UV 200 nm

Separační napětí 18 kV (hegativní polarita)



haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

Volba separačních podmínek

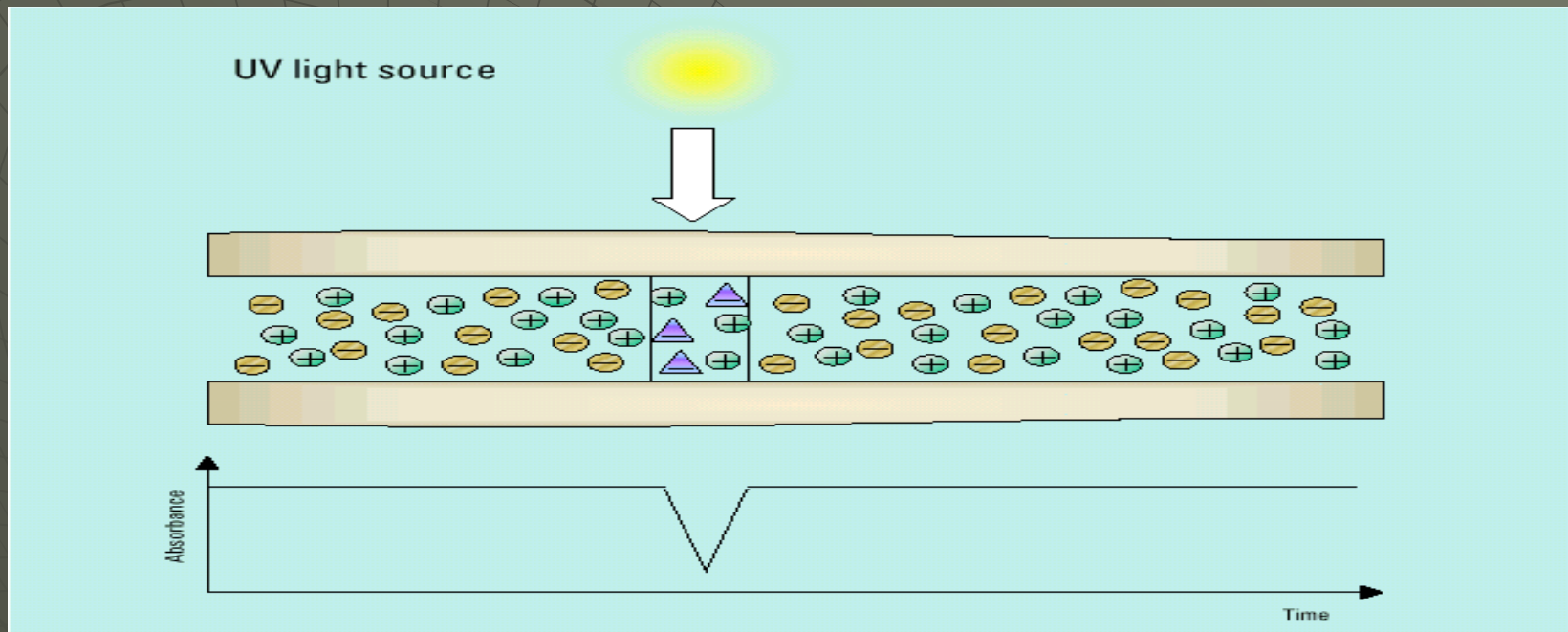


Nepřímá detekce



haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

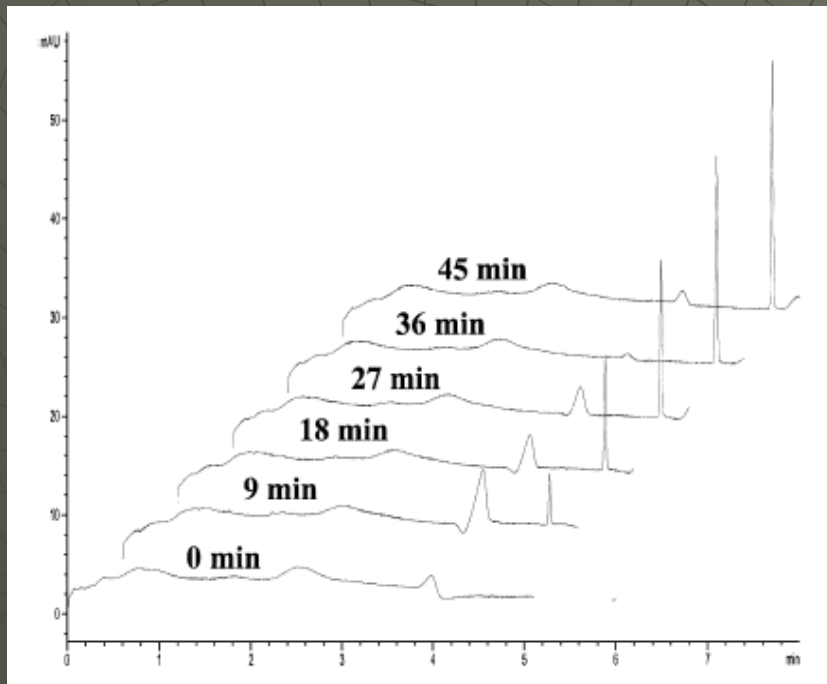
Nepřímá detekce



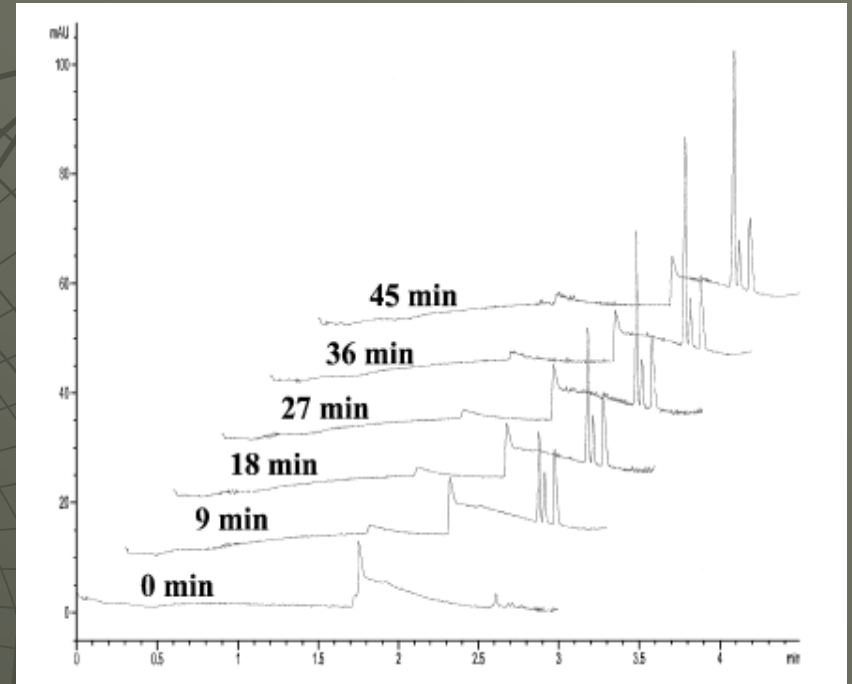
5 mM chroman 0.5 mM TTAB pH 8.5
Nepřímá detekce – 315 nm / 375 nm
Separační napětí 15 kV (negativní polarita)

haloalkandehalogenasa – pre-capillary stanovení

Stanovení aktivity substrát 1-brombutan



Přímá detekce



Nepřímá detekce

haloalkandehalogenasa – EMMA

Dávkovací a separační parametry Základní elektrolyt

20 mM β -alanin - HCl, pH 3.5 - přímá detekce
separační napětí 29,9 kV (negativní polarita)

nebo

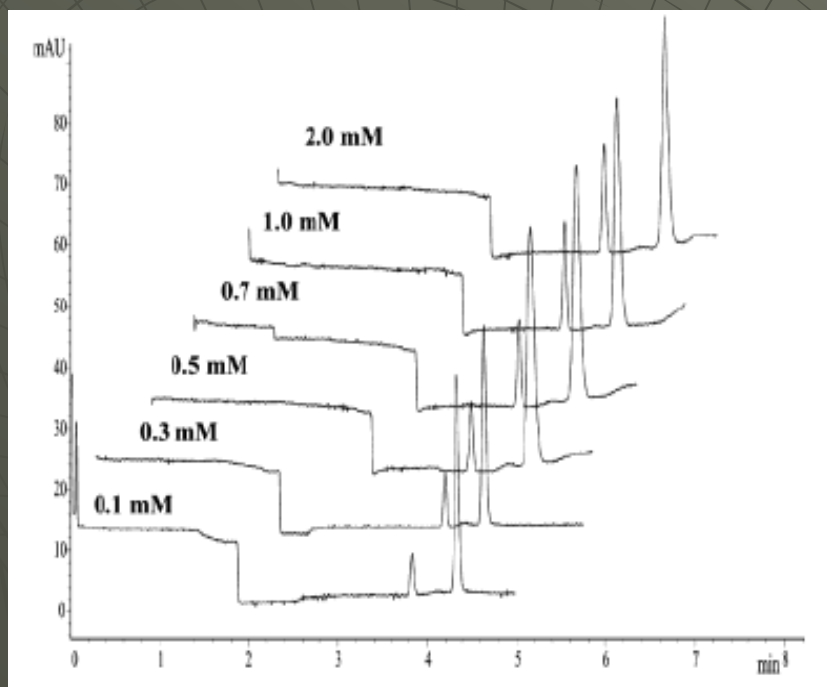
10 mM chroman 0.1 mM CTAB pH 9.2 - nepřímá detekce
separační napětí 18 kV (negativní polarita)

Dávkování

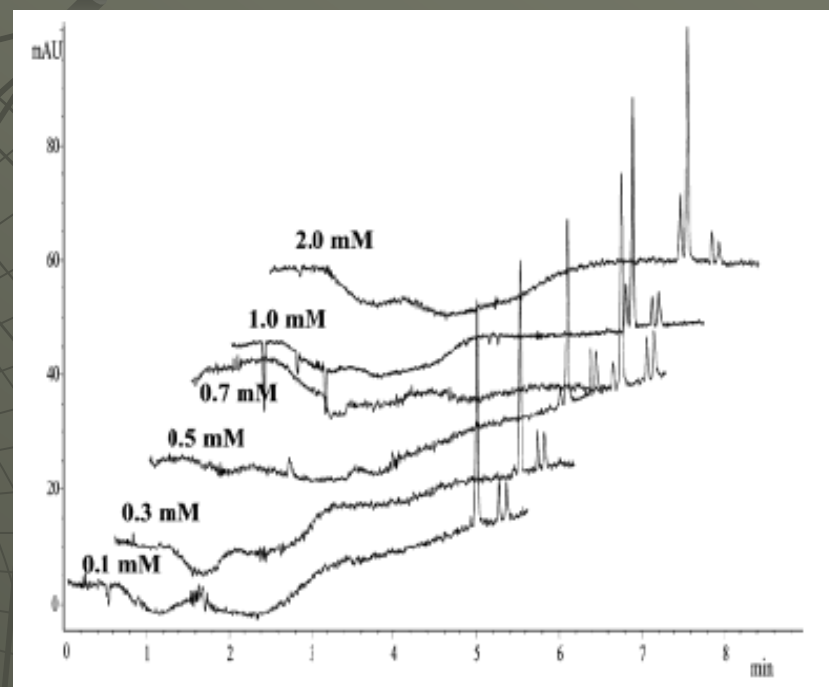
1. 20 mM glycinátový pufr (pH 8.6) : 50 mbar/4s
2. Enzym ve 20 mM glycinátovém pufru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
3. Substrát ve 20 mM glycinátovém pufru pufru (pH 8.6) : 50 mbar/4s
4. 20 mM glycinátový pufr (pH 8.6) : 50 mbar/4s

haloalkandehalogenasa – EMMA

Stanovení Michaelisovy konstanty K_m substrát 1-brombutan



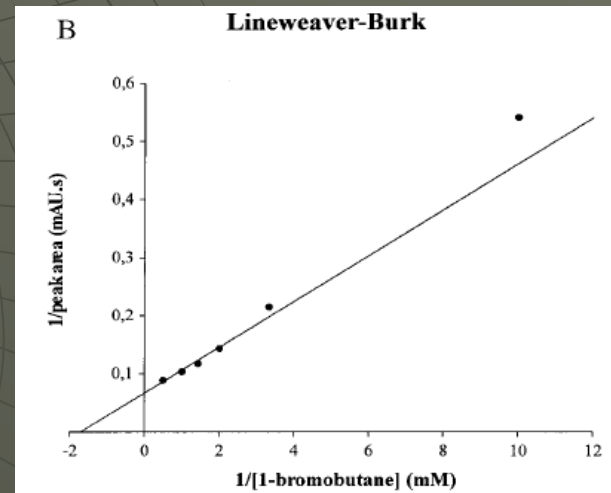
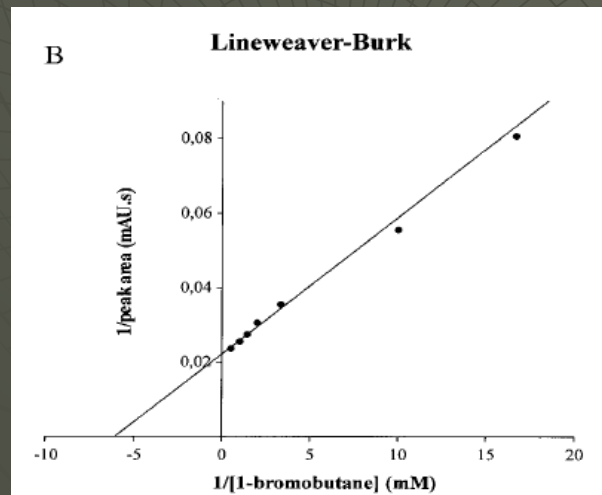
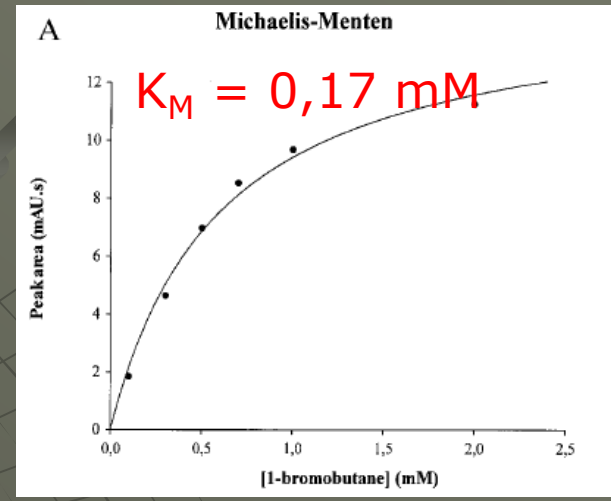
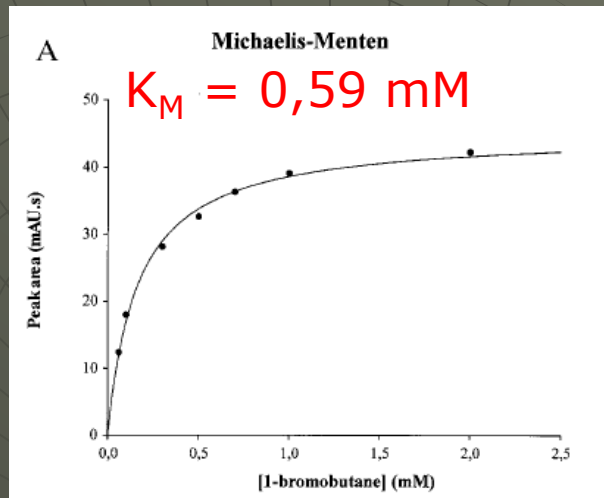
Přímá detekce



Nepřímá detekce

haloalkandehalogenasa – EMMA

Stanovení Michaelisovy konstanty K_M substrát 1-brombutan

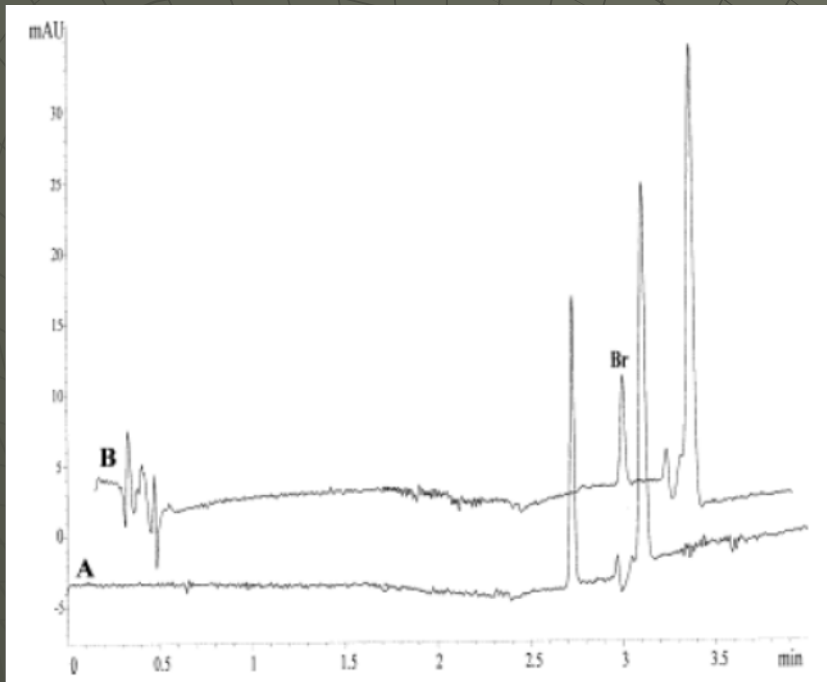


Přímá detekce

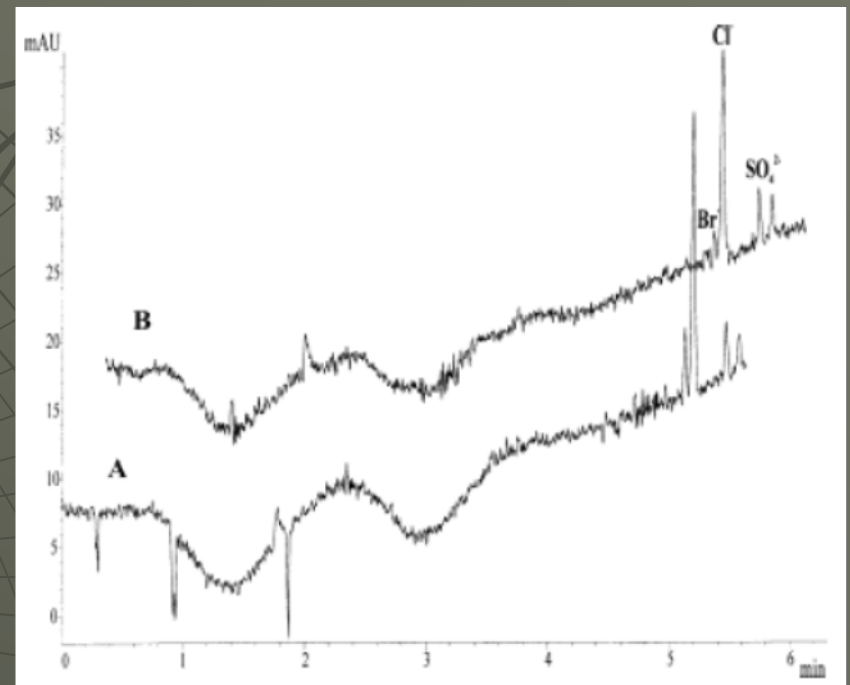
Nepřímá detekce

haloalkandehalogenasa – EMMA

Stanovení inhibiční konstanty K_i
substrát 1-brombutan; inhibitor 1,2-dichloethan



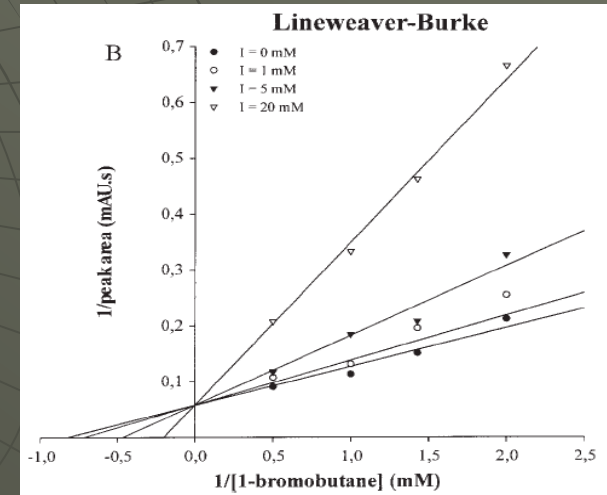
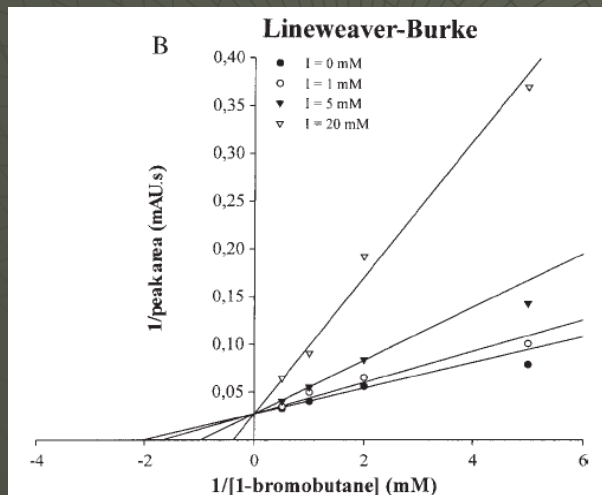
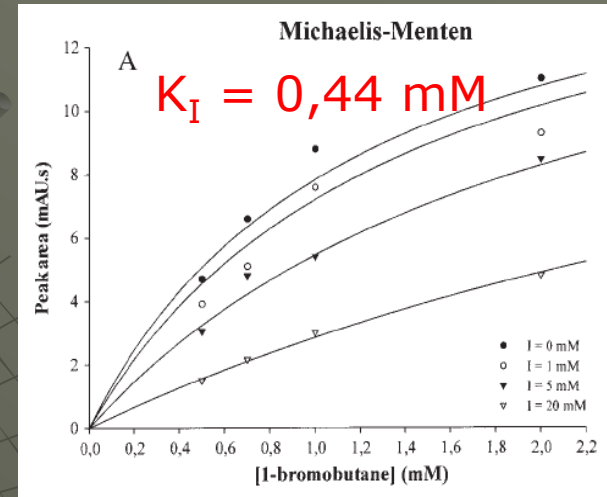
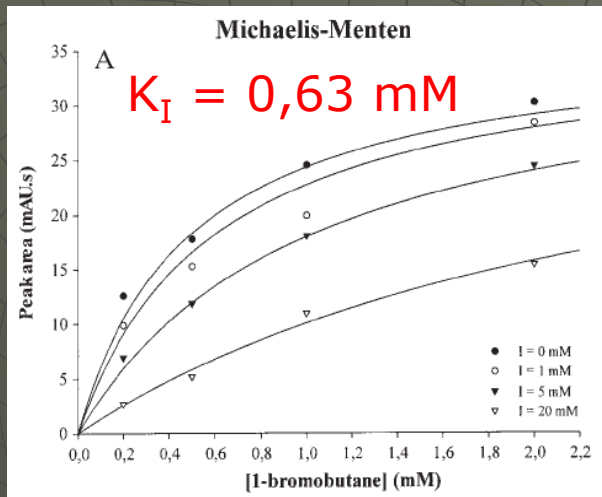
Přímá detekce



Nepřímá detekce

haloalkandehalogenasa – EMMA

Stanovení inhibiční konstanty K_i substrát 1-brombutan; inhibitor 1,2-dichloethan



Přímá detekce

Nepřímá detekce

„Pre-capillary“ enzymové stanovení stanovení aktivity

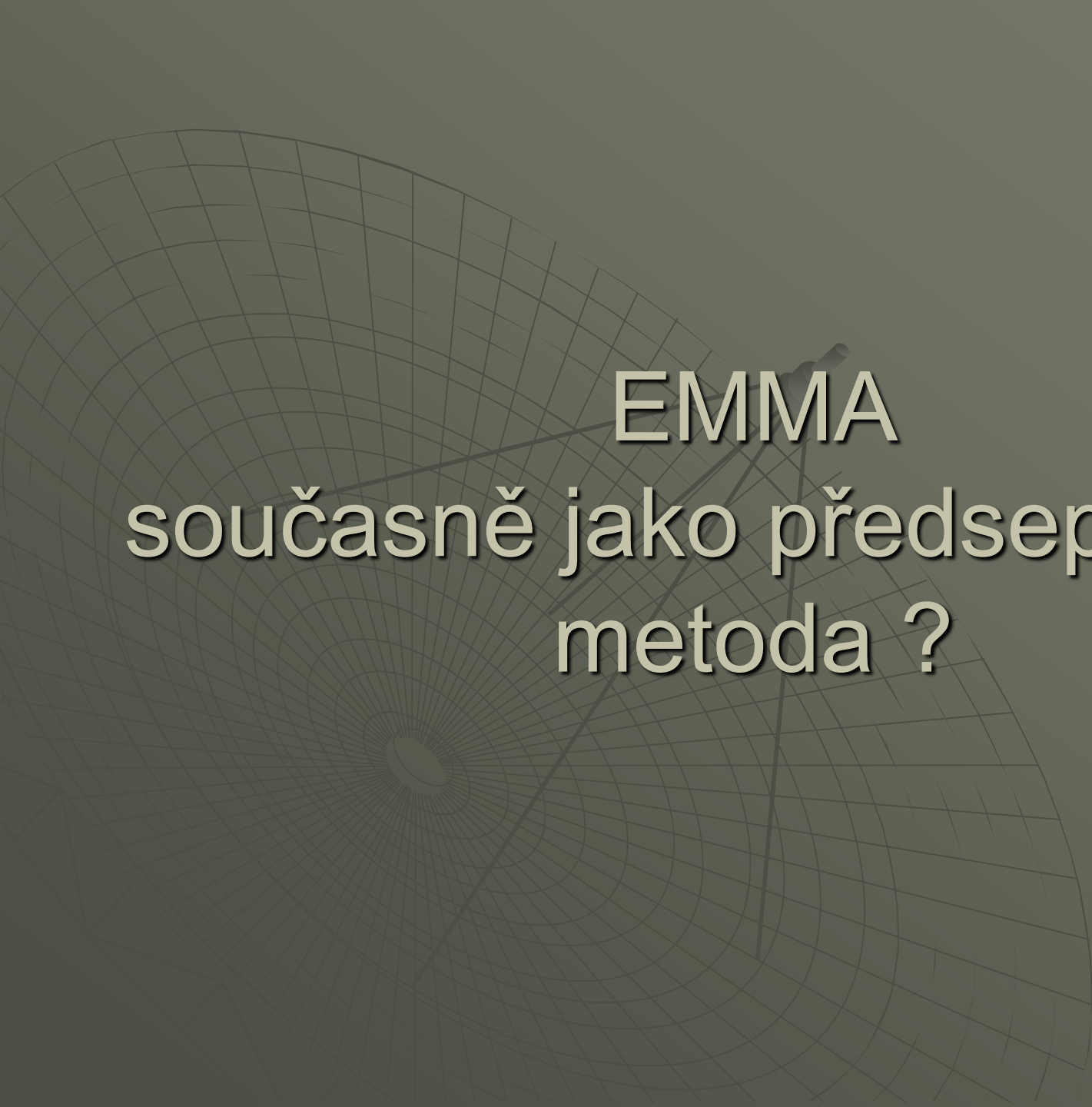
- ◆ Vysoká účinnost
- ◆ Vysoké rozlišení
- ◆ Rychlost analýzy

„On-capillary“ enzymové stanovení studium kinetiky

- ◆ Vysoká účinnost
- ◆ Vysoké rozlišení
- ◆ Rychlost analýzy
- ◆ **Automatizace**
- ◆ **Malá množství vzorku**

Studium kinetiky dvousubstrátové enzymové reakce
(60 experimentů)

- * spotřeba vzorku enzymu – **20 μ l !!** (1200 μ l LE)
- * doba studie – **3 hodiny SE !!** (10 hodin LE)



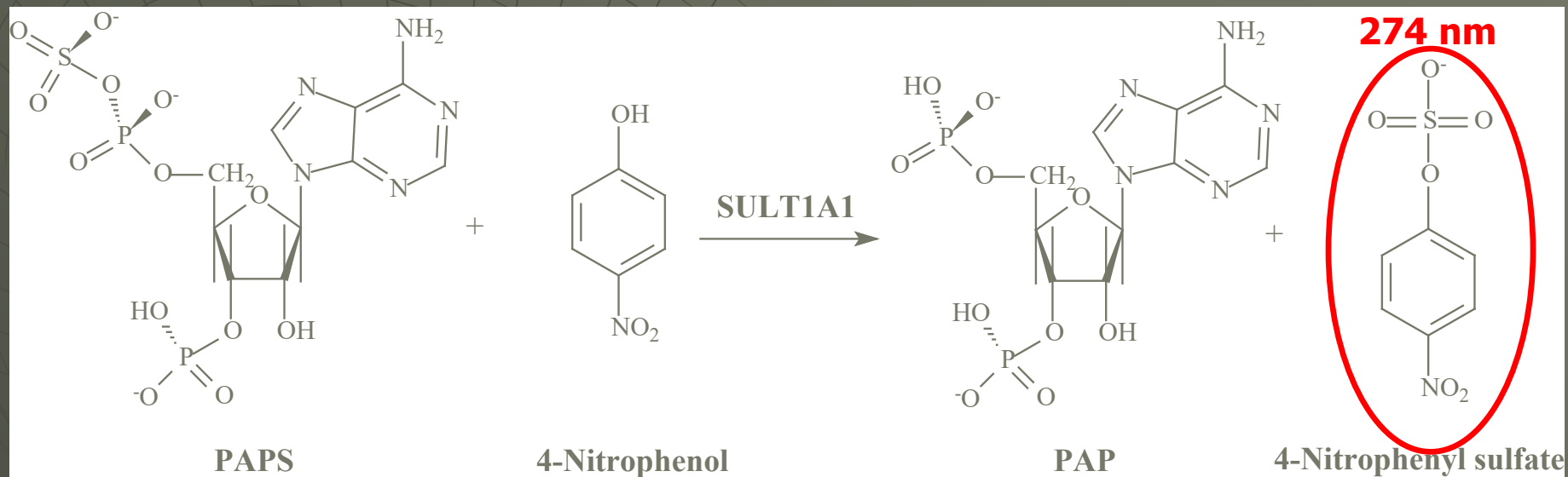
EMMA
současně jako předseparační
metoda ?

Sulfotransferasa (EC 2.8.2.1)

- cytosolická
 - biotransformace/detoxikace xenobiotik (II fáze)
- membránově vázaná
 - sulfatace glykoproteinů

sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

Reakce



Velmi nestabilní
80 % (20 % PAP)

1 mg CZK 8,290.00

Velmi silný inhibitor reakce
K_I = 0.4 μM

sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

Předseparace PAP od PAPS – MEKC (cholát)

Separační podmínky:

BGE: 150 mM HEPES, pH 6.5 +

20 mM kyselina cholová

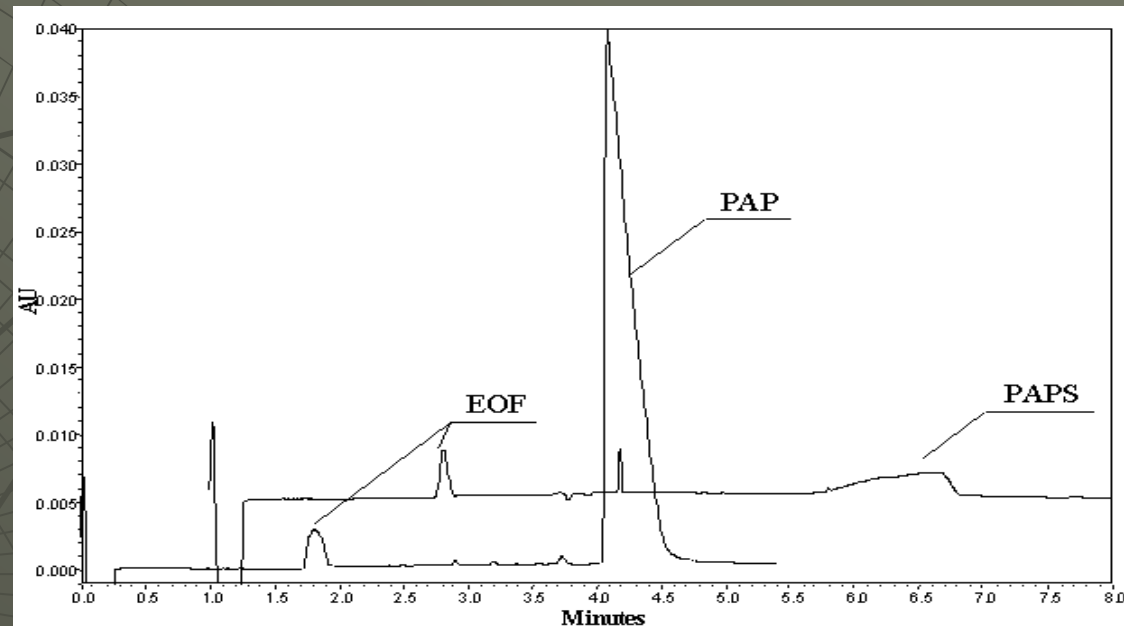
Kapilára: $L_T=31.2$ cm ($L_E = 21$ cm),
75 μ m I.D.

Napětí: + 10 kV

Teplota kapiláry: 37 °C

Detekce: 260 nm

Dávkování: 0.3 psi/ 5 s 1mM PAP
nebo 115 mM PAPS



<i>Standard</i>	<i>Migrační čas (s)</i>	<i>Mobilita (cm²V⁻¹s⁻¹)</i>	<i>Rychlost (cm s⁻¹)</i>
PAP	246	-3.90×10^{-4}	-0.106
PAPS	339	-4.03×10^{-4}	-0.130

sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

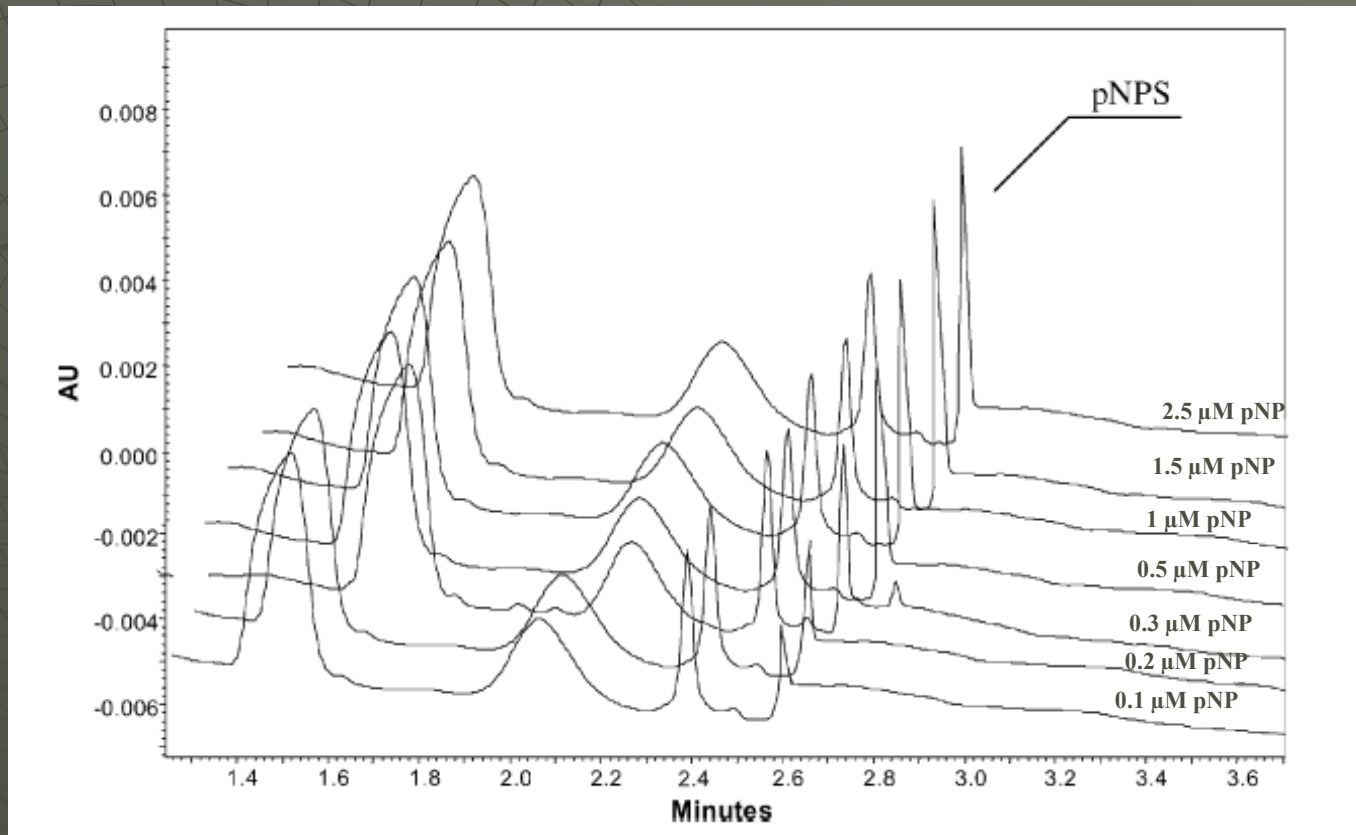
Dávkování a inkubace

Krok	Zóna	Tlak p_i (psi)	Čas (s)	Napětí (kV)
1. Dávkování PAPS	PAPS	0.5	5	/
2. Předseparace od PAPS	/	/	60	15
3. Dávkování S	4-NP	0.3	5	/
4. Dávkování E	SULT1A1	0.3	5	/
5. Smísení a enzymová reakce	/	/	60	5
6. Inkubace	/	/	120	0
7. Separace	/	/	300	10

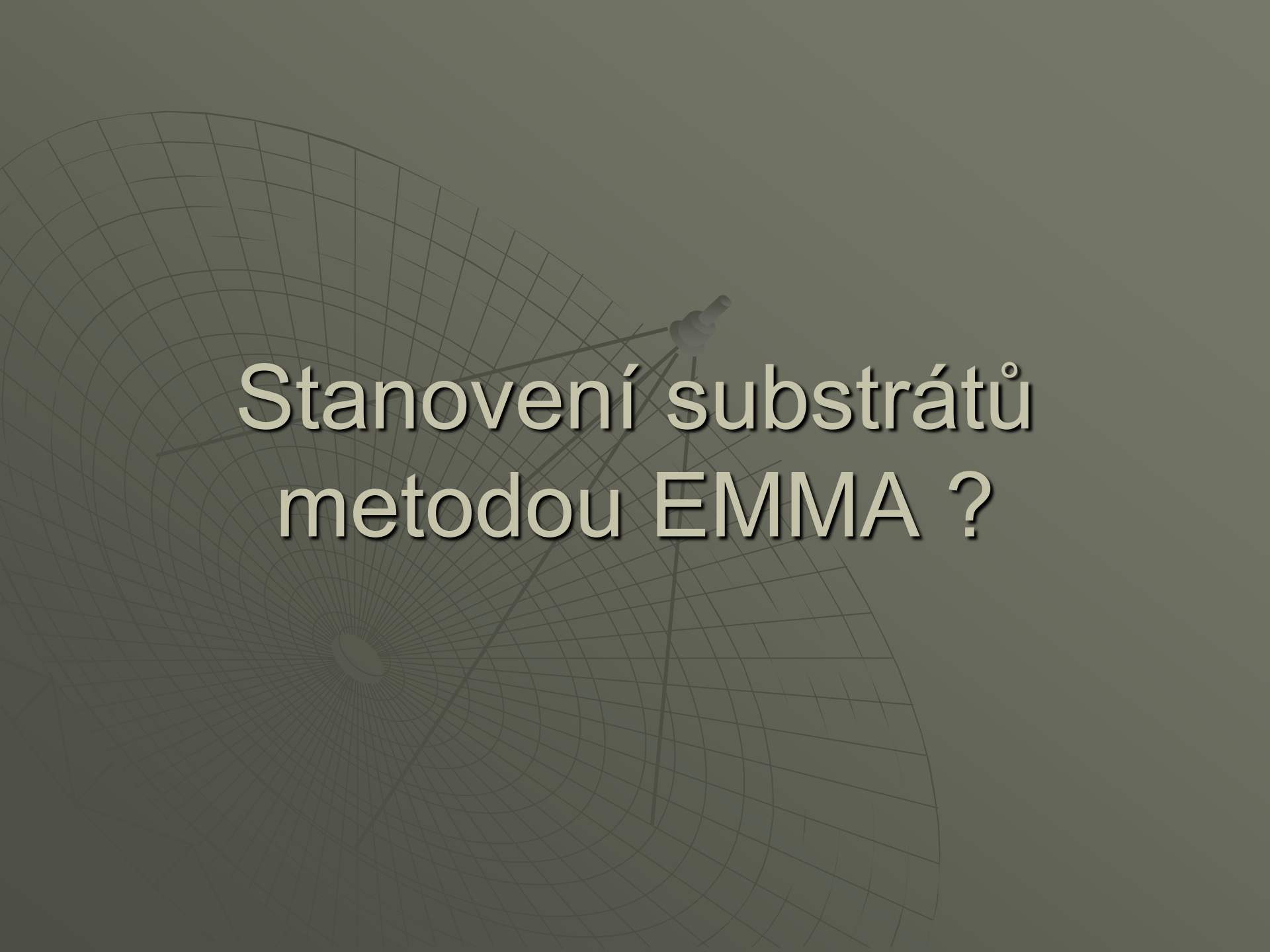


sulfotransferasa – EMMA stanovení aktivity a kinetických parametrů

Stanovení Michaelisovy konstanty pro 4-nitrofenol



$$K_M = 0.8 \mu\text{M}$$



Stanovení substrátů
metodou EMMA ?

stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

Rhodanasa



20 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
v 25 mM HEPES (pH 8,5)

Vzorek CN^-

Rhodanasa a 20 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
v 25 mM HEPES (pH 8,5)

20 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
v 25 mM HEPES (pH 8,5)



nástřik
vzorku

detekce

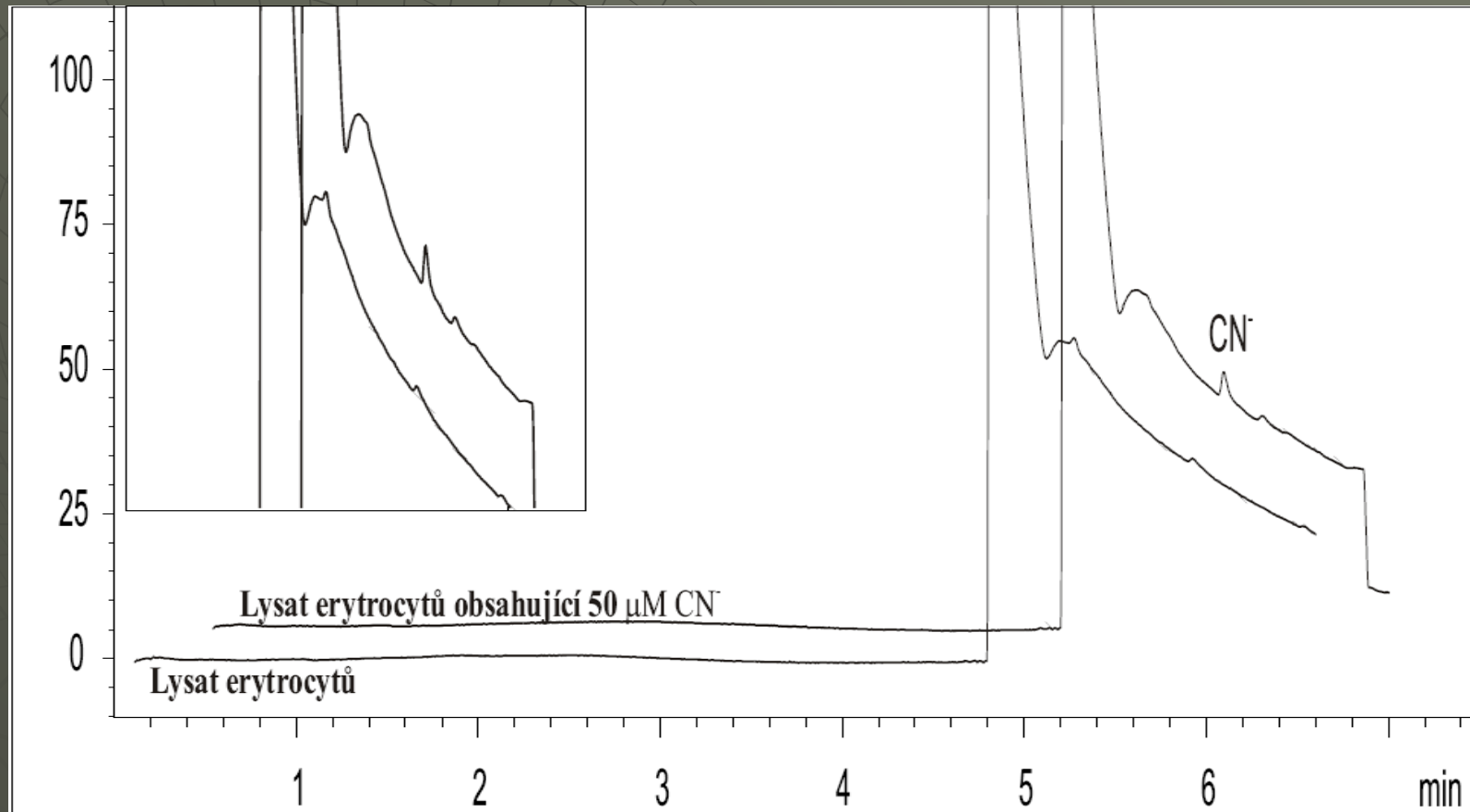
stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

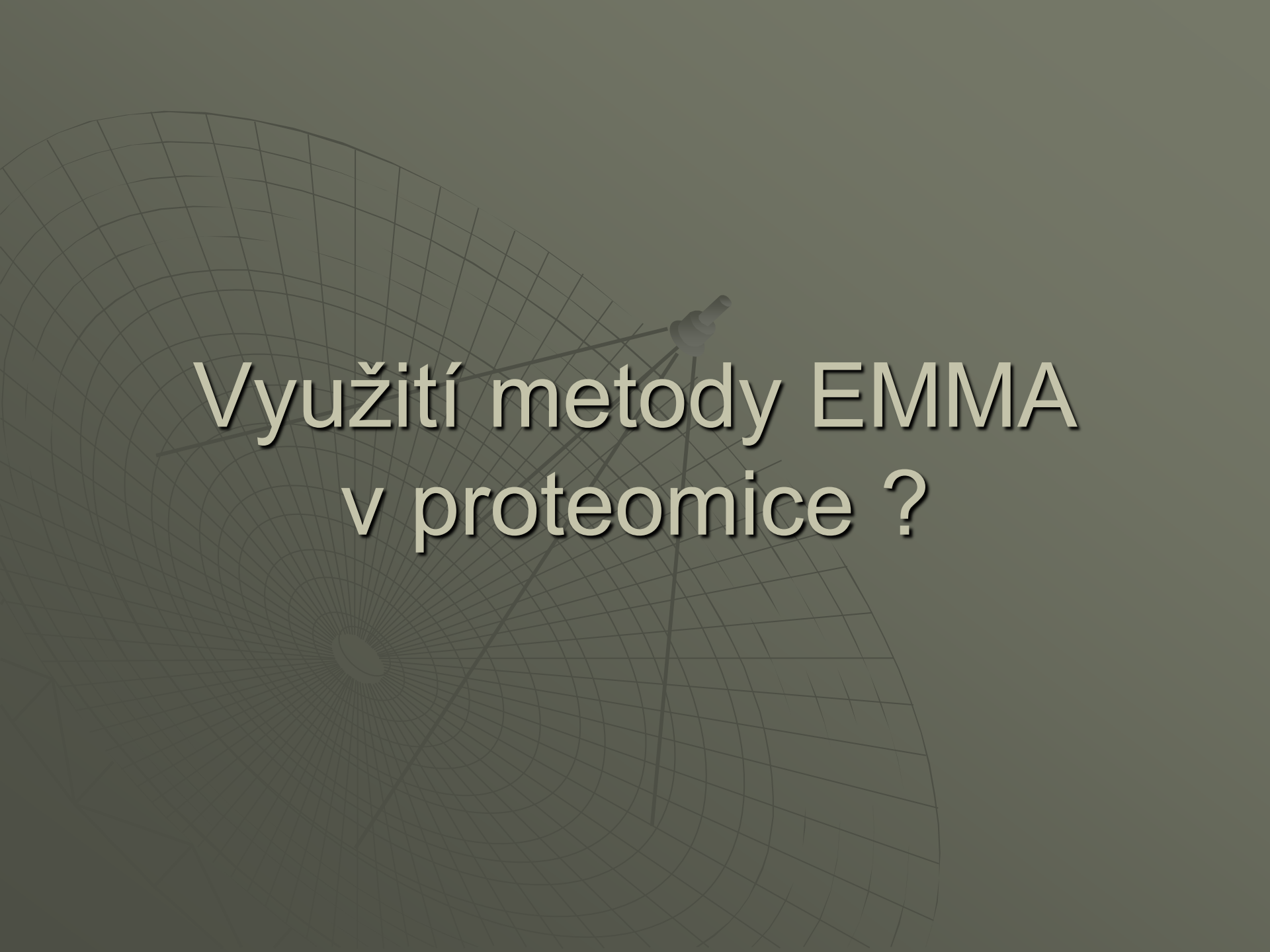
Dávkování a inkubace

Krok	Tlak (mbar)	Čas (s)	Napětí (kV)
1. Dávkování HEPES pufru	50	4	0
2. Dávkování rhodanasy	50	4	0
3. Dávkování vzorku	50	4	0
4. Dávkování HEPES pufru	50	4	0
5. Smíchání vzorku a rhodanasy	0	3	18
6. Inkubace	0	21	0
7. Separace	0	420	18

stanovení kyanidu metodou EMMA po enzymatické konverzi na thiokyanatan

Vzorek lysatu erythrocytů (LOD 3 μM)

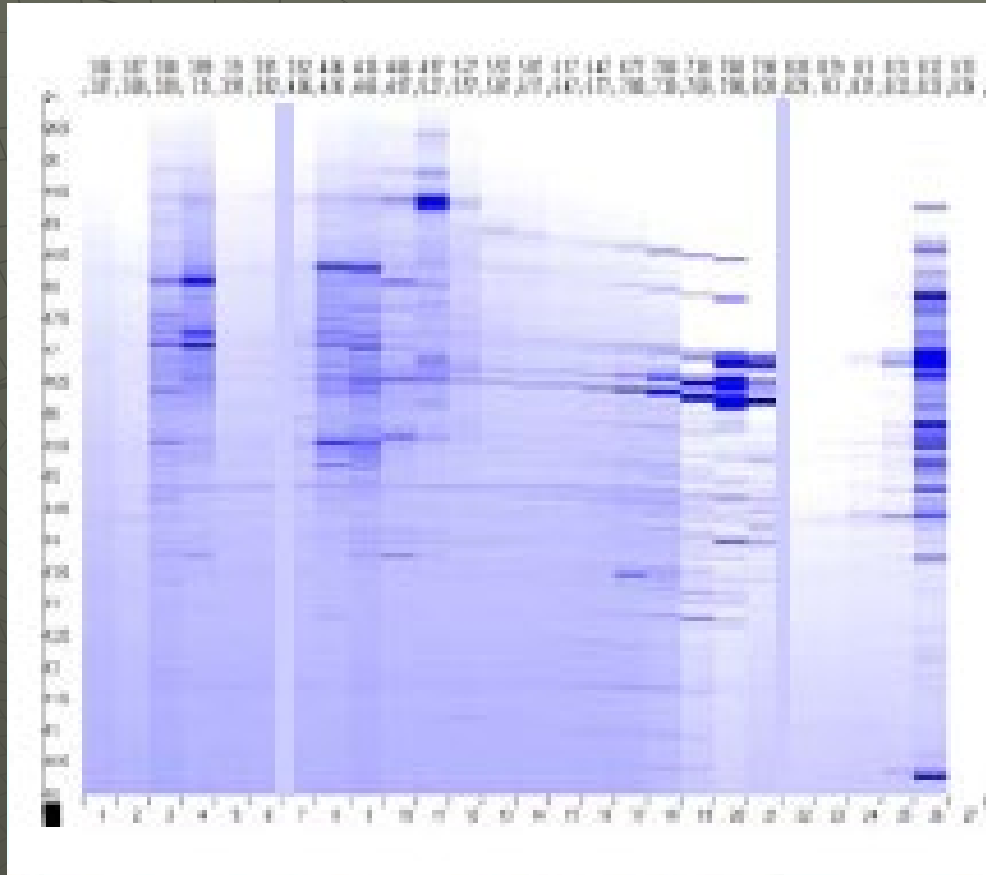




Využití metody EMMA v proteomice ?

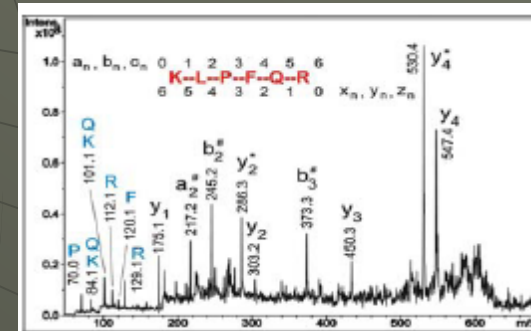
1D, 2D HPLC, CZE, HPLC-CE, CE-HPLC

Vzorek

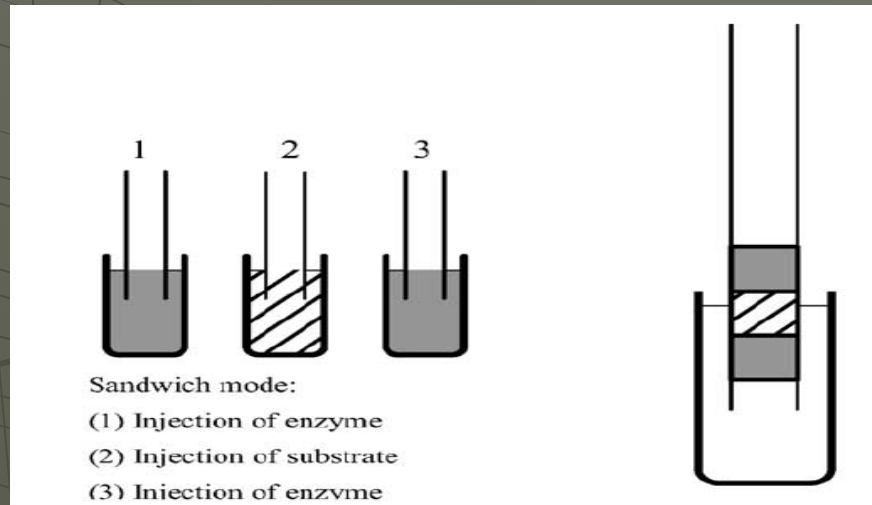


Tryptické štěpení

MS/MS



integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE Dávkovací a separační parametry



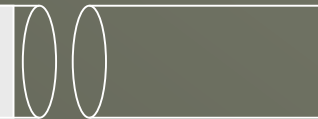
25 mM Tris-HCl
(pH 8,5)

Trypsin ve 25 mM
Tris HCl (pH 8,5)

Protein ve 25 mM
Tris HCl (pH 8,5)

Trypsin ve 25 mM
Tris HCl (pH 8,5)

25 mM Tris-HCl
(pH 8,5)



nástřik
vzorku

Detekce
200 nm

Základní elektrolyt

0,1 M fosfátový pufr pH 2,5
nebo

0,1 M mravenčanový pufr pH 2,5

Separační napětí

18 kV (negativní polarita)

integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE

Optimalizace

β -kasein, cytochrom c

Teplota kapiláry

↓
35 °C

Množství trypsinu

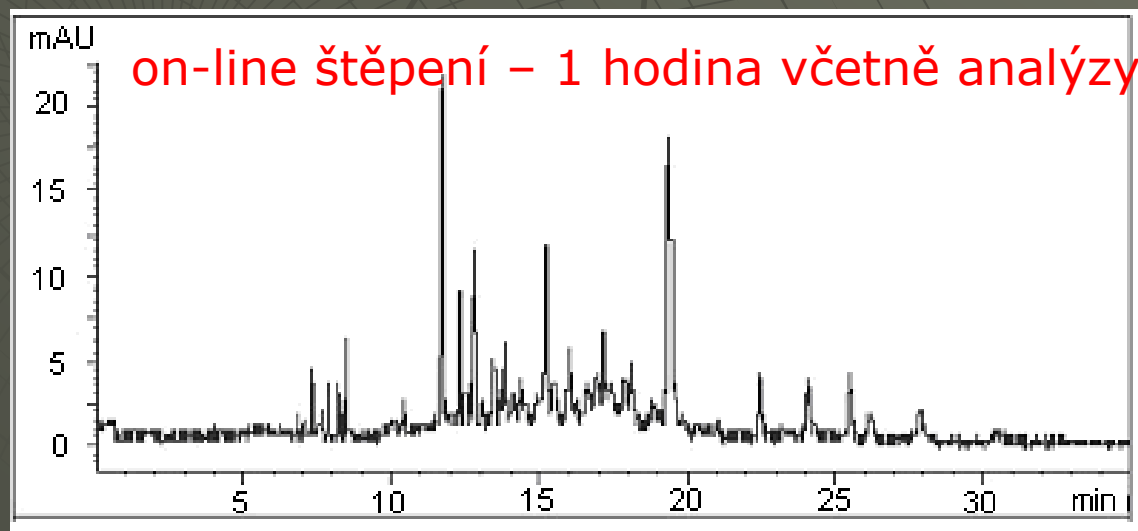
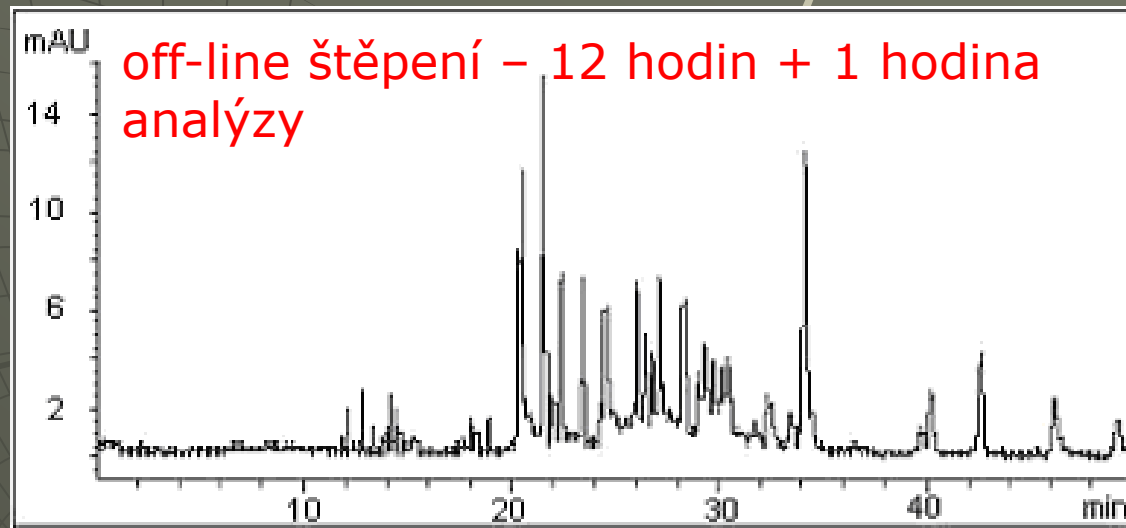
↓
0,1 mg/ml

„Zero potential amplification“

↓
0 s

integrace „on-line“ tryptického štěpení do CE

modelová bílkovina - cytochrom c



EMMA – využití

➤ Enzymové systémy

- *Aktivita enzymů*
- *Koncentrace substrátů a inhibitorů*
- *Michaelisovy a inhibiční konstanty*

➤ Neenzymové systémy

- *GSH, HCys, Cys, DTT*
- *AMK*
- Ca(II)
- Gentamycin a kanamycin
- Kreatin
- Cr(VI) a Co(II)

The background features a faint, light-colored grid pattern that resembles a globe or a technical drawing. The grid consists of concentric circles and radial lines, creating a spherical effect. The text is centered over this pattern.

Využití metody CE při studiu metabolismu léčiv

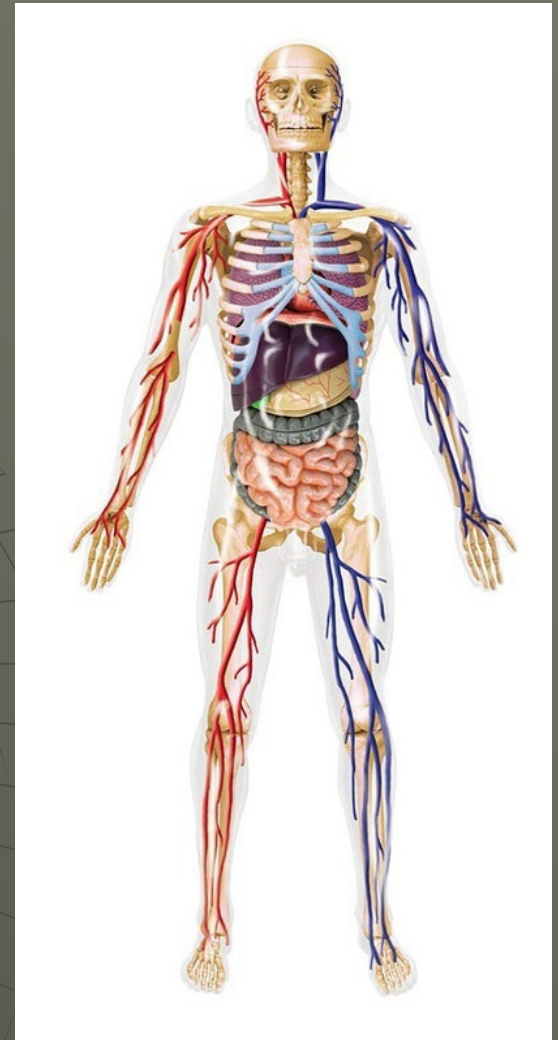
Vývoj léčiv



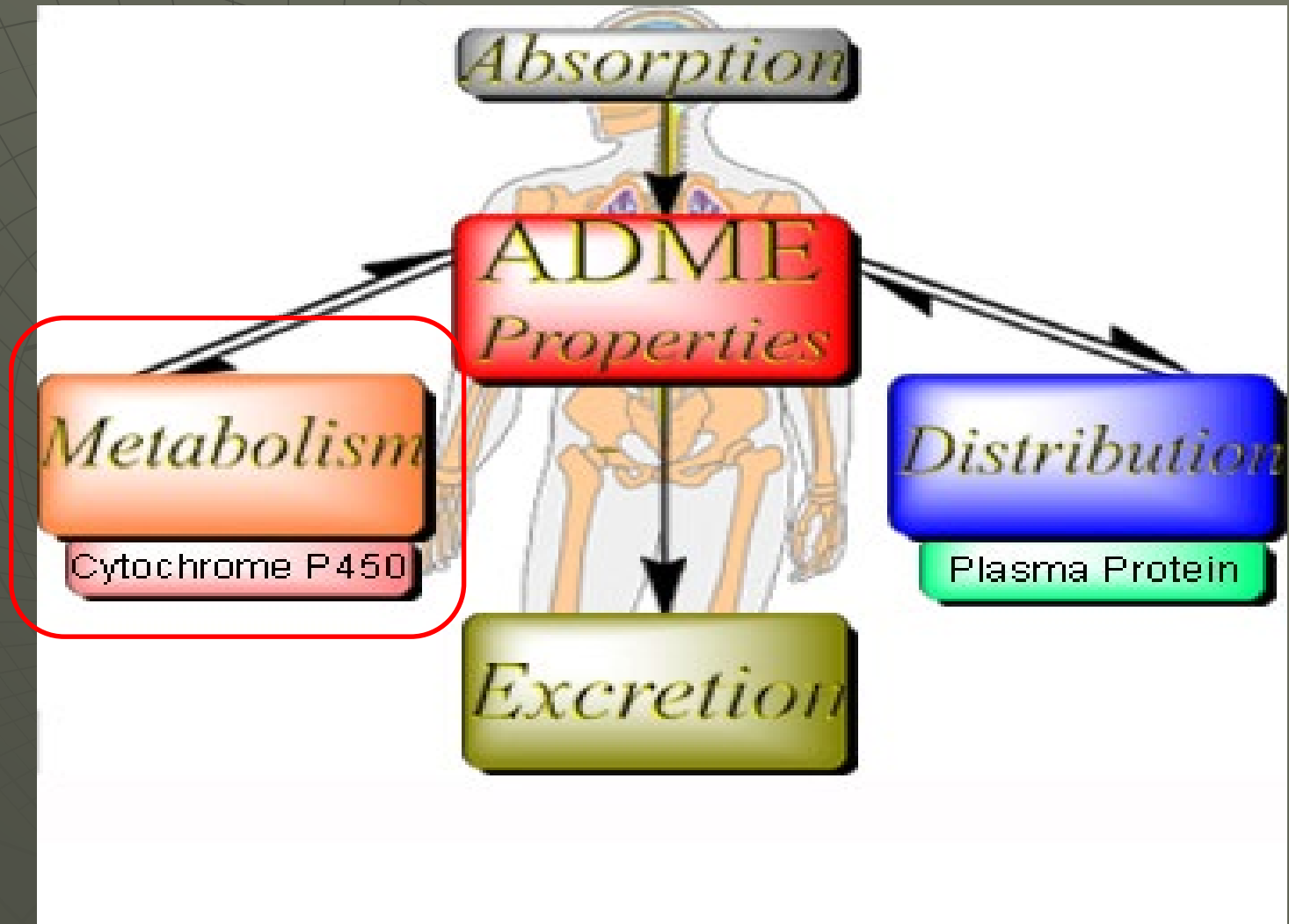
Farmakodynamika



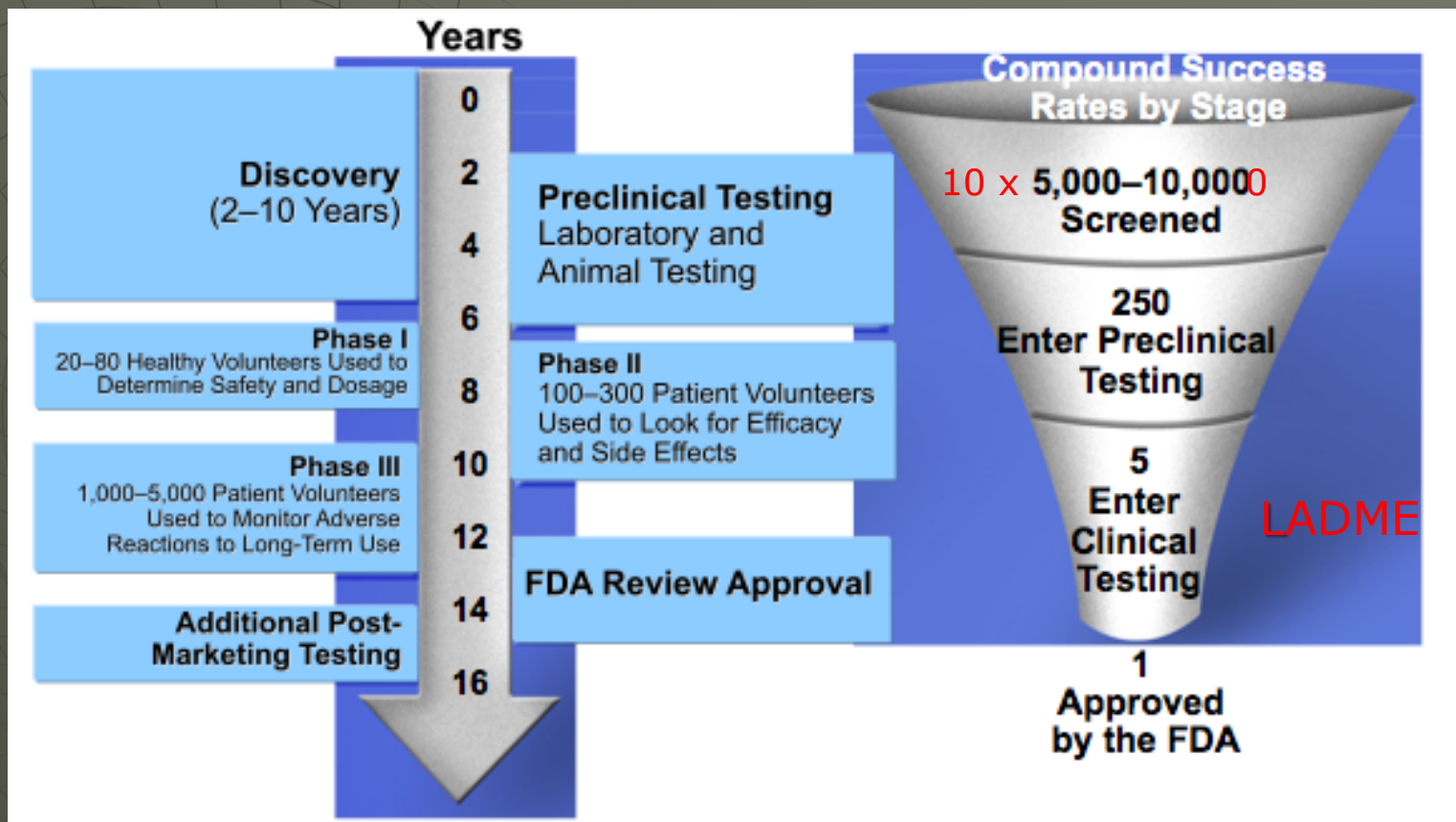
Farmakokinetika



Vývoj nového léčiva - LADME



Vývoj nového léčiva



high-throughput screening

Cytochromy P450 (CYP)



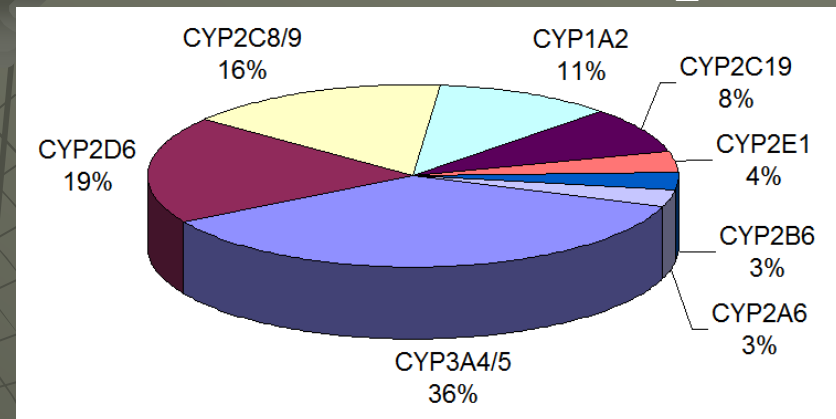
Homo sapiens

50 různých CYP izoforem

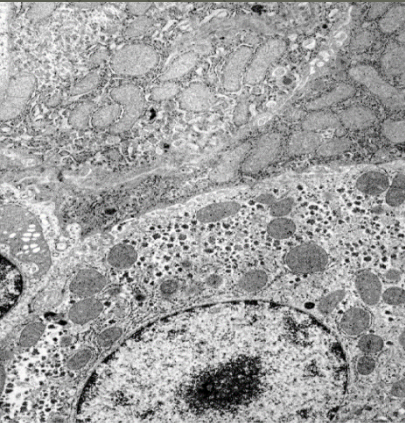
podíl na metabolismu 80 % známých léčiv



Jaterní plátky, hepatocyty, mikrosomy, rekombinantní enzymy



Lidské jaterní mikrosomy



Hepatocyt



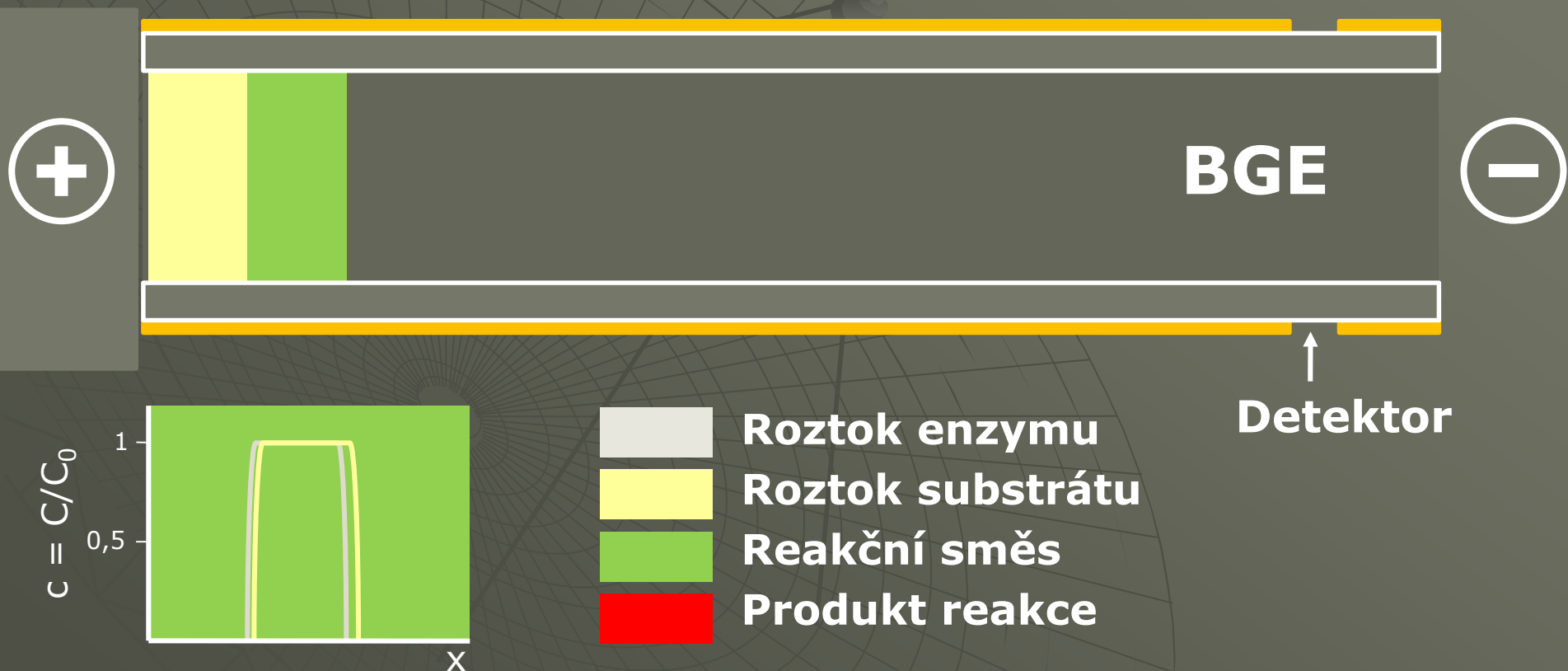
Lidské jaterní mikrosomy

= Malé vezikuly získané z endoplazmatického retikula homogenizované jaterní tkáně

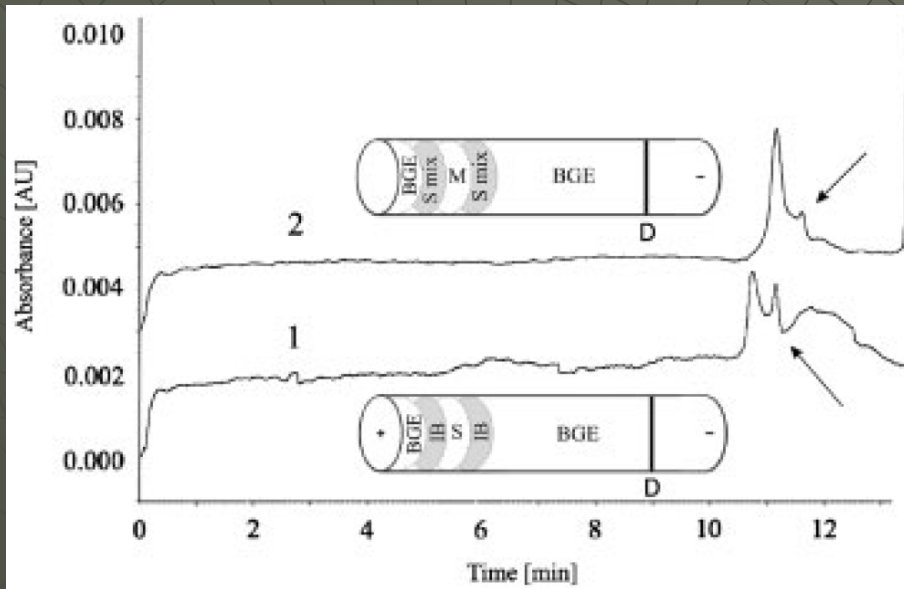
- + vysoká koncentrace CYP
- + zastoupení všech isoform CYP
- + vysoká enzymová aktivita
- + jednoduchá příprava a použití
- + vysoká stability při skladování a inkubaci



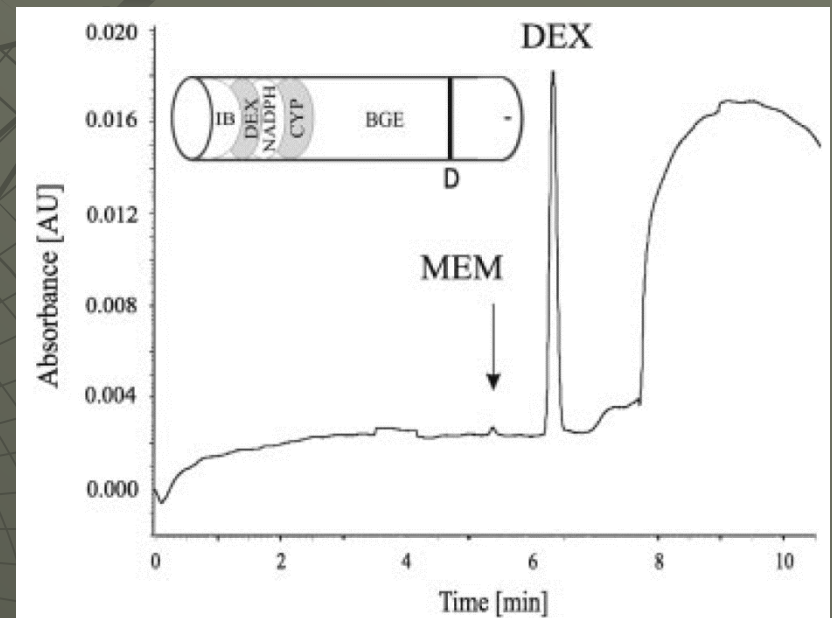
EMMA – CYP3A4 + dextrometorfan



EMMA – CYP3A4 + dextrometorfan



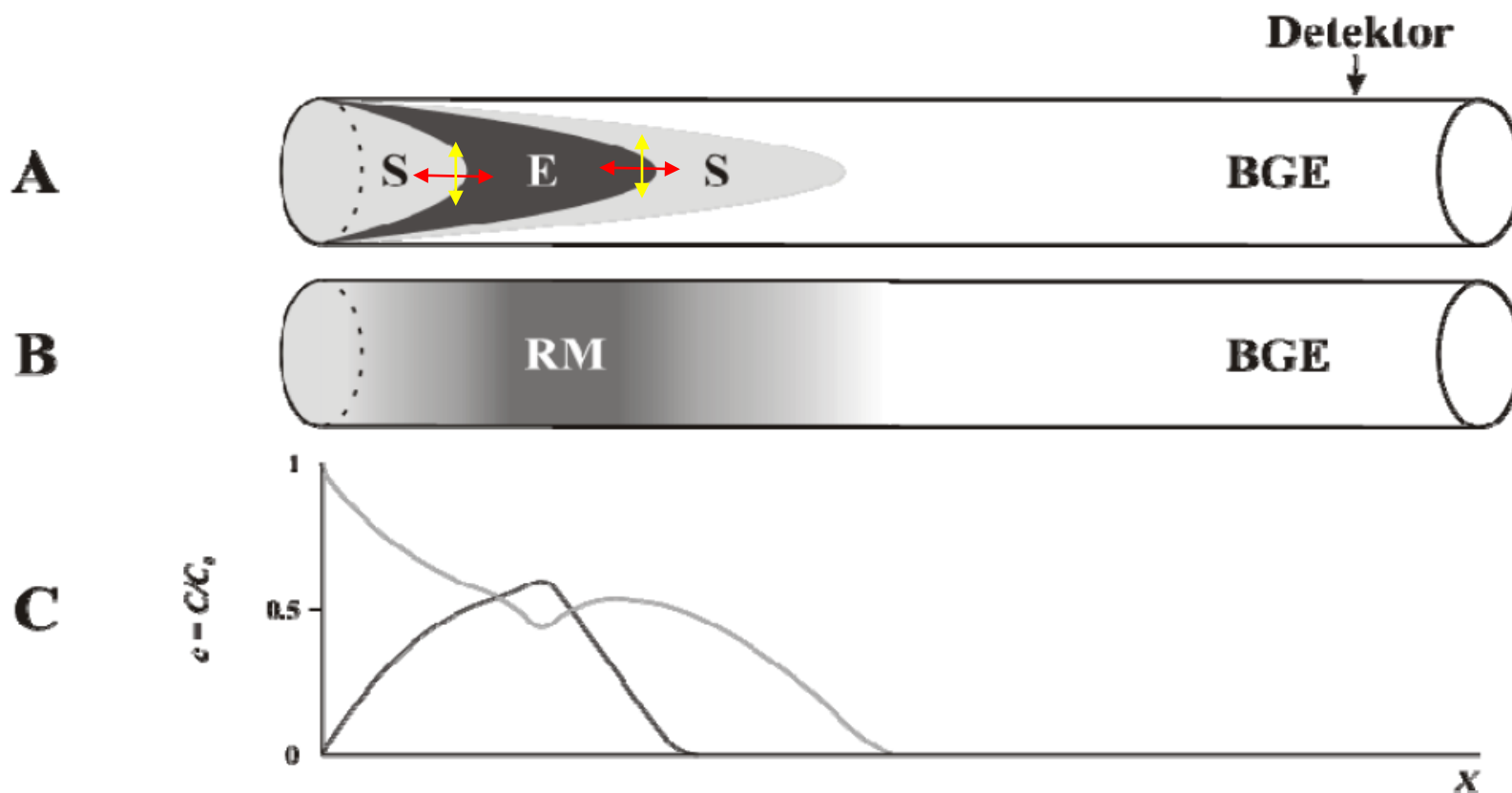
HLM



CYP3A4

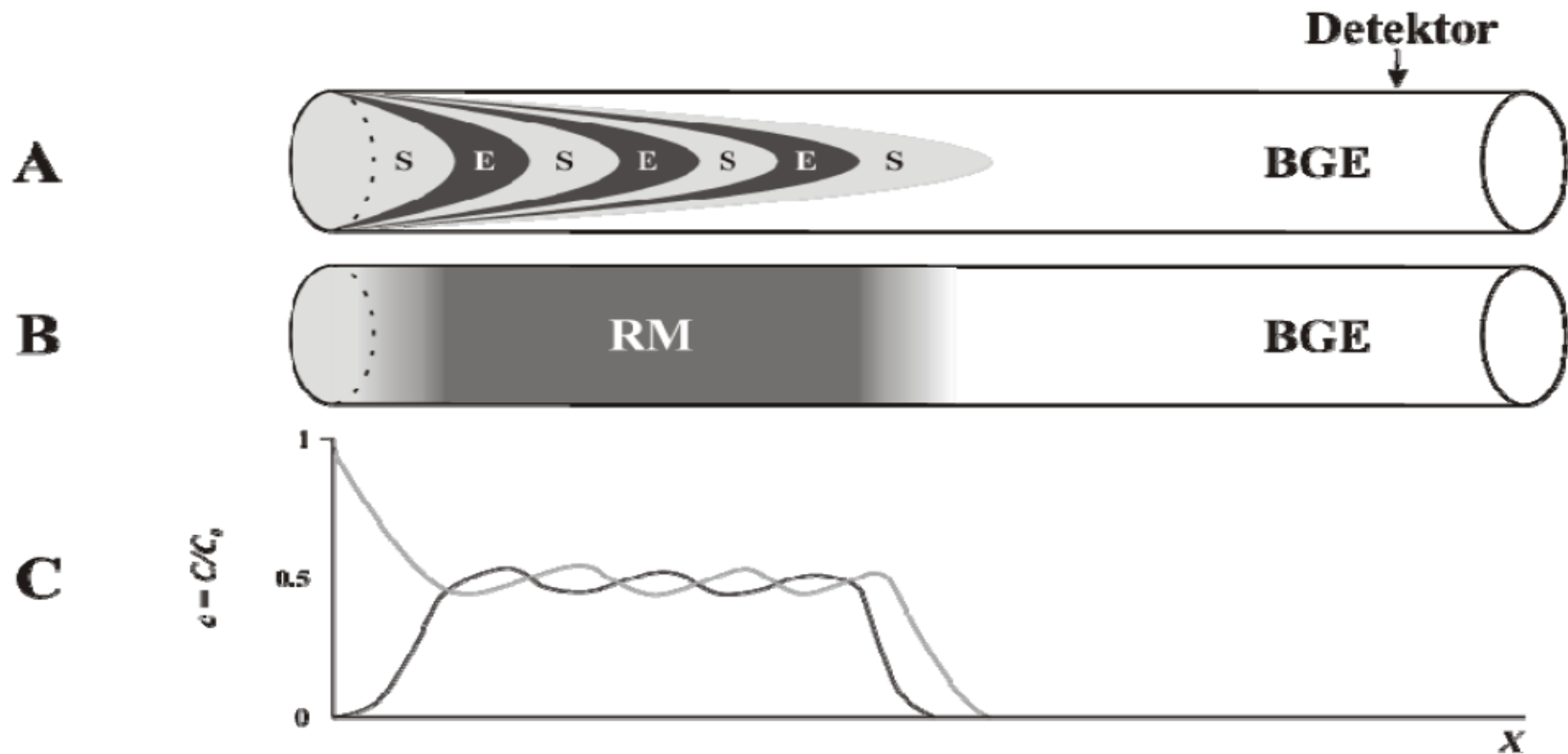
Míchání difuzí

TDLFP = **T**ransverse **D**iffusion of **L**aminar **F**low **P**rofiles



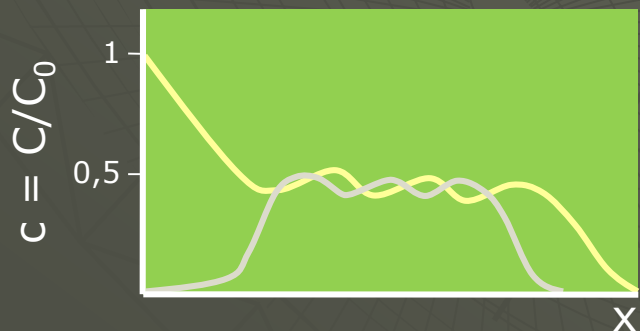
Míchání difuzí

TDLFP = **T**ransverse **D**iffusion of
Laminar **F**low **P**rofiles



R. Řemínek, M. Zeisbergerová, M. Langmajerová, Z. Glatz, *Electrophoresis*, 34 (2013) 2705.

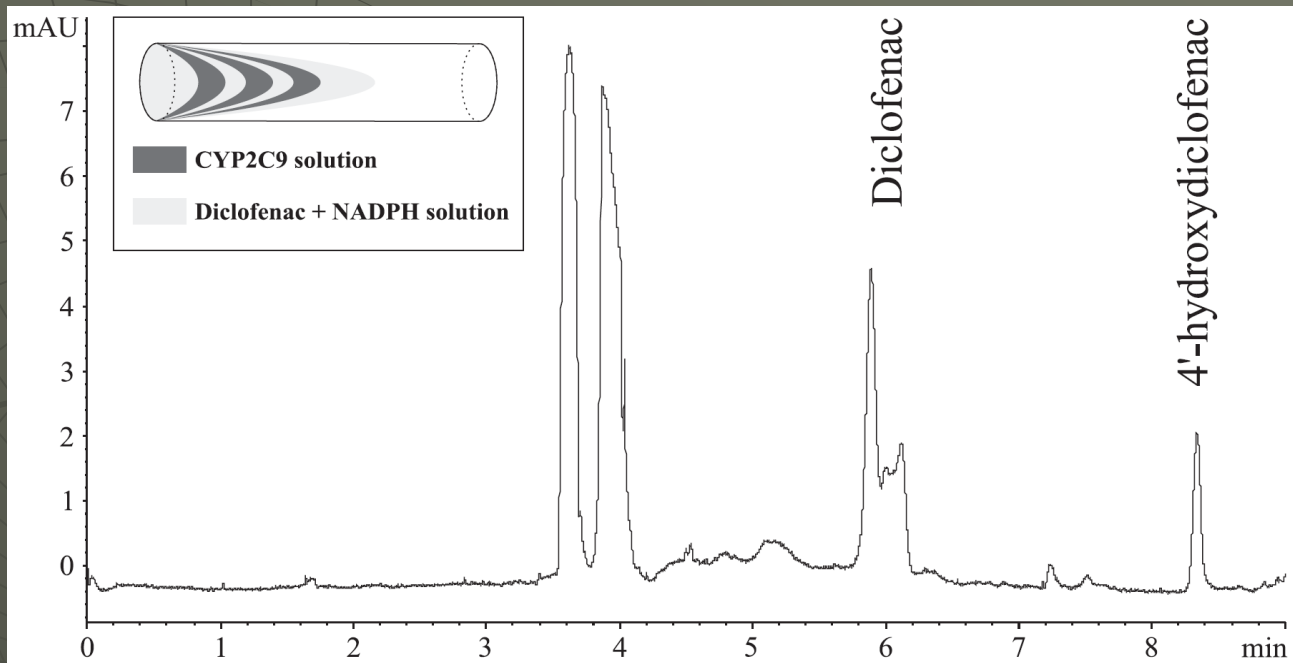
Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



- Roztok enzymu
- Roztok substrátu
- Reakční směs
- Produkt reakce

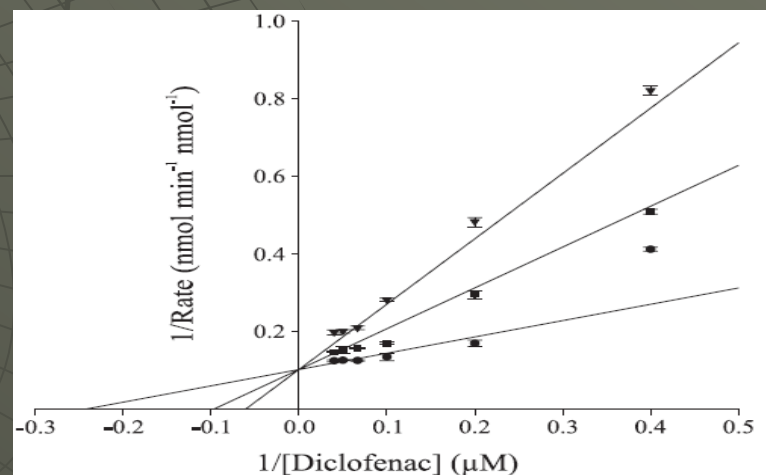
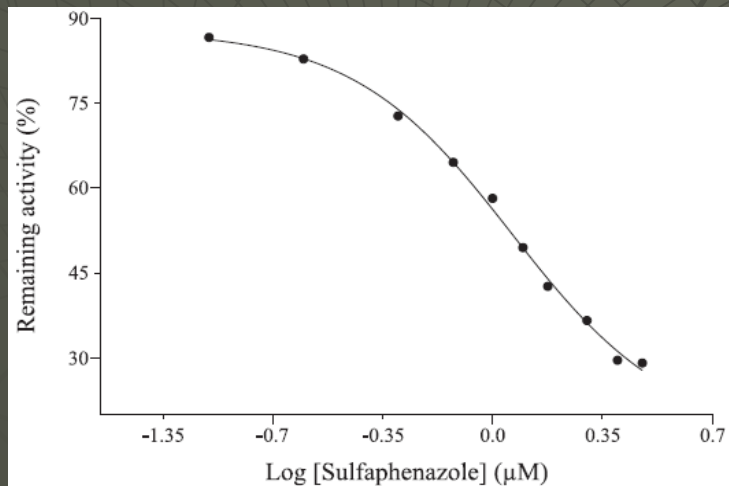
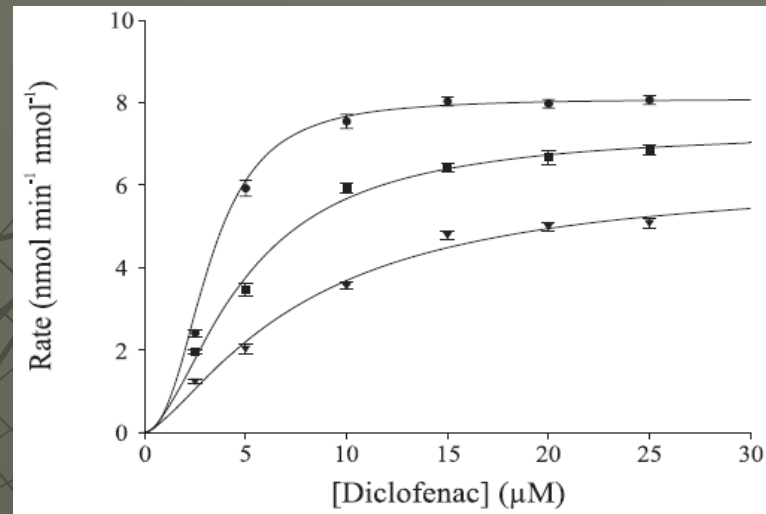
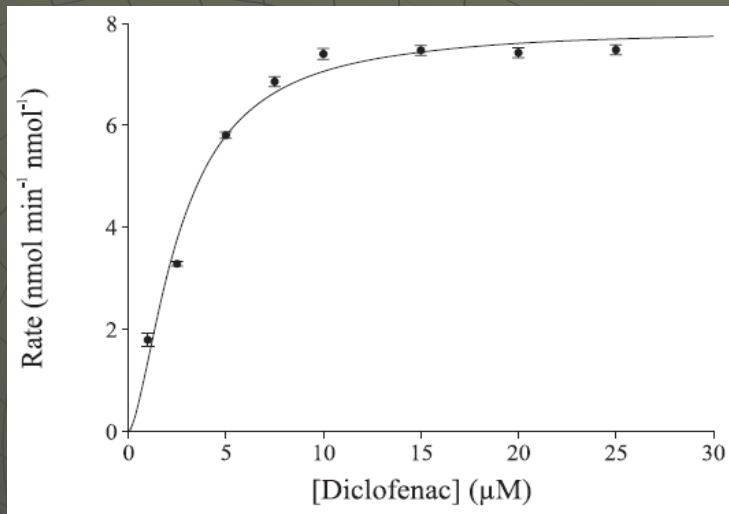
Detektor

Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



R. Řemínek, M. Zeisbergerová, M. Langmajerová, Z. Glatz, Electrophoresis, 34 (2013) 2705.

Míchání difuzí – CYP2C9 + diclofenac



$K_m = 2,66 \pm 0,18 \mu\text{M}$; $V_{max} = 7,91 \pm 0,22 \text{ nmol/min/nmol}$; $n = 1,59 \pm 0,16$;
 $IC_{50} = 0,94 \pm 0,04 \mu\text{M}$; $K_i = 0,39 \pm 0,07 \mu\text{M}$

Kombinace TDLP s MS detekcí

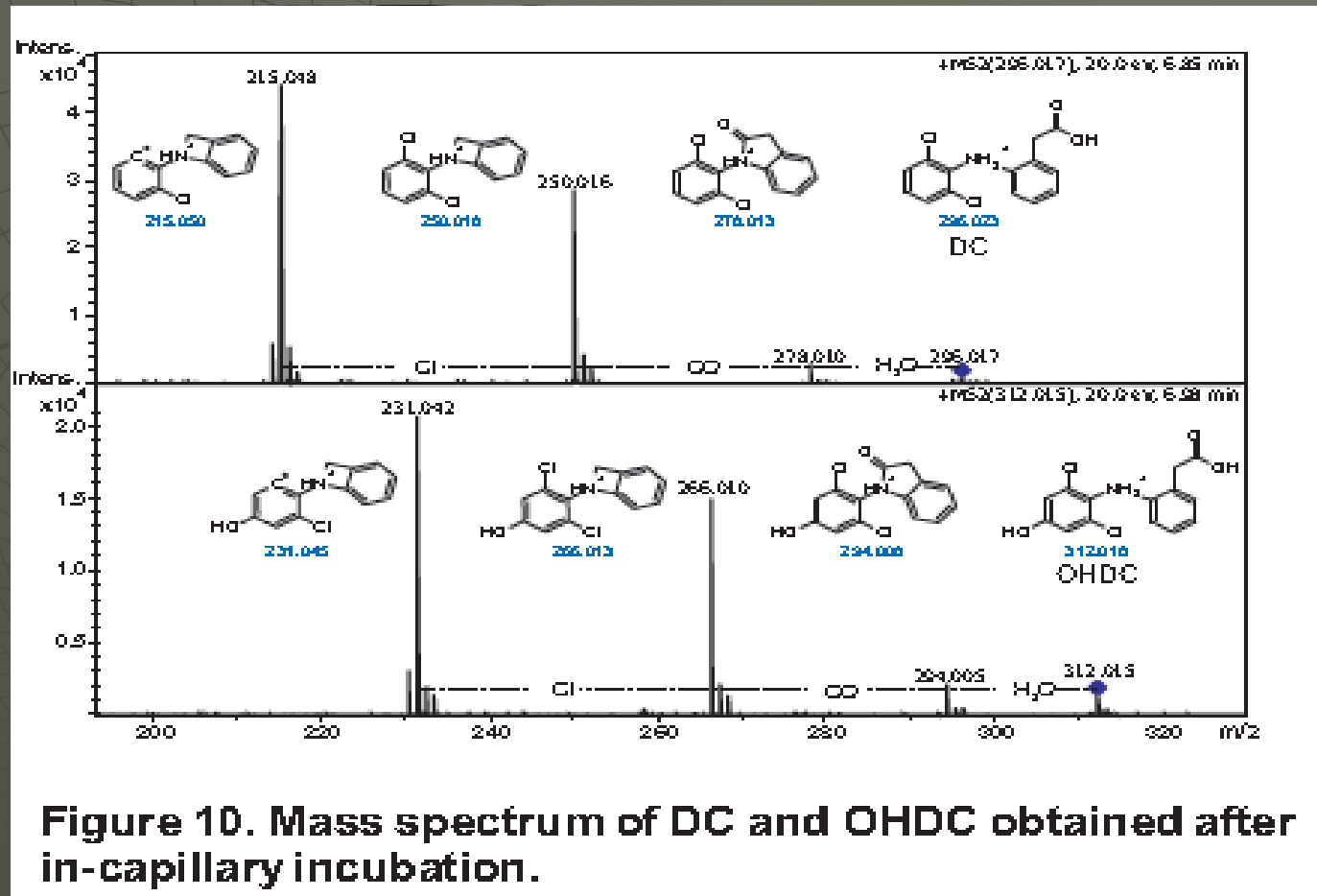


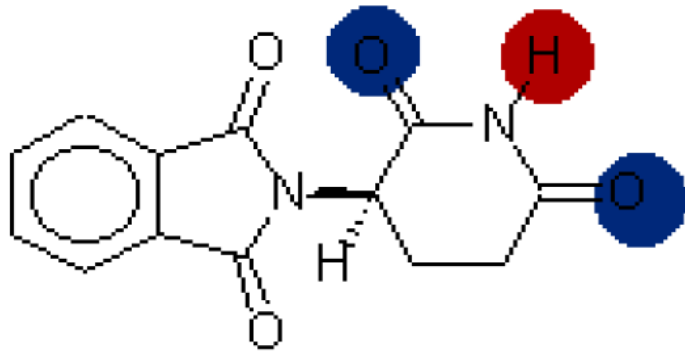
Figure 10. Mass spectrum of DC and OHDC obtained after in-capillary incubation.

Langmajerová, M., Řemínek, R. Pelcová, M., Foret, F. a Glatz, Z. Electrophoresis. 2015, 36, , s. 1365-1373.

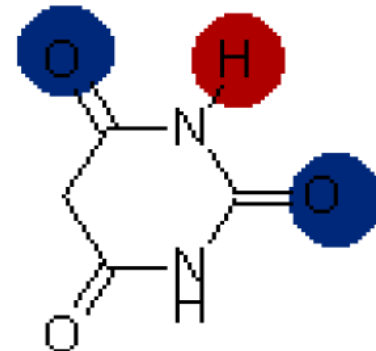


Chiralita – chirální separace ?
pomocí CE

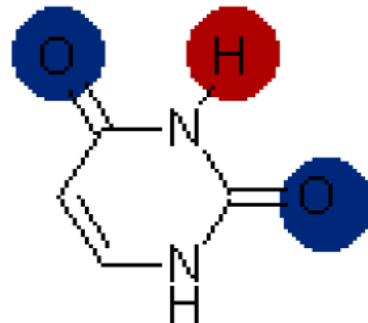
Thalidomid



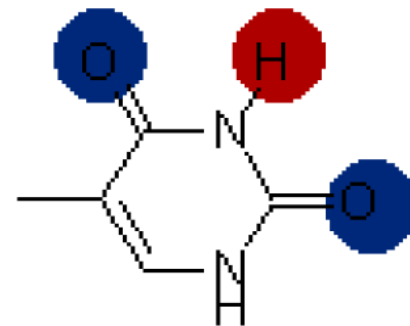
Thalidomid



Barbitursäure

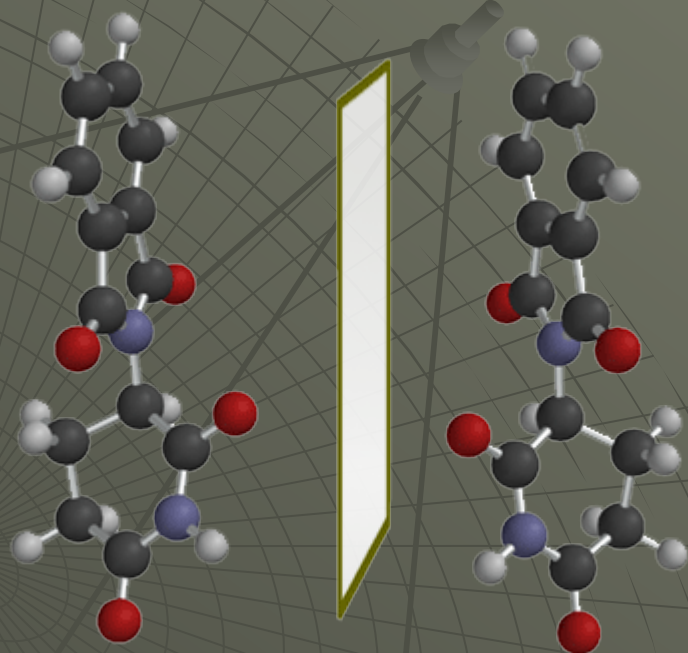


Uracil



Thymin

Thalidomid



(R)-(+)-Thalidomide

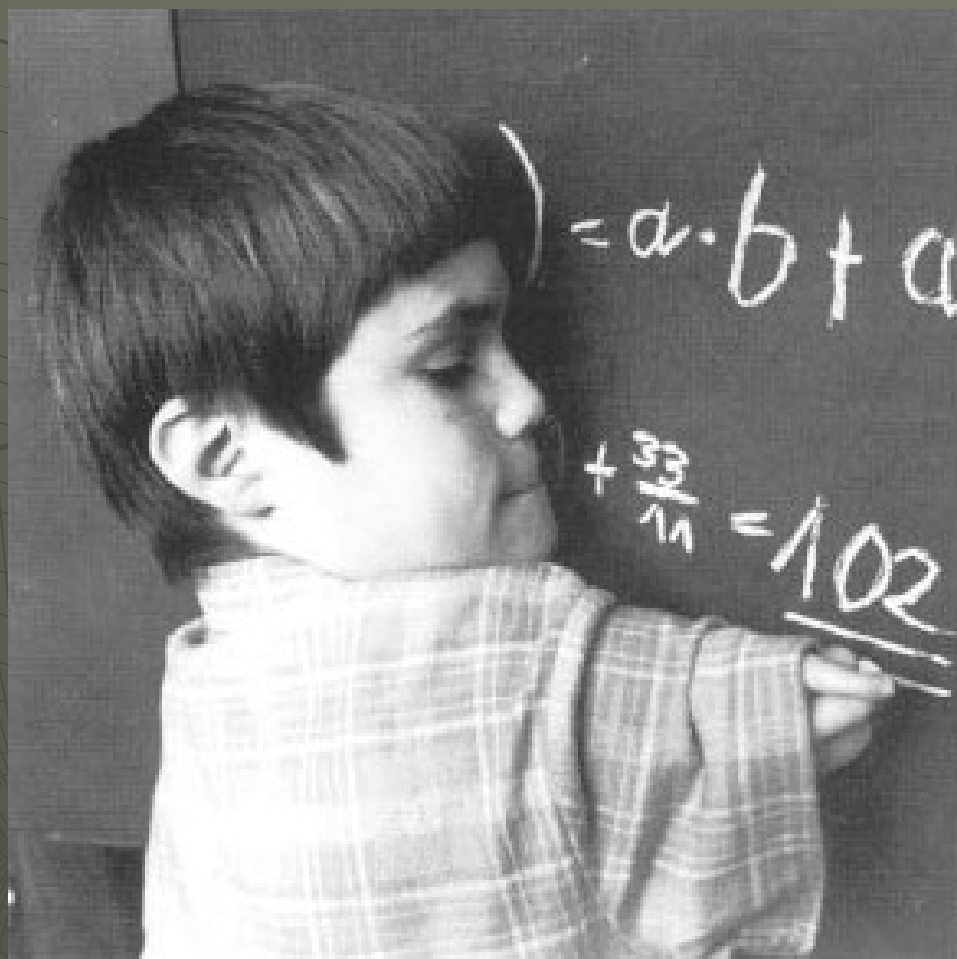
(S)-(-)-Thalidomide

Léčivo

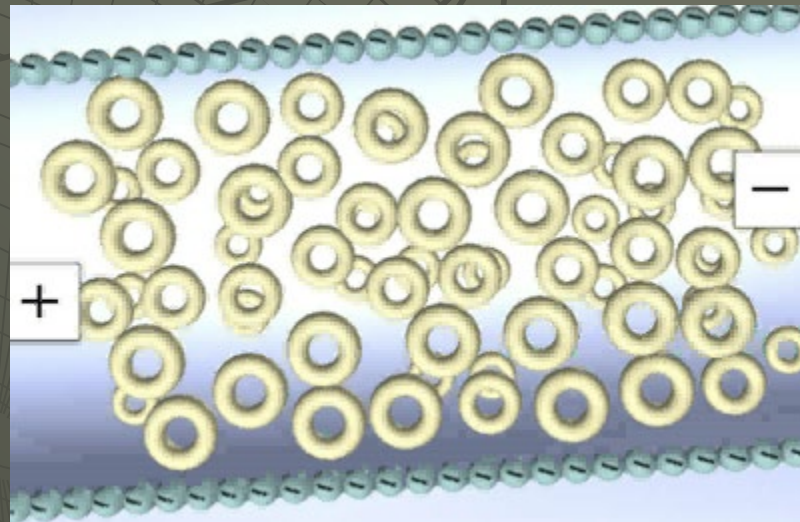
Teratogen

Thalidomid

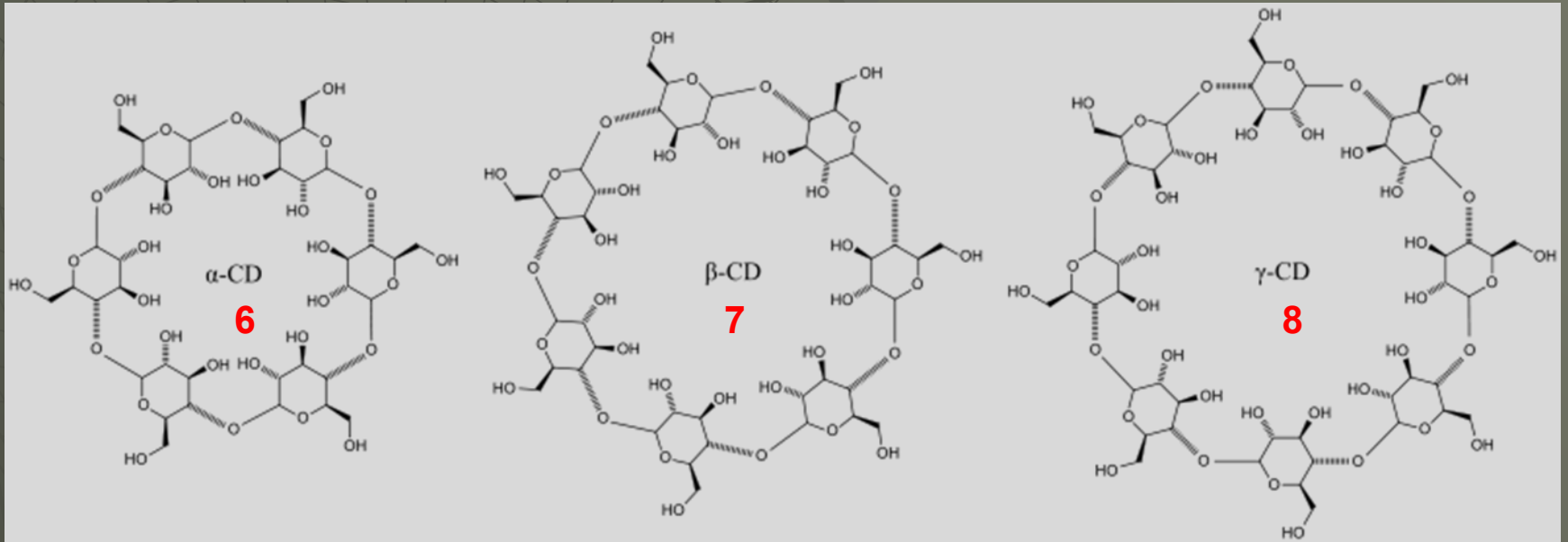




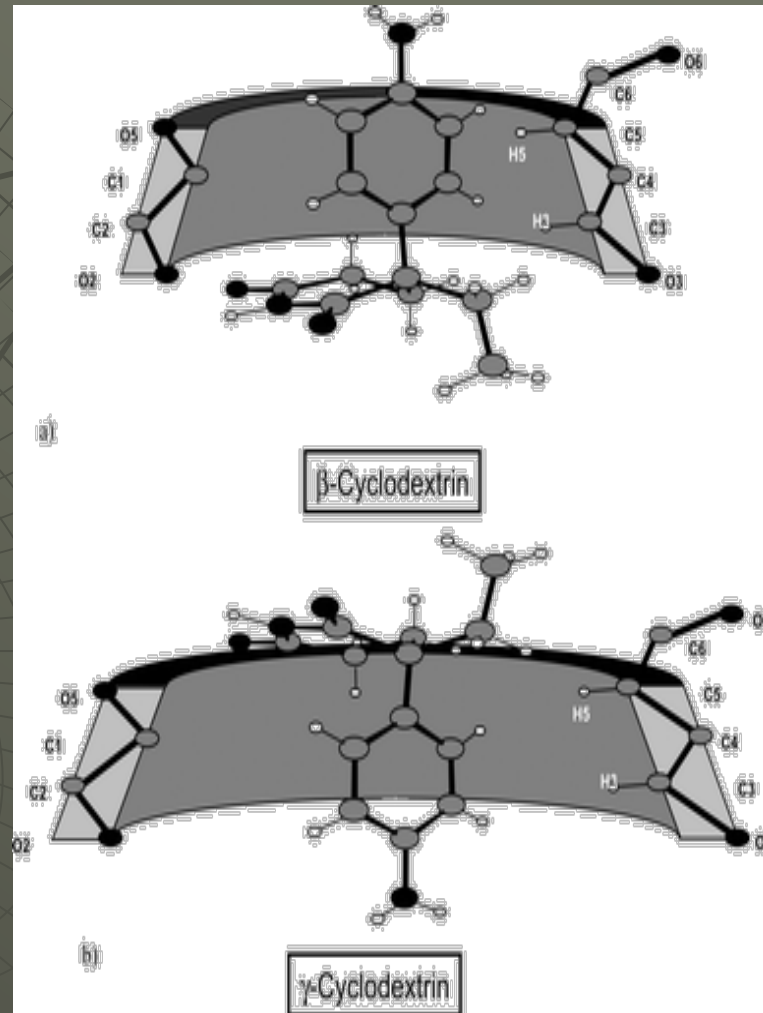
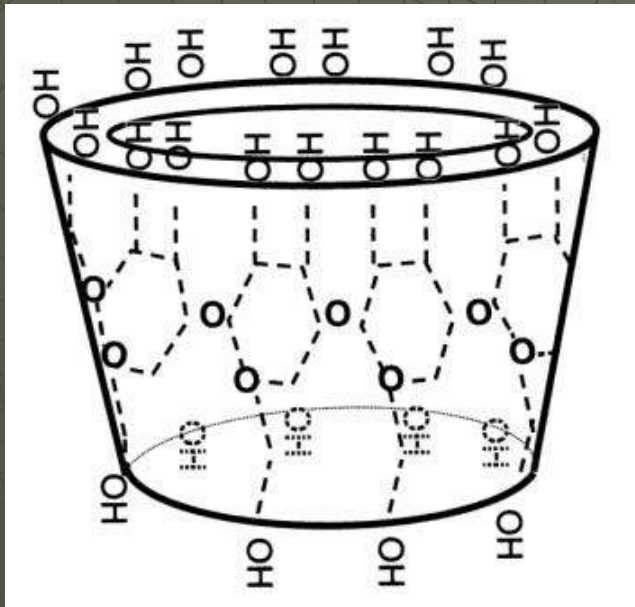
Chirální separace



Cyklodextriny

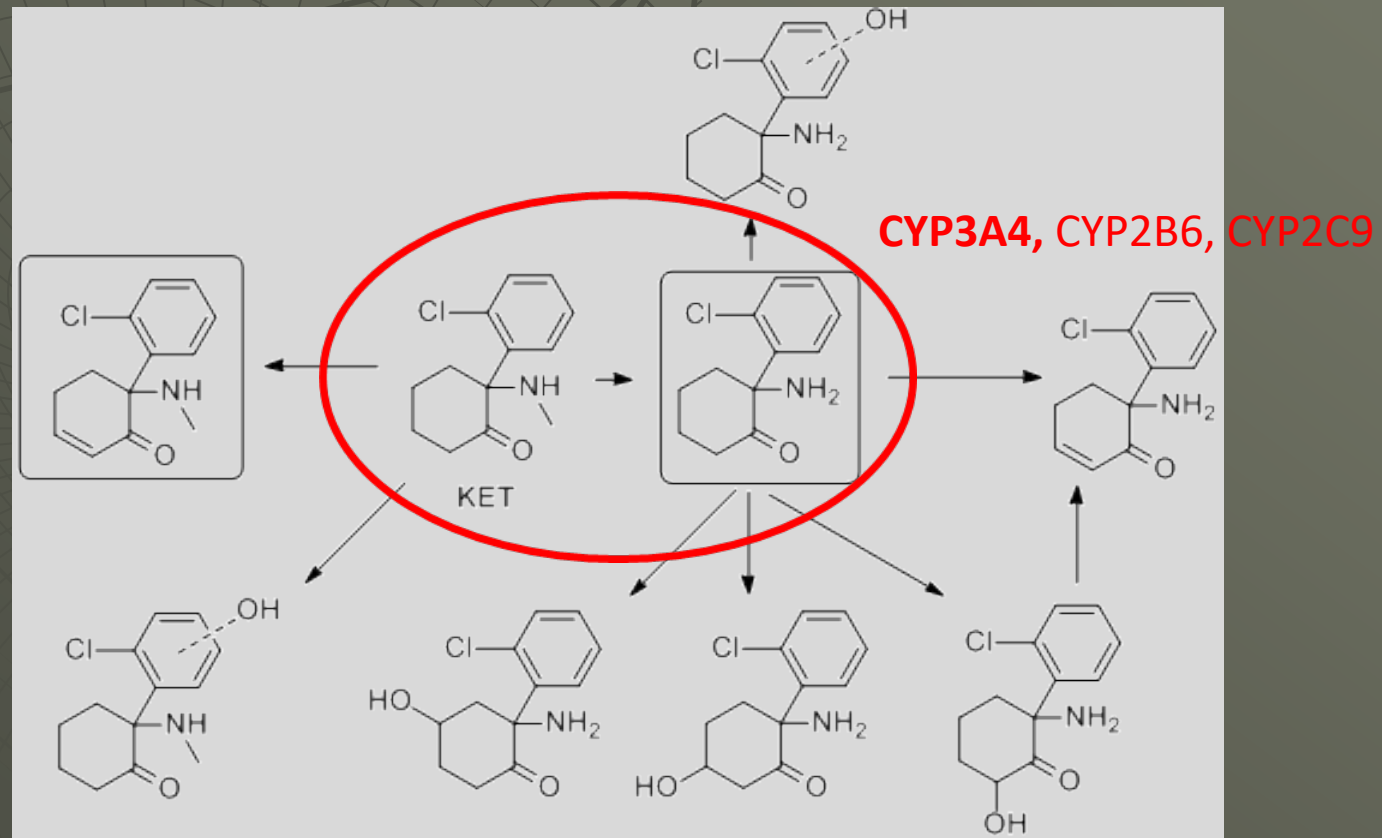


Cyklodextriny

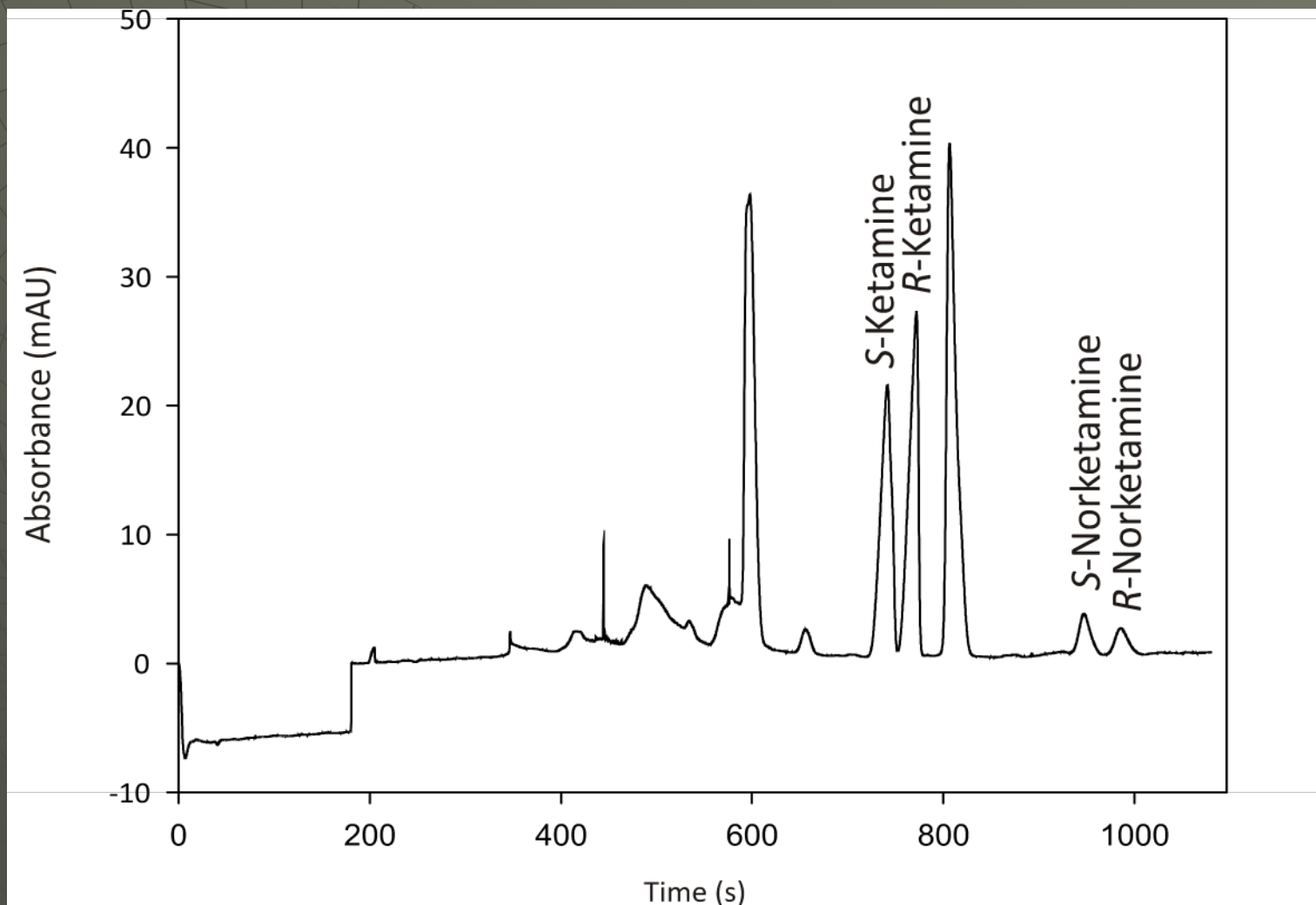


Ketamin

anestetikum a analgetikum v humánní a veterinární medicíně

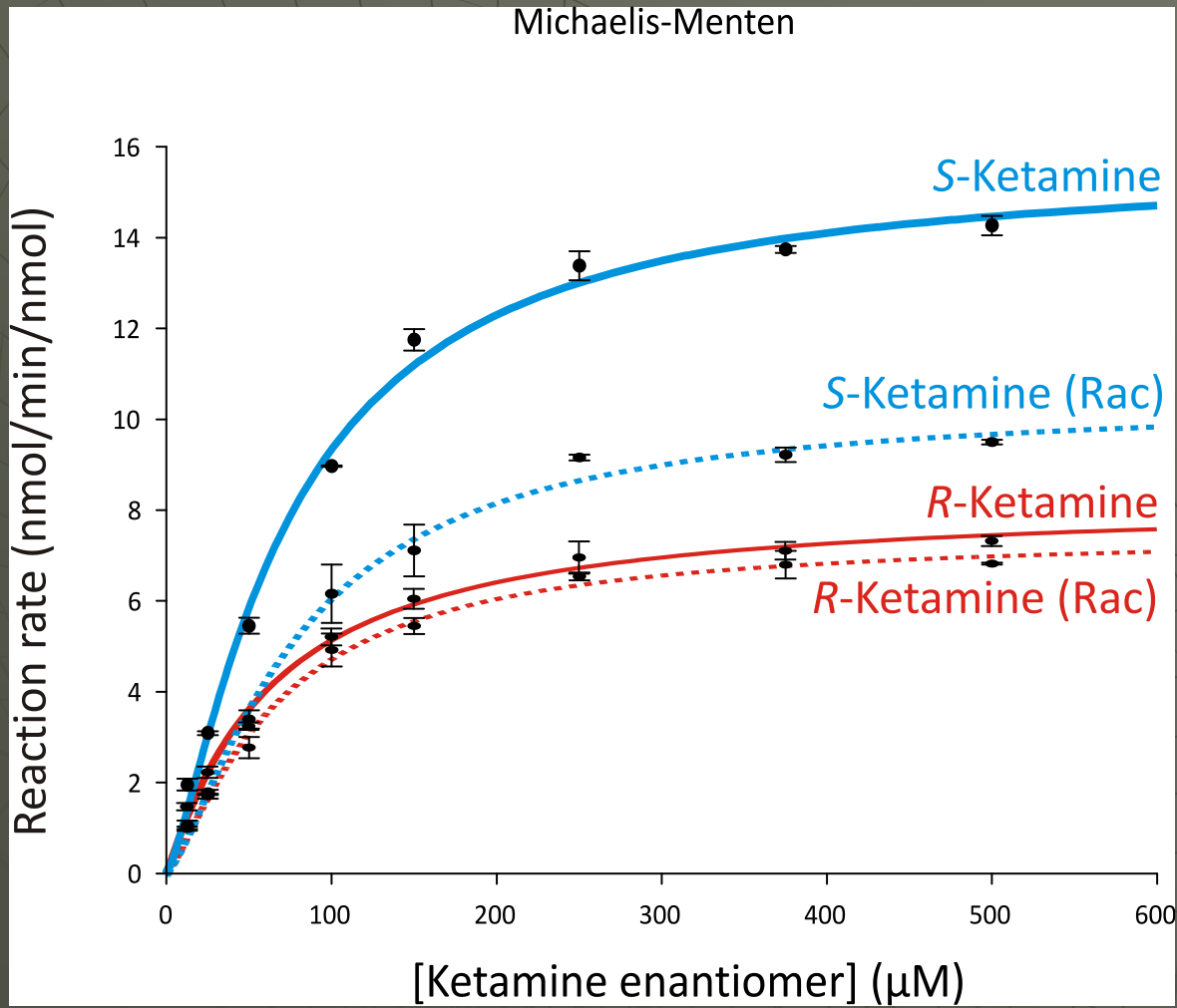


TDLFP ketaminu



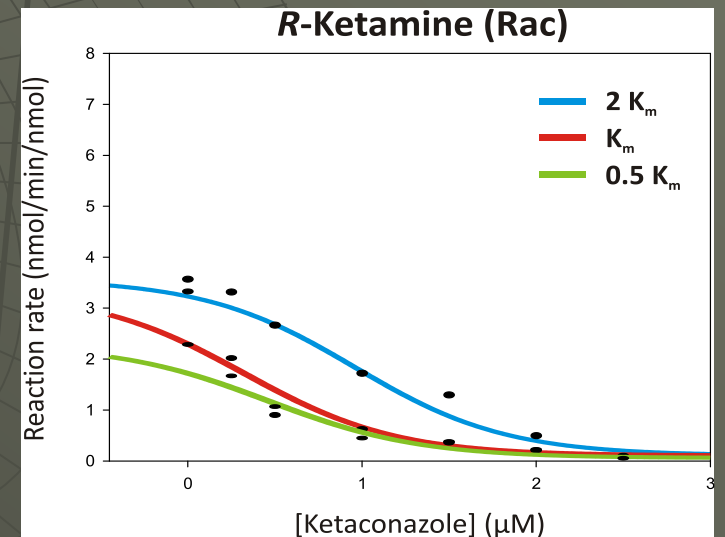
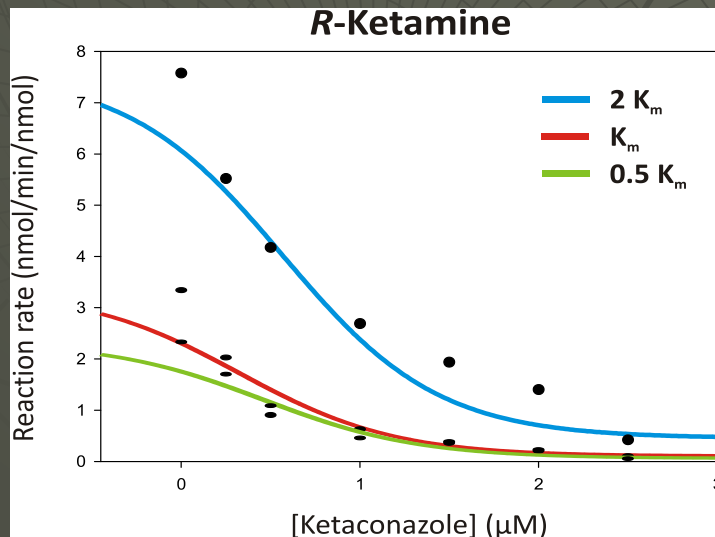
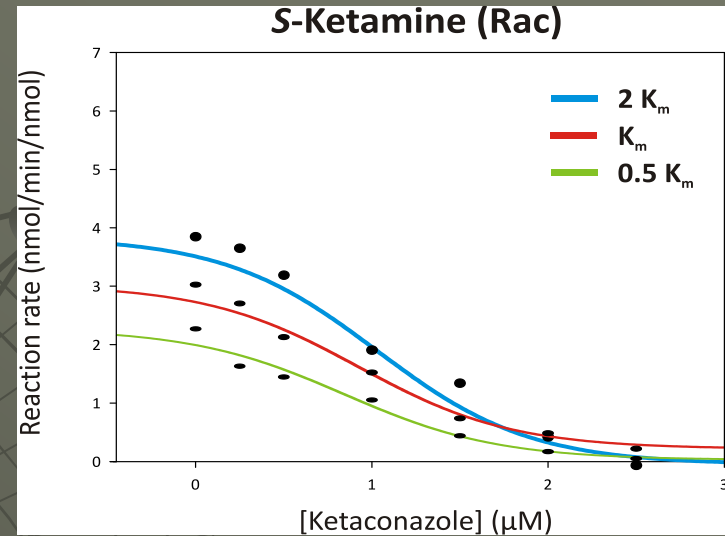
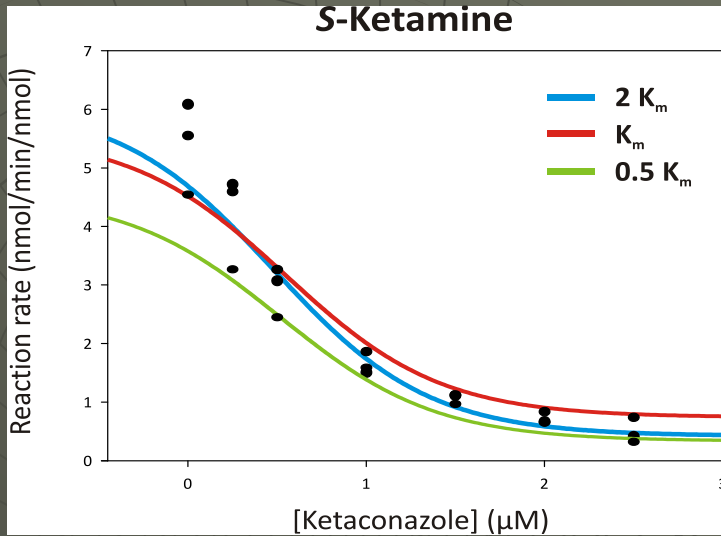
50 mM TRIS-fosfátový pufr (pH 2.5) obsahující
3 % (w/v) vysoce sulfatovaný γ -cyclodextrin

Kinetická studie



K_M (μM)	V_{max} (nmol/min/nmol)
74.22 ± 5.75	15.66 ± 0.52
79.54 ± 8.49	10.13 ± 0.48
62.91 ± 8.02	8.18 ± 0.40
66.45 ± 6.62	7.47 ± 0.31

Inhibiční studie



EMMA versus TDLFP

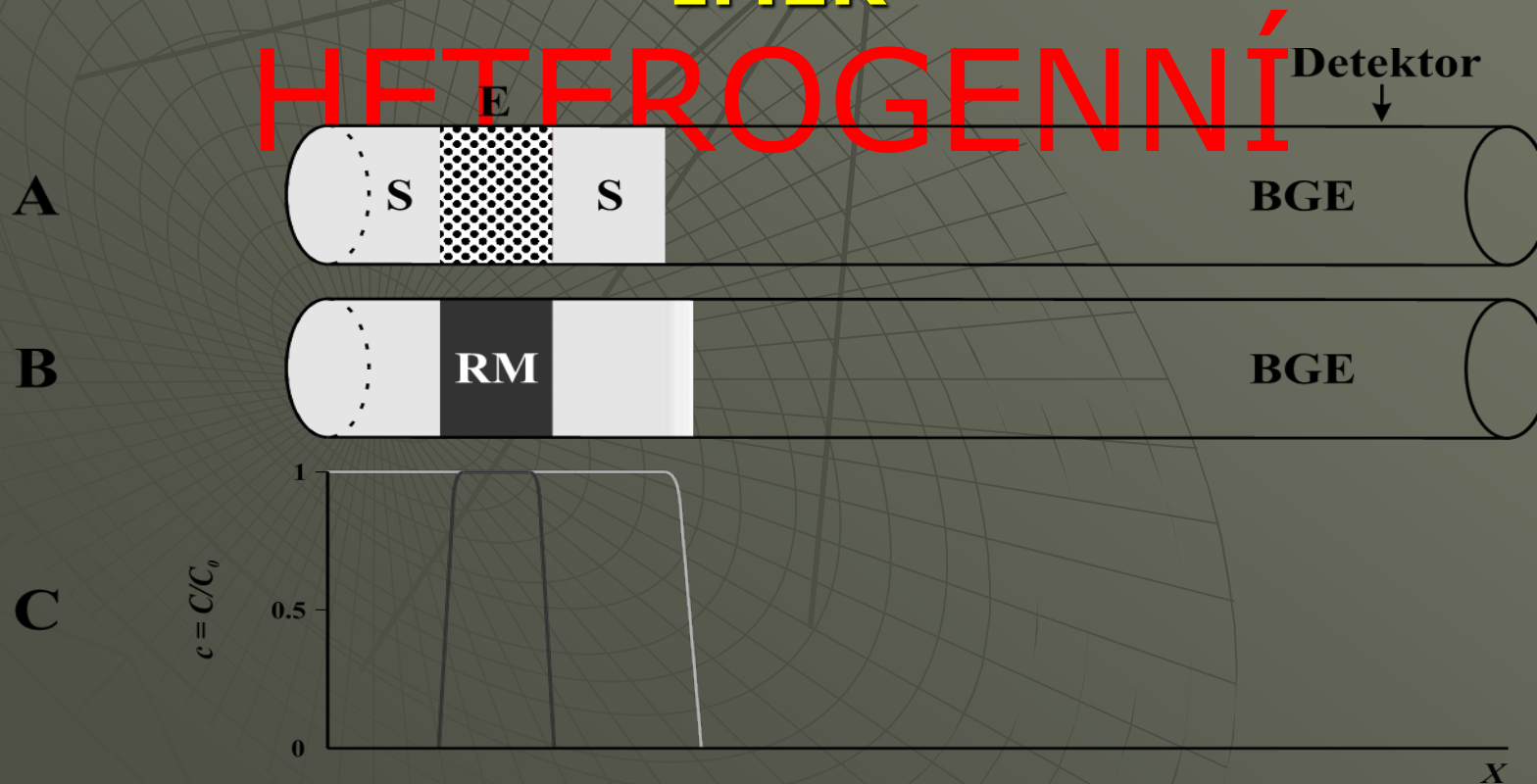
- ◆ EMMA + homogenní reakční směs
 - nutné optimalizovat
- ◆ TDLFP + universálnost
 - homogenita ???

Studium enzymových reakcí pomocí CE

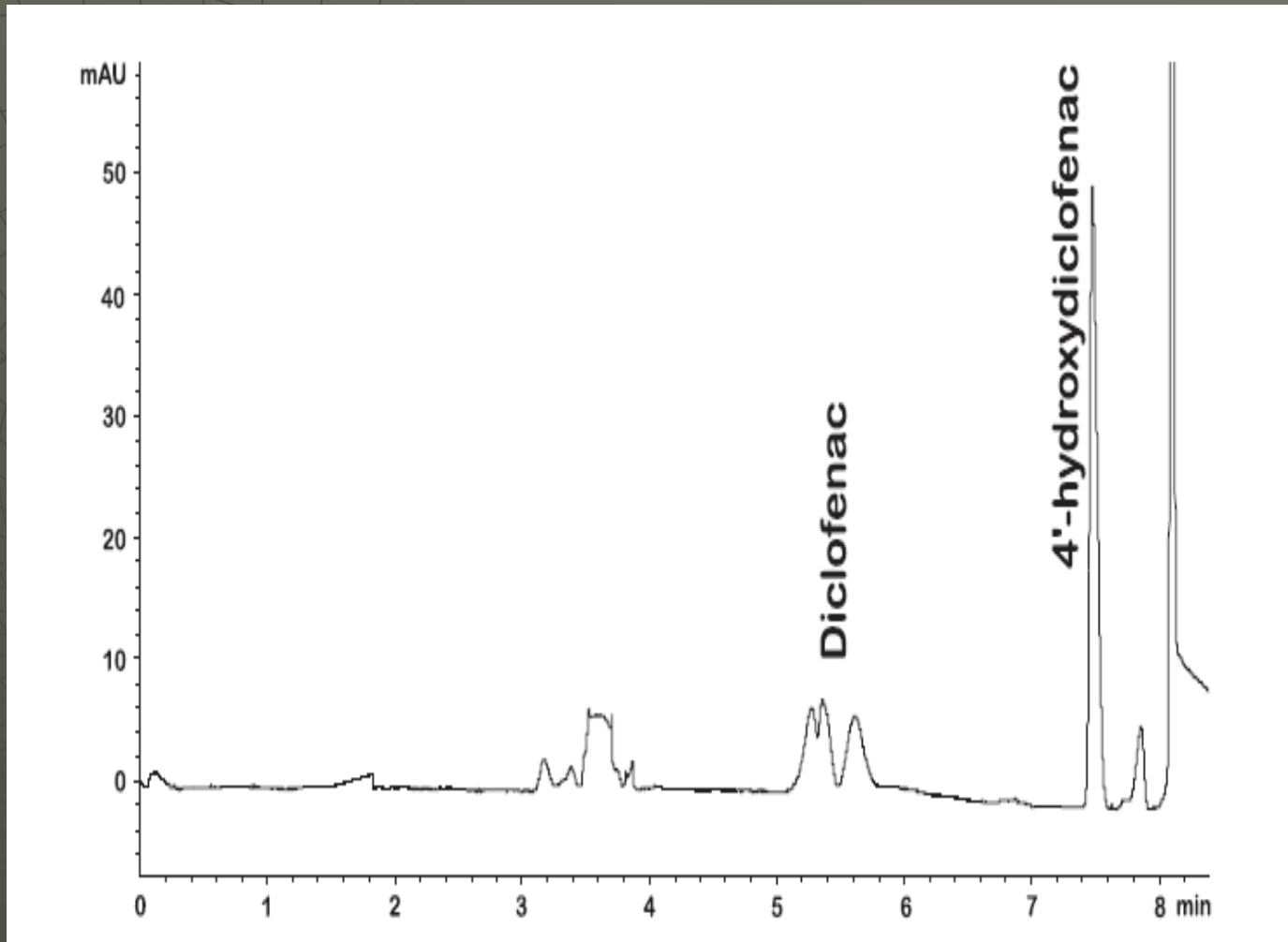
Enzymový reaktor

IMER

HETEROGENNÍ

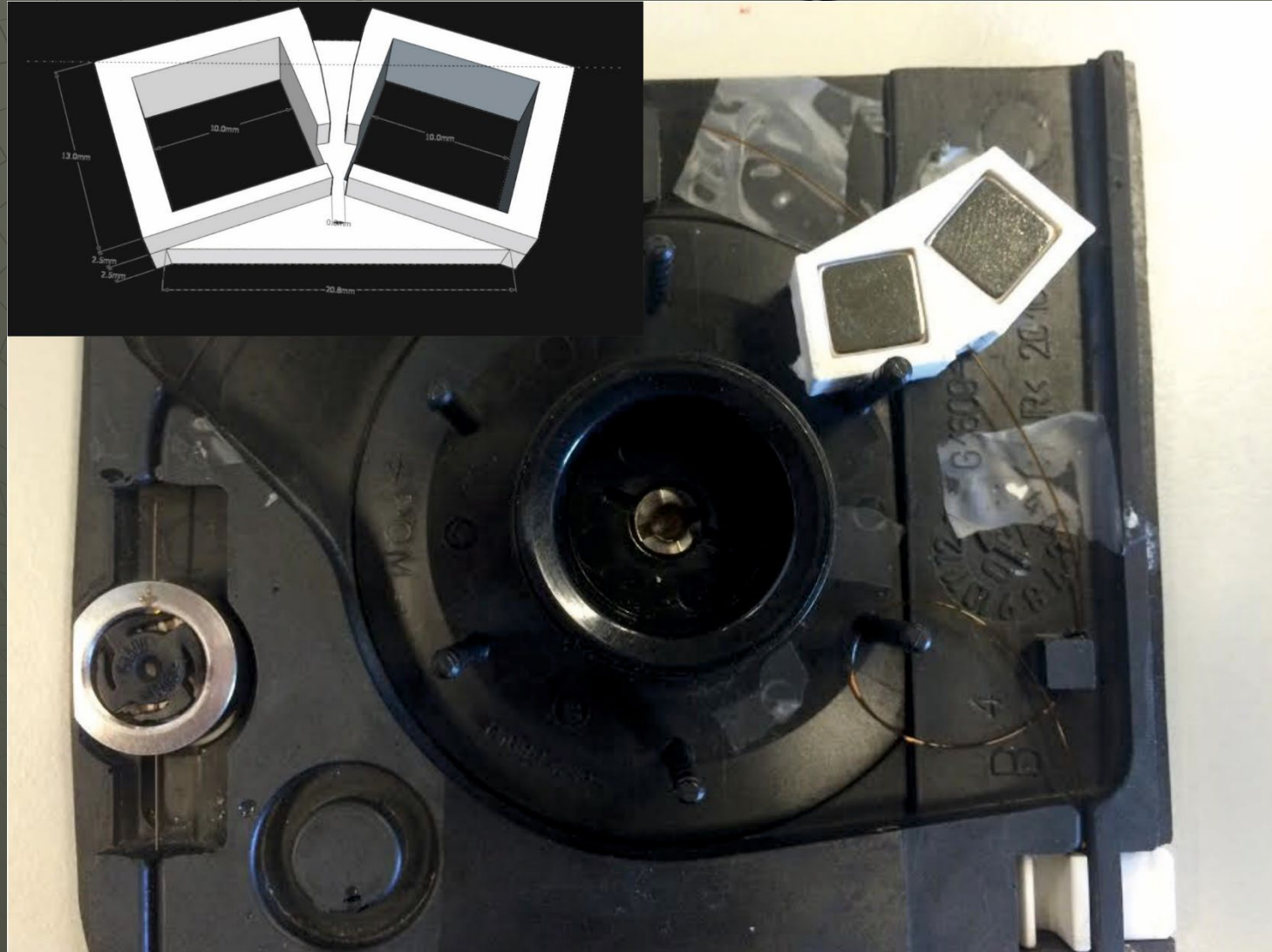


CYP 2CD IMER



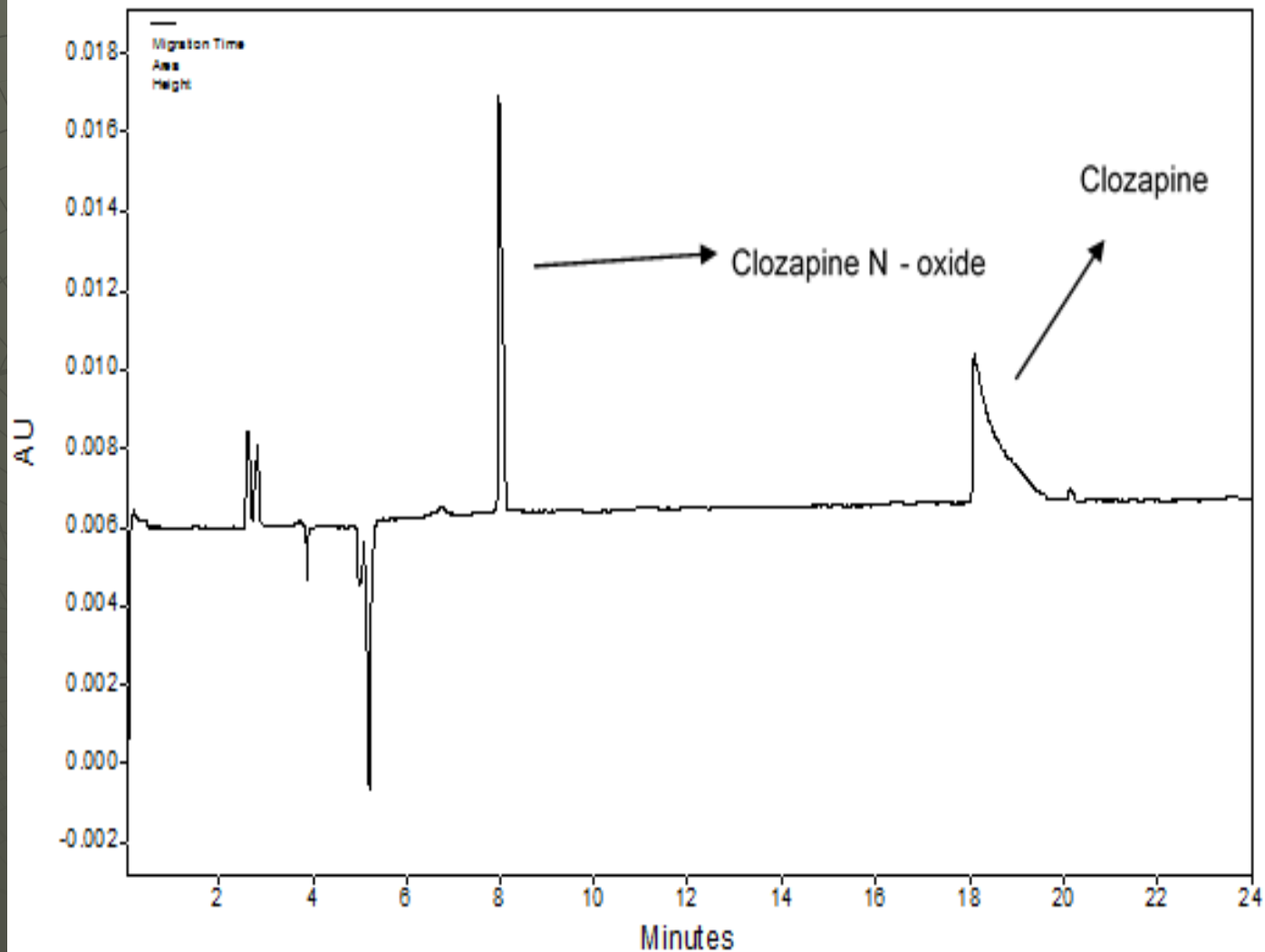
Schejbal, J., Řemínek, R., Zeman, L., Mádr, A., Glatz, Z., J. Chromatogr. A 2016, 1437, 234–240.

hFMO3- Agilent



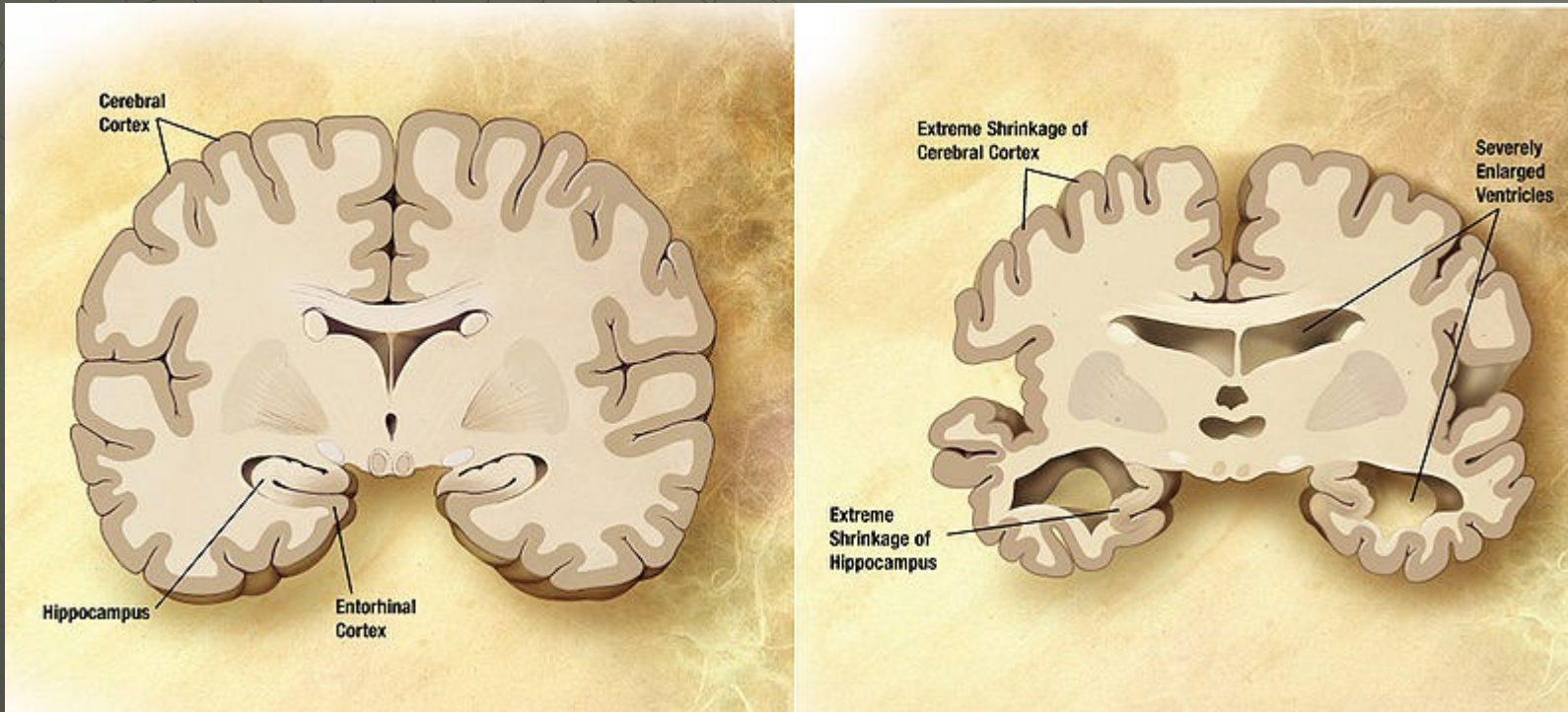
Ramana, P. et al. *Electrophoresis* 2018,39, 981 -988.

hFMO3- Beckman



Alzheimer (1906 Alois Alzheimer)

tvorba β -amyloidu, formace plaku

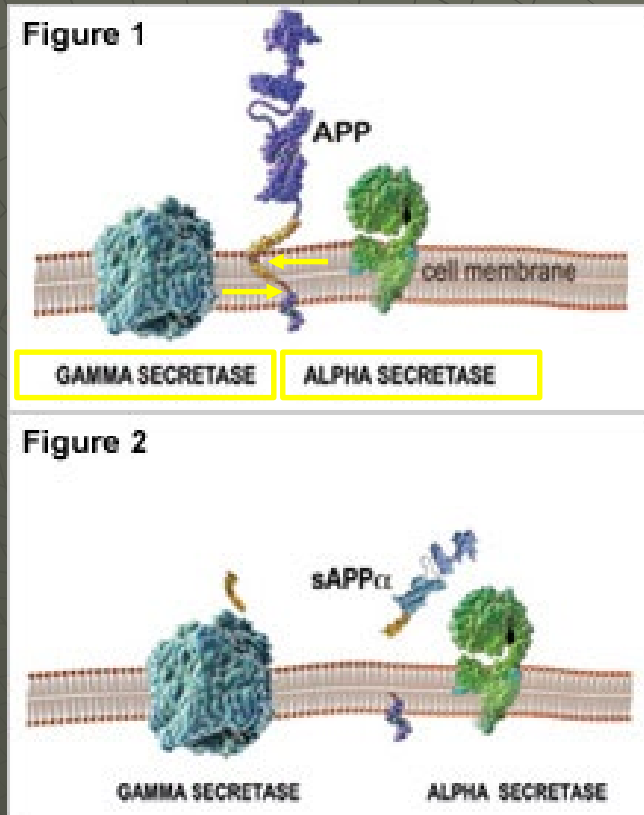


- ▶ Neurodegenerativní onemocnění
- ▶ Příčina 60 – 70 % demence
- ▶ Více než 30 milionů pacientů

Alzheimer

tvorba β -amyloidu, formace plaku, účast sekretas

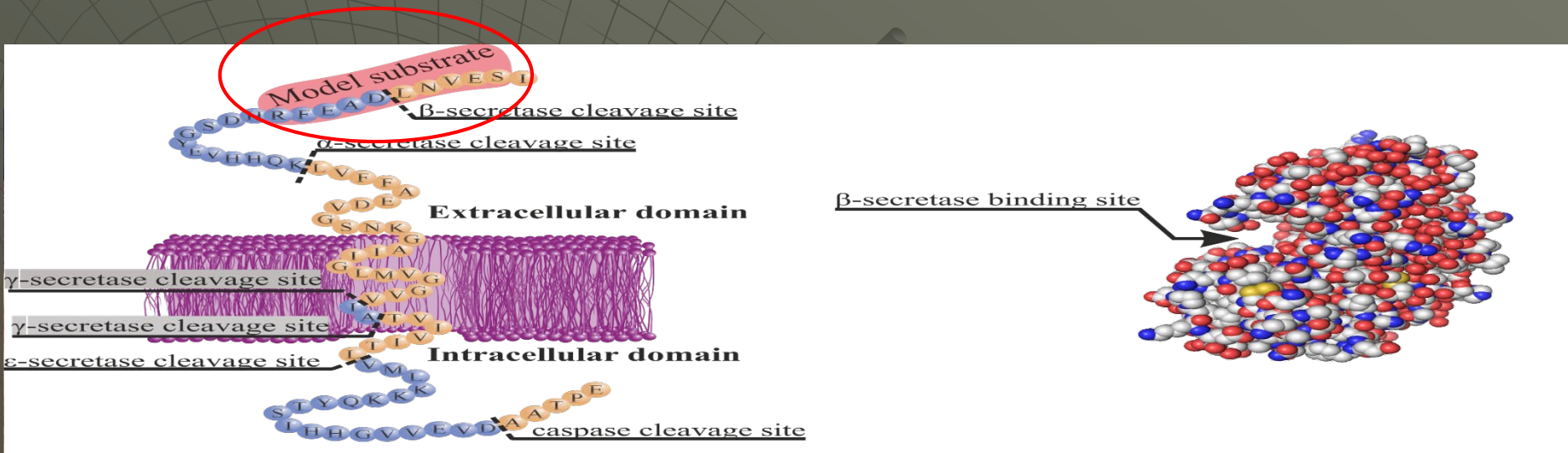
Normální



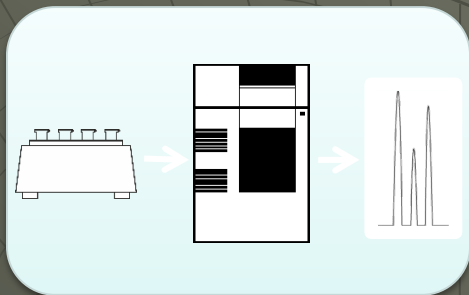
Inhibitory

Alzheimer

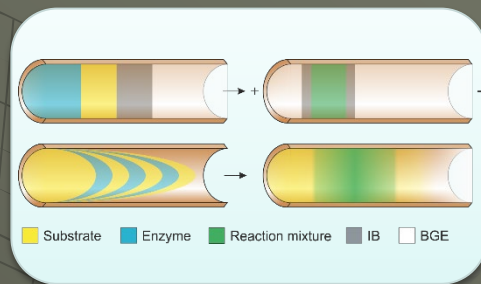
tvorba β -amyloidu, formace plaku, účast sekret



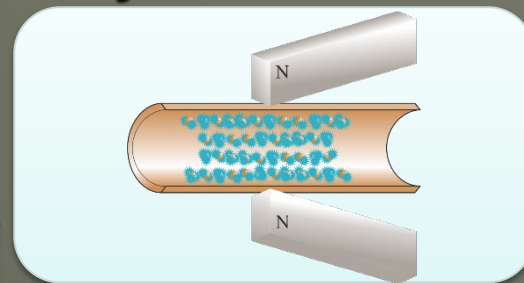
CE β -sekretasy



Offline stanovení



On-line stanovení
EMMA a TDLFP




Heterogenní online
stanovení (CE-IMER)

DOI: 10.1002/jssc.201800947

RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF
SEPARATION SCIENCE

Capillary electrophoresis integrated immobilized enzyme reactor for kinetic and inhibition assays of β -secretase as the Alzheimer's disease drug target

Jan Schejbal | Šárka Šefraná | Roman Řemínek | Zdeněk Glatz 

Studium enzymových reakcí pomocí CE



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Chromatography B, 841 (2006) 23–37

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

Review

Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis[☆]

Zdeněk Glatz*

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

Received 10 January 2006; accepted 21 February 2006

Available online 30 March 2006

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010) 1076–1090



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Review

Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays

Yi Fan, Gerhard K.E. Scriba*

Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

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.

EMMA



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1032 (2004) 173–184

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Review

Electrophoretically mediated microanalysis

Soňa Nováková^{a,b}, Sigrid Van Dyck^a, Ann Van Schepdael^a,
Jos Hoogmartens^a, Zdeněk Glatz^{b,*}

^a *Laboratory for Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
K.U. Leuven, Van Evenstraat 4, B-3000 Leuven, Belgium*

^b *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic*

Record 1 of 4

Title: Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis

Author(s): Van Dyck, S (Van Dyck, S); Kaale, E (Kaale, E); Novakova, S (Novakova, S); Glatz, Z (Glatz, Z); Hoogmartens, J (Hoogmartens, J); Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)

Source: ELECTROPHORESIS **Volume:** 24 **Issue:** 22-23 **Pages:** 3868-3878 **DOI:** 10.1002/elps.200305636 **Published:** DEC 2003

Record 2 of 4

Title: Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis: An update

Author(s): Zhang, J (Zhang, J); Hoogmartens, J (Hoogmartens, J); Van Schepdael, A (Van Schepdael, A)

Source: ELECTROPHORESIS **Volume:** 27 **Issue:** 1 **Pages:** 35-43 **DOI:** 10.1002/elps.200500492 **Published:** JAN 2006

Record 3 of 4

Title: Advances in CE-mediated microanalysis: An update

Author(s): Zhang, J (Zhang, Jie); Hoogmartens, J (Hoogmartens, Jos); Van Schepdael, A (Van Schepdael, Ann)

Source: ELECTROPHORESIS **Volume:** 29 **Issue:** 1 **Pages:** 56-65 **DOI:** 10.1002/elps.200700475 **Published:** JAN 2008

Record 4 of 4

Title: Recent developments and applications of EMMA in enzymatic and derivatization reactions

Author(s): Zhang, J (Zhang, Jie); Hoogmartens, J (Hoogmartens, Jos); Van Schepdael, A (Van Schepdael, Ann)

Source: ELECTROPHORESIS **Volume:** 31 **Issue:** 1 **Special Issue:** SI **Pages:** 65-73 **DOI:** 10.1002/elps.200900373 **Published:** JAN 2010

TDLFP

742

J. Sep. Sci. 2009, 32, 742–756

Svetlana M. Krylova
Victor Okhonin
Sergey N. Krylov

Department of Chemistry, York
University, Toronto, Ontario,
Canada

Review

**Transverse diffusion of laminar flow profiles –
a generic method for mixing reactants in capillary
microreactor**

Jana Krenkova
Frantisek Svec

The Molecular Foundry, E. O.
Lawrence Berkeley National
Laboratory, Berkeley, CA, USA

Review

Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology

Review

Jana Krenková*
František Foret

Institute of Analytical Chemistry,
Brno, Czech Republic

Immobilized microfluidic enzymatic reactors

Received: 10 August 2017 | Revised: 22 September 2017 | Accepted: 22 September 2017

DOI: 10.1002/jssc.201700905

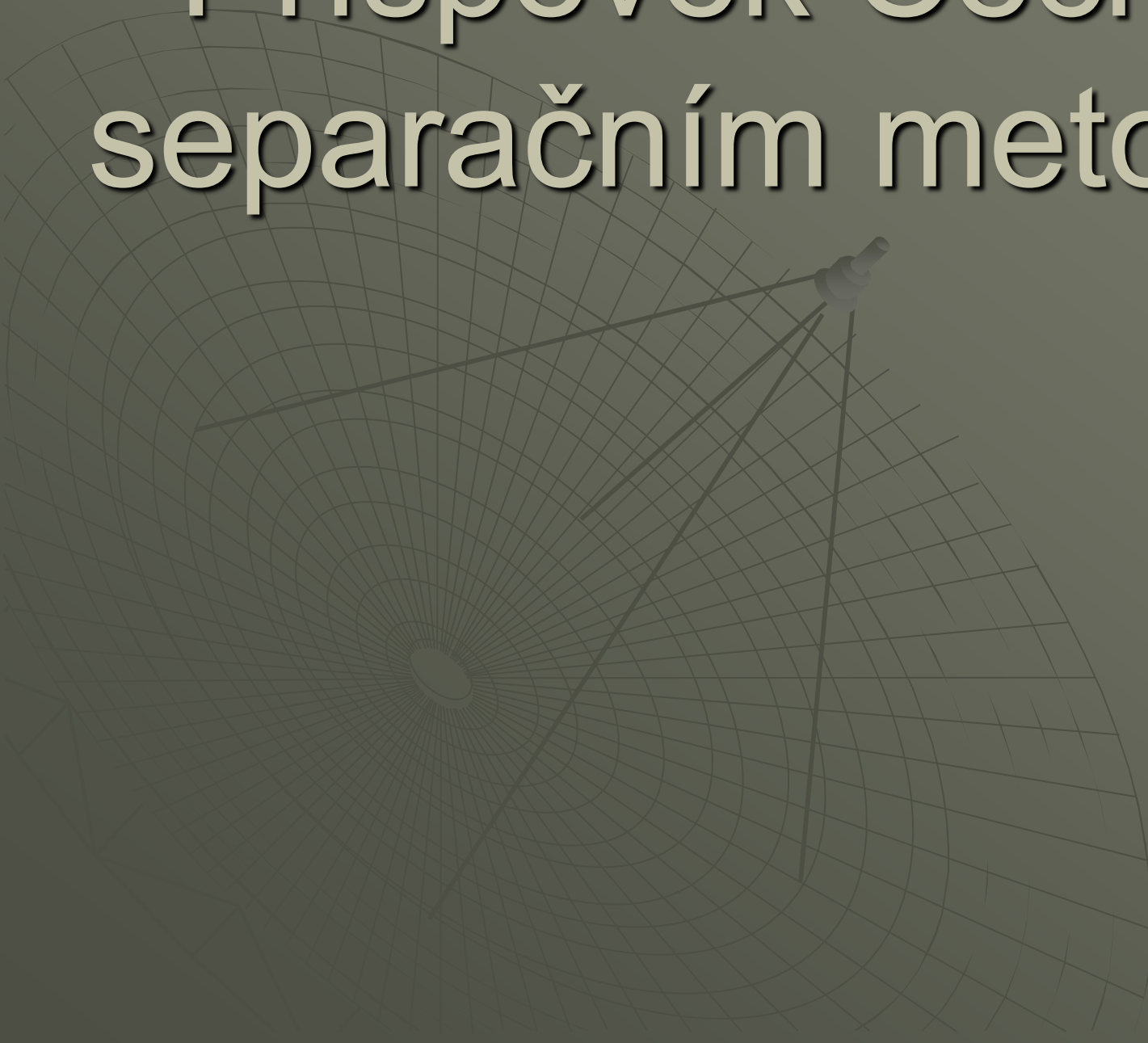
REVIEW ARTICLE

**JOURNAL OF
SEPARATION SCIENCE**

Immobilized-enzyme reactors integrated with capillary electrophoresis for pharmaceutical research

Jan Schejbal | Zdeněk Glatz

Příspěvek Čechů k separačním metodám



Příspěvek Čechů k separačním metodám





Vám děkuji za pozornost!

**Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie**

Bioanalytická skupina

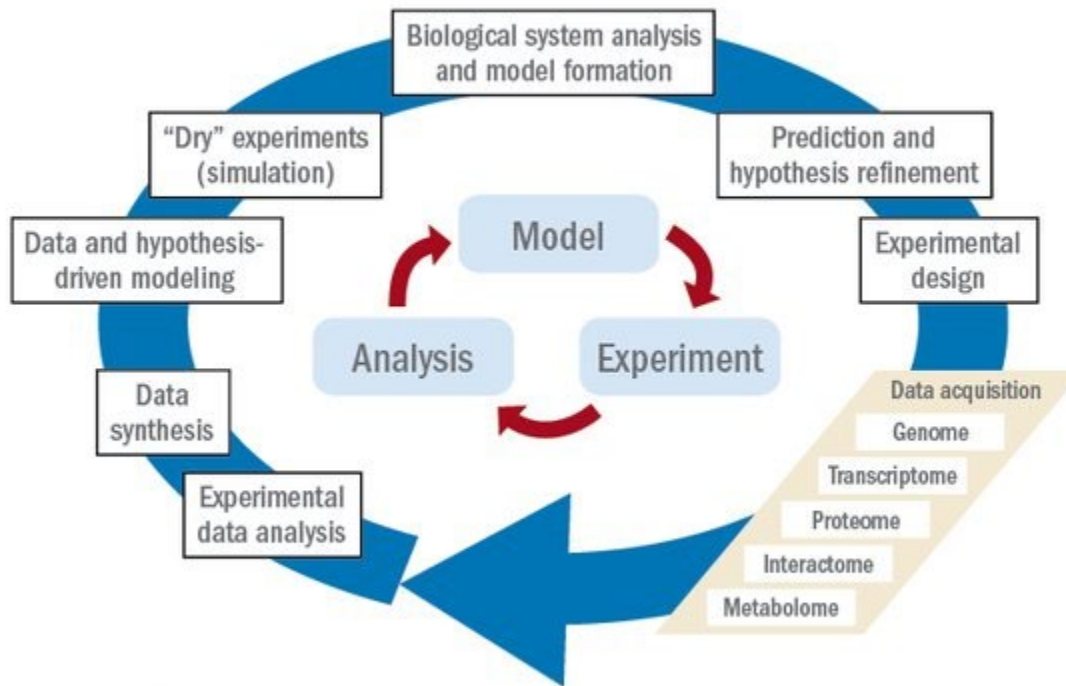
Mgr. Marta Pelcová, PhD.

Mgr. et Mgr. Lenka Kohútová, PhD.

prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.

-omiky

The process of systems biology research



Source: Agilent Technologies

Systems biology

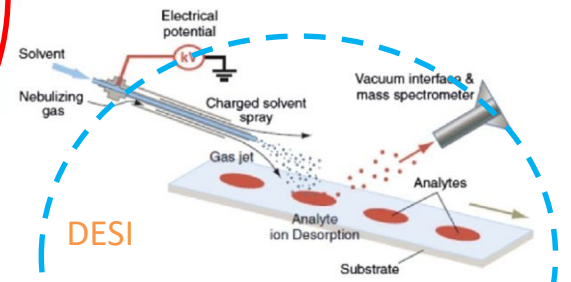
S čim pracujemo



CE



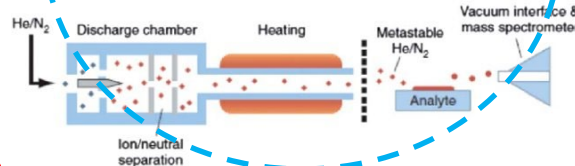
C⁴D



DESI



UV-VIS



DART



HPLC

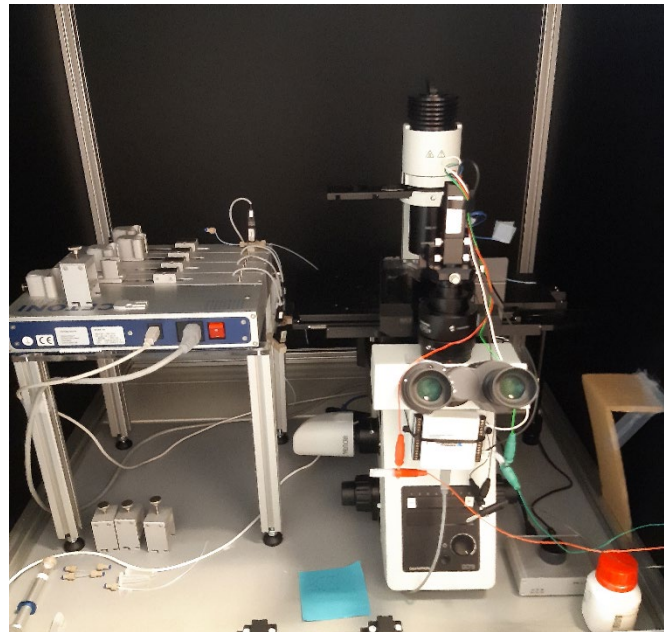
LEDiF



S čím (**nově**) pracujeme



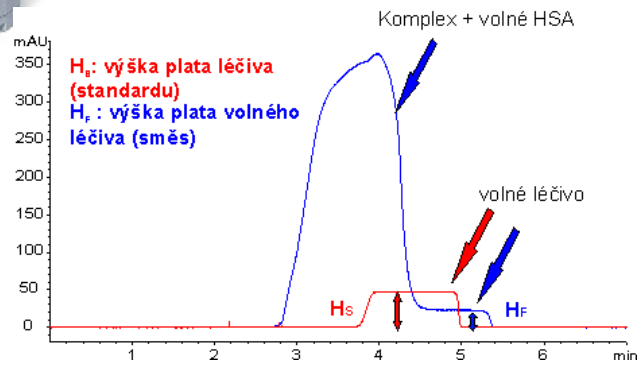
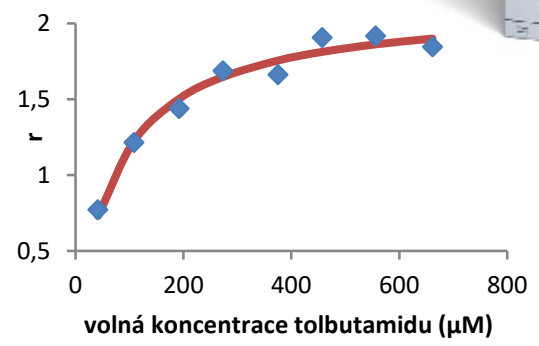
MST (Termoforéza v mikroměřítku)



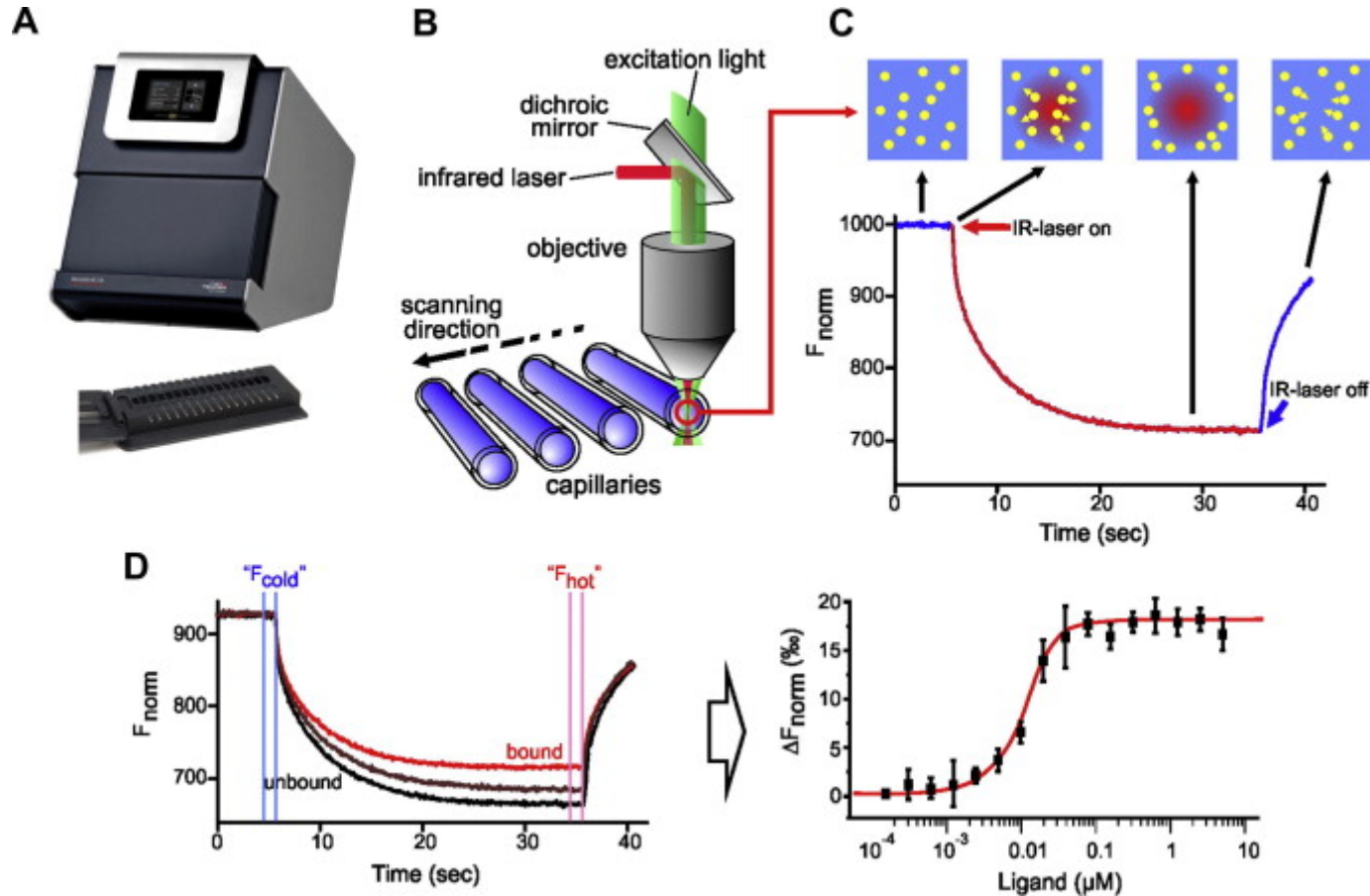
DM (Kapičková mikrofluidika)

Aktuální témata a projekty

I. Studium interakcí pomocí **CE** a **MST**



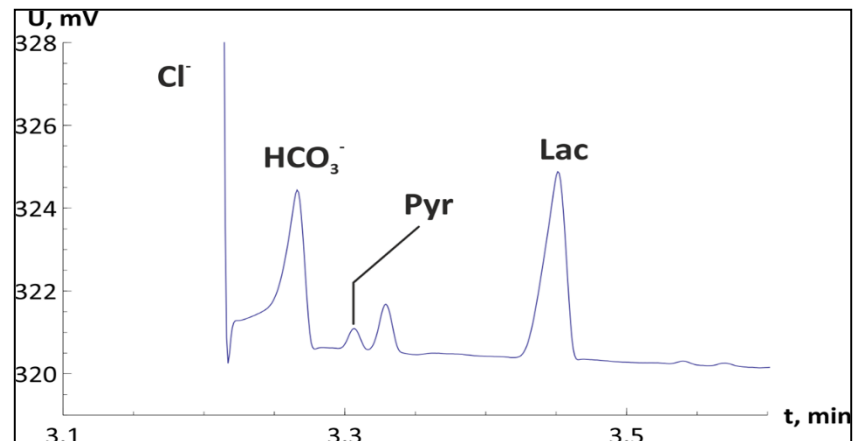
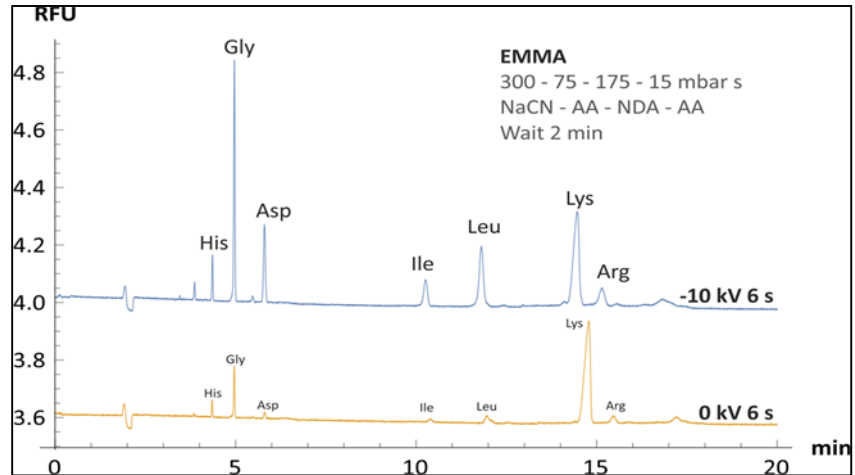
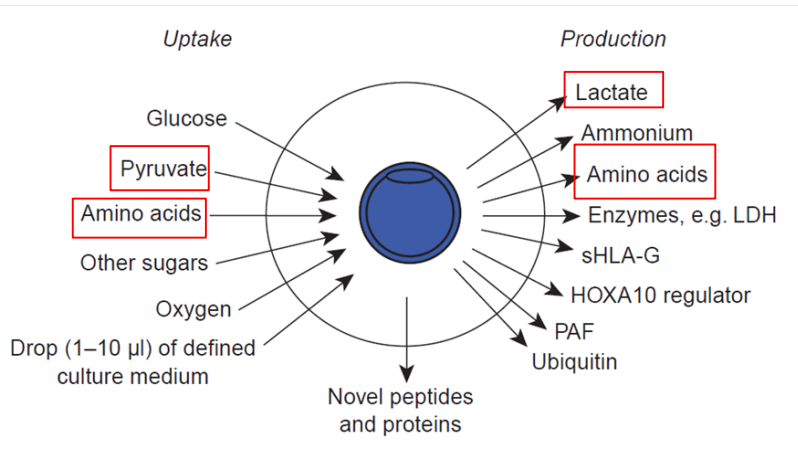
I. Studium interakcí pomocí CE a MST



II. Metabolomika a biomarkery CE a HPLC

v asistované reprodukci

amino- a karboxylové kyseliny

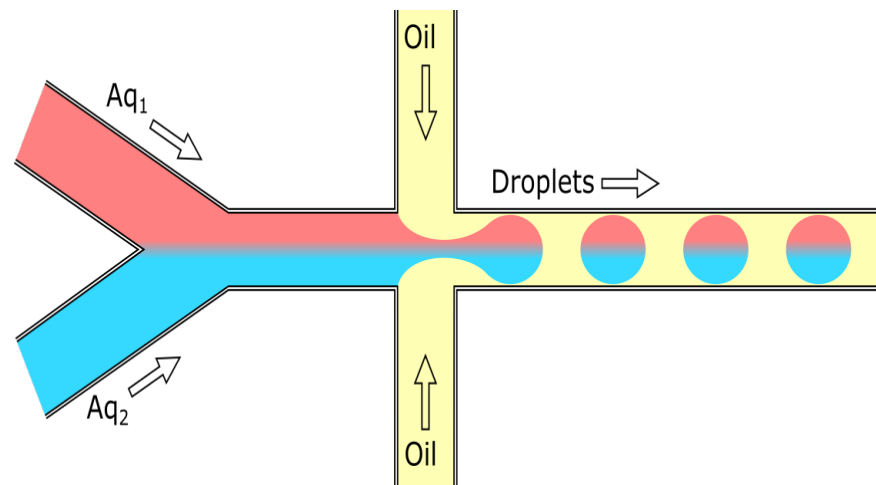


III. Enzymová kinetika v kapce

Využití kapičkové mikrofluidiky - microfluidic

Výhody DM:

- Žádná disperze
- Vysoká propustnost – desetitisíce vzorků za minutu
- Žádný kontakt se stěnami kanálu
- Nízká spotřeba vzorku pL-nL
- Rychlé míchání
- využití v genomice, proteomice, enzymologii a diagnostice



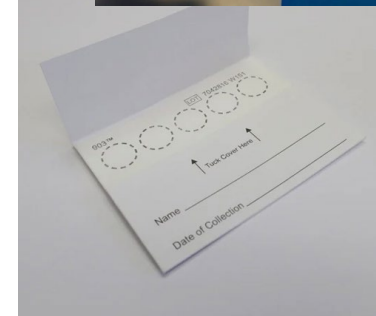
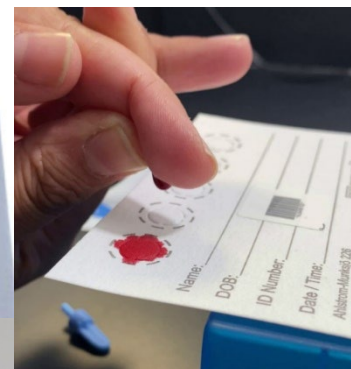
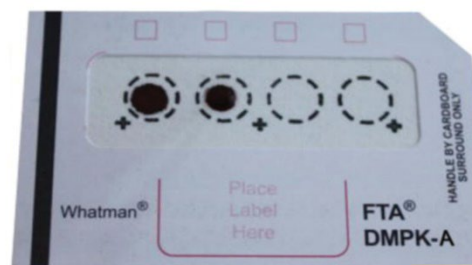
IV. Alternativní typy biologické matrice

Farmakologické studie

preklinické
klinické

toxikologické a farmakokinetické profily
terapeutické monitorování léčby

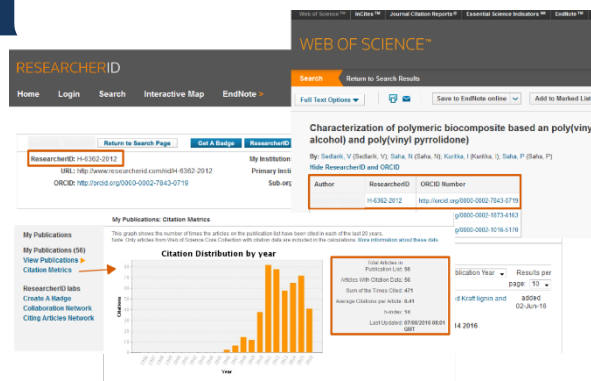
AZV projekt NU23-08-00229



Co Vás čeká

S čím budu pracovat / co se naučím?

- Práce s literaturou / databázemi
- Běžná práce v laboratoři (příprava roztoků, vzorků, atd.)
- Optimalizace metody
- Práce s Excelem – pokročilé funkce jako je řešitel, atd.



Kontakty

Budova C5, 2. nadzemní podlaží

Prof. Zdeněk Glatz, CSc.

glatz@chemi.muni.cz

217

Mgr. Marta Pelcová, PhD.

zeisbergerova@mail.muni.cz

216

Mgr. et Mgr. Lenka Kohútová, PhD.

lenna@mail.muni.cz

216 ?

Laboratoře

227-229, 323

