

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

Afinitní kapilární elektroforéza

Věra Pacáková a Tereza Vařilová
PřF UK Praha



Obsah

- 1. Úvod**
- 2. Principy afinitní elektroforézy**
- 3. Analýza rovnovážných směsí**
- 4. Analýza založená na změně mobilit**
- 5. Požadavky na CE systém**
- 6. Imunitní stanovení založená na CE**
 - 6.1 Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení**
 - 6.2 Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení**
- 7. Příklady použití ACE**
- 8. Závěry**

1. Úvod

Elektroforetické metody - vysoká účinnost, vysoká výpovědní schopnost (M_r , náboj)

Kapilární elektroforéza - vysoká citlivost, vynikající rozlišovací schopnost, rychlost analýzy, malý objem vzorků potřebný pro analýzu, nízká spotřeba reagensů a rozsáhlé možnosti automatizace

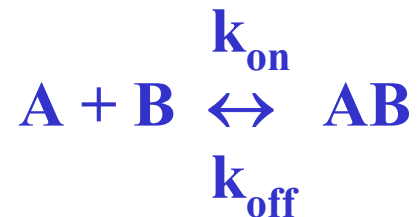
Bioafinitní princip - molekulové rozpoznávání, selektivita

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) - kombinace obou principů, komplementární k afinitní kapalinové chromatografii (AC)

Obvykle kapilární zónová elektroforéza (CZE), ale i gelová (CGE) nebo kapilární elektrochromatografie (CEC)

2. Principy afinitní elektroforézy

Dvě molekuly A a B s pohyblivostmi μ_A , μ_B vytvářejí komplex AB s pohyblivostí μ_{AB} ,



k_{on} - rychlostní konstanta pro tvorbu komplexu

k_{off} - pro jeho disociaci

μ_{AB} obvykle leží mezi μ_A a μ_B ; pokud jedna složka imobilizovaná nebo nerozpustná, pak $\mu_{AB} = 0$.

Interakce proteinů s ligandy \Rightarrow změna náboje
nízkomolekulárního ligandu \Rightarrow změny μ_{AB} ; změna M_r
zanedbatelná

Provádění ACE

- A) Obě složky A, B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE)

- B) Jedna ze složek je imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu (CGE) či na chromatografickém nosiči (CEC)

Metoda ad A)

(obě složky A, B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE))

V závislosti na rychlosti rozpadu komplexu AB:

- a) *analýza rovnovážných směsí* - disociace AB
pomalá vzhledem k době analýzy, můžeme přímo detekovat komplex; vzorek obsahuje rovnovážnou směs receptoru a ligandu
- b) *analýza založená na změně elektroforetických pohyblivosti* - disociace komplexu AB rychlá, komplex nelze detekovat; komplexotvorné reakce ovlivňují elektroforetické pohyblivosti interagujících složek

Výhody a omezení ACE

Metoda ad A) (obě složky A, B, ligand i receptor, interagují v homogenním roztoku (CZE))

- *nejrozšířenější*, aplikovatelná na široký rozsah analytů i separačních podmínek
- tvorbou komplexu musí dojít k měřitelné *změně μ* ; když separace volných složek od komplexu nedostatečná \Rightarrow nelze použít
- K_D na základě zjištění koncentrací složek komplexu nebo z posunů migračních časů

Výhody a omezení ACE

Metoda B) (jedna ze složek je imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu či na chromatografickém nosiči)

- interakce probíhají s *maximální účinností*
- *koncentrace* aktivních molekul po imobilizaci je *velmi nízká* a tedy obtížně stanovitelná
- možnost *pozměnění procesu rozpoznávání* v důsledku imobilizace
- obtížné *regenerovat povrch* s imobilizovaným ligandem, aniž by došlo ke snížení aktivity a koncentrace imobilizovaného materiálu

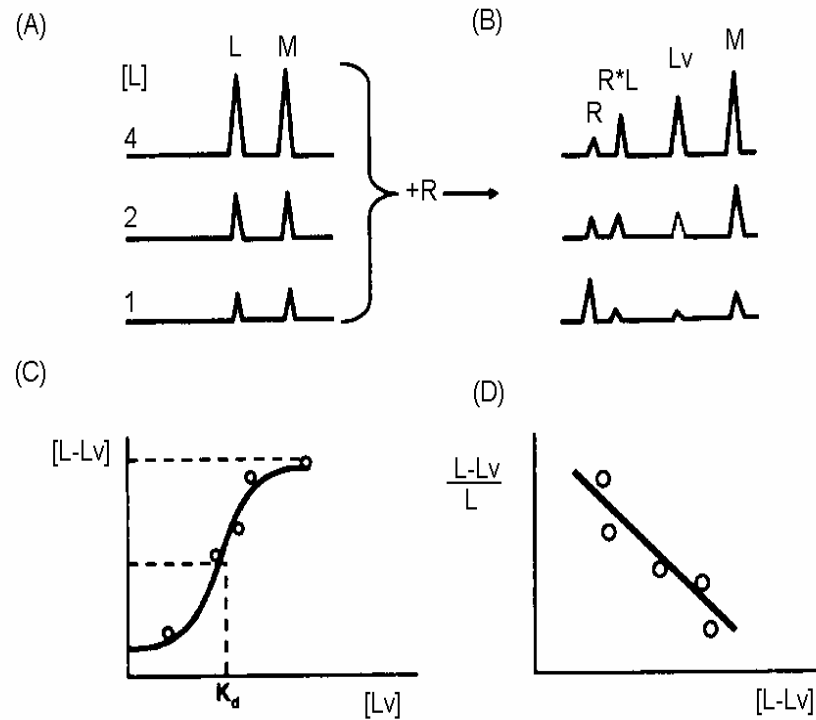
3. Analýza rovnovážných směsí (a)

Oddělení komplexu od rovnovážné směsi a jeho detekce \Rightarrow důkaz interakcí mezi složkami \Rightarrow CE k separaci a kvantifikaci volných a vázaných molekul.

Pouze pro systémy s pomalou kinetikou, tj. s vysokou afinitou

Určení rovnovážných konstant viz následující obr.

Stanovení vazebných konstant na základě CE analýzy rovnovážných směsí (podle Heegaard N.H.H. et al., J.Chromatogr.B 715, 29 (1998)).



(A) – Generace dat pro kalibrační křivku (závislost plochy píků na koncentraci ligandu L; M – značkovač (marker))

(B) – CE analýza rovnovážné směsi různých koncentrací ligandu [L] s fixní koncentrací receptoru R; vzorky byly ekvilibrovány před CE analýzou (R – receptor, R*L komplex, Lv – volný ligand)

(C) – Vyhodnocení dat - přímé, z koncentrace volného ligandu [Lv] se určí koncentrace vázaného ligandu, [L-Lv], a ze závislosti [L-Lv] na Lv se určí K_D jako Lv v polovině saturace

(D) – Scatchardova závislost poměru koncentrací $[(L-Lv)/L]$ na koncentraci vázaného ligandu, [L-Lv] Směrnice je $1/K_D$.

Výhody a omezení metody (a)

- receptor nemusí být čistý
- ligand a receptor nemusí mít rozdílnou velikost
- dobu potřebnou pro ustálení rovnováhy lze zjistit z opakovaných analýz (malá spotřeba vzorku)
- titrací lze zjistit stechiometrii komplexu
- disociace komplexu v průběhu CE musí být zanedbatelná
- dostatečná separace ligandu od komplexu
- nízká citlivost UV detekce (LIF)
- pro slabé interakce frontální nebo vakantní technika

4. Analýza založená na změně mobilit (b)

Nízkoafinitní (nestabilní) komplexy s krátkým poločasem
na základě změny μ

Kinetika tvorby komplexů rychlá ve srovnání s dobou
analýzy,

$$1/k_{\text{off}} \ll t_{\text{m(R)}}$$

a poločas rozpadu komplexu

$$\ln 2/k_{\text{off}} < 1 \% t_{\text{m}}$$

Elektroforéza složky A v roztoku B $\Rightarrow \mu$ složky A
se v okamžicích disociace a asociace diskontinuálně
mění mezi hodnotami μ_{A} a μ_{AB}

Pozorovaná pohyblivost μ složky A \Rightarrow váženým průměrem časových intervalů, v nichž se pohybuje jako volná molekula A a jako komplex AB,

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

α_{AB} - doba, po kterou existuje komplex AB

Přepsat ve formě

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} \alpha_{AB}$$

kde $\Delta\mu = \mu - \mu_A$ pozorovaná změna pohyblivosti složky A přítomnosti B a

$\Delta\mu_{\max} = \mu_{AB} - \mu_A$ maximální změna pohyblivosti A v přítomnosti B při nekonečném zředění \Rightarrow rozdíl pohyblivostí volné složky A a komplexu AB.

α_{AB} můžeme vyjádřit jako molární zlomek,

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

který souvisí s rovnovážnou konstantou K_D

$$K_D = [A][B]/[AB]$$

vztahem

$$\alpha_{AB} = [B]/(K_D + [B])$$

Pro změnu pohyblivosti $\Delta\mu$ lze odvodit rovnici

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} [\mathbf{B}] / (\mathbf{K}_d + [\mathbf{B}])$$

$\Delta\mu_{\max}$ a \mathbf{K}_d se určí nelineární regresí hodnot $\Delta\mu$ při různé koncentraci \mathbf{B}

Řada linearizovaných závislostí, např.

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\max} - \mathbf{K}_d (\Delta\mu / [\mathbf{B}])$$

Změna pohyblivosti se zjistí z experimentu

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

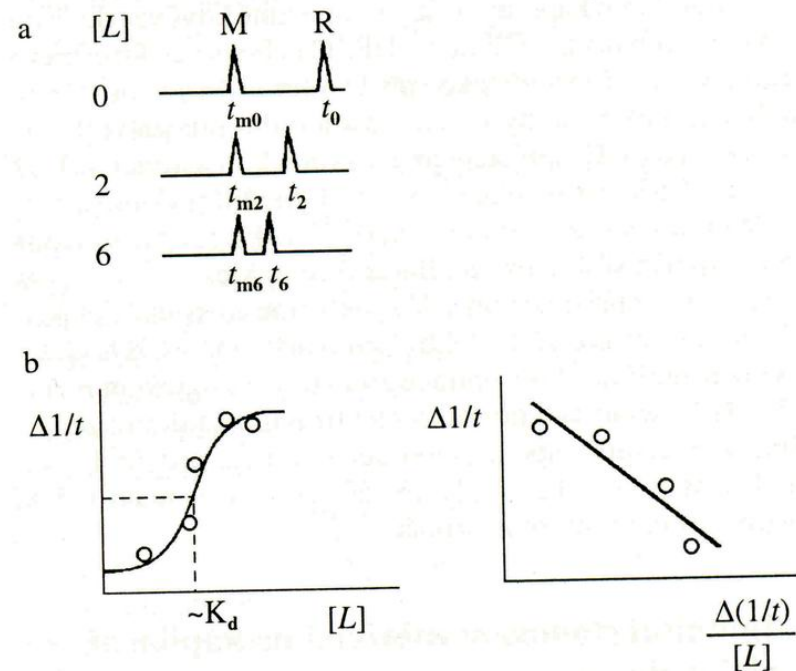
takže dostaneme

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

t_m a t_0 - migrační časy složky A a značkovače EOF za nepřítomnosti složky B (ligandu L) v nosném elektrolytu a t'_m a t'_0 - za přítomnosti složky B, L_D je délka kapiláry k detektoru, E je intenzita elektrického pole.

Stanovení vazebných konstant na základě změny elektroforetických pohyblivostí (podle Heegaard N.H.H. et al., J.Chromatogr.B 715, 29 (1998)).

Jedna složka v elektrolytu,
druhá ve vzorku (závisí na
dostupnosti, relativní
snadnosti pozorování
změn μ - když
vysokomolekulární složka
(protein) v pufru, pak
největší změna μ u
nizkomolekulární složky
(léčivo)



Požadavky, výhody a omezení (b)

- koncentrace receptoru \ll ligandu ($< 0.1 \times K_D$), ale jeho absolutní hodnota nemusí být známa (obtížné stanovit nízké koncentrace proteinů)
- koncentrační rozsah dostatečně široký pro přesné stanovení
- reakce musí být dostatečně rychlá
- vazebná stechiometrie **1:1**
- vazebná místa homogenní a rovnoměrně distribuována
- vzorek nemusí být čistý (důležité, je-li ligand nestálý a tvoří neaktivní produkty)
- stanovit současně afinitní konstanty isoenzymů
- přesnost určení $\Delta\mu$ závisí na stabilitě komplexu vzhledem k době analýzy

5. Požadavky na CE systém

- vliv *elektrického pole* na K_D zanedbatelný
- vliv *teploty* na K_D významný - termostatovat kolony
- *zamezení adsorpce* - modifikované kapiláry
- *citlivá detekce* (DL UV detekce pro proteiny 0,1 až 1 ng, tj. 0,1 až 1 mg/ml, LIF DL o tři řády nižší)
- *koncentrace elektrolytů* v CE je výrazně nižší než ve fyziologickém roztoku (zvýšit koncentraci při nižším napětí)
- *doporučené pufry* v ACE: 0,1 M tricin, 0,2 M glycin, 50 mM taurin nebo 0,5 M trimethylamoniumpropylsulfonát.

6. Imunitní stanovení založená na CE (přímá a kompetitivní)

Výhody:

- oddělení volných protilátek od komplexu i látek přítomných ve vzorku
- možnost současně stanovovat více látek, např. drogy i jejich metabolity
- kratší doba analýzy ve srovnání s imunitními testy na pevné fázi
- malé vzorky (ca nl) \Rightarrow nižší cena analýzy

- citlivá LIF detekce při označení antigenu, buď fluoroforem nebo enzymaticky, např. alkalickou fosfatázou ve spojení s fluorogenním substrátem (fluoresceindifosfátem) - někdy nestačí, např. při stanovení estradiolu a hCG proteinu (koncentrace $< 10^{-12}$ M)

Nevýhody:

- možnost sorpce analytů na stěny kapiláry
- nižší produktivita (max. 20 vzorků/hodinu)

6.1 Nekompetitivní (přímé) imunitní stanovení

Princip:

Přebytek protilátky nebo jejího fragmentu, **Ab***, označených fluoroforem nebo enzymaticky, se přidá ke vzorku, aby bylo zajištěno, že veškerý antigen **Ag** ve vzorku interaguje s protilátkou:

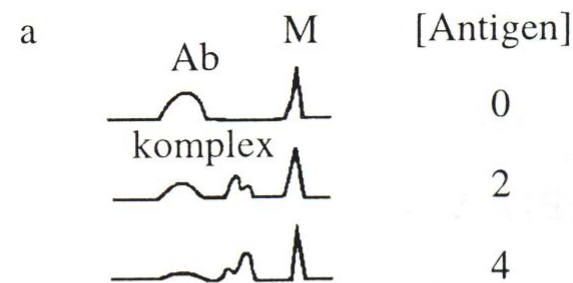


Po proběhlé interakci (inkubaci) se část vzorku nadávkuje do CE kapiláry, separuje se komplex **[AbAg]*** od nadbytku **Ab*** a detegují se obě složky pomocí LIF. Při vazbě značených protilátek na antigen dochází k významné změně jejich μ .

Princip přímého a kompetitivního imunitního stanovení pomocí CE s LIF (podle Heegaard N.H.H. et al., J.Chromatogr.B, 715, 29 (1998))

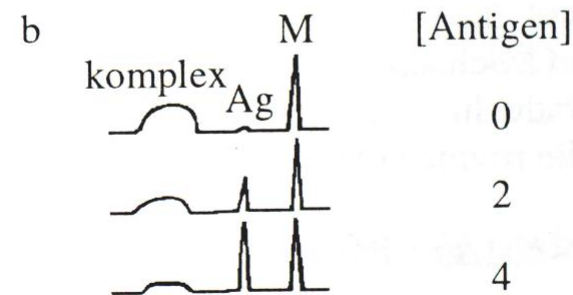
(A) Přímé stanovení

Protilátka značená fluoroforem, Ab a fluoreskující značkovač M, jsou přidány k roztoku, který obsahuje neznačený antigen Ag ve zvyšující se koncentraci. Dva píky komplexu jsou důsledkem mono- a divalentní protilátky.



(B) Nepřímé (kompetitivní) stanovení

Antigen značený fluoroforem je smíchán s rostoucím množstvím protilátky Ab, která vytěsňuje FITC-Ag z komplexu Ag-FITC-Ag. Měří se plocha píku značeného Ag, která je úměrná množství neznačeného Ag.



Omezené použití

heterogenita značených protilátek nebo jejich fragmentů \Rightarrow řada píků v elektroferogramu

obtížná příprava a čištění fragmentů z monoklonálních protilátek - naděje v genové inženýrství

6.2 Kompetitivní (nepřímé) imunitní stanovení

Princip:

Vzorek s neznačeným antigenem **Ag** v přítomnosti matrice se inkubuje s protilátkou (antisérem) **Ab** a značeným antigenem **Ag*** (nebo jeho fragmentem),



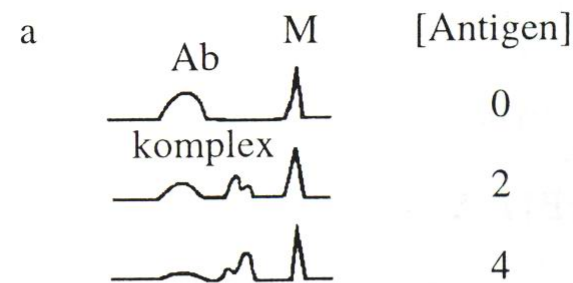
Ag* soutěží s **Ag** přítomným ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky **Ab**. Po ustavení rovnováhy se dávkuje alikvot směsi do CE systému s LIF detekcí, kde se oddělí volný **Ag*** od komplexu **[AbAg]***.

Výška (plocha) píku volného **Ag*** a **[AbAg]*** nebo jejich poměr jsou úměrné obsahu antigenu v původním vzorku

Princip přímého a kompetitivního imunitního stanovení pomocí CE s LIF (podle Heegaard N.H.H. et al., J.Chromatogr.B, 715, 29 (1998))

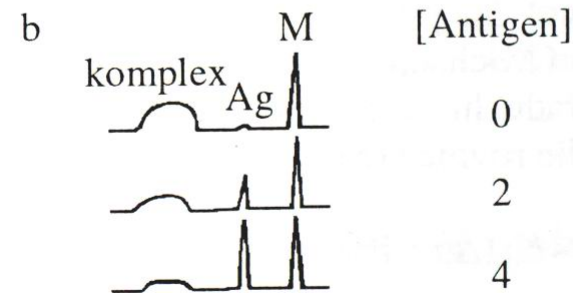
(A) Přímé stanovení

Protilátka značená fluoroforem, Ab a fluoreskující značkovač M, jsou přidány k roztoku, který obsahuje neznačený antigen Ag ve zvyšující se koncentraci. Dva píky komplexu jsou důsledkem mono- a divalentní protilátky.



(B) Nepřímé (kompetitivní) stanovení

Antigen značený fluoroforem je smíchán s rostoucím množstvím protilátky Ab, která vytěsňuje FITC-Ag z komplexu Ag-FITC-Ag. Měří se plocha píku značeného Ag, která je úměrná množství neznačeného Ag.



Tento postup tedy, když je obtížné separovat volnou protilátku od komplexu (nelze tudíž použít přímé stanovení) \Rightarrow **u nízkomolekulárních protilátek**, např. peptidů, které významně neovlivňují pohyblivost komplexu **[AbAg]***

Výhody a nevýhody CE při kompetitivním imunitním stanovení

- *vysoká citlivost* (mez detekce 0,1 nM)
- *malé množství vzorku* potřebné k analýze (< amol)
- možnost analyzovat *několik analytů současně*
- *vysoká přesnost* stanovení
- doba analýzy *0,5 až 1 min* (pouze Ag*)
- není nutné používat elektroforeticky čisté protilátky (vyhovují i *polyklonální*)
- *nelineární kalibrační křivky* (zvolit koncentrace [Ag*] + [Ag] v lineární části)

7. Příklady použití

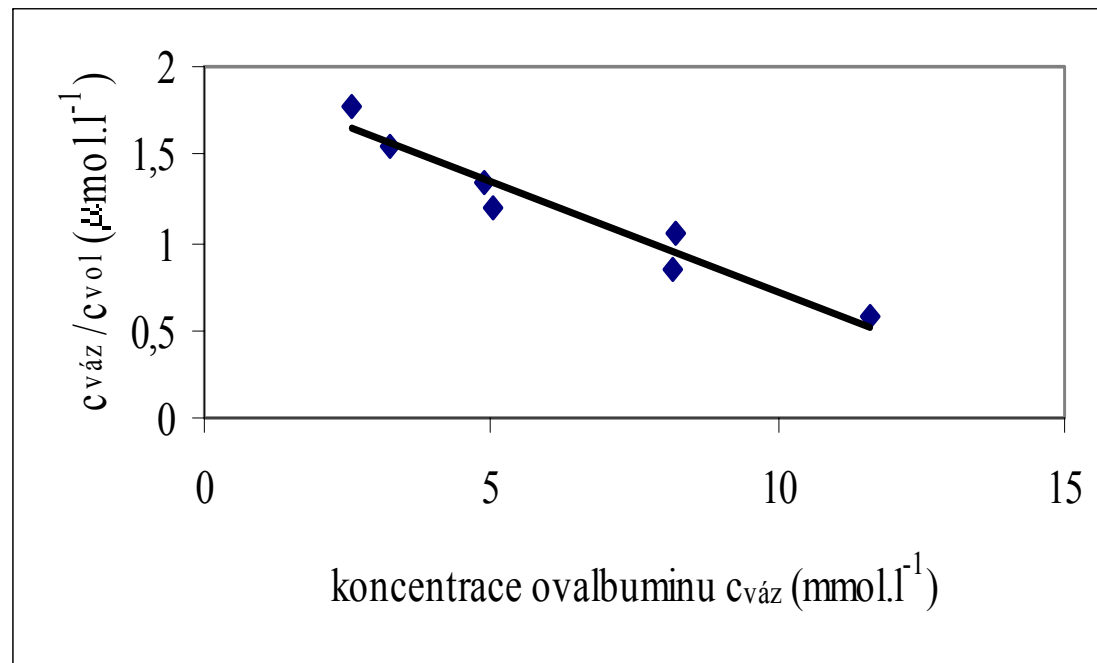
- Studium interakcí léčiv s proteiny, cukrů s lektiny, antigenů s protilátkami a pod.
- Stanovení K_D
- Chirální separace

Naše výsledky:

Stanovení K_D komplexů:

- 1) **con A s glykoproteiny** (ovalbuminem, kyselým α -glykoproteinem a fetuinem)
- 2) prasečího **pepsinu s 3,5-dijodtyrosinem**

Směrnice odpovídá $-1/K_D$



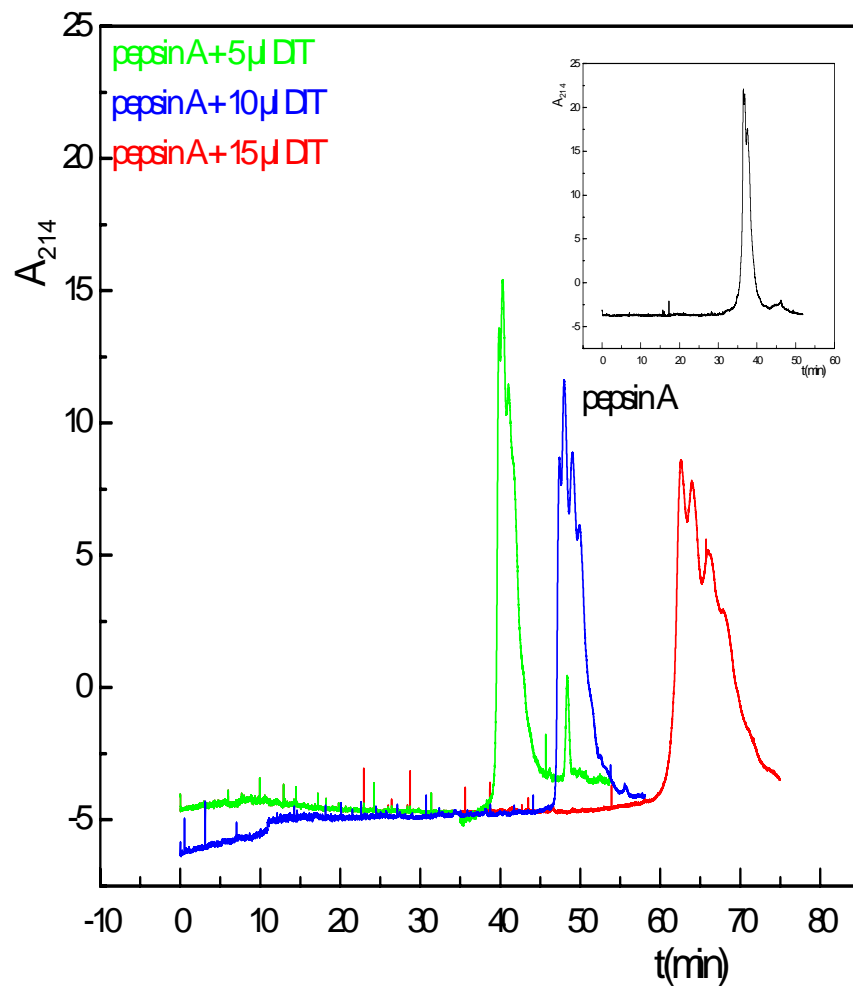
Disociační konstanty komplexu Con A s glykoproteiny

Ovalbumin $8,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Fetuin $9,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$

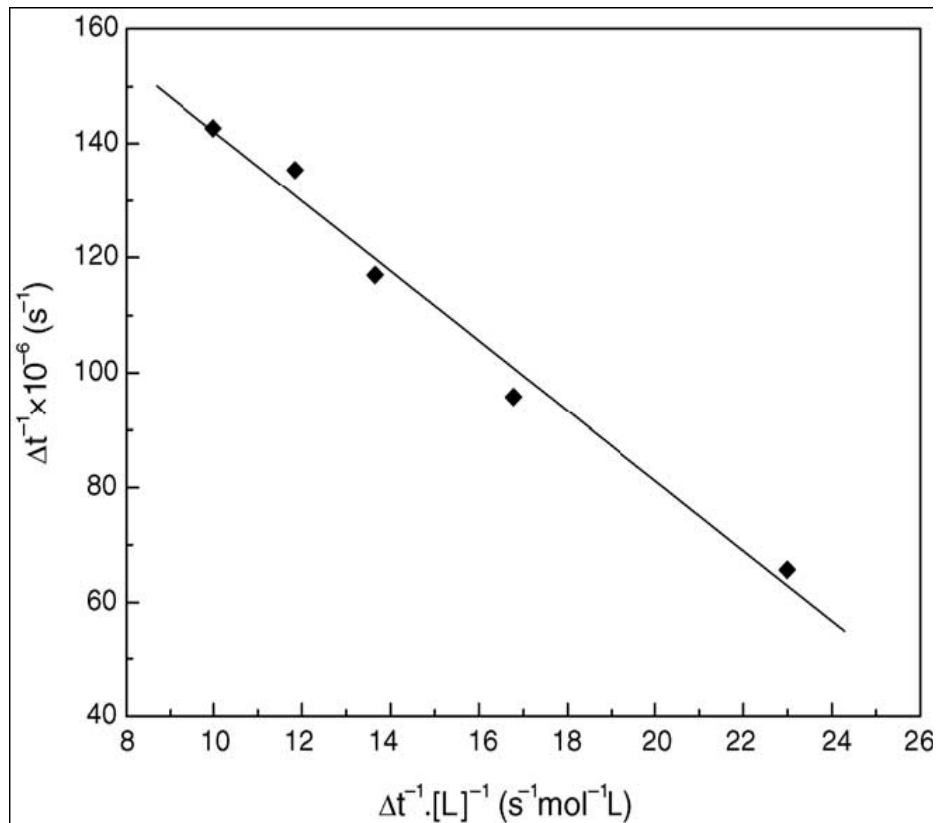
Kyselý α -glykoprotein $18 \mu\text{mol.l}^{-1}$

ACE prasečího pepsinu A



50 mM fosfátový pufr,
pH 8.5, s přidavky 5, 10
a 15 μ g/mL DIT

Určení K_D komplexu prasečího pepsinu s DIT



Závislost změny migračních časů na koncentraci ligandu pro komplex prasečího pepsinu A s DIT

Výpočet K_D na základě vztahu

$$\Delta(1/t) = \Delta(1/t)_{\max} - K_D \Delta(1/t)/[L]$$

$$K_D \text{ } 2,4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$$

8. Závěry

ACE $0,001 > k_{off} > 0,1 \text{ s}^{-1}$

komplementární separační metoda *k ALC* (bude ji nahrazovat)

spojení *on-line s MS a NMR* při určování struktury biologicky aktivních látek

vývoj *nových separačních medií* zvyšujících účinnost a selektivitu separací - vtištěné polymery s požadovanou afinitou

miniaturizace \Rightarrow vhodná pro studium interakcí ve velmi malých objemech, které se blíží objemu buněk (elektroforéza na čipu)

A close-up photograph of a dense field of purple flowers, likely a species of willowherb, with green foliage and reddish-brown stems. The flowers are in various stages of bloom, showing five petals and prominent stamens. The background is slightly blurred, emphasizing the foreground flowers.

Děkuji vám za pozornost