

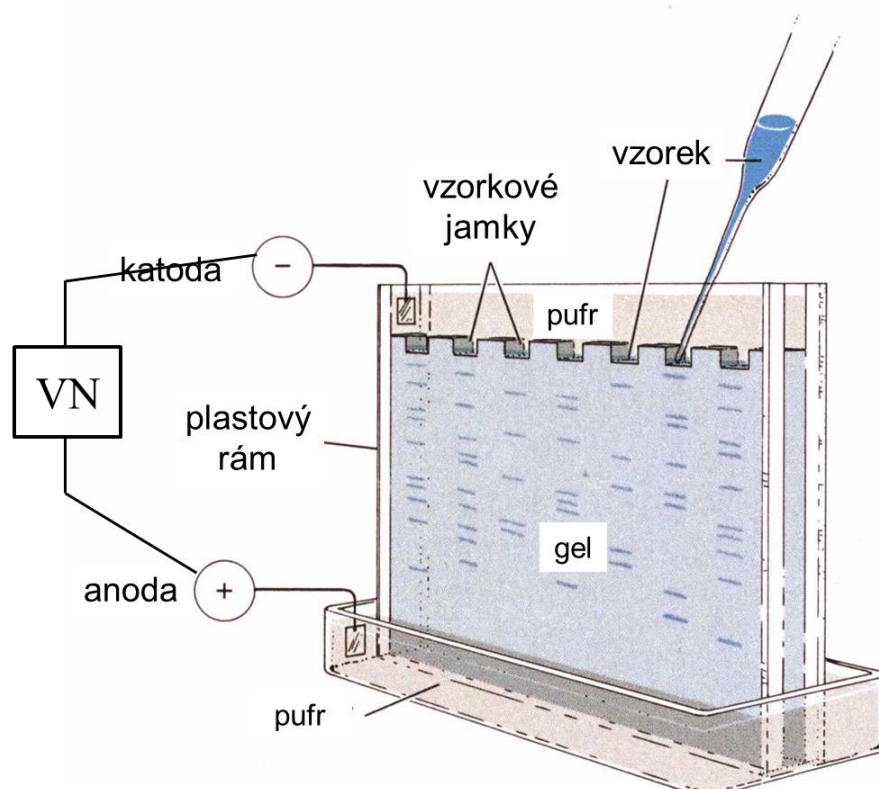
Separační módy II

aneb

přehledka separačních mechanismů, druhá část

Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Gelová elektroforéza v plošném uspořádání (angl. *slab gel*) našla rozsáhlé uplatnění v molekulární biologii a biochemii, kde se hojně využívá pro separace biomakromolekul – proteinů a nukleových kyselin. Její provedení je pro připomenutí naznačeno na **Obr. 1**.



Obr. 1 Gelová elektroforéza v plošném uspořádání (angl. *slab gel electrophoresis*).

Kapilární gelová elektroforéza (CGE, *capillary gel electrophoresis*) je založena na stejném principu s tím rozdílem, že je vše přeneseno do elektroforetické kapiláry. Kapilára je naplněna gelem, jehož řetězce vytvářejí hustou síť, která klade odpor migraci makromolekul. Čím delší je řetězec DNA nebo proteinu, tím obtížněji se proplétá sítí gelu a tím pomalejší je jeho migrace. Jedná se o čistě mechanickou záležitost, můžeme si to představit tak, že máme za úkol z klubka zamotaných provazů vymotat kousek provázku o délce 5 cm nebo provaz o délce 2 metry. Vymotávání dvoumetrového provazu nám bude jistě trvat delší dobu. Ve srovnání s provedením gelové elektroforézy v plošném uspořádání přináší CGE řadu výhod. Jednou z nich je možnost použití 10 až 100× větších intenzit elektrického pole díky výrazně efektivnějšímu odvodu Jouleova tepla z kapiláry. To umožňuje výrazné zrychlení separací. Na rozdíl od plošného uspořádání, kde je nutno skvrny v gelu vybarvovat, případně vyřezávat a dále analyzovat, umožňuje CGE detekci přímo v kapiláře. CGE nabízí výrazně vyšší stupeň automatizace, což je spojeno s možností provádění dlouhých sérií měření bez nutnosti

zásahu operátora. S propustností procesu analýzy je spojena i možnost použití multikapilárních přístrojů, ve kterých probíhá paralelní separace v desítkách kapilár najednou. Tyto přístroje se ukázaly jako vysoce cenné při sekvenování DNA.

Gely chemické a fyzikální

V plošné gelové elektroforéze se tradičně používá zesítený polyakrylamidový nebo agarózový gel. Přitom polyakrylamidový gel se svými menšími póry se používá spíše pro separace proteinů, agarózový gel s většími póry se používá spíše pro separace nukleových kyselin.

Chemické gely jsou ty, které jsou zesíteny prostřednictvím kovalentních vazeb a vytvářejí velmi pevnou síť. Vzhledem k tomu, že v CGE je separační prostředí uzavřeno uvnitř kapiláry, nemusejí být gely nutně zesítené a je možné použít i **fyzikální gely**, jejichž gelová struktura není dána kovalentním zesítením polymerních řetězců. Jejich řetězce jsou provázány pouze mechanickým propletením, popřípadě prostřednictvím vodíkových vazeb či jiných slabých interakcí. Naopak příprava zesítených polymerů přímo uvnitř kapiláry je experimentálně náročná, a proto je zde často dávána přednost právě fyzikálním gelům. Ty je možné do kapiláry snadno vpravit promytím kapiláry roztokem gelu.

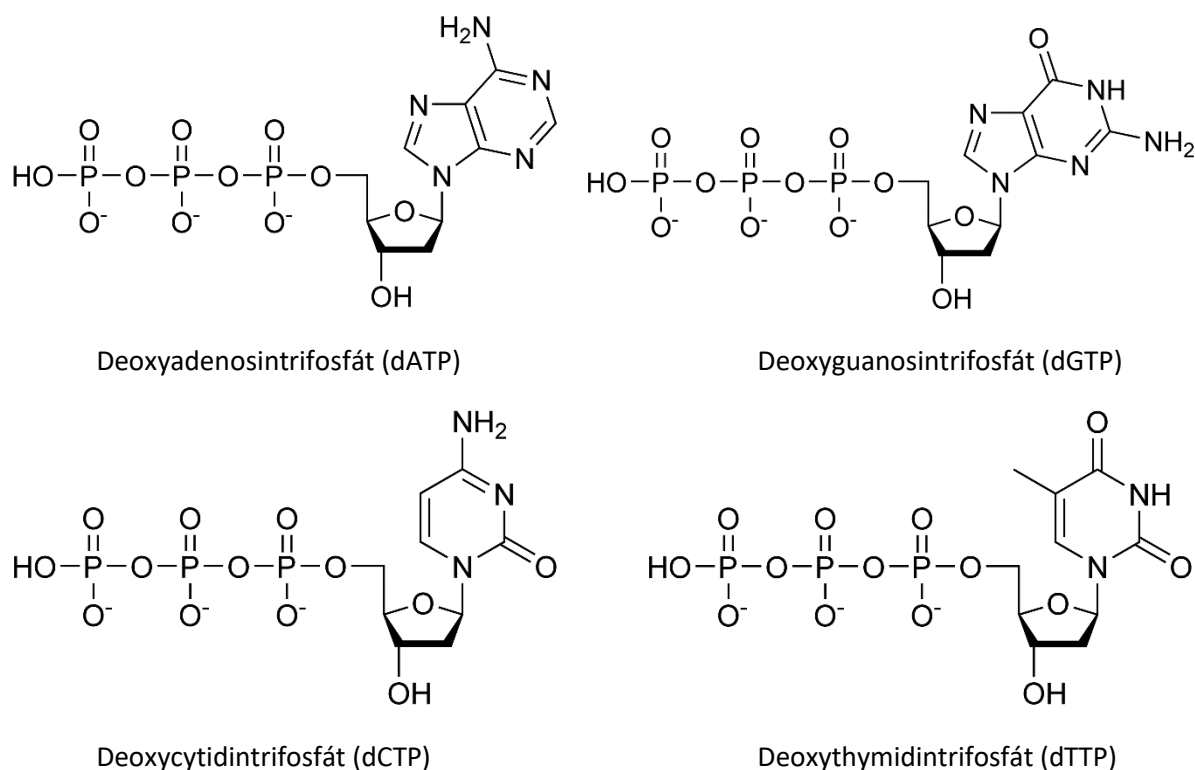
Proteomika a sekvenování DNA

V raných fázích rozvoje proteomiky se zdálo, že CGE má díky velmi vysoké separační účinnosti elektroforézy obrovský potenciál v oblasti separací komplexních směsí proteinů, identifikace a detekce i těch málo zastoupených z nich. Následně však došlo k velkému rozmachu a masové aplikaci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí, která nabízí pro identifikace proteinů do té doby nepředstavitelné možnosti. Kvůli problémům se spojením CE s MS detekcí a také kvůli nekompatibilitě BGE obsahujících fyzikální gely s MS detekcí se zásadní rozmach CGE v oblasti proteomiky nakonec nekonal. Kde však CGE výrazně promluvila do historie, bylo sekvenování DNA.

Sangerova metoda sekvenování DNA

V genomice se dobře prosadila a na zhruba 40 let byla nejhojněji využívanou metodou Sangerova metoda sekvenování DNA. Ačkoli v současnosti je pro velkoobjemové sekvenování nahrazena metodami dalších generací, stále se aktivně využívá v celé řadě případů, například pro projekty menšího měřítka nebo pro potvrzení podezření získaných jinými metodami, jelikož tato metoda dokáže číst sekvence o délce více než 500 nukleotidů a má velmi malou chybovost (správnost je zhruba 99,99 %).

Sangerova metoda využívá **polymerázovou řetězovou reakci (PCR, polymerase chain reaction)**. V reakční směsi máme jako templát jednořetězcovou DNA, jejíž sekvenci chceme zjistit. K ní přidáme DNA primer, DNA polymerázu a deoxyribonukleotidy všech čtyř bazí (deoxyadenosintrifosfát = dATP, deoxyguanosintrifosfát = dGTP, deoxycytidintrifosfát = dCTP a deoxythymidintrifosfát = dTTP, viz **Obr. 2**). V této směsi nám DNA polymeráza vyprodukuje kopie templátové DNA, čímž vlastně „namnoží“ vzorek.



Obr. 2 Deoxyribonukleotidy čtyř bazí vyskytujících se v DNA.

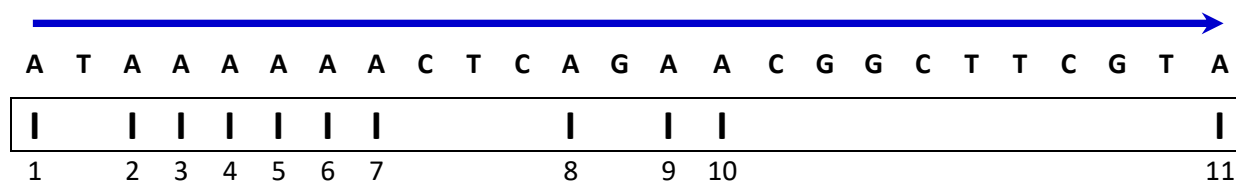
Při Sangerově sekvenování se do této reakční směsi přidávají ještě dideoxyribonukleotidy, jejichž ribóza postrádá i druhou hydroxylovou skupinu. Pokud se do rostoucího řetězce DNA připojí dideoxyribonukleotid, ukončí růst daného řetězce, protože bez hydroxylové skupiny deoxyribózy se nemůže vytvořit fosfodiesterová vazba mezi dvěma nukleotidy. Dideoxyribonukleotidy se do směsi přidávají zhruba ve stokrát menším množství než normální deoxyribonukleotidy, např. 0,5 mM dATP a 0,005 mM ddATP (dideoxyadenosintrifosfát).

V klasickém provedení Sangerovy metody se reakce provádí ve čtyřech oddělených nádobkách. V každé z nich jsou všechny deoxyribonukleotidy a pouze jeden z dideoxyribonukleotidů. Příklad situace v nádobce, do které je přidán ddATP, je na **Obr. 3**. To, jak dlouho daný řetězec DNA poroste, než jeho růst ukončí náhodné připojení ddATP namísto dATP, je čistě statistická záležitost. Jelikož v reakční směsi narůstají ohromné počty řetězců DNA, dostaneme nakonec směs, která obsahuje všechny varianty různě dlouhých řetězců terminovaných ddATP, které jsou možné. V případě **Obr. 3** je jich 11.

Následně se tato směs separuje na gelové elektroforéze. Řetězce DNA se v gelu separují podle své délky. Vzhledem k tomu, že všechny 4 báze mají velmi podobné molekulové hmotnosti i velikost, dostaneme na gelu „žebřík“, na kterém každá příčka odpovídá řetězci s o jednotku větším počtem nukleotidů než ten předchozí. Aby bylo možné zóny jednotlivých řetězců v gelu zviditelnit, jsou molekuly dideoxyribonukleotidů značeny buď radioaktivně (pomocí ^{32}P) nebo fluorescenční značkou. **Obr. 4** ukazuje zóny získané po separaci řetězců terminovaných ddATP na **Obr. 3**.

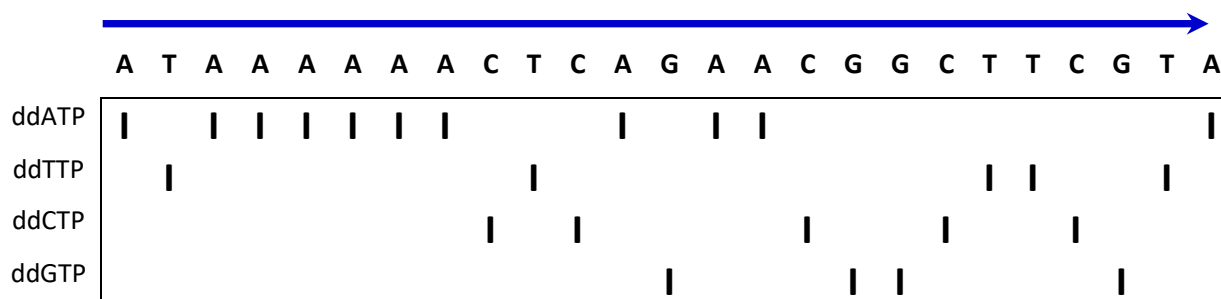
Sekvence DNA:	A-T-A-A-A-A-A-C-T-C-A-G-A-A-C-G-G-C-T-T-C-G-T-A
Řetězec 1:	A*
Řetězec 2:	A-T-A*
Řetězec 3:	A-T-A-A*
Řetězec 4:	A-T-A-A-A*
Řetězec 5:	A-T-A-A-A-A*
Řetězec 6:	A-T-A-A-A-A-A*
Řetězec 7:	A-T-A-A-A-A-A-A*
Řetězec 8:	A-T-A-A-A-A-A-A-C-T-C-A*
Řetězec 9:	A-T-A-A-A-A-A-A-C-T-C-A-G-A*
Řetězec 10:	A-T-A-A-A-A-A-A-C-T-C-A-G-A-A*
Řetězec 11:	A-T-A-A-A-A-A-A-C-T-C-A-G-A-A-C-G-G-C-T-T-C-G-T-A*

Obr. 3 Ukázka vzniku různě dlouhých řetězců DNA při reakci s přidavkem ddATP. Hvězdička označuje značené ddATP, které ukončují růst řetězce.



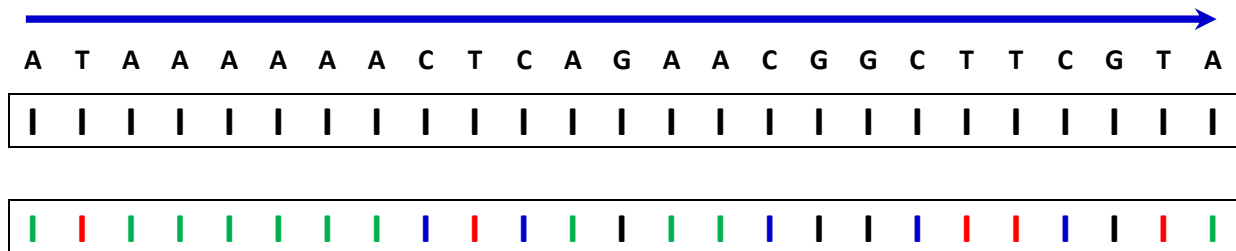
Obr. 4 Zóny zviditelněné v gelu po separaci DNA z Obr. 3. Čísla pod pruhem znázorňujícím gel korespondují s čísly řetězců na Obr. 3.

V klasické metodě se stejným způsobem provedou 3 další reakce, pokaždé s jiným dideoxyribonukleotidem a tyto směsi se separují. Schematické znázornění gelu, na kterém se vedle sebe separují řetězce ze všech čtyř reakcí, je na **Obr. 5**.



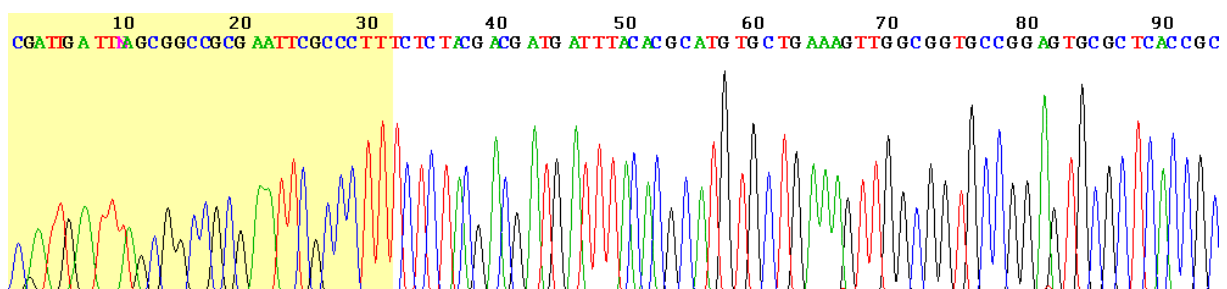
Obr. 5 Schematické znázornění gelu se zónami získanými paralelní separací čtyř reakčních směsí, z nichž jedna obsahovala ddATP, druhá ddTTP, třetí ddCTP a čtvrtá ddGTP.

Vidíme, že ze záznamu na **Obr. 5** je možno vcelku snadno odečíst kompletní sekvenci nukleotidů. Jistou nevýhodou tohoto přístupu je nutnost provádění čtyř reakcí a čtyř separací. Pokud bychom přidali všechny deoxyribonukleotidy do jedné reakce a provedli jednu separaci, dostaneme výsledek ukázaný na **Obr. 6 nahoře**, který nám neposkytuje žádnou informaci o sekvenci. Zrychlení a zjednodušení procesu sekvenování je možné v případě, kdy každý z dideoxyribonukleotidů označíme jinou fluorescenční značkou, která vykazuje fluorescenci při jiné vlnové délce. V takovém případě je možné přidat všechny dideoxyribonukleotidy do jedné reakce a separovat je v rámci jedné separace. Kterým nukleotidem je daný řetězec ukončen, poznáme podle vlnové délky, při které vykazuje fluorescenci. Tato situace je znázorněna na **Obr. 6 dole**.



Obr. 6 Srovnání výsledku separace řetězců terminovaných značenými dideoxyribonukleotidy na gelu pro případ, kdy jsou všechny dideoxyribonukleotidy značeny stejnou značkou, je nahoře, a pro případ, kdy jsou značeny různými fluorescenčními značkami (zde znázorněno různými barvami) je dole.

Díky svým výhodám se varianta provedení Sangerova sekvenování s různými fluorescenčními značkami pro různé dideoxyribonukleotidy stala dominantní metodou. Separaci a detekci lze snadno provádět nejen v plošném gelu, ale i v CGE, kde se využívá vysokého stupně automatizace. Navíc lze s výhodou použít i **multikapilární přístroje (capillary arrays)**, ve kterých jsou umístěny desítky kapilár a je možno tam provádět až sto paralelních CGE separací najednou. Ukázka výstupu z CGE sekvenace DNA je na **Obr. 7**. Je zde vidět, že se jedná v podstatě o čtyři překryté elektroferogramy. Každý z těchto čtyř elektroferogramů je zaznamenáván při jiné vlnové délce emitovaného záření a odpovídá tedy jinému dideoxyribonukleotidu.



Obr. 7 Ukázka výstupu z CGE sekvenování DNA pomocí Sangerovy metody s dideoxyribonukleotidy označenými různými fluorescenčními značkami.

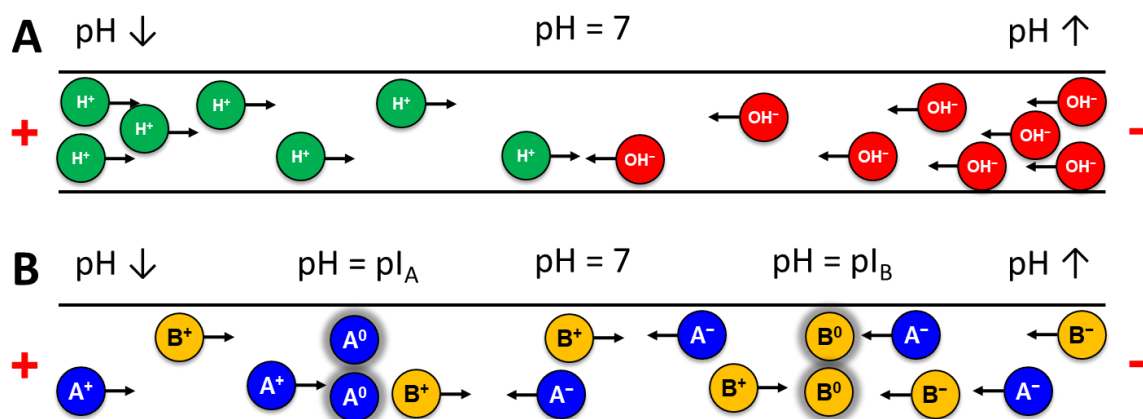
Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)

Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF, *capillary isoelectric focusing*) je podobně jako CGE přenesením klasické isoelektrické fokusace do kapiláry. CIEF slouží k separaci proteinů a peptidů na základě jejich isoelektrického bodu (pI). Uvnitř kapiláry je **vytvořen gradient pH prostřednictvím amfolytů**, což jsou zwitterionické molekuly, které obsahují jak kyselou, tak zásaditou funkční skupinu. Rozsah hodnot pI amfolytů pokrývá oblast, ve kterém chceme pracovat, např. pH 3-9. Kapilára se naplní směsí amfolytů a analyzovaného vzorku. Na katodický konec kapiláry se umístí nádobka se zásaditým roztokem, na anodický konec se umístí nádobka s kyselým roztokem. Po vložení napětí se OH^- z katodického konce pohybují kapilárou směrem anodickému konci, H^+ se naopak pohybují od anodického konce ke katodickému, tedy v opačném směru, jak je znázorněno na **Obr. 8A**. pH v roztoku zásady na katodickém konci kapiláry je nad hodnotou pI všech analytů i amfolytů. Všechny tyto látky jsou zde proto nabitý záporně a pohybují se směrem dovnitř od kapiláry. Na anodickém konci jsou naopak v silně kyselém roztoku všechny analyty i amfolyty nabitý kladně a rovněž se pohybují směrem do kapiláry. Ionty H^+ a OH^- z opačných konců kapiláry migrují proti sobě a když se setkají, tak se navzájem neutralizují, takže se v kapiláře vytvoří gradient pH, které je nejnižší u anodického konce a postupně se zvyšuje až ke katodickému konci. Analyty a amfolyty migrují od konců kapiláry tak dlouho, až narazí na místo, kde se pH rovná jejich pI. V tomto místě ztratí náboj a přestanou migrovat. Tento proces je naznačen na **Obr. 8B**. Jelikož gradient pH je spojitý, je zóna, která má přesně $\text{pH} = \text{pI}$, a do které se tedy soustředí daná látka, velmi úzká. Proto se látka zaostří (zafokusuje). Odtud název isoelektrická fokusace.

Mobilizace

Byť se s pojmem mobilizace v poslední době setkáváme hlavně ve vojenském smyslu, zde jím myslíme obecně rozpohybování něčeho. V tomto případě rozpohybování celého systému amfolytu se zafokusovanými analyty. Ukončení procesu fokusace indikuje pokles procházejícího proudu k nule, ten nastává při dosažení ustáleného stavu, kdy všechny analyty i amfolyty dosáhly místa, kde se $\text{pH} = \text{pI}$, přestaly migrovat a tím i přestaly vést elektrický proud. Pochopitelně to, že máme kdesi uvnitř kapiláry zafokusované proteiny podle jejich pI, nám není příliš platné, protože je zvenku nevidíme. Po ukončení fokusace musejí být zóny v kapiláře mobilizovány tak, aby prošly detektorem a byly jím zachyceny. Mobilizace se provádí aplikací tlaku na vstupní konec kapiláry, přičemž se stále aplikuje i napětí, aby zóny zůstaly zaostřeny. Kromě toho může být mobilizace dosaženo buď přidáním soli do jedné z nádobek na konci kapiláry, nebo umístěním nádobek s kyselinou na oba konce kapiláry, případně umístěním nádobek se zásadou na oba konce kapiláry a aplikací napětí. Tím se poruší ustálený stav, látky v kapiláře získají náboj a celý systém se uvede do pohybu.

Pro úspěšné provedení CIEF **musí být v systému potlačen EOF**, protože jeho přítomnost by mohla vést k vymytí zón z kapiláry ještě před koncem fokusace. Směsí vzorku s amfolyty se plní celá kapilára, tím pádem dávkované množství vzorku může být velmi velké a analyty jsou z tohoto množství zakoncentrovány do velmi úzké zóny, což přináší výhodu vysoké citlivosti. Na druhé straně bývá rozpustnost analytů ve vodě v oblasti blízké jejich pI nejnižší, takže právě rozpustnost je limitujícím faktorem, co se týče dávkovaného množství vzorku.



Obr. 8 Kapilární isoelektrická fokusace. (A) Ustavení pH gradientu v kapiláře. (B) Putování analytů A a B na místo, kde $\text{pH} = \text{pI}$.

Kapilární isotachoforéza (CITP)

Název isotachoforéza pochází z toho, že při této technice se separace provádí v prostoru mezi dvěma různými elektrolyty. První z nich je **vedoucí elektrolyt** (angl. *leading electrolyte*), druhý je **koncový elektrolyt** (angl. *terminating electrolyte*). Umístění vzorku mezi tyto rozdílné elektrolyty způsobí, že se analyty rozdělí do zón, které se kapilárou pohybují všechny stejnou (*iso-*) rychlostí (*-tacho-*).

Co vše se děje mezi dvěma elektrolyty

Volba vedoucího a koncového elektrolytu záleží na tom, zda se mají stanovovat kationty nebo anionty. Ukažme si to na příkladu stanovení kationtů. V tom případě musí mít kation přítomný ve vedoucím elektrolytu větší elektroforetickou mobilitu než všechny analyty. Kation přítomný v koncovém elektrolytu musí mít naopak mobilitu menší než všechny analyty. Díky nutnosti zachování kontinuity elektrického proudu v různých částech kapiláry pak dojde k podobnému jevu, jako je ten, který se využívá při zakoncentrování analytů zesílením pole (viz lekce 3 **Instrumentace**).

Situace je naznačena na **Obr. 9**. Na **Obr. 9A** můžeme vidět situaci bezprostředně po vložení napětí. V kapiláře máme vedoucí elektrolyt, který má kationty s největší mobilitou, a tedy největší vodivostí, protože přenesou za čas nejvíce náboje. Uprostřed je zóna vzorku, který obsahuje dva hypotetické analyty – kationty A^+ a B^+ – jejich mobilita je mezi mobilitami kationtů vedoucího a koncového elektrolytu. Vodivost této zóny je proto střední. Poslední část je naplněna koncovým elektrolytem, který má málo pohyblivé, a proto málo vodivé kationty.

Pokud by se celkový potenciálový rozdíl vloženého napětí rozdělil podél kapiláry rovnoměrně, kationty vedoucího elektrolytu, které jsou nejrychlejší, by „utekly“ kationtům analytů, a ty by „utekly“ kationtům koncového elektrolytu. Tím by se přerušil elektrický obvod, protože v oblastech mezi jednotlivými zónami by nebyly kationty, které by vedly proud. Proto se systém zachová tak, že se potenciálový rozdíl rozprostře po délce kapiláry nerovnoměrně. Největší část se ho „spotřebuje“ v oblasti, kde jsou pomalé ionty koncového elektrolytu. Díky tomu zde bude větší intenzita elektrického pole, která donutí pomalé kationty k rychlejšímu pohybu. V zóně vzorku bude intenzita pole střední, v zóně vedoucího elektrolytu bude pole nejslabší. Ionty vedoucího elektrolytu se ve

slabším poli nakonec budou pohybovat stejnou rychlostí jako kationty koncového elektrolytu v silnějším poli.

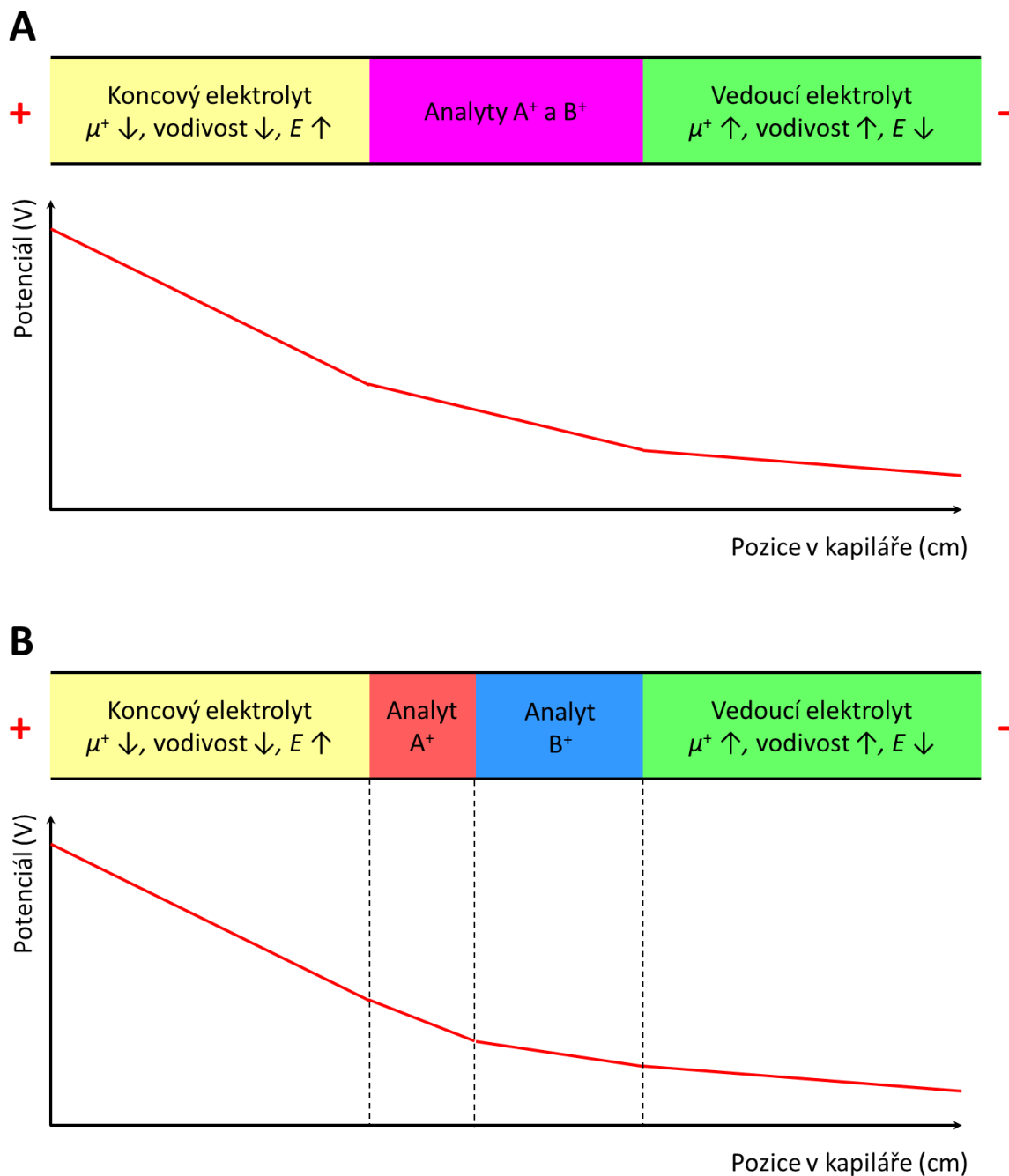
V této situaci se ještě musí uspořádat stav věcí v zóně vzorku. V t jsou namíchány o něco rychlejší kationty B^+ a o něco pomalejší kationty A^+ . Vodivost zóny vzorku je někde uprostřed mezi těmito dvěma ionty, tm pádem i intenzita pole. To znamená, že v této zóně migrují ionty B^+ s vyšší mobilitou o něco rychleji než ionty A^+ s nižší mobilitou. Díky tomu se ionty B^+ dostávají do přední části zóny a ionty A^+ do její zadní části. Nakonec se vytvoří dvě oddlen zóny, jako je tomu na **Obr. 9B**. V těchto zónách je intenzita pole mrn odlišn, což m za následek, že i ionty v těchto dvou zónách se nakonec pohybují stejnou rychlostí, a to rychlostí rovnou rychlosti pohybu kationtů vedoucího a koncového elektrolytu.

Samozaostřujc efekt

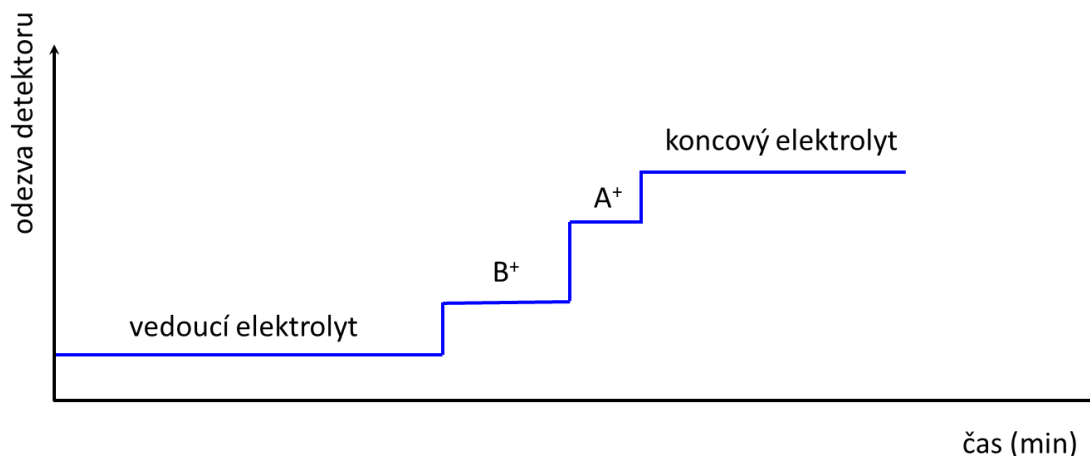
Intenzita pole se v jednotlivých zónách v kapiláre liší, proto stane-li se například, že nkter z iontů B^+ se dostane do zóny vedoucího elektrolytu, slabší elektrick pole v této zóně jeho pohyb zpomalí a on se rychle vrátí zpět do své vlastní zóny. Stejn tak pokud se ion B^+ dostane do zóny iontů A^+ , silnější pole v této zóně jeho pohyb urychlí a on se okamžit vrátí do své zóny. Díky tomu se mezi jednotlivými znmi udržují ostr rozhraní. Za zmínku také stojí, že koncentrace iontů v jednotlivých zónách je konstantn a je dána koncentrací vedoucího elektrolytu.

Netradiční záznam

V CIP se často použiv vodivostní detekce. Vodivost zóny vedoucího elektrolytu je nejvyšší, vodivost dalších zón postupn klesá. Při použit vodivostní detekce jsou proto primárním záznamem jaks „schody“ (měly by být klesající, ale obvykle se vynáší msto vodivosti odpor, takže jsou schody stoupající). Ukázka takového záznamu je na **Obr. 10**. Výška schodu dan látky je dána její vodivostí a tm pádem nese kvalitativn informaci. Jak bylo zmnno, koncentrace analytu je v jeho zóně za danch podmínek vdy stejn, takže větší koncentrace analytu ve vzorku se projeví prodlouženm jeho zóny. Velmi netradičn tedy výška schodu nese kvalitativn informaci a délka schodu informaci kvantitativn. V přpad záznamu na **Obr. 10** je schod látky B delší než schod látky A, ve vzorku bylo tedy přítomno více látky B.



Obr. 9 Princip isotachoforézy - zóny v kapiláře a rozdělení potenciálového rozdílu vloženého mezi konce kapiláry po délce kapiláry - (A) na začátku separace, (B) v pozdější fázi separace.

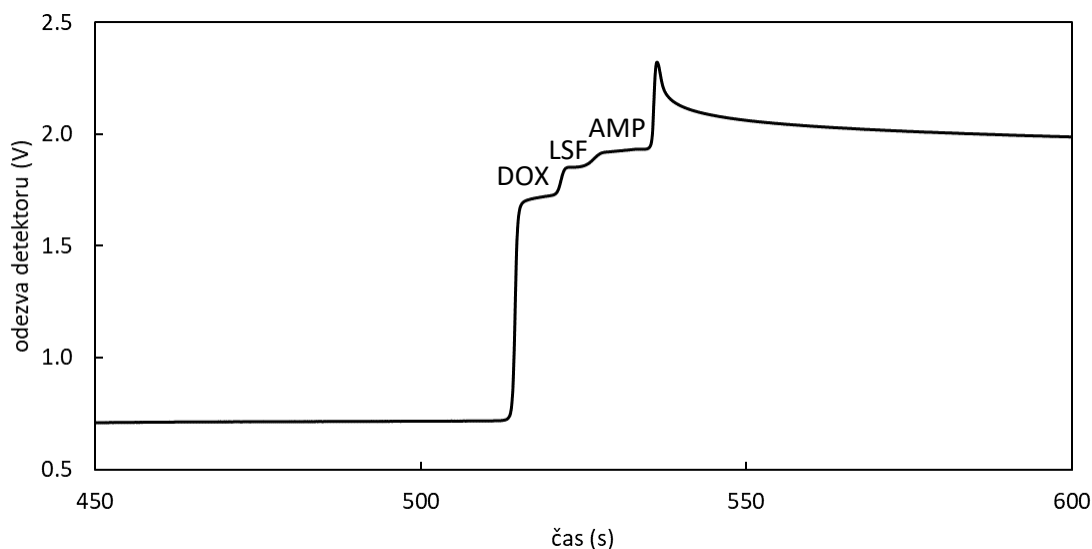


Obr. 10 Ukázka záznamu z CIPF s vodivostní detekcí.

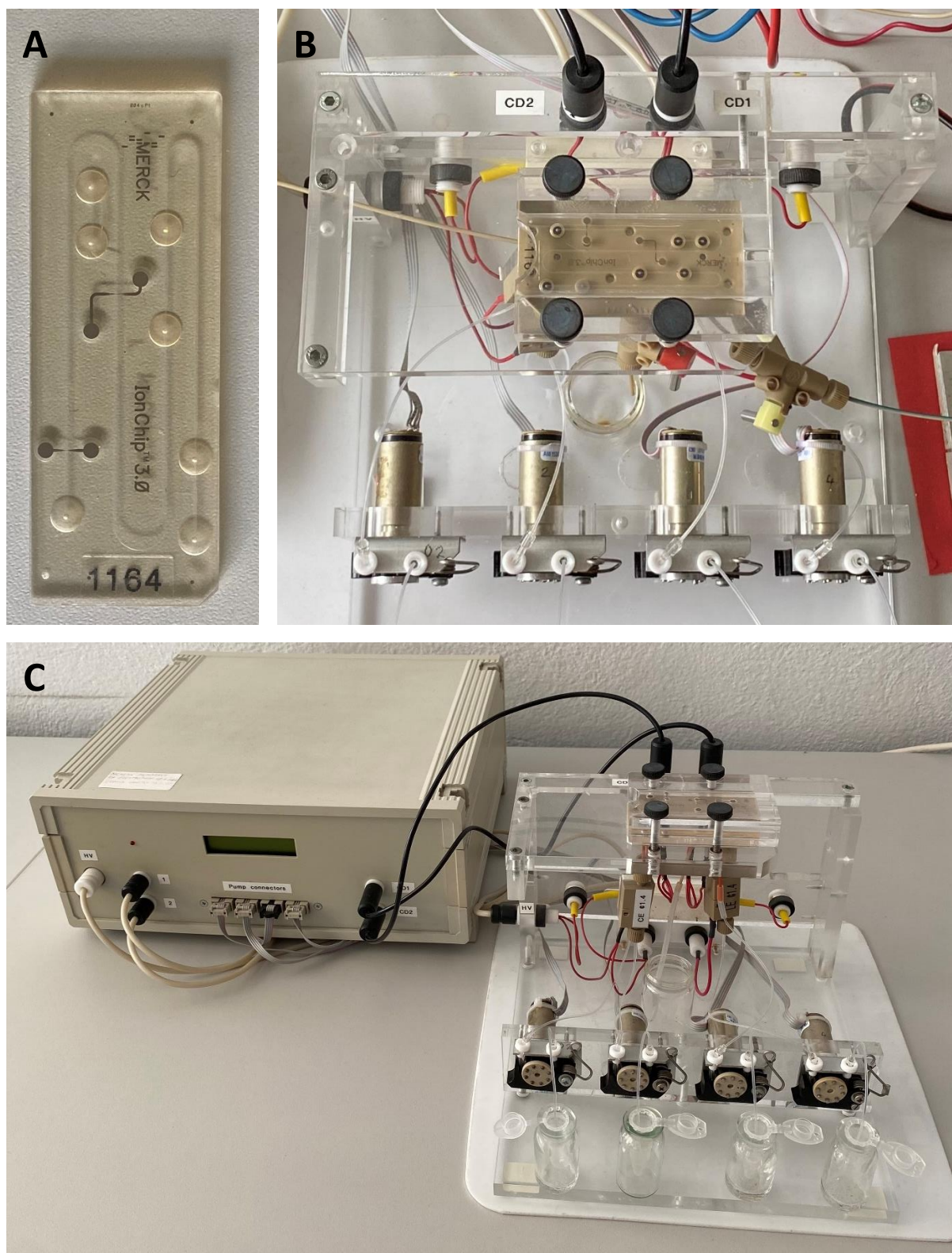
A jak to vypadá v realitě?

Záznam na **Obr. 10** schematicky naznačoval ideální stav. Realita je o něco méně idylická. Na **Obr. 11** je skutečný záznam izotachoforetické separace tří farmaceutických látek ve formě kationtů. Separace byla provedena na izotachoforetickém čipu. Fotografie samotného čipu a čipu s obslužným zařízením je na **Obr. 12**.

V popisu podmínek měření u **Obr. 11** si povšimněte složení vedoucího a koncového elektrolytu. Jedná se o stanovení kationtů, vedoucí elektrolyt proto obsahuje rychle migrující sodné ionty, které mají větší mobilitu než všechny tři analyty. Koncový elektrolyt obsahuje v tomto případě pouze kyselinu octovou. Takto může být někdy také řešen koncový elektrolyt. Vodivost (G) vedoucího elektrolytu je vyšší než vodivost koncového elektrolytu, což je v souladu s principem metody. Přídavek methyl hydroxyethylcelulózy do obou elektrolytů slouží k potlačení EOF, které je v ITP nezbytné.



Obr. 11 Izotachoforetická separace směsi účinných farmaceutických látek doxazosinu (DOX), lasofoxifenu (LSF) a amlodipinu (AMP) ve formě kationtů. **Vedoucí elektrolyt:** 10 mM CH_3COONa + 10 mM CH_3COOH + 0,1% methyl hydroxyethylcelulóza, pH = 4,56, G = 801 $\mu\text{S/cm}$. **Koncový elektrolyt:** 200 mM CH_3COOH + 0,1% methyl hydroxyethylcelulóza, pH = 2,73, G = 692 $\mu\text{S/cm}$.



Obr. 12 Izotachoforetický čip (A), jeho instalace a zapojení k obslužnému zařízení (B), celkový pohled na sestavu (C).

Prekoncentrace pomocí ITP

V případech, kdy je potřeba zvýšit citlivost měření, se někdy používá tzv. **přechodná isotachoforéza (angl. *transient isotachopheresis*)**. Při této metodě se do vzorku přidá vysoká koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu. Jinak se separace ale provádí za podmínek CZE, MECK nebo CGE. Do kapiláry se dávkuje velmi dlouhá zóna vzorku obohaceného o vedoucí a koncový elektrolyt (délka zóny může být až 30 % délky kapiláry). Díky dávkování dlouhé zóny se do kapiláry dostane relativně velké množství i takového analytu, který je ve vzorku přítomen ve velmi nízké koncentraci. Po vložení napětí se rychlé ionty vedoucího elektrolytu pohybují na přední straně zóny vzorku, ionty koncového elektrolytu na zadní straně. Ionty analytů se na základě principu ITP zaostří do relativně krátkých zón mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Jelikož je koncentrace vedoucího elektrolytu vysoká, je vysoká i koncentrace zón analytů. Díky tomu se i velmi naředěný analyt mnohonásobně zakoncentruje. Vzhledem k tomu, že však mimo zónu vzorku není vedoucí a koncový elektrolyt, ale BGE pro separaci pomocí CZE, MEKC nebo CGE, isotachoforéza je pouze přechodná a po zaostření zón přejde separace rychle do režimu CZE, MEKC nebo CGE.

Kapilára jako mikroreaktor

Na závěr bych rád zmínil jednu zajímavou možnost, kterou nám kapilární elektroforéza nabízí. Do elektroforetické kapiláry je možné vpravit odděleně zóny dvou nebo více látek, které je pak možno přímo v kapiláře smísit, nechat proběhnout jejich reakci a reakční produkty separovat a detegovat. Výhodou takového přístupu je vysoký stupeň automatizace, kterého lze dosáhnout, a také velmi nízká spotřeba reaktantů. Můžeme je totiž dávkovat opakovaně z jedné nádoby a pro každé měření spotřebovat pouze jednotky až desítky nanolitů. Pro provedení desítek experimentů nám tak stačí například jen několik mikrolitrů nákladného nebo obtížně získaného enzymového preparátu. Toho lze využít při sledování aktivity enzymů, kdy do kapiláry dávkujeme odděleně zóny enzymu a substrátu. Toto provedení je zvláště výhodné pro screening inhibitorů, kdy sledujeme, zda se přítomností potenciálního inhibitoru výrazně sníží aktivita enzymu. Vzhledem k tomu, že řada léčiv je založena právě na inhibici enzymů, má takový screening velký význam pro vývoj léčiv. Druhou možností využití této techniky je derivatizace analytů přímo v kapiláře pro jejich následnou separaci, detekci a stanovení.

Obecný postup takových měření je následující:

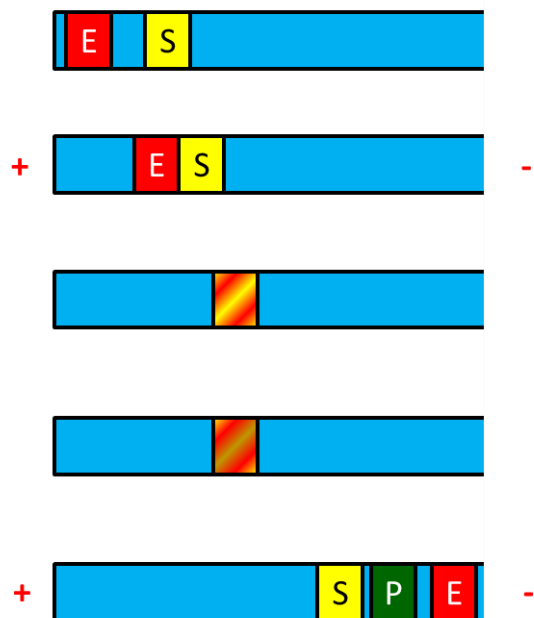
- 1) Dávkování oddělených zón reaktantů do kapiláry.
- 2) Smísení reaktantů v kapiláře.
- 3) Průběh reakce.
- 4) Vložení separačního napětí – separace a následná detekce výchozích látek a produktů reakce.

Kapilára jako míchačka

Kritickým krokem tohoto postupu je smísení zón reaktantů v kapiláře. Toho lze dosáhnout v zásadě dvěma způsoby. Můžeme využít buď elektroforetickou migraci nebo difúzi.

Elektroforetické mísení

Tento přístup je znázorněn na **Obr. 13**. Do kapiláry nadávkuje se odděleně zóna substrátu (S) a zóna enzymu (E). Obě látky musíme dávkovat v takovém pořadí, aby po vložení napětí migrovaly směrem k sobě, a ne od sebe. Následně vložíme napětí na vhodně dlouhou dobu tak, aby se zóny právě překryly. Pak napětí vypneme a necháme reakci probíhat. Po určité době vložíme separační napětí a separujeme a detegujeme zóny nezreagovaného substrátu, enzymu a vzniklého produktu.



Obr. 13 Schématické znázornění měření aktivity enzymu s elektroforetickým mísením zón v kapiláře.

Výhodou tohoto přístupu je, že známe koncentrace látek v jednotlivých zónách a známe tedy i poměrně přesně koncentrace reaktantů při průběhu reakce, takže touto metodou lze stanovovat i Michaelisovu konstantu a další parametry. Nevýhodou je, že musíme znát elektroforetické mobility reaktantů, abychom věděli, na jak dlouhou dobu přesně aplikovat napětí při mísení zón. Případě musíme tuto dobu experimentálně zjišťovat.

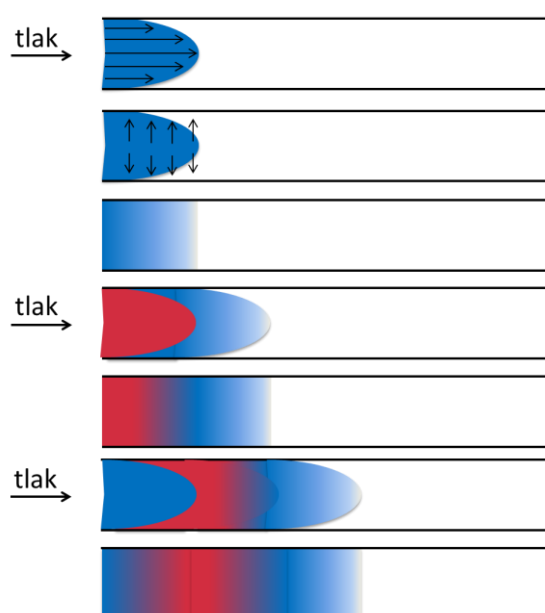
Difúzní mísení

Tento přístup je znázorněn na **Obr. 14**. V tomto případě jsou zóny do kapiláry dávkovány tlakem bezprostředně za sebou. U difúzního mísení se uplatňují specifické rozměry elektroforetické kapiláry, o kterých byla řeč v první lekci. Vzhledem k tomu, že vnitřní průměr kapiláry je pouhé desítky mikrometrů, probíhá difúze napříč kapilárou velmi rychle, prakticky okamžitě. Je-li tedy koncentrace nějaké látky ve středu kapiláry jiná než u stěny, dojde prakticky okamžitě k vyrovnání tohoto rozdílu prostřednictvím difúze. Naproti tomu délka kapiláry je několik desítek centimetrů, takže v podélném směru se koncentrační rozdíly uvnitř kapiláry difúzí prakticky nezmění ani po několika desítkách minut.

Dávkuje-li do kapiláry zónu nějaké látky tlakem, má tato zóna parabolický profil, jak je vidět v prvním poli **Obr. 14**. Jakmile tlak vypneme, difúze okamžitě vyrovná koncentrace dávkované látky (např. enzymu) v příčném směru kapiláry (druhé a třetí pole **Obr. 14**). Když poté dávkujeme zónu druhého reaktantu (např. substrátu), díky parabolickému profilu se tato zóna „zasune“ do zóny první

(čtvrté pole **Obr. 14**). Tím vzniká poměrně velké rozhraní obou zón, které je navíc z velké části orientováno v příčném směru, ve kterém dochází k rychlé difúzi. Po vypnutí tlaku dojde tedy k poměrně efektivnímu promísení zón příčnou difúzí (daleko efektivnějším, než kdyby šlo jen o difúzi přes rovné rozhraní dvou sousedících zón a mísení tak probíhalo pouze v podélném směru), jak je vidět v pátém poli **Obr. 14**. Často se pak dávkuje ještě jedna zóna prvního reaktantu, aby se mísení zefektivnilo (šesté a sedmé pole). Takto je možno mísit i více látek, např. enzym, substrát a inhibitor.

Nevýhodou této metody je, že neznáme přesné složení reakční zóny, a navíc tato zóna není homogenní, takže je obtížné provádět např. stanovení Michaelisovy konstanty. Na druhé straně je metoda naprosto postačující v situacích, kdy chceme porovnat aktivitu enzymu ve dvou různých případech, třeba při screeningu inhibitorů. Výhodou je, že nemusíme znát elektroforetické mobility reaktantů a ani jeden z nich v principu nemusí vykazovat elektroforetickou migraci, pokud ji vykazuje alespoň produkt reakce.



Obr. 14 Schématické znázornění mísení zón uvnitř kapiláry prostřednictvím difúze. Zóny modré a červené barvy označují oba mísené reaktanty.