

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Marie Chocenská

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Možnosti studia kinetiky bioafinitních interakcí – porovnání metod a jejich
využití**

Marie Chocenská

Bakalářská práce

2022

Vysoká škola: **Univerzita, Pardubice**

Fakulta: **chemicko-technologická**

Katedra: **biologických a biochemických věd**

Akademický rok: **2021 / 22**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Pro: **Marii Chocenskou**

Obor: **Zdravotní laborant**

Název tématu:

Možnosti studia kinetiky bioafinitních interakcí – porovnání metod a jejich využití

Anglický název tématu:

Possibilities of studying the kinetics of bioaffinity interactions - comparison of methods and their use

Zásady pro vypracování

Z dostupných odborných zdrojů vypracujte literární rešerši o možnostech monitorování kinetiky bioafinitních interakcí. Zaměřte se zejména na afinitní páry antigen-protilátka, enzym-substrát nebo enzym-inhibitor.

Popište možné metody, které lze pro studium afinitních interakcí využít, jejich principy a uspořádání. V závěru práce metody porovnejte z pohledu citlivosti a informací, které o interakcích poskytují.

Seznam odborné literatury: Pro vypracování rešerše využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, *apod.* Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Školitel specialista bakalářské práce:

Mgr. Nikola Mannová

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice mám právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Marie Chocenská

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a Mgr. Nikole Mannové za vedení mé práce, za odborné rady, vstřícný přístup, trpělivost a čas, který mi věnovaly při vypracování této práce. Velice děkuji za obětavý přístup po celou dobu tvorby mé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na popis metod využitelných pro studium kinetiky bioafinitních interakcí, hlavně na interakce antigen - protilátka. Popisuje jejich principy, uspořádání a provedení. Je zde popsána například afinitní chromatografie, izotermální titrační kalorimetrie či afinitní kapilární elektroforéza.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioafinitní interakce, kinetika, afinitní chromatografie, izotermální titrační kalorimetrie, afinitní kapilární elektroforéza

TITLE

Possibilities of studying the kinetics of bioaffinity interactions - comparison of methods and their use

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on the description of methods that can be used for studying the kinetics of bioaffinity interactions, mainly on antigen – antibody interactions. It describes their principles, arrangement and implementation. For example, affinity chromatography, isothermal titration calorimetry or affinity capillary electrophoresis are described here.

KEYWORDS

Bioaffinity interactions, kinetics, affinity chromatography, isothermal titration calorimetry, affinity capillary electrophoresis

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ÚVOD.....	11
1 Bioafinitní interakce	12
2 Metody studia kinetiky bioafinitních interakcí	12
2.1 Izotermální titrační kalorimetrie	13
2.1.1 Výhody a nevýhody měření izotermální titrační kalorimetrií.....	14
2.1.2 Příklady využití ITC pro kinetická měření	15
2.2 Afinitní chromatografie	15
2.2.1 Výhody a nevýhody afinitní chromatografie	17
2.2.2 Příklady využití afinitní chromatografie pro kinetická měření	18
2.3 Interferometrie biovrstev	18
2.3.1 Výhody a nevýhody interferometrie biovrstev	19
2.3.2 Příklady využití interferometrie biovrstev pro kinetická měření	19
2.4 Imunoanalytické metody.....	20
2.4.1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA).....	20
2.4.1.1 Typy uspořádání ELISA metody	21
Přímá imunoanalýza	22
Nepřímá imunoanalýza	22
Sendvičová imunoanalýza	22
Kompetitivní imunoanalýza.....	23
2.4.1.2 Výhody a nevýhody ELISA metody	24
2.4.1.3 Příklady využití enzymové imunoanalýzy na pevné fázi pro kinetická měření	24
2.4.2 Radioimunoanalýza.....	25
2.4.2.1 Příklady využití radioimunoanalýzy pro kinetická měření.....	26
2.4.3 Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza	26
2.4.3.1. Příklady využití elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy pro kinetická měření.....	27

2.5	Průtoková injekční analýza	27
2.6	Försterův rezonanční přenos energie	28
2.7	Povrchová plasmonová rezonance	30
2.7.1	Výhody a nevýhody povrchové plasmonové rezonance	32
2.7.2	Příklady využití povrchové plasmonové rezonance pro kinetická měření.....	33
2.8	Afinitní kapilární elektroforéza	33
2.8.1	Typy afinitní kapilární elektroforézy	34
2.8.1.1	Afinitní kapilární elektroforéza s posunutým tokem	34
2.8.1.2	Nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí	34
2.8.1.3	Vakantní afinitní kapilární elektroforéza	34
2.8.1.4	Frontální analýza v kapilární elektroforéze.....	35
2.8.1.5	Kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze	35
2.8.1.6	Průtok přes částečně naplněnou afinitní kapilární elektroforézu	36
2.8.2	Příklady využití metod kapilární elektroforézy pro kinetická měření	36
2.9	UV-VIS spektroskopie.....	37
2.9.1	Výhody a nevýhody UV-VIS spektroskopie.....	38
2.9.2	Příklady využití UV-VIS spektroskopie pro kinetická měření	38
2.10	Termoforéza v mikroměřítku	40
2.10.1	Experimentální nastavení termoforézy v mikroměřítku	40
2.10.2	Výhody termoforézy v mikroměřítku	41
2.10.3	Příklady využití termoforézy v mikroměřítku pro kinetická měření	41
	Použitá literatura	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Metody využívané pro studium bioafinitních interakcí.....	11
Obrázek 2: Schématické uspořádání přístroje pro izotermální titrační kalorimetrii MicroCal® (Malvern Panalytical Ltd., UK).	14
Obrázek 3: Obecné modely pro použití afinitní chromatografie pro kinetické analýzy interakcí	16
Obrázek 4: Schéma kinetiky vzniku afinitního komplexu mezi analytem s imobilizovaným ligandem v koloně.....	17
Obrázek 5: Mechanismus interferometrie biovrstev.	19
Obrázek 6: Obecné uspořádání ELISA metody.	21
Obrázek 7: Schéma provedení ELISA metody	23
Obrázek 8: Schéma provedení kompetitivní ELISA metody.....	24
Obrázek 9: Schéma provedení RIA metody.....	25
Obrázek 10: Schéma základního zapojení FIA.	27
Obrázek 11: Základní princip FRET.....	29
Obrázek 12: Nejběžnější geometrické uspořádání SPR (Kretschmannovo schéma).	31

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (z angl. affinity capillary electrophoresis)
B	koncentrace standardu
B ₀	koncentrace standardu v nepřítomnosti kompetitivního antigenu
BGE	základní elektrolyt (z angl. background electrolyte)
BLI	interferometrie biovrstev (z angl. biolayer interferometry)
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	účinnost Försterova rezonančního přenosu energie
ECL	elektrochemiluminiscence
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (z angl. electrochemiluminiscent immunoassay)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay)
EOF	elektroosmotický tok (z angl. electro-osmotic flow)
FACCE	kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze (z angl. frontal analysis continuous capillary electrophoresis)
FTPF-ACE	afinitní kapilární elektroforéza s průtočným částečným plněním kapiláry (z angl. flow through partial filling affinity capillary electrophoresis)
FIA	průtoková injekční analýza (z angl. flow injection analysis)
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)
ΔH	entalpie vazby
HPAC	vysokoúčinná afinitní chromatografie (z angl. high performance affinity chromatography)
ITC	izotermální titrační kalorimetrie (z angl. isothermal titration calorimetry)
K _a	rovnovážná konstanta
k ₁	asociační konstanta
k ₂	disociační konstanta
k ₁	asociační rychlostní konstanta
k ₋₁	disociační rychlostní konstanta
LOD	limit detekce (z angl. limit of detection)
MST	termoforéza v mikroměřítku (z angl. microscale thermophoresis)

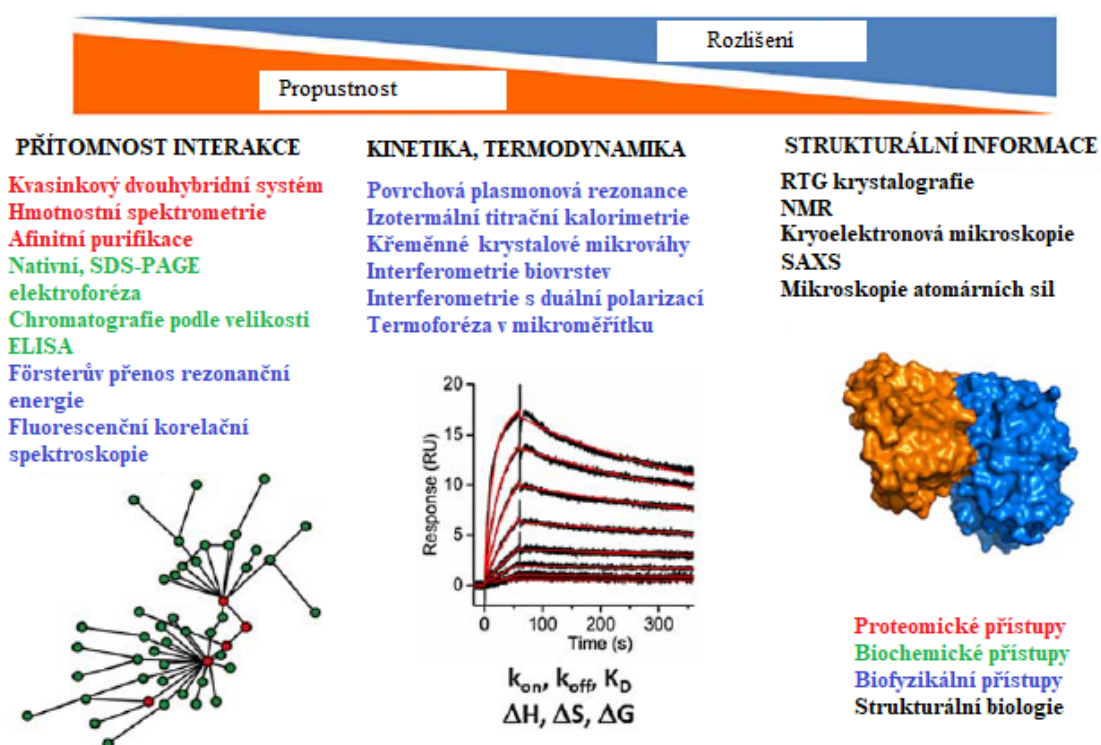
NECEEM	nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí (z angl. non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures)
QY	kvantový výnos donorů (z angl. quantum yield)
RI	index lomu (z angl. refractive index)
RIA	radioimunoanalýza
RNA	ribonukleová kyselina
SP	povrchový plasmon (z angl. surface plasmon)
SPPs	polaritony povrchového plasmonu (z angl. surface plasmon polaritons)
SPR	povrchová plasmonová rezonance (z angl. surface plasmon resonance)
UII	urotensin-II
VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza (z angl. vacancy affinity capillary electrophoresis)

ÚVOD

Interakce mezi molekulami v živých systémech jsou základem všech biologických procesů. Studium a identifikace těchto interakcí je proto stále velice důležitá pro pochopení buněčných procesů.

Ke studiu molekulárních interakcí jsou využívány techniky, které pomáhají objasnit jejich povahu, význam v živých systémech i potenciální způsoby, jak do nich zasahovat. Každá z technik používaných pro studium interakcí má své výhody i omezení a volba nejvhodnější metody se odvíjí od povahy studovaných molekul i informací, které lze danou metodou získat. Jen pomocí jedné techniky je velmi obtížné přesně reprodukovat interakce, ke kterým dochází za fyziologických podmínek. K relativně realistickému obrazu interakce může vést společné použití kombinace několika technik.

Na obrázku 1 jsou uvedeny metody pro studium těchto interakcí. V této práci jsou dále popsány zejména ty metody, které jsou využitelné ke studiu kinetiky bioafinitních interakcí se zaměřením na interakci antigen-protilátka.



Obrázek 1: Metody využívané pro studium bioafinitních interakcí. Převzato a upraveno z (1).

1 Bioafinitní interakce

Bioafinitní interakce jsou základem chemických reakcí a procesů uvnitř živých buněk. Detailní zkoumání těchto vysoce specifických interakcí nám může poskytnout lepší porozumění živým organismům. Umožňují nám lepší vhled do kontrolních a regulačních mechanismů, zejména pokud se jedná o růst buňky, její reprodukci či smrt. Jsou důležité i z medicínského pohledu při určování diagnóz a volbě terapie různých onemocnění. Metody pro jejich charakterizaci jsou podstatné i v základních biochemických výzkumech, vývoji léčiv a klinických diagnózách (2).

Mnoho z těchto procesů probíhá pomocí nekovalentních vazeb a účastní se jich základní biomolekuly, tedy peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, ale také hormony, léky, aj. Kromě celkové síly a termodynamiky těchto vazeb, je důležité zvažovat i kinetiku těchto interakcí. Pokud získáme informace o kinetice, můžeme lépe porozumět funkci těchto interakcí (3).

Tyto interakce jsou ovlivňovány mechanismy, které mohou měnit afinitu či kinetické parametry. Nejčastějším druhem této interakce je interakce proteinů. Mezi další druhy těchto interakcí patří například interakce antigen – protilátka, enzym – substrát, enzym – inhibitor, protein – nukleová kyselina, apod. (4).

Interakce protein-protein je proces, při kterém dochází ke spojení proteinů a tvorbě proteinového komplexu. Spojení jsou realizována pomocí vodíkových můstků nebo Van der Waalsových interakcí. Při studiu bioafinitních párů je důležité zvažovat jejich vlastnosti jako například elektrostatiku, hydrofobicitu, 3D strukturu celého komplexu a geometrickou komplementaritu vázaných proteinů. Komplementarita dvou proteinů se odvíjí od komplementarity jejich kontaktních zón. V těchto oblastech dochází ke kontaktu zmíněných molekul a následkem je vytvoření bioafinitního komplexu (5, 6). Důležitou roli hrají i faktory ovlivňující tyto vazby, například teplota, pH či iontová síla (7).

2 Metody studia kinetiky bioafinitních interakcí

Bioafinitní interakce probíhají různou rychlostí v závislosti na povaze interagujících látek, chemické přeměně, teplotě a dalších faktorech. Pochopení těchto interakcí je proto závislé i na sledování jejich kinetiky. Asociační a disociační rychlostní konstanty vyjadřují vztah rychlosti této interakce na koncentraci sledovaných látek. Bioafinitní interakce je reverzibilní proces, při

kterém dochází k tvorbě komplexu a tato asociace je charakterizována asociační konstantou (k_1), naopak rozpad komplexu je disociace (k_2) a je charakterizován disociační konstantou. Kinetika reakce nám poskytuje informace o mechanismu procesů (8).

Bioafinitní reakce jsou zapojeny v buněčném rozpoznávání a zprostředkovávání většiny buněčných procesů. Studování termodynamiky a kinetiky těchto interakcí je nezbytné pro studium funkcí a vlastností proteinů. Patologické jevy v buňkách, které vedou k onemocnění často zahrnují špatnou komunikaci mezi proteiny. Například změny ve vazebné kinetice způsobené mutacemi proteinových interakcí jsou hlavní příčinou dysfunkce dráhy apoptózy. Interakce biomolekul také úzce souvisí se skládáním jejich struktury (9). V této práci jsem se zaměřila na některé z využívaných metod, konkrétně: izotermální titrační kalorimetrii, afinitní chromatografii, interferometrii biovrstev, imunoanalytické metody, průtokovou injekční analýzu, Försterův přenos rezonanční energie, povrchovou plasmonovou rezonanci, afinitní kapilární elektroforézu, UV-VIS spektroskopii, sekvenční injekční analýzu a termoforézu v mikroměřítku.

2.1 Izotermální titrační kalorimetrie

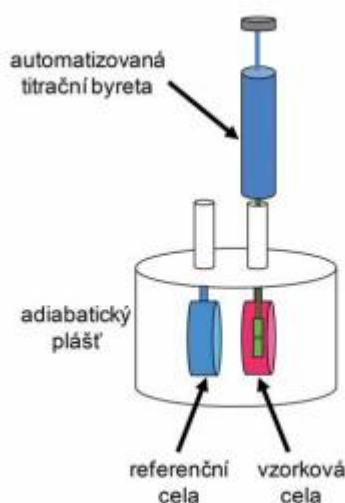
Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) je vhodnou metodou pro získání informací o termodynamice a kinetice biologických interakcí. Metoda ITC se používá převážně pro sledování kinetiky reakcí probíhajících delší dobu, obvykle řádově desítky minut až hodiny, aby nedošlo ke komplikacím kvůli době potřebné k detekci tepelného toku v kalorimetrické cele. Metoda ITC se běžně využívá pro charakterizaci kinetiky reakcí malých molekul, vazby biomolekul či enzymatické katalýzy (10).

Při této metodě dochází k opakovanému dávkování makromolekul ligandu nebo roztoku substrátu do vzorkovací cely, která obsahuje sledovaný vzorek, který interaguje s ligandem. Během každého dávkování přístroj zaznamená, jak velký výkon musí být dodán či odebrán k udržení konstantní teploty. U exotermických reakcí dochází k dočasnému úbytku výkonu od referenční hodnoty, zatímco u reakcí endotermických musí být výkon navýšen pro zachování konstantní teploty. Následnou analýzou tvaru a šířky píku získáme informace o reakční kinetice. V jediném experimentu je také možné získat podrobný termodynamický profil reakce. Měřením přenosu tepla při vazbě totiž přesně stanovíme vazebné konstanty (asociační konstanty k_1) nebo disociační konstanty (k_2), afinitu a entalpii vazby (ΔH). Šířka píku je přímo úměrná času nutnému k proběhnutí endotermické či exotermické reakce po každém přidání

ligandu/substrátu. Rychlé reakce trvající sekundy až desítky sekund, vedou k ostrým píkům. Zato reakce pomalé, trvající minuty až hodiny odpovídají píkům širokým (10).

ITC přístroj je poměrně jednoduchý. Mikrokalorimetr obsahuje dvě cely (obrázek 2), referenční celu naplněnou vodou a vzorkovací celu. Obě cely jsou regulovány na stejnou teplotu, kdy v referenční cele je teplota konstantní a v cele vzorkovací je teplota udržována zvyšováním či snižováním výkonu topného tělesa v důsledku probíhajících endotermických či exotermických reakcí uvnitř cely (1).

Exotermické reakce mají za následek přechodná snížení ve výkonu, zatímco endotermické reakce mají za následek přechodná zvýšení v dodávaném výkonu (10).



Obrázek 2: Schématické uspořádání přístroje pro izotermální titrační kalorimetrii *MicroCal®* (Malvern Panalytical Ltd., UK). Převzato a upraveno z (11).

2.1.1 Výhody a nevýhody měření izotermální titrační kalorimetrií

ITC nabízí několik výhod oproti dalším experimentálním kinetickým metodám jako jsou např. povrchová plazmonová rezonance (SPR – z angl. surface plasmon resonance), UV-VIS spektrofotometrie a nukleární magnetická rezonance. Mezi tyto výhody patří například možnost provést analýzu v roztoku za fyziologických podmínek, které odpovídají přirozeným podmínkám ve zdravém organismu, přesnost i pro velmi nízké koncentrace, možnost sledování reakce bez nutnosti značení spektroskopicky aktivními (např. fluorescenčními) látkami a možnost analýzy i zakalených roztoků (10).

Nevýhodou je nepřesné modelování tvaru ITC píků při rychlých reakcích. Důvodem nepřesnosti je fakt, že produkce tepla v ITC je detegována v rámci sekund až desítek sekund. Když reakce probíhají v podobném časovém rozmezí jako detekce, je náročné oddělit kinetiku reakce od odezvy samotného přístroje. Pro pomalejší reakce v řádu minut až hodin, může být odpověď přístroje zanedbána. Bohužel mnoho biologicky důležitých reakcí probíhá v řádu několika sekund a pro ně je tedy metoda ITC nevhodná (10).

Další velkou nevýhodou je poměrně velké množství vzorku potřebné pro analýzu ve srovnání s jinými metodami. Nicméně přechodem na modernější přístroje je tento problém postupně překonáván (1).

2.1.2 Příklady využití ITC pro kinetická měření

Burnouf, Ennifar a spol. (2012) prokázali, že ITC metoda umožňuje získat úplný kinetický popis různých systémů, od jednoduché vazby ligandu až po skládání RNA komplexu. Prováděli experimenty pomocí interakce HIV-1 reverzní transkriptázy a inhibitoru a skládáním riboswitchu spuštěným vazbou k jeho ligandu (12). Di Trani, Moitessier a spol. (2017) prováděli pomocí ITC rychlé testy kinetiky enzymu trypsinu, které trvaly pouze desítky sekund. Jejich studie ukázala, že běžné kalorimetry jsou schopné měřit s přesností na méně než sekundu (13). Luo, Chen, a spol. (2018) k lepšímu pochopení role pepsinu ve štěpení proteinů použili ITC metodu ke studiu kinetiky interakce pepsinu s hovězím sérovým albuminem jako substrátem. Byli schopni určit kinetické parametry pro pepsinem katalyzovanou hydrolyzu pepsinu (14).

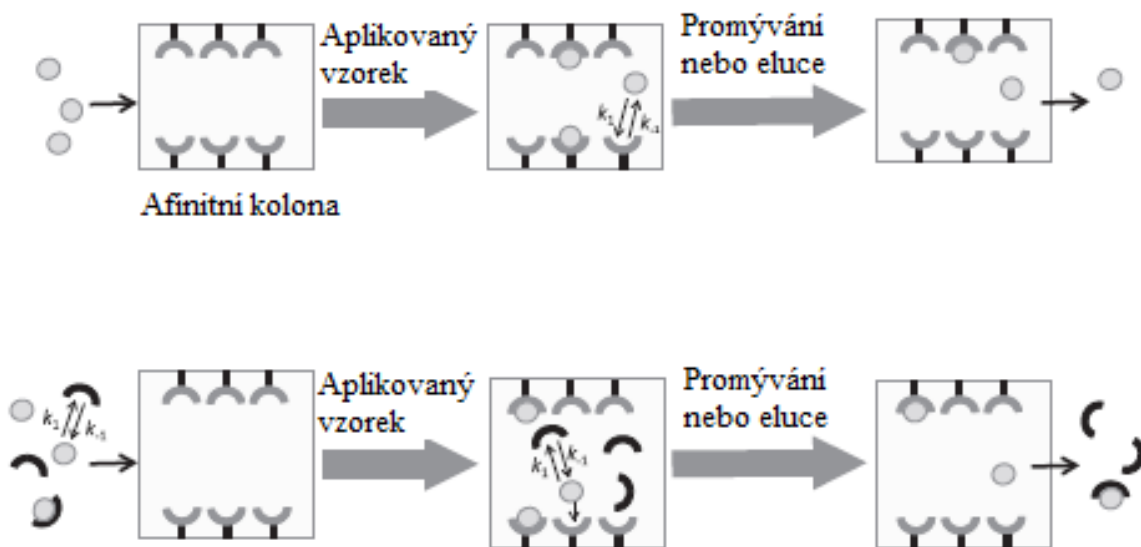
2.2 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda, která se používá pro selektivní separaci a analýzu látek v chemických a biologických systémech. Jedná se o typ kapalinové chromatografie, ve které se používá vhodná inertní stacionární fáze, která má vázaný specifický ligand, se kterým sledovaná látka selektivně interaguje (15). Tato biologicky příbuzná vazebná látka je označována jako afinitní ligand“ a může se jednat o imobilizované sekvence DNA nebo RNA, proteinu nebo enzymu, enzymového substrátu nebo inhibitoru. Schopnost ligandů specificky interagovat s cílovými analyty je základem selektivní separace využívané v afinitní

chromatografii. Díky své vysoké selektivitě je afinitní chromatografie velmi oblíbenou metodou v analýze biomolekul (16).

V minulosti se afinitní chromatografie prováděla za použití nosičů jako je agaróza nebo polyakrylamid, které z dnešního hlediska mají velmi nízkou účinnost. Dnes jsou více využívány vysokoúčinné křemičité a monolitické nosiče. Při použití těchto nosičů metodu označujeme jako vysokoúčinnou afinitní chromatografii (HPAC – z angl. high performance affinity chromatography). HPAC je efektivní a rychlou metodou pro selektivní separaci a analýzu látek v komplexních biologických vzorcích. Vývoj afinitní chromatografie našel uplatnění i ve studiu biologických interakcí a jejich kinetiky (16).

Na obrázku 3 jsou zobrazeny obecné přístupy k použití afinitní chromatografie ke studování kinetiky interakce mezi vzorkem a imobilizovaným ligandem a mezi vzorkem a imobilizovaným i volným ligandem. Konstanty k_1 a k_2 představují asociační a disociační rychlostní konstanty pro cílový analyt s daným ligandem.

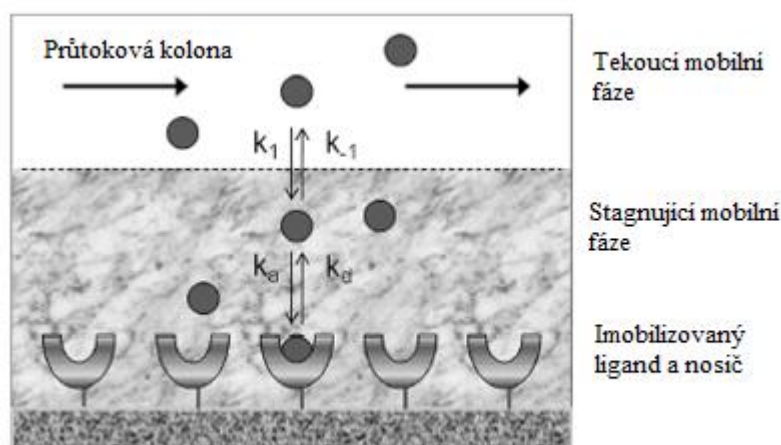


Obrázek 3: Obecné modely pro použití afinitní chromatografie pro kinetické analýzy interakcí. V horní části je zobrazena interakce vzorku a imobilizovaného ligandu. Ve spodní části je zobrazena interakce vzorku a volného i imobilizovaného ligandu. Převzato a upraveno z (3).

2.2.1 Využití afinitní chromatografie v kinetických studiích

Kinetika interakcí je zkoumána pomocí ligandu navázaného v afinitní koloně, zatímco druhý analyt je aplikován ve vzorku na kolonu. Získaný eluční profil pro aplikovaný analyt poté poskytuje informace o kinetice interakce analyt – ligand (16).

Na obrázku 4 je zobrazen detail k interakce analytu a imobilizovaného ligandu na chromatografickém nosiči. Jak analyt putuje kolonou v mobilní fázi, část analytu se dostane do oblasti se stagnující mobilní fází, kde může interagovat s imobilizovaným ligandem na stacionární fázi (16)



Obrázek 4: Schéma kinetiky vzniku afinitního komplexu mezi analytem s imobilizovaným ligandem v koloně. Převzato a upraveno z (16).

2.2.1 Výhody a nevýhody afinitní chromatografie

Jednou z hlavních výhod je možnost regenerace stacionární fáze s imobilizovaným ligandem pro opakované experimenty. Tato vlastnost zvyšuje reprodukovatelnost experimentů a snižuje cenu za jednotlivé analýzy. Další výhodou afinitní chromatografie je její variabilita. Správným nastavením experimentu můžeme měřit asociační konstanty v rozmezí od 10^3 do 10^7 $\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$ a disociační konstanty v rozmezí od 10^2 do 10^{-1}s^{-1} . Afinitní chromatografie je tak citlivá metoda a dá se využít pro studium relativně slabých interakcí. V mnoha výzkumech je afinitní chromatografie použita spolu s povrchovou plasmonovou rezonancí pro získání kompletních informací o kinetice reakce afinitního páru (3).

Detekce je prováděna až po eluci analytu či jiné složky vzorku z kolony. Z detekčních metod využívaných pro afinitní chromatografii jsou spektrofotometrie, fluorescenční spektrometrie nebo hmotnostní spektrometrie (3).

Pro získání stejných vlastností navázaného ligandu v afinitní koloně, které má tento ligand v přirozeném prostředí, je nutný správný výběr a nastavení podmínek imobilizace ligandu. Použití ligandu volně rozptýleného v roztoku není časté pro studium kinetiky, nejčastěji je využívána stacionární fáze s imobilizovaným ligandem (3).

2.2.2 Příklady využití afinitní chromatografie pro kinetická měření

Významným využitím afinitní chromatografie je studium kinetiky biologických interakcí ve vývoji léčiv. Jelikož kinetická měření interakcí léčiva v séru může pomoci v predikci farmakokinetických vlastností (16).

Tong a Hage (2011) využili metodu profilování píků a vysoce výkonné kolony k charakterizaci kinetiky interakce mezi chirálními soluty a lidským sérovým albuminem, jejich práce demonstrovala, jak může být metoda profilování píků přizpůsobena k současnému zkoumání kinetiky interakce několika látek s imobilizovaným proteinem (17). Dále například Mallik, Yoo a spol. (2009) analyzovali vazbu lék-protein pomocí imobilizovaného lidského sérového albuminu, jejich práce byla založena na použití pojiva v afinitních mikrokolonách pro rychlou extrakci a měření volného léku. Zjistili, že ultrarychlou extrakci lze použít pro měření volných frakcí některých léků ve směsi lék-protein (18). Arias, Rosenberg a spol. (2010) při zkoumání interakce 18-methoxykaronaridinu s nikotinovými acetylcholinovými receptory v různých konformačních stavech použili nelineární chromatografii k určení kinetických parametrů 18-methoxykaronaridinu (19).

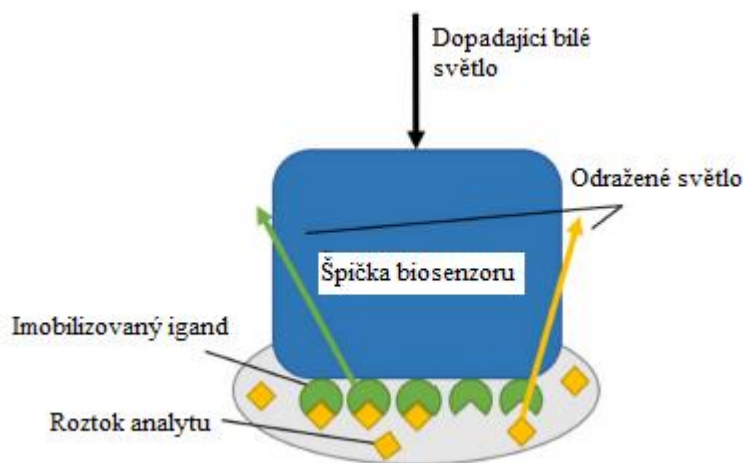
2.3 Interferometrie biovrstev

Interferometrie biovrstev (BLI – z angl. bio-layer interferometry) je optická metoda pro měření biomolekulárních interakcí v reálném čase bez nutnosti značení. Použitím BLI metody je možné studovat afinitu a kinetiku mnoha různých interakcí jako například interakcí protein-protein, protein-nukleová kyselina nebo protein-lipoprotein (1).

BLI systémy jsou specifické biosenzory, které mají na špičce senzoru imobilizovanou vrstvu rozpoznávacích molekul (ligandů). Špička biosenzoru je ponořena do jamek

obsahujících roztok analytu, kde dochází k vazbě molekul analytu k ligandu. Tato vazba je následně měřena jako změna interferenčního obrazce bílého světla (obrázek 5) (20).

Světlo je odrážené od dvou vrstev: biovrstvy a referenční vrstvy. Biovrstva je vrstva navázaného ligandu, která je následně ponořena do roztoku obsahujícího sledovaný analyt. Interakce mezi analytem a stacionárními molekulami ligandu způsobí změnu interferenčního obrazce, který je zaznamenáván v reálném čase (21).



Obrázek 5: Mechanismus interferometrie biovrstev. Převzato a upraveno z (20).

2.3.1 Výhody a nevýhody interferometrie biovrstev

Jednou z hlavních výhod této metody je možnost automatizace, kterou výrazně omezíme lidskou chybu. Další výhodou je měření vazebné kinetiky v reálném čase a bez nutnosti značení analytu fluorescenční nebo radioaktivní látkou (21). BLI využívá jednoduššího zařízení s biosenzorem ponořeným do roztoku analytu, díky čemuž má vyšší účinnost a jednodušší ovladatelnost než např. povrchová plasmonová rezonance (20).

Nevýhodou této metody je náročnost instrumentálního vybavení, nutnost využívat kvalitní čočky, zrcadla a polopropustné destičky (21).

2.3.2 Příklady využití interferometrie biovrstev pro kinetická měření

Lad, Clancy a spol. (2015) použili BLI metodu ke sledování hybridomů na základě míry disociace. Porovnávali tradiční metody (např. enzymovou imunoanalýzu na pevné fázi,

povrchovou plasmonovou rezonanci atd.) s touto metodou. Zjistili, že metodou BLI byli schopni identifikovat několik hybridomů, které tradičními metodami nebyly zjištěny (22). Sultana, Lee (2015) popsali přístup využívající streptavidin k BLI analýze interakcí DNA – protein a protein – protein. Pomocí nanomolárních množství vzorku byly schopni určit rovnovážné vazebné konstanty a rychlost asociace a disociace během několika minut (23). Dysinger, King (2012) využili schopnosti BLI metody k měření vazebné kinetiky terapeutických monoklonálních protilátek. Srovnávali BLI metodu s enzymovou imunoanalýzou na pevném nosiči a zjistili, že BLI testy mají menší citlivost, ale mnohem větší dynamický rozsah, což snižuje potřebu ředění vzorků (24).

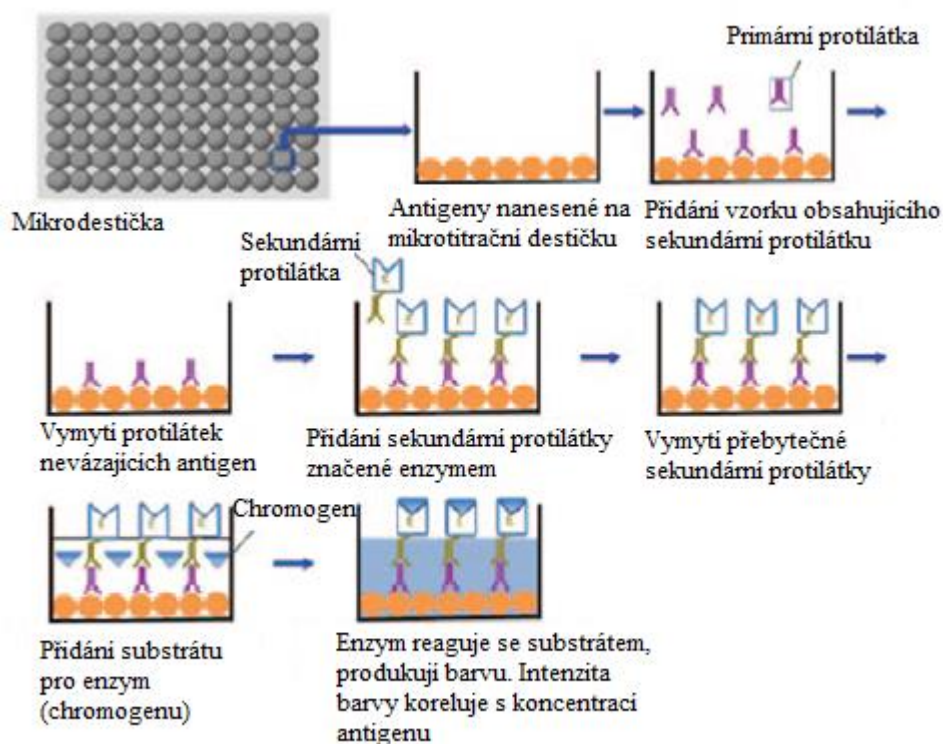
2.4 Imunoanalytické metody

Imunoanalytické metody jsou testy, při nichž se měří přítomnost a koncentrace látky v roztoku s použitím protilátky a antigenu. Využívají značení jednoho z reaktantů k určení látek ve vzorku. Ke značení mohou být využity radioizotopy, enzymy, fluoreskující látky atd. (25).

2.4.1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA)

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA – z angl. enzyme linked immunosorbent assay) je univerzální citlivá technika, která může být využita pro kvantitativní nebo kvalitativní určení prakticky jakéhokoliv antigenu či protilátky. Reagenty jsou stabilní a ve většině případů dobře dostupné. V její nejjednodušší formě analýza zahrnuje imobilizaci jednoho z reagentů (např. antigenu) na pevný povrch. Následuje přidání protilátek specifických pro antigen. Po promytí jsou přidány s enzymem konjugované sekundární protilátky proti primární protilátce. Po přidání substrátu vzniká barevný, fluorescenční nebo luminiscenční reakční produkt, díky němuž je možné určit přesnou koncentraci reaktantů i ve velmi nízkých koncentracích (26).

Nejpoužívanějšími enzymy jsou alkalická fosfatáza a křenuvová peroxidáza (27). Obecné uspořádání ELISA metody je zobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 6: *Obecné uspořádání ELISA metody. Převzato a upraveno z (27)*

2.4.1.1 Typy uspořádání ELISA metody

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi může být v homogenním nebo heterogenním uspořádání. Heterogenní uspořádání jsou častěji používána. Aby v těchto uspořádáních bylo možné zabránit narušení vazby antigen-protilátka ostatními molekulami v médiu, komplex antigen-protilátka je vázán ke stěnám zkumavek a všechno kromě komplexu je z média odstraněno pomocí promývacích procesů. V těchto uspořádáních jsou zásadní promývací fáze k oddělení vázaného antigenu od volného antigenu po interakci antigenu s protilátkou (28).

ELISA je heterogenní technikou používanou k detekci specifických protilátek a antigenů. Jelikož struktura a charakteristika měřených látek nejsou vždy stejné, byly vyvinuty různé typy této metody ke zvýšení specifity měření. Podle protilátky udávající signál dělíme ELISA metodu na přímou a nepřímou a dle uspořádání na sendvičovou a kompetitivní (28).

Přímá imunoanalýza

Je vhodná pro určení koncentrace vysokomolekulárních antigenů. Na povrch destičky je imobilizován antigen, ke kterému je následně přidána primární protilátka značená enzymem. Po inkubaci následuje promytí, při němž jsou odstraněny nevyvázané protilátky z jamky. Poté je přidán substrát, který reaguje s enzymem na primárních protilátkách a pomocí přidaného chromogenu produkuje signál přímo úměrný množství antigenu nebo protilátky (28).

Nepřímá imunoanalýza

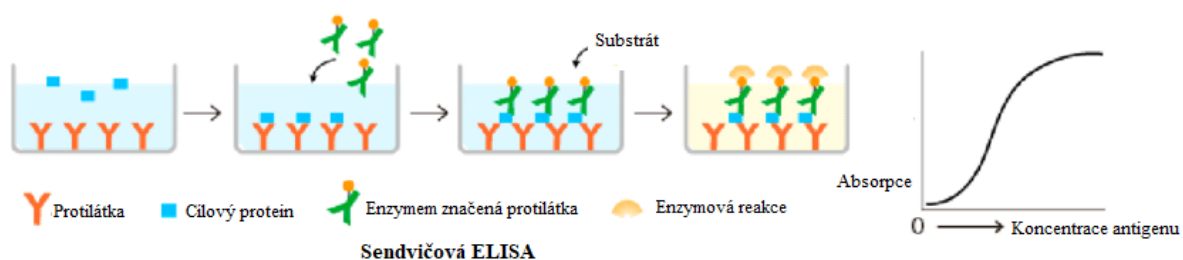
Rozdílem mezi přímou a nepřímou metodou je, že v případě nepřímé detekce je signál produkován značenou sekundární protilátkou s afinitou k primární protilátce. Tedy po imobilizaci antigenu na povrch destičky je následně přidána primární protilátka, která se specificky váže na antigen stejně jako u metody přímé. Poté je ale k imunokomplexu přidána sekundární protilátka značená enzymem, která se specificky váže na primární protilátku. Kvantifikace primární protilátky je provedena přidáním substrátu, který reaguje s enzymem a pomocí chromogenu způsobí barevnou změnu roztoku. Koncentrace primární protilátky přítomné ve vzorku přímo koreluje s intenzitou barvy (27).

Jednou z nevýhod této metody je, že imobilizace antigenu není specifická. Po aktivaci povrchu destičky by mohli s povrchem nespecificky reagovat nejen protilátky ze vzorku ale i všechny ostatní proteiny. Tudíž se využívá blokovacího inertního proteinu, který zaujme všechny zaktivovaná místa na destičce neobsazená antigenem a zabrání nespecifické vazbě vzorku (27).

Sendvičová imunoanalýza

Na povrch jamky je imobilizována primární protilátka zbytek povrchu je blokován inertním proteinem (např. hovězí sérový albumin). Vzorek je přidán do jamek a destička je inkubována a promyta. Promytí odstraní nenavázané antigeny a všechny ostatní složky ve vzorku. Následně jsou přidány sekundární protilátky označené enzymem se specifitou k antigenu (ale k odlišné antigenní determinantě než protilátka primární). Aby bylo možné identifikovat enzymovou aktivitu, je do média přidán enzymový substrát a detekováno

zbarvení. Zbarvení indikuje pozitivní výsledek, zatímco jeho nedostatek indikuje nedostatek enzymů, tedy sekundární protilátky, což znamená negativní výsledek. Metoda se nazývá sendvičová, jelikož zkoumaný antigen je umístěn mezi dvě protilátky a spolu vytváří pomyslný sendvič. Průběh této metody je zobrazen na obrázku 7. Tato metoda je dvakrát – pětkrát citlivější než jiné ELISA metody (28).

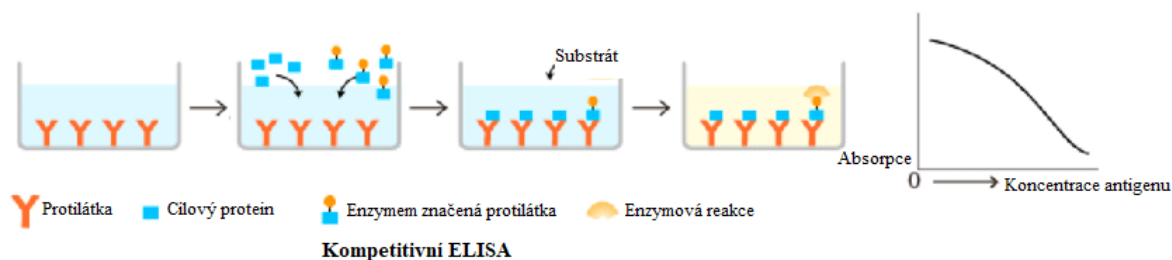


Obrázek 7: Schéma provedení ELISA metody. Převzato a upraveno z (29).

Kompetitivní imunoanalýza

Klíčová je v tomto uspořádání kompetitivní reakce mezi antigenem ve vzorku a antigenem vázaným na jamce mikrotitrační destičky s primární protilátkou. Primární protilátka spolu se vzorkem obsahujícím či neobsahujícím antigen jsou přidány do jamek, ve kterých je imobilizován stejný antigen. Čím je ve vzorku více antigenu, tím více primární protilátky se na něj naváže. Proto je menší množství primární protilátky dostupné k vazbě s antigenem imobilizovaným v jamkách. Po inkubační době je nenavázaná protilátka na imobilizovaný antigen vymyta pryč. Následuje přidání značené sekundární protilátky proti primární protilátce a substrátu pro získání signálu. Nepřítomnost barevné změny značí přítomnost antigenu ve vzorku. Průběh kompetitivní ELISA metody je zobrazen na obrázku 8.

Hlavní výhodou kompetitivní ELISA metody je vysoká citlivost ke kompozičním rozdílům v komplexních směsích antigenů (27).



Obrázek 8: Schéma provedení kompetitivní ELISA metody. Převzato a upraveno z (29).

2.4.1.2 Výhody a nevýhody ELISA metody

ELISA je citlivá a specifická analýza. Má širokou oblast aplikací díky její jednoduchosti a rychlosti (28). Umožňuje detekci všech typů biologických molekul i ve velmi malých koncentracích a množstvích (27). ELISA je téměř stejně citlivou metodou jako RIA a nevyžaduje speciální vybavení nebo radioaktivní značení. Nicméně její spolehlivost je ve srovnání s RIA nízká (28).

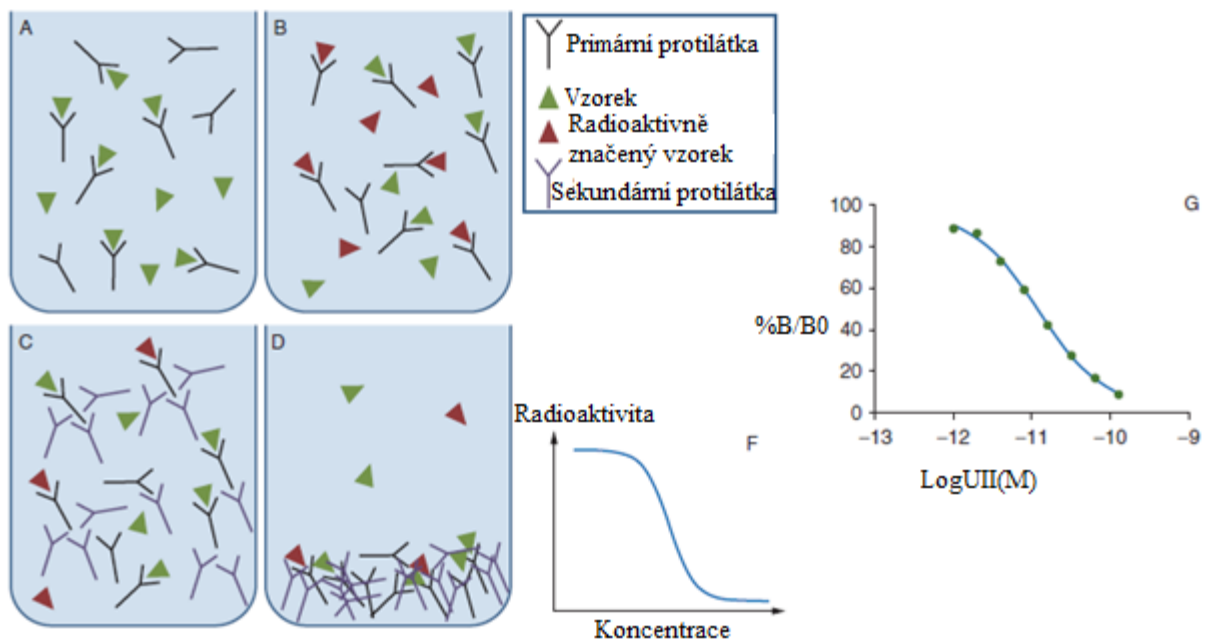
2.4.1.3 Příklady využití enzymové imunoanalýzy na pevné fázi pro kinetická měření

Alban, Gastpar (2001) vyvinuli ELISA screeningový test pro studium interakcí mezi sulfatovanými polysacharidy a proteiny. Zjištěné výsledky odpovídaly těm zjištěným pomocí gelové permeační chromatografie a afinitní gelové elektroforézy. Navíc ELISA je jednodušší na provedení, levná a vysoce citlivá (30). Syedbasha, Linnik a spol. (2016) popsali dva rychlé a spolehlivé způsoby pro zkoumání interakce ligand – receptor založené na ELISA metodě. Tato metoda umožňuje vytvoření vazebné křivky a dalším analyzováním dat odhadnutí disociační konstanty (31). Martínet-Sernández, Orbegozo-Medina a spol. (2016) zkoumali interakce mezi lipopolysacharidy a několika proteiny a peptidy pomocí několika ELISA uspořádání. Zjistili, že některé ELISA uspořádání lze použít k testování schopnosti peptidů nebo proteinů vázat lipopolysacharidy a zároveň poskytovat cenné informace o způsobu interakce (32).

2.4.2 Radioimunoanalýza

Pro radioimunoanalýzu (RIA) je typické kompetitivní uspořádání. Nejprve je vzorek antigenu inkubován společně s primární protilátkou, což umožňuje tomuto antigenu se navázat na vazebná místa protilátky. Poté je přidán radioaktivně značený antigen. Radioaktivně značený antigen soutěží s antigenem ve vzorku a vytěsňuje ho z vazebných míst protilátky. Čím více je antigenu ve vzorku, tím méně radioaktivně značeného antigenu je schopno se vázat na protilátku. Následně je vhodnou separační technikou oddělen volný antigen od vázaného s protilátkou. Pomocí změření radioaktivity je možné určit množství radioaktivně značeného antigenu, který byl navázán na protilátku a tím pádem i koncentraci antigenu ve vzorku (33). Na obrázku 9 je znázorněn schéma provedení RIA metody.

Nevýhodami RIA metody je použití radioaktivního značení (obvykle [^{125}I]) a proto krátká životnost, náročná manipulace a vznik radioaktivního odpadu. Naopak výhodou je, že RIA nevyužívá enzymy a z toho důvodu se snižuje riziko interference samotného vzorku (33).



Obrázek 9: Schéma provedení RIA metody (A) Vzorek je inkubován s primární protilátkou. (B) Poté je přidán radioaktivně značený vzorek probíhá soutěž o vazebná místa primární protilátky. (C) Sekundární protilátka se váže k primární protilátce a způsobí její vysrážení z roztoku. (D) Centrifugace vytvoří z komplexu antigen-protilátka peletu. (F) Příklad typické standardní křivky. (G) Standardní křivka pro urotensin-II (UII), kde množství vázaného radioaktivního jódu je vyjádřeno jako B/B_0 , což je poměr vazby v každé koncentraci standardu B a při nepřítomnosti kompetitivního antigenu B_0 . Vzorky analytu v biologických vzorcích by měly ležet na rovné části křivky. Převzato a upraveno z (33).

2.4.2.1 Příklady využití radioimunoanalýzy pro kinetická měření

Higashi, Yukari a spol. (2005) metodou RIA porovnávali kinetiku digoxinu s použitím antiséra-I a antiséra-II a vyhodnocovali interakci lék – lék s digoxinem a glukokortikoidy u potkanů (34). Nestor, Andersson a spol. (2008) využili rotační RIA technologii k detekování interakce protein – buňka v reálném čase. Jejich práce se zabývala charakterizací protilátek značených ^{111}I a ^{177}Lu vázajících se na CD44v6. Práce s touto RIA technologií umožnila podrobnější studie těchto interakcí (35). Ding R., Tayrouz Y. a spol. (2004) sledovali farmakokinetické interakce mezi digoxinem a ritonavirem, v této práci použili RIA metodu ke stanovení koncentrace digoxinu v plazmě a moči. Následně určili kinetiku digoxinu pomocí analýzy plochy pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace na čase pro digoxin (36).

2.4.3 Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza využívá efektu elektrochemiluminiscence (ECL), což je luminiscence produkovaná během elektrochemických exergonických reakcí, způsobená přestupem elektronů elektrochemického meziproduktu z excitovaného stavu do stavu základního (37).

Při ECL nejprve dochází k přenosu heterogenních elektronů na elektrodě a vzniká volný radikál. Signál ECL je detekován, když se elektrony z excitovaného stavu vrátí do základního. Emise fotonu je identifikována při konkrétní vlnové délce pomocí energetické mezery mezi těmito dvěma stavy (37).

Při elektrochemiluminiscenční imunoanalýze (ECLIA) nejsou použity žádné radioizotopy, proto je šetrnější k životnímu prostředí. ECLIA je velmi citlivou metodou, protože některé její značky, například rutheniový komplex, mohou být regenerovány na elektrodě. A tím poskytují možnost detekování analytů i ve velmi nízkých koncentracích. ECLIA analýza je také velmi rychlá trvá pouze několik sekund. Při hodnocení metody lze využít mnoha parametrů – intenzity generované luminiscence, použitého napětí nebo vlnové délky (37).

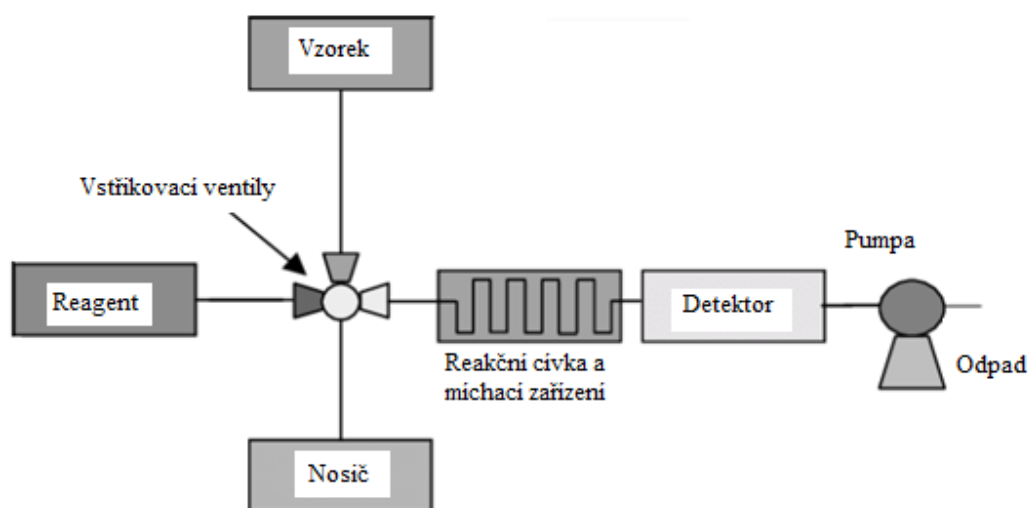
ECLIA je jednou z nejslibnějších metod v klinických diagnózách a monitorování životního prostředí (37).

2.4.3.1. Příklady využití elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy pro kinetická měření

Lazar, Rabe a spol. (2020) sledovali vliv kinetiky a neutralizace protilátek v krvi a mateřském mléce na reaktivaci cytomegaloviru během laktace. Pomocí ECLIA metody testovali vazbu cytomegaloviru a protilátek (38). Giannella, Righi a spol. (2022) využili ECLIA test k detekci protilátky odpovídající na vakcínu proti COVID-19 a hodnotili kinetiku této protilátkové odpovědi (39).

2.5 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA – z angl. flow injection analysis) je metodou kontinuální průtokové analýzy založené na kontrolované disperzi vzorku. Vzorek je vstříkovaný do inertního nosného proudu v reprodukovatelném objemu v přesných časových intervalech do proudu takovým způsobem, že tento tok vstříkovaním není narušován. Odezva detektoru je závislá na čase a závisí na disperzi vzorku do okolního nosiče. Když dojde k reakci analytu s nosičem, je detegován produkt reakce. Ve FIA analyzátoch je možné dávkovat 200-400 vzorků za hodinu. Výsledkem měření jsou ostré píky, jejichž výšku ovlivňuje čas, který vzorek v analyzátoru stráví. FIA je kinetickou metodou analýzy (40). Schématické zapojení průtokové injekční analýzy je na obrázku 10.



Obrázek 10: Schéma základního zapojení FIA. Převzato a upraveno z (41).

Vzorek nadávkovaný do tekoucího proudu se zpočátku chová jako zátka. Jak tato zátka putuje po proudu, rozptyluje se a smíchává se s nosným proudem. Pro většinu FIA systémů je charakteristický laminární průtok. V laminárním průtoku lze tekutinu považovat za rozdělenou do nekonečného množství rychlostních profilů. Maximální rychlosti je dosaženo ve středu proudu. Další dva procesy, ke kterým dochází jsou: molekulární difúze v podélném směru (rovnoběžně se směrem průtoku) a molekulární difúze v radiálním směru (kolmá se směrem průtoku). Disperze musí být kontrolována kvůli poklesu citlivosti metody. Objem dávkovaného vzorku je důležitou proměnnou, která může být použita ke změně disperze vzorku. Jak stoupá objem vzorku, stoupá i výška píku a citlivost (40).

Prakticky jakékoliv detektory mohou být používány ve FIA metodě. Příklady detektorů používaných ve FIA systémech jsou: fluorometrické, cheluminiscenční, coulometrické, spektrofotometrické, nefelometrické apod. FIA metoda může být považována za HPLC bez kolony. V HPLC je specifita zajištěna kolonou, zatímco FIA metodě poskytuje specifitu kombinace chemie a detektorů (40).

FIA má mnoho výhod, jednou z nich je její automatizace v přípravě a detekci vzorku, jednoduchost FIA konfigurace, vysoká vzorkovací rychlost, rychlý čas odezvy, menší spotřeba vzorku a činidel, a proto i menší produkce odpadu, jednoduché a levné přístrojové vybavení (40).

Zitka, Huska a spol. (2007) použitím FIA metody vyšetřovali interakce glutathion – platina (II). Ukázali, že FIA metodou ve spojení s elektrochemickou detekcí je vhodná pro přímou detekci různých forem glutathionu, ale i pro zkoumání interakcí mezi thioly a cytostatiky (42).

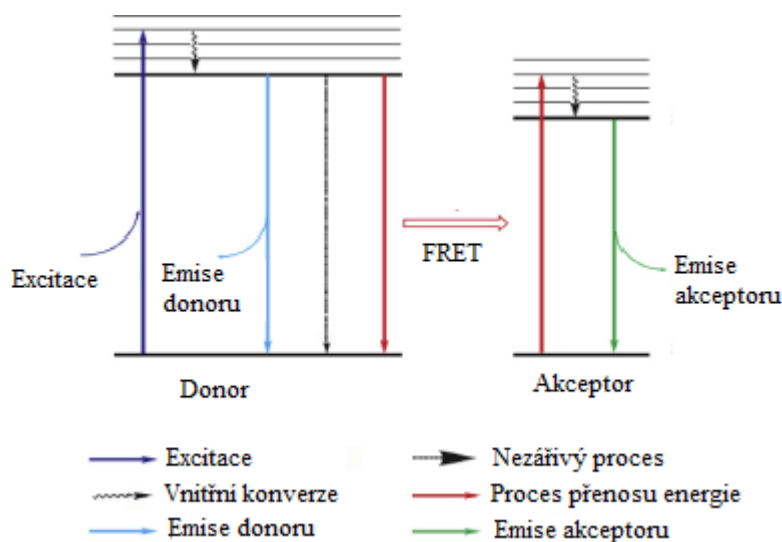
2.6 Försterův rezonanční přenos energie

Försterův rezonanční přenos energie neboli fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET z angl. fluorescence resonance energy transfer) umožňuje identifikaci molekulových párů v těsné blízkosti a je zvláště vhodný pro studium mezibuněčných interakcí (1). Často je také využíván ke studiu proteinů a jejich interakcí. Metoda FRET měřením vzdálenosti mezi doménami proteinů, dokáže získat informace o jejich konformačních změnách způsobených například během denaturace, skládání proteinů a jejich interakcí (43). FRET je důležitým fyzikálním jevem a díky němu je možné porozumět některým biologickým systémům. Stále více se používá v biomedicínských výzkumech a při vývoji léků (44).

FRET je proces nezářivého přenosu energie od donoru k akceptoru pomocí interakce dipól-dipól. Kvantifikace přenosu energie je ovlivněna několika faktory: vzdálenost donoru a akceptoru, kvantový výnos donorů (QY), absorpční koeficient akceptoru (ϵ_{max}), orientace donoru a akceptoru a překryv mezi emisním spektrem donoru a absorpčním spektrem akceptoru (45).

Mechanismus FRET zahrnuje donorový fluorofor v excitovaném elektronovém stavu, který je schopen přenášet svou excitační energii k blízkému akceptorovému chromoforu prostřednictvím interakce dipól-dipól (44). Excitovaný donor stimuluje akceptor do excitovaného stavu a donor se dostává do počátečního nefluorescenčního stavu (45). Základní princip FRET metody je vyobrazen na obrázku 11.

Účinnost FRET (E) je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, proto je FRET velmi citlivý k malým změnám ve vzdálenosti (46). Pro funkčnost metody FRET musí být vzdálenost mezi akceptorem a donorem od 1 do 10 nm (45).



Obrázek 11: Základní princip FRET. Převzato a upraveno z (46).

Detekce ve FRET probíhá pomocí fluorescenčního spektrofotometru nebo mikroskopu. Při excitaci donoru se detekuje buď úbytek intenzity fluorescence donoru nebo jako zvýšení v intenzita fluorescence akceptoru (pokud je akceptor fluorescenční) anebo kombinace těchto dvou efektů (46).

2.6.1 Využití Försterova rezonančního přenosu energie pro studium interakcí

Závislost účinnosti FRET na vzdálenosti je široce využívána při studiu struktury a dynamiky proteinů a nukleových kyselin, v detekci a vizualizaci intermolekulárních asociací a při vývoji testů intermolekulárních vazeb (44).

FRET je užitečným nástrojem v molekulární biologii. Techniky proměření FRET jsou stále více sofistikované a přesné, proto jsou vhodné pro řadu aplikací při zkoumání struktur, konformačních změn a interakcí mezi molekulami. FRET je i vhodným indikátorem biochemických procesů (44).

Nesmelov, Agafonov a spol. (2011) touto metodou studovali současně strukturu a kinetiku myosinu, ve své práci dokázali, že FRET metoda umožňuje přímou analýzu strukturální kinetiky řádově v milisekundách, což vede k jednoznačnému určení kinetiky a termodynamiky systému (47). Biener, Chalrier a spol. (2005) využili tuto metodu ke zobrazení kinetiky oligomerizace leptinového receptoru v jednotlivých buňkách, FRET mikroskopie jim umožnila studovat události související s leptinovým receptorem na plazmatické membráně a kinetiku interakcí leptinového receptoru (48). Li, Augustine a spol (2007) určovali kinetiku vazby komplexinu k membránově ukotveným SNARE komplexům pomocí FRET na úrovni jednotlivých molekul, což jim umožnilo přímé sledování na čase závislého FRET signálu generovaného interakcemi mezi jednotlivými SNARE komplexy a komplexinem (49).

2.7 Povrchová plasmonová rezonance

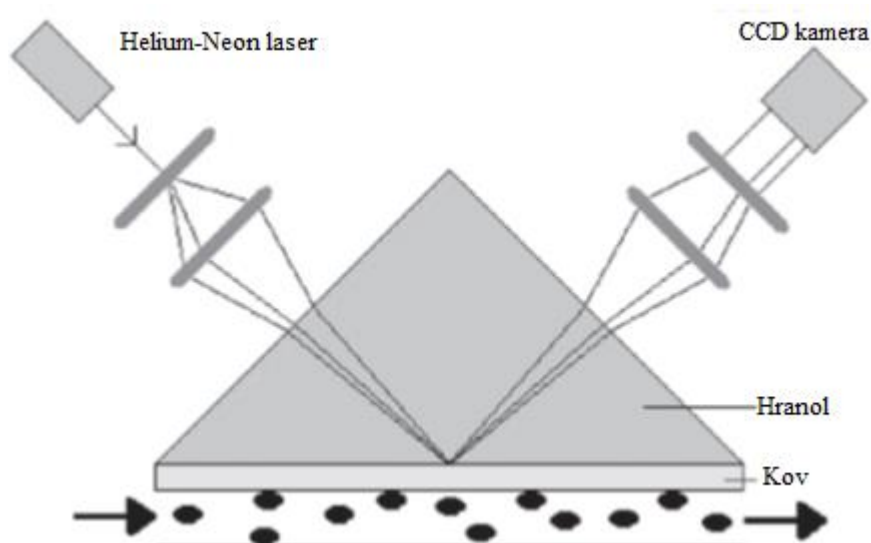
Povrchová plasmonová rezonance (SPR – z angl. surface plasmon resonance) je jev rezonanční oscilace elektronů na rozmezí vrstev materiálů o různé optické hustotě. Jev je vyvolán elektromagnetickou vlnou, jež splňuje podmínky rezonance. Typicky lze tento jev pozorovat na kovových površích typicky zlato a stříbro (50).

Tato neinvazivní metoda se používá pro měření kinetiky bioafinitních interakcí v reálném čase například pro interakce antigen-protilátka, hybridizace DNA, interakce enzym-substrát, epitopové mapování, studium konformace proteinů a obecně sledování bioafinitních reakcí bez nutnosti značení indikátorem (50).

Většina SPR zařízení se skládá z optického hranolu, pokovaného senzoru, mikrofluidního systému pro aplikaci nosné kapaliny a vzorku, detektoru/software. Měření

probíhá buď v konstantním toku (kinetická měření) nebo je tok po aplikaci vzorku zastaven (měření afinity). Součástí měřicí cely by měl být tepelný senzor pro důsledné měření teploty, neboť kolísání teploty může značně ovlivnit nejenom odezvu SPR senzoru, ale i kinetiku a afinitu biomolekulárních reakcí (51).

Principem SPR je, že zlomek světelné energie dopadající pod přesně definovaným úhlem může interagovat s delokalizovanými elektrony v daném povrchu, tím pádem se sníží intenzita odraženého světla. Za jistých podmínek mohou být tyto elektrony excitovány fotony, tím dojde ke vzniku povrchového plasmonu. Nejběžnějším geometrickým uspořádáním SPR je Kretschmannovo schéma, které je zobrazeno na obrázku 12 (52).



Obrázek 12: Nejběžnější geometrické uspořádání SPR (Kretschmannovo schéma).
Převzato a upraveno z (52).

Povrchové plasmony patří do kvazičástic, které vykazují vlnově-částicový dualismus. Vyskytují se primárně na povrchu látek obsahující volné elektrony jako jsou například kovy. Plasmonem můžeme rozumět oscilaci hustoty volných elektronů s ohledem na kladné ionty v kovu. Termín „povrchový plasmon“ (SP – z angl. surface plasmon) označuje vlnu hustoty náboje šířící se po povrchu kovu. Interakce fotonů dopadajících na povrch kovu s povrchovými plasmony vytvářejí takzvané polaritony povrchového plasmonu (SPPs – z angl. surface plasmon polaritons), což jsou kvazičástice složené z povrchových plasmonů a fotonů. Vlnové délky fotonů se mění se středním indexem lomu prostřednictvím disperze, ale jejich oscilační frekvence zůstávají nezměněny (51).

SPPs jsou excitovány při specifickém úhlu (úhel SPR) pro daný monochromatický světelný zdroj. Za daných optických a materiálových podmínek SPR úhel závisí pouze na

indexu lomu média. Index lomu (RI – z angl. refractive index) dielektrického média je jednou z nejcitlivějších proměnných souvisejících s jevy v blízkém poli, jako je například transport, změny teploty, vypařování a chemické reakce. Citlivost SPR metody je definována poměrem změny ve výstupním signálu ke změně měřené veličiny (index lomu), zatímco rozlišení je definováno nejmenšími změnami indexu lomu, který způsobí detekovatelnou změnu ve výstupu ze senzoru. Mez detekce (LOD – z angl. limit of detection) dosažená s využitím SPR technologií je odhadována na $1 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$ vázaného biomateriálu na povrchu senzoru (51).

2.7.1 Výhody a nevýhody povrchové plasmonové rezonance

Hlavními výhodami SPR metod jsou jejich neinvazivní detekce bez nutnosti značení indikátorem a sledování vazebných změn v reálném čase. SPR detekce umožňuje přímé měření afinity a kinetických veličin biomolekulárních interakcí a nevyžaduje značení indikátorem (např. fluorescenčním, radioaktivním), což je důležité kvůli možnému narušení struktury analytu vazbou indikátoru (51).

Možnost zaznamenávat i velmi malé změny indexu lomu nám nabízí příležitost k měření biologických interakcí, kdy sledujeme změny indexu lomu média v blízkosti kovového povrchu senzoru. Těmito změnami lze přesně měřit adsorpci molekul na kovový povrch a jejich případné interakce se specifickými ligandy (50).

Ačkoliv jsou SPR techniky velmi populární a vedou k významným objevům a lepšímu porozumění biologickým interakcím, jako jiné analytické techniky i SPR metody mají své limity. Často je složité při analýzách malých molekul odlišit skutečný signál od šumu. SPR systémy využívají měření změny úhlu odraženého světla, která je úměrná velikosti molekuly a hustoty analytu. Malé molekuly však produkují slabý signál (52).

Citlivost je dostatečná pro biologické testy sloučenin s vysokou molekulovou hmotností, jako protilátky nebo DNA. Je však nutné zvýšení citlivosti pro látky s malou molekulovou hmotností ($< 500 \text{ Da}$), jako jsou mykotoxiny, léky, vitamíny, atd. Toho lze dosáhnout pomocí nanostrukturovaných substrátů (například zlatých nanočástic), na které je sledovaný vzorek navázán (51).

Za další nevýhodu může být považována nutnost volby vhodných imobilizačních látek. Po vazbě na senzor musí být totiž zachována jejich biologická aktivita a zároveň i aktivita látek na ně se vázajících. Jednou z možností, jak tohoto dosáhnout je funkcionalizovat povrch senzoru monoklonálními protilátkami, které vazbou pouze jedné determinanty zajistí přesné

zachycení analyzovaných antigenů. Tato varianta je však náročná z pohledu dostupnosti protilátek a v případě jejich výroby i z finančního hlediska (52).

2.7.2 Příklady využití povrchové plasmonové rezonance pro kinetická měření

Katsamba, Park a spol. (2002) použili Biacore technologii založenou na povrchové plasmonové rezonanci, aby získali přehled o interakci mezi RNA a proteiny nesoucími RNA rozpoznávající domény. Tato technologie má schopnost získávat kvalitní informace o kinetice interakcí RNA – protein. Takové aplikace mohou mít uplatnění při vývoji léčiv, které účinkují cílením na RNA zasahují do interakcí RNA - protein (53). De-los Santos Álvarez a Lobo-Castanón (2009) studovali, jak modifikace RNA aptameru vyvinutého proti neomycinu B ovlivňuje afinitu interakce s malými molekulami. Použitím SPR a faradaické impedanční spektroskopie byla vypočtena afinitní konstanta (54). Wang, Shah a spol. (2011) použili SPR techniku ke stanovení kinetiky adsorpce a agregace β -amyloidu na samonosné jednovrstvé povrchy. Jejich výsledky osvětlily agregaci β -amyloidu na buněčnou membránu (55).

2.8 Afinitní kapilární elektroforéza

Elektroforetické techniky jsou schopné izolovat analyt od směsi a detekovat ho prostřednictvím různých detektorů. V klasické kapilární elektroforéze nastává separace pomocí nescifických interakcí mezi analytem a stacionární fází v kapiláře. Analyty jsou separovány na základě rozdílů v jejich elektroforetických mobilitách. Afinitní kapilární elektroforéza (ACE – z angl. affinity capillary electrophoresis) umožňuje vysoce specifickou separaci díky použití specifických ligandů, jako jsou například kovové ionty, proteiny, lektiny nebo selektivní protilátky. Je možné izolovat a detekovat analyty z komplexních biologických vzorků jako je třeba krev, sérum apod. Použitím metody ACE je možné provádět analýzy v roztoku i při imobilizaci ligandu ve stacionární fázi (56). Elektroforetický separační princip je založen na rozdílech rychlostí nabitých rozpuštěných látek pohybujících se v aplikovaném elektrickém poli. Směr a rychlost tohoto pohybu jsou určeny pomocí migračního a elektroosmotického průtoku (EOF – z angl. electroneutral electroosmotic flow). ACE je založena na elektroforetické separaci a principu afinitní chromatografie. Tato metoda vyžaduje pouze krátký čas analýzy v řádu minut (56).

2.8.1 Typy afinitní kapilární elektroforézy

2.8.1.1 Afinitní kapilární elektroforéza s posunutým tokem

Afinitní kapilární elektroforéza s posunutým tokem je nejpoužívanější metodou při měření afinity pomocí kapilární elektroforézy. Různé koncentrace ligandu jsou přidávány do elektrolytu BGE (z angl. background electrolyte), zatímco analyt je zaveden do kapiláry s elektroneutrálním elektroosmotickým tokem. Předpokládáme, že k rovnováze analytu a ligandu dojde před koncem separace, což vyžaduje rychlou kinetiku. Z tohoto důvodu jsou běžně používány vyšší koncentrace ligandu než analytu (57).

ACE s posunutým tokem má také svá omezení. Vysoké koncentrace analytu pomáhají k vytvoření dostatečného signálu, ale mohou mít za následek chybu při měření rovnovážné konstanty. Zvýšená koncentrace ligand může vyvolat změnu ve viskozitě a iontové síle (57).

2.8.1.2 Nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí

Nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí (NECEEM – z angl. non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures) byla vyvinuta k výpočtu rovnovážné konstanty a rychlostních konstant druhého řádu (58). NECEEM afinitní metoda založená na separaci. Pro měření kinetiky je vhodnější než SPR a nevyžaduje imobilizaci molekul na povrchu. Důležitou vlastností NECEEM je, že jediný elektroforeogram obsahuje data pro vyhodnocení rovnovážné konstanty a disociační rychlostní konstanty. Oblasti píků analytu, ligandu a komplexu jsou úměrné množství sledovaných látek (59).

NECEEM se typicky využívá k separaci a zkoumání vazebných interakcí velkých proteinů. Receptor značený fluoroforem, který se váže na sledovanou molekulu je smíchán se vzorkem. Směs a komplexy jsou odděleny kapilární elektroforézou. Původní směs analytu a receptoru byla v rovnováze, disociace molekul během elektroforézy má za následek jejich separaci a rovnováha se posune směrem k další disociaci (59).

2.8.1.3 Vakantní afinitní kapilární elektroforéza

Ve vakantní afinitní kapilární elektroforéze (VACE - z angl. vacancy affinity capillary electrophoresis) je kapilára naplněna roztokem obsahujícím pufr, protein a lék. Přítomnost

těchto složek generuje silný signál na detektoru. Po nadávkování pufru je zapnuto napětí a na elektroferogramu se objeví dva negativní píky, které odpovídají léku a proteinu. Tyto píky jsou způsobené lokálním nedostatkem volného proteinu a léku. Oblast těchto píků souvisí s koncentrací léku a proteinu, zatímco migrační čas koreluje se stupněm komplexnosti. Vazebné parametry mohou být určeny definováním poměru koncentrace vázaného léku a celkové koncentrace proteinu (60).

Koncentraci volného a vázaného léku můžeme spočítat z aktuální mobility léku, která se pohybuje mezi mobilitou vázaného léku a mobilitou komplexu. Po přidání sekundárního analytu do systému dojde ke kompetitivní interakci, protože obě sloučeniny vykazují afinitu ke stejnému aktivnímu místu proteinu. Uvolnění vázaného léku druhým analytem je zaznamenáno posunem v aktivní mobilitě. Díky kompetici bude stoupat koncentrace volného léku. Zásadním požadavkem pro provedení VACE je, že mobilita sledovaného léku a sekundárního analytu se dostatečně liší nebo detektor nereaguje na vytěšňovací lék (60).

2.8.1.4 Frontální analýza v kapilární elektroforéze

Frontální analýza vyžaduje dvě série měření. První sérii pro předem vyváženou směs s daným množstvím analytu a několika koncentracemi ligandu. Druhá série měření probíhá s čistým ligandem v různých koncentracích k sestrojení kalibrační křivky. Analýza probíhá za dávkování dostatečně velkého množství rovnovážné směsi do kapiláry pod tlakem a poté aplikaci napětí. Látky ve vzorku jsou odděleny a ligand z něj začíná migrovat. Přesná koncentrace volného ligandu je určena pomocí kalibrační křivky (56).

Výhodou frontální analýzy je možnost měření koncentrace nevázaného ligandu. Díky čemuž poskytuje nezkreslené vazebné konstanty. Naopak nevýhodou je, že není možné zkoumat několik ligandů během jedné analýzy. Dalším omezením je také požadavek provádět analýzy s relativně čistými ligandy a analyty. Nicméně celková spotřeba vzorku je nízká, tudíž to u většiny analýz nepředstavuje tak velký problém (56).

2.8.1.5 Kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze

Na rozdíl od dalších technik afinitní kapilární elektroforézy při kontinuální frontální analýze (FACCE – z angl. frontal analysis continuous capillary electrophoresis) je vzorek do

kapiláry průběžně zaváděn. Kapilára je naplněna a ekvilibrována s pufrem před nadávkováním vzorku. Kapilára je poté ponořena do lahvičky se vzorkem a je aplikováno napětí. Po aplikaci napětí dojde k zahájení dávkování a separace. Zavedení vzorku a separace jsou spojeny do jednoho procesu (60).

Výhody FACCE jsou nízké detekční limity, které jsou způsobené delší dobou vstřikování a stálou rovnováhou v kapiláře. Tím se i snižuje čas nutný ke kalibraci a zrychluje samotná analýza. Navzdory vyšší spotřebě vzorku ve srovnání s ostatními metodami, je snížena celková spotřeba ligandu (60).

2.8.1.6 Průtok přes částečně naplněnou afinitní kapilární elektroforézu

V metodě průtoku přes částečně naplněnou afinitní kapilární elektroforézu (FTPF-ACE z angl. flow through partial filling affinity capillary electrophoresis) je kapilára naplněna pufrem, do kterého je nejprve dávkován roztok obsahující ligand a následně vzorek obsahující receptor a neinteragující standardy. Po nadávkování ligandu i receptoru ve dvou krocích, je aplikováno separační napětí. Během elektroforézy receptor a standardy protékají přes ligand v migračním čase receptoru vzhledem k neinteragujícím standardům jako funkce koncentrace ligandu (60).

2.8.2 Příklady využití metod kapilární elektroforézy pro kinetická měření

Berezovski, Krylov (2002) popsali použití NECEEM ve studiích interakcí protein – DNA. Zjistili, že aplikace NECEEM v těchto studiích zahrnuje řadu výhod. Například, že NECEEM je možné využít i pro komplexy s nízkou afinitou a je to vysoce citlivá metoda (61). Xu, Feng a spol. (2008) zkoumali pomocí NECEEM kinetiku a termodynamiku telomerického G-kvadruplexu. Metoda NECEEM poskytla nový způsob studia kinetiky a termodynamiky nukleových kyselin v duálních rovnovážných systémech. Bylo dosaženo extrémně nízké spotřeby vzorku a vysoké opakovatelnosti (62).

Dvořák, Svobodová a spol. (2013) srovnávali použitelnost ACE a VACE pro stanovení komplexačních konstant. Tyto dvě metody jsou pro tento účel běžně používány, bylo však zjištěno, že hodnoty získané pomocí VACE mohou být nesprávné zejména v případech silné komplexace (63). Sun, Fang a spol. (2008) sledovali chování interagujících biomolekul

v VACE. Použili třináct scénářů se čtyřmi různými kombinacemi migračních řádů volného proteinu, volného léčiva a vytvořeného komplexu (64).

Østegaard, Hansen a spol. (2005) zkoumali využití frontální analýzy na interakčních systémech vykazujících rychlou asociační a disociační kinetiku. Výsledky naznačili, že frontální analýza poskytuje spolehlivá data (65).

Seyrek, Hattori a spol. (2004) využili FACCE ke studiu tvorby komplexu mezi proteiny a syntetickými i přírodními polyanionty. Touto metodou byly schopni určit vazebné izotermny i vazebné parametry (66).

Kaddis, Mito a spol. (2003) hodnotili použití kompetitivního vazebného testu provedeného pomocí FTPF-ACE k odhadnutí vazebných konstant neutrálních ligandů a receptorů. Prokázali snadnost použití této techniky a její všestrannost (67).

2.9 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie je levná, jednoduchá, flexibilní, nedestruktivní analytická metoda. UV-VIS spektrofotometry měří absorbanci (tedy množství pohlceného světla vzorkem) nebo transmitanci (množství světla procházející skrz vzorek) jako funkci vlnové délky. Ačkoliv UV vlnové délky jsou v rozmezí 100-380 nm a viditelná oblast dosahuje až 800 nm, většina spektrofotometrů pracuje v rozmezí vlnových délek 200-1100 nm. Praktický rozsah pro UV-VIS spektroskopii je od 200 do 800 nm, nad 800 nm je infračervené záření, zatímco záření pod 200 nm je známé jako daleké (vakuum) UV (68).

Jako v mnoha spektroskopických technikách i zde Lambert-Beerův zákon popisuje korelaci mezi absorpcí světla molekulou, délkou dráhy světla a koncentrací absorbujících molekul v tekutém médiu. Proto je možné na základě změření absorpce, určit přítomnost a koncentraci analytů (69).

Nekovalentní sloučeniny absorbují UV-VIS záření ve specifických vlnových délkách. Například proteiny jsou měřeny při vlnové délce 280 nm a nukleové kyseliny při 260 nm. Tyto sloučeniny se nazývají chromofory (např. hem, tyrosin, tryptofan). Kovalentně nasycené sloučeniny neabsorbují UV-VIS záření, ale mohou ovlivňovat chromofory se nazývají auxochromy (např. amino-, hydroxy-, alkoxy- skupiny). Když UV-VIS záření zasáhne chromofor, elektrony v základním stavu přejdou do excitovaného stavu. Auxochromy mohou darovat elektron a mají schopnost ovlivnit barvu chromoforu, ale auxochromy svou barvu nemění. Voda a alkoholy jsou většinou průhledné a neabsorbují UV-VIS světlo, tím pádem jsou

vynikajícími médii pro UV-VIS spektroskopii. Aceton a dimethylformamid (DMF) jsou dobrá rozpouštědla pro sloučeniny, které nejsou rozpustné ve vodě. Aceton absorbuje světlo pod 320 nm a DMF pod 275 nm, proto jsou vhodné jen pro analýzy probíhajícími pouze nad těmito vlnovými délkami (68).

Informace o kinetice interakcí jsou získávány pomocí určování koncentrace látky v závislosti na čase. Podmínkou je, aby reakční komponenty měly jiné maximum absorpce. Měření spočívá v měření absorbance při vlnové délce v závislosti na čase (68).

Zdroj UV-VIS spektrofotometru vysílá světlo přes vzorek k detektoru na opačné straně, který procházející světlo zaznamenává. Výsledný záznam UV-VIS spektroskopie udává závislost absorbance na vlnové délce (68).

Chromofory mají charakteristická absorpční pásma. Posuny pásem do delších vlnových délek jsou bathochromické posuny a posuny do kratších vlnových délek se nazývají hypsochromní posuny. Zvýšení v intenzitě píku absorpčního pásma nazýváme hyperchromismus a snížení hypochromismus. Rozpouštědla mohou ovlivňovat intenzitu absorbance a posuny vlnových délek (68).

2.9.1 Výhody a nevýhody UV-VIS spektroskopie

Ačkoliv většina spektrofotometrů má pracovní rozsah vlnových délek v rozmezí 200-1100 nm, pro lepší přesnost a spolehlivost analýz je třeba využívat interval 220-780 nm. Je obtížnější analyzovat touto metodou směsi látek, ale je možné je analyzovat vícesložkovými analyzačními metodami, které splňují, že všechny složky tvořící směs známe a Lambert-Beerův zákon je možné aplikovat na všechny z nich (68).

Je důležité zvažovat interakce mezi rozpouštědly a rozpuštěnými látkami. Polární molekuly v polárních roztocích interagují a dochází ke snížení rozlišení spektra. U interakcí nepolárních sloučenin s nepolárními rozpouštědly je tento efekt zanedbatelný (68).

2.9.2 Příklady využití UV-VIS spektroskopie pro kinetická měření

Saito, Silva a spol. (2012) studovali pomocí UV-VIS spektroskopie interakci DNA s emodinem. Výsledky z UV-VIS spektroskopie ukázaly interkalaci emodinu do DNA a umožnily odhad vazebné konstanty (70). Suhartano, Thalib a spol. (2018) pomocí UV-VIS spektroskopie prováděli studii, která měla za cíl vysvětlit interakci kadmia se sérovým

albuminem. Pomocí vytvoření lineární rovnice z údajů o absorpaci byly schopni vypočítat hodnotu vazebných konstant kovů k proteinům (71). Zhang, Chen a spol. (2013) využili tuto metodu ke zkoumání vazby léčiva chloramfenikolu na hovězí sérový albumin. Výsledky jim poskytly vhled do této interakce, který vedly k farmakologické aplikaci chloaramfenikolu (72).

2.10 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza je běžně používanou metodou studium kinetiky intermolekulárních procesů, které trvají milisekundy až sekundy. Typický experiment začíná smícháním dvou roztoků a poté sledováním návratu roztoku do ustálenému stavu (73). Jde o jednoduchou a univerzální metodu spojenou s optickou detekcí (obvykle fluorescence, absorbance nebo cirkulárního dichroismu) (74).

Některé kinetické studie jsou založeny na měření změny v koncentraci reagentů nebo produktů jako funkci času po smíchání reagentů. Tyto studie vyžadují, aby byl sledovaný proces dostatečně pomalý a reakční doba byla delší než čas potřebný pro smíchání reagentů a odezvu přístroje. Mnoho biologických interakcí však probíhá v rámci sekund či milisekund, proto pro studium takových reakcí nelze využívat tradiční kinetické metody (3).

Sekvenční injekční analýza je jedna z technik, která může být využita ke studování kinetiky biologických interakcí. Doba míchání v sekvenční injekční analýze pro reagenty je přibližně 1-2 ms, proto je možné v těchto analýzách zkoumat interakce, ke kterým dochází v rámci sekund až milisekund. Biologické interakce, které byly studovány touto metodou jsou například skládání proteinů, inhibice enzymů, vazba proteinů nebo DNA k hormonům, lékům a malým molekulám (3).

V typických sekvenčních injekčních analýzách je několik stovek mikrolitrů roztoku dodáno do míchacího zařízení pomocí dvou jehel. Rychlost průtoku je od 5 do 15 ml/s a průměry kanálů od 1 mm, což zajišťuje turbulentní podmínky průtoku. Do systému je dodán dostatečný objem právě smíchaného roztoku k vyčištění a naplnění pozorovací komory. Poté je průtok náhle zastaven (74). Časový interval mezi smícháním reagentů a začátkem pozorování signálu je označován jako „mrtvý čas“ (3).

Detekce při sekvenční injekční analýze může být provedena různými metodami. Pro tento typ analýzy se běžně užívá detekce fluorescence či absorbance. Reagenty nebo produkty se specifickými chromofory nebo fluofory mohou být využity ke sledování rychlosti biologických reakcí. Cirkulární dichroismus může být využit v analýze zastaveného toku pro sledování změn konformace proteinů (3).

Dlugosz, Bojarska a spol. (2002) touto metodou studovali kinetiku přechodových jevů asociace protein – ligand (73).

2.10 Termoforéza v mikroměřítku

Termoforéza v mikroměřítku (MST – z angl. microscale thermophoresis) je metoda založená na fyzikálním jevu zvaném termoforéza, který popisuje řízený pohyb molekul skrz teplotní gradient. Termoforetický pohyb molekul je závislý na třech parametrech molekuly: velikosti, náboji a jejím hydratačním obalu. Při interakci molekul se alespoň jeden tento parametr změní, což má za následek změnu v termoforetické mobilitě komplexu (75).

Změny v termoforetickém pohybu molekuly jsou sledovány optickým systémem detekujícím buď vnitřní fluorescenci tryptofanu v proteinech nebo fluorescenčním signálem fluoroforů, které jsou připojeny k jedné z interagujících molekul. Vazebné parametry jsou určeny pomocí měnících se termoforetických vlastností vzorku se vzrůstající koncentrací potenciálních vazebných partnerů (75).

MST umožňuje přesnou analýzu vazebných událostí i v malých objemech (několika μl vzorku). Metodou MST je možné vazebné události detekovat podle změny velikosti a změn v hydratačním obalu molekul. Proto je tato metoda velmi citlivá a detekuje i události jako je vazba malých molekul k proteinům, enzymům k jejich substrátům apod. (76).

2.10.1 Experimentální nastavení termoforézy v mikroměřítku

V případě monolitických kolon je termoforéza vyvolána a detekována v malé skleněné kapiláře (většinou s průměrem okolo $50 \mu\text{l}$), která obsahuje roztok fluorescenčních molekul. Infračervený laser s vlnovou délkou 1480 nm je soustředěný skrz objektiv do kapiláry. Prostřednictvím laseru je vytvořen teplotní gradient v rozpětí $2 - 6 \text{ }^\circ\text{C}$. Mezitím jsou fluorofory v roztoku excitovány a jejich vyzařovaná fluorescence je sbírána detektorem (76).

Toto nastavení umožňuje sledovat termoforézu závislou na vyčerpání nebo akumulaci fluoroforů v rámci teplotního gradientu indukovaného infračerveným laserem. Pro odvození rychlostních konstant je měřeno více kapilár s konstantní koncentrací fluorescenčních molekul a vzrůstajícími koncentracemi ligandu. Změny v termoforéze fluorescenčních molekul

způsobené vazbou k ligandům mohou být poté použity k výpočtu rovnovážných vazebných konstant (76).

2.10.2 Výhody termoforézy v mikroměřítku

První velkou výhodou MST je rychlé a flexibilní nastavení testů. Integrovaná kontrola kvality umožňuje detekci agregačních a srážecích procesů v reálném čase a to velmi rychle po začátku procesu. Při detekci těchto účinků mohou být jednoduše a rychle optimalizovány technické podmínky a pufrů pro zajištění nejlepší kvality dat (77).

Díky tomu, že termoforéza molekul závisí kromě jejich velikosti také na náboji a hydratačním obalu, není tedy omezena jen na měření velikosti produktů, jedno měření MST nám poskytuje více informací o reakci než jiné kinetické metody (77). Mezi další výhody MST patří malá spotřeba vzorku a možnost provést měření v roztoku na rozdíl od nejběžnějších nefluorescenčních metod, jako je izotermická titrační kalorimetrie nebo povrchová plasmonová rezonance. Metodu MST lze provádět prakticky v jakémkoliv pufru, dokonce i v komplikovaných směsích jako je krevní plasma či buněčný lyzát (76).

2.10.3 Příklady využití termoforézy v mikroměřítku pro kinetická měření

Jerabek-Willemsen, André a spol. (2014) se ve své práci mimo jiné zaměřili na použití MST ke stanovení termodynamiky a enzymové kinetiky. Prokázali, že MST metodu lze použít ke sledování kinetiky interakcí enzym – substrát (78). Stein, Ianeselli a spol. (2021) představili novou metodu nazvanou kinetická termoforéza v mikroměřítku pro stanovení kinetických reakčních rychlostí v roztocích. Vyvinuli novou metodu ke stanovení kinetických rychlostí a vazebných afinit v jediném experimentu (79). Topf, Franz a spol. (2017) pomocí testů založených na MST sledovali kinetiku polymerace aktinu. MST vyhodnotili jako jednoduchý a užitečný nástroj pro zkoumání kinetiky aktinu (80).

ZÁVĚR

Bioafinitní interakce hrají klíčovou roli v živých organismech. Sledování jejich kinetiky je zásadní pro porozumění jejich funkce. Mezi tyto interakce patří například enzymy katalyzované reakce, interakce transportních proteinů a lipidů, hormonů nebo živin v cirkulačním systému, protilátek využívané imunitním systémem apod. Proto bylo vyvinuto mnoho metod pro jejich studování jako například afinitní kapilární elektroforéza, afinitní chromatografie či povrchová plasmonová rezonance.

Jako jedna z levných nedestruktivních a populárních metod je často používaná UV-VIS spektroskopie. Její nevýhodou sice je větší náročnost při analýze směsi látek, ale velkou výhodou je její dostupnost. Oproti tomu, povrchová plasmonová rezonance je dražší a náročnější na přístrojové vybavení, ale za to poskytuje přesnější informace.

Díky informacím o kinetice bioafinitních interakcí tak můžeme lépe porozumět jejich jedinečným funkcím. Každá z používaných metod má své silné a slabé stránky. Proto je důležité zvolit správnou metodu pro studium kinetiky těchto interakcí s ohledem na interagující látky, citlivost metody a to, v jakém časovém rozmezí nám poskytuje výsledky. Výhodou stanovování kinetiky je možnost stanovovat látky v malých množstvích, jednoduše, efektivně a v poměrně krátkém čase.

Sledování kinetiky pomocí uvedených metod nachází uplatnění v kinetických analýzách směsi chemicky podobných látek, hlavně díky jejich různým reakčním rychlostem.

Použitá literatura

1. **PODOBNIK M., KRAŠEVEC N., BEDINA ZAVEC A., NANEH O., FLAŠKER A., CASERMAN S., HODNIK V. a ANDERLUH G..** How to Study Protein-protein Interactions. *Acta Chimica Slovenica [online]*. 2016, 424-439.
2. **ROSANNE M. G., BALTUSSEN E., VAN DEDEM G. W. K.** Use of bioaffinity interactions in electrokinetically controlled assays on microfabricated devices. *Electrophoresis*. 23, 2002, 6, 823-835.
3. **ZHENG X., BI C., LI Z., PODARIU M., HAGE D. S.** Analytical methods for kinetic studies of biological interactions: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 113, 163-180.
4. **BERGGARD T., LINSE S., JAMES P.** Methods for detection and analysis of protein-protein interactions. *PROTEOMICS [online]*. 2007, 7(16).
5. **HUMPHREY W., DALKE A., SCHULTEN K.** VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphic [online]*. 1996, 14(1), 33-38.
6. **PETTERSEN E., GODDARDT. D., HUANG C. C., COUCH G. S., GREENBLATT D. M. MENG E. C.; FERRIN T. E.** UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry [online]*. 2004, 25(13), 1605-1612.
7. **REVERBI R., REVERBI L.** Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 2007, 227-40.
8. **SCHREIBER G., HARAN G., ZHOU H. X.** Fundamental Aspects of Protein-Protein Association Kinetics. *Chemical Reviews [online]*. 2009, 109(3), 839-860.
9. **CAO H., HUANG Y. LIU Z.** Interplay between binding affinity and kinetics in protein-protein interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics [online]*. 2016, 84(7), 920-933.
10. **DI TRANI, J. M., MOITESSIER N. MITTERMAIER A. K.** Measuring Rapid Time-Scale Reaction Kinetics Using Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Chemistry*. 2017, 89(13), 7022-7030.

11. **ĎURECH M., TRČKA F., VOJTĚŠEK B.,MÜLLER P.** <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/395/4488.pdf>. *Linkos.cz*. [Online] Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně, 2014.
12. **BURNOUF D., ENNIFAR E., GUWDICH S., a spol.** KinITC: A New Method for Obtaining Joint Thermodynamic and Kinetic Data by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of the American Chemical Society [online]*. **134**, 2012, 1.
13. **DI TRAMI J. M., MOIESSIER N., MITTERMAIER A. K.** Measuring Rapid Time-Scale Reaction Kinetics Using Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Chemistry [online]*. 2017, **13**, 7022-7030.
14. **LI Q., CHEN D., BOOM R. M.,JANSSEN A. E. M.** Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry. *Food Chemistry [online]*, 2018, **268**, 94-100.
15. **BI C., BEERAM S., LI Z., ZHENG X., HAGE D. S.** Kinetic analysis of drug-protein interactions by affinity chromatography. *Drug discovery today technology [online]*. 2015, **17**, 16-21.
16. **SCHIEL J. E., HAGE D. S.** Kinetic studies of biological interactions by affinity chromatography. *Journal of separation science*. 2009, **32**(10), 1507-1522.
17. **TONG Z., HAGE D. S.** Characterization of interactio kinetics between chiral solutes and human serum albumin by using high-performance affinity chromatography and peak profiling. *Journal of Chromatography A [online]*., 2011, **1218**(39), 6892-6897.
18. **MALLIK R., YOO M.J., BRISCO Ch. J., HAGE D. S.** Analysis of drug–protein binding by ultrafast affinity chromatography using immobilized human serum albumin. *Journal of Chromatography A [online]*., 2010, **1217**(17), 2796-2803.
19. **ARIAS H. R., ROSENBERG A., FEUERBACH D., a spol.** Interaction of 18-methoxycoronaridine with nicotinic acetylcholine receptors in different conformational states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes [online]*., 2010, 1798(6), 1153-1163.
20. **MURALI S., RUSTANDI R., ZHENG X., PAYNE A., SHANG L.** Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus-Binding. *Viruses [online]*. 2022, **14**(4).
21. **BARROWS J., VAN DYKE M. W., D'AURIA S.** Biolayer interferometry for DNA-protein interactions. *PLOS ONE [online]*., 2022, **17**(2).

22. **LAD L., CLANCY S., KOVALENKO M., LIU Ch., HUI T., SMITH V., PAGRATIS N.** High-Throughput Kinetic Screening of Hybridomas to Identify High-Affinity Antibodies Using Bio-Layer Interferometry. *SLAS Discovery [online].*, 2015, **20**(4), 498-507.
23. **SULTANA A., LEE J. E.** Measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions by Biolayer interferometry. *Current Protocols in Protein Science [online].*, 2015, **79**(1).
24. **DYSINGER M., KING L. E.** Practical quantitative and kinetic applications of bio-layer interferometry for toxicokinetic analysis of a monoclonal antibody therapeutic. *Journal of Immunological Methods [online].*, 2012, **379**(1-2), 30-41.
25. **YETIEN A. K., AKRAM M. S., LOWE CH. R.** Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on Chip [online].* 2013, **13**(12).
26. **PAULIE S., PERLMANN P., PERLMANN H.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. [autor knihy] WILEY J. *eLS.* 2006.
27. **GAN S. D., PATEL K. R.** Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linkde Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology [online].* 2013, **133**(9), 1-3.
28. **AYDIN S.** A short history, principles and types of ELISA, and our laboratory expirience with peptie/protein analyses using ELISA. *Peptides [online].* 2015, **72**, stránky 4-15.
29. **LINDAHL G.** The effects of flaxseed and tamoxifen on the inflammatory microenvironment in normal breast tissue and in breast cancer [online]. *Linköping: Linköping Universtiy Electronic Press [online].* 2019.
30. **ALBAN S., GASTPAR R.** Development of SPC-ELISA: A New Assay Principle for the Study of Sulfated Polysaccharide–Protein Interactions. *SLAS Discovery [online].*, 2001, **6**(6), 393-400.
31. **SYEDBASHA M., LINNIK J., SANTER D., a spol.** An ELISA Based Binding and Competition Method to Rapidly Determine Ligand-receptor Interactions. *Journal of Visualized Experiments [online].* 2016, **109**.
32. **MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ V., ORBEGOZO-MEDINA R. A., ROMARÍS F., PANIAGUA E., UBEIRA F. M., BHATTACHARJYA S.** Usefulness of ELISA Methods for Assessing LPS Interactions with Proteins and Peptides. *PLOS ONE [online].*, 2016, **11**(6)

33. **GRANGE R. D., THOMPSON J. P., LAMBERT D. G.** Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme based immunoassays. *British Journal of Anaesthesia [online]*. 2014, **112**(2), 213-216.
34. **HIGASHI Y., IKEDA Y., YAMAMOTO R., YAMASHIRO M., FUJII Y.** Pharmacokinetic interaction with digoxin and glucocorticoids in rats detected by radioimmunoassay using a novel specific antiserum. *Life Sciences [online]*., 2005, **77**(9), 1055-1067.
35. **NESTOR M., ANDERSSON K., LUNDQVIST H.** Characterization of ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu-labeled antibodies binding to CD44v6 using a novel automated radioimmunoassay. *Journal of Molecular Recognition [online]*., 2008, **21**(3), 179-183.
36. **DING R., TAYROUZ Y., RIEDEL K. D., BURHENNE J., WEISS J., MIKUS G., HAEFELI W. E.** Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers*1. *Clinical Pharmacology & Therapeutics [online]*. 2004, **76**(1), 73-84.
37. **RAHMAWATI I., IRKHAM I., WIBOWO R., GUNLAZUARDI J., EINAGA Y., IVANDINI T. A.** Electrogenated Chemiluminescence for Immunoassay Applications. *Indonesia Journal of Chemistry [online]*. 2021, **21**(6), 1599-1618.
38. **LAZAR K., RABE T., GOELZ R., HAMPRECHT K.** Human Cytomegalovirus Reactivation During Lactation: Impact of Antibody Kinetics and Neutralization in Blood and Breast Milk. *Nutrients [online]*., 2020, **121**(22).
39. **GIANELLA M., RIGHI E., PASCALE R., a spol.** Evaluation of the Kinetics of Antibody Response to COVID-19 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients: The Prospective Multicenter ORCHESTRA Cohort. *Microorganisms [online]*., 2022, **10**(5).
40. **ADITYA K. A., VAIDYA, ITISHREE S.** Flow injection analysis: an overview. *J Crit Rev.*2015, **25**, 19-24.
41. **IBAÑEZ-GARCIA N., GONÇALVES R. D. M., DA ROCHA Z. M., GÓNGORA-RUBIO M. R., SEABRA A. C., CHAMARRO J. A.** LTCC hybrid technology applied to water quality meso analytical system. *Sensors and Actuators B: Chemical [online]*. **118**(1-2), 2006, 67-72.
42. **ZITKA O., HUSKA D., KRIZKOVA S., a spol.** An Investigation of Glutathione-Platinum(II) Interactions by Means of the Flow Injection Analysis Using Glassy Carbon Electrode. *Sensors [online]*, 2007, **7**, 1256-1270.

43. **Basics of FRET Microscopy** Nikon's MicroscopyU. 2022. Nikon's MicroscopyU - The Source for Microscopy Education [online]. /
44. **HUSSAIN A. S.** An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Department of Physics*. 2009.
45. **IMANI M., MOHAJERI N., RASTEGAR M., ZARGHAMI N.** Recent advances in FRET-Based biosensors for biomedical applications. *Analytical Biochemistry [online]*. 2021, **630**.
46. **ZHANG X., HU Y., YANG X., TANG Y., HAN S., KANG A., DENG H., CHI Y., ZHU D., LU Y.** Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosensors and Bioelectronics [online]*. 2019, **138**.
47. **NESMELOV Y. E., AGAFONOV R. V., NEGRASHOV I. V., BLAKELY S. E., TITUS M. A., THOMAS D. D.** Structural kinetics of myosin by transient time-resolved FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences [online]*., 2011, **108**(5), 1891-1896.
48. **BIENER E., CHARLIER M., RAMANUJAN K. V., a spol.** Quantitative FRET imaging of leptin receptor oligomerization kinetics in single cells. *Biology of the Cell [online]*., 2005, **97**(12), 905-919.
49. **LI Y., AUGUSTINE G. J., WENINGER K.** Kinetics of Complexin Binding to the SNARE Complex: Correcting Single Molecule FRET Measurements for Hidden Events. *Biophysical Journal [online]*., 2007, **93**(6), 2178-2187.
50. **ENGLEBIENNE P., HOONACKER A. V., VERHAS M.** Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy [online]*. **17**(2-3), 255-273.
51. **PUIU M., BALA C.** SPR and SPR Imagine: Recent Trends in Developing Nanodevices for Detection and Real-Time Monitoring of Biomolecular Events. *Sensors [online]*. 2016, **16**(6).
52. **PATTNAIK P.** Surface Plasmon Resonance: Applications in Understadnig Receptor-Ligans Interaction. *Applied Biochemistry a Biotechnology [online]*. 2005, **126**(2), 079-092.
53. **KATSAMBA P.** Kinetic studies of RNA–protein interactions using surface plasmon resonance. *Methods [online]*., 2002, **26**(2), 95-104.

- 54. DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ N., LOBO-CASTANÓN M. J., MIRANDA-ORDIERES A. J., TUNÓN-BLANCO P.** SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers: Detection of neomycin B. *Biosensors and Bioelectronics [online].*, 2009, **24**(8), 2547-2553.
- 55. WANG Q., SHAH N., ZHAO J., a spol.** Structural, morphological, and kinetic studies of β -amyloid peptide aggregation on self-assembled monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics [online].*, 2011, **13**(33).
- 56. OLABI M., STEIN M., WÄTZIG H.** Affinity capillary electrophoresis for studying interactions in life sciences. *Methods [online].* 2018.
- 57. WANG Y., ADEOYE D. I., OGUNKUNLE E. O., WEI I., FILLA R. T., ROPER M.G.** Affinity Capillary Electrophoresis: A Critical Review of the Literature from 2018 to 2020. *Analytical Chemistry [online].* 2021, **93**(1), 295-310.
- 58. NEWMAN C. I. D., COLLINS G. E.** Advances in CE for kinetic studies. *ELECTROPHORESIS [online].* 2008, **29**(1), 44-55.
- 59. KRYLOV S.** Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (NECEEM): A Novel Method for Biomolecular Screening. *SLAS Discovery [online].* 2006, **11**(2), 115-122.
- 60. GUIJT-VAN DUIJN R. M., FRANK J., VAN DEDEM G. W. K., BALTUSSEN E.** Recent advances in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis [online].* 2000, **21**(18), 3905-3918.
- 61. BEREZOVSKI M., KRYLOV S. N.** Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures – A Single Experiment Reveals Equilibrium and Kinetic Parameters of Protein–DNA Interactions. *Journal of the American Chemical Society [online].*, 2002, **124**(46), 13674-13675.
- 62. XU Y., FENG X., DU W., LIU X., LUO Q., LIU B.** Kinetic and Thermodynamic Characterization of Telomeric G-Quadruplex by Nonequilibrium Capillary Electrophoresis: Application to G-Quadruplex/Duplex Competition. *Analytical Chemistry [online].*, 2008, **80**(18), 6935-6941.
- 63. DVOŘÁK M., SVOBODOVÁ J., BENEŠ M., GAŠ B.** Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for

determination of complexation constants. *ELECTROPHORESIS [online].*, 2013, **34**(5), 761-767.

64. SUN Y., FANG N., CHEN D. D. Y. Behavior of interacting species in vacancy affinity capillary electrophoresis described by mass balance equation. *ELECTROPHORESIS [online].*, 2009, **29**(16), 3333-3341.

65. ØSTEGAARD J., HANSEN S. H., JENSEN H., THOMSEN A. E. Pre-equilibrium capillary zone electrophoresis or frontal analysis: Advantages of plateau peak conditions in affinity capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS [online].*, 2005, **26**(21), 4050-4054.

66. SEYREK E., HATTORI T., DUBIN P. L. Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis for Protein–Polyelectrolyte Binding Studies. In: STREGE, Mark A. a Avinash L. LAGU. *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides [online].* 2004, 217-228.

67. KADDIS J., MITO E., HEINTZ J., PLAZAS A., GOMEZ F. A. Flow-through partial-filling affinity capillary electrophoresis can estimate binding constants of neutral ligands to receptors via a competitive assay technique. *ELECTROPHORESIS [online].*, 2003, **24**(6), 1105-1110.

68. ROCHA F., GOMES A. J., LUNARDI C. N., KALIAGUINE S., PATIENCE G. S. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy. *The Canadian Journal of Chemical Engineering [online].* 2018, **96**(12), 2512-2517.

69. ROBERTS J., POWER A., CHAPMAN J., CHANDRA S., COZZOLINO D. The Use of UV-Vis Spectroscopy in Bioprocess and Fermentation Monitoring. *Fermentation [online].* 2018, **4**(1).

70. SAITO S. T., SILVA G., PUNGARTNIK C., BRENDEL M. Study of DNA–emodin interaction by FTIR and UV–vis spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology [online].* 2012, **111**, 59-63.

71. SUHARTONO E., THALIB I., AFLANIE I., NOOR Z., IDROES R. Study of Interaction between Cadmium and Bovine Serum Albumin with UV-Vis Spectroscopy Approach. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering [online].*, 2018, **350**.

72. ZHANG J., CHEN L., ZENG B., KANG Q., DAI L. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV–vis spectroscopy.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy [online]., 2013, **105**, 74-79.

73. DŁUGOSZ M., BOJARSKA E., ANTOSIEWICZ J. M. A procedure for analysis of stopped-flow transients for protein-ligand association. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods [online].* 2002, **51**(2),179-193.

74. RODER H., MAKI K., CHENG H. Early Events in Protein Folding Explored by Rapid Mixing Methods. *Chemical Reviews [online].* 2006, **106**(5), 1836-1861.

75. SCHUBERT T., LÄNGST G. Studying epigenetic interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *AIMS Biophysics [online].* 2015.

76. JERABEK-WILLEMSSEN M., ANDRÉ T., WANNER R., ROTH H. M., DUHR S., BAASKE P., BREITSPRECHER D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure [online].* 2014, **1077**, 101-113.

77. ENTZIAN C., SCHUBERT T. Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermohoresis (MST). *Methods [online].* 2016, **97**, 27-34.

78. JERABEK-WILLEMSSEN M., ANDRÉ T., WANNER R., ROTH H. M., DUHR S., BAASKE P., BREITSPRECHER D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure [online].*, 2014, **1077**, 101-113.

79. STEIN J. A. C., IANASELLI A., BRAUN D. Kinetic Microscale Thermophoresis for Simultaneous Measurement of Binding Affinity and Kinetics. *Angewandte Chemie [online].*, 2021, **133**(25), 14107-14114.

80. TOPF A., FRANZ P., TSIVALIARIS G. MicroScale Thermophoresis (MST) for studying actin polymerization kinetics. *BioTechniques [online].*, 2017, **63**(4), 187-190.