

# **MOLEKULARBIOLOGISCHE AFFINITÄTSSTUDIEN**

Neue Anwendungen elektrophoretischer,  
miniaturisierter Trennsysteme

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

**ALEXANDRA STETTLER**

aus Eggwil, BE

Birsfelden, November 2006

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag von:

Prof. Wolf-D. Woggon, Departement Chemie, Universität Basel

Dr. Maria A. Schwarz, Departement Chemie, Universität Basel

Basel, den 21.11.2006

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

Dekan

*Quidquid agis,  
prudenter agas  
et respice finem!*

*(Ovid)*

## Danksagung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Zeit vom Juni 2003 bis September 2006 am Chemischen Departement der Universität Basel verfasst. Die finanzielle Unterstützung war durch die Universität Basel und den Schweizer Nationalfonds (Nr. 200021-103812/1) gewährleistet.

Ich bedank mich ganz hürzlich by mynere Betreuerin dr Dr. Maria Schwarz für 's interessante Thema, die inspirierende Diskussionen und d' Unterstützung.

Ebefalls bedank ich mich by allne im Departement, wo mir während mynere Zyt do gholfe händ.

“Last but not least” bedank ich mich by mynere Familie für die unändliche Geduld, wo sie während dere Zyt mit mir gha händ. By mym Schweschterhürz möcht ich es riesigs Danggschön für 's Korrektur-Läse loswärde – merci vyl Mol.

## **Abstract**

Molecular biological affinity studies is a field with an abundance of interesting analytical methods. The following work summarises the current methods in a short overview before focussing on the electrophoretic measurements. They belong to an active area of research, which is suitable for a large spectrum of applications. The possibility to transfer affinity studies from capillary to a miniaturised system – the chip – is the main aim of this work. In the age of high throughput screening, fast new analytical methods are required and miniaturised systems, such as the electrophoretic chip, become a common demand.

Up-to-now the application of EMSA (electrophoretic mobility shift assay) was only used on capillary. Here it was successfully transferred for the first time to a planar miniaturised system. In order to characterise the microchip, known systems (neurotransmitters and cyclodextrins) have been measured. As for the binding parameters, the measurements proofed that chips deliver the same results as the capillary, however in a shorter time and with less material consumption.

Apart from measurements with neurotransmitters, studies with artificial receptors and peptides, with single-stranded DNA and metal cations have been accomplished. The results of the binding affinities have been compared to calorimetric measurements and confirmed the quality of the ACE (affinity capillary electrophoresis) measurements on chip. By choosing certain oligonucleotide sequences and suited buffer systems, the binding selectivity of metal ions for tetranucleotides could be shown. Considering the building of binary and tertiary complexes, which depends on the kind of buffer molecules, the binding constants and the amount of binding partners were calculated. Although not the same number of measurements has been

compiled for the microchip as for the capillary, in principal the suitability of the chip to examine non-covalent bindings to oligonucleotides and DNA strands was shown.

Methodical specialities as well as qualitative differences between measurements on the capillary and on the chip have been observed and documented. In some areas of research, important for electrophoretic ACE measurements, chips are superior to capillary. The smaller amount of probes and buffer and the shorter separation time, which allows the measurement of instable systems, all speak in favour of the chip. Due to the significantly shorter separation times, the phenomenon of diffusion has a distinctly smaller impact on the peak broadening. This improves the separation efficiency. High separation efficiency is important for ACE analytics, especially so when the separation is done in seconds. The worse sensitivity of the chip could only be put down to technical peculiarities and less efficient detection systems of the chips used here. Although capillaries with normal separation lengths deliver qualitatively better results at the moment, the microchip will be superior to the classical capillary electrophoresis as soon as reliable injection methods are available and the steering of probe and separation media are solved, additional to its present advantages.

## Liste der Abkürzungen

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>	<i>EN</i>	<i>Epinephrin</i>
<i>AC</i>	<i>Affinity Chromatography</i>	<i>EOF</i>	<i>Elektroosmotischer Fluss</i>
<i>ACE</i>	<i>Affinity Capillary</i>	<i>FA</i>	<i>Frontal Analysis</i>
	<i>Electrophoresis</i>	<i>FAC</i>	<i>Frontal Affinity</i>
<i>ACEC</i>	<i>Affinity Capillary</i>		<i>Chromatography</i>
	<i>Electrochromatography</i>	<i>FACCE</i>	<i>Frontal Analysis</i>
<i>AMP</i>	<i>Adenosinmonophosphat</i>		<i>Continuous Capillary</i>
<i>AUC</i>	<i>Area Under the Curve</i>		<i>Electrophoresis</i>
<i>b</i>	<i>Breite</i>	<i>FI</i>	<i>Floating Injection</i>
<i>b<sub>1/2</sub></i>	<i>Peak-Breite auf halber</i>	<i>FS</i>	<i>Fluorescence</i>
	<i>Höhe</i>		<i>Spectroscopy</i>
<i>c</i>	<i>Konzentration</i>	$\Delta_R G$	<i>Freie Reaktionsenthalpie</i>
<i>CD</i>	<i>Cyclodextrin</i>	$\Delta_R G^\ominus$	<i>Freie Standard-</i>
<i>CE</i>	<i>Kapillarelektrophorese</i>		<i>Reaktionsenthalpie</i>
<i>CMP</i>	<i>Cytidinmonophosphat</i>	<i>g</i>	<i>Erdbeschleunigung</i>
<i>CV</i>	<i>Cyclic Voltammetry</i>	<i>GI</i>	<i>Gated Injection</i>
$\delta$	<i>Chemische Verschiebung</i>	<i>Gl.</i>	<i>Gleichung</i>
<i>D</i>	<i>Diffusionskoeffizient</i>	<i>GMP</i>	<i>Guanosinmonophosphat</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>	$\Delta_R H$	<i>Reaktionsenthalpie</i>
<i>E<sub>Sep</sub></i>	<i>E-Feld der Separation</i>	<i>h</i>	<i>Höhe</i>
<i>ED</i>	<i>Equilibrium Dialysis</i>	<i>HD</i>	<i>Hummel-Dreyer</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immuno-</i>	<i>HUGO</i>	<i>Human Genome</i>
	<i>sorbent Assay</i>		<i>Organisation</i>
<i>EMSA</i>	<i>Electrophoretic Mobility</i>	<i>Ibu</i>	<i>Ibuprofen</i>
	<i>Shift Assay</i>		

$IC_{50}$	Konzentration für 50%ige Inhibition	$n$ NMR	Anzahl Liganden Nuclear magnetic resonance
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	OTA	o-Toluylsäure
$K_B$	Bindungskonstante	$\Delta p$	Druck
$K_i$	Inhibitionskonstante	PE	Preequilibrated
$k_{on}$	Geschwindigkeits- konstante der Hinreaktion	PI PPT	Pinched Injection Potentiometric pH-Titration
$k_{off}$	Geschwindigkeits- konstante der Rückreaktion	Pro $\Delta_R Q$	Propranolol Reaktionswärme
$\lambda$	Wellenlänge	$q$	Ladung
L	Ligand	$\rho$	Dichte
$l_{eff}$	Effektive Länge	R	Universelle Gaskonstante
$l_{inj}$	Länge des Injektionsplugs	$r_i$	Radius
$l_{tot}$	Totale Länge	$\sigma$	Standardabweichung
$\mu$	Mobilität	S	Substrat
MC	Microchip	$\Delta_R S$	Reaktionsentropie
MC-ACE	Microchip-Affinitätskapillar- elektrophorese	$s_{EOF}$ $s_{IntStd}$	Migrationstrecke des EOFs Migrationsstrecke des Standards
MEKC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography	$s_m$	Migrationsstrecke
MOPS	4-Morpholinopropansulfon- säure	$s_{Probe}$	Migrationsstrecke der Probe
MS	Massenspektrometer	sCD	Sulfatiertes $\beta$ -Cyclodextrin
$\eta$	Viskosität	SI	Simplest Injection
N	Theoretische Bodenzahl	SL	Komplex, Produkt

<i>SPR</i>	<i>Surface Plasmon Resonance</i>	<i>TRIS</i>	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
<i>T</i>	<i>Temperatur</i>	$\Delta U$	<i>Spannung</i>
$t_{1/2}$	<i>Halbwertszeit</i>	$U_{Sep}$	<i>Separationsspannung</i>
$t_{EOF}$	<i>Migrationszeit des EOFs</i>	<i>UV</i>	<i>Ultraviolett</i>
$t_{IntStd}$	<i>Migrationszeit des internen Standards</i>	<i>V</i>	<i>Volumen</i>
$t_m$	<i>Migrationszeit</i>	<i>VACE</i>	<i>Vacancy ACE</i>
$t_{Probe}$	<i>Migrationszeit der Probe</i>	<i>VP</i>	<i>Vacancy Peak</i>
$t_{Sep}$	<i>Separationszeit</i>	$x_S$	<i>molare Fraktion des Substrats</i>
<i>Tab.</i>	<i>Tabelle</i>		
<i>TMP</i>	<i>Thyminmonophosphat</i>	<i>&gt;-I-O</i>	<i>Zweiarmiger Rezeptor</i>

## Messeinheiten

Mobilität  $\mu$   $\left[ \frac{\text{cm}^2}{\text{s} \cdot \text{V}} \right]$

E-Feld  $E_{Sep}$   $\left[ \frac{\text{V}}{\text{cm}} \right]$

# EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die Dissertation "**Molekularbiologische Affinitätsstudien – Neue Anwendungen elektrophoretischer, miniaturisierter Trennsysteme**" nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst, bei keiner anderen Universität und bei keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.

Alexandra Stettler

Birsfelden, im Oktober 2006

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Affinitätsstudien	3
2.2 Thermodynamik	4
2.3 Andere Messmethoden	4
2.4 Literaturverzeichnis von Kapitel 2	9
3 Thesis	11
4 Grundlagen und Theorie	13
4.1 Kurze Einleitung in die Kapillarelektrophorese	13
4.1.1 Injektion	15
4.1.2 Trennung	16
4.1.3 Detektion	18
4.1.4 Die verwendeten Geräte für Messungen auf Kapillare	19
4.2 Mikroanalytische Systeme	20
4.2.1 Das verwendete Gerät für Chipmessungen	23
4.3 Affinitätskapillarelektrophorese	24
4.3.1 Theorie	24
4.3.2 Methoden	25
4.3.3 MC-ACE	31
4.4 Literaturverzeichnis von Kapitel 4	32
5 Resultate und Diskussion	35
5.1 Transfer von Kapillare auf Chip	35
5.1.1 Trenneffizienz	36
5.1.2 Theoretische Bodenzahlen	37
5.1.3 Sensitivität	42

## Inhaltsverzeichnis

---

5.1.4 Puffersysteme	43
5.1.5 Puffervermögen	44
5.1.6 Konzentrationen	45
5.1.7 Beschichtung der Innenwand	46
5.1.8 Externe Einflüsse	47
5.2 Verschiedene Applikationen	47
5.2.1 Interne Standards	48
5.2.2 Peak-Verschiebung ( $\mu$ ) und Peak-Fläche (AUC)	51
5.2.3 Neurotransmitter – Paper I	54
5.2.4 Peptide – Paper II	55
5.2.5 Einzelstrang-DNA – Paper III	57
5.2.6 Review	67
5.3 Literaturverzeichnis von Kapitel 5	68
<b>PAPER I</b>	71
<b>PAPER II</b>	81
<b>PAPER III</b>	89
<b>REVIEW I</b>	101
6 Schlussfolgerung und Ausblick	133

---

## 1 Zusammenfassung

Molekularbiologische Affinitätsstudien bergen eine Vielzahl interessanter Analysen-Methoden in sich. Die folgende Arbeit streift in einem kurzen Überblick die gängigen nicht-elektrophoretischen Methoden, bevor sie näher auf die elektrophoretischen Messmethoden eingeht. Diese gehören zu einem aktiven Forschungsgebiet, das sich für ein breites Anwendungsspektrum eignet. Die Möglichkeit, Affinitätsstudien von Kapillare auf ein verkleinertes System – den Chip – zu übertragen, bildet den Schwerpunkt der Arbeit. Da im Zeitalter von High Throughput Screening ein Bedarf an neuen, schnellen Analysen-Methoden besteht, stossen miniaturisierte Systeme wie der Elektrophorese-Chip auf grosses Interesse.

Die bisher nur auf Kapillare angewandte EMSA-Applikation (Electrophoretic Mobility Shift Assay) wurde hier erstmalig erfolgreich auf ein planares, miniaturisiertes System überführt. Zur Charakterisierung des Mikrochips wurden bekannte Systeme (Neurotransmitter und Cyclodextrine) gemessen. Hinsichtlich der bestimmten Bindungsparameter zeigte sich, dass der Chip in kürzerer Zeit und mit geringerem Materialverbrauch vergleichbare Ergebnisse liefert wie Kapillaren mit einer ca. 25 mal längeren Trennstrecke.

Neben den Messungen mit den Neurotransmittern wurden Studien mit künstlichen Rezeptoren und Peptiden, mit Einzelstrang-DNA und Metall-Ionen durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindungsaffinitäten wurden mit kalorimetrischen Messungen verglichen und lieferten die Bestätigung der Qualität der ACE-Messungen (Affinitätskapillarelektrophorese) auf Mikrochips. Durch Auswahl bestimmter Oligonukleotid-Sequenzen und geeigneter Puffersysteme konnte eine Bindungsselektivität von Metall-Ionen zu Tetranukleotiden gezeigt werden. Unter Berücksichtigung der Bildung von binären und ternären Komplexen, abhängig von

---

der Art der Puffermoleküle, wurden die Bindungskonstanten und die Anzahl der Bindungspartner berechnet. Auch wenn die Messungen auf dem Mikrochip nicht im gleichen Umfang wie auf der Kapillare durchgeführt wurden, so wird prinzipiell die Eignung des Chips für Untersuchungen von nicht-kovalenten Bindungen an Oligonukleotiden und DNA-Strängen gezeigt.

Methodische Besonderheiten als auch die qualitativen Unterschiede der Messergebnisse zwischen kapillarer Elektrophorese und Elektrophorese auf planaren Mikrochips wurden verglichen. Hinsichtlich einiger Kriterien, bedeutsam für elektrophoretische ACE-Messungen, ist der Chip der Kapillare gegenüber klar überlegen. Der geringere Proben- und Pufferverbrauch und die kürzere Trennzeit, die auch das Messen instabiler Systeme ermöglicht, sprechen für den Chip. Durch wesentlich kürzere Trennzeiten wirkt sich das Phänomen der Diffusion deutlich weniger auf eine Peak-Verbreiterung aus, was zu einer verbesserten Trenneffizienz führt. Eine hohe Trenneffizienz ist in der ACE-Analytik bedeutsam insbesondere dann, wenn die Trennungen im Sekundenbereich liegen. Das schlechtere Abschneiden bezüglich Sensitivität konnte im Vergleich einzig auf geometrische Eigenheiten und leistungsschwächere Detektionssysteme der verwendeten Chips zurückgeführt werden. Auch wenn mit Kapillaren gängiger Trennlängen die qualitativ besseren Ergebnisse geliefert werden, ist zu erwarten, dass der Mikrochip mit zuverlässigen Injektionsmethoden und Steuerung der Proben- und Trennmedien zusätzlich zu seinen jetzigen Vorteilen der klassischen kapillaren Elektrophorese überlegen sein wird.

## 2 Einleitung

### 2.1 Affinitätsstudien

Affinität stammt vom lateinischen Wort "affinitas", die Verschwägerung, ab. Im naturwissenschaftlichen Sinne ist damit die Anziehung oder auch die Stärke der Wechselwirkung zwischen einem Substrat (S) und dem dazugehörigen Liganden (L) – manchmal auch Host bzw. Guest genannt – gemeint.

Wo werden Affinitätsstudien verwendet? Bei der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes muss dessen Affinität zu seinem Wirkort (Target), aber auch der Ausschluss nicht erwünschter Targets bekannt sein, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. In dieser Phase werden in der Forschung die verschiedensten Affinitätsstudien eingesetzt, deren Ziel es ist, zur Entscheidung beizutragen, ob eine neu gefundene Substanz die richtigen Voraussetzungen als potentiellen Wirkstoff hat. Die wichtigsten Vertreter der verschiedenen Messmethoden werden später im Text beschrieben.

Zum tieferen Verständnis molekularer Wechselwirkungen in den Bereichen Biochemie aber auch Pharmakologie ist die Bindungskonstante ( $K_B$ ) eine wichtige Kennzahl; sie beschreibt, mit welcher Affinität S an L bindet. Aus der Reaktionsgleichung [Gl. 01] lässt sich das Massenwirkungsgesetz [Gl. 02] ableiten, welches  $K_B$  beschreibt. Der Wert von  $K_B$  entscheidet, ob das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Edukte (S und L) oder auf der des Produkts (SL) liegt.



$$K_B = \frac{[SL]^z}{[S]^x \cdot [L]^y} \quad \text{[Gl. 02]}$$

Die Eruiierung von  $K_B$  wird meist durch eine Titration erreicht. S wird vorgelegt und L wird schrittweise zugegeben. Da die Reaktion im Gleichgewicht ist, muss dabei

vermehrt Produkt entstehen. Die physikochemischen Eigenschaften des zunehmend vorhandenen Produkts unterscheiden sich von denen der Edukte. Die Veränderung der Gleichgewichtslage ist in einer Kurve darstellbar, aus der  $K_B$  berechnet werden kann.

## 2.2 Thermodynamik

Ein weiterer wichtiger Parameter nebst  $K_B$  ist die freie Reaktionsenthalpie ( $\Delta_R G$ ), ein Kriterium für die Richtung von Reaktionen. Nur exergone Reaktionen mit einem negativen  $\Delta_R G$  laufen spontan ab, bei positivem  $\Delta_R G$  wird Energie zur Ausführung der Reaktion benötigt. Die freie Reaktionsenthalpie bestimmt also die Richtung, in welche eine Reaktion abläuft. Im chemischen Gleichgewicht [Gl. 03] ist  $\Delta_R G$  gleich null. Die freie Standard-Reaktionsenthalpie  $\Delta_R G^\theta$  [Gl. 04] kann daher bei konstanter Temperatur  $T$  direkt aus  $K_B$  berechnet werden ( $R$  ist die universelle Gaskonstante).

$$\Delta_R G = \Delta_R G^\theta + R \cdot T \cdot \ln K_B = 0 \quad [\text{Gl. 03}]$$

$$\Delta_R G^\theta = -R \cdot T \cdot \ln K_B \quad [\text{Gl. 04}]$$

Zum Vergleich zu verschiedenen Methoden zwecks Affinitätsstudien werden oft statt der  $K_B$ - die  $\Delta_R G^\theta$ -Werte verglichen.

## 2.3 Andere Messmethoden

Nebst der in dieser Arbeit behandelten Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) – sie wird noch ausführlich im Kapitel Grundlagen und Theorie unter Punkt 4.3 besprochen – gibt es weitere Methoden, um  $K_B$  zu berechnen. Die gebräuchlichsten, nicht-elektrophoretischen Messmethoden werden im Folgenden aufgeführt und kurz erläutert.

Zur zusätzlichen Charakterisierung der Wechselwirkung kann mit einigen Methoden die Stöchiometrie der Gleichgewichte berechnet werden. Damit können die Fragen

beantwortet werden, wie viele Moleküle an eine Bindungsstelle binden und ob es verschiedene Bindungsstellen an einem Target hat. Mit Ausnahme der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) -Tests, die keine quantitative Aussage über Gleichgewichte machen können, handelt es sich bei allen Methoden um Titrationsen.

**Potentiometric pH-Titrations** (PPT) Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Titration im klassischen Sinne. In der ersten Messung wird die Säure und das Substrat vorgelegt und mit der Base titriert. In der zweiten Messung wird zusätzlich zu Säure und Substrat Ligand vorgelegt. Beide Male wird unter Schutzgas gearbeitet, um eine Reaktion mit Luftsauerstoff zu verhindern. Die Ionenstärke wird bei beiden Titrationsen konstant gehalten.  $K_B$  wird aus der Differenz der zwei pH-Titrationskurven berechnet. In komplexeren Messungsvorgängen kann auch die Stöchiometrie berechnet werden. [1] Die zur Messung benötigten Volumina an Substrat und Ligand sind sicher ein Nachteil dieser Methode, da sie nicht beliebig verkleinert werden können.

**Surface Plasmon Resonance** (SPR) Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz ist eine oberflächensensitive optische Technik zur Messung von  $K_B$ ,  $\Delta_{RH}$ ,  $\Delta_{RS}$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $IC_{50}$ ,  $K_i$  und  $c$ . Der Ligand wird auf einem dünnen Gold- oder Edelmetallfilm immobilisiert, und das Substrat wird in einer Flusszelle darüber gespült. Surface Plasmons sind Oszillationen freier Elektronen parallel zum Metall- / Dielektrizitätsinterface. p-polarisiertes Licht (Schwingung parallel zur Oberfläche) wird durch ein Prisma von hinten auf den Edelmetallfilm geschickt und dort reflektiert. Nur in einem bestimmten Winkel findet keine Reflektion statt. Veränderungen des Lichts werden auf der Vorderseite mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Wird die Oberfläche durch Absorption oder Desorption des Substrats verändert, ändert sich

der "Nichtreflektions-Winkel". [2] Eine Messung kann in 1-2 Minuten ausgeführt werden. Als Nachteil kann sicher die notwendige Immobilisierung des Liganden angesehen werden.

**Fluorescence Spectroscopy** (FS) Total internal reflection fluorescence ist eine der SPR ähnliche Methode. Beide registrieren Veränderungen an der Oberfläche des immobilisierten Liganden. Die Substrate müssen markiert sein. [3] Auch kompetitive Tests sind möglich, womit die Kinetik von Agonisten und Antagonisten bestimmt werden kann. [3] In Lösung wird das Substrat mit Ligand titriert, die Veränderung der Fluoreszenz bis zum Erreichen des Gleichgewicht wird aufgezeichnet. Die Affinitäten zu verschiedenen Bindungsstellen eines Liganden können unterschieden werden. [4,5]

**Nuclear Magnetic Resonance** (NMR) Auch mit Detektion durch Messung der kernmagnetischen Resonanz kann eine Titration verfolgt werden. Das Mischungsverhältnis von Substrat und Ligand wird durch Zugabe von Substrat zum Liganden verändert. Das Lösungsmittel ist kompetitiv zum Substrat. Dadurch ändert sich die chemische Verschiebung  $\Delta\delta$  der an der Bindung beteiligten Atome. Es entsteht eine Kurve, aus der die  $K_B$  berechnet werden kann. [6]

**Isothermal Titration Calorimetry** (ITC) Isothermale Kalorimetrie ist eine Titrationsmethode, bei der die freigewordene Wärme gemessen wird. In eine vorgegebene Konzentration des Liganden wird Substrat titriert. Die durch die Bindung frei gewordene Wärme  $\Delta_R Q$  wird nach jedem Injektionsschritt gemessen. Daraus können  $K_B$ ,  $\Delta_{RS}$ ,  $\Delta_{RH}$  und die Stöchiometrie berechnet werden. Da sich

---

zwischen den einzelnen Injektionen unter gleichmässigem Rühren ein Gleichgewicht einstellen muss, kann eine Titration bis zu 24 Stunden dauern. [7]

**Cyclic Voltammetry (CV)** Zyklische Voltammetrie – eine Kurzform aus den Worten Volt-Ampero-Metrie – misst die Stromveränderung, die der Ligand über einen bestimmten Spannungsbereich erzeugt. Die entstehenden Stufen stehen für Oxidations- bzw. Reduktions-Reaktionen. Durch Zugabe von Substrat verändert sich das Halbstufenpotential. Die Stufenhöhe des Ligands bei verschiedenen Mengen an Substrat im Gleichgewicht ist proportional zu  $K_B$ . [8]

**Frontal Affinity Chromatography (FAC)** Bei der frontalen Affinitätschromatographie wird der Ligand auf porösen Glaskügelchen immobilisiert und in eine Säule gegeben. Substrate werden aufgrund ihrer Affinität verschieden schnell durch die Säule laufen,  $K_B$  ist proportional zum Retentionsvolumen. [9]

Der Ligand kann auch in Gel immobilisiert werden. Das Substrat wird injiziert und fließt mit der flüssigen Phase daran vorbei. Die Berechnung von  $K_B$  erfolgt mittels der Hummel-Dreyer-Methode, die mit der Integration des Kurven-Peaks arbeitet. Sie wird in Kapitel Grundlagen und Theorie unter Punkt 4.3.2 noch genauer beschrieben. [10]

**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** In einer Mikrotiter-Platte wird der Ligand immobilisiert. Das Substrat wird zugegeben und nach einer Inkubationszeit mit Puffer entfernt. Antikörper des Substrats wird zugegeben. Der Überschuss wird entfernt. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym reagiert in einer Farbreaktion auf eine Testlösung. Das Vial der Kontrolle ist weniger stark gefärbt. ELISA wird zur Beantwortung der Ja-Nein-Frage, ob Substrat und Ligand binden, verwendet.

**Equilibrium Dialysis** (ED) Bei der Gleichgewichtsdialyse sind in zwei durch eine Membran getrennten Kammern auf der einen Seite Ligand und auf der anderen Seite markiertes Substrat in einer Pufferlösung. Nach 24 h Inkubation wird auf beiden Seiten eine Probe entnommen und die Konzentration des markierten Substrats gemessen. Die Konzentration des Substrats wird variiert, so dass mit einer nichtlinearen Regression  $K_B$  berechnet werden kann. Als Nachteil kann sicher die Zeitaufwand der Methode angesehen werden. [11,12]

Die hier beschriebenen Methoden können bezüglich Gleichgewicht in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Bei ACE, AC und ED basieren die Messungen auf der Trennung und Quantifizierung der verschiedenen Spezies, in denen das Substrat im Gleichgewicht vorherrscht (frei und mit dem Ligand komplexiert). Der Vorteil dieser Methoden ist deren einfache Handhabung. Nachteilig ist ein zusätzlich nötiger Analyseschritt nach dem Einstellen des Gleichgewichts.

Bei ACE, PPT, SPR, ITC, spektroskopischen Methoden (UV, IR, Fluoreszenz, NMR), CV und AC hingegen stellt sich das Gleichgewicht erst während der Messung ein. Diese Methoden beobachten die Veränderung in den spezifischen physikochemischen Eigenschaften des komplexierten Substrats oder des bindenden Liganden: Mit diesen Methoden werden gute Schätzwerte erreicht, sie sind automatisierbar und bei schwachen bis starken Wechselwirkungen einsetzbar. Bei multiplen Gleichgewichten kann leider oft keine quantitative Aussage über das  $K_B$  eines einzelnen Schrittes gemacht werden.

Sowohl die ACE als auch die AC können je nach Messart beiden Gruppen zugeteilt werden.

Die ACE hat die zusätzlichen Vorteile eines geringen Probeverbrauchs, einer raschen Messung, der Möglichkeit der Automatisierung und der Messung der Wechselwirkungen in freier Lösung, wobei zu beachten ist, dass zwischen  $K_B$  gemessen in freier Lösung und auf fester Phase ein Unterschied besteht. [13]

In dieser Arbeit wurde eine auf Kapillare schon etablierte Methode erstmalig auf ein planares, miniaturisiertes System übertragen. Die Fehlerabweichung der Bindungskonstanten für den auf dem Chip verwendeten Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) – die Methode wird im Kapitel Grundlagen und Theorie noch genauer vorgestellt – lag bei weniger als 15%. Zum Vergleich wurden für die oben beschriebenen Affinitäts-Messmethoden die folgenden Mess-Ungenauigkeiten für  $K_B$  gefunden, siehe [Tab. 01]. Die Messungen auf dem Chip sind qualitativ mit anderen Methoden vergleichbar.

Tabelle 01: Fehlerabweichung der verschiedenen Methoden

Methode	ACE	CV	ED	FAC	FS	ITC	NMR	PPT	SPR
$K_B$	$\pm < 15\%$	$\pm > 30\%$	$\pm > 10\%$	$\pm > 5\%$	$\pm > 3\%$	$\pm > 5\%$	$\pm > 10\%$	$\pm < 10\%$	$\pm < 10\%$

## 2.4 Literaturverzeichnis von Kapitel 2

- [1] H. Sigel, R. Griesser, Chem. Soc. Rev. 34 (2005) 875.
- [2] H.J. Lee, Y. Yan, G. Marriott, R.M. Corn, J. Physiol. 563 (2005) 61.
- [3] E.L. Schmid, A.-P. Tairi, R. Hovius, H. Vogel, Anal. Chem. 70 (1998) 1331.
- [4] D.S. Smith, J.R. Kramer, Anal. Chim. Acta 363 (1998) 21.
- [5] L. D'Alfonso, M. Collini, G. Baldini, Biochim. Biophys. Acta 1432 (1999) 194.
- [6] M.P. Hughes, M. Shang, B.D. Smith, J. Org. Chem. 61 (1996) 4510.
- [7] C. Arnulphi, L. Jin, M.A. Tricerri, A. Jonas, Biochemistry 43 (2004) 12258.

- 
- [8] J.N. Butt, F.A. Armstrong, J. Breton, S.J. George, A.J. Thomson, E.C. Hatchikian, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 6663.
- [9] B. Zhang, M.M. Palcic, H. Mo, I.J. Goldstein, O. Hindsgaul, *Glycobiology* 11 (2001) 141.
- [10] D.J. Winzor, *J. Mol. Recognit.* 13 (2000) 279.
- [11] M. Kwon, S. Jeong, K.H. Lee, Y.-K. Park, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13996.
- [12] M. Gupta, S. Alam, R. Bhatnagar, *Arch. Biochem. Biophys.* 446 (2006) 28.
- [13] R. Levicky, A. Horgan, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 143.

---

### 3 Thesis

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung von Affinitätsstudien mittels Elektrophorese zu etablieren. Die verwendete Methode basiert auf der Veränderung des Gleichgewichts zwischen Substrat und Substrat-Ligand-Komplex, wodurch aus der daraus resultierenden Veränderung der Ionenbeweglichkeit des Substrat-Peaks die Bindungskonstante  $K_B$  berechnet wird. Sie ist für schwache bis mittelstarke nicht-kovalente Bindungen geeignet, deren Gleichgewicht sich rasch einstellt. Dass sich in elektrophoretischen Messungen sowohl Substrat als auch Ligand in flüssiger Phase befinden, ist ein Vorteil gegenüber Festphasen-Tests, denn der Hintergrund-Elektrolyt kann auch an Zellflüssigkeit angeglichen werden, um möglichst physiologische Verhältnisse zu imitieren.

Eine einfache und präzise Methode ist für die Eruierung neuer Arznei-Wirkstoffe bedeutsam. Zusätzlich sollte der Fokus auf einer Screening-Methode liegen, die rasch Resultate liefert. Die bisher erst auf Kapillare angewandte Methode wurde in dieser Arbeit auf ein miniaturisiertes planares System – den Chip – übertragen. Nach dem Wechsel von der Kapillare auf den Chip konnten die Messungen auf Grund der kürzeren Trennstrecke des Chips schneller und mit weniger Materialaufwand ausgeführt werden. In dieser Arbeit soll aufgezeigt werden, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, damit der Wechsel von Kapillare auf Chip erfolgreich angewendet werden kann, aber auch wann die Grenzen der Messmöglichkeiten auf Chip erreicht werden.

Die Arbeit ist wie folgt aufgebaut: in der Einleitung wird näher auf den Begriff der Affinität eingegangen, die für Wechselwirkungen zwischen Substrat und Ligand eine zentrale Rolle spielt. Nicht-elektrophoretische Affinitäts-Messmethoden werden dabei auf Grund ihrer Vor- und Nachteile sowie der Fehlerabweichung bei der Berechnung der Bindungskonstanten mit der ACE verglichen. Anschliessend werden die

---

Grundlagen der Elektrophorese sowie die Theorie der ACE erklärt. Basierend auf diesem theoretischen Wissen werden die Unterschiede zwischen Kapillare und Chip erläutert. Die Beschreibung der Vor- und Nachteile der beiden Messmedien wird mit einen Überblick über die erarbeiteten Resultate in den Bereichen Neurotransmitter, Peptide und Einzelstrang-DNA ergänzt. Zuletzt folgen die daraus gezogenen Schlüsse und ein Ausblick auf die weitere Forschung.

---

## 4 Grundlagen und Theorie

### 4.1 Kurze Einführung in die Kapillarelektrophorese

Elektrophorese leitet sich von den griechischen Wörtern "ηλεκτρονιο φορεσις" ab und bedeutet "das Tragen von Elektronen" – also Elektronenübertragung. Es handelt sich um eine analytische Trennmethode, die eine Probe aufgrund einer über die gesamte Messstrecke angelegten Spannung in ihre einzelnen Komponenten trennt. Die Trennung erfolgt durch Unterschiede im hydrodynamischen Radius ( $r_i$ ) und in der Ladung ( $q$ ) der zu analysierenden Substanzen.

Die bekannteste elektrophoretische Messart ist die Gelelektrophorese [Abb. 01], die vor allem seit dem HUGO- (Human Genome Organisation) Projekt an Popularität gewonnen hat, da sie dort zur Trennung von DNA-Segmenten verwendet werden konnte. Dabei wird die gelöste Probe in ein in Gel gestanztes Loch appliziert. An das Gel wird nun eine Spannung angelegt. Die Segmente wandern aufgrund ihres Volumens und ihrer Ladung verschieden schnell durch das Gel. Zusätzlich wirkt das Gel wie ein Sieb, das kleinere Segmente weniger am Wandern hindert als grössere. Dadurch verbessert sich die Trenneffizienz bei Segmenten, die gleiche Ladung aber verschiedene Volumina haben. Die Spannung wird bei etablierten Systemen nach einer festgelegten Zeit abgeschaltet. Bei neuen Systemen wird eine an der Puffer-Front mitlaufende Kontrollfarbe zur Probe zugegeben, die anzeigt, wann das Gel durchlaufen ist. Die Visualisierung der zu messenden Substanzen kann bei Proteinen durch anschließende Färbung mit Silber oder Coumassie-Blau geschehen, bei DNA und RNA durch eine Anlagerung von Ethidiumbromid, das dann im UV-Licht sichtbar ist.

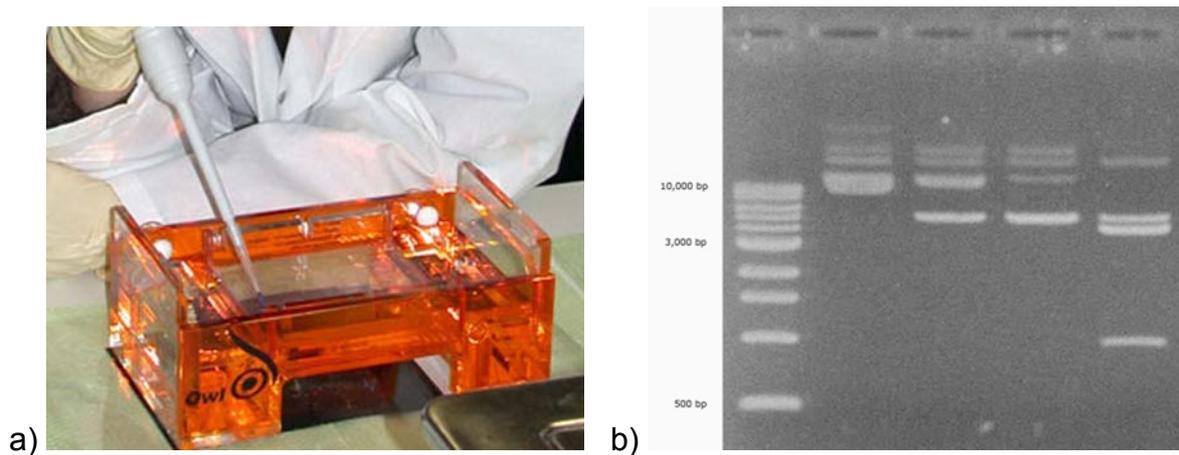


Abbildung 01: Gelelektrophorese

a) Probe wird mit einer Eppendorf-Pipette ins Gel injiziert; b) Gel nach der Trennung unter UV-Licht.

Kapillarelektrophorese (CE) funktioniert nach genau dem gleichen Prinzip, wobei die Messumgebung statt einer Gelplatte eine mit Puffer gefüllte Kapillare ist. Die Kapillare besteht aus Quarzglas und hat einen Innendurchmesser von 25 bis 100  $\mu\text{m}$ . Die Kapillarlänge hängt vom Messgerät ab und beträgt zwischen 50 und 100 cm. Meistens ist die Kapillare aussen mit einer Polyimid-Schicht bruchgeschützt. Der Puffer dient als Grundmedium, das den angelegten Strom weiterleitet und für die Konstanthaltung des pHs während der Messung sorgt. Als Lösungsmittel für den Puffer wird doppelt deionisiertes Wasser verwendet, um unkontrolliertem Stromfluss vorzubeugen. Die Probe wird ebenfalls in doppelt deionisiertem Wasser oder im Puffer gelöst. Sie kann aus Ionen, Molekülen bis hin zu ganzen Zellen bestehen. Die Geschwindigkeit, mit der sie sich aufgrund der angelegten Spannung durch die Kapillare bewegt, wird Mobilität ( $\mu$ ) genannt. Diese ist abhängig von der Viskosität ( $\eta$ ) des Puffers, vom Volumen der zu messenden Spezies ( $6 \cdot \pi \cdot r_i$ ) und von deren Ladung ( $q$ ), wie in [Gl. 05] dargestellt. Bei wässrigen Lösungen kann  $\eta$  der Viskosität von Wasser (1.002 Pa  $\cdot$  s, bei Raumtemperatur) gleichgesetzt werden. In der CE ist es üblich, die Mobilität  $\mu$  statt in [ $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] in [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] anzugeben. Die Werte liegen im Bereich von  $1 - 10 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

$$\mu = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad [\text{Gl. 05}]$$

Der Anfang und das Ende der Kapillare sind zusammen mit je einer Platin-Elektrode in ein Vial (Gefäß) mit Puffer eingetaucht, siehe [Abb. 02]. Die Kapillare wird vom Inlet-Vial (Vial am Anfang) aus hydrodynamisch mit Puffer gefüllt. Für die Injektion der Probe wird das Puffer-Vial am Kapillaranfang durch das Vial mit der Probe ausgewechselt. Die Probe wird während einem vordefinierten Zeitraum von 1 – 10 s in die Kapillare überführt.

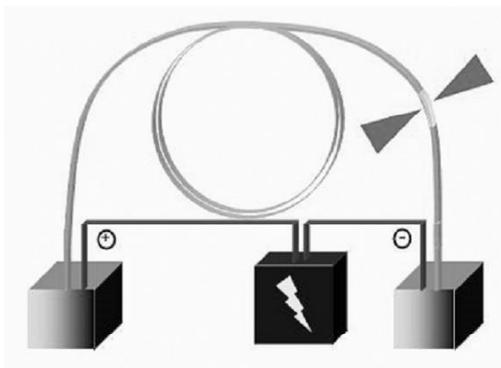


Abbildung 02: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese

Kapillare mit Puffervials, Spannungsquelle, Elektroden und Detektionsfenster (Pfeile).

#### 4.1.1 Injektion

Die Injektion kann elektrokinetisch (durch Anlegen einer Spannung  $\Delta U$ ), hydrodynamisch (mit Druck am Kapillaranfang oder mit Vakuum am Kapillarende  $\Delta p$ ) und hydrostatisch (über ein Flüssigkeitsgefälle zwischen Kapillaranfang und -ende  $\Delta h$ ) erfolgen. Genau genommen ist die hydrostatische Injektion eine Untergruppe der hydrodynamischen, da sich durch die unterschiedliche Höhe von Kapillaranfang und -ende auch der Druck verändert. Wie aus [Gl. 06] ersichtlich wird, ist der Druck direkt proportional zur Höhe, da die Dichte des Puffers ( $\rho$ ) und die Erdbeschleunigung ( $g$ )

konstant sind. Die hydrostatische Injektion wird vor allem dort verwendet, wo die Möglichkeit des Anlegen eines Druckes bzw. eines Vakuums nicht gegeben ist.

$$p = \rho \cdot g \cdot h \quad \text{[Gl. 06]}$$

Bei der elektrokinetischen Injektion wird eine Spannung angelegt. Dadurch wandert die Probe, gleich wie im später beschriebenen Trennungsschritt, in die Kapillare. Die Probenmenge ist abhängig von der Zeit und der Spannung, daneben aber auch noch von der Mobilität der darin enthaltenen Substanzen und vom elektroosmotischen Fluss (EOF). Substanzen mit gegensätzlicher Ladung können unter Umständen nicht miteinander injiziert werden. Diese Injektionsart wird bevorzugt bei viskösen Puffern und Gels verwendet, wo das Anlegen eines Drucks Schwierigkeiten bereitet.

Die hydrodynamische Injektion erfolgt durch einen Druckunterschied zwischen Kapillaranfang und –ende; sie ist unabhängig von der Zusammensetzung der Probe. Sie liefert bei Konstanthaltung der äusseren Parameter (Temperatur, Kapillarwand, Puffer, etc.) gut reproduzierbare Probemengen und ist daher die beliebtere Methode als die elektrokinetische Injektion. In dieser Arbeit wurde für die Kapillare die hydrodynamische, für den Chip die elektrokinetische Injektion verwendet.

#### 4.1.2 Trennung

Nach einem Wechsel zurück ins Puffer-Vial, wird die Trennung mit einer angelegten Spannung von 10 bis 30 kV gestartet. Bei normal angelegter Spannung mit der Kathode am Messende bewegt sich der Puffer Richtung Kathode. Die Eigengeschwindigkeit des Puffers wird elektroosmotischer Fluss (EOF) genannt. Er entsteht durch den Dissoziationsgrad der Silanol-Gruppen der Quarzglas-Oberfläche; dieser ist pH-abhängig und ist somit mit den Wechselwirkungen der Hydroxid-Gruppen mit dem Puffer verknüpft. Die anionische Form der Hydroxid-Gruppen bildet

mit den positiv geladenen Teilchen des Puffers eine Doppelschicht. Je tiefer der pH desto kleiner wird die Doppelschicht und damit auch der EOF.

Die Mobilität verschiedener Substanzen im elektrischen Feld der Kapillare ist proportional zu deren Volumen und Ladung, siehe [Gl. 05]. Kleine Kationen mit hoher Ladung wandern schneller als grosse mit tiefer Ladung. Nach den Kationen folgen die neutralen Teilchen, die sich mit dem EOF bewegen. Anionen bewegen sich entgegen des EOFs. Anionen, deren Eigenmobilität grösser ist als der EOF, sind nur mit umgekehrt angelegter Spannung – die Anode am Messende – messbar, siehe [Abb. 03].

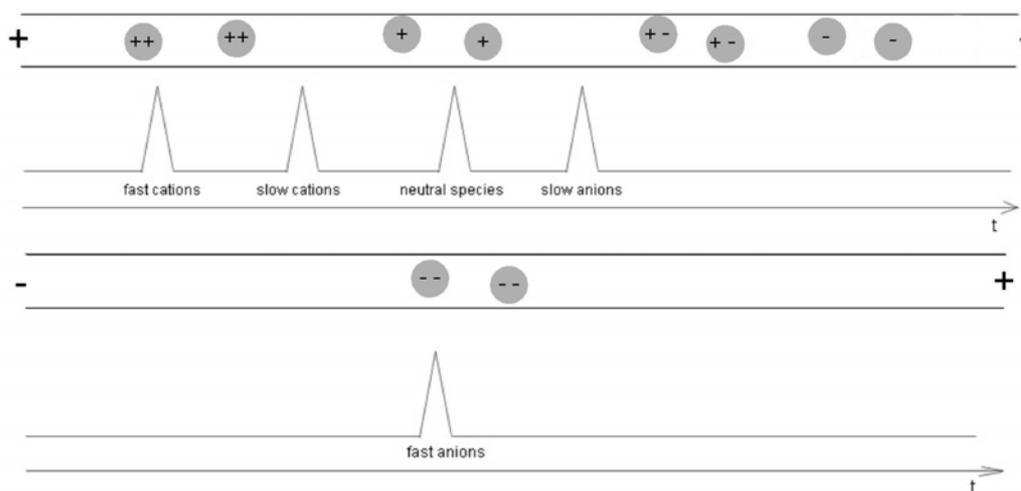


Abbildung 03: Schema der Kapillare mit dazugehörigem Elektropherogramm.

Oben: normaler Mode (angelegte Spannung mit Kathode am Kapillarende). Der Peak mit den schnellen Kationen kommt als erstes, dann folgen langsame Kationen, neutrale Teilchen und langsame Anionen.

Unten: umgekehrter Mode (angelegte Spannung mit Anode am Kapillarende). Nur die schnellen Anionen können so gemessen werden.

Der EOF kann kontrolliert und im Optimalfall sogar unterdrückt werden. Da er vom elektrischen Feld und vom pH abhängig ist, erfolgt eine erste grobe Kontrolle durch das Variieren eben dieser Parameter. Sie kann mittels Pufferadditiven zur

Konstanthaltung der Ionenstärke und dynamischer oder kovalenter Beschichtung (Coating) der Innenoberfläche der Kapillare noch verfeinert werden. Die Ionenstärke verändert die Dicke der Doppelschicht an der Kapillarwand: durch eine Erhöhung wird sie zusammengedrückt und der EOF wird kleiner, eine Erniedrigung erhöht den EOF. Eine zu hohe Ionenstärke kann allerdings zu unkontrollierten Strömen in der Kapillare führen. Tenside und neutrale hydrophile Polymeren im Puffer bewirken durch Absorption an der Kapillarwand eine dynamische Beschichtung und verkleinern so den EOF. Bei einer kovalenten Beschichtung wird meist mit Polyacrylamid gearbeitet, es unterdrückt den EOF nahezu vollständig. Dadurch werden bei normal angelegter Spannung die Kationen und bei umgekehrter Spannung die Anionen gemessen. Die neutralen Teilchen wandern ohne EOF gar nicht und können daher auch nicht online gemessen werden.

#### 4.1.3 Detektion

Zur Detektion der Proben sind verschiedene Methoden möglich. Die wichtigsten sind Fluoreszenz, MS, UV, Amperometrie und Leitfähigkeit, wobei UV die am häufigsten verwendete und Fluoreszenz und MS die zukunftssträchtesten sind. Beide haben im Gegensatz zu UV eine sehr niedrige Nachweisgrenze und können daher zur Bestimmung von Realproben im unteren mikromolaren Bereich eingesetzt werden. Der Nachteil bei der Fluoreszenz ist eine Derivatisierung der Probe. Für eine stabile Detektion im MS-Ionenspray muss ein Zusatzvolumen zur Probe eingespritzt werden, was zu einer Verdünnung der ohnehin schon kleinen Proben-Konzentration führt. Bei Fluoreszenz- und UV-Detektion wird in die schützende Polyimid-Schicht nahe des Endes der Kapillare ein Fenster eingebrannt, wie es in [Abb. 02] ersichtlich ist, da sie nicht Licht-durchlässig ist. Die Amperometrie hat auch eine sehr niedrige Nachweisgrenze, ist aber auf die Messung oxidier- und reduzierbarer Substanzen

beschränkt. Da die Detektion am Kapillarende stattfindet und nicht durch ein Fenster, ist die Nachweisgrenze – anders als bei Fluoreszenz- und UV-Detektion – nicht vom Innendurchmesser der Kapillare, der die optische Wegstrecke bildet, abhängig.

Mit allen Methoden kann direkt und indirekt gemessen werden. Bei der direkten Messung erhält man einen positiven Peak, wenn das Substrat am Detektionsort vorbeiläuft. Man erhält positive Peaks, weil die in der Probe enthaltenen Substanzen detektierbar sind und sich daher von der Grundlinie abheben. Die indirekte Methode ergibt für das Substrat einen negativen Peak. Bei der indirekten Messung ist der Puffer messungsaktiv und bewirkt eine Erhöhung der Grundlinie. Die negativen Peaks entstehen durch das Vorbeiwandern einer nicht detektierbaren Substanz am Detektor, was zu einem Unterbruch in der Grundlinie führt.

Die Detektion erfolgt für Fluoreszenz- und UV-Messungen während der Trennung, für Amperometrie, Leitfähigkeit und MS direkt am Ausgang der Kapillare. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese wird nicht die zurückgelegte Strecke während einer bestimmten Zeit gemessen, sondern die Migrationszeit der Substanz zum Detektionsort. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips bilden eine Ausnahme. Dank verteilter Dioden ist der gesamte Trennkanal beobachtbar. Hier ist die Messzeit festgelegt und die Migrationsstrecke wird gemessen.

#### 4.1.4 Die verwendeten Geräte für die Messungen auf Kapillare

Für die Messungen mit Kapillare wurden zwei Geräteversionen von PrinCE Technologie verwendet (Crystal ATI Unicam Modell 310 und PRINCE 500 Autosampler 2-Lift). Beim Unicam 310 hatten die Kapillaren eine effektive Länge von 54 und eine Gesamtlänge von 67 cm, beim PRINCE 500 33.5 bzw. 84 cm. Der UV-Detektor war bei beiden ein Spectra 100 von Thermo Separation Products. Die Daten wurden beim Unicam 310 mit einem  $\mu$ DAQ AD-Wandler von Eagle Technologie

aufgezeichnet, beim PRINCE 500 war es ein PowerChrom 280 AD-Wandler von eDAQ.

#### 4.2 Mikroanalytische Systeme

Im Trend liegen zurzeit Methoden, die mit weniger Ressourcen schnellere und billigere Analysen ermöglichen. Eine Miniaturisierung der Kapillare ist die logische Konsequenz. Die Verkürzung der Trennstrecke hat eine klare Zeitersparnis zur Folge, siehe [Abb. 04]. Durch eine Verkleinerung der In- und Outlet-Vials werden Probe und Puffer eingespart. Die Überführung auf ein planares System – sogenannte Chips – vervielfacht die Messmöglichkeiten: parallellaufende Mehrfachmessungen; integrierte Reaktionen vor, während und nach der Messung werden möglich. Im Baukasten-System kann täglich eine neue Chipvariante hergestellt werden. Platten aus Glas und spezielle Plastik-Arten dienen als Grundoberfläche, mittels Laser und Säure werden die Kanäle eingefräst bzw. -geätzt, eine zweite Platte schliesst die Kanäle nach oben ab. Die Detektions- und Hochspannungsapparatur werden passend zusammengestellt.

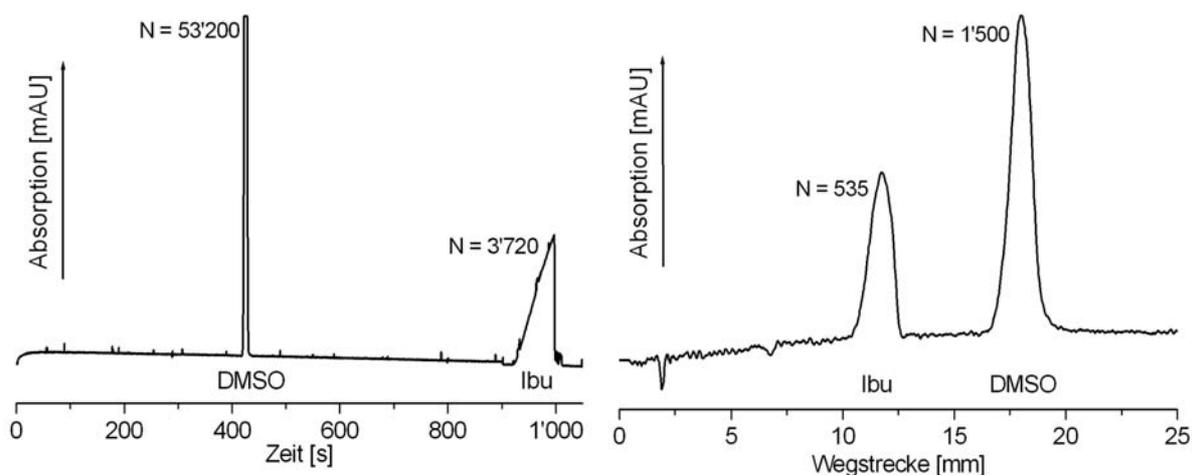


Abbildung 04: Elektropherogramme

Links: Elektropherogramm auf Kapillare mit Detektionsfenster bei 54 cm. Rechts: Elektropherogramm auf Chip mit Diodenarray über die gesamte Trennstrecke nach 10 s.

Durch ihre Geometrie erfordern die Chips eine neue Methode der Probenaufnahme. Der Wechsel von Puffer- zu Probe-Vial und zurück entfällt, da der Chip nebst dem Trennkanal noch einen weiteren quer dazu verlaufenden Injektionskanal – bildlich als Kreuz vorstellbar – hat. Vor der Messung werden die beiden Kanäle hydrodynamisch mit Puffer gefüllt. An den Enden jedes Kanals liegt eine verkleinerte Variante eines Vials. Es gibt ein Probe-, ein Probenabfall-, ein Puffer- und ein Pufferabfall-Vial. Das Probe-Vial wird mit Probe, die anderen drei werden mit Puffer befüllt.

Der Wechsel vom Injektions- zum Trennschritt erfolgt durch Umpolen der Spannung zwischen Trenn- und Injektionskanal, so kann die Migrationsrichtung geändert werden. Die Injektion auf dem Chip erfolgt elektrokinetisch, da sich die besser reproduzierbare, hydrodynamische Injektion bis jetzt erst im Versuchsstadium befindet. [1,2] Die elektrokinetische Injektion kennt verschiedene Techniken, siehe [Abb. 05]: [3,4]

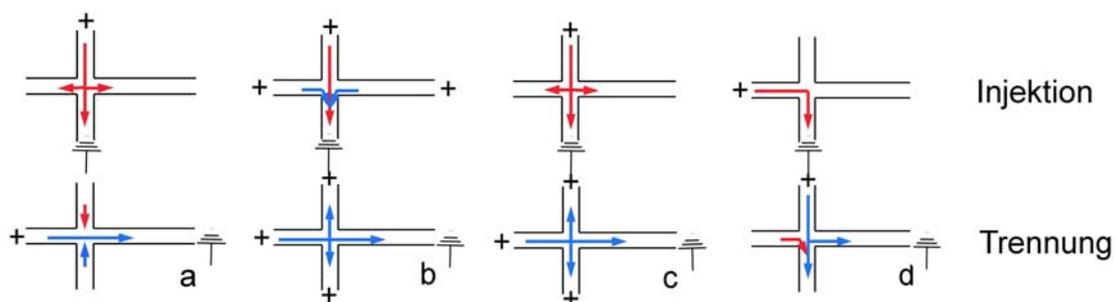


Abbildung 05: Injektion und Trennung auf dem Chip

Simplest Injection a), Pinched Injection b), Floating Injection c) und Gated Injection d). Pfeile zeigen die Migrationsrichtung von Probe (rot) und Puffer (blau) an. Probevial bei a)-c) oben, bei d) links.

In der Simplest Injection (SI) wandert die Probe durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf den Injektionskanal aus dem Probe-Vial über die Kreuzung in das Probenabfall-Vial. Durch Umschalten der Spannung auf den Trennkanal migriert der Teil der Probe, der sich im Kreuz befindet, durch den Trennkanal zum Pufferabfall-Vial.

---

Die Pinched Injection (PI) arbeitet nach einem ähnlichen Prinzip wie die SI. Zusätzlich wird während der Injektion auf den Trennkanal eine Spannung angelegt, die auch den Puffer zum Probenabfall-Vial migrieren lässt. So wird ein vorzeitiges Hineindiffundieren der Probe in den Trennkanal verhindert. Im Trennschritt wird analog dazu eine Spannung auf den Injektionskanal gelegt, welche die Probe vom Kreuz fernhält.

Die Floating Injection (FI) hat die gleiche Injektion wie die SI. Zur Trennung folgt sie den Regeln der PI mit einer zusätzlichen Spannung auf den Injektionskanal. Sie hat eine niedrigere Nachweisgrenze als SI und PI.

Bei der Gated Injection (GI) liegt das Probenabfall-Vial dem Proben-Vial nicht gegenüber sondern in einem 90° Winkel. Während der Trennung fließt weiterhin Probe durch das Kreuz. Puffer-Wanderung vom Puffer-Vial zu den beiden Abfall-Vials hindert die Probe daran, in den Trennkanal zu diffundieren. Während der Injektion wird der Fluss des Puffers kurz unterbrochen, so dass Probe in den Trennkanal gelangen kann. [5]

In [Abb. 05] sind die Fließrichtungen von Probe und Puffer aller vier Techniken bei normal angelegter Spannung schematisch dargestellt. Die GI unterbindet die Diffusion nicht aktiv durch eine angelegte Spannung sondern mit seinen speziellen geometrischen Verhältnissen. Der Injektionsschritt von SI und FI ist identisch und im Gegensatz zur PI wird eine Diffusion der Probe in den Trennkanal nicht verhindert. Die erlaubte Diffusion im Injektionsschritt bewirkt eine Vergrößerung des Probenvolumens und damit sinkt die Nachweisgrenze. Das kann jedoch nur ausgenutzt werden, wenn die Kenntnis der exakten Stoffmenge der Probe für die Messung nicht erforderlich wird. Die SI hat während der Trennung ein höheres Grundrauschen als PI und FI, da ein Hineindiffundieren der Probe in den Trennkanal

nur bei den letzten zwei Methoden verhindert wird. [4] In dieser Arbeit wurde für die Messungen auf dem Chip ausschliesslich die PI verwendet.

#### 4.2.1 Das verwendete Gerät für Chipmessungen

Die erste kommerziell erhältliche Chip-Station ist die MCE-2010 von der Firma Shimadzu. Als Besonderheit hat dieses Gerät einen UV-Dioden-Array (mit 1'024 Dioden) über die gesamte Trennstrecke verteilt, so dass die Wanderung der Peaks beobachtet werden kann, siehe [Abb. 06]. Hier wird wie bei der Gelelektrophorese die zurückgelegte Strecke während einer vorher bestimmten Zeit ermittelt.

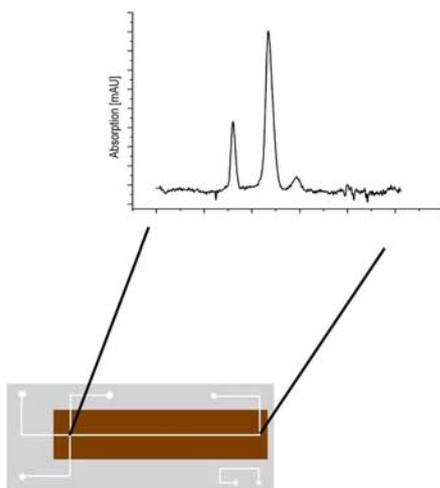


Abbildung 06: Schematischer Aufbau des Shimadzu-Chips

Das Elektropherogramm zeigt die letzte Aufnahme einer Messung.

Für die Chip-Station sind normale Quarzglas- und Polyacrylamid-beschichtete Chips erhältlich, letztere unterdrücken den EOF und verhindern eine Wandadsorption der Probe. Die Masse aller Chips sind: Länge 35, Breite 12.5 und Tiefe 2 mm, mit einem Separationskanal (ab dem Kreuz bis zum Linksknick) von 25 mm. Die Schnittstelle der beiden Kanäle ergibt die Form eines einfachen Kreuzes oder eines Doppel-Ts,

bei dem sich die Injektionsmenge vergrößert. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips hatten alle die Kreuzform.

Die Chip-Station kann bei gleichbleibendem Puffer vollautomatisch laufen gelassen werden. Drei Gefässe stehen für Puffer, deionisiertes Wasser und Abwasser zur Verfügung, die Proben werden in einer 96er Mikrotiterplatte vorgelegt. Der automatische Betrieb bot für die Messungen dieser Arbeit keine Vorteile, da das Befüllen und Waschen der Chips manuell effizienter erledigt werden konnte. Zum Befüllen der Kanäle und zum Absaugen überschüssiger Flüssigkeiten standen abdichtende Spitzen zur Verfügung, die auf eine Spritze passend speziell für diese Chips konzipiert worden sind. Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit Fasern, die von Reinigungstüchern in die Kanäle gelangten und das Kreuz verstopften, wurde zum Trocknen der Chips ausschliesslich der Sog einer Wasserstrahlpumpe verwendet. Zur Vorbeugung gegen Staub in den Kanälen wurden die Chips in einem Wasser-Ethanol-Gemisch aufbewahrt.

### 4.3 Affinitätskapillarelektrophorese

#### 4.3.1 Theorie

Mit der Affinity Capillary Electrophoresis (ACE) ist es möglich nicht-kovalente molekulare Interaktionen (Komplexe und Verteilungsgleichgewichte) zu charakterisieren. Die Bruttostabilitäts-Bindungskonstanten ( $K_B$ ) bezogen auf den verwendeten Puffer können mit dieser Methode berechnet werden. Diese  $K_B$ s liefern einen Wert für die Anziehungskraft (ionische, hydrophobe und Wasserstoff-Brücken-Wechselwirkungen) zwischen einem Ligandmolekül und seinem Substrat. Sie dient als Basis-Information für das Verständnis von Hormonen, Medikamenten und deren Ziele wie zum Beispiel Rezeptoren im menschlichen Körper.

### 4.3.2 Methoden

Alle ACE-Methoden bauen auf dem Gleichgewicht von Edukten und Produkten [Gl. 01] auf. Entweder ist das Gleichgewicht in der Probe voreingestellt und dessen Veränderung wird während der Messung unter der Einwirkung des Puffers und des elektrischen Feldes beobachtet, oder das Gleichgewicht soll während der Messung erst entstehen. Im zweiten Fall werden die Edukte entweder als Gemisch der Probelösung oder dem Hintergrund-Puffer beigegeben, oder sie werden getrennt verwendet, so dass eines im Elektrolyten läuft, das andere als Probe injiziert wird. Die Konzentration einer Spezies bleibt konstant, die andere wird variiert, um die Lage des Gleichgewichts zu verschieben. Die als Probe gemessene Spezies wird Substrat (S), die mit der Probe agierende Spezies Ligand (L) und deren Produkt (SL) genannt. Über das verschiebende Gleichgewicht von S und SL wird die Bindungskonstante  $K_B$  berechnet. Sie kann aus der Peak-Verschiebung ( $\mu$ ), der Fläche unter der Peak-Kurve (Area under the curve, AUC) oder aus der Peak-Höhe (h) abgeleitet werden. Die gängigsten Methoden sind im Detail auch bei Busch et al. [6,7] zu finden. In [Tab. 02] sind die variablen Parameter der ACE-Methoden mit ihrem Wirkungsbereich aufgelistet.

Der Vollständigkeit halber eine kurze Beschreibung der **Affinity Capillary Electrochromatography-Methode** (ACEC); sie stellt ein Hybrid zwischen Elektrophorese und Chromatographie dar: hier ist L an der Kapillarwand einer leeren oder auf der Oberfläche einer gepackten Kapillare als stationäre Phase immobilisiert. S wird als Probe zugegeben. Zur Trennung wird reiner Puffer verwendet. Aus schwachen bis starken Wechselwirkungen kann die Mobilität der Probe berechnet werden. Im Gegensatz zur ACEC liegen in den rein elektrophoretischen Methoden S und L beide in gelöster Form vor.

Die gebräuchlichste und auch in dieser Arbeit verwendete Methode ist der **Electrophoretic Mobility Shift Assay** (EMSA); sie wird oft auch "die" ACE-Methode genannt. S wird als Probe injiziert, L wird in steigenden Konzentrationen dem Puffer zugegeben. Durch das Entstehen von SL verschiebt sich der Peak der Probe. Schwache bis mittelstarke Wechselwirkungen können damit untersucht werden, sofern sich die Mobilitäten  $\mu$  von Edukt und Produkt unterscheiden.

Werden als L steigende Konzentrationen von Mizellen, Liposomen, etc. in den Puffer gegeben, finden die Wechselwirkungen mit S an deren Phasengrenze zwischen hydro- und lipophil statt, was zu einer komplexeren Berechnung von  $K_B$  führt. Die Bindungskonstante ist hier zusätzlich abhängig vom Verteilungsquotienten von S in der mizellären und mobilen Phase. Diese Unterart der EMSA wird **Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography** (MEKC) genannt. [8] Sie ist eine Mischung aus Elektrophorese und Chromatographie insofern, dass die Mizellen als pseudostationäre Phase angesehen werden können. Durch Zugabe von chiralen Liganden in den Puffer, wie Cyclodextrine (CD) und Peptide, kann nebst der Peak-Verschiebung eine chirale Trennung von Enantiomeren erreicht werden.

Die oben erwähnte Mobilität  $\mu$  ist eine substratspezifische Konstante. Um  $\mu$  aus Elektropherogrammen von Kapillaren zu berechnen, wird die Migrationszeit [s] bei einer vorgegebenen Länge  $l_{\text{eff}}$  [cm] gemessen.

$$\mu = \frac{l_{\text{eff}} \cdot l_{\text{tot}}}{U_{\text{Sep}}} \cdot \left( \frac{1}{t_{\text{Probe}}} - \frac{1}{t_{\text{IntStd}}} \right) \quad [\text{Gl. 07}]$$

In der [Gl. 07] ist  $U_{\text{Sep}}$  die elektrische Spannung [V],  $l_{\text{eff}}$  ist die Länge der Kapillare vom Anfang bis zum Detektionsort (auch effektive Länge genannt), und  $l_{\text{tot}}$  ist die totale Länge der Kapillare [cm]. Nebst der Probe sollte immer ein inerter, interner Standard mitgemessen werden, mit dem sich der Proben-Peak vergleichen lässt.

Wird ein neutrales Teilchen, dessen Mobilität null ist, als Standard verwendet, kann die reale Mobilität der Probe direkt berechnet werden;  $t_{\text{Probe}}$  und  $t_{\text{IntStd}}$  sind die gemessenen Migrationszeiten der Peaks [s].

Das Substrat interagiert mit dem zugegebenen Liganden zu SL und verändert dadurch seine Mobilität. Die zunehmende Ligand-Konzentration im Puffer bewirkt jedoch zusätzlich zur Bildung des Komplexes SL auch eine Veränderung des Stroms und der Leitfähigkeit in der Kapillare, was sich auf das Migrationsverhalten der ganzen Probe (Standard und Substrat) auswirkt. Die Veränderung geht in die Berechnung der Mobilität des Substrats ein, wird aber, da der Standard-Peak auch davon betroffen ist, wegkompensiert.

In einer Titration mit L verändert sich die Mobilität von S durch eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite von SL. Im folgenden Beispiel wurde Einzelstrang-DNA als Substrat und Ni(II) als Ligand eingesetzt. In [Abb. 07 a] sind Elektropherogramme zu sehen, bei denen die Ligandkonzentration von 0 auf 9 mM erhöht wird. Dadurch wird der Substrat-Peak, der zu Beginn mit dem internen Standard wandert (nur ein Peak im schwarzen Elektropherogramm), in seiner Mobilität verlangsamt. Das rote und das blaue Elektropherogramm zeigen die Substrat- und Standard-Peaks getrennt. In diesem Beispiel wurde bei umgekehrt angelegter Spannung gemessen (Anode am Ende der Kapillare), so dass eine Verlangsamung der (negativen) Mobilität zu grösseren Werten führt. Die Verschiebung von  $\mu$  resultiert also aus der steigenden Konzentration des Liganden. Wird [L] gegen  $\mu$  aufgetragen, entsteht eine Kurve die sich asymptotisch der Mobilität des Komplexes  $\mu_{\text{SL}}$  nähert, siehe [Abb. 07 b]. Die Bindungskonstante  $K_B$  lässt sich nun mathematisch über die ionische Mobilität der Probe ( $\mu_S$ ), die des Komplexes ( $\mu_{\text{SL}}$ ) und die realen Netto-Mobilitäten ( $\mu$ ) beschreiben und berechnen. [9]

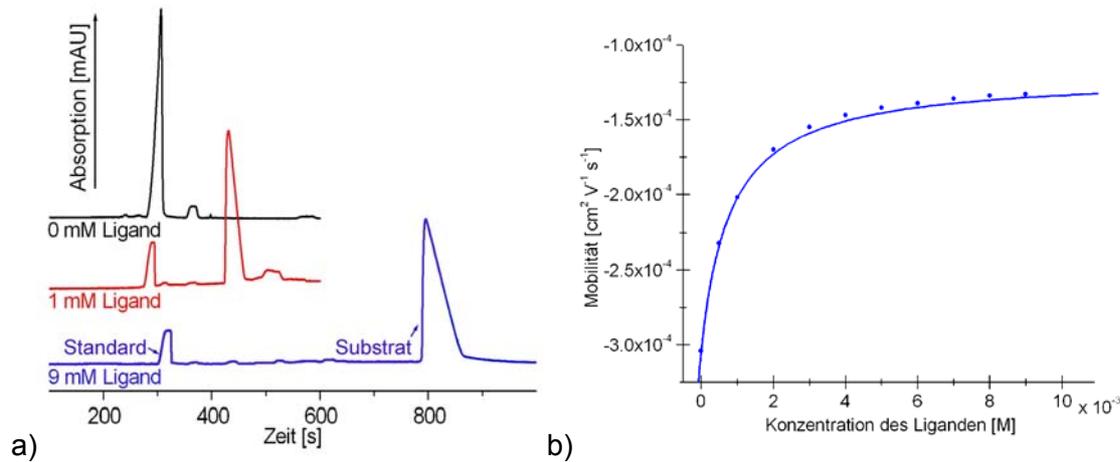


Abbildung 07: Peak- und daraus errechnete Mobilitätsverschiebung

a) Drei Elektropherogramme bei denen das Substrat durch Zunahme der Ligandkonzentration verschieden wandert; b) Mobilität  $\mu$  aufgetragen gegen die Konzentration des Liganden mit gefitteter  $K_B$ -Kurve.

$\mu$  ist die Summe der Mobilitäten des freien und des gebundenen Substrats, was für eine 1:1-Wechselwirkung wie folgt aussieht:

$$\mu = x_S \cdot \mu_S + x_{SL} \cdot \mu_{SL} = x_S \cdot \mu_S + (1 - x_S) \cdot \mu_{SL} \quad [\text{Gl. 08}]$$

Die molare Fraktion des Substrats ( $x_S$ ) wird ins Massenwirkungsgesetz, siehe [Gl. 02], eingefügt:

$$x_S = \frac{[S]}{[S] + [SL]} \quad [\text{Gl. 09}]$$

Nun wird die reale Netto-Mobilität [Gl. 08] mit [Gl. 09] kombiniert:

$$\mu = \frac{[S]}{([S] + [SL])} \cdot \mu_S + \left(1 - \frac{[S]}{([S] + [SL])}\right) \cdot \mu_{SL} = \frac{([S] \cdot \mu_S + [SL] \cdot \mu_{SL})}{([S] + [SL])} \quad [\text{Gl. 10}]$$

Das Massenwirkungsgesetz [Gl. 02] wird nach [SL] aufgelöst und in [Gl. 10] eingesetzt. Nach dem Herauskürzen von [S] entsteht die folgende Gleichung:

$$\mu = \frac{([S] \cdot \mu_S + K_B \cdot [S] \cdot [L] \cdot \mu_{SL})}{(K_B \cdot [S] \cdot [L] + [S])} = \frac{(\mu_S + K_B \cdot [L] \cdot \mu_{SL})}{(K_B \cdot [L] + 1)} \quad [\text{Gl. 11}]$$

Um aus [Gl. 11] die Bindungskonstante  $K_B$  zu berechnen, ist ein nicht-lineares Kurvenfitting nötig.

Bei mehrstufigen Reaktionen steht  $n$  für die Anzahl Liganden, die ans Substrat binden. Auch hier müssen in der realen Netto-Mobilität alle Mobilitäten des freien und des gebundenen Substrats einberechnet werden, siehe [Gl. 12].

$$\mu = X_S \cdot \mu_S + X_{SL} \cdot \mu_{SL} + X_{SL_2} \cdot \mu_{SL_2} + \dots + X_{SL_n} \cdot \mu_{SL_n} \quad [\text{Gl. 12}]$$

Die Umformung von [Gl. 12] für eine 1:2-Stöchiometrie wird in [Gl. 22] am Ende dieser Arbeit aufgenommen. Bei den übrigen gemessenen Gleichgewichten handelt es sich entweder um einfache 1:1-Wechselwirkungen oder sie sind stark kooperativ, wodurch sich eine vereinfachte Formel ergibt, siehe [Gl. 13].

$$\mu = \frac{\mu_S + K_B \cdot [L]^n \cdot \mu_{SL_n}}{1 + K_B \cdot [L]^n} \quad [\text{Gl. 13}]$$

In diesem Fall ist es nicht möglich, ein einzelnes  $K_B$  aus der Kettenreaktion zu berechnen, und nur das totale  $K_B$  über alle Stufen kann berechnet werden.

Den gleichen experimentellen Aufbau wie der EMSA hat auch die **Hummel-Dreyer-Methode** (HD). Sie wird angewendet, wenn S und SL die gleiche Mobilität haben. Statt der Peak-Verschiebung als variablen Parameter wird die Veränderung der AUC betrachtet. Als wichtige Grundbedingung darf bei der Bildung des Komplexes keine Veränderung der UV-Aktivität auftreten. Durch die zunehmende Konzentration von SL wird der Negativ-Peak des nicht mehr in Lösung vorhandenen L grösser, damit kann  $K_B$  berechnet werden.

Bei Reaktionen, die zu starken Komplexen oder kovalenten Bindungen führen, wie die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA zum Doppelstrang oder die Bildung schwerlöslicher Salze, ist keine Peak-Verschiebung sichtbar, da das Gleichgewicht

---

auf der Seite von SL liegt. In diesem Fall und bei sich langsam einstellenden Gleichgewichten ist, als Variante von HD, die **Preequilibrated Methode** (PE) nützlich, bei der S mit L zusammen als Probe injiziert wird. Die Konzentration von L wird dabei von Messung zu Messung schrittweise erhöht. Die gemessene Variable ist wie in der HD-Methode die AUC. [10]

Eine Variante des EMSA stellt die **Vacancy Affinity Capillary Electrophoresis** (VACE) dar. Hier laufen S und  $\Delta L$  im Hintergrund-Elektrolyt und reiner Puffer wird als Probe verwendet. Die Peaks in der VACE sind negativ, weil indirekt detektiert wird. Wie in der EMSA dient die Verschiebung des Substrat-Peaks zur Berechnung von  $K_B$ . Die Methode ist für schwache bis mittelstarke Wechselwirkungen geeignet. Nachteilig sind sicher der grössere Verbrauch an S und L.

Die **Vacancy Peak-Methode** (VP) hat den gleichen experimentellen Aufbau wie die VACE. Zur  $K_B$ -Berechnung wird wie in HD und PE die Veränderung der AUC des freien S als variabler Parameter genommen. Die Methode ist für schwache bis mittelstarke Wechselwirkungen geeignet, die eine langsame Kinetik haben. Der durch die indirekte Detektion bedingte grössere Verbrauch an S und L ist ein Nachteil der VP.

In einer ähnlichen Methode wie der PE werden S und L zusammen als Probe injiziert. Der Unterschied besteht in der Menge der Probe. Durch eine längere Injektion werden in der **Frontal Analysis** (FA) keine Peaks sondern Stufen abgetrennt. Zur Berechnung von  $K_B$  wird die Stufenhöhe (als Indikator des freien S) ausgewertet. Die Methode ist für mittelstarke bis starke Wechselwirkungen geeignet.

In der **Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis** (FACCE) wird die Probe kontinuierlich injiziert. Die Berechnung ist analog zur FA, die Methode ist aber nur für schwache bis mittelstarke Wechselwirkungen mit einer langsamen Kinetik geeignet.

Für alle oben erwähnten Methoden sind in [Tab. 02] die Bedingungen zur Vorbereitung von Probe und Puffer, die variablen Parameter und der Wirkungsbereich im Überblick aufgelistet.

Tabelle 02: Die verschiedenen ACE-Methoden

Methode	Probe	Puffer	Variable	Wirkbereich
EMSA	S	$\Delta L$	$\mu$	schwache bis mittlere WW; schnelle Kinetik
FA	S + $\Delta L$	Puffer	Höhe	mittlere bis starke WW; langsame Kinetik
FACCE	S + $\Delta L$	Puffer	Höhe	schwache bis mittlere WW; langsame Kinetik
HD	S	$\Delta L$	AUC	schwache bis mittlere WW; schnelle Kinetik
PE	S + $\Delta L$	$\Delta L$	AUC	mittlere bis starke WW; langsame Kinetik
VACE	Puffer	S + $\Delta L$	$\mu$	schwache bis mittlere WW; langsame Kinetik
VP	Puffer	S + $\Delta L$	AUC	schwache bis mittlere WW; langsame Kinetik

#### 4.3.3 MC-ACE

Die Messmethoden der Kapillare sind alle auf Mikrochip (MC) übertragbar. Die Messungen passen sich dem Chip mit seinen kürzeren Kanälen an. In dieser Arbeit wurde sowohl auf Kapillare wie auch auf Chip mit dem EMSA gemessen, wobei die Messungen auf dem Chip ohne einen internen Standard nicht auswertbar sind. Der Hauptgrund dafür besteht darin, dass durch die elektrokinetische Injektion der Probe und der damit verbundenen Diffusion ins Kreuz der beiden Kanäle die Probe bei Wiederholungen einer Messung nicht immer genau gleich weit wandert. Die durch den kurzen Separationskanal bedingte kurze Trennzeit sorgt des Weiteren für

weniger präzise Werte als auf der Kapillare. Diesen Ungenauigkeiten kann mit einem Standard Abhilfe geschaffen werden.

Im Unterschied zur Kapillare hat der verwendete Shimadzu-Chip keine End-Detektion, sondern detektiert mit einem UV-Dioden-Array über den ganzen Trennkanal. Um  $\mu$  aus den MC-Elektropherogrammen zu berechnen, wird die Migrationsstrecke gemessen, siehe [Gl. 14].

$$\mu = \frac{(s_{\text{Probe}} - s_{\text{IntStd}})}{E_{\text{Sep}} \cdot t_{\text{Sep}}} \quad [\text{Gl. 14}]$$

$E_{\text{Sep}}$  ist das angelegte elektrische Feld [V/cm],  $t_{\text{Sep}}$  die vorgegebene Zeit der Messung [s] und  $s$  die gemessene Migrationsstrecke des Proben- und des Standard-Peaks [cm]. Die Verschiebung von  $\mu$  resultiert – wie auch bei der Kapillare – aus steigenden Konzentrationen von L. Weitere Unterschiede zwischen Kapillare und Chip werden in Kapitel 5 noch ausführlich diskutiert.

#### 4.4 Literaturverzeichnis von Kapitel 4

- [1] C.-C. Lin, C.-C. Chen, C.-E. Lin, S.-H. Chen, J. Chromatogr. A 1051 (2004) 69.
- [2] S. Büttgenbach, R. Wilke, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 733.
- [3] S.V. Ermakov, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Anal. Chem. 72 (2000) 3512.
- [4] C.-X. Zhang, A. Manz, Anal. Chem. 73 (2001) 2656.
- [5] S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenröder, A.W. Moore Jr., J.M. Ramsey, Anal. Chem. 66 (1994) 3472.
- [6] M.H.A. Busch, J.C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A 777 (1997) 329.
- [7] M.H.A. Busch, L.B. Carels, H.F.M. Boelens, J.C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A 777 (1997) 311.

- 
- [8] R.H.H. Neubert, M.A. Schwarz, Y. Mrestani, M. Plätzer, K. Raith, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1663.
- [9] H.-H. Rüttinger, in R.H.H. Neubert, H.-H. Rüttinger (Editors), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel, 2003, p. 23.
- [10] A.V. Rudnev, S.S. Aleksenko, O. Semenova, C.G. Hartinger, A. Timerbaev, R., B.K. Keppler, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 121.



---

## 5 Resultate und Diskussion

### 5.1 Transfer von Kapillare auf Chip

Der Trend zu schnelleren Analysemethoden spiegelt sich in der Verwendung von immer kürzeren Trennstrecken auf Kapillaren wieder. Ein weiterer Schritt ist die Integration von Trenn- und Probenkanal mit Durchmessern im Mikrometerbereich auf ein planares System. Neben kurzer Trennzeiten und einfacher Handhabung kann die Geometrie und die Anordnung der Mikrokanäle individuell und entsprechend der Anwendung gestaltet werden. Der Phantasie sind keine Grenzen gesetzt, wie ein Chip strukturiert werden kann. Nebst variabel geformten Trennkanälen sind Parallelmessungen, Anreicherungsschritte und Derivatisierungsreaktionen vor und nach der Trennung möglich.

Bei kommerziell erhältlichen Chip-Messstation ist die Vielfalt deutlich eingeschränkter. Lediglich bei einem von vier Herstellern ist eine frei wählbare Messumgebung möglich, das heisst die Auswahl von variablen Trennmedien, eine wichtige Voraussetzung bei ACE-Messungen. Eingeschränkt ist auch die Art der Detektion. Fast ausschliesslich wird bei kommerziellen Chip-Stationen mit laser-induzierter Fluoreszenz gemessen, wobei weder der Detektionsort noch die Anregungswellen variabel sind. Bei der MCE-2010 von Shimadzu wird mit UV-Licht gemessen, die Chips unterscheiden sich nur in ihren Trennkanälen (beschichtet oder aus Quarzglas) und in der Form der Schnittstelle der beiden Kanäle (einfaches Kreuz oder Doppel-T).

Beim Transfer von Messungen von UV-durchlässigen Kapillaren auf die Chips der MCE-2010 musste einiges angepasst werden. Im Folgenden werden Kapillare und Chip einander gegenübergestellt und verglichen. Um Kapillar- und Chip-Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden auf beiden Systemen möglichst wenige Parameter verändert. Eine direkte 1:1-Übertragung aller Messparameter war aber

nicht möglich, da sich Kapillare und Chip bezüglich Injektionsmethode, Trennstrecke und Detektionsort unterscheiden. Obschon der Chip der Kapillare bezüglich kurzer Messzeit und geringem Probe- und Pufferverbrauch überlegen ist, erzielt sie bei anderen Parametern die besseren Ergebnisse. Dies liegt aber hauptsächlich an der noch jungen Messmethodik, die in verschiedener Hinsicht noch optimiert werden muss.

### 5.1.1 Trenneffizienz

Die Trennstrecke auf der Kapillare hat in dieser Arbeit eine Länge von 33.5 bzw. 54.0 cm. Im Gegensatz dazu ist die Strecke auf dem Chip nur 2.5 cm lang. Bei einem Verkürzungsfaktor von 13.4 bzw. 21.6 können Peak-Verschiebungen, die auf der Kapillare noch knapp visuell unterschieden werden können, auf dem Chip nicht mehr gemessen werden. Die Auflösung des Chips ist schlechter als die der Kapillare. Obwohl die Trennstrecke der Kapillare 10-20 Mal länger ist als die des Chips, sind die Messungen auf der Kapillare (ca. 10 min) um einen Faktor 60 langsamer als auf dem Chip (10 s). Die Kapillare misst somit 3-6 Mal langsamer als der Chip.

Nicht nur die Trennstrecken sind auf der Kapillare und dem Chip unterschiedlich auch die elektrischen Felder ( $E_{\text{Sep}}$ ) sind verschieden gross. Die angelegte Spannung von 30'000 V auf der Kapillare ergeben bei einer Gesamtlänge von 84 bzw. 67 cm ein  $E_{\text{Sep}}$  von 357 bzw. 448 V/cm. Auf dem Chip wird zur Trennung ein elektrisches Feld von 280 V/cm angelegt. Ein grösseres  $E_{\text{Sep}}$  lässt Substanzen in gleicher Zeit weiter wandern; so trennt es Peaks in gleicher Zeit weiter auseinander als ein kleineres  $E_{\text{Sep}}$ . Der Chip kann also auf Grund des kleineren  $E_{\text{Sep}}$  nur Wechselwirkungen mit deutlichen Peak-Verschiebungen messen. Würde auf dem Chip ein gleich grosses elektrisches Feld angelegt wie auf der Kapillare, dann müsste zugleich der Widerstand in den Kanälen vergrössert werden, um zu hohe

Ströme zu verhindern. Da der Puffer nicht signifikant verändert werden soll, müsste der Durchmesser der Kanäle verkleinert werden. Würden Trennstrecke und elektrisches Feld für beide Systeme übereinstimmen, dann wäre der Chip zwar die schnellere Messmethode, die Peaks könnten aber in Nanokanälen nicht mehr detektiert werden, weil die optische Wegstrecke für UV zu klein wäre.

### 5.1.2 Theoretische Bodenzahlen

Die Dispersion der Probenzone wird in der Kapillarelektrophorese in Analogie zur Chromatographie mit der theoretischen Bodenzahl ( $N$ ), einem Ausdruck für die Störung der Migration, berechnet. Je schmaler ein Peak ist, desto grösser wird dessen Bodenzahl und somit die Trenneffizienz für das Trennsystem. In der CE ist die Aufnahme von Nadel-Peaks möglich, da die Diffusion, als einer der Faktoren, der für eine Verbreiterung der Peaks sorgt, ungleich kleiner ist als in chromatographischen Messungen. Jedoch hauptsächlich verantwortlich für die schmalen Probenzonen ist die Ausbildung eines pfropfenförmigen Profils, welches sich durch die treibende Kraft, stammend von der Kapillaroberfläche (siehe EOF), ausbildet. Zur Berechnung werden die Migrationszeit ( $t_m$ ) und die Peak-Breite auf halber Höhe ( $b_{1/2}$ ) benötigt, siehe [Gl. 15],  $N$  ist dimensionslos. [1]

$$N = 5.54 \cdot \left( \frac{t_m}{b_{1/2}} \right)^2 \quad [\text{Gl. 15}]$$

Auf dem Chip muss die Berechnung angepasst werden, da nicht die Migrationszeit sondern der zurückgelegte Weg ( $s_m$ ) in einem festgelegten Zeitintervall gemessen wird, siehe [Gl. 16].

$$N = 5.54 \cdot \left( \frac{s_m}{b_{1/2}} \right)^2 \quad [\text{Gl. 16}]$$

Dass man auch mit [Gl. 16] auf die gleichen Werte kommt wie mit dem Original-Term, wird aus den Auswertungen der Elektropherogramme [Abb. 08] mit Epinephrin (EN) und DMSO als Probe und sulfatiertem  $\beta$ -Cyclodextrin im Puffer ersichtlich.

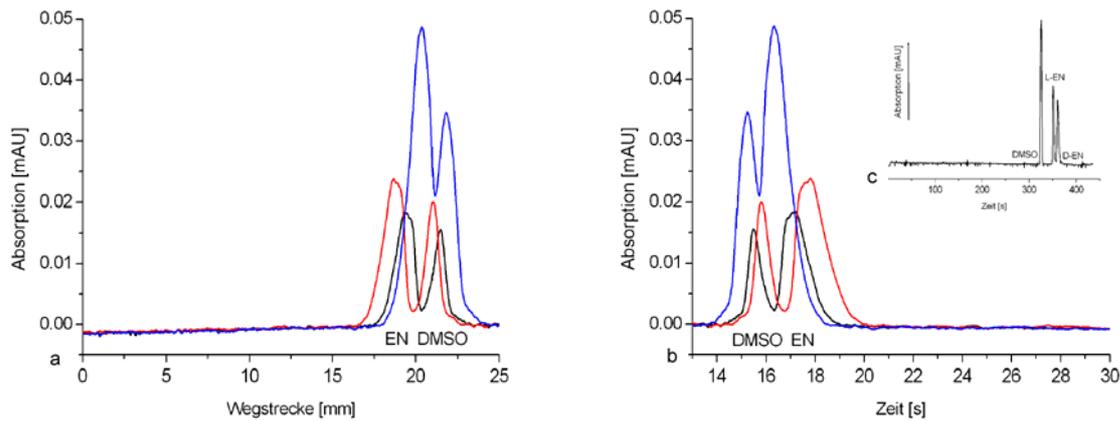


Abbildung 08: Chip-Elektropherogramme mit Epinephrin und DMSO

a) normales Elektropherogramm; b) nach Umwandlung der Migrationsstrecke in –zeit und c) Vergleich mit Kapillare. a) und b) Gemessen wurde auf einem unbeschichteten Chip mit sulfatiertem  $\beta$ -Cyclodextrin in 10 mM TRIS-Puffer bei pH 7.3, einer Wellenlänge von 210 nm, einem  $E_{Sep}$  von 280 V/cm und einer  $t_{Sep}$  von 13 s. c) Gemessen wurde in einer Quarzglas-Kapillare von 84 cm Länge und einer angelegten Spannung von 30 kV.

Das verkleinerte Elektropherogramm [Abb. 08 c] dient zum Vergleich, wie die Peaks unter den gleichen Bedingungen auf Kapillare aussehen. Sie sind, wie die Bodenzahlen in [Tab. 03] zeigen, viel schmäler; zusätzlich hat sich das Racemat von Epinephrin in seine Enantiomere aufgetrennt. Wie in Kapitel 5.1.3 noch erklärt wird, muss auf dem Chip mit grösseren Substrat-Konzentrationen gemessen werden. Bei Epinephrin war sie 10 Mal grösser, was auch erklärt, warum auf dem Chip erst bei höheren Cyclodextrin-Konzentrationen eine visuell ersichtliche Trennung des Racemats erkennbar wird.

Der Faktor, der den zurückgelegten Weg in Migrationszeit umwandelt, ist in [Gl. 17] beschrieben und zur Überführung des Elektropherogramms [Abb. 08 a] in [Abb. 08 b] angewendet worden.

$$t_x = \frac{S_{\text{bei 25 mm}}}{\left( \frac{S_x}{t_{\text{bei 13 s}}} \right)} \quad \text{[Gl. 17]}$$

Die mit [Gl. 15 und 16] berechneten Bodenzahlen sind praktisch identisch, siehe [Tab. 03], was bedeutet, dass beide Gleichungen gleichwertig verwendet werden können. Klar ersichtlich ist auch, dass die gleiche Messung auf Kapillare genauer ist. Schmalere Peak-Breiten im Verhältnis zur Migrationszeit zeigen eine bessere Trenneffizienz.

Auf Kapillare kann bei einer Spannung von 30 kV eine maximale Bodenzahl von  $1.1 \cdot 10^6$  erwartet werden. Die angelegte Spannung auf dem Chip ist etwas kleiner, so dass etwa  $0.9 \cdot 10^6$  hätten erhalten werden können. Während die Messungen auf der Kapillare gute Werte erreichen, hat der verwendete Chip eine weit schlechtere Trenneffizienz. Die theoretischen Bodenzahlen von Chip (berechnet mit [Gl. 15 und 16]) und Kapillare sind in [Tab. 03] aufgelistet.

Tabelle 03: Auswertung der Bodenzahlen

Chip			Kapillare					
$t_{EN}$	$b_{\frac{1}{2} EN}$	$N_{EN}$	$S_{EN}$	$b_{\frac{1}{2} EN}$	$N_{EN}$	$t_{DL-EN}$	$b_{\frac{1}{2} DL-EN}$	$N_{DL-EN}$
17.1 s	1.20 s	1'120	19.5 mm	1.35 mm	1'150	351 s, 361 s	3.0 s, 4.0 s	75'800, 45'000
17.7 s	1.41 s	864	18.8 mm	1.48 mm	902	349 s, 358 s	3.5 s, 4.0 s	54'900, 44'400
16.3 s	1.17 s	1'080	20.4 mm	1.45 mm	1'050	347 s, 356 s	2.5 s, 3.0 s	106'000, 78'000

Was sind die Gründe für die geringere Trenneffizienz des Chips? Die Antwort liefert eine alternative Berechnung der theoretischen Bodenzahl. N kann auch über die

effektive Länge der Kapillare ( $l_{\text{eff}}$ ) und die Standardabweichung des Peaks ( $\sigma$ ) berechnet werden, siehe [Gl. 18].

$$N = \left( \frac{l_{\text{eff}}}{\sigma} \right)^2 \tag{Gl. 18}$$

Die Summe der Quadrate aller Standardabweichungen ergibt die Gesamt-Standardabweichung, siehe [Gl. 19].

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{Diff.}}^2 + \sigma_{\text{Elektro-Disp.}}^2 + \sigma_{\text{Inj.}}^2 + \sigma_{\text{Temp.}}^2 + \sigma_{\text{Vol.}}^2 + \sigma_{\text{Wand-Abs.}}^2 \tag{Gl. 19}$$

Die oben erwähnte Longitudinal-Diffusion ist nur ein Faktor, der zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz führen kann. Die Diffusion eines Peaks ist von dessen Diffusionskoeffizienten abhängig. Die Standardabweichung der Diffusion ( $\sigma_{\text{Diff.}}$ ) ist direkt proportional zum Diffusionskoeffizienten ( $\sigma^2 = 2 \cdot D \cdot t_m$ ). Kleinere Moleküle diffundieren mehr als grössere, womit ein DMSO-Peak breiter sein wird als ein Peptid-Peak. Da die Standardabweichung der Diffusion nicht nur vom Diffusionskoeffizienten sondern auch von der Migrationszeit abhängig ist, machen sich bei den Bodenzahlen der Kapillare grössere Unterschiede bemerkbar als auf dem Chip. Dazu sind die in [Abb. 04] berechneten theoretischen Bodenzahlen für die Peaks von DMSO und Ibuprofen in der [Tab. 04] noch einmal dargestellt.

Tabelle 04: Bodenzahlen auf Kapillare und Chip

	Kapillare	Chip
$N_{\text{DMSO}}$	53'200	1'500
$N_{\text{Ibu}}$	3'720	535



der Geometrie des Kreuzes), so entspricht dies nicht der wirklichen Länge. Messungen der Peak-Breite kurz nach der Injektion haben Probenzonen im Millimeter-Bereich gezeigt und sind auf die schlechte Kontrollierbarkeit des Probenstroms zurückzuführen. Trotz Verwendung des PI-Modus (Zurückhalten der Probenflüssigkeit durch Gegenspannungen in den Probe-Vials und Fokussierung des Probenplugs durch Anlegen von Gegenspannungen in den Puffer-Vials) diffundiert sowohl vor als nach der Injektion Probe in den Trennkanal. Dies bedeutet auch, dass  $\sigma_{\text{Diff}}$  deutlich kleiner ist als die injizierte Zone. Die signifikant kleineren Bodenzahlen der Chipsysteme können also einzig auf die schlecht kontrollierbare Injektion  $\sigma_{\text{Inj}}$  und die damit auftretende Massen- bzw. Volumenüberladung zurückgeführt werden. Erste Studien von anderen Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine deutliche Verkleinerung des Querschnittes der Probenkanäle dieses Problem lösen kann.

### 5.1.3 Sensitivität

Der oben erwähnte Injektionsplug wird aus dem Probevolumen berechnet. Dieses Volumen wird mit dem Trennvolumen in Relation gesetzt. Es sollte weniger als 1-2% des Trennvolumens betragen, damit die der Kapillare bzw. der Kanal nicht überladen wird. Ein Überladen beeinträchtigt die Peak-Form. Für die Kapillare bei hydrodynamischer Injektion gilt die [Gl. 20].  $\Delta p$  steht für den Druck [Pa] während der Injektion,  $r_i$  [m] für den Innenradius der Kapillare,  $t$  [s] für die Injektionszeit,  $\eta$  [Pa · s] für die Viskosität des Puffers und  $l_{\text{tot}}$  [m] für die Gesamtlänge der Kapillare. Das Probevolumen des Chips in [Gl. 21] entspricht dem Volumen des Kreuzes der beiden Kanäle.

$$V = \frac{\Delta p \cdot r_i^4 \cdot \pi \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot l_{\text{tot}}} \quad [\text{Gl. 20}]$$

$$V = b^2 \cdot h \quad [\text{Gl. 21}]$$

Für die unbeschichtete Kapillare und den unbeschichteten Chip wurden folgende Werte für das Probe- und das Trennvolumen berechnet, siehe [Tab. 06].

Tabelle 06: Probe- und Trennvolumen auf Kapillare und Chip

	Probenvolumen [m <sup>3</sup> ]	Trennvolumen [m <sup>3</sup> ]	Anteil
Kapillare	$3.85 \cdot 10^{-11}$	$1.06 \cdot 10^{-9}$	3.63%
Chip	$5.00 \cdot 10^{-14}$	$2.50 \cdot 10^{-11}$	0.20%

Das Probenvolumen auf dem Chip ist fast 1000 Mal kleiner als das der Kapillare, dadurch wird auch verständlich, warum für den Chip grössere Probe-Konzentrationen benötigt werden, damit vergleichbare Peak-Flächen detektierbar sind. Die kürzere optische Wegstrecke auf dem Chip bedeutet ein weiterer Verlust an Sensitivität. Der Chip hat somit zwar das bessere Probe-Puffer-Verhältnis (0.20%) als die Kapillare (3.63%), hat dafür aber im Vergleich eine höhere Nachweisgrenze.

#### 5.1.4 Puffersysteme

Sowohl Kapillare als auch Chip werden mit einem Puffer befüllt. Er leitet den elektrischen Strom und sorgt zudem für pH-Konstanz. Nicht jedes Puffersystem kann verwendet werden, da je nach Leitfähigkeit und Konzentration der fließende Strom zu gross werden kann. Auch hier gilt wieder, der Chip ist sensibler als die Kapillare. So kann bei Messungen bei pH 7 der klassische Phosphat-Puffer nur auf Kapillare Verwendung finden, da er für den Chip einen zu grossen Strom erzeugt und zu kochen beginnt. Bestens geeignet sind Puffer mit einer niedrigen Leitfähigkeit [2].

Als weitere wichtige Bedingung muss der Puffer inert sein, er darf also weder Wechselwirkungen mit dem Substrat noch mit dem Liganden eingehen. Die Auswahl des richtigen Puffers ist somit nicht ganz trivial. Auf diesen Punkt wird auch in Paper III genauer eingegangen, in dessen Vorfeld etliche Mühe verwendet wurde, einen

---

Puffer zu finden, der weder mit DNA noch mit Kationen interagiert. Aus einer Gruppe von nicht-komplexierenden, tertiären Aminen, die auch unter dem Namen "Better Buffers" bekannt sind, wurde 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) ausgewählt, da er bei pH 7 puffert. [3] Er hat allerdings eine zu grosse Leitfähigkeit für Messungen auf den Chips und konnte nur für die Kapillare verwendet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffersysteme sind Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) ein primäres Amin mit drei Hydroxy-Gruppen und MOPS. Ersterer ist der wohl am meisten gebrauchte Puffer für elektrophoretische Messungen, letzterer gehört zu den oben erwähnten "Better Buffers". Diese haben die Eigenschaft nur geringe Wechselwirkungen einzugehen. Soweit wären sie den zwitterionischen "Good Buffers" [4] gleichzustellen; zusätzlich gehen sie jedoch keine oder nur sehr schwache Komplexe mit Metall-Ionen ein.

#### 5.1.5 Puffervermögen

Durch oxidative und reduktive Prozesse an der HV-Anode und -Kathode wird Wasserstoff und Sauerstoff produziert, daraus resultiert eine Änderung des pH-Wertes. Wie oben beschrieben, dient der Puffer zur Konstanthaltung des pHs.

Beim Wechsel von Kapillare auf Chip wird nicht nur die Trennstrecke verkleinert, sondern auch die Puffer-Vials. Die gebräuchlichen Vials für die Kapillare haben ein Volumen von 250 bzw. 4000  $\mu\text{L}$ . Das im Chip eingebaute Vial fasst 3  $\mu\text{L}$ . Obschon der Puffer in den Vials der Kapillare jeweils nach drei Messungen ausgewechselt wurde, wäre es problemlos möglich gewesen, selbst mit den 250  $\mu\text{L}$ -Vials Dutzende von Messungen durchzuführen, ohne ihn erneuern zu müssen. Auf dem Chip hingegen waren maximal vier Messungen möglich, bevor das für einen konstanten

Strom benötigte Puffervermögen aufgeschöpft war. Deshalb wurde der Chip nach jeder Messung gewaschen und neu befüllt.

#### 5.1.6 Konzentrationen

Der UV-Detektor der Kapillare hat eine niedrigere Nachweisgrenze als derjenige der Chip-Station, siehe 5.1.3. Daher können Substrat und interner Standard auf dem Chip nicht in der gleichen Konzentration, wie auf Kapillaren verwendet, gemessen werden. Eine Verdopplung bis Verzehnfachung der Proben- und Standardkonzentrationen war notwendig.

Bei der Berechnung des  $K_{BS}$  wird die Substratkonzentration zwar nicht benötigt, sie ist aber im Zusammenhang mit ihrem Verhältnis zur Ligandkonzentration dafür verantwortlich, in welchem Bereich der  $K_B$ -Kurve man sich befindet. Die auf dem Chip einsetzbaren Ligandkonzentrationen sind aber durch den Anstieg der dadurch erhöhten Leitfähigkeit limitiert. Es kann maximal im gleichen Konzentrationsbereich wie auf der Kapillare gemessen werden. Die Kurven von Kapillare und Chip können also nicht direkt visuell verglichen werden, da die Chip-Kurve bedingt durch die grössere Substratkonzentration weniger schnell das angestrebte Sättigungsplateau erreicht. Der Unterschied wird in der folgenden Graphik ersichtlich [Abb. 09].

Hier wird eine Titrationskurve, gemessen auf Mikrochip, mit den Ergebnissen stammend von der Kapillare verglichen. Die Substrat-Konzentration für den Chip muss auf Grund der höheren Nachweisgrenze grösser sein als für die Kapillare. Bei gleicher Ligand-Konzentration liegen also nicht die gleichen S/L-Verhältnisse vor, und die auf dem Chip gemessenen Punkte scheinen weniger steil anzusteigen. Die blaue Linie in [Abb. 09] zeigt aber, dass für Kapillare und Chip bei gleichem S/L-Verhältnis die gleiche Mobilität berechnet wird. Da, auf Grund zu geringer Detektionsempfindlichkeit, die Titrationskurve auf Chip nicht vollständig verfolgt

werden kann (das heisst, dass das Sättigungsplateau nicht erreicht wird), werden entsprechend fehlerhafte Gleichgewichtskonstanten berechnet. Jedoch ist die Reihenfolge hinsichtlich berechneter Bindungsparameter der vergleichenden Systeme identisch mit den Ergebnissen der kapillaren Messungen.

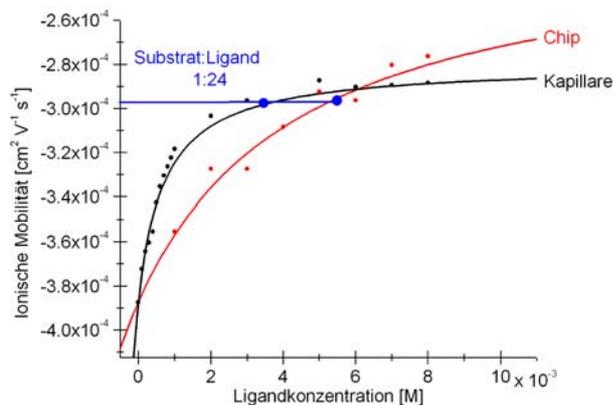


Abbildung 09: Vergleich der  $K_B$ -Kurven auf Chip und Kapillare

Die Chipkurve steigt scheinbar weniger schnell an als die der Kapillare, was durch den Unterschied der Substrat-Ligand-Verhältnisse zustande kommt.

### 5.1.7 Beschichtung der Innenwand

Die verwendeten Chips sind mit zwei verschiedenen Kanalwand-Oberflächen erhältlich: unbeschichtete aus Quarzglas und mit Polyacrylamid-beschichtete. Letztere unterdrücken den EOF und verhindern eine Adsorption des Substrats an die Innenwand, die bei den freien Silanolgruppen beim unbeschichteten Chip möglich wäre.

Nach ersten Messungen auf Quarzglas-Chips, wurden für das Messen von Peptiden ein beschichtetes System verwendet. Um in Analogie zum Chip auf Kapillaren messen zu können, musste die Kapillaroberfläche ebenfalls mit einer Beschichtung, die inert gegenüber kationischen Makromolekülen ist, überzogen sein. Zunächst wurde mit kommerziell erhältlichen, methylierten Kapillaren gearbeitet, die sowohl den EOF als auch eine allfällige Wandadsorption unterdrücken sollten. Beim

---

Vergleich mit dem beschichteten Chip wurde jedoch festgestellt, dass die Methylierung der Kapillarenwand nicht die gleichen Messungen ermöglichte wie der Chip. Die Problematik wurde in Paper II noch genauer besprochen. In einem nächsten Schritt wurden Quarzglas-Kapillaren nach einem von Hjertén [5] vorgestellten Verfahren mit Polyacrylamid beschichtet, was zu vergleichbaren Resultaten zwischen beschichteten Chips und Kapillaren führte.

#### 5.1.8 Externe Einflüsse

Alle Messungen müssen, um untereinander vergleichbar zu sein, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Dies gilt nicht nur für Substrat- und Ligandkonzentration, Puffer und Beschaffenheit der Kapillarenwand; dazu gehört auch das Messen bei konstanter Temperatur (die Viskosität des Puffers ist temperaturabhängig).

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Leider verfügen weder die Chipstation noch die CE-Geräte über einen Thermostaten. Bei hochsommerlichen Temperaturen führte dies insbesondere für die empfindlicheren Messungen auf den Chips zu Messstörungen. Puffer und Probe verdampfte während der Messung aus den Vials und Kanälen, so dass keine konstante Spannung mehr angelegt werden konnte. Erst in einem klimatisierten Raum konnte auch auf dem Chip das ganze Jahr über gemessen werden.

#### 5.2 Verschiedene Applikationen

Bevor molekularbiologische Affinitätsstudien von Kapillare auf Chips übertragen werden konnten, musste abgeschätzt werden können, welche Trennungen überhaupt möglich sind.

Die ersten Messungen wurden mit Propranolol (Pro) , Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ibuprofen (Ibu) durchgeführt als je einem Vertreter der Kationen, neutralen Teilchen und Anionen. Auf dem unbeschichteten Chip konnten im normalen Modus (Kathode am Trennkanaal-Ende) alle zusammen gemessen werden. Die Elektropherogramme in [Abb. 10] zeigen die letzte Aufnahme des Trennkanaals nach der vorher festgelegten Zeit von 11 s. Propranolol wandert am weitesten, gefolgt von DMSO und Ibuprofen. DMSO als neutrales Teilchen wandert mit der Geschwindigkeit des EOFs. Das positiv geladene Propranolol wandert schneller zur Kathode als DMSO, da zum EOF noch die Eigengeschwindigkeit dazukommt. Ibuprofen als Anion würde eigentlich in die entgegengesetzte Richtung zur Anode wandern, wird aber durch den grösseren Beitrag des EOFs in Richtung Kathode bewegt.

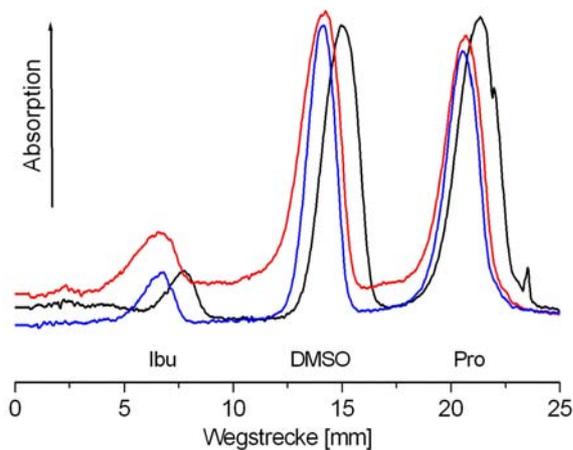


Abbildung 10: Drei Elektropherogramme von Propranolol, DMSO und Ibuprofen

0.5 mM Pro, 33 mM DMSO und 0.5 mM Ibu wurden auf einem unbeschichteten Chip mit 10 mM TRIS, pH 7.09 bei  $\lambda$  218 nm,  $E_{\text{Sep}}$  280 V/cm,  $t_{\text{Sep}}$  11 s gemessen.

### 5.2.1 Interne Standards

In [Abb. 10] ist dargestellt, dass die Peaks von drei identischen Messungen auf Chip bei konstanter Zeit nicht zu einem gleichen Punkt wandern. Obwohl die drei Elektropherogramme unter gleichen Bedingungen gemessen wurden, liegen die Peaks nicht genau übereinander. Auf der Kapillare zeigen die Peaks eine grössere



---

maximalen Konzentration an Ligand im Puffer dient zur Überprüfung, ob der gewählte Standard inert ist.

Propranolol und Ibuprofen können in Quarzglas-Kapillaren und -Chips gemessen werden, da sie nicht mit der negativ geladenen Oberfläche – den Silanolgruppen – interagieren. Für andere Substrate und Liganden muss die Innenwandoberfläche beschichtet werden. Beim Wechsel von Quarzglas- zu beschichteten Oberflächen, die den EOF weitgehend unterdrücken, müssen anstelle des neutralen DMSO kationische (kathodenseitige Detektion) oder anionische (anodenseitige Detektion) Referenzen eingesetzt werden. Ein weiteres Kriterium für die Eignung einer Referenz ist die Detektierbarkeit, was bedeutet, dass das Referenzmolekül bei Wellenlängen adsorbieren muss, die durch die Probenmoleküle vorgegeben sind.

Der interne Standard für die Neurotransmitter in Paper I war DMSO, da auf einem unbeschichteten Chip bei normalem Modus gemessen wurde und da DMSO bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 220$  nm ein Signal gibt. Die Rezeptoren in Paper II wurden auch bei  $\lambda = 220$  nm gemessen. Statt eines Quarzglas-Chips wurde ein beschichteter Chip mit umgekehrtem Modus verwendet, so dass an Stelle von DMSO mit Ibuprofen beim 1-armigen Rezeptor und mit Salicylsäure beim 2-armigen Rezeptor gemessen wurde. Die Einzelstrang-DNA in Paper III wurde ebenfalls auf einem beschichteten Chip bei umgekehrtem Modus gemessen, in diesem Fall erwiesen sich Ibuprofen (nicht UV-aktiv bei  $\lambda$  grösser als 230 nm) und Salicylsäure (komplexiert irreversibel mit der DNA) als ungeeignet. Nach mehreren Tests mit verschiedensten Aromaten, die zwar bei  $\lambda$  240 bis 260 nm UV-aktiv sind, sich aber nicht als inert erwiesen, wurde mit der o-Toluylsäure (OTA) schliesslich ein geeigneter Standard gefunden.

### 5.2.2 Peak-Verschiebung ( $\mu$ ) und Peak-Fläche (AUC)

Wie in Kapitel 4 bereits beschrieben, kann die Bindungskonstante  $K_B$  aus der Peak-Verschiebung ( $\mu$ ), der Area under the Curve (AUC) oder aus der Peak-Höhe ( $h$ ) berechnet werden.

Die Bestimmung der Peak-Höhe angewendet bei beiden Formen der Frontal Analyse-Methoden setzt eine andere experimentelle Durchführung voraus als die hier verwendete. Die Probe wird länger injiziert, so dass an Stelle von Peaks Stufen entstehen. EMSA- und HD-Messungen hingegen werden hinsichtlich der experimentellen Durchführung identisch gemessen. Jedoch, die Berechnung von  $K_B$  geht bei der ersten Methode von einer Peak-Verschiebung aus, bei der zweiten Methode werden die veränderten Peak-Flächen ausgewertet. Unter bestimmten Bedingungen ist es mit beiden Methoden möglich, erfolgreich Bindungsparameter zu berechnen. Während bei EMSA die Mobilitäten von Substrat und Produkt unterschiedlich sein müssen, benötigt die HD, als wichtige Grundbedingung, eine Konstanz in der UV-Aktivität dieser beiden Substanzen.

Im Folgenden wird bei der Interaktion eines 24mer DNA-Einzelstrangs mit Kalzium-Ionen gezeigt, dass die Auswertung der Peak-Flächen des sich bildenden Komplexes nicht zur Berechnung von  $K_B$  herangezogen werden kann. Grund dafür ist die veränderte UV-Aktivität des freien Substrats gegenüber des zu messenden Komplexes.

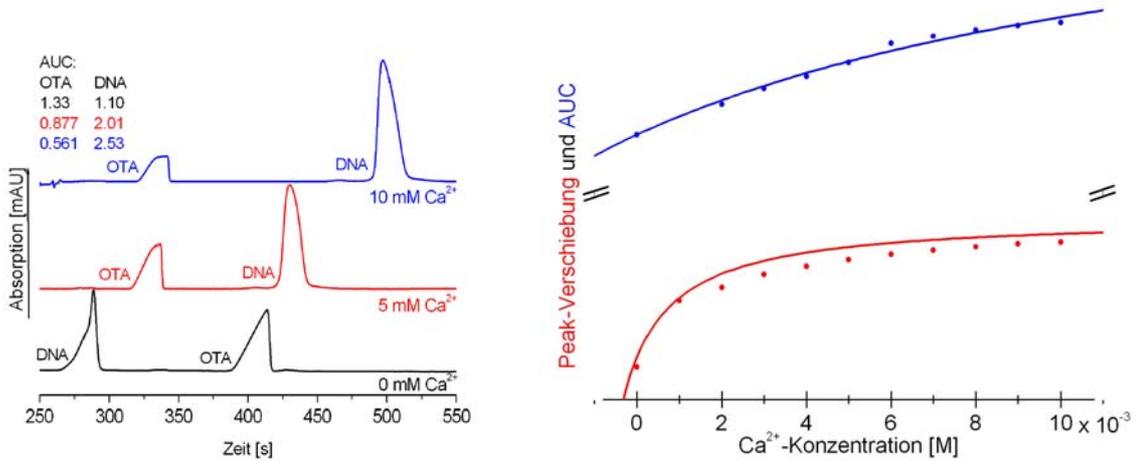


Abbildung 11: Vergleich AUC und Mobilitätsverschiebung

Auf beschichteter Kapillare mit MOPS bei pH 7.4 bei einer Wellenlänge von 240 nm gemessen. Links: Elektropherogramme bei verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen. Rechts: Gefittete Kurven von AUC (oben); Mobilitätsverschiebung (unten).

In [Abb. 11, links] wird die Peak-Fläche des Standards (OTA) mit steigender Kalziumkonzentration stetig kleiner. Von 1.33 mAU · s ohne Kalzium schrumpft sie auf 0.561 mAU · s bei 10 mM Kalzium im Hintergrund-Elektrolyten. Der Puffer bildet mit Kalzium Komplexe, welche die UV-Absorption des Hintergrunds verändern. Da schon die Peak-Flächen des Standards optisch betrachtet nicht gleich sind, geht dieser Fehler auch bei der Evaluierung der Peak-Fläche des Substrats ein. Um diesen Fehler zu berücksichtigen, wurden die Peak-Flächen des Standards linearisiert. Dazu wurde die  $x$ . Peak-Fläche des Standards von der ersten Peak-Fläche des Standards subtrahiert. Anschliessend wurde die linearisierte Peak-Fläche des Standards zur Peak-Fläche des Substrates addiert, siehe [Gl. 22].

$$AUC_{\text{korrigiert}} = AUC_{\text{Substrat } x} + (AUC_{\text{Standard } 0} - AUC_{\text{Standard } x}) \quad [\text{Gl. 22}]$$

Trotzdem sind die beiden Kurven in [Abb. 11, rechts] so verschieden, dass sich berechnete  $K_B$ -Werte von  $65.9 \pm 16.4 \text{ M}^{-1}$  für die Peak-Fläche bzw.  $737 \pm 72.2 \text{ M}^{-1}$  für die Peak-Verschiebung ergeben, was einem Unterschied von einem Faktor 11

entspricht. Somit ist in diesem Beispiel die Auswertung der AUC zur Berechnung von  $K_B$  nicht geeignet.

Zur die Berechnung der Mobilität einer Substanz ist ein Nadel-Peak, der die gleiche Mobilität wie der Hintergrundpuffer hat, ideal; dadurch ist er symmetrisch, mit seinem Maximum genau in der Mitte. Das Maximum wird zur Berechnung verwendet, da sich an diesem Punkt 50% der Gesamtkonzentration der Substanz befinden. Peaks mit einer Mobilität, die sich von der des Puffers unterscheidet, sind entweder sogenannte fronting oder tailing Peaks. Fronting Peaks haben eine grössere Mobilität als der Puffer und das Maximum ist von der Mitte nach hinten (in der Zeit) verschoben. Tailing Peaks haben eine kleinere Mobilität und ihr Maximum ist nach vorne verschoben, siehe [Abb. 12].

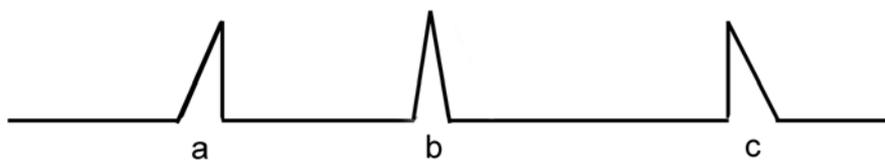


Abbildung 12: Peak-Formen

Fronting Peak a), symmetrischer Peak b) und tailing Peak c).

Bei der Berechnung der Mobilität von zwei Peaks, was durch die Zugabe eines internen Standards zum Substrat immer der Fall ist, können nicht beide eine ideale Form haben. Weiterhin ist ein Abweichen vom symmetrischen Peak auch durch verschiedene Ligand-Konzentrationen im Puffer unvermeidbar, da die Ionenstärke und damit die Leitfähigkeit des Trennpuffers verändert wird.

Wird also zur Berechnung jeweils der Maximal-Wert verwendet, schliesst das, je nachdem ob der Peak tailing oder fronting war, einen zeitlichen Fehler ein. Zur

Eliminierung des Fehlers müssten komplizierte Berechnungen angestellt werden. Durch visuelles Abschätzen, an welchem Punkt des Peaks die Hälfte der Substratkonzentration erreicht ist, kann der Fehler zumindest minimiert werden.

### 5.2.3 Neurotransmitter – Paper I

Nach den aufgezeigten Vor- und Nachteilen von Kapillar- und Chip-Messungen, folgt in den nächsten Unterkapiteln die praktische Anwendung von Affinitätsstudien. In drei verschiedenen Bereichen der Molekularbiologie konnte der EMSA erfolgreich auf Chip angewandt werden. In Paper I wurden die Neurotransmitter Epinephrin (Adrenalin), Norepinephrin (Noradrenalin) sowie der Metabolit Metanephrin als Modellsubstanzen für eine 1:1-Affinitätsstudie mit sulfatiertem  $\beta$ -Cyclodextrin (sCD) ausgewählt; für die Strukturen siehe [Abb. 13]. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem inneren Hohlraum des sCDs und den Neurotransmittern wurden erstmalig auf Chip gemessen. Die mit der EMSA-Methode bestimmten Bindungsparameter der Modellsubstanzen waren mit analogen Messungen auf der Kapillare vergleichbar.

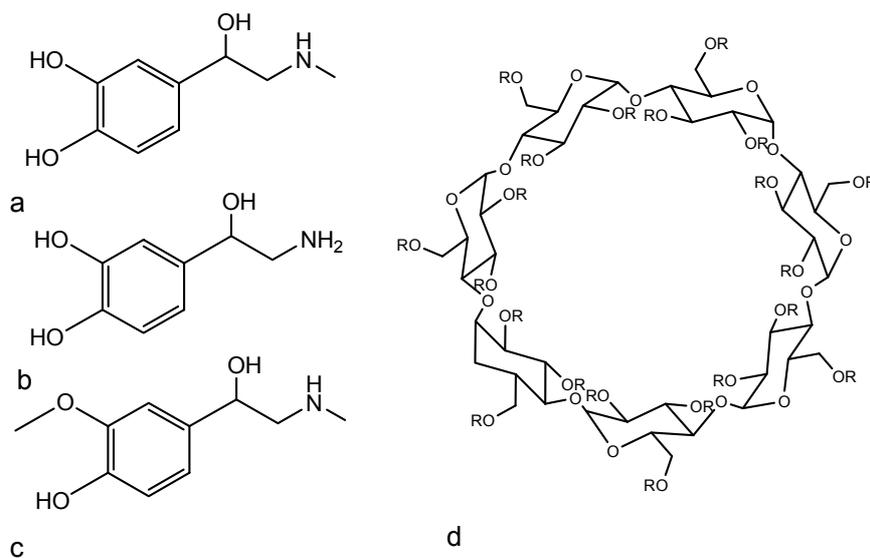


Abbildung 13: Strukturformeln

Epinephrin a), Norepinephrin b), Metanephrin c) und sCD d), wobei R für H oder  $\text{SO}_3^-$  steht.

Die zwei Neurotransmitter, welche sich chemisch nur durch eine Methylgruppe unterscheiden und beim Messen in blosser Puffer die gleiche Mobilität aufweisen, zeigen verschiedene Wechselwirkungen mit sCD. Metanephrin, das sich schon bei der Messung ohne Ligand von Epinephrin und Norepinephrin unterscheidet, geht dann auch eine deutlich grössere Wechselwirkung mit sCD ein, siehe Fig. 4 (Seite 78, Paper I). Dies kann schon aus dem steileren Abfall der Kurve herausgelesen werden.

Nebst der eigentlichen Wechselwirkung mit sCD werden Epinephrin und Metanephrin, die als Racemat in die Probe gegeben wurden, dank dem ebenfalls chiralen sCD in ihre Enantiomere getrennt, so dass man pro Substanz zwei Kurven mit unterschiedlichen  $K_B$ -Werten erhält. DL-Norepinephrin zeigt bei pH 7 keine Auftrennung.

In Paper I wird gezeigt, dass Chip- und Kapillar-Messungen, UV- und amperometrische Messungen übereinstimmende Resultate liefern. Der EMSA ist unabhängig von der Länge der Trennstrecke und von der Detektionsmethode einsetzbar. Die Abhängigkeit der  $K_B$ -Werte vom pH des Puffers wird mit Epinephrin-Messungen gezeigt. Die Table 1 (Seite 77, Paper I) zeigt eine Übersicht aller Messungen.

#### 5.2.4 Peptide – Paper II

Nach Beschreibung der MC-ACE-Messungen der Modellsubstanzen in Paper I wurden in einem zweiten Projekt zwei künstliche Rezeptoren gemessen, an die verschiedene Tripeptide nicht-kovalent binden. Die zuvor mit ITC-Daten berechneten Bindungskonstanten und Stöchiometrien sollten mit dem EMSA auf Chip bestätigt werden.

Da Peptide mit den Silanol-Gruppen des unbeschichteten Chips interagierten, wurde vom normalen Quarzglas-Chip auf einen Polyacrylamid-beschichteten gewechselt. Die bei pH 7.4 negativ geladenen Rezeptoren wurden im umgekehrten Modus, mit der Anode am Ende, gemessen. Die Tripeptide kamen als Ligand in den Puffer, und Ibuprofen bzw. Salicylsäure wurden als interner Standard für den 1- bzw. 2-armigen Rezeptor eingesetzt.

Die berechneten Mobilitäten in Paper II zeigen eine deutliche andere Kurvenform auf als die der 1:1-Wechselwirkung zwischen den Neurotransmittern und sCD, vergleiche Fig. 4 (Seite 78, Paper I) mit [Abb. 14]. Vor dem Anstieg der Kurve liegt eine lag-Phase, die bei der 1:1-Wechselwirkung nicht vorhanden ist. In letzterem Fall steigt die Kurve nach Zugabe von sCD sofort an und endet bei höheren Ligandkonzentrationen in einem Sättigungsplateau. Neben einfachen 1:1-Stöchiometrien können nur komplexe Gleichgewichte diesen direkten Anstieg der Mobilität aufweisen, allerdings nur bei gekoppelten Gleichgewichten, deren einzelne Teilschritte sehr ähnliche Mobilitäten aufweisen. In Paper III wird gezeigt, wie verschiedene Kationen mit Einzelstrang-DNA-Sequenzen interagieren. Es scheint sich dabei um die oben beschriebenen gekoppelten Gleichgewichte handeln, da auch hier ein direkter Anstieg der Mobilität zu verzeichnen ist. Alle anderen Gleichgewichte zeigen diese lag-Phase zu Beginn der Kurve auf.

Im Falle unserer Rezeptor-Peptid-Gleichgewichte muss also ein Gleichgewicht höherer Ordnung vorliegen, da auch hier die lag-Phase klar erkennbar ist, siehe [Abb. 14]. Die gestrichelte Kurve mit dem Tripeptid RRR ist hypothetisch, da nicht genügend Punkte gemessen werden konnten. Bei höheren RRR-Konzentrationen war die Basislinie so weit erhöht, dass keine Peaks mehr gemessen werden konnten.

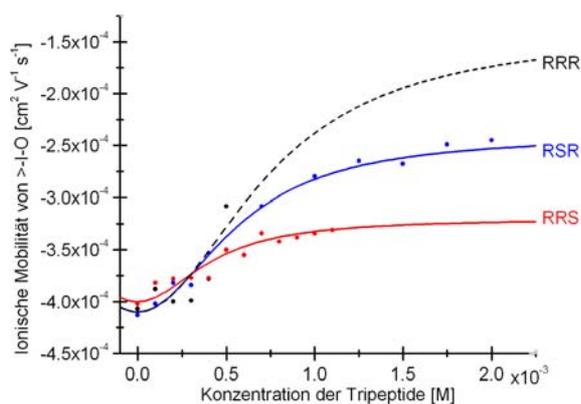


Abbildung 14: Mobilitätsverschiebung des zweiarmligen Rezeptors (>-I-O) mit drei verschiedenen Tripeptiden

Die Kurven entsprechen einer 1:2-Wechselwirkung zwischen den Tripeptiden und dem Rezeptor.

Eine Zusammenfassung aller gemessenen Gleichgewichte ist in Table 1 (Seite 87, Paper II) dargestellt. Die freien Standard-Reaktionsenthalpien der ITC- und der EMSA-Messungen sind darin enthalten. Es zeigte sich, dass die Messungen auf dem Chip zwar etwas weniger präzise waren als die auf der ITC, dafür konnten Reaktionen, die nur von einer kleinen Entropie angetrieben wurden, ausschliesslich auf dem Chip gemessen werden.

### 5.2.5 Einzelstrang-DNA – Paper III

Bisherige Chip-Messungen wurden in TRIS-Puffer durchgeführt, da er eine relativ geringe Eigenleitfähigkeit besitzt. TRIS wurde in den meisten Untersuchungen, die allgemein elektrophoretische DNA-Messungen beschreiben, verwendet. [6-10]

Auch auf Chip wurden die Messungen von Einzelstrang-DNA mit verschiedenen Metall-Ionen als Liganden in diesem Puffer gemessen. Dabei traten Ungereimtheiten bezüglich der berechneten Bindungskonstanten auf, die sich nur dadurch erklären liessen, dass TRIS mit den Metall-Ionen und der DNA ternäre Komplexe bildet. Die Erdalkalimetall-Ionen binden hauptsächlich an die Phosphat-Gruppe. Die

---

Übergangsmetall-Ionen interagieren jedoch auch noch mit den Basen, was zu grösseren Bruttostabilitätskonstanten führen sollte; mit TRIS als Puffer waren die  $K_B$ -Werte der Übergangsmetalle aber kleiner als die der Erdalkali-Metalle. In den Messungen mit TRIS war auch die maximale Verschiebung der Mobilität, die mit den Übergangsmetallen gemessen wurden, kleiner als die mit den Erdalkali-Metallen gemessene, siehe Fig. 2 (Seite 94, Paper III). Als Referenzmessungen zu den Untersuchungen auf Mikrochips wurden auch Messungen mit Kapillare durchgeführt, die das gleiche Phänomen zeigten.

Es wurde ein Puffer benötigt, der eine niedrigere Affinität zu Kationen hat. MOPS aus der Gruppe der "Better Buffers", schien ein erfolgsversprechendes Molekül zu sein. Zwar interagiert auch er mit Übergangsmetall-Ionen, bildet aber keine stabilen ternären Komplexe. Der neu ausgewählte Puffer wurde zunächst erfolgreich auf der Kapillare getestet, hatte aber für den Chip eine zu grosse Leitfähigkeit, weshalb keine Messungen möglich waren. Die weiteren DNA-Messungen wurden daher auf der Kapillare durchgeführt.

Paper III befasste sich mit den Affinitäten von Erdalkali- und Übergangsmetall-Ionen zu Einzelstrang-DNA-Sequenzen. Die möglichen Bindungsstellen der DNA, an die Kationen binden können – die Phosphat-Gruppe und die Heteroatome der vier DNA-Basen – sind in [Abb. 15] aufgezeigt.

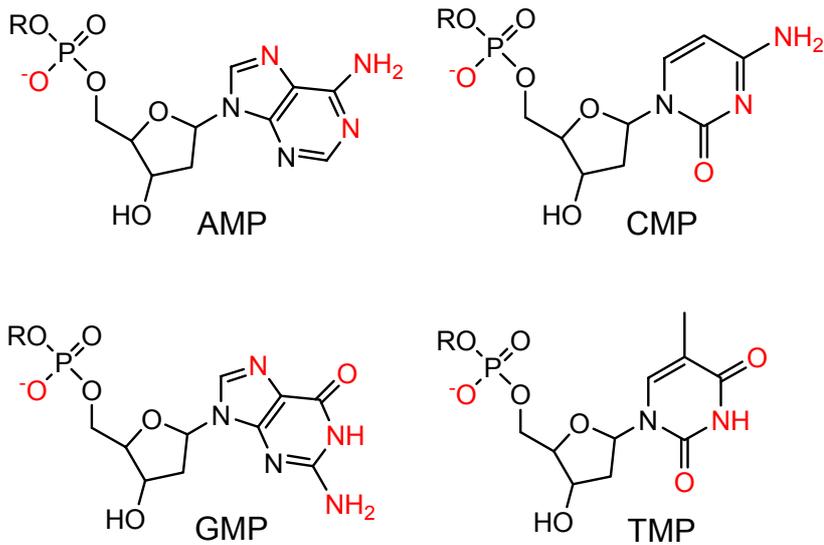


Abbildung 15: Die vier DNA-Nukleotide mit den möglichen Bindungsstellen für Metall-Ionen

Adenosin-, Cytidin-, Guanodin- und Thymidin-Monophosphat. Rot eingezeichnet die möglichen Bindungsstellen für Kationen.

Als Substrate wurden die Tetramere  $5\text{'-dAAAA-3'}$ ,  $5\text{'-dCCCC-3'}$ ,  $5\text{'-dGGGG-3'}$ ,  $5\text{'-dTTTT-3'}$  gegen  $\text{Ca(II)}$ ,  $\text{Mg(II)}$  und  $\text{Ni(II)}$  gemessen. Die maximale Verschiebung  $\Delta\mu$  ergab, dass die Adenosin-, Cytidin- und Thymidin-Tetramere jeweils ein Metall-Ion binden, es sich daher um eine 1:1-Stöchiometrie handelt. Beim Guanodin-Tetramer war  $\Delta\mu$  doppelt so gross wie bei den anderen Tetrameren; daher wurde für die Berechnung der Wechselwirkung mit allen drei Kationen eine 1:2-Stöchiometrie angewandt. Die wahrscheinliche Anzahl der bindenden Liganden lässt sich in diesem Fall (die Ladung der Liganden ist bekannt) direkt über die absolute Änderung der Ionenbeweglichkeit und somit über die absolute Ladungsänderung der Oligonukleotide berechnen.

Das Guanodin-Tetramer unterschied sich nicht nur signifikant bezüglich der Interaktion mit Metall-Ionen von den anderen drei Tetrameren. Überraschenderweise wurde auch eine deutlich erhöhte Startmobilität (negativer, bei Abwesenheit von

---

Ligand) gegenüber den anderen Tetramere gemessen, was auf die Bildung eines Quadruplexes, induziert durch Natrium-Ionen im Puffer, schliessen lässt. Neben den schon besprochenen Tetrameren wurde ein Tetramer, das alle vier Basen enthielt, untersucht. Dieses Tetramer mit der Sequenz 5'-dTTCAG-3' lässt schlussfolgern, dass eine einzelne Guanin-Base den  $K_B$  stärker beeinflusst als die übrigen drei Basen. Die Position des aktiven Bindungszentrums scheint dabei eine Schlüsselrolle zu spielen. Die Übergangsmetall-Ionen interagieren mit den Purin-Basen, wobei die Bildung eines intramolekularen Makrochelaten (mit dem N7-Stickstoff des Guanins und dem 5'-Phosphat am selben Zuckermolekül) als sehr wahrscheinlich angenommen werden kann. Dies würde auch die recht starke Affinität erklären, wenn Guanin 3'-endständig ist.

Im Folgenden wird näher auf gemischte Tetramere eingegangen (für eine allgemeine Einleitung in die Messungen mit Einzelstrang-DNA, siehe Paper III). Mit Ca(II), Mg(II) und Ni(II) wurden die Wechselwirkungen verschiedener Sequenzen gemessen, siehe [Abb. 16-18].

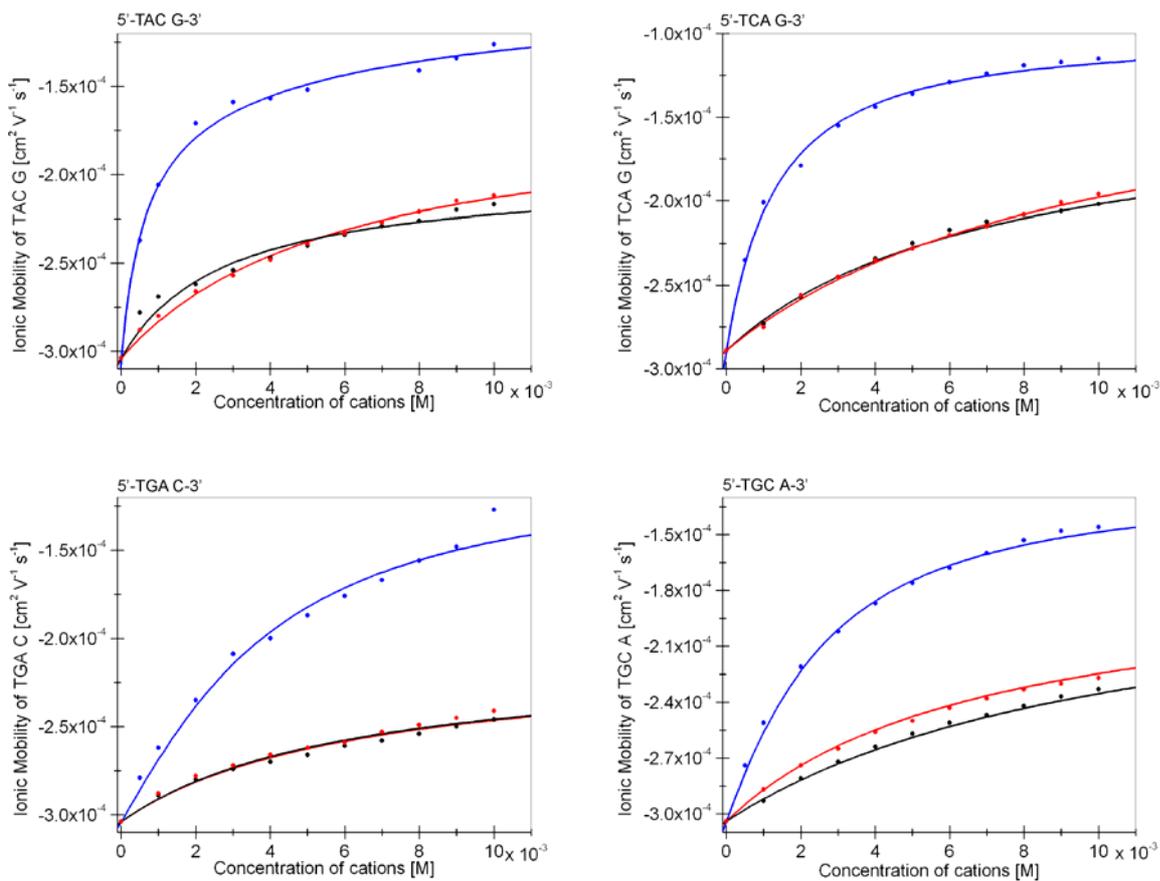


Abbildung 16: Kurven der gemischten Tetramer-Sequenzen, die alle Basentypen enthalten.

Ca(II): schwarz, Mg(II): rot und Ni(II): blau

Die gemischten Sequenzen lassen sich in drei Kategorien einteilen: in Tetramere, die alle vier Basen enthalten, solche mit je zwei Adenins und Guanins und einer dritten Gruppe, die sich nach drei Thymins vom 5'-Ende aus nur in der Base am 3'-Ende unterscheiden. In [Abb. 16] sind die Sequenzen 5'-dTACG-3', 5'-dTCA G-3' (aus Paper III), 5'-dTGAC-3' und 5'-dTGCA-3' zu sehen, sie haben alle ein Thymin am 5'-Ende. Die übrigen Basentypen sind so verteilt, dass sie je einmal an der zweiten, der dritten und der vierten Stelle stehen.

Sletten et al. zeigten in [11] die Selektivitätsordnung 5'-GG > 5'-GA > 5'-GT >> 5'-GC, in welcher Übergangsmetalle an Guanin in Doppelstrang-DNA binden. Diese Ordnung kann allerdings nicht auf Einzelstrang-DNA übertragen werden. [12] Wie die

Daten aus den gemischten Tetrameren in [Abb. 16] zeigten, lässt sich bezüglich der Selektivität von Ni(II) die folgende Reihenfolge aufstellen: vom 5'-Ende aus betrachtet, ist TAX > TCX > TGX > TTX. Ansonsten hat die restliche Abfolge, mit Ausnahme eines 3'-endständigen Guanins, keinen grossen Einfluss auf die Gesamtwechselwirkung. Das N7 des Guanins bildet mit Ni(II) und dem 5'-Phosphat einen intramolekularen Makrochelate mit einer sichtlich höheren Bindungskonstanten. Adenin in unmittelbarer Nachbarschaft zum Guanin vermindert diesen Effekt jedoch durch Stacking der  $\pi$ -Elektronen, wodurch der Zugang für Ni(II) zum N7 erschwert wird.

Die Messungen mit den Erdalkalimetall-Ionen zeigten keine erkennbare Selektivitätsfolge.

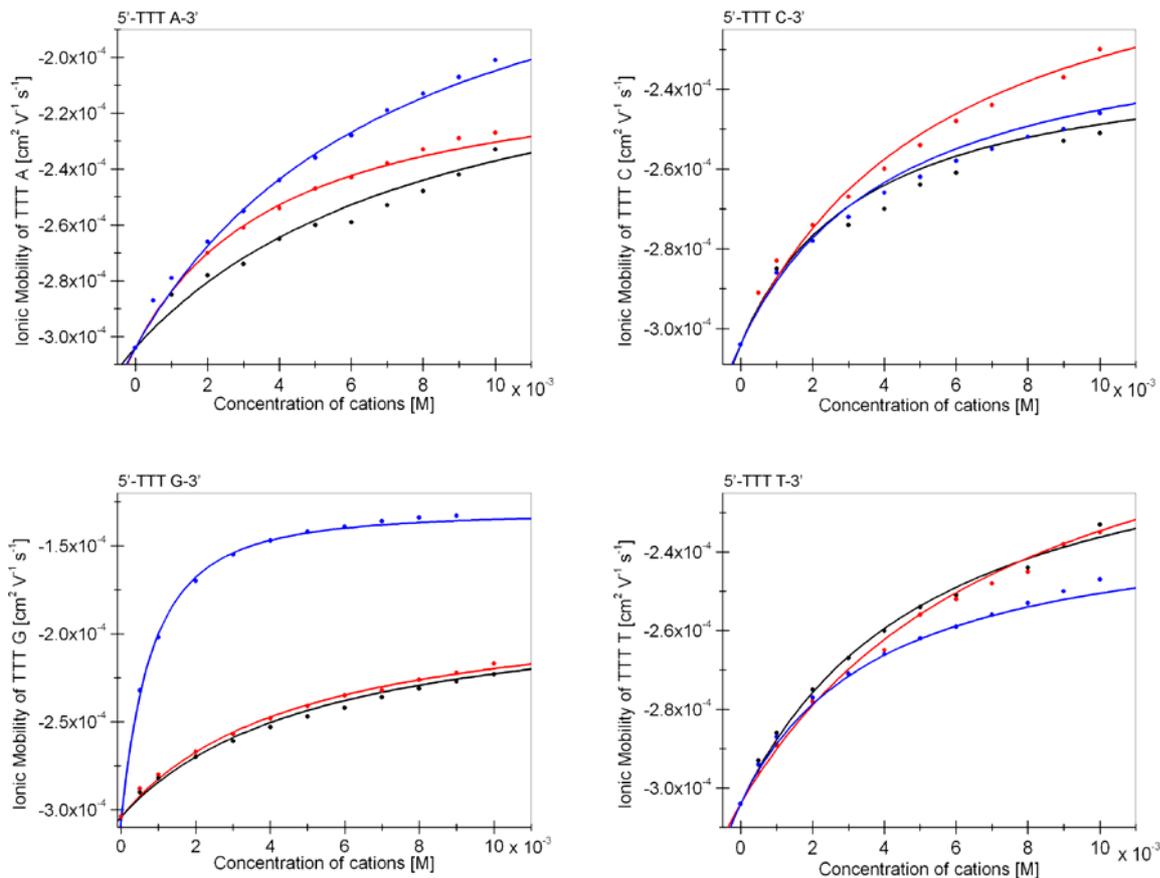


Abbildung 17: Kurven der Thymidin-Tetramer-Sequenzen, die sich in der letzten Base unterscheiden.

Ca(II): schwarz, Mg(II): rot und Ni(II): blau

Die Sequenzen in [Abb. 17] unterscheiden sich nur in der Base am 3'-Ende: 5'-dTTTA-3', 5'-dT TTC-3', 5'-dT TTG-3' und 5'-dT TTT-3' (aus Paper III). Sie sind ein gutes Beispiel dafür, wie stark eine einzelne Base die Affinität verändern kann. Die  $K_B$ -Werte führten zu einer Affinitätsfolge für Ni(II) von  $G \gg T > C > A$  vom 3'-Ende aus. Über eine Reihenfolge hinsichtlich Bindungsstärke für die Erdalkalimetall-Ionen, kann – wie schon bei den gemischten Tetrameren mit allen vier Basen – auch hier keine Aussage gemacht werden.

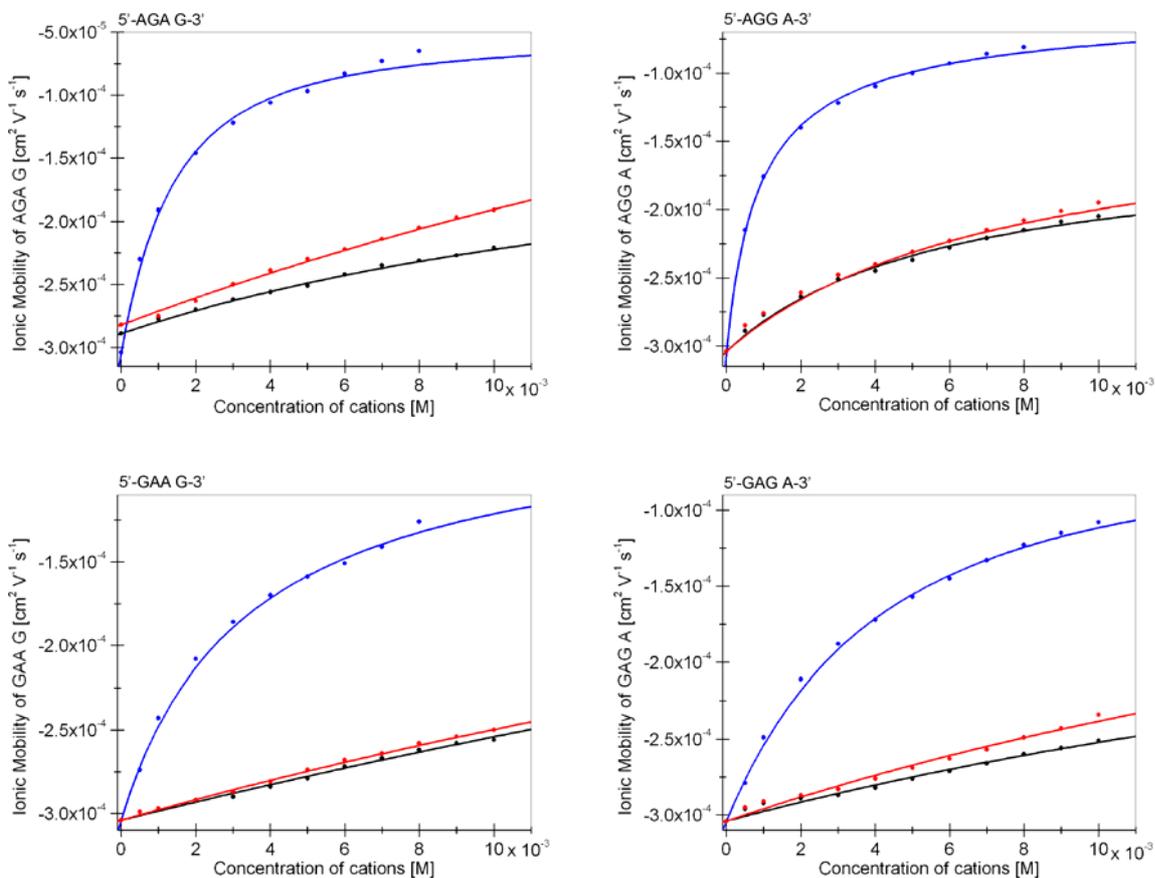


Abbildung 18: Kurven der gemischten Tetramer-Sequenzen, die je zwei Adenosine und zwei Guanosine enthalten.

Ca(II): schwarz, Mg(II): rot und Ni(II): blau

In [Abb. 18] sind Sequenzen dargestellt, die je zwei Adenosine und Guanosine enthalten: 5'-dAGAG-3', 5'-dAGGA-3', 5'-dGAAG-3' und 5'-dGAGA-3'. Beide Purin-

Basen verfügen durch das Vorhandensein eines elektronegativen Stickstoffs an der Stelle N7 über eine grössere Affinität zu Übergangsmetall-Ionen als die Pyrimidin-Basen. Vom 3'-Ende aus gesehen haben die Sequenzen 5'-dAGAG-3' und 5'-dAGGA-3' zwei Guanin- und eine Adenin-Base, dies führt zu grösseren Wechselwirkungen als bei den Sequenzen mit zwei Adenin- und nur einer Guanin-Base. Die Base am 5'-Ende ist somit weniger entscheidend für das Verhalten des DNA-Stranges. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch das Fehlen einer Phosphatgruppe am 5'-Ende des Zuckers; somit kann der Makrochelate nicht ausgebildet werden. Sind sich dagegen zwei Guanosine innerhalb einer Sequenz direkt benachbart, führt diese Gruppierung zu einer noch grösseren Interaktion, die nicht nur bei Ni(II) sondern auch bei den Erdalkalimetall-Ionen auftritt, siehe [Tab. 08]. Doch nicht nur die Reihenfolge der Basen spielt für die Wechselwirkung eine Rolle, sondern auch die Richtung in der sie angeordnet sind. So konnten bei den Tetrameren 5'-dAGAG-3' und 5'-dGAGA-3', die sich nur in der Lese-Richtung unterscheiden, unterschiedliche  $K_B$ -Werte berechnet werden. Guanosin am 3'-Ende hat durch Anwesenheit einer 5'-Phosphatgruppe eine grössere Affinität zu Metall-Ionen als Guanosin in 5'-endständiger Position.

Die Veränderung der Mobilität kommt durch ein Verschieben des Gleichgewichts auf die Seite des SLs zustande. Die negativ geladene DNA interagiert mit Kationen. Die Mobilität ist von der Ladung und dem hydrodynamischen Radius des Substrats abhängig, siehe [Gl. 05]. Der Radius verändert sich durch die Anlagerung eines Kations nicht gross. Die negative Ladung hingegen, die von den drei Phosphatgruppen zwischen den Basen stammt, wird von der Ladung eines Kations verkleinert, was zu positiveren Mobilitäten führt. Je mehr Kationen mit der DNA interagieren, desto grösser wird der Mobilitätsunterschied  $\Delta\mu$  zwischen der Kationen-

freien und der -gesättigten DNA. Die Erdalkali-Ionen Ca(II) und Mg(II) zeigten  $\Delta\mu$ -Werte, die alle im Bereich bis maximal  $10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  lagen, was, wie in Paper III (Seite 95) erklärt, einer 1:1-Stöchiometrie entspricht.

Die Messungen mit Ni(II) hingegen zeigten klar Komplexe mit verschiedenen Stöchiometrien. Für  $\Delta\mu$ -Werte im Bereich bis  $10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  wurden die  $K_B$ -Werte mit einer 1:1-Wechselwirkung berechnet; für  $\Delta\mu$ -Werte im Bereich von  $1.25 \cdot 10^{-4}$  bis  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  wurden sie mit einer 1:2-Stöchiometrie berechnet, analog zu den Tetrameren in Paper III. Es ist durchaus denkbar, dass, entgegen der vorherigen Annahme für eine kooperative Bindung (siehe Paper III), die Wechselwirkungen nicht kooperativ sind. Dies lässt sich aus der Kurvenform als auch der besseren Anpassung an folgende Gleichung vermuten, siehe [Gl. 23].

$$\mu = \frac{\mu_S + \mu_{SL} \cdot K_{B1} \cdot [L] + \mu_{SL_2} \cdot K_{B1} \cdot K_{B2} \cdot [L]^2}{1 + K_{B1} \cdot [L] + K_{B1} \cdot K_{B2} \cdot [L]^2} \quad [\text{Gl. 23}]$$

Die berechneten  $K_B$ -Werte deuten sogar auf ein nicht-kooperatives Verhalten hin, da  $K_{B2}$  deutlich kleiner ist als  $K_{B1}$ . Dies bedeutet, dass nach dem ersten Komplexierungsschritt die Anlagerung weiterer Kationen thermodynamisch ungünstig ist.

Bei allen Tetrameren mit einer Guanin-Base in der Sequenz kam die 1:2-Berechnung zum Tragen, wobei vermutet werden kann, dass der erste Schritt ( $K_{B1}$ ) der Bindung ans N7 des Guanosins entspricht. In [Tab. 08] für die Interaktionen mit Ni(II) stehen somit die  $K_B$ -Werte für beide Gleichgewichtsschritte. Eine überraschend grosse Interaktion zeigte die Messung von 5'-TTTG-3', das zusammen mit 5'-TACG-3' und 5'-AGGA-3'  $K_B$ -Werte über  $1'000 \text{ M}^{-1}$  erreichte.



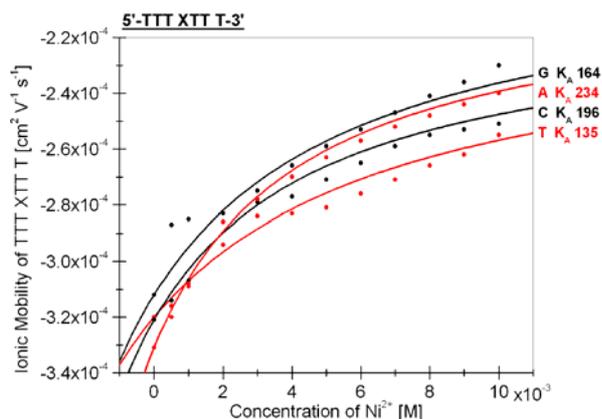


Abbildung 19: Kurven der Heptamere, deren Sequenz sich nur in der mittleren Base unterscheiden.

Für genauere Rückschlüsse über die Wichtigkeit der Sequenz in Einzelstrang-DNA betreffend deren Affinität zu Metall-Ionen sind Messungen mit weiteren, sinnvollen Sequenzen und unterschiedlichen Kettenlängen nötig. Die hier beschriebenen Tetramere stellen einen Beginn dar und zeigen auf, dass durch logische Variation der Nukleotid-Reihenfolge sowohl Bindungsposition als auch Anzahl der Liganden einfach und schnell bestimmt werden kann.

### 5.2.6 Review

Neben den anwendungsbezogenen Untersuchungen wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Review verfasst. Die Arbeit umfasst eine Übersicht über alle Affinitätsstudien, die bisher auf elektrophoretischen Chips gemessen wurden. Da die Messart noch relativ neu ist, konnten alle Einsatzgebiete des Chips im Detail erörtert werden. Daneben wurde die Methodik der verschiedenen, kapillaren Affinitätsmessungen miteinander verglichen, obwohl sie bisher noch nicht alle auf Chip übertragen worden sind.

Mikrochips wurden bisher hauptsächlich zum Studium von Enzym- und Antikörper-Wechselwirkungen verwendet. Auf dem Gebiet der Enzymassays wurden sie zur

Bestimmung der Michaelis-Menten- und der Inhibitionskonstanten eingesetzt. In Immunoassays interagierten in direkten Messungen oder sogenannten Sandwich-Tests Antikörper mit Antigenen. Im ersten Fall fungiert ein bekanntes Antigen als Ligand und der gesuchte Antikörper als Substrat, oder umgekehrt. Im zweiten Fall wird das Substrat (Antigen) zwischen zwei Antikörper eingeklemmt, von denen ein Antikörper durch Derivatisierung detektiert werden kann. Häufig sind hier nur Ja-Nein-Antworten erwünscht: Sie gehören somit nicht zu den Affinitätsstudien, mit denen Gleichgewichte untersucht werden. Die EMSA-Messungen mit Neurotransmittern und Cyclodextrin (Paper I) stellen die erste veröffentlichte Arbeit dar, die generell Wechselwirkungen in einem Gebiet ausserhalb der zwei oben beschriebenen Anwendungen, Enzym- und Immunoassay, untersucht.

### 5.3 Literaturverzeichnis von Kapitel 5

- [1] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, Kapillarelektrophorese, Friedrich Vieweg, Braunschweig, 1994.
- [2] A.E. Kelly, H.D. Ou, R. Withers, V. Dötsch, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 12013.
- [3] A. Kandededara, D.B. Rorabacher, Anal. Chem. 71 (1999) 3140.
- [4] N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M.M. Singh, Biochemistry 5 (1966) 467.
- [5] S. Hjertén, J. Chromatogr. A 347 (1985) 191.
- [6] B. Hartzell, B. McCord, Electrophoresis 26 (2005) 1046.
- [7] X. He, D. Li, A. Liang, B. Lin, Electrophoresis 285 (2002) 285.
- [8] A.A. Ouameur, H.-A. Tajmir-Riahi, J. Biol. Chem. 279 (2004) 42041.
- [9] D. Liang, J. Zhang, B. Chu, Electrophoresis 24 (2003) 3348.
- [10] N.C. Stellwagen, C. Gelfi, P.G. Righetti, Biopolymers 42 (1997) 687.

- 
- [11] N.A. Froystein, J.T. Davis, B.R. Reid, E. Sletten, *Acta Chem. Scand.* 47 (1993) 649.
- [12] J. Vinje, J.A. Parkinson, P.J. Sadler, T. Brown, E. Sletten, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 1620.



**PAPER I**

AFFINITY CAPILLARY ELECTROPHORESIS ON MICROCHIPS

Alexandra R. Stettler and Maria A. Schwarz

Publiziert in: *J. Chromatogr. A*, **1063**, (2005), 217-225.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Chromatography A, 1063 (2005) 217–225

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Affinity capillary electrophoresis on microchips

Alexandra R. Stettler, Maria A. Schwarz\*

*Department of Chemistry, University of Basel, Spitalstr. 51, 4056 Basel, Switzerland*

Received 21 September 2004; received in revised form 17 November 2004; accepted 23 November 2004

Dedicated to Katharina Helene Schwarz on the occasion of her birth

### Abstract

The present study shows that the application of the method of affinity capillary electrophoresis (ACE) to investigate interactions between ligands and their substrates can be realized on microchips. With ACE it is possible to characterize non-covalent molecular interactions (complexation and partition equilibria). Binding constants ( $K_B$ ) provide a measured value of the affinity of a ligand molecule to a substrate, which is basic information for the understanding of hormones, drugs and their targets, e.g. receptors in the human body. A microchip electrophoresis instrument equipped with a UV-detector and a home-built chip-station with electrochemical detection were used. ACE could be achieved with model solutions of neurotransmitters using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin (sCD) as substrate in a background buffer. This paper describes the advantages of microchip-ACE (MC-ACE) to traditional affinity capillary electrophoresis on a capillary. The results show that MC-ACE has great potential as a tool for fast scanning of interactions and to calculate binding constants of ligands with their substrates. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ACE; Affinity capillary electrophoresis; Binding constant; Capillary electrophoresis; Chip; Cyclodextrin; Epinephrine; Microchip; Neurotransmitter

### 1. Introduction

Since the introduction of the miniaturized total analysis system ( $\mu$ TAS [1]) principle, microfabricated devices for increasingly complex analyses have revolutionized the area of chemical and biological analysis. Particular attention has been paid to micromachined capillary electrophoresis. Miniaturized analysis systems have brought various new schemes of processing analytical operations including the pre-treatment, enrichment, separation, post-treatment and detection of a wide range of sample molecules [2]. This development has mainly been caused by the advantages of miniaturization, the variety of geometry, the layout of microseparation channels and therefore reduced reagent consumption, rapid analysis time, opportunities for parallel screening and ease of automation. Until now electrophoretic processes on micro-machined channels have been applied mainly in separation tasks. The separations of proteins [3], DNA [4], biogenetic

molecules [5] and enantiomers [6] are only a few applications. A new research field would be the transformation of ACE onto a chip for characterizing of chemical equilibria.

Many techniques have been developed to determine apparent equilibrium constants for molecular association. All experimental techniques are based on titrating changes in physicochemical properties of molecule depending on the presence of substrate. Changes in size and charge (conductivity [7]) might result, in measurable differences in spectroscopic properties (spectrofluorimetry [7–12]), thermo-chemistry (calorimetry [13–15]), surface tension [16], molecular weight (nuclear magnetic resonance (NMR) [17–19]) and electrophoretic migration (ACE) [20–23].

ACE may be classified into three modes: (a) non-equilibrium electrophoresis of equilibrated sample mixture, no additives are in the background electrolyte; (b) dynamic equilibrium affinity electrophoresis, the substrate is dissolved in the running buffer (ACE mode [24,25]); and (c) affinity based CE or affinity capillary electrochromatography, the substrate is immobilized ([26,27]). All types of procedure involve measurements of the migration times ( $t_m$ ) of solute

\* Corresponding author. Tel.: +41 61 2671002; fax: +41 61 2671005.  
E-mail address: [Maria.Schwarz@unibas.ch](mailto:Maria.Schwarz@unibas.ch) (M.A. Schwarz).

in the presence of complexation agents. Intensity and shape of the peak are not required [28]. Binding constants of many non-covalently bound biomolecules are determined by ACE and compared with the values obtained by other methods. All results indicate that ACE is acceptable for calculations of binding constants [29]. Examples include the action of enzymes upon substrates and the binding of hormones with their receptors [30]. ACE techniques are excellently suited for investigating protein–protein interactions [31,32], in particular because they can be performed in free solutions, generally under non-denaturing conditions and they require only minimal amounts of sample. By adding increasing concentrations of the ligand into the background buffer a shift in the ionic mobility of the substrate can be observed. This shift allows the calculation of the binding constant.

The main focus in this study is on cyclodextrin–drug interactions, because in the literature there are a lot of characterizations on capillary [33]. One kind of neurotransmitter, the natural human sympathomimetics, was chosen as a drug model because epinephrine (EN) and norepinephrine (NEN) have receptors omnipresent in the whole body. Here, we describe the simulation of a simple 1:1 complexation between ligand and “receptor”. Additionally, the sample structures had to be measurable with UV- and amperometric detection for comparison of two different microanalytical systems. Beside the affinity studies of these compounds the results obtained can be used for the development of separation methods that is especially important for simultaneous measurements of similar analytes [34]. In addition to the interest in binding reactions and stoichiometry under physiological conditions, interactions under non-physiological conditions have also been taken into account. These data provide more detailed information about the physicochemical parameters influencing the binding interaction and a better insight into the binding mechanism. The formation of inclusion complexes is influenced by the hydrophobic interaction in the cavity and hydrogen bonds/electrostatic interactions between the CDs substituents groups (e.g. carboxymethyl, hydroxypropyl, methyl groups) on the rim of the CD and substituents of the drug.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical grade. ( $\pm$ ) Epinephrine (4-[1-hydroxy-2(methylamino)ethyl]-1,2-benzenediol) HCl, ( $\pm$ ) norepinephrine ( $\alpha$ -(aminomethyl)-3,4-dihydroxybenzyl alcohol) hydrogentartrate, DL-metanephrine (4-hydroxy-3-methoxy- $\alpha$ -(methylaminomethyl)benzene-methanol) HCl and 3,4-dihydroxy-DL-phenylalanine (DL-DOPA) were obtained from Sigma (Buchs, Switzerland). Sulfated  $\beta$ -cyclodextrin was obtained from Aldrich (Buchs, Switzerland). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), 2-morpholinoethane-sulfonic acid (MES) monohydrate, NaOH and citric acid monohydrate were obtained from

Fluka (Buchs, Switzerland). Boric acid and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Acros (Geel, Belgium). *o*-Phosphoric acid was obtained from Merck (Dietikon, Switzerland). The buffers were prepared by mixing a 10 mM solution of TRIS with acid to get to the corresponding pH-value (for pH 6 citric acid, pH 7 boric acid, pH 8 phosphoric acid and pH 9 boric acid) and a 10 mM solution of MES with NaOH to get to pH 6 (for the amperometric measurement). Sample compounds (2 mM for UV-chip, 0.2 mM for UV-CE and 0.5 mM for amperometry-chip) and the internal standard (DMSO for UV and DOPA for amperometry) were dissolved in the buffer solution. CD was dissolved in the buffer solution to yield stock solutions of 10 mg/mL. These were diluted stepwise by the buffer solution to 0.01 mg/mL.

### 2.2. Apparatus

#### 2.2.1. Microchip with UV detection

On-chip experiments were performed on the commercial Shimadzu MCE-2010 (Kyoto, Japan). The D<sub>2</sub>-lamp based instrument possesses a diode array detector located along the separation channel. All microchips for UV detection were purchased from Shimadzu. The 35 mm  $\times$  12.5 mm  $\times$  2 mm quartz chip has a simple cross injector design. The separation channel is 25 mm long, 20  $\mu$ m deep and 50  $\mu$ m wide. Access holes are at the end of each channel. These reservoirs are labelled sample inlet (#1), sample waste (#2), buffer inlet (#3) and buffer waste (#4). All channels are uncoated.

#### 2.2.2. Microchip with amperometric detection

The glass microchip for amperometric detection was purchased from Alberta Microelectronic Corp. (AMC, model MC-BF4-TT100; Edmonton, Canada). The effective length of the separation channel is 8 cm with a semicircular cross-section of 50  $\mu$ m width and 20  $\mu$ m depth. The joint has the shape of a double T. The modified chip was mounted on an inverse microscope from Leica (model DM IL) equipped with a XYZ micro-manipulator as a working electrode holder. A laboratory-built amperometric detector was connected to the working electrode. Everything was placed inside a faraday cage, except the high voltage power supplies. A Teflon-coated gold wire (bare wire diameter: 75  $\mu$ m, Teflon coating: 18  $\mu$ m; available from Advent Research Materials Ltd. England), attached to a holder for the XYZ micro manipulator, is used as working electrode.

#### 2.2.3. Capillary with UV detection

For the measurements on capillary, a Crystal ATI Unicam Model 310 from PrinCE Technology (Emmen, Netherlands) was used as the CE system. The capillary tubing from BGB Analytik AG (Adliswil, Switzerland) was of uncoated fused silica with an internal diameter of 75  $\mu$ m, a length from inlet to detector of 65 cm and a length from detector to outlet of 14 cm. The UV detector was a Spectra 100 from thermo separation products (Egelsbach, Germany). Data were collected

and analyzed with a  $\mu$ DAQ AD-modifier from Eagle Technology (Cape Town, South Africa). The conditions used in CE were the following: voltage, +25 kV.

### 2.3. Methods

All measurements were detected with UV light and electrochemically and were reproduced at least two times. The whole procedures were performed at room temperature (25 °C). Calculations and nonlinear fittings were carried out with a computer program called Origin 6.0 from Microcal Software Inc. (Northampton, USA).

#### 2.3.1. Microchip with UV detection

Flushing the channels was done manually by means of a 2.5 mL syringe with special flushing tip (Shimadzu). Before and after every use, the chip was washed with 0.1 M NaOH at least for 30 s and rinsed afterwards with double deionised water. The channels were dried using the vacuum from a water-pump. Before measuring, the channels were flushed with buffer solution. The four access holes were cleaned with the vacuum (without emptying the channels). Finally, the reservoirs #2–#4 were filled with buffer and #1 with sample solution. This was also done manually using syringes. After setting up the chip into the instrument, the chip was washed again with high voltage. For 60 s, voltages of 0.80 kV, 0.80 kV, 1.50 kV and 0.00 kV, respectively, were applied. Then the measurements were made as pinched injections. This was achieved by a two-step high-voltage program. In a first step (injection mode), a sample plug was performed into the intersection. The applied voltages at the four reservoirs were 0.60 kV, 0.00 kV, 0.32 kV and 0.39 kV. After 10 s, the voltage was switched for a previously chosen length of time (e.g. 15 s) to the separation mode (second step) with 0.80 kV, 0.80 kV, 1.00 kV and 0.00 kV, respectively.

On microchip the detection method was with UV light: at a wavelength of 210 nm. The detection took place over the whole separation channel.

#### 2.3.2. Microchip with amperometric detection

For preconditioning of separation channel a 1 M NaOH-solution (1 min, daily) and the appropriate running buffer (3 min, before every run) was used for flushing the channel. Fresh sample and buffer solutions were prepared daily.

Injection- and separation parameters were controlled and data acquisition was performed with a home-written program in "LabVIEW", Version 6.0.2, a graphical programming language and a controller card (Data Acquisition Devices, PCI-MIO-16XE-50) with a built-in analogue-to-digital converter both from National Instruments (Austin, USA). Two high voltage power supplies model CZE1000R (Spellman HV Electronics Corp., Europe, Haarlem, The Netherlands) were used for switching of the voltages for injection and separation.

Amperometric measurements were performed with a home built detector on the end of the separation channel [35].

The applied potential could be controlled via a voltage divider connected to the non inverting input of an amplifier having the working electrode in its inverting branch. Measuring of the redox current of the working electrode was performed with a precision instrumentation at a 1 M $\Omega$  resistor. After passing an amplification stage, the signal was fed to the input of the A/D converter.

#### 2.3.3. Capillary with UV detection

Conditioning was done daily before each use of the capillary: 1 min, 0.1 M NaOH, 300 mbar and 3 min, water, 250 mbar. Before each change of buffer, the capillary was washed: 3 min, water, 250 mbar. The loading method consisted of three programs: Washing for 3 min, 250 mbar with buffer, injection for 0.1 min, 30 mbar with the sample and separation for 20 min, 25 kV with buffer. Preparing buffer and sample *vide supra*, additionally, these samples had to be diluted by the factor 10.

The detection method on the capillary was with UV light: at a wavelength of 210 nm. In comparison to microchip (MC), it was a normal on-capillary method with detection on the cathode-site.

## 3. Theory

To achieve qualitatively meaningful results, the following preliminary conditions of ACE must be complied with:

- no interactions between the capillary surface and the molecules under observation;
- low conductivity of the molecules (buffer as well as analyte);
- the background buffer has to be UV-permeable and electrochemically inactive;
- there has to be a difference between the ionic mobility of the ligand and the substrate;
- either the ligand or substrate has to be detectable (by UV or amperometry);
- at least one binding partner has to be charged.

CDs are chiral cyclic oligosaccharides with a shape similar to a truncated cone and containing a hydrophobic cavity. The interactions between the model-drug and CD-molecules are caused by weak physicochemical forces such as hydrophobic (unspecific), electrostatic effects (specifically dipole–dipole or dipole–induced dipole) and steric effects; for the formation of inclusion complexes hydrophobic stereospecific interactions predominate in the cavity of CD-molecule. Using CDs with ionic substituents on the rim, hydrogen bonds and electrostatic interactions are responsible for improving the strength of binding affinity to opposite charged model-drugs.

An indirect indication for the presence of interactions between complexing agent and interacting substance is given by molecular and dynamic parameters of the CD-molecules and the model-substance (ionic mobility, diffusion coefficient,

hydrodynamic radius, apparent molecular mass), which are altered by the aggregation of substances in a characteristic manner.

A more precise characterisation is possible by examining the alteration of the electrophoretic properties of the solubilized drugs than by studying the complex itself or the complete system. With ACE the complexation behaviour of substances can be studied in a straightforward way simply by observing the effect of the composition and concentration of the complexing agent on the ionic mobility. For the calculation of the binding constants according to Eq. (1), [33] the measured ionic mobility of the drug ( $\mu$ ), the mobility of the drug in absence of CD-molecules ( $\mu_S$ , constant) and the concentration of the free CD-molecules [L] have to be known. In the case of ACE, the free concentration of the ligand is equal to the total concentration of CD because the sample stays a small zone. By non-linear curve fitting assuming a 1:1 interaction, the binding constant ( $K_B$ ) and the mobility of the drug-CD-complex  $\mu_{SL}$  (both are parameters) to the experimentally obtained values (measured ionic mobility of drug on the y-axis to concentration gradient [L] on the x-axis) can be calculated.

$$\frac{\mu - \mu_S}{\mu_{SL} - \mu_S} = \frac{K_B[L]}{1 + K_B[L]} \quad (1)$$

The parameter  $\mu = f([L])$  stands for the real electrophoretic mobility of the ions with a contribution from the electroosmotic flow ( $\mu = \mu_{\text{measured}} - \mu_{\text{EOF}}$ ). The method to calculate  $\mu$  from the electropherograms depends on the detection method. With the end-channel and on capillary detection methods, the x-axis represents the passing time at a certain separation length. With UV detection over the whole channel on MC, the length of the separation channel forms the abscissa at a certain time (see Fig. 1).

$$\mu = \frac{l_{\text{eff}}/t_{\text{tot}}}{U_{\text{Sep}}} \left( \frac{1}{t_{\text{Sample}}} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (2)$$

$$\mu = \frac{s_{\text{Sample}} - s_{\text{EOF}}}{E_{\text{Sep}} t_{\text{Sep}}} \quad (3)$$

In Eq. (2) which is used for on-capillary and end-channel detections,  $l_{\text{tot}}$  (cm) is the total length of the capillary,  $l_{\text{eff}}$  is the length from inlet end of the capillary to the detector;  $t_{\text{Sample}}$  and  $t_{\text{EOF}}$  are the measured migration times of the sample and the DMSO peak. In Eq. (3) which is especially designed for detection over the whole separation channel,  $E_{\text{Sep}}$  is the electric field (V/cm),  $t_{\text{Sep}}$  is the time of the separation and  $s_{\text{Sample}}$  and  $s_{\text{EOF}}$  (cm) are the measured migration lengths of the analyte. The shift of  $\mu$  results from increasing concentrations of the ligand (L) and therefore the position of equilibrium. sCD was added to the background buffer in concentrations from 0 to 3.96 mM.

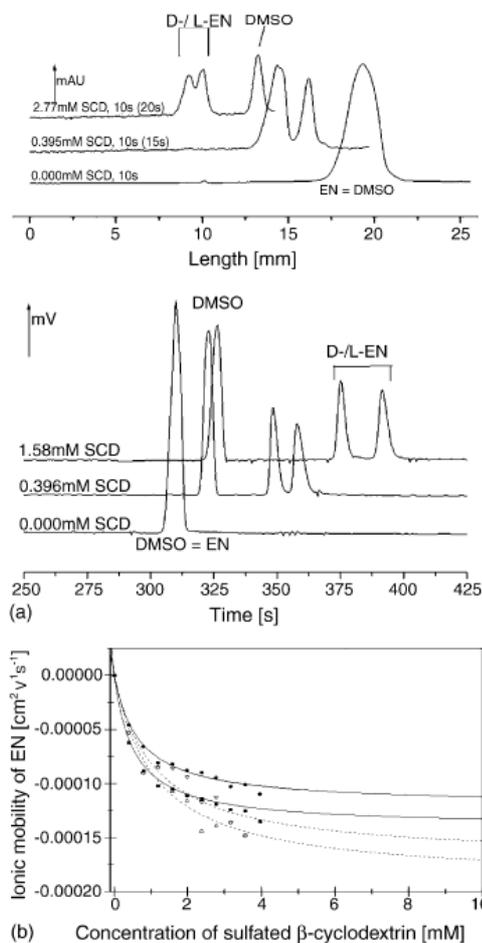


Fig. 1. (a) Electropherograms measured on microchip and capillary. Buffer: 10 mM TRIS at 210 nm containing sulfated cyclodextrin (sCD); internal standard: DMSO; up microchip: 2 mM epinephrine (EN) at pH 7.37. The separation times differed from 10 s up to 20 s (converted to 10 s) at 280 V/cm using an uncoated chip  $50 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  i.d. Down capillary: 0.2 mM EN at pH 7.33. Injection time in each run was 6 s at 25 kV using a 65 cm (79 cm in total)  $75 \mu\text{m}$  i.d. open, uncoated quartz capillary. (b) Affinity capillary electrophoresis: comparison between capillary and microchip. The electropherograms of (a) converted into affinity curves with increasing sCD concentrations vs. ionic mobility of EN. The thick lines with the filled symbols is the result of the capillary, the thin lines with the hollow symbols the result of MC.

## 4. Results and discussion

The strategy for the present work was to verify that MC-ACE would be a useful tool and even advantageous over other techniques. We approached our studies from different angles.

### 4.1. Comparison between capillary and chip

One electrophoretic study of complex formation between neurotransmitters and CDs on capillary has been reported at a pH of 3.2 [36]. Our work focussed on the idea that ACE can

be transferred from capillary to microchip. We directly compared ACE using uncoated fused-silica capillaries with MC-ACE using quartz microchips, where the separation channel is on average between a 10th and a 20th shorter. Fig. 1a represents a comparison between electropherograms measured with capillary and MC. It shows electropherograms with different concentrations of sCD in the background buffer measured on chip (top) and capillary (bottom). Both diagrams illustrate a shift in migration time of solute depending on the concentration of sCD. Without sCD in the running buffer, at pH of 7 EN migrates with the EOF of the anionic sCD, the EN peak is getting slower. Furthermore, the EOF is decelerated due to the increasing ionic strength. Towards a complete binding, EN migrates with a mobility near of the sCD molecules. Since the enantiomers interact with different intensity, a chiral separation can be observed at a concentration of 0.395 mM sCD on capillary. In consequence of the short migration length (MC/CE: 1/26) at 1.58 mM sCD (not shown) the D- and L-form can be distinguished on chip, however EN could not be separated completely. With further increasing of CD concentration the UV-signal decreased significantly so that an optimum for a baseline separation is not measurable. The experimental data consider [EN] and [EN<sup>+</sup>]. In the mathematical derivation of Eq. (1) both are truncated. The calculated  $K_B$ -value contains the fraction of [EN] and [EN<sup>+</sup>] regarding their interactions.

Due to the noticeable difference in length of the separation ways (65 cm versus 2.5 cm) the migration times on the chip are substantially shorter. The separation time on the chip has to be fixed at a period defined beforehand (e.g. 10 s). The electrophoretic migration can be compared on capillary and MC (accessible by means of the formula  $v = s/t$ ); it is identical for the same sample on both the capillary and chip. The differences between MC and capillary are obvious: the fast separation time and the use of less buffer (about 0.1–0.5 mL for the series of measurements) obtained with the MC competes with the narrow peaks and the more precise separation obtained using capillary. The large peak width on the chip results from both the higher injection volume relative to the channel length and the principle to record the electropherogram (see Section 4.2).

In Fig. 1b, the ionic mobility is set in relation to different concentrations of sCD in the CE-buffer. With both methods (MC and capillary), the ionic mobility behaves similarly with increasing concentrations of sCD in the background electrolyte.

By shifting the complex-formation equilibrium to the side of the complex ( $S + L \rightleftharpoons SL$ ), EN migrates towards longer detection times because sCD is anionic in the pH range used. In addition to the higher scattering of  $\mu$ -values measured on chip, the resulting functions are analogical and therefore provide similar  $K_B$ -values; these are summarized in Table 1. For calculating  $K_B$  of the functions,  $\mu_S$  was applied as a constant value (see Section 4.3).

In a next step, different separation conditions and detection methods were investigated to validate MC-ACE. A sensitive

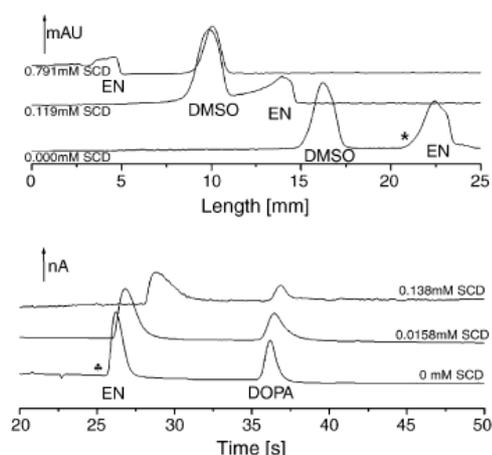


Fig. 2. Electropherograms detected amperometric and with UV. Up amperometric: 0.5 mM EN with DOPA as internal standard at pH 6.00. Buffer was 10 mM MES containing sCD. Injection time was 3 s at 1 kV; separation voltage was 3 kV using an uncoated glass chip 50  $\mu$ m i.d. and a Au-electrode. Down UV: 2 mM EN with DMSO as internal standard at pH 6.10 at 210 nm. Buffer was 10 mM TRIS containing sCD. The separation time in each run was 10 s at 280 V/cm using an uncoated chip 50  $\mu$ m  $\times$  20  $\mu$ m i.d.

method of differentiation is required for the application of ACE on the very short distance over which separation occurs.

#### 4.2. Detection methods and EOF-markers

Migration times on MC are typical within a range of 10–20 s (at a 2.5 cm separation way) and 20–40 s (at 8 cm); this requires a particularly high resolution of the detectors and low injection volumes. Especially with MC-UV, the short separation way and the detection limit of UV make it difficult to guarantee these conditions; this leads to wide peaks in relation to the distance over which separation occurs. In order to implement ACE studies on MC, internal standards are necessary. The best method is to use a neutral molecule (migration with the EOF) to get internal standards and EOF-markers. It is important that the molecule does neither interact with CDs nor with the surface of the channel. With an internal standard, the calculated  $\mu$  will be in relation to the EOF. The UV-active neutral molecule DMSO was chosen as an internal standard for our MC-UV measurements. As DMSO is not electrochemically active, DOPA was used as a reference material. A comparison between UV- and amperometric detection is illustrated in Fig. 2. In both cases – without sCD in the background buffer – EN migrates faster than the EOF due to the positively charged amine group. With increasing of the CD concentration a shift of EN is observed whereas peak broadening is influenced. Above a concentration of about 0.2 mM sCD (not shown) EN migrates as a result of advanced complexation as an anion. The amperometric measurements are more precise with narrower peaks. As above note, the reason for this observation can be explained with the unfavourable ratio of length of injection plug and the migration length

Table 1  
Overview of different equilibria at various conditions

Comparison of	Sample	Ligand	Binding constant, $K_B$ (L mol <sup>-1</sup> )	Mobility of complex, $\mu_{SL}$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Detection	Reference	pH	Method	R <sup>2</sup> (%)	
Chip vs. capillary	EN	sCD	891 <sup>a</sup>	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	96.991	
			919	-0.00017					91.614	
	EN	sCD	1870 <sup>a</sup>	-0.00015	UV	DMSO	7	Capillary	98.675	
			1460	-0.00012					98.939	
	NEN	sCD	1030	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	95.258	
			1560	-0.00018					97.053	
	MN	sCD	2250 <sup>a</sup>	-0.00022	UV	DMSO	7	Chip	99.845	
			2560	-0.00018					99.752	
	MN	sCD	4100 <sup>a</sup>	-0.00020	UV	DMSO	7	Capillary	99.97	
			3690	-0.00018					99.974	
	EN	sCD	4200 <sup>a</sup>	-0.00054	UV	DMSO	6	Chip	93.121	
			3880	-0.00047					95.239	
	EN	sCD	5420 <sup>a</sup>	-0.00060	UV	DMSO	6	Capillary	99.787	
			3830	-0.00062					99.802	
Detections	EN	sCD	891 <sup>a</sup>	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	96.991	
			919	-0.00017					91.614	
	EN	sCD	671 <sup>a</sup>	-0.00027	Amp.	DMSO	7	Chip	99.366	
			823	-0.00025					98.741	
pH-values	EN	sCD	4200 <sup>a</sup>	-0.00054	UV	DMSO	6	Chip	93.121	
			3880	-0.00047					95.239	
	EN	sCD	891 <sup>a</sup>	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	96.991	
			919	-0.00017					91.614	
	EN	sCD	1870 <sup>a</sup>	-0.00056	UV	DMSO	8	Chip	90.694	
			1830	-0.00052					91.836	
	EN	sCD	2710 <sup>a</sup>	-0.00031	UV	DMSO	9	Chip	93.448	
			8360	-0.00018					96.117	
	Neurotransmitter	EN	sCD	891 <sup>a</sup>	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	96.991
				919	-0.00017					91.614
NEN		sCD	1030	-0.00019	UV	DMSO	7	Chip	95.258	
MN		sCD	2250 <sup>a</sup>	-0.00022	UV	DMSO	7	Chip	99.752	
			2560	-0.00018					99.845	

In case of chiral separation there are two results, the first belongs to the analyte with lower interactions to sCD.

<sup>a</sup> Chiral separation of the molecule.

(MC-UV: 50 μm (simple cross)/2.5 cm, MC-Amp: 100 μm (twin tee)/8 cm). Another fact leads to the apparent lower separation efficiency at MC-UV. With recording the detection signal depending on the migration way the peak width results from the sample plug (50 μm) and dispersion of the zone (e.g. in Fig. 2 above, \*, the peak width is about 2.5 mm). The concentration profile along the separation channel is a snap-shot at a defined time. With recording the detection signal at one point on the channel in dependence on the time the peak width is given by the width of the sample zone including dispersion and the velocity with that the analyte migrates. In the example given above the following time-interval (peak width (t) on the base) for detection can be calculated: 2.5 mm peak width, velocity of EN: 2.98 mm/s would lead to a time-interval of 0.83 s. This result is clearly narrower than measured in the amperometric experiment (2.4 s, see in Fig. 2 below, ♣) and demonstrates the more unfavourable format of record of MC-UV. The difference in the number of theoretical plates ( $N_{Amp} = 4110$  versus  $N_{MC} = 151$ ), the standard deviation and the relative standard deviation of migration times ( $\sigma_{MC-Amp} = 0.0516$  s and R.S.D.<sub>MC-Amp} = 0.0949%,  $\sigma_{MC-UV} = 0.344$  mm and R.S.D.<sub>MC-UV} = 8.11%, both calcu-</sub></sub>

lations were made with the electropherograms of Fig. 2) emphasise this. At the pH-values in the study, DOPA is deprotonated and does not interact with the CDs. In one separate series on MC, the metabolite metanephrine (MN) was measured with DOPA and DMSO. The peak of DOPA stayed constantly at the mobility of  $1.95 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> compared with DMSO and was independent of the increasing sCD concentration. As a consequence DOPA can be used as constant bench mark in ACE with CDs. After transferring the results from DOPA standard to DMSO standard, the amperometric approach could be compared with MC-UV measurements. At higher concentrations of sCD (>0.158 mM), it was impossible to measure electrochemically. The background noise increased in both cases, which influenced the peak form and the sensitivity of the measurement.

4.3. pH-values

As we had assumed, the interactions between S and L depend on the pH-value. The part of electrostatic interactions can be estimated by studies outside the physiological pH-range, as ionic interactions are taking place besides the

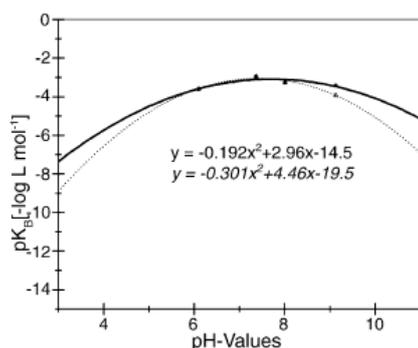


Fig. 3. The dependence of  $pK_B$  on different pH-values. Epinephrine at pH 6.10, 7.37, 8.01 and 9.13 the same procedure *vide supra*. The fat line with the filled symbols is l-epinephrine; the thin line with the hollow symbols represent d-epinephrine.

hydrophobic force. The charge on the drug substance as well as the charge of the CD molecules has an effect on the interactions and thereby on the binding constant. In the case of EN, it was possible to observe how the pH-value (measured in the range between 6 and 9) influences  $K_B$  (see Fig. 3). The calculated binding constants describe the sum of all equilibrium constants and result from the dissociation constant of both the EN and sCD molecule as well as from the binding constant of single complexes. A mathematical equation that includes six equilibria (two for the protonated and deprotonated form) would be too complicated for the description of the pH dependence, so that a simple quadratic equation was used to explain the tendencies in the used pH range. In strong acidic and basic buffers (outside the measured range), the  $pK_B$ s would diminish tremendously. At pH 7 the  $pK_B$  is at a maximum. This means, at the same pH-value as in vivo (pH 7.3–7.4), EN has the lowest affinity to sCD.

With an increase of  $K_B$ , the chiral separation of the enantiomers is more obvious. Higher electrostatic interactions between ligand and substrate are responsible for the better separation of the D- and L-forms. At low pH-values, EN is getting protonated and sCD partially deprotonated; at basic pH-values, EN is almost completely presented as the neutral species and sCD as anionic species molecules. Additionally the starting point ( $\mu_S$ ) and  $\mu_L$  are influenced by them, the migration of the complex formed ( $\mu_{SL}$ ). MC and capillary were compared with results in a similar range.

#### 4.4. Neurotransmitters

The two natural human sympathomimetics norepinephrine (NEN) and epinephrine (EN) and one of their metabolites (metanephrine, MN) were chosen as drug models. Due to their similar structures, the migration times are nearly identical at pH 7. However, after calculating their  $K_B$ s, they were easily distinguishable because of their different interactions with sCD.

MN has the largest affinity to sCD followed by NEN and EN. These measurements were repeated on a capillary (for results see Table 1). The difference between the three neurotransmitters is reasonable in terms of the structures of the molecules. MN has the highest  $K_B$  (2250, 2560 L mol<sup>-1</sup>) with a methoxy group on the benzene ring. The increase of lipophilicity on one end of the molecule leads to a higher interaction with the hydrophobic cavity of sCD. The methyl group on the hydrophilic end does not seem to have such an effect. NEN (without methoxy and methyl groups) is sterically more compatible with the hydrophilic sulfated part of sCD than EN, but the two phenol groups decrease the  $K_B$ -value (1030 L mol<sup>-1</sup>) in comparison to MN. EN has the lowest binding constants (891, 919 L mol<sup>-1</sup>).

The optimal concentration of CDs in chiral separations depends on both the aggregation properties (selectivity) and the stability of the host-guest complex (sensitivity) formed. Theoretical aspects describing the dependence of resolution on chiral selector concentrations are clearly shown by Wren and Rowe [37]. Chiral separations are mainly carried out at acidic pH, avoiding the detrimental effect of the electroosmotic flow on the resolution of cationic analytes and taking into account that most drug compounds contain an amine functionality.

Fig. 4 illustrates the shift of  $\mu_{MN}$ ,  $\mu_{MEN}$  and  $\mu_{EN}$  in dependence on sCD. Additionally, the fitted curves calculated with the Eq. (1) are graphed. The starting point without sCD corresponds to the mobility of the free solved sample  $\mu_S$ . At this pH-value, the mobility of MN starts in the positive range (Fig. 4), whereas the mobilities of NEN and EN start at zero. Both the mobility of the complex  $\mu_{SL}$  and  $K_B$  were calculated with nonlinear fitting using these two variables. The enantiomers of MN and EN could be separated; D- and L-forms have different affinities to sCD. In theory the  $\mu_{SL}$ s of the enantiomers are identical. However, since this value

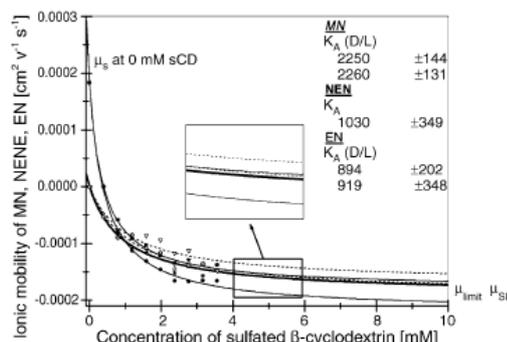


Fig. 4. Affinity capillary electrophoresis of metanephrine (MN), norepinephrine (NEN) and epinephrine (EN): ligand concentration versus ionic mobility of the sample. Buffer: 10 mM TRIS (pH 7.37) at 210 nm containing sCD; internal standard: DMSO; chip: 50  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  i.d., uncoated; voltage: 289 V/cm. Dashed lines with hollow symbols: 2 mM MN. The separation time was 10 s up to 15 s. Thick line with star symbol: 2 mM NEN. The separation time was 10 s. Normal lines with filled symbols: 2 mM EN. The separation time was 10 s up to 20 s.

was set variable in the calculation, the D- and L-form of the complex show slightly different values (see Table 1), this is independent of the  $K_B$ -value that mirrors the real facts. In comparison to other calculations of  $K_B$ , the mobility of the ligand  $\mu_L$  can be unknown, but it has to be more negative than  $\mu_{SL}$ .

#### 4.5. Overview

The efficiency of MC-ACE was tested using different approaches to confirm that miniaturization is a viable alternative to ACE on a capillary. An overview of the results is presented in Table 1. For the resulting chirality, there are two data lines for each sample, only NEN did not separate into its two enantiomers. In each row the measured sample, the ligand in the buffer, the detection method, the reference peak, the pH-value, the binding constant and the mobility of the complex are mentioned. To verify the accuracy of the mathematically fitted data ( $K_B$  and  $\mu_{SL}$ ), the coefficient of determination ( $R^2$ ) in percent is given in the last column. The data achieved from the amperometric measurements are transposed from DOPA to DMSO to make them comparable to UV-detection.

In principle, any ionic or neutral complexing agent as well as model-drugs could be used instead of the neurotransmitters and the sCD.

## 5. Conclusion

ACE has proved to be an adequate method for studying molecular interactions. We can foresee that there could be important applications in pharmaceutical research and medical diagnostics. The high separation efficiency of CZE in general makes it possible to transfer affinity studies from capillary to miniaturized systems. By choosing a suitable detector, selective measurements are possible whereas impurities in the sample produce no falsification of the results. The limiting factor caused by the small sample volumes is the sensitivity obtained using optical detection techniques. Below 1 mM, the detection limit is reached. On the other hand, traditional binding assays like enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) are tedious, and significant amounts of expensive reagents are consumed.

The introduction of the  $\mu$ TAS concept provides new opportunities for studying binding interactions [21]. MC-ACE is advantageous as a low-cost, rapid and simple screening method, which provides quantitative results on various interactions with minimum reagent consumption and short analysis time (8–60 s). A disadvantage is that MC-ACE provides less precise data compared to capillary. Even this problem, though, can be minimized with an internal standard. The new method described here is a useful tool to obtain an estimation of the strength of interactions between the ligand and its substrate. For the future, more applications of ACE-based chips for high-throughput screening and combinatorial chemistry are to be expected.

## Acknowledgements

We would like to thank Shimadzu Corp. for their kind support. We also thank Markéta Vlčková for the amperometric measurements (University of Basel, Department of Chemistry). Partial funding for this project was provided by Swiss National Science Foundation, Grant number 200021-103812/1.

## References

- [1] N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 22 (2001) 2526.
- [2] D. Erickson, D. Li, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 11.
- [3] S.-H. Chen, Y.-H. Lin, L.-Y. Wang, C.-C. Lin, G.-B. Lee, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5146.
- [4] A.T. Woolley, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3676.
- [5] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 556.
- [6] M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder, *Electrophoresis* 24 (2003) 3233.
- [7] A. Rodríguez, E. Junquera, P. del Burgo, E. Aicart, *J. Colloid Interface Sci.* 269 (2004) 476.
- [8] M.A. El-Kemary, I.M. El-Mehasseb, *Talanta* 62 (2004) 317.
- [9] H. Kitano, H. Endo, M. Gemmei-ide, M. Kyogoku, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 47 (2003) 83.
- [10] V. Gabelica, N. Galic, F. Rosu, C. Houssier, E. de Pauw, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 491.
- [11] B. Tang, L. Ma, C. Ma, *Talanta* 58 (2002) 841.
- [12] K. Tanhuanpää, K.H. Cheng, K. Anttonen, J.A. Virtanen, P. Somerharju, *Biophys. J.* 81 (2001) 1501.
- [13] A. Vega-Rodríguez, Á. Piñeiro, S. Perez-Casas, *Thermochim. Acta* 405 (2003) 109.
- [14] G. Castronuovo, M. Niccoli, F. Velleca, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5 (2003) 2658.
- [15] J.J. Michels, J. Huskens, D.N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2056.
- [16] M.S. Bakshi, *J. Colloid Interface Sci.* 227 (2000) 78.
- [17] Z. Kriz, J. Koca, A. Imberty, A. Chariot, R. Auzély-Velty, *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 2590.
- [18] M. Canipelle, L. Caron, C. Christine, S. Tilloy, E. Monflier, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 281.
- [19] C. Merino, E. Junquera, J. Jiménez-Barbero, E. Aicart, *Langmuir* 16 (2000) 1557.
- [20] L. Liu, S. Abid, M.E. Hail, M.S. Lee, J. Hangeland, N. Yein, *Analyst* 123 (1998) 1455.
- [21] R.M. Guijt, J. Frank, G.W.K. van Dedem, E. Baltussen, *Electrophoresis* 21 (2000) 3905.
- [22] S.B. Cheng, C.D. Skinner, J. Taylor, S. Attiya, W.E. Lee, G. Picelli, D.J. Harrison, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1472.
- [23] M. Plätzer, M.A. Schwarz, R.H.H. Neubert, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 215.
- [24] N.H.H. Heegaard, *Electrophoresis* 24 (2003) 3870.
- [25] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 235.
- [26] M. Ye, H. Zou, Z. Liu, R. Wu, Z. Lei, J. Ni, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 651.
- [27] M. Quaglia, B. Sellergren, E. De Lorenzi, *J. Chromatogr. A* 1044 (2004) 53.
- [28] L.Z. Avila, Y.-H. Chu, E.C. Blosssey, G.M. Whitesides, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 126.
- [29] H. Kajiwara, *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 61.
- [30] D.S. Hage, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 3.
- [31] M. Nilsson, V. Harang, M. Bergström, S. Ohlson, R. Isaksson, G. Johansson, *Electrophoresis* 25 (2004) 1829.
- [32] Y.-H. Chu, W.J. Lees, A. Stassinopoulos, C.T. Walsh, *Biochemistry* 33 (1994) 10616.
- [33] H.-H. Rüttinger, *Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2003.
- [34] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 225.
- [35] M.A. Schwarz, B. Galliker, K. Fluri, T. Kappes, P.C. Hauser, *Analyst* 126 (2001) 147.
- [36] W.-C. Yang, A.-M. Yu, X.-D. Yu, H.-Y. Chen, *Electrophoresis* 22 (2001) 2025.
- [37] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, *J. Chromatogr. A* 603 (1992) 235.



## **PAPER II**

ELECTROPHORETIC AFFINITY MEASUREMENTS ON MICROCHIP –  
DETERMINATION OF BINDING AFFINITIES BETWEEN DIKETOPIPERAZINE  
RECEPTORS AND PEPTIDE LIGANDS

Alexandra R. Stettler, Philipp Krattiger, Helma Wennemers, and Maria A. Schwarz

Publiziert in: *Electrophoresis*, **28**, (2007), 1832-1838.

Alexandra R. Stettler  
Philipp Krattiger  
Helma Wennemers\*  
Maria A. Schwarz

Department of Chemistry,  
University of Basel,  
Basel, Switzerland

Received August 31, 2006  
Revised October 24, 2006  
Accepted December 5, 2006

## Research Article

# Electrophoretic affinity measurements on microchip. Determination of binding affinities between diketopiperazine receptors and peptide ligands

ACE on a microchip (MC-ACE) is introduced as a fast and reliable method to determine binding affinities. It is based on monitoring the change in the ionic mobility of a receptor upon binding to a ligand, or *vice versa*. The method is complementary to other standard methods for binding affinity determinations, like isothermal titration calorimetry (ITC), NMR, UV-Vis spectroscopy, *etc.* and allows for affinity studies of weak to strong binding interactions. The method is attractive since it principally allows for the analysis of the binding affinity of multiple receptors to a given ligand and requires comparatively small quantities of the binding partners (particularly in comparison to affinity measurements on capillary). We demonstrate the applicability of MC-ACE for the determination of the binding affinities between acid-rich diketopiperazine receptors and basic tripeptides in aqueous solution.

### Keywords:

ACE / Binding constants / Isothermal calorimetry / Microchip / Peptides

DOI 10.1002/elps.200600545

## 1 Introduction

The analysis of intermolecular interactions is the key to understanding a vast amount of biomolecular recognition processes. NMR, isothermal titration calorimetry (ITC), and chromatographic techniques among others have been utilized to study intermolecular interactions [1]. As an alternative approach, ACE has been introduced and used for a wide range of applications to gain qualitative and quantitative information on specific as well as nonspecific interactions [2, 3]. ACE relies on monitoring the difference in the ionic mobility of the receptor upon interaction with the ligand. Since each receptor has typically a characteristic ionic mobility that is not disturbed in the presence of other receptors or impurities (in the sample zone), using ACE for binding affinity measurements brings about the advantage that also mixtures of receptors can be analyzed for binding to a given ligand. As a result, not only for cost-intensive and dif-

ficult-to-purify biological substances, such as enzymes, and proteins, but also for synthetic compounds this method is particularly attractive since even small amounts of impurities in the receptor analyte have no influence on the ACE results. Furthermore, if the concentration of the injected analyte is significantly lower compared to that of the ligand dissolved in the CE-buffer the exact concentration plays only a minor role for the evaluation of the binding strength in the mobility shift mode [4].

In comparison to standard ACE (measured on capillaries), the use of ACE on a microchip (MC-ACE) is even more appealing since it is based on the same principles but requires considerably less material and is much faster. Since the first description of an electrophoretic separation on chip (1992) [5], MC-ACE has mainly been used as a separation tool and both micellar and chiral separations on microfluidic systems have been investigated [6]. Planar microscaled systems have proven particularly valuable for applications of very specific bioassays, such as enzyme assays and immunoassays [7]. In enzyme assays the kinetics of enzymatic reactions have been studied. Immunoassays serve often for the identification of antigens or antibodies. In contrast, the use of MC-ACE for the determination of

**Correspondence:** Dr. Maria Schwarz, University of Basel, Spitalstrasse 51, CH-4056 Basel, Switzerland  
**E-mail:** Maria.Schwarz@unibas.ch  
**Fax:** +41-61-267 1005

**Abbreviations:** ITC, isothermal titration calorimetry; MC, microchip; RRR, Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr; RRS, Ac-Arg-Arg-Ser-NHPr; RSR, Ac-Arg-Ser-Arg-NHPr

\* Additional corresponding author:  
Professor Dr. Helma Wennemers  
E-mail: Helma.Wennemers@unibas.ch

binding constants is still in its infancy [6, 8]. We have recently described the first example of using MC-ACE for the determination of binding constants between neurotransmitters as analytes and sulfated  $\beta$ -CD as ligand [9]. These studies demonstrated that measurements on MC-ACE are in good agreement with known binding affinities previously determined on capillaries.

In this paper, we use MC-ACE for the determination of yet unknown binding affinities between synthetic diketopiperazine receptors and peptidic ligands. Diketopiperazine receptors consist of a diketopiperazine serving as a rigid, structure-directing template and two peptidic side chains, the “receptor arms” [10–12]. Combinatorial binding studies revealed that such two-armed receptors bind tripeptides with high sequence selectivity and binding affinities up to  $\Delta_R G = -6$  kcal/mol in organic solvents and water. In aqueous solution, combinatorial binding assays revealed selective binding between the aspartic acid-rich receptor 1 and arginine-containing peptides 3–5 (Fig. 1) [13]. For the interaction between receptor 1 and peptide Ac-Arg-Arg-Arg-NHPr (RRR) 3, ITC studies suggested a binding affinity of  $\Delta_R G = -5.7 \pm 0.1$  kcal/mol ( $K_B = 13\,900 \pm 500$  M<sup>-1</sup>, where  $K_B$  is binding constant) for a 1:1 complex [13]. For the binding between 1 and the serine containing tripeptides Ac-Arg-Arg-Ser-NHPr (RRS) 4 and Ac-Arg-Ser-Arg-NHPr (RSR) 5 weaker binding affinities of  $\Delta_R G = -3.7 \pm 0.1$  kcal/mol ( $K_B = 520 \pm 70$  M<sup>-1</sup>) and  $\Delta_R G = -4.0 \pm 0.1$  kcal/mol ( $K_B = 850 \pm 70$  M<sup>-1</sup>), respectively, were determined by ITC [14].

We also attempted to determine the binding affinities between peptides 3 and 5 and the peptidic side chain of the

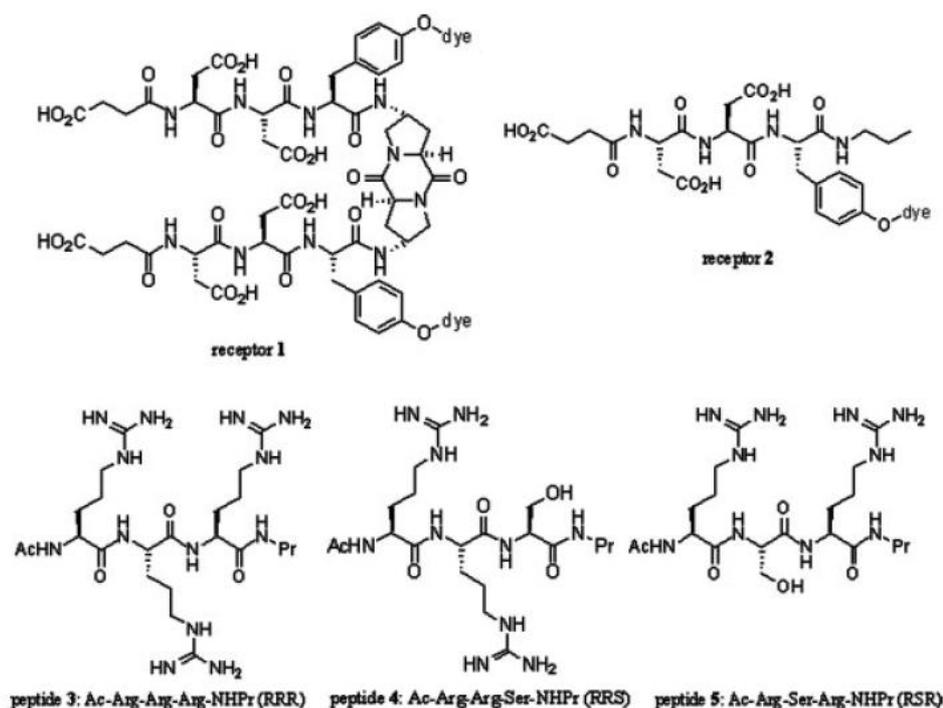
receptor, Suc-Asp-Asp-Tyr(dye)-NHPr 2, to analyze the influence of the diketopiperazine template on the observed intermolecular binding. However, data recorded by ITC measurements for the determination of the binding affinity between the “one-armed receptor” 2 and peptide 3 (RRR) did not allow for determination of the binding affinities. For the interaction of 2 with peptides 4 (RRS) and 5 (RSR) hardly any change in the molar reaction enthalpies  $\Delta_R H$  were observed over the course of the titration. Similarly, binding affinity measurements using NMR spectroscopy did not yield conclusive results, due to too many overlapping and broad signals. We therefore needed an alternative method to analyze the binding affinities between our ionic binding partners.

Here, we present the first application of MC-ACE for the determination of yet unknown binding affinities between acid-rich diketopiperazine receptors and basic arginine-rich peptides. Several of the MC-ACE measurements are compared to measurements carried out using both ACE and ITC.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical grade. Tris was obtained from Acros (Geel, Belgium). Boric acid, DMSO, and sodium salicylate were from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium ibuprofen was obtained from Sigma (Buchs, Switzerland). Water was doubly deionized. The receptors and the ligands were synthesized as described in ref. [10].



**Figure 1.** Structures of the one-armed (2) and the two-armed (1) receptors and peptide ligands RRR (3), RRS (4), and RSR (5); dye: Disperse Red 1.

## 2.2 Apparatus

### 2.2.1 MC-ACE

MC experiments were performed by a commercial Shimadzu MCE-2010 (Kyoto, Japan). The D<sub>2</sub>-lamp based instrument possesses a DAD located along the separation channel. UV detection at a wavelength of 218 nm was used for all samples.

All MCs were purchased from Shimadzu (Kyoto, Japan). The 35 × 12.5 × 2 mm quartz chip has a simple cross injector design. The separation channel is 25 mm long, 50 μm deep and 110 μm wide. Access holes are at the end of each channel. These reservoirs are labeled sample inlet (#1), sample waste (#2), buffer inlet (#3), and buffer waste (#4). All channels are coated with a polyacrylamide layer (Shimadzu).

### 2.2.2 CE-ACE

For the measurement with capillaries, a Crystal ATI Unicam Model 310 from PrinCE Technology (Emmen, Netherlands) was used as the CE system. The UV detector was a Spectra 100 from thermoseparation products (Egelsbach, Germany). Data were collected and analyzed with a μDAQ AD-modifier from Eagle Technology (Cape Town, South Africa). The methylated (HMDS) capillary tubing from BGB Analytik AG (Adliswil, Switzerland) had an internal diameter of 50 μm (outer diameter of 375 μm), an effective length of 54 cm and a total length of 67 cm.

### 2.2.3 ITC

Titration were performed on a Microcal VP-ITC titration microcalorimeter equipped with a 300 μL syringe and a 1.4204 mL cell from MicroCal LLC (Northampton, USA).

## 2.3 Methods

### 2.3.1 MC-ACE

The buffer (pH 7.28) was prepared by mixing a 10 mM solution of Tris with boric acid. Sample compounds (1 mM for the one-armed receptor 2, 0.5 mM for the two-armed 1) and the internal standard (ibuprofen and salicylic acid (1 mM) for the chip and DMSO for the capillary) were dissolved in the buffer solution. The ligands were dissolved in the buffer solution to yield stock solutions of 2.0 mM. These were diluted stepwise by the buffer solution to 0.1 mM.

All measurements were reproduced three times. The whole procedures were performed at room temperature (25°C). Calculations and nonlinear fittings were carried out with Origin 6.0 from OriginLab Corporation (Northampton, USA).

Flushing the channels and filling the buffer and sample vials (3 μL) was done manually by means of a 2.5 mL syringe

with special flashing tip (Shimadzu). Before and after use, the chip was washed with water at least for 30 s. The channels were dried using water-jet vacuum. Before measuring, the channels were flushed with buffer solution. The four access holes were cleaned with the vacuum (without emptying the channels). Finally, the reservoirs #2–#4 were filled with buffer and #1 with sample solution. After setting up the chip into the instrument, the chip was rinsed again with high voltage. For 90 s, voltages of 0.20, 0.20, 0.00, and 1.00 kV, respectively, were applied. The loading of sample into the intersection was achieved by pinched injections (0.00, 0.67, 0.39, and 0.32 kV). After 10 s, the voltage was switched for the previously chosen length of time (e.g. 15 s) to the separation mode with 0.06, 0.06, 0.00, and 1.00 kV, respectively. Measuring the anionic receptors for the coated chips has to be done in the reversed mode. The anions migrate from the cathode to the anode.

### 2.3.2 CE-ACE

Buffer and sample preparation was the same as on chip, *vide supra*. Conditioning was done daily before each use of the capillary: 10 min water (1000 mbar) and 10 min buffer (1000 mbar). To change the buffer, the capillary was washed for 10 min, 1000 mbar with the new buffer. The loading method consisted of three programs: washing for 3 min, 1000 mbar with buffer, injection for 0.1 min, 250 mbar with the sample, and separation for 20 min, 30 kV with buffer. The detection method on the capillary was with UV light at a wavelength of 218 nm. It was a normal on-capillary method with detection on the anode site. Each measurement was repeated three times.

### 2.3.3 ITC

Titration were performed at 25°C using a Microcal VP-ITC titration microcalorimeter. Sample solutions were prepared using deionized water. Titrations of RRR 3, RRS 4, and RSR 5 were performed by adding 5 μL aliquots of 8 mM (3) or 5 mM (4 and 5) peptide solution to 1.42 mL of 0.2 mM solution in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) of either receptor 1 or 2. The titrations were corrected with the enthalpies of the titration of the peptide solutions into buffer and analyzed using a least squares curve-fitting procedure (Origin<sup>®</sup> implemented with the calorimetric setup provided by MicroCal).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Mathematical description of the interaction

In ACE, the analytes migrating in an electrical field undergo an interaction, which changes their electrophoretic behavior. This effect can be used for the identification and quantification of specific binding by the evaluation of the altered be-

havior of the ionic mobility  $\mu_A$  (A, analyte). Whereas in ACE a physicochemical parameter of only one interacting partner is measured, with ITC the sum of reaction heat in the mixture is monitored.

Starting from a 1:1 complex, described by the binding constant  $K_B$  (Eq. 2), the heat of reaction and the ionic mobility of the formed complex, respectively, can be described as a function of the concentration of added ligand [L] (Eq. 3, ITC) and of the concentration of [L] solved in the running buffer (Eq. 4, MC-ACE).  $K_B$  can then be calculated by fitting the experimentally obtained data of  $\Delta Q$  or  $\Delta\mu$  monitored by changing [L] [15, 16].  $\mu_{AL}$  and  $\Delta_R H$  (molar enthalpy) represent the sum of  $\Delta_R Q$  and the maximum value for the mobility shift, respectively, and are identical with the molar Gibbs free energy ( $\Delta_R G$ ) and the mobility of the complex.



$$K_B = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (2)$$

$$Q = f([L]) = \frac{K_B[L]\Delta_R H}{1 + K_B[L]} \quad (\Delta_R H = \Delta Q_{\max}) \quad (3)$$

$$\mu = f([L]) = \frac{\mu_A + K_B[L]\mu_{AL}}{1 + K_B[L]} \quad (\mu_{AL} = \Delta\mu_{\max}) \quad (4)$$

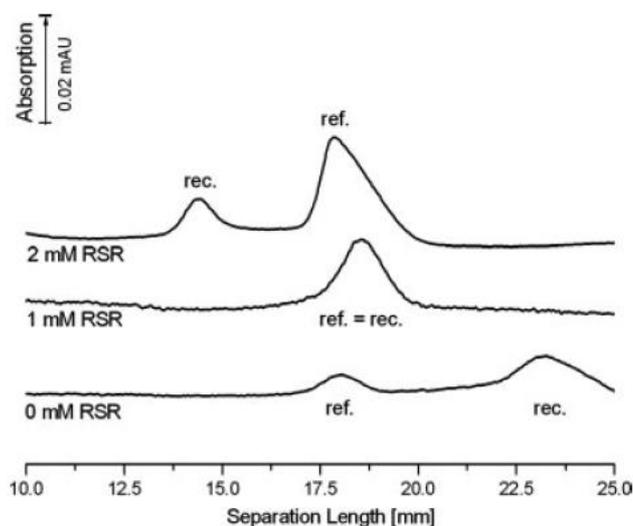
In ACE experiments, the equilibrium concentration of [L] can be equated with the concentration of L, solved in the CE buffer. In a second step  $\Delta_R G = -RT \ln K_B$  can be calculated from the data obtained by ITC or MC-ACE and additionally, for ITC measurements, the molar reaction entropy is available ( $\Delta_R G = \Delta_R H - T\Delta_R S$ ). For higher stoichiometry of complexation, according to the binding constant, the function for  $\Delta_R Q$  and  $\Delta\mu$  can be derived in a similar fashion but is considerably more complex [17] and not shown here.

### 3.2 Binding studies using MC-ACE

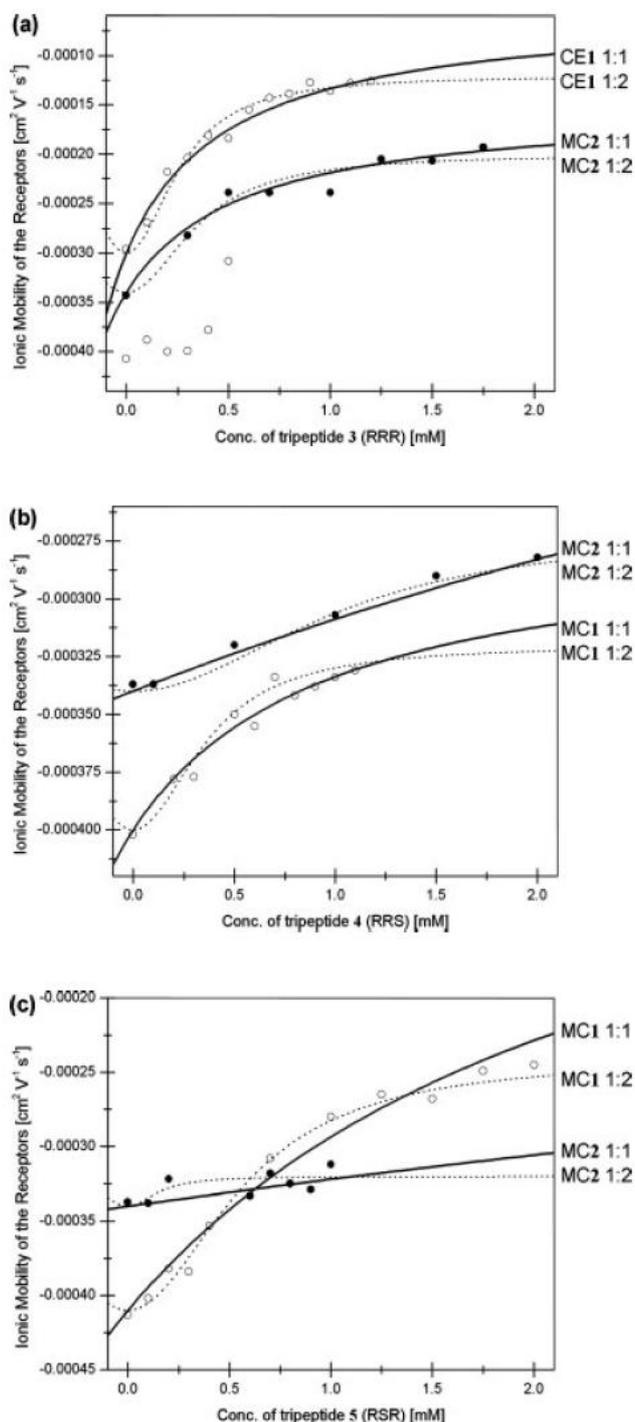
When using MC-ACE for the determination of binding affinities, the following requirements need to be fulfilled to achieve qualitatively meaningful results: (i) the channel surface should not interact with the investigated molecules, (ii) for UV-detection the background buffer and the solved ligand have to be UV-permeable while the complex needs to absorb, and (iii) there has to be a difference between the ionic mobility of the ligand and the receptor. The ligands (peptides 3–5) studied here showed slight interaction with the silica surface of the channel but fulfilled requirements (ii) and (iii). They allow for UV detection and have distinctly different ionic mobilities compared to the analyte, the receptor (anionic receptors, cationic peptides). This fact is particularly important for measurements on very short separation channels. The adsorption to the channel surface

can often not be avoided (particularly with peptidic systems) but can be reduced to a minimum by coating the channel surface with nonionic polymers, for example polyacrylamides have proven suitable for peptides. With increasing peptide concentration in the BGE the EOF should be nearly constant. This can be controlled by using an inert reference molecule (with respect to the surface of the channel and ligand molecule) that is coinjected with the analyte. In our case, salicylic acid and ibuprofen proved as ideal references due to their indifference to the peptidic ligands and the small time window for the detection of receptor and reference molecule together. In an independent experiment, a constant effective ionic mobility of the reference molecule (standardized against DMSO) was obtained with increasing ligand concentration. Additionally, interactions between ligand and/or receptor with the capillary wall is observable by peak deformation and noticeable smaller  $K_B$  values.

In MC-ACE the binding affinities between both receptor 1 and receptor 2 with each of the peptides are deducible from electropherograms as shown in Fig. 2. With increased peptide concentration in the running buffer the migration way of the analyte molecule is shifted to a shorter migration way and in relation with the reference molecule (reducing in effective anionic mobility). This reflects the change of the net receptor charge due to counterion binding of the positively charged peptide molecule. The starting point of effective ionic mobility (see also Figs. 3a–c), that is identical to the intrinsic effective ionic mobility of the receptor, is different for receptors 1 and 2. Expectedly, the two-armed receptor 1 shows a higher anionic mobility due to the twofold higher net charge without appreciable modification of the hydrodynamic radius.



**Figure 2.** Electropherogram of receptor 1 (0.5 mM) and internal standard (1 mM salicylic acid (standardized against DMSO)), UV-detection: 218 nm;  $E$ : 280 V/cm;  $T$ : 26.5°C; separation time: 20 s; coated chip C0066K; buffer:  $x$  mM RSR (5), 10 mM Tris, boric acid, pH 7.28. ref = reference, rec = receptor.



**Figure 3.** Altered behavior of the effective ionic mobility  $\Delta\mu_A$  with increasing peptide concentrations in the running buffer and fitting curves calculated with Eq. (4); (a) RRR, (b) RRS, and (c) RSR, sample: 0.5 mM two-armed and 1.0 mM one-armed receptor with salicylic acid and ibuprofen as internal standards solved in 10 mM Tris buffer (pH 7.33), UV-detection: 218 nm. The separation time was 20 and 25 s, respectively, at 280 V/cm using a coated chip  $110 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  id; symbols: CE-capillary, MC-microchip; filled circles: one-armed receptor 2; open circles: two-armed receptor 1; solid lines: fit for a 1:1 complex; dotted lines: fit for a 1:2 complex.

### 3.2.1 Comparison of the data by MC-ACE and ITC

In Table 1 the calculated molar free enthalpies on the basis of the measured ionic mobilities (Figs. 3a–c) of each combination (receptor 1 and 2 with the three peptides 3–5) are summarized. The determined binding affinities between receptor 1 and peptides 4 (RRS) and 5 (RSR) are in good agreement with those previously obtained by ITC. The differences of  $\leq 0.4$  kcal/mol are in the range described in the literature that compares different methods for characterizing equilibria [18–20]. One reason for variations and precision in the molar Gibbs free energy measured with MC-ACE is the unfavorable ratio of the length of the injection plug to the migration length (MC:  $100 \mu\text{m}$  (simple cross)/2.5 cm, capillary: 1 mm/67 cm). As shown in a recent study of capillary and MC ACE [9], microanalytical planar systems provide comparable data compared to capillary, even though less precise. Furthermore, whereas the estimated sample length or volume injected on the capillary can be assumed as precise, (both with pressure and electrokinetic injection), the sample length injected on the separation channel can only be estimated approximately. The minimum injection plug is the result of the inner width of the channel cross ( $100 \mu\text{m}$ ). Often, uncontrolled diffusion processes both before and after the injection process depend on various factors such as ionic strength of the buffer, relation between currents in the separation channel and injection channel, and are responsible for an undefined broadening of the analyte zone. The nonreproducible injection procedure is one of the most important factors which influence the resolution and separation efficiency on short separation channels. Regardless of the detection mode (detection on the whole column or detection on one point), the separation efficiency is merely influenced by the resolution of the detection system (number and density of detection points and focusing of detection system, respectively).

### 3.2.2 Binding of receptor 1 to peptides 3–5

The MC-ACE data recorded for the binding of receptor 1 to peptides 4 (RRS) and 5 (RSR) are indicative of 1:1 complexes with binding affinities of  $\Delta_R G = -4.0 \pm 0.3$  kcal/mol ( $K_B = 820 \pm 408 \text{ M}^{-1}$ ) and  $\Delta_R G = -3.8 \pm 0.2$  kcal/mol ( $K_B = 609 \pm 167 \text{ M}^{-1}$ ), respectively. Typical for a 1:1 interaction measured with ACE is the observed instant shift of effective ionic mobility with increasing ligand concentration. For the interaction between receptor 1 and peptide 3 (RRR) the MC-ACE measurements proved difficult due to the demanding evaluation of the analyte signal, detected near the LOD (Fig. 3a). The data suggest that the experimentally obtained data pictured up to a concentration of 0.5 mM peptide in the running buffer (Fig. 3a, open circles without fitting line) have not reached a limiting ionic mobility (plateau). For this reason, the system was additionally measured with a methylated capillary (Fig. 3a, open circles with fitting curve, marked as CE1). Since here the sensitivity is higher, the

**Table 1.** Gibbs free energy – a comparison between ITC and MC-ACE

$\Delta_R G$ (kcal/mol) (rec: peptide)		Peptide 3 (RRR)	Peptide 4 (RRS)	Peptide 5 (RSR)
Two-armed receptor 1	1:1 MC-ACE	$(-4.4 \pm 0.4)$	$-4.0 \pm 0.3$	$-3.8 \pm 0.2$
	ITC	$-5.7 \pm 0.1$	$-3.7 \pm 0.1$	$-4.0 \pm 0.6$
One-armed receptor 2	1:1 MC-ACE	$-4.5 \pm 0.2$	$-2.9 \pm 0.6$	$-2.4 \pm 0.744$
	ITC	No fitting possible	$\Delta_R H \approx 0$	$\Delta_R H \approx 0$
	1:2 MC-ACE	$-9.5 \pm 0.4$	$-8.2 \pm 0.2$	$-7.9 \pm 1.0$

receptor molecule could be measured up to a peptide concentration of 1.2 mM.  $\Delta_R G$  was calculated to be  $-4.5$  kcal/mol differing significantly from the value of  $-5.7$  kcal/mol obtained by ITC. This discrepancy is due to slight interactions between the coated capillary wall and the solved peptides leading to the apparent lower binding constant of this system. However, from the curve in Fig. 3a (marked with CE1) a typical behavior of analyte mobility influenced by ligand concentration is visible. Even stronger adsorption on the methylated capillary surface was observed for peptides 4 (RRS) and 5 (RSR) so that measurements using capillary ACE resulted in falsified values with too small binding constants (results not shown).

### 3.2.3 Binding of receptor 2 to peptides 3–5

ITC measurements with receptor 2 and peptides 4 (RRS) and 5 (RSR) showed no significant changes in the molar enthalpy  $\Delta_R H$  over the course of the binding titration, thereby not allowing for an evaluation of the binding affinities. For the interaction between receptor 2 and peptide 3 (RRR) changes in molar enthalpy were observed, however, fitting of the data did not yield conclusive results.

Two reasons can be responsible for small reaction enthalpies: first, also the binding affinity  $\Delta_R G$  is small or second, the binding affinity is entropy driven ( $\Delta_R G = \Delta_R H - T\Delta_R S$ , large  $\Delta_R S$ , small  $\Delta_R H$ ). Using MC-ACE allowed for the determination of binding affinities between 2 and all three peptides. For the interaction between receptor 2 and peptide 3 (RRR) a binding affinity of  $\Delta_R G = -4.5 \pm 0.2$  kcal/mol ( $K_B = 1760 \pm 640$  M<sup>-1</sup>) was obtained and for the interaction with peptides 4 and 5 where one Arg is exchanged by a Ser values of  $\Delta_R G = -2.9 \pm 0.6$  kcal/mol ( $K_B = 127 \pm 92$  M<sup>-1</sup>) and  $\Delta_R G = -2.4 \pm 0.7$  kcal/mol ( $K_B = 56 \pm 14$  M<sup>-1</sup>), respectively. The binding affinities are significantly weaker compared to the binding of the two-armed receptor 1 to the peptides, indicating that the central diketopiperazine helps the binding. The fact that no significant change in the reaction heat,  $\Delta_R H$ , was observed by ITC for the binding between receptor 2 and peptides 4 (RRS) and 5 (RSR), suggests that the observed binding is driven mainly by entropic changes  $\Delta_R S$ . For the interaction between receptor 2 and the peptides, the occurrence of 1:2 complexes cannot be excluded. In summary, the following tendency can be stated regarding the binding affinity with both ITC and MC-

ACE: the two armed receptor 1 binds to all of the examined peptides stronger than the one-armed receptor 2. Replacement of one arginine residue in the peptidic ligand by serine results in a lower binding affinity.

## 4 Concluding remarks

Besides fundamental studies of binding equilibria, MC-ACE has been used as a complementary method to ITC for the quantification of Gibbs free energies. Whereas ITC delivers more precise data depending on  $\Delta_R H$  and the stoichiometry, slight interactions of entropy driven processes are measurable with MC-ACE. In the case of low reaction enthalpies, as shown for the studies of receptor 2, with MC based binding affinity parameters the reaction entropy is assessable in conjunction with the ITC measurements. ACE-measurements differ from ITC and other binding affinity methods regarding the number of affinity analyses that can be performed in a single run. Even though no simultaneous separation of the two types of receptors (1 and 2) is shown here, in principle measurements with more than one receptor are feasible.

MC-ACE proved as a fast, reliable, and therefore ideal method for the determination of binding affinities between receptor 1 and receptor 2 to Arg-containing peptides 3–5. The separation times necessary for MC analyses are about 50 times shorter compared to analyses on standard capillaries. ACE-investigation on a MC require only a small amount of analyte and especially small amounts of ligand compared to commercial CZE devices, thereby reducing the efforts for the laborious and often costly synthesis of ligands.

*This work was supported by BACHEM and the Swiss National Science Foundation (grant nos. 200021-103812 and 200020-109511). H. W. is grateful to the BACHEM Company for an endowed professorship.*

## 5 References

- [1] Connors, K. A., *Binding Constants*, Wiley-Interscience, New York 1987.
- [2] Heegaard, N. H. H., Nilsson, S., Guzmán, N. A., *J. Chromatogr. B* 1998, 715, 29–54.

1838 A. R. Stettler *et al.**Electrophoresis* 2007, 28, 1832–1838

- [3] Schou, C., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis* 2006, 27, 44–59.
- [4] Busch, M. H. A., Carels, L. B., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1997, 777, 311–328.
- [5] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettingner, J. C. *et al.*, *J. Chromatogr.* 1992, 593, 253–258.
- [6] Stettler, A., Vlckova, M., Schwarz, M. A., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2006, 29, 1047–1076.
- [7] Guijt-van Duijn, R. M., Baltussen, E., van Dedem, G. W. K., *Electrophoresis* 2002, 23, 823–835.
- [8] Le Saux, T., Hisamoto, H., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 352–358.
- [9] Stettler, A., Schwarz, M. A., *J. Chromatogr. A* 2004, 1063, 217–225.
- [10] Wennemers, H., Conza, M., Nold, M., Krattiger, P., *Chem. Eur. J.* 2001, 7, 3342–3347.
- [11] Conza, M., Wennemers, H., *J. Org. Chem.* 2002, 67, 2696–2698.
- [12] Conza, M., Wennemers, H., *Chem. Commun.* 2003, 866–867.
- [13] Krattiger, P., Wennemers, H., *Synlett* 2005, 4, 706–708.
- [14] Krattiger, P., *Dissertation*, University of Basel, 2005.
- [15] Neubert, R. H. H., Schwarz, M. A., Mrestani, Y., Platzer, M., Raith, K., *Pharma. Res.* 1999, 16, 1663–1673.
- [16] Saboury, A. A., *J. Therm. Anal. Calorim.* 2003, 72, 93–103.
- [17] Bowser, M. T., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3261–3270.
- [18] Hoffmann, J., Mechref, Y., Cassely, A., Novotny, M. V., *Electrophoresis* 2003, 24, 2914–2923.
- [19] Hemond, C., Furtos-Matei, A., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 2003, 24, 816–823.
- [20] Saboury, A. A., Divsalar, A., Jafari, G. A., Moosavi-Movahedi, A. A. *et al.*, *J. Biochem. Molecul. Biol.* 2002, 35, 302–305.

**PAPER III**

QUANTIFICATION OF SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID AND  
OLIGONUCLEOTIDE INTERACTIONS WITH METAL IONS BY AFFINITY  
CAPILLARY ELECTROPHORESIS – PART I

Alexandra R. Stettler, Valérie Chaurin, Edwin C. Constable, Catherine E. Housecroft,  
and Maria A. Schwarz

Publiziert in: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, (2007), 194-203.

J Biol Inorg Chem (2007) 12:194–203  
DOI 10.1007/s00775-006-0180-z

ORIGINAL PAPER

## Quantification of single-stranded nucleic acid and oligonucleotide interactions with metal ions by affinity capillary electrophoresis: part I

Alexandra R. Stettler · Valérie Chaurin ·  
Edwin C. Constable · Catherine E. Housecroft ·  
Maria A. Schwarz

Received: 3 July 2006 / Accepted: 21 September 2006 / Published online: 31 October 2006  
© SBIC 2006

**Abstract** The interactions between oligonucleotides and inorganic cations have been measured by capillary zone electrophoresis. With increasing concentrations of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ) in the running buffer, the migration behavior was evaluated by calculation of the binding constants. Besides these fundamental studies of binding equilibria, different buffer components, tris(hydroxymethyl)aminomethane and 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, have been investigated and their effects on metal ion binding quantified.

**Keywords** Affinity capillary electrophoresis · Buffer · Oligonucleotide · Metal cation

### Introduction

With the completion of the Human Genome Project in 2003 [1], it is critical to understand in detail the mechanisms for the expression of the phenotype from the genotype. It is clear that the modulation and control of DNA expression is achieved through interactions both with large biomolecules and with small molecules or ions. Metal cations are ubiquitous and play an important regulatory role through specific and nonspecific interactions with negatively charged nucleic acids [2–4].

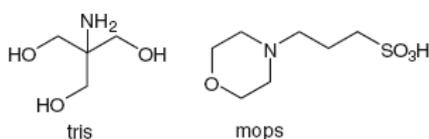
Solid-state structural characterization of DNA, RNA or oligonucleotide complexes provides unambiguous information about binding modes but caution is required in extending these results to equilibria in solution. There is a demand for rapid and precise analytical methods for the quantification of metal ion–nucleotide interactions under equilibrium conditions.

Methods for the quantification of nucleotide–metal ion interactions can be classified as mixture-based (spectroscopy, densimetry, potentiometry and calorimetry [5–7]) or separation-based (ultrafiltration–centrifugation, chromatography and electrophoresis). Affinity capillary electrophoresis (ACE) is a powerful tool for studying DNA–macromolecule interactions [8–10] and the simplicity, speed and sensitivity of measurement make it attractive for studying DNA–metal ion interactions. Although ACE investigations of metal ion–DNA interactions have been reported, only a few studies describe the quantification of complex equilibria. Apparent equilibrium constants have been determined for the interactions of  $\text{Ag}^+$  [11],  $\text{Mg}^{2+}$  [12],  $\text{Ca}^{2+}$  [12] and  $\text{Fe}^{2+}$  [13] salts with double-stranded DNA.

Two different modes of capillary electrophoresis, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and peak area evaluation, are commonly used. EMSA is best suited to studying low-affinity complexes formed under conditions of rapid equilibration and should be ideal for measuring interactions of labile metal ions with DNA, although all previous studies have utilized peak area analysis. The specific features that make EMSA appropriate to studying DNA–metal ion interactions are (1) the fast kinetics, (2) the moderate binding and (3) the fact that the ionic mobility of the complex is significantly different from that of the DNA itself.

A. R. Stettler · V. Chaurin · E. C. Constable ·  
C. E. Housecroft · M. A. Schwarz (✉)  
Department of Chemistry,  
University of Basel,  
Spitalstrasse 51,  
4056 Basel, Switzerland  
e-mail: maria.schwarz@uni-bas.ch

The different techniques used for studying DNA–metal ion interactions have varying environmental conditions. In particular, measurements have been made in a variety of buffers, most of which contain components (e.g., phosphate, amine) that can coordinate to metal ions and form ternary DNA–metal ion–buffer complexes. Most reported studies of DNA–metal ion interactions have been performed in tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) which is known to coordinate metal ions. As the ionic mobilities of DNA, DNA–metal ion complexes and DNA–metal ion–buffer ternary complexes will be different, EMSA is an ideal technique with which to probe these interactions in detail.



In this paper, we describe the use of ACE for investigating interactions between single-stranded DNA (ss-DNA) or oligonucleotides and metal ions. Apparent aggregation constants for the binding of metal ions by the oligonucleotide have been calculated and the role of the buffer components Tris and 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS; Structure 1) investigated. Varying the oligonucleotide sequence allows us to investigate the selectivity of binding.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

All chemicals used were of analytical grade: acrylamide, boric acid,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Acros, Geel, Belgium); dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , NaOH, *o*-toluic acid (OTA), 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, Tris and  $\text{ZnCl}_2$  (Fluka, Buchs, Switzerland);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haën, Buchs, Switzerland);  $\text{MgCl}_2$ , MOPS and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (Sigma, Buchs, Switzerland);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Dietikon, Switzerland). The ss-DNA, 5'-d(TTATTGACGCCGCTTTTTTTTTT) and the tetranucleotides 5'-d(AAAA), 5'-d(GGGG), 5'-d(TTTT), 5'-d(CCCC) and 5'-d(TCAG) were obtained purified (high-performance liquid chromatography, HPLC) from Microsynth (Balgach, Switzerland); the 24mer strand was purified again immediately before use by HPLC.

### Apparatus

For the measurements in Tris buffer, a Crystal ATI Unicam model 310 from PrinCE Technology (Emmen, Netherlands) with a Spectra 100 UV detector from Thermo Separation Products (Egelsbach, Germany) was used; data were collected and analyzed with a  $\mu$ DAQ AD modifier from Eagle Technology (Cape Town, South Africa). For measurements in MOPS buffer, a PRINCE 500 autosampler 2-LIFT from PrinCE Technology (Emmen, Netherlands) with a Spectra 100 UV detector from Thermo Separation Products (Egelsbach, Germany) was used; data were collected and analyzed with a PowerChrom 280 AD modifier from eDAQ (Denistone East, Australia).

Uncoated fused silica capillary tubing from BGB Analytik (Adliswil, Switzerland) with an internal diameter of 50  $\mu\text{m}$ , an effective length of 54 cm and a total length of 67 cm or an effective length of 33.5 cm and a total length 84 cm was used for all measurements. The procedure reported by Hjertén [14] was utilized for preparing a covalently bound layer of 3% polyacrylamide (PAA) on the surface of the silica capillary to prevent wall absorption.

### Method

Capillaries were conditioned daily by flushing with water for 10 min at 1,000 mbar and for 10 min with buffer at 1,000 mbar. Before changing to measurements with a different cation concentration in the buffer, the capillary was washed for 10 min at 1,000 mbar with the plain buffer. The loading method consisted of three programs: washing for 3 min at 1,000 mbar with buffer, injection for 0.1 min at 250 mbar with the sample and separation for up to 20 min at a potential of  $-30$  kV (anode detection site) with buffer.

Two different buffers, Tris and MOPS, were used. The Tris buffer was prepared by mixing a solution of Tris with boric acid (solid) to obtain a pH of 7.4 and dilution to a final Tris concentration of 50 mM. For the MOPS buffer, MOPS and 1 M NaOH were mixed to give a pH of 7.4 and diluted to a final MOPS concentration of 20 mM. The DNA (0.3 mM) and the internal standard (OTA, 10  $\mu\text{l}$  saturated solution diluted by 210  $\mu\text{l}$  sample solution) were dissolved in water. The metal salts were dissolved in the buffer solution to yield stock solutions that were 10.0 mM in metal ion. These were diluted stepwise by the buffer solutions to 0.5 mM. On-capillary detection at 240 nm (MOPS) or 260 nm (Tris) at the anode site was used and each measurement was repeated three times for each sample.

**Results and discussion**

Theory of ACE

ACE can be used to characterize noncovalent intermolecular interactions such as complexation or partition equilibria. We derive here the general relationships between the mobility and equilibria for a system involving a solute L and a metal ion M that can form a 1:1 complex ML (Eq. 1):



Binding constants ( $K_B$ ) can be calculated from an evaluation of the variation of the net mobility of L with metal ion concentration in the running buffer [15].

*Derivation of the relationship between  $K_B$  and  $\mu$*

The net mobility  $\mu$  is related to the mole fraction ( $x_L$ ) and mobility ( $\mu_L$ ) of the ligand L and the mole fraction ( $x_{ML}$ ) and mobility ( $\mu_{ML}$ ) of the complex ML (Eq. 2), where the mole fractions have the conventional definitions in terms of the equilibrium concentration of the ligand and the equilibrium concentration of the complex (Eqs. 3, 4).

$$\mu = x_L \mu_L + x_{ML} \mu_{ML} \tag{2}$$

$$x_L = \frac{[L]}{[L] + [ML]} \tag{3}$$

$$x_{ML} = \frac{[ML]}{[L] + [ML]} \tag{4}$$

Combining Eqs. 2, 3 and 4 yields Eq. 5 in which the net mobility is related to the equilibrium concentrations of the species L, M and ML:

$$\begin{aligned} \mu &= \frac{[L]}{[L] + [ML]} \mu_L + \left(1 - \frac{[L]}{[L] + [ML]}\right) \mu_{ML} \\ &= \frac{1}{1 + [ML]/[L]} \mu_L + \frac{[ML]}{[L] + [ML]} \mu_{ML} \end{aligned} \tag{5}$$

For the 1:1 ML complex with stability constant  $K_B$  (Eq. 6), it follows that the net mobility is a function of the equilibrium concentration of the analyte M (Eq. 7):

$$K_B = \frac{[ML]}{[L][M]} \tag{6}$$

$$\mu = f([M]) = \frac{\mu_L + K_B[M] \mu_{ML}}{1 + K_B[M]} \tag{7}$$

In the case of more than one metal ion binding to the solute to give complexes  $M_nL$ , the experimental  $K_B$  will describe the macroscopic equilibrium and express the sum of every possible interaction between M and L. In the specific case of cooperative binding [15], the net mobility is given by Eq. 8, and the mobility of the complex,  $\mu_{M_nL}$  and the apparent stability constant,  $K_B$ , can be obtained from nonlinear curve fitting:

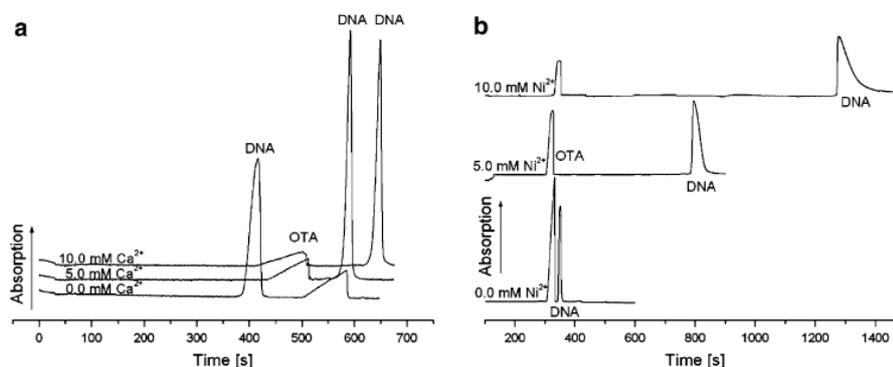
$$\mu = \frac{\mu_L + K_B[M]^n \mu_{M_nL}}{1 + K_B[M]^n} \tag{8}$$

To obtain the net mobility,  $\mu$ , from capillary electropherograms, the time taken for the analyte and a reference molecule to reach a certain point on the capillary is determined (Eq. 9). Knowing the separation potential ( $U_{sep}$  in volts), the effective and total length of the capillary ( $l_{eff}$  and  $l_{tot}$  in centimeters) and the experimental migration times of the analyte and the electroosmotic flow (EOF in square centimeters per volt per second  $t_{sample}$  and  $t_{EOF}$  in seconds), we can calculate  $\mu$  using Eq. 9:

$$\mu = \frac{l_{eff} \cdot l_{tot}}{U_{sep}} \left( \frac{1}{t_{sample}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \tag{9}$$

Migration pattern

In this section, we comment on the empirical observations of the electropherograms of DNA and oligonucleotides in the presence of metal ions and buffers. All measurements were made at a constant total buffer concentration, although the ionic strength changes as the concentration of metal salt is varied. To calculate the true mobility of the DNA (or oligonucleotide), a noninteracting internal standard has to be added (an inert and preferably neutral molecule, e.g., DMSO). The use of a PAA-coated capillary not only prevents wall absorption, but also suppresses the EOF. In Fig. 1 the influence of added metal ions on the mobility of the reference molecule OTA and indirectly on the magnitude of the EOF is shown. With increasing concentrations of metal ions in the running buffer, the standard apparently migrates faster towards the anode (Fig. 1a). In an independent experiment with OTA and DMSO (an EOF marker) as analytes in the presence of various concentration of metal ions, it was shown that the ionic mobility is not influenced by the metal ion concentration, despite a decrease in the EOF. The decrease in ionic mobility of the DNA or oligonucleotide induced by increased complexation to the metal ion is significantly greater. The reduction in the



**Fig. 1** Capillary electropherograms in **a** 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (*Tris*), pH 7.4, 24-base single-stranded DNA (*ss-DNA*) with  $\text{Ca}^{2+}$  in the running buffer and **b** 20 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (*MOPS*), pH 7.4,

5'-d(TCAG) with  $\text{Ni}^{2+}$  in the running buffer. Separation voltage of  $-30$  kV; *o*-toluic acid (*OTA*) was used as an internal standard; capillary, fused silica coated with 3% polyacrylamide (*PAA*)

electrophoretic mobility of the DNA is a measurable quantity that reflects the change of the net DNA charge due to coordination of metal ions. As the metal ion concentration increases, the equilibrium tends towards saturation and the metal complex is the dominant DNA-containing species and the measured ionic mobility is equal to that of the fully complexed *ss-DNA* strand. Despite the short length of the oligonucleotide (four-base *ss-DNA*) in Fig. 1b, the change in DNA charge compared with that of the reference molecule is significant.

#### Buffer influence

Studies of DNA and oligonucleotides are invariably made in buffer solution; however, the buffer components are not benign and can form adducts with DNA [16], metal ions [17–19] or metal–DNA complexes [16, 20]. We initially considered *Tris* as a buffer as it is commonly used as a medium for studies of metal ion–DNA interactions with DNA [11, 12, 21] and is particularly suitable for capillary electrophoresis experiments owing to its low conductivity [22]. However, transition metal ions form complexes of reasonable stability with *Tris* [20, 23–29] and ternary  $\text{M}(\text{DNA})(\text{Tris})$  complexes with oligonucleotides or DNA [16, 20]. Measured macroscopic  $K_B$  values in the presence of a large excess of buffer will relate to mixtures of species. We therefore selected *MOPS* as our standard buffer for two reasons; firstly, it is known that complexes of *MOPS* with group 1 and group 2 metal ions are only of marginal stability in aqueous solution, although transition metal complexes are of similar or greater stability than those with *Tris* [20, 30] and, secondly, although the zwitterionic or

anionic character of *MOPS* stabilizes the binary complexes with transition metal ions, it also destabilizes ternary complexes with negatively charged oligonucleotides or DNA (Table 1). This prediction has been quantified for ternary complexes of *MOPS* or *Tris* with AMP, ADP or ATP, where (1) compared where metal ion–nucleotide complexes, the ternary complexes with *Tris* are an order of magnitude more stable than those with *MOPS* and (2) the larger the negative charge on the nucleotide, the less stable is the ternary complex with *MOPS* [20, 30].

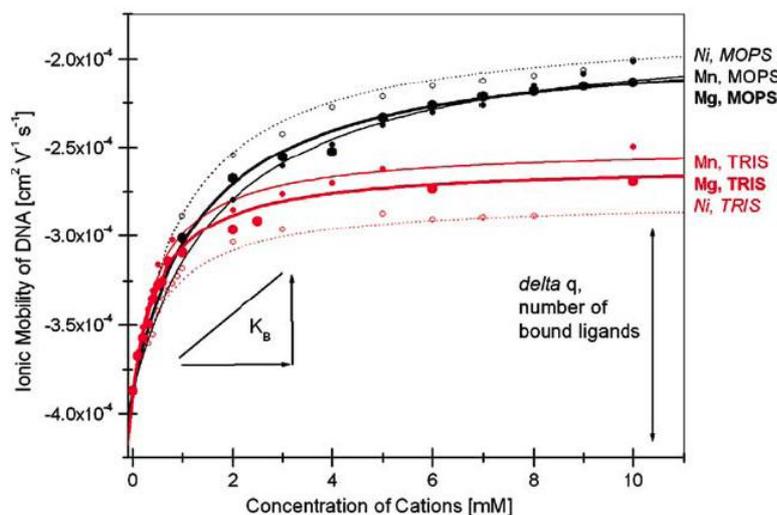
Figure 2 shows that the choice of buffer has a significant effect upon the ionic mobility of the DNA–metal ion solutions and that with a given buffer the behavior is further modulated by the specific metal ion present. The ionic mobility in the absence of metal salt is the same in both buffers, indicating that the same solution species are present—in other words, DNA–buffer complexes are not important in our experimental conditions. In the next section we present the analysis of the electrophoretic behavior in such systems.

**Table 1** Binding constants of the 24mer nucleotide measured in 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (*MOPS*) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (*Tris*) buffers

Metal cation	<i>MOPS</i> $K_B \times 10^5$ ( $\text{M}^{-2}$ )	<i>Tris</i> $K_B \times 10^3$ ( $\text{M}^{-1}$ )
$\text{Ca}^{2+}$	$8.49 \pm 2.24$	$1.36 \pm 0.10$
$\text{Mg}^{2+}$	$7.75 \pm 1.75$	$1.75 \pm 0.10$
$\text{Mn}^{2+}$	$5.70 \pm 1.63$	$1.81 \pm 0.14$
$\text{Ni}^{2+}$	$9.85 \pm 1.75$	$1.41 \pm 0.92$

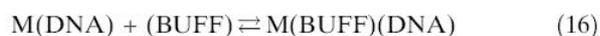
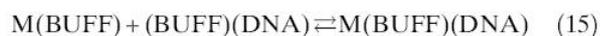
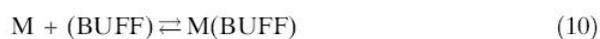
Experimental conditions as in Fig. 2. Note that the apparently large differences in stability are, in part, a function of the different dimensionality of the  $K_B$  values

**Fig. 2** Running buffer: *red* 50 mM Tris buffer (pH 7.4), *black* 20 mM MOPS buffer (pH 7.4); sample 24mer ss-DNA, 5'-d(TTATTGACGC CGCTTTT TTTT TTTT); separation voltage -30 kV; capillary, fused silica coated with 3% PAA, 67 cm/54 cm/50 μm (*red*; total length/effective length/diameter), 84 cm/33.5 cm/50 μm (*black*)



Detailed analysis and quantification of electrophoretic behavior

For a detailed interpretation of the differences between the two buffers, we need, in principle, to discuss the various possible equilibria in a solution containing DNA, metal and buffer (Eqs. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16):



Our experiments allow the determination of the overall stability constant  $K'_B$  for the formation of the ternary (or binary) complex (Eq. 17) and require no detailed knowledge of the speciation of the starting metal ion–buffer solution or the nature of DNA–buffer complexes. The overall stability constant  $K'_B$  is simply the product of the usually quoted stability constants for Eqs. 11 and 16 [20, 30]:



$$K'_B = \frac{[M(\text{DNA})(\text{BUFF})]}{[M][\text{DNA}][\text{BUFF}]}$$

The mobility is given by Eq. 18 (cf. Eq. 2), with the assumption that DNA–buffer complexes make a minimal contribution [16]:

$$\mu = x_{\text{DNA}}\mu_{\text{DNA}} + x_{M(\text{DNA})(\text{BUFF})}\mu_{M(\text{DNA})(\text{BUFF})} \quad (18)$$

The overall binding constant  $K'_B$  (Eq. 16) is related to the mobility by Eq. 19, which is simply an extension of Eq. 7 to the ternary system. The buffer is in large excess and the concentration remains essentially constant at all concentration of the metal. For multiple metal binding sites it necessary to substitute  $[M]^n$  and  $[\text{BUFF}]^n$  in Eq. 19:

$$\mu = f([M]) = \frac{\mu_{\text{DNA}} + K'_B[M][\text{BUFF}]\mu_{(M)(\text{BUFF})}}{1 + K'_B[M][\text{BUFF}]} \quad (19)$$

We now consider the case of the binding of nickel(II) in detail and demonstrate the true stoichiometry of the reaction. At higher metal ion concentrations, the mobility in Tris has reached a plateau value and in MOPS is close to this. The plateau mobility represents the mobility of the metal ion saturated DNA. Excess nickel(II) will be predominantly present as nickel–buffer complexes (10 mM Ni(II), 50 mM Tris, 17% Ni(aq)<sup>2+</sup>, 46% Ni(Tris)<sup>2+</sup>, 37% Ni(Tris)<sub>2</sub><sup>2+</sup> [20, 23, 24, 26, 28, 29]; 10 mM Ni(II), 20 mM MOPS, 7% Ni(aq)<sup>2+</sup>,

93% Ni(MOPS)<sup>2+</sup> [30, 31]) and the nickel(II) complexes could be binary or ternary, with the former favored by MOPS and the latter by Tris.

In the case of the Tris buffer, the change in mobility from zero metal ion concentration to the plateau value  $\Delta\mu$  is  $1.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The less negative value of  $\mu$  confirms that the nickel–DNA complex has a less negative charge than the DNA. The absolute value of the mobility is given by Eq. 20 (where  $q$  is the charge,  $r$  is the hydrodynamic radius and  $\eta$  is the viscosity of the medium):

$$\mu = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad (20)$$

The change in mobility is given in Eq. 21, where  $\Delta q$  is the change in charge of the DNA between the metal-free and metal-saturated forms, making the assumptions that the viscosity of the solution remains the same [32] and that the hydrodynamic radii of the DNA and the DNA–nickel complexes are the same [33]:

$$\Delta\mu = \frac{\Delta q}{6\pi r\eta} \quad (21)$$

Solving Eq. 21 using the experimental value for  $\Delta\mu$  in Tris of  $1.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $0.9 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for  $\eta$  [34], we obtain Eq. 22:

$$\Delta q = 1.7 \times 10^{-10} rC \quad (22)$$

As Tris is a neutral ligand, regardless of the formation of ternary or binary complexes the change in charge per nickel ion bound is +2 (at pH 7.4, hydroxy complexes can be discounted) and  $\Delta q$  is simply  $2n$ , where  $n$  is the number of nickel ions bound. Using a value of 1.1 nm for the hydrodynamic radius of a single strand [33], we obtain  $\Delta q = 1.9 \times 10^{-19} \text{ C}$ , and dividing by the elementary charge of  $1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$ , we obtain a difference between the DNA and nickel–DNA complex of 1.2 charge units. In view of the gross assumptions made in this calculation, together with the expectation that the ss-DNA conformation is likely to be complex, possibly with a minihairpin at the 5'-d(CGCCG) motif, this is a minimum value and we can state that the nickel–DNA complex in Tris buffer has a 1:1 metal–DNA stoichiometry, although we cannot state whether it is a binary or a ternary complex.

A comparison of the mobility shifts for the nickel–DNA system in Tris and MOPS buffers is most informative. In MOPS buffer the plateau value for  $\Delta\mu$  is about twice that for Tris buffer, which means that the change in charge is also twice that in Tris. On the basis

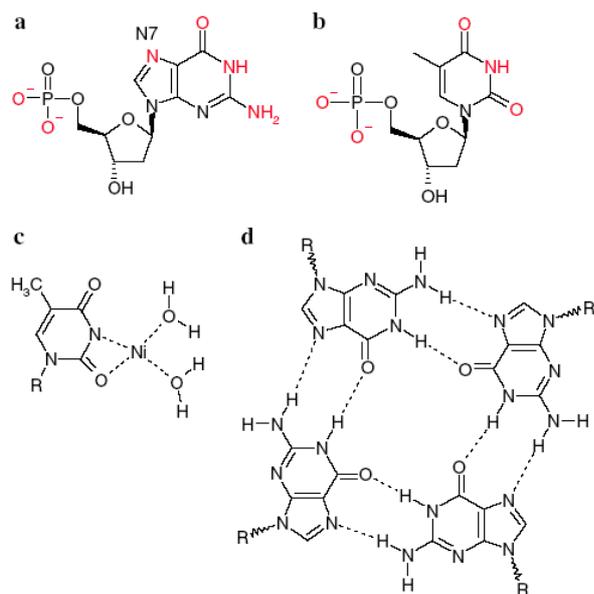
of a 1:1 complex in Tris, we conclude that in MOPS either four {Ni(MOPS)}<sup>+</sup> or two Ni<sup>2+</sup> units are coordinated to the DNA. The former is unreasonable, in terms of both speciation and the known destabilisation of MOPS ternary complexes and we conclude that the saturated species in MOPS buffer is a Ni<sub>2</sub>(DNA) species although small amounts of the ternary species could be present. The difference in behavior is probably partly steric in origin—Tris acts as a terdentate N,O,O donor [35, 36] and the molecular volume of a {Ni(Tris)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>} moiety is  $158 \text{ \AA}^3$  compared with  $100 \text{ \AA}^3$  for {Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>}.

#### Tetranucleotides—specific interactions

In the previous section we discussed the behavior of a 24mer ss-DNA with metal ions and analyzed the interactions with nickel(II) in detail. It is not appropriate to discuss the site of metal ion binding in detail. In an attempt to investigate metal–DNA interactions in a more systematic way, we studied the behavior of the tetranucleotides 5'-d(AAAA), 5'-d(GGGG), 5'-d(CCCC), 5'-d(TTTT) and 5'-d(TCAG). Rather surprisingly, very little is known about the solution or the solid-state conformation of tetranucleotides in the absence of a complementary strand. In particular, the tetranucleotides we selected are expected to be single-stranded and flexible in solution and certainly will not adopt a DNA duplex structure [37, 38].

Metal ions can stabilize or destabilize the duplex forms of A-DNA or B-DNA [13]. There are a number of different potential binding sites for metal ions at the DNA: the most likely are the phosphate groups and N7 of the purine bases adenine and guanine (Scheme 1a, b) [7, 39]. The higher electronegativity of N7 of guanine is responsible for stronger interaction with cations than other nitrogen donors within the heterocycles [40, 41]. Hard cations prefer to bind to the phosphate group of the backbone, whereas softer cations, such as transition metal dications, preferentially interact with the nitrogen donor of the purine bases. Binding of the metal ions may be direct or indirect through water molecules, and coordinated water ligands can provide additional bridging interactions to other bases [7, 39, 42, 43]. It has been shown that nickel(II) has a particular preference for binding to the N7 terminal or outlooped guanine sites of B-form DNA [39, 44–53]. Although at pH > 8, transition metals can generate M–DNA in which cations replace the imino protons (Scheme 1c), this is not likely to be relevant under our experimental conditions [54].

Uniquely, in the case of 5'-d(GGGG), there is also the possibility of forming a guanine quadruplex



**Scheme 1** **a** Guanosine monophosphate, **b** thymidine monophosphate, **c** M-DNA (thymine) with an imino group and **d** guanine quadruplex. In **a** and **b** the potential donor atoms are indicated in red

through Hoogsteen hydrogen bonding which can be further stabilized by binding a metal ion such as  $K^+$  [55]. The most stable structures are obtained with potassium or strontium ions and the stabilizing influence is in the sequence  $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > Cs^+ \gg Li^+$  and  $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$  [56]. It has been reported that  $Li^+$  [57] and transition metal dications [58] destabilize the quadruplex structure. We now describe the electrophoretic behavior of the tetranucleotides in the presence of various metal ions.

Figure 3 gives an overview of the migration patterns of the various tetranucleotides in the presence of metal cations. The starting point for the discussion is the mobility in the absence of added metal ions (although, of course, sodium is present in the buffer). The four tetranucleotides 5'-d(AAAA), 5'-d(CCCC), 5'-d(TTTT) and 5'-d(TCAG) all have a mobility of  $-3.0 \pm 0.05 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , whereas 5'-d(GGGG) has a mobility of  $-4.0 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The electrophoresis provides clear evidence for the presence of different species in the solution of 5'-d(GGGG) from the species in solutions of the other tetranucleotides ( $N_4$ ). However, it is possible to comment further on the nature of the solution species. The increased mobility of the 5'-d(GGGG) species results from an increase in the charge-to-hydrodynamic radius ratio compared with that of a single-stranded tetranucleotide. From Eq. 20 it follows that the ratio of the mobility of

5'-d(GGGG) ( $G_4$ ) to  $N_4$  is given by Eq. 23 (assuming the viscosity of the solutions is constant):

$$\frac{\mu(G_4)}{\mu(N_4)} = \frac{q(G_4)r(N_4)}{q(N_4)r(G_4)} \quad (23)$$

For a  $G_n$  multiplex, assuming a common hydrodynamic radius of single-stranded  $G_4$  and  $N_4$ , we obtain Eq. 24:

$$\frac{\mu(G_4)}{\mu(N_4)} = \frac{4}{3} = n \frac{r(N_4)}{r(G_4)} \quad (24)$$

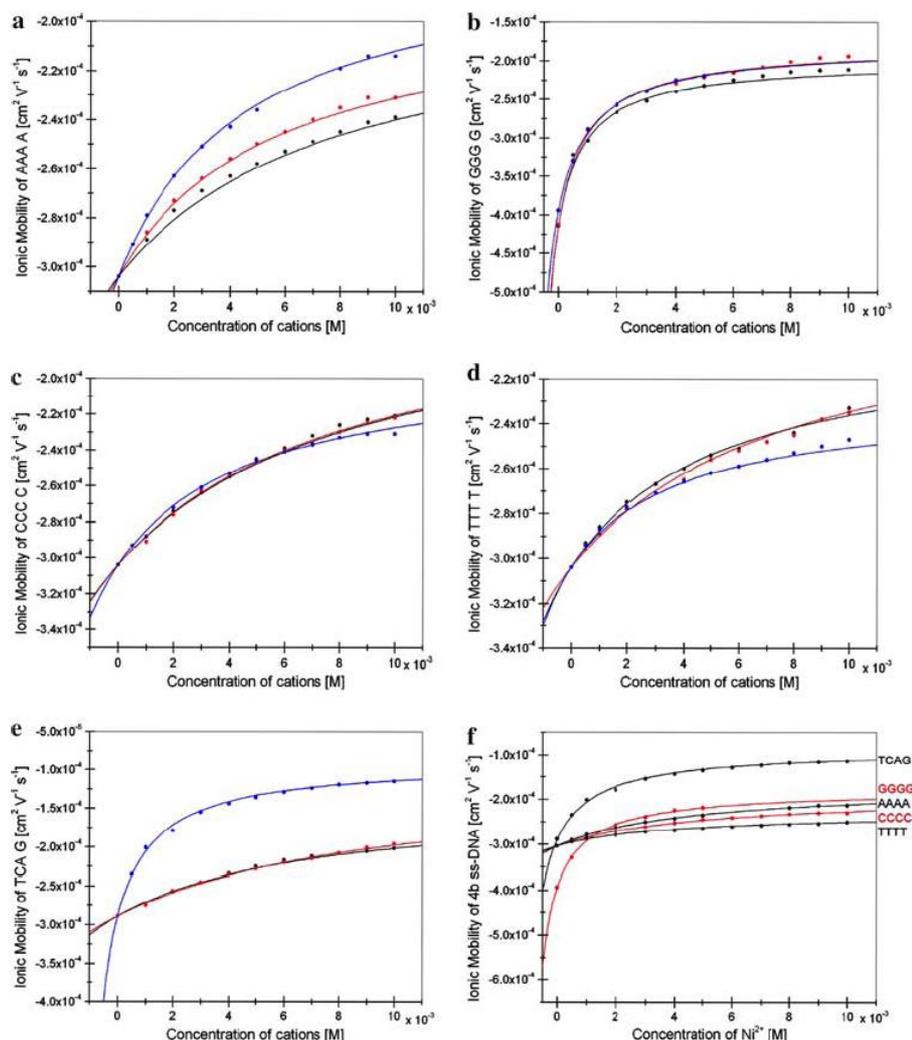
The best solution is for a quadruplex with  $n = 4$ , where the calculated ratio  $r(N_4)/r(G_4)$  of 1/3 is close to that calculated from a simple model based on cylinders of fixed radius (1/2.414) and that observed in solid-state structural determinations of sequences with guanine quadruplexes.

The pyrimidine tetranucleotides 5'-d(CCCC) and 5'-d(TTTT) show essentially similar behavior with extrapolated plateau values in the presence of  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  being reached at lower metal ion concentrations than with  $Ni^{2+}$ . Extrapolation to the final plateau mobilities is not reliable for  $Ni^{2+}$ , but the data (in particular the estimated  $\Delta q$ ) are compatible with the binding of a single metal ion per nucleotide. We suggest that the binding site is the phosphate, compatible with the higher stability of the complexes with the harder  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions.

The trend for the pyrimidine tetranucleotides is reversed for 5'-d(AAAA), with the mobility reaching a plateau at lower metal ion concentrations in the presence of  $Ni^{2+}$ , indicating a greater stability for the nickel complex compared with the calcium and magnesium complexes. The curves for  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  are very similar to those for the pyrimidine tetranucleotides. These observations are compatible with binding of calcium or magnesium at the phosphate and nickel at the purine although the  $K_B$  values are the same within experimental error (Table 2).

Very different behavior is observed for the tetranucleotide 5'-d(TCAG), where the change in mobility in the presence of  $Ni^{2+}$  is double that for  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and the extracted stability constant for the nickel complex is significantly larger than that for calcium or magnesium. As the mobility of 5'-d(TCAG) in the absence of added metal ion is the same as that of 5'-d(CCCC), 5'-d(AAAA) or 5'-d(TTTT), the different behavior in the presence of nickel is not due to different starting structures of the tetranucleotides. This behavior is almost certainly associated with the binding

**Fig. 3** Mobility shifts of tetranucleotides (0.3 mM) in the presence of various concentrations of metal salts (20 mM MOPS running buffer). **a** 5'-d(AAAA), **b** 5'-d(GGGG), **c** 5'-d(CCCC), **d** 5'-d(TTTT) and **e** 5'-d(TCAG) all in the presence of various concentrations of Mg<sup>2+</sup> (red), Ca<sup>2+</sup> (black) and Ni<sup>2+</sup> (blue). **f** A comparison of the five tetranucleotides in the presence of Ni<sup>2+</sup>



of nickel to the N7 of the terminal guanine. We tentatively suggest that a second nickel is interacting with phosphate.

In the case of 5'-d(GGGG) the behavior is very different. We have already commented upon the difference in mobility in the absence of metal salt being

compatible with the presence of the guanine quadruplex in solution. The three metal ions Ni<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> all give very similar changes in mobility and the change in charge to radius ratio is significantly larger than is observed with the other nucleotides. The change in mobility is  $2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at the plateau value

**Table 2** The interactions between the single-stranded DNA and Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> with 20 mM MOPS at pH 7.4

	$K_B$		
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
5'-d(AAAA)	128 ± 14 M <sup>-1</sup>	177 ± 8 M <sup>-1</sup>	220 ± 10 M <sup>-1</sup>
5'-d(CCCC)	115 ± 7 M <sup>-1</sup>	118 ± 9 M <sup>-1</sup>	204 ± 16 M <sup>-1</sup>
5'-d(GGGG)	<i>19.7 ± 5.54 × 10<sup>5</sup> M<sup>-2</sup></i>	<i>17.4 ± 4.19 × 10<sup>5</sup> M<sup>-2</sup></i>	<i>18.7 ± 3.80 × 10<sup>5</sup> M<sup>-2</sup></i>
5'-d(TTTT)	221 ± 26 M <sup>-1</sup>	187 ± 32 M <sup>-1</sup>	261 ± 20 M <sup>-1</sup>
5'-d(TCAG)	140 ± 13 M <sup>-1</sup>	104 ± 8 M <sup>-1</sup>	<i>10.1 ± 2.52 × 10<sup>5</sup> M<sup>-2</sup></i>

Experimental conditions as in Fig. 1. Value in *italics* were calculated on the basis of a 1:2 stoichiometry (ligand to metal)

and using a value for the hydrodynamic radius of the quadruplex of  $3 \times 1.1$  nm (see earlier), the calculated  $\Delta q$  value is 4, strongly indicating that the quadruplex binds a metal ion at each of the two termini.

Finally, it is useful to compare the behavior of the five tetranucleotides with the single metal ion,  $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 3f). This clearly shows that (1) the overall changes in mobility for the three tetranucleotides 5'-d(CCCC), 5'-d(TTTT) and 5'-d(AAAA) are very similar, (2) that the changes in mobility for 5'-d(TCAG) and 5'-d(GGGG) are very similar and (3) the overall change for 5'-d(TCAG) and 5'-d(GGGG) is twice that of 5'-d(CCCC), 5'-d(TTTT) or 5'-d(AAAA). These observations are in accord with the proposals above.

## Conclusion

We have shown that ACE may be used to investigate the interactions of oligonucleotides with metal ions. Initial studies have indicated that the choice of buffer solution is critical and that the commonly used Tris and MOPS buffers bind transition metal ions by introducing additional equilibria into the solution phase. The observed binding affinities of oligonucleotides for group 2 and transition metal ions may be rationalized in terms of a two-site binding model involving phosphate and nitrogen donors in the nucleotide and quantified using limiting mobility values. Anomalous results with 5'-d(GGGG) are interpreted in terms of a quadruplex. In short, ACE methods provide a great deal of information in rapid experimental procedures and we are currently investigating environmental variables in detail to determine whether the method may be used for the extraction of "conventional" binding constants for metal ion–DNA interactions. Principally chip measurements with short separation lengths of 2.5 cm are feasible; however, more suitable buffer components (UV permeability) for a higher sensitivity have to be found to measure a complete titration row and thus more precise  $K_B$  values.

**Acknowledgements** We would like to thank Shimadzu Corporation and the University of Basel for their kind support. We also thank Yorck-Michael Neuhold for constructive discussions. Partial funding for this project was provided by Swiss National Science Foundation, grant numbers 200021-103812/1 and 20C321-101122.

## References

- Human Genome Program (2003) Genomics and its impact on science and society: a 2003 Primer. US Department of Energy
- Sigel H (ed) (1979) Metal ions in biological systems, vol 8. Nucleotides and derivatives: their ligating ambivalency
- Sigel A, Sigel H (eds) (1996) Metal ions in biological systems, vol 32. Interactions of metal ions with nucleotides, nucleic acids, and their constituents
- Sigel A, Sigel H (eds) (1996) Metal ions in biological systems, vol 33. Probing of nucleic acids by metal ion complexes of small molecules
- de la Fuente M, Hernanz A, Navarro R (2004) *J Biol Inorg Chem* 9:973–986
- Kankia BI (2004) *Biopolymers* 74:232–239
- Sigel H, Griesser R (2005) *Chem Soc Rev* 34:875–900
- He XY, Ding YS, Li DZ, Lin BC (2004) *Electrophoresis* 25:697–711
- Heegaard NHH (2003) *Electrophoresis* 24:3879–3891
- Guijt-van Duijn RM, Frank J, van Dedem GWK, Baltussen E, Schalkhamer T (2001) *Electrophoresis* 22:1247–1247
- Arakawa H, Neault JF, Tajmir-Riahi HA (2001) *Biophys J* 81:1580–1587
- Ahmad R, Arakawa H, Tajmir-Riahi HA (2003) *Biophys J* 84:2460–2466
- Ouameur AA, Arakawa H, Ahmad R, Naoui M, Tajmir-Riahi HA (2005) *DNA Cell Biol* 24:394–401
- Hjertén S (1985) *J Chromatogr A* 347:191–198
- Rüttinger H-H (2003) In: Neubert RHH, Rüttinger H-H (eds) *Affinity capillary electrophoresis in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. Dekker, New York, pp 23–43
- Stellwagen NC, Bossi A, Gelfi C, Righetti PG (2000) *Anal Biochem* 287:167–175
- Sokolowska M, Bal W (2005) *J Inorg Biochem* 99:1653–1660
- Taha M, Khalil MM, Mohamed SA (2005) *J Chem Eng Data* 50:882–887
- Good NE, Winget GD, inter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966) *Biochemistry* 5:467–477
- Fischer BE, Haring UK, Tribolet R, Sigel H (1979) *Eur J Biochem* 94:523–530
- Ouameur AA, Tajmir-Riahi H-A (2004) *J Biol Chem* 279:42041–42054
- Shihabia SK (2000) *Electrophoresis* 21:2872–2878
- Hall JL, Liden TM, Swisher JA, Brannon DG (1962) *Inorg Chem* 1:409–413
- Bai KS, Martell AE (1969) *J Inorg Nucl Chem* 31:1697–1707
- Brignac PJ, Mo C (1975) *Anal Chem* 47:1465–1466
- Bologni L, Sabatini A, Vacca A (1983) *Inorg Chim Acta* 69:71–75
- Canepari S, Carunchio V, Schina R (1999) *Polyhedron* 18:3263–3267
- Rao GN, Murthy CSR, Prakash A (1982) *Indian J Chem A* 21:203–205
- Forsling W (1978) *Acta Chem Scand A* 32:857–865
- Azab HA, Orabi AS, El-Salam ETA (2001) *J Chem Eng Data* 46:346–254
- Anwar Z, Azab H (1999) *J Chem Eng Data* 44:1151–1157
- Okafo GN, Brown R, Camilleri (1991) *J Chem Soc Chem Commun* 864–866
- Fujimoto BS, Miller JM, Ribeiro NS, Schurr JM (1994) *Biophys J* 67:304–308
- Kell GS (1972) In: Franks F (ed) *Water—a comprehensive treatise*. Plenum, New York, p 406
- Ivarsson GJM (1982) *Acta Crystallogr Sect B* 38:1828–1831
- Zeng M-H, Liang H, Zeng R-Y, Yi X-H, Yu K-B (2002) *Acta Chim Sin* 60:784–788
- Packer MJ, Dauncey MP, Hunter CA (2000) *J Mol Biol* 295:85–103
- Dixit SB, Beveridge DL, Case DA, Cheatham TE, Giudice E, Lankas F, Lavery R, Maddocks JH, Osman R, Sklenar H, Thayer KM, Varnai P (2005) *Biophys J* 89:3721–3740

39. Egli M (2004) *Curr Opin Chem Biol* 8:580–591
40. Abrescia NGA, Huynh-Dinh T, Subirana JA (2002) *J Biol Inorg Chem* 7:195–199
41. Sponer J, Sabat M, Gorb L, Leszczynski J, Lippert B, Hobza P (2000) *J Phys Chem B* 104:7535–7544
42. Soler-López M, Malinina L, Subirana JA (2000) *J Biol Chem* 275:23034–23043
43. Chiu TK, Dickerson RE (2000) *J Mol Biol* 301:915–945
44. Valls N, Usón I, Gouyette C, Subirana JA (2004) *J Am Chem Soc* 126:7812–7816
45. Gao YG, Sriram K, Wang AH (1993) *Nucl Acid Res* 21:4093–4101
46. Abrescia NGA, Malinina L, Subirana JA (1999) *J Mol Biol* 294:657–666
47. Subirana JA, Abrescia NGA (2000) *Biophys Chem* 86:179–189
48. Abrescia NGA, Malinina L, Fernández LG, Huynh-Dinh T, Neidle S, Subirana JA (1999) *Nucleic Acid Res* 27:1593–1599
49. Yang XI, Robinson H, Gao YG, Wang AH-J (2000) *Biochemistry* 39:10950–10957
50. De Meester P, Goodgame DML, Skapski AC, Smith BT (1974) *Biochim Biophys Acta* 340:113–115
51. Collins AD, De Meester P, Goodgame DML, Skapski AC (1975) *Biochim Biophys Acta* 116:2958–2971
52. Sigel H, Massoud SS, Corfu NA (1994) *J Am Chem Soc* 116:2958–2971
53. Labiuk SL, Delbaere LTJ, Lee JS (2003) *J Biol Inorg Chem* 8:715–720
54. Hartzell B, McCord B (2005) *Electrophoresis* 26:1046–1056
55. Simonsson T (2001) *Biol Chem* 382:621–628
56. Guschlbauer W, Chantot JF, Thiele D (1990) *J Biomol Struct Dyn* 8:491–511
57. Sen D, Gilbert W (1992) *Methods Enzymol* 211:191–199
58. Blume SW, Guarcello V, Zacharias W, Miller DM (1997) *Nucleic Acid Res* 25:617–625



**REVIEW I**

MICROCHIP AFFINITY CAPILLARY ELECTROPHORESIS: APPLICATIONS AND  
RECENT ADVANCES

Markéta Vlčková, Alexandra R. Stettler, and Maria A. Schwarz

Publiziert in: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, (2006), 1047-1076.

---

# Microchip Affinity Capillary Electrophoresis: Applications and Recent Advances

Markéta Vlčková, Alexandra R. Stettler,  
and Maria A. Schwarz

Universität Basel, Departement Chemie, Basel, Switzerland

**Abstract:** This review gives the basic principle of affinity capillary electrophoresis (ACE) and examines its utilization in bioscience on microchips. ACE on chip is used as a separation tool as well as for study of molecular interactions. MEKC and chiral separations on microfluidic systems are described. Applications for measuring bioaffinity are focused on enzyme assay and immunoassay that demonstrate a further development of classical ACE in capillaries.

**Keywords:** Affinity capillary electrophoresis, Chip, Interactions, Electrochromatography, Micellar electrokinetic chromatography, Chiral separation, Enzyme assays, Immunoassay, Biomolecules

## INTRODUCTION

Up to now, a variety of capillary electrophoresis based methods for studying interactions have been established. Preferentially, diverse biomolecular interactions are investigated in order to better understand the functioning of living systems. These investigations are crucial for genomic and proteomic research, but also beneficial for other fields of biosciences. Electrophoresis based methods for studying interactions use various experimental approaches and are sometimes summarily termed affinity capillary electrophoresis (ACE). However, no unifying definition of ACE exists in the literature and some

Address correspondence to Maria A. Schwarz, Universität Basel, Departement Chemie, Spitalstrasse 51, CH-4056 Basel, Switzerland. E-mail: maria.schwarz@unibas.ch

authors refer ACE to one concrete method for studying interactions. Throughout this review, however, the term ACE is used in its general meaning, which means for all of capillary electrophoresis based methods studying interactions.

An immense number of investigations using ACE methods in capillaries have been published. Since 1995, more than 300 applications for the study of nonspecific and specific interacting equilibrium, including several reviews, have appeared in the literature. On the contrary, only a few articles performing ACE analysis in microfluidic devices, so called microchips or chips, have been published so far.

In ACE, the substances migrating in an electrical field undergo an interaction, which changes their electrophoretical behavior. This effect can be used for the identification and also partly for the quantification of specific binding, or simply for enhancing the separation selectivity. The identification and quantification of an interaction is based on the evaluation of the altered behavior of the substance. Partly, an estimation of the association constant of the interaction is feasible. Affinity interactions, with the objective to enhance separation selectivity, serve mainly for the separation of mixtures of substances with very similar or identical electrophoretical behavior. Typical applications are micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and chiral separations.

Since the first description of an electrophoretical separation on a chip (1992), ACE on the chips has mainly been used as a separation tool. Both micellar and chiral separations on microfluidic systems are investigated. On the other hand, only very few applications aimed at the characterization of partition and/or complexation equilibria have been performed on microchips until the present time. One reason for such shortness of publications is the difficulty in electrokinetical control of the sample plug by the simple cross, tee, or double-tee injector, respectively. Another reason is the limitation of detection systems available for planar systems. Most applications deal with fluorescence detection, which has inherently good sensitivity and is, therefore, well suited for the small channel cross-sections. However, most analyte species are not native fluorophores. Such analytes have to be derivatized with a suitable reagent or detected indirectly *via* displacement of a fluorescent ion. Both the derivatization and the addition of a fluorophore to the background buffer may distort the equilibrium in question, as the molecular parameters can be changed. Therefore, fluorescence-labeling-based detection is not well suited for affinity measurements unless the binding is very specific. If the binding occurs between specific regions of the molecules, other parts of these molecules can be labeled without detrimental effects on the interactions. The binding of an enzyme to its substrate, or of an antibody to its antigen, is the typical example of such specific interactions.

For general affinity measurements on microchips, electrochemical detection methods are advantageous due to their easy miniaturization and ability to perform direct detection. UV/VIS absorption is not commonly

used for on-chip detection because the short optical path lengths allow only limited sensitivity. Nevertheless, for analytes available in higher concentrations (0.5-1 mM), UV/VIS detection is still very useful because of its versatility and simplicity.

Both participants of the equilibrium can be injected as sample or rather added to the background buffer. In many cases, the detectability of the compound is decisive for the judgment. Here, we term  $S$  for solute (usually in the sample) and  $L$  for ligand (usually in the buffer), whereas  $S$  and  $L$  could be all types of molecules as proteins, enzymes, inorganic ions etc.

The review presented here gives an overview of all possible applications of affinity measurements on microfluidic devices published so far. Always, a brief description of the principle of the method including references on review articles is provided. Applications of affinity measurements are divided into two groups according to the goal of the affinity measurement. Affinity measurements serving as a separation tool include chiral separation, MEKC, and chip electrochromatography. Affinity measurements for the characterization of equilibria are comprised of general affinity measurements and special assays, namely enzyme assays and immunoassays.

## THEORY

In addition to interactions serving for achieving the separation of complicated sample mixtures and interaction for proper investigation of the equilibrium, some experiments serve only for recognizing an interaction. The result of such experiments is a yes/no answer with regard to the presence of an interaction. Disregarding the purpose of the affinity measurement, three different interaction phases can be distinguished in affinity electrophoresis.<sup>[1]</sup>

**Affinity measurements in free solutions:** If the ligand is simply dissolved in the background electrolyte, the interaction takes place in a homogenous solution, which can model the biological conditions inside living organisms. This kind of measurements is, therefore, most widely used for the characterization of the equilibrium. However, certain affinity measurements aimed at the separation of species (such as chiral separations) are also performed in free solutions.

**Affinity measurements with pseudostationary phases:** The pseudostationary phase is a phase with different physicochemical properties, which is, in contrast to the stationary phase, still in movement with regard to the channel. Interactions taking place in these pseudostationary phases serve mainly for the separation of sample mixtures, but recognition of an interaction (yes/no answer) is also possible. Typical examples of a pseudostationary phase are micelles, dendrimers, or liposomes.

**Affinity measurements with stationary phases:** Measurements performed in devices containing a solid stationary phase are aimed at separations of mixtures or at the recognition of an interaction. In this concept, features of

both electrophoresis and liquid chromatography are combined and the technique is, therefore, denoted as electrochromatography. The sample components are driven through the device electrokinetically and are separated due to a difference in both electrophoretic mobility (for ionized analytes) and specific interaction with the stationary phase.

### Characterization of Equilibria

The characterization of an interaction represents an important tool for a deeper understanding of biological events triggered by specific receptor-ligand interactions. However, the information on an interaction may be useful in many fields of chemistry and other sciences.

In general, interactions are characterized by association constants (frequently also called binding constants) and by the number of ligands that bind to the same class of binding sites present on the solute. For the sake of simplicity, the binding sites within one class are considered identical and the classes are considered independent in the majority of binding studies.<sup>[2]</sup>

Mathematically, the binding isotherm of such an interaction is commonly expressed by the following equation:

$$r = \frac{[LS]}{c_S} = \sum_{j=1}^m n_j \frac{K_j[L]}{1 + K_j[L]} \quad (1)$$

where  $r$  is the fraction of bound ligand per receptor or the concentration of ligand bound by one mole of solute;  $[LS]$  and  $[L]$  are the equilibrium concentrations of bound and free ligand, respectively;  $c_S$  is the total (analytical) concentration of the solute;  $n_j$  is the number of binding sites of class  $j$ , and  $K_j$  is the corresponding association constant.

The more classes of binding sites are present on the solute, the more complicated is the calculation of binding parameters. Therefore, the common first approximation is a 1:1 association.<sup>[3]</sup> The simplified form of Eq. (1) can then be linearized and the respective association constant is thereby calculated. If there is a deviation from linearity observed using this simplification, multiple equilibria have to be considered and non linear models according to Eq. (1) should be used for the calculation of the binding parameters.

### Methods for the Characterization of Equilibria

At present there are six affinity electrophoresis modes developed for capillaries, for measuring binding constants. Most of these modes also allow the determination of the number of ligand molecules that bind to the different classes of binding sites.

**Microchip Affinity Capillary Electrophoresis****1051**

Methods for the calculation of binding parameters can be divided into three groups according to the way of acquiring binding parameters. The binding parameters can be extracted from the mobility changes, from the peak area of the species, or from the plateau of the elution profile.<sup>[2]</sup>

Elution profiles of available affinity measurement methods, including the measured parameter of the particular measurement for the calculation of the association constant, are schematically depicted in Figure 1. For explanation see the text below.

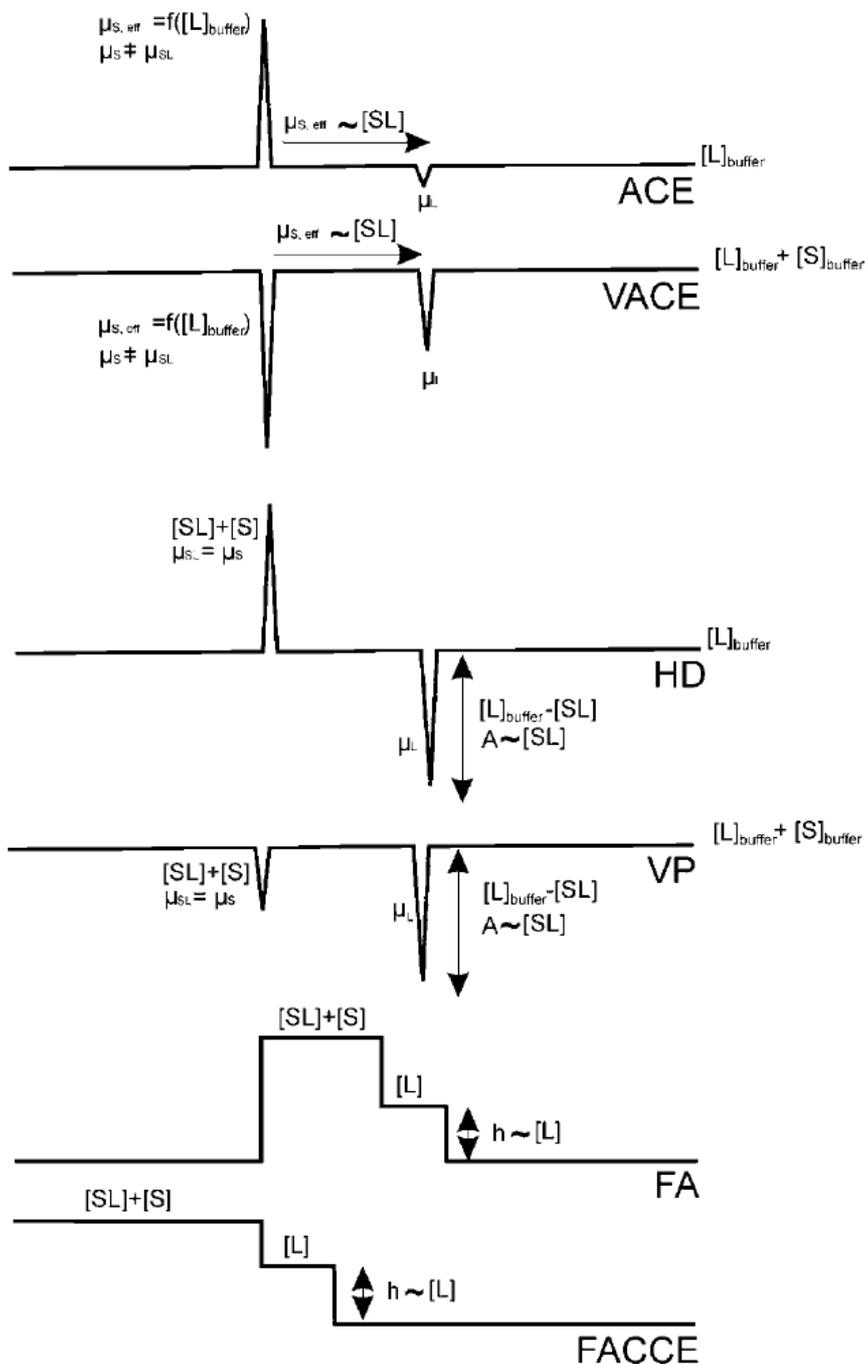
**Mobility-Shift Assays (Affinity Capillary Electrophoresis)**

The mobility-shift assay is sometimes denoted as ACE. Note that this is the narrower meaning of ACE; in this review ACE means any of electrophoretic based methods for studying interactions. Mobility-shift assay is the favorite method in capillary zone electrophoresis (CZE) for the investigation of simple 1:1 equilibria, and it has been recently successfully implemented also for free solution affinity measurements on chips.<sup>[4]</sup> The separation channel is filled with a buffer containing the ligand in varying concentrations; the solute is injected as a sample. Since the equilibrium is established during the separation, the apparent mobility of the solute depends on the association constant and the mobility difference between ligand and solute. The association constant is thus calculated from the change in the mobility of the solute independent of the concentration of the ligand in the buffer according to Eq. (2).

$$\mu = f([L]) = \frac{\mu_S + K[L]\mu_{SL}}{1 + K[L]} \quad (2)$$

The equilibrium concentration of the free ligand is approximated by the total concentration of the ligand. Obviously, the necessary prerequisite of this method is the difference in the mobilities of the ligand and the solute. This prerequisite is even more demanding if the measurements are realized on a microchip because the separation length is limited to several centimeters at maximum.<sup>[4]</sup> Small mobility differences cannot manifest in such a short distance. Moreover, short and well defined sample plugs are crucial for high resolution separations. Beside the necessity of small sample plugs in relation to the separation length, a reference compound that does not interact with any type of involved molecule is essential. The mobility change is then referred to the mobility of this compound, a so-called internal standard.

A related method being established only in capillary format so far is the so called vacancy affinity capillary electrophoresis (VACE).<sup>[5]</sup> In this method, the capillary is filled with a solution, which contains buffer, fixed amount of solute, and varying amount of ligand. A small buffer plug is then injected as a sample and two negative peaks corresponding to the solute and the ligand, respectively, are obtained. The shift in the negative peak mobility of the solute is monitored independent of the concentration of the ligand in the



**Figure 1.** Schematic elution profiles of ACE, VACE, HD, VP, FA and FACCE for the reaction:  $A - \text{area of detection signal}; \mu_{\text{eff}} - \text{effective mobility}$ . The arrows indicate the parameter  $S + L \rightleftharpoons SL$  measured in dependence on the concentration of free ligand,  $[L]_{\text{buffer}}$ , in the background electrolyte.

background electrolyte. This method is advantageous especially in the case of a weakly soluble ligand<sup>[3]</sup> because the presence of the solute in the background electrolyte helps to solubilize it. VACE is also recommended for interactions of adsorbing species, as the capillary is saturated by all compounds and, therefore, the adsorption is less detrimental. The use of VACE for

**Microchip Affinity Capillary Electrophoresis****1053**

adsorbing species and weakly soluble ligands can, therefore, also be suitable for mobility-shift measurements on a chip.

The shift in the mobility of the solute in the absence and presence of the ligand is often used as a proof of interaction, also by affinity measurements with ligands in pseudostationary or stationary phase. The association constant cannot be calculated from these measurements.

**Peak-Area-Changes Assays**

In free solution methods using peak-area-changes of the solute for the calculation of binding parameters, two different approaches are used depending on the stability of the complex formed by the interaction.

In the case of strong interactions, a direct separation of free and complexed solute is possible and the method is commonly called pre-equilibrium capillary electrophoresis.<sup>[6]</sup> The solute is pre-equilibrated with different concentrations of the ligand and then injected into the channel filled with buffer. Upon applying high voltage, the free solute is separated from the free ligand and the complex. Peak areas are used for the determination of the equilibrium concentration of free and bound ligand, and the association constant is calculated according to Eq. (1). Calibration measurements are required to relate the concentration to the peak area. This method is applicable to interactions yielding sufficiently stable complexes with slow dissociation kinetics. Pre-equilibrium electrophoresis on chips is preferentially used in immunoassays where the interaction is strong enough for a direct separation.

In the second approach, the equilibrium is established during the separation, similar to mobility shift assays. Peak-area-changes assays based on this approach are applicable to weaker interactions with fast kinetics and have been established only in capillary electrophoresis so far. Two methods are available, Hummel-Dreyer method (HD) with the experimental setup identical to mobility-shift assay, and vacancy peak method (VP) with the same setup as in VACE.<sup>[7]</sup> The peak-area-changes of the ligand, which is added to the background electrolyte in varying concentration, are always evaluated (see Fig. 1).

Generally, the reproducibility of the detection signal is crucial for the ACE methods based on measuring peak-area-changes. In traditional capillary electrophoresis, this is easily accomplished by hydrodynamic injection. On the contrary, microchips rely on electrokinetically driven injections using intersecting channels<sup>[8]</sup> where the diffusion of the analyte into the separation channel impairs the reproducibility significantly. Several injection strategies such as pinched or gated injections,<sup>[9,10]</sup> based on applying different voltages during the injection and separation step have been developed to improve the reproducibility, but the voltage control is complicated. However, a pressure driven injection with high reproducibility was recently introduced to microfluidic devices.<sup>[11,12]</sup> The fast development of affinity

1054

M. Vlčková, A. R. Stettler, and M. A. Schwarz

measurements based on peak-area-changes is, therefore, expected in the near future.

#### Elution-Profile-Changes Assays

Methods evaluating elution-profile-change for the characterization of an equilibrium works with pre-equilibrated samples, which are injected in a large plug (frontal analysis, FA<sup>[13]</sup>) or continuously (frontal analysis continuous capillary electrophoresis, FACCE<sup>[14]</sup>) to the buffer (see Fig. 1). It is assumed that the mobility of the complex is close to the mobility of the solute and that the mobility of the ligand differs from it sufficiently. Free ligand leaks out from the sample plug because of its different mobility and makes its own plateau. The concentration of free ligand is extracted from the height of the free ligand plateau by means of calibration. Elution-profile-changes assays are employed in capillary electrophoresis so far; the only description of this method on a microchip, however performed in sieving matrix, is given by Backhouse et al.<sup>[15]</sup> In the publication, DNA (PCR product and primer) was successfully separated in polyacrylimide sieving medium on microchip by using both CZE and FACCE. Even though FACCE was not used for the characterization of any equilibrium there, it clearly shows that frontal analysis with its simple experimental setup could easily be realized on a microchip.

## APPLICATIONS OF AFFINITY MEASUREMENTS AS A SEPARATION TOOL

### Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

MEKC is basically a separation method, which allows a simultaneous analysis of uncharged and charged molecules in untreated capillaries. However, it can be considered as a special case of ACE because it is based on affinity interactions of analytes with micelles. MEKC can easily be used not only for the separation but also for the study of distribution behavior of the analyte. In the latter case, the effect of the micellar composition and the concentration of the surfactant on the alteration of the analyte mobility are investigated. A wide range of applications in pharmaceuticals for characterizing partition equilibria between a surfactant and a drug are described. These investigations are focused on the development of effective transport systems for the drugs with respect to their bioavailability. However, all of these studies have been performed in capillaries. Up to the present day, no application dealing with the study of partition equilibria and estimation of partition coefficient can be found for planar microanalytical systems.

MEKC in chip format is not applied very often and uses micelles only for controlling the selectivity and the migration of analytes. The solubilization of the analyte in the micellar phase alters its properties in a significant manner.

**Microchip Affinity Capillary Electrophoresis****1055**

Migration times, selectivity, and resolution result from the partitioning of the analytes between micelle and the buffer phase and can strongly be influenced by addition of modifiers. The electrophoretic migration behavior is then determined by the sum of interactions, which the analyte undergoes during the separation process.

Mainly anionic surface-active compounds, in particular sodium dodecyl sulfate (SDS), are used in MEKC.<sup>[16–23]</sup> SDS and all other anionic surfactants have a net negative charge dependent on the pH value. Therefore, SDS micelles migrate towards the anode, which means in opposite direction to the electroosmotic flow (EOF). Moreover, SDS, similarly as any anionic species, does not interact with the negatively charged surface of the capillary/channels, which is favorable especially in ACE measurements.

Applications of MEKC on a chip are aimed at the improvement of three different goals: separation, partitioning of the analytes, and sensitivity.

**Separation**

A micellar separation of eight biogenic amines derivatized by fluorescein isothiocyanate (FITC) has been shown with approximately 15 shorter separation times compared to fused silica capillaries.<sup>[19]</sup> Detection limits satisfactory for analysis in food samples have been reached on a microchip in less than 1 min with the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and tryptamine.<sup>[21]</sup> An integrated postcolumn reaction of these amines with *o*-phthaldialdehyde served for their sensitive fluorescent detection. It is demonstrated that SDS stabilizes the EOF in the channels of a cheap plastic chip (made from poly(dimethylsiloxane)–PDMS) and the separations compare well to glass chips. MEKC separations of explosives on a glass microchip are presented by Wallenborg et al.<sup>[22]</sup> Also, here SDS micelles are used. Indirect laser-induced-fluorescence served for the detection of the explosives. The resolution enhancement of neurotransmitters by addition of surfactants to the running buffer is demonstrated by Suljak et al.<sup>[23]</sup> MEKC with amperometric detection has been applied to the separation of these compounds. Here, the sample is continuously introduced into the channel of a microchip with sub-micrometer internal height. Garcia et al.<sup>[24]</sup> demonstrated the use of anionic surfactants (SDS, sodium deoxycholate, and phosphatidic acid, respectively) in order to increase the EOF, and to enhance the detection signal for a PDMS-microchip. Anionic surfactants adsorbed to the surface of PDMS and affected the zeta potential of the surface and, thereby, the EOF. Also, the electrochemical response for several biomolecules is improved by the presence of anionic surfactants.

**Partition Process Adjustment**

Microchips are very suitable for precise fluidic mixing and manipulation. Thereby, a solvent gradient for MEKC can be realized in a simple way.

1056

M. Vlčková, A. R. Stettler, and M. A. Schwarz

A microchip device, presented by Kutter et al.<sup>[16]</sup> allows on-chip adjustment of the elution strength of the buffer by the electroosmotic fluid control and by the mobility of micelles. Isocratic and gradient solvent changes on the MEKC separation are controlled by proper setting of voltages applied to the buffer reservoirs of the microchip.

### Sensitivity

A sensitivity improvement of lipophilic dyes by on-line enrichment with a sweeping process is demonstrated by Sera et al.<sup>[25]</sup> The profile of the concentration process and the diffusion during the sweeping was investigated by changing the migration length. Between 90 fold and 1500 fold enhancement in detection sensitivity compared to the normal MEKC mode was achieved for different dyes. The enrichment process is strongly dependent on the partition behavior of analyte and on its migration.

### Chiral Separation

Chiral separations represent affinity measurements in free solutions serving for the separation of the enantiomers of an optically active compound. The different interactions of enantiomers present in the sample, in the form of a racemate, with a chiral selector, is the only way to discriminate between them. The chiral selector is dissolved in the buffer and the racemic sample is injected. During the separation, weak complexes between the respective enantiomers and chiral selector are formed and cause the change of the apparent mobilities of the enantiomers. This leads to their separation because the interaction of a chiral selector with each enantiomer is different. The concentration of the chiral selector is varied in order to achieve sufficient separation between the enantiomers. In some applications, the mobility changes of the enantiomers are plotted against the concentration of the chiral selector in the buffer, in order to calculate the association constants of their interaction with the selector.<sup>[26]</sup> These association constants then serve for the determination of the optimal chiral selector concentration following from the equation:

$$c_{opt} = (K_R K_S)^{-0.5} \quad (3)$$

Enantiomeric separations on micromachined electrophoretic devices are achievable and have been reviewed recently.<sup>[27]</sup> The applications of chiral separations, performed on a microchip so far (summarized in Table 1), are restricted to the chiral separation of amino acids and biogenic amino compounds. However, the fast development of other chiral separations in micro/nano-channels is expected in the next few years. The main motivation

Table 1. Enantiomer separations on microfluidic devices

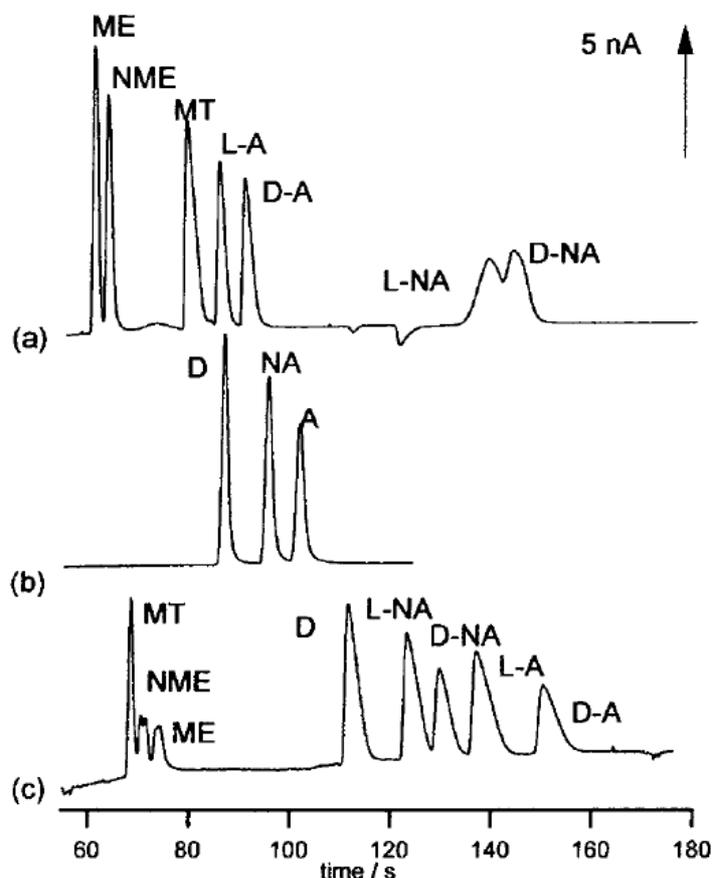
Analyte	Derivatization	pH/buffer additives	Detection	Separation length	Year, ref.
Amino acids	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	9.2/ $\gamma$ -CD, SDS	Fluorescence	19 cm	1999, [34]
Amino acids	FITC	9.4/ $\gamma$ -CD, SDS	Fluorescence	7 cm	2000, [36]
Amphetamines	Fluoro-nitrobenzofurazane	7.4–8.5/HS- $\gamma$ -CD, SDS	Fluorescence	14.5–16 cm	2000, [37]
Tryptophan	—	9.1/ $\alpha$ CD	Conductivity	9.4 cm	2001, [31]
Neurotransmitter, ephedrine	—	6–12.9/CM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD	Amperometry	8.5 cm	2001, [38]
Amines	FITC	9.0/HP- $\gamma$ -CD	Fluorescence	7 cm	2002, [39]
Gemifloxacin	—	4.0/crown ether 18C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Fluorescence	10.35 cm	2002, [40]
Amines	FITC	9.2/HP- $\gamma$ -CD	Fluorescence	8.5 cm	2003, [33]
Neurotransmitter metabolites, precursor	—	2.3–7.2/s- $\beta$ -CD, CM- $\beta$ -CD, crown ether, dendrimer	Amperometry	8.5 cm	2003, [32]
Basic and acidic drugs	—	2.5/HS- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -CD	UV-detection	2.5 cm	2003, [29]
Amino acids	Fluorescamine	$\leq$ 9.0/HP- $\beta$ -CD	Fluorescence	6.2–19.25 cm	2003, [41]
Amino acids	DNS	2.5/HS- $\gamma$ -CD	Fluorescence	0.7–3.5 cm	2004, [35]
Gemifloxacin	—	4.0/crown ether 18C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Fluorescence	3.8 cm	2004, [28]
Aminoindan	—	7.0/s- $\beta$ -CD	UV-detection	0.6 cm	2005, [30]

for this development could be fast, qualitative control of pharmaceutical products, or tests of large libraries of enantioselective catalysts.

Similar to all chip applications, fluorescence detection is the most common detection mode in chiral microchip capillary electrophoresis (MCE). An overview of the detection methods used is given in Table 1. In all chiral separations using fluorescence detection, the sample has been labeled outside the microanalytical system. However, due to the flexibility of the chip design, the implementation of on-chip derivatization, as it was shown for MEKC,<sup>[21]</sup> is expected soon. The potential of chip design versatility was demonstrated by Cho et al.<sup>[28]</sup> They used a channel-coupled microchip device, which combines a cleaning up of the metal ions present in urine and the separation of gemifloxacin enantiomers by chiral crown ethers. Despite the low sensitivity of UV-detection, several chiral separations applying the commercial instrument MCE 2010 from Shimadzu equipped with UV detector have been shown<sup>[4,29,30]</sup> For example, Ludwig et al.<sup>[29]</sup> successfully separated drug enantiomers in 2.5 s. By using highly sulfated- $\gamma$ -cyclodextrin (HS- $\gamma$ -CD), low pH and a separation length of 2.5 mm, resolutions up to 12 were reached. One of the few applications using electrochemical detection is demonstrated by Ölvecka et al.<sup>[31]</sup> In the publication, the enantiomeric separation of tryptophan in the isotachopheresis mode was monitored by conductivity detection. A clear advantage of UV detection and electrochemical methods compared to the fluorescence is the direct measuring without derivatization reactions.

The most widely used chiral selectors in CZE are native and modified  $\alpha$ -,  $\beta$ -, or  $\gamma$ -cyclodextrins (CD), chiral crown ethers, proteins, and oligosaccharides. Beside CD, only a few chiral agents have been implemented to enantiomeric chip separations so far. The concurrent use of more interacting agents for the separation of neurotransmitters, their metabolites, and artificial precursors on a chip has been demonstrated by Schwarz et al.<sup>[32]</sup> Figure 2 compares the effects of two different pairs of interacting agents used concurrently to improve the separation (a and b/c). The sandwich complexes formed by a combination of carboxymethylated-CD (CMCD) and crown ether (Fig. 2(a)) leads to a good enantiomeric separation of adrenalin, but the noradrenalin enantiomers are only partially resolved. Good separation of dopamine, noradrenalin, and adrenalin, albeit not into their isomers, may be achieved by using a dendrimer in the buffer, as shown in Fig. 2(b). The combination of the effects of the dendrimer with the effects of the CMCD, as demonstrated in Fig. 2(c), leads to a complete chiral separation of noradrenalin and adrenalin (dopamine is not chiral) and a good non-chiral separation of methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine.

Besides the selection of a suitable chiral agent, coating of the surface is another way to improve the separation performance in chiral separations. Enantiomeric separations of FITC amino acids have been performed in PVA-coated glass chips.<sup>[33]</sup> The reduction of analyte wall interactions and reduction in the EOF has led to the clear improvement of the separation efficiency. The

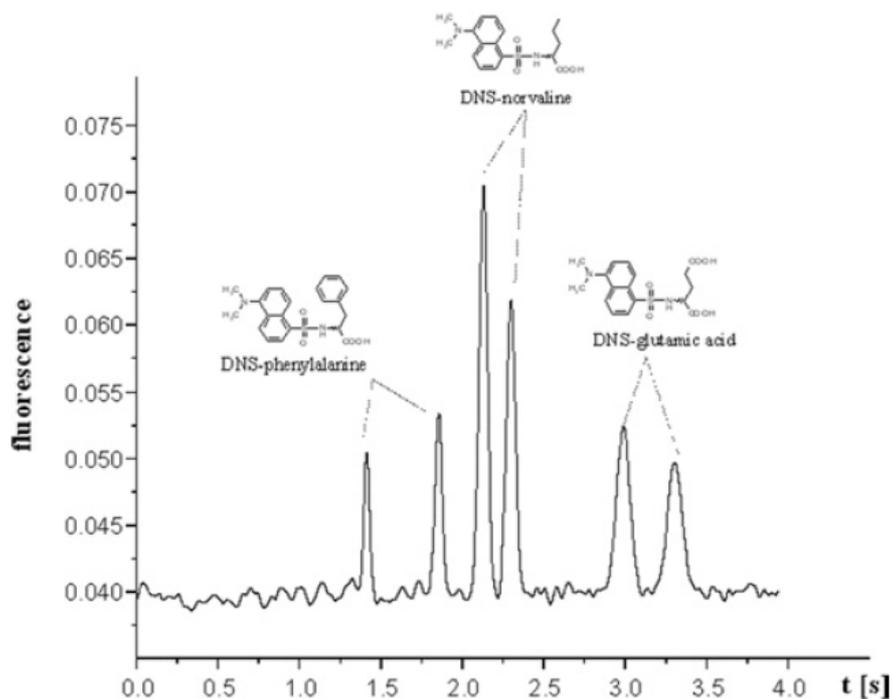


**Figure 2.** Electropherogram for noradrenaline (NA) and adrenaline (A) in the presence of dopamine (D), methoxytyramine (MT), normetanephrine (NME), and metanephrine (ME). Conditions: buffers, (a) 10 mM TRIS, pH 3.0, 10 mg/mL CMCD, 38 mmol/L 18-crown-6; (b) 20 mM MES, pH 6.0; 5 mg/mL dendrimer; (c) 20 mM MES, pH 6.0, 1.2 mg/mL CMCD, 1 mg/mL dendrimer. HV, 4 kV; detection potential, (a) 1600, (b) 1700, and (c) 1800 mV; injection voltage, 1 kV (2 s); concentration, 100  $\mu$ M; electrode, Au. From [32] with permission.

separation length of microchip separations undergoes a noticeable trend, as may be demonstrated by the example of enantiomeric separation of amino acids. Whereas Hutt et al.<sup>[34]</sup> achieved chiral separation of amino acids within 19 cm, Piel et al.<sup>[35]</sup> chirally separated amino acids derivatized with dansyl chloride (DNS-amino acids) within 0.7 cm, with a separation time of 3.3 s (see Figure 3). Smaller cross section dimensions (50  $\mu$ m compared to 110  $\mu$ m) and higher electric field strengths (about 2000 V/cm compared to 520 V/cm) resulted in high resolution separations.

### Chip Electrochromatography

Chip electrochromatography is probably the most rapidly growing area of microchip electrophoresis based separations. Specific interactions with



**Figure 3.** Chiral separation of three compounds in less than 3.5 s. conditions: electrolyte: 2% HS- $\gamma$ -CD, 25 mM triethylammonium phosphate buffer, pH 2.5. From [35] with permission. Conditions see Table 1.

stationary phases serve for the separation of components. Two main groups of chip electrochromatography, according to the type of stationary phase, are clearly distinguishable: electrochromatography in coated channels (so called open channel electrochromatography) and electrochromatography in filled channels.

#### Open Channel Chip Electrochromatography

In the open channel electrochromatography, the inner surface of the channel is coated with a stationary phase, which maintains the chromatographic separation mechanism when placed in contact with a mobile phase. In practice, the stationary phase is built via chemical modification of the inner walls. Wall modification on glass microchips has been well established, primarily using silanization, whereas on plastic chips the methods are still under development.<sup>[42]</sup> Stationary phases for open tubular capillary electrochromatography have been reviewed by Guihen and Glennon.<sup>[43]</sup>

#### Filled Channel Chip Electrochromatography

The channel can be packed with particles (beads) or can contain porous monoliths. Packed channels and monoliths have much higher surface area and easily controlled surface chemistry contrary to open channels. Silica

beads are well characterized and easily functionalized; however, uniform and reproducible packing and retaining the beads in miniaturized scale represent a technical challenge.

On the other hand, monolithic stationary phases can be prepared easily and rapidly via free radical polymerization within the channel without need of frits or other retaining structures. Polymer monoliths can possess various functionalities given by the selection of monomers and eventually by their further functionalization. The porosity, the surface area, and the pore size of the monolith are controlled by the composition of the initial monomer solution and by the polymerization conditions. Monoliths, therefore, represent an attractive alternative among stationary phases for microfluidic devices, especially due to its easy preparation in miniaturized formats, and are gaining popularity in the last years.<sup>[44]</sup> In addition to various porous polymer monoliths, silica based monoliths have been recently introduced as a stationary phase for electrochromatography on microchips.<sup>[42]</sup> Solid support preparation and their applications on a chip have been recently reviewed by Peterson.<sup>[45]</sup>

Between open and filled channel stationary phases lie the so called collocated monolith support structures (developed by Regnier and coworkers),<sup>[46]</sup> a tightly packed array of posts fabricated directly in the channel. These posts divide the channel into a bundle of interconnecting capillaries with frequent mixing nodes, which leads to an increase in surface area compared to open channel stationary phases. Advantages of these support structures are precise dimensions and geometry, and controlled extent of mixing.

Because of the easy preparation of most of the stationary phases in miniaturized formats, a lot of applications for chip electrochromatography either in open tubular or filled channel format can be found in the literature. These applications are not listed in this review because they have been extensively reviewed by Stachowiak et al.<sup>[42]</sup> in 2004 and most recently by Pumera.<sup>[48]</sup> For an overview of the applications and a more detailed description of the method, including available technologies, please refer to these reviews dedicated entirely to chip electrochromatography.

In both formats of electrochromatography, albeit in the capillary format, special stationary phases, so called molecularly imprinted polymers (MIPs), have been developed. Molecular imprinting is based on creating a three dimensional cross-linked polymer network containing cavities complementary to the template molecule in terms of size, shape, and chemical functionality. The template is present during the polymerization *in situ* and after its extraction leaves behind a cavity, which is then able to rebind the template (analyte) during separation. MIPs phases are used either in open or in filled channel format, either as a coating, as particles, or as monoliths. MIP phases for capillary electrochromatography have been reviewed by Schweitz et al.<sup>[47]</sup> MIP stationary phases have not been transferred from the capillary to the chip format to our knowledge so far, probably due to the

short existence of the MIP-technology. Anyway, microfluidic devices based on MIP phases seem to have a promising future.<sup>[47]</sup>

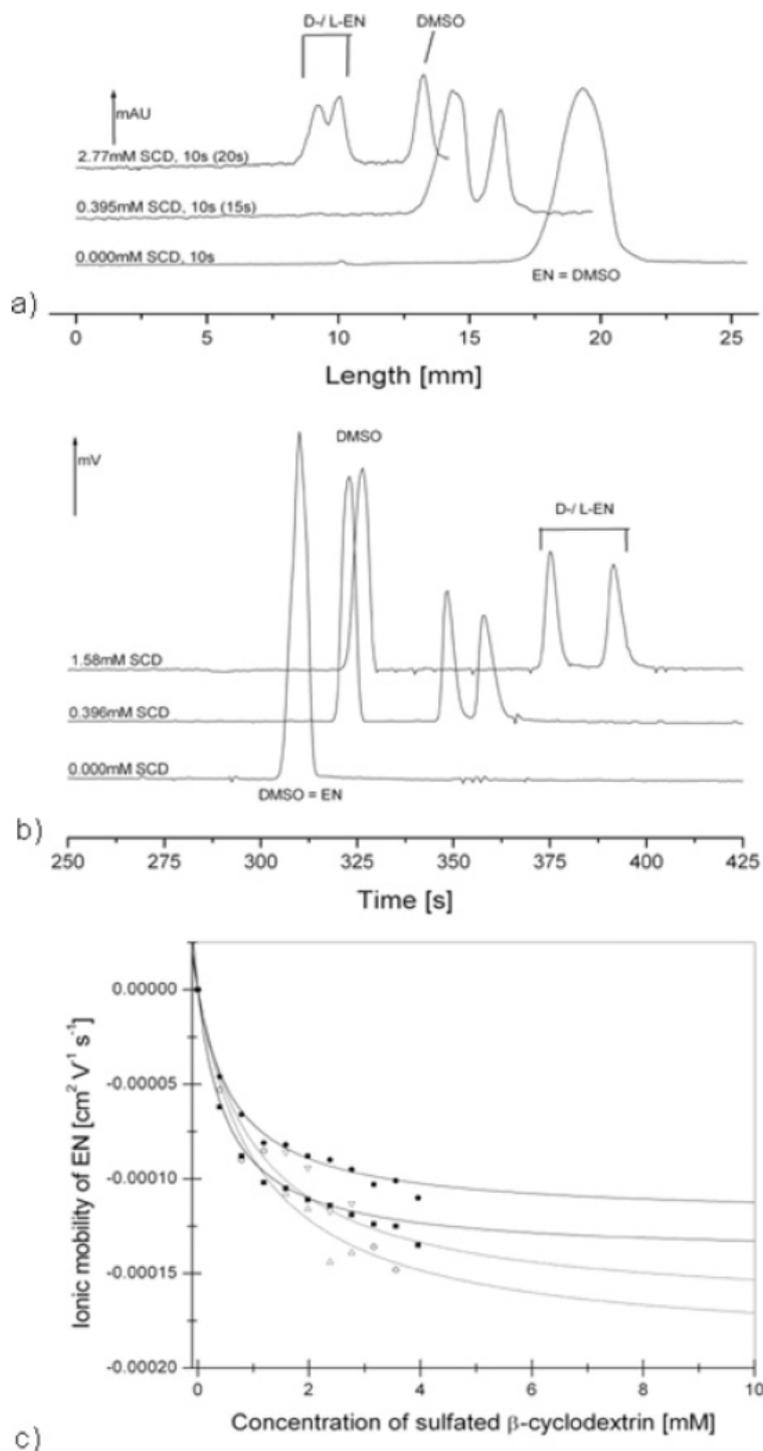
## APPLICATIONS OF AFFINITY MEASUREMENTS FOR THE STUDY OF INTERACTIONS

The most important applications for studying interactions are of biochemical origin. The detailed investigation of chemical reactions and processes inside the cells can provide better understanding of living systems, which is necessary to be able to control and regulate their functioning. In capillary electrophoresis, classical binding studies concerning various drugs, biomolecules, and biomacromolecules are routinely performed and binding parameters are calculated. On the contrary, with microchips, very specific bioassays, such as enzyme assays and immunoassays are most frequently studied. The output of these bioassays is rather different and will be briefly discussed in following sub-chapters. For more detailed insight to enzyme assays and immunoassays performed on microchips, the authors recommend the review from the year 2002 given by Guijt et al.<sup>[49]</sup>

The only microchip application of classical affinity measurement, including the calculation of binding constants, is a study of the interaction between neurotransmitters as solutes and sulfated  $\beta$ -CD as ligand by Stettler and Schwarz.<sup>[4]</sup> This paper compares affinity measurements, including calculation of association constants, carried out in microchip and in capillary. The obtained results are shown in Figure 4. Microchip ACE was demonstrated to provide comparable data to the capillary ACE, even though less precise. Affinity measurements on microchips were shown as a low-cost, rapid, and simple screening alternative to capillary.

### Enzyme Assays

Enzymes are highly specific catalysts of every reaction inside a living organism. In enzyme assays, the kinetics of the enzymatic reaction is studied and provides information about the affinity of the substrate to the enzyme. The substrate affinity is commonly described by the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ). However,  $K_m$  constant is not equal to the association constant calculated in classical binding studies because it is not measured in the equilibrium state. In case of slow conversion of the substrate-enzyme complex to the final product, the  $K_m$  value is numerically equal to the dissociation constant of the enzyme-substrate complex, which is reciprocal to the association constant of the complex. In addition to the kinetics of the enzyme-substrate reaction, the kinetics in presence of different inhibitors is often included in the study and the respective inhibition constants ( $K_i$ ) are



**Figure 4.** Electropherograms measured on microchip (a) and capillary (b). Buffer: 10 mM TRIS at 210 nm containing sulfated cyclodextrin (sCD); internal standard: DMSO; microchip: 2 mM epinephrine (EN) at pH 7.37. The separation times differed from 10 s up to 20 s (converted to 10 s) at 280 V/cm using an uncoated chip 50 μm × 20 μm i.d. capillary: 0.2 mM EN at pH 7.33. Injection time in each run was 6 s at 25 kV using a 65 cm (79 cm in total) 75 μm i.d. open, uncoated quartz capillary. (c) Affinity capillary electrophoresis: comparison between capillary and microchip. The electropherograms of (a/b) converted into affinity curves with increasing sCD concentrations vs. ionic mobility.

determined. Enzyme kinetics is traditionally studied in cuvettes, where the formation of a product or a consumption of a substrate is monitored.

In the nineties, a new concept in enzyme assay based on capillary electrophoresis has been developed and was denominated as electrophoretically mediated microanalysis (EMMA). The EMMA methodology couples together all of the operations required for the enzyme assay, such as mixing of reagents, initiation of the reaction, incubation of reaction mixture, and detection of the reaction product. Different electrophoretic mobilities of the substrate and the enzyme make it possible to initiate the reaction inside the capillary and to separate the components prior to the detection. A review dedicated to EMMA in capillary, as well as on a microchip, is given by Novakova et al.<sup>[50]</sup>

Implementation of the microfluidic devices for enzyme assays is even more advantageous compared to the capillary because all of the steps required for the enzyme assays are not only integrated in one device but can also be automatically controlled. A more complex layout of the chip enables the simultaneous screening of several inhibitors in one study.

Enzyme reactions in microscale format are also employed for the determination of compounds. The enzyme either converts undetectable substrate to detectable product or amplifies the detection signal. Such measurements, however, do not belong to the affinity measurements and are, therefore, not discussed in this review.

Generally, enzymes used for enzyme assay can be present in a free solution or immobilized, either over the whole chip or in a restricted area. The overview of enzyme assays performed on microchips so far is summarized in Table 2. Almost all of the measurements used fluorescence detection.

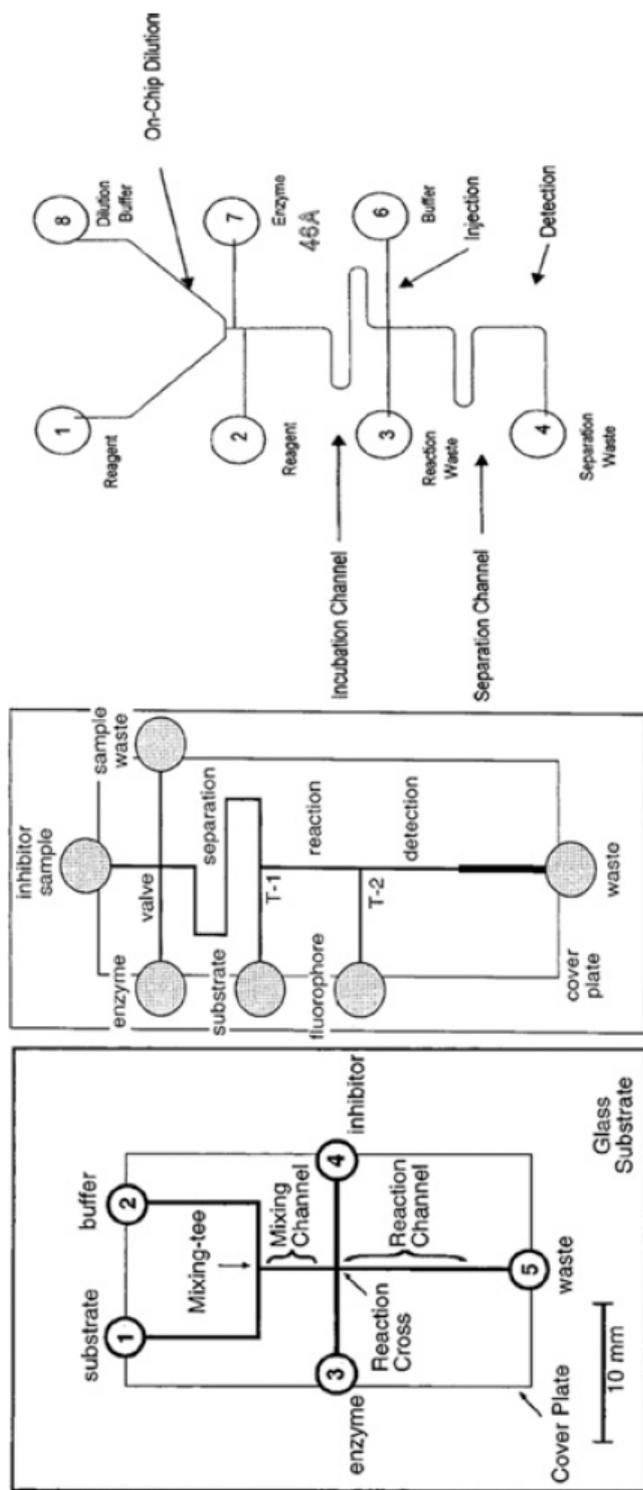
The possibilities, how to design a chip having channels adequately arranged for specific applications, are almost unlimited. For a comparison of the various chips' layout see Figure 5. For example, Ramsey and co-workers<sup>[52]</sup> studied the enzymatic conversion of acetylthiocholine to thiocholine with an on-chip derivatization of the product (see Fig. 5, in the middle). A possible inhibition of this reaction was investigated by adding an inhibitor, namely tacrine, to the sample. The results of the chip assays have been compared to traditional enzyme assay in a cuvette with good agreement (see Fig. 6).

In free solution enzyme assays, the enzyme is, in most cases, dissolved in the background electrolyte, partly also together with possible inhibitors. The only example of pre-equilibrium electrophoretic study on a microchip, in which both substrate and enzyme are injected as a sample, is given by Wehmeyer and co-workers.<sup>[53]</sup> Equal incubation times of the sample prior to the injection were important to achieve comparable results. Regnier and Burke<sup>[54,55]</sup> invented a microfabricated mixer in the cross of the channels in order to improve the mixing of the reagents. The mixing is achieved by transporting the reagents through the mixer consisting of multiple intersecting channels of varying length and width. Microchips have also been used for

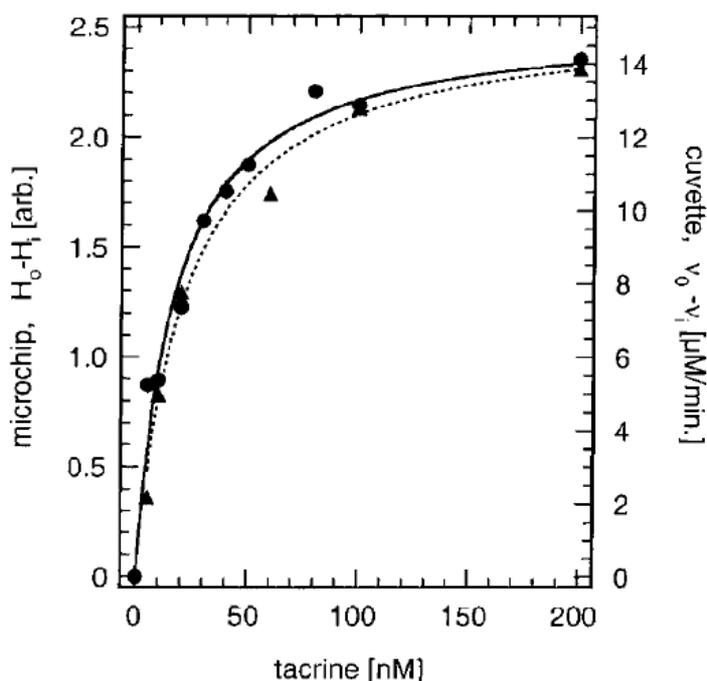
Table 2. Chip based enzyme assays

In free solution	Solute	Ligand	K	Ref.
Resorufin	$\beta$ -D-galactopyranoside	$\beta$ -Galactosidase and $\Delta c$ inhibitor	$K_m$ 450 $\mu$ M, $K_i$ 8 $\mu$ M	[51]
Acetylthiocholine		Acetylcholinesterase and $\Delta c$ inhibitors	$K_m$ 75 $\mu$ M, $K_i$ 1.5 nM	[52]
Fluorescein mono- $\beta$ -D-glucuronide and $\beta$ -Glucuronidase and $\Delta c$ inhibitor		—	$K_m$ 18 $\mu$ M	[53]
Fluorescein mono- $\beta$ -D-galactopyranoside and $\Delta c$ inhibitor		$\beta$ -Galactosidase	$K_m$ 75 $\mu$ M	[54, 55]
Kemptide and ATP <sup>a</sup>		Protein kinase A and $\Delta c$ competitive inhibitor in a different well	$K_m$ 10 $\mu$ M, $K_i$ 103 nM, $K_m$ 3.1 $\mu$ M, $K_i$ 48 nM	[56]
L-Leucine $\beta$ -naphthylamine and $\beta$ -naphthylamine		Leucin aminopeptidase	—	[57]
Fluorescein diphosphate		Alkaline phosphatase	—	[58]
<i>p</i> -Cresol		Soy bean peroxidase	$K_m$ 0.98 mM,	[59]
		lipase B invertase glu- cose oxidase	$K_m$ 0.59 mM	

<sup>a</sup>Two different chips designs with different methods.



**Figure 5.** Schematic of the chips used in [51, 52, 56]. With the chip on the left side, dilution of the substrate is possible. Enzyme and a possible inhibitor are added simultaneously. On the chip in the middle, the enzyme first interacts with the inhibitor before coming to the substrate, the product of the enzymatic reaction later binds to the fluorophore and is measured at last. The chip on the right side has two possibilities to dilute the sample before and after the reaction with the enzyme. From [51, 52, 55] with permission.



**Figure 6.** Difference in initial and inhibited enzyme reaction rates versus tacrine concentration for microchip- and cuvette-based assays. Left axis shows values for difference in peak height ( $H_0 - H_i$ ) for the microchip assay (▲); right axis, the difference in initial reaction rates ( $v_0 - v_i$ ) for the cuvette assay (●). Nonlinear least-squares fits are indicated as a dotted line for the microchip assay and as a solid line for the cuvette assay. From (52) with permission.

investigation of more complex enzymatic reactions, which combines more substrates or more enzymes in one assay. Nikiforov and co-workers<sup>[56]</sup> described a two substrate-enzyme assay for protein kinase A. During the two step reaction the  $\gamma$ -phosphate group was transferred from ATP (first substrate) to a labeled peptide (second substrate). Dordick et al.<sup>[59]</sup> presented a multienzyme assay with the enzymes immobilized in the channel. The injected substrate is converted stepwise by up to three enzymes and the product of one enzyme reaction served as substrate for the next reaction.

### Immunoassays

Immunoassays rely on the affinity reaction between the antigen (a substance recognized by the immune system) and a specific antibody (immunoglobulin (Ig) binding specifically to the antigen). In clinical analysis, the immunoassays serve for identification of the antigen (Ag) or the antibody (Ab) by its selective reaction with the known Ab/Ag. Traditionally, the assay is heterogeneous; the Ag or Ab is immobilized on the surface and the sample containing the other interaction partner is added and incubated there. After removing the unbound fraction of the sample, the bound fraction is washed out and



**Figure 7.** Schema of immunoassays on microfluidic devices.

detected. Labeling based on radioactivity, fluorescence, or on colored enzyme reactions is traditionally used for the detection. In homogenous immunoassays, a separation of the immuno complex from the unbound fraction of the sample is necessary for the evaluation of the assay. High performance liquid chromatography (HPLC), CZE, or newly MCE are used as separation tools. CZE has been also used for the characterization of the equilibrium between Ab-Ag, both in pre-equilibrium electrophoresis and mobility shift assay format, depending on the interaction kinetics. However, because of large variability in the stoichiometry of the Ab-Ag complex, the meaningful interpretation of the binding data often remains an obstacle.<sup>[60]</sup> As the same problem is encountered in microchips, the use of microfluidic devices is often restricted to the separation of the reaction mixture in homogenous assays. In fact, only a few publications dealing with determination of association constants on microchips have been found.<sup>[61,62]</sup> However, microchips are also employed for heterogeneous assays, then the chip serves as an immobilization matrix and separation between free and bound Ab/Ag is achieved by a washing step. A schematic drawing of immunoassay arrangement on a microchip in heterogeneous (with Ag (a) or Ab (b) immobilized in the channel) and homogenous (c) format is depicted in Figure 7.

Fluorescent labeling followed by laser-induced fluorescence detection or electrochemical detection is mostly applied for immunoassays performed in microfluidic devices. According to the aim of the particular measurement, a direct or competitive assay is selected. In direct assays either Ag or Ab, forming the immuno complex with the sample in question, is labeled. In competitive assays, labeled and unlabeled Ag or Ab competes for a limited number of the corresponding interaction partner. Applications of immunoassays established on microchips are summarized in Table 3.

Most of the immunoassays serve for the determination of a particular Ag/Ab and not for the investigation of interactions. However, in homogeneous assays the association constants could be determined if the changes in concentration of free and bound Ag/Ab are monitored during calibration measurements. The investigation of the equilibrium in the heterogeneous format is possible only if the incubation is not performed during electrophoresis, thus under non-equilibrium conditions.

Microchip Affinity Capillary Electrophoresis

1069

Table 3. Chip based immunoassays

Solute	Ligand	Details	Ref.
Homogeneous assays			
Cortisol and rabbit anti-cortisol	—	Competitive, determination of cortisol, pre-solved	[63]
BSA and mouse monoclonal anti-BSA	—	Direct, determination of anti-BSA, pre-solved	[64]
Theophylline and anti-theophylline	—	Competitive, determination of theophylline, pre-solved	[64]
BSA and anti-BSA	—	Direct, affinity study, pre-solved	[61]
TNT, 1,3,5-trinitrobenzene, picric acid, 2,4-dinitrotoluene, 1,3-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenol and monoclonal anti-TNT	—	Competitive, affinity study, pre-solved	[62]
Sheep erythrocytes	Rabbit anti IgG	Mobility changes assay, no derivatization, cell counting detection (CCD)	[65]
Estradiol and anti-estradiol	—	Direct	[66]
Mouse-IgG	Anti-mouse-IgG	Direct, electrochemical	[67]
Histamine and anti-histamine	—	Competitive, pre-solved, electrochemical	[68]
Mouse-IgG	Anti-mouse-IgG	Direct, amperometric	[69]
Triiodo-L-thyronine	Anti-triiodo-L-thyronine	Competitive, affinity study, amperometric	[69]
Heterogeneous assays			
Human IgG	Goat anti-human IgG	Competitive	[70, 71]
Rabbit IgG	Protein A	Competitive, nonequilibrium conditions	[72]
D-Dimer	Anti D-Dimer	Direct, electrochemical	[73, 74]
Atrazine	Anti-atrazine	Competitive, chemiluminescence	[75]

The determination of the Ag or Ab by an immunoassay is very selective, sensitive, and is often used in clinical measurements. In general, clinical assays have to be simple, fast, and sufficiently sensitive for detecting the substances in human liquids. Some of published microchip immunoassays<sup>[63,64]</sup> were shown to fulfill the criteria for the clinical use. Similar to all chip applications, various chip arrangements have been developed for homogenous chip immunoassays. For example, Mathies and Bromberg<sup>[62]</sup> worked with a special folded channel with several detection points. Harrison and co-workers<sup>[66,67]</sup> developed a multichannel immunoassay analysis system for measuring up to six independent reactions at the same time. A galvano scanner, moving across the channels, was used for the fluorescence detection. A rather special homogenous immunoassay was performed by Ichiki and co-workers.<sup>[65]</sup> They have investigated an immunoreaction between sheep red blood cells and rabbit anti-IgG on a microchip coated by gelatine to prevent the cell adsorption. For the detection of the cells a CCD camera, based on counting of the cells, was used. Enzyme mediated detection for microchip immunoassays has been demonstrated, too. An indirect electrochemical detection of Ab and Ag-Ab complex is possible by labeling the Ab with alkaline phosphatase enzyme converting the substrate to aminophenol, which is then oxidized at the electrode.<sup>[67]</sup> A direct detection mechanism using amperometry for investigations of immunological reactions is described by Wang et al.<sup>[69]</sup> The principle is based on a ferrocen redox labeling of Ab/Ag and can be applied to a variety of clinical and pharmaceutical immunoassays.

A single use chip with electrochemical detector for the determination of d-dimer in a heterogeneous immunoassay has been developed by Girault and co-workers.<sup>[73]</sup> A complex immobilization strategy for a heterogeneous immunoassay was published by Thormann and co-workers.<sup>[70,71]</sup> They covered the channel successively with three layers consisting of biotin-conjugated goat anti-human IgG, neutravidin, and biotin-conjugated dextran, respectively. Labeled human IgG was then shown to bind to the first layer.

## FUTURE PROSPECTS

The broadening of the range of application areas and the quantity of utilizations is associated with the commercialization of high performance electrophoretical microchip systems. Such systems represent planar electrophoresis chips with narrow channels of nm dimensions with reliable control of sample and buffer flux equipped with a sensitive detection. Small channel dimensions and high electric field strengths are the most important features for high resolution electrophoresis and are, therefore, substantial for a sensitive recording of mobility shifts. On the other hand, powerful detection systems are indispensable for identifying minor changes in peak area. The main motivation is given by high throughput analysis, coupling various

**Microchip Affinity Capillary Electrophoresis****1071**

processes to one system such as pre- and post-channel reactions and the possibility to do parallel measurements in an easy way. The miniaturization, as compared to the ACE in capillaries, enables utilization, cost intensive and uncommon samples, and ligands.

Generally, the transfer of known ACE processes to the miniaturized format is becoming more and more common. Since the basic concept of affinity measurement is derived from capillary measurements, the applicability of microchip investigations depends mainly on the efforts in technology developments as mentioned above. In addition to the transfers of known investigation from the capillary to microchip, a lot of novel microchip applications, including the use of so far unknown ligands for better separation efficiencies and new kinds of noncovalent interactions are, therefore, expected in the near future.

**ABBREVIATIONS**

A	adrenaline
A	area
Ab	antibody
ACE	affinity capillary electrophoresis
Ag	antigen
BSA	bovine serum albumin
CCD	cell counting detection
CD	cyclodextrin
CMCD	carboxymethyl-cyclodextrin
CZE	capillary zone electrophoresis
D	dopamine
DNS	dimethylamino-naphthalensulfonyl-
EMMA	electrophoretically mediated microanalysis
EN	epinephrine
EOF	electro osmotic flow
FA	frontal analysis
FACCE	frontal analysis continuous capillary electrophoresis
FITC	fluorescein isothiocyanate
H	peak height
HD	Hummel-Dreyer
HS	highly sulfated
HP	hydroxypropyl
HPLC	high performance liquid chromatography
Ig	immunoglobulin
K	association constant
$K_i$	inhibition constant
$K_m$	Michaelis-Menten constant
L	ligand
$\mu_{\text{eff}}$	effective mobility

1072

M. Vlčková, A. R. Stettler, and M. A. Schwarz

MCE	microchip capillary electrophoresis
ME	metanephrine
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MIP	molecular imprinted polymer
MT	methoxytyramine
NA	noradrenaline
NME	normetanephrine
PDMS	polydimethylsiloxane
PVA	poly(vinyl-alcohol)
S	solute
s	sulfated
sCD	sulfated cyclodextrin
SDS	sodium dodecyl sulfate
VACE	vacancy affinity capillary electrophoresis
VP	vacancy peak
$v$	reaction rate

## REFERENCES

1. Guijt, R.M.; Frank, J.; van Dedem, G.W.K.; Baltussen, E. Recent advances in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3905–3918.
2. Busch, M.H.A.; Carels, L.B.; Boelens, H.F.M.; Kraak, J.C.; Poppe, H. Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 311–328.
3. Tanaka, Y.; Terabe, S. Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **2002**, *768*, 81–92.
4. Stettler, A.R.; Schwarz, M.A. Affinity capillary electrophoresis on microchips. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1063*, 217–225.
5. Busch, M.H.A.; Boelens, H.F.M.; Kraak, J.C.; Poppe, H. Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants. *J. Chromatogr. A* **1997**, *775*, 313–326.
6. Rundlett, K.L.; Armstrong, D.W. Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1419–1427.
7. Busch, M.H.A.; Kraak, J.C.; Poppe, H. Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 329–353.
8. Alarie, J.P.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 312–317.
9. Ermakov, S.V.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Computer simulations of electrokinetic injection techniques in microfluidic devices. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3512–3517.
10. Zhang, C.-X.; Manz, A. Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2656–2662.
11. Lee, N.Y.; Yamada, M.; Seki, M. Pressure-driven sample injection with quantitative liquid dispensing for on-chip electrophoresis. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 483–487.
12. Solignac, D.; Gijs, M.A.M. Pressure pulse injection: a powerful alternative to electrokinetic sample loading in electrophoresis microchips. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1652–1657.

## Microchip Affinity Capillary Electrophoresis

1073

13. Ostergaard, J.; Heegard, N.H.H. Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding-*Electrophoresis* **2003**, *24*, 2903–2913.
14. Gao, J.Y.; Dubin, P.L.; Muhoberac, B.B. Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2945–2951.
15. Backhouse, C.J.; Crabtree, H.J.; Glerum, D.M. Frontal analysis on a microchip. *Analyst* **2002**, *127*, 1169–1175.
16. Kutter, J.P.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Integrated microchip device with electrokinetically controlled solvent mixing for isocratic and gradient elution in micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5165–5171.
17. Moore, A.W.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Microchip separations of neutral species via micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4184–4189.
18. vonHeeren, F.; Verpoorte, E.; Manz, A.; Thormann, W. Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2044–2053.
19. Rodriguez, I.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y. Microchannel electrophoretic separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 118–126.
20. Culbertson, C.T.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Microchip devices for high-efficiency separations. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5814–5819.
21. Ro, K.W.; Lim, K.; Kim, H.; Hahn, J.H. Poly(dimethylsiloxane) microchip for precolumn reaction and micellar electrokinetic chromatography of biogenic amines. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1129–1137.
22. Wallenborg, S.R.; Bailey, C.G. Separation and detection of explosives on a microchip using micellar electrokinetic chromatography and indirect laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1872–1878.
23. Suljak, S.W.; Thompson, L.A.; Ewing, A.G. Improving resolution for channel-format chip-based electrophoresis with electrochemical array detection *J. Sepn. Sci.* **2004**, *27*, 13–20.
24. Garcia, C.D.; Dressen, B.M.; Henderson, A.; Henry, C.S. Comparison of surfactants for dynamic surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchips. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 703–709.
25. Sera, Y.; Matsubara, N.; Otsuka, K.; Terabe, S. Sweeping on a microchip: Concentration profiles of the focused zone in micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3509–3513.
26. Vespalec, R.; Bocek, P. Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities. *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 431–445.
27. Belder, D.; Ludwig, M. Microchip electrophoresis for chiral separations. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2422–2430.
28. Il Cho, S.; Shim, J.; Kim, M.S.; Kim, Y.K.; Chung, D.S. On-line sample cleanup and chiral separation of gemifloxacin in a urinary solution using chiral crown ether as a chiral selector in microchip electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1055*, 241–245.
29. Ludwig, M.; Kohler, F.; Belder, D. High-speed chiral separations on microchip with UV-detection. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3233–3238.
30. Kitagawa, F.; Aizawa, S.; Otsuka, K. Rapid enantioseparation of 1-aminoindan by microchip electrophoresis with linear-imaging UV detection. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 61–65.

1074

M. Vlčková, A. R. Stettler, and M. A. Schwarz

31. Olvecka, E.; Masar, M.; Kaniansky, D.; Johnck, M.; Stanislawski, B. Isotachopheresis separations of enantiomers on a planar chip with coupled separation channels. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3347–3353.
32. Schwarz, M.A.; Hauser, P.C. Chiral on-chip separations of neurotransmitters. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4691–4695.
33. Ludwig, M.; Belder, D. Coated microfluidic devices for improved chiral separations in microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2481–2486.
34. Hutt, L.D.; Glavin, D.P.; Bada, J.L.; Mathies, R.A. Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyser for extraterrestrial exploration. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4000–4006.
35. Piehl, N.; Ludwig, M.; Belder, D. Subsecond chiral separations on a microchip. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3848–3852.
36. Rodriguez, I.; Jin, L.J.; Li, S.F.Y. High-speed chiral separations on microchip electrophoresis devices. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 211–219.
37. Wallenborg, S.R.; Lurie, I.S.; Arnold, D.W.; Bailey, C.G. On-chip chiral and achiral separation of amphetamine and related compounds labeled with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazene. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3257–3263.
38. Schwarz, M.A.; Hauser, P.C. Rapid chiral on-chip separation with simplified amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *928*, 225–232.
39. Belder, D.; Deege, A.; Maass, M.; Ludwig, M. Design and performance of microchip electrophoresis instrument with sensitive variable-wavelength fluorescence detection. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2355–2361.
40. Il Cho, S.; Lee, K.N.; Kim, Y.K.; Jang, J.H.; Chung, D.S. Chiral separation of gemifloxacin in sodium-containing media using chiral crown ether as a chiral selector by capillary and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 972–977.
41. Skelley, A.M.; Mathies, R.A. Chiral separation of fluorecamine-labeled amino acids using microfabricated capillary electrophoresis devices for extraterrestrial exploration. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1021*, 191–199.
42. Stachowiak, T.B.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. Chip electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1044*, 97–111.
43. Guihen, E.; Glennon, J.D. Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1044*, 67–81.
44. Svec, F. Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. *J. Sepn. Sci.* **2005**, *28*, 729–745.
45. Peterson, D. Solid supports for micro analytical systems. *Lab On A Chip* **2005**, *5*, 132–139.
46. He, B. Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3790–3797.
47. Schweitz, L. Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 4053–4063.
48. Pumera, M. Microchip-based electrochromatography: designs and applications. *Talanta* **2005**, *66*, 1048–1062.
49. Guijt, R.M.; Baltussen, E.; van Demen, G.W.K. Use of bioaffinity interactions in electrokinetically controlled assays on microfabricated devices. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 823–825.
50. Novakova, S.; Van Dyck, S.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J.; Glatz, Z. Electrophoretically mediated microanalysis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 173–184.
51. Hadd, A.G.; Raymond, D.E.; Halliwell, J.W.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Microchip device for performing enzyme assays. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3407–3412.

## Microchip Affinity Capillary Electrophoresis

1075

52. Hadd, A.G.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M. Microfluidic Assays of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5206–5212.
53. Starkey, D.E.; Han, A.; Bao, J.J.; Ahn, C.H.; Wehmeyer, K.R.; Prenger, M.C.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R. Fluorogenic assay for b-glucuronidase using microchip-based capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **2001**, *762*, 33–41.
54. Burke, B.J.; Regnier, F.E. Stopped-flow enzyme assays on a chip using a microfabricated mixer. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1786–1791.
55. Burke, B.J.; Regnier, F.E. Electrophoretically mediated microanalysis of b-galactosidase on microchips. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3744–3751.
56. Cohen, C.B.; Chin-Dixon, E.; Jeong, S.; Nikiforov, T.T.A. Microchip-based enzyme assay for protein kinase A. *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 89–97.
57. Zugel, S.A.; Burke, B.J.; Regnier, F.E.; Lytle, F.E. Electrophoretically mediated microanalysis of leucine aminopeptidase using two-photon excited fluorescence detection on a microchip. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5731–5735.
58. Murakami, Y.; Morita, T.; Kanekiyo, T.; Tamiya, E. On-chip capillary electrophoresis for alkaline phosphatase testing. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 1009–1014.
59. Lee, M.-Y.; Srinivasan, A.; Ku, B.; Dordick, J.S. Multienzyme catalysis in microfluidic biochips. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 20–28.
60. Tseng, W.-L.; Chang, H.-T.; Hsu, S.-M.; Chen, R.-J.; Lin, S. Immunoaffinity capillary electrophoresis: Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen recognition. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 836–846.
61. Chen, S.-H.; Lin, Y.-H.; Wang, L.-Y.; Lin, C.-C.; Lee, G.-B. Flow-through sampling for electrophoresis-based microchips and their applications for protein analysis. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5146–5153.
62. Bromberg, A.; Mathies, R.A. Homogeneous immunoassay for detection of TNT and its analogues on a microfabricated capillary electrophoresis chip. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1188–1195.
63. Koutny, L.B.; Schmalzing, D.; Taylor, T.A.; Fuchs, M. Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 18–22.
64. Chiem, N.; Harrison, D.J. Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: Analysis of monoclonal antibodies and theophylline. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 373–378.
65. Ichiki, T.; Ujiie, T.; Shinbashi, S.; Okuda, T.; Horiike, Y. Immunoelectrophoresis of red blood cells performed on microcapillary chips. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2029–2034.
66. Cheng, S.B.; Skinner, C.D.; Taylor, J.; Attiya, S.; Lee, W.E.; Picelli, G.; Harrison, D.J. Development of a multichannel microfluidic analysis system employing affinity capillary electrophoresis for immunoassay. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1472–1479.
67. Wang, J.; Ibáñez, A.; Chatrathi, M.P.; Escarpa, A. Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5323–5327.
68. Lim, T.-K.; Ohta, H.; Matsunaga, T. Microfabricated on-chip-type electrochemical flow immunoassay system for the detection of histamine released in whole blood samples. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3316–3321.
69. Wang, J.; Ibáñez, A.; Chatrathi, M.P. Microchip-based amperometric immunoassays using redox tracers. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3744–3749.
70. Linder, V.; Verpoorte, E.; Thormann, W.; de Rooij, N.F.; Sigrist, H. Surface biopassivation of replicated poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and application to heterogeneous immunoreaction with on-chip fluorescence detection. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4181–4189.

1076

M. Vlčková, A. R. Stettler, and M. A. Schwarz

71. Linder, V.; Verpoorte, E.; de Rooij, N.F.; Sigrist, H.; Thormann, W. Application of surface biopassivated disposable poly(dimethylsiloxane)/glass chips to a heterogeneous competitive human serum immunoglobulin G immunoassay with incorporated internal standard. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 740–749.
72. Dodge, A.; Fluri, K.; Verpoorte, E.; de Rooij, N.F. Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3400–3409.
73. Rossier, J.S.; Schwarz, A.; Reymond, F.; Ferrigno, R.; Bianchi, F.; Girault, H.H. Microchannel networks for electrophoretic separations, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 727–731.
74. Rossier, J.S.; Girault, H.H. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. *Lab On A Chip* **2001**, *1*, 153–157.
75. Yakovleva, J.; Davidsson, R.; Lobanova, A.; Bengtsson, M.; Eremin, S.; Laurell, T.; Emnéus, J. Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2994–3004.
76. Jiang, G.; Attiya, S.; Ocvirk, G.; Lee, W.E.; Harrison, D.J. Red diode laser induced fluorescence detection with a confocal microscope on a microchip for capillary electrophoresis. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *14*, 861–869.

Received September 1, 2005

Accepted December 14, 2005

Manuscript 6770B



## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Auf dem Gebiet der Affinitätsstudien wurde eine Alternative zu konventionellen Messmethoden gefunden, auf ein miniaturisiertes System übertragen und erfolgreich getestet. Die Messungen auf Chip weisen ganz klare Vorteile auf. Die Trennzeit ist deutlich verkürzt, so dass auch Substanzen mit einer kurzen Halbwertszeit gemessen werden können. Die Methode ist überdies für ein High Throughput Screening geeignet. Da die benötigten Puffer- und Probevolumina gegenüber der Kapillare reduziert sind, können Messungen mit speziellen Reagenzien – wie Dendrimeren, chiralen Peptiden oder, wie hier gezeigt, aufwendig hergestellten künstlichen Rezeptoren – durchgeführt werden, deren Einsatz auf Kapillaren zu kostenintensiv wäre.

Kriterien für erfolgreiche Affinitätsstudien auf Mikrochips waren die Detektierbarkeit einer der Spezies (UV oder elektrochemische Oxidation) und eine deutliche Veränderung der Ionenbeweglichkeit des sich bildenden Komplexes. Im Gegensatz zur kapillaren ACE stellt die Auswahl von Puffersubstanzen hinsichtlich der resultierenden elektrophoretischen Ströme als auch von geeigneten Referenzsubstanzen eine grössere Herausforderung dar.

Einige Aspekte der Messmethodik auf dem Chip sind noch verbesserungswürdig. Die Injektion sollte zukünftig auch hydrodynamisch erfolgen können, da während einer elektrokinetischen Injektion die Probe während des Injektions- und Separationsschrittes in den Trennkanal diffundieren kann. Eine weitere Problematik der elektrokinetischen Detektion besteht in der Diskriminierung von kationischen und anionischen Analyten. Es ist jedoch in näherer Zukunft zu erwarten, dass – hinsichtlich zuverlässiger Injektionsmengen und Vorhandensein alternativer Methoden – technische Lösungen gefunden werden. [1,2] Des Weiteren ist es künftig

---

sinnvoll, sich nicht auf UV-Detektion zu beschränken, da die Nachweisgrenze zu hoch ist, um Real-Proben im unteren mikromolaren Bereich messen zu können. Sowohl der Einsatz von Fluoreszenzdetektoren als auch Kopplungen mit Massenspektrometern sind eine sinnvolle Ergänzung. Jedoch sollte die Weiterentwicklung der im Vergleich unproblematischen UV-Detektion nicht ausser Acht gelassen werden, da sie ubiquitär einsetzbar ist. Eine Verkleinerung der Nachweisgrenze würde Messungen in Kanälen mit deutlich geringeren Querschnitten ermöglichen. Der Trend geht in Richtung Herstellung von Nano-Kanälen, womit sich wesentlich bessere Trenneffizienzen bei höheren elektrischen Feldern erzielen lassen.

Auch wenn noch nicht kommerzialisiert, so besteht die Möglichkeit der parallelen Messungen mit Multi-Kanal-Mikrochips und flexibler Veränderung der Pufferzusammensetzung, ein wichtiges Kriterium, ACE-Messungen zu automatisieren. Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft planare elektro-phoretische Trennsysteme vermehrt für diese Zwecke eingesetzt werden.

#### Literaturverzeichnis von Kapitel 6

- [1] C.-C. Lin, C.-C. Chen, C.-E. Lin, S.-H. Chen, J. Chromatogr. A 1051 (2004) 69.
- [2] S. Büttgenbach, R. Wilke, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 733.

---

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 01: Gelelektrophorese	14
Abb. 02: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese	15
Abb. 03: Schema der Kapillare mit dazugehörigem Elektropherogramm.	17
Abb. 04: Elektropherogramme	20
Abb. 05: Injektion und Trennung auf dem Chip	21
Abb. 06: Schematischer Aufbau des Shimadzu-Chips	23
Abb. 07: Peak- und daraus errechnete Mobilitätsverschiebung	28
Abb. 08: Chip-Elektropherogramme mit Epinephrin und DMSO	38
Abb. 09: Vergleich der $K_B$ -Kurven auf Chip und Kapillare	46
Abb. 10: Drei Elektropherogramme von Propranolol, DMSO und Ibuprofen	48
Abb. 11: Vergleich AUC und Mobilitätsverschiebung	52
Abb. 12: Peak-Formen	53
Abb. 13: Strukturformeln	54
Abb. 14: Mobilitätsverschiebung des zweiarmigen Rezeptors (>-I-O) mit drei verschiedenen Tripeptiden	57
Abb. 15: Die vier DNA-Nukleotide mit den möglichen Bindungsstellen für Metall-Ionen	59
Abb. 16: Kurven der gemischten Tetramer-Sequenzen, die alle Basentypen enthalten	61
Abb. 17: Kurven der Thymidin-Tetramer-Sequenzen, die sich in der letzten Base unterscheiden	62
Abb. 18: Kurven der gemischten Tetramer-Sequenzen, die je zwei Adenosine und zwei Guanosine enthalten	63
Abb. 19: Kurven der Heptamere, deren Sequenz sich nur in der mittleren Base unterscheidet	67

---

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 01: Fehlerabweichung der verschiedenen Methoden	9
Tab. 02: Die verschiedenen ACE-Methoden	31
Tab. 03: Auswertung der Bodenzahlen	39
Tab. 04: Bodenzahlen auf Kapillare und Chip	40
Tab. 05: Dispersionsprozesse und ihr Einfluss auf Kapillare und Chip	41
Tab. 06: Probe- und Trennvolumen auf Kapillare und Chip	43
Tab. 07: Die Migrationsstrecke [s in cm] und die daraus berechneten Mobilitäten [ $\mu$ in $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] aus Abb. 10	49
Tab. 08: Wechselwirkungen von Metall-Ionen mit unterschiedlichen Einzelstrang-DNA-Sequenzen	66

---

## Literaturverzeichnis

- L. D'Alfonso, M. Collini, G. Baldini, *Biochim. Biophys. Acta* 1432 (1999) 194.
- C. Arnulphi, L. Jin, M.A. Tricerri, A. Jonas, *Biochemistry* 43 (2004) 12258.
- M.H.A. Busch, L.B. Carels, H.F.M. Boelens, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 311.
- M.H.A. Busch, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 329.
- J.N. Butt, F.A. Armstrong, J. Breton, S.J. George, A.J. Thomson, E.C. Hatchikian, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 6663.
- S. Büttgenbach, R. Wilke, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 733.
- H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese*, Friedrich Vieweg, Braunschweig, 1994.
- S.V. Ermakov, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3512.
- N.A. Frøystein, J.T. Davis, B.R. Reid, E. Sletten, *Acta Chem. Scand.* 47 (1993) 649.
- N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M.M. Singh, *Biochemistry* 5 (1966) 467.
- M. Gupta, S. Alam, R. Bhatnagar, *Arch. Biochem. Biophys.* 446 (2006) 28.
- B. Hartzell, B. McCord, *Electrophoresis* 26 (2005) 1046.
- X. He, D. Li, A. Liang, B. Lin, *Electrophoresis* 285 (2002) 285.
- S. Hjertén, *J. Chromatogr. A* 347 (1985) 191.
- M.P. Hughes, M. Shang, B.D. Smith, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 4510.
- S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenröder, A.W. Moore Jr., J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3472.
- A. Kandededara, D.B. Rorabacher, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3140.
- A.E. Kelly, H.D. Ou, R. Withers, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 12013.
- M. Kwon, S. Jeong, K.H. Lee, Y.-K. Park, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13996.

- 
- H. J. Lee, Y. Yan, G. Marriott, R.M. Corn, *J. Physiol.* 563 (2005) 61.
- R. Levicky, A. Horgan, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 143.
- D. Liang, J. Zhang, B. Chu, *Electrophoresis* 24 (2003) 3348.
- C.-C. Lin, C.-C. Chen, C.-E. Lin, S.-H. Chen, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 69.
- R.H.H. Neubert, M.A. Schwarz, Y. Mrestani, M. Plätzer, K. Raith, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1663.
- A.A. Ouameur, H.-A. Tajmir-Riahi, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 42041.
- A.V. Rudnev, S.S. Aleksenko, O. Semenova, C.G. Hartinger, A. Timerbaev, R., B.K. Keppler, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 121.
- H.-H. Rüttinger, in R.H.H. Neubert, H.-H. Rüttinger (Editors), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel, 2003, p. 23.
- E.L. Schmid, A.-P. Tairi, R. Hovius, H. Vogel, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1331.
- H. Sigel, R. Griesser, *Chem. Soc. Rev.* 34 (2005) 875.
- D.S. Smith, J.R. Kramer, *Anal. Chim. Acta* 363 (1998) 21.
- N.C. Stellwagen, C. Gelfi, P.G. Righetti, *Biopolymers* 42 (1997) 687.
- J. Vinje, J.A. Parkinson, P.J. Sadler, T. Brown, E. Sletten, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 1620.
- D.J. Winzor, *J. Mol. Recognit.* 13 (2000) 279.
- B. Zhang, M.M. Palcic, H. Mo, I.J. Goldstein, O. Hindsgaul, *Glycobiology* 11 (2001) 141.
- C.-X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2656.

---

## Kollaborationen

Paper II:

Philipp Krattiger und Helma Wennemers  
Universität Basel  
Institut für Organische Chemie  
St. Johann-Ring 19  
CH 4056 Basel

Paper III:

Valérie Chaurin, Edwin C. Constable und Catherine E. Housecroft  
Universität Basel  
Institut für Anorganische Chemie  
Spitalstr. 51  
CH 4056 Basel



## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Alexandra Ruth Stettler

Geburtstag: 21. 11. 1976

Heimatort: Eggwil BE

Eltern: Paul Stettler, geb. 17. 06. 1944  
Ruth Stettler, geb. 19. 04. 1953

Familienstand: ledig

Schulbildung: 04. 1983 – 04. 1988, Primarschule in Birsfelden  
04. 1988 – 06. 1992, Latein-Typus am Progymnasium  
Birsfelden  
08. 1992 – 12. 1995, Latein-Matura am Gymnasium  
MuttENZ

Studium: 10. 1996 – 11. 2002, Pharmazie-Studium an der  
Universität Basel mit dem Abschluss als eidgenössisch-  
diplomierte Apothekerin  
06. 2003 – 08. 2006, Dissertation im Departement  
Chemie der Universität Basel

Während meiner Doktorarbeit habe ich Vorlesungen der folgenden DozentInnen besucht: Gabriele Betz, Jürgen Drewe, Alex N. Eberle, Beat Ernst, Matthias O. Hamburger, Peter C. Hauser, Paul L. Herrling, Karl G. Hofbauer, Stephan Krähenbühl, Klaus Müller, Michael Oehme, Maria Schwarz, Urs Séquin, Angelo Vedani, Helma Wennemers, Hans-Peter Wessels