

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Mikrofluidikai immobilizált enzimreaktorok
kialakítása proteomikai alkalmazásokhoz**

Nagy Cynthia Nóra

Témavezető: Dr. Gáspár Attila



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

I. Bevezetés és célkitűzések

A proteomikai kutatások célja egy adott sejt vagy szövet fehérjeállományának minél alaposabb megismerése. Az analitikai kémia széles eszköztárat biztosít a proteom feltérképezésére, ahol az egyes technikák alkalmazása más-más információt szolgáltat. Az egyik legfontosabb kérdés általában az, hogy a vizsgálandó mintában milyen fehérjék találhatóak (tekintettel a poszttranszlációs módosulásokra is) és azok milyen mennyiségben fordulnak elő. A kérdés megválaszolására az elválasztástechnikával kapcsolt tömegspektrometrián (MS) alapuló analitikai módszerek kitűnően alkalmazhatóak. Attól függően, hogy a fehérjét intakt, részlegesen hidrolizált vagy teljesen hidrolizált formájában analizáljuk, megkülönböztethetünk top-down, middle down/up és bottom-up proteomikát. A három stratégia közül a bottom-up módszernek van a legnagyobb múltja, azonban napjainkban egyre népszerűbb a top-down proteomika, ami a tömeganalizátorok fejlődésének és alternatív fragmentációs technikák alkalmazásának köszönhető.

A bottom-up proteomikában - ahogy az elnevezés is sejteti - kisebb peptid-darabokból rakjuk össze a “teljes képet”. Általában egy (vagy több) proteáz enzim alkalmazásával történik a fehérjék hidrolízise. A már néhány évtizede erősödő miniatürizálási trendek a proteomikai módszerfejlesztésben is megjelentek, főleg az enzimés emésztés optimalizálását megcélozva. A legtöbb esetben ezen mikrofluidikai rendszerek az enzimet egy szilárd hordozóhoz rögzített formában tartalmazzák, ezeket mikrofluidikai immobilizált enzimreaktoroknak (μ -IMER) nevezzük. Ellentétben a hagyományos oldatfázisban lejátszódó reakciókkal, melyekben az enzim szabad formában van jelen, az immobilizált enzim egyrészt könnyen újrahaználható, másrészt kevésbé képes önemésztésre és ebből fakadóan aktivitását is tovább megőrizheti. Ezenkívül a mikroreaktorok nagy felület-térfogat aránya jelentősen növeli az enzim-szubsztrát arányt, így nagyságrendekkel gyorsabban megy végbe a reakció. A felsorolt előnyöknek köszönhetően növekvő érdeklődés mutatkozik a μ -IMER eszközök kifejlesztése és proteomikai

alkalmazása iránt, az utóbbi években közel száz publikáció jelent meg évente ezen a területen.

Reál mintáknál gyakran előfordul, hogy a fehérjék csak kis koncentrációban, míg egyéb szennyező komponensek nagy mennyiségben vannak jelen. Ilyenkor egyfajta tisztítási, elődúsítási lépést érdemes alkalmazni (pl.: szilárd fázisú extrakció (SPE)), ahol a célkomponenseket egy nagyobb térfogatból egy kisebb térfogatra juttatjuk. Az SPE egy általánosan használt eszköze a bottom-up proteomikában gyakran alkalmazott sómentesítésnek, amellyel a mintában jelenlevő zavaró komponensektől meg lehet szabadulni. Bizonyos esetekben azonban csak korlátozott mintatérfogat áll rendelkezésre. Kapilláris elektroforézis (CE) rendszerekben lehetőség van on-line minta-stacking jelenségek alkalmazására, ahol az elemző egységen belül (kapilláris) történik meg a komponensek dúsítása és így gyakorlatilag kiküszöbölhető a mintavesztés. Ezen technikák közé tartozik az elektromos térrel erősített minta-stacking (FASS), a (tranzien)-izotachoforézis ((t)-ITP) vagy a dinamikus pH-csatlakozás (DPJ).

Munkám során két fő célkitűzés fogalmazódott meg. Egyrészt olyan könnyen és gyorsan előállítható μ -IMER eszközöket kívántam kifejleszteni, melyekkel akár percek alatt végre lehet hajtani a fehérje-emésztéseket. Másrészt, célom volt megvizsgálni a sómentesítés szükségességét és ehhez szorosan kapcsolódóan egy olyan on-line minta-stacking jelenséget kihasználó CE-MS módszert kidolgozni, mellyel növelhető a peptid-, ill. fehérjetalálatok száma.

II. Alkalmazott módszerek

A mikrofluidikai csipeket polidimetilsziloxánból (PDMS) készítettem el lágy litográfias módszerrel. A mikrocipek csatornarendszerét AutoCAD szoftverrel terveztem meg (v.2013, Autodesk, San Rafael, CA, USA). Két típusú mintázatot használtam. Az egyik egy szélesebb csatorna (w: 375 μ m), melyben szabályos elrendezésben pillérszerű struktúrákat helyeztem el, a másik egy keskenyebb csatornából (w: 25-75 μ m) álló serpentin mintázat. A tripszint spontán adszorpcióval immobilizáltam a PDMS felületre. Frissen

készített tripszinoldatot (20 mg/ml) áramoltattam keresztül a csatornán (2 μ l/perc, 10 perc), majd a csatorna falán nem adszorbeálódott tripszint 25 mM NH_4HCO_3 - oldattal mostam ki (2 μ l/perc, 10 perc). A folyadékok mikrocsonnában történő áramoltatásához perisztaltikus pumpát használtam (IPC, Ismatec, Cole-Palmer, IL, USA). A folyadékcsatlakozás megteremtéséhez pumpacsövet (belső átmérő: 0,19 mm, Tygon, Cole-Palmer, IL, USA) csatlakoztattam a csatorna bemeneti portjához. Az in-line IMER-CE-MS rendszer esetében elektrosztatikus kölcsönhatással történt a tripszin rögzítése a kapilláris kezdeti ~ 2 cm hosszú szakaszára.

A mikroreaktorok hatékonyságának vizsgálatát különböző fehérjeminták (humán szérum albumin – HSA, kigyóméreg, emberi könny és nyál) emésztésével végeztem el és azokat oldatban emésztéssel hasonlítottam össze. A minták előkészítése során a következő segédanyagokat alkalmaztam: karbamid, mely megbontja a fehérjék harmadlagos szerkezetét; ditiotreitolt (DTT), mely redukálja a diszulfid-hidakat és jóacetamid (IAM), melynek az a szerepe, hogy megakadályozza a diszulfid-hidak rekombinálódását azáltal, hogy alkilezi a keletkező szabad SH-csoportokat. Az elegyeket ezután 25 mM NH_4HCO_3 - oldattal hígítottam annak érdekében, hogy a karbamid koncentrációját olyan értékre csökkentsem ($c < 1$ M), mely már nem veszélyezteti a tripszin aktivitását, ill. hogy biztosítsam az optimális pH-t az enzim emésztéséhez. Mikroreaktorral történő emésztésekhez az így előkészített mintákat áramoltattam keresztül a reaktoron. Oldatban emésztés esetén a mintához tripszinoldatot adagoltam (tripszin:fehérje = 1:50), a proteolízist 1% hangyasav oldattal állítottam le, 16 órás inkubáció után.

A peptidegységek analízisét kapilláris zónaelektroforézissel (CZE) végeztem el fotometriás (UV), ill. MS detektálással. A CZE elemzéseket egy Agilent 7100 típusú CE készülékben hajtottam végre (Agilent, Waldbronn, Németország). UV detektáláshoz a detektálás hullámhosszát 200 nm-re állítottam (4 nm sávzélesség, referencia nélkül, válaszidő: 0,3 s). MS detektáláshoz egy maXis II qTOF-MS (Bruker) berendezést használtam. A CE és MS közötti kapcsolatot egy CE-ESI Sprayer (G1607B, Agilent) interfész biztosította. A segédfolyadékot egy 1260 Infinity II izokratikus pumpa

(Agilent) szállította. Segédfolyadékként izopropil-alkohol:víz = 1:1 + 0,1 % FA összetételű elegy szolgált, az áramlási sebesség 4 µl/perc volt. Az elemzésekhez általában 90 cm hosszú kvarckapillárisokat (ID: 50 µm) használtam (Polymicro, Phoenix, AZ, USA). A mintabevitel hidrodinamikus injektálással, a kapilláris anódhoz közeli végén (pozitív polaritás) történt. Háttérelektrolitént (BGE) általában 1 M hangyasav (pH=1,9) szolgált. Az alkalmazott feszültség jellemzően +25-30 kV volt, a kapilláristeret 25 °C-on termosztáltam. Az MS készülék beállításai: pozitív ion mód; vizsgált m/z tartomány: 50-2200; MS frekvencia 3 Hz; MS/MS frekvencia a prekursorion intenzitásától függően 1-4 Hz. Termékionokat ütközés által kiváltott disszociációval (CID) generáltam.

A folyadékok mikrocatornában való áramlását COMSOL Multiphysics (Burlington, MA, USA) szoftverrel tanulmányoztuk (ver.: 5.3), melynek működése végeelem analízisen (FEM) alapul.

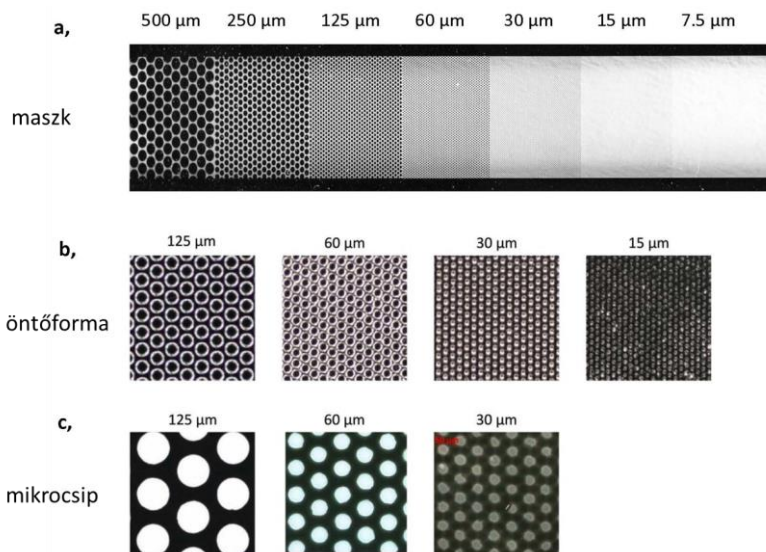
III. Új tudományos eredmények

1. Elsőként alakítottunk ki PDMS mikrocsipben nagy fajlagos felületet biztosító pillérszerű struktúrát enzimreaktorként való alkalmazáshoz.

1.1 Megállapítottuk, hogy a lágy litográfias módszerrel a pillérek miniatürizálásának alsó határa ~25-30 µm.

A mikrofluidikai csip tervezésekor a lehető legegyszerűbb módon kívántuk növelni annak fajlagos felületét. Mivel a reaktor - elrendezését tekintve - egy teljes keresztmetszetében nyitott csatorna (nincs benne utólagosan kialakított fajlagos felület-növelő egység, pl.: porózus réteg, monolit vagy szilika részecskék), olyan csatorna kialakítása volt a cél, melynek fajlagos felületét geometriai elemekkel lehet növelni: pilléreket helyeztünk a csatornába a csipkészítéshez használt lágy litográfias technikával. A felület-térfogat (S/V) arány szempontjából sokkal kedvezőbb, ha a pillérátmérőt és a pillérközi távot minimalizáljuk, azonban az általunk alkalmazott módszernek megvannak a maga sajátos korlátai. A mikrogyártási eljárás két fő lépésből áll: először az öntőformát készítjük el fotolitográfiával, melynek során egy általunk tervezett

litográfiás maszkon található mintázatot alakítjuk ki egy fényérzékeny réteget tartalmazó szilícium-lapkán; majd erről az öntőformáról készítünk másolatokat PDMS felhasználásával. A mikrogyártási eljárásunk optimalizálásakor megállapítottuk, hogy $\sim 25\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$ méretig tudunk miniatürizálni (1. ábra), mely már jelentős S/V aránybeli növekedést eredményezett az ilyen méretű pilléreket tartalmazó csatornák esetén.



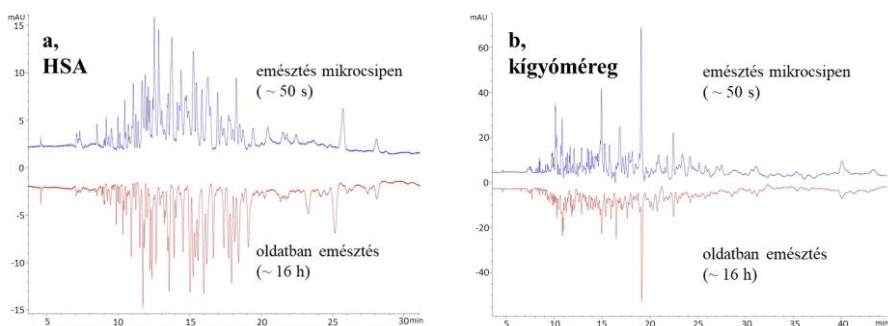
1. ábra: (a) a litográfiás maszkról készült kép, melyen a csökkenő átmérőjű pilléreket tartalmazó csatorna található, (b) a kialakított öntőforma releváns részeinek kinagyított képe és (c) az öntőforma felhasználásával készített mikrocsip mikroszkópos képei.

Ugyan az irodalomban előfordulnak olyan pillérszerkezettel rendelkező mikrocsatornák, ahol a pillérek átmérője $5\text{ }\mu\text{m}$, ezek kialakítását költséges berendezésekkel speciális infrastruktúrát igényelve (pl. tisztaszoba), száraz maratásos mikrofabricációs technikával végzik el.

1.2 A kialakított mikrocsippel történő emésztés hatékonyságát összehasonlítottuk az oldatban emésztés hatékonyságával. Igazoltuk, hogy a kétféle módszerrel kapott elektroferogramokon a csúcsmintázatok és a

beazonosított fehérjék hasonlóak. A hasonló emésztési hatékonyság úgy volt elérhető, hogy az oldatban emésztés esetén alkalmazott 16 órás reakcióidőt ~ 1 perc időtartamra csökkentettük az IMER használatával.

Komplexitásukban különböző fehérjeminták emésztését végeztem el a mikroreaktorral (HSA, kigyóméreg). Oldatban emésztéssel összevetve, a CZE-UV peptid térképek nagy hasonlóságot mutattak (2. ábra). Egyik minta esetében sem találtunk emésztetlen fehérjére utaló jelet a csúcsmintázatban (széles, elnyúló csúcs). A CE-MS/MS vizsgálatok is alátámasztották az IMER megbízhatóságát; peptid- és fehérjetalálatok tekintetében is jó egyezést mutattak az oldatban, ill. a mikroreaktorral történő emésztések (HSA esetében ~ 80% szekvencia lefedettséget értünk el mindkét módszerrel).



2. ábra: Mikrocsipen történő és oldatban emésztéssel kapott (a) HSA és (b) kigyóméreg minta CZE-UV peptid térképei.

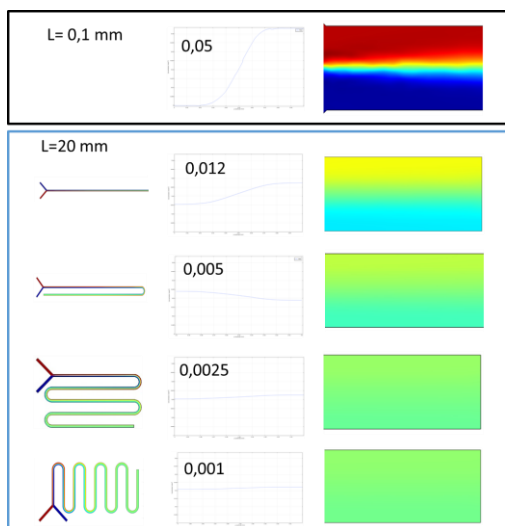
2. Megállapítottuk, hogy kis belső átmérőjű (< 100 μm), hosszú (> 20 cm) üres csatornák is – nagy fajlagos felületük révén – hatékonyan alkalmazhatók enzimreaktorként.

2.1 Megállapítottuk, hogy nem előnyös a belső átmérők csökkentése 25 μm alá, ill. növelése 100 μm fölé, mivel a túl keskeny csatornában jelentős ellennyomás lép fel, ugyanakkor a túl széles csatornák alkalmazása csökkentheti az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kialakulását.

Miniaturizálással az üres csatornák esetén is jelentősen növelhető a fajlagos felület. Ebben az esetben csupán a csatornák falán található immobilizált enzim, így a csatornák szélességének csökkentésével a diffúziós úthossz is csökken, mely kedvez az enzim-szubsztrát kölcsönhatások kialakulásának. Kimutattuk, hogy egy 100 μm széles csatornában 20 s szükséges ahhoz, hogy egy albumin molekula a csatorna közepétől diffúzióval eljusson a csatorna faláig, míg ez az idő csupán ~ 1 s, ha a szélességet 25 μm -re csökkentjük. Ilyen keskeny csatornában azonban jelentős ellennyomás lép fel. Egy 20 cm hosszú reaktorban 10 μl minta átáramoltatásához szükséges idő több mint 10 óra egy 10 μm széles csatornában, ugyanez a folyamat viszont csupán ~ 15 perc, ha a csatorna szélessége 25 μm . Ezen megfontolások alapján a 25-75 μm szélességű csatornák alkalmazását találtuk optimálisnak.

2.2 Számítógépes szimulációkkal igazoltuk, hogy szűk (25-100 μm), üres csatornában a nagyon lamináris áramlás ($\text{Re} < 1$) ellenére is, a csatornába iktatott kanyarulatok elősegítik az oldatbeli komponensek passzív keveredését.

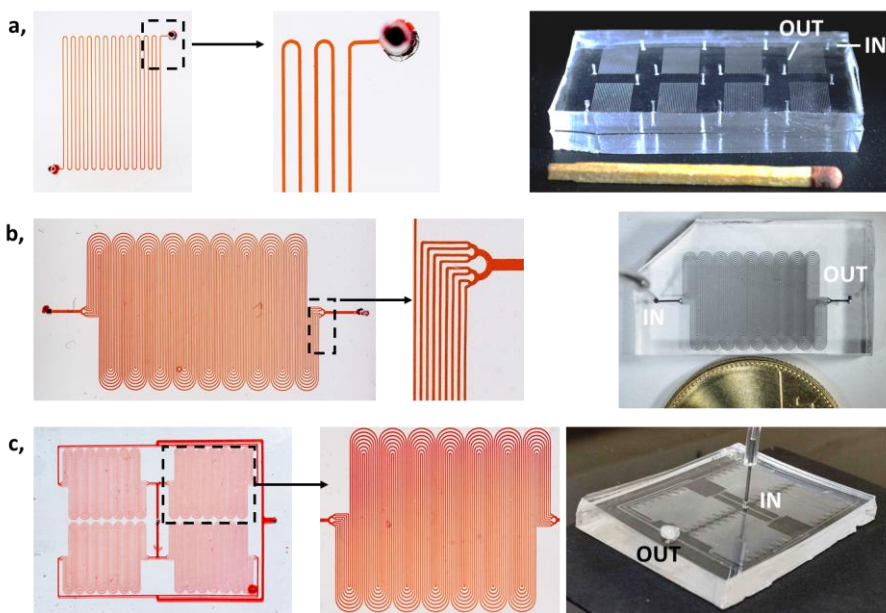
Mikrofluidikai csatornában az áramlás általában erősen lamináris jellegű (áramvonalak párhuzamosan haladnak). A folyadékrétegek elegyedését legegyszerűbben passzív keverőelemek közbeiktatásával lehet elérni. Passzív keverőnek számít a kanyarulat, mely másodlagos folyadékáramot generálva (Dean-örvények) növelheti a diffúziós felületet. A szakirodalomban nincs egyetértés arra vonatkozóan, hogy a kanyarulatoknak milyen mértékű hozzájárulása van a keveredéshez, de kimutatták, hogy a Dean-hatás leginkább olyan rendszereknél jelentős, ahol $\text{Re} > 10$. A mi rendszerünkben COMSOL szimulációkkal igazoltuk, hogy az erőteljes laminaritás ($\text{Re} < 1$) ellenére is van hatása a kanyarulatoknak (3. ábra). A legnagyobb hozzájárulása az első kanyarulatnak van, míg az utolsó kanyar keveredésre gyakorolt hatása csupán 10 % az elsőhöz képest.



3. ábra: Több kanyar hatása a folyadékok keveredésére. A felső panel a kezdeti koncentráció-viszonyokat mutatja ($L = 0,1$ mm), az alsó panelben a végső koncentráció-eloszlások láthatók ($L = 20$ mm) négy különböző csatorna esetére: egyenes, 1-, 4- és 8 görbületet tartalmazók ($L = 20$ mm, $ID = 100$ μ m).

2.3 Annak érdekében, hogy az alkalmazható (össz)folyadékáramlási sebességet növelhessük és így az emésztési időt csökkenthessük, olyan mintázatokat fejlesztettünk ki, melyekben a csatornák bemeneti portjánál a folyadékáramot 8 vagy 32 párhuzamos csatornába osztottuk.

A mikroreaktorokban a kontaktidőt tovább növeltük oly módon, hogy osztott folyadékáramú csatornákat alakítottunk ki, ahol egy folyadék bemenethez 8, ill. 32 párhuzamosan futó szerpentin csatorna csatlakozik (4. ábra). Az utóbbi esetében a bejuttatott folyadékot először 4, majd további 8-8 részre osztottuk. Az osztott folyadékáram előnye, hogy a szubsztrátoldat nagyobb felületen érintkezik az immobilizált enzimmal a nagyobb (össz)folyadékáramlási sebesség alkalmazása mellett is.



4. ábra: Különböző csatornarendszerű PDMS mikrocsipek (jobb oldalt). Bal oldalon a piros ételfestékkel megtöltött csatornák. Csatornák paramétereit: $ID = 25 \mu\text{m}$; $L = 20 \text{ cm}$; csatornák száma: (a) 1; (b) 8 és (c) 32.

3. Kifejlesztettünk egy olyan in-line IMER-CE-MS rendszert, melyben az immobilizálás, az emésztés, az elválasztás és a detektálás teljesen automatizáltan megy végbe. Az elválasztáshoz használt kapilláris kezdeti szakasza ($\sim 2 \text{ cm}$) tartalmazza a reaktor részt.

On-line és különösen in-line rendszerek esetén fontos az egyes egységek megfelelő működéséhez szükséges kísérleti körülmények összehangolása. Esetünkben az immobilizálás, az emésztés és az elválasztás ugyanabban az elemző egységben történt (kvarckapilláris). A tripszint csupán a kapilláris kezdeti szakaszára ($\sim 2 \text{ cm}$) rögzítettük adszorpcióval. A tripszin viszonylag magas izoelektromos pontja révén ($pI \sim 10,3$) tág pH-tartományban nettó pozitív töltéssel bír, s így kézségesen kötődik meg a kvarckapilláris negatív töltésű felületén (szilanol-csoportok $pH \sim 4$ értéknél deprotonálódnak).

Az emésztéshez a tripszin optimális működéséhez szükséges pH-t biztosítottuk (pH ~ 8). Mivel MS készülékkel történt a detektálás, az elválasztáshoz használt BGE illékony kellett legyen. Mindezen feltételeknek az NH_4Ac oldat tett eleget (40 mM, pH = 8,0). Az in-line rendszerrel HSA-t és emberi könnymintát emésztettünk. Oldatban emésztéssel összevetve, a peptidterképek és fehérjetalálatok száma is összhangban voltak.

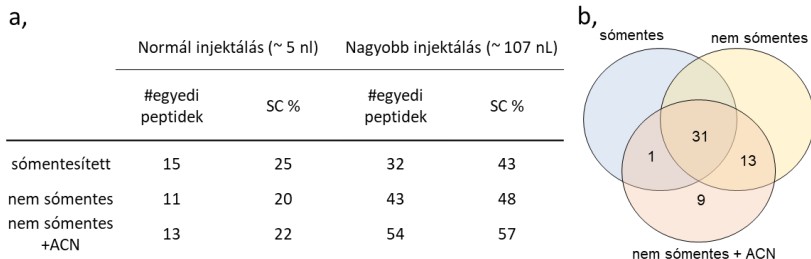
4. Kimutattuk, hogy a fehérje emésztmények a szokásos mintaelőkészítés (pl.: SPE, puffercsere) nélkül is megfelelő mintamátrixszal rendelkeznek a CE során történő on-line minta-stacking előidőzéséhez.

4.1 Megállapítottuk, hogy a fehérje emésztmények kapilláris zónaelektroforetikus elválasztása során a minta sótartalma (NH_4HCO_3) révén t-ITP effektus alakulhat ki.

A bottom-up munkafolyamatban az emésztményeket gyakran sómentesítik elemzések előtt a mátrixkomponensek eltávolítása érdekében. CZE elemzéseknél nagy mintatérfogat injektálásakor a mintamátrix összetételétől függően különböző on-line minta-stacking mechanizmusok léphetnek fel. Ennek tanulmányozásához HSA emésztmények elemzését végeztem el. Sómentesített minták esetén elektromos térrel erősített minta-stacking (FASS) a fő mechanizmus, a nem sómentesített mintáknál viszont főleg tranziens-izotachoforézis (t-ITP) felelős a mintadúsulásért. A bottom-up elemzéseknél alkalmazott mintaelőkészítés során jelentős mennyiségű NH_4HCO_3 kerül a mintákba, így az NH_4^+ ionok vezető ionként fognak viselkedni, t-ITP jellegű állapotot előidézve. Az injektált mintatérfogat növelésével arányosan változtak a csúcsintenzitások is, míg a csúcsok szélesedése a legtöbb peptid esetén csak kis mértékű volt.

4.2 Kimutattuk, hogy a bottom-up proteomikában az emésztményeknek az általánosan használt SPE töltettel való sómentesítése nem jár előnyökkel a CE-MS mérések esetében.

Az emésztmények a mintaelőkészítésnek köszönhetően nagy sótartalommal rendelkeznek, mely általában zavarja az elemzéseket. A sótartalom eltávolítását leggyakrabban SPE sómentesítő egységekkel végzik el. Kísérleteim során összehasonlítottam a sómentesített és nem sómentesített HSA emésztmények CE-MS elemzése esetén kapott peptidtalálatokat. Az SPE C18-as tölteten megkötött peptideket ACN:víz = 70:30 + 0,1% FA- tartalmú eleggyel eluáltam. Mivel így jelentős mennyiségű szerves oldószer került a mintába, egy FASS-típusú minta-stacking történt. Nem sómentesített mintákhoz képest a csúcshintenzitások hasonlóak, mivel mindkét esetben történik minta-stacking (melyek fő mechanizmusa eltér). A talált peptidek számában azonban jelentős eltérés volt tapasztalható (5. ábra). Sómentesítés során előfordulhat peptid-vesztés, ugyanis a kis méretű, hidrofil peptidek nem kötődnek meg a C18 fázison, így a sókkal együtt távoznak. A harmadik mintatípus (nem sómentes + ACN) esetén kaptuk a legjobb eredményeket. A sókat és szerves oldószert is tartalmazó mintáknál feltehetően t-ITP és FASS effektusok erősítik egymást.



5. ábra: A három mintatípus esetén kapott eredmények: (a) szekvencia lefedettségek, ill. egyedi peptidtalálatok száma normál és nagyobb mintainjektálásoknál és (b) Venn-diagram, mely a közös peptidtalálatokat is szemlélteti stacking körülmények mellett. Az ábrán feltüntetett adatok a minták ötszöri ismétlésével kapott átlagértékek.

IV. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

A proteomikai kutatások célja a fehérjeminták minél kimerítőbb jellemzése. Megközelítéstől (top-down, middle-down/up vagy bottom-up) függően eltérő információhoz juthatunk, melyek egymást kiegészítve egy teljesebb képet alkothatnak a fehérjemintáról. A bottom-up proteomikát rutinszerűen alkalmazzák fehérjék szekvenciájának megismerésére, igazolására vagy biológiai minták minőségi és mennyiségi karakterizálására és egyre nagyobb jelentősége van a gyógyszeranalitika területén a fehérjealapú gyógyszerek elterjedésének köszönhetően. A bottom-up stratégia a fehérjék enzimés emésztésén alapul, mely általában a munkafolyamat sebességhatározó lépése (2-24 óra). Célszerű olyan módszereket kidolgozni, mellyel ez a lépés nagyságrendekkel gyorsabban végbemehet. A kialakított immobilizált enzimreaktorok képesek percek alatt biztosítani az oldatban emésztéssel (16 óra) elérhető hatékonyságot. Nagy előnye ezen reaktoroknak, hogy az tripszin immobilizálása nem igényel származékképző reagenseket, egyszerűen érintkezésbe hozzuk az enzimoldatot a hordozó közeggel, ebből kifolyólag könnyen regenerálhatóak. Az in-line IMER rendszer alkalmazása egy teljesen automatizált munkafolyamatot tesz lehetővé.

Az enzimés emésztésen túlmenően kiemelkedő fontosságú a keletkezett peptidek elemzése is. Az emésztményekben lévő sók és szennyező komponensek eltávolítását gyakran SPE módszerrel végzik el (mely alkalmas a peptidek elődúsítására is, ha a megkötött peptideket kisebb térfogatba eluáljuk). Rámutattunk, hogy a CZE elemzéseket nem zavarja a minta sótartalma, sőt a sótartalomnak köszönhetően on-line minta-stacking lép fel. A sómentesítési lépés elhagyása azért is előnyös, mert így kiküszöbölhető az SPE eredményeként jelentkező peptidvesztés, mely több peptid/fehérje beazonosítását teszi lehetővé.



Nyilvántartási szám: DEENK/145/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Cynthia Nóra
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10063903

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

1. **Nagy, C., Szabó, R., Gáspár, A.:** Microfluidic Immobilized Enzymatic Reactors for Proteomic Analyses-Recent Developments and Trends (2017-2021).
Micromachines. 13 (2), 1-19, 2022. EISSN: 2072-666X.
DOI: <https://doi.org/10.3390/mi13020311>
IF: 3.523 (2021)
2. **Nagy, C., Szabó, R., Gáspár, A.:** Development of an In-Line Enzyme Reactor Integrated into a Capillary Electrophoresis System.
Molecules. 26 (19), 1-14, 2021. ISSN: 1420-3049.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26195902>
IF: 4.927
3. **Nagy, C., Huszánk, R., Gáspár, A.:** Study of the geometry of open channels in a layer-bed-type microfluidic immobilized enzyme reactor.
Anal. Bioanal. Chem. 413 (25), 6321-6332, 2021. ISSN: 1618-2642.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-021-03588-x>
IF: 4.478
4. **Nagy, C., Kecskeméti, Á., Gáspár, A.:** Fabrication of immobilized enzyme reactors with pillar arrays into polydimethylsiloxane microchip.
Anal. Chim. Acta. 1108, 70-78, 2020. ISSN: 0003-2670.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2020.02.048>
IF: 6.558





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (9)

5. András, M., Gyémánt, G., Sajtos, Z., **Nagy, C.**: Analysis of Sugars in Honey Samples by Capillary Zone Electrophoresis Using Fluorescence Detection.
Separations. 10 (3), 1-10-, 2023. EISSN: 2297-8739.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/separations10030150>
IF: 3.344 (2021)
6. Hamidli, N., Pajaziti, B., András, M., **Nagy, C.**, Gáspár, A.: Determination of human insulin and its six therapeutic analogues by capillary electrophoresis ? mass spectrometry.
J. Chromatogr. A. 1678, 1-8, 2022. ISSN: 0021-9673.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463351>
IF: 4.601 (2021)
7. Borrego, J., Naseem, M. U., Sehgal, A. N. A., Panda, L. R., Shakeel, K., Gáspár, A., **Nagy, C.**, Varga, Z., Panyi, G.: Recombinant Expression in Pichia pastoris System of Three Potent Kv1.3 Channel Blockers: Vm24, Anuroctoxin, and Ts6.
J. Fungi. 8 (11), 1-15, 2022. EISSN: 2309-608X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8111215>
IF: 5.724 (2021)
8. **Nagy, C.**, András, M., Hamidli, N., Gyémánt, G., Gáspár, A.: Top-down proteomic analysis of monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry.
Journal of Chromatography Open. 2, 1-21, 2022. EISSN: 2772-3917.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100024>
9. Hamidli, N., András, M., **Nagy, C.**, Gáspár, A.: Analysis of intact proteins with capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry using uncoated and coated capillaries.
J. Chromatogr. A. 1654, 1-9, 2021. ISSN: 0021-9673.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462448>
IF: 4.601
10. **Nagy, C.**, Pesti, A., András, M., Vasas, G., Gáspár, A.: Determination of artemisinin and its analogs in Artemisia annua extracts by capillary electrophoresis: Mass spectrometry.
J. Pharm. Biomed. Anal. 202, 1-7, 2021. ISSN: 0731-7085.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114131>
IF: 3.571
11. Kecskeméti, Á., **Nagy, C.**, Biró, P., Szabó, Z., Pócsi, I., Bartók, T., Gáspár, A.: Analysis of fumonisins mycotoxins with capillary electrophoresis: mass spectrometry.
Food Addit. Contam. Part A-Chem. 37 (9), 1553-1563, 2020. ISSN: 1944-0049.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2020.1778797>
IF: 3.057





12. András, M., Pajaziti, B., Sipos, B., **Nagy, C.**, Hamidli, N., Gáspár, A.: Determination of deamidated isoforms of human insulin using capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. A. 1626, 1-8, 2020. ISSN: 0021-9673.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461344>
IF: 4.759
13. Kecskeméti, Á., **Nagy, C.**, Csósz, É., Kalló, G., Gáspár, A.: The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples.
Proteom. Clin. Appl. 11 (11-12), 1-9, 2017. ISSN: 1862-8346.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201700055>
IF: 3.567

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 52,71

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
19,486**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.05.09.



