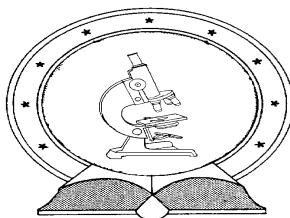


DE TTK



1949

**Fehérjék bontására alkalmas enzimreaktorok
fejlesztése mikrofluidikai csipekben**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Kecskeméti Ádám
témavezető neve: Dr. Gáspár Attila

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2018.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2018. 06. 18.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Kecskeméti Ádám doktorjelölt 2015 - 2018 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2018. 06. 18.

a témavezető aláírása

**FEHÉRJÉK BONTÁSÁRA ALKALMAS ENZIMREAKTOROK
FEJLESZTÉSE MIKROFLUIDIKAI CSIPEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Kecskeméti Ádám okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Doktori Iskolája
(K/2 – Koordinációs és Analitikai Kémia programja) keretében

Témavezető: Dr. Gáspár Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Tóth Imre	
tagok:	Dr. Péter Antal	
	Dr. Vasas Gábor	

A doktori szigorlat időpontja: 2018.04.17.

Az értekezés bírálói:

Dr. Kilár Ferenc	
Dr. Kuki Ákos	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Fábián István	
tagok:	Dr. Németh Krisztina	
	Dr. Galbács Gábor	
	Dr. Bányai István	
	Dr. Kurtán Tibor	

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	7
2. Bevezetés és célkitűzés	9
3. Irodalmi előzmények.....	11
3.1 Fehérjék peptidtérkép vizsgálata	11
3.2 Enzimek immobilizálása	16
3.3 Mikrofluidikai csip alapú enzimreaktorok	21
4. Anyag és módszer	26
4.1 Felhasznált vegyszerek.....	26
4.2 Mikrofluidikai csipek tervezése és készítése.....	27
4.3 Fehérjék tripszines emésztése	29
4.3.1 Fehérjeminták előkészítése tripszines emésztéshez, oldatban emésztés	29
4.3.2 Tripszin immobilizálása és reaktorokon történő emésztés	30
4.3.3 Lowry-féle összfehérje meghatározás	33
4.4 Műszerek.....	35
4.4.1 Atomerő mikroszkópia.....	35
4.4.2 Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia.....	35
4.4.3 Kapilláris elektroforézis	36
4.4.4 nanoLC-MS.....	36
4.4.5 Kapilláris zónaelektroforézissel kapcsolt tömegspektrometria	37
5. Eredmények és értékelésük	39
5.1 Adszorbeált tripszint tartalmazó reaktor	39
5.1.1 Tripszin adszorpciójának vizsgálata poli(dimetilsziloxán) felületen.....	39
5.1.2 Adszorbeált tripszin aktivitásának vizsgálata.....	42
5.1.3 A reaktor emésztésének reprodukálhatósága.....	44
5.1.4 Fehérjeminták emésztése.....	47
5.2 Kovalensen rögzített tripszint tartalmazó reaktor.....	54
5.2.1 Tripszin kovalens rögzítése szilika részecskékre	54
5.2.2 Megkötött tripszin mennyiségének meghatározása	55
5.2.3 A kovalensen rögzített tripszin stabilitásának vizsgálata	58
5.2.4 Reprodukálhatósági vizsgálatok.....	60
5.2.5 Fehérjeminták emésztése.....	63
5.3 Eltérő módon emésztett könnyminták összehasonlítása.....	66

6. Összefoglalás.....	69
7. Summary	73
8. Köszönetnyilvánítás	77
9. Irodalomjegyzék.....	78
10. Függelék	88
11. Publikációs jegyzék.....	108

1. Rövidítések

AFM	atomerő mikroszkópia
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CE	kapilláris elektroforézis
CID	ütközések-indukálta disszociáció
CLEA	kereszt kötött enzim aggregátum
CLEC	kereszt kötött enzim kristály
COC	ciklikus olefin kopolimer
COG	tömegközéppont algoritmus
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
DTT	ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	elektrospray ionizáció
FA	hangyasav
FAB	gyors atom bombázásos ionizáció
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
FT-SPR	Fourier-transzformációs felületi plazmon rezonancia
GOD	glükóz oxidáz
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HSA	humán szérum albumin
IAA	jódecetsav
IAM	jódacetamid
IMER	immobilizált enzimreaktor
LBL	layer-by-layer (adszorpció)
LC	folyadékkromatográfia
MALDI	mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizáció
MS	tömegspektrometria
NHS	N-hidroxisukcinimid
PDDA	poli(diallildimetilammónium klorid)

PDMS	poli(dimetilsziloxán)
PET	poli(etilén-tereftalát)
PMMA	poli(metil-metakrilát)
PTFE	poli(tetrafluor-etilén)
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
QTRAP	hibrid kvadrupól – ioncsapda analizátor
SC%	szekvencia lefedettség
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp
TFA	trifluorecetsav
UV	ultraibolya (sugárzás)

2. Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt 20 évben nagy jelentőséggel bíró tudományterületté vált a proteomika, melynek fő célja az élő szervezet proteomjának, azaz teljes fehérjeállományának felderítése [1], tekintettel az egyes fehérjék szerkezetére, aktivitására és poszttranszlációs módosításaira [2]. A proteomika egyik legjelentősebb módszere a peptidtérkép vizsgálat, melynek alapja a vizsgált fehérjeminták tripszines emésztése, majd ezt követően a peptidek további elemzése [3]. A peptidek elemzésével kapott eredmény – elektroferogram, kromatogram vagy tömegspektrum – ujjlenyomatként jellemzi az adott fehérjét, így teszi lehetővé azok azonosítását.

Enzimek szilárd felületen történő rögzítésével számos módon juthatunk immobilizált enzimreaktorhoz (IMER) [4]. Ezen reaktorok legfőbb előnye, hogy a bennük rögzített enzim stabilabb - tovább megőrzi aktivitását [5], így többször felhasználhatóak és az enzimet könnyű elválasztani a katalizált reakcióban keletkező terméktől. Proteomikai jellegű feladatok során egy további előnyös tulajdonságuk, hogy nem kell a tripszin – szabad formában előforduló – önemésztésével számolni, ami miatt standard oldatban emésztés során nem javallott ezen enzim nagy koncentrációban történő alkalmazása. A reakció jelentősen gyorsabbá tehető, ha a tripszint immobilizált formában, nagy (felületi) koncentrációban alkalmazzuk. Ezen kívül is számos irodalmi példát lehet találni az immobilizált enzimreaktorok analitikai vagy szintetikus célokra történő felhasználására [6].

A mikrofluidikai kutatások fő célja a laboratóriumi eszközök miniatürizálása (*lab-on-a-chip*) és az így nyert eszközök fejlesztése, alkalmazása. Egy-egy mikrofluidikai csip előállítása olcsón és rutinszerűen kivitelezhető poli(dimetilsziloxán)-ból (PDMS) [7], továbbá segítségükkel egyszerre több laboratóriumi művelet is végezhető egymást követően vagy párhuzamosan. Használatuk akkor célszerű amikor a vizsgálandó minta

korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre (akár $<1 \mu\text{L}$), pl. egyes klinikai minták vizsgálatakor.

Kutatómunkám során azt a célt tűztem ki, hogy olyan, immobilizált tripszint tartalmazó enzimreaktorokat készítek, melyek segítségével nagyságrendekkel gyorsabb fehérjebontást lehet végezni, ami nagyban csökkentheti a fehérjék analíziséhez szükséges időt. Annak érdekében, hogy az IMER-ek kis térfogatú minták esetén is alkalmazhatóak legyenek, fontosnak találtam a reaktorok mikrofluidikai eszközökbe integrálását. Ezen megfontolások alapján két típusú reaktort készítettem eltérő immobilizálási stratégiával, melyeket az Eredmények és értékelésük fejezet két külön alfejezetében mutatok be.

3. Irodalmi előzmények

3.1 Fehérjék peptidtérkép vizsgálata

A proteomika kifejezést Marc Wilkins és Keith Williams alkották meg; előbbi egy 1994-es sienai konferencián vezette be a proteom kifejezést, mint a genom által kódolt fehérjék összességét („*protein complement expressed by a genome*”) [8]. Habár a proteomikát többféleképpen lehet definiálni, a legfontosabb jellemzője, hogy egy olyan fehérjékkel foglalkozó tudományágról van szó, amely célul tűzte ki, hogy egy adott szervezet/sejt által termelt fehérjéket minél kimerítőbben tanulmányozza, azaz leírja a fehérjék típusát, funkcióját, aktivitását, szerkezetét, poszttranszlációs módosításait.

A proteomika megszületéséhez nagyban hozzájárultak az 1970-es és 80-as évek tudományos áttörései. Ilyen volt a 2D gélelektroforézis, amit az 1970-es évek második felétől használnak nagyszámú fehérjék elválasztására [9]. Eleinte a 2D gélelektroforézis használatának az elválasztások gyenge reprodukálhatósága szabott határt, azonban a 80-as évek végének fejlesztéseivel sikerült ezt kiküszöbölni. Ekkortól kezdtek immobilizált amfolitokkal kialakított pH gradienst használni az 2D elválasztások izoelektromos fókuszálási dimenziójában [10], továbbá olyan ún. mikroszekvenálási technikák is megjelentek, amikkel a gélen elválasztott „foltokból”, azaz nagyon kis mennyiségű fehérjéből is tudtak szekvenálást végezni [11]. A másik fontos tudományos áttörés, ami megalapozta a fehérjék vizsgálatát az a tömegspektrometria (MS) intenzív fejlődése, különösen a lágy ionizációt lehetővé tévő ionforrások megjelenése. Ilyen ionforrások a gyors atom bombázás (FAB) [12], a mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI) [13] és az elektropray ionizáció (ESI) [14].

A fehérjék azonosítására az 1990-es évek első felétől használnak peptidtérkép vizsgálatokat [15–17]. A módszer elve az, hogy a fehérjék bontásából származó peptidek a kiindulási fehérjét ujjlenyomatszerűen jellemzik; azaz, ha ismeretes a hasító ágens specificitása, akkor előre meg tudjuk

határozni, hogy milyen peptideket várunk a fehérje teljes szekvenciája és a hasítási helyek alapján. Ezek a peptidek egyedi mintázatot adnak analízist követően a kromatogramon, elektroferogramon vagy tömegspektrumon, ami – elsősorban a peptid tömegcsúcsok alapján – lehetővé teszi a fehérjék azonosítását.

A vizsgálat gyakorlati megvalósítása során a fehérjemintát érdemes semleges vagy enyhén lúgos elektrolitban feloldani (pl. 25 mM NH_4HCO_3 , pH=7,8), amellyel a későbbi emésztés során használatos enzim (pl. tripszin) számára optimális pH-t lehet beállítani. Ezt követően a mintát elő kell kezelni denaturáló ágenssel (pl. karbamid vagy guanidin-hidroklorid), amely biztosítja a fehérje szerkezetének kitekerését a könnyebb bontás érdekében. Ezután a diszulfidhidakat bontják meg, leggyakrabban ditiotreitollal (DTT), amit jódecetamiddal (IAM) vagy jódecetsavval (IAA) kombinálva alkalmaznak, hogy a tiolcsoportok alkileződjenek (karbamidometileződés ill. karboximetileződés), így megakadályozva diszulfidhíddá történő regenerálódásukat. Az ezt követő fehérjeemésztést kémiai reagensekkel (pl. bróm-cián) vagy proteáz enzimekkel (pl. tripszin, pepszin) lehet elvégezni [18]. Mivel a fehérjebontó enzimek hajlamosak önmaguk emésztésére, ezért oldatban való használatuk során törekedni kell arra, hogy alacsony koncentrációban alkalmazzuk őket (általában fehérje:enzim=200-20:1) [18], különben az önemésztésükből származó peptidek zavarják az analízist. Emiatt az emésztés időigényes (2-30 óra) [18], még úgy is, ha a bontást szobahőmérsékletnél magasabb hőmérsékleten hajtjuk végre (általában 37 °C-on). Az emésztést követően a tripszin aktivitását meg lehet szüntetni az oldat savanyításával (általában hangyasav (FA) hozzáadásával 0,1% végső koncentrációra) és a kapott oldatot az analízisig érdemes -20 °C-on tárolni. Attól függően, hogy hogyan szeretnénk a továbbiakban analizálni az elegyet, szükséges lehet a minta sómentesítése (különösen MS esetén).

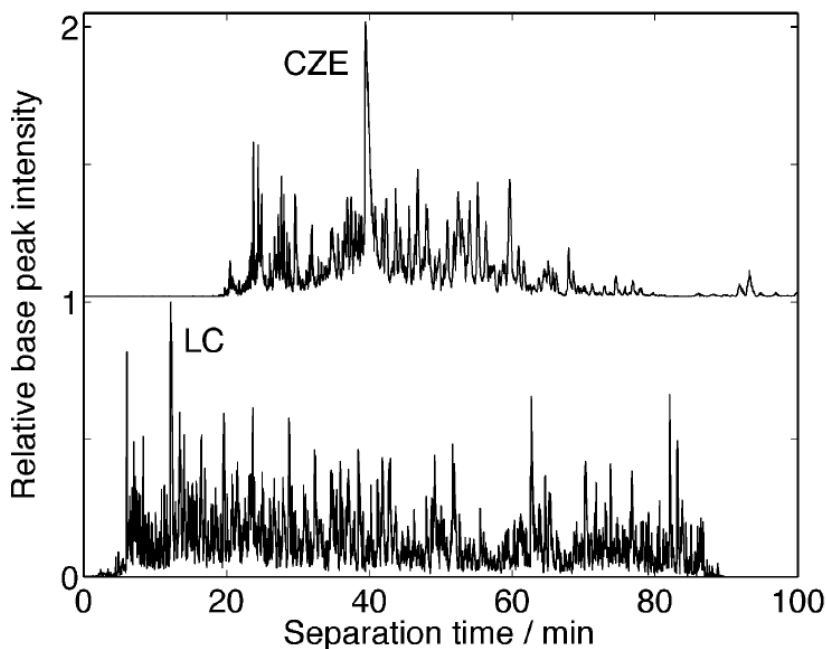
A peptidek detektálását/azonosítását – azaz a peptidtérkép elkészítését – a tandem tömegspektrometria kialakulása alapozta meg a 90-es évek közepén [19], hiszen segítségével az egyes peptidek szekvenciája rutinszerűen

meghatározható. Enélkül nem jöhetett volna létre az ún. *shotgun* (sörétes puska) proteomika [20], melynek lényege, hogy egy fehérjekeverék időigényes 2D gélelektroforetikus elválasztása, majd az azt követő fehérjeemésztés helyett a fehérjekeveréket elválasztás nélkül emésztik, majd általában nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS módszerrel) azonosítják a peptideket. Ez a fehérjeazonosítás (MS/MS ion keresés) azon alapszik, hogy 2D tömegspektrometriával az egyedi peptidek szerkezetét meg lehet határozni, a kapcsolt elválasztás pedig biztosítja, hogy a peptidek ne egyszerre jussanak az MS-be (valójában, annál jobb azonosítást kapunk, minél szélesebb időintervallumban kerülnek be a peptidek a tömegspektrométerbe [21]).

Minél hosszabb egy peptidlánc, annál valószínűbb, hogy nincs jelen csak egy adott fehérje szekvenciájában (azaz ún. egyedi peptid), tehát az analízis célja minél több, ugyanahhoz a fehérjéhez tartozó egyedi peptid megtalálása. Szemléletesebben: mivel 22-féle fehérjeépítő aminosav ismeretes, n aminosavból 22^n különböző peptidlánc építhető fel, ez pl. 6 aminosav esetén 113.379.904 különböző variációt jelent. Így könnyen belátható, hogy egy 5 aminosavegységnél hosszabb peptid jó eséllyel csak egyféle fehérjében fordul elő, azaz egyedi (hogy valóban egyedi-e, az egyértelműen kideríthető internetes fehérjeadatbázisokból). Továbbá, ha ugyanahhoz a fehérjéhez tartozó 2 egyedi peptidláncot sikerül azonosítani egy mintában, a kapott fehérjetalálatot a gyakorlatban elfogadhatónak tekintjük.

Ezen megfontolások figyelembe vételével megérthető, hogy miért a tripszin a legelterjedtebb fehérjebontó reagens: egyrészt kiemelkedő a specificitása, aminek köszönhetően nem jellemző rá a véletlenszerű – hibás – hasítás (lizin és arginin C-terminális peptidkötéseit hasítja), továbbá ezek a hasítóhelyek egymástól jellemzően nagy, de nem túl nagy távolságban fordulnak elő a fehérjék szekvenciájában, így a keletkező peptidek többsége 6-20 aminosavból álló, egyedi peptid, amiről az is tudható, hogy a C-terminális végükön csak bázikus aminosav lehet.

Habár általában a fentebb megadott módon végzik a peptid térkép vizsgálatokat, a peptidok detektálását más analitikai módszerekkel is el lehet végezni. Elválasztáshoz alkalmazható a HPLC mellett kapilláris elektroforézis (CE), MS helyett UV detektálást is végezhetünk, ill. elválasztás nélkül is vehetünk fel tömegspektrumokat (pl. MALDI-MS-sel [22]), így az alkalmazható elválasztó – detektáló rendszerek a következők: CE-UV [23–26], CE-MS [27], (2D) HPLC-UV [23,28], HPLC-MS [20,29,30]. Az LC-MS módszer jelenlegi előnye a CE-MS-sel szemben az, hogy könnyebben megoldható, hogy az emésztés során keletkező peptidok széles időintervallumban eluálódjanak, míg CE elválasztás esetén ennek megvalósítása kevésbé kidolgozott. Dovichi csoportja nemrég egy olyan CE-MS módszert mutatott be, aminek segítségével emésztett HeLa sejtlizátumot analizáltak, s az eredményeket LC-MS-sel hasonlították össze [21]. Az így kapott báziscsúcs elektroferogram, ill. kromatogram látható az 1. ábrán.

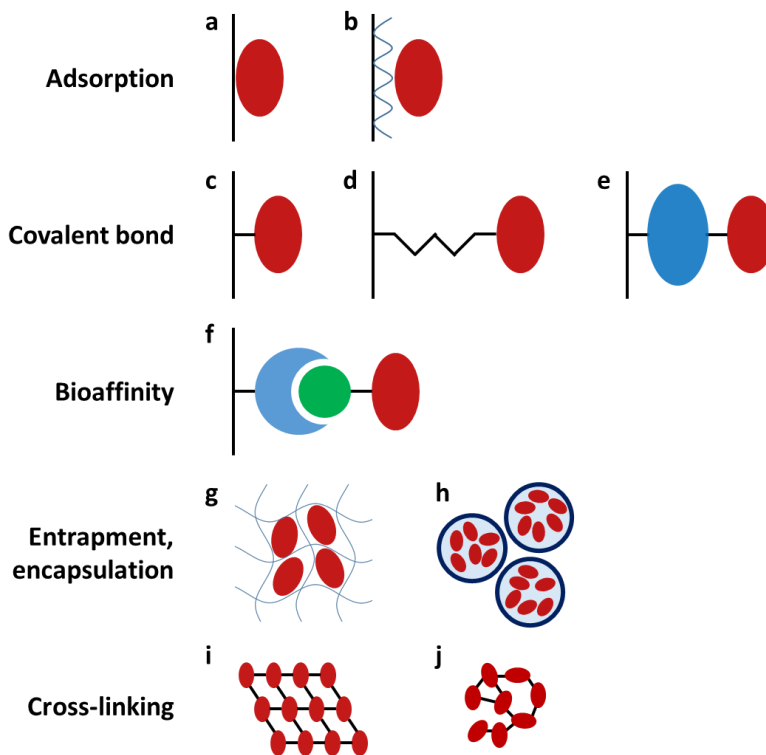


1. ábra: Kapilláris zónaelektroforetikus (CZE-) és LC-MS/MS módszerek összehasonlítása emésztett HeLa sejtlizátum elválasztására. Az ábrát a [21] hivatkozásból illesztettem be, a John Wiley and Sons kiadó engedélyével.

Módszerükkel sikerült ~90 percre növelniük azt az időintervallumot, míg a peptidek migrációjuk révén az MS-be jutnak azáltal, hogy lineáris poli(akrilamid) bevonatú kapillárist és viszonylag magas ecetsav koncentrációt (5% V/V) használtak az elválasztó pufferben. Emellett nagyobb mennyiséget tudtak injektálni annak köszönhetően, hogy a minta mátrixában 0,03-0,04% (V/V) ecetsav és 30-40% (V/V) acetonitril volt jelen, így a mintamátrix vezetőképessége jóval alacsonyabb lett az elválasztópuffer vezetőképességéhez képest, ami a zónák dúsulásához vezetett. Ezzel a módszerrel sikerült ~10.000 peptidet azonosítaniuk, ami ~2.100 fehérjetalálatnak felelt meg.

3.2 Enzimek immobilizálása

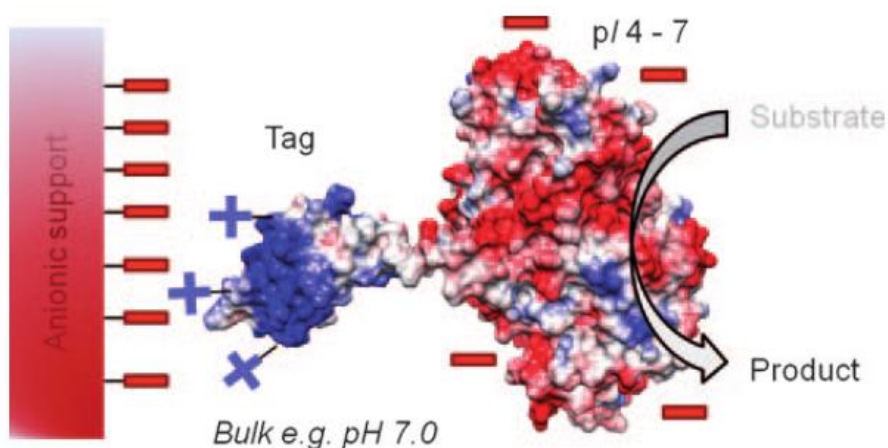
Az enzimek immobilizálása számos kutatócsoportot foglalkoztat, így nem meglepő, hogy sokféle immobilizálási módszer létezik. Az enzimek immobilizálási lehetőségeinek sematikus csoportosítása látható a 2. ábrán.



2. ábra: Enzimek immobilizálási stratégiái. Adsorpció (a) közvetlen módon, ill. (b) távtartón (spacer) keresztül. Kovalens kötés (c) közvetlenül, (d) kisméretű távtartón keresztül, ill. (e) nagyméretű távtartón keresztül. (f) Rögzítés bioaffinitás kölcsönhatás alapján. (g) Csapdázás, (h) kapszulázás. Keresztkötött enzim (i) kristályok, ill. (j) aggregátumok. Az ábrát a [4] hivatkozásból illesztettem be.

Az adszorpció a legegyszerűbb immobilizálási technika, hiszen kivitelezhető azáltal, hogy az adszorbens és az enzim (adszorptívum) oldata érintkezésbe kerül egymással. Az adszorpció hajtóereje hidrofób vagy elektrosztatikus kölcsönhatás, amely kialakulhat közvetlenül az enzim és az adszorbens felülete mentén (pl. a PDMS kiválóan adszorbeál fehérjéket [31]),

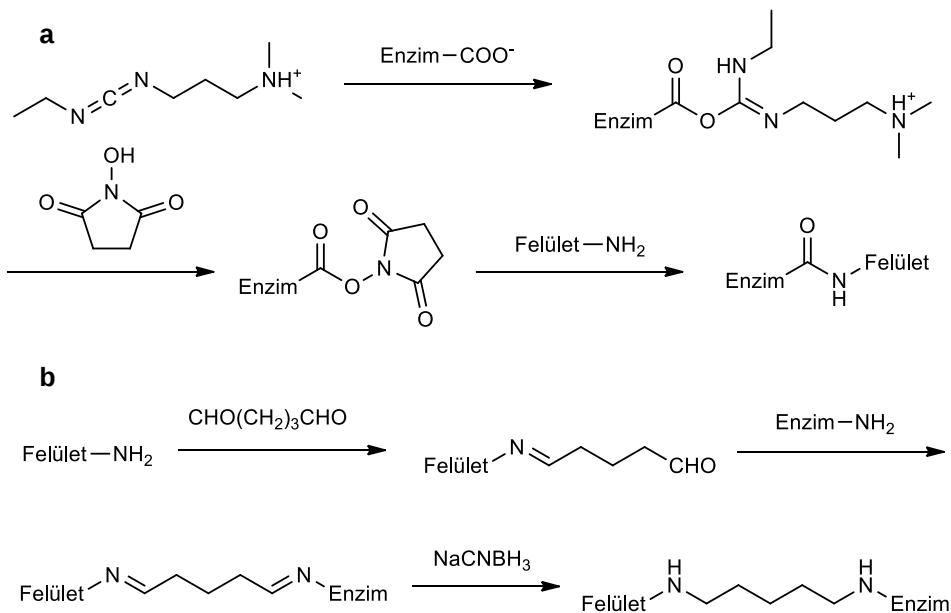
vagy használhatunk elektrosztatikusan töltött távtartót (spacer), aminek segítségével töltéssel rendelkező enzimet tudunk azonos töltésű felületre – közvetve – adszorbeálni. Utóbbi esetre jó példa egy kisméretű, pozitívan töltött fehérje (Z_{basic2}) használata távtartóként (3. ábra), melynek segítségével negatívan töltött adszorbenst és enzimet lehet „összekötni”, melyet Nidetzky és csoportja írt le [32,33].



3. ábra: Rendezett immobilizálási stratégia enzimek rögzítésére Z_{basic2} távtartón keresztül. Az ábrát a [33] hivatkozásból illesztettem be, a John Wiley and Sons kiadó engedélyével.

Elsősorban akkor érdemes adszorpciót választani immobilizálási stratégiaként, ha a felület, amire az enzimet rögzíteni szeretnénk nem tartalmaz reaktív csoportokat (pl. PDMS), ilyenkor ugyanis csak komplex kémiai reakciók útján lehetne kovalens kötést kialakítani. A módszer legnagyobb hátránya (pl. a kovalens immobilizálással szemben), hogy az adszorbeált enzim kölcsönhatásba léphet a szilárd felülettel (ha az immobilizálás során nem alkalmaznak távtartót), ami gyakran eredményezi az enzim konformációjának torzulását, ami végsősoron az enzimaktivitás csökkenéséhez, majd megszűnéséhez vezet. Különösen az erősen hidrofób felületek esetén jellemző, hogy az enzim hidrofób oldalláncai a szilárd határfelületen helyezkednek el, ami végül az enzimnek a hordozó felületén történő szétterüléséhez vezet.

A leggyakrabban használatos immobilizálási stratégia a kovalens kötés kialakítása. Érdekes, hogy habár számos kovalens immobilizálási reakciót leírtak, a publikációk többségében kétféle reakció ismétlődik (4. ábra).



4. ábra: A két leggyakrabban alkalmazott kovalens immobilizálási reakció: (a) EDC és NHS segítségével amidkötés kialakítása, ill. (b) glutáraldehiddel történő immobilizálás (aminocsoportokon keresztül).

Az egyik ilyen reakció a „karbodiimides” módszer (4.a ábra), amikor a felületen vagy az enzimen lévő karboxilcsoportot első lépésben aktiválják egy karbodiimiddel (általában 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimiddel (EDC)), s az így kapott köztitermék akár önmagában, akár NHS-sel való stabilizálást követően alkalmas arra, hogy aminocsoportokkal amidkötést létesítsen. A másik immobilizálási reakcióban a felületi és az enzimen található aminocsoportokat glutáraldehid segítségével kapcsolják össze (4.b ábra); a reakció első lépésében egy Schiff-bázis keletkezik, amit a második lépésben szekunder aminná redukálnak, általában NaCNBH_3 -del. A kovalens immobilizálás előnye, hogy a rögzítés stabilabb, nincs lehetőség arra, hogy az enzim molekulái a felületről lemosódjanak (kivéve erélyes reagensek esetén, ami

a kötés felbontásához vezetne). Nem jellemző a szétterülés okozta enzimaktivitás csökkenés, de a nagyobb aktivitás érdekében nagyméretű távtartók használatára is van lehetőség (pl. szarvasmarha szérum albumin - BSA) [34]. A kovalensen immobilizált enzimek gyakran akár hónapokig megőrzik aktivitásukat.

A bioaffinitás kölcsönhatáson alapuló immobilizálás specifikus kölcsönhatáson alapszik, aminek kialakításához a felület és az enzim származékképzése szükséges. Jellemzően biotinilezett enzimeket kötnek avidin- vagy sztreptavidin borítású felületre (avidin borítású részecskék kereskedelmileg beszerezhetők a Bangs Laboratories cégtől [35–37]) vagy hexahisztidinnel jelölt enzimeket rögzítenek Ni-, ill. Co-ionokat tartalmazó állófázisra [38,39]. Legnagyobb előnye ennek a technikának, hogy kiváló specificitást és jó szabályozhatóságot biztosít az immobilizálás során, továbbá az így immobilizált enzimek aktivitása jellemzően nagy, ugyanis a kötést létesítő molekularészletek (pl. biotin és avidin) távtartóként is funkcionálnak, így megakadályozzák az enzim felülettel való kölcsönhatását. E technikák széleskörű felhasználását a származékképző reagensek magas költsége korlátozza.

Egy molekula csapdázása azt a folyamatot jelenti, mely során a csapdázandó molekulát (esetleg részecskét [40]) körülveszik (csapdázzák) oldhatatlan mátrixszal (gél). Fontos tisztázni, hogy ezt a gélt többféle módon használhatják: monolitról beszélünk, ha a gél a kapilláris teljes keresztmetszetét kitölti, de hasonló gélt bevonatként a csatorna falán is lehet alkalmazni, amiben molekulákat vagy részecskéket (pl. zeolit részecskéket [41,42]) lehet csapdázni. A csapdázáshoz nagyon hasonló technika a kapszulázás, ami olyan csapdázásnak tekinthető, amikor a molekulák (esetleg sejtek [43]) valamilyen oldhatatlan anyagú (pl. alginát-, szilikagél) részecskébe kerülnek .

Az enzimek keresztkötésével keresztkötött enzimmembránt, aggregátumot (CLEA) vagy kristályt (CLEC) kaphatunk. A keresztkötési reakció egyszerű, a glutáraldehiddel történő kovalens rögzítéshez hasonló, azonban a CLEC-ok előállításához nagy tapasztalat szükséges fehérjék kristályosításával

kapcsolatban. Ennél a módszernél értelemszerűen nincs szükség szilárd felületre, a kristályok aktivitása kimagasló.

Egy kivételes immobilizálási technikát mutattak be Pohar és társai [44], akik lipáz enzimet immobilizáltak izoamil-acetát szintéziséhez. Egy ionfolyadék/n-heptán elegyből emulziót képeztek egy üveg mikrofluidikai csipben, ahol az enzim felületaktív anyagként viselkedett, azaz az amfifil jellege miatt az emulgeált n-heptán cseppek határfelületén helyezkedett el.

3.3 Mikrofluidikai csip alapú enzimreaktorok

A mikrofluidika tudományterülete a kémiában követi a számítástechnikában megfigyelhető miniatürizálási trendeket. Célja a laboratóriumi eszközök integrálása néhány cm^2 -nyi területű mikrofluidikai csipekre, melyek segítségével akár több művelet egymást követő (vagy párhuzamos) elvégzésére is van lehetőség, emiatt ezeket a csipeket ún. *lab-on-a-chipek*nek is hívják. Ezen eszközök előnye, hogy a folyadékok áramoltatásánál használt csatornák kis átmérője miatt igen kis mintatérfogatok is elegendőek lehetnek egy analízishez.

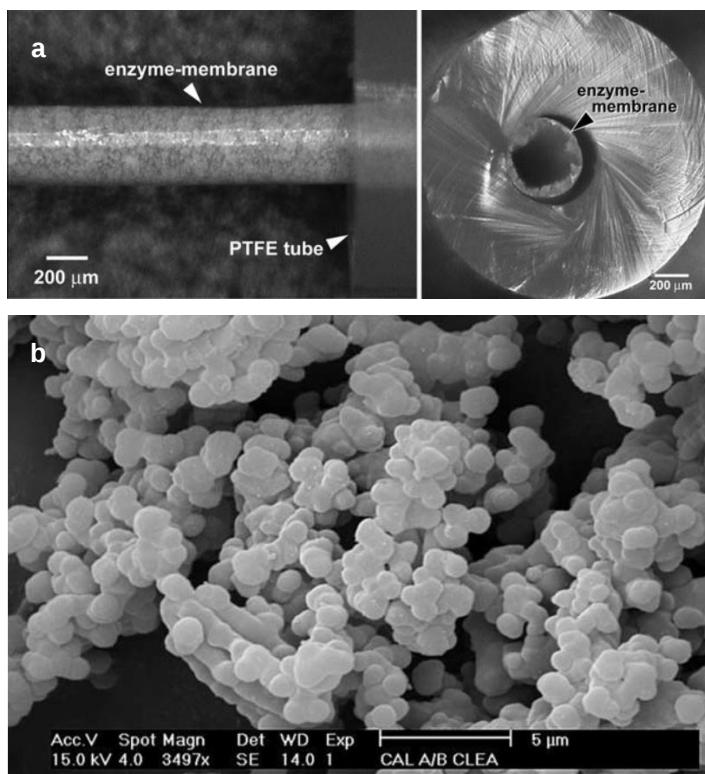
A mikrofluidikai csipeket gyakran PDMS-ből állítják elő kutatólaboratóriumokban, ugyanis a PDMS viszonylag olcsó, így a kapott csip is olcsó, eldobható. Ebben az esetben a csipek előállítására lágy litográfias módszerrel egyszerűen történhet [7]. A PDMS áttetsző, rugalmas, biokompatibilis polimer, kitűnő adszorbens, különösen a fehérjék előszeretettel adszorbeálódnak rá [31,45]. Ez analitikai feladatok esetén probléma lehet, amit speciális bevonatok alkalmazásával lehet elkerülni [46], ugyanakkor alkalmazása kézenfekvő adszorpcióval történő immobilizáláshoz.

Az 1. függelékben 59 (többségében) mikrofluidikai, immobilizált enzimreaktor tulajdonságát foglaltam össze, felhasználási területük alapján (pl. szintézis, glükóz meghatározás, glikán analízis, fehérjeemésztés stb.). Ezen reaktorok számos tulajdonsága közül többet is ki lehetne emelni a reaktorok osztályozása céljából, azonban számomra a szilárd hordozó típusa és mérete alapján történő csoportosítás tűnik a leglogikusabbnak.

Az irodalomban fellelhető nagyszámú reaktor szilárd hordozói a következők lehetnek: *i*, az adott eszköz belső csatornafala vagy a csatornába integrált membrán (felszínen történő immobilizálás), *ii*, monolitok, ill. *iii*, részecskék. A csatornafalon való immobilizálás a legegyszerűbb, hiszen nincs szükség arra, hogy a hordozót valamilyen módon integráljuk a reaktorba, amelynek az elkészítése ezáltal gyorsabb és egyszerűbb. A csatornafalon történő

immobilizálásra példa a PDMS csip [47,48], poli(metil-metakrilát) (PMMA) csip [49], poli(etilén-tereftalát) (PET) csip [50] vagy szilícium csip belső falán [22], ill. kvarc kapilláris belső falán történő immobilizálás [51–53]. Érdemes megjegyezni, hogy a hatékony immobilizálás érdekében ezekben az esetekben gyakran szükséges felületi rétegek kialakítása (pl. LBL adszorpcióval [50]) vagy a felület funkcionálizálása későbbi kovalens kötéshez [49], bioaffinitás kölcsönhatáshoz [48] vagy elektrosztatikus adszorpcióhoz [54]. Membránok esetén is többféle membránt találhatunk: poli(vinilidén-fluorid) (PVDF) membránt [55–57], nyilont [57] és keresztkötött enzimmembránt [58,59]. Utóbbi a keresztkötött enzim aggregátumok egyik speciális típusának tekinthető, azonban a kettő nem ugyanaz, hiszen az enzim aggregátum kifejezés inkább részecskére vonatkozik [60], nem membránra. A két eset összehasonlításaképp az 5. ábrán látható két irodalomból vett példa. Az 5.a ábrán jól látható, ahogy az aminoaciláz membrán bevonatot képez a poli(tetrafluor-etilén) (PTFE) kapilláris belsejében, az 5.b ábrán pedig lipáz enzimből készített ~1 µm-es aggregátumok figyelhetők meg.

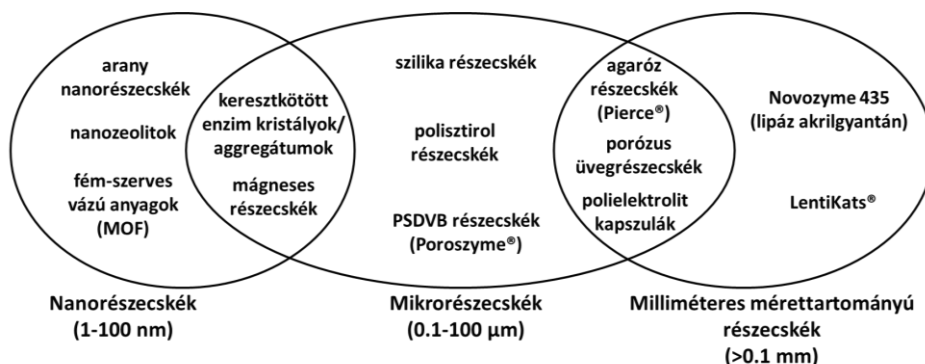
A szilika, ill. szintetikus polimer alapú monolitok az 1990-es években váltak népszerűvé, amikor újfajta HPLC állófázisként kezdték el használni őket. Ez a porózus állófázis kitűnő immobilizálási felületnek bizonyult IMER-ek létrehozásához, vagy bioaffinitás kromatográfiás célokra is [61]. Népszerűségüket jól mutatja a monolit enzimreaktorok kiemelkedő száma [24,29,62–75]. Ezeket a reaktorokat kapillárisban, üveg [76], PDMS [77], PMMA [77], ciklikus olefin kopolimer (COC) [77], ill. kereskedelmi (Micralyne) [78] mikrofluidikai csipekben alakították ki. Előnyös tulajdonságaik ellenére kevés csip-alapú monolit enzimreaktorra találni példát, a monolitok csipekben történő legnépszerűbb felhasználása inkább a hőre keményedő monolitok alkalmazása csapként a csipek csatornáiban folyadékáramlás szabályzására [79].



5. ábra: (a) CCD kép egy keresztmetsztett aminoaciláz enzimmembránról, amelyet PTFE kapillárisban alakítottak ki, majd a kapilláris egy részét eltávolították (a felvétel elkészítéséhez). Az ábrát a [58] hivatkozásból illesztettem be, a John Wiley and Sons kiadó engedélyével. (b) Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) képek *Candida antarctica* lipáz CLEA-ról. Egy-egy ilyen aggregátum 8 millió enzim molekulából állhat. (3500x nagyítás). Az ábrát a [60] hivatkozásból illesztettem be, a Taylor & Francis kiadó engedélyével.

A részecskéken történő immobilizálás foglalja magában a legtöbb immobilizálási lehetőséget, hiszen számos típusú (eltérő funkcionalitással, szerkezettel és mérettel rendelkező) részecske kereskedelmileg hozzáférhető kromatográfiás állófázisként. A könnyebb áttekinthetőség érdekében ezek a részecskék méretük szerint csoportosíthatók, ami az 6. ábrán látható. Érdekes megjegyezni, hogy ezen részecskék közül a nanorészecskéket elsődlegesen a csatorna falánál lokalizálva használják [42,80], míg a mikrorészecskékből inkább töltetet készítenek. A milliméteres mérettartományú részecskék – értelemszerűen – nem integrálhatók mikrofluidikai csipekbe, a nagyobb méret

miatt viszont ezek a részecskék jól használhatók szintetikus célokra – katalizátorként. Hatékonyságukat és népszerűségüket jól mutatja, hogy a táblázatban szereplő két részecske kereskedelmi forgalomban szerepel.



6. ábra: A részecskealapú enzimreaktorokban leggyakrabban használatos részecskék (immobilizálási felületek) csoportosítása méretük szerint. Az ábrát a [4] hivatkozásból illesztettem be és fordítottam le.

Az enzimreaktorok legfontosabb – kiemelt – alkalmazási területei a publikációk nagy számát tekintve a szintézis, a csipen történő jelerősítés analitik érzékeny detektálásához, ill. a fehérjeemésztés.

A kémiai szintéziseket akkor érdemes mikrofluidikai csipekben végrehajtani, ha az előállított termék értékes és csak kis mennyiségben kell előállítani (pl. a ^{18}F -flourodeoxiglükóz mikrofluidikai szintézise [81]), ha a reakciókörülmények gyors optimálása a célunk [38] vagy ha az alkalmazott részecskék mérete lehetővé teszi a nagyobb léptékű szintézist (bár utóbbit már nem nevezhetjük mikrofluidikának).

A csipen (tehát nem kapcsolt technika segítségével) történő detektálás jelenleg kevésbé kidolgozott technika, azonban van néhány speciális eset arra, hogy miként detektálhatunk érzékenyen – adott tulajdonságú – komponenseket csipen. Ezekben a csipekben a H_2O_2 -nak központi szerepe van, amit amperometriával lehet közvetlenül detektálni [82], vagy kemilumineszcenciás detektálást lehet alkalmazni luminol tormaperoxidáz (HRP) enzimmel történő

oxidálásával (első lépésként glükóz oxidázzal (GOD) H_2O_2 -t termeltetnek, ami a HRP szubsztrátja) [36].

A fehérjeemésztés proteomikában betöltött szerepét a 3.1 fejezetben részleteztem. Csipben történő megvalósítása során az emésztés a csipben immobilizált proteáz enzimmal történik, ami on-line kapcsolatban lehet az elválasztó/detektáló egységgel (pl. MS) vagy a keletkező peptideket analizálhatjuk off-line módon, a csipen áthaladt folyadék összegyűjtését követően. A fehérjeemésztéshez gyakran használt tripszin immobilizálásához előszeretettel alkalmaznak mágneses részecskéket [83–91], amikből egy külső mágnes segítségével egyszerűen lehet a részecskéket elkülöníteni az oldatfázistól, vagy tripszinnel eleve bevont agaróz részecskéket [92–96], amik ebben a formában kereskedelmileg is elérhetők (Pierce, Rockford, IL). A fehérjék emésztéséhez használatos reaktorok tulajdonságait bővebben a 2. függelékben foglaltam össze (összesen 55 reaktorét), ahol megtalálható az egyes reaktorokban alkalmazott enzim típusa, a reaktor típusa, az immobilizálási felület és stratégia, a fehérjeemésztéshez szükséges idő, a reaktorral emésztett mintafehérjék, azok szekvencia lefedettség (SC%) értéke, ill. néhány esetben a felületi borítottság. Az SC% megmutatja, hogy a meghatározott peptidek az azonosított fehérje szekvenciájának hány százalékát fedik le, a felületi borítottság pedig adott mennyiségű szilárd hordozóra vonatkoztatott, immobilizált enzim.

4. Anyag és módszer

4.1 Felhasznált vegyszerek

Kísérleteimhez analitikai tisztaságú vegyszereket használtam. Proteáz enzimként sertés hasnyálmirigy eredetű tripszint alkalmaztam (Type IX-S, liofilizált por, Sigma, St. Louis, MO, USA). Tesztfehérjeként BSA-t, (csirke) tojásfehérjéből származó lizozimet, ló vázizom eredetű mioglobint és szarvasmarha vérből származó hemoglobint (mind Sigma termék), továbbá egészséges önkéntesektől származó (emberi) vérsérumot és könnyet emésztettem az enzimreaktorok segítségével. A kovalensen rögzített töltetes reaktor esetén a tripszint aminocsoporttal funkcionizált szilika részecskékhez rögzítettem (HPLC töltet, Microsorb 100-5, amino, Varian, Palo Alto, CA, USA) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) és N-hidroxiszukcinimid (NHS) segítségével.

A különböző mintaelőkészítésekhez a következő vegyszereket használtam: trifluorecetsav (TFA), karbamid, DTT, jóacetamid (IAM), NH_4HCO_3 , hangyasav (FA) és benzamidin hidroklorid (mind Sigma termék). Oldatkészítéshez kétszeresen ioncserélt vizet használtam (Elix-3, Millipore, Darmstadt, Németország). A CZE elválasztások során használt pufferhez NaH_2PO_4 -t és Na_2HPO_4 -t, pre- és poszt kondicionáláshoz nátrium-dodecilszulfátot és NaOH-t használtam (VWR International, PA, USA).

4.2 Mikrofluidikai csipek tervezése és készítése

A kétféle reaktor elkészítéséhez két eltérő mintázatú mikrofluidikai csipet terveztem. Az adszorbeált enzimet tartalmazó reaktor csatornája 100 μm széles, 35 μm magas és 20 cm hosszú volt (belső térfogat: 700 nL), amely szerpentinszerűen volt kialakítva a csipen. A kovalens rögzítésű, töltetes reaktor kialakításához több párhuzamos csatornát terveztem ugyanarra a csipre 1 mm-es szélességgel, 35 μm -es magassággal és 1 cm-es hosszal (belső térfogat: 350 nL).

A csipeket PDMS-ből lágy litográfiás eljárással készítettem el [7]. Ennek során a csipek mintázatát AutoCAD program segítségével rajzoltam meg, majd a mintázatokat nagy felbontással (3000 dpi) átlátszó fóliára nyomtattuk ki. Egy 3 hüvelyk átmérőjű szilícium lapkát spincoater segítségével negatív típusú fényérzékeny anyaggal (SU-8 2025, Microchem, Newton, MA, USA) vontam be, mely során 3000 rpm sebességet alkalmaztam 30 s-ig. Ezt követően a lapkát 15 percre 95 °C-os kemencébe raktam. A maszkon lévő mintát úgy vittem át a Si-lapkára, hogy 365 nm-en sugárzó UV lámpával besugároztam 10 percig a maszkon keresztül. A besugárzott lapkát előhívás előtt még visszaraktam a 95 °C-os kemencébe 5 percre, majd az előhívószerrel (1-metoxi-2-propanol-acetát) leoldottam azt a részét a bevonatnak, amely nem lett besugározva, így megkaptam az öntőformát.

A PDMS csipet ezután a PDMS elasztomer és térhálósító (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) 10:1 (m:m) arányú keverékének öntőformára való ráöntésével készítettem el. A viszkózus keverék gázmentesítése után az öntőformára öntött keveréket 65 °C-os kemencébe helyeztem 1 óráig. Ez idő alatt végbement a térhálósodás, így a mintákat formára vágtam, 300 μm -es lyukakat lyukasztottam bele a csatornák végeinél a folyadékcsövek csatlakoztatásához, majd levegő plazmás aktiválást követően (PDC-32G, Harrick, Ithaca, NY, USA) a csipet egy hasonlóan aktivált üveglapra helyeztem („ragasztottam”), mely során a reaktív gyökök rekombináálódtak, így a PDMS csip irreverzibilisen rögzült az üveglapra.

Folyadékok áramoltatásához perisztaltikus pumpát használtam (IPC, Ismatec, Cole-Palmer, IL, USA). A pumpához csatlakozó csövek 0,25 mm belső átmérőjűek voltak (Tygon, Cole-Palmer, IL, USA).

Az így elkészített csipeket egy nagysebességű CCD kamerával ellátott inverz mikroszkóppal vizsgáltam (Axio Observer A1, Zeiss), a képeket az AxioVision 4.6.3 szoftverrel dolgoztam fel (Zeiss).

4.3 Fehérjék tripszines emésztése

4.3.1 Fehérjeminták előkészítése tripszines emésztéshez, oldatban emésztés

A fehérjeminták előkészítése során a következő lépéseket végeztem el: ~2,5 mg tesztfehérjét feloldottam 100 μL 25 mM NH_4HCO_3 -ban, majd azonnal 300 μL 8 M karbamidot adtam hozzá, így hagytam állni szobahőmérsékleten 30 percig, mely idő alatt felbomlott a fehérje harmadlagos szerkezete. Ekkor 40 μL 100 mM DTT-t adtam hozzá, amely a diszulfidhidak redukálásáért felelős (37 °C-on 1 óra). Ezt követően 40 μL 200 mM IAM oldatot adtam hozzá, amely karbamidometilezi a redukált diszulfidhidakat, így megakadályozza azok regenerálódását (45 perc, szobahőmérséklet, sötét). Ezután 2 mL 25 mM NH_4HCO_3 oldatot adtam az elegyhez, hogy a végső fehérjekoncentráció ~1 mg/mL, ill. karbamidkoncentrációja <1 M legyen.

A könnyeminták vétele egy standard módszerrel, kapillárisal való könnygyűjtéssel történt [97]. A szérum- és könnyeminták esetén a mintaelőkészítésnél ügyelni kellett arra, hogy kevesebb minta áll rendelkezésre és előre nem ismert a minták fehérjetartalma. Így a mintaelőkészítést enyhén módosítottam: egy előzetes összfehérjetartalom vizsgálat után a szérumot és a könnyet is hígítottam, hogy 3 mg/mL összfehérje koncentrációjú mintából induljak ki, majd a következő mennyiségű reagenseket alkalmaztam: 5 μL mintához 0,9 mg karbamid, 0,3 μL 100 mM DTT, 0,3 μL 200 mM IAM és 9,5 μL 25 mM NH_4HCO_3 . Az előkészített fehérjeoldatokat (standard vagy valós minta) -20 °C-on tároltam addig, míg oldatban vagy valamelyik reaktor segítségével meg nem emésztettem őket [98].

Oldatban emésztés során az előkészített mintákhoz tripszint adtam (fehérje:tripszin = 50:1) és a mintát 37 °C-on 16 óráig inkubáltam. Az emésztést követően az oldat savanyításával lehet leállítani a reakciót, ekkor annyi FA-t adtam a mintához, ami 0,1% végkoncentrációt eredményezett. Az így kapott mintát esetenként sómentesítettem (a sómentesítés megtörténtét minden esetben jelölöm az eredmények részben), amihez C18-as töltettel rendelkező 10 μL -es

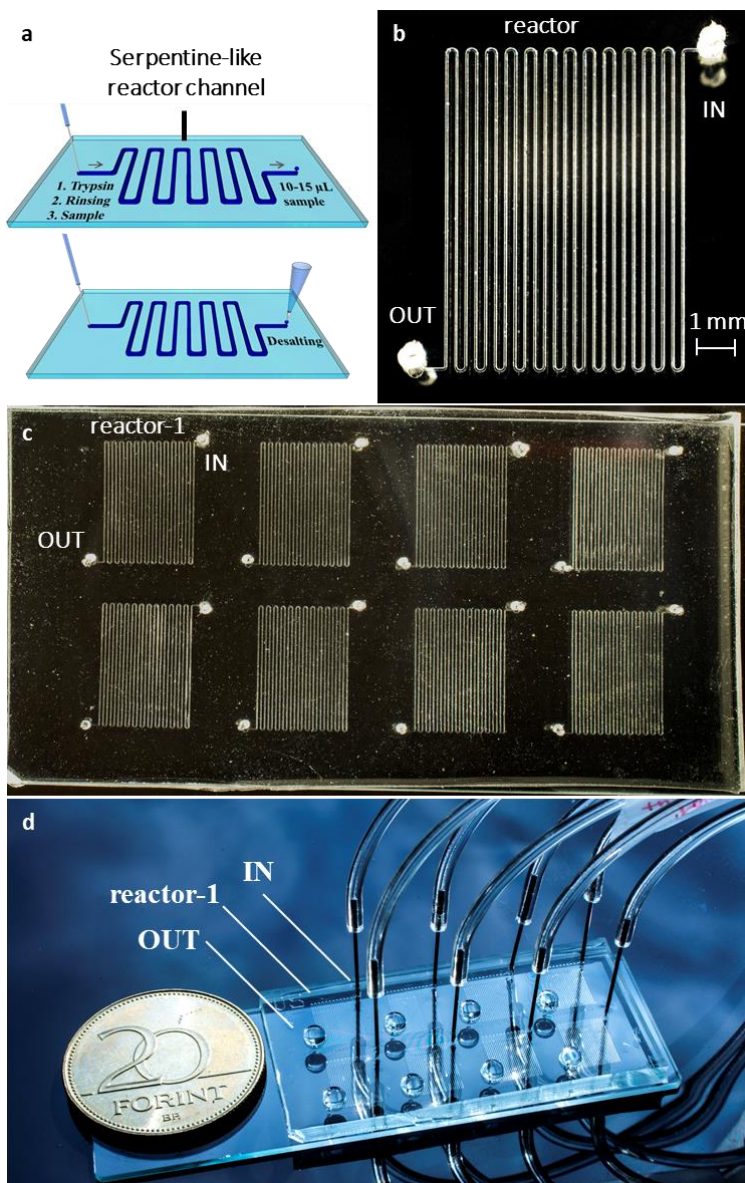
pipettahegyet használtam (ZipTip® C18, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Cork, Írország) a gyártó leírása szerint. 0,1% FA-t használtam a hegyben lévő töltet nedvesítéséhez és a megkötött peptidek sótól való megtisztításához, ill. 0,1% FA-t tartalmazó acetonitril:víz (70:30) elegyet a peptidek eluálásához 10 µL végső térfogatra.

4.3.2 Tripszin immobilizálása és reaktorokon történő emésztés

Az adszorpcióval történő immobilizálás esetén a tripszint a mikrofluidikai csip csatornájának belső falán adszorbeáltattam (a munkafolyamat sematikus ábrája a 7.a ábrán látható) [98,99]. Frissen elkészített 20 mg/mL koncentrációjú tripszinoldatot - amely 20 mM CaCl₂-t és 1 mM HCl-t is tartalmazott (a Ca²⁺-ionok jelenléte és a savas pH a tripszin aktivitását csökkentik, visszaszorítják az önemésztését) - áramoltattam keresztül a csatornán 2 µL/min áramlási sebességgel, 10 percig. Ezután a nem adszorbeálódott tripszint kimostam 25 mM NH₄HCO₃-tal (2 µL/min, 10 perc).

Ezt követően következett a fehérjeminta emésztése: 10 µL előkészített fehérjemintát áramoltattam keresztül a csatornán 0,65 µL/min sebességgel (ez a térfogat szükséges a sómentesítéshez és a CZE elemzésekhez). A fehérjeminta reaktorban való tartózkodási ideje – azaz az emésztés ideje – 1 percnak adódott. Mielőtt a megemésztett fehérjeminta elérte volna a csatorna kimeneti nyílását (ahol az áthaladást követően cseppként összegyűlt), 1,5 µL 1% FA-t pipettáztam a kimenetre, ami a mintával elegyedve gátolta az esetlegesen jelen lévő maradék tripszin aktivitását. Ez a lépés garantálta, hogy ha véletlenül még maradt is volna szabad tripszin a csatornában a mosást követően vagy deszorbeálódna a tripszines emésztés közben, a minta csatornán való áthaladását követően biztosan ne szenvedhessen el további emésztést (a tripszin ugyanis elveszti aktivitását savas közegben). Az emésztés szobahőmérsékleten történt, s a cseppként kifolyó mintát gyűjtöttem (általában sómentesítés után) a további vizsgálatokhoz. A tripszinréteg regenerálható, ilyenkor a csatornát 50 mM nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS), majd 25 mM NH₄HCO₃-tal kell mosni 5-5

percig ($5\ \mu\text{L}/\text{min}$), hogy eltávolítsuk az előzetesen rajta lévő tripszint, majd az újabb immobilizálás a már leírtak szerint történik.



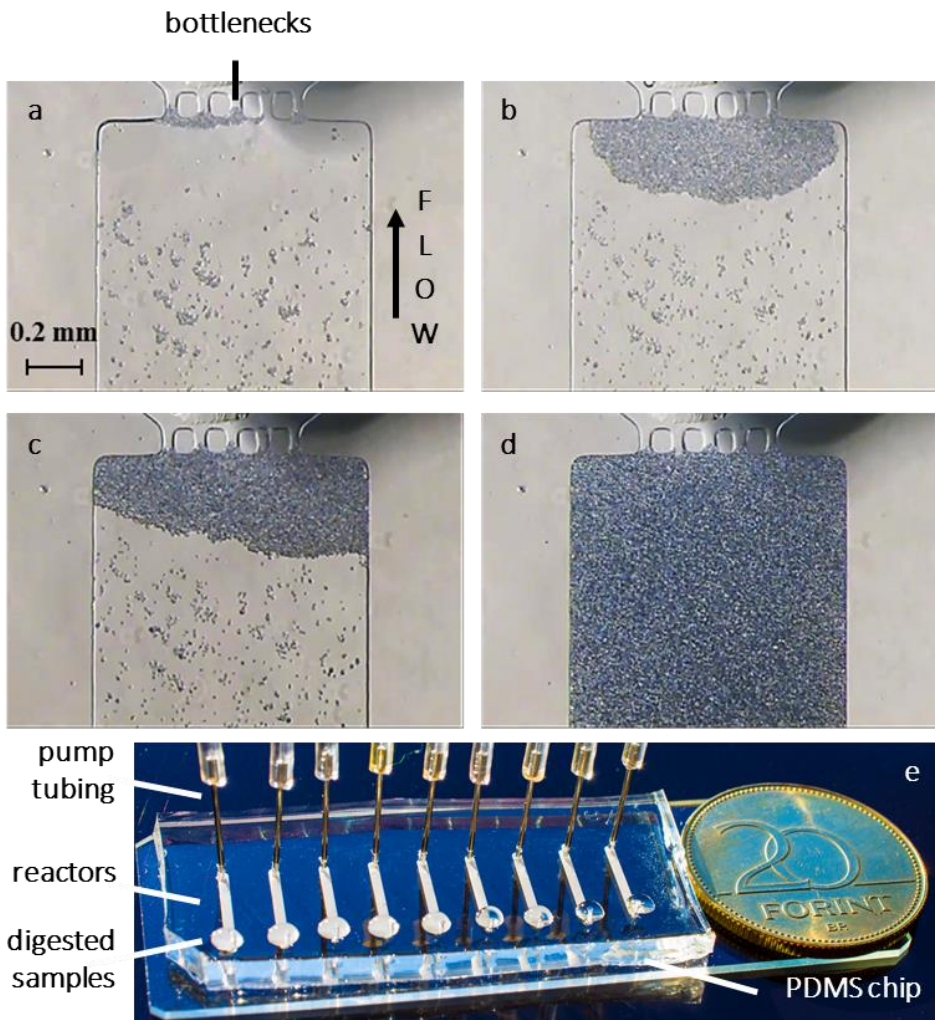
7. ábra: (a) A tripszin adszorpciójához szükséges munkafolyamat sematikus ábrája a szerpentin-eszaktör esetén. Fényképek a (b) 20 cm hosszú, $100\ \mu\text{m}$ széles és $35\ \mu\text{m}$ magas csatornamintázatról, amiből akár (c) 8 db is elhelyezhető egy csipen, ill. (d) használható emésztésre egyidejűleg. Az ábrákat a [99] és a [98] hivatkozásokról illesztettem be, a Springer (a) és a John Wiley and Sons (b-d) kiadók engedélyeivel.

A tripszin kovalens rögzítését az EDC/NHS módszerrel végeztem, amely reakció a 4.a ábrán látható. Tripszint (3 mg/mL), EDC-t (7 mg/mL) és NHS-t (1,3 mg/mL) oldottam fel 50 mM foszfát pufferben (pH=6,8) [51], ami 12 mg/mL koncentrációban tartalmazott szuszpendált amino-funkcionalizált szilika részecskéket. Az elegyet 5 órán át kevertetem szobahőmérsékleten. Az immobilizálást követően a részecskék szuszpenzióját többszöri mosással és centrifugálással tisztítottam. Minden centrifugálás után a felülúszót dekantálással távolítottam el, 1,5 mL acetonitril:víz (70:30) elegyet adtam hozzá, majd egy percig rázattam. Ezt a centrifugálás – öblítés lépést 6-szor ismételt meg (minden második lépésnél 1,5 mL vízzel öblítettem az acetonitril:víz (70:30) helyett), hogy biztosan eltávolítsam az oldatban maradó szabad tripszint. Az utolsó mosási lépés után 200 μ L 1 mM HCl-t, 20 mM CaCl_2 -t és 0,4 mg/mL benzamidint tartalmazó tárolóoldatot adtam a részecskékhez, amit ebben az oldatban szuszpendálva, fagyasztva (-20 °C-on) tároltam [100].

A reaktor kialakításához a tripszines szilika részecskékből töltetet alakítottam ki a PDMS csip csatornáiban (8.a-8.d ábrák) [100]. A részecskék visszatartását 5 db 20 μ m-es szűkület segítségével oldottam meg. ~2,5 μ L szuszpenzióra volt szükség az 1 cm hosszú töltet kialakításához. 25 mM NH_4HCO_3 -t áramoltattam a tölteten keresztül 10 percig 1 μ L/min sebességgel, ami a töltetet tömörítette, ill. a tripszin számára optimális 7,8-as pH-t biztosította.

Emésztés során az előkészített fehérjeminta 10 μ L-es részletét 1 μ L/min sebességgel áramoltattam át a tölteten. A tölteten való áthaladás ~10 s-t vett igénybe, így ez tekinthető emésztési időnek. A csatorna kimeneti végénél 10 μ L mintát gyűjtöttem, amit (általában) sómentesítettem. Az emésztés szobahőmérsékleten történt. Mivel több töltet is elhelyezhető egymás mellett, így akár 9 egyidejű emésztés is lehetséges (8.e ábra).

Emésztést követően a töltet poszt kondicionálása 25 mM NH_4HCO_3 -t tartalmazó acetonitril:víz (20:80) eleggyel történt 10 percig 1 μ L/min sebességgel.



8. ábra: (a-d) Optikai mikroszkóp felvételek egy tripszinnel borított szilika részecskékből kialakuló töltetről. (e) Fénykép 9 fehérjeminta egyidejű emésztéséről, több reaktor egy csipen való elhelyezésével. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

4.3.3 Lowry-féle összfehérje meghatározás

A Lowry-féle összfehérje meghatározás [101] során a Lowry-oldat három összetevőjét előre elkészítettem, majd a végső Lowry-oldatot közvetlenül a kísérletek előtt készítettem el a három komponens elegyítésével, a gyártó (Sigma) leírása alapján. A Lowry-oldat összetevőinek elkészítéséhez NaOH-ra,

Na_2CO_3 -ra, CuSO_4 -ra és kálium-nátrium-tartarát-ra volt szükségem (mind Sigma termék). A meghatározáshoz még Folin és Ciocalteu reagensre (2N, Sigma) volt szükségem, a kísérletek során mindenben a gyártó leírását követtem. Az oldatok abszorbanciáját egy kétsugaras spektrofotométerrel mértem (V-550, Jasco).

4.4 Műszerek

4.4.1 Atomerő mikroszkópia

Egy PDMS lapka felületének morfológiáját atomerő mikroszkópiával (AFM) tanulmányoztam. Az AFM képeket tapogató módban mértem levegőben, TESP-MT antimon (n) dópolt szilícium konzollal (Bruker, Karlsruhe, Németország), egy Veeco diCaliber típusú készüléken, ami tartalmazott egy Caliber Mag Mount Scanner-t. A szkennelési sebesség 1 Hz volt, a konzol rezonancia frekvencia tartománya 280-334 kHz, a pixelszám 256×256 .

4.4.2 Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia

A tripszin PDMS felületre történő adszorpcióját Fourier-transzformációs felületi plazmon rezonancia (FT-SPR) spektroszkópia segítségével tanulmányoztam egy Nicolet™ 6700 FT-IR készüléken, amihez egy SPR™ 100 modul volt kapcsolva. A készüléket az OMNIC™ szoftver vezérelte (Thermo Electron Co. Waltham, MA, USA). Az SPR arany szenzorlapkáját 0,1% (m/V) hexános PDMS oldattal vontam be spincoater segítségével, így egy nagyon vékony (~100 nm vastag) PDMS réteget képeztem a szenzor felületén. Perisztaltikus pumpa segítségével (Masterflex C/L 77120–62, Vernon Hills, IL, USA) áramoltattam a folyadékokat az SPR szenzoron. Az alapvonal felvételéhez több SPR spektrumot rögzített a készülék $10.700\text{--}6.500\text{ cm}^{-1}$ hullámszám között, majd a spektrumokat a TQ Analyst™ szoftver illesztette tömegközéppont (COG) algoritmussal az összes adatpont 25%-a alapján, melyek a kisebb intenzitásokhoz tartoztak. Ezzel az illesztéssel meg lehetett határozni minden spektrum minimumát, egy-egy ilyen görbe 10 interferogram átlaga volt, az egyes adatpontok közti távolság $0,964\text{ cm}^{-1}$ volt. A minimumok értékeit az idő függvényében ábrázolta a szoftver, amivel a hullámszám időbeli eltolódása szemléltethető, amit analitok felületi kötődése eredményez. A kísérletekben különböző koncentrációjú tripszinoldatot injektáltam PDMS-sel borított SPR

szenzorra, majd vízzel mostam a szenzort, hogy eltávolítsam a nem kötődő tripszint.

4.4.3 Kapilláris elektroforézis

A CZE peptidtérkép vizsgálatokat egy Agilent 7100 típusú kapilláris elektroforézis készülékkel végeztem (Agilent, Waldbronn, Németország). Méréseimnél hidrodinamikus injektálást alkalmaztam, a mintákat a kapilláris anód felőli végénél injektáltam. A CZE elválasztásokat 80 cm hosszú, 50 μm belső átmérőjű buborékcélás kvarckapillárisban hajtottam végre (Agilent). Az elválasztás során 30 kV feszültséget használtam. A detektálás a kapillárison történt diódasoros detektorral, 200 nm-en. Az elválasztáshoz használt foszfát puffer 11,3 mM NaH_2PO_4 -t és 13,7 mM Na_2HPO_4 -t tartalmazott (pH=7,0). Az elektroferogramokat a ChemStation B.04.02 verziójával rögzítettem és értékeltem ki.

4.4.4 nanoLC-MS

A nanoLC-MS méréseket egy EasynLC II (Bruker) – 4000 QTRAP (AB Sciex) nanoHPLC-MS/MS rendszeren végeztem, a műszert az Analyst szoftver 1.4.2 verziója vezérelte (AB Sciex). Ezen méréseknél információ-alapú adatnyerést hajtott végre a szoftver, amely egy 440-1400 Da tartományú pozitív módban történő pásztázásból és egy megnövelt felbontású pásztázásból állt, a két legintenzívebb ion töltésállapotának megállapításához. Ezt követően a szoftver kiszámolta a megfelelő ütközési energiákat, majd ütközések-indukálta disszociációval (CID) fragmentálta a szülőiont.

A peptidek elválasztása az MS detektálás előtt 90 perces víz:acetonitril gradiens elúcióval történt (300 nL/min áramlási sebesség). Az első lépés sómentesítés volt egy Zorbax 300SB-C18 oszlopon (5 $\times$ 0,3 mm, pórusméret: 5 μm , Agilent), majd az elválasztás egy Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlopon (150 mm $\times$ 75 μm , pórusméret: 3,5 μm , Agilent) történt. Az „A” eluens 0,1% FA volt, a B eluens pedig 0,1% FA-t tartalmazó acetonitril. Az LC-MS/MS

spektrumokból a ProteinPilot 4.0 (ABSciex) végzett fehérjeazonosítást a SwissProt adatbázis alapján (2015.07-es kiadás, 548872 szekvencia). Az azonosításhoz minimum 2 peptidszekvenciát 95% feletti konfidenciával használt.

4.4.5 Kapilláris zónaelektroforézissel kapcsolt tömegspektrometria

Bontott fehérjeelegyek CE-MS vizsgálatát egy Agilent 7100 típusú CE készüléken végeztem, ami egy CE-ESI Sprayer (G1607B, Agilent) kereskedelmi CE-ESI-MS interfészen keresztül kapcsolódott egy maXis II MS-hez (Bruker). A segéd folyadékáramot egy 1260 Infinity II izokratikus pumpa szállította (Agilent). A CE műszert az OpenLAB CDS Chemstation szoftver vezérelte.

A CZE elválasztás során alkalmazott paraméterek: kapilláris: 90 cm × 50 µm kvarckapilláris, háttéreltrolit: 1 M FA, feszültség: 20 kV. Segéd folyadékáram sebessége: 4 µL/min, összetétele: 2% FA izopropanol:víz = 1:1-ben oldva. Injektálás: hidrodinamikus: 50 mbar × 50 s.

Az ionforrásra alkalmazott MS paraméterek: kapilláris feszültség: 3,6 kV; end plate offset: 500 V; szárítógáz sebessége: 4,5 L/min, hőmérséklete: 40 °C. A porlasztógáz az elválasztás első 5 percében (ahol a peptidek még nem érték el a kapilláris végét) 0 bar volt, majd 5 perctől 0,6 bar.

Az MS módszer finomhangolása: funnel 1 RF: 350 Vpp; multipole RF: 350 Vpp; ion energia: 8,0 eV; legalacsonyabb tömeg: 100 m/z. Az ütközési cella paraméterei: ütközési energia: 10,0 eV; collision RF: 600 Vpp; transzfer idő: 80,0 µs; pre pulse storage: 22,0 µs.

Az MS-el minden spektrum 2 legintenzívebb csúcsát fragmentáltam (amik elérték a küszöbintenzitást), 3 spektrum után aktív kizárást alkalmaztam, ami megszűnt 2 perc után vagy ha a csúcs intenzitása a fragmentált 2-szeresét elérte. Az adatok rögzítésének sebessége 10 Hz volt. Az MS/MS frekvencia a fragmentált csúcs intenzitásának függvényében 2 és 10 Hz között változott. Az MS elektroferogramokat az otofControl 4.1 verziójával (build: 3.5) rögzítettem (Bruker).

Csúcslista generálásához a Compass DataAnalysis 4.4 verziót (build: 200.55.2969) használtam (Bruker). Az AutoMS(n) csúcslista generálásakor használt intenzitás küszöbérték 1000, a csúcsok megtalálásához Sum Peak algoritmust használtam. Az exportált MGF fájl alapján a Mascot (Matrix Science) webes felületén végeztem (ingyenes) kereséseket (MS/MS ions search). Keresésnél a SwissProt adatbázist használtam, tripszines emésztést választva, maximum 1 megengedett nem hasított kötéssel. Karbamidometilezést állítottam be változó (peptid) módosításnak. A hibára vonatkozó paramétereket az eredeti értéken hagytam: peptidre $\pm 1,2$ Da, MS/MS toleranciára $\pm 0,6$ Da.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 Adszorbeált tripszint tartalmazó reaktor

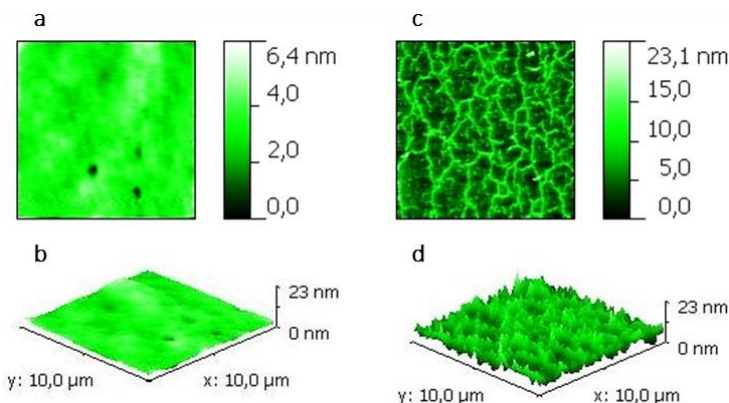
5.1.1 Tripszin adszorpciójának vizsgálata poli(dimetilsziloxán) felületen

A 7. ábrán felvázolt IMER fejlesztésénél az volt a kiindulási alapom, hogy habár ismert tény, hogy a fehérjék rendkívül erősen adszorbeálódnak a PDMS (csipek) felületén [31], ezt a fajta spontán adszorpciót még nem használták ki enzimek immobilizálására. Valójában egy példát sikerült találni – ami az 1. függelékben is látható – ahol PDMS csatorna falán adszorpcióval immobilizáltak tripszint [54], de ebben a munkában a PDMS felületére akrilsav egységeket (negatív karboxilcsoportokat) vittek be ojtásos polimerizációval, amire egy pozitívan töltött poli(dialildimetilammónium klorid) polimert (PDDA-t), majd negatívan töltött tripszint vittek fel, így az itt bemutatott adszorpció elektrosztatikus kölcsönhatáson alapul, LBL adszorpciónak tekinthető. Ezzel szemben a tripszin spontán adszorpciójához nem szükséges több lépésben rétegeket kialakítani, az eljárás jóval egyszerűbb, nem igényel speciális reagenseket. Ilyen típusú – spontán adszorpción alapuló – immobilizálási technikát még nem alkalmaztak enzimek immobilizálására PDMS felületen [99], emellett a módszer jóval egyszerűbb az irodalomban található más enzimreaktoroknál.

A reaktor megtervezése és tesztelése előtt szükséges volt meggyőződnöm arról, hogy a spontán adszorpcióval felvitt tripszin valóban adszorbeálódik-e a PDMS felületére. Emiatt egy tripszinoldatba merített, majd alaposan előblített PDMS lapkát vizsgáltam AFM segítségével [99]. Az így kapott eredmények – melyek a PDMS felületének morfológiáját mutatják – láthatók a 9. ábrán. A felvételek igazolják, hogy a tripszinnel kezelt PDMS lapka felülete megváltozik a tripszin adszorpciója következtében.

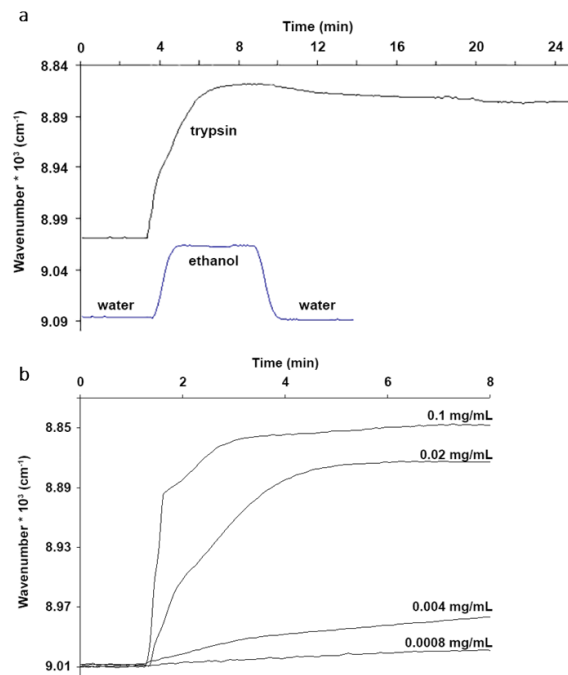
Az adszorpció jelenségének pontosabb követését teszi lehetővé az SPR spektroszkópia [31,102]. Ahhoz, hogy a PDMS-en végbemenő változásokat követhessük, az SPR arany szenzorát vékony PDMS réteggel szükséges bevonni.

Ilyenkor fontos megfelelően vékony bevonatot képezni (~ 100 nm), ugyanis a plazmon gerjesztése során elnyelt evanescens hullám amplitúdója exponenciálisan csökken a felülettől mért távolság függvényében és körülbelül a fény hullámhosszával megegyező távolságba képes behatolni, de leginkább a felülettől 300 nm-en belül történő változásokat lehet megfelelően követni [103].



9. ábra: AFM felvételek (a, b) egy kezeletlen és (c, d) egy előzetesen tripszinoldatba merített, majd alaposan előblített PDMS lapkáról. Az ábrát a [99] hivatkozásból lett illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

A bevonat kialakítása után a szenzorgram „alapvonalát” vízre vettem fel, majd tripszint injektáltam, aminek hatására megfigyelhető az SPR gerjesztési hullámszámának eltolódása (10. ábra) [99]. Amennyiben a tripszint követően ismételtén vízzel mostam a szenzort (10.a ábra), megfigyelhető, hogy az SPR jel elkezd tartani az eredeti érték felé, de azt hosszas mosás után sem éri el, szemben az etanollal, ami azonnal kimosódik a szenzorról és visszaáll az eredeti érték. Ennek magyarázata, hogy a tripszin jelentős mértékben adszorbeálódik a felületen és a vizes mosással az oldatban maradt tripszin mosódik ki a rendszerből. Mivel az SPR az oldatból is érzékel egy keveset, így a jel elkezd csökkenni, viszont mivel a tripszin egy része erősen adszorbeálódott a PDMS-re, az nem hagyja el a szenzort és az SPR jel nem nyeri vissza eredeti értékét.



10. ábra: A tripszin PDMS-en való adszorpciójának vizsgálata SPR spektroszkópiával. SPR szenzorgramok (a) 1% etanolra (nincs adszorpció) és 0,02 mg/mL tripszinoldatra, amikből 2 ml-t dugószerűen injektáltam, a minta előtt és után vizet áramoltatva, ill. (b) 0,1, 0,02, 0,004 és 0,0008 mg/mL tripszinoldatokra, folyamatos áramoltatásukkal a szenzorra. Az ábrát a [99] hivatkozásból illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

A 10.b ábrán az SPR jel változásának függése látható a tripszinoldat koncentrációjától. Az SPR jel változásából arra lehet következtetni, hogy – amint azt a BSA esetén is igazolták korábban [31,45] – az adszorbeált tripszin mennyisége függ a tripszin oldatbeli koncentrációjától. Az oldatok injektálásakor kezdetben állandó meredekséggel emelkedik az SPR jelének görbéje, ami azt jelenti, hogy a tripszin molekulái könnyedén találnak kötőhelyet a PDMS felületen. Néhány perc áramoltatást követően a 0,02 és 0,1 mg/mL koncentrációnál telítődés jelentkezik. Az eredmények azt mutatják, hogy nagyobb koncentrációjú tripszinoldatok injektálásánál nagyobb mennyiségű tripszin adszorbeálódik, vélhetően amiatt, mert ekkor kezdetben a tripszin molekulái gyorsabban elfoglalják a felületi kötőhelyeket és nincs idejük

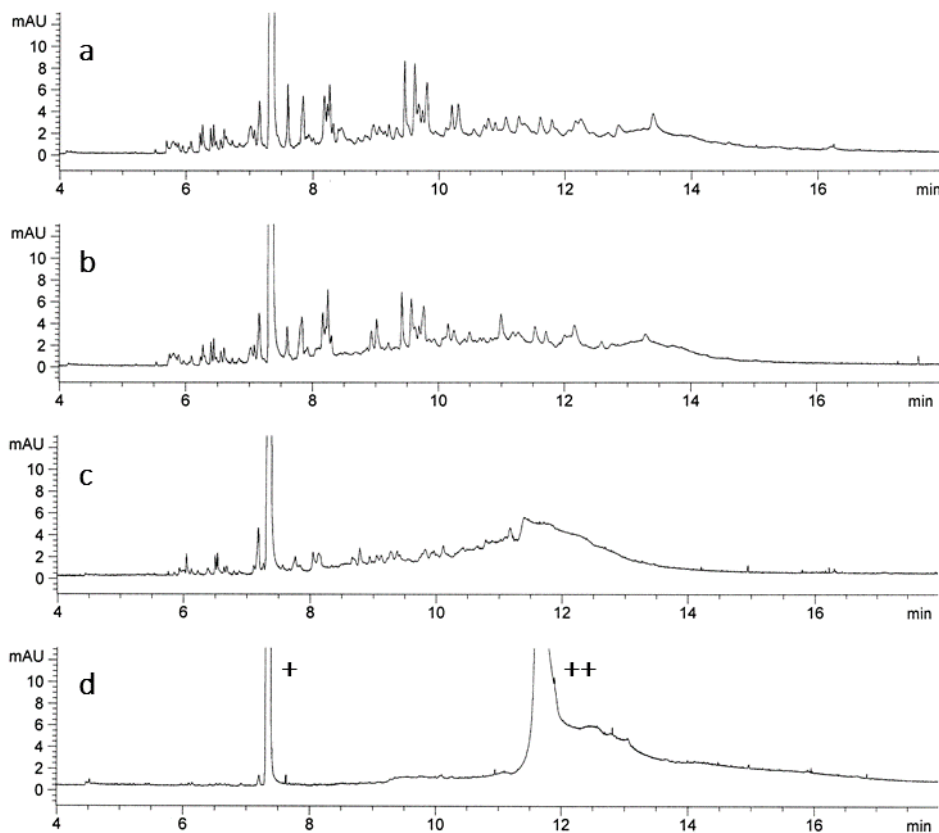
szétterülni a hidrofób felületen. A szétterülés akkor fordulhatna elő, ha a felület lassan telítődne tripszinnel, és mivel szétterülés után a tripszin nagyobb felületet – több kötőhelyet – foglal el, így kevesebb molekula tud ugyanarra a felületre adszorbeálódni (a vékonyabb fehérjeréteg kisebb SPR jelet eredményez).

5.1.2 Adszorbeált tripszin aktivitásának vizsgálata

Az előzőekben leírtakban beigazolódott, hogy a tripszin erősen adszorbeálódik a PDMS felszínén, így amennyiben aktivitását is megőrzi az adszorpció során, az adszorbeált tripszin használható lenne IMER-ben. Következő kísérletemben mellőztem az aktivitás vizsgálatához egyébként jól használható kisméretű szubsztrátokat (pl. N α -benzoil-L-arginin etil észter), ugyanis tapasztalatom szerint az ilyen kis szubsztrátok bontása jóval könnyebb, a reakció gyorsabban megy végbe és nem feltétlenül ad megbízható képet arra nézve, hogy a reaktor mennyire tud jól működni fehérjék bontásánál.

Az aktivitás vizsgálatát az indokolta, hogy a fehérjék hidrofób felületen való szétterülése közismert jelenség [104–106] és a tripszin szétterülése könnyen okozhatja az aktivitásának csökkenését vagy elvesztését. Ekkor a tripszin hidrofób oldalláncai úgy rendeződnek, hogy a PDMS hidrofób felületére kerüljenek.

Az aktivitás vizsgálata során BSA mintákat emésztettem eltérő idővel a tripszin adszorpcióját követően (11. ábra) [99]. Azt tapasztaltam, hogy maximum 1 órával az immobilizálást követően a reaktor aktivitása nem változott, a BSA teljes mennyisége elbomlott. 4 órával az immobilizálást követően a peptidek mellett már megjelent a bontatlan fehérje is az elektroferogramon, azaz a tripszin veszített aktivitásából. 1 nap elteltével már nem látszódnak peptidek a vizsgált mintában, csak a meg nem emésztett BSA-ra jellemző csúcs látható az elektroferogramon (és az előkészítésnél hozzáadott egyéb reagensekre jellemző csúcs).



11. ábra: 1 mg/mL emésztett BSA CZE elektroferogramjai. A mintákat a tripszin adszorbeáltatása után (a) 30 perccel, (b) 1 órával, (c) 4 órával, ill. (d) 1 nappal emésztettem. A (d) elektroferogramon a töltés nélküli komponensekhez (pl. karbamid) tartozó csúcsot +-al, az emésztetlen fehérjéhez tartozót ++-al jelöltem. Körülmények: buborékcélás kvarckapilláris: belső átmérő: 50 μ m, effektív hossz: 67 cm, teljes hossz: 75 cm. Puffer: 25 mM foszfát, pH: 7. Feszültség: +30 kV. Injektálás: 100 mbar·s. Detektálási hullámhossz: 200 nm. A minták nem sómentesítettek. Az ábrát a [99] hivatkozásból illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

Az eredményekből következik, hogy a tripszin szétterül a felületen, ami aktivitásának elvesztéséhez vezet. Mivel a PDMS csip olcsó (eldobható), ill. több szerpentin is kialakítható egy csipen, a reaktor – aktivitáscsökkenése ellenére is – jól használható egyszerhasználatos reaktorként, ha az enzim immobilizálása utáni ~2 órán belül emésztünk vele. Bár így minden emésztés előtt újra el kell végezni az immobilizálást (eltérő szerpentineken), de biztosak

lehetünk benne, hogy az enzim aktív a minta áramoltatása során, kizárjuk a minták közti keresztzennyezés lehetőségét és nem szükséges az emésztés után mosogatni a csatornát.

Az adszorpció jelenségének SPR-es vizsgálata és az aktivitás időbeni csökkenése arra enged következtetni, hogy az ún. többállapot modellel (multiple-states model) [106,107] lehet jellemezni a tripszin PDMS-re történő adszorpcióját. Ez a modell azt mondja ki, hogy az adszorbeált enzim a felületen többféle állapotban lehet jelen, amelyek egymásba alakulhatnak egyre nagyobb felületet elfoglalva (jelen esetben egyre kisebb aktivitással).

Fontos megemlíteni, hogy immobilizálás során azért szükséges nagyon tömény (20 mg/mL) tripszinoldatból kiindulni, hogy a felületet minél jobban telítsük tripszinnel. Alacsonyabb koncentráció esetén lassabb lenne az adszorpció, ami miatt egyrészt tovább tartana a telített tripszinréteg kialakítása, másrészt a telített réteg kialakítása során elindulna a már adszorbeált tripszin molekuláinak szétterülése, s így nagyobb felületet foglalna el egy-egy (részben szétterült) tripszinmolekula a telített rétegben, azaz kisebb lenne a tripszin felületi koncentrációja (és az aktivitása is). Mivel a tripszinoldat koncentrációja csökken az adszorpció során, miközben a szerpentinén áthalad, az előbb említett hatás különösen igaz a csatorna kimenethez közelebb eső részein.

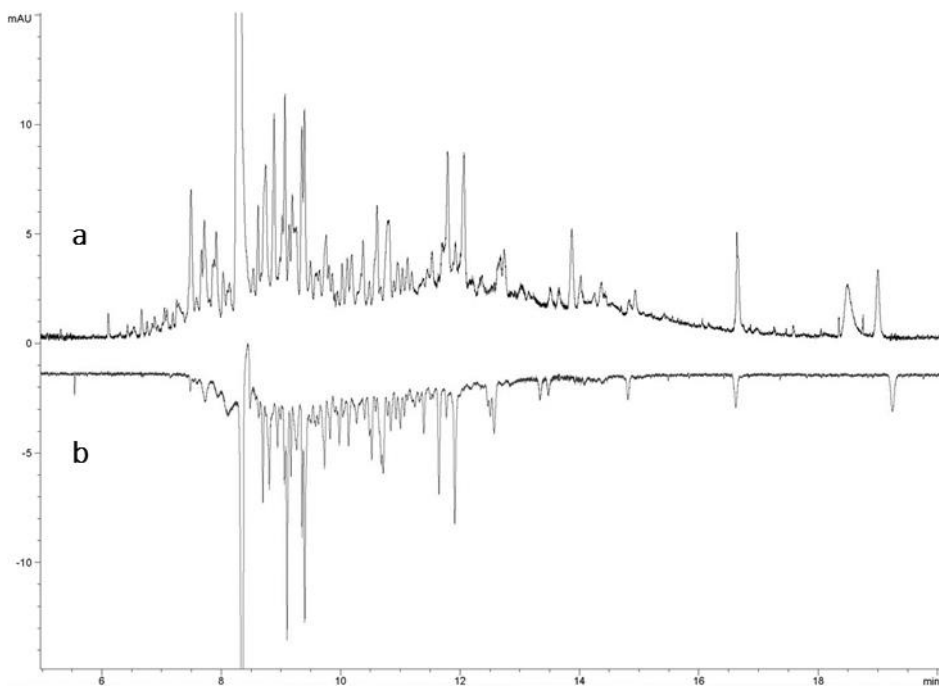
5.1.3 A reaktor emésztésének reprodukálhatósága

Egy előnyösen használható IMER fő ismérvei az egyszerű és olcsó előállíthatóság, hatékony működés, jó reprodukálhatóság és hosszú élettartam. Az aktivitás vizsgálata során megmutattam, hogy habár a PDMS csip csatornáján adszorbeált tripszin nem rendelkezik jó stabilitással, a csip eldobható jellegéből fakadóan lehetőség nyílik egy előnyös – egyszerűhasználatos reaktorként való – felhasználásra, amivel elkerülhető a minták közti keresztzennyezés. Tudván, hogy az immobilizálási technika a lehető legegyszerűbb és az IMER előállítása is viszonylag olcsó, már csak a reaktor

működésének hatékonyságát és reprodukálhatóságát kellett megvizsgálnom, amihez különböző fehérjeminták emésztését végeztem el.

Mivel több helyen is kiemelem, hogy adott mérésnél megtörtént-e a minta sómentesítése, így szükséges írnom ennek szerepéről és hatásáról [98]. A fehérjék előkészítése során a mintákhoz adott vegyületek eltávolítása általában az MS mérések előtt szokásos, hogy ezek a – peptidekhez képest – nagy mennyiségben jelen lévő anyagok ne nyomják el a peptidek ionizációját és hogy ne szennyezzék el az MS ionforrását. CZE elemzéseknél a sómentesítés kevésbé kritikus, viszont az így kapott elektroferogramok nem tartalmazzák a karbamidtól származó, nagy intenzitású csúcsot. A sómentesítés fontos hátránya viszont, hogy a karbamid és a sók mellett azok a peptidek is „eltűnhetnek” a mintából, amelyek annyira hidrofilek, hogy nem extrahálhatók ki a C18-as pipettaheggyel. A 12. ábrán jól látható, hogy ugyanazon mintát sómentesítve, nem csak a ~8,3 percnél jelentkező karbamid csúcsa tűnik el, de több peptid csúcsa is: a 6-8 perc közötti, a 13-15 perc közötti szakaszokon és a ~18 percnél látható csúcs.

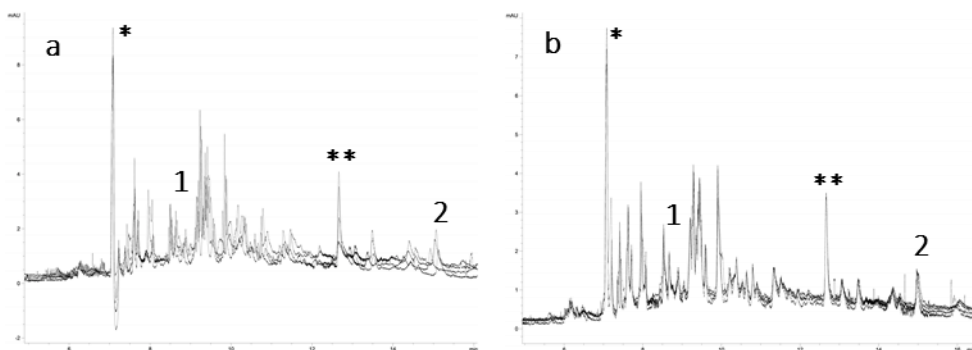
Már a 11.a és 11.b ábrán is látható volt, hogy ha frissen immobilizált tripszinnel végeztem emésztést, úgy a reaktor elbontotta az átáramoltatott BSA mintát, amiben így nem maradt emésztetlen fehérje. A BSA fehérjéből 78 db peptid keletkezése várható tökéletes emésztés során. Bár az ábrán nehéz a csúcsok számát pontosan megállapítani, ~60-80 csúcs látható az elektroferogramokon, ami azt jelenti, hogy a mért csúcsok száma nagyságrendileg egyezik a tökéletes bontás során várható peptidek számával.



12. ábra: C18 töltetet tartalmazó pipettaheggyel (ZipTip®) történő sómentesítés hatása a bontás utáni peptidelegyre: emésztett könny minta (a) sómentesítés nélkül és (b) sómentesítve. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel. Az ábrát a [98] hivatkozásból illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

A következőkben az IMER reprodukálhatóságát vizsgáltam [99]. 4 BSA mintát emésztettem ugyanazon szerpentinnel egymás után, az emésztések között a szerpentin tripszines felületét regeneráltam a kísérleti részben leírtak szerint. Ez a 4 elektroferogram látható a 13.a ábrán. Összehasonlításképp a 13.b ábrán az egyik emésztett BSA minta 4 ugyanazzal a CZE módszerrel kapott elektroferogramja látható, ami a mérési módszer reprodukálhatóságát szemlélteti. Az ábra leírásában szerepeltetett RSD% értékek jobbak, mint az irodalomban található reprodukálhatóság β -kazein bontásából származó peptidek elválasztása során (0,71-4,47% migrációs időkre) [26]. A jobb eredmény oka valószínűleg az, hogy a migrációs időket két referenciacsúcs alapján korrigáltam. A csúcsterületek nagyobb szórását az egyes minták között az okozhatta, hogy az enzimreakcióban keletkező peptidek kissé eltérő

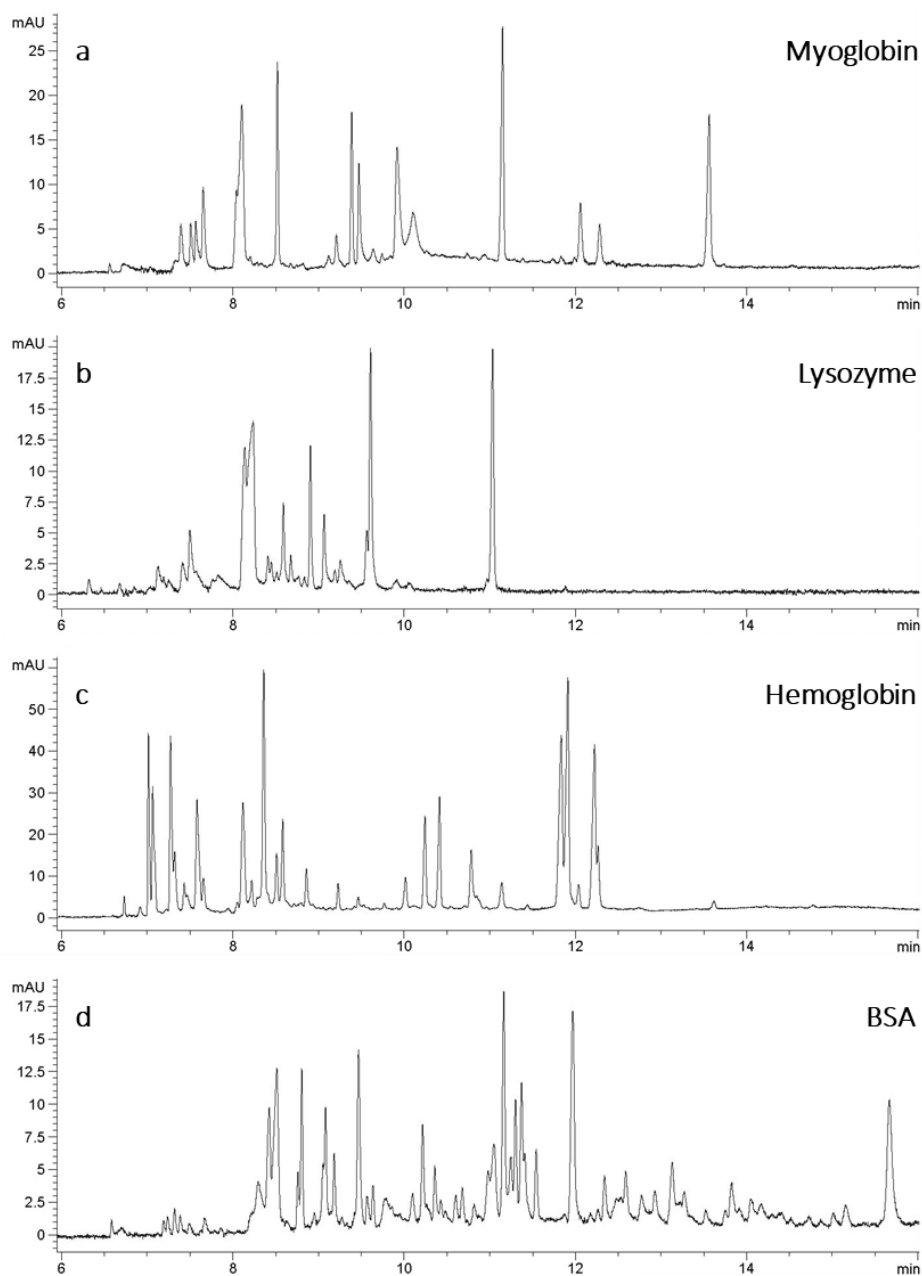
mennyiségben keletkeztek az eltérő mintákban, továbbá a sómentesítés mintánként kissé eltérő mértékben befolyásolhatta a peptidek mennyiségét.



13. ábra: CZE elektroferogramok (a) azonos szerpentinén egymás után megemésztett 4 db BSA mintáról, ill. (b) az egyik megemésztett BSA minta 4-szeri méréséről azonos CZE módszerrel. Két véletlenszerűen kiválasztott csúcshoz (1 és 2) tartozó RSD% értékek: (a) 0,24 és 0,34% migrációs időkre és 30,14 és 17,21% csúcsterületekre, valamint (b) 0,02 és 0,13% migrációs időkre és 15,65 és 4,05% csúcsterületekre. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek. A migrációs időket két referenciacsúcs alapján korrigáltam, amiket *-gal és **-gal jelöltem. Az ábrát a [99] hivatkozásból illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

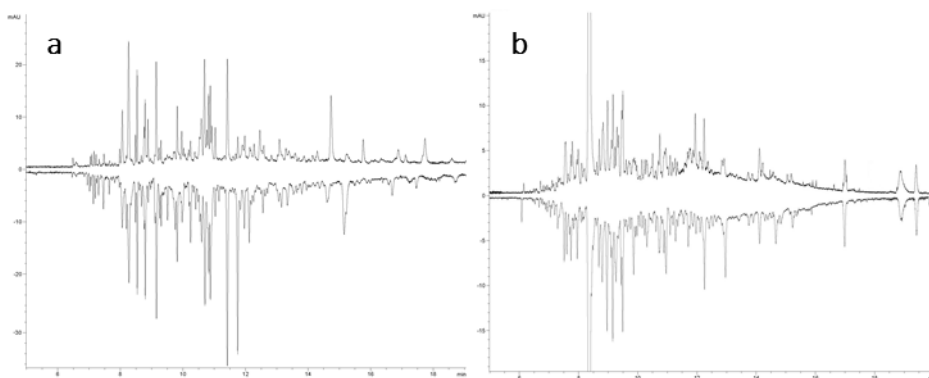
5.1.4 Fehérjeminták emésztése

A reaktorról más fehérjék (hemoglobin, mioglobin, lizozim) emésztését is végrehajtottam (14. ábra), hogy ne csak egyféle fehérjével igazoljam a működését [99]. A fehérjék teljes mennyisége elbomlott minden esetben, mivel nem látható a bontatlan fehérjére jellemző migrációs idejű és széles csúcs. Ezeknél a vizsgált kisebb fehérjéknél könnyebb volt megszámolni a detektált csúcsok számát, ami ~20, 20 és 30 volt a hemoglobinra, mioglobinra és lizozimra. Ezek a csúcsszámok – az emésztett BSA-nál talált csúcsszámhoz hasonlóan – is összhangban voltak a tökéletes emésztésre várható 19, 19 és 31 db keletkező peptiddel. Fontos kiemelni, hogy a fehérjék emésztése minden esetben ~1 perc alatt ment végbe, szemben az oldatban emésztésnél szokásos 16 órával.



14. ábra: Adszorbeált tripszint tartalmazó IMER-rel emésztett (a) mioglobin (17 kDa), (b) lizozim (16 kDa), (c) hemoglobin (62 kDa) és (d) BSA (69 kDa) CZE elektroferogramjai. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek. Az ábrát a [99] hivatkozásból illesztettem be, a Springer kiadó engedélyével.

Következő lépésként az IMER-rel emésztett BSA-t oldatban emésztettel hasonlítottam össze (15.a ábra) [99]. Ismeretes, hogy a BSA-t viszonylag nehéz megemésztetni, mivel nagyméretű fehérje (69 kDa) sok diszulfidhiddal. A két elektroferogramon közel azonos a csúcsok száma (~70-80 db), ill. több csúcs is megfeleltethető egymásnak a migrációs idők alapján. LC-MS/MS meghatározást elvégezve ugyanebből a két mintából látható, hogy az emésztés közel ugyanolyan hatékony volt, a két mintában azonosított fehérjék SC%-ában minimális eltérés mutatkozott az IMER-es emésztés javára (1. táblázat). A 3. függelékben feltüntettem a BSA-ra meghatározott összes peptidet is, amiből kitűnik, hogy a peptidek többsége valóban megegyezik a két mintában.



15. ábra: Emésztett (a) BSA és (b) könny minta CZE elektroferogramjai IMER-es emésztést (felső elektroferogram), ill. oldatban emésztést követően (tükrözött elektroferogram). A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, a minták az (a) esetben sómentesítettek, ill. a (b) esetben a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrákat a [99] és a [98] hivatkozásokból illesztettem be, a Springer (a) és a John Wiley and Sons (b) kiadók engedélyeivel.

Hasonló összehasonlítást végeztem el egy könny mintával is (15.b ábra), amikor ugyanazt a mintát emésztettem kétféleképpen [98]. A két elektroferogram ennél a mintánál is mutat hasonlóságokat. A könnyről tudni kell, hogy viszonylag nagy a fehérjetartalma (5-10 mg/mL); legalább 491 fehérjéből áll [108], viszont a teljes mennyiség 70-80%-át 3 fehérje, a lipokalin, lizozim és a laktotranszferrin teszi ki [109]. Mivel a CE(-UV) érzékenysége

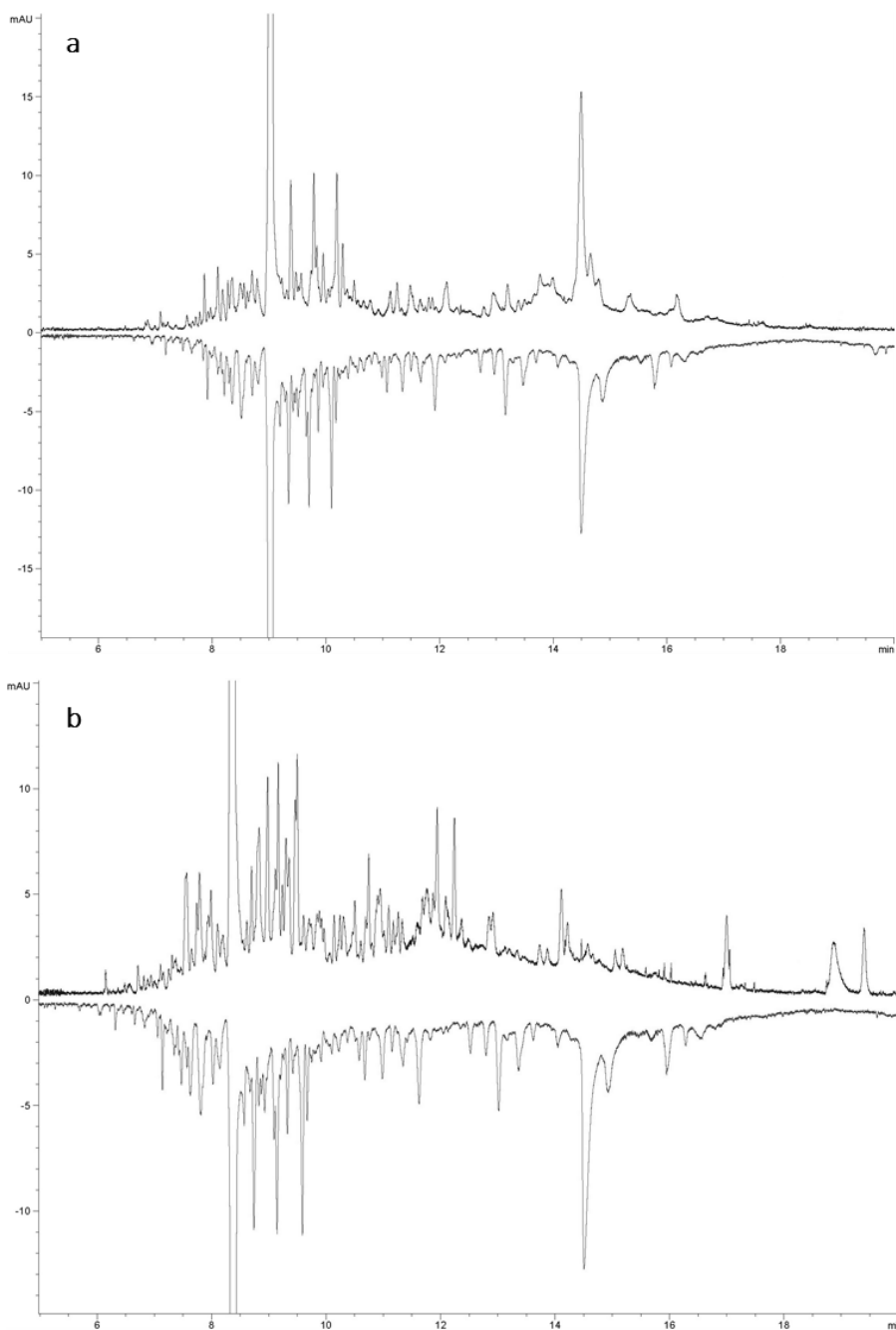
viszonylag kicsi a kapilláris vékony átmérője – optikai úthossz – miatt, az elektroferogramon is látható csúcsok valószínűleg ettől a három fehérjétől származnak, mivel ezek vannak jelen elég nagy mennyiségben ahhoz, hogy peptidjei detektálhatóak legyenek. Ennél valamivel több fehérjét sikerült kimutatni LC-MS/MS analízis segítségével, melyek közül több azonosított fehérje megegyezett a két esetben (1. táblázat – „A” személy oldatban és IMER-rel emésztve) és az IMER-rel nagyobb SC% értékeket kaptam, ill. további fehérjéket is sikerült kimutatni.

Mindezen eredmények alátámasztják, hogy az IMER emésztési hatékonysága nem marad el az oldatban emésztésétől, viszont sokkal rövidebb idő alatt zajlik le a reakció (1 perc szemben a 16 órával) és ez nem csak a tiszta, standard fehérjemintákra igaz, hanem valós mintákra is (könny), amik számos fehérje keverékéből állnak.

A 16.a ábrán látható két elektroferogram ugyanattól a személytől („B”) származó, ugyanabban az időpontban gyűjtött két könnyeminta, amit két eltérő szerpentinemésztettem, míg a 16.b ábra két elektroferogramja két különböző személytől („A” és „B”) azonos időpontban gyűjtött és különböző szerpentineken emésztett könnyeminta [98]. Azért volt szükség a könnyeminták azonos időpontban történő vételére, mert egy személy esetén is nagy a könny összetételének változása egy nap leforgása során. Az ezekhez a mintákhoz tartozó LC-MS/MS meghatározások eredményei is az 1. táblázatban találhatók.

1. táblázat: Oldatban, ill. IMER-rel emésztett BSA és könnyminták LC-MS/MS elemzéseinek eredményei. A táblázat adatait a [99] és a [98] hivatkozásokból illesztettem be és fordítottam le, a Springer és a John Wiley and Sons kiadók engedélyeivel.

Minta	Emésztési módszer	Azonosított fehérje	Fehérje tömege (Da)	Szignifikáns szekvenciák száma	Szekvencia lefedettség (%)
BSA	Oldatban	BSA	69248	16	25
BSA	IMER	BSA	69248	17	29
"A" személy könnye	Oldatban	Lipocalin-1	19250	48	24
		Lactotransferrin	78181	15	13
		Ig alpha-1 chain C region	37654	2	5
		Extracellular glycoprotein lacritin	14246	6	8
		Prolactin-inducible protein	16572	2	14
"A" személy könnye	IMER	Lipocalin-1	19250	40	34
		Lactotransferrin	78181	44	26
		Ig alpha-1 chain C region	37654	2	5
		Extracellular glycoprotein lacritin	14246	23	34
		Prolactin-inducible protein	16572	13	15
		Lysozyme C	16537	8	54
		Zinc-alpha-2-glycoprotein	34258	3	12
		Mammaglobin-B	10883	3	8
		Proline-rich protein 4	15096	4	22
"B" személy könnye	IMER	Lipocalin-1	19250	57	47
		Lactotransferrin	78181	29	24
		Ig alpha-1 chain C region	37654	4	5
		Extracellular glycoprotein lacritin	14246	13	17
		Prolactin-inducible protein	16572	8	14
		Lysozyme C	16537	9	28
		Zinc-alpha-2-glycoprotein	34258	5	11
		Mammaglobin-B	10883	3	12
		Opiorphin prepropeptide	27216	3	17
		Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	8187	2	27
"B" személy könnye	IMER	Lipocalin-1	19250	43	41
		Lactotransferrin	78181	43	25
		Ig alpha-1 chain C region	37654	8	8
		Extracellular glycoprotein lacritin	14246	19	24
		Prolactin-inducible protein	16572	6	25
		Lysozyme C	16537	9	24
		Zinc-alpha-2-glycoprotein	34258	4	11
		Mammaglobin-B	10883	3	26
		Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	8187	2	27



16. ábra: (a) Ugyanattól a személytől, ill. (b) eltérő személyektől származó 2-2 emésztett könny minta CZE elektroferogramjai. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, a minták nem sómentesítettek, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [98] hivatkozásból illesztettem be, a John Wiley and Sons kiadó engedélyével.

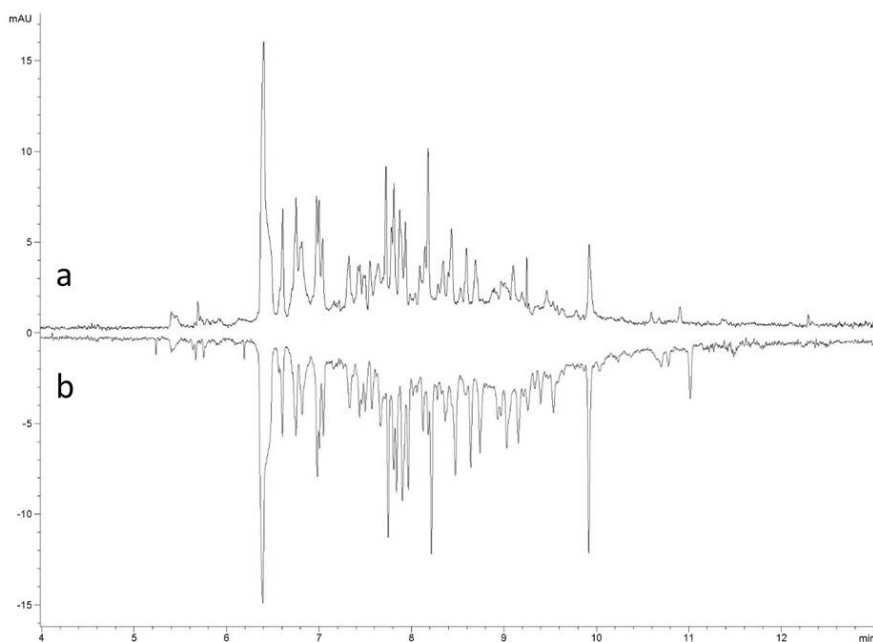
Az azonos személytől gyűjtött két minta emésztést követően hasonló csúcsmintázatot adott, ami azt jelenti, hogy az IMER jó reprodukálhatósággal képes emészteni az összetett – valós – mintákat is. Különböző személyektől származó minták esetén nagy eltérés látható az elektroferogramok között, különösen a nagyobb migrációs időknél (>12 perc) jelentkező csúcsok mutatnak eltéréseket. Ennek oka, hogy az eltérő személyek könnyének összetétele jelentősen eltérhet. Azonos, ill. eltérő személyek könnyének összetételével kapcsolatban hasonló megállapításokat tettek Gonzalez és társai [110], akik MALDI-MS segítségével vizsgálták a könnyben előforduló 20 kDa alatti fehérjéket tripszines emésztés nélkül. Munkájukban beszámolnak arról, hogy nem tapasztaltak jelentős eltérést azonos személy könnyének összetételében a vizsgált egyhetes periódusban, viszont különböző személyek esetén szignifikáns eltéréseket találtak. Emellett azt is leírták, hogy az eredményeket jelentősen befolyásolta, hogy milyen típusú sómentesítést hajtottak végre, ami igazolja az általam korábban leírt, sómentesítésnél tapasztalható változást a peptidelegy összetételében.

5.2 Kovalensen rögzített tripszint tartalmazó reaktor

5.2.1 Tripszin kovalens rögzítése szilika részecskékre

A kovalens kötés kialakításánál használt EDC/NHS kovalens immobilizálási technika általánosan használt eljárás, az egyes reagenseknél alkalmazott koncentrációk alapja az [51] hivatkozás. Noha az immobilizálási technika ismert, a reaktor kivitelezése újszerű, hiszen ez az első olyan munka, amelyben hagyományos (kromatográfiás) részecskéken rögzített tripszint töltésként integráltak PDMS csipbe.

Ennél a munkánál [51] – egy sor másik munkához [62–64,75,111,112] hasonlóan - a szerzők az immobilizálás során benzamidint használtak adalékként, ami a tripszin kompetitív inhibitoraként bekötődik annak aktív centrumába, így biztosított, hogy az aktív centrum megőrizi geometriáját az immobilizálás során, azaz az enzim aktív marad.



17. ábra: Töltetes IMER-rel emésztett BSA CZE elektroferogramjai, ahol a tripszin immobilizálása során (a) alkalmaztam, ill. (b) nem alkalmaztam benzamidint. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

Megvizsgáltam, hogy a benzamidin használata az immobilizálási elegyben szükséges-e, azaz, hogy kevésbé hatékony-e attól az emésztés, ha nem használók benzamidint [100]. A 17. ábrán látható eredményeket úgy kaptam, hogy a tripszines részecskék kialakításánál a 17.a esetben az immobilizálási reakcióelegy 0,4 mg/mL benzamidint is tartalmazott, míg a 17.b esetben nem tartalmazott benzamidint, azaz a 4.3.2 fejezetben leírtak szerint jártam el. A két elektroferogram alapján arra jutottam, hogy nincs lényeges különbség a BSA emésztések hatékonyságában, emiatt a benzamidint nem alkalmaztam az immobilizálási elegyben, csak a töltet részecskéinek tárolásánál.

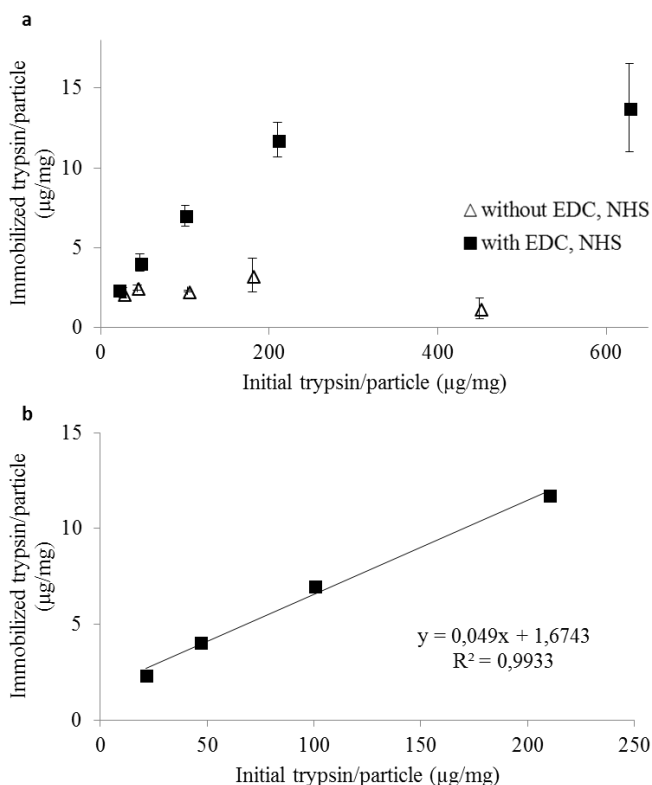
5.2.2 Megkötött tripszin mennyiségének meghatározása

Az enzimek immobilizálásával foglalkozó munkák egy kisebb részében a szerzők meghatározzák a megkötött enzim mennyiségét. Ennek gyakorlati oka, hogy azonos körülmények közt, nagy felület/térfogat aránnyal rendelkező immobilizálási felület esetén az enzim mennyisége határozza meg a reakció sebességét, tehát érdemes arra törekedni, hogy minél több enzim immobilizálódjon, minél nagyobb legyen a felületi borítottság.

Az immobilizálási módszer eredeti leírása [51] tartalmazta a reagensek koncentrációját, viszont ebben a munkában az immobilizálási felület egy kapilláris belső fala volt, így fontos volt meghatároznom, hogy mekkora legyen a szilika részecskék koncentrációja az általam használt immobilizálási elegyben ahhoz, hogy a részecskék felülete telítődjön. Az immobilizálást a leírtak szerint végeztem, de a szilika részecske tömegét változtattam, így eltérő tripszin/szilika arányokat kaptam, amiknél meghatároztam a kapott részecskék felületi borítottságát.

Az irodalomban találni olyan publikációt [68], amiben a glutáraldehiddel – szekunder aminként - rögzített tripszint 0,1 M NaOH-val vitték ismét szabad formába, ugyanis a kialakult aminkötés elbomlik lúg hatására. A felszabadult tripszint ezután Lowry-módszerrel egyszerűen meg lehet határozni. Az általam

is használt reakció során a tripszint peptidkötéssel rögzítettem a hordozóhoz, amely kötés jobban tolerálja a lúgos közeget, azonban a tripszin szabad formába vitele ilyenkor is elvégezhető 0,1 M NaOH-val, csak ilyenkor nem ez a kötés bomlik, hanem a hordozó szilika reagál a lúggal és lényegében „kioldódik” a tripszin alól.



18. ábra: (a) A kovalensen kötött tripszin felületi borítottságának függése az immobilizálási reakció kezdeti (bemért) tripszin/részecske arányától (fekete négyzetek), ill. kontroll mérés EDC és NHS reagentsek nélkül (fehér háromszögek). (b) A tripszin felületi borítottsága lineárisan változik a telítési értékig. Minden ábrázolt pont három párhuzamos kísérlet átlaga. A hibasávok 95% konfidenciának felelnek meg (Student-féle *t* teszt alapján). Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

A tripszin kovalens immobilizálása és a részecskék alapos mosogatása után a részecskéket 0,1 M NaOH oldattal kevertettem 2 órán át, szobahőmérsékleten. Ez idő alatt a részecskékről felszabadul a korábban immobilizált tripszin, amit az oldat tisztájából határoztam meg Lowry-

módszerrel és számoltam vissza a bemért részecske tömegére. Kontrol kísérletként olyan immobilizálást végeztem, ahol az elegy nem tartalmazott EDC-t és NHS-t (a kovalens kötés kialakulásáért felelős reagenseket), így a két kísérletsorozat közti különbség a kovalensen kötött tripszin miatt várható. Ez a két kísérletsor a 18.a ábrán látható [100].

A két kísérletsorozatban meghatározott tripszin mennyisége jelentősen eltért egymástól. Minden esetben akkor határoztam meg több tripszint, amikor az immobilizálási elegy tartalmazott EDC-t és NHS-t. Továbbá megfigyelhető, hogy nagyobb kezdeti tripszin/részecske aránynál (x tengely) – azaz ugyanannyi tripszinhez kevesebb részecskét bemérve – nagyobb lesz a részecskék felületi borítottsága. Az eredményekből az is látható, hogy a felületi borítottság telítési görbe szerint változik a kezdeti tripszin/részecske aránytól, a maximális értéknél a részecskék felülete valószínűleg teljesen telítődik tripszinnel. Érdekes volt kísérleteimben azzal az optimális kezdeti tripszin/részecske aránnyal dolgoznom, ami se nem túl nagy és nem is túl kicsi, hogy egyrészt a részecskék maximálisan telítődjenek, másrészt a lehető legtöbb tripszinnel borított részecskét eredményezze a reakció. Ez az optimális kezdeti körülmény a ~ 250 μg tripszin/mg részecske értéknek adódott, aminek megfelel a 4.3.2 fejezetben leírt tripszin (3 mg/mL) és részecske koncentráció (12 mg/mL) az immobilizálási elegyben.

A kontrol kísérletekben meghatározott 1-3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tripszin valószínűleg a spontán adszorbeálódott és mosás során el nem távolított tripszin miatt adódott vagy kísérleti hiba lehetett (ez okozhatta azt is, hogy a görbék nem origóból indultak). Ha a kovalens kötést képező reaktánsok is jelen voltak, a tripszin felületi borítottsága 13-14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ -nak adódott. A kovalensen kötött tripszin a két érték különbsége, ami így 10-13 μg tripszin/mg részecske felületi borítás. Ez az érték jól összemérhető más munkákban közölt felületi borítottságokkal: monolit reaktorokra: 130 μg tripszin / 4,2 cm [24], 2,6 μg tripszin / 2 cm [68], 97 ng tripszin / 1 cm [70], 35 μg tripszin / 2,5 cm [62], ill. 0,9-1,5 mg tripszin / monolit lemezek [67]; membránon adszorbeálva: 15,36 μg tripszin / 4 cm $\times$ 192

μm -es membrán [56], ill. $97 \mu\text{g}$ tripszin / cm^2 [57]; továbbá mágneses részecskékhez kovalensen kötött tripszinre: $86 \mu\text{g}$ tripszin/mg részecske [85], ill. $78 \mu\text{g}/\text{mg}$ részecske [113]. Habár az általam kapott felületi borítottság lényegesen kisebb, mint a mágneses részecskénél az utóbbi két esetben feltüntetett értékek, az eltérés oka valószínűleg a részecskék eltérő fajlagos felületével van kapcsolatban, mivel ezek a mágneses részecskék nanorészecskék voltak.

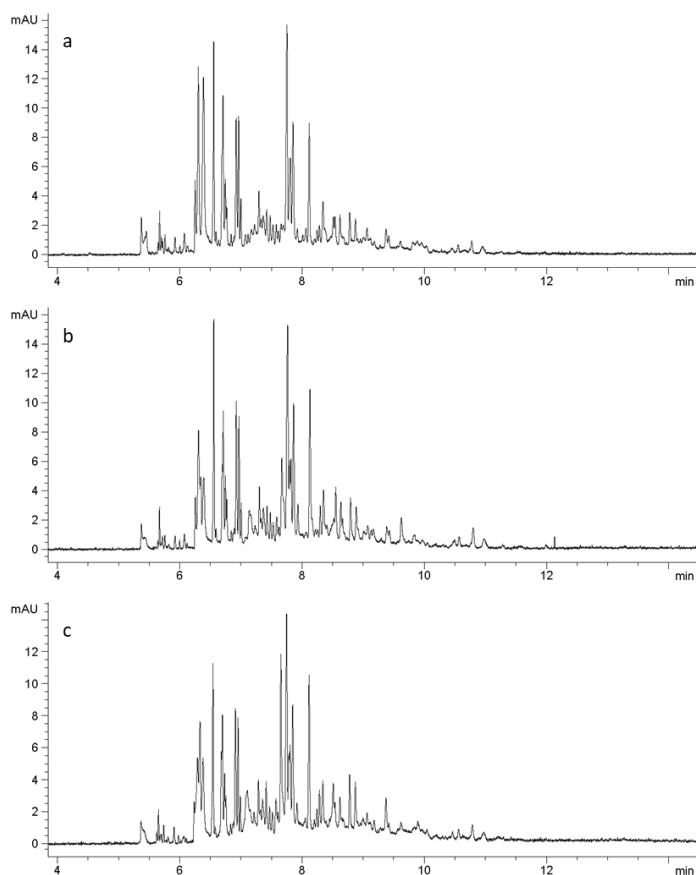
A standard oldatban emésztés során a tripszin/fehérje arány általában kicsi (1:50). A reaktorral várható emésztési hatékonyság becsléséhez, két dolgot kell feltételeznünk: egyrészt egy töltethez $\sim 0,5$ mg részecske szükséges (vö. a csatorna térfogata 350 nL), másrészt a töltet holtterfogata (ami a részecskék közti holtterfogatra vonatkozik csak) nem lehet több 50 nL -nél. Ebben az esetben a töltet $5 \mu\text{g}$ tripszint, a holtterfogatban lévő fehérjeminta pedig 50 ng fehérjét tartalmaz ($1 \text{ mg}/\text{mL}$ koncentrációval számolva), azaz a tripszin/fehérje arány $5000:50$, ami 5000 -szeres tripszinkoncentrációt jelent az oldatban emésztéshez képest. Ha a reakcióhoz szükséges időt (16 óra) elosztjuk ezzel a faktorial, megkapjuk, hogy az emésztés lejátszódásához elég $11,5 \text{ s}$, ami nagyjából megegyezik az emésztés során mért reakcióidővel. Ha a feltételezés során a holtterfogatot túl-, vagy a töltet tömegét alábecsültem, akkor a hatékonyságbeli szorzó még nagyobb, mint 5000 .

5.2.3 A kovalensen rögzített tripszin stabilitásának vizsgálata

A kovalens IMER stabilitásának vizsgálatakor arra voltam kíváncsi, hogy mennyi ideig tárolhatók a tripszinnel borított részecskék. Mivel ebben az esetben is (majdnem) közvetlen a tripszin és a felület kapcsolata (a peptidkötés nem nevezhető távtartónak), nem lehetett előre sejteni, hogy ennél az IMER-nél megjelenik-e a kovalens rögzítésű reaktorokra jellemző hosszú enzim élettartam.

A vizsgálat során először egy frissen elkészített és csipbe töltött tölteten végeztem el BSA emésztését (19.a ábra) [100]. Ezután ezt a csipet tárolóoldatba

(1 mM HCl-t, 20 mM CaCl₂-t és 0,4 mg/mL benzamidint tartalmazó oldat) merítettem, hogy megakadályozzam a kiszáradását és 4 °C-on tároltam 2 hónapig. Emellett a tripszinnel borított részecskék maradékát is tárolóoldatban szuszpendáltam és -20 °C-on tároltam 2 hónapig. Az így tárolt részecskékből 2 hónap után friss töltetet készítettem és ezzel is elvégeztem a BSA emésztését (19.b ábra), ill. a 2 hónapig tárolt IMER-rel is elvégeztem az emésztést (19.c ábra).



19. ábra: CZE elektroferogramok emésztett BSA mintákról, melyeket (a) frissen immobilizált tripszines részecskéket tartalmazó IMER-rel, (b) 2 hónapig szuszpenzióként tárolt tripszines részecskékből frissen készített IMER-rel, ill. (c) 2 hónapig tárolt IMER-rel emésztettem. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

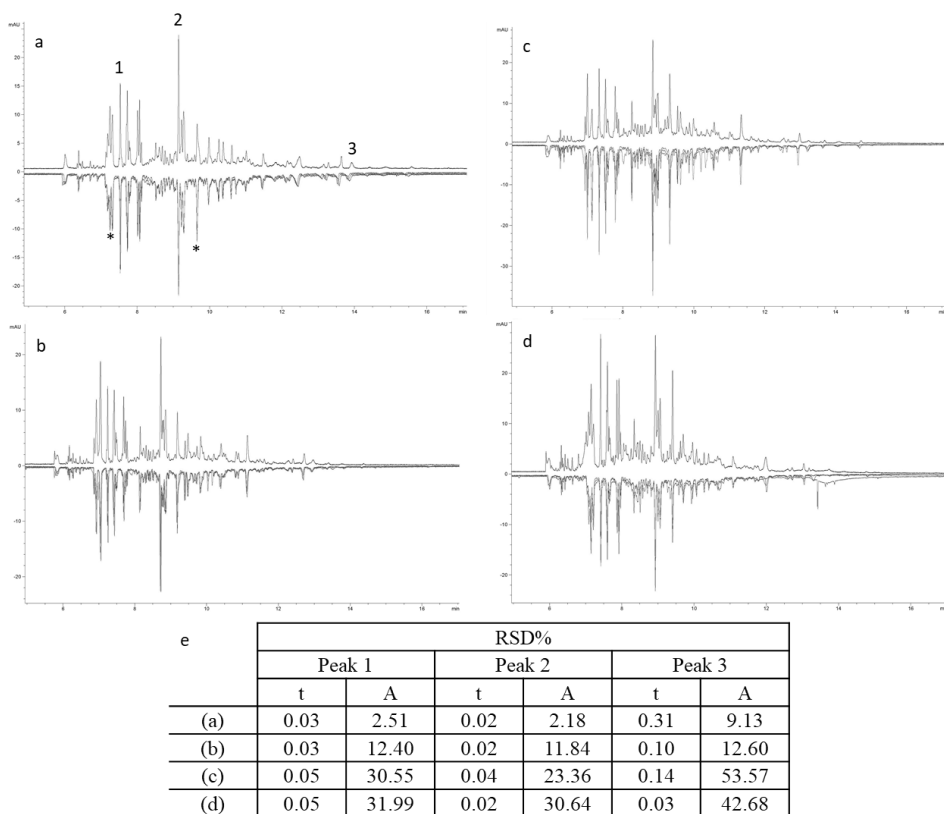
Vizsgálataim szerint mindegyik esetben elbomlott a BSA teljes mennyisége és az elektroferogramok mintázata is megegyezett. Ez alapján megállapítható, hogy a kovalensen immobilizált tripszin legalább 2 hónapig megőrzi aktivitását, akár töltetként 4 °C-on, akár a részecskék szuszpenzióját -20 °C-on fagyasztva tároltam.

5.2.4 Reprodukálhatósági vizsgálatok

A szerpentes IMER-hez hasonlóan a töltetes reaktor reprodukálhatóságát egy BSA fehérjestandard emésztésével teszteltem [100]. A reaktor jellege miatt azonban több művelet reprodukálhatóságát vizsgáltam. Vizsgáltam a CZE módszer reprodukálhatóságát (20.a ábra), az emésztés reprodukálhatóságát egy adott tölteten (20.b ábra), az emésztés reprodukálhatóságát különböző tölteteken (20.c ábra) és az emésztés reprodukálhatóságát, amikor a tripszines részecskék eltérő immobilizálásokból (eltérő sarzsokból) származtak (20.d ábra). Minden ábrán 4 mérést tüntettem fel, ezek rendre ugyanannak az emésztett BSA-nak (20.a), egy adott tölteten 4 BSA minta egymás utáni emésztésének (20.b), 4 BSA-nak egy sarzsból származó részecskékből készített 4 eltérő tölteten való emésztésének (20.c), ill. 4 BSA-nak 4 eltérő immobilizálási sarzsból származó részecskékből készített 4 eltérő tölteten való emésztésének (20.d) CZE elektroferogramjai. Az elektroferogramok migrációs időit 2 referenciacsúcs migrációs idői alapján korrigáltam (a referenciacsúcsokat 20.a ábrán csillaggal jelöltem).

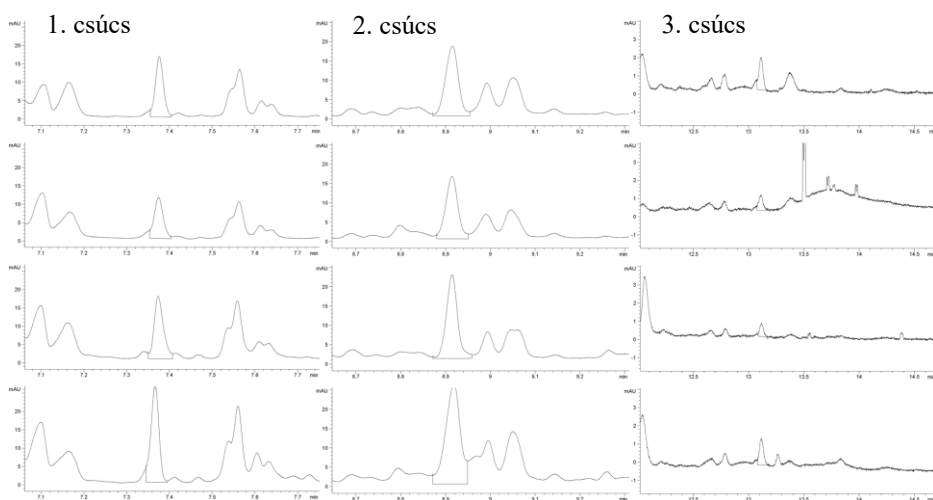
A reprodukálhatóságot úgy jellemeztem, hogy a csúcsok közül véletlenszerűen kiválasztottam hármat (amit mindegyik elektroferogramon könnyen be tudtam azonosítani), amelyeknek kiszámoltam a migrációs idejükre és a csúcsterületükre vonatkozó RSD% értékeiket. Ezeket a csúcsokat a 20.a ábrán 1, 2 és 3-mal jelöltem. A 20.e táblázat tartalmazza ezeknek a csúcsoknak a szórását, míg az integrált elektroferogramok a 21. ábrán láthatóak.

A migrációs idők szórása minden esetben kiváló volt ($RSD\% < 0,5\%$), ami a kapilláris alapos kondicionálása és a migrációs idők korrigálása miatt adódhatott. Az egymásra helyezett elektroferogramokon jól lászik, hogy a csúcsok száma (~70-80) és mintázata hasonló. Ez a csúcsszám egybevág a BSA tökéletes emésztése esetén termékként kapható 78 db peptiddel.



20. ábra: Töltetes IMER CZE peptid térképeinek reprodukálhatósági vizsgálata: (a) egy emésztett BSA minta 4-szer ismételt mérése, (b) 4 BSA minta emésztése azonos tölteten, (c) 4 BSA minta emésztése 4 különböző tölteten és (d) 4 BSA minta emésztése 4 különböző immobilizálási sarzsból származó részecskékből készült 4 különböző tölteten. (e) Az 1, 2 és 3 csúcsok RSD%-a migrációs időre és csúcsterületre, az eltérő esetekben ($N=4$). A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

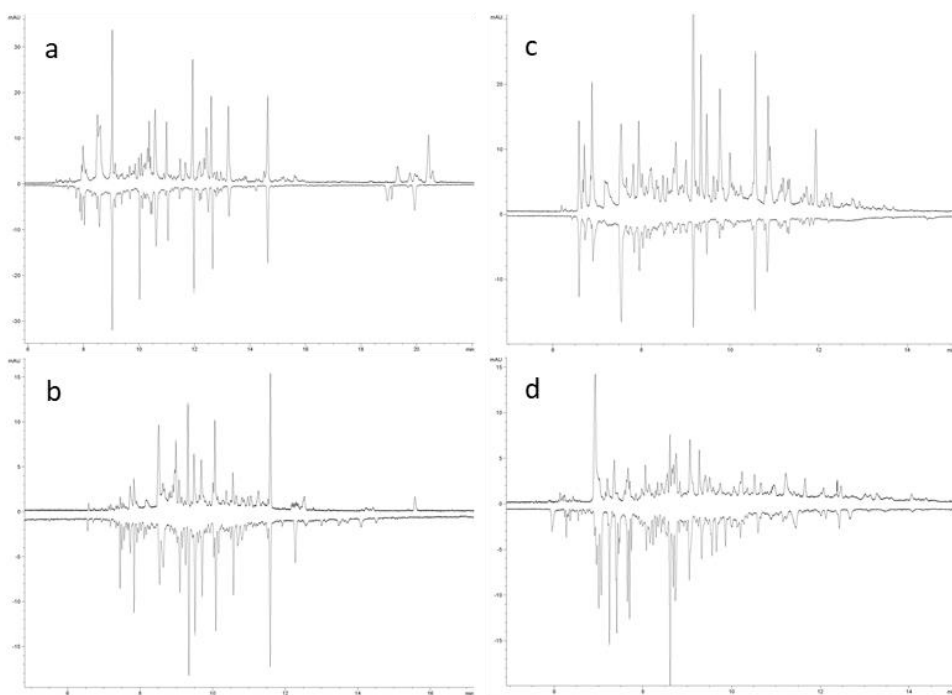
A csúcsterületekre kivétel nélkül nagy RSD% értékeket kaptam. Már a CZE módszer reprodukálhatósága (a) is a szokásos értékeknél rosszabb volt (2-10%), amit okozhatott a minták sómentesítése, amikor bizonyos peptidek eltérő koncentrációban eluálódhatnak eltérő esetekben vagy a csúcsok integrálása (21. ábra), hiszen a csúcsok jellemzően nagyon kicsik voltak (21. ábra, 3. csúcs) vagy nem volt alapvonal elválasztás (21. ábra, 1. és 2. csúcs). Ennél nagyobb RSD% értékeket kaptam a (b) és még nagyobbakat a (c) és (d) esetekben, viszont a (c) és (d) esetekben tapasztalt reprodukálhatóság között nem jelentős a különbség. Ez úgy értelmezhető, hogy a különböző minták a különböző peptideket kicsit eltérő mennyiségben tartalmazzák (a sómentesítés vagy a PDMS falon történő esetleges adszorpció miatt). Tovább fokozta az eredmények szórását, ha az emésztéshez különböző tölteteket használtam, mivel az eltérő töltetek nem teljesen egyformák, kis mértékben különbözhet a hosszuk és a tömörségük is. Viszont nem figyelhető meg további szórásnövekedés, ha a tripszines részecskék eltérő sarzsokból származtak, ami azért lehetséges, mert az optimalizált immobilizálási reakció során teljesen telített részecskéket kaptam.



21. ábra: A bontott BSA CZE peptid térképein kiválasztott három integrált csúcs kinagyítva. A csúcsterületek nagy szórását az okozhatta, hogy nem volt ezeknél a csúcsoknál alapvonal elválasztás, ill. a 3. csúcsnál a nagyon kicsi csúcsterület/magasság, ahol láthatóan alacsony a jel/zaj arány. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

5.2.5 Fehérjeminták emésztése

A töltetes IMER hatékonyságának vizsgálatát 4 fehérje emésztésével végeztem el [100]. Mioglobint (17 kDa), lizozimet (16 kDa), hemoglobint (62 kDa) és BSA-t (69 kDa) emésztettem és hasonlítottam össze ugyanezen fehérjék oldatban emésztésével. Tökéletes emésztéseket feltételezve a keletkező peptidek száma 19, 19, 31, ill. 78 a négy fehérjére, ebben a sorrendben. A töltetes IMER-rel való emésztés eredményei jól korreláltak ezekkel a számokkal, körülbelül 20, 20, 30 és 80 csúcsot számoltam az egyes elektroferogramokon (22. ábra).

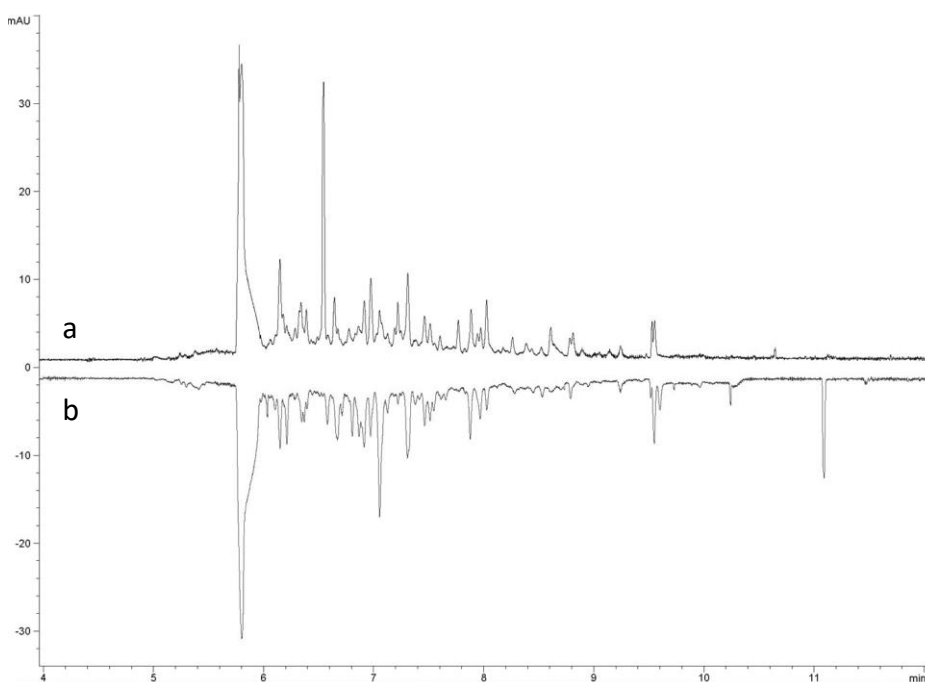


22. ábra: Négyféle emésztett fehérje CZE elektroferogramjai: (a) mioglobin, (b) lizozim, (c) hemoglobin és (d) BSA. A felső elektroferogramok mutatják az oldatban emésztéssel kapott minták, a tükröztetett elektroferogramok pedig az IMER-es emésztéssel kapott minták analíziseit. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

Az oldatban emésztéssel való összehasonlításból látszik, hogy a keletkező peptidek többsége megegyezik a két esetben, hiszen hasonló csúcsmintázatokat

kaptam, az azonos migrációs időkhöz tartozó csúcsok azonos peptidekhez tartoznak. A reakcióidő <10 s volt, amely idő alatt az emésztendő fehérjeminta átáramlott a tölteten. Bár az oldatban emésztés 16 órán át tartott, jelentős különbséget a kettő hatékonysága között nem találtam.

A reaktorról elvégeztem egy humán szérumminta emésztését [100]. A 23. ábrán látható, hogy ebben az esetben is hasonló eredményre jutottam a töltetes IMER-rel történő és az oldatban emésztéssel. A legnagyobb koncentrációban jelenlévő fehérje a szérumban a HSA, melynek tökéletes emésztéséből 74 peptid várható, amely összemérhető az elektroferogramokon látható csúcsok számával (~65-70).



23. ábra: (a) Oldatban emésztéssel és (b) töltetes IMER-rel emésztett humán szérum elektroferogramjai. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábrán feltüntetettekkel, de a minták sómentesítettek, az injektált minta: 200 mbar·s, ill. a kapilláris effektív hossza 72 cm. Az ábrát a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

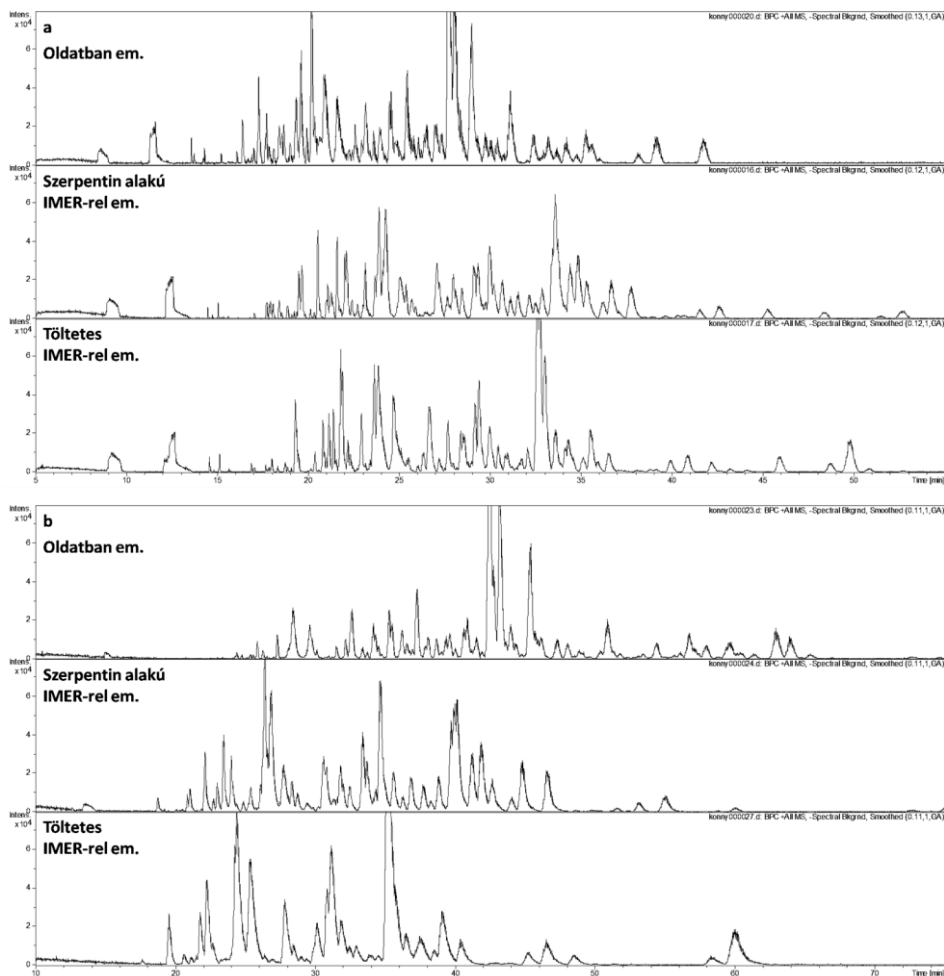
LC-MS/MS módszert is használtam az emésztés hatékonyságának ellenőrzésére [100]. Négyféle, a töltetes IMER-rel emésztett fehérjét vizsgáltam, az LC-MS/MS meghatározások eredményeit a 2. táblázat tartalmazza, az összes azonosított peptid listája a 4. függelékben található. Mindegyik fehérjét sikerült elfogadható SC%-kal meghatározni (29-50%), emellett egyik esetben sem sikerült kimutatni a tripszin önemésztéséből származó peptideket. Ezen fehérjék közül a BSA-t használják leggyakrabban a reaktorok hatékonyságának jellemzésére. A töltetes IMER-rel emésztett BSA-ra 29%-os SC%-t kaptam. Valószínűleg a használt LC-MS módszerrel nem tudtam az összes peptidet detektálni, hiszen a 4. függelékben is szereplő, azonosított peptidek száma jelentősen kevesebb, mint az emésztett BSA-ra CZE módszerrel kapott csúcsok száma. Ennek ellenére is a kapott érték összemérhető más, irodalomban található SC% értékekkel, amiket olyan IMER-ekkel történő emésztés után kaptak, ami kovalensen rögzített tripszint tartalmazott különféle szilárd hordozókon: 22 és 30%, 5 s reakcióidővel [54], 43%, 5 perces reakcióidővel [85], 46%, szintén 5 perces reakcióidővel [113], 23%, 12 perces reakcióidővel [95], 35%, 24 s reakcióidővel [49], 45%, 10 s reakcióidővel [114] és 40%, 5 s reakcióidővel [115].

2. táblázat: Négy fehérjeminta töltetes IMER-en való emésztése utáni LC-MS/MS analízis eredménye. A fehérjékhez tartozó meghatározott szekvenciák a 4. függelékben találhatók. A táblázat adatait a [100] hivatkozásból illesztettem be és fordítottam le, az Elsevier kiadó engedélyével.

Azonosított fehérje	Fehérje tömege (Da)	Szekvencia lefedettség (%)	Azonosítás score értéke
Lizozim	16228	50	370
Mióglobin	17072	50	372
Hemoglobin α -alegység	15130	31	197
Hemoglobin β -alegység	15944	40	379
BSA	69248	29	853

5.3 Eltérő módon emésztett könnyminták összehasonlítása

A két reaktor összehasonlítását egy könnyminta emésztésével és CZE-MS analízisével végeztem el. A könnymintát oldatban, ill. a kétféle reaktorral egyaránt megemésztettem, továbbá mindhárom mintát analizáltam sómentesítve és sómentesítés nélkül. Az eredményeket a 24. ábra és a 3. táblázat mutatja.



24. ábra: A háromféle emésztett könnyminta (a) sómentesítés nélküli és (b) sómentesítést követő CZE-MS analízise. A CZE-MS analízis során alkalmazott körülmények a 4.4.5 fejezetben találhatók.

Az itt bemutatott CZE-MS elektroferogramok is azt mutatják, hogy mindhárom reaktor képes volt megemészteni a könnymintát. A szerpentines IMER-rel való emésztés és az oldatban emésztés hasonlóan hatékonyak, míg a töltetes IMER-rel való emésztés hatékonysága kissé rosszabbnak tűnik, mivel az első két esetben hasonló mennyiségű, nagyszámú, míg a harmadik esetben valamivel kevesebb csúcsot (peptidet) detektáltam. Minden mintában lecsökkent a detektálható csúcsok száma sómentesítés hatására, ami alapján elmondható, hogy annak ellenére is megéri a mintákat sómentesítés nélkül mérni CZE-MS technikával, hogy a minták nagy mennyiségben tartalmaznak (nem illékony) karbamidot. Ennek magyarázata, hogy a sómentesítés során bizonyos peptidek elvesznek az elúciós lépést megelőzően (vagy nem kötődnek meg a C18 pipettahegyen vagy hamarabb eluálódnak a kellesténél). CZE-MS analízis esetén amiatt sem feltétlenül szükséges a sómentesítés, mivel az analízis során injektált minta mennyisége minimális (<100 nL), ami jelentősen hígul az MS-be érve az illékony CZE háttérelektrolit és segéd folyadékáram által.

3. táblázat: a 6 mintából kimutatott fehérjék, a hozzájuk tartozó SC% értékekkel. A táblázatban csak a legalább 2 egyedi és szignifikáns peptiddel meghatározott fehérjéket tüntettem fel.

	Nem sómentesített minta			Sómentesített minta		
	Oldatban	Szerpentin IMER	Töltetes IMER	Oldatban	Szerpentin IMER	Töltetes IMER
Laktotranszferrin	30%	33%	10%	10%	19%	8%
Lipokalin-1	21%	24%	36%	12%	17%	33%
Prolaktin-indukált fehérje	37%	-	-	-	-	-
Lizozim C	29%	39%	-	-	22%	-
Ig alfa-1 lánc	5%	-	-	-	-	-
Extracelluláris glikoprotein lakritin	21%	22%	30%	-	23%	15%
Prolinban gazdag fehérje 4	-	32%	32%	-	32%	32%
Tripszin	17%	-	-	-	-	-

A meghatározott fehérjék száma és SC% értékei alátámasztják, hogy valóban jobb eredményeket kaptam sómentesítés nélkül. Tripszint egyedül az oldatban emésztett – nem sómentesített – mintából sikerült kimutatni, ami azt jelenti, hogy a kétféle kifejlesztett reaktorban immobilizált tripszin nem képes mobilizálódni és elhagyni a reaktort kimutatható mennyiségben. Érdekes, hogy a prolaktin-indukált fehérjét és az Ig alfa-1 fehérjeláncot egyedül oldatban emésztéssel sikerült meghatározni, viszont ezek már sómentesítés hatására eltűntek a mintából. Ezzel szemben mindkét reaktorral sikerült meghatározni a prolinban gazdag fehérje 4-et, amit viszont oldatban emésztéssel nem határoztam meg. Ezen mérésekkel is igazoltam, hogy a reaktorok alkalmazásával jóval gyorsabb emésztés mellett érhető el az oldatban emésztés hatékonysága, azaz használatuk kedvező proteomikai célú kutatásokban.

6. Összefoglalás

A Kémiai Tudományok Doktori Iskolában folytatott kutatómunkám célja az volt, hogy fehérjék bontására alkalmas mikrofluidikai eszközöket fejlesszek ki. Ezen eszközök hordozzák a mikrofluidika és az immobilizált enzimek nyújtotta előnyöket (pl. kis mintaigény, eldobható (egyszer használatos) reaktor, megnövekedett enzimaktivitás és/vagy stabilitás). Munkám során két különböző típusú reaktort sikerült kifejlesztenem eltérő immobilizálási stratégiával.

Az egyik reaktor fejlesztésénél az volt a célom, hogy megalkossam a létező legegyszerűbben kialakítható enzimreaktort. Ezt úgy sikerült elérni, hogy egy PDMS csipben egy hosszú, szerpentin alakú csatornát alakítottam ki, amelyen csak keresztül kellett áramoltatni a tripszinoldatot annak immobilizálásához. Habár köztudott, hogy a PDMS kiváló adszorbens, ezt a tulajdonságát eddig nem használták ki enzimek immobilizálására, így ez az első olyan munka, melyben ez az egyszerű módszer használatos enzim immobilizálására. A reaktor egyszerűségét az is jól mutatja, hogy az adszorpciós felület maga a csip anyaga (a csatorna belső fala), így nem volt szükség valamilyen szilárd hordozó vagy felületi réteg kialakítására az immobilizáláshoz.

A reaktor kifejlesztéséhez első lépésként a tripszin adszorpcióját vizsgáltam, és megállapítottam, hogy a tripszin erősen adszorbeálódik PDMS felületen, vizes pufferekkel nem mosható le onnan (csak felületaktív anyagokkal vagy szerves oldószerekkel). Továbbá azt is igazoltam, hogy az adszorbeált tripszin mennyisége (és ezzel összefüggésben a reaktor aktivitása) függ a tripszinoldat koncentrációjától, töményebb tripszinoldatból a molekulák egymáshoz közelebb – „sűrűbben” – adszorbeálódnak. A CZE-vel végzett enzimstabilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a tripszin ~2 óráig marad aktív, majd fokozatosan elveszti aktivitását. Ez vélhetően a hidrofób PDMS felülettel való erős kölcsönhatásából eredő szétterülés következménye. Ezen tapasztalatok alapján a tripszin PDMS felületen való adszorpciójának mechanizmusára a többállapot kinetikai modellt javasoltam.

A reaktor emésztésének reprodukálhatóságát BSA minta emésztésével vizsgáltam, hatékonyságát négyféle mintafehérje (mioglobín, lizozim, hemoglobín, BSA) és könnyminták emésztésével igazoltam. Azt kaptam, hogy az emésztés minden esetben megfelelő volt, az oldatban emésztéssel szemben 16 óra helyett ~1 perc alatt sikerült így megemészteni a fehérjéket. A BSA peptidjeinek migrációs idői kiváló reprodukálhatóságot mutattak (RSD% <1%). Az egyes peptid térképek hasonlósága és az LC-MS/MS meghatározások igazolták, hogy a kétféle emésztés során keletkező peptidek többsége megegyezik.

A könnyminták mikrofluidikai reaktorral történő emésztése kézenfekvő a minta kis térfogata miatt; több, a könnyben nagyobb mennyiségben előforduló fehérjét sikerült kimutatni ezen minták reaktorral történő emésztésével. Az oldatban emésztéshez képest több fehérjét nagyobb SC%-kal sikerült kimutatni a reaktoros emésztéssel. A CZE peptid térképek jelentős eltérést mutattak, amikor különböző személyek könnyeit vizsgáltam, míg hasonló peptid térképeket kaptam egy személy két, azonos időben vett könnymintája esetén.

Egy kifejlesztett csipen 8 emésztés is végezhető párhuzamosan, de akár tovább is növelhető az elemzések száma még több csatorna ugyanazon csipen való elhelyezésével. Mivel az analízisekhez ~10 µL térfogatú mintára volt szükség, a teljes emésztési folyamat ~35 percet vett igénybe, ami tartalmazta a tripszin felvitelét (10 perc), a szabad tripszin kimosását (10 perc) és az emésztést (15 perc). A reaktor hátránya, hogy hamar elveszti aktivitását, azonban jól használható egyszerhasználatos reaktorként, hiszen az eszköz viszonylag olcsó, eldobható és így használata során nem kell tartani a minták közti keresztszennyezéstől.

Ezután újabb célként egy másik típusú – a szerpentin reaktorral ellentétben – jó stabilitással rendelkező reaktor tervezésébe kezdtem. A jobb stabilitás ára az lett, hogy a reaktor elkészítése valamivel körülményesebb. Immobilizálási stratégiának a tripszin kovalens rögzítését választottam, amit az indokolt, hogy kovalens kötés esetén az immobilizált enzimek általában jó

stabilitással rendelkeznek (mivel gátolt a felülettel való kölcsönhatásuk). Ennek az elvárásnak megfelelt a kapott IMER stabilitása: a reaktor 2 hónapos tárolást követően is aktív maradt, ill. az aktivitást az sem befolyásolta, hogy milyen módon tároltam (a csipben töltetként 4 °C-on vagy a tripszines részecskék szuszpenzióját fagyasztva -20 °C-on).

Habár a kovalens kötés létrehozásáért felelős reagensek arányait irodalomból vettem (az EDC/NHS immobilizálás általánosan használatos eljárás) [51], a tripszin/részecske arányát a kiindulási elegyben optimalizáltam, s az optimális értékkel dolgoztam kísérleteimben. Ezzel a kezdeti körülménnyel sikerült 10-13 µg tripszint immobilizálnom 1 mg részecskén, ami összemérhető más munkákban feltüntetett mennyiségekkel. Ennél a reaktornál is megvizsgáltam az emésztés hatékonyságát. Mivel a tripszin a részecskékből kialakított töltet felületén volt jelen, ezért azt vártam, hogy a reaktor hatékonysága legalább olyan jó lesz, mint a serpentine reaktoré, ugyanis a töltet nagy felület/térfogat aránya biztosítja a gyors (heterogén) katalízist (a reakció nem lesz diffúziógátolt). Tekintve a tripszin felületi borítottságát a tölteten, a töltetes reaktor hatékonysága az oldatban emésztéshez képest több, mint három nagyságrenddel nagyobb lehet.

Vizsgáltam a CZE analízis, emésztés, töltet kialakítás és immobilizálás peptid térképek felvételének reprodukálhatóságára gyakorolt hatását, melynek során minden esetben jó reprodukálhatóságokat kaptam a peptidek migrációs időire, ami azt mutatja, hogy azonos peptidek keletkeztek minden esetben. Nem különbözött jelentősen a reaktorral emésztett négyféle fehérje (mioglobin, lizozim, hemoglobin, BSA) és szérum minta az oldatban emésztett mintáktól, viszont az emésztési idő csupán ~10 s volt, szemben a 16 órával. Ezekből a mintákból sikerült LC-MS/MS fehérjemeghatározásokat is elvégezni, mely során kielégítő SC% értékeket (29-50%) kaptam.

Habár ezen reaktor kialakítása során egy jól ismert immobilizálási technikát alkalmaztam, a reaktor újszerűsége a kialakításában rejlik, hiszen mind a mai napig az irodalomban csak elvétve lehet PDMS csipben kialakított

tölteteket használó enzimreaktort (vagy bármilyen más, pl. elválasztó rendszert) találni. A reaktor segítségével akár 9 minta emésztése végezhető egyidejűleg, a reaktor 2 hónapig is megőrzi aktivitását, mely idő alatt többször használható emésztésre. Ez a hosszú élettartam kiküszöböli a reaktor azon hátrányát is, hogy az immobilizálási reakció hosszú (5 óra), hiszen egy nagyobb adag tripszines töltet elkészítése után ebből a töltetből sokáig lehet akár minden alkalommal friss, aktív tölteteket kialakítani, mivel egy-egy töltet kialakításához <2 mg töltet szükséges.

CZE-MS mérések segítségével összehasonlítottam a kétféle reaktor és az oldatban emésztés hatékonyságát. Megállapítottam, hogy CZE-MS analízis esetén a minták sómentesítésének elkerülésével jobb eredmények érhetők el (több meghatározott fehérje, magasabb SC% értékekkel). Ezzel a kísérlettel egy újabb módszerrel támasztottam alá, hogy a reaktorok alkalmazásával jóval gyorsabb emésztés mellett érhető el az oldatban emésztés hatékonysága.

Ezen reaktorok kifejlesztése mintául szolgálhat más típusú enzimekből hasonló reaktorok létrehozásához, amivel lehetőség nyílna arra, hogy egy komplex mikrofluidikai csipen több, különböző enzimaktivitással rendelkező reaktorokat alakítsak ki egymást követően. Például egy ilyen többenzimes rendszerben el lehetne végezni akár a fehérje emésztését követően a glikopeptidek glikánegységeinek felszabadítását. Mindkét csip-alapú reaktor további előnye, hogy viszonylag egyszerűen lehet őket kapcsolni MS-hez vagy további műveletek elvégzése is kivitelezhető a csipen (pl. peptidok sómentesítése, koncentrálása, elválasztása), amivel akár egy komplex fehérjeemésztő, dúsító, elválasztó és detektáló lab-on-a-chip megalkotására is mód nyílhat.

7. Summary

The purpose of my PhD research activity was to develop microfluidic devices capable of rapid protein digestion. These devices possess the advantageous features offered by microfluidics and by immobilized enzymes, that are the requirement of small sample volume, disposability, elevated enzyme activity and stability. During my research I succeeded in developing two different immobilized enzymatic reactors (IMERs) with different immobilization strategy.

My purpose was to create the simplest possible IMER with the development of the first reactor. This was achieved by forming a long serpentine-like channel in the PDMS microfluidic chip, through which trypsin solution was transferred to immobilize the enzyme. Although it is well-known that PDMS is an excellent adsorbent of large macromolecules, this property was not utilized for enzyme immobilization thus far, which means that this is the first work applying this simple immobilization approach. The simplicity of the reactor is guaranteed by using the wall of the PDMS chip as solid immobilization support, therefore, the formation of supports (e.g. packings, membranes) or interfacial layers (e.g. LBL adsorption) was not necessary.

The first step in the development was the demonstration of trypsin adsorption on the PDMS surface. According to my atomic force microscopic (AFM) and surface plasmon resonance (SPR) studies, trypsin adsorbs strongly to the PDMS surface and it cannot be washed out with aqueous solutions. It was also proven that the amount of adsorbed trypsin (and the IMER's activity, as well) depends on the trypsin concentration: when trypsin was applied in higher concentration, the enzyme molecules can be localized more tightly – close to each other – on the surface. The CZE enzyme stability examinations showed that trypsin retained maximal activity for ~2 hours, then the activity gradually decreased and reached no activity after 1 day. This is likely due to the spreading effect occurring on highly hydrophobic surfaces, as a consequence of the strong

interactions with the hydrophobic side chains of the enzyme. Based on the obtained results, multiple state model was suggested as kinetic model of the adsorption of trypsin from aqueous media to the hydrophobic PDMS surface.

The digestion reproducibility of the IMER was examined by the digestion of BSA samples and the digestion efficiency was tested with 4 standard protein samples (myoglobin, lysozyme, hemoglobin and BSA) and tear samples. Sufficient digestion was obtained in each case, digestion time was ~1 min compared to 16 hours by using in solution digestion. The BSA digest showed excellent reproducibility for the peptides' migration times (RSD% <1%). The similarity of the peptide maps obtained from the 2 different digestion methods and the LC-MS/MS determinations proved that mostly the same peptides were formed during digestion.

Digesting tear samples with microfluidic reactors seems straightforward as of the limited volume of tear. Several proteins (mostly those with higher abundance) were identified from these samples: more protein hits with higher sequence coverage values were acquired after microfluidic IMER digestion (compared to in solution digestion). CZE peptide maps were significantly different when tears from different persons were examined, while similar profiles were obtained for samples collected from the same person at the same period of the day.

With the proposed IMER 8 digestions can be performed at the same time, but this number might be further increased by integrating more channels to the same chip. As ~10 μ L sample is necessary for the analysis, the whole digestion procedure takes ~35 min, which includes the trypsin immobilization (10 min), elimination of the free trypsin (10 min) and digestion (15 min). Although adsorbed trypsin loses activity within 4 hours, it might be utilized as a disposable/single use IMER, as the chip is relatively cheap and there is no cross contamination between the samples.

After this reactor was characterized, I started to develop another type of IMER, with the desire to create one with good stability. To have good enzyme

stability, the immobilization method must be somewhat more complex. I chose a covalent coupling reaction (EDC/NHS) to covalently attach trypsin to amino-coated silica particles, as it is generally true that covalently immobilized enzymes possess excellent stability (due to prohibited interaction with the surface). This expectation was fulfilled by the IMER: it retained tryptic activity after 2 months of storage, furthermore, the way of storing trypsin-coated particles did not affect the activity (good activity was achieved after storing either as a packing immersed into storage solution at 4 °C or as a suspension of the particles frozen at -20 °C).

As the applied reaction is used widely, the concentrations of the reagents were obtained from literature [51]. However, the ratio of trypsin/particle in the initial immobilization mixture was optimized and the optimal value was applied in my immobilization experiments. With these circumstances, 10-13 µg trypsin was successfully immobilized per 1 mg particle, which is comparable with other works.

I examined the digestion efficiency of this reactor, as well. As trypsin was present on the surface of the packing created from the coated particles, I expected equal or better efficiency compared to the serpentine-like IMER, because the high surface-to-volume ratio of the packing provided rapid (heterogenic) catalysis (the reaction was not limited by diffusion). Thusly, digestion efficiency of the IMER might be at least 3 orders of magnitude higher compared to in solution digestion, with respect to the trypsin concentration on the surface versus in solution.

I also investigated how the CZE analysis, digestion, packing formation and immobilization affected the reproducibility of the CZE peptide maps. In all cases, good reproducibility was achieved for migration times, meaning the formation of the same peptides in each case. The 4 microfluidic IMER digested proteins (myoglobin, lysozyme, hemoglobin, BSA) and human serum samples did not differ significantly from the in solution digested samples, however, digestion time was only ~10 sec in the former cases (compared to 16 hours with

in solution digestion). LC-MS/MS analyses of these samples were performed, proteins were identified with sufficient sequence coverage values (29-50%).

Although a well-known immobilization strategy was utilized for the development of the reactor, the novelty of the IMER lies in its construction: hardly any IMER based on packed beads integrated into PDMS chip can be found in literature. With this IMER even 9 protein samples can be digested simultaneously, it retains tryptic activity for at least 2 months, in which period the IMER can be used for multiple digestions. This long shelf-life compensates the long immobilization reaction (5 hours), because it is possible to form fresh, active packings from the trypsin-coated particles any time within the 2 months period, if a larger particle batch was prepared initially (one packing requires <2 mg particle).

Digestion efficiencies of the 2 developed IMERs and standard in solution digestion were compared with CZE-MS analyses. It was proven that better analysis results (more identified proteins with higher coverage) can be obtained when samples were not desalinated. With this experiment it was confirmed, that the efficiency of the in-solution digestion can be attained more rapidly by using any of these IMERs.

The development of these reactors might set an example to create such IMERs of different enzymes. Thus, it would be possible to successively integrate multiple IMERs with various enzymatic activities into a chip. This might enable the deglycosylation of glycopeptides after enzymatic (glyco)protein digestion. Both chip-based IMERs have the advantages that they are relatively easy to couple with mass spectrometry and additional operations might be implemented into the same chip (e.g. desalination, preconcentration, separation of peptides), which enables the fabrication of a complex protein digestion, peptide separation and detection lab-on-a-chip.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attila egyetemi tanárnak a munkám során nyújtott sok segítségéért és türelméért.

Köszönöm Dr. Andrási Melindának, Dr. Nagy Andreának, Dr. Koczka Péter Istvánnak, Dr. Lehoczki Gábornak, továbbá Molnár Andreának, Nagy Cynthia Nórának, ill. a D501 labor korábbi és jelenlegi dolgozóinak, hogy munkámhoz nem csak tanácsokat adtak, hanem pozitív, baráti légkört is teremtetek.

Jó tanácsaikat, munkámhoz fűzött észrevételeiket köszönöm Dr. Gyémánt Gyöngyinek és Dr. Lázár Istvánnak. A mérési lehetőségeket köszönöm Dr. Bakó Józsefnek (SPR) a DE Bioanyagtani és Fogpótlástani nem önálló Tanszékről, Dr. Csarnovics Istvánnak (AFM) a DE Kísérleti Fizikai Tanszékről, ill. Dr. Csósz Évának és Kalló Gergőnek (LC-MS) a DE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetből.

Végül szeretném megköszönni feleségemnek, Kiss Virágnak szeretetét és támogatását, ill. családomnak és barátaimnak a türelmüket, biztatásukat.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 és 2.3.3-15-2016-00004 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Köszönöm az OTKA (K111932) támogatását, mely a munkám során használt berendezések és anyagok beszerzését tették lehetővé.

Köszönöm a CEEPUS programnak, hogy több alkalommal részt vehettem külföldi tanulmányutakon, nyári egyetemeken (CIII-RO-0010-12-1718).

Dolgozatom az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

9. Irodalomjegyzék

- [1] M.R. Wilkins, J.-C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphery-Smith, D.F. Hochstrasser, K.L. Williams, Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13 (1996) 19–50.
- [2] M. Mann, O.N. Jensen, Proteomic analysis of post-translational modifications, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 255–261.
- [3] H.K. Hustoft, H. Malerod, S.R. Wilson, L. Reubsaet, E. Lundanes, T. Greibrokk, A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics, in: *Integr. Proteomics, InTech, Rijeka*, 2012.
- [4] A. Kecskemeti, A. Gaspar, Particle-based immobilized enzymatic reactors in microfluidic chips, *Talanta*. 180 (2018) 211–228.
- [5] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–6307.
- [6] S. Liu, H. Bao, L. Zhang, G. Chen, Efficient proteolysis strategies based on microchip bioreactors, *J. Proteomics*. 82 (2013) 1–13.
- [7] G.M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D.E. Ingber, Soft lithography in biology and biochemistry, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3 (2001) 335–373.
- [8] M.R. Wilkins, R.D. Appel, Ten Years of the Proteome, in: *Proteome Res.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007: pp. 1–13.
- [9] P.H. O’Farrell, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007–4021.
- [10] A. Gorg, W. Postel, J. Weser, S. Gunther, J.R. Strahler, S.M. Hanash, L. Somerlot, Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension in the presence of nonionic detergent, *Electrophoresis*. 8 (1987) 45–51.
- [11] P. Matsudaira, Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10035–10038.
- [12] K. Biemann, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biol. Mass Spectrom.* 16 (1988) 99–111.
- [13] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (1988) 151–153.
- [14] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*. 246 (1989) 64–71.
- [15] W.J. Henzel, T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 5011–5015.
- [16] P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, Protein identification by mass profile fingerprinting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (1993) 58–64.
- [17] D.J.C. Pappin, P. Hojrup, A.J. Bleasby, Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting, *Curr. Biol.* 3 (1993) 327–332.
- [18] 2.2.55. Peptide mapping, *Eur. Pharmacopoeia* 5.0. (2005) 82–86.
- [19] J.R. Yates, J.K. Eng, A.L. McCormack, D. Schieltz, Method to correlate tandem

- mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1426–1436.
- [20] M.P. Washburn, D. Wolters, J.R. Yates, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 242–247.
 - [21] L. Sun, A.S. Hebert, X. Yan, Y. Zhao, M.S. Westphall, M.J.P. Rush, G. Zhu, M.M. Champion, J.J. Coon, N.J. Dovichi, Over 10 000 peptide identifications from the HeLa proteome by using single-shot capillary zone electrophoresis combined with tandem mass spectrometry, *Angew. Chemie.* 126 (2014) 14151–14153.
 - [22] S. Ekstrom, P. Onnerfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification, *Anal. Chem.* 72 (2000) 286–293.
 - [23] K.A. Cobb, M. Novotny, High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography, using immobilized trypsin for protein digestion, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2226–2231.
 - [24] M. Ye, S. Hu, R.M. Schoenherr, N.J. Dovichi, On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis.* 25 (2004) 1319–1326.
 - [25] M. Zeisbergerova, A. Adamkova, Z. Glatz, Integration of on-line protein digestion by trypsin in CZE by means of electrophoretically mediated microanalysis, *Electrophoresis.* 30 (2009) 2378–2384.
 - [26] E. Bonneil, M. Mercier, K.C. Waldron, Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta.* 404 (2000) 29–45.
 - [27] P. Huang, Jing-TaoWu, D.M. Lubman, Separation of tryptic digests using a modified buffer in pressurized capillary electrochromatography with an ion trap storage/reflectron time-of-flight mass spectrometer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3003–3008.
 - [28] D.R. Stoll, P.W. Carr, Fast, comprehensive two-dimensional HPLC separation of tryptic peptides based on high-temperature HPLC, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 5034–5035.
 - [29] S. Feng, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, H. Zou, Coupling the immobilized trypsin microreactor of monolithic capillary with μ RPLC–MS/MS for shotgun proteome analysis, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 422–428.
 - [30] N.I. Govorukhina, T.H. Reijmers, S.O. Nyangoma, A.G.J. van der Zee, R.C. Jansen, R. Bischoff, Analysis of human serum by liquid chromatography–mass spectrometry: Improved sample preparation and data analysis, *J. Chromatogr. A.* 1120 (2006) 142–150.
 - [31] A. Gaspar, F.A. Gomez, Application of surface plasmon resonance spectroscopy for adsorption studies of different types of components on poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chim. Acta.* 777 (2013) 72–77.
 - [32] J.M. Bolivar, C. Luley-Goedl, E. Leitner, T. Sawangwan, B. Nidetzky, Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: Options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format, *J. Biotechnol.* 257 (2017) 131–138.
 - [33] J. Wiesbauer, J.M. Bolivar, M. Mueller, M. Schiller, B. Nidetzky, Oriented immobilization of enzymes made fit for applied biocatalysis: non-covalent attachment to anionic supports using Zbasic2 module, *ChemCatChem.* 3 (2011)

- 1299–1303.
- [34] M. Nouaimi, K. Möschel, H. Bisswanger, Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001) 567–574.
 - [35] C.R. Boehm, P.S. Freemont, O. Ces, Design of a prototype flow microreactor for synthetic biology in vitro, *Lab Chip.* 13 (2013) 3426–3432.
 - [36] J. Heo, Spatial distance effect of bienzymes on the efficiency of sequential reactions in a microfluidic reactor packed with enzyme-immobilized microbeads, *Anal. Sci.* 30 (2014) 991–997.
 - [37] G.H. Seong, J. Heo, R.M. Crooks, Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3161–3167.
 - [38] D. Jussen, H. Soltner, B. Stute, W. Wiechert, E. von Lieres, M. Pohl, μ MORE: A microfluidic magnetic oscillation reactor for accelerated parameter optimization in biocatalysis, *J. Biotechnol.* 231 (2016) 174–182.
 - [39] A. Srinivasan, H. Bach, D.H. Sherman, J.S. Dordick, Bacterial P450-catalyzed polyketide hydroxylation on a microfluidic platform, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 528–535.
 - [40] L. Shangguan, L. Zhang, Z. Xiong, J. Ren, R. Zhang, F. Gao, W. Zhang, Investigation of bi-enzymatic reactor based on hybrid monolith with nanoparticles embedded and its proteolytic characteristics, *J. Chromatogr. A.* 1388 (2015) 158–166.
 - [41] Y. Zhang, Y. Liu, J. Kong, P. Yang, Y. Tang, B. Liu, Efficient proteolysis system: A nanozeolite-derived microreactor, *Small.* 2 (2006) 1170–1173.
 - [42] Y. Huang, W. Shan, B. Liu, Y. Liu, Y. Zhang, Y. Zhao, H. Lu, Y. Tang, P. Yang, Zeolite nanoparticle modified microchip reactor for efficient protein digestion, *Lab Chip.* 6 (2006) 534–539.
 - [43] A.G. Hati, D.C. Bassett, J.M. Ribe, P. Sikorski, D.A. Weitz, B.T. Stokke, Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices, *Lab Chip.* 16 (2016) 3718–3727.
 - [44] A. Pohar, I. Plazl, P. Znidarsic-Plazl, Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale, *Lab Chip.* 9 (2009) 3385–3390.
 - [45] K.Y. Chumbimuni-Torres, R.E. Coronado, A.M. Mfuh, C. Castro-Guerrero, M.F. Silva, G.R. Negrete, R. Bizios, C.D. Garcia, Adsorption of proteins to thin-films of PDMS and its effect on the adhesion of human endothelial cells, *RSC Adv.* 1 (2011) 706–714.
 - [46] B. Huang, H. Wu, S. Kim, R.N. Zare, Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl- β -D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption, *Lab Chip.* 5 (2005) 1005–1007.
 - [47] F. Xi, J. Wu, Z. Jia, X. Lin, Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead, *Process Biochem.* 40 (2005) 2833–2840.
 - [48] H. Mao, T. Yang, P.S. Cremer, Design and characterization of immobilized enzymes in microfluidic systems, *Anal. Chem.* 74 (2002) 379–385.
 - [49] J. Lee, H.K. Musyimi, S.A. Soper, K.K. Murray, Development of an automated digestion and droplet deposition microfluidic chip for MALDI-TOF MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 964–972.
 - [50] Y. Liu, H. Lu, W. Zhong, P. Song, J. Kong, P. Yang, H.H. Girault, B. Liu, Multilayer-assembled microchip for enzyme immobilization as reactor toward low-level protein identification, *Anal. Chem.* 78 (2006) 801–808.

- [51] J. Krenkova, K. Kleparnik, F. Foret, Capillary electrophoresis mass spectrometry coupling with immobilized enzyme electrospray capillaries, *J. Chromatogr. A.* 1159 (2007) 110–118.
- [52] L.N. Amankwa, W.G. Kuhr, Trypsin-modified fused-silica capillary microreactor for peptide mapping by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1610–1613.
- [53] L. Licklider, W.G. Kuhr, M.P. Lacey, T. Keough, M.P. Purdon, R. Takigiku, Online microreactors/capillary electrophoresis/mass spectrometry for the analysis of proteins and peptides, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4170–4177.
- [54] H. Wu, J. Zhai, Y. Tian, H. Lu, X. Wang, W. Jia, B. Liu, P. Yang, Y. Xu, H. Wang, Microfluidic enzymatic-reactors for peptide mapping: strategy, characterization, and performance, *Lab Chip.* 4 (2004) 588–597.
- [55] J.W. Cooper, J. Chen, Y. Li, C.S. Lee, Membrane-based nanoscale proteolytic reactor enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification using mass spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1067–1074.
- [56] J. Gao, J. Xu, L.E. Locascio, C.S. Lee, Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2648–2655.
- [57] F. Xu, W.-H. Wang, Y.-J. Tan, M.L. Bruening, Facile trypsin immobilization in polymeric membranes for rapid, efficient protein digestion, *Anal. Chem.* 82 (2010) 10045–10051.
- [58] T. Honda, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Maeda, Facile preparation of an enzyme-immobilized microreactor using a cross-linking enzyme membrane on a microchannel surface, *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 2163–2171.
- [59] G. Nair, J.F. Gargiuli, N.R. Shiju, Z. Rong, E. Shapiro, D. Drikakis, P. Vadgama, In situ fabrication of cross-linked protein membranes by using microfluidics, *ChemBioChem.* 7 (2006) 1683–1689.
- [60] R.A. Sheldon, R. Schoevaart, L.M. Van Langen, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review), *Biocatal. Biotransformation.* 23 (2005) 141–147.
- [61] F. Svec, Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports, *Electrophoresis.* 27 (2006) 947–961.
- [62] J. Krenkova, Z. Bilkova, F. Foret, Characterization of a monolithic immobilized trypsin microreactor with on-line coupling to ESI-MS, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1675–1684.
- [63] J. Duan, L. Sun, Z. Liang, J. Zhang, H. Wang, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, Rapid protein digestion and identification using monolithic enzymatic microreactor coupled with nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1106 (2006) 165–174.
- [64] A.K. Palm, M. V. Novotny, Analytical characterization of a facile porous polymer monolithic trypsin microreactor enabling peptide mass mapping using mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1374–1382.
- [65] K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyo'oka, On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2943–2949.
- [66] R. Nicoli, S. Rudaz, C. Stella, J.-L. Veuthey, Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2695–2699.

- [67] R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 398–407.
- [68] J. Ma, Z. Liang, X. Qiao, Q. Deng, D. Tao, L. Zhang, Y. Zhang, Organic–inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2949–2956.
- [69] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.-L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 99–109.
- [70] M.T. Dulay, Q.J. Baca, R.N. Zare, Enhanced proteolytic activity of covalently bound enzymes in photopolymerized sol gel, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4604–4610.
- [71] S. Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi, High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 57–62.
- [72] C. Temporini, E. Perani, E. Calleri, L. Dolcini, D. Lubda, G. Caccialanza, G. Massolini, Pronase-immobilized enzyme reactor: an approach for automation in glycoprotein analysis by LC/LC–ESI/MSⁿ, *Anal. Chem.* 79 (2007) 355–363.
- [73] J. Duan, Z. Liang, C. Yang, J. Zhang, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, Rapid protein identification using monolithic enzymatic microreactor and LC-ESI-MS/MS, *Proteomics* 6 (2006) 412–419.
- [74] R.M. Schoenherr, M. Ye, M. Vannatta, N.J. Dovichi, CE-Microreactor-CE-MS/MS for protein analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2230–2238.
- [75] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, High-throughput peptide mass mapping using a microdevice containing trypsin immobilized on a porous polymer monolith coupled to MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometers, *J. Proteome Res.* 1 (2002) 563–568.
- [76] G.A.M. Mersal, U. Bilitewski, Development of monolithic enzymatic reactors in glass microchips for the quantitative determination of enzyme substrates using the example of glucose determination via immobilized glucose oxidase, *Electrophoresis* 26 (2005) 2303–2312.
- [77] M.F. Bedair, R.D. Oleschuk, Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1130–1138.
- [78] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4081–4088.
- [79] C. Yu, S. Mutlu, P. Selvaganapathy, C.H. Mastrangelo, F. Svec, J.M.J. Frechet, Flow control valves for analytical microfluidic chips without mechanical parts based on thermally responsive monolithic polymers, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1958–1961.
- [80] J. Qiao, L. Qi, H. Yan, Y. Li, X. Mu, Microchip CE-LIF method for the hydrolysis of L-glutamine by using L-asparaginase enzyme reactor based on gold nanoparticle, *Electrophoresis* 34 (2013) 409–416.
- [81] A.M. Elizarov, R.M. van Dam, Y.S. Shin, H.C. Kolb, H.C. Padgett, D. Stout, J. Shu, J. Huang, A. Daridon, J.R. Heath, Design and optimization of coin-shaped microreactor chips for PET radiopharmaceutical synthesis, *J. Nucl. Med.* 51 (2010) 282–287.
- [82] J. Sheng, L. Zhang, J. Lei, H. Ju, Fabrication of tunable microreactor with

- enzyme modified magnetic nanoparticles for microfluidic electrochemical detection of glucose, *Anal. Chim. Acta.* 709 (2012) 41–46.
- [83] A. Le Nel, J. Krenkova, K. Kleparnik, C. Smadja, M. Taverna, J.-L. Viovy, F. Foret, On-chip tryptic digest with direct coupling to ESI-MS using magnetic particles, *Electrophoresis.* 29 (2008) 4944–4947.
- [84] M. Slovakova, N. Minc, Z. Bilkova, C. Smadja, W. Faigle, C. Futterer, M. Taverna, J.-L. Viovy, Use of self assembled magnetic beads for on-chip protein digestion, *Lab Chip.* 5 (2005) 935–942.
- [85] J. Liu, S. Lin, D. Qi, C. Deng, P. Yang, X. Zhang, On-chip enzymatic microreactor using trypsin-immobilized superparamagnetic nanoparticles for highly efficient proteolysis, *J. Chromatogr. A.* 1176 (2007) 169–177.
- [86] Y. Li, X. Xu, B. Yan, C. Deng, W. Yu, P. Yang, X. Zhang, Microchip reactor packed with metal-ion chelated magnetic silica microspheres for highly efficient proteolysis, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2367–2375.
- [87] Z. Bilkova, M. Slovakova, N. Minc, C. Futterer, R. Cecal, D. Horak, M. Benes, I. le Potier, J. Krenkova, M. Przybylski, J.-L. Viovy, Functionalized magnetic micro- and nanoparticles: Optimization and application to μ -chip tryptic digestion, *Electrophoresis.* 27 (2006) 1811–1824.
- [88] Q. Min, X. Zhang, R. Wu, H. Zou, J.-J. Zhu, A novel magnetic mesoporous silica packed S-shaped microfluidic reactor for online proteolysis of low-MW proteome, *Chem. Commun.* 47 (2011) 10725–10727.
- [89] A. Le Nel, N. Minc, C. Smadja, M. Slovakova, Z. Bilkova, J.-M. Peyrin, J.-L. Viovy, M. Taverna, Controlled proteolysis of normal and pathological prion protein in a microfluidic chip, *Lab Chip.* 8 (2008) 294–301.
- [90] Y. Li, B. Yan, C. Deng, W. Yu, X. Xu, P. Yang, X. Zhang, Efficient on-chip proteolysis system based on functionalized magnetic silica microspheres, *Proteomics.* 7 (2007) 2330–2339.
- [91] Y. Li, R. Wojcik, N.J. Dovichi, A replaceable microreactor for on-line protein digestion in a two-dimensional capillary electrophoresis system with tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2007–2011.
- [92] C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault, D.J. Harrison, Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1377–1383.
- [93] P. Liuni, T. Rob, D.J. Wilson, A microfluidic reactor for rapid, low-pressure proteolysis with on-chip electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 315–320.
- [94] C. Wang, A.B. Jemere, D.J. Harrison, Multifunctional protein processing chip with integrated digestion, solid-phase extraction, separation and electrospray, *Electrophoresis.* 31 (2010) 3703–3710.
- [95] L.J. Jin, J. Ferrance, J.C. Sanders, J.P. Landers, A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping, *Lab Chip.* 3 (2003) 11–18.
- [96] J.R. Freije, P.P.M.F.A. Mulder, W. Werkman, L. Rieux, H.A.G. Niederlander, E. Verpoorte, R. Bischoff, Chemically modified, immobilized trypsin reactor with improved digestion efficiency, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1805–1813.
- [97] A. Berta, Collection of tear samples with or without stimulation., *Am. J. Ophthalmol.* 96 (1983) 115–116.
- [98] A. Kecskemeti, C. Nagy, E. Csosz, G. Kallo, A. Gaspar, The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein

- digestion of human tear samples, *Proteomics - Clin. Appl.* 11 (2017) 1700055.
- [99] A. Kecskemeti, J. Bako, I. Csarnovics, E. Csosz, A. Gaspar, Development of an enzymatic reactor applying spontaneously adsorbed trypsin on the surface of a PDMS microfluidic device, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3573–3585.
 - [100] A. Kecskemeti, A. Gaspar, Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion, *Talanta*. 166 (2017) 275–283.
 - [101] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
 - [102] A. Gaspar, A. Kecskemeti, F.A. Gomez, Use of surface plasmon resonance to study the adsorption of detergents on poly(dimethylsiloxane) surfaces, *Electrophoresis*. 34 (2013) 1249–1252.
 - [103] F. Markey, Real-time analysis of biomolecular interactions: applications of BIACORE, 1st ed., Springer-Verlag, Tokyo, 2000.
 - [104] F. Secundo, Conformational changes of enzymes upon immobilisation, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6250–6261.
 - [105] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters, *Soft Matter*. 5 (2009) 1039–1047.
 - [106] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106.
 - [107] G.J. Szollosi, I. Derenyi, J. Voros, Reversible mesoscopic model of protein adsorption: From equilibrium to dynamics, *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.* 343 (2004) 359–375.
 - [108] G.A. de Souza, L.M.F. Godoy, M. Mann, Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors, *Genome Biol.* 7 (2006) R72.1-11.
 - [109] A.M. Azzarolo, K. Brew, S. Kota, O. Ponomareva, J. Schwartz, C. Zylberberg, Presence of tear lipocalin and other major proteins in lacrimal fluid of rabbits, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 138 (2004) 111–117.
 - [110] N. Gonzalez, I. Iloro, J.A. Duran, F. Elortza, T. Suarez, Evaluation of inter-day and inter-individual variability of tear peptide/protein profiles by MALDI-TOF MS analyses, *Mol. Vis.* 18 (2012) 1572–1582.
 - [111] L. Sun, G. Zhu, X. Yan, S. Mou, N.J. Dovichi, Uncovering immobilized trypsin digestion features from large-scale proteome data generated by high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1337 (2014) 40–47.
 - [112] L. Sun, G. Zhu, N.J. Dovichi, Integrated capillary zone electrophoresis–electrospray ionization tandem mass spectrometry system with an immobilized trypsin microreactor for online digestion and analysis of picogram amounts of RAW 264.7 cell lysate, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4187–4194.
 - [113] Y. Li, X. Xu, C. Deng, P. Yang, X. Zhang, Immobilization of trypsin on superparamagnetic nanoparticles for rapid and effective proteolysis, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 3849–3855.
 - [114] T. Liu, S. Wang, G. Chen, Immobilization of trypsin on silica-coated fiberglass core in microchip for highly efficient proteolysis, *Talanta*. 77 (2009) 1767–1773.
 - [115] H. Fan, G. Chen, Fiber-packed channel bioreactor for microfluidic protein digestion, *Proteomics*. 7 (2007) 3445–3449.
 - [116] M. Conejero-Muriel, I. Rodriguez-Ruiz, C. Verdugo-Escamilla, A. Llobera, J.A. Gavira, Continuous sensing photonic lab-on-a-chip platform based on cross-linked enzyme crystals, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11919–11923.

- [117] A. Nomura, S. Shin, O.O. Mehdi, J.-M. Kauffmann, Preparation, characterization, and application of an enzyme-immobilized magnetic microreactor for flow injection analysis, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5498–5502.
- [118] A. Blandino, M. Macias, D. Cantero, Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochem.* 36 (2001) 601–606.
- [119] A. Schenk Mayerova, M. Bucko, P. Gemeiner, D. Trelova, I. Lacik, D. Chorvat, P. Acai, M. Polakovic, L. Lipták, M. Rebros, M. Rosenberg, V. Stefuca, V. Nedela, E. Tihlarikova, Physical and bioengineering properties of polyvinyl alcohol lens-shaped particles versus spherical polyelectrolyte complex microcapsules as immobilisation matrices for a whole-cell Baeyer–Villiger monooxygenase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174 (2014) 1834–1849.
- [120] C. Berne, L. Betancor, H.R. Luckarift, J.C. Spain, Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 2631–2636.
- [121] L. Blanes, M.F. Mora, C.L. do Lago, A. Ayon, C.D. Garcia, Lab-on-a-chip biosensor for glucose based on a packed immobilized enzyme reactor, *Electroanalysis.* 19 (2007) 2451–2456.
- [122] T. Ito, M. Kunimatsu, S. Kaneko, S. Ohya, K. Suzuki, Microfluidic device for the detection of glucose using a micro direct methanol fuel cell as an amperometric detection power source, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1725–1730.
- [123] D.N. Kim, Y. Lee, W.-G. Koh, Fabrication of microfluidic devices incorporating bead-based reaction and microarray-based detection system for enzymatic assay, *Sensors Actuators B.* 137 (2009) 305–312.
- [124] G.H. Seong, R.M. Crooks, Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13360–13361.
- [125] M.A. Bynum, H. Yin, K. Felts, Y.M. Lee, C.R. Monell, K. Killeen, Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8818–8825.
- [126] M. Bucko, A. Vikartovska, I. Lacik, G. Kollarikova, P. Gemeiner, V. Patoprsty, M. Brygin, Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 118–126.
- [127] S. V. Pereira, G.A. Messina, J. Raba, Integrated microfluidic magnetic immunosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*, *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 253–257.
- [128] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori, Integration of an immunosorbent assay system: analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1144–1147.
- [129] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1213–1218.
- [130] K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon- γ , *Electrophoresis.* 23 (2002) 734–739.
- [131] R.-P. Liang, X.-N. Wang, C.-M. Liu, X.-Y. Meng, J.-D. Qiu, Construction of graphene oxide magnetic nanocomposites-based on-chip enzymatic microreactor

- for ultrasensitive pesticide detection, *J. Chromatogr. A*. 1315 (2013) 28–35.
- [132] S. Banu, G.M. Greenway, T. McCreedy, R. Shaddick, Microfabricated bioreactor chips for immobilised enzyme assays, *Anal. Chim. Acta*. 486 (2003) 149–157.
 - [133] S. Kundu, A.S. Bhangale, W.E. Wallace, K.M. Flynn, C.M. Guttman, R.A. Gross, K.L. Beers, Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6006–6011.
 - [134] Y. Liu, Y. Xue, J. Ji, X. Chen, J. Kong, P. Yang, H.H. Girault, B. Liu, Gold nanoparticle assembly microfluidic reactor for efficient on-line proteolysis, *Mol. Cell. Proteomics*. 6 (2007) 1428–1436.
 - [135] S. Wang, F.E. Regnier, Proteolysis of whole cell extracts with immobilized enzyme columns as part of multidimensional chromatography, *J. Chromatogr. A*. 913 (2001) 429–436.
 - [136] M. Conejero-Muriel, I. Rodriguez-Ruiz, S. Martinez-Rodriguez, A. Llobera, J.A. Gavira, McCLEC, a robust and stable enzymatic based microreactor platform, *Lab Chip*. 15 (2015) 4083–4089.
 - [137] L.L. Woodcock, C. Wiles, G.M. Greenway, P. Watts, A. Wells, S. Eyley, Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novozyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor, *Biocatal. Biotransformation*. 26 (2008) 501–507.
 - [138] M. Cvjetko, J. Vorkapic-Furac, P. Znidarsic-Plazl, Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor, *Process Biochem.* 47 (2012) 1344–1350.
 - [139] J. Madarasz, D. Nemeth, J. Bakos, L. Gubicza, P. Bakonyi, Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor, *J. Clean. Prod.* 93 (2015) 140–144.
 - [140] A. Pohar, P. Znidarsic-Plazl, I. Plazl, Integrated system of a microbioreactor and a miniaturized continuous separator for enzyme catalyzed reactions, *Chem. Eng. J.* 189–190 (2012) 376–382.
 - [141] I. Dencic, S. de Vaan, T. Noel, J. Meuldijk, M. de Croon, V. Hessel, Lipase-based biocatalytic flow process in a packed-bed microreactor, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 10951–10960.
 - [142] J. Wang, S.-S. Gu, H.-S. Cui, X.-Y. Wu, F.-A. Wu, A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor, *Bioresour. Technol.* 158 (2014) 39–47.
 - [143] M. Bajic, I. Plazl, R. Stloukal, P. Znidarsic-Plazl, Development of a miniaturized packed bed reactor with ω -transaminase immobilized in LentiKats®, *Process Biochem.* 52 (2017) 63–72.
 - [144] H.R. Luckarift, B.S. Ku, J.S. Dordick, J.C. Spain, Silica-immobilized enzymes for multi-step synthesis in microfluidic devices, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 701–705.
 - [145] T. Richter, L.L. Shultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Bilitewski, D.J. Harrison, Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic devices: Determination of xanthine, *Sensors Actuators B*. 81 (2002) 369–376.
 - [146] X. Liu, R.C. Lo, F.A. Gomez, Fabrication of a microfluidic enzyme reactor utilizing magnetic beads, *Electrophoresis*. 30 (2009) 2129–2133.
 - [147] Y. Jiang, C.S. Lee, On-line coupling of micro-enzyme reactor with micro-membrane chromatography for protein digestion, peptide separation, and protein

- identification using electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 924 (2001) 315–322.
- [148] Q. Min, R. Wu, L. Zhao, H. Qin, M. Ye, J.-J. Zhu, H. Zou, Size-selective proteolysis on mesoporous silica-based trypsin nanoreactor for low-MW proteome analysis, *Chem. Commun.* 46 (2010) 6144–6146.
- [149] D. Dogruel, P. Williams, R.W. Nelson, Rapid tryptic mapping using enzymatically active mass spectrometer probe tips, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4343–4348.
- [150] L. Sun, Y. Li, P. Yang, G. Zhu, N.J. Dovichi, High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres, *J. Chromatogr. A.* 1220 (2012) 68–74.
- [151] M.T. Davis, T.D. Lee, M. Ronk, S.A. Hefta, Microscale immobilized protease reactor columns for peptide mapping by liquid chromatography/mass spectral analyses, *Anal. Biochem.* 224 (1995) 235–244.

10. Függelék

1. függelék: Összefoglaló táblázat azon (többségében) mikrocship alapú immobilizált enzimreaktorok tulajdonságairól, melyek részecskéket tartalmaznak az enzimek szilárd hordozóiként. A táblázatot a [4] hivatkozásból illesztettem be és fordítottam le. Használt rövidítések: CLEC: keresztköötti enzimkristályok, PVA: poli(vinil-alkohol), PS: poli(szirol), GOD: glükóz oxidáz, HRP: peroxidáz (torma), LIF: lézerindukált fluoreszcencia, CEA: carcino-embriónális antigén, PSDVB: poli(szirol-ko-divinil-benzol), PMMA: poli(metil-metakrilát), PET: poli(etilén-tereftalát), XOD: xantin oxidáz, SEC: méretkizárásos kromatográfia, TPCK-tripszin: L-1-tozilamido-2-feniletill klórmetil ketonnal kezelt tripszin.

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
bioszenzor, szintézis	lipáz	PDMS mikrocship	CLEC	keresztikötés	fotometria	-	[116]
FIA	GOD	FIA rendszer	mágnese töltet	kovalens (glutaráldéhid)	amperometria	5-10 µm	[117]
funkciós csoport átalakítás	GOD	batch	polielektrolit kapszula	kapszulázás	fotometria	-	[118]
funkciós csoport átalakítás	ciklopentanon monooxygenáz sejtek	batch	PVA részecskék, polielektrolit kapszula	kapszulázás	GC	3,65 mm, 0,82 mm	[119]
funkciós csoport átalakítás	nitrobenzol nitroreduktáz	mikrooszlop	szilika részecskék	kapszulázás	HPLC	-	[120]
funkciós csoport bevitel	PikC hidroxiláz	PDMS mikrocship	Ni-NTA agaróz töltet	His-tag	fotometria	-	[39]
glükóz meghatározás	GOD	PDMS mikrocship	agaróz töltet	kovalens	amperometria	-	[121]
glükóz meghatározás	GOD	PDMS mikrocship - kvarcekapilláris	mágnese töltet	kovalens (glutaráldéhid)	amperometria	-	[82]

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
glükóz meghatározás	GOD	Pyrex csip	nem porózus üvegrészecske	kovalens (glutáraldehid)	amperometria	50 µm	[122]
glükóz meghatározás	GOD	PDMS mikrocsip	nem porózus üvegrészecske	kovalens (glutáraldehid)	fluoreszcens	70 µm	[123]
glükóz meghatározás	GOD, HRP	PDMS mikrocsip	PS töltet	bioaffinitás	fluoreszcens	15,5 µm	[124]
glükóz meghatározás	GOD, HRP	PDMS mikrocsip	PS töltet	bioaffinitás	fluoreszcens	-	[36]
glikán analízis	PNGáz F	kereskedelmi mikrocsip, poliimid mikrocsip	szilika részecskék	kovalens	LC-MS	5 µm	[125]
hidrolízis	cisz-epoxiszukcinát hidroláz sejtek	batch	polielektrolit kapszula	kapszulázás	HPLC, ESI-MS, optikai rotáció	-	[126]
immuneszt	IgG antitest	Plexi mikrocsip	mágnese töltet	kovalens (glutáraldehid)	elektrokémiai detektálás	-	[127]
immuneszt	IgA antitest	üveg mikrocsip	PS töltet	adszorpció	lézerindukált termikus lencse mikroszkópia	-	[128]
immuneszt	anti-CEA antitest	üveg mikrocsip	PS töltet	adszorpció	lézerindukált termikus lencse mikroszkópia	-	[129]

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
immuneszt	anti-interferon antitest	üveg mikrocsip	PS töltet	adszorpció	lézerindukált termikus lencse mikroszkópia	-	[130]
laktóz meghatározás	β -galaktozidáz, GOD, HRP	PDMS mikrocsip	PS töltet	bioaffinitás	fluoreszcens	-	[35]
L-glutamin hidrolízis	L-aszparagináz	üveg mikrocsip	arany nanorészecske	kovalens	LIF	-	[80]
peszticid meghatározás	acetilkolin észteráz	PDMS mikrocsip	mágneses nanokompozit	adszorpció	amperometria	-	[131]
p-nitrofenil foszfát és hipoxantin meghat.	alkalikus foszfátáz, XOD	PDMS mikrocsip	porózus üvegrészecskek	kovalens	fotometria	-	[132]
polimerizáció	lipáz	töltetes reaktor	akrilgyanta	adszorpció	SEC	-	[133]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	agaróz töltet	kereskedelmi töltet	ESI-MS	40-60 μ m	[92]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	agaróz töltet	kereskedelmi töltet	ESI-MS	40-60 μ m	[94]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	agaróz töltet	kereskedelmi töltet	CE, MALDI-MS	-	[95]
fehérje emésztés	pepszin	PMMA mikrocsip	agaróz töltet	kereskedelmi töltet	ESI-MS	-	[93]

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
fehérje emésztés	tripszin	kereskedelmi rendszer	agaróz töltet, PSDVB részecskék, szefaróz töltet	kovalens	HPLC, LC-MS	-	[96]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	kapilláris	porózus üvegrészecskék	kovalens	CE	125-177 µm	[26]
fehérje emésztés	tripszin	PMMA mikrocship	üveg rost	kovalens (glutáraldehid)	MALDI-MS	-	[114]
fehérje emésztés	tripszin	PMMA mikrocship	üveg rost	kovalens (glutáraldehid)	MALDI-MS	-	[115]
fehérje emésztés	tripszin	PET mikrocship	arany nanorészecske	adszorpció	LC-MS, MALDI-MS	-	[134]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocship	mágneses töltet	adszorpció	MALDI-MS	200 nm	[86]
fehérje emésztés	tripszin	üveg mikrocship	mágneses töltet	adszorpció	MALDI-MS	-	[88]
fehérje emésztés	proteináz K	PDMS mikrocship	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	SDS-PAGE	500 nm	[89]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	PDMS mikrocship	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	CE, MALDI-MS	626 nm	[84]
fehérje emésztés	tripszin, TPCK-tripszin	PDMS mikrocship	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	SDS-PAGE, HPLC, CE, MALDI-FT-ICR-MS	0,29-10 µm	[87]

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
fehérje emésztés	tripszin	PDMS mikrocship	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	ESI-MS	500 nm	[83]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	kapilláris	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	CE-MS	100 nm	[91]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocship	mágneses töltet	kovalens (glutáraldehid)	MALDI-MS	300 nm	[90]
fehérje emésztés	TPCK-tripszin	üveg mikrocship	mágneses töltet	kovalens (glutáraldehid)	MALDI-MS	50 nm	[85]
fehérje emésztés	tripszin	PMMA mikrocship	nanozeolit	adszorpció	MALDI-MS	-	[41]
fehérje emésztés	tripszin	PMMA mikrocship	nanozeolit	kapszulázás	MALDI-MS	-	[42]
fehérje emésztés	tripszin	kereskedelmi rendszer	PSDVB részecskék	kereskedelmi töltet	SEC	-	[135]
fehérje emésztés	tripszin	PDMS mikrocship	szilika részecskék	kovalens (karbodiimid)	CE, LC-MS	5 µm	[100]
szintézis	formamidáz	PDMS mikrocship	CLEC	keresztkötés	fotometria	-	[136]
szintézis	szukróz foszforiláz	-	porózus üvegészecskék	adszorpció	HPLC	-	[32]
szintézis	lipáz	üveg mikrocship	emulzió	amfil jelleg	GC, CCD	emulzió	[44]
szintézis	benzoilformiát dekarboxiláz	üveg mikrocship	mágneses töltet	His-tag	HPLC	-	[38]

Alkalmazás	Enzim	Reaktor típus	Részecske	Immobilizálási stratégia	Detektálás	Részecske-méret	Hiv.
szintézis	lipáz	töltött kapilláris reaktor	akrilgyanta	adszorpció	GC	-	[137]
szintézis	lipáz	töltetes reaktor	akrilgyanta	adszorpció	GC	-	[138]
szintézis	lipáz	H-Cube™, X-Cube™	akrilgyanta	adszorpció	GC	-	[139]
szintézis	lipáz	töltetes reaktor	akrilgyanta	adszorpció	GC	-	[140]
szintézis	lipáz	töltetes reaktor	akrilgyanta	adszorpció	GC	-	[141]
szintézis	lipáz	töltetes reaktor	akrilgyanta	adszorpció	LC-MS, NMR, HPLC	-	[142]
szintézis	ω-transzamináz	töltetes reaktor	PVA részecskék	kapszulázás	HPLC, GC	-	[143]
szintézis	hidroxilamino-benzol mutáz, szójabab peroxidáz	PDMS mikrocip	szilika részecskék	kapszulázás	HPLC	-	[144]
xantin meghatározás	XOD HRP	üveg mikrocip	szilika részecskék	kovalens (glutáraldehid)	fluoreszcens	-	[145]
-	diaforáz	PDMS mikrocip	mágneses töltet	kovalens (karbodiimid)	fluoreszcens	-	[146]

2. függelék: Immobilizált proteáz enzimeket tartalmazó reaktorok irodalomban fellelhető tulajdonságai (reaktorban immobilizált enzim típusa, reaktor típusa – kivitelezése, immobilizálási felület – hordozó, immobilizálási stratégia, fehérjeemésztéshez szükséges idő, emésztett (teszt)fehérjék, talált szekvencia lefedettség az MS adatok alapján (SC%), az enzim felületi borítottsága a hordozón, ill. hivatkozás száma). Az SC% értékek esetén zárójelben helyenként szereplő érték a standard oldatban emésztésre vonatkozik.

Használt rövidítések: TPCK-tripszin: L-1-tozilamido-2-feniletill klórmetil ketonnal kezelt tripszin, BSA: szarvasmarha szérum albumin, CYT C: citokróm C, MELT: melittin, CAS: kazein, MB: mioglobulin, UB: ubikitin, mAbs: monoklonális antitestek, rhGH: rekombináns humán növekedési hormon, OVA: ovalbumin, BLG: β -laktoglobulin, HlgG: humán immunoglobulin, LYz: lizozim, HB: hemoglobin, ICB: oxidált inzulin B-lánc, AT1: humán angiotenzin I, CPY: karboxipeptidáz Y, LB: lys-bradikinin, BHB: szarvasmarha hemoglobin, AGP: α_1 -savas glikoprotein, LALBA: α -laktalbumin, RNASE: ribonukleáz, CA: szénsavanhidráz, NT: neurotensin, HTF: humán transzferrin, INZ: inzulin, PB: foszforiláz B, PSDVB: poli(sztírol-ko-divinil-benzol), PMMA: poli(metil-metakrilát), PET: poli(etilén-tereftalát), LBL: layer-by-layer (rétegenkénti adszorpció), PNGáz F: peptid-N-glikozidáz F.

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hiv.
TPCK-tripszin	kapilláris csatlakozás	membrán	adszorpció	másodpercek	CYT C OVA	-	-	[55]
tripszin	PDMS mikrocsip	membrán	adszorpció	3-10 perc	CYT C	-	15,36 μ g tripszin / reaktor	[56]
tripszin	PDMS mikrocsip	membrán	adszorpció	3-10 perc	CYT C	-	-	[147]
tripszin	PDMS mikrocsip	csatorna fala	adszorpció	20 mp	BSA CYT C CAS	22 (29) 86 (90) 44 (43)	-	[54]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hív.
tripszin	-	mezopórusos szilika	adszorpció	12 óra	BSA CYT C MB LYZ	30-55 (67-76) 71 (63) 100 (100) 80 (51)	-	[148]
TPCK-tripszin	kapilláris	mágneses töltet	adszorpció	5 perc	BSA CYT C	21 (41) 77 (76)	-	[86]
tripszin	kapilláris	csatoma fala	bioaffinitás	25 perc	CAS B	-	-	[52]
alkalikus foszfatáz	PDMS mikrocsip, boroszlíkat kapilláris	csatoma fala	bioaffinitás	-	-	-	-	[48]
TPCK-tripszin, karboxipeptidáz Y	kapilláris	csatoma fala	bioaffinitás	30 perc (tripszin), 20 perc (CPY)	MB BHB CYT C ICB (tripszin) AT1 (CPY) LB (CPY)	54 79	-	[53]
tripszin	oszlop	agaróz részecskék	kereskedelmi csip	-	CAS B	-	-	[23]
TPCK-tripszin	kapilláris	porózus üvegrészecskék	kereskedelmi csip	2 óra	CASB ICB	-	-	[26]
tripszin	-	agaróz részecskék	kereskedelmi csip	10 perc	LYZ	-	-	[149]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hív.
tripszin	kereskedelmi rendszer	agaróz részecskék, PSDVB részecskék	kereskedelmi csip	4 mp, 1,4 perc	CYT C MB	-	-	[96]
tripszin	oszlop	PSDVB részecskék	kereskedelmi csip	10 perc	BSA CYT C MB OVA AGP	50 36 61 43 24	-	[66]
TPCK-tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	1,5 perc, 9 mp, 2 perc	CYT C CASB LALBA	-	0,13 mg tripszin/ 4,2 cm monolit	[24]
tripszin, kimotripszin	szilícium mikrocsip	csatorna fala	kovalens kötés	1 perc	BSA CYT C MB LYZ RNAse A	23 50-100	-	[22]
TPCK-tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	1 perc	BSA	75 (79)	-	[29]
tripszin	PDMS mikrocsip	csatorna fala	kovalens kötés	5 mp	BSA CYT C CAS	30 (29) 93 (90) 45 (43)	-	[54]
tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	30 mp	BSA CYT C MB CA	42 (34) 47 (51) 92 (92) 17 (21)	2,6 µg tripszin/ 2 cm monolit	[68]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hív.
tripszin	oszlop	monolit	kovalens kötés	1,8-8 perc	MB	75 (76)	66,07 mg tripszin/ oszlop	[69]
TPCK-tripszin, pepszin	kapilláris	csatorna fala	kovalens kötés	30-150 mp	CYT C MB CASB MELT	90 (86) - tripszin 0 - pepszin 20 - tripszin 0 - pepszin	-	[51]
TPCK-tripszin	-	mágneses töltet	kovalens kötés	1-30 perc	BSA	90 (75)	-	[150]
PNGáz F	ker. mikrocsp, poliimid mikrocsp	szilika részcsekkék	kovalens kötés	-	mAbs	-	-	[125]
tripszin	oszlop	szilika részcsekkék	kovalens kötés	-	CYT C	-	-	[151]
TPCK-tripszin	pipettahegy	arany felület	kovalens kötés	10 perc	LYZ	-	-	[149]
TPCK-tripszin	kereskedelmi rendszer	szefaróz részcsekkék	kovalens kötés	4 mp, 1,4 perc	CYT C MB	-	-	[96]
TPCK-tripszin	kapilláris	mágneses töltet	kovalens kötés	30 perc	CAS B ICB	45 100	-	[91]
TPCK-tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	10 mp - 10 perc	ICB NT	-	97 ng tripszin/ 1 cm reaktor	[70]
tripszin	oszlop	monolit lemez	kovalens kötés	10 perc	BSA CYT C MB OVA AGP	62-73 62-63 89-99 41-50 45-47	-	[66]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hív.
TPCK-tripszin	pipettahegy	monolit	kovalens kötés	20 pipettázás	BSA OVA HTF	-	-	[71]
pronáz E	oszlop	monolit	kovalens kötés	1 óra (analízissel)	RNASE B	-	-	[72]
tripszin	oszlop	monolit lemez	kovalens kötés	5 perc	BSA CYT C MB OVA AGP	22,42,62 (51) 0,54,62 (54) 43,64,89 (88) 0,0,41 (46) 27,19,47 (50)	0,9-1,5 mg tripszin/ monolit lemez	[67]
TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	mágneses töltet	kovalens kötés	5 perc	CYT C	77 (76)	-	[90]
proteináz K	PDMS mikrocsip	mágneses töltet	kovalens kötés	3 perc	prion fehérjék	-	-	[89]
tripszin, TPCK-tripszin	PDMS mikrocsip	mágneses töltet	kovalens kötés	10 perc	rhGH	44 (44)	-	[84]
TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	mágneses töltet	kovalens kötés	10 mp	BSA CYT C MB	43 83 79	86 µg tripszin / mg részecske	[85]
TPCK-tripszin	-	mágneses töltet	kovalens kötés	5 perc	BSA CYT C MB	46 (41) 76 (76) 90 (75)	78 µg tripszin / mg részecske	[113]
tripszin, TPCK-tripszin	PDMS mikrocsip	mágneses töltet	kovalens kötés	22,5 perc	BSA OVA BLG HlgG	37	-	[87]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hív.
tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	73 mp	CYT C	58	-	[73]
pepszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	-	MB CYT C	22 48	-	[74]
tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	57 mp - 71 mp	BSA CYT C MB CAS RNASE MELT AGP HTF	19, 23 74, 80 41, 65 30, 50 38, 84 100, 100 19, 22 13, 22	-	[75]
TPCK-tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	<30 mp	CYT C	70-83 (78)	35 µg tripszin / 2,5 cm monolit	[62]
tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	7-142 mp	CYT C OVA LYZ INZ	55-59 (60) 4 9 16	-	[63]
TPCK-tripszin	-	mágneses töltet	kovalens kötés	2-30 perc	-	-	--	[111]
tripszin	kapilláris	monolit	kovalens kötés	18-240 mp	BSA CYT C MB	32 47 29	-	[64]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hiv.
tripszin	kapilláris	mágneses töltet	kovalens kötés	1-3 perc	BSA CYT C MB CASA CASB ICB BLG	2-6 69-73 74-96 20 19 100 0	-	[112]
tripszin	PMMA mikrocsip	csatorna fala	kovalens kötés	24 mp	BSA CYT C MB PB	35 64 58 47	-	[49]
tripszin	PMMA mikrocsip	üveg rost	kovalens kötés	<10 mp	BSA CYT C	45 (37) 77 (75)	-	[114]
tripszin	PMMA mikrocsip	üveg rost	kovalens kötés	5 mp	BSA MB	40 66	-	[115]
TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	agaróz részcscék	kovalens kötés (kereskedelmi)	3-6 perc, 5 mp	BSA CYT C MELT	71 92	-	[92]
TPCK-tripszin	üveg mikrocsip	agaróz részcscék	kovalens kötés (kereskedelmi)	12 perc	BSA CYT C CASB	66 (47)	-	[95]
pepszin	PMMA mikrocsip	agaróz részcscék	kovalens kötés (kereskedelmi)	4 mp - 15 mp	BSA MB UB	34-88 99 64	-	[93]
tripszin	kapilláris	monolit	kapszulázás	-	-	-	-	[65]

Enzim	Reaktor típus	Hordozó	Immobilizálási stratégia	Emésztési idő	Mintafehérjék	SC (%)	Felületi borítottság	Hiv.
TPCK-tripszin	szűrőrendszer	membrán	LBL adszorpció	3,2-6,4 mp	BSA CASA S1 CASA S2	84 (71) 53-55 (46) 33-43 (26)	0,097 mg tripszin / cm ²	[57]
tripszin	PET mikrocsp	csatoma fala	LBL adszorpció	<5 mp	BSA MB CYT C	38-41 (29) 28-54 84-85 (90)	-	[50]

3. függelék: Az adszorbeált tripszint tartalmazó IMER-rel emésztett és az oldatban emésztett BSA minták LC-MS/MS mérésének részletes eredménye: az azonosított egyedi peptidék listája. A mindkét mintában megtalált (azonos) peptidákat *-gal jelöltem. A táblázatot a [48] hivatkozásból illesztettem be és fordítottam le, a Springer kiadó engedélyével.

Minta	Emésztési módszer	Fehérje	Szekvencia lefedettség (%)	Talált peptidék	Pozíció	Kihagyott hasítás	Azonos peptidék
BSA	Oldatban emésztés	BSA	25	K.DLGEEHFK.G	37-44	0	
				K.LVNELTEFAK.T	66-75	0	*
				K.SLHTLFGDELCK.V	89-100	0	
				K.YLYEIA.R	161-167	0	*
				K.AEFVEVTK.L	249-256	0	*
				K.AEFVEVTKLVTDLTK.V	249-263	1	*
				K.YICDNQDTISK.L	286-297	0	*
				K.SHCIAEVEK.D	310-318	0	
				R.RHPEYAVSVLLR.L	360-371	1	*
				K.HLVDEPQNLIK.Q	402-412	0	*
				K.LGEYGFQNALIVR.Y	421-433	0	*
				R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	437-451	1	*
				K.CCTESLVNR.R	499-507	0	
				K.KQTALVELLK.H	548-557	1	*
				K.QTALVELLK.H	549-557	0	
				K.LVVSTQTALA.-	598-607	0	

Minta	Emésztési módszer	Fehérje	Szekvencia lefedettség (%)	Talált peptidek	Pozíció	Kihagyott hasítás	Azonos peptidek
BSA	IMER	BSA	29	R.FKDLGEEHFK.G	35-44	1	
				K.LVNELTEFAK.T	66-75	0	*
				K.SLHTLFGDELCKVASLR.E	89-105	1	
				K.LKPDNPNTLCDEFK.A	139-151	0	
				K.YLYEIA.R	161-167	0	*
				R.ALKAWSVAR.L	233-241	1	
				K.AEFVEVTK.L	249-256	0	*
				K.AEFVEVTKLVTDLT.K.V	249-263	1	*
				K.YICDNQDTISSK.L	286-297	0	*
				R.RHPEYAVSVLLR.L	360-371	1	*
				K.HLVDEPQNLIK.Q	402-412	0	*
				K.QNCDDQFEK.L	413-420	0	
				K.LGEYGFQNALIVR.Y	421-433	0	*
				R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	437-451	1	*
				R.LCVLHEKTPVSEK.V	483-495	1	
				K.TPVSEKVT.K.C	490-498	1	
				K.KQTALVELLK.H	548-557	1	*

4. függelék: A töltetes IMER segítségével emésztett négyféle fehérje LC-MS/MS meghatározásának eredménye (az egyes azonosított szekvenciákra vonatkozó adatokkal). A táblázat adatait a [100] hivatkozásból illesztettem be, az Elsevier kiadó engedélyével.

1, Lizozim

Peptid	Pozíció	Detektált [M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	Várt tömeg (Da)	Számolt tömeg (Da)	Eltérés (Da)	Kihagyott hasítás
GYSLGNWVCAAK + karbamidometil (C)	40-51	663,5	1325,0	1324,6	0,4	0
FESNFNTQATNR	52-63	715,0	1428,1	1427,6	0,4	0
NTDGSTDYGILQINSR	64-79	877,6	1753,2	1752,8	0,3	0
NLCNIPCSALLSSDITASVNCAC + 3 karbamidometil (C)	92-114	836,9	2507,8	2507,2	0,6	0
CKGTDVQAWIR + karbamidometil (C)	133-143	667,4	1332,9	1332,7	0,2	1
GTDVQAWIR	135-143	523,3	1044,7	1044,5	0,1	0

2. Miogloblin

Peptid	Pozíció	Detektált [M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	Várt tömeg (Da)	Számolt tömeg (Da)	Eltérés (Da)	Kihagyott hasítás
GLSDGEWQQVLNVWGK	2-17	908,7	1815,3	1814,9	0,4	0
VEADIAGHGQEVLR	18-32	536,4	1606,1	1605,8	0,3	0
LFTGHPETLEK	33-43	636,5	1271,0	1270,7	0,3	0
HGTVVLTALGGILK	65-78	460,4	1378,1	1377,8	0,3	0
HGTVVLTALGGILKK	65-79	503,2	1506,5	1505,9	0,5	1
ALELFRNDIAAK	135-146	454,3	1360,0	1359,8	0,2	1
YKELGFQK	147-154	471,3	940,6	940,5	0,1	1

3. Hemogloblin α-alegység

Peptid	Pozíció	Detektált [M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	Várt tömeg (Da)	Számolt tömeg (Da)	Eltérés (Da)	Kihagyott hasítás
VGGHAAEYGAEALER	18-32	510,5	1528,5	1528,7	-0,2	0
MFLSFPTTK	33-41	536,5	1070,9	1070,5	0,3	0
LRVDPVNFK	92-100	544,5	1087,1	1086,6	0,5	1
FLANVSTVLTSK	129-140	640,6	1279,2	1278,7	0,5	0

4, Hemoglobin β -alegység

Peptid	Pozíció	Detektált [M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	Várt tömeg (Da)	Számolt tömeg (Da)	Eltérés (Da)	Kihagyott hasítás
AAVTAFWGK	8-16	475,8	949,5	949,5	0,0	0
VKVDEVGGEALGR	17-29	665,1	1328,2	1327,7	0,5	1
VDEVGGEALGR	19-29	551,3	1100,7	1100,5	0,1	0
LLVVYPWTQR	30-39	638,0	1274,0	1273,7	0,2	0
LLGNVLVVVLAR	104-115	633,6	1265,3	1264,8	0,4	0
VVAGVANALAHRYH	132-145	493,5	1477,5	1476,8	0,7	1

5. BSA

Peptid	Pozíció	Detektált [M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	Várt tömeg (Da)	Számolt tömeg (Da)	Eltérés (Da)	Kihagyott hasítás
FKDLGEEHFK	35-44	625,4	1248,8	1248,6	0,2	1
DLGEEHFK	37-44	488,0	973,9	973,5	0,5	0
LVNELTEFAK	66-75	582,5	1163,0	1162,6	0,3	0
SLHTLFGDELCK + karbamidometil (C)	89-100	474,0	1419,0	1418,7	0,3	0
YLYEIAK	161-167	464,4	926,9	926,5	0,4	0
AEFVEVTK	249-256	462,0	921,9	921,5	0,5	0
YICDNQDTISSK + karbamidometil (C)	286-297	722,5	1443,0	1442,6	0,4	0
LKECCDKPLLEK + 2 karbamidometil (C)	298-309	511,7	1532,2	1531,8	0,4	1
RHPEYAVSVLLR	360-371	480,8	1439,4	1438,8	0,6	1
HLVDEPQNLIK	402-412	653,6	1305,1	1304,7	0,4	0
QNCDQFEK + karbamidometil (C)	413-420	534,7	1067,5	1067,4	0,0	0
LGEYGFQNALIVR	421-433	740,6	1479,2	1478,8	0,4	0
KVPQVSTPTLVEVSR	437-451	547,6	1639,7	1638,9	0,8	1
CCTESLVNR + 2 karbamidometil (C)	499-507	569,5	1137,1	1137,5	-0,4	0
RPCFSALTPDETYVPK + karbamidometil (C)	508-523	627,9	1880,6	1879,9	0,7	0
LFTFHADICTLPDTEK + karbamidometil (C)	529-544	636,9	1907,6	1906,9	0,7	0
KQTALVELLK	548-557	571,6	1141,1	1141,7	-0,6	1
QTALVELLK	549-557	508,0	1014,1	1013,6	0,5	0

11. Publikációs jegyzék

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. A. Gaspar, A. Kecskemeti, F.A. Gomez
Use of surface plasmon resonance to study the adsorption of detergents on poly(dimethylsiloxane) surfaces
Electrophoresis. 34 (2013) 1249-1252.
IF (2013): 3,161
Quartile 1 in Analytical Chemistry
2. A. Kecskemeti, A. Gaspar
Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion
Talanta. 166 (2017) 275-283.
IF (2017): 4,162
Quartile 1 in Chemistry (miscellaneous)
3. A. Kecskemeti, J. Bako, I. Csarnovics, E. Csosz, A. Gaspar
Development of an enzymatic reactor applying spontaneously adsorbed trypsin on the surface of a PDMS microfluidic device
Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 3573-3585.
IF (2017): 3,431
Quartile 1 in Analytical Chemistry
4. A. Kecskemeti, C. Nagy, E. Csosz, G. Kallo, A. Gaspar
The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples
Proteom. Clin. Appl. 11 (2017) 1700055.
IF (2017): 3,814
Quartile 2 in Clinical Biochemistry
5. A. Kecskemeti, A. Gaspar
Particle-based immobilized enzymatic reactors in microfluidic chips
Talanta. 180 (2018) 211-228.
IF (2017): 4,162
Quartile 1 in Chemistry (miscellaneous)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

1. A. Kecskemeti, A. Gaspar
Particle-based liquid chromatographic separations in microfluidic devices
Analytica Chimica Acta. 1021 (2018) 1-19.
IF (2017): 4,950
Quartile 1 in Analytical Chemistry

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó előadások:

1. Kecskeméti Ádám
Polidimetilsziloxánból készült mikrofluidikai csipekben történő adszorpciós hatások vizsgálata, tripszin immobilizálása peptidtérkép vizsgálatokhoz
Tavaszi Tudományos Hallgatói Konferencia, 2012. május 3-4., Debrecen
2. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxánból készült mikrofluidikai csipekben peptidtérkép vizsgálatokhoz, az adszorpciós hatások vizsgálata
2012. évi Eötvös Konferencia, 2012. május 4-6., Budapest
3. Kecskeméti Ádám*, Bakó József, Csarnovics István, Szabó István, Gáspár Attila
Study of adsorption effects on polydimethylsiloxane surfaces
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2012. július 1-31., Kolozsvár, Románia
4. Kecskeméti Ádám*, Bakó József, Gáspár Attila
Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxán felületen fehérjék on-line bontásához
XXXV. Kémiai Előadói Napok, 2012. október 29-31., Szeged
5. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxán felületen fehérjék on-line bontásához
Őszi Tudományos Diákköri Konferencia, 2012. november 23., Debrecen
6. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxán felületen fehérjék on-line bontásához
XXXI. OTDK Kémiai és Vegyipari szekciója, 2013. április 6., Eger
7. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása polidimetilsziloxán felületen fehérjék on-line bontásához
Tavaszi Tudományos Hallgatói Konferencia, 2013. május 2-3., Debrecen
8. Kecskeméti Ádám*, Gáspár Attila
Immobilization of trypsin on polydimethylsiloxane surface for rapid protein digestion
13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2013. június 27-július 7., Debrecen
9. Kecskeméti Ádám
Mire jók az immobilizált enzimek avagy hogyan gyorsítsunk a fehérjék azonosításán
Kutatók Éjszakája - Tehetséges Kutatók, 2013. szeptember 27., Debrecen

10. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása különböző hordozókon fehérjék on-line bontásához, peptid térkép vizsgálatok
DETEP konferencia, 2014. április 25., Debrecen
11. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása különböző hordozókon fehérjék on-line bontásához, peptid térkép vizsgálatok
2014. évi Eötvös Konferencia, 2014. április 25-27., Budapest
12. Kecskeméti Ádám
Mikrofluidika – miniatürizálási trendek a tudományban
Kutatók Éjszakája - Tehetséges Kutatók, 2014. szeptember 26., Debrecen
13. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása többféle felületen fehérjék gyors emésztéséhez, peptid térkép vizsgálatokhoz
XXXVII. Kémiai Előadói Napok, 2014. november 3-5., Szeged
14. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása többféle felületen fehérjék gyors emésztéséhez, peptid térkép vizsgálatokhoz
Őszi Tudományos Diákköri Konferencia, 2014. november 28., Debrecen
15. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása többféle felületen fehérjék gyors emésztéséhez, peptid térkép vizsgálatokhoz
Őszi Tudományos Hallgatói Konferencia, 2014. december 5., Debrecen
16. Kecskeméti Ádám
Tripszin immobilizálása többféle felületen fehérjék gyors emésztéséhez, peptid térkép vizsgálatokhoz
XXXII. OTDK Kémiai és Vegyipari szekciója, 2015. április 9-11., Veszprém
17. Kecskeméti Ádám
Immobilizált tripszint tartalmazó mikroreaktor készítése gyors fehérjebontáshoz
2015. évi DETEP konferencia, 2015. április 24., Debrecen
18. Kecskeméti Ádám
Immobilizált tripszint tartalmazó mikroreaktor készítése gyors fehérjebontáshoz
XXXVIII. Kémiai Előadói Napok, 2015. október 26-28., Szeged
19. Kecskeméti Ádám*, Gáspár Attila
The application of non-covalently immobilized trypsin in a poly(dimethylsiloxane) microfluidic device for rapid protein digestion
16th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2016. július 6-15., Varsó, Lengyelország

20. Kecskeméti Ádám*, Gáspár Attila
The application of non-covalently immobilized trypsin in a poly(dimethylsiloxane) microfluidic device for rapid protein digestion
 8th Chemistry Towards Biology, 2016. augusztus 28-szeptember 1., Brno, Csehország
21. Kecskeméti Ádám*, Gáspár Attila
PDMS mikrofluidikai csipben adszorpcióval immobilizált tripszin használata gyors fehérjebontáshoz
 Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2016. november 9-11., Kecskemét
22. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing immobilized trypsin for rapid protein digestion
 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2017. június 18-22., Prága, Csehország
23. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing immobilized trypsin for rapid protein digestion
 17th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2017. július 2-8., Ohrid, Macedónia
24. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Fehérjék bontására alkalmas enzimreaktorok fejlesztése mikrofluidikai csipekben
 Analitikai Napok – Új utakon az analitikában, 2018. április 23-24., Balatonszemes.

Az értekezés témájából készült posztterek:

1. Kecskeméti Ádám*, Bakó József, Csarnovics István, Szabó István, Gáspár Attila
Study of adsorption effects on polydimethylsiloxane surfaces
 12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Kolozsvár, Románia
2. Kecskeméti Ádám*, Bakó József, Csarnovics István, Szabó István, Gáspár Attila
Study of adsorption effects on polydimethylsiloxane surfaces
 13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Debrecen
3. Kecskeméti Ádám*, Gáspár Attila
Immobilization of trypsin on various solid supports for on-line protein digestion
 14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Smolenice, Szlovákia

4. Kecskeméti Ádám*, Molnár Andrea, Gáspár Attila
Preparation of trypsin-based packed bead microreactor for rapid protein digestion
 15th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Marosvásárhely, Románia
5. Molnár Andrea*, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Optimizing Peptide Mapping by Capillary Zone Electrophoresis
 16th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Varsó, Lengyelország
6. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing adsorbed trypsin for rapid protein digestion
 33rd International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis
 Noordwijkerhout, Hollandia
7. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing adsorbed trypsin for rapid protein digestion
 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
 Prága, Csehország
8. Nagy Cynthia*, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Tryptic digestion of tear samples using a microfluidic enzyme reactor
 17th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Ohrid, Macedónia
9. Molnár Andrea*, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
The study of mass spectrometry compatible electrolyte systems for capillary zone electrophoresis
 17th International Symposium and Summer School on Bioanalysis
 Ohrid, Macedónia
10. Kecskeméti Ádám*, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing adsorbed trypsin for rapid protein digestion
 11th Balaton Symposium
 Siófok