



1949

**MIKROFLUIDIKAI IMMOBILIZÁLT
ENZIMREAKTOROK KIALAKÍTÁSA PROTEOMIKAI
ALKALMAZÁSOKHOZ**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Nagy Cynthia Nóra

Témavezető: Dr. Gáspár Attila, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Kémia Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2023.05.15.

.....

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Nagy Cynthia Nóra** doktorjelölt **2019 - 2023** 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, 2023.05.15.

.....

a témavezető aláírása

MIKROFLUIDIKAI IMMOBILIZÁLT ENZIMREAKTOROK KIALAKÍTÁSA PROTEOMIKAI ALKALMAZÁSOKHOZ

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

Írta: Nagy Cynthia Nóra okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémia programja) keretében

Témavezető: Dr. Gáspár Attila, egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1. Az értekezésben előforduló fontosabb rövidítések	6
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi áttekintés.....	10
3.1 Tömegspektrometrián alapuló proteomika.....	10
3.1.1 Bottom-up proteomika	11
3.1.2 Peptidek elválasztása és on-line dúsítása kapilláris elektroforézis rendszerében.....	16
3.2 Enzimek immobilizálása	19
3.2.1 Immobilizálási stratégiák	20
3.2.2 Hordozó közegek.....	23
3.3 Mikrofluidikai enzimreaktorok	26
3.3.1 Mikrocsipben kialakított enzimreaktorok	26
3.3.2 Kapillárisbeli rendszerek.....	28
3.3.3 Enzimreaktorok analitikai alkalmazásai.....	29
4. Anyagok és módszerek.....	32
4.1 Felhasznált vegyszerek.....	32
4.2 Mikrofluidikai csipek előállítása	32
4.3 Immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorok kialakítása	34
4.4 Fehérjék emésztése.....	36
4.5 Alkalmazott műszerek, szoftverek	37
5. Eredmények és értékelésük	41
5.1 Enzimreaktor kialakítása PDMS mikrofluidikai csipben.....	41
5.1.1 Fajlagos felület növelése	41
5.1.2 Csatorna-geometria hatásának vizsgálata.....	53
5.2 Kvarckapillárisban kialakított enzimreaktor	66

5.3 Emésztmények on-line mintadúsítása és elemzése CE-MS rendszerben	78
6. Összefoglalás	88
7. Summary	92
8. Köszönetnyilvánítás	96
9. Irodalomjegyzék	97
10. Függelék	109
11. Publikációs jegyzék	116

1. Az értekezésben előforduló fontosabb rövidítések

ACN	acetonitril
BAEE	N _α -benzoil-L-arginin-etil-észter
BGE	háttérelktrolit
BUP	bottom-up proteomika
CE	kapilláris elektroforézis
CID	ütközés által kiváltott disszociáció
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
DDA	adatfüggő analízis
DIA	adatfüggetlen analízis
DPJ	dinamikus pH-csatlakozás
DTT	ditiotreitól
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
EOF	elektroozmotikus áramlás
FASP	szűrővel segített mintaelőkészítési módszer
FASS	elektromos térrel erősített minta-stacking
FESI	elektromos térrel erősített mintainjektálás
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HSA	humán szérum albumin
IAA	jódecetsav
IAM	jódacetamid
ID	belső átmérő
IMER	immobilizált enzimreaktor
μ-IMER	mikrofluidikai immobilizált enzimreaktor

IPA	izopropil-alkohol
ITP	izotachoforézis
LBL	layer-by-layer (több rétegű adszorpció)
LE	vezető elektrolit
MALDI	mátrixszal segített lézer deszorpció és ionizáció
MS	tömegspektrometria
MS/MS	tandem tömegspektrometria
OT	teljes keresztmetszetében nyitott csatorna
PB	foszfát puffer
PDMS	polidimetilsziloxán
PTM	poszttranszlációs módosítás
QTOF	kvadрупól repülési idő analizátor
RPLC	fordított fázisú folyadékkromatográfia
SC	szekvencia lefedettség
S/V	felület/térfogat arány
SPE	szilárd fázisú extrakció
TDP	top-down proteomika
TE	záró elektrolit

2. Bevezetés

A proteomikai kutatások célja egy adott sejt vagy szövet fehérjeállományának minél alaposabb megismerése. Az analitikai kémia széles eszköztárat biztosít a proteom feltérképezésére, ahol az egyes technikák alkalmazása más-más információt szolgáltat. Az egyik legfontosabb kérdés általában az, hogy a vizsgálandó mintában milyen fehérjék találhatóak (tekintettel a poszttranszlációs módosulásokra is) és azok milyen mennyiségben fordulnak elő. A kérdés megválaszolására az elválasztástechnikával kapcsolt tömegspektrometrián (MS) alapuló analitikai módszerek kitűnően alkalmazhatóak. Többféle megközelítés létezik attól függően, hogy a fehérjét intakt, részlegesen hidrolizált vagy teljesen hidrolizált formájában analizáljuk, melynek értelmében megkülönböztethetünk top-down, middle down/up és bottom-up proteomikát [1]. A három stratégia közül a bottom-up proteomikának van a legnagyobb múltja, azonban napjainkban egyre népszerűbb a top-down módszer, ami a tömeganalizátorok fejlődésének és alternatív fragmentációs technikák alkalmazásának köszönhető [2].

A bottom-up proteomikában - ahogy az elnevezés is sejteti - kisebb peptid-darabokból rakjuk össze a "teljes képet". Általában egy (vagy több) proteáz enzim alkalmazásával történik a fehérjék hidrolízise. A már néhány évtizede erősödő miniatürizálási trendek a proteomikai módszerfejlesztésben is megjelentek, főleg az enzimes emésztés optimalizálását megcélozva. A legtöbb esetben ezen mikrofluidikai rendszerek az enzimet egy szilárd hordozóhoz rögzített formában tartalmazzák, ezeket mikrofluidikai immobilizált enzimreaktoroknak (μ -IMER) nevezzük. Ellentétben a hagyományos oldatfázisban lejátszódó reakciókkal, melyekben az enzim szabad formában van jelen, az immobilizált enzim egyrészt könnyen újrahasználható, másrészt kevésbé képes önemésztésre és ebből fakadóan aktivitását is tovább megőrizheti. Ezenkívül a mikroreaktorok nagy felület-

térfogat aránya jelentősen növeli az enzim-szubsztrát arányt, így nagyságrendekkel gyorsabban megy végbe a reakció. A felsorolt előnyöknek köszönhetően növekvő érdeklődés mutatkozik a μ -IMER eszközök kifejlesztése és proteomikai alkalmazása iránt, az utóbbi években közel száz publikáció jelent meg évente ezen a területen [3].

Valós mintáknál gyakran előfordul, hogy a fehérjék csak kis koncentrációban, míg egyéb szennyező komponensek nagy mennyiségben vannak jelen. Ilyenkor egyfajta tisztítási, elődúsítási lépést érdemes alkalmazni (pl.: szilárd fázisú extrakció (SPE)), ahol a célkomponenseket egy nagyobb térfogatból egy kisebb térfogatba juttatjuk. Az SPE egy általánosan használt eszköze a bottom-up proteomikában gyakran alkalmazott sómentesítésnek, amellyel a mintában jelenlevő zavaró komponensektől meg lehet szabadulni. Bizonyos esetekben azonban csak korlátozott mintatérfogat áll rendelkezésre. Kapilláris elektroforézis (CE) rendszerekben lehetőség van on-line elődúsításra, ahol az elemző egységen belül (kapilláris) történik meg a komponensek dúsítása és így gyakorlatilag kiküszöbölhető a mintavesztés. A peptidelegyek elektrokinetikus mintadúsításával kapcsolatos nagyszámú tudományos és összefoglaló közlemény jelzi a módszer jelentőségét a bottom-up proteomikában [4-6].

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

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Tömegspektrometrián alapuló proteomika

A proteom kifejezést a 90-es években alkották meg a „protein” és „genom” szavak összevonásával, mely egy organizmus által termelt fehérjekészletre utal [7]. Ennek feltérképezése egy rendkívül összetett feladat; a fehérjék minőségi és mennyiségi meghatározásán túlmenően magába foglalja többek között azok lokalizációjának és poszt-transzlációs módosulásainak (PTM) vizsgálatát, a fehérjék funkcionalitásának, aktivitásának és más molekulákkal való kölcsönhatásának megismerését is [8].

A genomikához képest a proteomika jóval több kihívással néz szembe [9], főleg azért, mert egy nagyobb és összetettebb adathalmaz feldolgozását kívánja meg. Egy gén több fehérjét is kódolhat, ill. ezek a fehérjék különböző módosulásokon mehetnek keresztül transzlációt követően (pl.: foszforiláció, glikoziláció, oxidáció, acetilezés, metilezés). A komplexitás egy másik fő oka, hogy a fehérjeállomány időben és térben folyamatosan változik a sejt állapotától függően [10]. A proteom ezen dinamikus jellege viszont kiemelkedő jelentőséggel bír a diagnosztikában, hiszen a megváltozott fehérjeprofil utalhat valamilyen fiziológiás vagy patológiás állapotra. Általánosságban, ezen állapotokra jellemző molekulákat biomarkereknek nevezzük [11].

A proteomika evolúciójában az első igazi áttörést a 2D gélelektroforézis hozta az 1970-es évek közepén [12]. A komponensek elválasztása két független paraméter (izoelektromos pont és méret) alapján történt, mely addig nem látott felbontást eredményezett komplex biológiai minták esetén. Az elválasztott fehérjék beazonosítását a tömegspektrometria (MS) [13] tette lehetővé. Nagy technológiai újtásnak számított a lágú ionforrások megjelenése (pl.: mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció (MALDI) [14], elektroporlasztásos ionizáció (ESI) [15]), melyek jórészt

fragmentáció nélkül ionizálják a mintát, és így a kapott spektrumok molekulatömeg-információt is szolgáltatnak. A tömeganalizátorok és bioinformatikai eszközök dinamikus fejlődése, valamint a peptid/fehérje adatbázisok jelentős bővülése is nagyban hozzájárultak a proteomika területén elért sikerekhez [16].

Az egyik fő irányvonal az MS-alapú proteomikában a top-down (TDP) megközelítés, ahol általánosságban, egy elválasztástechnikai lépés után a fehérjéket a tömeganalizátorba juttatják [17, 18]. A fehérjék ütközési cellában történő fragmentációja információt nyújthat azok aminosav-szekvenciájáról, ill. PTM-k pozíciójáról. Ez természetesen szükségessé teszi a nagy tömegpontosságot és felbontást biztosító MS analizátorok alkalmazását (pl.: kvadrupól repülési idő (QTOF), orbitrap vagy Fourier-transzformációs ionciklotron-rezonancia (FT-ICR)). Bottom-up proteomika (BUP) esetén hasonló műszerezettségre van szükség, viszont itt a fehérjéket előzetesen peptidekké daraboljuk egy hasító ágenssel, majd ezt a peptidelegyet elemezzük [16, 19]. A keletkezett peptidek molekulatömege tipikusan < 3 kDa. A TDP és BUP módszerek egyfajta hibridje a middle-up/down stratégia, melynél a fehérjéket nagyobb polipeptid-egységekre (> 7 kDa) hasítjuk az analízist megelőzően [1]. Ezt a megközelítést elsődlegesen monoklonális antitestek (mAb) vizsgálatánál alkalmazzák.

3.1.1 Bottom-up proteomika

Egy mintában a fehérjék beazonosításához általában a bottom-up módszert alkalmazzák. Egy tipikus bottom-up munkafolyamat a következő lépésekből áll: (1) mintaelőkészítés, (2) emésztés, (3) sómentesítés/dúsítás, (4) peptidek elemzése nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC)/kapilláris elektroforézissel (CE) kapcsolt MS/MS technikával és (5) adatelemzés. Komplex biológiai mátrixok esetén érdemes lehet az enzimes emésztés előtt

izolálni a fehérjéket majd meghatározni az összfehérje-koncentrációt (pl.: Bradford-módszerrel).

Az emésztést megelőző mintaelőkészítés célja az, hogy a fehérjékben található hasítási helyeket hozzáférhetővé tegyük az enzim számára. Általában ez a folyamat magában foglalja a fehérjék denaturálását (pl.: hő, karbamid, tiokarbamid, guanidin-HCl, Rapigest™), a diszulfid-hidak redukálását (pl.: ditiotreitolt (DTT), trisz(2-karboxi-etil)-foszfin-hidroklorid (TCEP)) majd a ciszteinek alkilezését (pl.: jódacetamid (IAM), jódecetsav (IAA), klóracetamid). Az emésztéshez optimális pH beállítását egy megfelelő pufferrel (pl. ammónium-hidrogén-karbonát, Tris-HCl) biztosítjuk. Ezen segédanyagok (főleg a denaturálószer) eltávolítása általában erősen tanácsos elemzések előtt, hiszen zavarhatják a HPLC-s meghatározást ill. MS detektálást. A Rapigest™ - egy MS-kompatibilis felületaktív anyag - azonban erre megoldást kínál, hiszen sav hozzáadásával lebomlik, leegyszerűsítve a mintaelőkészítést. Egy másik lehetőség az ún. szűrővel segített mintaelőkészítés (Filter Aided Sample Preparation - FASP) [20]. A FASP ultraszűrő egységeket használ a mintaelőkészítés és emésztés hagyományos lépéseinek végrehajtására, ami egy viszonylag tiszta peptid eluátumot eredményez. Ez különösen akkor hasznos, ha nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) használnak a minták szolubilizálására, amelynek jelenléte akadályozná a proteolízist és zavarná az MS detektálást.

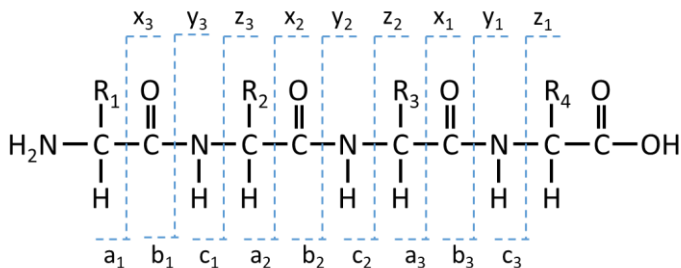
Enzimatis hasításhoz általában tripszint, kimotripsint, pepszint, Lys-C-t vagy ezek kombinációit használják. A tripszin a leggyakrabban használt proteáz, mely a lizin és arginin C-terminális kötéseit hasítja [21]. Népszerűségét a specificitásának köszönheti, a kapott peptidek tipikusan 6-30 aminosavat tartalmaznak, mely ionizáció és MS/MS analízis szempontjából megfelelő [22]. Hagyományos oldatfázisban történő emésztéseknél a tripszint általában csak kis koncentrációban használjuk (enzim:fehérje arány = 1:20 - 200 [23]), ugyanis az enzim önemésztésre is képes. A kis koncentráció

viszonylag hosszú inkubációs idők alkalmazását teheti szükségessé (~16 óra). Ugyan a tripszin hatékony emésztéseket tesz lehetővé, előfordulnak hasítatlan kötések, főleg lizin aminosavak mellett [24]. A proteolízis teljessé tételét Lys-C enzimmal történő előemésztéssel el lehet érni [24-26], mely a lizin C-terminális kötéseire specifikus.

A kapott peptidelegekből a zavaró komponensek eltávolítását leggyakrabban C18 töltetet tartalmazó SPE pipettahegyek segítségével végzik. A C18 töltetet tartalmazó sómentesítő egységek a fordított fázisú folyadékkromatográfiában (RPLC) használatos kolonnáknál megszokott viselkedést mutatják; a hidrofil peptidek gyengén, míg a nagy, hidrofób peptidek erősen kötődnek a töltethez. Ebből következően előfordulhat, hogy mintavesztés lép fel.

Az emésztés eredményeképp keletkező peptidek beazonosítása tandem tömegspektrometriával lehetséges, mely az adott peptidről tömeg- ill. szekvencia-információkat szolgáltat. Annak érdekében, hogy minél több komponensről készülhessen hasznos MS/MS felvétel, szükséges a peptidek előzetes elválasztása. A proteomikában leginkább alkalmazott elválasztástechnikai módszer az RPLC, de egyre népszerűbb a kapilláris zónaelektroforézis (CZE) is. Az RPLC hidrofóbicitás alapján választja el a peptideket, a CZE esetében pedig azt használjuk ki, hogy a komponensek tömeg/töltés arányuktól függően eltérő sebességgel haladnak egy elektromos erőterben. A két módszer együttes használatával több peptid/fehérje beazonosítására van lehetőség, ezért egyre elterjedtebbek az olyan 2D elválasztások, melyek az RPLC és CZE ortogonalitását használják ki [27-29]. Mivel az elválasztó egység egy folyamatos áramlásos rendszer, a tömegspektrométerhez történő kapcsolás megteremtéséhez az ESI ionforrás a legalkalmasabb (peptidek és fehérjék analízise esetén), mivel az folyamatosan porlasztást és ionizációt tesz lehetővé. ESI esetében többszörösen töltött ionok

is képződhetnek, melynek köszönhetően a nagyobb peptid darabok (~3 kDa) kényelmesen detektálhatóak a kisebb (300-1500) m/z tartományban, valamint a nagyobb töltöttségi állapotban lévő komponensek készségesebben is fragmentálódnak. Minőségi információt a peptidekről fragmentáció útján nyerhetünk. Az ún. *tandem-in-space* típusú készülékek két tömeganalizátorral rendelkeznek, melyek között egy ütközési cella található. MS/MS módban az első analizátor kiválasztja a tanulmányozni kívánt iont (prekurzor) az adatgyűjtési beállításoknak megfelelően, majd ez a prekursor kerül fragmentálásra az ütközési cellában. A termékionok elemzése a második analizátorban történik. A legelterjedtebb módszer az ütközés által kiváltott disszociáció (CID), melynél inert gázmolekulákkal (pl.: N_2) való ütköztetés hatására fragmentálódnak a komponensek. Tipikusan a leglabilisabb kötések hasadnak, mely problémát okozhat olyan esetekben, mikor a helyspecifikus PTM-mintázat meghatározása a cél, hiszen CID hatására pl.: a glikánok vagy foszforil-csoportok lehasadása a kedvezményezettebb folyamat, így nincs információnk a PTM lokalizációjáról. CID esetén a peptidgerinc az amidkötéseknél hasad, *b* és *y* ionokat generálva (1. ábra) [30]. Alternatív fragmentációs technikák közé tartozik az elektron-transzfer disszociáció (ETD) ill. az elektron befogásos disszociáció (ECD), ahol töltött részecskékkel történik az ütköztetés, jellemzően *c* és *z* típusú fragmenseket létrehozva (1. ábra). Tandem MS vizsgálatokhoz természetesen olyan berendezésre van szükség, mely képes fragmentációra. Bottom-up proteomika célokra leginkább hibrid készülékeket alkalmaznak (pl.: Q-TOF, kvadrupól-orbitrap).



1. ábra: Peptidek fragmentációja során keletkező fragmens ionok. Ha a töltés a C-terminális részen marad akkor x, y, z, ha pedig az N-terminális részre kerül akkor a, b és c ionokat kapunk. Az alsó index jelzi az adott fragmensben lévő aminosavak számát.

A vizsgálatok során nagy mennyiségű adat keletkezik, melynek feldolgozása bioinformatikai eszközökkel történik. A fehérjék beazonosítását egy adatbázis-kereső program segítségével lehet elvégezni (pl.: Mascot, Byonic). A program összehasonlítja a peptidek MS/MS spektrumait az adatbázisban szereplő in-silico emésztett és fragmentált fehérjék spektrumaival, majd a beazonosított fragmensekből következtet a minta fehérje-összetételére [31].

Amikor nincs előzetes ismeretünk arra vonatkozóan, hogy a minta milyen fehérjéket tartalmaz, felderítő (vagy shotgun) proteomikáról beszélünk. A legáltalánosabb adatgyűjtési módszer az adatfüggő analízis (data-dependent acquisition - DDA), melynek során a készülék tipikusan a legintenzívebb ionokról készít MS/MS felvételt. Ennek az a hátránya, hogy az alacsonyabb intenzitással rendelkező peptidekről nem kapunk információt, s így a kisebb mennyiségben előforduló fehérjék kevésbé reprezentáltak a találatok között. Erre kínálhat megoldást az adatfüggetlen analízis (data-independent acquisition – DIA), melynél lehetőségünk van az összes ion fragmentációjára. Ez a megközelítés ugyan nagyobb információ-tartalommal bír, de egy sokkal komplexebb adathalmazt eredményez, ahol a prekursor-fragmens kapcsolat megállapítása nem egyértelmű.

3.1.2 Peptidek elválasztása és on-line dúsítása kapilláris elektroforézis rendszerekben

A kapilláris elektroforézis (CE) egy olyan analitikai módszer, melynél az oldott komponensek feszültség hatására eltérő sebességgel vándorolnak egy vékony (ID: 25-75 μm), pufferoldattal töltött kapillárisban. Több típust lehet megkülönböztetni attól függően, hogy a részecskéket milyen tulajdonságuk alapján választjuk el (pl.: izoelektromos pont, méret vagy töltés). A legszélesebb körben alkalmazott CE módszer a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), melynél a komponensek elektroforetikus mozgékonyágbeli különbségét használjuk ki. Egy részecske vándorlását (migrációs idejét, t_{mig}) a kapilláris hossz (L), az alkalmazott feszültség (U) és saját elektroforetikus mozgékonyágán (μ_i) kívül az elektroosmotikus áramlás mozgékonyága (μ_{EOF}) is befolyásolja a következő összefüggés szerint:

$$t_{\text{mig}} = \frac{L^2}{U \cdot (\mu_i + \mu_{\text{EOF}})}$$

Az elektroosmotikus áramlás (EOF) akkor alakul ki, mikor feszültséget kapcsolunk egy elektromosan töltött felülettel érintkező elektrolitra, esetünkben a kvarckapillárisban található háttéarelektrolitra (BGE). Az EOF tulajdonképpen egy folyamatos áramlást idéz elő a kapillárisban, az összes komponenst (töltésüktől függetlenül) azonos elektród felé tereli. Ez a folyadékáram az oldat dielektromos állandójától és az egyes komponenseknek az adott pH-n lévő mozgékonyágától fog azonos, vagy akár különböző módon hatni a komponensekre. BUP elemzéseknél érdemes az EOF-t visszaszorítani annak érdekében, hogy a komponensek minél hosszabb időt töltsenek a kapillárisban és így minél jobban elváljanak egymástól, mely leginkább MS/MS szempontból kedvező [32].

A CZE egy nagy hatékonyságú elválasztástechnikai módszer, azonban a teljesítőképességét korlátozza a detektálási lehetőségek viszonylag gyenge

érzékenysége. A detektálás kihívást jelent, ugyanis a szokásos CZE elemzéseknél csupán néhány nl mintatérfogatot injektálunk. Nagyobb mintatérfogatok alkalmazása a zónák kiszélesedésével jár. Az érzékenységi problémákra megoldást nyújthat a minták off-line elődúsítása (pl.: szilárd fázisú extrakcióval – SPE), melynek során a mintát egyrészt egy kisebb térfogatba koncentráljuk, másrészt a szennyező komponensektől megtisztítjuk. Egy másik lehetőség az on-line minta-stacking, melynél a CE kapillárisban automatizált módon mehet végbe a folyamat. Az injektált mintatérfogat ilyenkor több mint 10x nagyobb a szokásosnál, ám zónaszélesedés csak kisebb mértékben lép fel, ha a kapillárisban végbemenő folyamatoknak köszönhetően a komponensek egy szűk zónába korlátozódnak. Számos mintadúsítási technikát kidolgoztak már, melyeket alapvetően két típusba lehet sorolni: elektrokinetikus és elektrokromatográfiás módszerek [33]. Az utóbbiak használata nem jellemző BUP analíziseknél, feltehetően azért, mert valamilyen pszeudo-állófázis alkalmazása (pl.: micellák) szükséges [34, 35], aminek jelenléte az ESI-MS detektálás érzékenységét ronthatja. A továbbiakban ezért csak az elektrokinetikus dúsítási módszerek bemutatására térek ki.

Az elektrokinetikus jelenségen alapuló dúsítási technikák esetében azt használjuk ki, hogy a komponensek eltérő sebességgel mozognak különböző fiziko-kémiai sajátságú közegekben, s így a határfelületen feldúsulnak. A dolgozatban ezen jelenségekre minta-stacking vagy mintadúsítás/dúsulásként fogok hivatkozni.

Az egyik legelterjedtebb ilyen módszer az elektromos térrel erősített minta-stacking (field-amplified sample stacking – FASS), ahol a BGE vezetőképesége jóval nagyobb, mint a mintamátrix vezetőképesége. Ez a különbség azt eredményezi nagy mintainjektálásoknál, hogy a kapillárisban elektromos tér inhomogenitás alakul ki. A mintamátrixban a komponensek felgyorsulnak, mert nagyobb térerősség hat rájuk, azonban a BGE zónába érkezve hirtelen

lelassulnak a csökkent térerősség miatt. A komponensek így a mintamátrix-BGE határfelületen csoportosulnak. A BGE leggyakrabban hangyasav vagy ecetsav, a minta pedig általában jelentős mennyiségű (20-60%) acetonitrilt (ACN) tartalmaz. FASS technikát alkalmaztak *E. coli* [36, 37], MCF7 sejtvonal [38], HeLa sejtlizátum [39], valamint béka és zebrahal embrió [40] emésztmények analíziséhez. Ha a mintát nem nyomással injektáljuk, hanem feszültség alkalmazásával, akkor elektromos térrel erősített mintainjektálásról (field-amplified sample injection – FASI) van szó.

Peptidek dúsítanak egy másik népszerű módja a tranziens izotachoforézis (t-ITP). Klasszikus ITP esetében szükség van vezető- és záróelektrolitokra, ahol a vezető- és záróionok rendelkeznek a legnagyobb, ill. legkisebb mozgékonyssággal. A mintát a két elektrolit közé injektáljuk, majd feszültség hatására a mintakomponensek mozgékonyáguk szerint csökkenő sorrendben helyezkednek el. Tranziens ITP-ről akkor beszélünk, ha az ITP állapot csak egy rövid ideig áll fenn, az analízis hátralevő részében a komponensek a zónaelektroforézis elveinek megfelelően vándorolnak. Vezető ionként általában NH_4^+ szolgál [41, 42], míg záró ionként értelemeszerűen egy jóval kisebb mobilitású komponenst, pl.: β -alanint lehet alkalmazni. Ugyan a H^+ mozgékonyága messze meghaladja az eddig említett komponensekét, záró ionként való alkalmazása hatékonyabb dúsulást idéz elő [43, 44], ugyanis a H^+ ionok valójában semlegesítődnek a rendszerben jelenlévő ellenionok által (pl.: acetáttion), s ennek hatására lelassulnak. T-ITP indukálódhat spontán is nagy sótartalmú minták esetén [45]. Ilyenkor a mintában található sók viselkednek vezető elektrolitként, a kisebb mozgékonyágú BGE pedig záró elektrolitként funkcionálhat.

A leggyakrabban alkalmazott on-line mintadúsítási módszerek közé tartozik még a dinamikus pH csatlakozás (dynamic pH-junction – DPJ). A DPJ

az izoelektromos fókuszálás (IEF) elvein alapul, miszerint a komponensek addig vándorolnak a kapillárisban, amíg el nem érnek egy olyan pontot, ahol töltésüket elvesztik. Itt azt lehet kihasználni, hogy a komponensek töltöttségi állapota, és így a sebessége megváltozik különböző pH-jú régiókban. Peptidek dúsításához tipikusan savas BGE-t alkalmaznak (pl.: 5% ecetsav, pH = 2,4), a mintát pedig lúgos oldatban oldják fel (pl.: ammónium-hidrogén-karbonát, pH ~8) [27, 28, 46].

Gyakran nincs éles határ az egyes elektrokinetikus dúsítási technikák között, a DPJ és t-ITP körülményei bizonyos esetekben nagyon hasonlóak [33], így valószínűsíthető, hogy mindkét mechanizmus lejátszódik. Ezenkívül lehetőség van több technikát is alkalmazni egyszerre, mellyel még erőteljesebb dúsítás érhető el. Az ún. elektrokinetikus túltöltés (electrokinetic supercharging – EKS) során a FASI és t-ITP módszereket kombinálják [47].

3.2 Enzimek immobilizálása

A fehérjék oldatfázisban történő enzimés emésztése általában egy hosszadalmas folyamat (2-24 h), ugyanis az enzimet - autolízisre való hajlama miatt - csak kis koncentrációban érdemes alkalmazni. Ha azonban az enzimeket egy szilárd hordozóhoz rögzítjük, mozgásuk korlátozott, így nagyobb koncentrációban használhatóak jelentős önemésztés nélkül, aminek köszönhetően nagyságrendekkel gyorsabban végbemehetnek a reakciók. Az ilyen, enzimet rögzített formában tartalmazó rendszereket immobilizált enzimreaktoroknak (IMER) nevezzük. Az immobilizálás költséghatékonyabb enzimfelhasználást tesz lehetővé, mivel az enzim a reakció után könnyen visszanyerhető és többször is újrahasználható. További előny, hogy az immobilizált formában lévő enzimek kevésbé érzékenyek denaturálószerekre és magasabb hőmérsékletre [48]. Ügyelni kell azonban arra, hogy az immobilizálás során olyan reakciókörülményeket alkalmazzunk, melyek

biztosítják, hogy a rögzített enzim nem szenved konformációváltozást és aktív centruma hozzáférhető marad a szubsztrát számára.

Több stratégiát kidolgoztak már enzimek immobilizálására, melyek a fent említett alapvető követelményeket többnyire kielégítik. Ezen módszerek nagy változatosságot mutatnak, mind az immobilizálási reakció típusa, mint az enzimet hordozó közeg szempontjából. A választott stratégia jelentősen függ az immobilizálandó enzimtől és a tervezett alkalmazási területtől. Különböző enzimek immobilizálásáról számoltak már be (pl.: pepszin [49, 50], kimotripszin [51, 52], neuraminidáz [53], glükóz-oxidáz [54, 55], acetilkolin-észteráz [56, 57], PNGase F [58, 59], lipáz [60, 61], torna-peroxidáz [62, 63], ureáz [64]), de a következőkben az általunk is használt tripszint tartalmazó IMER-ek bemutatására fókuszálunk.

3.2.1 Immobilizálási stratégiák

Az alkalmazott immobilizálási reakció nagyban befolyásolja az IMER élettartamát, újrahasználatosságát és teljesítményét. A főbb stratégiákat a 2. ábra szemlélteti: adszorpció, kovalens kötés, bioaffinitás-kölcsönhatás, enzimek csapdázása és keresztkötött enzimkristályok kialakítása [65].

Legegyszerűbben adszorpció útján lehet immobilizálni az enzimeket. Tipikusan olyan esetekben folyamodnak adszorpcióhoz, mikor a hordozó-felület nem tartalmaz reaktív csoportot, vagy nagyon körülményes annak kialakítása. Az enzim és a felület között hidrogénkötés, elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatás alakul ki. Mivel az enzim kémiaiilag nem módosul az immobilizáció során, elvileg nem kell számolnunk jelentős konformáció-változással [66]. Ugyanakkor, az adszorbeált enzim hamar elvesztheti aktivitását. Kutatócsoportunkban megfigyelték, hogy egy polidimetilsziloxán (PDMS) mikrocip felületén rögzített tripszin ~ 2 óráig marad aktív. Idővel egyre több hidrofób oldallánc kerül kapcsolatban a PDMS hidrofób felületével,

aminek következtében az enzim „szétterül”, és elveszti aktivitását [67, 68]. További hátrány, hogy az enzim viszonylag gyenge kötőerőkkel való rögzítése az enzim mobilizálódását eredményezheti. Adszorpció esetében azonban könnyen regenerálható az immobilizált réteg, amely valamelyest enyhíti az instabilitási problémát.

Elektrosztatikus kölcsönhatás is alkalmas enzimek immobilizálására, ami ugyan általánosságban erősebb kötést eredményez, mint a hidrofób-hidrofób kölcsönhatás, azonban sokkal érzékenyebb a pH vagy ionerősség megváltozására [66]. Tripszin rögzítettek elektrosztatikus kölcsönhatással grafén-oxid nanoréteggel módosított mikrorészecskékre [69, 70]. Elektrosztatikus kölcsönhatással többrétegű polielektrolit-rendszerekbe is lehet enzimet immobilizálni, mely aktivitás szempontjából kedvező lehet, ugyanis az enzim meg tudja őrizni natív formáját ilyen közegekben. Többrétegű hálózatot ki lehet alakítani kitozán (CS) és hialuronsav (HA) egymásra rétegezésével [71] (layer-by-layer – LBL). A többrétegű CS-HA rendszer nagyobb felületet biztosított az enzim számára, ami hatékonyabb emésztéseket tett lehetővé a nagyobb enzimkoncentrációnak köszönhetően.

Stabilabb enzimréteg alakítható ki kovalens rögzítéssel. Jellemzően karboxil-, amino- vagy tiolcsoportok részvételével valósul meg a kovalens kötés a felületen található reaktív csoport és az enzim funkciós csoportja(i) között. A kovalensen rögzített enzimet tartalmazó IMER-ek élettartama általában hosszabb (akár több hónap), mint az adszorpciós technikát kihasználó IMER-eké, viszont előállításuk bonyolultabb, többlépcsős folyamat, olykor jelentős költségigénnyel. Annak érdekében, hogy az aktív centrumban található funkciós csoportok ne vegyenek részt az immobilizációs reakcióban, gyakran egy kompetitív inhibítort is adnak a reakcióelegyhez (pl.: tripszin esetében benzamidint [72]).

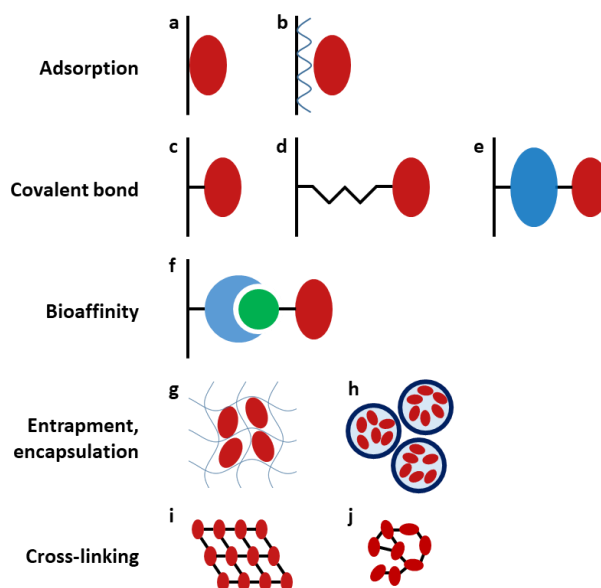
A leggyakoribb kapcsolási reakciók közé a glutáraldehides [73, 74], a karbodiimides [72, 75, 76], az azlakton-kémiát [77, 78], ill. a tiol-én klikk reakciót [79, 80, 81] kihasználó módszerek tartoznak. A glutáraldehides módszernél aldehidszoportokat viszünk fel a hordozó felületére, amihez az enzimek a primer aminocsoportjaikon keresztül kapcsolódnak. A keletkezett Schiff-bázist redukálva stabil, szekunder amin képződik. Karbodiimides aktiválás esetében végeredményben egy karboxil- és egy aminocsoport között jön létre egy amidkötés. Az eddig említett stratégiáknál szükség volt a felület/enzim aktiválására egy többlépéses folyamatban, azonban bizonyos hordozók esetében lehetőség van közvetlen immobilizálásra is. Amennyiben a hordozó azlakton csoportokkal rendelkezik, azok egy gyűrűnyílási reakcióban reagálnak a fehérjék amino- vagy tiolcsoportjaival. Hasonlóan, az enzimek a tiolcsoportjaikon keresztül kapcsolódni tudnak felületi kettős kötést tartalmazó csoportokhoz, mely egy tioéter kötést eredményez. Manapság egyre elterjedtebbek az ilyen tiol-én klikk reakción alapuló stratégiák, hiszen nagy hatásfokkal, gyorsan és melléktermék képződése nélkül mennek végbe.

Rendkívül stabil és orientált kapcsolást tesz lehetővé a bioaffinitáson alapuló immobilizálás, ahol az affinitás-párok (pl.: antiest-antigén, biotin-avidin [82]) közötti specifikus kölcsönhatást lehet kihasználni. Ilyenkor származékképzéssel a pár egyik tagját a felülethez, a másikat az enzimhez kapcsolják. Az ún. DNS-vezérelt immobilizálás során (DNA-directed immobilization – DDI) a hordozót egyszálú DNS-el funkcionalizálják, az enzimet pedig a komplementer DNS-szállal [83]. Az egyedüli hátránya ezen módszereknek az, hogy a származékképző reagensek meglehetősen drágák.

Az enzimek csapdázása vagy kapszulázása is egy kíméletes technika, ugyanis az adszorpcióhoz hasonlóan, ezekben az esetekben sem történik kémiai reakció az immobilizáció során. Egy oldhatatlan mátrixba (pl.: szilika

[84], titánia [85]) vagy féligáteresztő membránon belüli térrészbe ágyazzák ilyenkor az enzimeket.

Kimagasló enzimaktivitás érhető el enzimkristályok vagy enzimaggregátumok kialakításával [86, 87]. Ebben az esetben az enzimmolekulákat összekapcsolják egy keresztkötő reagens alkalmazásával (pl.: glutáraldehid), így nincs szükség hordozó közegre.

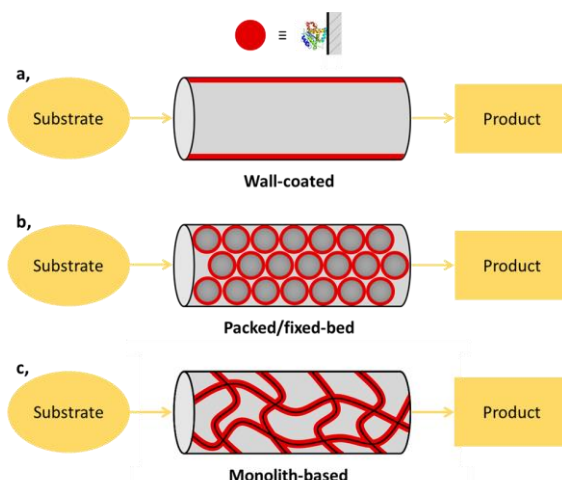


2. ábra: Enzimek immobilizálásának fő típusai: adszorpció (a) közvetlenül a felületen vagy (b) távtartó molekulán keresztül; kovalens kötés (c) közvetlen, (d) kisméretű-, ill. (e) nagyméretű távtartón keresztül; (f) bioaffinitás kölcsönhatás; oldhatatlan mátrixba való (g) csapdázás vagy (h) kapszulázás; (i) enzimkristályok vagy (j) enzimaggregátumok kialakítása keresztkötéssel [65].

3.2.2 Hordozó közegek

Az immobilizáláshoz használt reakción kívül, az IMER-ek aktivitását és hatékonyságát a hordozó közeg (és főleg annak fajlagos felülete) is befolyásolja. A cél általánosságban az, hogy az oldatban lévő szubsztrát minél több aktivitást mutató immobilizált tripszinmolekulához eljusson. Leggyakrabban közvetlenül a csatorna falára (3.a ábra), részecskékre (3.b ábra)

vagy monolitra (3.c ábra) történik az enzimek rögzítése, de előfordulnak papíralapú IMER-ek is [88], azonban azok proteomika alkalmazása nem jellemző.



3. ábra: μ -IMER-ek hordozó közeg szerinti csoportosítása: (a) csatorna falán rögzített enzim, (b) töltetes reaktor, mely enzimmal borított részecskéket tartalmaz és (c) monolit-alapú reaktor [3*].

*-gal jelölt hivatkozások saját publikációkra mutatnak

A három fő módszer közül az enzimek csatornafalon való immobilizálása a legegyszerűbben és leggyorsabban megvalósítható, viszont a felület/térfogat aránya (S/V), és ebből következően az immobilizált enzim mennyisége is elmarad a másik két típuséhoz képest. A csatornafalon történő immobilizálás a diffúziós úthossz szempontjából sem a legkedvezőbb, hiszen a szubsztrátnak ebben az esetben kell a leghosszabb utat megtennie, hogy a felületen rögzített enzimmolekulákkal találkozzon. A μ -IMER hatékonyságának fokozása érdekében érdemes növelni a kontaktidőt, amit legkönnyebben a reaktor hosszának növelésével vagy kisebb áramlási sebesség alkalmazásával lehet elérni. Ezenkívül, kereskedelmi forgalomban elérhetőek többcsatornás kapillárisok (multi-lumen capillary – MLC), melyek külső átmérője összemérhető a hagyományos kvarckapillárisokéval, ám 126 kisebb csatorna foglal helyet bennük ($id < 10 \mu m$) [88, 89]. Az ilyen kis átmérőjű

csatornában a S/V arány természetesen jóval kedvezőbb. Az irodalomban számos példa található olyan csatornákra is, melyek belső felületét porózus réteggel [73, 89] vagy nano-struktúrákkal (pl.: arany nanorészecskékkel [90, 91]) módosították ugyancsak a fajlagos felület növelése érdekében. Az ilyen típusú reaktor előnye egyrészt az egyszerűsége, másrészt az, hogy a rendszerben elhanyagolható a nyomásesés (töltetes reaktorokhoz képest), hiszen a csatorna teljes keresztmetszetében nyitott (open tubular – OT).

Lényegesen nagyobb az S/V arány töltetes reaktorok esetében, ahol gyakran a kromatográfiában is használatos részecskéket alkalmaznak. Először általában az enzimet immobilizálják a részecskékre, és ezt követően történik a részecskék csatornába/kapillárisba helyezése. Sokféle részecske áll rendelkezésre méretüket (mikro/nano), ill. porozitásukat tekintve. A pórusok kiemelkedő fajlagos felületet kölcsönöznek a reaktornak, ugyanakkor, jelentősen csökkentik az anyagtranszport sebességét [92], így az elméletileg várt IMER-hatékonyság nem mindig érhető el. Fontos tehát a kívánt alkalmazásnak megfelelő méretű és porozitású részecskét alkalmazni. A töltet anyagát tekintve is nagy a változatosság, legjellemzőbbek a szilika- [75], cellulóz- [93], polisztirol-divinilbenzol- (PSDVB) [94] és akrilát-alapú [69] részecskék. Ahogyan a HPLC kolonnák készítésénél, úgy az IMER-ek esetében is kritikus az egyenletes töltetanyag reprodukálható módon történő kialakítása. A részecskék visszatartását frittekkel [93] vagy mikrocsipek esetében csatornaszűkületekkel [75] lehet elérni. Számos előnye van a mágneses mikrogömböcskék alkalmazásának [76]. A részecskék csatornába helyezését/visszatartását és eltávolítását egy mágnes alkalmazásával könnyen el lehet végezni, mely egyrészt leegyszerűsíti a töltet kialakításának folyamatát, másrészt lehetővé teszi a részecskék regenerálását és újbóli felhasználását.

A monolit egy olyan egy darabból álló „töltet”, melyben az átjárhatóságot a mezo- és makropórusok összenyílásából kialakult csatornák biztosítják. A monolitok nagy fajlagos felülettel, ill. gyors anyagátadási tényezővel rendelkező anyagok, így ötvözik a töltetes és az OT reaktorok kedvező tulajdonságait. Kialakíthatóak szervetlen vagy szerves anyagokból, ill. hibrid módon is, melyek közül a szerves polimer-alapú monolitok a legelterjedtebbek, főleg a pH tűrésük és egyszerű elkészíthetőségüknek köszönhetően. Metakrilát monomerekből felépülő monolitokat gyakran használnak proteolitikus IMER-ként [79-81, 95]. Megfelelő funkciós csoporttal ellátott monomerek segítségével egyszerűen hangolható a monolit hidrofil/hidrofób jellege [95] vagy felületi funkcionalitása [78].

3.3 Mikrofluidikai enzimreaktorok

A mikrofluidika rendszerek olyan eszközök összessége melyek lehetővé teszik a rendkívül kis térfogatokkal (így a nano- és akár pikoliter térfogatú mintákkal) való munkát. Méretükből következően, a mikrofluidikai rendszerek nagy fajlagos felülettel rendelkeznek, így enzimreaktorok kialakításához kedvező közeget biztosítanak. Alapvetően kétféle elrendezés lehetséges: kapillárisba vagy mikrofluidikai csipbe integrált IMER. Mikrocsipek esetében lehetőség van szabadon megtervezni a csatornarendszer elrendezését, a kapillárisok geometriája viszont adott. Léteznek egyéb egyszerű platformok is (pl.: monolit-IMER pipettahegyben [96], membrántartóba elhelyezett membrán-IMER [97]), azonban ezek tárgyalására nem térnek ki.

3.3.1 Mikrocsipben kialakított enzimreaktorok

A mikrofluidikai csipek tipikusan néhány cm² alapterületű eszközök, melyekben a folyadékok áramoltatása egy előre megtervezett

csatornarendszerben történik. Eleinte az üvegből és kvarcból készült eszközök domináltak, melyek előállításához fotolitográfiát és maratásos technikákat alkalmaztak, azonban ezen eljárások kevésbé terjedtek el az akadémiai szférában a szükséges infrastruktúrális háttér magas költségigénye miatt. Ennek ellenére található példa az irodalomban ilyen eszközök proteomikai alkalmazására [98]. Yamamoto és mtsai. elektronsugaras litográfia és maratás kombinálásával állítottak elő egy olyan csipet, melyben a csatornák szélessége 18 μm [74]. Ilyen szintű miniatürizálást általában csak komoly, drága műszerezettséggel lehet elérni. Manapság megfigyelhető polimer-alapú mikroszippek térnyerése. Ezen csipek elkészítéséhez használatos mikrogyártási eljárások jelentősen olcsóbbak, ill. lehetőség van sorozatgyártásra. A legelterjedtebben alkalmazott polimerek közé tartozik a polietilén-tereftalát (PET) [71, 84, 99], poli(metil-metakrilát) (PMMA) [100-102], polisztirol [103] és a poldimetilsziloxán (PDMS) [67, 85, 104-107]. A PDMS számtalan előnyös tulajdonsággal rendelkezik: átlátszó, olcsó, biokompatibilis, rugalmas és könnyen megmunkálható. A PDMS alkalmazásához azonban nehézségek is társulhatnak, ugyanis kiváló adszorbens jellege miatt a makromolekulák adszorbeálódnak a felületen, ami gyakran problémákat vet fel. Továbbá, a kismolekulák képesek bediffundálni az anyag belsejébe, ebből fakadóan bizonyos szerves oldószerek duzzasztják, ami csatornageometria sérüléséhez vezethet. Sokszor a PDMS mechanikai stabilitása sem megfelelő, 2 bar feletti nyomás alkalmazása esetében a csatornák deformálódhatnak vagy akár fel is szakadhatnak. Az említett korlátok miatt egyre gyakrabban alkalmaznak tiol-én mikroszippeket proteomikai célokra [50, 91], melyek oldószerekkel és a nagyobb nyomással szemben ellenállóbbak. Tiol-én csipeket tiol- és allil-funkciós csoportokat tartalmazó monomerek elegyének UV-kezelés hatására beinduló polimerizációjával lehet készíteni [108]. Amennyiben a kiindulási monomereket a sztöchiometrikustól eltérő arányban alkalmazzák, az

elkészített mikrocip felülete fölös tiol- vagy allil-csoportokat tartalmaz, melyek felhasználhatóak enzimek immobilizálására [91].

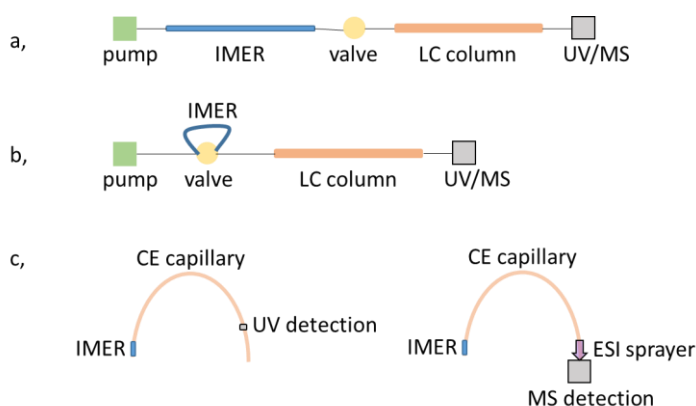
Mikroreaktorok analitikai platformokkal (HPLC-MS vagy CE-MS) való on-line kapcsolása általánosságban nagy kihívás, hiszen olyan körülményeket kell alkalmazni, melyek az emésztés, analízis és detektálás szempontjából is kielégítőek, ill. biztosítani kell az egyes egységek közötti megfelelő csatlakozást is. Jönsson és mtsai. fejlesztettek ki egy on-line rendszert, ahol a tiol-én mikrocipet egy LC-MS rendszerhez kapcsoltak [50]. A tiol-én mikrocipek nyomásállósága ~ 34 bar, ami jelentősen nagyobb, mint PDMS mikrocipeké.

3.3.2 Kapillárisbeli rendszerek

Az IMER-ek kapillárisokba való integrálása egy viszonylag gyors és egyszerű folyamat, hiszen a mikrocsatorna kialakítására nincs külön szükség. A mikrocipekben ráadásul csak drága eljárások alkalmazásával (pl.: elektronsugaras litográfia) lehet elérni egészen szűk ($<20 \mu\text{m}$) csatornadimenziókat, míg a hasonló belső átmérővel rendelkező kvarckapillárisok viszonylag olcsón beszerezhetőek. A csatorna szélessége leginkább olyan esetekben kritikus, amikor a reaktor OT elrendezésű (csak a csatorna falán található az immobilizált enzim), hiszen a diffúziós úthossz ennél a reaktortípusnál a legnagyobb. Foret és mtsai. $10 \mu\text{m}$ belső átmérőjű kapillárist használtak az S/V arány növelése és a diffúziós úthossz csökkentése érdekében [109]. Ugyanebből a célból gyakran alkalmaznak monolit-alapú μ -IMER-t kapillárisokban, melyek közül manapság a legelterjedtebbek a tiol-én klikk-reakciót kihasználó eljárások [79] az előzőekben részletezett előnyöknek köszönhetően.

Kapilláris-IMER eszközök analitikai rendszerrel (HPLC-MS [69, 70, 73, 89], CE-MS [93]) való on-line kapcsolására több példa található az

irodalomban. HPLC esetében a μ -IMER egységet általában az analitikai oszlop elé helyezik, de kidolgoztak már egy olyan 4D rendszert is, ahol az emésztést két elválasztechnikai lépés közé integrálták [110]. Egy másik elegáns módszernél a μ -IMER egy mintahurokban foglal helyet [78]. CE technika alkalmazása esetén lehetőség van az μ -IMER részt az elválasztás „útvonalába” helyezni, így az emésztés és az elválasztás tulajdonképpen ugyanazon kapillárisban valósul meg [93]. A 4. ábrán láthatóak az online μ -IMER konfigurációk legelterjedtebb megvalósítási formái.



4. ábra: On-line μ -IMER rendszerek (a,b) HPLC és (c) CE alkalmazása esetén [3*].

3.3.3 Enzimreaktorok analitikai alkalmazásai

Az eddigiekben proteomikai alkalmazásokra kifejlesztett μ -IMER rendszereket mutattam be, melyek nagy fajlagos felületüknek köszönhetően nagyságrendekkel felgyorsítják a BUP megközelítésben használatos enzimes emésztési lépést. On-line integrálásuk lehetővé teszi a munkafolyamat automatizálását. Yuan és mtsai. egy olyan on-line IMER-nanoLC-MS rendszert alakítottak ki, amelyben az emésztés és izotópjelölés egyszerre valósul meg. Ezzel a módszerrel E. coli fehérjekivonat mennyiségi meghatározását végezték el [69]. Comamala és kutatócsoportja egy mAb epitóp térképezését végezték

el hidrogén/deutérium csere tömegspektrometriával (HDX-MS) [111]. A kialakított on-line platform integrálja a fehérjék deglikozilezését, diszulfid-hidak redukálását és pepszines emésztését végző modulokat. Az enzimes emésztésekhez tiol-én mikrocipeket használtak.

Proteolitikus enzimeken túlmenően más enzimek is alkalmasak IMER-ben való alkalmazásokhoz. Különböző glikoproteinek glikomikai vizsgálatát végezték el monolit-alapú hordozóra immobilizált PNGase F enzim használatával [112, 113]. Az enzim az aszparagin és cukorrész közötti amidkötést hasítja, a felszabadított N-glikánokat lézer-indukált fluoreszcens (LIF) detektálást alkalmazó CE technikával, ill. MS módszerrel vizsgálták. Lipáz enzimet tartalmazó IMER segítségével tanulmányoztak polimer nanorészecskéket, ill. azok degradációs termékeit [114]. A reaktort egy cikloolefin kopolimer (COC) mikrocipben alakították ki, ahol az enzimet kovalensen rögzítették a mikrocSATornában található monolithoz. A mikrocipet mikromaratási technológiával [115] készítették el. A 24 óra hosszú, hagyományos módszerrel történő enzimes bontás időtartamát 2 percre sikerült csökkenteni az IMER alkalmazásával. Liang és mtsai. növényvédőszeret detektálására fejlesztettek ki egy töltetes PDMS mikrocipet [116]. Acetilkinolin-észteráz enzimet immobilizáltak grafén-oxid/magnetit nanokompozitokra. A hordozó közeget egy külső mágnes használatával pozicionálták a PDMS csatornába.

IMER eszközöket gyógyászati jelentőséggel bíró kutatásokban is használnak. Online IMER-CE rendszert dolgoztak ki neuraminidáz gátlószeret fel-fedezésére (a neuraminidáz inhibitoroknak az influenza vírus kezelésében van szerepük) [53]. Katepszin D enzimet tartalmazó mikroreaktort hasonlóképpen használtak inhibitor-vizsgálatra [117]. Az új, specifikus gátlószeret keresése amiatt fontos, mert a katepszin D túlzott aktivitása tumorok kialakulásához vezet [118]. Quiao és kutatócsoporja L-aszparagináz kinetikai vizsgálatát végez-

ték el, annak érdekében, hogy az enzim akut limfoid leukémia kezelésénél fellépő mellékhatásait vizsgálják. Az enzimet arany nanorészecskékkel funkcionizált kapillárisba immobilizálták [119].

Az orvostudományban fontos terület a különböző testfolyadékokban jelenlevő komponensek mennyiségének monitorozása. Glükóz-oxidáz enzimet immobilizáltak mágneses nanorészecskékre és az így kialakított IMER-t glükóz mennyiségi meghatározására használták vérmintákban [120]. Boehm és mtsai. laktóz meghatározására fejlesztettek ki egy olyan töltetes mikrocsipet, melyben három különböző enzimet (β -galaktozidáz, glükóz-oxidáz, tormaperoxidáz) immobilizáltak. Az enzimeket bioaffinitás kölcsönhatással rögzítették polisztirol mikrogömböcskékre [121].

Célkitűzések:

- PDMS mikrocsipben kialakított enzimreaktor fajlagos felületének növelése
- PDMS mikrocsipben kialakított enzimreaktor csatorna-geometriájának módosítása az emésztési hatékonyság fokozása érdekében
- Egy in-line μ -IMER-CE-MS rendszer kifejlesztése, mellyel a minták emésztése és analízise automatizált módon megy végbe
- On-line minta-stacking jelenséget kihasználó CE-MS módszer kidolgozása, mellyel növelhető a beazonosított peptidek/fehérjék száma.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált vegyszerek

Munkám során analitikai tisztaságú vegyszereket használtam. A fehérjeminták előkészítéséhez az alábbi anyagokból készítettem törzsoldatot kétszeresen ioncserélt vízzel (Elix-3, Millipore, Darmstadt, Németország): karbamid, NH_4HCO_3 , ditiotritol (DTT), jódiacetamid (IAM) és hangyasav, melyek mindegyike Sigma termék (St. Louis, MO, USA). Fehérjebontó enzimként sertés eredetű tripszint használtam (Type IX-S, liofilizált, Sigma). Kísérleteimben a következő mintákat emésztettem: human szérum albumin (HSA) (Sigma), kígyóméreg (*Vipera ammodytes ammodytes*, Cetox Kft. által) és emberi könny-, valamint nyálminta (önkéntes írásos beleegyezésével).

Mikrofluidikai csipek elkészítéséhez negatív fotorezisztre (SU-8 2025, Microchem, Newton, MA, USA), 1-metoxi-2-propanol acetátra (Microresist Technology, Berlin, Németország), PDMS elasztomerre és térhálósító adalékra volt szükség (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA).

Az emésztmények sómentesítését 10 μl -es C18 ZipTip (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Írország) pipettahegyek alkalmazásával végeztem el a gyártó leírásának megfelelően.

A CZE méréseknél használt izopropil-alkohol (IPA), metanol (MeOH), acetonitril (ACN), NaH_2PO_4 és Na_2HPO_4 mind VWR termék (Radnor, PA, USA), a HCl oldat Sigma termék volt.

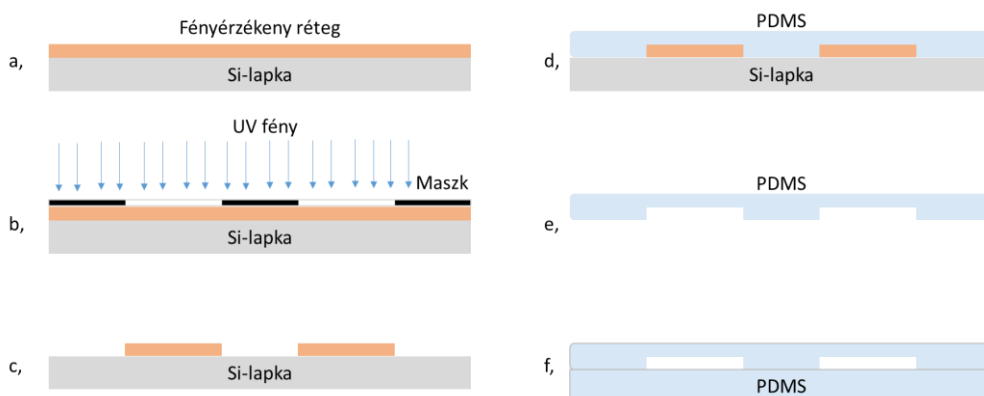
4.2 Mikrofluidikai csipek előállítása

A mikrocipeket a lágy litográfias módszernek megfelelően készítettem el [122]. Az ehhez szükséges litográfias maszk létrehozásához először AutoCAD szoftverrel (v.2013, Autodesk, San Rafael, CA, USA) megterveztem a csatornamintázatokat, majd ezeket egy átlátszó fóliára nyomtattuk ki egy nagy felbontású (6000 dpi) nyomtató segítségével (Képpont

Kft., Debrecen). Egy vékony szilícium lapkára $\sim 0,5$ g negatív típusú fényérzékeny anyagot (SU-8) öntöttem. A kellően vékony ($\sim 25 \mu\text{m}$), egyenletes rétegvastagság elérése érdekében a fotorezisztet egy spincoater segítségével (3200 rpm, 30 s) oszlattam el a Si-lapkán. A kialakított réteg stabilizálásához és a felesleges oldószer eltávolításához a Si-lapkát kemencébe helyeztem (95°C , 15 perc). Az előmelegített, majd lehűlt lapkát ezt követően UV fénnel ($\lambda=365 \text{ nm}$, Spectroline FC-100/F lámpa, Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) sugároztam be a litográfias maszkon keresztül. A fényérzékeny rétegben térhálósodás következett be az UV fény hatására. A térhálósodás teljessé tétele érdekében besugárzás után a Si lapkát ismét kemencébe helyeztem (95°C , 5 perc). A lapka felületét ezután előhívószerrel (1-metoxi-2-propanol-acetát) öblöttem. Az oldószer a nem besugárzott részeket leoldotta, így láthatóvá vált a tervezett csatornamintázat. Az elkészített öntőformát átöblítettem metanollal, majd kemencébe raktam (95°C , 1 óra).

Mikrofluidikai csipek készítéséhez PDMS és térhálósító adalék keverékét (PDMS:térhálósító = 10:1) öntöttem az öntőformára, 20 percig hagytam állni szobahőmérsékleten, majd vákuumba helyeztem annak érdekében, hogy az öntőforma szűk mélyedéseiben ragadt légbuborékokat eltávolítsam, így biztosítva a PDMS jobb illeszkedését. A polimer 1 óra alatt megszilárdult a kemencében (60°C). Ezt követően a polimert lehúztam az öntőformáról, formára vágtam, majd egy kézi lyukasztóval kialakítottam a folyadékcsövek csatlakozásához szükséges portokat (átmérő: $\sim 300 \mu\text{m}$). A csatornát tartalmazó PDMS lapkát egy másik PDMS lapkához rögzítettem oxigén plazmás kezelés után. A két lapkát plazmázó berendezésben (PDC-32G, Harrick, Ithaca, NY, USA) tartottam 2 percig, melynek hatására a felületeken reaktív gyökök keletkeztek. Amennyiben rövid időn belül érintkezésbe hoztuk egymással a két felületet, irreverzibilis kötés alakult ki a két PDMS lapka

között. A mikrocipet végül kemencébe helyeztem (180 °C, 10 perc) a kötés stabilizálása érdekében.



5. ábra: PDMS mikrocipek elkészítésének főbb lépései: (a) egyenletes vastagságú fényérzékeny réteg kialakítása a Si-hordozón, (b) litográfiai maszkon keresztül történő UV-besugárzás, (c) a nem exponált részek eltávolítása, (d) PDMS prepolimer öntőformára öntése, (e) megszilárdult PDMS eltávolítása a Si-hordozóról és (f) a mintázatot tartalmazó PDMS lapka hozzáillesztése egy másik PDMS lapkához.

4.3 Immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorok kialakítása

Két típusú enzimreaktort használtam munkám során: mikrocip- és kapilláris-IMER. Mindkét esetben adszorpcióval rögzítettem a tripszint. Mikrofluidikai csipben való immobilizáláshoz frissen készített tripszinoldatot (20 mg/ml) áramoltattam keresztül a csatornán egy perisztaltikus pumpa (IPC, Ismatec, Cole-Palmer, IL, USA) segítségével (2 µl/perc, 10 perc). A folyadékcsatlakozás megteremtéséhez egy pumpacsövet (belső átmérő: 0,19 mm, Tygon, Cole-Palmer, IL, USA) csatlakoztattam a csatorna bemeneti portjához. A nem adszorbeálódott tripszint 25 mM NH_4HCO_3 - oldattal (pH = 8,0) mostam ki a csatornából (2 µl/perc, 10 perc). Többféle csatornamintázattal dolgoztam, melyek geometriájukban és hosszukban is eltérnek, ebből fakadóan a folyadék átáramoltatásához szükséges idő (kontaktidő) is változó. A fent említett paraméterek egy olyan csatornára érvényesek, melyben a kontaktidő ~ 50

s. Ettől rövidebb vagy hosszabb kontaktidők esetén arányosan változtattuk az NH_4HCO_3 - oldattal történő mosáskor alkalmazott áramlási sebességet annak érdekében, hogy a nem megkötődött tripszint alaposan kimossuk.

A kapilláris-IMER kialakítását magában a CE készülékben végeztük el programozott módon, az 1. táblázatban foglalt paramétereknek megfelelően. A cél az volt, hogy a kapilláris kezdeti $\sim 1\text{-}2$ cm hosszú szakasza tartalmazza az immobilizált tripszint. A táblázatban feltüntetett nyomás $\times$ idő értékeket a Hagen–Poiseuille egyenlet segítségével számítottuk ki. CE-UV méréseknél 34 cm-es kapillárisokat használtunk, a kialakított tripszintréteg 1,04 cm hosszú; CE-MS elemzések esetén 90 cm hosszú kvarckapillárisokat alkalmaztunk, a tripszinezett szakasz 1,95 cm volt. Tripszinezés előtt a kapillárisokat BGE oldattal (40 mM NH_4Ac , pH = 8,0) átöblítettünk annak érdekében, hogy a felületen található szilanolcsoportok deprotonálódjanak. A tripszinoldat bejutatása után az 1 perces várakozási idő biztosította a molekulák diffúzióját a kapilláris falához. A kapilláris elejéről az oldatot az arra a kapilláris végre kapcsolt ellentétes nyomással távolítottuk el. Ezt a háromlépéses folyamatot 3-szor ismételtük meg, végezetül az outlet vég felől 2 percig áramoltattunk BGE oldatot azért, hogy a nem megkötődött tripszinmolekulákat biztosan kimossuk a kapillárisból.

1. táblázat: Adott hosszúságú tripszinezett szakasz kialakításához alkalmazott injektálási paraméterek az in-line IMER-CE rendszerénél

inlet	outlet	művelet	CE-UV		CE-MS	
			idő	nyomás*	idő	nyomás*
mosó BGE	üres	öblítés	1 perc	1 bar	3 perc	4 bar
tripszin	mosó BGE	nyomás	8 s	50 mbar	40 s	50 mbar
tripszin	mosó BGE	várakozás	1 perc	-	1 perc	-
tripszin	mosó BGE	nyomás	12 s	-50 mbar	60 s	-50 mbar
üres	mosó BGE	nyomás	2 perc	-50 mbar	2 perc	-50 mbar
inlet BGE	outlet BGE	öblítés	1 perc	1 bar	1 perc	1 bar

*a kapilláris injektálási (inlet) végén alkalmazott nyomás a légköri nyomáshoz képest

4.4 Fehérjék emésztése

Munkám során különböző fehérjemintákkal dolgoztam: HSA, kígyóméreg, emberi könny- és nyálminták, melyek tripszines emésztéshez való előkészítése és oldatban emésztése az 2. táblázatban feltüntetett módon történt. A mintaelőkészítés során használatos reagensek szerepét a 3.1.1 fejezetben már tárgyaltam. A fehérjéket általában NH_4HCO_3 -oldatban (25 mM, pH = 8,0) oldottam fel, majd 8 M karbamid-oldatot adtam hozzájuk és hagytam állni őket szobahőmérsékleten 30 percet. DTT adagolása után 1 óráig inkubáltam az elegyeket 37 °C-on, majd IAM hozzáadását követően sötétbe helyeztem a mintákat 45 percre. Végezetül NH_4HCO_3 -oldattal hígítottam, majd tripszinoldatot pipettáztam az előkészített mintákhoz. 16 órán át történő inkubáció (37 °C) után a mintákat megsavanyítottam hangyasavval a reakció leállítása érdekében. Az előkészített, ill. oldatban emésztett mintákat fagyasztóban tároltam (-20 °C) felhasználásukig/elemzésig. Mikrocsipben történő emésztések esetében a mintákat minden esetben 0,65 μl /perc áramlási sebességgel áramoltattam át a csatornákon perisztaltikus pumpa segítségével. A kapilláris-IMER rendszer használatát az 5.2 fejezetben részletezem.

A kígyóméreg mintát liofilizált por formájában kaptuk. A nem-stimulált könnyminták vételezése üvegkapillárisal (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Németország) történt [123] a külső szemzugarból. A könnyminták összfehérje-koncentrációja 6-11 mg/ml [124], így ennek megfelelően kellett módosítani a hozzáadott reagensek mennyiségét. A nyálmintákat egy 2 ml térfogatú Eppendorf-csőbe gyűjtöttem. A mintavételezés előtt 2 órával nem történt folyadék vagy táplálék fogyasztása. A mintákat centrifugáltam ($2700 \times g$, 20 perc), majd a felülúszót liofilizáltam.

2. táblázat: Fehérjeminták előkészítése és oldatban emésztése során alkalmazott reagensek/oldatok mennyisége

kiindulási mintamennyiség	HSA 2 mg	kígyóméreg 1 mg	könny 5 μ l	nyál 1 mg
25 mM NH_4HCO_3 (μ l)	100	6,66	-	6,66
karbamid	300 μ l	20 μ l	0,9 mg	20 μ l
0,1 M DTT (μ l)	40	2,66	0,3	2,66
0,2 M IAM (μ l)	40	2,66	0,3	2,66
25 mM NH_4HCO_3 (μ l)	2000	133	9,5	133
1 mg/ml tripszin (μ l)	50	6,66	0,3	6,66
1 % hangyasav (μ l)	280	19	1,7	19

4.5 Alkalmazott műszerek, szoftverek

4.5.1 Szimulációk

A folyadékok mikrocatornában való áramlását COMSOL Multiphysics (Burlington, MA, USA) szoftverrel tanulmányoztuk, melynek működése végeelem analízisen (FEM) alapul. A szoftver 5.3-as verzióját használtuk, a következő beépített modulokkal: lamináris áramlás és hígított anyagok szállítás. Az áramlási sebességet 3×10^{-3} m/s, a diffúziós együtthatót 6.1×10^{-11} m²/s értékre állítottuk. A csatorna kezdeti szakaszára bejuttatott fehérjeoldat koncentrációja: 4.3×10^{-5} mol/l. A hálóméretet a maximális finomságra állítottuk.

4.5.2 Számításokhoz használt összefüggések

A pilléreket tartalmazó csatornák fajlagos felületének megállapításához a csatornák felület/térfogat arányát számítottam ki. A pillérátmérő és pillérközi táv függvényében eltérő számú pillér helyezhető el a csatornában ($h = 25 \mu\text{m}$; $l = 5 \text{ mm}$; $w = 375 \mu\text{m}$). A fajlagos felület számításához a csatornák felületét és térfogatát korrigáltam a pillérek felületével és térfogatával.

A pilléreket nem tartalmazó csatornák esetében a komponensek diffúziós idejét és a mintatérfogatok átáramoltatásának időtartamát is vizsgáltuk. A diffúziós idők számítását a következő összefüggés alapján végeztük el:

$$t_D \approx \frac{x^2}{2D}$$

ahol t_D : diffúziós idő (s); x : diffúziós távolság (itt a csatornaszélesség fele) (m) és D : diffúziós együttható ($9,3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$).

A $10 \text{ }\mu\text{l}$ mintatérfogat átáramoltatásához szükséges idő számításához a Hagen-Poiseuille egyenletet alkalmaztuk:

$$\Delta_P = \frac{8 \times Q \times L \times \mu}{\pi \times r^4}$$

ahol Δ_P : nyomáscsökkenés ($2 \times 10^5 \text{ Pa}$); Q : térfogati áramlási sebesség ($5,52 \times 10^{-13} \text{ m}^3/\text{s}$); L : csatorna hossza (0,1 m); μ : víz dinamikus viszkozitása ($8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) és r : csatorna sugara ($5 \times 10^{-6} \text{ m}$).

4.5.3 Mikrocsipek mikroszkópos felvétele

A mikrocsipeket egy CCD kamerával (AxioCam ICC3, Zeiss, Oberkochen, Németország) felszerelt inverz mikroszkóppal vizsgáltam (Axio Observer A1, Zeiss), a mikroszkópos képeket az Axio Vision 4.6.3 (Zeiss) szoftverrel rögzítettem.

4.5.4 Kapilláris elektroforézis UV detektálással

Az emésztmények CZE-UV elemzését egy Agilent 7100 típusú CE készülékben hajtottam végre (Agilent, Waldbronn, Németország). Az elektroferogramok rögzítése és feldolgozása az OpenLAB CDS Chemstation (Agilent) szoftverrel történt. Az elválasztásokhoz poliimid külső bevonattal ellátott 80 cm hosszú buborékcélás kvarckapillárisokat (ID: $50 \text{ }\mu\text{m}$) használtam, melyeknek effektív hossza (detektorablakig terjedő hossz, L_{eff})

71,5 cm (Agilent). A mintabevitel hidrodinamikus injektálással (50 mbar, 2 s) történt, a kapilláris anódhoz közeli végén (pozitív polaritás). Háttélelektrolitént 1 M hangyasav (pH= 1,9) vagy 100 mM foszfát puffer (PB) (pH= 2,2) szolgált. Az alkalmazott feszültség jellemzően +25-30 kV volt, a kapilláristeret 25 °C-on termosztáltam. A detektálás hullámhosszát 200 nm-re állítottam (4 nm sávszélesség, referencia nélkül, válaszidő: 0,3 s). A kapillárist minden mérés előtt a háttélelektrolittal (1 bar, 15 perc), mérések után pedig 1 M NaOH-val (1 bar, 3 perc) és vízzel (1 bar, 3 perc) mostam a megfelelő mérési reprodukálhatóság érdekében.

4.5.5 Kapilláris elektroforézissel kapcsolt tömegspektrometria

A CE-MS elemzésekhez Agilent 7100 típusú CE készülékhez kapcsolt maXis II qTOF-MS (Bruker) berendezést használtam, melyek közötti kapcsolatot egy CE-ESI Sprayer (G1607B, Agilent) interfész biztosította. A segédfolyadékot egy 1260 Infinity II izokratikus pumpa (Agilent) szállította. A CE készülék és a pumpa vezérlése az OpenLAB CDS ChemStation szoftverrel történt. Az MS készülék vezérlését, az elektroferogramok, ill. a spektrumok rögzítését az otofControl 4.1 (build: 3.5, Bruker) program segítségével végeztem el. Az elválasztásokhoz 90 cm hosszú (ID: 50 µm) poliimid bevonatú kvarckapillárisokat használtam (Polymicro, Phoenix, AZ, USA). Hidrodinamikus injektálással (50 mbar, 120 s) juttattuk a mintát a kapilláris anódhoz közeli végébe. A kapilláristeret 25 °C-on termosztáltam, az alkalmazott feszültség +25 kV, a háttélelektrolit 1 M hangyasav (pH= 1,9) volt. Segédfolyadékként (SL) izopropil-alkohol:víz = 1:1 + 0,1 % hangyasav összetételű elegy szolgált, az áramlási sebesség 4 µl/perc volt. A kapillárist a mérések előtt a háttélelektrolittal kondicionáltam (4 bar, 5 perc), a mérések után acetonnitrillel (4 bar, 1 perc), metanollal (3 bar, 2 perc), vízzel (3 bar, 2 perc) és háttélelektrolittal (4 bar, 2 perc) mostam, végül feszültséget alkalmaztam (15 kV, 20 s).

Az MS készülék beállításai: pozitív ion mód; vizsgált m/z tartomány: 50-2200; MS frekvencia 3 Hz; MS/MS frekvencia a prekursorion intenzitásától függően 1-4 Hz. Termékionokat ütközés által kiváltott disszociációval (CID) generáltam. MS/MS adatgyűjtésnél aktív kizárást alkalmaztam (1 spektrum után az adott prekursor nem kerül kiválasztásra fél percig, kivéve ha az adott csúcs intenzitása 5x nagyobbá nem változik); az egyszeres töltésű ionokat kizártam a fragmentációból. Az ionforrás beállításai: porlasztógáz nyomása 0,5 bar (az injektálás alatt és a mérések első 1 percében ki volt kapcsolva); szárítógáz hőmérséklete 180 °C; szárítógáz áramlási sebessége 4 l/perc; kapilláris feszültség 4500 V, end plate offset 500 V.

Az elemzések végén nátrium-formiát kalibrálót juttattam a kapillárisba, mely lehetővé tette minden mérési fájl m/z tartományának belső kalibrációját. Az eredményeket a Compass DataAnalysis 4.4 (build: 200.55.2969, Bruker) szoftver segítségével értékeltem ki. A fehérjék beazonosításához Byonic keresőszoftvert használtam (ver.: 3.9.6, Protein Metrics, Cupertino, CA, USA). Ehhez először a DataAnalysis programban csúcslistát generáltam, amit MGF fájlként exportáltam. A keresőfelületen a következő paramétereket állítottam be: tripszines emésztés; maximálisan megengedett nem hasított kötések: 1; prekursorionok esetén 15 ppm toleranciát, termékionok esetén: 30 ppm toleranciát engedélyeztem; fix módosítás: Cys karbamidometilezés (ciszteinek jódacetamid származéka); lehetséges módosulás: deamidáció (Asn, Gln); Swissprot adatbázis.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 Enzimreaktor kialakítása PDMS mikrofluidikai csipben

Kihasználva a PDMS kiváló adszorptív tulajdonságát [68], a tripszint spontán adszorpcióval immobilizáltam [67]. Ez a lehető legegyszerűbb IMER típus, ugyanis nem igényel származékképzést, felületkezelést vagy hosszadalmas inkubációt az enzim immobilizálásához, csupán érintkezésbe kell hozni a PDMS felületét az enzimmoldattal. Az enzimreaktor OT (open-tubular) elrendezéséből fakadóan korlátozottabb a rendelkezésre álló felület, mint a másik két reaktortípus esetén (töltetes, ill. monolit), csak a mikrocatornák falán található tripszin. Az enzim-szubsztrát kölcsönhatások előfordulásának maximalizálása érdekében gyakran a csatorna fajlagos felületét tovább növelik utólagosan kialakított porózus membrán réteggel [89], falhoz rögzített nanostruktúrákkal [91] vagy LBL adszorpció esetén a rétegek által kiépített polielektrolit-hálózatokkal [71]. Ugyan figyelemre méltó hatékonyság érhető el ezekkel a rendszerekkel, egy többlépéses folyamat szükséges a kialakításukhoz.

Az enzimreaktor teljesítményét a csatorna geometriájának változtatásával is lehet hangolni. Többféle mintázatot terveztem, melyek nagy változatosságot mutatnak, de alapvetően kétféle struktúra volt a jellemző: szerpentinés ill. pilléreket tartalmazó csatornák (6. ábra), melyeknek célja egyrészt az áramlási dinamika befolyásolása, másrészt a fajlagos felület növelése.

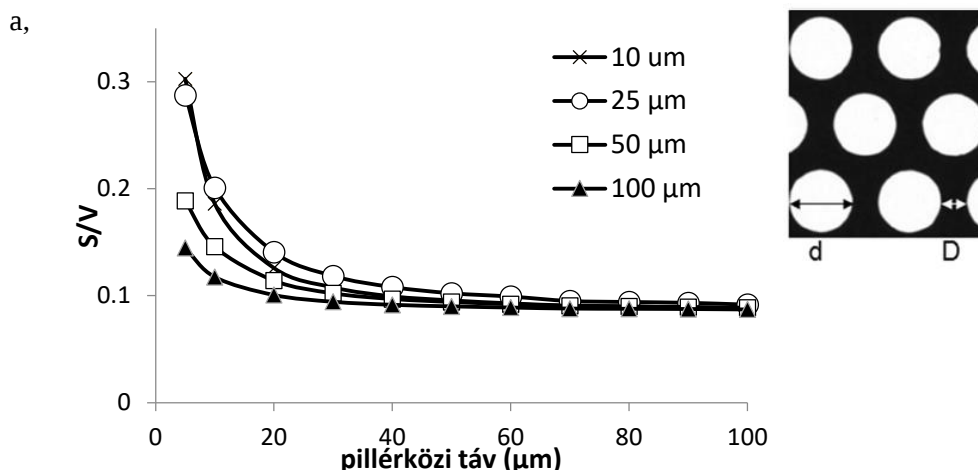
5.1.1 Fajlagos felület növelése

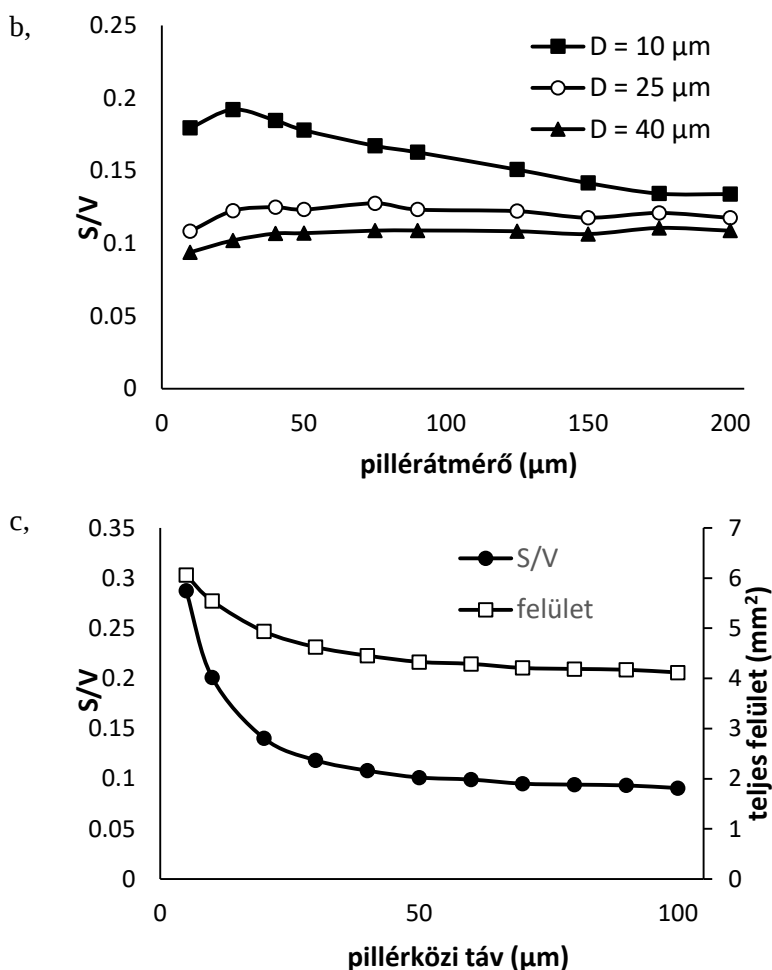
A fajlagos felület növelésének egyik módja az, ha különböző geometriai struktúrákat (pl.: pilléreket) integrálunk a mikrofluidikai csatornába. A pillérszerű szerkezettel rendelkező mikrocatornák kialakítása nem egy teljesen új koncepció, ilyen mikrocipeket már alkalmaznak az

elválasztástechnika területén. Az ún. μ PAC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eszközök olyan kereskedelmi forgalomban lévő mikrocsip-LC rendszerek, melyekben a pilléreket egy Si-lapkán alakították ki litográfiával és maratásos technikával. A mikrocsipben $5\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű pilléreket helyeztek el egymástól $2,5\text{ }\mu\text{m}$ távolságra. PDMS csipben is alakítottak ki hasáb alakú struktúrákat ($9,8\text{ }\mu\text{m} \times 9,8\text{ }\mu\text{m}$, távolság $5\text{ }\mu\text{m}$) tartalmazó csatornát, melyet kapilláris elektrokratográfiás (CEC) elemzésekhez használtak [125]. Elválasztástechnikai alkalmazásokon kívül, a pillérszerkezet előnyös tulajdonságát IMER rendszereknél is kihasználták már. Egy olyan kimotripsint-IMER-t tartalmazó pillérszerkezetű tiol-én mikrocsipet dolgoztak ki, ahol a pillérek átmérője $50\text{ }\mu\text{m}$ volt [91]. Ugyanúgy $50\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű pilléreket (ill. $50\text{ }\mu\text{m}$ pillérközi távot) alakítottak ki PMMA mikrocsipekben, melyet mikromaratás és forró dombornyomás technikákkal készítettek el [126]. A pillérek fajlagos felület-növelő hatása kimutatható volt a fent említett esetekben, és az is valószínűsíthető, hogy a miniaturizálás fokozása tovább növelhetné az IMER hatékonyságát.

Számításokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy a csatornák fajlagos felülete és teljes felülete hogyan alakul a pillérátmérő és pillérközi táv módosításával (6. ábra). Egy olyan mintázatot vettem alapul, melynél a magasság $\times$ hosszúság $\times$ szélesség = $25\text{ }\mu\text{m} \times 5000\text{ }\mu\text{m} \times 375\text{ }\mu\text{m}$. A pillérközi táv (D) és pillérátmérő (d) változtatásával eltérő számú pillér helyezhető el a csatornában. Látható, hogy amennyiben d vagy D nagyobb, mint $30\text{ }\mu\text{m}$, akkor nincs jelentős különbség a fajlagos felületben. A D értéket $30\text{ }\mu\text{m}$ alá csökkentve jelenik meg növekedés az S/V arányban, mely kisebb pillérátmérők esetében jelentősebb: ha $d = 100\text{ }\mu\text{m}$, akkor az S/V arány $\sim 1,5$ -szer, míg $d = 25\text{ }\mu\text{m}$ esetében $\sim 2,4$ -szer nagyobb, ha a pillérközi távot $30\text{ }\mu\text{m}$ -ról $5\text{ }\mu\text{m}$ -re csökkentjük. Azonban, ha a pillérátmérőt tovább csökkentjük $d = 10\text{ }\mu\text{m}$

értékre, számottevő különbséget nem lehet tapasztalni ahhoz a rendszerhez képest, ahol $d = 25 \mu\text{m}$. Meglepőnek tűnhet, hogy rögzített D érték mellett alig változott az S/V a pillérátmérő csökkentésével (6.b ábra), mely a vizsgált esetek közül különösen a viszonylag nagyobb pillérközi távoknál igaz ($D = 25 \mu\text{m}$; $40 \mu\text{m}$). Ennek a magyarázata az, hogy ugyan több pillér férhet el adott térrészben (és ezzel a teljes felület is nőhet) amennyiben azonban csökken a pillérek átmérője, azzal a csatorna térfogata is nő, mivel összességében kisebb a pillérek által kitöltött tér. Minél nagyobb a pillérek átmérője, annál kevésbé van hatása a pillérközi táv változtatásának. Adott pillérátmérő esetében ($d = 25 \mu\text{m}$) a teljes felület a S/V aránynál kisebb mértékben függ a D értékétől, mely azt jelzi, hogy D változtatása a csatorna térfogatra jelentősebben hat, mint a teljes felületre (6.c ábra).





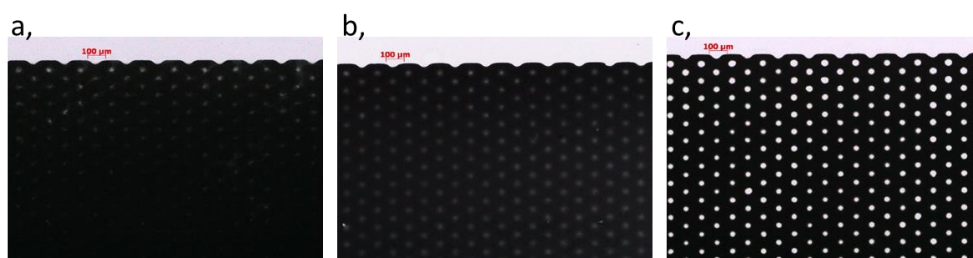
6. ábra: A felület/térfogat arány (S/V) függése (a) a pillérközi távolságtól és (b) pillérátmérőtől (magasság $\times$ hosszúság $\times$ szélesség = $25 \mu\text{m} \times 5000 \mu\text{m} \times 375 \mu\text{m}$); (c) a felület/térfogat arány és a teljes felület függése a pillérek közti távolságtól ($d = 25 \mu\text{m}$) [127*].

A fajlagos felület maximalizálása érdekében tehát érdemes egy olyan pillérrendszert kialakítani, melyben minél sűrűbben helyezkednek el a pillérek. Az általunk alkalmazott lágy litográfias módszernek megvannak a korlátai az elérhető felbontás tekintetében. A miniaturizálás határának feltérképezésére egy olyan litográfias maszkot terveztünk, melyen a csatorna változó átmérőjű pilléreket tartalmaz a $7,5\text{-}500 \mu\text{m}$ tartományban. Először a 4.2 fejezetben be-

mutatott kísérleti körülményeknek megfelelően próbáltam elkészíteni a pilléres mintázatot a mikrocshipen. PDMS mikrocshipet rutinszerűen készítünk ezekkel a paraméterekkel, amik azonban a pillérek esetében nem bizonyultak megfelelőnek, ugyanis $d < 100 \mu\text{m}$ pillérátmérőnél kisebb struktúrák nem jelentek meg megfelelően az öntőformán. A fentebb részletezett számítások alapján egyértelműen látszik, hogy ennél jóval kisebb pillérek szükségesek a fajlagos felület növeléséhez.

Az öntőforma kialakításánál az egyik legkritikusabb lépés az, amikor a fényérzékeny réteget UV fénnel sugározzuk be a litográfias maszkon keresztül (5.b ábra). Ehhez gyakran használnak fotomaszk-illesztő berendezéseket [128, 129], melyek segítenek a fénysugarak párhuzamosításában, így a szórt fény zavaró hatása jobban kiküszöbölhető. Ezek a berendezések meglehetősen drágák, így ennek hiányában a besugárzás egyéb paramétereit (maszk helyzete, időtartam, távolság a fényforrás és Si-lapka között) kellett módosítani, hogy a fénysugarak minél inkább párhuzamosan és a maszk síkjára merőlegesen érkezzenek a fényérzékeny rétegre. Fontos megjegyezni, hogy a $125 \mu\text{m}$ átmérő pillérek kialakítása csak akkor volt sikeres, amikor a besugárzás során a fotomaszkot nyomtatott oldalával lefelé helyeztem a fényérzékeny réteget tartalmazó Si-lapkára. A fotomaszk úgy készül, hogy egy átlátszó fólia egyik oldalára nyomtatják a mintázatot, tehát magának a maszknak is van egy vastagsága. Amennyiben a nyomtatott oldal felfelé néz besugárzás közben, úgy nagyobb a távolság a mintázat és a fényérzékeny réteg között, aminek az a következménye, hogy a fénysugár kevésbé fókuszált mire a fotoreziszthez ér. Ezt követően a besugárzás időtartamának hatását vizsgáltam meg (7. ábra). Az időtartamot csökkentve egyre láthatóbbá váltak a $60 \mu\text{m}$ átmérőjű pillérek; 2 perces besugárzásnál jól definiált mintázatot kaptam (7.c ábra). A PDMS csipek mikroszkópos felvételén az látszik, hogy hosszabb megvilágításoknál a pillérek nem töltik ki a csatorna teljes magasságát, aminek oka feltehetően az,

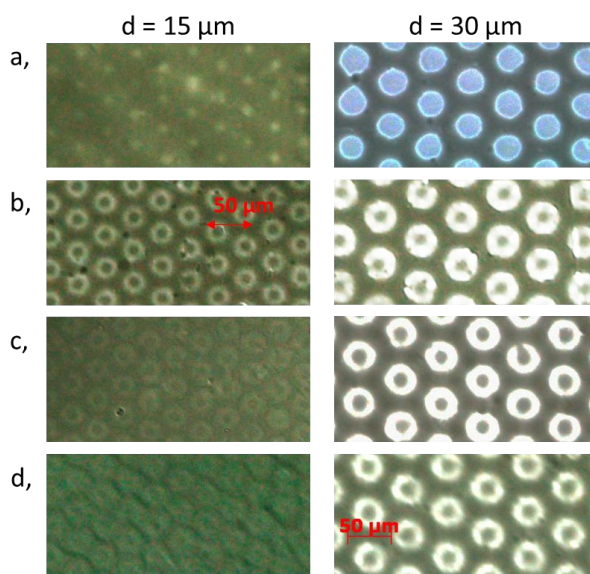
hogy nagyobb mennyiségű szórt fény került a fényérzékeny rétegre. Továbbá, a fotoreziszt és a maszk közötti légrésben a fény elhajlik, aminek eredményeként az eredetileg leárnyékolt területeket is érhet besugárzás. A besugárzási idő további csökkentése esetén az egész mintázat leoldódik a Si-lapkáról az előhívószerrel való öblítésnél, mivel a fényérzékeny réteget nem éri megfelelő dózisu sugárzás.



7. ábra: Mikroszkóppal készített képek az elkészített mikrocsipek fekete ételfestékkel megtöltött csatornáiról ($d = 60 \mu\text{m}$). Az öntőforma kialakításánál alkalmazott besugárzási időtartam (a) 4 perc, (b) 3 perc és (c) 2 perc.

Az eddigiek alapján a két perces besugárzás 70 cm távolságról bizonyult optimálisnak. A következőkben azt vizsgáltam meg, hogy milyen hatása van a fényforrás és a Si-lapka közötti távolság növelésének, melynek alapvető célja a fénysugarak párhuzamosítása volt. Annak érdekében, hogy elegendő mennyiségű sugárzás érje a fényérzékeny réteget, a távolsággal négyzetes arányban növeltem a besugárzás időtartamát (140 cm távolságnál 8 perces besugárzás). Kísérleteim során egészen 3 m-ig növeltem a távolságot. 140 cm távolság alkalmazásánál sikerült $30 \mu\text{m}$ átmérőjű pillérek kialakítani a mikrocsipeken. 210 cm távolság esetében az öntőformán jól kivehetően megjelentek a $15 \mu\text{m}$ átmérőjű pillérek is, azonban a mintázat PDMS csipekben való kialakítása már kevesebb sikerrel járt, a pillérek körvonala kissé elmosódott, ill. a magasságuk kisebb a csatorna magasságához viszonyítva (8. ábra). A 8. ábrán feltüntetett pillérek többsége szemmel láthatóan nagyobb az eredetileg tervezett átmérőnél, melynek oka a Fresnel-elhajlás jelenségében

keresendő [130]. Ez a fotomaszk és fényérzékeny réteg közötti légrés (pontosabban a levegő és a fényérzékeny réteg (SU-8) közötti törésmutatókülönbség) miatt jelentkezik. Ilyenkor a pillérek szélei nagyobb energiát kapnak és így azok körvonalai megduzzadnak. Ez a jelenség minimalizálható ún. törésmutató-illesztő anyagokkal (pl. glicerín [130]), munkám során azonban nem tapasztaltam jelentős javulást amikor glicerint helyeztem a fotoreziszt és fotomaszk közé.

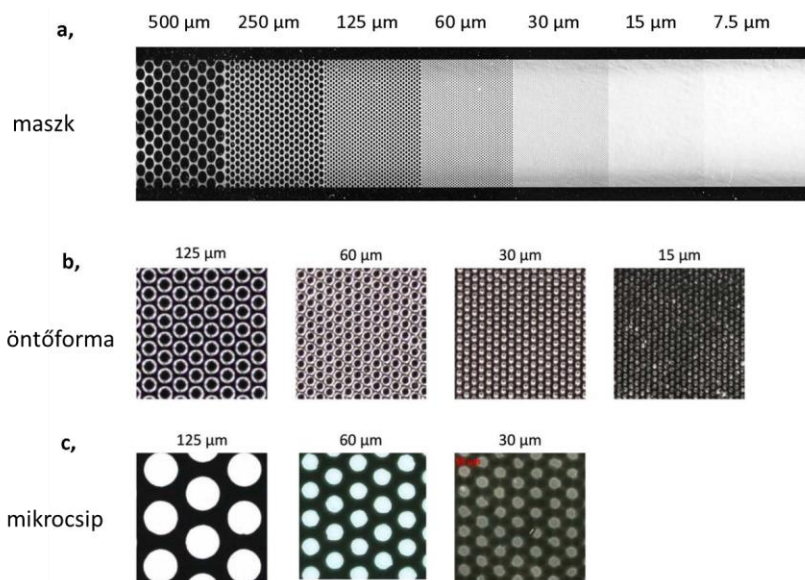


8. ábra: 15 és 30 μm átmérőjű pilléreket tartalmazó csatornák mikroszkópos képei. Besugárzási távolságok: (a) 140 cm; (b) 210 cm; (c) 260 cm és (d) 300 cm.

Az öntőformán kialakított mintázatról történő másolatok készítésekor is vannak kihívások, melyek főleg a PDMS hidrofób jellegéből fakadnak. Mivel az öntőforma felülete hidrofil, ezért előfordulhat, hogy a PDMS nem illeszkedik megfelelően a felületen található mintázathoz, különösen a pillérek helyén lévő szűk üregekhez. Ilyen esetben javasolt az öntőforma SDS oldattal való felületkezelése, melynek hatására annak felülete hidrofóbbá tehető, és így a PDMS jobban be tud hatolni a szűk üregekbe [125]. Kísérleteimben azonban

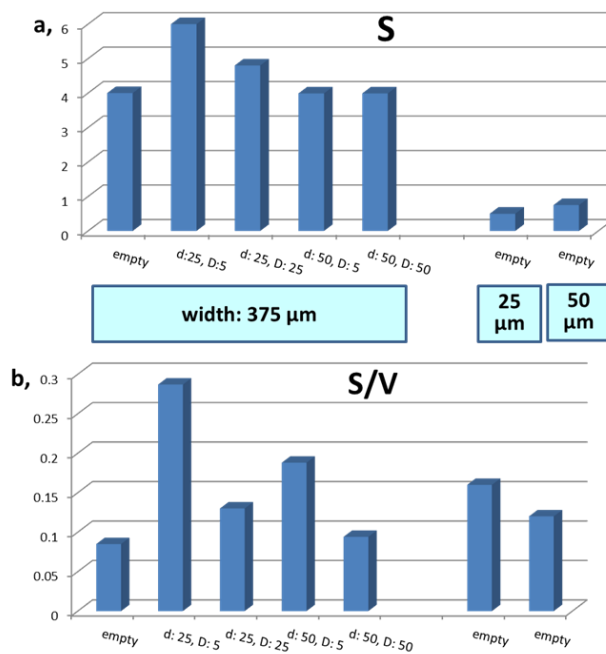
nem eredményezett egyértelmű javulást az öntőforma SDS oldattal való kezelése, így a továbbiakban nem alkalmaztam. A mikrocsipek készítésénél problémákat okozhat a PDMS rugalmassága. A megszilárdult PDMS öntőformáról történő lehúzása közben nagyon megnyúlhatnak az üregekben elhelyezkedő PDMS pillérek, bizonyos esetekben el is szakadhatnak. A PDMS pillérek megnyúlása azok összegabalyodásához is vezethet amikor megnyúlt állapotukból eredeti magasságukba térnek vissza, ami ugyancsak hibás csatornaszerkezetet eredményez [131]. A PDMS:térhálósító arányát változtatva hangolható a PDMS rugalmassága, mely segíthet ilyen hibák kiküszöbölésében, azonban az erre irányuló kísérletsorozat sem vezetett jobb eredményhez.

Mindezek arra engedtek következtetni, hogy az általunk alkalmazott lágy litográfiás módszerrel a miniatürizálás határa $\sim 25\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$ (d és D). Az öntőformán ugyan kialakíthatóak $15\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű pillérek, azonban azok PDMS mikrocsipen nem jelennek meg megfelelően (9. ábra). A szűk keresztmetszet feltehetően inkább a fotolitográfiás lépés, amellyel az öntőformát elkészítem, ugyanis a fény szóródása nem küszöbölhető ki teljesen átlagos felszereltségű laboratóriumi körülmények között.

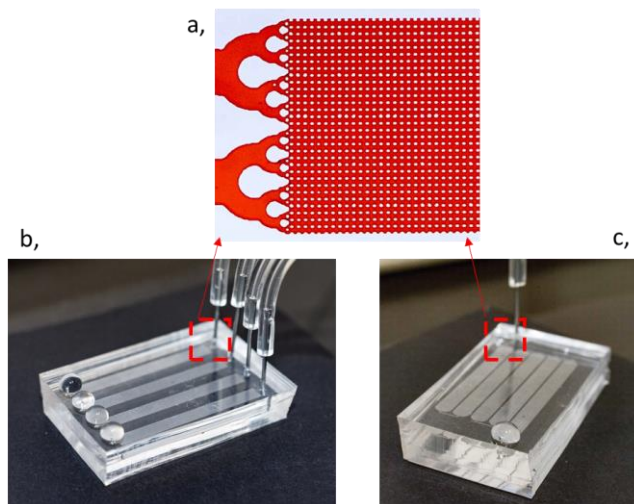


9. ábra: (a) a litográfias maszkról készült kép, melyen a csökkenő átmérőjű pilléreket tartalmazó csatorna található, (b) a kialakított öntőforma releváns részeinek kinagyított képe és (c) az öntőforma felhasználásával készített mikrocsip mikroszkópos képei [127*].

Az általunk elérhető miniaturizálással kialakított pilléres szerkezetű csatorna S/V és teljes felülete $\sim 30\%$ -al nő egy ugyanolyan szélességű ($375 \mu\text{m}$) „üres” csatornához képest (10. ábra). Ha $d = 25 \mu\text{m}$, látható, hogy a D értéket $25 \mu\text{m}$ -ról $5 \mu\text{m}$ -re csökkentve a csatorna teljes felülete $\sim 30\%$ -al, míg a S/V arány egy közel 2-szeres faktorral növekszik. A pillérközi táv ilyen szintű miniaturizálása ($D = 5 \mu\text{m}$) csupán speciális tisztaszobában, drága műszerezettséggel valósítható meg. Amennyiben az a szintű S/V növelés nem lenne elegendő, amit a lágy litográfias módszerünkkel el lehet érni, érdemes a fehérjeminta tartózkodás idejét meghosszabbítani a reaktorban az áramoltatási sebesség csökkentésével vagy a csatorna hosszának növelésével (11. ábra).



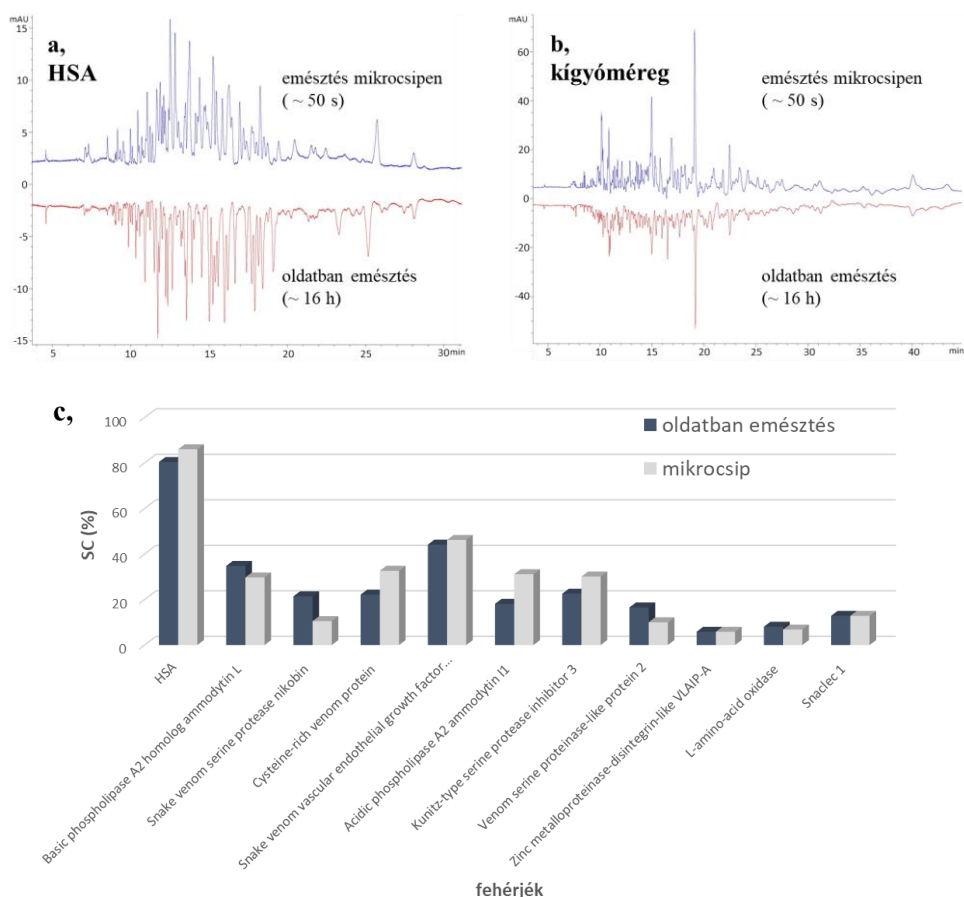
10. ábra: Üres, ill. pillérekot tartalmazó csatornák (a) teljes felülete és (b) S/V aránya (d : pillérátmérő, D : pillérközi táv) [127*].



11. ábra: (a) Az elkészített PDMS mikrocshipok piros ételfestéssel megtöltött csatornájának kinagyított képe ($d = 40 \mu\text{m}$; $D = 40 \mu\text{m}$), (b) 4 különálló csatornát tartalmazó PDMS mikrocship (2,2 mm széles, 22 mm hosszú) és (c) 1 csatornát tartalmazó PDMS mikrocship (2,2 mm széles, 110 mm hosszú).

A pilléres mikrocseppekben kialakított IMER hatékonyságát HSA minta emésztésével teszteltem. Viszonylag nagy méretének (~66,5 kDa) és a diszulfid-hidak gyakori előfordulásának (17 db S-S kötés) köszönhetően a HSA gyakran használt fehérje IMER eszközök hatékonyságának feltérképezésére. A 11.c ábrán feltüntetett IMER (L = 110 mm) alkalmazásával emésztett HSA CE-UV peptidtérképét a hagyományos oldatban való emésztéssel kapott minta peptidtérképével összevetve nagyfokú egyezés tapasztalható (12.a ábra). A csúcsmintázatban nem látható emésztetlen fehérjére utaló jel (széles, elnyúló csúcs), a csúcsok száma közelít az elméletileg várt peptidek (79) számához. Az IMER-ek alkalmazhatóságának bizonyítását sokszor valós minták emésztésével is elvégzik. Valós mintaként kígyómérget (*Vipera ammodytes ammodytes*) használtam. A kígyóméreg egy rendkívül komplex biológiai minta, mely akár 95 % fehérjetartalommal is rendelkezhet (szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva) [132]. A fehérjetartalom jelentős részét olyan enzimek teszik ki, amelyek a patológiás hatásokért felelősek [133]. Az IMER-alapú és oldatban emésztéssel kapott peptidelegyek CE elemzése ebben az esetben is egymással jól egyező peptidtérképeket eredményezett (12.b ábra). MS/MS elemzés segítségével információt nyertünk a fehérjeminták emésztésével kapott és elválasztott peptidek összetételéről, ill. ezen keresztül a kígyóméreg fehérje-összetételéről. A HSA és a kígyóméregben talált fehérjék szekvencia lefedettségei (SC%) is jó egyezést, 10%-nál kisebb eltérést mutatnak (12. c ábra). A kígyóméreg mintákban ~ 50 fehérjét sikerült beazonosítani a CE-MS/MS módszerünkkel, ezek közül csak azokat tüntettem fel, melyek legalább két egyedi peptid alapján kerültek beazonosításra és melyek Byonic pontszáma egy bizonyos határérték felett vannak. A Byonic pontszám a kísérletileg kapott tömegspektrum és egy lehetséges peptid elméleti spektruma közötti hasonlóságáról ad információt. Minél nagyobb ez az érték, annál nagyobb biztonsággal állítható, hogy a találat

helyes. Általánosságban a 300-as pontszám jó egyezést jelent [134], azonban a küszöbérték megválasztása függ a keresési paraméterektől ill. az analizált mintától is. Egyedi megfontolások alapján a kiértékelés során azokat a peptidtalálatokat fogadtuk el, melyek Byonic pontszáma legalább 200.



12. ábra: Mikrocsipen történő és oldatban emésztéssel kapott (a) HSA és (b) kigyóméreg minta CE-UV peptidtérképei; (c) a fehérjék szekvencia lefedettségének összehasonlítása. Mindkét minta esetében a 11.c ábrán feltüntetett mikrocsippel végeztem az emésztéseket [127*].

A kifejlesztett mikrocsippel történő emésztések reprodukálhatóságának vizsgálata során három különböző emésztést végeztem el ugyanazon csatorna felhasználásával, az egyes emésztések között

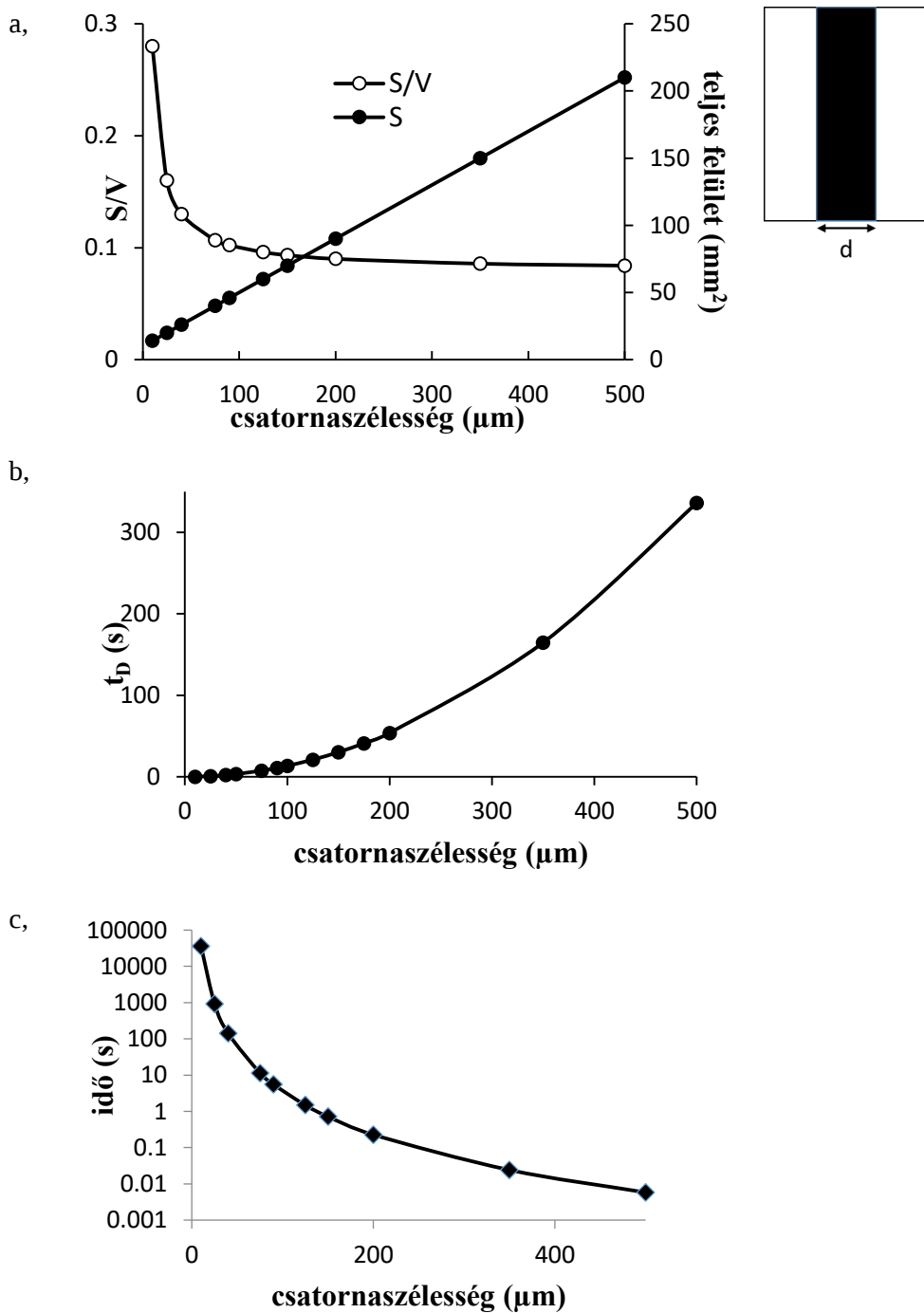
regenerálva az IMER-t. Az RSD értékek két véletlenszerűen választott csúcs esetén 0,31 és 0,44 % migrációs időre; ill. 34,3 és 18,4 % csúcsterületre vonatkozóan. A csúcsterület értékek esetén megmutatkozó nagyobb szórás oka az lehet, hogy bizonyos peptidek eltérő koncentrációban keletkeztek az emésztések során, mely főleg arra vezethető vissza, hogy a regenerált tripszínrétegek lefedettségében lehetnek különbségek. Ugyanazon emésztett minta többszöri elemzésével vizsgáltam a CZE módszer ismételtetését. Migrációs időkre az előzőhöz hasonló eredményeket kaptunk, csúcsterületek esetén azonban jóval kisebb ($RSD < 10\%$) értékek voltak jellemzőek. A migrációs idők ilyen kis mértékű szórása annak (is) köszönhető, hogy az elektroferogramokat két referencia csúcs alapján korrigáltam.

5.1.2 Csatorna-geometria hatásának vizsgálata

Az IMER-ek hatékonyságát általánosságban leginkább a csatorna fajlagos felülete és az enzim-szubsztrát interakciók gyakorisága szabják meg. Az előző fejezetben láthattuk, hogy egy OT elrendezésű IMER fajlagos felületét jelentősen meg lehet növelni, ha lágy litográfiás megmunkálással pilléreket alakítunk ki a csatornában. Ugyanilyen mértékű növekedést tapasztalhatunk a fajlagos felületben, ha egy üres (pilléreket nem tartalmazó) mikrocsatorna szélességét drasztikusan csökkentjük. A 10.b ábrán látható, hogy ha a csatornaszélességet $375\text{ }\mu\text{m}$ -ről $25\text{ }\mu\text{m}$ -re csökkentjük, akkor a pilléres mikrocsatorna ($d = 25\text{ }\mu\text{m}$; $D = 25\text{ }\mu\text{m}$) által elérhető S/V arányt is felül lehet múlni kis mértékben.

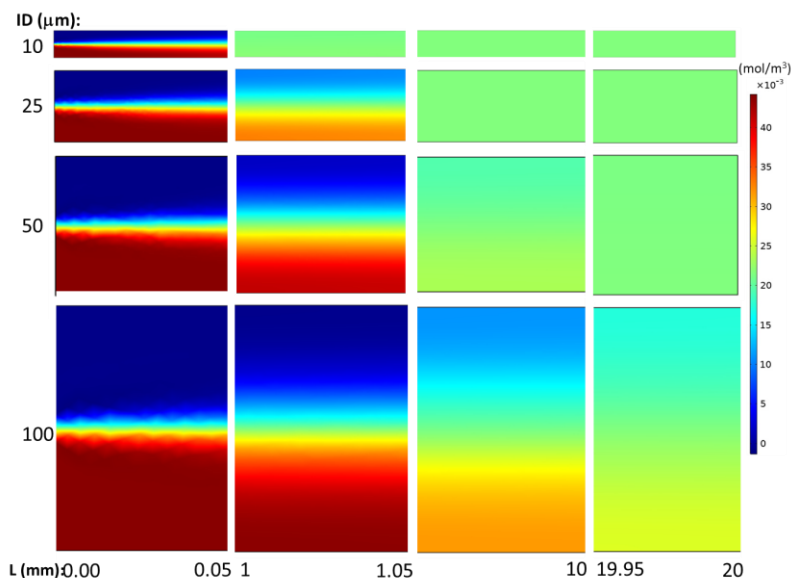
A csatorna szélességének növelésével a teljes felület egyre nagyobb, a fajlagos felület azonban csökken, legnagyobb mértékben a $10\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ tartományban (13.a ábra). Mikrofluidikai rendszerekben az áramlás erősen lamináris (Reynolds-szám (Re) < 1), az áramvonalak nem keresztezik egymást, így a komponensek radiális vándorlása szinte csak diffúzióval lehetséges. „Üres” mikrocsatornából álló enzimreaktoroknál csupán a csatorna belső

felületein található immobilizált enzim, így könnyen belátható, hogy a komponenseknek az áramoltatásuk során hosszabb utat kell megtenniük szélesebb csatornák esetén ahhoz, hogy enzimmolekulákkal találkozzanak. Kis méretű szubsztrátoknál ez nem okoz gondot, hiszen azok radiális (diffúziós) mozgása viszonylag gyors, proteolitikus enzimreaktoroknál azonban a szubsztrátok fehérjék, melyek diffúziós együtthatója kicsi (albumin esetén $6,1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), így a csatorna szélességének nagy jelentősége van a reaktor hatékony működése szempontjából. Az albumin példáján keresztül bemutatva, egy $100 \text{ }\mu\text{m}$ széles csatornában 20 s szükséges ahhoz, hogy egy molekula a csatorna közepétől diffúzióval eljusson a csatorna faláig, míg a diffúziós idő (t_D) csupán $\sim 1 \text{ s}$, ha a szélességet $25 \text{ }\mu\text{m}$ -re csökkentjük (13.b ábra). Ha a fehérjeoldatot a diffúziós időnél kevesebb idő alatt áramoltatjuk át a csatornán, akkor a fehérjemolekulák egy része nem emésztődik meg, mivel nincs idejük kölcsönhatásba lépni a falhoz rögzített tripszinnel. Keskenyebb csatornák alkalmazása tehát hatékonyabb emésztéseket biztosíthat adott kontaktidő alatt. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy az ilyen keskeny csatornában jelentős ellennyomás lép fel, mely a csatorna szélességének negyedik hatványával arányos. A CE-MS elemzésekhez szükségünk van legalább $10 \text{ }\mu\text{l}$ mintatérfogatra. Egy 20 cm hosszú reaktorban $10 \text{ }\mu\text{l}$ minta átáramoltatásához szükséges idő több mint 10 óra egy $10 \text{ }\mu\text{m}$ széles csatornában, ugyanez a folyamat viszont csupán $\sim 15 \text{ perc}$, ha a csatorna szélessége $25 \text{ }\mu\text{m}$ ($p = 2 \text{ bar}$, ami a PDMS mikrocip nyomástűrésének határa). A számítások alapján az körvonalazódott, hogy céljainkhoz az optimális csatornaszélesség $25\text{-}75 \text{ }\mu\text{m}$.



13. ábra: Üres (pilléreket nem tartalmazó) mikrocatornák enzímreaktor szempontjából fontos paraméterei: (a) S/V arány, ill. teljes felület; (b) diffúziós idő és (c) $10 \mu\text{l}$ folyadék átáramoltatásához szükséges idő a csatornaszélesség függvényében (d = csatornaszélesség) [135*].

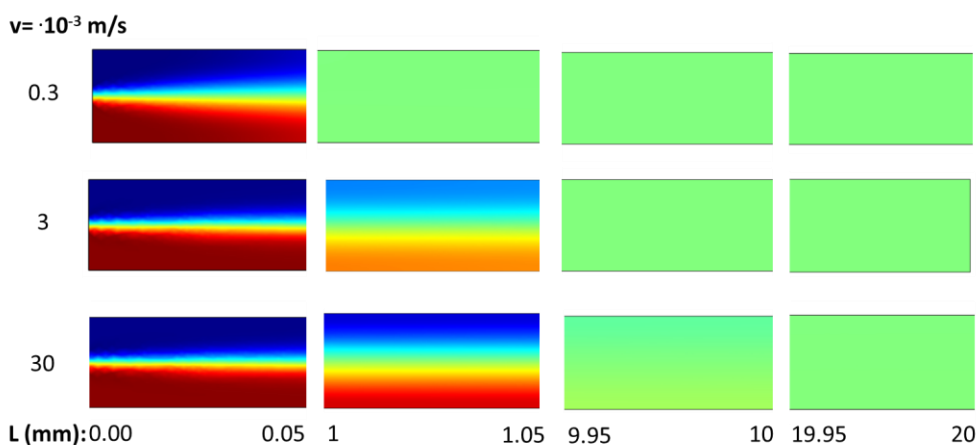
Az IMER hatékonyságát ilyen típusú reaktoroknál alapvetően a szubsztrát diffúziója befolyásolja, melynek érvényesülését COMSOL szimulációs szoftverrel tanulmányoztuk. A szimulációknál vizet és fehérjeoldatot ($c = 43 \mu\text{M}$) juttattunk a csatornába a bemeneti porton keresztül 1:1 arányban, két párhuzamos áramként, azonos áramlási sebességgel. Először azt vizsgáltuk, hogy eltérő csatornaszélességek esetén (ID: 10; 25; 50 és $100 \mu\text{m}$) hogyan változik a koncentráció-eloszlás a csatorna keresztmetszetében (14. ábra). Négy metszeti képet kinagyítottam különböző hosszúságoknál (0,005; 1; 9,95 és 19,95 mm), melyek alapján megállapítható, hogy míg ID = $10 \mu\text{m}$ esetén már 1 mm csatornahossznál homogén a koncentráció-eloszlás, addig ID = $100 \mu\text{m}$ esetében a csatorna legvégére (20 mm) sem történik meg a folyadékáramok teljes keveredése (tehát a fehérjemolekulák egy része nem jut a csatorna falához). A 13. ábra alapján optimálisnak ítélt 25 és $50 \mu\text{m}$ széles csatornában is homogén eloszlás látható 20 mm hosszúságnál. Az F-1. ábrán az egyes metszetekhez tartozó koncentráció-eloszlás értékeket is feltüntettük.



14. ábra: A koncentráció-eloszlás megváltozását mutató COMSOL szimulációk különböző csatornaátmérők (ID) esetén: 10; 25; 50; 100 μm . A bemeneti portnál vizet és albuminoldatot ($c = 43 \mu\text{M}$) juttattunk be 1:1 arányban. A metszeti képek 50 μm hosszú szakaszokat mutatnak, a lenti sávban feltüntetett értékek a csatorna bemeneti pontjától számított távolságot jelzik (L : 2 cm; $D_{\text{albumin}} = 6,1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$; v : $3 \times 10^{-3} \text{ m/s}$) [135*].

A csatornában áramló folyadékok sebessége is befolyásolja a komponensek keveredését, melyet egy 25 μm átmérőjű csatorna esetére szemléltetnek (15. ábra, F-2. ábra). Az áramlási sebességet a 0,3 – 30 mm/s tartományban változtatva (Re : 0,0084–0,84) jelentős eltérés tapasztalható a koncentráció-profilokban. A legkisebb áramlási sebességet alkalmazva már a csatorna kezdeti 1 mm-es szakaszán belül megtörténik a teljes keveredése a komponenseknek. A sebességet egy nagyságrenddel növelve homogén koncentrációs-eloszlást 10 mm hosszúságnál kaphatunk. A vizsgált leggyorsabb áramlás esetén (30 mm/s) is homogénnek tűnik a végső koncentráció-profil ($L = 20 \text{ mm}$) (F-2. ábra). Diffúzió szempontjából tehát előnyösebb kisebb áramlási sebesség mellett dolgozni, ugyanis a komponensek radiális mozgása ilyen esetekben kevésbé korlátozott. Ugyanakkor, a rendkívül lassú áramlás gyakorlati megvalósítása nehézkes

lehet; 0,3 mm/s lineáris sebesség a 25 μm átmérőjű csatornában 0,009 $\mu\text{l}/\text{perc}$ térfogati áramlási sebességnek felel meg, mely jóval kisebb annál a minimális értéknél, melyet a perisztaltikus pumpák általában biztosítani tudnak ($\sim 0,2 \mu\text{l}/\text{perc}$). A nagyobb áramlási sebességeknél fellépő korlátozott falmegközelítés könnyen kompenzálható a csatorna hosszának növelésével.



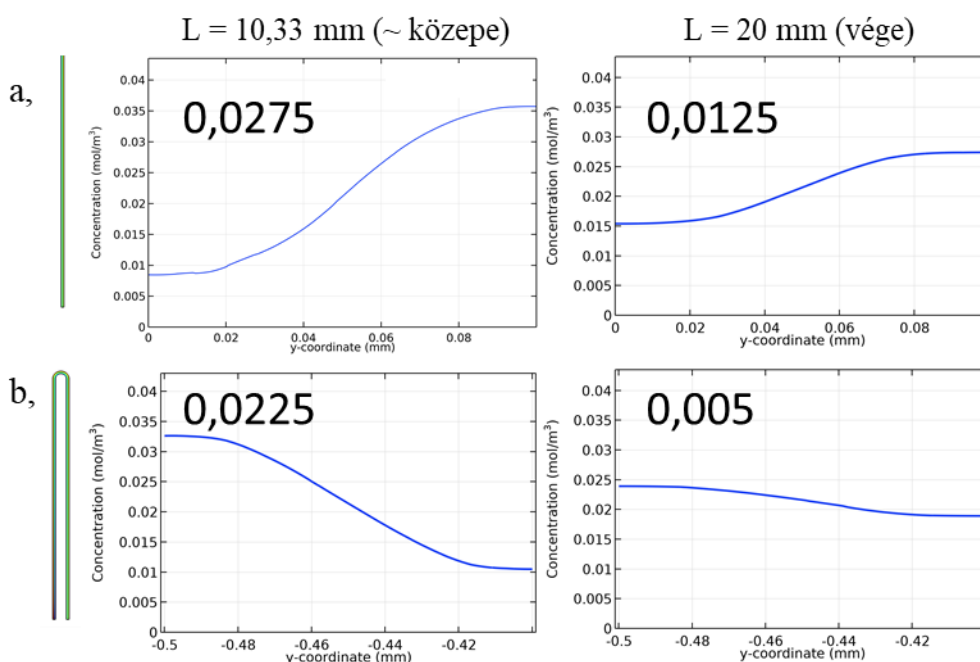
15. ábra: Az áramlási sebesség hatását bemutató COMSOL szimulációk ($ID = 25 \mu\text{m}$; minden egyéb paraméter megegyezik a 14. ábránál leírtakkal.). Az egyes sorokhoz tartozó metszeti képek az egyre növekvő áramlási sebességekhez tartoznak [135*].

Ugyan a mikrofluidikai csatornában lamináris az áramlás (a folyadékrétegek párhuzamosan haladnak), aktív vagy passzív keverőelemek alkalmazásával elérhető a folyadékok keveredése [136]. Az aktív keverők valamilyen külső energiaforrást igényelnek (pl.: elektromos, mágneses vagy akusztikus tér) és mikrofluidikai rendszerekbe való integrálásuk egy bonyolultabb feladat, mint passzív keverők esetében, ahol egyszerűen a csatornába épített geometriai struktúrákkal idézhető elő az elegyedés [137-139]. Passzív keverőelemek közé tartozik pl.: a halszálla-keverő [140], vagy a kígyókeverő [141], melyek egy másodlagos folyadékáramot generálva növelik a diffúziós felületet. Kígyókeverők esetében a csatorna kanyarulatokat tartalmaz, melyek megfelelően nagy áramlási sebesség mellett ún. Dean-örvényeket hoznak létre. Ilyenkor a csatorna középső részén áramló folyadékra

nagyobb centrifugális-erő hat, mint a környező folyadékra, mely két, ellentétes irányba forgó, szimmetrikus örvényt alakít ki, helyi turbulenciát okozva. Alacsony áramlási sebességeknél még nem elég erőteljes a centrifugális hatás ahhoz, hogy lamináris áramlást megzavarja. Kimutatták, hogy a Dean-hatás leginkább olyan rendszereknél jelentős, ahol $Re > 10$ [142]. A szakirodalomban nincs egyetértés arra vonatkozóan, hogy a kanyarulatoknak milyen mértékben hangsúlyos a keveredés elősegítésében betöltött szerepük, egyesek szerint jelentősen megzavarják a folyadékáramlás eredeti irányát [142, 143], mások azonban azt tapasztalták, hogy nincs komoly hatásuk az áramlási profilra [142, 144]. Ezek alapján az OT elrendezésű proteolitikus enzimreaktorok esetén tehát leginkább két tényező befolyásolhatja az emésztés hatékonyságát: a szubsztrát diffúziója, ill. passzív keveredést előidéző csatorna-geometriák. Kis áramlási sebességek alkalmazása kedvez a komponensek diffúziójának (15. ábra), ill. így a kontaktidő is nagyobb (a szubsztrát több időt tölt a reaktorban), azonban a Dean-örvények kialakulása ilyen esetekben korlátozottabb. Emiatt kérdéses volt, hogy a mi rendszerünkben ($Re < 1$) van-e bármilyen előnye annak, ha szerpentin alakú csatornákat alkalmazunk.

A kanyarulatok hatásának tanulmányozása során először egy olyan esetet vizsgáltunk, melynél a csatorna ($L = 20$ mm; $ID = 100$ μ m) fele hosszúságánál 180° -os szögben meg van hajlítva (F-3. ábra, 16. ábra). A kanyarulatnál három ponton rögzítettünk metszeti képeket a koncentrációeloszlásról (a kanyar előtt, után és közepén), melyek között szemmel látható különbség nincs, viszont a diagramok alapján számított eloszlásértékek enyhe eltérést mutattak: a koncentráció-különbség a kanyar előtti 0,026 mM-ról 0,0225 mM-ra csökken. Ez ugyan nem tűnik drasztikus változásnak, azonban a csatorna egyenes szakaszához képest az egységnyi hosszúságra vonatkoztatott elegyedés mértéke közel háromszorosára nőtt. Hasonló következtetések vonhatóak le a 16. ábráról, ahol a kanyar utáni

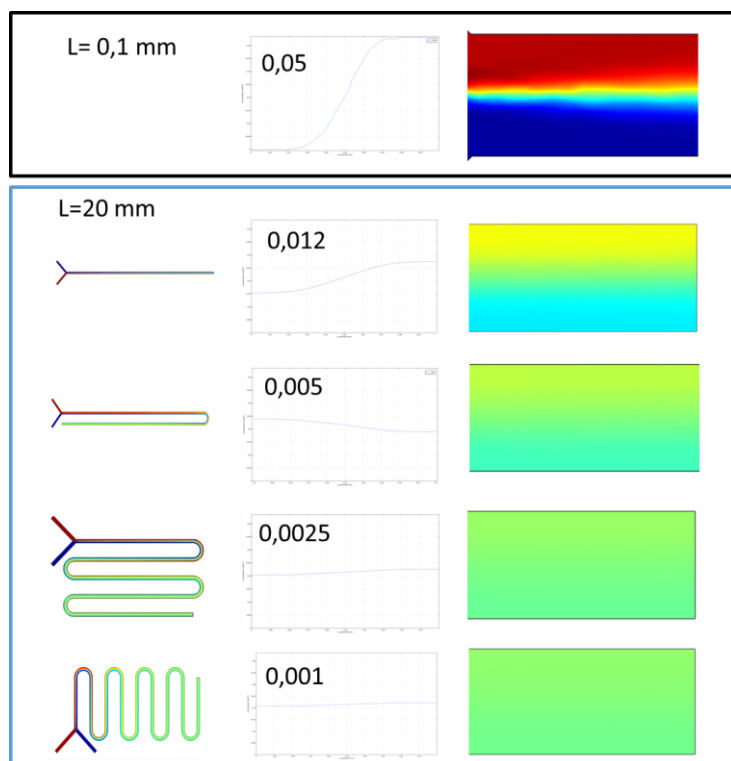
pozícióknak megfelelő hosszánál ($L = 10,33 \text{ mm}$) lévő, ill. a csatorna végénél (20 mm) kialakuló koncentráció-profilokat hasonlítottuk össze egy egyenes és egy meghajlított csatorna esetében. Már közvetlenül a kanyarulat utáni pozícióban is észrevehető a csatorna két oldala közötti koncentráció-különbség enyhe csökkenése, a csatorna legvégére pedig kevesebb, mint felére mérséklődik a koncentráció-különbség az egyenes csatornához képest.



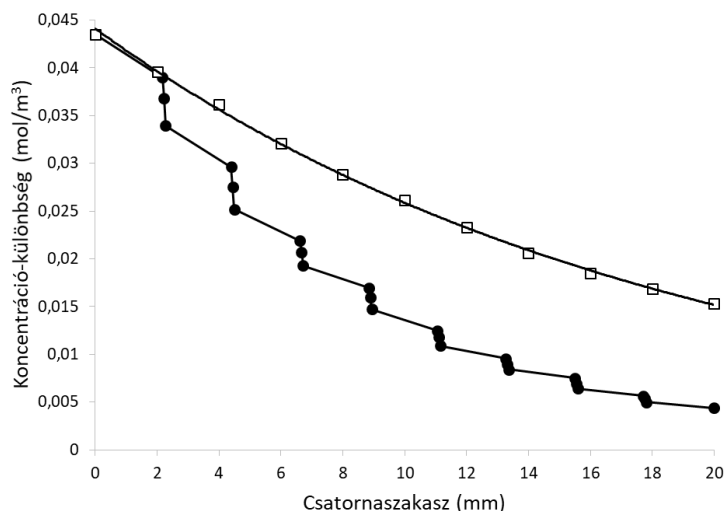
16. ábra: Az elegyedés szemléltetése egy (a) egyenes és (b) egy kanyarulatot tartalmazó mikrofluidikai csatornában ($L = 20 \text{ mm}$, $ID = 100 \mu\text{m}$). A diagramok a koncentráció változását mutatják a csatorna keresztmetszete mentén, a feltüntetett értékek (mM) a csatorna két oldala között kialakult koncentráció-különbségeket jelzik az adott pozícióban [135*].

Mivel a görbület - ha csak kis mértékben is – előnyösen hat a keveredésre, érdemes olyan rendszereket használni, melyek csatornája több ilyen struktúrát tartalmaz. Megvizsgáltuk azt, hogy a növekvő számú (0; 1; 4 és 8) kanyar esetén hogyan változik meg a koncentrációprofil a csatorna legvégére (17. ábra). A kanyarulatok számának növekedésével egyre

homogénebb a végső koncentrációeloszlás, 8 kanyarulat esetén szinte teljes (~97 %) a keveredés (ezzel szemben az egyenes csatornában ez az érték ~72 %). A 18. ábrán az egyenes és 8 kanyarulatot tartalmazó szerpentines csatornák koncentráció-eloszlásának változását hasonlítottuk össze a csatorna teljes hosszában. A csatorna különböző szakaszain elhelyezett görbületek által indukált keveredés egyre kisebb mértékű a csatorna hosszának növekedésével. A legnagyobb hozzájárulása az első kanyarulatnak van, míg az utolsó kanyar keveredésre gyakorolt hatása csupán 10 % az elsőhöz képest. Az ábrán látható töréspontok a kanyarulatok pozícióinak felelnek meg, a csatorna ezen részein a koncentráció-változás jelentősebb, mint az egyenes csatorna esetén.

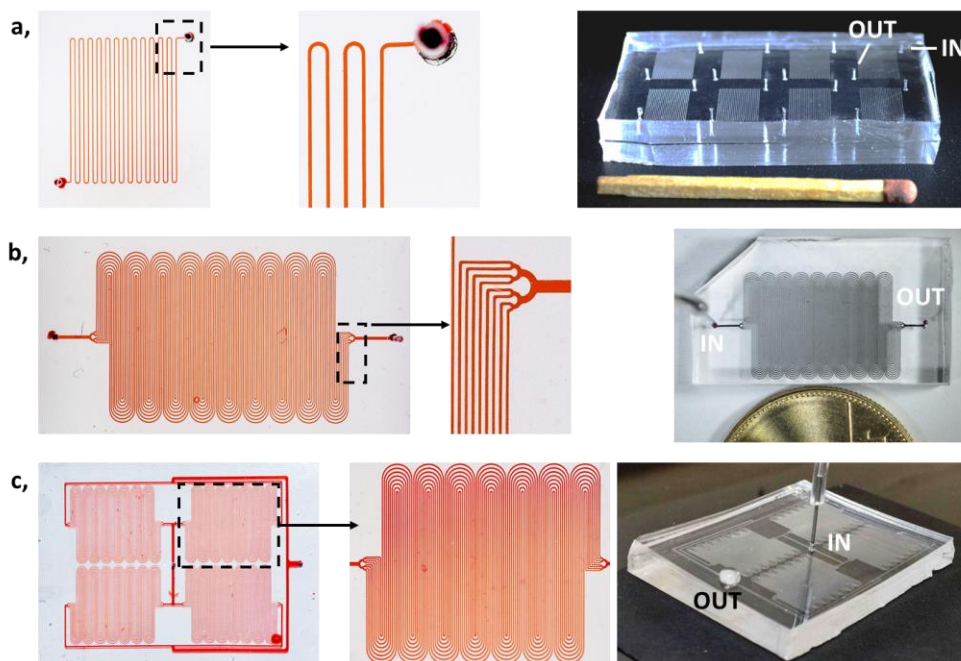


17. ábra: Több kanyar hatása a folyadékok keveredésére. A felső panel a kezdeti koncentráció-viszonyokat mutatja ($L = 0,1 \text{ mm}$), az alsó panelben a végső koncentráció-eloszlások láthatóak ($L = 20 \text{ mm}$) négy különböző csatorna esetére: egyenes, 1-, 4- és 8 görbületet tartalmazók [135*]. A paraméterek megegyeznek a 16. ábránál leírtakkal.



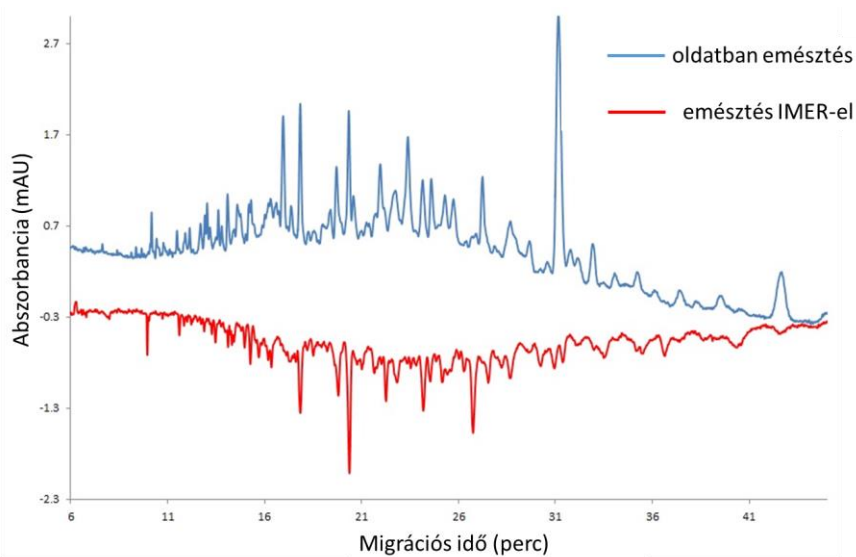
18. ábra: A koncentráció-eloszlás változása a csatorna különböző szakaszain egyenes és szerpentes elrendezések (8 kanyarulat) esetén. A kanyarulatoknál 3 pontban vizsgáltuk a koncentrációprofil (ld. F-3. ábra). Áramlási sebesség: 10 mm/s, a többi paraméterek megegyezik a 16. ábránál leírtakkal.

Ezen elméleti megfontolások alapján 25-75 μm átmérőjű csatornákat terveztünk, melyek hossza 20 cm (10x nagyobb, mint a szimulációk esetében). A csatorna meghosszabbításának alapvetően az volt a célja, hogy a kontaktidőt növeljük. A mikrocipjeink mérete tipikusan $\sim 2,5 \text{ cm} \times 7,5 \text{ cm}$ méretű téglalapok, így a hosszú csatornák esetén tulajdonképpen elkerülhetetlen a kanyarulatok alkalmazása. Ennek megfelelően 24 kanyart tartalmazó csatornát terveztünk, melyből 8 darab helyezhető el egy PDMS mikrocipen (19.a ábra). A kontaktidő további növelése érdekében osztott folyadékáramú csatornákat alakítottunk ki, ahol egy folyadék bemenethez 8 (19.b ábra), ill. 32 (19.c ábra) párhuzamosan futó szerpentin csatorna csatlakozik. Az utóbbi esetében a bejuttatott folyadékot először 4, majd további 8-8 részre osztottuk. Az osztott folyadékáram előnye, hogy a szubsztrátoldal nagyobb felületen érintkezik az immobilizált enzimmel viszonylag nagy (össz)folyadékáramlási sebesség alkalmazása mellett is.



19. ábra: Különböző csatornarendszerű PDMS mikrocsipek (jobb oldalt). Bal oldalon a piros ételfestékkel megtöltött csatornák. Csatornák paraméterei: $ID = 25 \mu m$; L , 20 cm; csatornák száma: (a) 1; (b) 8 és (c) 32 [135*].

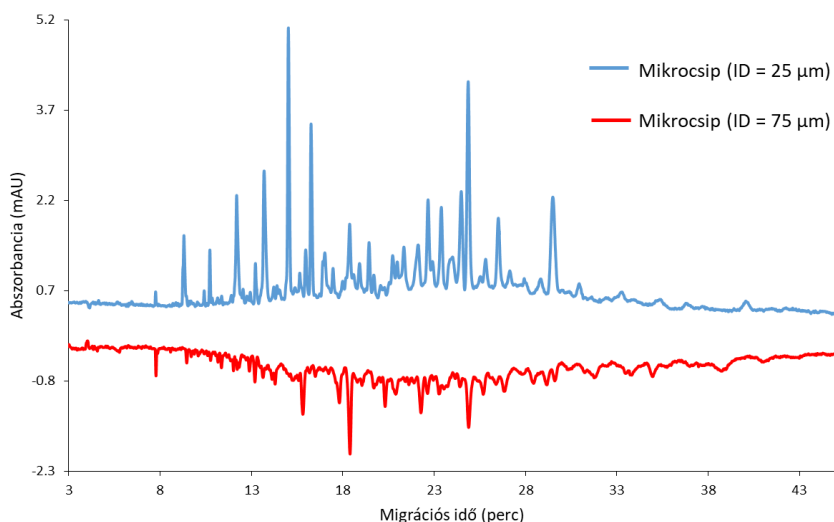
Az elkészített mikrocsipekben kialakított enzimreaktorok hatékonyságának vizsgálatához nyálminták emésztését végeztük el. A nyál egy komplex biológiai minta, melynek fehérjetartalma 0,9-4 mg/ml. A mikrosippel és az oldatban történő emésztéssel kapott peptidelegyek CE-UV elektroferogramjai jó egyezést mutattak. A csúcsok száma hasonló (55–62), különbség inkább a csúcsok intenzitásában van (20. ábra). A nyál jelentős arányban tartalmaz glikoproteineket, melyekben a cukorrészek akadályozhatják az enzim hozzáférését a hasítási helyekhez. Feltehetően a szabad formában lévő és immobilizált enzimek más-más konfigurációban férnek hozzá a szubsztráthoz, és így az adott kötést eltérő valószínűséggel hasítják el. Mivel az elektroferogramon nem jelent meg bontatlan fehérje jelenlétét jelző csúcs, megállapítható, hogy a kialakított mikrocsip-IMER hatékony emésztéseket tesz lehetővé.



20.ábra: Oldatban ill. mikrocshipen emésztett nyálminta CE-UV peptidtérképei. Mikrocshipes emésztéshez a 19.b ábrán feltüntetett csatornát használtuk (ID= 75 μm). CE kísérleti körülmények: L_{eff} : 71,5 cm; BGE: 100 mM foszfát puffer (pH: 2,2); U: 30 kV; mintainjektálás: 50 mbar $\times$ 10 s; λ :200 nm [135*].

Adott csatornaátmérő esetén (ID = 75 μm) a 19. ábrán feltüntetett három mikrocship emésztési hatékonyságában nem tapasztaltunk számottevő különbséget. Ugyanolyan elrendezésű (19.b ábra), de eltérő szélességű csatornák (25 és 75 μm) esetében viszont szemmel látható eltérések vannak a csúcsmintázatokban (21. ábra). Az elválasztott csúcsok száma nagyobb a szélesebb csatorna alkalmazásával (ID = 25 μm kapillárisban a csúcsok száma 55, míg ID = 25 μm kapilláris esetében $\sim$ 44), és emellett intenzitásbeli különbségek is vannak. Fontos megjegyezni, hogy ebben a kísérletben a térfogati áramlási sebességet rögzítettük 0,65 $\mu\text{l}/\text{perc}$ értékre, így az adott időegység alatt átáramló folyadék mennyisége megegyezik mindkét ID esetében. Azonban keskenyebb csatornáknál ez a térfogatáram csak úgy biztosítható, hogy a lineáris áramlási sebesség nő, és így adott oldatrészlet kevesebb időt tölt a reaktorban. Valószínűleg a kisebb kontaktidő miatt tapasztalható az enyhe eltérés a peptidmintázatban. Amennyiben a lineáris

áramlási sebességet tartjuk rögzítve (és így a kontaktidő azonos) nem várható ilyen mértékű különbség a peptid térképekben.

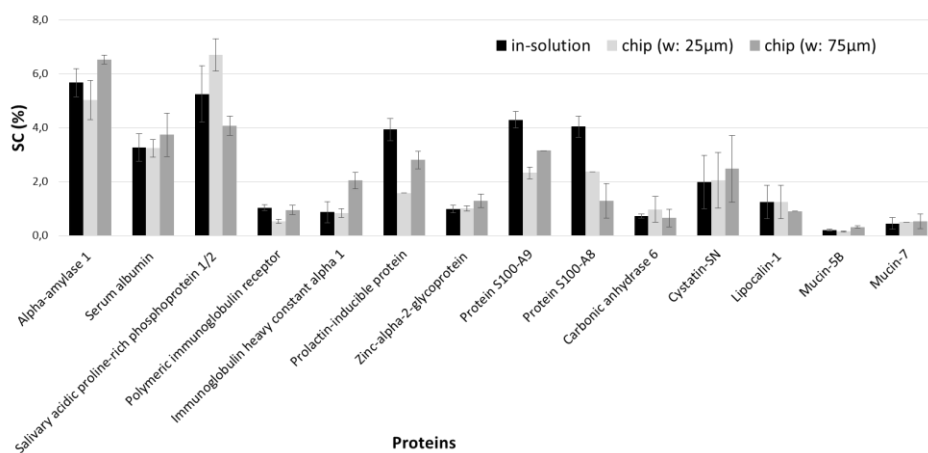


21. ábra: Két különböző mikrocsippel emésztett nyálminta CE-UV peptid térképe. A két IMER csatornaszélessége eltérő (25, ill. 75 µm) [135*]. CE körülmények megegyeznek a 20. ábránál leírtakkal.

A reaktorról történő emésztés reprodukálhatóságának vizsgálatához a 19.b ábrán mutatott mikrocsipet használtam (ID = 25 µm). Öt párhuzamos emésztést végeztünk el különböző reaktorokkal. Két véletlenszerűen választott csúcsra kapott RSD% értékek a következők: 0,88 és 1,05% a migrációs időkre, ill. 36,1 és 20,2% a csúcsterületekre. A CE mérés ismételhetőségének tanulmányozásához hat párhuzamos mérést végeztem egy mintával. Az RSD% értékek nem haladták meg az 1,2 és 7,8 %-t migrációs időkre, ill. csúcsterületekre.

CE-MS/MS mérések segítségével sikerült beazonosítani a nyálmintában legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéket. Az egyes fehérjetalálatokra kapott SC% értékeket a 22. ábrán tüntettem fel mindhárom emésztés esetében (oldatban emésztés, mikrocsipes emésztések: ID = 25 és 75 µm).

Nagy eltérést az SC% értékek között nem találtunk. Az oldatban emésztés csupán 3 fehérje esetében adott nagyobb SC%-t. A két mikrocsip hatékonyságában nem fedezhető fel jelentős különbség a diagram alapján, a CE-UV elektroferogramokon észrevehető különbségek csak kis mértékben mutatkoztak meg fehérjék szekvencia lefedettség értékeiben.



22. ábra: A beazonosított fehérjék szekvencia lefedettség értékeinek összehasonlítása a háromféle emésztés esetén. A diagramon csak azokat a fehérjéket jelenítettük meg, melyek beazonosítása legalább 2 egyedi peptidtalálat alapján történt [135*].

Mindezen eredmények egyrészt bizonyítják a kialakított szerpentines reaktorok hatékonyságát, másrészt az is megállapítható volt, hogy a 25-75 µm tartományban bármilyen csatornaszélesség alkalmas lehet a kívánt hatékonyság eléréséhez. A COMSOL szimulációk alapján a mi rendszerünkben ($Re < 1$) is van hatása a kanyarulatoknak.

5.2 Kvarckapillárisban kialakított enzimreaktor

Az előzőekben bemutatott mikrocsipek off-line módon működnek, miszerint a reaktor és az CE készülék között nincs fizikai kapcsolat, manuális beavatkozás szükséges ahhoz, hogy a megemésztett mintákat analizáljuk.

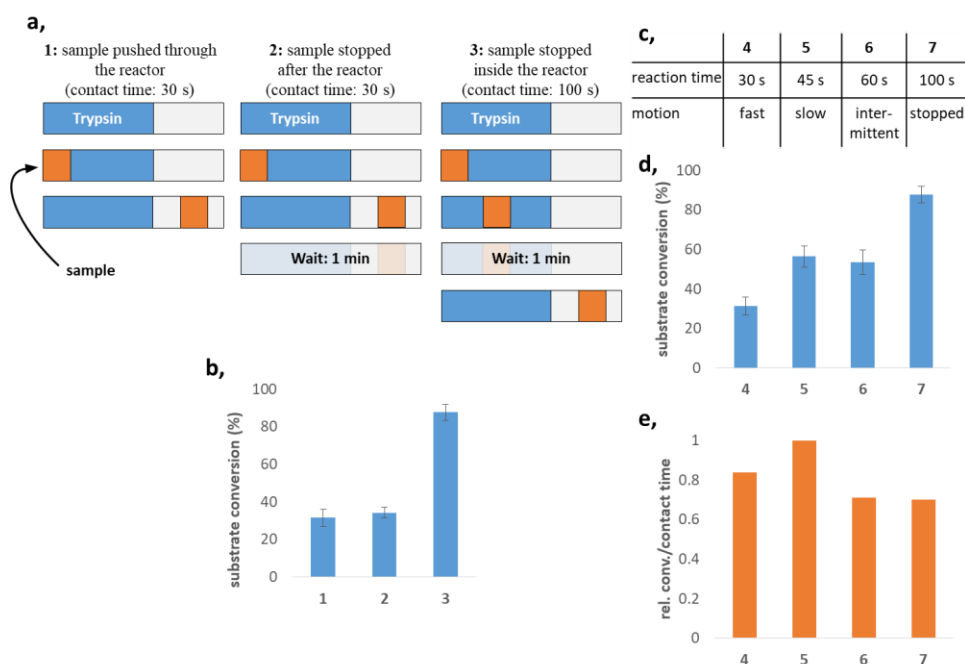
Mivel a proteolízis és az elektroforézis a térben teljesen elkülönülten mennek végbe, egymástól függetlenül lehet kidolgozni az optimális módszert az adott művelet elvégzéséhez. Ezzel ellentétben, on-line (és különösen in-line) rendszereknél össze kell hangolni a kísérleti körülményeket annak érdekében, hogy mindkét modul megfelelően működjön. Az in-line konfiguráció annyiban más egy „hagyományos” on-line rendszertől, hogy ebben az esetben a két funkciót ellátó egység ugyanabban a térrészben foglal helyet (pl.: egy kapillárisban).

Az IMER-CE rendszerünkben a kapilláris kezdeti szakaszán (~ 2 cm) rögzítettük a tripszint, majd a keletkezett peptidek elválasztása a kapilláris további részében valósult meg. Munkánk során törekedtünk arra, hogy az immobilizálás egyszerű és könnyen reprodukálható legyen. Az enzimet elektrosztatikus kölcsönhatással immobilizáltuk közvetlenül a kapilláris falára, kihasználva azt, hogy vizes oldatokban a kvarc felületén kialakuló szilanol-csoportok pH ~ 3 felett deprotonálódnak. A tripszin izoelektromos pontja (pI ~ 10,3) alatti pH értékeknél nettó pozitív töltéssel bír, így egy viszonylag széles pH-tartományban áll fenn töltéskülönbség az enzim és a kvarcfelület között. Immobilizálás előtt szükség volt a kapilláris felületkezelésre lúgos BGE oldattal (NH₄Ac, pH = 8), mely biztosította a kvarcfelület egységes, negatív töltését.

Annak igazolására, hogy a tripszin valóban immobilizálódik a felületen, egy kis méretű szubsztrát (N_α-benzoil-L-arginin-etil-észter – BAEE) bontását tanulmányoztuk az IMER-CE rendszerrel 7 eltérően végrehajtott mintainjektálási műveletsorral. Az első kísérletsorozatban a következő eseteket vizsgáltuk: (1) a szubsztrát injektálása után rögtön BGE-t juttattunk a kapillárisba, így „áttolva” a mintadugót a tripszinezett szakaszon, (2) a mintadugót a tripszinezett szakaszon túlra juttatva 1 percet várahoztunk (IMER és mintadugó közötti távolság ~ 0,25 cm) és (3) a mintadugót a reaktor szakasz

közepére mozdítottuk, ahonnan 1 perces várakozási idő után továbbtoltuk a tripszinezett szakaszon túlra. Ezt követően feszültséget kapcsoltunk az elektródokra és ezzel elkezdődött az elválasztás. A termék és az intakt szubsztrát területarányából számolt konverzió az 1. és 2. esetben szinte megegyezett (~ 30%). Ez igazolta egyrészt azt, hogy a tripszin valóban immobilizálódott, méghozzá a számításainknak megfelelő szakaszon, másrészt, hogy a kialakított enzimréteg stabil. A reaktor részen túlra juttatott mintaoldat az 1 perces várakozási idő alatt jelentős oldatban emésztést szenvedett volna, ha a tripszin mobilizálódik a kapilláris elejéről. A 3. esetben jóval nagyobb konverziót kaptunk (~ 90%). Az IMER szakasz közepén „parkoltatott” mintaoldatban a komponensek szabadon diffundálhattak a kapilláris falán található tripszinhez. A hosszabb kontaktidőnek köszönhetően nőtt az enzim-szubsztrát kölcsönhatások száma. A kontaktidő 3-szoros növekedésével a konverzió is ugyanilyen mértékben emelkedett, mely ugyancsak azt támasztja alá, hogy az enzim a kapilláris megcélzott szakaszán immobilizálódott. A második kísérletsorozatban a minta mozgatasának hatását vizsgáltuk: (4) a mintadugót állandó nyomással toltuk a reaktor szakasz mellé közvetlenül, (5) ugyanaz, mint a 4. eset, azzal a különbséggel, hogy a mintadugó mozgatasáa kisebb belső nyomás alkalmazásával történt, (6) szakaszos mozgatas, ahol a mintadugót 4 lépésben (50 mbar, 2 s × 4) juttattuk a reaktor mellé és (7) a mintadugót az IMER közepén hagytuk állni 1 percig (3. esettel megegyezik). A 23.d ábra alapján a minta reaktorban való megállításával lehet elérni a legnagyobb konverziót. Azonban meg kell jegyezni, hogy ez a fajta ábrázolásmód figyelmen kívül hagyta a kontaktidő változását, így a minta mozgatasának hatásáról nem nyújt felvilágosítást. Nem meglepő módon, hosszabb kontaktidők alkalmazásával a konverzió is nő. Az időegység alatt elérhető konverziókat a 23.e ábra mutatja be, mely alapján a minta lassú mozgatasáa tűnik a legelőnyösebbnek. Ebben az esetben a

kényszeráram állandó mozgásban tartja a mintát, s így a mintakomponensek folyamatosan „friss” tripszinezett felülettel találkoznak.



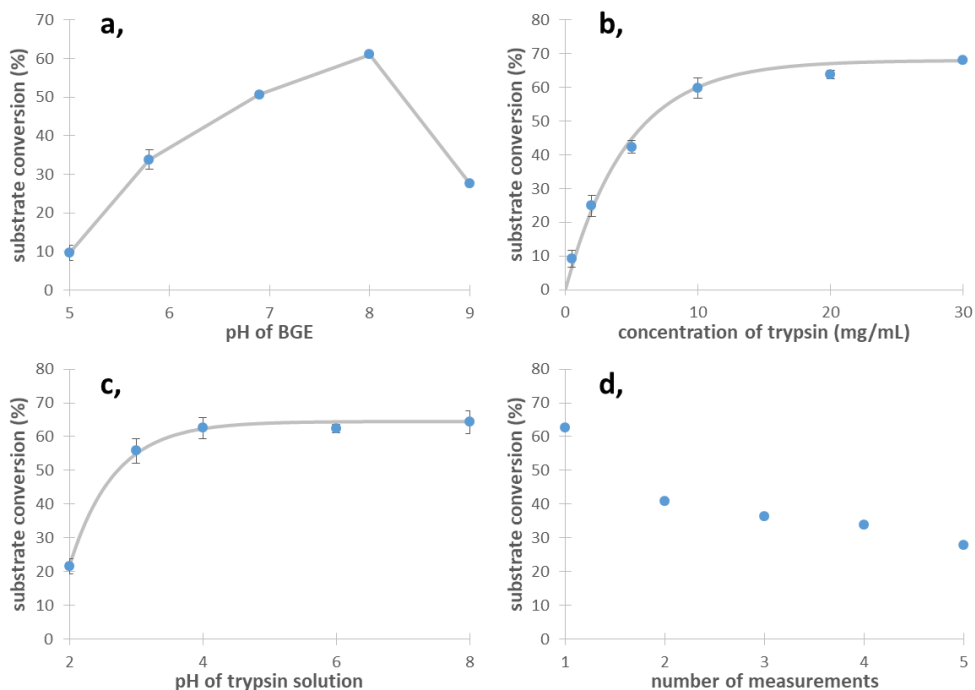
23. ábra: A tripszin immobilizálódásának igazolására irányuló kísérletek: (a) 1-3 kísérletek szemléltetése; (b) 1-3 kísérletekben elért konverziók; (c) 4-7 kísérletek leírása; (d) 4-7 kísérletekben elért konverziók és (e) konverzió/reakcióidő értékek normalva a 4-7 kísérletek esetén. Mérési körülmények: kvarckapilláris (ID = 50 μ m, L = 34 cm); BGE: 25 mM NH₄Ac, pH = 7; tripszinoldat koncentrációja: 20 mg/ml; szubsztát: 1 mM BAE; feszültség: 25 kV; UV detektálás (λ : 230 nm); minta injektálása: 50 mbar, 2 s [145*]. A különböző mintamozgatások pontos paramétereit az F-4. ábrán bemutatott táblázat tartalmazza.

A minta gyors és lassú mozgatása közötti különbséget - a kontaktidő változása mellett – a diffúzió eltérő mértékű érvényesülése okozza. Kísérleteinkben a minta mozgatásának sebességei nagyságrendileg megegyeznek a 15. ábránál szimulált esetekkel (3×10^{-3} m/s és 3×10^{-4} m/s). Az IMER-CE rendszerünkben a reaktor 1,04 cm hosszú, és látható, hogy ezen szakaszon belül csupán a legkisebb áramlási sebesség alkalmazásával történik meg a teljes keveredés (az összes szubsztrátmolekula eljut a kapilláris falához). Ugyan egy-egynyi időre vonatkoztatva az 5. eset (lassú mozgatás) biztosítja a legnagyobb

konverziót, végeredményben a minta megállítása eredményezte a legjobb bontási hatékonyságot a hosszabb kontaktidő miatt. Mivel a CE készülékünkben nem volt lehetőség 15 mbar-nál kisebb belső nyomást alkalmazni reprodukálható módon, így a továbbiakban a 7. esetnek megfelelően végeztük a méréseket.

Az IMER kialakítását és hatékonyságát befolyásoló paraméterek tanulmányozásához a BAEE szubsztrát bontási reakcióját használtuk. A BGE oldatot úgy kellett megválasztani, hogy MS detektálás szempontjából is megfelelő legyen. MS detektáláshoz illékony pufferek használata javasolt, így az NH_4Ac oldatra esett a választás. A BGE pH-ja az immobilizációt és az IMER működését is befolyásolja. A pH-függés vizsgálatához különböző pH értékű NH_4Ac oldatok felhasználásával végeztünk méréseket, ahol az adott pH-jú oldat szolgált háttérelktrolitként, ill. a tripszin- és szubsztrátoldatok oldószereként is (24.a ábra). Nem vizsgáltuk a $\text{pH} < 5$ tartományt, ugyanis olyan esetekben nem is várható megfelelő immobilizálás a deprotonált szilanolcsoportok kisebb aránya miatt. Az eredmények alapján a legoptimálisabbnak a $\text{pH} = 8$ bizonyult, ezen érték felett azonban hirtelen csökkenés volt tapasztalható a bontási hatékonyságokban. Mivel a tripszin működésének optimális pH-tartománya 8-9 körül van, így a hatékonyság csökkenésének nem az enzim korlátozottabb működése az oka. A pH növelésével egyre csökken a tripszinmolekula nettó pozitív töltése ($\text{pI} \sim 10,3$), így bizonyára $\text{pH} \sim 8$ felett egyre rosszabb a kapillárisfelület borítottsága a tripszinnel a csökkenő elektrosztatikus vonzóerők miatt. Az immobilizáláshoz használt tripszinoldat vizsgálatánál $c = 10 - 15 \text{ mg/ml}$ felett nem tapasztaltunk változást, a felület telítetté vált (24.b ábra), így a továbbiakban 20 mg/ml koncentrációjú tripszinoldatokat használtunk. Ilyen tömény tripszinoldatoknál viszont számolni kell az enzim önemésztésével is. Tripszines emésztések esetén az enzimreakciót sav hozzáadásával szokás leállítani, így megnéztük milyen hatása

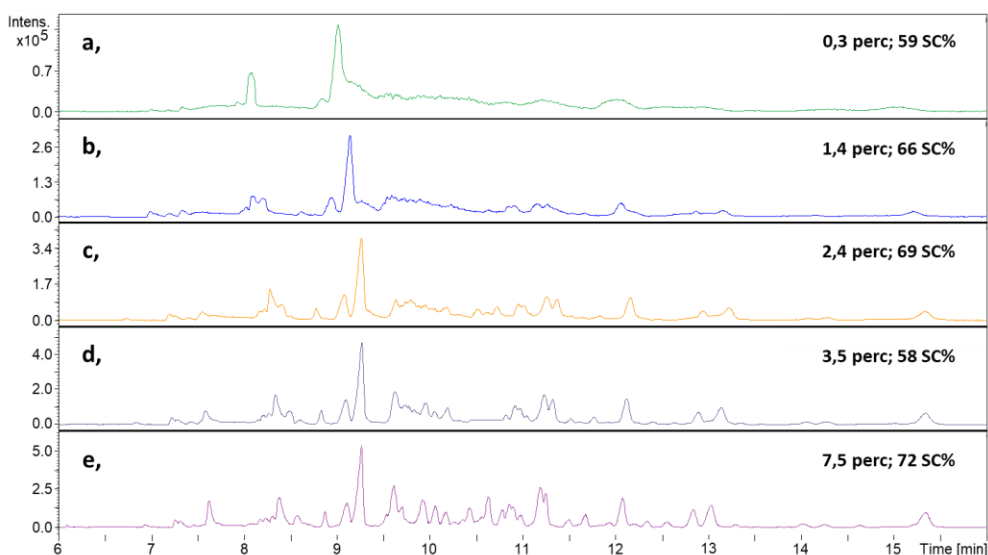
van annak, ha a tripszinoldat pH-ját csökkentjük. A bontási hatékonyságban nem mutatkozik különbség egészen pH=4 értékig, a pH további csökkentése esetében azonban jelentősen romlik az IMER hatékonysága, feltehetően azért, mert ez a savas tartomány egyrészt messze esik a tripszin működéséhez optimális pH-tól, másrészt nem biztosít negatív töltéstöbbletet a kapilláris felszínén a tripszin immobilizálásához (24.c ábra). Annak érdekében tehát, hogy viaszosorítsuk az immobilizálás közben végbemenő autoproteolízist olyan módon, hogy az IMER hatékonysága ne csökkenjen, a továbbiakban pH=4 tripszinodatokat használtunk. Az immobilizált tripszinréteg stabilitásának vizsgálata során az egymást követő méréseknél nem regeneráltuk a tripszines réteget (24.d ábra). Az első mérés után már észrevehető volt egy erőteljesebb csökkenés az IMER hatékonyságában, így a továbbiakban minden egyes mérés előtt elvégeztük a kapilláris tripszinezését a 3.3 fejezetben bemutatott módon. A feszültség vagy az elemzések után történő alapos mosogatás következtében előfordulhat, hogy kis mennyiségű tripszin mobilizálódik a felületről. Eleinte a kapilláris tripszinezését (injektálás, várakozás, majd ellentétes nyomással történő eltávolítás) csak egyszer végeztük el minden elemzés előtt, azonban az ezt követő méréseknél egy növekvő tendenciát láttunk a konverzióban (F-5. ábra). Valószínűleg a harmadik elemzésnél telítődött a felület tripszinnel, így a tripszinezési lépéseket háromszor ismételtük meg a megfelelő borítottság érdekében.



24. ábra: Az IMER hatékonyságát befolyásoló paraméterek: (a) a BGE pH-ja, (b) a tripszinoldat koncentrációja, (c) a tripszinoldat pH-ja és (d) a mérések száma [145*].

A következőkben az IMER-t egy CE-MS rendszerbe integráltuk és megvizsgáltuk, hogy fehérjék esetén is megfelelően működik-e. Mivel a fehérjék jóval nagyobb és bonyolultabb molekulák az eddigiekben használt BAEE szubsztrátnál, kérdéses volt, hogy a ~100 s hosszú kontaktidő elegendő-e a fehérjék bontásához is. Megvizsgáltuk a kontaktidő növelésének hatását HSA felhasználásával (25. ábra). Azt találtuk, hogy növekvő kontaktidőkkel javul az emésztési hatékonyság, mivel egyre több csúcs (peptid) jelenik meg az elektroferogramokon. Az SC% értékekben azonban nem mutatkozik meg olyan mértékű eltérés, mint ami a peptidtérképek mintázata alapján várható. A legrövidebb kontaktidő esetén (0,3 perc) is viszonylag magas, 59 % szekvencia lefedettséget kaptunk. Az elektroferogramon csak egy-két nagyobb csúcs, és több elnyúló jelalak látható, melyek arról árulkodnak, hogy valószínűleg több

hasítatlan kötést tartalmazó, nagyobb peptid-darabok vannak jelen a rendszerben. Az adatbázisos keresés során a megengedett hasítatlan kötések számát 2-re állítottam, így ezen nagyobb peptidek beazonosítása eredményezte a vártnál nagyobb SC% értéket.

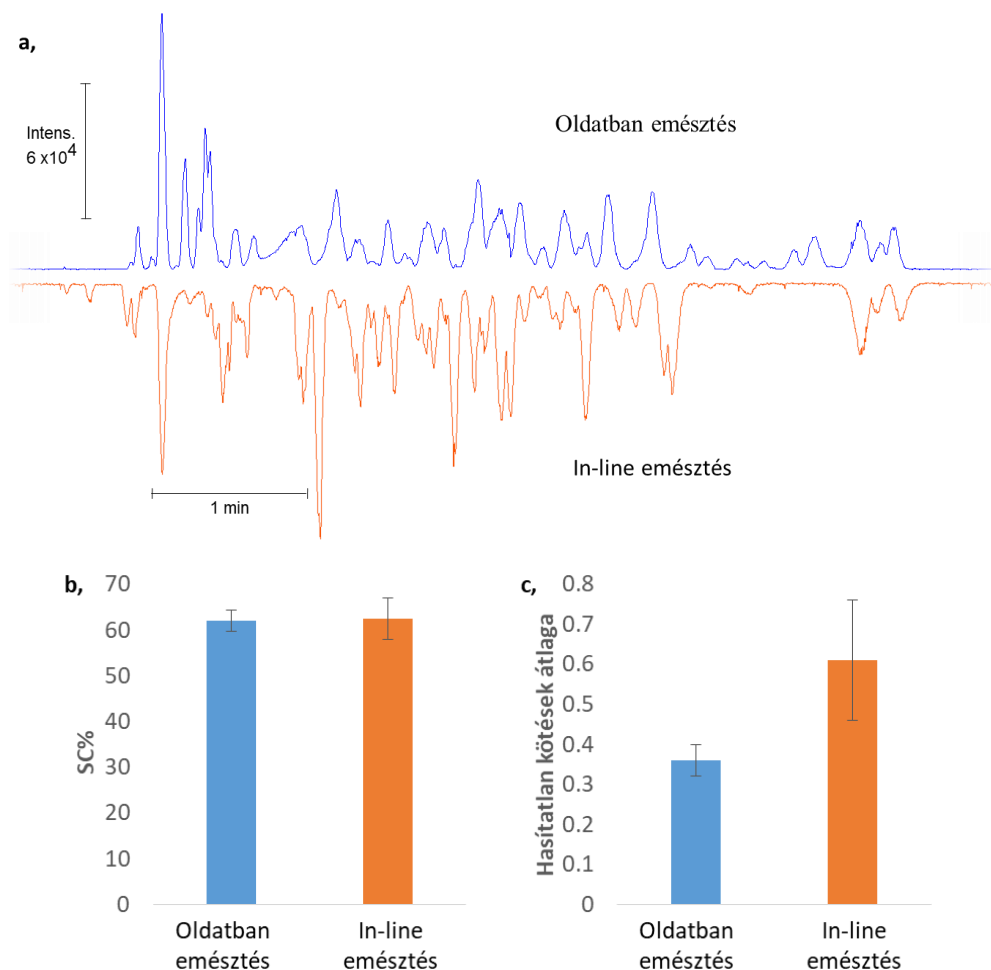


25. ábra: HSA minta CE-MS rendszerben történő in-line emésztésével kapott elektroferogramok növekvő kontaktidők esetén. A mintainjektálás minden esetben 50 mbar $\times$ 6 s. Injektálás után (a) azonnal, illetve különböző várakozási időket követően (b-e) indítottuk az elektroforézist. (b) BGE: 15 mbar $\times$ 60 s; (c) BGE: 15 mbar $\times$ 120 s; (d) BGE: 15 mbar $\times$ 60 s, 60 s várakozási idő, majd újra 15 mbar $\times$ 60 s és (e) BGE: 15 mbar $\times$ 60 s, 300 s várakozási idő, majd 15 mbar $\times$ 60 s. Mérési körülmények: kvarckapilláris (ID = 50 μ m, L = 90 cm); BGE: 40 mM NH₄Ac, pH = 8,0; tripszinoldat koncentrációja: 20 mg/ml; IMER hossza: 1,95 cm [145*].

A vizsgált esetek közül a leghatékonyabb emésztést a 7,5 perc hosszú kontaktidő biztosította. Az in-line IMER hatékonyságát összevetettük az oldatban emésztés hatékonyságával. A peptidterképeken található csúcsok nagyon jól megfeleltethetőek egymásnak (26.a ábra). Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a két emésztés közötti különbségekbe, SC% és hasítatlan kötések arányát is összehasonlítottuk (26.b-c ábrák). Az utóbbi kiszámításához a hasítatlan kötéseket tartalmazó peptidok összegzett csúcsterületének és az

összes peptid összegzett csúcsterületének vettük a hányadosát. Ugyan az SC% értékekben nem volt jelentős eltérés, nagyobb mennyiségben fordultak elő hasítatlan kötést (főleg 1) tartalmazó peptidek az in-line emésztés esetében. A hasítatlan kötéseket tartalmazó peptidek több esetben olyan peptidrészeket tartalmaztak, melyeknek jelenlétét hatékonyabb emésztés esetén sem tudtunk igazolni. Ezek tipikusan olyan kis molekulatömegű peptidek, melyek csupán 2-3 aminosavból épülnek fel (pl.: FK peptid a 35–36 pozícióban, vagy YK peptid a 185–186 pozícióban). A kidolgozott MS módszerünk nem bizonyult alkalmasnak az ilyen kis molekulatömegű peptidek detektálására. Az in-line emésztés során beazonosított peptideket az F-6. ábrán mutatom be, jelölve azokat a peptideket, melyek hasítatlan kötést tartalmaznak.

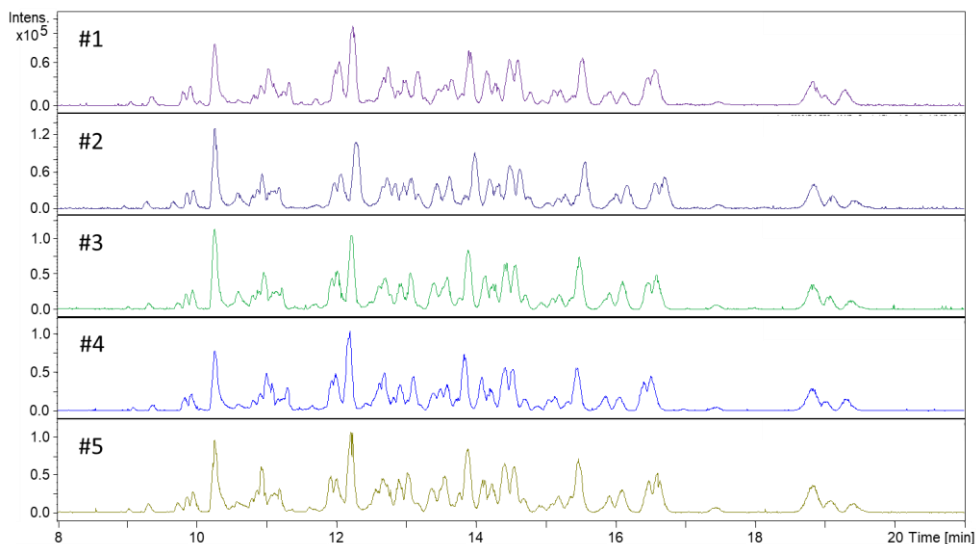
A peptidtalálatok között szerepeltek tripszin önemésztéséből származó komponensek is mindkét típusú emésztésnél. Az in-line rendszernél ez azért fordulhatott elő, mert a tripszinmolekulák mobilizálódásuk után a kapillárisban kölcsönhatásba kerültek és/vagy a mobilizálódott tripszinmolekula vándorlása során egy felületen rögzített tripszinmolekuláról hasított le egy darabot. Tripszin önemésztéséből származó peptidek jelenlétének igazolása összhangban van a 24.d ábránál tapasztaltakkal, miszerint az IMER hatékonysága egy elemzés után csökken.



26. ábra: In-line emésztés összehasonlítása oldatban emésztéssel: (a) tükröztetett peptid térképek, (b) SC% és (c) hasítatlan kötések arányának összevetése. Minta kontaktideje a reaktor részben: 7,5 perc [145*]. Minden egyéb paraméter megegyezik a 25. ábránál leírtakkal.

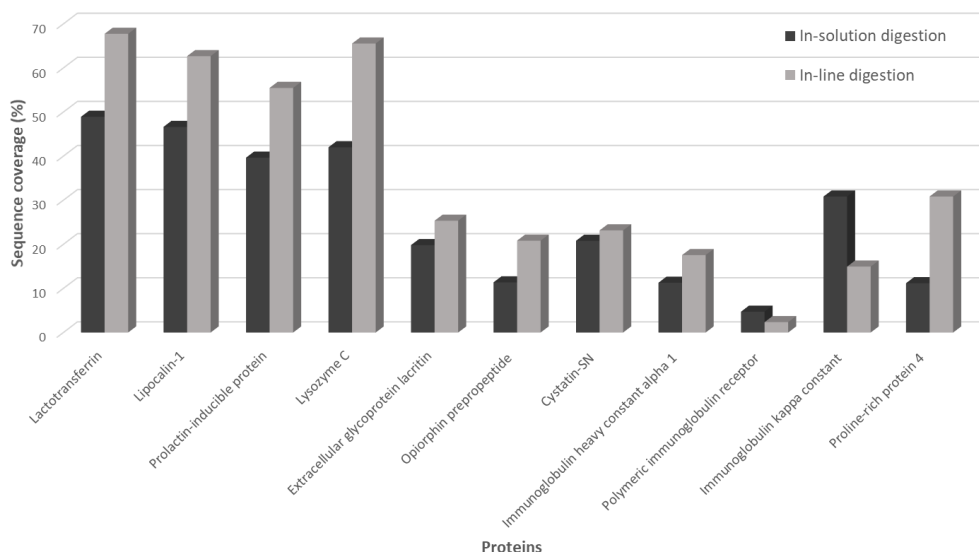
Annak bizonyítására, hogy az in-line IMER megbízhatóan működik, öt egymás után végzett elemzést hasonlítottunk össze (27. ábra). Az elektroferogramok nagyon jó egyezést mutatnak, három véletlenszerűen választott csúcsra számolt RSD% értékek 0,75; 1,08 és 1,02 % migrációs időkre és 37,9; 39,8 valamint 37,4% csúcsterületekre. A CE módszer ismételhetőségét is vizsgáltuk oldatban emésztett HSA minta elemzésével (F-7. ábra). Három

csúcsra kapott RSD% értékek a következők: 1,21; 0,89 és 0,97 % migrációs időkre és 11,2; 16,3 valamint 21,2 % csúcsterületekre.



27. ábra: HSA in-line emésztésének ötszöri ismétlésével kapott CZE-MS peptid térképek [145*]. A mérési körülmények megegyeznek a 25. ábránál leírtakkal.

Az in-line IMER rendszer alkalmazhatóságának vizsgálatához emberi könnyminták emésztését végeztük el, majd az eredményt oldatban emésztéssel hasonlítottuk össze. A könnyben található legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjékre kapott SC% értékek hasonlóak, viszont a legtöbb fehérje esetében az in-line rendszerrel nagyobb lefedettséget tapasztaltunk (28. ábra). Ennek okára már kitértem a 26. ábra tárgyalásánál (hasítatlan kötések szerepe a nagyon kis molekulatömegű peptidek beazonosításában).



28. ábra: Oldatban és mikroreaktorral emésztett könnyűmintában beazonosított fehérjék szekvencia lefedettség értékei. 11 fehérje van feltüntetve, melyek beazonosítása legalább 2 egyedi peptidtalálattal történt [145*].

Összességében az in-line μ -IMER a hagyományos oldatban emésztéssel összemérhető teljesítményt nyújtott. Nagy előnye az in-line μ -IMER-CE-MS rendszernek az, hogy az immobilizálás, emésztés és detektálás teljesen automatizált módon megy végbe. A μ -IMER megfelelő működéséhez szükség volt enyhén lúgos BGE használatára, ugyanis a peptidelegyek CE-MS mérésénél leggyakrabban alkalmazott savas BGE a tripszin aktivitását visszaszorítja. Az in-line rendszerben általában rosszabb volt az érzékenység és kisebb a peptid/fehérjetalálatok száma, ami főleg három okra vezethető vissza: (1) az injektált minta mennyisége kicsi ahhoz képest, mint amit off-line mérések esetében alkalmazunk, (2) a háttélektrolitként használt NH_4Ac jelentős elektroosmotikus áramlást generál, ami azt eredményezi, hogy az egyes peptidek kevésbé válnak el egymástól, és ebből következően MS analízis során ionelnyomás léphet fel és (3) on-line minta-stacking (pl. (t)-izotachoforézis – t-ITP) kialakulására alig van lehetőség, mivel a mintamátrix és a BGE összetétele, valamint pH-ja megegyezik.

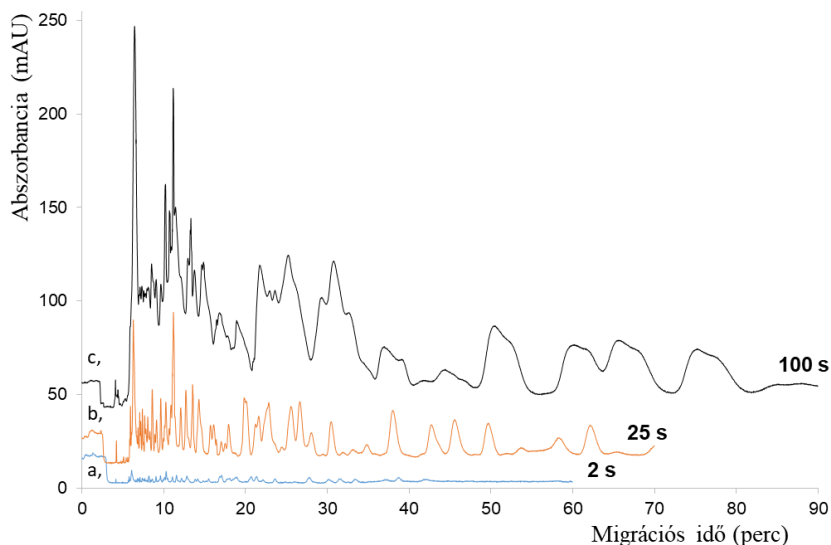
5.3 Emésztmények on-line mintadúsítása és elemzése CE-MS rendszerben

A fehérjék emésztésén túlmenően, a bottom-up munkafolyamat egy másik kritikus lépése a keletkezett peptidek analízise (elválasztása és azonosítása), melyet általában (nano)RPLC-MS/MS módszerrel végeznek el. Manapság egyre elterjedtebb a CZE-MS/MS alkalmazása is, főleg azért, mert eltérő elválasztási mechanizmusából fakadóan kiegészítheti az RPLC által kapott eredményeket [32, 36, 146, 147]. Ez a komplementer jelleg abból adódik, hogy míg az RPLC hidrofóbicitás alapján választja el a komponenseket, a CZE ionos komponensekre nézve számít kifejezetten nagy hatékonyságú módszernek. Különösen nagy kihívásnak számít a kisebb mennyiségben lévő fehérjékből származó peptidek detektálása, ugyanis könnyen előfordulhat, hogy DDA adatgyűjtési mód mellett azok nem kerülnek kiválasztásra fragmentációhoz, vagy ha mégis, akkor a keletkező MS/MS spektrum nem mindig ad megbízható információt a termékionok rendkívül kis intenzitása miatt. Éppen ezért érdemes analízis előtt dúsítani a peptideket a mintában. A CZE esetében lehetőségünk van az elválasztáshoz használt kapillárisban elvégezni a mintadúsítást az elemzés részeként, on-line módon.

Az emésztmények a mintaelőkészítésnek köszönhetően nagy sótartalommal rendelkeznek, mely általánosságban zavarja az elemzéseket. A sótartalom eltávolítását leggyakrabban pipettahegyben elhelyezett SPE sómentesítő egységekkel végzik el. Anyagát tekintve az SPE töltet tulajdonképpen egy fordított fázisú oszlop, így az RPLC esetén megszokott retenciós viselkedést mutatják a peptidek. Ebből adódóan fennállhat annak a veszélye, hogy a kis méretű, erősen hidrofil peptidek a sótartalommal együtt távoznak. CZE esetén azért is sómentesítenek, mert utána szabadabban lehet módosítani a minta mátrixát, mely az on-line mintadúsítás szempontjából fontos. Sómentesítést majd liofilezést követően gyakran oldják fel a peptideket

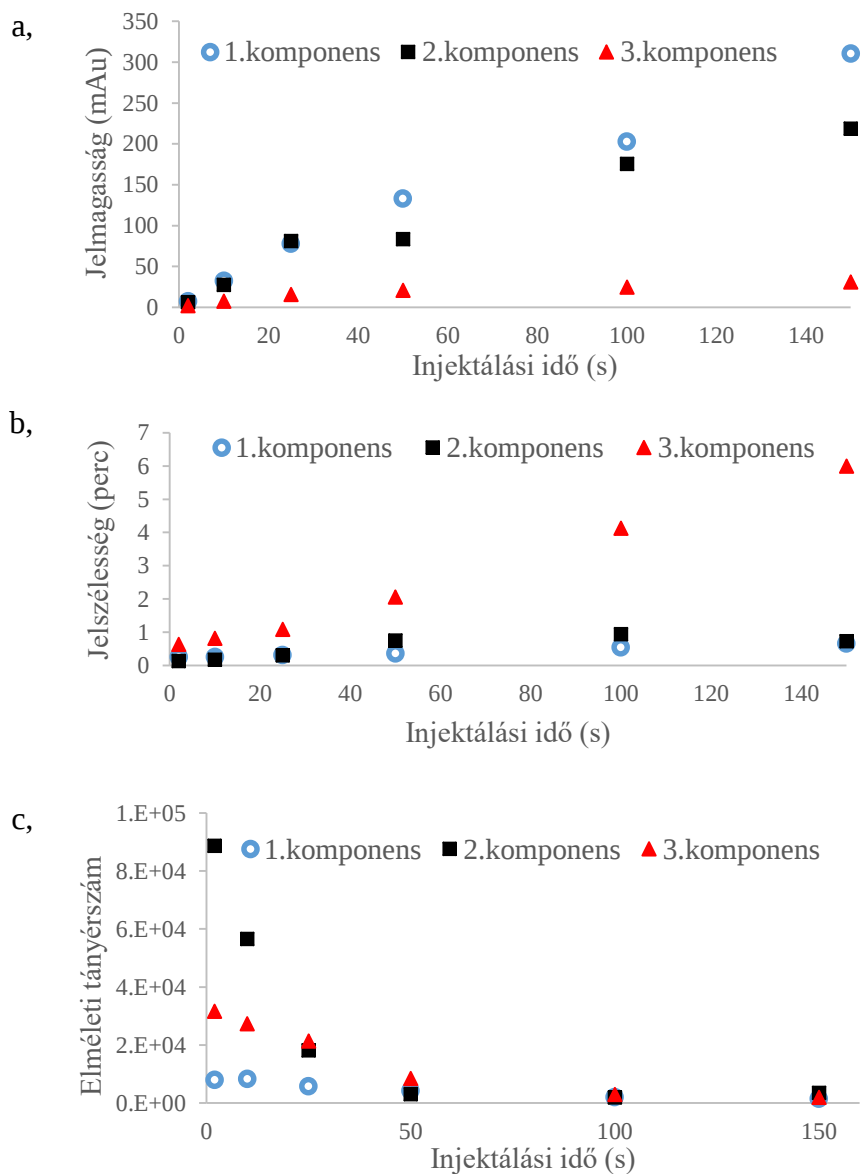
enyhén lúgos oldatban dinamikus pH-csatlakozáson (DPJ) alapuló mintadúsítást generálva (melynek egy másik feltétele az, hogy a BGE savas legyen) [148-150]. Mások nagy szerves oldószer-tartalmú (pl.: 30-60% ACN) mintamatrixot használva váltanak ki elektromos térrel erősített minta-stacking jelenséget (FASS), melynek egyik alapvető feltétele a nagy vezetőképességbeli különbség a minta és a BGE között [38-40, 151].

A sómentesítési lépést tipikusan olyan esetekben hagyják el, ahol a fehérjék előkészítése során denaturáló ágensként RapigestTM-et használják, mely sav hozzáadására elbomlik, így az analízisnél nem okoz problémát. Ahhoz, hogy a CZE során egy tranziens-izotachoforetikus állapot révén minta-stacking történjen, az elemzés előtt elegendő a mintát NH_4Ac oldattal hígítani [152] vagy a bepárolt mintát NH_4Ac oldatban feloldani [41, 153] hogy a jelenlevő NH_4^+ ionok vezető ionként viselkedjenek. Mivel a mintáink nagy mennyiségű NH_4^+ iont tartalmaznak standard mintaelőkészítési protokollunknak köszönhetően, megvizsgáltuk megjelenik-e esetünkben is a t-ITP effektus HSA emésztményeknél (29. ábra, F-8. ábra).



29. ábra: Nem sómentesített minták peptidtérképei növekvő térfogatú mintainjektálással: 50 mbar $\times$ (a) 2 s; (b) 25 s és (c) 100 s. Körülmények: kvarckapilláris (50 μ m $\times$ 40 cm); BGE: 1 M hangyasav, U: 20 kV; λ : 200 nm.

Az injektálási térfogat növelésével a csúcsok magassága nő, viszont a nagyobb térfogatok esetén fokozatosan egyre erőteljesebbé válik a csúcsok szélesedése és így a csúcsok összeolvadása. A dúsítási effektus konkrétabb tanulmányozása érdekében három csúcsot választottunk ki az elektroferogramokon, melyek migrációs ideje jelentősen eltér egymástól és azok magasságát, szélességét és elméleti tányérszámát ábrázoltuk az injektálási idő függvényében (30. ábra). Növekvő injektálási idővel a gyorsabb komponensek (1. és 2.) csúcsmagasság értékei jelentősen nőttek erőteljesebb csúcsszélesedés nélkül, a leglassabb peptid esetében (3. komponens) azonban inkább csak a csúcsszélesség nőtt számottevően. Az elektroferogram végén megjelenő, lassabban migráló komponensek nem (vagy csak nagyon csekély mértékben) dúsulnak, melynek oka az lehet, hogy ezen peptidek mobilitása kisebb, mint a záró ion mobilitása, így nem kerülnek koncentrációra.

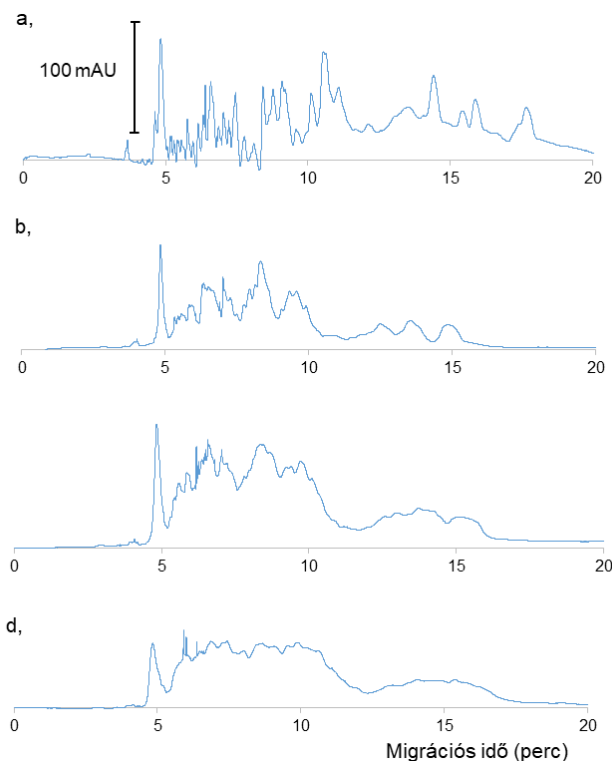


30. ábra: Növekvő mintainjektálás hatása a (a) jelmagasságra; (b) jelszélességre és (c) elméleti tányérszámra. A három komponenst az F-8. ábrán jelöltem, migrációs idejük 6,09; 10,3 és 30,2 perc.

Az eddigi kísérletek alapján bizonyossá vált, hogy valóban történik mintadúsulás az olyan nem sómentesített minták esetében is, melyek emésztést követően semmilyen mintaelőkészítésen nem mentek keresztül. Mivel a

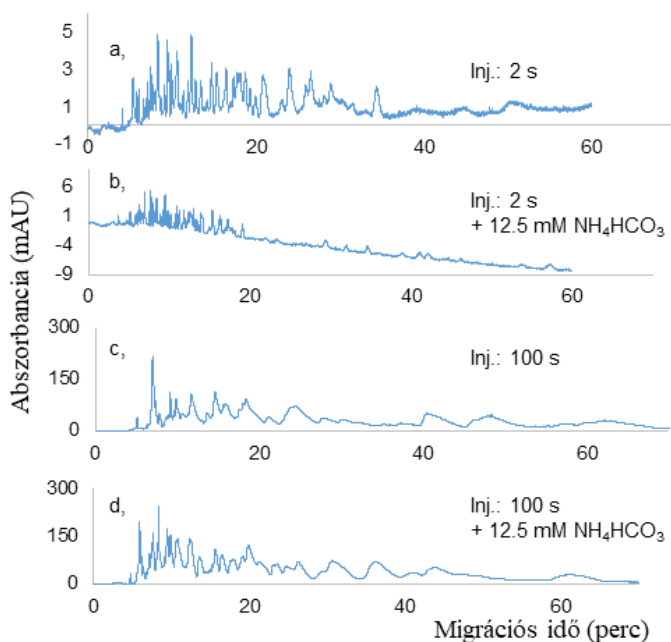
lassabb peptidek esetén nem tapasztaltunk számottevő dúsulást, így a mintamátrix vagy a BGE összetételének csekély módosítására lehet szükség ezen komponensek dúsításához.

Mivel a kapillárisba külön nem injektáltunk záró elektrolitot (TE) (mint ahogy klasszikus ITP-nél szükséges), így valószínűleg a háttélelektrolitként használt hangyasav viselkedett TE-ként. Ugyan a H^+ ionok mobilitása messze a legnagyobb vízben, a LE ellenionjai képesek lelassítani azok mozgását [154]. A LE ellenion a rendszerünkben a HCO_3^- , mely a katód felé vándorolva lelassíthatja a gyors H^+ ionokat. Megvizsgáltuk milyen hatása van annak, ha a BGE koncentrációját a 0,05 – 1 M tartományban változtatjuk (31. ábra). Megfigyelhető volt, hogy ahogy csökken a BGE koncentrációja, egyre kevésbé válnak el a csúcsok egymástól, ill. a csúcsmagasság is csökken. Ennek több oka is lehet: egyrészt a peptidek nagyobb valószínűséggel adszorbeálódnak a kapilláris felületére kisebb ionerősségű vagy nagyobb pH-jú oldatokban, másrészt a hangyasav koncentrációjának erőteljes csökkenése a komponensek dúsulásának sem kedvez. 1 M feletti koncentrációt nem alkalmaztunk a túlzott Joule-hő termelődés és ezzel a zónaszélesedés elkerülése érdekében.



31. ábra: Nem sómentesített HSA minták peptidtérképei csökkenő koncentrációjú BGE használatával: (a) 1 M; (b) 0,25 M; (c) 0,1 M és (d) 0,05 M hangyasav. Injektálás: 50 mbar $\times$ 40 s. Minden egyéb paraméter megegyezik a 29. ábránál leírtakkal. Az elektroferogramokat 2 referenciapont alapján korrigáltuk.

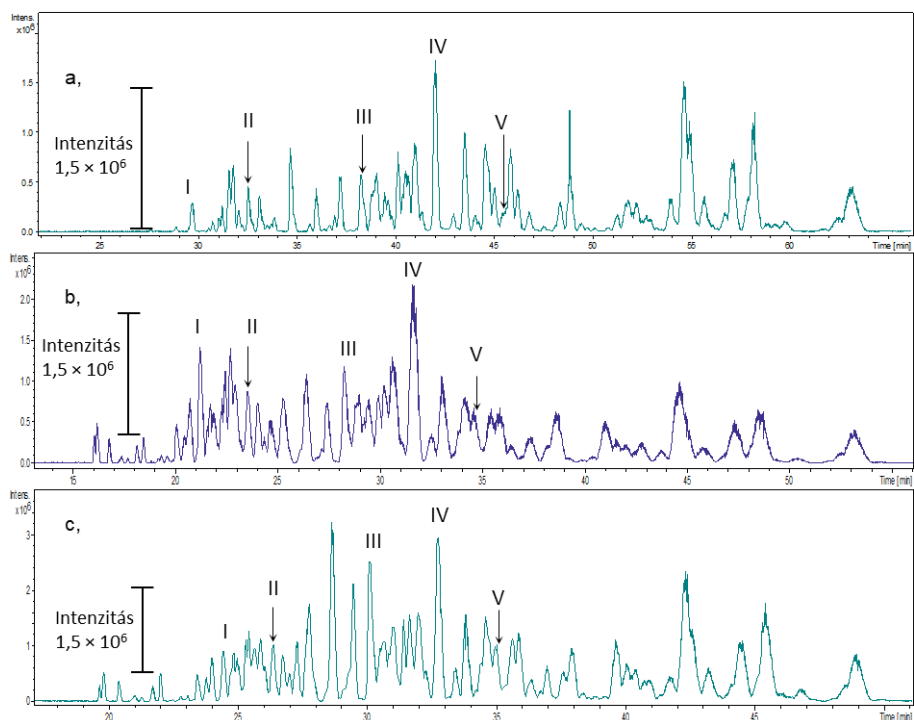
Az LE koncentráció növelésének hatását is megvizsgáltuk (32. ábra). A hozzáadott NH_4HCO_3 hatására a csúcsok közötti felbontás javult, meglehetősen nagy injektálási időnél is (50 mbar $\times$ 100 s injektálás $\sim$ 215 nl térfogatnak felel meg). Feltehetően a nagyobb NH_4^+ koncentrációnak köszönhetően hosszabb ideig tartott a t-ITP állapot.



32. ábra: Nem sómentesített HSA emésztményekhez hozzáadott NH_4HCO_3 hatása. Mintainjektálás: $50 \text{ mbar} \times (a,b) 2 \text{ s}$ és $(c,d) 100 \text{ s}$. Minden egyéb paraméter megegyezik a 29. ábránál leírtakkal.

A kísérletek és az irodalmi adatok arra mutattak, hogy a nem sómentesített minták esetében a t-ITP lehet a felelős a peptidek dúsulásáért és a dúsulás mértéke hasonlóknak tűnt, mint a hagyományos, sómentesített mintákkal végzett elemzések esetén. Ezért, összehasonlításukért, SPE pipettahegyekkel sómentesített HSA emésztményeket is elemeztünk. A sómentesítés során $\text{ACN}:\text{víz} = 70:30 + 0,1 \%$ hangyasav eleggyel eluáltuk a peptideket a töltetről, mely kis vezetőképessége révén elvileg alkalmassá tette a mintát a FASS-típusú mintadúsításra. Ennek természetesen az a feltétele, hogy egy jóval nagyobb vezetőképességű háttéreltrolitot használjunk, mely esetünkben továbbra is az 1 M hangyasav volt. Ezenkívül megvizsgáltuk az ACN hatását nem sómentesített minták esetén is, így ez a minta egyszerre tartalmaz ACN-t és jelentős mennyiségű sót. A három minta CZE-MS elektroferogramjai között a csúcsintenzitásokat tekintve csak csekély eltérés

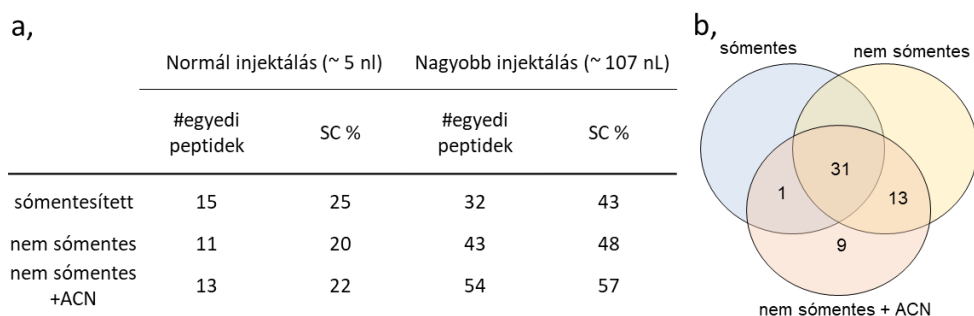
volt tapasztalható (33. ábra), mely arról árulkodott, hogy mindhárom minta esetében történt mintadúsítás, ezek fő mechanizmusai azonban eltérnek egymástól. Sómentesített mintáknál FASS, míg nem sómentesített minták esetén főleg t-ITP-n alapul a dúsítás. Az ACN-t is tartalmazó nem sómentes mintáknál is egy t-ITP-szerű állapot alakul ki [155], ahol a vezető ion az NH_4^+ , a záró “ionként” pedig az ACN viselkedik. Az ACN-t nem tartalmazó sómentesítetlen mintához képest a nagyobb migrációs idejű komponensek kissé élesebb csúcsot adnak. A sómentesítetlen mintáknál a t-ITP mellett (ami a fő mintadúsítási mechanizmus) FASS-típusú dúsítási effektus is előfordulhat. Ha figyelembe vesszük, hogy FASS esetén az egyik alapvető követelmény a kapillárisban lévő oldatrészek vezetőképességbeli különbsége (ill. az abból fakadó elektromos-tér inhomogenitás), belátható, hogy az ACN jelenléte erőteljesebb dúsulást eredményezhet egy tisztán vizes oldathoz képest. Az ACN-t tartalmazó régióban tehát a peptideket a nagy elektromos térerősség is gyorsítja. A dúsításon túlmenően, szembetűnő különbség az, hogy a sómentesített minta esetén kevesebb csúcs jelenik meg a peptidtérképen, főleg a 22-30 perc migrációs időknél. Ebben a tartományban jelen(né)nek meg a legnagyobb mozgékonyaságú komponensek, tehát a kis méretű és nagy töltésű peptidek. Az ilyen tulajdonságú peptidek nem (vagy csak nagyon gyengén) kötődnek a C18-as SPE töltethez, így ezeket a peptideket a sómentesítés során elveszíthetjük. Az F-9. ábrán feltüntettük mindazokat a peptideket, melyeket a sómentesített mintában nem találtuk meg. GRAVY (Grand Average of Hydropathy) értékük alapján (www.gravy-calculator.de) ezek valóban főleg kis, hidrofíl peptidek.



33. ábra: HSA emésztmények CZE-MS elemzése: (a) sómentesítve; (b) nem sómentesítve és (c) nem sómentesítve + 50% ACN. Hidrodinamikus injektálás: 50 mbar $\times$ 112 s. A római számmal jelzett csúcsok a következő peptideket jelölik: (I) LKECKEPLLEK, (II) FKDLGEENFK, (III) KVPQVSTPTLVEVSR, (IV) LVNEVTEFAK és (V) QNCELFEQLGEYK.

A CZE-MS/MS vizsgálatok révén információt nyertünk a HSA szekvencia lefedettségéről és a fehérjében beazonosított peptidekről is (34. ábra). A HSA teljes emésztésekor 85 helyen történhet hasítás, ha feltételezzük, hogy minden lizin (K) és arginin (R) aminosavnál sikeres a hidrolízis. Teljes hidrolízis esetén keletkezhetnek csak egy aminosavat tartalmazó hasítási termékek is, ugyanis a szekvenciában előfordulnak olyan szakaszok, ahol K vagy R aminosavak vannak egymás mellett. Amennyiben az emésztményeinkben valóban képződnek ilyen hidrolízis-termékek, azok detektálására nincs lehetőségünk, ugyanis kis m/z tartományokra nem érzékeny az MS módszerünk. Továbbá, mikor a K és R aminosavakat prolin (P) előzi meg, a hidrolízis nem, vagy csak kisebb valószínűséggel megy végbe, így összességében ezen peptidek

keletkezésével nem kell számolnunk. Mindezeket figyelembe véve, ~ 65-75 peptid képződhet a tripszines emésztések során. A szokásos, kis térfogatú mintainjektálás (50 mbar × 5 s, ami ~ 5 nl térfogatnak felel meg) viszonylag alacsony SC% értékeket eredményezett. Nagyobb mintainjektálásnál, ahol FASS és/vagy t-ITP dúsításokat használunk ki, láthatóan megugrik a fehérje szekvencia lefedettsége. A legjobb eredményt az ACN-t tartalmazó nem sómentesített mintával lehetett elérni, az SC% közel háromszorosa lett a kis térfogatú mintainjektáláshoz viszonyítva. A beazonosított peptidek száma 2-4-szeres növekedést mutatott attól függően, hogy a dúsulás fő mechanizmusa a FASS vagy a t-ITP. Ugyanakkor, itt meg kell jegyezni, hogy ez a megállapítás nem teljesen korrekt az egyes dúsítások hatékonyságának összehasonlítása esetén, mivel sómentesítés során peptideket veszthetünk, így az egyes minták peptid-összetétele nem azonos. A kísérletek azonban jól szemléltették milyen különbségekre lehet számítani sómentesített, ill. nem sómentesített mintáknál. Az eredmények tehát arra mutattak, hogy a sómentesítés nem jár előnyökkel, a mintamátrix közvetlenül alkalmas lehet t-ITP jelenségen alapuló on-line mintadúsítás előidézéséhez, ráadásul a sómentesítési mintaelőkészítési lépést kihagyva egy teljesebb peptidkészletet tartalmazó mintához jutunk.



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

6. Összefoglalás

Doktori munkám során azt a célt tűztem ki, hogy a fehérjeminták bottom-up analízisére dolgozzak ki az ismert, hagyományos eljárásoknál lényegesen gyorsabb és hatékonyabb módszert, mely magába foglalja az enzimes emésztés és az emésztett minta CE-MS analízisének továbbfejlesztését is. Immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorokat fejlesztettem ki, melyekkel a proteolitikus lépés nagyságrendekkel gyorsabban ment végbe (1-10 perc alatt az irodalomban szokásosan használt 4-24 óra helyett). A CE elemzések során megvizsgáltam a peptidelegyek sómentesítésének fontosságát, melynek során kimutattam egyrészt azt, hogy a mintamátrixtól függően különböző elektrokinetikus dúsítási jelenségek dominálnak (t-ITP vagy FASS), másrészt hogy a sómentesítési lépés elhagyásával a peptidtalálatok száma növelhető.

Ugyan számtalan példa található az irodalomban a hatékony immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorokra, melyek szinte teljes proteolízist eredményeznek percek alatt [3], ezen rendszerek általában egy bonyolult, több lépéses vagy drága immobilizáláson alapulnak. Munkám során a lehető legegyszerűbb μ -IMER konstrukciót alkalmazva (csatornafalon közvetlenül adszorbeált tripszin [67]) vizsgáltam, milyen lehetőségek vannak a reaktor hatékonyságának növelésére.

Az ilyen, teljes keresztmetszetében nyitott csatornák viszonylag kis mennyiségű enzim immobilizálására képesek (töltetes és monolit reaktorokhoz hasonlítva), mivel csak a csatornák fala biztosít felületet az enzim rögzítésére. Először olyan mikrocsip-IMER eszközt fejlesztettem ki, melynél a reaktor fajlagos felületének növelését a csatornában kialakított mikrostruktúrázottság biztosította. Ezen struktúrákat (pilléreket) nem utólagosan helyeztem a mikrocsip csatornájába, hanem eleve olyan mikrocsatornákat terveztem, melyek tartalmazták a pilléreket, a csipkészítéshez használatos lágy litográfias

megmunkálás részeként kerültek kialakításra. Megállapítottam, hogy az általunk alkalmazott lágy litográfias technikával a miniaturizálás felbontásának (reprodukálhatóan, biztonsággal kialakítható formák méretének) határa $\sim 25\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$. A további miniaturizálásnak főleg a fotolitográfias lépésnél fellépő Fresnel-elhajlás szab korlátot, melynek során a fotoreziszt bizonyos részeit nagyobb energia érheti, aminek eredményeként nem kapható vissza litográfias maszkon található mintázat hű másolata. Ilyen korlátok mellett az általunk is használt csatornadimenziókkal rendelkező mikrocseppek fajlagos felülete $\sim 30\%$ -al nőtt egy ugyanolyan szélességű és hosszúságú üres csatornához viszonyítva. Az elkészített mikrocseppek proteolitikus hatékonyságát a hagyományos, oldatban történő emésztéssel összevetve nem tapasztaltunk számottevő eltérést a kigyóméregre kapott CE peptidterképekben, ill. a talált peptidek/fehérjék számában. A μ -IMER eszközben a fehérjeoldat kontaktideje $\sim 1,5$ perc, ezzel szemben az oldatban emésztés 16 óra.

A másik kifejlesztett mikrocsep-IMER rendszer esetében, ahol a nyitott csatorna nem tartalmazott pilléreket vagy más beépített felületnövelő mintázatot, azt vizsgáltam, hogy a csatornageometriának milyen hatása van a fehérjeoldat áramlására. Mikrofluidikai rendszerekben az áramlás általában erősen lamináris jellegű, így a részecskék rétegesen haladnak egymás mellett, keveredés csakis diffúzió útján lehetséges (ha nincsenek beépített aktív keverőelemek). A vizsgált reaktor nyitott elrendezéséből adódóan az enzim csupán a csatorna falán található, így a diffúziós úthossz viszonylag nagy, ami kisebb szubsztrátok esetén nem probléma, hiszen azok gyorsabban diffundálnak. Proteolitikus enzimreaktorok esetén azonban a szubsztrátok fehérjék, melyeknek viszonylag kicsi a diffúziós állandójuk, így előfordulhat, hogy áramló közegben a csekély diffúzió miatt a fehérjekomponensek egy része nem jut el a csatorna falán rögzített tripszinhez. Kisebb csatornaátmérők

és áramlási sebességek kedveznek a komponensek teljes elegyedésének, azonban ezek gyakorlati megvalósításának vannak korlátai. Bár a lágy litográfiás módszerünkkel legfeljebb 25 μm -ig tudunk miniaturizálni, nem is lenne értelme ennél szűkebb csatornákat kialakítani, ugyanis a megnövekedett ellennyomás miatt ~ 10 órába telhet egy ilyen szűk mikrocsatornán 10 μl mintatérfogat átáramoltatása (míg az 50 μm szélességű csatornánál ez az időtartam csupán ~ 1 perc). A keveredés elősegítése passzív keverőelemek (pl.: kanyarulatok) alkalmazásával is lehetséges. A rendszerünk erőteljes lamináris jellege ($Re < 1$) miatt kérdéses volt, hogy lesz-e hatása a szerpentes elrendezésnek, ugyanis az irodalomban sincs egyetértés ezzel kapcsolatban. A COMSOL szimulációk alapján az általunk alkalmazott geometriák esetén a kanyarulatok csatornába iktatása helyi turbulenciát okozott. Az elkészített szerpentes mintázatú mikrocsipeket emberi nyálminták emésztésére használtam. Oldatban emésztéssel kapott peptideleggyel összevetve, a CE-MS mérések eredményei jó egyezést mutattak.

Manapság egyre inkább előtérbe kerülnek az on-line kapcsolt analitikai módszerek, melyek automatizált módon működhetnek. Ezzel minimalizálható az emberi tényezőből származó hibák előfordulása. Egy olyan μ -IMER-CE-MS rendszert fejlesztettünk ki, melyben az enzimreaktor az elválasztáshoz használt kapilláris kezdeti részén foglalt helyet. A tripszin elektrosztatikus kölcsönhatással rögzült a kapilláris falán a kapilláris felülete és a tripszinmolekulák közötti töltéskülönbség miatt. On-line rendszer lévén olyan kísérleti körülmények alkalmazására volt szükség, melyek biztosítják mindhárom egység (IMER, CE és MS) megfelelő működését. A háttélektrolit helyes megválasztása kiemelkedő fontosságú volt, ugyanis az biztosítja egyrészt a tripszin immobilizálásához és optimális működéséhez, másrészt a keletkezett peptidek elválasztásához szükséges körülményeket. Emellett ügyelni kellett arra is, hogy az elektrolit kellően illékony is legyen az

MS detektáláshoz. Mindezen követelményeknek az NH_4Ac - tartalmú oldat (25 mM, pH = 8) tett eleget. On-line emésztésekkor a fehérjemintákat kis ideig (néhány perc) parkoltattam a reaktor részben annak érdekében, hogy a fehérjemolekulák szabadon diffundálhassanak a kapilláris falához. A μ -IMER-CE-MS rendszerben emberi könnyminták emésztését végeztem el, melynek során a hagyományos, oldatban emésztett könnyhöz hasonló eredményeket kaptam.

A bottom-up munkafolyamatban az emésztményeket gyakran sómentesítik elemzések előtt a szennyező komponensek eltávolítása érdekében. A sómentesítést általában C18 töltetet tartalmazó (SPE) pipettahegyekkel végzik el. RPLC-s elválasztásokhoz hasonlóan, a peptidek elúciója viszonylag nagy szerves oldószertartalmú eleggyel történik (pl.: ~ 50% ACN). A sómentesítéssel, ill. az anélkül kapott mintamátrixok jelentősen eltértek egymástól. CZE elemzéseknél nagy mintatérfogat injektálásakor a mintamátrix összetételétől függően különböző on-line mintadúsítási mechanizmusok léphetnek fel. Ennek tanulmányozásához HSA emésztmények elemzését végeztem el. Sómentesített minták esetén elektromos térrel erősített minta-stacking (FASS) a fő mechanizmus, a nem sómentesített mintáknál főleg tranziens-izotachophorézis (t-ITP) felelős a mintadúsulásért. Mindkét esetben van lehetőség tehát a peptidek dúsítására az elektroforetikus elválasztás előtt, azonban a nem sómentesített minták több peptidtalálatot eredményeztek. Ennek oka az, hogy a SPE sómentesítéssel elveszthetünk bizonyos kis méretű, hidrofíl peptideket.

A munkám során kialakított enzimreaktorok mindegyike alkalmas volt komplex biológiai minták (kígyóméreg, emberi nyál és könny) emésztésére, igazolva a μ -IMER eszközök hatékonyságát. A sómentesítési lépés elhagyásának lehetősége különösen valós minták esetében lehet kedvező, ahol

a korlátozott mintatérfogat miatt még kritikusabb a minta utólagos feldolgozása során fellépő peptidvesztesség.

7. Summary

The aim of my PhD research was the improvement of the standard bottom-up proteomic workflow regarding the proteolytic step and the analysis of digests using CE-MS. I developed immobilized microfluidic enzymatic reactors that enable an order of a magnitude acceleration of proteolysis reaction time (1-10 min opposed to the standard in-solution digestion lasting 4-24 h). The importance of desalinating the protein digests prior to CE analysis was evaluated, as well. It was found that depending on sample matrix, different electrokinetic stacking mechanism dominate the stage before the zone electrophoretic separation and that the omission of the desalinating step actually increased the number of peptide hits.

Although there is a plethora of efficient immobilized microfluidic enzymatic reactors in the scientific literature that allow the near complete proteolysis of protein samples in a matter of minutes [3], these typically rely on the utilization of complex, multi-step immobilization procedures. The focus of my study was to investigate what possibilities there are for boosting the efficiency of the reactors by exploiting one of the simplest construction (trypsin directly immobilized on the channel wall [67]).

Such open tubular enzyme reactors allow the lowest enzyme load (compared to packed-bed or monolithic reactors), since only the channel walls serve as support for immobilization. First, I developed a microchip-IMER, where the increase in specific surface area was achieved by creating microstructures within the channel. These microstructures (pillars) were accommodated within the channel and were developed as a part of the soft lithographic method we use for chip fabrication, so no further processing step was required to create the pillar obstructions post-fabrication. It was concluded

that with our technique the limit of miniaturization is $\sim 25\text{-}30\ \mu\text{m}$ (microstructures with such dimensions could be created with high reproducibility). Limitations on miniaturization are imposed mainly by Fresnel diffraction occurring during the photolithography step, whereby certain sections of the photoresist experience a higher dosage of light, and so the outlines of the microstructures can not be replicated on the mold with high fidelity. Even with such limitations there is a $\sim 30\%$ increase in the specific surface area of the microchannel used, compared to an empty channel having the same width and length. Taking snake venom as a test sample, the proteolytic efficiencies of the μ -IMER and in-solution digestions were compared. No significant difference was found in the peptide maps or the number of peptide/protein hits. The contact time in the μ -IMER was $\sim 1.5\ \text{min}$, whereas in-solution digestion took 16 h.

In the other microchip-IMER system, which contained no additional pillars of surface area enhancing structures I examined how channel geometry affects fluid dynamics. Microfluidic systems can be generally characterized by a high level of laminarity, meaning that fluid streams do not cross paths, the mixing of components can only occur through diffusion (given that no additional active mixers are incorporated into the channel). The open tubular arrangement of the microreactor implies that the enzyme is immobilized only on the sidewalls of the channel, hence diffusion path length is relatively long, which is not necessarily a problem when we are dealing with small molecules as substrates, since their diffusion constant is quite high. In the case of proteolytic enzyme reactors, however, the substrates are proteins, which have a relatively low diffusion constant and so it can easily happen in flow systems that a certain portion of the protein molecules do not get in contact with surface-bound trypsin molecules because of restricted diffusion. Narrower channels and the application of lower flow rates generally facilitate the

complete mixing of components, although the implementation of these requirements can be hindered by technical difficulties. Although our limit of miniaturization was established to be $\sim 25\ \mu\text{m}$, it would make no sense to further reduce channel width down to $10\ \mu\text{m}$, since in such cases the transportation of $10\ \mu\text{L}$ sample volume through the reactor would take $\sim 10\ \text{h}$, whereas if the channel is $50\ \mu\text{m}$ wide, the same process takes only a minute. In order to promote mixing in the microchannel so-called passive mixers (e.g., curvatures) can also be utilized. Our microchannel demonstrates high laminarity ($\text{Re} < 1$), therefore the role of curvatures was questionable, since there is no real consensus about their positive effect in the literature. According to our COMSOL simulations, however, the incorporation of curvatures induced local turbulence. The serpentine-like structured microchannel was used for the digestion of human saliva samples. The μ -IMER digestion yielded comparable results to that of in-solution digestion based on the CE-MS measurements.

Nowadays the development and application of on-line coupled systems offering automatization are starting to prevail. Automatization minimizes the common errors associated with manual intervention. A μ -IMER-CE-MS system was developed where the reactor is located at the initial section of the separation capillary. Immobilization was carried out via electrostatic interaction between the negatively charged capillary surface and the positively charged trypsin molecules. Being an on-line system, efforts needed to be made to ensure that the experimental conditions enable that proper operation of all units in the workflow (IMER, CE, MS). The choice of background electrolyte was of outstanding importance, since it needed to provide suitable conditions for the immobilization and activity of trypsin, as well as the separation of the peptides generated. Furthermore, attention had to be paid to the MS-compatibility issue. All of the conditions above were fulfilled by the use of NH_4Ac solution ($25\ \text{mM}$, $\text{pH} = 8$) as background electrolyte. During the operation of the on-

line system, the protein was parked in the reactor zone for a couple of minutes to allow molecules to diffuse to the surface-bound trypsin. Human tear samples were digested with the μ -IMER-CE-MS platform. The results corresponded well with those of in-solution digestion.

Bottom-up workflows often resort to the desalination of digests prior to analysis in order to eliminate interfering components. Desalination is typically carried out with C18 SPE pipette tips. Similarly to RPLC, the elution of peptides is done with a mixture having high organic content (e.g., ~ 50% ACN). The matrix of desalinated and non-desalinated samples largely differ. The use of large injection volumes for CZE separations can induce certain on-line stacking phenomena depending on the sample matrix. HSA digests were used for investigating the stacking effects. In the case of desalinated digests field-amplified sample stacking (FASS) was the main mechanism, whereas when non-desalinated samples were analyzed mainly transient isotachopheresis (t-ITP) was responsible for the enrichment of peptides. Both sample matrix compositions promote the stacking of components, however, non-desalinated digests yielded a higher number of peptide identifications. The reason for this is that during the SPE procedure, the small, hydrophilic peptides might be eliminated together with the salts (since these peptides are practically not, or only minimally retained on the C18 phase).

The microreactors developed were all capable of digesting complex biological samples (snake venom, human saliva and tears), proving their applicability and efficiency. The possibility of excluding the desalination step can have great significance especially in the case of real samples, where, owing to the limited samples volumes, the utilization of any post-processing step with potential peptide loss can be more devastating.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attilának, akihez bármikor fordulhattam segítségért. Szakmai támogatása és iránymutatása mellett hálás vagyok azért is, hogy fordított időt a kutatócsoport aktív kikapcsolódását elősegítő programok szervezésére is.

A kutatócsoport további tagjainak is nagy köszönettel tartozom, különösen Dr. András Melindának, Szabó Dávid Rubennek és Narmin Hamidlinak, akiktől egyrészt sokat tanulhattam, másrészt jókedvükkel és kedvességükkel feldobták a mindennapokat.

Dr. Kecskeméti Ádámnak ugyancsak szeretném megköszönni a sok segítséget és azt, hogy meghívott a kutatócsoportba.

Köszönettel tartozom Dr. Huszánk Róbertnek a COMSOL szimulációk kivitelezéséért, Dr. Bodor Róbertnek a dúsítási effektusokról szóló megbeszéléseinkért, Nagyné Dombi Gizella tanszéki irodavezetőnek, hogy mindig segítségemre volt az adminisztratív ügyekben, és megoldott jópár nehéz helyzetet.

Szeretném megköszönni a családomnak és páromnak a töretlen biztatásukat és türelmüket.

Köszönöm a CEEPUS és programnak, hogy többször is lehetővé tette a külföldi nyári egyetemeken és tanulmányutakon való részvételt.

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

Köszönöm az OTKA pályázatoknak (K111932, 127931), hogy biztosították a munkám során használt berendezéseket, a szükséges anyagok beszerzéséhez és fontos tanulmányutakhoz az anyagi támogatást.

Dolgozatom a Richter Gedeon Talentum Alapítvány és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-I, ÚNKP-21-3-II és ÚNKP-22-3-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

9. Irodalomjegyzék

1. Lermyte, F., Tsybin, Y. O., O'Connor, P. B., Loo, J. A. (2019). Top or middle? Up or down? Toward a standard lexicon for protein top-down and allied mass spectrometry approaches. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 30(7), 1149–1157.
2. Vinh, J. (2019). Proteomics and proteoforms: Bottom-up or top-down, how to use high-resolution mass spectrometry to reach the Grail. *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry*, 529–567.
3. Nagy, C., Szabo, R., Gaspar, A. (2022). Microfluidic immobilized enzymatic reactors for proteomic analyses—recent developments and trends (2017–2021). *Micromachines*, 13(2), 311.
4. Šlampová, A., Malá, Z., Gebauer, P., Boček, P. (2016). Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2014–2016). *Electrophoresis*, 38(1), 20–32.
5. Stroink, T., Paarlberg, E., Waterval, J. C., Bult, A., Underberg, W. J. (2001). On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis, focused on the determination of proteins and peptides. *Electrophoresis*, 22(12), 2374–2383.
6. Kašička, V. (2017). Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2015–mid 2017). *Electrophoresis*, 39(1), 209–234.
7. James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: The rapid rise of Proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(4), 279–331.
8. Han, X., Aslanian, A., Yates, J. R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483–490.
9. Sidoli, S., Kulej, K., Garcia, B. A. (2016). Why proteomics is not the new genomics and the future of Mass Spectrometry in Cell Biology. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 21–24.
10. Cox, J., Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics? *Cell*, 130(3), 395–398.
11. Silberring, J., Ciborowski, P. (2010). Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(2), 128–140.
12. O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–4021.
13. Loo, J. A., DeJohn, D. E., Du, P., Stevenson, T. I., Ogorzalek Loo, R. R. (1999). Application of mass spectrometry for target identification and characterization. *Medicinal Research Reviews*, 19(4), 307–319.
14. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/Z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153.
15. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64–71.
16. Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., Darie, C. C. (2020). A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. *Proteomes*, 8(3), 14.

17. Toby, T. K., Fornelli, L., Kelleher, N. L. (2016). Progress in top-down proteomics and the analysis of Proteoforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 9(1), 499–519.
18. Fornelli, L., Damoc, E., Thomas, P. M., Kelleher, N. L., Aizikov, K., Denisov, E., Makarov, A., Tsybin, Y. O. (2012). Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(12), 1758-1767.
19. Cheng, J., Morin, G. B., Chen, D. D. Y. (2020). Bottom-up proteomics of envelope proteins extracted from spinach chloroplast via high organic content CE-MS. *Electrophoresis*, 41(5-6), 370-378.
20. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009). Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nature Methods*, 6(5), 359–362.
21. Olsen, J. V., Ong, S.-E., Mann, M. (2004). Trypsin Cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6), 608–614.
22. Laskay, Ü. A., Lobas, A. A., Srzentić, K., Gorshkov, M. V., Tsybin, Y. O. (2013). Proteome digestion specificity analysis for rational design of extended bottom-up and middle-down proteomics experiments. *Journal of Proteome Research*, 12(12), 5558–5569.
23. 2.2.55. Peptide mapping, Eur. Pharmacopoeia 6.0. (2005) 82-86.
24. Glatzer, T., Ludwig, C., Ahrné, E., Aebersold, R., Heck, A. J., Schmidt, A. (2012). Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem lys-C/trypsin proteolysis over Trypsin digestion. *Journal of Proteome Research*, 11(11), 5145–5156.
25. Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by Multidimensional Protein Identification Technology. *Nature Biotechnology*, 19(3), 242–247.
26. Hervey, Y.W., Strader, M. B., Hurst, G. B. (2007). Comparison of digestion protocols for microgram quantities of enriched protein samples. *Journal of Proteome Research*, 6(8), 3054–3061.
27. Chen, D., Shen, X., Sun, L. (2018). Strong cation exchange-reversed phase liquid chromatography-capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry platform with high peak capacity for deep bottom-up proteomics. *Analytica Chimica Acta*, 1012, 1–9.
28. Yang, Z., Shen, X., Chen, D., Sun, L. (2019). Improved Nanoflow RPLC-CZE-MS/MS system with high peak capacity and sensitivity for nanogram bottom-up proteomics. *Journal of Proteome Research*, 18(11), 4046–4054.
29. Kumar, R., Shah, R. L., Rathore, A. S. (2020). Harnessing the power of electrophoresis and chromatography: Offline coupling of reverse phase liquid chromatography-capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry for peptide mapping for monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*, 1620, 460954.
30. Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., Watson, J. T. (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in

- a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and Isoleucine. *Analytical Chemistry*, 59(21), 2621–2625.
31. Marcotte, E. M. (2007). How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? *Nature Biotechnology*, 25(7), 755–757.
 32. Faserl, K., Sarg, B., Kremser, L., Lindner, H. (2011). Optimization and evaluation of a sheathless capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry platform for peptide analysis: Comparison to liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83(19), 7297–7305.
 33. Jong, G. de. (2016). *Capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS): Principles and applications*. Wiley-VCH.
 34. Yang, X., Hao, L., Zhang, S., Wang, C., Wang, Z. (2018). Sweeping-micelle to solvent stacking for the on-line preconcentration and determination of organic acids in *Angelica sinensis* by capillary electrophoresis. *RSC Advances*, 8(15), 7949–7955.
 35. Lin, H. J., Kou, H. S., Chiou, S. S., Wu, S. M. (2016). Therapeutic deferoxamine and deferiprone monitoring in β -thalassemia patients' plasma by field-amplified sample injection and sweeping in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 37(14), 2091–2096.
 36. Zhu, G., Sun, L., Yan, X., Dovichi, N. J. (2013). Single-shot proteomics using capillary zone electrophoresis–electrospray ionization-tandem mass spectrometry with production of more than 1250 *Escherichia coli* peptide identifications in a 50 min separation. *Analytical Chemistry*, 85(5), 2569–2573.
 37. Yan, X., Essaka, D. C., Sun, L., Zhu, G., Dovichi, N. J. (2013). Bottom-up proteome analysis of *E. coli* using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry with an electrokinetic sheath-flow electrospray interface. *Proteomics*, 13(17), 2546–2551.
 38. Sun, L., Zhu, G., Mou, S., Zhao, Y., Champion, M. M., Dovichi, N. J. (2014). Capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for quantitative parallel reaction monitoring of peptide abundance and single-shot proteomic analysis of a human cell line. *Journal of Chromatography A*, 1359, 303–308.
 39. Sun, L., Hebert, A. S., Yan, X., Zhao, Y., Westphall, M. S., Rush, M. J., Zhu, G., Champion, M. M., Coon, J. J., Dovichi, N. J. (2014). Over 10000 peptide identifications from the Hela proteome by using single-shot capillary zone electrophoresis combined with tandem mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(50), 13931–13933.
 40. Lombard-Banek, C., Moody, S. A., Manzini, M. C., Nemes, P. (2019). Microsampling capillary electrophoresis mass spectrometry enables single-cell proteomics in complex tissues: Developing cell clones in live *Xenopus laevis* and zebrafish embryos. *Analytical Chemistry*, 91(7), 4797–4805.
 41. Lew, C., Gallegos-Perez, J.-L., Fonslow, B., Lies, M., Guttman, A. (2015). Rapid level-3 characterization of therapeutic antibodies by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 53(3), 443–449.

42. Heemskerk, A. A., Busnel, J.-M., Schoenmaker, B., Derks, R. J., Klychnikov, O., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M., Mayboroda, O. A. (2012). Ultra-low flow electrospray ionization-mass spectrometry for improved ionization efficiency in phosphoproteomics. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4552–4559.
43. An, Y., Cooper, J. W., Balgley, B. M., Lee, C. S. (2006). Selective enrichment and ultrasensitive identification of trace peptides in proteome analysis using transient capillary isotachopheresis/zone electrophoresis coupled with nano-ESI-MS. *Electrophoresis*, 27(18), 3599–3608.
44. Xia, S., Zhang, L., Qiu, B., Lu, M., Chi, Y., Chen, G. (2008). On-line preconcentration and quantitative analysis of peptide hormone of brain and intestine using on-column transient isotachopheresis coupled with capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(23), 3719–3726.
45. Gebauer, P., Thormann, W., Boček Petr. (1992). Sample self-stacking in zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 608(1-2), 47–57.
46. Chen, D., Ludwig, K. R., Krokhn, O. V., Spicer, V., Yang, Z., Shen, X., Hummon, A. B., Sun, L. (2019). Capillary zone electrophoresis–tandem mass spectrometry for large-scale phosphoproteomics with the production of over 11,000 phosphopeptides from the colon carcinoma HCT116 cell line. *Analytical Chemistry*, 91(3), 2201–2208.
47. Busnel, J.-M., Lion, N., Girault, H. H. (2008). Electrokinetic supercharging for highly efficient peptide preconcentration in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 29(7), 1565–1572.
48. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463.
49. Long, Y., Wood, T. D. (2014). Immobilized pepsin microreactor for rapid peptide mapping with Nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(1), 194–197.
50. Jönsson, A., Svejda, R. R., Bøgelund, N., Nguyen, T. T., Flindt, H., Kutter, J. P., Rand, K. D., Lafleur, J. P. (2017). Thiol-ene monolithic pepsin microreactor with a 3D-printed interface for efficient UPLC-MS peptide mapping analyses. *Analytical Chemistry*, 89(8), 4573–4580.
51. Ghafourifar, G., Fleitz, A., Waldron, K. C. (2013). Development of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsin and an in situ immobilized enzyme microreactor with peptide mapping by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 34(12), 1804–1811.
52. Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z., Cai, Z. (2015). An enzyme–inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(11), 2295–2300.
53. Zhao, H., Chen, Z. (2014). Screening of neuraminidase inhibitors from traditional Chinese medicines by integrating capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor. *Journal of Chromatography A*, 1340, 139–145.

54. Wang, S., Su, P., Yang, Y. (2012). Online immobilized enzyme microreactor for the glucose oxidase enzymolysis and enzyme inhibition assay. *Analytical Biochemistry*, 427(2), 139–143.
55. Kim, D. N., Lee, Y., Koh, W.-G. (2009). Fabrication of microfluidic devices incorporating bead-based reaction and microarray-based detection system for enzymatic assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(1), 305–312.
56. Lourenço Vanzolini, K., Jiang, Z., Zhang, X., Curcino Vieira, L. C., Gonçalves Corrêa, A., Lucia Cardoso, C., Bezerra Cass, Q., Moaddel, R. (2013). Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening. *Talanta*, 116, 647–652.
57. Min, W., Wang, W., Chen, J., Wang, A., Hu, Z. (2012). On-line immobilized acetylcholinesterase microreactor for screening of inhibitors from natural extracts by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(8), 2397–2405.
58. Jmeian, Y., Hammad, L. A., Mechref, Y. (2012). Fast and efficient online release of N-glycans from glycoproteins facilitating liquid chromatography–tandem mass spectrometry glycomic profiling. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8790–8796.
59. Bynum, M. A., Yin, H., Felts, K., Lee, Y. M., Monell, C. R., Killeen, K. (2009). Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection. *Analytical Chemistry*, 81(21), 8818–8825.
60. Urban, J., Svec, F., Fréchet, J. M. J. (2011). A monolithic lipase reactor for biodiesel production by transesterification of triacylglycerides into fatty acid methyl esters. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 371–380.
61. He, P., Greenway, G., Haswell, S. J. (2010). Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. *Process Biochemistry*, 45(4), 593–597.
62. Tudorache, M., Mahalu, D., Teodorescu, C., Stan, R., Bala, C., Parvulescu, V. I. (2011). Biocatalytic microreactor incorporating HRP anchored on micro-/nanolithographic patterns for flow oxidation of phenols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(3–4), 133–139.
63. Rodríguez-Ruiz, I., Masvidal-Codina, E., Ackermann, T. N., Llobera, A. (2014). Photonic lab-on-chip (PhLOC) for enzyme-catalyzed reactions in continuous flow. *Microfluidics and Nanofluidics*, 18(5–6), 1277–1286.
64. Tang, X., Liu, S., Wang, S., Zhang, Q., Cheng, Z. (2014). Preparation of reversibly immobilized jack bean urease on microchannel surface and application for enzyme inhibition assay. *Microfluidics and Nanofluidics*, 17(4), 721–728.
65. Kecskemeti, A., Gaspar, A. (2018). Particle-based immobilized enzymatic reactors in microfluidic chips. *Talanta*, 180, 211–228.
66. Zhu, Y., Chen, Q., Shao, L., Jia, Y., Zhang, X. (2020). Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. *Reaction Chemistry & Engineering*, 5(1), 9–32.
67. Kecskemeti, A., Bako, J., Csarnovics, I., Csosz, E., Gaspar, A. (2017). Development of an enzymatic reactor applying spontaneously adsorbed trypsin on the

- surface of a PDMS microfluidic device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(14), 3573–3585.
68. Gaspar, A., Gomez, F. A. (2013). Application of surface plasmon resonance spectroscopy for adsorption studies of different types of components on poly(dimethylsiloxane). *Analytica Chimica Acta*, 777, 72–77.
 69. Yuan, H., Zhang, S., Zhao, B., Weng, Y., Zhu, X., Li, S., Zhang, L., Zhang, Y. (2017). Enzymatic reactor with trypsin immobilized on graphene oxide modified polymer microspheres to achieve automated proteome quantification. *Analytical Chemistry*, 89(12), 6324–6329.
 70. Zhang, S., Yuan, H., Zhao, B., Zhang, L., Zhang, Y. (2018). Integrated platform with combination of on-line protein digestion, isotope dimethyl labeling and multidimensional peptide separation for high-throughput proteome quantification. *Analytica Chimica Acta*, 1000, 172–179.
 71. Liu, Y., Zhong, W., Meng, S., Kong, J., Lu, H., Yang, P., Girault, H. H., Liu, B. (2006). Assembly-controlled biocompatible interface on a microchip: Strategy to highly efficient proteolysis. *Chemistry - A European Journal*, 12(25), 6585–6591.
 72. Cheng, M., Wang, R., Zhang, B., Mao, Z., Chen, Z. (2019). Rapid proteolytic digestion and peptide separation using monolithic enzyme microreactor coupled with capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 129–134.
 73. Liu, X., Zhu, X., Camara, M. A., Qu, Q., Shan, Y., Yang, L. (2019). Surface modification with highly-homogeneous porous silica layer for enzyme immobilization in capillary enzyme microreactors. *Talanta*, 197, 539–547.
 74. Yamamoto, K., Morikawa, K., Imanaka, H., Imamura, K., Kitamori, T. (2020). Picoliter enzyme reactor on a nanofluidic device exceeding the bulk reaction rate. *The Analyst*, 145(17), 5801–5807.
 75. Kecskemeti, A., Gaspar, A. (2017). Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion. *Talanta*, 166, 275–283.
 76. Bataille, J., Viodé, A., Pereiro, I., Lafleur, J. P., Varenne, F., Descroix, S., Becher, F., Kutter, J. P., Roesch, C., Poüs, C., Taverna, M., Pallandre, A., Smadja, C., Le Potier, I. (2018). On-a-chip tryptic digestion of Transthyretin: A step toward an integrated microfluidic system for the follow-up of familial transthyretin amyloidosis. *The Analyst*, 143(5), 1077–1086.
 77. Wouters, B., Dapic, I., Valkenburg, T. S. E., Wouters, S., Niezen, L., Eeltink, S., Corthals, G. L., Schoenmakers, P. J. (2017). A cyclic-olefin-copolymer microfluidic immobilized-enzyme reactor for rapid digestion of proteins from dried blood spots. *Journal of Chromatography A*, 1491, 36–42.
 78. Olsen, C., Skottvoll, F. S., Brandtzaeg, O. K., Schnaars, C., Rongved, P., Lundanes, E., Wilson, S. R. (2019). Investigating monoliths (vinyl azlactone-co-ethylene dimethacrylate) as a support for enzymes and drugs, for proteomics and drug-target studies. *Frontiers in Chemistry*, 7, 835.
 79. Fan, P.-R., Zhao, X., Wei, Z.-H., Huang, Y.-P., Liu, Z.-S. (2020). Robust immobilized enzyme reactor based on trimethylolpropane trimethacrylate organic

- monolithic matrix through “thiol-ene” click reaction. *European Polymer Journal*, 124, 109456.
80. Wei, Z., Fan, P., Jiao, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, Z. (2020). Integrated microfluidic chip for on-line proteome analysis with combination of denaturing and rapid digestion of protein. *Analytica Chimica Acta*, 1102, 1–10.
 81. Zhao, X., Fan, P.-R., Mo, C.-E., Huang, Y.-P., Liu, Z.-S. (2020). Green synthesis of monolithic enzyme microreactor based on thiol-ene click reaction for enzymatic hydrolysis of protein. *Journal of Chromatography A*, 1611, 460618.
 82. Amankwa, L. N., Kuhr, W. G. (1992). Trypsin-modified-fused-silica capillary microreactor for peptide mapping by capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 64(14), 1610–1613.
 83. Wu, N., Wang, S., Yang, Y., Song, J., Su, P., Yang, Y. (2018). DNA-directed trypsin immobilization on a polyamidoamine dendrimer-modified capillary to form a renewable immobilized enzyme microreactor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 38–44.
 84. Liu, Y., Qu, H., Xue, Y., Wu, Z., Yang, P., Liu, B. (2007). Enhancement of proteolysis through the silica-gel-derived microfluidic reactor. *Proteomics*, 7(9), 1373–1378.
 85. Wu, H., Tian, Y., Liu, B., Lu, H., Wang, X., Zhai, J., Jin, H., Yang, P., Xu, Y., Wang, H. (2004). Titania and alumina sol–gel-derived microfluidics enzymatic-reactors for peptide mapping: design, characterization, and performance. *Journal of Proteome Research*, 3(6), 1201–1209.
 86. Jegan Roy, J., Emilia Abraham, T. (2004). Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chemical Reviews*, 104(9), 3705–3722.
 87. Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A. M., Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6), 754–762.
 88. Nadar, S. S., Patil, P. D., Tiwari, M. S., & Ahirrao, D. J. (2021). Enzyme embedded microfluidic paper-based analytic device (μ PAD): A comprehensive review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(7), 1046–1080.
 89. Brandtzaeg, O. K., Røen, B.-T., Enger, S., Lundanes, E., Wilson, S. R. (2017). Multichannel open tubular enzyme reactor online coupled with mass spectrometry for detecting ricin. *Analytical Chemistry*, 89(17), 8667–8673.
 90. Currivan, S. A., Chen, W. Q., Wilson, R., Sanz Rodriguez, E., Upadhyay, N., Connolly, D., Nesterenko, P. N., Paull, B. (2018). Multi-lumen capillary based trypsin micro-reactor for the rapid digestion of proteins. *The Analyst*, 143(20), 4944–4953.
 91. Tähkä, S., Sarfraz, J., Urvas, L., Provenzani, R., Wiedmer, S. K., Peltonen, J., Jokinen, V., Sikanen, T. (2019). Immobilization of proteolytic enzymes on replica-molded thiol-ene micropillar reactors via thiol-gold interaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(11), 2339–2349.
 92. Xie, S., Svec, F., Fréchet, J. M. J. (1999). Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: Poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1), 30–35.

93. Villegas, L., Pero-Gascon, R., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. (2019). On-line protein digestion by immobilized enzyme microreactor capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Talanta*, 199, 116–123.
94. Hata, K., Izumi, Y., Hara, T., Matsumoto, M., Bamba, T. (2020). In-line sample processing system with an immobilized trypsin-packed fused-silica capillary tube for the proteomic analysis of a small number of mammalian cells. *Analytical Chemistry*, 92(4), 2997–3005.
95. Meller, K., Pomastowski, P., Szumski, M., Buszewski, B. (2017). Preparation of an improved hydrophilic monolith to make trypsin-immobilized microreactors. *Journal of Chromatography B*, 1043, 128–137.
96. Ota, S., Miyazaki, S., Matsuoka, H., Morisato, K., Shintani, Y., Nakanishi, K. (2007). High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(1), 57–62.
97. Dong, J., Ning, W., Liu, W., Bruening, M. L. (2017). Limited proteolysis in porous membrane reactors containing immobilized trypsin. *The Analyst*, 142(14), 2578–2586.
98. Wang, C., Oleschuk, R., Ouchen, F., Li, J., Thibault, P., Harrison, D. J. (2000). Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(15), 1377–1383.
99. Liu, Y., Wang, H., Liu, Q., Qu, H., Liu, B., Yang, P. (2010). Improvement of proteolytic efficiency towards low-level proteins by an antifouling surface of alumina gel in a microchannel. *Lab on a Chip*, 10(21), 2887.
100. Qu, H., Wang, H., Huang, Y., Zhong, W., Lu, H., Kong, J., Yang, P., Liu, B. (2004). Stable microstructured network for protein patterning on a plastic microfluidic channel: strategy and characterization of on-chip enzyme microreactors. *Analytical Chemistry*, 76(21), 6426–6433.
101. Huang, Y., Shan, W., Liu, B., Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., Lu, H., Tang, Y., Yang, P. (2006). Zeolite nanoparticle modified Microchip Reactor for efficient protein digestion. *Lab on a Chip*, 6(4), 534.
102. Lee, J., Musyimi, H. K., Soper, S. A., Murray, K. K. (2008). Development of an automated digestion and droplet deposition microfluidic chip for MALDI-TOF MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(7), 964–972.
103. Hu, X., Dong, Y., He, Q., Chen, H., Zhu, Z. (2015). Fabrication of a polystyrene microfluidic chip coupled to electrospray ionization mass spectrometry for protein analysis. *Journal of Chromatography B*, 990, 96–103.
104. Jiang, Y., Lee, C. S. (2001). On-line coupling of micro-enzyme reactor with micro-membrane chromatography for protein digestion, peptide separation, and protein identification using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 924(1-2), 315–322.
105. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E., Lee, C. S. (2001). Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification. *Analytical Chemistry*, 73(11), 2648–2655.

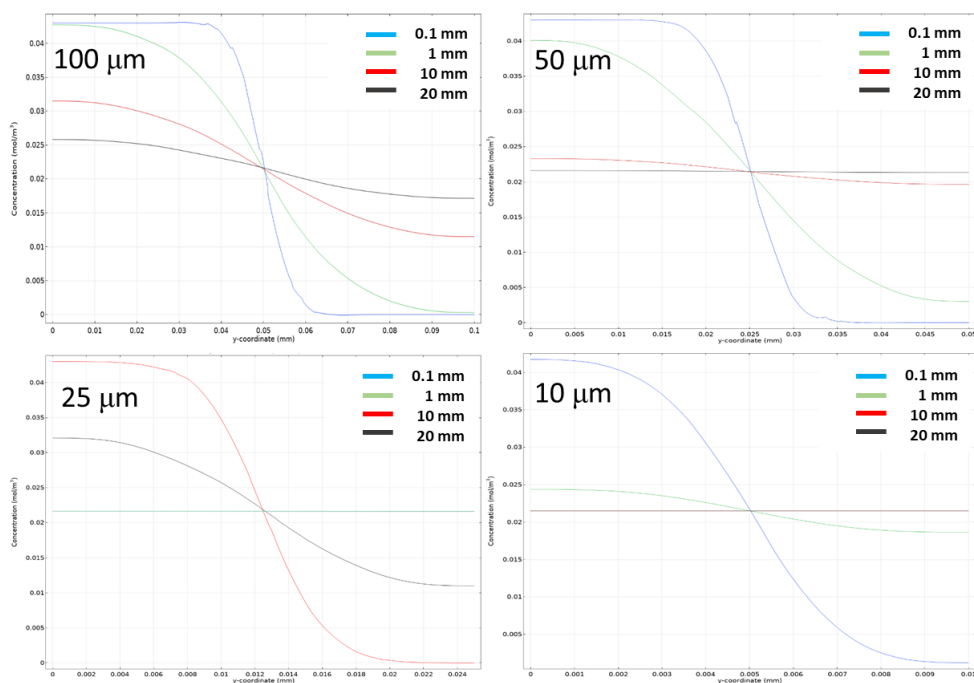
106. Wu, H., Zhai, J., Tian, Y., Lu, H., Wang, X., Jia, W., Liu, B., Yang, P., Xu, Y., Wang, H. (2004). Microfluidic enzymatic-reactors for peptide mapping: Strategy, characterization, and performance. *Lab on a Chip*, 4(6), 588.
107. Bílková, Z., Slovákova, M., Minc, N., Fütterer, C., Cecal, R., Horák, D., Beneš, M., le Potier, I., Křenkova, J., Przybylski, M., Viovy, J.-L. (2006). Functionalized magnetic micro- and nanoparticles: Optimization and application to μ -chip tryptic digestion. *Electrophoresis*, 27(9), 1811–1824.
108. Carlborg, C. F., Haraldsson, T., Öberg, K., Malkoch, M., van der Wijngaart, W. (2011). Beyond PDMS: Off-stoichiometry thiol–ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 11(18), 3136.
109. Křenkova, J., Klepárník, K., Foret, F. (2007). Capillary electrophoresis mass spectrometry coupling with immobilized enzyme electrospray capillaries. *Journal of Chromatography A*, 1159(1-2), 110–118.
110. Gstöttner, C., Klemm, D., Habberger, M., Bathke, A., Wegele, H., Bell, C., Kopf, R. (2018). Fast and automated characterization of antibody variants with 4D HPLC/MS. *Analytical Chemistry*, 90(3), 2119–2125.
111. Comamala, G., Krogh, C. C., Nielsen, V. S., Kutter, J. P., Voglmeir, J., Rand, K. D. (2021). Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with integrated electrochemical reduction and microchip-enabled deglycosylation for epitope mapping of heavily glycosylated and disulfide-bonded proteins. *Analytical Chemistry*, 93(49), 16330–16340.
112. Palm, A. K., Novotny, M. V. (2005). A monolithic PNGase F enzyme microreactor enabling glycan mass mapping of glycoproteins by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(12), 1730–1738.
113. Krenkova, J., Szekrenyes, A., Keresztessy, Z., Foret, F., Guttman, A. (2013). Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis. *Journal of Chromatography A*, 1322, 54–61.
114. Wouters, B., Pirok, B. W. J., Soulis, D., Garmendia Perticarini, R. C., Fokker, S., van den Hurk, R. S., Skolimowski, M., Peters, R. A. H., Schoenmakers, P. J. (2019). On-line microfluidic immobilized-enzyme reactors: A new tool for characterizing synthetic polymers. *Analytica Chimica Acta*, 1053, 62–69.
115. Guckenberger, D. J., de Groot, T. E., Wan, A. M., Beebe, D. J., Young, E. W. (2015). Micromilling: A method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15(11), 2364–2378.
116. Liang, R.-P., Wang, X.-N., Liu, C.-M., Meng, X.-Y., Qiu, J.-D. (2013). Construction of graphene oxide magnetic nanocomposites-based on-chip enzymatic microreactor for ultrasensitive pesticide detection. *Journal of Chromatography A*, 1315, 28–35.
117. Cornelio, V. E., de Moraes, M. C., Domingues, V. de, Fernandes, J. B., da Silva, M. F., Cass, Q. B., Vieira, P. C. (2018). Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 252–259.
118. Mijanovic, O., Petushkova, A. I., Brankovic, A., Turk, B., Solovieva, A. B., Nikitkina, A. I., Bolevich, S., Timashev, P. S., Parodi, A., Zamyatnin, A. A. (2021). Cathepsin D—managing the delicate balance. *Pharmaceutics*, 13(6), 837.

119. Qiao, J., Qi, L., Yan, H., Li, Y., Mu, X. (2013). Microchip CE-LIF method for the hydrolysis of L-glutamine by using L-asparaginase enzyme reactor based on gold nanoparticle. *Electrophoresis*, 34(3), 409–416.
120. Sheng, J., Zhang, L., Lei, J., Ju, H. (2012). Fabrication of tunable microreactor with enzyme modified magnetic nanoparticles for microfluidic electrochemical detection of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 709, 41–46.
121. Boehm, C. R., Freemont, P. S., Ces, O. (2013). Design of a prototype flow microreactor for synthetic biology in vitro. *Lab on a Chip*, 13(17), 3426.
122. Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J., Whitesides, G. M. (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70(23), 4974–4984.
123. Berta, A. (1983). Collection of tear samples with or without stimulation. *American Journal of Ophthalmology*, 96(1), 115–116.
124. Zhou, L., Beuerman, R. W. (2017). The Power of Tears: How Tear Proteomics Research could revolutionize the clinic. *Expert Review of Proteomics*, 14(3), 189–191.
125. Slentz, B. E., Penner, N. A., Lugowska, E., Regnier, F. (2001). Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane). *Electrophoresis*, 22(17), 3736–3743.
126. Lee, J., Soper, S. A., Murray, K. K. (2009). Development of an efficient on-chip digestion system for protein analysis using MALDI-TOF MS. *The Analyst*, 134(12),
127. Nagy, C., Kecskemeti, A., Gaspar, A. (2020). Fabrication of immobilized enzyme reactors with pillar arrays into polydimethylsiloxane microchip. *Analytica Chimica Acta*, 1108, 70–78.
128. Miyajima, H., Mehregany, M. (1995). High-aspect-ratio photolithography for MEMS applications. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 4(4), 220–229.
129. Weichelt, T., Bourgin, Y., Zeitner, U. D. (2017). Mask Aligner lithography using laser illumination for versatile pattern generation. *Optics Express*, 25(18), 20983.
130. Chuang, Y.-J., Tseng, F.-G., Lin, W.-K. (2002). Reduction of diffraction effect of UV exposure on SU-8 negative thick photoresist by air gap elimination. *Microsystem Technologies*, 8(4-5), 308–313.
131. Shao, G., Wu, J., Cai, Z., Wang, W. (2012). Fabrication of elastomeric high-aspect-ratio microstructures using polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique. *Sensors and Actuators A: Physical*
132. Carregari, V. C., Rosa-Fernandes, L., Baldasso, P., Bydlowski, S. P., Marangoni, S., Larsen, M. R., Palmisano, G. (2018). Snake venom extracellular vesicles (SVEVs) reveal wide molecular and functional proteome diversity. *Scientific Reports*, 8(1).
133. Kalogeropoulos, K., Treschow, A., auf dem Keller, U., Escalante, T., Rucavado, A., Gutiérrez, J., Laustsen, A., Workman, C. (2019). Protease activity profiling of snake venoms using high-throughput peptide screening. *Toxins*, 11(3), 170.
134. Bern, M., Kil, Y. J., Becker, C. (2012). Byonic: Advanced peptide and protein identification software. *Current Protocols in Bioinformatics*, 40(1).

135. Nagy, C., Huszank, R., Gaspar, A. (2021). Study of the geometry of open channels in a layer-bed-type microfluidic immobilized enzyme reactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(25), 6321–6332.
136. Cai, G., Xue, L., Zhang, H., Lin, J. (2017). A review on micromixers. *Micromachines*, 8(9), 274.
137. Huanming, X., Jiawei, W., Zhiping, W. (2017). A comparative discussion of different designs of passive micromixers: Specific sensitivities of mixing efficiency on Reynolds numbers and fluid properties. *Microsystem Technologies*, 24(2), 1253–1263.
138. Sudarsan, A. P., Ugaz, V. M. (2006). Multivortex micromixing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7228–7233.
139. Javaid, M., Cheema, T., Park, C. (2017). Analysis of passive mixing in a serpentine microchannel with sinusoidal side walls. *Micromachines*, 9(1), 8.
140. Hama, B., Mahajan, G., Fodor, P. S., Kaufman, M., Kothapalli, C. R. (2018). Evolution of mixing in a microfluidic reverse-staggered herringbone micromixer. *Microfluidics and Nanofluidics*, 22(5).
141. Yin, B., Yue, W., Sohan, A. S., Zhou, T., Qian, C., Wan, X. (2021). Micromixer with fine-tuned mathematical spiral structures. *ACS Omega*, 6(45), 30779–30789.
142. Howell, Jr, P. B., Mott, D. R., Golden, J. P., Ligler, F. S. (2004). Design and evaluation of a Dean Vortex-based micromixer. *Lab on a Chip*, 4(6), 663.
143. Rösing, W., Schildhauer, T., König, J., Cierpka, C. (2019). Passive control of the concentration boundary layer in microfluidic fuel cells using Dean vortices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 23(9).
144. Karthikeyan, K., Sujatha, L. (2018). Study of permissible flow rate and mixing efficiency of the micromixer devices. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 17(1).
145. Nagy, C., Szabo, R., Gaspar, A. (2021). Development of an in-line enzyme reactor integrated into a capillary electrophoresis system. *Molecules*, 26(19), 5902.
146. Johnson, K. R., Greguš, M., Kostas, J. C., Ivanov, A. R. (2022). Capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry for ultra-sensitive proteomic analysis of limited samples. *Analytical Chemistry*, 94(2), 704–713.
147. Li, Y., Champion, M. M., Sun, L., Champion, P. A., Wojcik, R., Dovichi, N. J. (2012). Capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry as an alternative proteomics platform to ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for samples of intermediate complexity. *Analytical Chemistry*, 84(3), 1617–1622.
148. Zhu, G., Sun, L., Yan, X., Dovichi, N. J. (2014). Bottom-up proteomics of *Escherichia coli* using dynamic pH junction preconcentration and capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86(13), 6331–6336.
149. Chen, D., Shen, X., Sun, L. (2017). Capillary zone electrophoresis–mass spectrometry with microliter-scale loading capacity, 140 min separation window and high peak capacity for bottom-up proteomics. *The Analyst*, 142(12), 2118–2127.

150. Zhu, G., Sun, L., Heidbrink-Thompson, J., Kuntumalla, S., Lin, H.-yu, Larkin, C. J., McGivney, J. B., Dovichi, N. J. (2016). Capillary zone electrophoresis tandem mass spectrometry detects low concentration host cell impurities in monoclonal antibodies. *Electrophoresis*, 37(4), 616–622.
151. Choi, S. B., Zamarbide, M., Manzini, M. C., Nemes, P. (2016). Tapered-tip capillary electrophoresis nano-electrospray ionization mass spectrometry for ultra-sensitive proteomics: The Mouse Cortex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(4), 597–607.
152. Saadé, J., Biacchi, M., Giorgetti, J., Lechner, A., Beck, A., Leize-Wagner, E., François, Y.-N. (2021). Analysis of monoclonal antibody glycopeptides by capillary electrophoresis–mass spectrometry coupling (CE-MS). *Methods in Molecular Biology*, 97–106.
153. Busnel, J.-M., Schoenmaker, B., Ramautar, R., Carrasco-Pancorbo, A., Ratnayake, C., Feitelson, J. S., Chapman, J. D., Deelder, A. M., Mayboroda, O. A. (2010). High capacity capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry: Coupling a porous sheathless interface with transient-isotachopheresis. *Analytical Chemistry*, 82(22), 9476–9483.
154. Melzer, T., Wimmer, B., Bock, S., Posch, T. N., Huhn, C. (2020). Challenges and applications of isotachopheresis coupled to mass spectrometry: A Review. *Electrophoresis*, 41(12), 1045–1059.
155. Shihabi, Z. K. (2002). Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23(11), 1612.

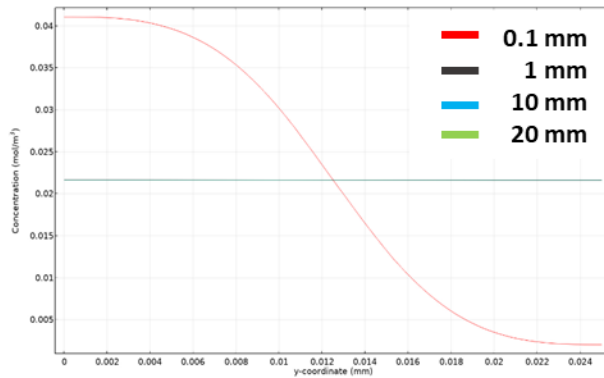
10. Függelék



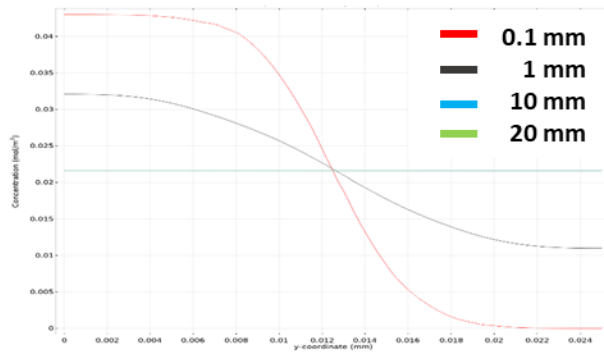
F-1. ábra: A koncentráció-eloszlás megváltozását mutató diagramok a 14. ábrán feltüntetett négy különböző szélességű csatornában (10; 25; 50; 100 μm). Minden esetben négy eltérő csatornahosszágnál (0,1; 1; 10 és 20 mm) generáltuk a keresztmetszeti koncentráció-profilokat. Az x—tengelynél a 'y-coordinate' a keresztmetszet hosszát jelöli (csatornaszélesség) [135*]. A körülmények megegyeznek a 14. ábránál leírt paraméterekkel.

$$v = \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$$

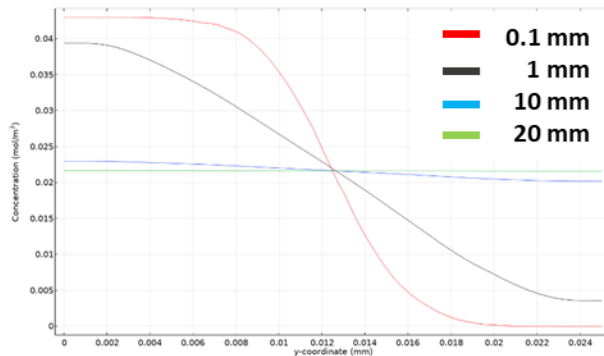
0.3



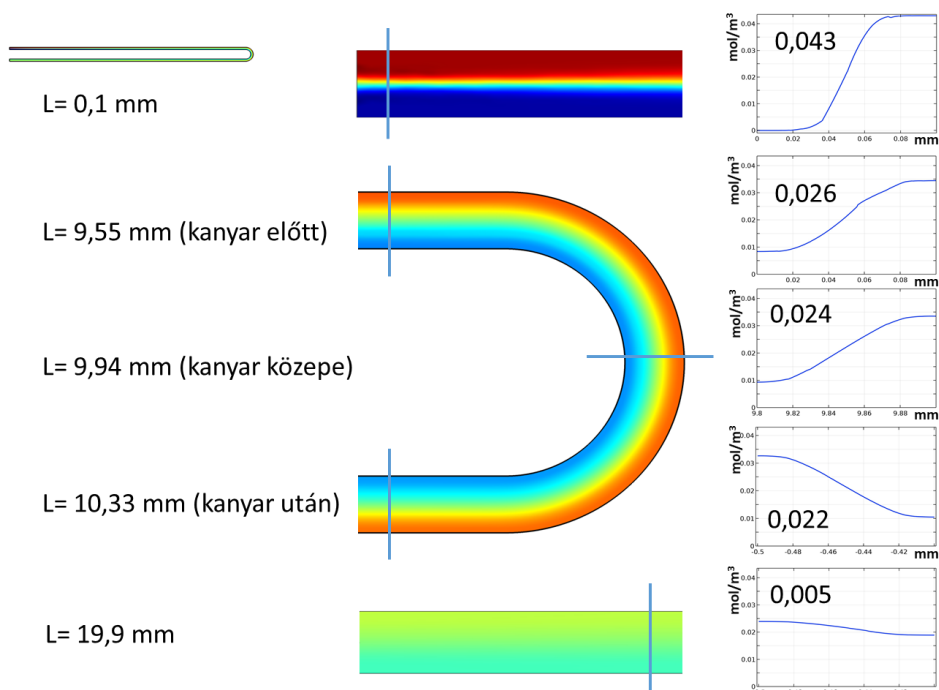
3



30



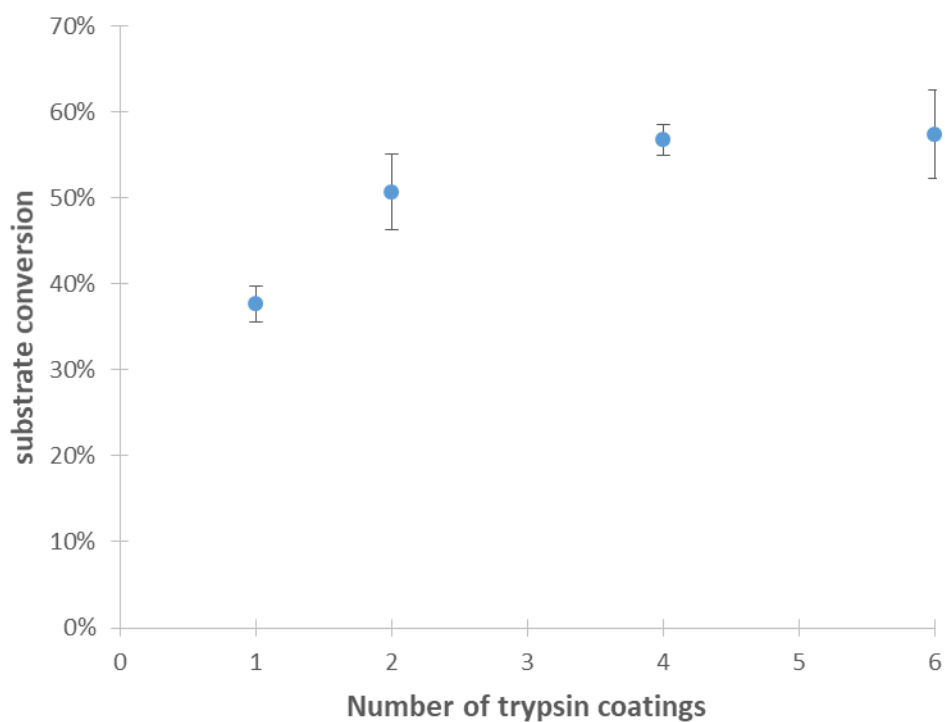
F-2. ábra: Az áramlási sebesség változtatásának hatása a keveredésre egy $25 \mu\text{m}$ széles csatorna esetén [135*]. A diagramok a 15. ábrán bemutatott koncentrációeloszlásokat szemléltetik. Minden egyéb paraméter megegyezik a 15. ábrán lévőkkel.



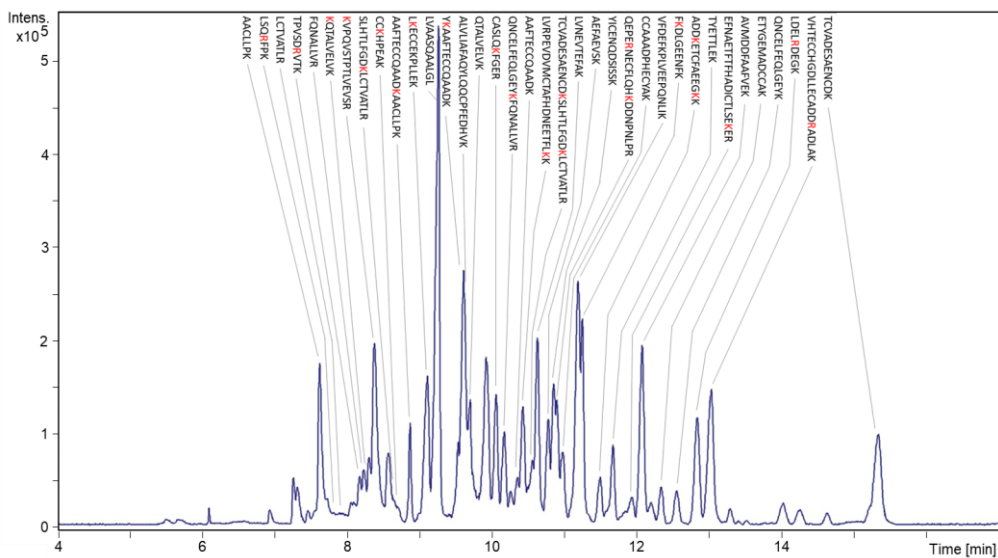
F-3. ábra: Egy kanyarulat hatása az elegyedésre ($ID = 100 \mu\text{m}$ $L = 20 \text{ mm}$). Kék vonalak jelzik a metszeti kép készítésének pozícióját, melyek pontos helye az ábra bal oldalán van megjelenítve. A jobb oldali diagramok a csatorna keresztmetszete mentén mutatják a koncentráció-változást, a feltüntetett értékek a csatorna két oldala között kialakult koncentráció-különbségeket jelzik az adott pozícióban [135*]. Minden egyéb paraméter megegyezik a 14. ábránál leírtakkal.

	inlet	művelet	idő	nyomás
1	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	10 s	50 mbar
2	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	10 s	50 mbar
	inlet BGE	várakozás	60 s	-
3	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	3 s	50 mbar
	inlet BGE	várakozás	60 s	-
	inlet BGE	nyomás	7 s	50 mbar
4	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	8 s	50 mbar
5	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	30 s	15 mbar
6	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	4×2 s	50 mbar
7	minta	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	nyomás	2 s	50 mbar
	inlet BGE	várakozás	60 s	-
	inlet BGE	nyomás	6 s	50 mbar

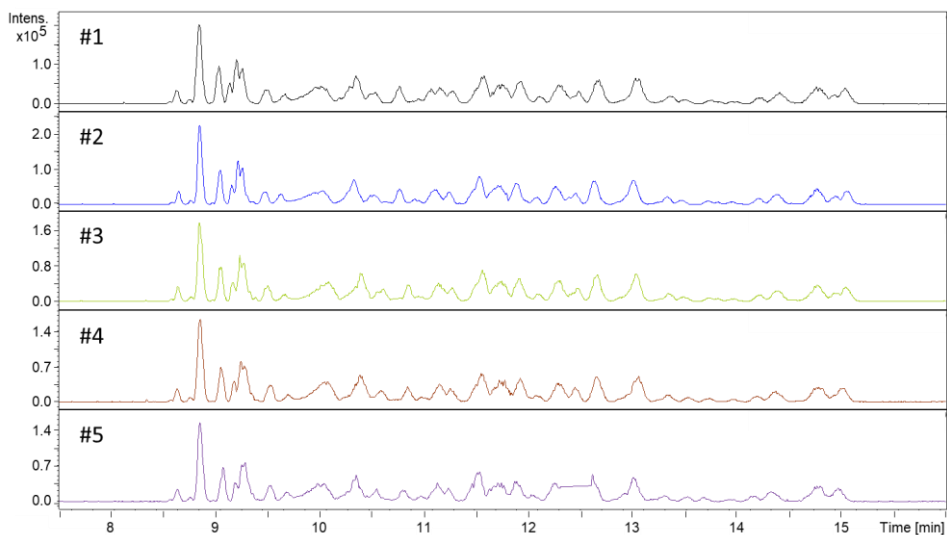
F-4: A 24. ábrán bemutatott kísérleteknél alkalmazott mintamozgatási paraméterek.



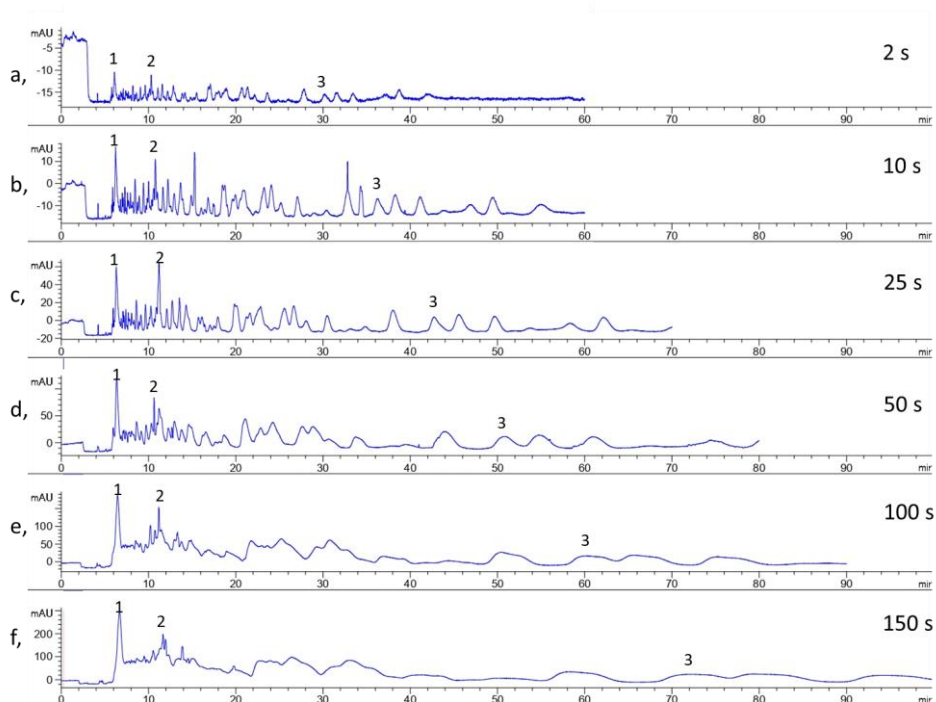
F-5 ábra.: A tripszinezési művelet ismétlésének hatása [145*].



F-6 ábra: HSA in-line emésztésével kapott elektroferogram a beazonosított peptidekkel. A hasítatlan kötéseket pirossal jelöltem [145*].



F-7. ábra: a CE módszer ismételtettségének vizsgálata. Minta: oldatban emésztett HSA. A kapilláris nem tartalmazott tripszinezett szakaszt. Minden egyéb mérési körülmény megegyezik a 25. ábránál leírtakkal.



F-8. ábra: Nem sómentesített HSA emésztmények CZE-UV peptidtérképei növekvő injektálási idővel. Hidrodinamikus injektálás: 50 mbar × (a) 2 s; (b) 10 s; (c) 25 s; (d) 50 s; (e) 100 s and (f) 150 s. Minden egyéb parameter megegyezik a 29. ábránál leírtakkal.

Peptid	GRAVY érték
K.QEPER.N	-3.32
K.PKHK.V	-3.15
R.DAHK.S	-2.20
K.HPEAK.R	-2.08
R.YTK.K	-1.97
K.LQEK.T	-1.78
K.FGER.A	-1.40
K.ADDKETCFEEGK.K	-1.35
R.LSQR.F	-1.25
K.TPVSDR.V	-1.15
R.NECFLQHK.D	-1.06
K.SEVAHR.F	-1.00
R.NLGK.V	-1.00
K.ASSAK.Q	-0.38
K.PLLEK.S	-0.28
K.SLHTLFGDK.L	-0.23
K.VFDEFK.P	-0.18
K.DVCK.N	-0.18
K.CASLQK.F	-0.02
R.ADLAK.Y	0.00
K.CCK.H	0.37
R.HPDYSVLLLLR.L	0.45

F-9. ábra: Sómentesített HSA emésztményekben nem beazonosított peptidek.

11. Publikációs jegyzék

Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos közlemények

1. C. Nagy, A. Kecskemeti, A. Gaspar, Fabrication of immobilized enzyme reactors with pillar arrays into polydimethylsiloxane microchip, *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1108, 70-78.
2. C. Nagy, R. Huszank, A. Gaspar, Study of the geometry of open channels in a layer-bed-type microfluidic immobilized enzyme reactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413, 6321-6332.
3. C. Nagy, R. Szabo, A. Gaspar, Development of an in-line enzyme reactor integrated into a capillary electrophoresis system, *Molecules*, 2021, 26, 5902.
4. C. Nagy, R. Szabo, A. Gaspar, Microfluidic immobilized enzymatic reactors for proteomic analyses—recent developments and trends (2017–2021), *Micromachines*, 2022, 13, 311.

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó tudományos közlemények

1. 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 - Clinical Applications*, 2017, 11 (11-12)
2. M. Andrasi, B. Pajaziti, B. Sipos, C. Nagy, N. Hamidli, A. Gaspar, Determination of deamidated isoforms of insulin using capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2020, 1626, 461344.
3. Kecskemeti, C. Nagy, P. Biro, Zs. Szabo, I. Pocsi, T. Bartok, A. Gaspar, Analysis of fumonisin mycotoxins with capillary electrophoresis – mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants – Part A*, 2020, 37, 1553-1563.
4. C. Nagy, A. Pesti, M. Andrasi, G. Vasas, A. Gaspar, Determination of artemisinin and its analogs in *Artemisia annua* extracts by capillary electrophoresis – mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 202, 114131.

5. N. Hamidli, M. Andrasi, C. Nagy, A. Gaspar, Analysis of intact proteins with capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry using uncoated and coated capillaries, *Journal of Chromatography A*, 2021, 1654, 462448.
6. C. Nagy, M. Andrasi, N. Hamidli, Gy. Gyemant, A. Gaspar, Top-down proteomic analysis of monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography Open*, 2022, 2, 100024.
7. N. Hamidli, B. Pajaziti, M. Andrasi, C. Nagy, A. Gaspar, Determination of human insulin and its six therapeutic analogues by capillary electrophoresis – mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2022, 1678, 463351.
8. J. Borrego, M.U. Naseem, A.N.A. Sehgal, L.R. Panda, K. Shakeel, A. Gaspar, C. Nagy, Z. Varga, Gy. Panyi, Recombinant Expression in *Pichia pastoris* System of Three Potent Kv1.3 Channel Blockers: Vm24, Anuroctoxin, and Ts6, *Journal of Fungi*, 2022, 8, 1215.
9. M. Andrasi, Gy. Gyemant, Zs. Sajtos, C. Nagy, Analysis of Sugars in Honey Samples by Capillary Zone Electrophoresis Using Fluorescence Detection, *Separations*, 2023, 10, 150.

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

1. Nagy Cynthia
Könnyminták fehérjetartalmának tripszines bontása mikrofluidikai csipben
Intézeti TDK konferencia, 2016. november
2. Nagy Cynthia
Könnyminták fehérjetartalmának tripszines bontása mikrofluidikai csipben
OTDK, 2017. március
3. 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.

4. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Tryptic digestion of tear samples using a microfluidic enzyme reactor
17th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2017. július 2-8., Ohrid, Macedónia
5. Kecskeméti Ádám, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing immobilized trypsin for rapid protein digestion
17th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2017. július 2-8., Ohrid, Macedónia.
6. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Characterization of a microfluidic enzyme reactor for the rapid proteolysis of human tear samples
14th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 2017. október 8-11., Veszprém
7. Kecskeméti Ádám, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Fehérjék bontására alkalmas enzimreaktorok fejlesztése mikrofluidikai csipekben
Analitikai Napok 2018, április 23-24, Balatonszemes
8. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Advancements in developing microfluidic chips with increased specific surface area for proteomic applications
19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2019. július 8-13., Suior, Románia
9. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Mikrofluidikai enzimreaktorok kifejlesztése proteomikai alkalmazásokhoz
Fiatal Analitikusok XXVII. Előadójelentése, 2020. november 27., online
10. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Accelerating proteolysis with immobilized microfluidic enzymatic reactors
MBKE Proteomika Szakosztály, „Tanuljunk egymástól” online miniszimpozium, 2021. május. 19.
11. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Immobilized microfluidic enzymatic reactor with pillar array structure for the rapid digestion of proteins
V4 Symposium Flow Analysis & Capillary Electrophoresis (FA&CE),
2021. június 28 – július 1., online
12. Gáspár Attila, Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Kecskeméti Ádám
Microfluidic enzyme reactors for fast protein digestion
V4 Symposium Flow Analysis & Capillary Electrophoresis (FA&CE),
2021. június 28 – július 1., online

13. Gáspár Attila, Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Huszánk Róbert, Kecskeméti Ádám
Fehérjék bontása mikrofluidikai enzimreaktorokban proteomikai alkalmazásokhoz
 METT25 - Magyar Elválasztástudományi Társaság Jubileumi Konferenciája, 2021. október 18-20., Egerszalók
14. Nagy Cynthia
Mikrofluidikai enzimreaktorok fejlesztése proteomikai alkalmazásokhoz
 MTA Szerves- és Gyógyszeranalitikai Munkabizottság Előadóülése, 2021. november 26., online
15. Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Huszánk Róbert, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Development of immobilized enzymatic microreactors for bottom-up proteomic studies
 20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2022. június 24-30., Pécs
16. Narmin Hamidli, Melinda Andrasi, Blerta Pajaziti, Cynthia Nagy, Attila Gaspar
Intact protein analysis by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry
 20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2022. június 24-30., Pécs
17. Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Huszánk Róbert, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorok kialakítása bottom-up proteomikai alkalmazásokhoz
 52. Kromatográfiás továbbképző tanfolyam, 2022. június 27-29., Szeged
18. Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Huszánk Róbert, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Development of immobilized enzymatic microreactors for bottom-up proteomic studies
 33rd International Symposium on Chromatography, 2022. szeptember 18-22., Budapest
19. Nagy Cynthia, Andrasi Melinda, Gáspár Attila
Questioning the significance of sample clean-up prior to CZE peptide mapping studies
 39th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis, 2023. május 21-24., Tallahassee, Florida, Egyesült Államok

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek

1. 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, 2017. március 26-29., Noordwijkerhout, Hollandia
2. 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, 2017. június 18-22., Prága, Csehország
3. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Tryptic digestion of tear samples using a microfluidic enzyme reactor
17th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2017. július 2-8., Ohrid, Macedónia
4. Kecskeméti Ádám, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Characterization of a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip containing adsorbed trypsin for rapid protein digestion
11th Balaton Symposium, 2017. szeptember 6-8., Siófok
5. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Development of microfluidic chips with increased specific surface area
18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2018. június 25-30 Révkomárom, Szlovákia
6. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Nagy fajlagos felületű enzimreaktorok kifejlesztése polidimetilsziloxánból készült mikrocseppekben
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2018. november 8-10., Tapolca
7. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Nagy fajlagos felületű enzimreaktorok kifejlesztése polidimetilsziloxánból készült mikrocseppekben
I.FKF szimpózium, 2019. április 3-5., Debrecen
8. Nagy Cynthia, Kecskeméti Ádám, Gáspár Attila
Development of microfluidic chips with increased specific surface area for proteomic applications
12th Balaton Symposium, 2019. szeptember 11-13., Siófok
9. Szabó Ruben, Nagy Cynthia, Gáspár Attila
Development of an in-line enzyme reactor integrated into capillary electrophoresis system
V4 Symposium Flow Analysis & Capillary Electrophoresis (FA&CE), 2021. június 28 – július 1., online

10. Nagy Cynthia, Huszánk Róbert, Gáspár Attila
Mikrofluidikai csipek csatornageometriájának vizsgálata proteomikai alkalmazásokhoz
METT25 - Magyar Elválasztástudományi Társaság Jubileumi Konferenciája, 2021. október 18-20., Egerszalók
11. Nagy Cynthia, Szabó Ruben, Gáspár Attila
Development of an in-line enzymatic reactor for bottom-up proteomic studies
38th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis, 2022. július 3-6., Liège, Belgium
12. Andrási Melinda, Blerta Pajaziti, Sípos Bettina, Nagy Cynthia, Narmín Hamidli, Gáspár Attila
Study of the Degradation of Human Insulin
33rd International Symposium on Chromatography, 2022. szeptember 18-22., Budapest