

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fehérjék bontására alkalmas enzimreaktorok
fejlesztése mikrofluidikai csipekben**

Kecskeméti Ádám

Témavezető: Dr. Gáspár Attila



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Rövidítések

AFM	atomerő mikroszkópia
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
FA	hangyasav
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
IMER	immobilizált enzimreaktor
LBL	layer-by-layer (adszorpció)
LC	folyadékkromatográfia
MS	tömegspektrometria
NHS	N-hidroxiszukcinimid
PDMS	poli(dimetilsziloxán)
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SPR	felületi plazmon rezonancia

Bevezetés és célkitűzés

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

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

A mikrofluidikai kutatások fő célja a laboratóriumi eszközök miniatürizálása (*lab-on-a-chip*) és az így nyert eszközök fejlesztése, alkalmazása. Egy-egy mikrofluidikai csip előállítása olcsón és rutinszerűen kivitelezhető poli(dimetilsziloxán)-ból (PDMS), továbbá segítségükkel egyszerre több laboratóriumi művelet is végezhető egymást követően vagy párhuzamosan. Használatuk akkor célszerű amikor a vizsgálandó minta korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre (akár $<1 \mu\text{L}$), pl. egyes klinikai minták vizsgálatakor.

Kutatómunkám során azt a célt tűztem ki, hogy olyan, immobilizált tripszint tartalmazó enzimreaktorokat készítsek, melyek segítségével

nagyságrendekkel gyorsabb fehérjebontást lehet végezni, ami nagyban csökkentheti a fehérjék analíziséhez szükséges időt. Annak érdekében, hogy az IMER-ek kis térfogatú minták esetén is alkalmazhatóak legyenek, fontosnak találtam az IMER-ek mikrofluidikai eszközökbe integrálását. Ezen megfontolások alapján két típusú reaktort készítettem eltérő immobilizálási stratégiával, egy spontán adszorpción alapuló szerpentin alakú IMER-t és egy kovalensen rögzített tripszint tartalmazó töltetes IMER-t.

Alkalmazott módszerek és készülékek

A kétféle IMER elkészítéséhez eltérő mintázatú mikrofluidikai csipeket készítettem PDMS-ből, lágy litográfias technikával. Az adszorbeált tripszines IMER csatornája szerpentin alakú, 100 μm széles, 35 μm magas és 20 cm hosszú, amelyből 8-at helyeztem el egy csipen, míg a töltetes IMER csatornája 1 mm széles, 35 μm magas és 1 cm hosszú és egy csipre 9 db ilyen csatornát integráltam párhuzamosan. A folyadékok áramoltatásához perisztaltikus pumpát használtam (IPC, Ismatec, Cole-Palmer, IL, USA). A pumpához csatlakozó csövek 0,25 mm belső átmérőjűek voltak (Tygon, Cole-Palmer, IL, USA).

A reaktorok hatékonyságát különböző típusú fehérjeminták emésztésével vizsgáltam. Az emésztést megelőzően minden fehérjemintát előkezelttem, melynek során a következő reagenseket alkalmaztam: 8 M karbamid – a fehérje szerkezetének kitekeréséhez; 100 mM ditioneitol – a diszulfidhidak redukálásához; 200 mM jódiacetamid – a redukált diszulfidhidak alkilezéséhez. A mintát 25 mM NH_4HCO_3 oldattal hígítottam, hogy a karbamid koncentrációja 1 M alá csökkenjen (a tripszin szerkezetét ne bontsa meg), ez a puffer biztosította az emésztéshez szükséges optimális pH-t is (pH=7,8). Könnyminták emésztése esetén a mintavétel standard módon, kapillárisal való mintavétellel történt. Oldatban emésztés esetén 50:1 (m:m) fehérje:tripszin arányt alkalmaztam, majd a mintákat 37 °C-on inkubáltam 16 órán át. Az IMER-ekkel való emésztés során az előkészített fehérjemintát a reaktoron átáramoltattam, mely a szerpentin alakú

IMER esetén ~1 perccel, a töltetes IMER esetén ~10 s-et vett igénybe. Az emésztés leállításához FA-t alkalmaztam 0,1% koncentrációban. A minták sómentesítéséhez C18-as töltettel rendelkező pipettahegyet használtam (ZipTip® C18, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Cork, Írország).

Az adszorpcióval történő immobilizálás esetén a tripszint a mikrofluidikai csip csatornájának belső falán adszorbeáltattam. A 20 mg/mL koncentrációjú tripszinoldatot, mely 20 mM CaCl_2 -t és 1 mM HCl-t is tartalmazott a tripszin önemésztésének visszaszorítására, frissen készítettem minden alkalommal. Ezt az oldatot 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ sebességgel áramoltattam keresztül a csatornán 10 percig, majd 25 mM NH_4HCO_3 -tal való mosással eltávolítottam az oldatban maradt tripszint a csatornából és kondicionáltam a reaktort a megfelelő pH-ra, mely után következhetett az emésztés, 0,65 $\mu\text{L}/\text{min}$ sebességgel áramoltatva a mintát, szobahőmérsékleten. A tripszinréteg regenerálható a korábban felvitt réteg 50 mM nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) történő lemosásával és egy új réteg kialakításával. (A tripszinréteget csak felületaktív anyagokkal vagy szerves oldószerekkel lehet a PDMS felületéről eltávolítani.)

A tripszin kovalens rögzítését EDC/NHS módszerrel végeztem aminoszilikizált szilika részecskékre. A reakció 5 órás időtartama alatt a tripszin karboxilcsoportjait a karbodiimid aktiválja és a részecskék felületén lévő aminoszilikizációval amidkötést képeznek. Az immobilizálási reakció után a szuszpenzióból eltávolítottam a szabad formában maradt tripszint többszöri alapos öblítést, centrifugálást és dekantálást végezve. A részecskéket 1 mM HCl-t, 20 mM CaCl_2 -t és 0,4 mg/mL benzamidint tartalmazó oldatban tároltam. A reaktor kialakításakor a részecskékből töltetet alakítottam ki a PDMS csip csatornáiban, a részecskéket a csatorna végén elhelyezett szűkületek segítségével tartottam vissza. A töltet tömörítését 25 mM NH_4HCO_3 -tal végeztem, ami kondicionálta is azt az emésztéshez szükséges optimális pH=7,8-ra. Az emésztés szobahőmérsékleten, az előkészített fehérjeminta tölteten való átáramoltásával történt 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ sebességgel.

A tripszin adszorpciójának vizsgálatához atomerő mikroszkópiát (AFM, Veeco diCaliber) és felületi plazmon rezonancia spektroszkópiát használtam (SPR, Nicolet™ 6700 FT-IR, SPR™ 100 modul, Thermo Electron Co. Waltham, MA, USA). Kísérleteimhez az SPR arany szenzorlapkáját 0,1% (m/V) hexános PDMS oldattal vontam be spincoater segítségével, így egy nagyon vékony (~100 nm vastag) PDMS réteget képeztem a szenzor felületén.

CZE peptidterkép vizsgálatokat egy Agilent 7100 típusú kapilláris elektroforézis készülékkel végeztem (Agilent, Waldbronn, Németország). Méréseimnél hidrodinamikus injektálást alkalmaztam (100 mbar·s), a mintákat a kapilláris anód felőli végénél injektáltam. A CZE elválasztásokat 80 cm hosszú, 50 µm belső átmérőjű buborékcélás kvarckapillárisban hajtottam végre (Agilent). Az elválasztás során 30 kV feszültséget használtam. A detektálás a kapillárison történt diódasoros detektorral, 200 nm-en. Az elválasztáshoz 25 mM foszfát puffert (pH=7,0) használtam.

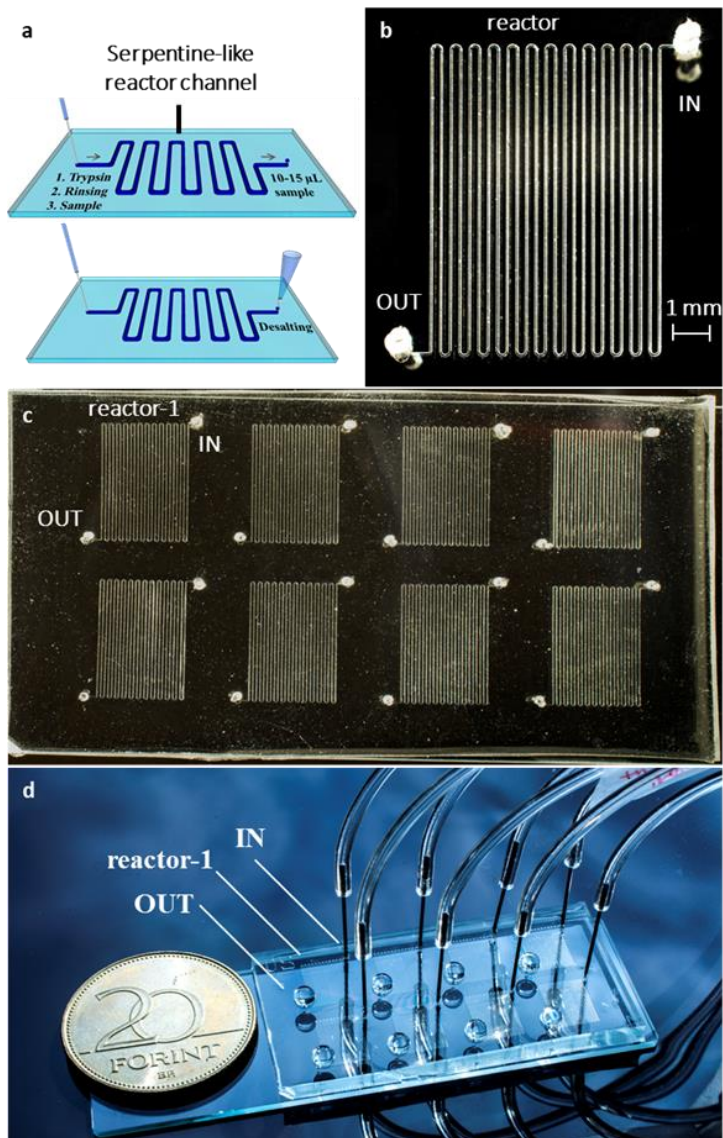
Új tudományos eredmények

1. Elsőként alkalmaztam PDMS felületen lejátszódó spontán adszorpciót enzim immobilizálásra, és ennek segítségével egy egyszerű IMER-t fejlesztettem ki.

Noha az irodalomban szerepelnek enzimek adszorpcióján alapuló IMER-ek, ezek általában vagy PVDF membránra történő adszorpciót írnak le – amely esetben a membrán csipbe integrálása jelenthet problémát – vagy LBL adszorpciót hajtanak végre, amikor ellentétes töltésű rétegeket visznek fel egymás után és így az adszorpció hajtóereje elektrosztatikus kölcsönhatás.

Az említett IMER fejlesztésénél az volt a célom, hogy megalkossam a létező legegyszerűbben kialakítható enzimreaktort. Ezt úgy sikerült elérni, hogy egy PDMS csipben egy hosszú, szerpentin alakú csatornát alakítottam ki, amelyen csak keresztül kellett áramoltatni a tripszin oldatot annak immobilizálásához. Habár köztudott, hogy a PDMS kiváló adszorbens, ezt a tulajdonságát eddig nem használták ki enzimek immobilizálására, így ez az első olyan munka, melyben ez

az egyszerű módszer használatos enzim immobilizálásra. Az IMER egyszerűségét az is jól mutatja, hogy az adszorpciós felület maga a csip anyaga (a csatorna belső fala), így nem volt szükség valamilyen szilárd hordozó vagy felületi réteg kialakítására az immobilizáláshoz (1. ábra).



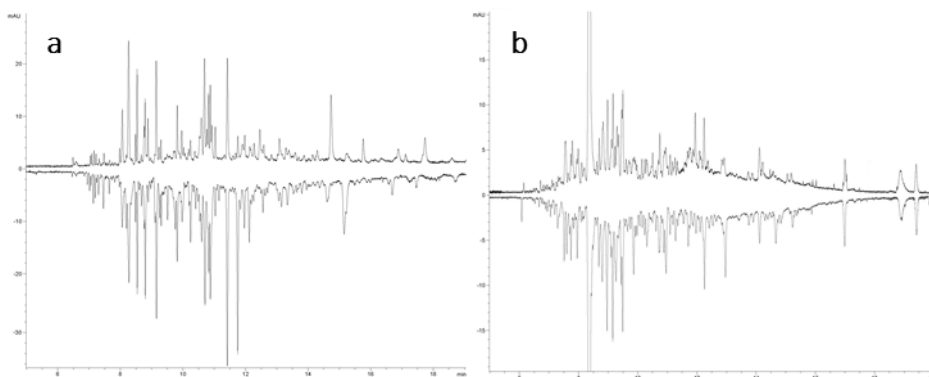
1. ábra: (a) A tripszin adszorpciójához szükséges munkafolyamat sematikus ábrája a szerpentinnes reaktor esetén. Fényképek a (b) 20 cm hosszú, 100 μm széles és 35 μm magas csatornamintázatról, amiből akár (c) 8 db is elhelyezhető egy csipen, ill. (d) használható emésztésre egyidejűleg.

2. Bizonyítottam, hogy a tripszin gyakorlatilag irreverzibilisen adszorbeálódik a PDMS felületen. Koncentrációfüggő SPR és CZE enzimaktivitás vizsgálatokkal igazoltam, hogy az adszorbeált tripszin többféle állapotban lehet jelen a PDMS felületen, melyek aktivitásai eltérnek.

Az adszorpció jelenségének tanulmányozását AFM és SPR technikák segítségével végeztem el. Megállapítottam, hogy a tripszin gyakorlatilag irreverzibilisen kötődik a PDMS felülethez, amelyet csak detergensok vagy szerves oldószerek segítségével lehetett a felületről eltávolítani. Továbbá azt is igazoltam, hogy az adszorbeált tripszin mennyisége (és ezzel összefüggésben a reaktor aktivitása) függ a tripszin oldat koncentrációjától, töményebb tripszin oldatból a molekulák egymáshoz közelebb – „sűrűbben” – adszorbeálódnak. A CZE-vel végzett enzimstabilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a tripszin ~2 óráig marad aktív, majd fokozatosan elveszti aktivitását. Ez vélhetően a hidrofób PDMS felülettel való erős kölcsönhatásából eredő szétterülés következménye. Ezen tapasztalatok alapján a tripszin PDMS felületen való adszorpciójának mechanizmusára az ún. többállapot kinetikai modellt javasoltam.

3. Igazoltam, hogy a PDMS felületén adszorbeált tripszint tartalmazó IMER-rel nagyságrendekkel gyorsabban lehet végrehajtani fehérjék emésztését az oldatban történő emésztéshez képest.

A reaktor emésztésének reprodukálhatóságát és hatékonyságát különböző fehérjeminták (mioglobin, lizozim, hemoglobin, BSA, könny – utóbbi kettő látható a 2. ábrán) emésztésével vizsgáltam. Az emésztés minden esetben megfelelő volt, az oldatban emésztéssel szemben 16 óra helyett ~1 perc alatt sikerült így megemésztetni a fehérjéket. A BSA peptidjeinek migrációs idői kiváló reprodukálhatóságot mutattak (RSD% <1%). Az egyes peptidterképek hasonlósága és az LC-MS/MS meghatározások igazolták, hogy a kétféle emésztés során keletkező peptidek többsége megegyezik.

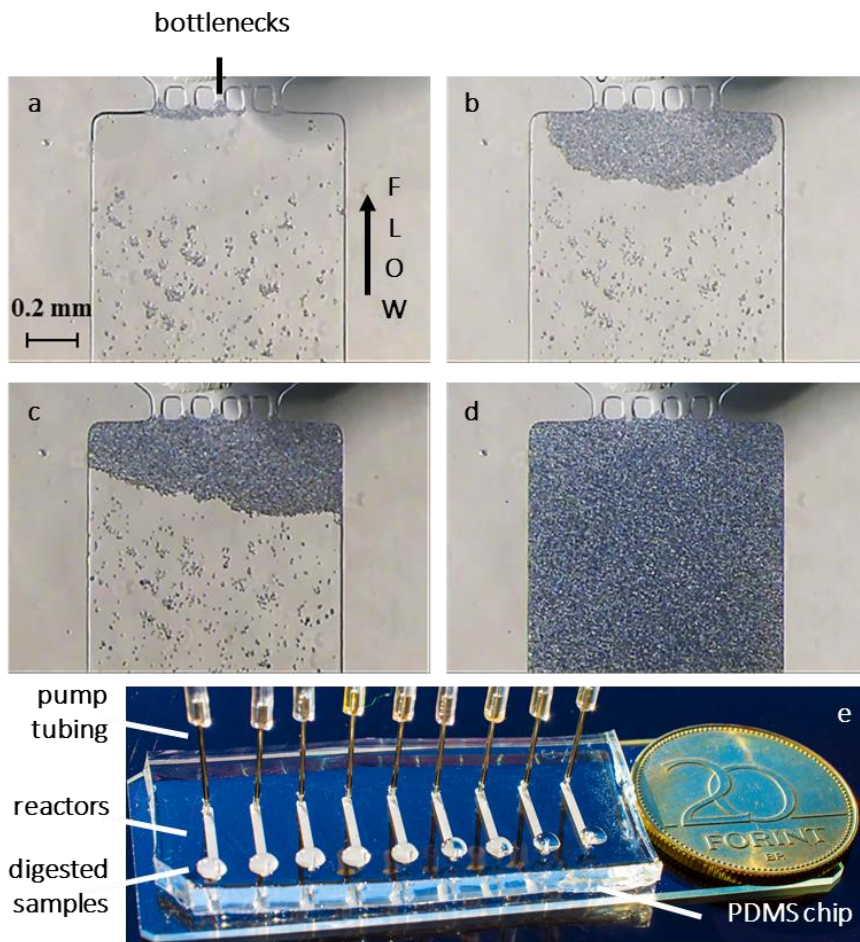


2. ábra: Emésztett (a) BSA és (b) könny minta CZE elektroferogramjai IMER-es emésztést (felső elektroferogram), ill. oldatban emésztést követően (tükröztetett elektroferogram). A minták az (a) esetben sómentesítettek.

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

4. Kifejlesztettem egy hagyományos szilika részecskékhez – mint szilárd hordozóhoz - kovalensen rögzített tripszint tartalmazó IMER-t. Igazoltam, hogy ez az IMER legalább 2 hónapig megőrzi aktivitását.

Kovalens immobilizálással sikerült egy olyan IMER-t kialakítani (3. ábra), amely az adszorbeált tripszint tartalmazó IMER-hez képest jobb stabilitással bírt. Ezt később igazoltam is, hiszen az IMER 2 hónapos tárolást követően is aktív maradt, ill. az aktivitást az sem befolyásolta, hogy milyen módon tároltam (a mikrofluidikai csipben töltésként 4°C -on vagy a tripszines részecskék szuszpenzióját fagyasztva -20°C -on).

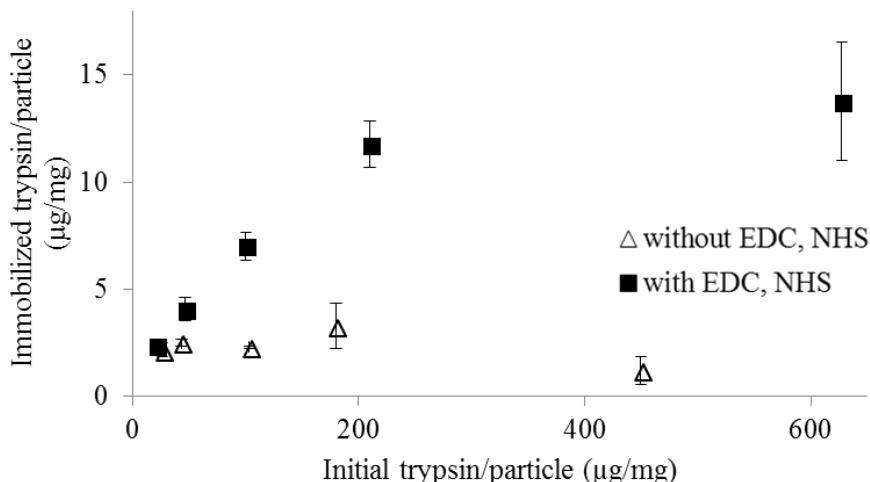


3. ábra: (a-d) Optikai mikroszkóp felvételek egy tripszinnel borított szilika részecskékből kialakuló töltetről. (e) Fénykép 9 fehérjeminta egyidejű emésztéséről, több reaktor egy csipen való elhelyezésével.

5. A tripszin immobilizálási reakcióelegyen meghatároztam a tripszin/részecske optimális arányát a felület megfelelő telítése érdekében.

Habár a kovalens kötés létrehozásáért felelős reagensek arányait irodalomból vettem (az EDC/NHS immobilizálás általánosan használatos eljárás), a tripszin/részecske arányát a kiindulási elegyen optimalizáltam, s az optimális értékkel dolgoztam kísérleteimben. Ezzel a kezdeti körülménnyel sikerült 10-13 μg tripszint immobilizálnom 1 μg részecskén (4. ábra), ami összemérhető más munkákban feltüntetett mennyiségekkel. A meghatározás során – legjobb

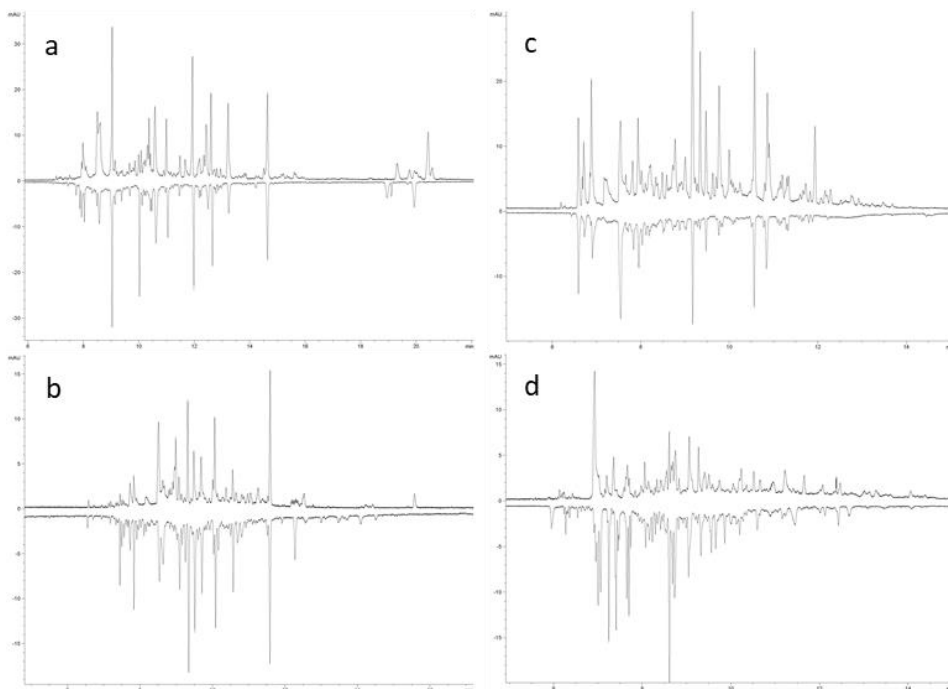
tudásom szerint – elsőként használtam azt az eljárást, amikor az amidkötéssel kovalensen kötött enzimet azáltal mobilizáltam, hogy lúggal hidrolizáltam az enzimmel kötésben lévő szilárd hordozót.



4. ábra: A kovalensen kötött tripszin felületi borítottságának függése az immobilizálási reakció kezdeti (bemért) tripszin/részecske arányától (fekete négyzetek), ill. kontroll mérés EDC és NHS reagensek nélkül (fehér háromszögek).

6. Igazoltam, hogy a kifejlesztett töltetes IMER segítségével a fehérjék hatékony és reprodukálható emésztése akár 10 s alatt is elérhető.

Megvizsgáltam a CZE analízisnek, az emésztésnek, a töltet kialakításának és az immobilizálásnak a peptidterképek felvételének reprodukálhatóságára gyakorolt hatását, melynek során minden esetben jó reprodukálhatóságokat kaptam a peptidek migrációs időire. Nem tapasztaltam jelentős különbséget az IMER-rel történő emésztés és az oldatban emésztés között többféle fehérjeminta esetén sem (mioglobin, lizozim, hemoglobin, BSA, humán szérum – utóbbi kivételével az 5. ábrán láthatók). Az emésztési idő csupán ~10 s volt, szemben az oldatban történő emésztésre jellemző 16 órával.



5. ábra: Négyféle emésztett fehérje CZE elektroferogramjai: (a) mioglobin, (b) lizozim, (c) hemoglobin és (d) BSA. A felső elektroferogramok mutatják az oldatban emésztéssel kapott minták, a tükröztetett elektroferogramok pedig az IMER-es emésztéssel kapott minták analíziseit. A minták sómentesítettek.

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

Az eredmények hasznosítási lehetőségei

A proteomika dinamikusan fejlődő tudományterület, a fehérjék analízise előreláthatólag egyre nagyobb jelentőségűvé fog válni a közeljövőben, elsősorban a fehérjealapú gyógyszerek elterjedése miatt. Mivel a proteomika legalapvetőbb módszerei – peptid térkép vizsgálat, *shotgun* (sörétespuska) proteomika – a fehérjék enzimatis emésztésén alapszanak, előnyös és célravezető olyan eszközök fejlesztése, amely ezen lépéshez szükséges időt nagyságrendekkel csökkenteni képes. Mivel a kifejlesztett IMER-ek pontosan erre képesek, így felhasználásuk előnyös lehet fehérjeemésztési célra. Az oldatban emésztéshez szükséges idő használatukkal lecsökkenthető 16 órától 1 percre, ill. 10 s-re. A töltetes IMER legalább 2 hónapig megőrzi aktivitását, ez idő alatt akár többször is felhasználható. Alternatívaként, mindkét IMER tekinthető egyszerhasználatos, eldobható eszköznek, hiszen az előállítási költségük minimális, továbbá így kizárható a minták közti keresztzennyezés lehetősége.

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

Tudományos közlemények

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

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

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

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



Nyilvántartási szám: DEENK/179/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kecskeméti Ádám
Neptun kód: CKNR71
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056883

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

1. **Kecskeméti, Á.**, Gáspár, A.: Particle-based immobilized enzymatic reactors in microfluidic chips.
Talanta. 180, 211-228, 2018. ISSN: 0039-9140.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.043>
IF: 4.162 (2016)
2. **Kecskeméti, Á.**, Bakó, J., Csarnovics, I., Csősz, É., Gáspár, A.: Development of an enzymatic reactor applying spontaneously adsorbed trypsin on the surface of a PDMS microfluidic device.
Anal. Bioanal. Chem. 409 (14), 3573-3585, 2017. ISSN: 1618-2642.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-017-0295-9>
IF: 3.431 (2016)
3. **Kecskeméti, Á.**, Gáspár, A.: Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion.
Talanta. 166, 275-283, 2017. ISSN: 0039-9140.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.060>
IF: 4.162 (2016)
4. **Kecskeméti, Á.**, Nagy, C., Csősz, É., Kalló, G., Gáspár, A.: The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples.
Proteom. Clin. Appl. 11 (11-12), 1-9, 2017. ISSN: 1862-8346.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201700055>
IF: 3.814 (2016)
5. Gáspár, A., **Kecskeméti, Á.**, Gomez, F. A.: Use of surface plasmon resonance to study the adsorption of detergents on poly(dimethylsiloxane) surfaces.
Electrophoresis. 34 (8), 1249-1252, 2013. ISSN: 0173-0835.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200573>
IF: 3.161





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

6. **Kecskeméti, Á., Gáspár, A.:** Particle-based liquid chromatographic separations in microfluidic devices.

Anal. Chim. Acta. 1021, 1-19, 2018. ISSN: 0003-2670.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.064>

IF: 4.95 (2016)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,68

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
18,73**

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

Debrecen, 2018.05.25.

