

Tripszin immobilizálása többféle felületen fehérjék gyors emésztéséhez, peptidtérkép vizsgálathoz

OTDK pályamunka

Kecskeméti Ádám, II. Vegyész MSc

Témavezető: Dr. Gáspár Attila



Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi előzmények.....	5
2.1. Peptid térkép vizsgálat.....	5
2.2. Fehérjék immobilizálási lehetőségei	8
2.3. Immobilizált enzimreaktorok	12
3. Kísérleti körülmények.....	16
3.1. Felhasznált vegyszerek, készülékek	16
3.2. Peptid térkép vizsgálatokhoz alkalmazott elválasztási és detektálási módszerek	18
3.3. Reaktorok kialakítása	20
4. Eredmények	21
4.1. Adszorpció vizsgálata felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópiával.....	21
4.2. Vizsgálati fehérjeminták.....	22
4.3. Reaktortípusok összehasonlítása	23
4.4. Tripszin aktív centrumának védelme az immobilizálás során.....	24
4.5. Az immobilizált tripszin stabilitásának és az emésztések reprodukálhatóságának vizsgálata	25
4.6. Oldatban emésztés és tölteten való emésztés összehasonlítása	27
5. Összefoglalás	29
6. Irodalomjegyzék	30
7. Köszönetnyilvánítás	32

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a miniatürizálási trendek forradalmasították a számítástechnikai eszközeinket, azonban ezek a törekvések a tudomány más területein is jelen vannak. Így alakult ki a mikrofluidika tudományterülete, mely az utóbbi időben egyre jelentősebbé vált az analitikai kémián belül. A mikrofluidikai eszközök (lab-on-a-chipek vagy mikrofluidikai csipek) alkalmazásának számos előnye van, pl. hogy ezen eszközök kicsik, előállításuk olcsó és kis térfogatú folyadékokkal dolgoznak, emellett a mikrofluidikai csipek kis átmérőjű csatornái lehetővé teszik különböző elektroforetikus technikák alkalmazását (pl. zónaelektroforézis, elektrokratográfia). Mikroreaktorok kialakítása is lehetséges ezen eszközökben, hiszen számos módon lehet nagy felület/térfogat arányt a szilárd felület és az áramoltatott folyadék fázisa között elérni (pl. töltetek, membránok, szol-gél mátrixok alkalmazásával).

Az 1990-es években jött létre a proteomika tudományterülete, mely komplex fehérjeelegyek analízisével foglalkozik. Ezen új tudományág kihívásai közé tartozik a sejtekben található több ezer fehérje elválasztása, ill. az izolált fehérje elsősorban kvalitatív elemzése. Ezen analízishez fontos volt találni olyan eljárásokat, melyek kevés mintát igényelnek, ugyanakkor gyors analízist tesznek lehetővé. Erre lehet megoldás a peptidtérkép vizsgálat (peptide mapping), azonban a standard eljárás időigényes (12 óra), így jelenleg is intenzív kutatások zajlanak ezen peptidtérkép vizsgálat gyorsítására.

A peptidtérkép vizsgálat fehérjék összehasonlításán alapuló kvalitatív meghatározását teszi lehetővé. A klasszikus eljárás szerint a fehérjéket először valamilyen kémiai reagenssel vagy enzimmal (pl. tripszinnel) peptid fragmensekre hasítjuk. Az általunk is használt tripszin egy olyan proteolitikus enzim, mely a fehérjéket a bennük található lizin és arginin aminosavaknál specifikusan hasítja. A hosszú reakcióidő oka, hogy csak alacsony koncentrációban lehet alkalmazni, ugyanis nagyobb koncentrációban számolni kell önméregteliséssel. A keletkező peptidelegeből elkészítjük a peptidtérképet. Erre leggyakrabban tömegspektrometriát (MS) vagy kapilláris elektroforézist (CE) használunk. A peptidtérképek az emésztett fehérjét ujjlenyomatszerűen jellemzik, így összehasonlítás után azonosíthatjuk a mintát.

A fent említett trendeknek megfelelően az analitikai módszerek fejlesztése arra irányul, hogy minél több mintát, minél rövidebb idő alatt tudjunk elemezni. Így célkitűzéseim közt az az elvárás fogalmazódott meg, hogy egy olyan mikroreaktort készítsek, amelyet hatékonyan lehet fehérjék emésztésére használni peptidtérkép vizsgálatokhoz, azaz az

emésztés időtartama jelentősen rövidüljön le a fent említettthez képest. Erre a célra általában immobilizált enzimeket (esetünkben tripszint) használnak.

Immobilizálás során a tripszint valamilyen szilárd felületen rögzítjük. A felületen megkötött tripszint nagy felületi koncentrációban használhatjuk anélkül, hogy önemésztés játszódna le. Így egy nagy felület/térfogat aránnyal rendelkező mikroreaktorban alkalmazva a reakcióidő nagyságrendekkel csökkenhet. A rögzítést többféleképpen érhetjük el, de a leggyakrabban használt technikák az adszorpció, a kovalens rögzítés, ill. a bioaffinitáson alapuló rögzítés. Kutatómunkám során az immobilizált tripszines mikroreaktorok kialakításánál adszorpción és kovalens kötésen alapuló immobilizálási technikákat alkalmaztam.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Peptidtérkép vizsgálat

Köztudott, hogy a fehérjék 20-féle fehérjeépítő aminosavból felépülő biopolimerek. Az aminosavak sorrendjét (aminosav szekvenciáját) nevezzük a fehérjék elsődleges szerkezetének. Az így kialakult peptidlánc konformációját nevezzük másodlagos szerkezetnek. A hosszú láncok a térben háromdimenziós szerkezetet vesznek fel, mely a fehérje harmadlagos szerkezete, ami alapján egy fehérje lehet fibrilláris vagy globuláris. Amennyiben több alegység is található egy fehérjén belül, úgy az alegységek egymáshoz viszonyított helyzete a fehérje negyedleges szerkezete.

A peptidtérkép vizsgálat egy olyan összehasonlításra alapuló teszt, mellyel fehérjék azonosítását lehet elvégezni. Az eljárás során kémiai reagenssel vagy enzimmel peptid fragmensekre hasítjuk a fehérjét, majd a keletkező peptideket elválasztjuk egymástól és detektáljuk őket. Ez történhet lágy ionizációs technikájú tömegspektrometriával (elsősorban mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS) vagy elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS)) vagy kapilláris elektroforézissel. Az így nyert tömegspektrum vagy elektroferogram maga a peptidtérkép, amely a kiindulási fehérjét ujjenyomatszerűen jellemzi. Az összehasonlításra alapuló azonosítás azt jelenti, hogy a fehérjemintákat azonos körülmények között emésztik. Az így kapott peptidtérképek egyezése azt jelenti, hogy a kiindulási fehérjék azonosak. Az eljárás nagy teljesítőképességét mutatja, hogy akár egy aminosavnyi eltérést is ki lehet vele mutatni. Alkalmazása túlmutat a fehérjeazonosításon, hiszen olyan különbségeket is detektálhatunk, ami a fehérje szerkezetének megváltozását, pl. poszttranszlációs módosítást jelenthet. Az efféle módosítások tanulmányozását használja ki az orvostudomány, mivel egy-egy fehérje módosulat betegségek indikátora lehet vagy jelentheti a szervezet válaszát egy gyógyszeres kezelésre^[1,2,3].

A fehérjeminták előkezelése. A megfelelően tisztított fehérjeminták előkezelése azt a célt szolgálja, hogy az emésztés minél hatékonyabb legyen. Első lépésben egy kaotróp anyagot, pl. karbamidot adunk a fehérjeoldathoz (tipikusan 8 M karbamid). Ennek hatására a fehérjemolekula kitekeredik, denaturálódik. Annak érdekében, hogy az enzim az összes hasítási helyhez hozzáférjen, szükséges lehet a diszulfidhidak redukálása és alkilezése, amikhez ditiotreitolt (DTT) és jódacetamidot (IAA) használunk^[4].

Oldatban emésztés körülményei. Egy fehérjeemésztési reakciót, csakúgy, mint bármely más kémiai reakciót, olyan tényezők befolyásolnak, mint a pH, hőmérséklet, reakcióidő, ill. az emésztést végző reagens mennyisége.

1. táblázat: Leggyakoribb peptidkötést hasító reagensok.^[4]

Típus	Reagens	Specifititás
Enzim	Tripszin (EC 3.4.21.4)	Arg és Lys C-terminálisa
	Kimotripszin (EC 3.4.21.1)	Hidrofób aminosavak C-terminálisa
	Pepszin (EC 3.4.23.1 és 2)	Nem specifikus emésztés
Kémiai reagens	Brómcián	Met C-terminálisa
	2-nitro-5-tiocianáto benzoosav	Cys N-terminálisa
	2-jódozo benzoosav	Trp és Tyr C-terminálisa

A reakcióközeg pH-ját érdemes az alkalmazott enzim pH optimumára állítani. Ez az általunk is használt tripszin esetében 8,0-as pH-t jelent. Az elegyet a reakció ideje alatt 37 °C-on termosztáljuk. A reakcióidő viszonylag széles skálán változhat (2-30 óra). Ezt az emésztett fehérje szerkezetének stabilitása határozza meg, leggyakrabban 12 vagy 16 óráig történik az emésztés, ezután a reakciót savanyítással lehet leállítani^[4].

A teljes emésztés tehát időigényes, ennek oka, hogy a hasítást végző reagens mennyiségét minimalizálni kell, hogy ne befolyásolja a peptidterkép mintázatát. (Nagyobb tripszin koncentráció esetén a tripszin önemésztéséből származó peptidek is megjelenhetnének a peptidterképen.) A fehérje:tripszin arány általában 50:1, de ettől eltérően mozoghat szélesebb skálán: 20:1-200:1.

A gyorsaságot jelentősen lehetne növelni a tripszin magasabb koncentrációban történő alkalmazásával, ekkor azonban ki kell küszöbölnünk az önemésztést. Ezt megtehetjük a tripszin immobilizálásával, ugyanis ha az emésztést helyhez kötött formában lévő tripszin végzi, úgy az nem tudja önmagát emészteni (nem fér hozzá a szomszédos molekulához). Fontos azonban, hogy immobilizált tripszin használatkor nagy felület/térfogat arányú rendszert használjunk (ilyenek pl. a kis belső átmérőjű kapillárisok, ill. a mikrofluidikai csipek), így tudjuk ugyanis biztosítani, hogy az oldatban lévő fehérjemolekulák többsége rövid idő alatt találkozzon a felületen immobilizált enzimmel^[5,6,7].

A peptidek elválasztására alkalmazott legfontosabb technikák: fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (RP-HPLC), ioncserés kromatográfia (IEC), hidrofób kölcsönhatású kromatográfia (HIC), poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE), kapilláris elektroforézis

(CE). Munkám során a felsorolt elválasztástechnikai módszerek közül kapilláris elektroforézist alkalmaztam (kapilláris zónaelektroforézis – CZE) fotometriás detektálással.

A peptidek detektálása lágy ionizációs technikájú tömegspektrometriával is lehetséges. Ide tartozik a MALDI-TOF-MS, ill. az ESI-MS. Ezeket a technikákat alkalmazhatjuk a peptidek elválasztása nélkül, így a tömegspektrumon az összes peptidfragmens önálló csúcsként jelentkezik, vagy elválasztástechnikához kapcsolva (2. dimenzióként, pl. CE-MS), amivel az egyes csúcsokhoz tartozó fragmentációs tömegspektrumok felvételével a csúcshoz tartozó peptidet azonosíthatjuk. Elválasztástechnika – MS kapcsolásnál azonban számolni kell a felbontás csökkenésével, ill. hígulással.

2.2. Fehérjék immobilizálási lehetőségei

Napjainkban nagy jelentőséggel bíró területe a biokémiának a fehérjék immobilizálása, hiszen különböző analitikai tesztek alapulnak immobilizált fehérjéken. Ilyen tesztek pl. az orvosdiagnosztikában alkalmazott ELISA (enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat), ill. a szénhidrátok azonosítására szolgáló immobilizált lektint tartalmazó tesztek. Ezen tesztek széleskörű alkalmazása miatt jelenleg is intenzív kutatások folynak e területen, számos immobilizálási technika ismeretes, melyek közül a legfontosabbakat részletezem a továbbiakban.

Az immobilizálási technikák csoportosítása történhet a szilárd hordozó felülete, ill. a kötés jellege alapján.

2. táblázat: Leggyakrabban használt felületek fehérjék (tripszin) immobilizálásához.^[8]

Sík mikrofluidikai csatorna felületek	Szilícium
	Üveg
	PDMS
	Műanyag
	Fém
Háromdimenziós szerkezetű anyagok mikrofluidikai csatornáiban	Töltetes mikroreaktor
	Hidrogél
	Szol-gél
	Porózus polimer monolit
	Membrán
	Papír
	Porózus szilícium

Az immobilizálási felület megválasztásánál a legfontosabb szempontok, hogy milyen típusú reaktort szeretnénk készíteni, ill. milyen jellegű immobilizálási stratégiát akarunk alkalmazni. A reaktor típusának megválasztásánál a legegyszerűbb megoldás, ha az adott mikrofluidikai eszköz anyagát választjuk immobilizálási felületnek. Mivel a legtöbb mikrofluidikai csip alapanyaga műanyag (pl. poli(dimetil-sziloxán) - PDMS), így ez meghatározza a kötés jellegét. Ezeknek a műanyagoknak a felülete inert, nincsenek rajta reaktív csoportok, emiatt kovalens kötés kialakítása nehézkes, a létező módszerek többlépéses komplex reakciók^[6, 9-10]. Azonban a PDMS hidrofóbicitása és porózus jellege miatt a nagyméretű fehérjék gyorsan adszorbeálódnak rá, így adszorpción alapuló immobilizálásra alkalmas.

3. táblázat: Legfontosabb immobilizálási technikák.^[8]

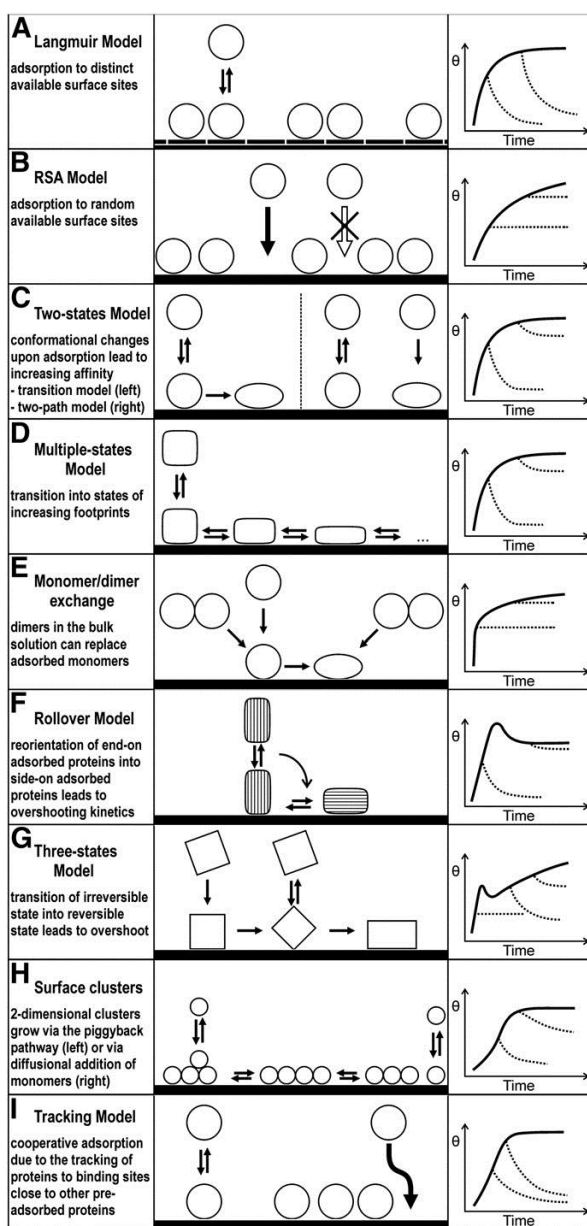
Kötés jellege	Kölcsönhatás jellege - kötés kialakítása
Adszorpció	Elektrosztatikus kölcsönhatás
	Hidrofób kölcsönhatás
	Nem specifikus intermolekuláris kölcsönhatás
Bioaffinitás	Avidin - biotin
	A/G fehérje - antitest
Kovalens kötés	"Glutáraldehydes" módszer
	"Karbodiimides" módszer
	"Epoxidos" módszer
Két vagy több technika kombinálása	Adszorpció - kovalens kötés
	Kovalens kötés - bioaffinitás

Az adszorpción alapuló immobilizálás során a felület és a fehérje között elektrosztatikus, hidrofób kölcsönhatások, van der Waals erők, ill. hidrogénkötések léphetnek fel^[11]. A kölcsönhatások erőssége elsősorban a pH-tól, ionerősségtől és a felület jellegétől függ. A PDMS felületén történő fehérje adszorpció hajtóereje elsősorban a hidrofób kölcsönhatás, az efféle, nem specifikus adszorpció leírására számos kinetikai modellt felállítottak^[12] (1. ábra). A modellek alapján a PDMS felületen az adszorpciót követően lejátszódhat a fehérje (tripszin) kitekeredése, ami az enzimaktivitás csökkenését eredményezheti.

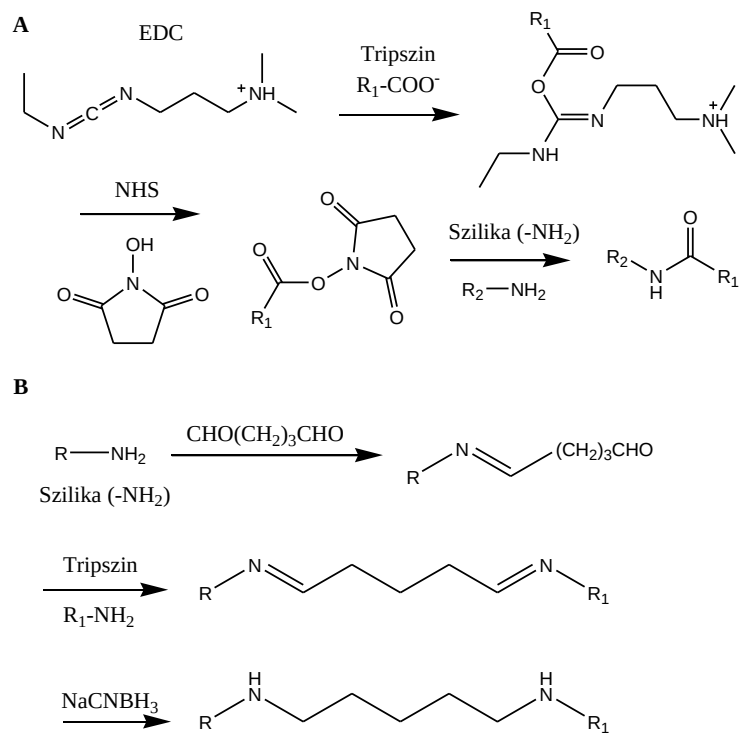
Különböző háromdimenziós anyagok is rendelkezésünkre állnak szilárd hordozóként, ezeknek a nagy felület/térfogat arány kialakításánál van jelentősége. Míg a PDMS csip felületén való adszorpció azt jelentette, hogy egy mikrofluidikai csatorna belső felületét vonjuk be tripszinnel, addig ilyen anyagokkal a csatornákon belül tudunk kialakítani mikroreaktorokat (pl. töltetes mikroreaktor). Ha kovalens kötéssel szeretnénk a mikroreaktor felületén immobilizálni a tripszint, akkor célszerű úgy választani a rendelkezésre álló anyagok közül, hogy az lehetőleg tartalmazzon valamilyen reaktív felületi csoportot, amihez egyszerűen lehet a tripszint kovalensen rögzíteni. Ilyen csoport az amino- vagy karboxilcsoport. A leggyakrabban alkalmazott kapcsolási reakciók a 2. ábrán láthatók.

A bioaffinitáson alapuló immobilizálásnak számos előnye van. Az adszorpciónál erősebb, specifikus rögzítést lehet vele elérni, az enzim rögzítése orientált (aktivitása megmarad)^[7, 13-14]. Az aktivitás megőrzését segíti elő a viszonylag nagyméretű spacer alkalmazása. Így az enzim a felülettől távolabb helyezkedik el, nem játszódhatnak le

fehérjekitekerekedési folyamatok. A rögzítés megfordítható, azaz a körülmények megváltoztatásával a fehérje eltávolítható. A legfontosabb ide tartozó módszer az avidin-biotin kölcsönhatáson alapuló rögzítés. Az avidin egy 66-69 kDa méretű glikoprotein, a biotin vízoldható B₇-vitamin. A köztük kialakuló kötés gyorsan kialakul, szinte érzéketlen a pH-ra, hőmérsékletre, denaturáló ágensekre és proteolízisre. A kötés kialakításakor a rögzíteni kívánt enzimet biotinilezik (pl. NHS-észter segítségével), majd a biotinilezett enzim gyorsan hozzákapcsolódik a felületen rögzített avidin molekulához. A bioaffinitáson alapuló immobilizálási technikák hátulütője, hogy drágák. Mivel célom egy olcsón és egyszerűen előállítható tripszines mikroreaktor előállítás volt, ezért az efféle immobilizálási technikákat a továbbiakban elvetettük.



1. ábra: Nem specifikus fehérje adszorpció leírására szolgáló kinetikai modellek.^[12]



2. ábra: Fehérjék kovalens rögzítésére leggyakrabban alkalmazott reakciók. A, EDC/NHS („karbodiimides”) módszer. B, „Glutáraldehydes” módszer.

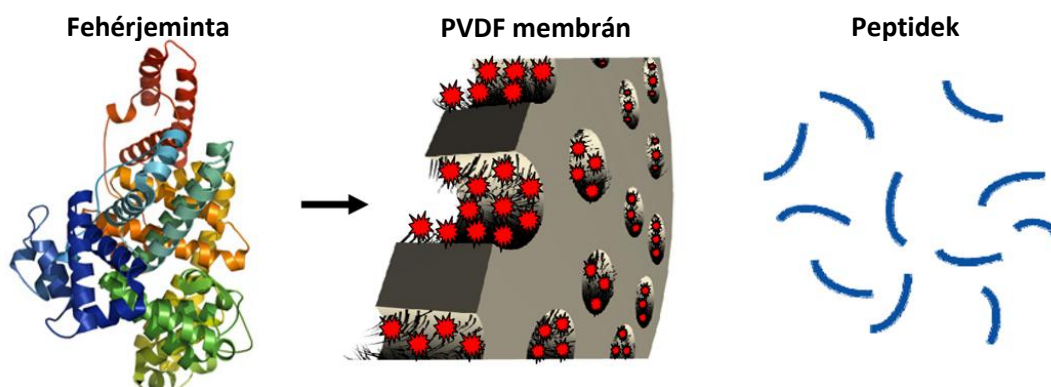
2.3. Immobilizált enzimreaktorok

A mikrofluidikai eszközökön történő fehérje immobilizálással mára már több nagyjelentőségű analitikai, ill. orvosdiagnosztikai gyorsesztet sikerült kifejleszteni. Az immobilizálási technikák fejlődésével párhuzamosan kialakult egy másik jelentős alkalmazási terület is, az immobilizált enzimreaktorok használata. A reaktorok tervezésekor szem előtt kell tartani, hogy nagy felület/térfogat aránnyal rendelkezzenek, hiszen a reakció a szilárd/folyadék határfelületen játszódik le. Ebben az esetben a reakciósebesség függ a fázisok határfelületének nagyságától, hiszen az ilyen folyamat tekinthető heterogén katalízisnek. Ez az oka, hogy a reaktorokat újabban gyakran mikrofluidikai csipbe vagy kapilláris rendszerbe integrálják (ezek az eszközök nagy felület/térfogat aránnyal rendelkeznek). Tovább lehet növelni a határfelület nagyságát, ha háromdimenziós szerkezetű, nagy fajlagos felületű, esetleg porózus anyagon végezzük az immobilizálást.

Az enzimes mikroreaktorok alkalmazásának előnye, hogy többször felhasználhatóak, ill. általában hosszú ideig nem veszítenek aktivitásukból, így jóval kevesebb enzimre van szükségünk, ha a reaktort gyakran használjuk. Alkalmazási területtől függően lehet előnyös, hogy kis térfogatú folyadékokkal dolgozik. Ezt a tulajdonságát használják ki online reaktorok létrehozásánál.

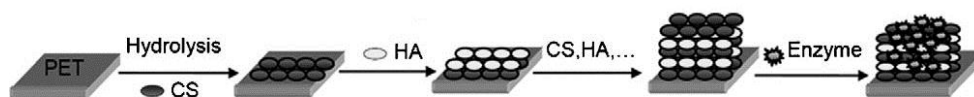
A peptidtérkép vizsgálatokhoz használható online reaktorokban a felületen proteolitikus enzimet rögzítenek (leggyakrabban tripszint). Az ilyen rendszerek jellemzője, hogy a fehérje emésztése után közvetlenül történik a termékként keletkező peptidfragmensek elválasztása/detektálása (pl. CZE peptidtérkép esetén a fehérjeminta injektálása után a szeparációs kapilláris belsejében megy végbe a minta emésztése).

Adszorpcióval immobilizált tripszin reaktorok. Számos adszorpción alapuló immobilizált tripszin reaktort leírtak. Leggyakrabban polimereket (PDMS vagy polimer membránok) alkalmaznak adszorbeáló felületként. Több kutatócsoport is sikeresen alkalmazott poli(vinilidén-fluorid) (PVDF) membránt tripszin megkötésére^[15-17]. Az ilyen típusú reaktor sematikus működése a 3. ábrán látható. A PVDF felületén az adszorpció hajtóereje a hidrofób kölcsönhatás, az adszorpciónak kedvez a porózus jelleg, ilyenkor a tripszin képes „befűződni” a membrán pórusaiba. Ezek a tripszinnel módosított membránok hatékonyan emésztettek fehérjéket néhány perc alatt. A tripszin adszorpciója nem specifikus, amelynek hátránya, hogy a fehérjeminta kiszoríthatja a tripszint a felületről. Ennek az a következménye, hogy lerövidül a reaktor élettartama. Emiatt gyakran alkalmaznak olyan polimereket, melyek felülete töltött, így elektrosztatikus adszorpció jöhet létre.



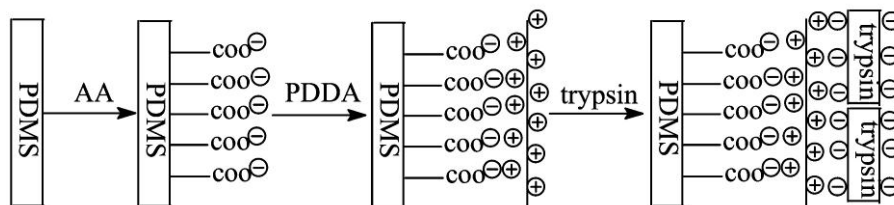
3. ábra: Fehérjeminta emésztése PVDF membránon immobilizált tripszinnel.^[15]

Elektrosztatikus adszorpcióval immobilizáltak tripszint Liu és társai^[18] egy polietilén-tereftalát (PET) mikrofluidikai csip 100 μm széles csatornájának belsejében, layer-by-layer (LBL) adszorpciós módszerrel, kationos kitozán és anionos hialuronsav alternálásával alakítva ki a töltött rétegeket (4. ábra). Xu és társai nylon membrán felületét polisztirol-szulfonáttal (PSS) vonták be, majd az így negatívan töltött felületre adszorbeáltak tripszint alacsony pH-n^[15].



4. ábra: Tripszin immobilizálása layer-by-layer (LBL) adszorpciós módszerrel.^[18]

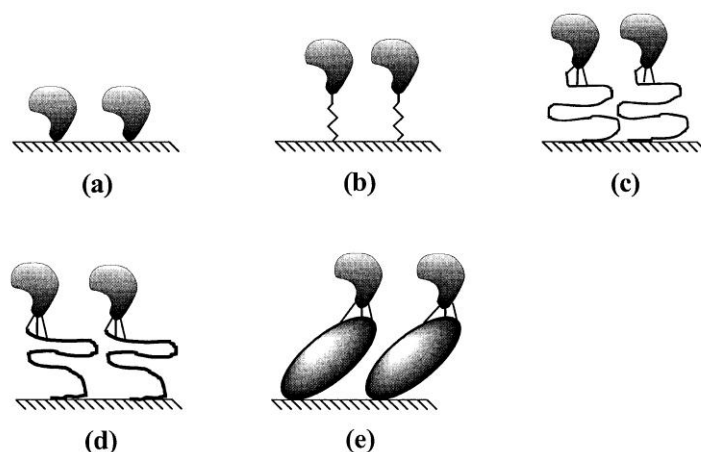
PDMS-en való megkötést alkalmaztak Heyries és társai^[19], akik teflon felületre vittek fel tripszin oldatot, majd az oldószer elpárolgása után folyékony PDMS-t öntötték a teflonra és így térhálósították azt. Ezen kívül kevés módszer ismeretes PDMS felületen való adszorpcióra, mivel a felülete inert, hidrofób. Egy bonyolultabb eljárást alkalmaztak Wu és társai^[20], akik a PDMS felületre akrilsav ojtásos polimerizálásával vittek be karboxilcsoportokat. A negatív töltésű felületre pozitív poli(diallil-dimetilammónium klorid)-ot (PDDA) vittek fel, majd erre adszorbeálták a tripszint (elektrosztatikus adszorpció, 5. ábra).



5. ábra: Tripszin layer-by-layer adszorpciója az akrilsavval kopolimerizált PDMS felületen (PDMS-AA/PDDA/tripszin).^[20]

Kovalens kötessel immobilizált tripszin reaktorok. Kovalens kötés kialakításának feltétele, hogy mind az enzim, mind a felület tartalmazzon reaktív csoportokat, amelyek egymással képesek kovalens kötést kialakítani. Ez a feltétel igaz a tripszinre a változatos aminosav oldalláncok miatt, tehát a felületet kell megfelelően kiválasztani. A két leggyakrabban alkalmazott módszer a „glutáraldehydes” és a „karbodiimides” módszer, a kapcsolás feltétele, hogy a szilárd hordozó amino- vagy karboxilcsoportokat tartalmazzon.

A kovalens kötés előnyei közé tartozik, hogy a tripszin nem mobilizálódhat a felületről, azaz felületi sűrűsége állandó az immobilizálás után. Az adszorpciónál jelentkező kitekeredés kovalens rögzítésnél is előfordulhat, emiatt előnyös, ha az immobilizálási felületet a tripszinnel egy másik molekulán keresztül, ún. spacerrel kötjük össze. A spacer megakadályozza a tripszin kitekeredését a felületen (6. ábra), ill. csökkenti a sztérikus gátat (könnyebben hozzáfér a fehérjemintához), azonban alkalmazása nem minden esetben szükséges, az immobilizálást egy új reakcióval bonyolítja. Spacerként alkalmazható vegyületek: pl. polietilén-glikol-diamin, dextrán aldehid, amino dextrán vagy marha szérum albumin (BSA)^[21].



6. ábra: Különböző típusú spacer alkalmazása tripszin immobilizálásához^[21]: a, közvetlen rögzítés a felületen; b, rövid, lineáris spacer alkalmazása; c, hosszú, hidrofíl spacer alkalmazása, pl. dextrán aldehid vagy d, amino dextrán; e, nagyméretű, globuláris spacer alkalmazása (pl. BSA).

Több irodalmi példa található a „glutáraldehydes”^[22-25], ill. a „karbodiimides”^[20, 26] immobilizálásra. Kevésbé elterjedt módszer az epoxi módosított szilika monolit felületén való rögzítés^[27-28]. A szilárd hordozó anyaga lehet pl. monolit^[22,24], szuperparamágneses nanorészecskék^[23], mágneses mikrogömbök^[25], kapilláris fala^[26] vagy PDMS^[20] (utóbbira akrilsavas kopolimerizáció után lehetséges a kovalens rögzítés). A mágneses részecskék alkalmazásának előnye, hogy a részecskékből egy mágnes segítségével egyszerűen lehet töltetet létrehozni, ill. a töltetet eltávolítani.

A kovalens kötés kialakítása során a kötés a felületen lévő reaktív csoport és a fehérje egy aminosav oldallánca között valósul meg. A tripszin aktivitásának megőrzése érdekében érdemes olyan módon végrehajtani a reakciót, hogy a kötés ne történhessen meg az enzim aktív centrumában. Erre alkalmas reagens a benzamidin, ami a tripszin kompetitív inhibitora. Az immobilizálási reakciót (2. ábra) benzamidin jelenlétében végezzük el^[26, 29-30], ami bekötődik a tripszin aktív centrumába, ezáltal megvédi azt, majd az immobilizálás után eltávolítjuk. Ezzel a módszerrel a reaktor aktivitását és élettartamát tudjuk növelni.

3. Kísérleti körülmények

3.1. Felhasznált vegyszerek, készülékek

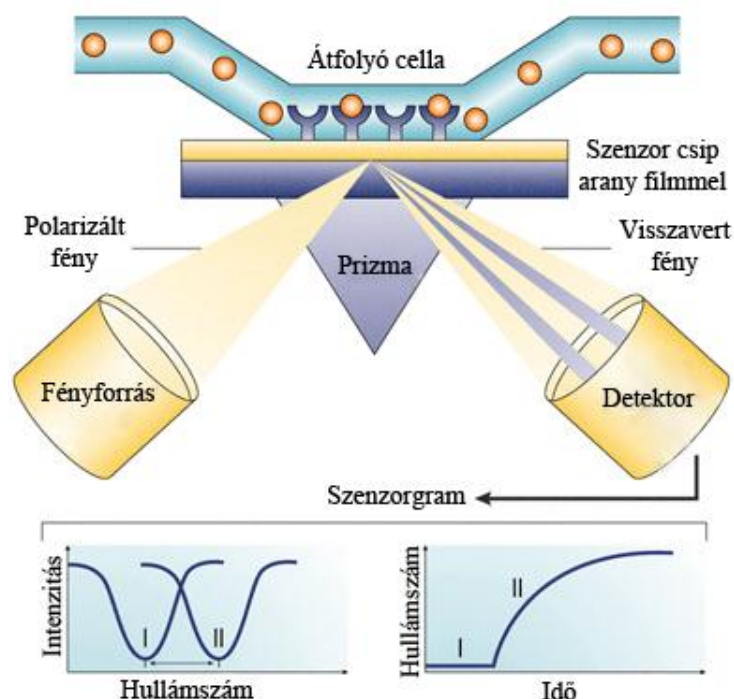
Proteolitikus enzimként kísérleteimben tripszint (Sigma Aldrich) alkalmaztam. Fehérjemintaként citokróm C, β -glükozidáz, marha szérum albumin és tiroglobulin mintákat emésztettem, az emésztéshez trifluorecetsavat (TFA), karbamidot, ditiotreitolt (DTT), jódcetamidot (IAA), ill. hangyasavat alkalmaztam (valamennyi VWR termék). A kovalens kötés kialakításához N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimidet (EDC), N-hidroxiszukcinimidet (NHS), ill. benzamidint alkalmaztam (Sigma Aldrich).

A minták előkészítése a következőképp történt: 100 μ l 1 mM TFA-ban oldottam 5 mg fehérjét és hozzáadtam 300 μ l 8 M karbamidot. 30 perc múlva hozzáadtam 40 μ l 100 mM DTT-t, majd 37 °C-on inkubáltam egy órát. Ezután 40 μ l 200 mM IAA-t adtam hozzá, s 45 percig sötétben hagytam. Ezután 2 mL vízzel hígítottam az elegyet, oldatban emésztésnél ekkor adtam hozzá a tripszint (tripszin:fehérje = 1:25). A reakciót 1%-os hangyasavval lehet leállítani. A reaktorban való emésztéshez a hígítás után az elegyet fagyasztva tároltam felhasználásig.

A PDMS csipek előállítása során a nyers PDMS-t térhálósító adalékkal (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) 10:1 arányban elegyítjük, majd ebből 70 °C-on 1 óra alatt nyerjük a megszilárdult polimert. A PDMS csipekben való töltetkészítéshez NH_2 -bevonatú szilika töltetet használtam (Varian, 5 μ m szilika, amino).

A sómentesítéshez 10 μ l-es C18 Supel-Tip pipettahegyeket használtam (SupelCo). A sómentesítést a gyártó leírása szerint végeztem.

Felületen végbemenő folyamatokat tudunk SPR spektroszkópiával vizsgálni^[31]. A felületi plazmon, az adott fémszenzor (általában arany) felületével párhuzamosan terjedő elektromágneses hullám igen érzékeny a felület változásaira. Az aranszenzor felületére egy prizmán keresztül bocsájtunk fényt (7. ábra). A prizma/arany határfelületen a fény visszaverődik, de a fény evanescens része képes az arany felületbe behatolni. A plazmon gerjesztéséhez szükséges energiát ez az evanescens fény biztosítja, de a felület megváltozásával a gerjesztéshez szükséges energia is megváltozik. A visszavert fény intenzitása csökken az adott energiának megfelelő értéknél. A gerjesztéshez szükséges energia (hullámszám) – idő függvényt nevezzük szenzorgramnak, amivel a felületi folyamatokra lehet következtetni. A szenzort vékony (~100 nm vastag) PDMS réteggel bevonva vizsgálhatjuk a PDMS-en történő adszorpciót^[32-33].



7. ábra: Az SPR felépítése^[34].

Kísérleteimet egy Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA) által gyártott NicoletTM 6700 FT-IR spektroszkópon végeztem, melyhez egy SPRTM 100 modul volt kapcsolva. Az SPR szenzor PDMS-sel történő bevonása spin coaterrel történt. Híg (0,1 m/V%-os), hexános PDMS oldatot kell spin coaterrel eloszlatni az arany felületen, a hexán gyors párolgása után a PDMS bevonat marad vissza.

Kapilláris elektroforézis méréseimhez Agilent 7100 CE System típusú készüléket használtam.

3.2. Peptidtérkép vizsgálatokhoz alkalmazott elválasztási és detektálási módszerek

A számos peptidtérkép vizsgálatokhoz használható analitikai módszer közül jelen fejezetben az általam alkalmazott kapilláris elektroforézist és MALDI-TOF tömegspektrometriát mutatom be részletesebben.

Kapilláris elektroforézis. Elektroforézis során az oldatban lévő, töltéssel rendelkező komponensek elektromos erőter hatására vándorolnak (az ellentétes töltésű elektróda felé). Kapilláris elektroforetikus elválasztásoknál egy kapillárisba injektált minta különböző komponensei eltérő sebességgel mozognak az elektromos erőterben. Ez az elválasztás hajtóereje.

Leggyakrabban kvarc kapillárisokat használunk, melyek belső átmérője 10-100 μm között terjedhet. Az kapillárist pufferral töltjük fel az elválasztást megelőzően, ami biztosítja az elektromos vezetést, ill. az állandó pH-t. A pH értéke befolyásolja a kvarc kapilláris belső falának és a minta komponenseinek töltését. Tipikusan 5-25 kV feszültséget alkalmazunk, a kapilláristér termosztált, hogy a fejlődő hő ne befolyásolja az elválasztást.

A kvarc kapillárisok felületén lévő szilanolcsoportok protonáltsága a használt puffer pH értékétől függ. A leggyakrabban alkalmazott pufferek esetében ($\text{pH} > 3,0$) a felület (részben) deprotonált, negatív töltésű. Ezen a felületen elektromos kettősréteg alakul ki, a pufferben lévő pozitív töltésű ionok koncentrációja megnő a felület közelében. Ezen szolvatált kationok feszültség hatására a katód (-) felé vándorolnak, miközben az oldószer molekuláinak áramlását idézik elő. Ez az elektroosmotikus áramlás (EOF). Az EOF tehát feszültség hatására létrejövő folyadékáram, töltött felülettel rendelkező kapilláris rendszerekben. Az áramlásprofil jellemzően lapos, aminek köszönhetően a csúcsok keskenyek.

Az EOF teszi lehetővé, hogy kapilláris elektroforetikus elválasztás során ne csak a pozitív, hanem a semleges és a negatív komponenseket is detektálhassuk. A mintakomponensek áramlási sebessége a saját elektroforetikus vándorlási sebességük és az EOF áramlási sebességének vektoriális összege. Belátható, hogy a kationok az EOF-nél nagyobb sebességgel, a semleges komponensek az EOF sebességével mozognak, míg az anionos komponensek csak akkor detektálhatók, ha elektroforetikus vándorlási sebességük kisebb, mint az EOF sebessége.

A CE előnyei a kis mintaigény és nagy elválasztási hatékonyság; különösen a biológiai makromolekulák (pl. nukleinsavak, fehérjék) hatékony elválasztásával nöött népszerűsége a bioanalitikában. Több módszere ismert, pl. a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), kapilláris

gélelektroforézis (CGE), kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF) vagy micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC).

Az általam alkalmazott technika, a CZE elve, hogy a különböző mintakomponensek eltérő sebességgel vándorolnak elektromos térben (ennek oka az eltérő méretük és töltésük). Ilyenkor az egyes komponensek diszkrét zónákra válnak szét, a zónák detektálása spektrofotometriásan történik. A fény a kapillárison kialakított detektorablakon keresztül jut a detektorba. A detektálás érzékenységét növelhetjük buborékcélás kapilláris segítségével, mivel az ilyen kapillárisok detektorablakánál a kapilláris belső átmérője kiszélesedik, így nő az optikai fényút.

MALDI-TOF tömegspektrometria. A MALDI-TOF tömegspektrométerek lágy ionizációs technikájuknak köszönhetően sérülékeny molekulák, pl. fehérjék, peptidok mérésére alkalmasak. A peptidfragmenseket tartalmazó mintát az emésztés után sómentesíteni kell (C18 Supeltip), majd egy olyan mátrixot adunk a mintához, mely képes abszorbeálni a lézer hullámhosszán. Leggyakoribb mátrixok: 4-hidroxi- α -ciano fahéjsav, ill. 2,5-dihidroxi benzoésav.

Ionizáció során nagy erejű lézerrel impulzusszerűen sugározzuk be a mintát, a lézer sugárzását a mátrix abszorbeálja. A lézer energiáját a mátrix közvetíti a minta felé, aminek hatására a minta komponensei deszorbeálódnak a felületről és ionizálódnak. Peptidek vizsgálatánál célszerű enyhén savas közegben felvinni a mintát, így protonált (pozitív töltésű) ionok keletkeznek. Ezek az ionok bekerülnek a vákuum alatt álló repülési csőbe (TOF analizátor), ahol feszültség alkalmazásával gyorsítjuk az ionokat, amiknek a repülési idejét mérjük. A pontos tömeg meghatározáshoz szükséges a mérés előtt standard mintákra kalibrálni, amelyek pontosan ismert tömeggel rendelkeznek.

A MALDI-TOF tömegspektrométerek alkalmazása kifejezetten előnyös nagyméretű biomolekulák tömeganalízisének, ugyanis ezek a molekulák gyakran fragmentálódnak, így más ionforrások alkalmazása a minta nagymértékű roncsolását eredményezi, ami miatt nehezebb lenne a molekulatömeg meghatározása.

3.3. Reaktorok kialakítása

Az immobilizált tripszines mikroreaktor tervezésénél elsődleges szempont volt, hogy egyszerű módon elkészíthető legyen, gyors fehérjeemésztést tegyen lehetővé és lehetőleg a szükséges vegyszerek legyenek olcsók, könnyen hozzáférhetők. Ez alapján kétféle mikroreaktort készítettem, a paramétereiket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A reaktorok kialakításának paramétereit.

Immobilizálás jellege	Felület	Aktív centrum védelme	Reakcióidő
Adszorpció	PDMS csip	Nincs	10 perc
Kovalens kötés (EDC/NHS)	NH ₂ -borított szilika töltet	Nincs	5 óra
		Benzamidin	

Adszorpcióval történő immobilizálásra a PDMS porózus, hidrofób jellege miatt van lehetőség. A kötődés gyorsan megtörtént, ha a PDMS mikrofluidikai csip csatornáján keresztül 2 mg/ml koncentrációjú tripszin oldatot áramoltattam.

A kovalens kötés alapján történő immobilizálási reakció a karbodiimides módszerrel történt. Az NH₂-borított szilika töltetet PDMS mikrofluidikai csipben készítettem el, majd a tripszint tartalmazó reagenst áramoltattam keresztül a tölteten (tripszin: 3 mg/ml, EDC: 7 mg/ml, NHS: 1,3 mg/ml, benzamidin: 0,4 mg/ml, 50 mM foszfát pufferben feloldva, pH=7,3). A kész reaktort a 8. ábra szemlélteti.

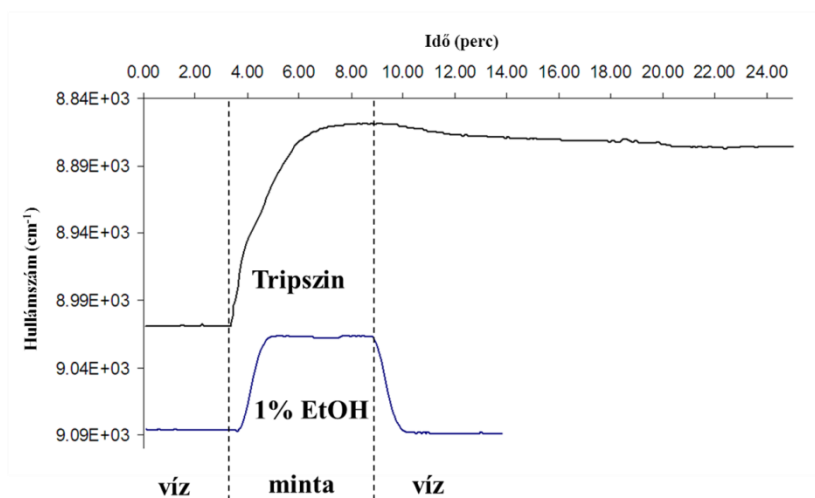


8. ábra: Kovalensen immobilizált tripszines mikroreaktor. A tripszin NH₂-borított szilika tölteten van rögzítve. A párhuzamos tölteteken egyidejűleg több minta emésztése lehetséges. A folyadékok áramoltatása perisztaltikus pumpa segítségével történik. Áramlási sebesség a fehérjeminták emésztése során: 0,5 µl/min.

4. Eredmények

4.1. Adszorpció vizsgálata felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópiával

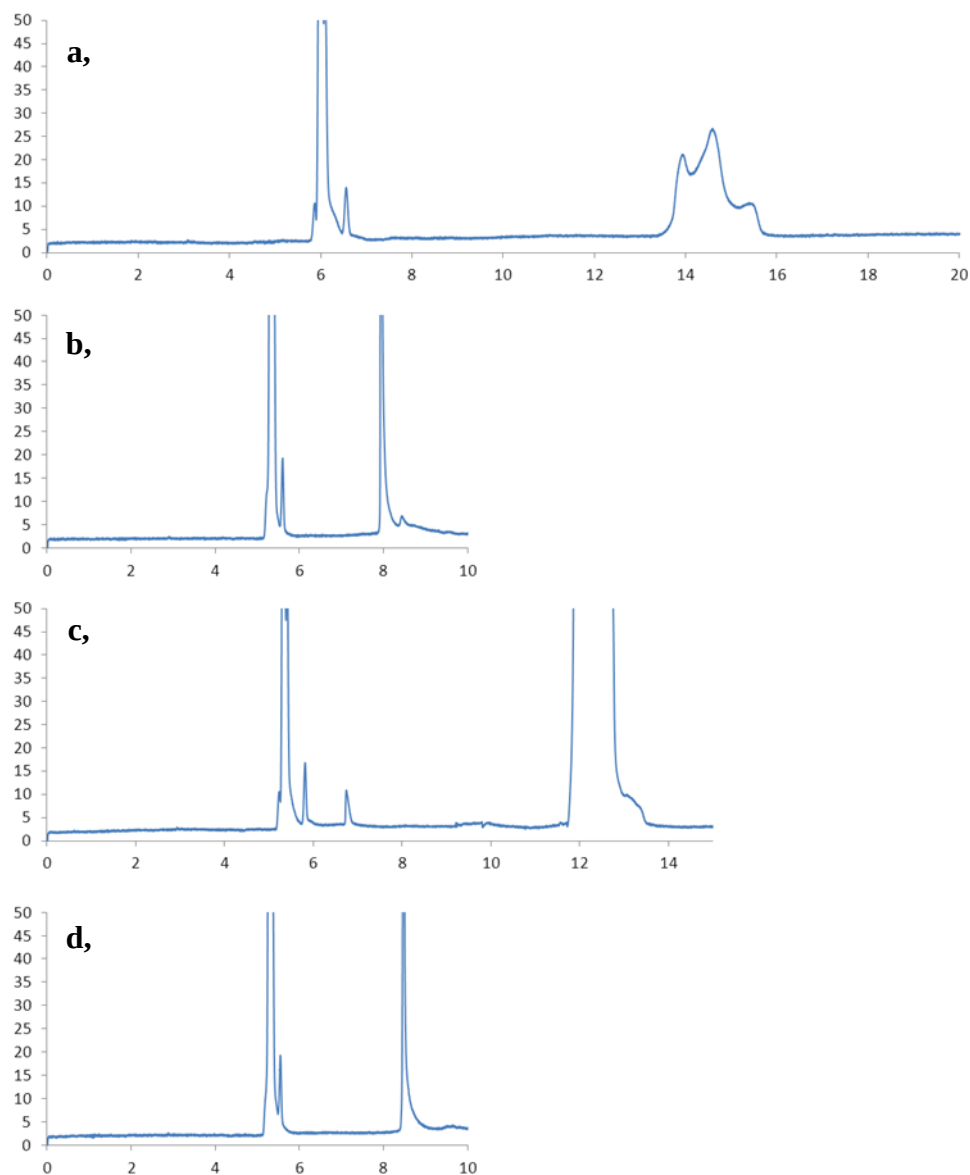
A vékony PDMS réteggel bevont arany szenzorra etanol, ill. tripszin oldatát injektálva jutottunk a 9. ábrán látható szenzorgramhoz. Az ábra alapján arra következtethetünk, hogy a tripszin adszorpciója csaknem irreverzibilis (vizes közegben), hiszen még hosszú vizes mosást követően sem csökken az SPR jele. A tripszin eltávolítása csak felületaktív anyagokkal vagy szerves oldószerekkel lehetséges.



9. ábra: PDMS-sel bevont SPR szenzoron adszorpció vizsgálata. Adott folyadékot (etanol, ill. tripszin oldat) injektálva az SPR jele megemelkedik. A vizes mosás az etanolt eltávolítja a felületről, az SPR jele lecsökken. A tripszin viszont hosszas vizes mosást követően is jelen van a PDMS felületén.

4.2. Vizsgálati fehérjeminták

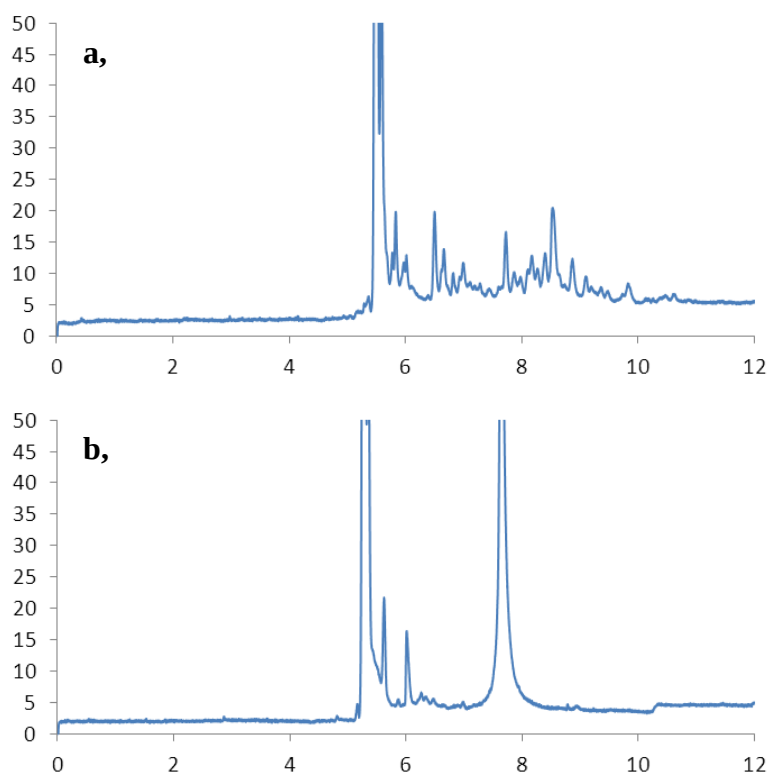
A reaktor fejlesztése során négyféle fehérjét használtam mintaként. Ezek: citokróm C (~12 kDa), β -glükózidáz (~72 kDa), marha szérum albumin (BSA, ~66 kDa) és tiroglobulin (~660 kDa). Kiválasztásuknál az elsődleges szempont az volt, hogy minél nagyobb mérettartományt öleljenek át. A minták előkészítése a kísérleti részben leírtak szerint történt. A fehérjeminták CZE elektroferogramjai a 10. ábrán láthatók. Ezen minták nem sómentesítettek, ~5,7 perc migrációs időnél a karbamid és egyéb adalékok csúcsa található.



10. ábra: Különböző fehérjeminták elektroferogramjai. a, citokróm C; b, β -glükózidáz; c, BSA; d, tiroglobulin. Mérési paraméterek: teljes kapilláris hossz: 40 cm; puffer: 100 mM, pH=9 foszfát; feszültség: 10 kV; injektálás: 50 mbar, 2 s; fehérjekoncentráció: 2 mg/ml minden fehérjénél.

4.3. Reaktortípusok összehasonlítása

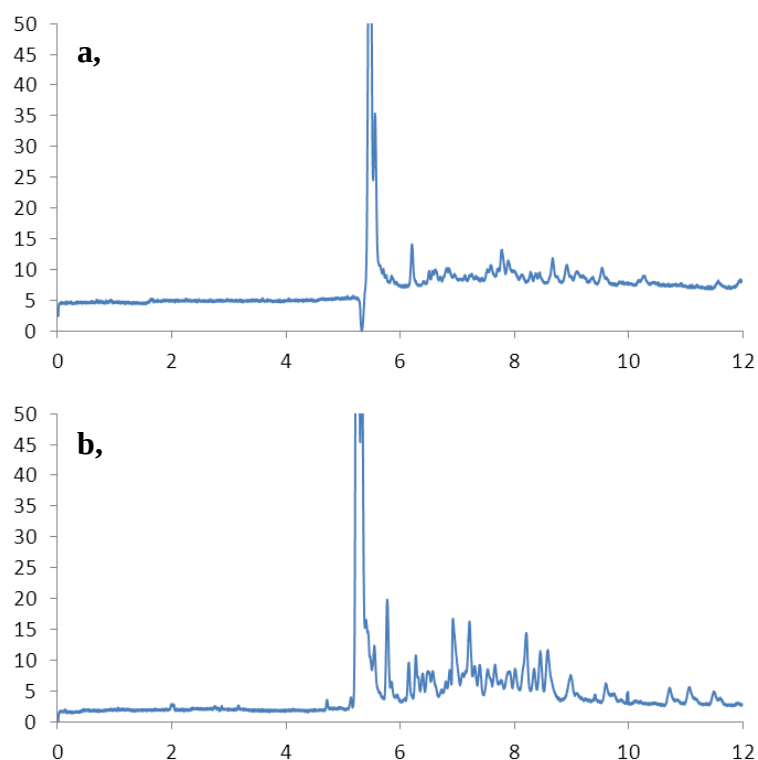
A kétféle reaktor összehasonlításánál azt vizsgáltam, hogy mindkét reaktor képes-e fehérjeminta emésztésére, ill. hogy mennyi ideig őrzi meg aktivitását a reaktor. Mindkét reaktorról sikerült hatékony fehérjeemésztést végezni (~30 mp reakcióidő), azonban a kísérletet 1 nappal később megismételve azt tapasztaltam, hogy az adszorpcióval rögzített reaktor aktivitása jelentősen csökkent, a fehérjeminta jelentős része nem bomlott el (11. ábra). Ennek a már említett kitekeredési folyamat lehet az oka. A kovalens rögzítésű reaktornál ez a probléma nem jelentkezett (bővebben lásd a 4.5. fejezetben), emiatt a kétféle típusú reaktor közül a kovalensen kötött tripszint tartalmazóval foglalkoztam részletesebben, nem vetve el azt a lehetőséget, hogy a PDMS-en való adszorpcióval egyszerű, egyszer használatos reaktort kapunk, amelyet minden fehérjebontás előtt regenerálni kell.



11. ábra: PDMS falon adszorbeált tripszint tartalmazó mikrofluidikai csipen BSA fehérjeminta emésztése. a, Frissen készített reaktoron emésztés; b, 1 nappal később az emésztés ismétlése, melynek során jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltam. A mérési paraméterek megegyeznek a 10. ábránál megadottakkal. Fehérjeminta: 2 mg/ml BSA.

4.4. Tripszin aktív centrumának védelme az immobilizálás során

A kovalens kötés kialakítása során a reakcióelegyhez benzamidint adva lehet megvédeni a tripszin aktív centrumát. Ekkor a benzamidin, ami a tripszin kompetitív inhibítora bekötődik az aktív centrumba, ezáltal az aktív centrum aminosav oldalláncai és a felület közötti kötés kialakulását megakadályozza. A benzamidin alkalmazásának előnye, hogy a kapott reaktor aktivitása nagyobb (12. ábra), mivel az immobilizálási reakcióban nem sérül az aktív centrum, ill. a kapott peptidtérképek jól reprodukálhatóak (bővebben lásd a 4.5. fejezetben).

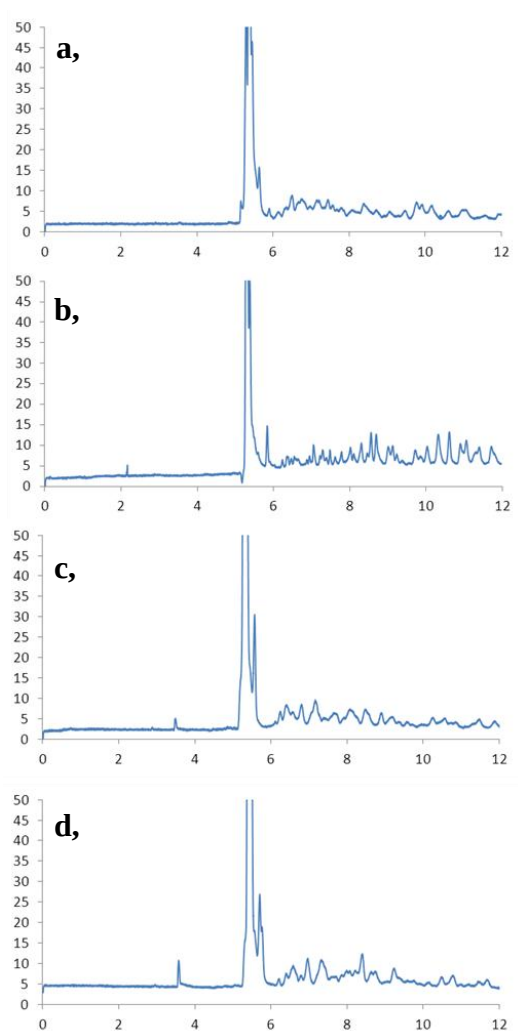


12. ábra: BSA peptidtérképei kovalensen rögzített tripszines reaktorokban történő emésztés után. a, benzamidin alkalmazása nélkül; b, benzamidint alkalmazva az immobilizálási reakcióban. A mérési paraméterek megegyeznek a 10. ábránál megadottakkal. Fehérjeminta: 2 mg/ml BSA.

4.5. Az immobilizált tripszin stabilitásának és az emésztések reprodukálhatóságának vizsgálata

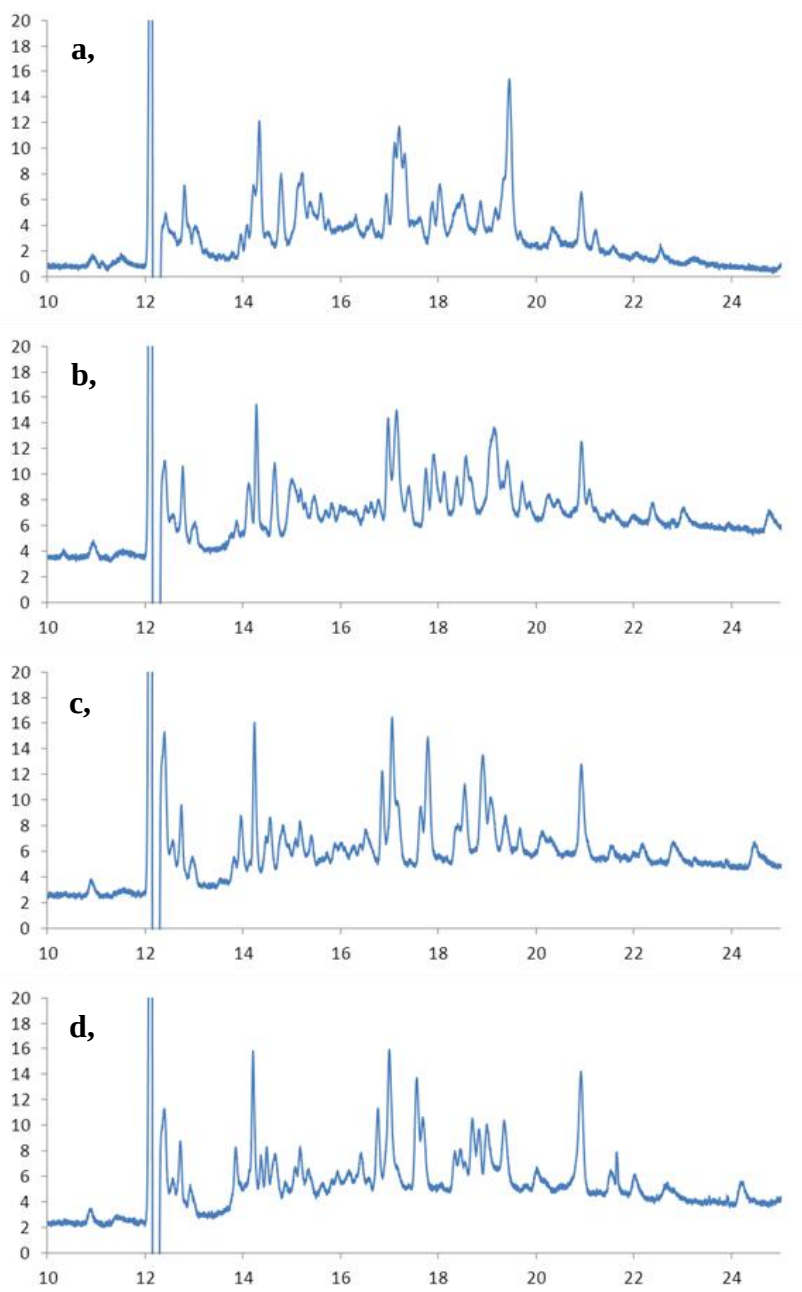
Az eddigi eredményekből azt a tapasztalatot vontam le, hogy a leghatékonyabb reaktort akkor kapom, ha a „karbodiimides” módszerrel végzem a tripszin kovalens rögzítését a felülethez, benzamidin jelenlétében. Az így nyert mikroreaktor stabilitásának és reprodukálhatóságának vizsgálata volt a következő lépés.

A stabilitás vizsgálata során rendszeres időközönként végeztem emésztést az elkészített reaktor segítségével, míg két emésztés közt a reaktort benzamidin 0,5 mg/ml koncentrációjú oldatában tároltam, 5°C-on. Az eredményeket tartalmazó 13. ábra alapján elmondható, hogy az immobilizált tripszin reaktor legalább 1 hónapig őrzi meg aktivitását, ezen időintervallumon belül többször felhasználható.



13. ábra: Kovalensen immobilizált tripszin reaktor stabilitásának vizsgálata. Az egyes emésztéseket a, 1; b, 7; c, 15; d, 25 nappal a reaktor elkészítése után végeztem el. A peptidtérképek azt mutatják, hogy legalább 1 hónapig a tripszin reaktor nem veszít aktivitásából, s ez idő alatt a reaktor többször felhasználható. A mérési paraméterek megegyeznek a 10. ábránál megadottakkal. Fehérjeminta: 2 mg/ml BSA.

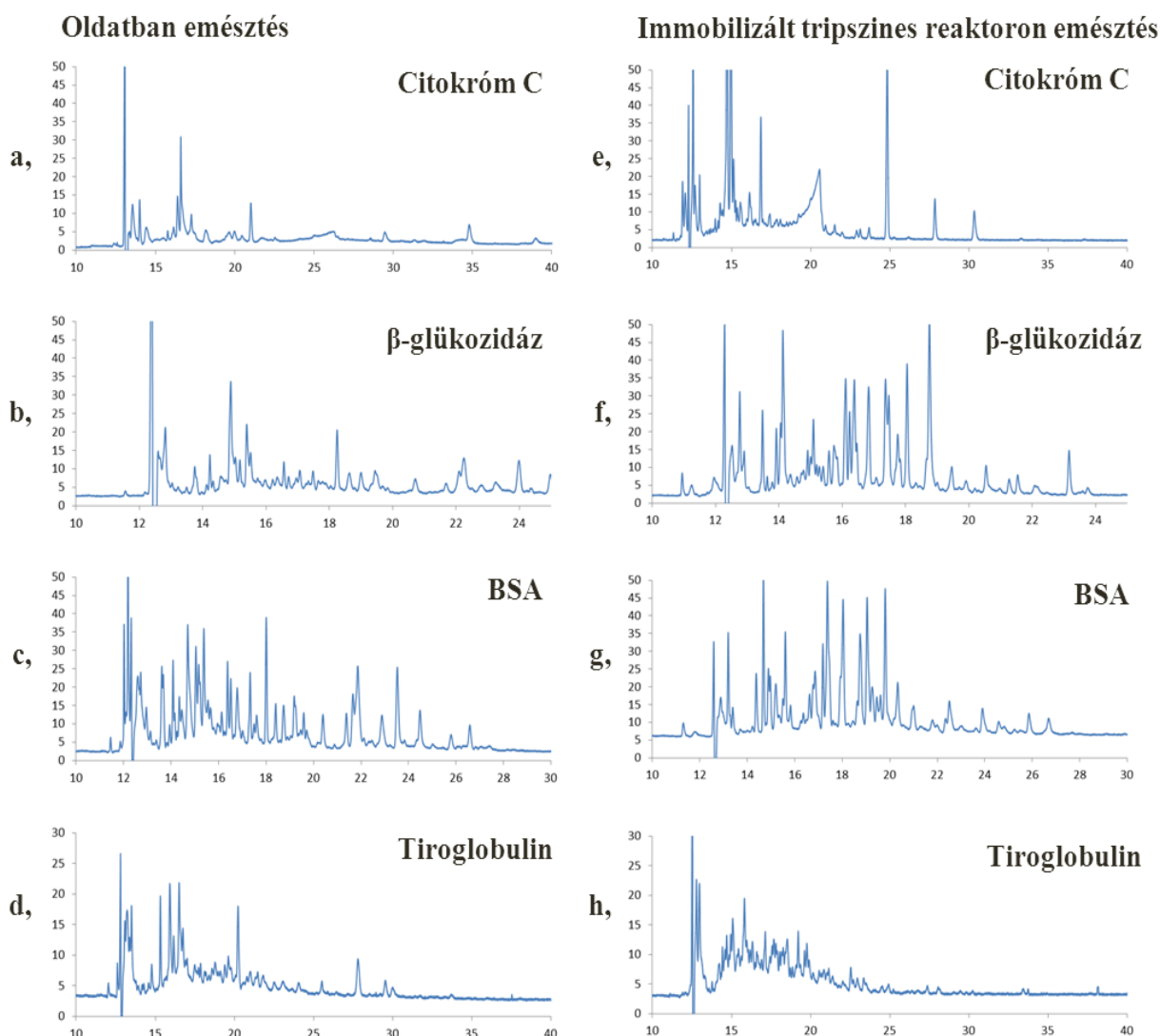
A kialakított mikroreaktor alkalmas arra, hogy egyszerre több minta párhuzamos emésztését végezzük el benne (8. ábra). Ugyanazt a fehérjemintát 4 különböző tölteten egyidejűleg emésztve tudjuk vizsgálni a peptidtérképek reprodukálhatóságát. Az áthaladó mintát ez esetben sómentesítettem (C18 Supel-Tip segítségével), majd az elektroforetikus elválasztást a jobb felbontás és nagyobb érzékenység érdekében egy hosszabb, buborékcellás kapillárisban végeztem el (14. ábra). A peptidtérképek hasonlóak, az elkészített reaktorokkal reprodukálható eredményeket kapunk.



14. ábra: 4 párhuzamos tölteten való emésztés CZE peptidtérképei (a, b, c, d). Mérési paraméterek: teljes kapillárishossz: 80 cm (buborékcellás kapilláris); puffer: 100 mM, pH=9 foszfát; feszültség: 20 kV; injektálás: 50 mbar, 2 s; minta: 2 mg/ml β -glükózidáz.

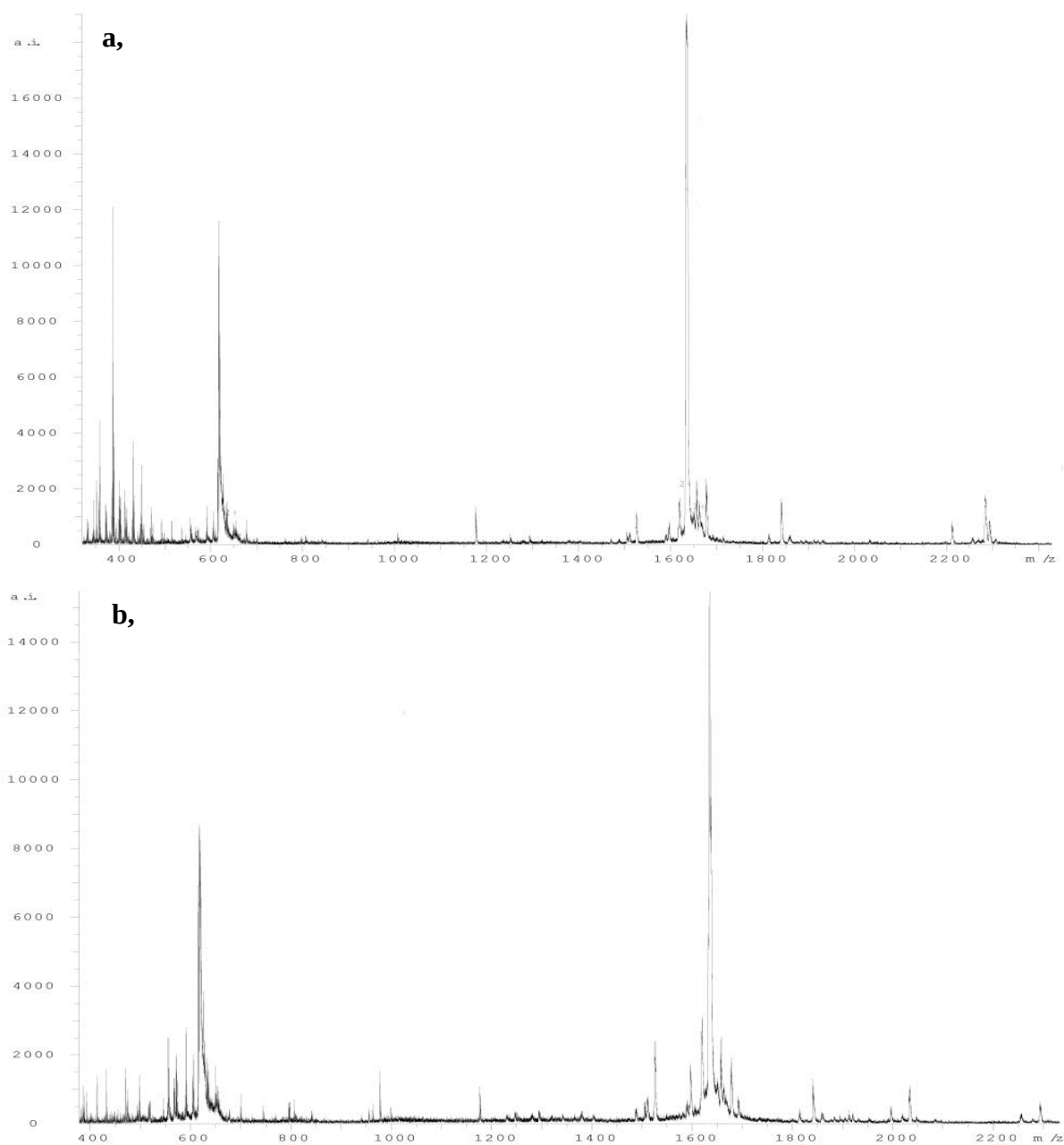
4.6. Oldatban emésztés és tölteten való emésztés összehasonlítása

A reaktor hatékonyságának vizsgálatát az oldatban emésztéssel való összehasonlítással végeztem el. A 4.2. fejezetben bemutatott összes fehérjének elvégeztem az oldatban (reakcióidő: 16 óra) és a reaktoron (reakcióidő: 30 mp) történő emésztését (15. ábra). A CZE peptidtérképek alapján megállapítható, hogy mindkét esetben elbomlott az összes fehérje, továbbá előfordul, hogy a töltetes reaktor segítségével több peptid keletkezett, ami teljesebb, hatékonyabb emésztést jelent. Tehát a reaktor alkalmas négy olyan fehérje emésztésére, amik nagy mérettartományt fognak át. További előny az is, hogy míg oldatban emésztésnél a fehérjeminta a tripszin hozzáadásakor hígul, addig a reaktoron nem kell a minta hígulásával számolni, így nő az analitikai érzékenység.



15. ábra: Négyféle fehérjeminta emésztése oldatban (a, b, c, d, reakcióidő: 16 óra) és immobilizált tripszines reaktoron (e, f, g, h, reakcióidő: 30 mp). A minták nagy mérettartományt ölelnek át: 10-700 kDa. A mérési paraméterek megegyeznek a 14. ábránál megadottakkal. Fehérjeminták: 2 mg/ml minden fehérjénél.

Az emésztés során keletkező peptidek azonosságát és ebből kifolyólag a kovalensen immobilizált tripszines mikroreaktor hatékonyságát igazolja a citokróm C emésztéséből származó peptidek MALDI-TOF tömegspektrumai (16. ábra).



16. ábra: a, Oldatban és b, kovalensen rögzített tripszines mikroreaktoron emésztett citokróm C MALDI-TOF peptidtérképei. A minták a 15/a és 15/e mintákkal megegyeznek.

5. Összefoglalás

Kutatómunkám célja egy olyan eszköz kifejlesztése volt, amely segítségével a peptidtérkép vizsgálatok emésztését jelentősen gyorsabbá lehet tenni úgy, hogy az eljárás hatékonysága ne csökkenjen. Erre a célra immobilizált enzimreaktort fejlesztettem ki. A reaktor elkészítéséhez legalkalmasabb immobilizálási technikák a PDMS mikrofluidikai csip csatorna falán való nem specifikus tripszin adszorpció, ill. a mikrofluidikai csipben felületi aminocsoportot tartalmazó szilikatöltet kialakítása, amin a "karbodiimides" módszer segítségével rögzítettük kovalensen a tripszint.

Mindkét reaktort mikrofluidikai csipbe integrálva készítettem el, nagy felület/térfogat arányuk és kis mintaigényük miatt. Alkalmazásukkal gyors fehérje emésztést sikerült elérni (~30 mp reakcióidő), azonban a PDMS-en adszorbeált tripszin hamar (1 nap alatt) elvesztette aktivitását a felületen történő kitekeredés miatt. Emiatt PDMS-en adszorbeált tripszines reaktorban fehérje emésztése csak akkor végezhető, ha közvetlenül a reakció előtt tripszin oldattal regeneráljuk a reaktor felületét (egyszer használatos reaktor). Ezen hátrányos tulajdonsága miatt a továbbiakban csak a kovalens rögzítésű tripszines reaktorral foglalkoztam.

A kovalensen immobilizált tripszines reaktor előnye, hogy aktivitását 1 hónapig megőrzi megfelelő körülmények között tárolva, ez idő alatt a reaktor többször felhasználható fehérje emésztésre. Az emésztésekből származó peptidtérképek jobb reprodukálhatóságának érdekében benzamidinnel védtem a tripszin aktív centrumát az immobilizálási reakcióban. Az ilyen módon elkészített reaktorok reprodukálható peptidtérképeket szolgáltatnak. Az oldatban emésztést és az immobilizált tripszines reaktorral való emésztést összehasonlítva megállapítható, hogy a reaktor hatékony, még a meglehetősen nagyméretű fehérjéket is teljesen megemésztette. Az általam kifejlesztett reaktorban a reakcióidő 30 mp szemben az oldatban emésztésnél szokásos 16 órával.

Jövőbeli célom, hogy a bemutatott reaktor segítségével on-line fehérjebontást végezzek, mikrofluidikai csip-MS kapcsolással.

A bemutatott eredmények egy részéből tudományos közlemény született, mely egy nemzetközi referált folyóiratban jelent meg^[33].

6. Irodalomjegyzék

1. Ghafouri, B., Tagesson, C., Lindahl, M., *Proteomics* 2003, **3**, 1003-1015.
2. Bergquist, J., Palmblad, M., Wetterhall, M., Hakansson, P., Markides, K. E., *Mass Spectrom. Rev.* 2002, **21**, 2-15.
3. Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C., Liotta, L. A., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, **1**, 683-695.
4. *European Pharmacopoeia*, **2.2.55**.
5. Alphonsus, H. C. Ng., Uddayasankar, U., Wheeler, A. R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, **397**, 991-1007.
6. Henares, T. G., Mizutani, F., Hisamoto, H., *Anal. Chim. Acta* 2008, **611**, 17-30.
7. Krenková, J., Foret, F., *Electrophoresis* 2004, **25**, 3550-3563.
8. Kim, D., Herr, A. E., *Biomicrofluidics* 2013, **7 (4)**, 041501.
9. Wang, H., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Yang, P., Liu, B., *Electrochem. Commun.* 2010, **12**, 258-261.
10. Laib, S., MacCraith, B. D., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 6264-6270.
11. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*.
12. Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S., *Adv. Colloid Interface Sci.* 2011, **162**, 87-106.
13. Rusmini, F., Zhong, Z., Freijen, J., *Biomacromolecules* 2007, **8**, 1775-1789.
14. Nakanishi, K., Sakiyama, T., Kumada, Y., Imamura, K., Imanaka, H., *Curr. proteomics* 2008, **5**, 161-175.
15. Xu, F., Wang, W.-H., Tan, Y.-J., Bruening, M. L., *Anal. Chem.* 2010, **82**, 10045-10051.
16. Cooper, J. W., Chen, J., Li, Y., Lee, C. S., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 1067-1074.
17. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E., Lee, C. S., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 2648-2655.
18. Liu, Y., Zhong, W., Meng, S., Kong, J., Lu, H., Yang, P., Girault, H. H., Liu, B., *Chem. Eur. J.* 2006, **12**, 6585-6591.
19. Heyries, K. A., Marquette, C. A., Blum, L. J., *Langmuir* 2007, **23**, 4523-4527.
20. Wu, H., Zhai, J., Tian, Y., Lu, H., Wang, X., Jia, W., Liu, B., Yang, P., Xu, Y., Wang, H., *Lab Chip* 2004, **4**, 588-597.
21. Nouaimi, M., Möschel, K., Bisswanger, H., *Enzyme Microb. Technol.* 2001, **29**, 567-574.
22. Nicoli, R., Rudaz, S., Stella, C., Veuthey, J.-L., *J. Chromatogr. A* 2009, **1216**, 2695-2699.
23. Li, Y., Xu, X., Deng, C., Yang, P., Zhang, X., *J. Proteome Res.* 2007, **6**, 3849-3855.
24. Ye, M., Hu, S., Schoenherr, R. M., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 2004, **25**, 1319-1326.

25. Sun, L., Li, Y., Yang, P., Zhu, G., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* 2012, **1220**, 68-74.
26. Krenková, J., Klepárník, K., Foret, F., *J. Chromatogr. A* 2007, **1159**, 110-118.
27. Nicoli, R., Gaud, N., Stella, C., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, **48**, 398-407.
28. Calleri, E., Temporini, C., Perani, E., Stella, C., Rudaz, S., Lubda, D., Mellerio, G., Veuthey, J.-L., Caccialanza, G., Massolini, G., *J. Chromatogr. A* 2004, **1045**, 99-109.
29. Freije, J. R., Mulder, P. P. M. F. A., Werkman, W., Rieux, L., Niederlander, H. A. G., Verpoorte, E., Bischoff, R., *J. Proteome Res.* 2005, **4**, 1805-1813.
30. Xie, S., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Biotechnol. Bioeng.* 1999, **62**, 30-35.
31. Mrksich, M., Sigal, G. B., Whitesides, G. M., *Langmuir* 1995, **11**, 4383-4385.
32. Gáspár, A., Gomez, F. A., *Anal. Chim. Acta.* 2013, **777**, 72-77.
33. Gáspár, A., Kecskeméti, A., Gomez, F. A., *Electrophoresis* 2013, **34**, 1249-1252.
34. Cooper, M. A., *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2002, **1**, 515-528.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attila egyetemi docensnek, a munkámhoz nyújtott segítségét és türelmét.

Köszönettel tartozom Dr. Hegedűs Csaba egyetemi tanárnak, és Bakó Józsefnek, akik lehetővé tették az SPR méréseket (DEOEC Fogorvostudományi Kar).

Hálával tartozom Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek értékes tanácsaiért és a MALDI-TOF mérésekhez nyújtott segítségéért.

Köszönöm Nagy Andreának a mikrofluidikai csipek és töltetek elkészítésében nyújtott segítségét.

Továbbá köszönöm a CETOX Kft.-nek, hogy biztosította a kutatásaimhoz szükséges eszközparkot.

A munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

