

Automatisierte Schnellfiltration zur Analyse intrazellulärer Metabolite in Mikroorganismen

Julian da Luz, Enrico Hans, An-Ping Zeng

Technische Universität Hamburg-Harburg, Germany

Für die Entwicklung biotechnologischer Prozesse ist das Wissen über intrazelluläre Vorgänge und Zusammenhänge von großem Nutzen. Insbesondere Reaktionsraten und Konzentrationen von Metaboliten, aber auch der Stofftransport über die Zellmembran liefern wichtige Informationen sowohl für die Stamm-, als auch für die Prozessentwicklung.

Für die Analyse intrazellulärer Metabolite ist eine Vielzahl von Schritten erforderlich, die sowohl die Probenahme und das Stoppen (Quenching) des Stoffwechsels beinhalten, als auch die Extraktion und Analytik der Metabolite. Für das Quenchen ist die Verwendung von kalter Methanol-Wasser-Lösung weit verbreitet. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie schnell und effektiv alle enzymatischen Reaktionen in der Probe stoppt. Problematisch ist jedoch der bei vielen Organismen beobachtete Austritt von Metaboliten aus den Zellen in die Umgebung (metabolic leakage). Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die schnelle Trennung von Zellen und Medium vor dem Quenchingschritt, um so eine Vermischung von intra- und extrazellulären Metaboliten zu verhindern. Da jedoch der Stoffwechsel erst durch den Quenchingschritt gestoppt wird, ist es wichtig, die Dauer dieser Trennoperation so kurz wie möglich zu halten. Um dies zu erreichen, wurde eine automatisierte Schnellfiltration entwickelt und in die bestehende Anlage zur schnellen Probenahme integriert. Mit dieser Methode ist es möglich, die Probenfiltration einer *E. coli* Kultur einschließlich zweifachen Waschens des Filterkuchens und Quenchen des Filters mit flüssigem Stickstoff innerhalb von 15 Sekunden durchzuführen. Es zeigte sich, dass unterschiedliche Morphologien der Mikroorganismen in den jeweiligen Phasen einer Batchkultur einen wesentlichen Einfluss auf den Filtrationsverlauf haben. Durch die Integration der Schnellfiltration in die bestehende automatisierte Schnellprobenahme können verschiedene Methoden, wie das Quenchen mit Methanol mit der Schnellfiltration kombiniert werden und somit die Vorteile der jeweiligen Methoden am Beispiel der Kultivierung von *E. coli* unter Einsatz von nicht-natürlichen Aminosäuren demonstriert werden.

Affinity based microfluidic separation of mitochondria from cell lysate

Sabrina Kayo, Matthias Klauser, Janina Bahnemann, Ralf Pörtner, An-Ping Zeng

Technische Universität Hamburg-Harburg, Hamburg

A rapid and sensitive isolation and characterization of mitochondria in high yield and purity is required to answer fundamental questions in systems biology and to support the optimization of industrial relevant cell lines. However, the common sample preparation steps such as using differential centrifugation are long and time-consuming which may lead to loss of physiological conditions and sample degradation.

This work introduces a new, immuno-affinity based method for isolation of mitochondria on a micro scale after cell disruption. As model organism we used the well-known industrial production cell line CHO-K1. The device comprises of linear micro channels casted in PDMS and sealed with glass. Specific antibodies against mitochondria are immobilized on the surface of the glass substrate using avidin-biotin sandwich construct. The mitochondria can be captured in the channel, whereas the remains of the lysate flow out the chip unhindered. Using a peltier cooler it is possible to cool down the whole chip so that a constant low temperature can be ensured during the sampling process (on chip quenching mechanism).

Using fluorescence microscopy and SEM we could show that the immobilized proteins and antibodies are active and covered the surface evenly. As proof of principle, successful immobilizations of pre-isolated mitochondria and mitochondria from cell lysates were shown. The yield is influenced by sampling time, antibody concentration on the surface, mitochondria concentration in the sample, as well as the flow rate used during sampling.

One advantage of our design is the possibility to directly observe the mitochondria on chip without the need to elute them first. The immobilized mitochondria can be used for *in-vitro* assays on chip, or eluted for metabolomic or proteomic analysis. Multiple biomarkers can also be immobilized in different segments of the channel so that simultaneous observation of different mitochondrial proteins or organelles is possible.

Subpopulation-proteomics in biotechnologically relevant bacterial populations

*Michael Jahn¹, Jana Seifert², Martin von Bergen^{2,3}, Andreas Schmid⁴, Bruno Bühler⁴
and Susann Müller¹*

¹ *Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department for Environmental Microbiology, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany*

² *Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department for Proteomics, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany*

³ *Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department for Metabolomics, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany*

⁴ *Laboratory of Chemical Biotechnology, Department of Biochemical and Chemical Engineering, TU Dortmund University, Emil-Figge-Str. 66, 44227 Dortmund, Germany*

In biotechnology, researchers are mainly working with pure prokaryotic cultures assuming that the performances of the cells might be computable and therefore controllable by applying, for example, simple Monod-kinetics. However, it was already demonstrated by many single cell based methods like flow cytometry and microchip technologies that cell behavior differs even under identical micro-environmental conditions.

Clonal microbial cells do not behave in an identical manner and form subpopulations during cultivation. Besides varying microenvironmental conditions, cell inherent features like cell cycle dependent localization and concentration of regulatory proteins as well as epigenetic properties are well accepted mechanisms creating cell heterogeneity. Another suspected reason is molecular noise on the transcriptional and translational level. A promising tool to unravel reasons for cell heterogeneity is the combination of cell sorting and subpopulation proteomics. This poster summarizes recent developments in prokaryotic single-cell analytics and provides a workflow for selection of single cells, low cell number mass spectrometry, and proteomics evaluation. This approach is useful for understanding the dependency of individual cell decisions on inherent protein profiles.