

Schlussbericht vom 30.04.2022

zu IGF-Vorhaben Nr. 20489 N

Thema

Proteinelektrophorese in offener Mikrofluidik

Berichtszeitraum

01.01.2019 - 31.12.2021

Forschungsvereinigung

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V.

Forschungseinrichtung(en)

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V. ("HS")

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik, Lehrstuhl für
Anwendungsentwicklung ("IMTEK")

Gefördert durch:

Inhaltsverzeichnis

Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse	3
Übersicht über das Projekt.....	3
Zielsetzung.....	3
Zeitplan	3
Darstellung der Ergebnisse.....	3
Offene Mikrofluidik und PRINTOMik-Strategie.....	3
Probeninjektion und elektrophoretische Proteintrennung.....	6
Proteintransfer und Immunoassay	8
Anwendungspotential	11
Zusammenfassung.....	12
Verwendung der Zuwendungen.....	13
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten	13
Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse sowie Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse	13
Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	14
Realisierbarkeit des Transferkonzepts	16

Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Übersicht über das Projekt

Zielsetzung

Ziel des Forschungsvorhabens 20489 N (PRINTOMik) war die Entwicklung einer miniaturisierten und automatisierten Proteinelektrophorese-Plattform auf der Basis einer offenen Mikrofluidik. Die Proteinelektrophorese (mit anschließendem immunologischen Nachweis spezifischer Zielproteine) ist eine der zentralen analytischen Methoden in einer Vielzahl von biochemischen Laboren, sowohl im akademischen Umfeld als auch in forschenden Biotechnologie- und Pharmaunternehmen. Die Standard-Verfahren (SDS-PAGE und Western Blot) sind jedoch sehr zeitaufwendig, erfordern viele manuelle Arbeitsschritte und weisen einen hohen Verbrauch an wertvollen Proben und kostenintensiven Antikörpern auf. Daher sind sie in Bezug auf die Automatisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Datenvalidität stark eingeschränkt. Im Rahmen von PRINTOMik wurde die Entwicklung einer neuartigen Plattform angestrebt, die den komplexen proteinbiochemischen Arbeitsablauf in eine miniaturisierte und weitgehend automatisierte Analytik überführt und somit die wesentlichen Nachteile der Standard-Verfahren adressiert. Dabei wurde auf eine Membran-basierte, offene Mikrofluidik gesetzt.

Zeitplan

Das Projekt war für eine Laufzeit vom 01.01.2019 bis zum 30.06.2021 ausgelegt. Durch Coronavirus-bedingte Verzögerungen in der Projektbearbeitung musste das Projekt einmalig (ausgabenneutral) bis zum 31.12.2021 verlängert werden.

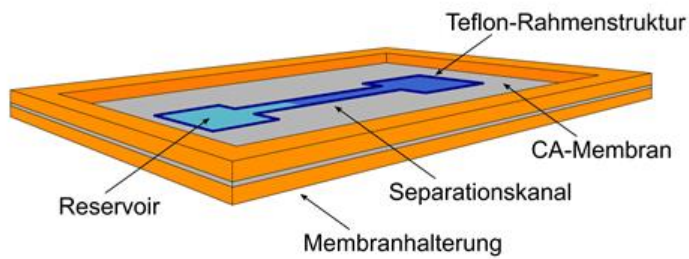
Darstellung der Ergebnisse

Im Zentrum des Forschungsvorhabens stand die Entwicklung einer offenen Mikrofluidik-Plattform, die eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen ermöglicht. Anschließend sollten die Proteine in einer geeigneten Form immobilisiert werden, um eine Schnittstelle zwischen der elektrophoretischen Auftrennung und dem immunologischen Nachweis eines spezifischen Zielproteins zu etablieren. Alle Prozessschritte sollten final in einem weitgehend automatisierbaren System integriert werden.

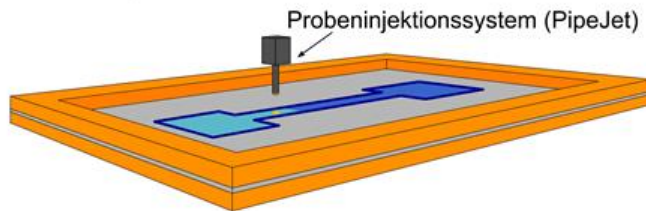
Offene Mikrofluidik und PRINTOMik-Strategie

Die Proteinelektrophorese-Plattform, die in diesem Forschungsvorhaben entwickelt wurde, beruht auf einer Membran-basierten, offenen Mikrofluidik. Hierbei werden mikrofluidische Strukturen in eine kompatible Membran eingebettet, indem die Membran mithilfe funktioneller Materialien strukturiert wird. Im Gegensatz zu herkömmlichen mikrofluidischen Kartuschen (strukturierte Polymere oder Glaschips) sind mikrostrukturierte Membranen sehr kosteneffizient, hochgradig skalierbar und mit geringen Infrastrukturanforderungen (keine Reinraumumgebung erforderlich) herstellbar. Durch die Einbettung der mikrofluidischen Strukturen in eine poröse Membran werden die Strukturen mechanisch stabilisiert (im Vergleich zu offenen Mikrofluidik-Strukturen auf der Oberfläche eines Polymersubstrates). Im Rahmen von PRINTOMik wurden die Membranen mithilfe eines digitalen Druckverfahrens hochauflösend strukturiert – hierfür wurde eine Teflon-haltige Lösung (Teflon in einem fluorinierten, organischen Lösungsmittel) lokal in die Membran eingedruckt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels bildete sich eine hydrophobe Barrierschicht innerhalb der Membran aus. Mithilfe dieses Verfahrens konnten mikrofluidische Elektrophoresestrukturen in eine Membran eingebettet werden (Abbildung 1).

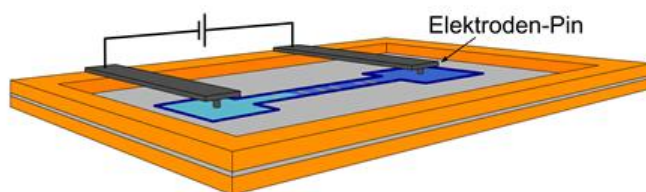
Offene Mikrofluidik



Probeninjektion



Elektrophorese



Proteintransfer

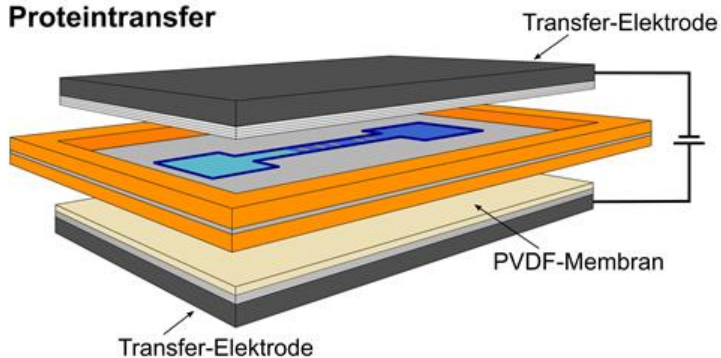


Abbildung 1: Übersicht über die Membran-basierten, offenen mikrofluidischen Strukturen sowie deren Prozessierung für eine elektrophoretische Proteinseparation mit immunologischem Nachweis. Die offene Mikrofluidik besteht aus einer mikrostrukturierten CA-Membran, in die mithilfe digitaler Druckverfahren geeignete Elektrophoresestrukturen eingebracht wurden. Nach der Injektion Protein-haltiger Proben erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine sowie deren Transfer auf eine Protein-bindende PVDF-Membran. Zuletzt wurden spezifische Zielproteine innerhalb der PVDF-Membran immunologisch nachgewiesen.

Umfangreiche Materialtests zu Projektbeginn ergaben, dass Celluloseacetat-Membranen (CA-Membranen) mit 5,0 μm Porengröße ideal für die PRINTOMik-Plattform geeignet sind, da sie mithilfe des digitalen Teflondrucks hochauflösend strukturiert werden können und eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen ermöglichen (siehe unten). Die eingesetzten

Elektrophoresestrukturen bestanden dabei im Wesentlichen aus einem Separationskanal mit endständigen Reservoiren (Abbildung 1), die die elektrische Kontaktierung der Strukturen ermöglichen und als Ionenreserve während der Elektrophorese dienen.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Hydrogele in die mikrofluidischen Strukturen eingebracht, die eine Separation der Proteine anhand ihres Molekulargewichts ermöglichen. Analog zu etablierten Proteinelektrophorese-Verfahren wurde dabei auf ein System aus zwei verschiedenen Gelmatrizen (Sammelgel und Trenngel) gesetzt, um die Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung zu optimieren. Diverse Hydrogelmatrizen wurden getestet, wobei sich Agarose-basierte Gele für die offene Mikrofluidik als besonders vielversprechend erwiesen. Standard-Verfahren für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen setzen vorrangig auf quervernetzte Polyacrylamid-Gele; diese konnten jedoch in der offenen Mikrofluidik nicht eingesetzt werden, da eine reproduzierbare Polymerisation der Acrylamid-Monomere nicht erzielt werden konnte. Als Hauptursachen hierfür wurde die sauerstoffhaltige Laborumgebung (Sauerstoff inhibiert die Radikalreaktion, die für die Polymerisation von Acrylamid verantwortlich ist) sowie die effektive Kompartimentierung der Acrylamid-Monomere in den Poren der CA-Membran angesehen. Auch lineare Polyacrylamid-Derivate, die in Mikrochips für die elektrophoretische Proteinseparation eingesetzt werden, erwiesen sich als ungeeignet für die offene Mikrofluidik. Mithilfe der Agarose-basierten Hydrogele (1 % Agarose im Sammelgel, 5 % Agarose im Trenngel) konnte hingegen ein System für eine effiziente und reproduzierbare Proteintrennung etabliert werden, wobei zusätzlich auf den Einsatz hochgiftiger Chemikalien (z.B. Acrylamid) verzichtet werden konnte.

Nach der Einbringung der Hydrogele in die Membran-basierte, offene Mikrofluidik wurden Proteinhaltige Proben in den Sammelgelbereich des Separationskanals injiziert (Abbildung 1). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes migrierten die Proteine entlang des Separationskanals, wobei (bedingt durch das Trenngel) eine Auftrennung anhand des Molekulargewichts erzielt wurde. Anschließend wurden die Proteine durch einen Elektrotransfer (analog zum Western Blot) aus der Gelmatrix im Separationskanal auf eine Protein-bindende Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Dabei werden die Proteine sowohl immobilisiert (durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der PVDF-Membran) als auch deren Zugänglichkeit für den anschließenden immunologischen Nachweis sichergestellt. Die Membran-ständige, offene Mikrofluidik ist für die Transfer-basierte Immobilisierung der Proteine ideal geeignet, da sie die vollständige Zugänglichkeit der mikrofluidischen Strukturen ermöglicht (im Gegensatz zu Mikrochips, in denen die mikrofluidischen Kanäle vollständig in eine Glas- bzw. Polymermatrix eingebettet sind). Zuletzt konnten anwenderspezifische Zielproteine mithilfe etablierter Verfahren (Immundetektion nach dem Western Blot) innerhalb der PVDF-Membran nachgewiesen werden, sodass mithilfe der offenen Mikrofluidik der komplette proteinbiochemische Arbeitsablauf (Proteintrennung und immunologischer Nachweis) abgedeckt werden konnte. Neben den schematischen Darstellungen (Abbildung 1) ist der reale Aufbau für die Probeninjektion sowie die elektrische Kontaktierung der offenen Mikrofluidik in Abbildung 2 dokumentiert.

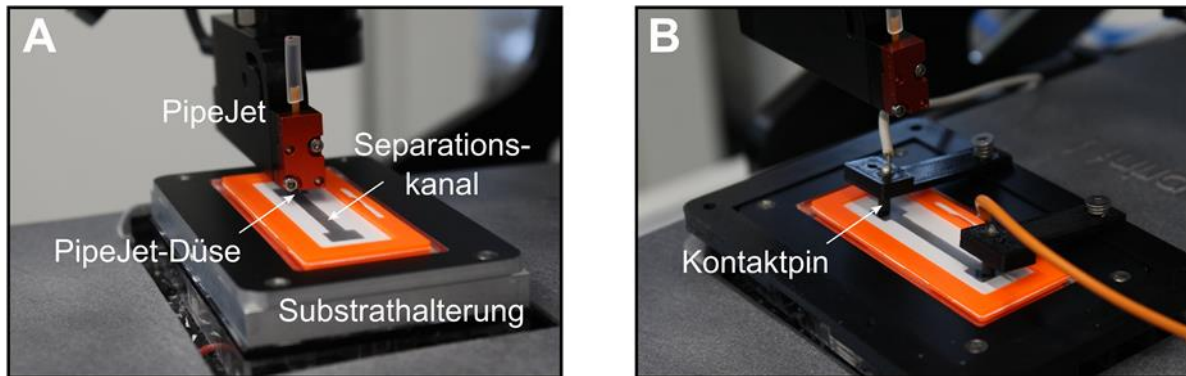


Abbildung 2: Aufbau für die Probeninjektion (A) bzw. die elektrische Kontaktierung der offenen Mikrofluidik (B).

Probeninjektion und elektrophoretische Proteintrennung

Nachdem die Membran-basierten Elektrophoresestrukturen generiert wurden, erfolgte die Injektion der Protein-haltigen Proben in das Sammelgel. Hierfür kamen Mikrodosierelemente (PipeJet®, BioFluidix GmbH) zum Einsatz, die eine hochpräzise Applikation minimaler Probenvolumina (typischerweise 10 nl) ermöglichten. Die Protein-haltigen Proben wurden zunächst mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) versetzt und für 10 min bei 90°C inkubiert, um die Proteine vollständig zu denaturieren und eine elektrophoretische Auftrennung anhand des Molekulargewichts zu ermöglichen. Anschließend wurden die Proben in das Mikrodosierelement eingegeben. Mithilfe eines Stroboskop-Aufbaus konnte eine hervorragende Reproduzierbarkeit dieser Mikrodosierelemente (Volumen-CV < 1%, n = 3205 Dispensiervorgänge) bei der Dispensierung von 10 nl Protein-haltigen Proben ermittelt werden. Durch die Integration von Rhodamin B-markierten Proteinen in die Probe sowie anschließende fluoreszenzmikroskopische Analysen konnte gezeigt werden, dass sich nach der Probeninjektion in den Sammelgelbereich des Separationskanals ein kreisrunder Injektionsspot mit $1000 \pm 47 \mu\text{m}$ Durchmesser (n = 22, CV = 4,7%) ausbildete.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes begannen die Proteine, entlang des Separationskanals zu migrieren (Abbildung 3). Dabei trafen die Proteine auf den Phasenübergang zwischen dem Sammelgel und dem Trenngel, der als stacking boundary (SB) bezeichnet wird. Durch die stark unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit der Proteine innerhalb des Sammelgels (hohe Migrationsgeschwindigkeit durch geringe Agarose-Konzentration) und des Trenngels (geringe Migrationsgeschwindigkeit durch hohe Agarose-Konzentration) wurde der Probeninjektionsspot an der SB komprimiert. Dadurch wird die Probeninjektionsdispersion reduziert und somit die Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung verbessert. Detaillierte Charakterisierungen zeigten, dass der Probeninjektionsspot an der SB um $49,9 \pm 3,5\%$ (n = 16, CV = 7,0%) entlang der Migrationsachse komprimiert wird, wodurch die Auflösung der anschließenden elektrophoretischen Proteintrennung um ca. 20% verbessert wurde.

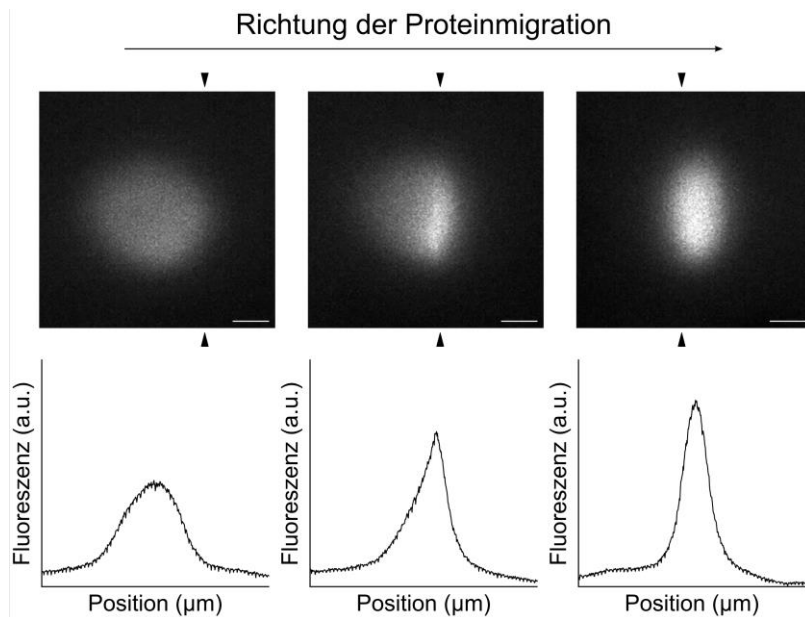


Abbildung 3: Reduktion der Probeninjektionsdispersion an der stacking boundary. Rhodamin B-markiertes Ovalbumin wurde stromaufwärts der stacking boundary in das Sammelgel (links) injiziert. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes begannen die Proteine zu migrieren und wurden dann an der stacking boundary (Pfeile) aufgrund der unterschiedlichen Porengröße zwischen dem Sammelgel (links) und dem Trenngel (rechts) komprimiert. Die oberen Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen des Phasenübergangs zwischen Sammelgel und Trenngel, Pfeilspitzen zeigen die Position der stacking boundary. Maßstabballen in den mikroskopischen Bildern entsprechen 500 µm. Unterhalb sind die entsprechenden Fluoreszenzprofile gezeigt, die aus den Aufnahmen extrahiert wurden.

Während der anschließenden Elektrophorese mit konstanter elektrischer Feldstärke (25 V/cm, 15 min) wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts im Separationskanal aufgetrennt. Zur Visualisierung wurden vier fluoreszenzmarkierte Modellproteine mit verschiedenem Molekulargewicht – Lysozym (14 kDa), Bsp98I (25 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und LacZ (116 kDa) – in entsprechende Linienstrukturen injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung konnte gezeigt werden, dass die vier Modellproteine reproduzierbar voneinander getrennt werden (Abbildung 4A). Die Separation Resolution (SR) gilt als Maß für die Auftrennung von zwei Molekülen in elektrophoretischen bzw. chromatographischen Verfahren – sie wird anhand des Abstandes zweier Peaks sowie der Peakbreite (im Elektropherogramm) berechnet und sollte mindestens 1,0 betragen, um von einer hinreichenden Trennung auszugehen. In der offenen Mikrofluidik konnte für alle Modellproteine eine Auflösung von $SR > 1,2$ ermittelt werden ($n = 24$, CV zwischen 9,8% und 14,8%), sodass von einer hinreichenden und reproduzierbaren Trennung dieser Proteine ausgegangen werden kann.

Zudem zeigte sich (analog zum Standard-Verfahren SDS-PAGE) ein linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,9935$) zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und der Migrationsdistanz (relativ zur SB) für alle vier Proteine (Abbildung 4B). Dies deutet darauf hin, dass die Proteine in der offenen Mikrofluidik ausschließlich anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Auch für die Migrationsdistanz der Modellproteine wurde eine akzeptable Reproduzierbarkeit ermittelt ($n = 24$, CV zwischen 6,7% und 14,0%). Die Leitfähigkeit der mikrofluidischen Strukturen reduzierte sich im Verlauf der Elektrophorese um 40 % (bedingt durch Verdunstungseffekte infolge des elektrischen Feldes; Abbildung 4C), jedoch erwies sich dieser Effekt als hinreichend reproduzierbar (CV zwischen 6,6% und 9,9%) für eine reproduzierbare

Proteinmigration und Proteinseparation. Die Verdunstungseffekte konnten durch eine aktive Substratkühlung und eine temporäre Abdeckung der offenen Mikrofluidik während der Elektrophorese auf dieses Maß begrenzt werden, wobei weitere Optimierungen zur Stabilisierung der elektrischen Leitfähigkeit in der Zukunft denkbar sind.

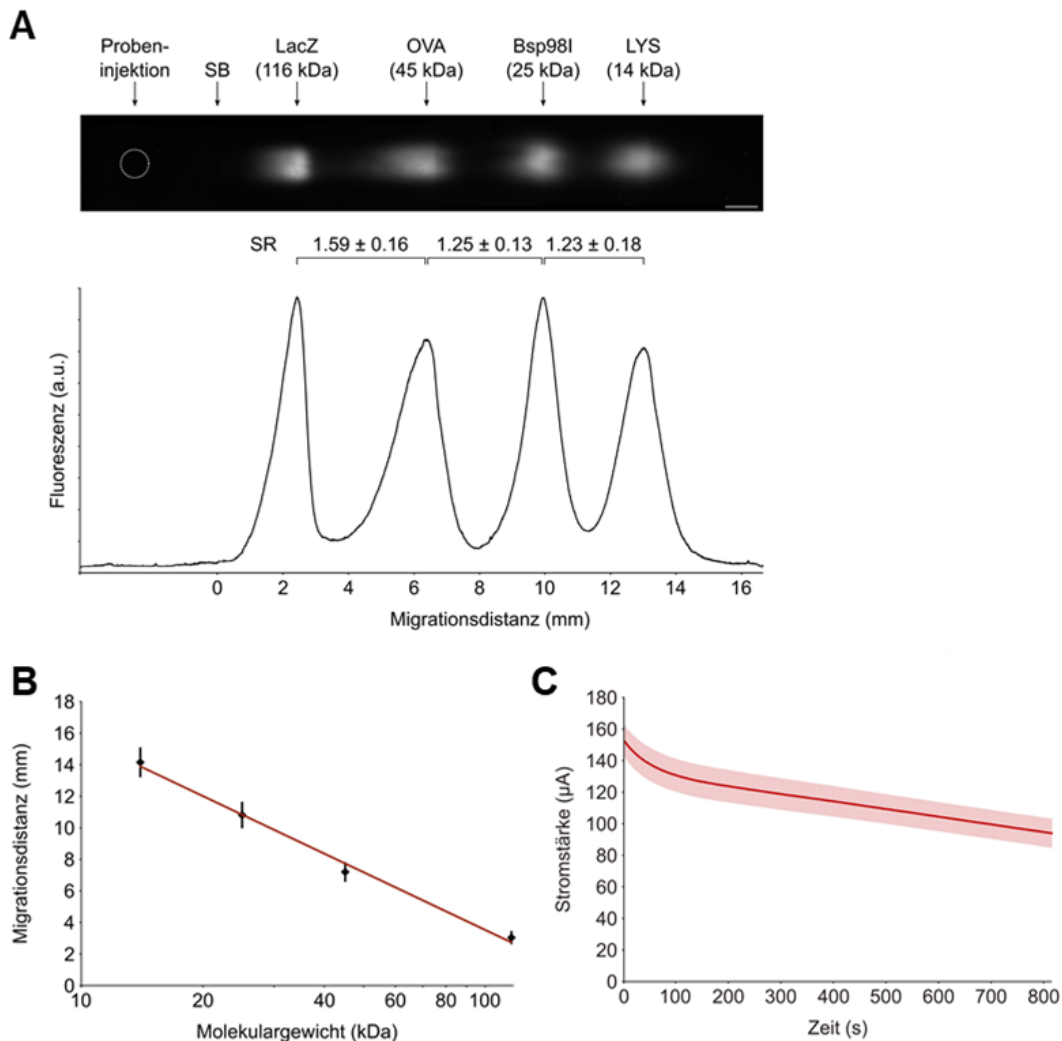


Abbildung 4: Elektrophoretische Auftrennung in offener Mikrofluidik. (A) Exemplarische Auftrennung von vier fluoreszenzmarkierten Modellproteinen sowie entsprechendes Elektropherogramm. Die SR-Werte entsprechen dem Mittelwert \pm eine Standardabweichung ($n = 24$), der Größenmaßstab im mikroskopischen Bild entspricht 1 mm. (B) Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Migrationsdistanz der Modellproteine. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm eine Standardabweichung ($n = 24$). (C) Leitfähigkeitsprofil der offenen Mikrofluidik während der Elektrophorese. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm eine Standardabweichung ($n = 24$).

Proteintransfer und Immunoassay

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung erfolgte der Elektrotransfer der Proteine aus der Gelmatrix im Separationskanal (innerhalb der CA-Membran) auf eine Protein-bindende PVDF-Membran (Abbildung 1). Hierfür kam das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories) zum Einsatz. Aufgrund der sehr geringen Dimensionen (140 μm Dicke der CA-Membran) konnte ein effizienter Proteintransfer innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (ca. 3 min) realisiert werden, wobei die maximale Transfereffizienz bei einem Elektrotransfer für 10 min (25 V, 72 mA/cm^2) erreicht wurde. Fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden durchgeführt,

um die Transfereffizienz der fluoreszenzmarkierten Proteine zu quantifizieren (Abbildung 5) – diese lagen im Bereich von 56 – 83% und waren somit vollständig vergleichbar mit dem klassischen Western Blot (Jungblut et al. 1990, Electrophoresis 11, 581-588). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch den Transferschritt die Auflösung der elektrophoretischen Separation nur minimal reduziert wird (Reduktion der SR-Werte um 10-15%), sodass das Separationsprofil auch nach dem Transferschritt erhalten blieb.

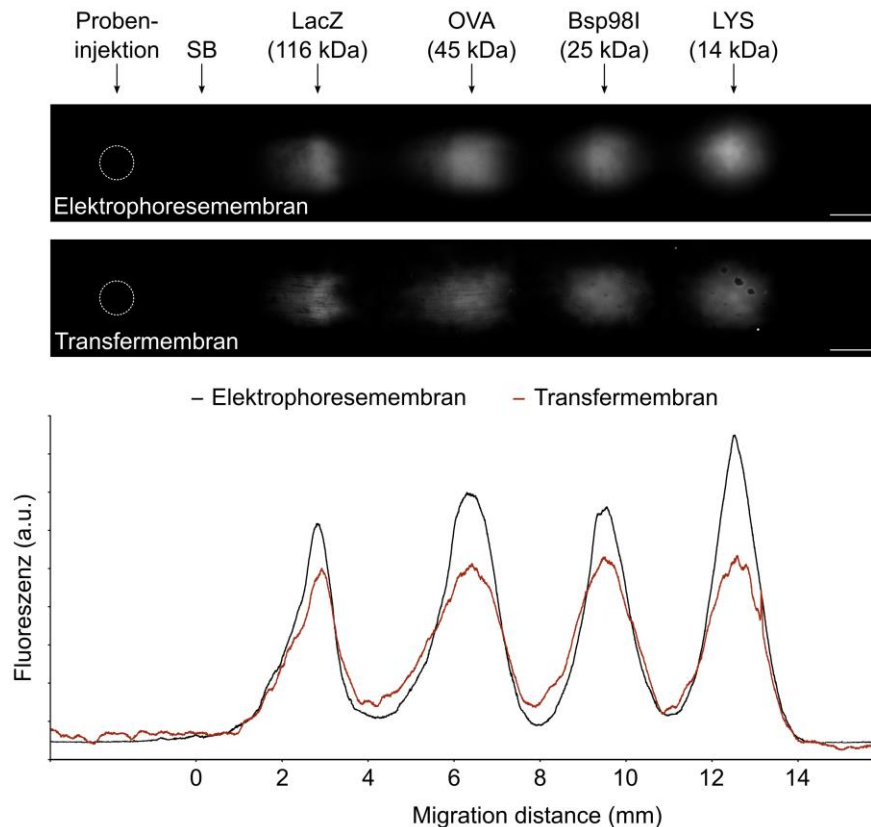


Abbildung 5: Bestimmung der Transfereffizienz. Vier Rhodamin B-markierte Proteine (LacZ, OVA, Bsp98I, LYS) wurden in die offene mikrofluidische Struktur injiziert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Gezeigt sind mikroskopische Bilder und die entsprechenden Elektropherogramme nach der Elektrophorese und nach dem Proteintransfer. Die Maßstabballen in den mikroskopischen Bildern entsprechen 1 mm.

Im Anschluss an den Transferschritt erfolgte der immunologische Nachweis anwenderspezifischer Zielproteine auf der Basis etablierter Verfahren (Blockierung der PVDF-Membran, Inkubation mit Primärantikörper und Enzym-markiertem Sekundärantikörper). Exemplarisch wurde dies zunächst für ein kommerzielles Fluoreszenzprotein (Grün fluoreszierendes Protein, GFP) gezeigt (Abbildung 6A).

GFP wurde dabei gemeinsam mit den vier Rhodamin B-markierten Modellproteinen (interner Größenstandard) in den Separationskanal injiziert, wodurch das Molekulargewicht der Immunoassay-Signale bestimmt werden konnte. Analog zur SDS-PAGE konnte GFP semi-quantitativ nachgewiesen werden (Abbildung 6B). Infolge der Miniaturisierung war die Nachweisgrenze in Bezug auf die absolute GFP-Masse in der offenen Mikrofluidik etwa um den Faktor 10 geringer als in der SDS-PAGE (10 pg GFP können in der offenen Mikrofluidik reproduzierbar nachgewiesen werden, während für die SDS-PAGE etwa 100 pg GFP erforderlich sind). Es ist davon auszugehen, dass die Sensitivität durch den Einsatz alternativer

Ausleseverfahren (z.B. Chemilumineszenz) noch erheblich gesteigert werden kann. Die Kompatibilität der offenen Mikrofluidik mit alternativen Verfahren zur Signalauslesung (Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper) konnte gezeigt werden.

Darüber hinaus konnte die Kompatibilität mit einem modernen, Vakuum-basierten Immunoassay-Verfahren gezeigt werden, wodurch sich der Zeitaufwand für den immunologischen Nachweis von 4-5 Stunden im diffusionsbasierten Verfahren auf ca. 25 min reduziert. Damit ergibt sich für den gesamten, proteinbiochemischen Ablauf ein Zeitaufwand von nur einer Stunde (10 min Probenvorbereitung + 15 min Elektrophorese + 10 min Proteintransfer + 25 min Immunoassay) – dies ist im Stand der Technik bisher unerreicht.

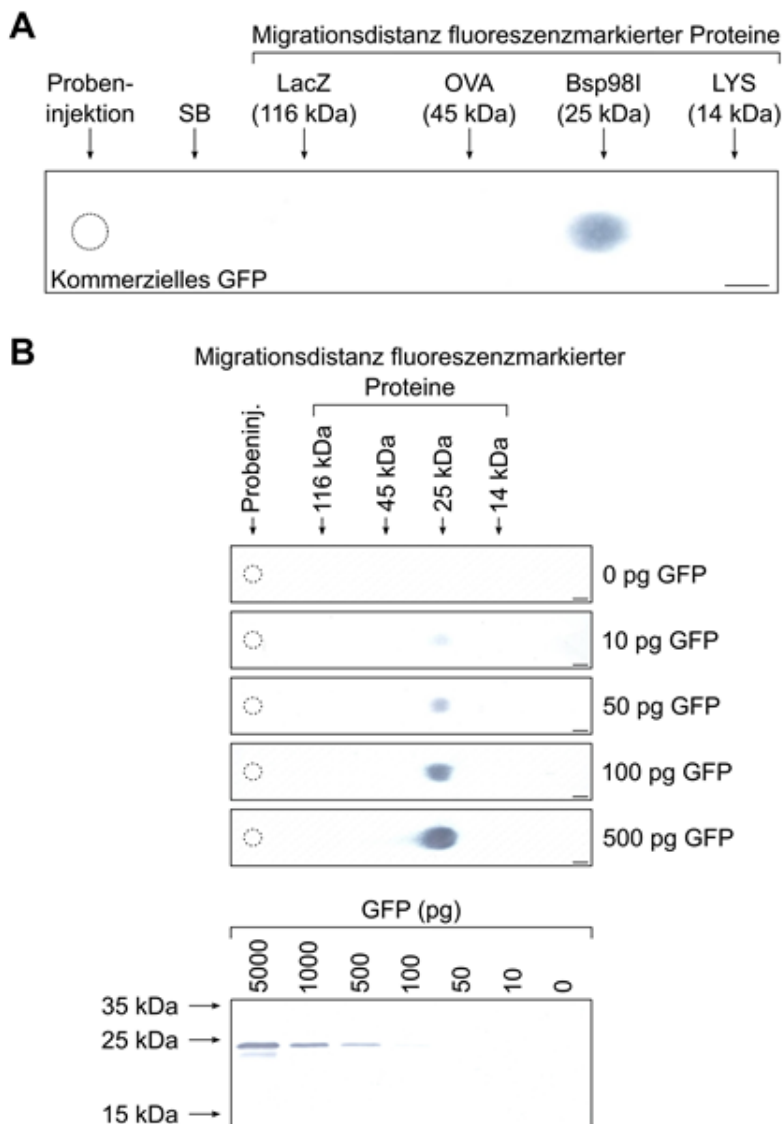


Abbildung 6: Immunoassay. (A) Immunologischer Nachweis von kommerziellem GFP (50 pg) nach gemeinsamer Injektion mit fluoreszenzmarkierten Modellproteinen, elektrophoretischer Auftrennung und Proteintransfer. Durch Fluoreszenzmikroskopie wurde die Position der Modellproteine und der SB bestimmt, der Größenmaßstab entspricht 1 mm. **(B)** Semi-quantitativer GFP-Nachweis. Verschiedene GFP-Konzentrationen wurden (zusammen mit den fluoreszenzmarkierten Modellproteinen) in der offenen Mikrofluidik aufgetrennt und GFP immunologisch nachgewiesen (oben). Der Größenmaßstab entspricht 1 mm. Zum Vergleich wurde GFP auch mittels SDS-PAGE und Western Blot (unter identischen Immunoassay-Bedingungen) nachgewiesen (unten).

Anwendungspotential

Um das Anwendungspotential der Technologie zu demonstrieren, wurden verschiedene Szenarien betrachtet. Zunächst wurde das Multiplexing-Potential der offenen Mikrofluidik analysiert. Durch den trennungsbasierten Ansatz bietet die Technologie eine intrinsische Multiplexing-Option, sofern die nachgewiesenen Proteine ein hinreichend unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu vier Proteine in einer Linienstruktur parallel nachgewiesen werden können (Abbildung 7A).

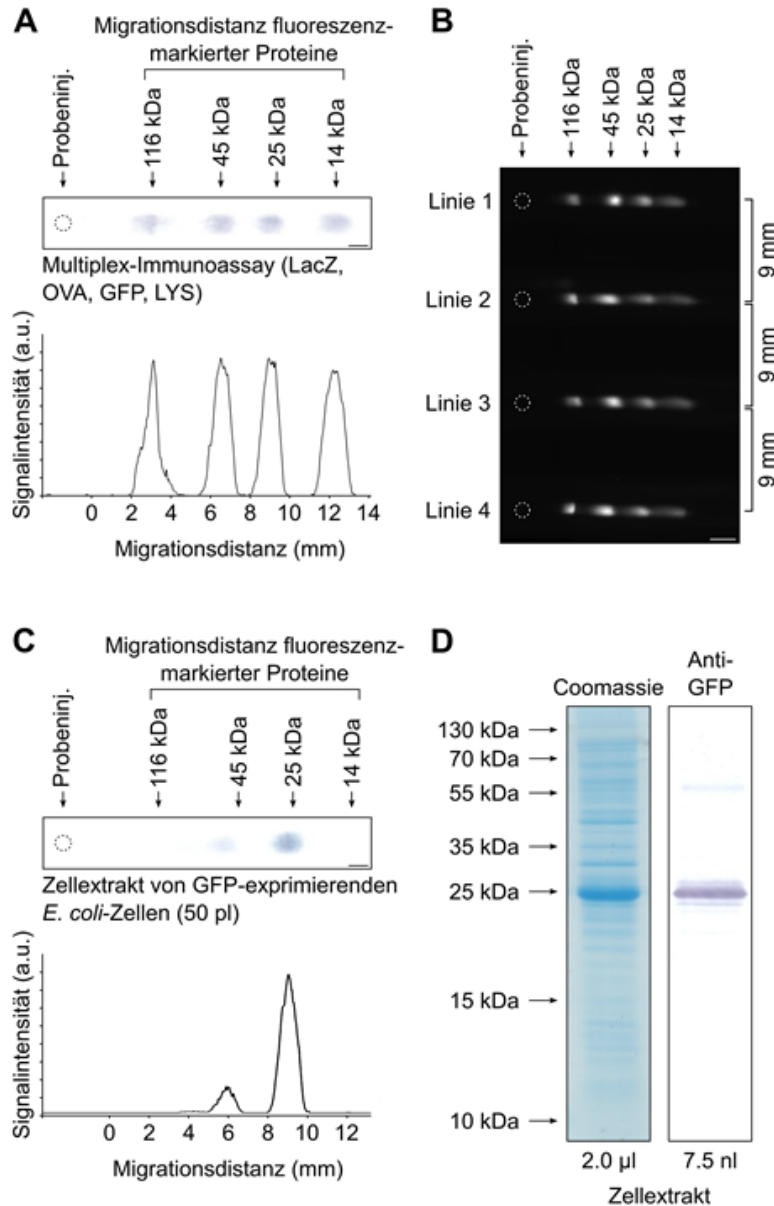


Abbildung 7: Anwendungspotential der offenen Mikrofluidik. (A) Multiplexing-Potential innerhalb einer Linienstruktur. Kommerzielles GFP wurde (zusammen mit vier fluoreszenzmarkierten Modellproteinen) in eine Linienstruktur injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden vier verschiedene Proteine simultan immunologisch nachgewiesen. Der Größenmaßstab entspricht 1 mm. (B) Multiplexing durch Linienarrays. Vier parallele Elektroforesestrukturen wurden in eine gemeinsame Membran eingebracht und simultan prozessiert. In jede Linienstruktur wurden vier fluoreszenzmarkierte Proteine injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Größenmaßstab entspricht 2 mm. (C) Anwendung für bakterielle Zellextrakte. *E. coli*-Zellen wurden thermisch lysiert und die Zellextrakte (zusammen mit vier

fluoreszenzmarkierten Modellproteinen) in die offene Mikrofluidik injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt; final wurde GFP mithilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen. Der Größenmaßstab entspricht 1 mm. **(D)** Elektrophoretische Auftrennung der *E. coli*-Zellextrakte mittels SDS-PAGE sowie Coomassie-Färbung bzw. Western Blot und immunologischer Nachweis von GFP.

Darüber hinaus sollte der Membran-basierte Immunoassay mit weiteren Multiplexing-Technologien (Multicolor-Multiplexing bzw. stripping/reprobing) vollständig kompatibel sein. Zudem kann Multiplexing auch durch eine Parallelisierung erreicht werden. Mehrere, parallele Elektrophoresestrukturen können in eine gemeinsame CA-Membran eingebracht und simultan prozessiert werden, wobei eine vergleichbare Auftrennung in allen parallelen Linienstrukturen erzielt wird. Wird eine identische Probe in jede dieser Linienstrukturen injiziert, können final unterschiedliche Zielproteine in jeder Struktur nachgewiesen werden (Multiplexing). Es konnte gezeigt werden, dass bis zu vier Elektrophoresestrukturen simultan prozessiert werden können (Abbildung 7B), wobei von einer geradlinigen Skalierbarkeit auf 8 oder 12 Linienstrukturen ausgegangen werden kann. Somit können, bei minimalem Probenbedarf (ca. 10 nl/Linienstruktur), komplexe immunologische Panels realisiert werden. Durch den Linienabstand von 9 mm, der auch in konventionellen liquid-handling-Systemen (z.B. 96-well Mikrotiterplatten) zu finden ist, ergibt sich hierbei ein sehr hohes Automatisierungspotential für zukünftige Anwendungen.

Zudem wurde die Kompatibilität der offenen Mikrofluidik mit komplexen biologischen Proben analysiert. Dafür wurden Zellextrakte von GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen in den offenen mikrofluidischen Strukturen analysiert. Die Zellextrakte erforderten keine spezielle Probenvorbereitung – die Zellen wurden lediglich thermisch aufgeschlossen (95°C, 10 min), die Rohextrakte mit den Rhodamin B-markierten Modellproteinen versetzt und in die offene Mikrofluidik injiziert. Das von den Zellen exprimierte GFP konnte immunologisch nachgewiesen werden (Abbildung 7C), wobei das Immunoassay-Profil (starkes Signal bei 25 kDa [GFP], schwächeres Signal bei 55-60 kDa [GFP-Dimer bzw. unspezifisches Signal]) identisch zur klassischen SDS-PAGE war (Abbildung 7D). Die offene Mikrofluidik lieferte diese Daten jedoch wesentlich schneller (insbesondere die elektrophoretische Auftrennung reduziert sich von 90-120 min in der SDS-PAGE auf 15 min in der offenen Mikrofluidik) und mit 150-fach reduziertem Probenbedarf. Somit konnte gezeigt werden, dass die offene Mikrofluidik auch mit hochkomplexen Proben wie bakteriellen Zellextrakten vollständig kompatibel ist.

Zusammenfassung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde eine offene Mikrofluidik-Plattform entwickelt, die durch eine weitgehende Miniaturisierung und Automatisierung durchaus konkurrenzfähig mit etablierten Verfahren ist. Die Machbarkeit der elektrophoretischen Auftrennung mit anschließendem Immunoassay konnte demonstriert werden, und die Technologie konnte in verschiedenen Anwendungsszenarien und mit komplexen Proben eingesetzt werden und lieferte hierbei vielversprechende Daten. So erwies sich die offene Mikrofluidik im Vergleich zur herkömmlichen SDS-PAGE als sehr zeiteffizient und materialsparend, und erste Schritte zu einer vollständigen Automatisierung konnten gezeigt werden. In einem Folgeprojekt (Fördermöglichkeiten werden aktuell evaluiert) soll die Plattform weiterentwickelt werden, um eine vollständige Automatisierung der trennungsbasierten Proteinimmunchemie zu ermöglichen.

Verwendung der Zuwendungen

- Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)
Im Berichtszeitraum wurde von HS Arbeit im Umfang von 33,49 Personenmonaten (wissenschaftlich-technisches Personal) geleistet, vom IMTEK wurden 33,65 Personenmonate (wissenschaftlich-technisches Personal) geleistet.
- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans): Entfällt.
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans): Entfällt.

Erläuterung zur Überschreitung der Personenmonate: Im Projekt PRINTOMik wurden ursprünglich von HS Arbeiten im Umfang von 30 Personenmonaten geplant. Aufgrund unerwarteter Schwierigkeiten bei der Etablierung einer kompatiblen Gelmatrix (siehe Zwischenbericht 2019) sowie Einschränkungen infolge der Coronavirus-Pandemie wurden von HS Arbeiten im Umfang von 33,49 Personenmonaten geleistet.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Die durchgeführten Arbeiten dienen der Erreichung des Projektziels, eine automatisierte und miniaturisierte Proteinelektrophorese-Plattform zu entwickeln. Diese Arbeiten entsprachen im Wesentlichen den im Projektantrag dargelegten Arbeitsschritten und stellten einen essentiellen Beitrag dar, um das Projektziel erreichen zu können. Die einzelnen Prozessschritte des Systems wurden zunächst individuell charakterisiert und quantitativ beschrieben; anschließend wurden sie in ein funktionales, weitgehend automatisierbares System überführt. Im Rahmen von regelmäßigen Projektbewertungen während der Projektlaufzeit wurden umfangreiche Risikobewertungen vorgenommen, um Projektrisiken zu identifizieren, geeignete Maßnahmen abzuleiten und somit die effektive und effiziente Verwendung der Fördermittel sicherzustellen. Aufgrund der Verzögerungen bei der Etablierung einer kompatiblen Gelmatrix (siehe Zwischenbericht 2019) sowie zahlreichen Einschränkungen infolge der Coronavirus-Pandemie trat eine Verzögerung in der Projektbearbeitung von ca. 6 Monaten auf, die durch die ausgabenneutrale Laufzeitverlängerung bis zum 31.12.2021 kompensiert wurde.

Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse sowie Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Der wissenschaftlich-technische Nutzen der erzielten Ergebnisse ist als hoch einzustufen. Es wurden eine Vielzahl von technischen Innovationen im Bereich der offenen, Papier-basierten Mikrofluidik entwickelt, die das Forschungsfeld bereichern können. Es wurde eine neuartige Methode zur Strukturierung poröser Substrate (digitaler Druck von Teflon in CA-Membranen) etabliert, der auch in anderen Systemen (z.B. Papier-basierte Mikrofluidik) von Interesse sein kann. Darüber hinaus wurden Systeme und Workflows etabliert, die die offene Mikrofluidik im Allgemeinen und die elektrophoretische Auftrennung von Biomolekülen in Papier-basierten Systemen im Speziellen erweitern.

Der wirtschaftliche Nutzen insbesondere für KMU liegt darin, dass die Machbarkeit einer offenen mikrofluidischen Prozessführung gezeigt werden konnte. Damit bietet die entwickelte Technologie umfangreiche Anknüpfungspunkte zu etablierten und innovativen Produkten im

Bereich der Proteinseparation und immunologischen Detektion. Aufgrund ihrer Datenvolidität und Aussagekraft zählen SDS-PAGE und Western Blot immer noch zu den Standardmethoden in der akademischen und industriellen Forschung und Entwicklung – jedoch ist das Marktpotential dieser Systeme wesentlich durch die Kosten für die Antikörper und den hohen Arbeitsaufwand limitiert (Inkwood Research, "GLOBAL WESTERN BLOTTING MARKET FORECAST 2019-2027"). Beide Parameter werden durch die Miniaturisierung und Automatisierung in der offenen Mikrofluidik wesentlich zugunsten des Anwenders verschoben, sodass der Marktzugang der Technologie sichergestellt ist. Der komplette proteinbiochemische Arbeitsablauf konnte auf der Basis einer mikrostrukturierten Membran umgesetzt werden, wodurch sich langfristig das Potential ergibt, eine vollautomatisierte und sehr kostengünstige Alternative zu SDS-PAGE und Western Blot zu etablieren. Mit der Entwicklung und Vermarktung dieser Plattform können KMUs ihre Geschäftsfelder erweitern bzw. ihre Marktstellung stärken.

Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Zeitraumen
Projekttreffen	Informationsaustausch mit dem PA	Freiburg	Jährlich während der Projektlaufzeit. Erfolgt am 28.06.2019, 17.08.2020 und 23.11.2021.
Bilaterale Absprache	Informationsaustausch mit PA-Mitgliedern	Nach Absprache	Nach Bedarf. Bilaterale Absprachen mit PA-Mitgliedern (insbesondere mit BioFluidix, Candor, anamed, Ruhr-Universität Bochum) im März/Mai/Juli 2019, im Mai/Juni/Juli 2020 sowie im März/April/Okttober 2021.
Präsentation Funktionsmuster	Präsentation gegenüber interessierten Firmen	Demonstrationen im Labor von HS bzw. IMTEK	Funktionsmuster der Membranbasierten, offenen Mikrofluidik stehen für Präsentationen zur Verfügung.
Einrichten und Aktualisieren einer Projektseite	Information über Projektausrichtung und Ergebnisse	Homepages von HS und IMTEK	www.hahn-schickard.de/projekt-detail/printomik https://www.imtek.de/professuren/anwendungsentwicklung/projekte/projekte?projectId=11259
Präsentation auf Messen	Vorstellung der Plattform sowie der Projektergebnisse gegenüber Anwendern	Messen (z. B. Analytica)	Prinzipiell stehen Funktionsmuster zur Präsentation zur Verfügung. Aufgrund der Coronavirus-Pandemie ist die Teilnahme an Messen aktuell jedoch stark eingeschränkt.
Publikation in wissenschaftlichen Veröffentlichungen	Information des Fachpublikums bezüglich der Themen offene Mikrofluidik, vollautomatisierter Western Blot und Proteinanalytik	Fachzeitschriften (z. B. Electrophoresis)	Die Projektergebnisse sind wissenschaftlich veröffentlicht: Hennig, S., Shu, Z., Gutzweiler, L., Koltay, P., von Stetten, F., Zengerle, R. and Früh, S.M. (2022), <i>Paper-based open microfluidic platform for protein electrophoresis and immunoprobing.</i>

			ELECTROPHORESIS, 43: 621-631. https://doi.org/10.1002/elps.202100327
Teilnahme an Konferenzen	Vorstellung der Ergebnisse gegenüber Anwendern, Fachpublikum & Unternehmen	Konferenzen und Tagungen (z.B. μ TAS, MST-Kongress)	Die Projektergebnisse stehen für die Präsentation auf Konferenzen zur Verfügung. Die Teilnahme an Konferenzen war jedoch aufgrund der Coronavirus-Pandemie stark limitiert. Die Ergebnisse wurden auf den folgenden Konferenzen präsentiert: Brunauer, A.; Breiner, B.; Hennig, S.; Kainz, D. M.; Verboket, R. D.; Johannsen, B.; Baumgartner, D.; Mitsakakis, K.; Gutzweiler, L.; Shu, Z.; Koltay, P.; Hutzenlaub, T.; Paust, N.; Zengerle, R.; Stetten, F. von; Früh, S. M. (2021): <i>Actuation principles for membrane-based bioanalytical devices - from smart membrane cartridges to highly integrated test stripes</i> . (Poster, 26.-29.07.2021) online: Biosensors Hennig, S., Shu, Z., Gutzweiler, L., Koltay, P., von Stetten, F., Zengerle, R. and Früh, S.M., <i>Paper-based open microfluidic platform for automatic protein analysis</i> . (Poster, 24.-27.05.2022) Dublin: SLAS Europe
Vorlesungen und Praktika	Ausbildung des Nachwuchses für Industrie und Wissenschaft	Lehrveranstaltungen der Universität Freiburg	Die Projektergebnisse sollen in geeignete Lehrveranstaltungen des Lehrstuhl einfließen (in Vorbereitung).
Workshops mit Unternehmen	Workshops mit Unternehmen zur Diskussion von Anwendungsszenarien/ Transferszenarien der Technologie in deren Produkte. Ggf. Planung von Folgeprojekten	Labor von HS bzw. IMTEK	Mehrere Online-Meetings mit Unternehmen (innerhalb und außerhalb des PA) haben stattgefunden. Mögliche Folgeprojekt zur Weiterentwicklung der Technologie, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung eines vollautomatisierten Prozessierungsgeräts, werden aktuell evaluiert.
Schutzrechte	Anmeldung von Schutzrechten für Erfindungen im Rahmen des Projekts. Ggf. Planung von Folgeprojekten mit	Labor von HS bzw. IMTEK	Verwertung der bereits angemeldeten Schutzrechte für die zugrundeliegende Technologie (Patentanmeldung der Universität Freiburg). Möglicherweise werden weitere Schutzrecht im Rahmen des Folgeprojektes angemeldet.

	Unternehmen auf der Basis der Schutzrechte		
--	--	--	--

Realisierbarkeit des Transferkonzepts

Der Transfer der Projektergebnisse in die Wirtschaft, insbesondere in Form von öffentlich geförderten Kooperationsprojekten der Projektpartner HS und IMTEK mit KMUs, wird als sehr wahrscheinlich angesehen. Mehrere KMU haben Interesse an der Weiterentwicklung der offenen Mikrofluidik hin zu einer vollautomatisierten Proteinelektrophorese-Plattform geäußert. Daher wird aktuell die Möglichkeit eines entsprechenden Folgeprojektes evaluiert. Die Projektergebnisse sind in der wissenschaftlichen Literatur veröffentlicht (Hennig et al., <https://doi.org/10.1002/elps.202100327>), sodass die Ergebnisse auf Konferenzen, Messen etc. vorgestellt und die mikrofluidische Plattform im akademischen und industriellen Bereich beworben werden kann (Ergebnisse wurden bereits auf den folgenden Konferenzen präsentiert: Biosensors 2021 online, SLAS Europe 2022 in Dublin). Einige Mitglieder des PA haben sich zudem bereiterklärt, den im Rahmen eines Folgeprojekts zu entwickelnden Prototyp in ihrer Arbeitsumgebung ausgiebig zu testen, sodass auch die bestehenden Kontakte zwischen Forschung und Industrie weiter ausgebaut werden könne