

# PROTEOfectene®

Das hocheffektive Proteofektionsreagenz  
für Säugerzellen

Bestellinformationen, SDB, Publikationen und Anwendungsbeispiele unter [www.bionttx.com](http://www.bionttx.com)

| Produkt        | Bestell-Nr. | Packungsgröße                                   |
|----------------|-------------|-------------------------------------------------|
| PROTEOfectene® | E010-0.1    | PROTEOfectene® 100 µl<br>R-Phycoerythrin 100 µl |
| PROTEOfectene® | E010-0.25   | PROTEOfectene® 250 µl<br>R-Phycoerythrin 100 µl |

**Versand:** Bei Raumtemperatur

**Lagerung:** PROTEOfectene® 4°C (**nicht einfrieren**)  
R-Phycoerythrin 4°C (**nicht einfrieren**)

**Stabilität:** Haltbar bis: siehe Label.

**Gebrauch:** Nur für Forschungszwecke *in vitro*, nicht zur diagnostischen, therapeutischen oder anderer klinischen Anwendung an Mensch oder Tier.

## Beschreibung

Der Transport von Proteinen in lebende Zellen stellt eine Alternative zur Transfektion von Nukleinsäuren und ein leistungsfähiges Werkzeug für Funktionsstudien dar. Das Reagenz PROTEOfectene® eröffnet ganz neue Forschungsbereiche in der aufstrebenden Disziplin Proteomics, worüber komplexe molekulare Mechanismen aufgedeckt werden können. PROTEOfectene® ist eine lipid-basierte Formulierung, die einfach mit dem entsprechenden Protein gemischt wird und nicht-kovalent gebundene Komplexe mit Proteinen bildet. Diese Komplexe werden dann von den Zellen per Endozytose aufgenommen und die in Struktur und Funktion gänzlich unveränderten Proteine werden im Zytoplasma freigesetzt.

## Inhalt

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Allgemeine Hinweise .....</b>                                           | <b>3</b>  |
| 1.1 Spezifikation .....                                                       | 3         |
| 1.2 Qualitätskontrolle .....                                                  | 3         |
| 1.3 Erläuterung.....                                                          | 3         |
| Wichtige Kriterien für den effizienten Transport von Proteinen in Zellen..... | 3         |
| Wichtiger Parameter: Proteinreinheit .....                                    | 3         |
| <b>2. Standardprotokoll.....</b>                                              | <b>4</b>  |
| 2.1 Allgemeine Hinweise .....                                                 | 4         |
| 2.2 Vorbereitung der Zellen.....                                              | 4         |
| Adhärente Zellen.....                                                         | 4         |
| Suspensionszellen .....                                                       | 4         |
| 2.3 Bildung des Proteoplexes.....                                             | 5         |
| <b>3. Optimierungsprotokoll.....</b>                                          | <b>6</b>  |
| 3.1 Protein : Lipid-Verhältnis.....                                           | 6         |
| 3.2 Proteinmenge.....                                                         | 6         |
| 3.3 Weitere Parameter.....                                                    | 7         |
| Zelldichte .....                                                              | 7         |
| Puffer zur Verdünnung des Proteins .....                                      | 7         |
| Inkubationszeit .....                                                         | 7         |
| An- bzw. Abwesenheit von Serum .....                                          | 7         |
| Transfektionsvolumen.....                                                     | 7         |
| <b>4. Troubleshooting .....</b>                                               | <b>8</b>  |
| 4.1 Positivkontrolle.....                                                     | 8         |
| 4.2 Geringe Transporteffizienz .....                                          | 9         |
| Reinheit des Proteins .....                                                   | 9         |
| Zelldichte .....                                                              | 9         |
| Zustand der Zellen .....                                                      | 9         |
| Medium für die Herstellung des Proteoplexes .....                             | 9         |
| Alte Proteoplexe .....                                                        | 9         |
| Temperatur von PROTEOfectene® .....                                           | 9         |
| Lagerung von PROTEOfectene® .....                                             | 9         |
| 4.3 Zelltoxizität.....                                                        | 10        |
| Zu hohe Konzentration des Proteoplexes .....                                  | 10        |
| Zellvitalität .....                                                           | 10        |
| Das Protein ist zytotoxisch.....                                              | 10        |
| Inkubationszeit .....                                                         | 10        |
| Proteinqualität .....                                                         | 10        |
| Transport eines Schlüsselproteins.....                                        | 10        |
| <b>5. Sonstiges.....</b>                                                      | <b>11</b> |
| 5.1 Wichtige Informationen .....                                              | 11        |
| 5.2 Gewährleistung .....                                                      | 11        |

# 1. Allgemeine Hinweise

## 1.1 Spezifikation

|            |                                                            |
|------------|------------------------------------------------------------|
| Anwendung  | Protein-Transport in lebende Säugerzellen                  |
| Sterilität | getestet                                                   |
| Assays     | 100 µl: max. 100 (24-Well-Platte); max. 20 (6-Well-Platte) |
| Zellkultur | getestet                                                   |
| Lagerung   | 4°C                                                        |

R-Phycoerythrin (Positivkontrolle, 100 µg/ml) ist ein fluoreszierendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa.

Anregungswellenlängen: 480, 545 and 565 nm. Emissionswellenlänge: 578 nm (sichtbares Rot).

## 1.2 Qualitätskontrolle

Um die Qualität von PROTEOfectene® sicherzustellen, wird jedes Lot anhand strikter Standards getestet. Es werden folgende Assays durchgeführt:

Reinheit: Silica Gel TLC

Sterilität: Thioglycolate-Test

Biologische Aktivität: Mit Hilfe von Zytofluorimetrie und Fluoreszenzmikroskopie überwachter Transport von R-Phycoerythrin in NIH3T3 Zellen.

## 1.3 Erläuterung

### Wichtige Kriterien für den effizienten Transport von Proteinen in Zellen

Proteine unterscheiden sich bezüglich ihrer Größe, Struktur, Zusammensetzung und biophysikalischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu Nukleinsäuren, die sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften kaum unterscheiden, können die Interaktionen von Proteinen mit einem Lipid wie PROTEOfectene® höchst unterschiedlich sein. Daher können die optimalen Transport-Parameter eines Proteintyps nicht ohne weiteres auf einen anderen übertragen werden. Auch die Transport-Effizienz kann von einer Zelllinie zur anderen variieren.

Einige Proteine können aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften nicht effizient mit PROTEOfectene® transportiert werden. So sind zum Beispiel stark basische Proteine, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind, sehr schwer in Zellen einzubringen (siehe Troubleshooting Kapitel 4.2).

Es gibt keine generellen Regeln, mit denen sich bestimmen ließe, ob ein Protein transportiert werden kann oder nicht. Probieren Sie deshalb PROTEOfectene® mit dem für Sie interessanten Protein aus!

### Wichtiger Parameter: Proteinreinheit

Jegliche Verunreinigungen, Kontaminationen und Additive, die sich in der Proteinlösung befinden, können die Transporteffizienz beeinträchtigen. Verwenden Sie folglich ein möglichst reines Protein. Stabilisatoren, wie z.B. Detergenzien, können den Proteintransport hemmen, wenn sie in großem Überschuss gegenüber dem Protein vorhanden sind. Stabilisatoren wie Glycerol oder ähnliche Additive stören den Transport hingegen nicht.

Konservierungsmittel, wie z.B. Natriumazid, können zu Zytotoxizität führen, wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen. Falls nötig, können solche Konservierungsmittel per Dialyse entfernt werden.

## 2. Standardprotokoll

### 2.1 Allgemeine Hinweise

Die folgende Arbeitsanleitung stellt ein Standardprotokoll dar, das bei einer Vielzahl von Zelllinien erfolgreich eingesetzt wurde. PROTEOfectene® ist ausführlich getestet und optimiert worden, um Ihnen ein einfaches und effizientes Vorgehen zu ermöglichen. Das Standardprotokoll sollte als allgemeine Richtlinie zur Planung Ihrer Versuche dienen. Die optimalen Bedingungen und Parameter unterscheiden sich von Protein zu Protein und von Zelllinie zu Zelllinie und müssen, wie in Kapitel 3 beschrieben, für jedes Versuchssetup neu bestimmt werden.

Das mitgelieferte R-Phycoerythrin (100 µg/ml) dient dabei als Positivkontrolle. Es wird mit einem Protein:Lipid-Verhältnis von 1:2 (pro 1 µg Protein 2 µl PROTEOfectene®) verwendet. R-Phycoerythrin ist beim Erstellen neuer Versuche hilfreich und sollte bei jeder neuen Zelllinie zum Einsatz kommen (siehe Kap. 4.1).

Die Reinheit des zu transportierenden Proteins und die An- bzw. Abwesenheit von Additiven und/oder Verunreinigungen haben einen hohen Einfluss auf die Transporteffizienz.

### 2.2 Vorbereitung der Zellen

#### Adhärenente Zellen

Die Zellen werden am Tag vor dem Protein-Transportversuch ausgesät. Die optimale Zelldichte hängt dabei von der Proliferationsrate und dem Zustand der Zellen ab. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt des Proteintransports zu etwa 50–70% konfluent (Bedeckung der Wachstumsfläche) sein.

#### Suspensionszellen

Schnellwachsende Suspensionszellen werden einen Tag vor dem Protein-Transportversuch bei einer Konzentration von etwa  $2 - 5 \times 10^5$  Zellen/ml gesplittet, um sie in optimaler Verfassung zu halten.

Tabelle 1: Auszusäende Zellzahlen für verschiedene Zellkulturgefäße

| Zellkulturgefäß  | Zellzahl adhärenente Zellen | Zellzahl Suspensionszellen | Überstandsvolumen |
|------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 96 Well          | $0.05 - 0.15 \times 10^5$   | $0.5 - 1 \times 10^5$      | 100 µl            |
| 24 Well          | $0.5 - 1 \times 10^5$       | $1.5 - 5 \times 10^5$      | 400 µl            |
| 12 Well          | $1 - 2 \times 10^5$         | $2.5 - 10 \times 10^5$     | 900 µl            |
| 6 Well           | $2.5 - 5 \times 10^5$       | $5 - 20 \times 10^5$       | 1.8 ml            |
| 60 mm Dish       | $5 - 10 \times 10^5$        | $1 - 5 \times 10^6$        | 3.8 ml            |
| 90 – 100 mm Dish | $12 - 30 \times 10^5$       | $2.5 - 10 \times 10^6$     | 7.6 ml            |
| T-75 Flasche     | $15 - 40 \times 10^5$       | $5 - 15 \times 10^6$       | 9.6 ml            |

## 2.3 Bildung des Proteoplexes

1. Das **Protein in 1x PBS auf** eine Konzentration von **100 µg/ml verdünnen**.

Kleine Konzentrationen von Glycerol (1–5%) in der Proteinlösung sind akzeptabel. BSA darf nicht vorhanden sein, da es den Proteintransport verhindern kann.

2. **Protein** (100 µg/ml) nach Tabelle 2 in ein Reaktionsgefäß **pipettieren**.

Verdünnen Sie PROTEOfectene® nicht. Wenn das Pipettieren von sehr kleinen Mengen nötig wäre, stellen Sie eine größere Menge Proteoplex (Protein–PROTEOfectene®–Komplex) her.

3. **PROTEOfectene®** nach Tabelle 2 in das Reaktionsgefäß **zugeben**, welches das Protein enthält.  
Durch mehrfaches sanftes Auf- und Abpipettieren mischen.
4. Für 10–15 min bei Raumtemperatur **inkubieren**.
5. **Serum-freies Medium** zur Proteoplexlösung **zugeben** (siehe Verdünnungsvolumen in Tabelle 2) und direkt im Anschluss auf die Zellen geben, die in ihrem üblichen Kulturmedium (mit Serum) wachsen.  
Bei Suspensionszellen wird die Komplexlösung mit der Zellsuspension durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren (3–4 Mal) vermischt, um eine homogene Verteilung der Komplexe zu gewährleisten.
6. **Zellen** unter Standardbedingungen **inkubieren** (z.B. bei 37°C in CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre), bis die Auswertung des Versuchs stattfindet (3–48 h). Inkubationszeit siehe Kapitel 3.3 Weitere Parameter.

Tabelle 2: Standardmengen von Protein und PROTEOfectene®, Verdünnungsvolumen und Gesamtvolumen pro Well/Schale/Flasche für verschiedene Zellkulturformate

| Zellkulturgefäß       | Protein<br>[µg] | PROTEOfectene®<br>[µl] | Verdünnungsvolumen<br>[µl] | Gesamtvolumen |
|-----------------------|-----------------|------------------------|----------------------------|---------------|
| 96 Well               | 0.4             | 0.8                    | 20                         | 120 µl        |
| 24 Well               | 1               | 2                      | 100                        | 500 µl        |
| 12 Well               | 2               | 4                      | 100                        | 1 ml          |
| 6 Well                | 5               | 10                     | 200                        | 2 ml          |
| 60 mm Schale          | 10              | 20                     | 200                        | 4 ml          |
| 90 – 100 mm<br>Schale | 30              | 60                     | 400                        | 8 ml          |
| T-75 Flasche          | 35              | 70                     | 400                        | 10 ml         |

## 3. Optimierungsprotokoll

### 3.1 Protein : Lipid-Verhältnis

Zunächst wird das Protein:Lipid-Verhältnis für das verwendete Protein und den verwendeten Zelltypus optimiert. Dazu wird die im Standardprotokoll angegebene Proteinmenge konstant gehalten und das Protein:Lipid-Verhältnis von 0.5:1 bis 1:5 verändert.

So werden z.B. 0.5 bis 5 µl PROTEOfectene® für 1 µg Protein im 24-Well Format verwendet.

### 3.2 Proteinmenge

Anschließend wird die Proteinmenge bei gleichbleibendem Protein:Lipid-Verhältnis erhöht.

*Tabelle 3: Optimierung der Proteinmenge und des Volumens an PROTEOfectene®*

| Zellkulturgefäß           | Protein [µg] | PROTEOfectene® [µl] | Verdünnungsvolumen [µl] | Gesamtvolumen |
|---------------------------|--------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| <b>96 Well</b>            | 0.2 – 0.5    | 0.2 – 1             | 20                      | 120 µl        |
| <b>24 Well</b>            | 0.5 – 2      | 0.5 – 5             | 100                     | 500 µl        |
| <b>12 Well</b>            | 1 – 4        | 1 – 10              | 100                     | 1 ml          |
| <b>6 Well</b>             | 2.5 – 10     | 2.5 – 25            | 200                     | 2 ml          |
| <b>60 mm Schale</b>       | 5 – 20       | 5 – 50              | 200                     | 4 ml          |
| <b>90 – 100 mm Schale</b> | 15 – 60      | 15 – 120            | 400                     | 8 ml          |
| <b>T-75 Flasche</b>       | 20 – 80      | 20 – 160            | 400                     | 10 ml         |

### 3.3 Weitere Parameter

Nach der Optimierung von Protein:Lipid-Verhältnis und Proteinmenge können – wenn nötig – folgende Parameter optimiert werden.

#### **Zelldichte**

Beste Ergebnisse werden erreicht, wenn die Zellen zum Zeitpunkt des Proteintransports zu etwa 50–70% konfluent (Bedeckung der Wachstumsfläche) sind.

#### **Puffer zur Verdünnung des Proteins**

1x PBS wird empfohlen, allerdings können andere Puffer (z.B. TRIS, HEPES oder HBS) abhängig vom Protein bessere Ergebnisse liefern.

#### **Inkubationszeit**

Die optimale Zeitspanne zwischen Transport des Proteins und Ausführung des Assays variiert u.a. mit der verwendeten Zelllinie, dem Proteintypus und der biologischen Funktion des Proteins.

Es sollte ein Experiment, das den Zeitverlauf des Protein-Transports beobachtet, durchgeführt werden, um die optimale Inkubationszeit zu ermitteln. Diese hängt z.B. von der Halbwertszeit des Proteins ab.

Die Transporteffizienz wird nach 4–96 h ermittelt.

#### **An- bzw. Abwesenheit von Serum**

PROTEOfectene® kann in serumfreiem Kulturmedium eingesetzt werden. Für diesen Fall wird das gesamte Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Dieses Verfahren kann bei bestimmten Zellen zu einem effizienteren Transport führen. Nach 3–4 h wird serumhaltiges Medium hinzugefügt, wenn über diesen Zeitraum hinaus inkubiert werden soll.

#### **Transfektionsvolumen**

Um die Transporteffizienz zu erhöhen kann das Transfektionsvolumen (Gesamtvolumen in Tabelle 2) für die ersten 4–24 h verringert werden.

## 4. Troubleshooting

### 4.1 Positivkontrolle

Ist bei der Auswertung des Versuchs kein Proteineintrag in die Zellen festzustellen, kann eine im Versuch verwendete Positivkontrolle Hinweise auf die Ursache der geringen Transporteffizienz geben.

Ist bei der Positivkontrolle Proteineintrag zu erkennen, bei dem Versuchsprotein jedoch nicht, ist dies ein Indiz, dass Zustand und Dichte der Zellen sowie die Versuchsdurchführung fehlerfrei waren. In der Fehlersuche sollten vor allem die Parameter der Proteoplexbildung (Protein:Reagenz-Verhältnis; Art und pH-Wert des Puffers; Art, Ladung und Reinheit des Proteins) im Fokus stehen.

Ist neben der Probe mit dem Versuchsprotein auch die Positivprobe negativ ausgefallen, sollten zunächst weitere Versuche mit der Positivprobe durchgeführt werden, bevor das Versuchsprotein erneut zum Einsatz kommt. R-Phycoerythrin konnte bereits in viele verschiedene Zellarten erfolgreich eingebracht werden. Die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Eintrags ist folglich hoch. Die Fehlersuche sollte zunächst auf Zustand, Gesundheit und Art der Zellen konzentriert werden.

Bei auftretender Zytotoxizität kann mit Hilfe der Positivkontrolle entschieden werden, ob das Versuchsprotein einen Einfluss auf die Zellvitalität hat.



## 4.2 Geringe Transporteffizienz

### Reinheit des Proteins

Stellen Sie sicher, dass das rekombinante Protein von höchster Reinheit ist und keine Zusätze wie BSA oder Detergenzien enthalten sind.

### Zelldichte

Eine nicht-optimale Zelldichte zum Zeitpunkt des Protein-Transports kann zu unzureichender Aufnahme des Protein-Lipid-Komplexes führen. Für beste Ergebnisse sollten die Zellen zwischen 50-70% Konfluenz gehalten werden.

### Zustand der Zellen

Zellen, die für längere Zeit in Kultur waren (> 8 Wochen), lassen sich unter Umständen nur noch sehr schlecht proteofizieren. Verwenden Sie frisch aufgetaute Zellen, die mindestens ein Mal passagiert wurden. Die Zellen sollten gesund sein und sich während des Transportversuchs in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Kontaminationen, wie z.B. Mykoplasmen, verringern die Transporteffizienz deutlich.

### Medium für die Herstellung des Proteoplexes

Tauschen Sie den Puffer, der zur Verdünnung des Proteins verwendet wurde oder verändern Sie den pH-Wert. Stark alkalische Proteine sind aufgrund ihrer positiven Ladungen schwierig zu transportieren. Dies kann zum Teil durch hydrophobe Eigenschaften des Proteins kompensiert sein. Die Ladung des Proteins kann über den pH-Wert beeinflusst werden.

### Alte Proteoplexe

Die Proteoplexe müssen stets frisch hergestellt werden. Komplexe, die hergestellt und für mehr als 1 h gelagert werden, aggregieren – dies führt zu Transport-inaktiven Clustern. Die Proteoplexe sollten direkt nach der Proteoplexbildung zu den Zellen gegeben werden.

### Temperatur von PROTEOfectene®

Die Proteinlösungen und das Reagenz sollten bei Raumtemperatur verwendet und vor Benutzung jeweils sanft gemischt werden.

### Lagerung von PROTEOfectene®

Die Transporteffizienz kann absinken, wenn PROTEOfectene® für mehr als eine Woche bei Raumtemperatur gelagert wird.

## 4.3 Zelltoxizität

### Zu hohe Konzentration des Proteoplexes

Um die Menge des Proteoplexes zu verringern, wird bei konstantem Protein:Lipid-Verhältnis die Proteinmenge bei der Komplexbildung reduziert.

Aggregierte Komplexe können zytotoxisch wirken. Komplexe müssen daher mit optimiertem Protein:Lipid-Verhältnis (Kapitel 3) stets frisch hergestellt werden.

### Zellvitalität

- Überprüfen Sie die Zellen auf Kontamination (z.B. auf Mykoplasmen)
- Verwenden Sie frisch aufgetaute Zellen, die mindestens ein Mal passagiert wurden.
- Stellen Sie optimale Bedingungen für Ihre Zellkultur sicher (z.B. pH-Wert oder Art des Kulturmediums).
- Die Zelldichte darf weder zu hoch noch zu niedrig sein. Die Zellen sollten sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden.

### Das Protein ist zytotoxisch

Verwenden Sie Kontrollproben, wie z.B. unbehandelte Zellen und eine Positivkontrolle mit R-Phycoerythrin.

### Inkubationszeit

Verringern Sie die Inkubationszeit der Zellen mit den Komplexen. Wenn nötig, kann das Transportmedium nach 3–24 h durch frisches Kulturmedium ersetzt werden.

### Proteinqualität

Verwenden Sie hoch-reine Proteine, da Verunreinigungen zum Zelltod führen können.

### Transport eines Schlüsselproteins

Das in die Zellen eingebrachte Protein kann einen Einfluss auf die Zellvitalität haben, wenn es Schlüsselstellen des Zellstoffwechsels beeinflusst.

## 5. Sonstiges

### 5.1 Wichtige Informationen

Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Forschung und für *in vitro* Anwendungen entwickelt und wird nur für diese Zwecke verkauft. Es darf nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke an Mensch oder Tier angewendet werden.

PROTEOfectene® ist eine eingetragene Handelsmarke der Biontex Laboratories GmbH.

### 5.2 Gewährleistung

Biontex gewährleistet nur dann für die beschriebenen Eigenschaften dieses Produktes bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum, wenn es gemäß der in diesem Manual angegebenen Informationen gelagert und angewendet wurde. Sollten Sie trotzdem mit diesem Produkt nicht zufrieden sein, kontaktieren Sie bitte Biontex Laboratories GmbH.

*Biontex Laboratories GmbH  
Landsberger Straße 234  
im MGH  
80687 München/Laim  
Germany*

*Tel.: +49 (0)89 3247995-0  
Fax: +49 (0)89 3247995-2  
E-Mail: [contact@biontex.com](mailto:contact@biontex.com)  
Internet: [www.biontex.com](http://www.biontex.com)*