

PROTEOfectene® AB

Das hocheffiziente Antikörper-Proteofektionsreagenz
für Säugerzellen

Bestellinformationen, SDB, Publikationen und Anwendungsbeispiele unter www.biontexas.com

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
PROTEOfectene® AB	E020-0.05	PROTEOfectene® AB 50 µl FITC-IgG 20µl
PROTEOfectene® AB	E020-0.1	PROTEOfectene® AB 100 µl FITC-IgG 100µl
PROTEOfectene® AB	E020-0.25	PROTEOfectene® AB 250 µl FITC-IgG 100µl

Versand: Bei Raumtemperatur

Lagerung: PROTEOfectene® AB 4°C (**nicht einfrieren**)
FITC-IgG ≤ -15°C

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 Antikörpern in lebende Zellen hinein stellt eine Alternative zur Transfektion mit Nukleinsäuren und eine mächtige Strategie für Funktionsstudien dar. Dieses Reagenz eröffnet neue Möglichkeiten im weiter aufstrebenden Bereich der Proteomics. Es besteht keine Notwendigkeit der kovalenten Bindung: PROTEOfectene® AB wird einfach mit dem gewünschten Antikörper gemischt. PROTEOfectene® AB ist eine auf Lipide basierende Formulierung, die nicht-kovalent gebundene Komplexe mit Antikörpern eingeht. Diese Komplexe werden von Zellen aufgenommen und die Antikörper werden im Cytosol freigesetzt.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Qualitätskontrolle	3
1.3 Wichtiger Parameter: Reinheit des Antikörpers	3
2. Standardprotokoll.....	4
2.1 Allgemeine Hinweise	4
2.2 Vorbereitung der Zellen	4
Adhärente Zellen	4
Suspensionszellen	4
2.3 Bildung des Proteoplexes	5
3. Optimierungsprotokoll.....	6
3.1 Antikörper : Lipid – Verhältnis	6
3.2 Antikörpermenge	6
3.3 Andere Parameter.....	7
Zelldichte	7
Puffer zur Verdünnung des Antikörpers	7
Inkubationszeit	7
An- bzw. Abwesenheit von Serum	7
Transfektionsvolumen	7
4. Troubleshooting	8
4.1 Positivkontrolle.....	8
4.2 Geringe Transporteffizienz	9
Reinheit des Antikörpers	9
Zelldichte	9
Zustand der Zellen	9
Medium für die Herstellung der Proteoplexe	9
Alte Proteoplexe	9
Temperatur von PROTEOfectene® AB	9
Lagerung von PROTEOfectene® AB	9
4.3 Zelltoxizität.....	10
Zu hohe Konzentration des Proteoplexes	10
Zellvitalität	10
Der Antikörper ist zytotoxisch	10
Inkubationszeit	10
Antikörperqualität.....	10
5. Sonstiges.....	11
5.1 Wichtige Informationen	11
5.2 Gewährleistung	11

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	Transport von Antikörpern in lebende Säugerzellen
Sterilität	getestet
Assays	100 µl: max. 100 (24-Well-Platte); max. 20 (6-Well-Platte)
Zellkultur	getestet
Lagerung	PROTEOfectene® AB: +4°C; FITC-IgG: ≤ -15°C

FITC-IgG (Positivkontrolle, 100 µg/ml) ist ein fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunoglobulin).

Anregungswellenlänge: 488 nm.

Emissionswellenlänge: 520 nm (sichtbares Grün).

1.2 Qualitätskontrolle

Um die Qualität von PROTEOfectene® AB 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 FITC-IgG in NIH3T3 Zellen.

1.3 Wichtiger Parameter: Reinheit des Antikörpers

Jegliche Verunreinigungen, Kontaminationen und Additive, die sich in der Antikörperlösung befinden, können die Transporteffizienz beeinträchtigen. Verwenden Sie folglich einen möglichst reinen Antikörper.

BSA in der Antikörperlösung verhindert den Antikörper-Transport! Übliche Konzentrationen von BSA in Antikörperlösungen betragen 0.1 – 2% – das bedeutet 1 bis 20 mg/ml. BSA liegt in diesen Lösungen in großem Überschuss vor, konkurriert mit dem einzubringenden Antikörper bei der Bildung des Proteoplexes (Antikörper-PROTEOfectene® AB-Komplex) und verhindert so den Eintrag des Antikörpers.

Stabilisatoren, wie z.B. Detergenzien, können den Antikörpertransport hemmen, wenn sie in großem Überschuss gegenüber dem Antikörper 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. Das Standardprotokoll soll als allgemeine Richtlinie zur Planung Ihrer Versuche dienen. Die optimalen Bedingungen und Parameter unterscheiden sich von Zelllinie zu Zelllinie und müssen, wie in Kapitel 3 beschrieben, für jedes Versuchssetup neu bestimmt werden.

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

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

2.2 Vorbereitung der Zellen

Adhärente Zellen

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

Suspensionszellen

Schnellwachsende Suspensionszellen werden einen Tag vor dem Antikörper-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 adhärente 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. **Antikörper** in 1x PBS auf eine Konzentration von 100 µg/ml **verdünnen**.

Kleine Konzentrationen von Glycerol (1–5%) in der Antikörperlösung sind akzeptabel. BSA darf nicht vorhanden sein, da es den Antikörpertransport vollständig verhindert!

2. **Antikörper** (100 µg/ml) nach Tabelle 2 in ein Reaktionsgefäß **pipettieren**.
3. **PROTEOfectene® AB** nach Tabelle 2 in das Reaktionsgefäß **zugeben**, welches den Antikörper enthält.
Durch mehrfaches sanftes Auf- und Abpipettieren mischen.

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

Tabelle 2: Standardmengen von Antikörper und PROTEOfectene® AB, Verdünnungsvolumen und Gesamtvolumen pro Well/Dish für verschiedene Zellkulturformate

Zellkulturgefäß	Antikörper [µg]	PROTEOfectene® AB [µl]	Verdünnungsvolumen [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 Dish	10	20	200	4 ml
90 – 100 mm Dish	30	60	400	8 ml
T-75 Flasche	35	70	400	10 ml

4. Für 10–15 min bei Raumtemperatur **inkubieren**.
5. **Serumfreies Medium** zum Proteoplex **zugeben** (siehe Verdünnungsvolumen in Tabelle 2) und das gesamte Volumen 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 (3–4 Mal) Auf- und Abpipettieren vermischt, um eine homogene Verteilung der Proteoplexe zu gewährleisten.

6. **Zellen** unter Standardbedingungen **inkubieren** (z.B. bei 37°C in CO₂-haltiger Atmosphäre), bis die Auswertung des Versuchs stattfindet (3–48 h).

3. Optimierungsprotokoll

3.1 Antikörper : Lipid – Verhältnis

Zunächst wird das Antikörper:Reagenz-Verhältnis für den verwendeten Antikörper und den verwendeten Zelltypus optimiert (Tabelle 3). Dazu wird die im Standardprotokoll angegebene Antikörpermenge konstant gehalten und das Antikörper:Reagenz-Verhältnis von 1:0.5 bis 1:10 verändert (Tabelle 2). So werden z.B. 0.5 bis 10 µl PROTEOfectene® AB für 1 µg Antikörper im 24-Well-Format verwendet.

3.2 Antikörpermenge

Anschließend wird die Antikörpermenge bei gleich bleibendem Antikörper:Reagenz-Verhältnis erhöht.

Tabelle 3: Optimierung der Antikörpermenge und des Volumens an PROTEOfectene® AB

Zellkulturgefäß	Antikörper [µg]	PROTEOfectene® AB [µl]	Verdünnungsvolumen [µl]	Gesamtvolumen
96 Well	0.2 – 0.5	0.2 – 1	20	120 µl
24 Well	0.5 – 3	0.5 – 5	100	500 µl
12 Well	1 – 6	1 – 10	100	1 ml
6 Well	2.5 – 15	2.5 – 25	200	2 ml
60 mm Dish	5 – 30	5 – 50	200	4 ml
90 – 100 mm Dish	15 – 75	15 – 120	400	8 ml
T-75 Flasche	20 – 80	20 – 160	400	10 ml

3.3 Andere Parameter

Nach der Optimierung von Antikörper : Reagenz – Verhältnis und Antikörpermenge können – wenn nötig – folgende Parameter optimiert werden.

Zelldichte

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

Puffer zur Verdünnung des Antikörpers

1x PBS wird empfohlen, von der Verwendung anderer Puffer wird abgeraten.

Inkubationszeit

Die optimale Zeitspanne zwischen Transport des Antikörpers und Ausführung des Assays variiert unter anderem mit der verwendeten Zelllinie, dem Isotyp des Antikörpers und der biologischen Funktion des Antikörpers.

Es sollte ein Experiment, das den Zeitverlauf des Antikörper-Transports beobachtet, durchgeführt werden, um die optimale Inkubationszeit zu ermitteln. Diese hängt unter anderem von der Lokalisierung des Antigens und dessen Zugänglichkeit sowie von der turn-over rate der Proteine ab.

Die Transporteffizienz wird nach 4-96 h ermittelt.

An- bzw. Abwesenheit von Serum

PROTEOfectene® AB 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 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 Antikörpereintrag in die Zellen festzustellen, kann eine im Versuch verwendete Positivkontrolle Hinweise auf die Ursache der geringen Transporteffizienz geben.

Ist bei der Positivkontrolle Antikörpereintrag zu erkennen, bei dem Versuchs-Antikörper 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 (Antikörper:Reagenz-Verhältnis; Art und pH-Wert des Puffers; Reinheit der Antikörperlösung) im Fokus stehen.

Ist neben der Probe mit dem Versuchs-Antikörper auch die Positivprobe negativ ausgefallen, sollten zunächst weitere Versuche mit der Positivprobe durchgeführt werden, bevor der Versuchs-Antikörper erneut zum Einsatz kommt. FITC-IgG 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 der Versuchs-Antikörper einen Einfluss auf die Zellvitalität hat.

4.2 Geringe Transporteffizienz

Reinheit des Antikörpers

Die Antikörperlösung darf **kein BSA** enthalten! Stellen Sie sicher, dass der Antikörper von höchster Reinheit ist und keine Zusätze wie Stabilisatoren oder Detergenzien enthält.

Zelldichte

Eine nicht-optimale Zelldichte zum Zeitpunkt des Antikörper-Transports kann zu unzureichender Aufnahme der Proteoplexe führen. Die optimale Konfluenz (Bedeckung der Wachstumsfläche) beträgt 50–70%.

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 gut proliferieren. Kontaminationen, wie z.B. Mycoplasmen, verringern die Transporteffizienz erheblich.

Medium für die Herstellung der Proteoplexe

Die Verwendung von PBS bei der Proteoplexbildung ist entscheidend. Andere Puffer sollten nicht verwendet 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 ihrer Bildung zu den Zellen gegeben werden.

Temperatur von PROTEOfectene® AB

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

Lagerung von PROTEOfectene® AB

Die Transporteffizienz kann absinken, wenn PROTEOfectene® AB 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 Antikörper:Reagenz-Verhältnis die Antikörpermenge bei der Komplexbildung reduziert.

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

Zellvitalität

- Überprüfen Sie die Zellen auf Kontamination (z.B. auf Mycoplasmen)
- 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 zu etwa 50–70% konfluent sein.

Der Antikörper ist zytotoxisch

Verwenden Sie Kontrollproben, wie z.B. unbehandelte Zellen und eine Positivkontrolle mit FITC-IgG.

Inkubationszeit

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

Antikörperqualität

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

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
Internet: www.biontex.com*