Versuchsplanung: 28.09.2022

Versuchsdurchführung: 04.10.2022

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL, RM

**Kopplungskontrolle der rekombinante Pockenvirusproteine**

**Hintergrund:**

Nach der Kopplung sollen die Beads in Kopplungskontrollen getestet werden. Hierzu sollen spezifische monoklonale Antikörper oder monospezifische polyklonale Antikörper auf dem Multiplex-Beadmix zusammen mit den an Beads gekoppelten VACV-Lysate und Hep-2 Lysaten in einem 18-Plex-Assay getestet werden

**Übersicht:**

18 Bead-Sets

Assaydurchführung: Angepasster Standard-Serologischer Assay je nach verwendetem Detektionssystem

- Für biotinylierte polyklonale Antikörper (ab 10 µg/mL, dann 2,5 µg/mL, 0,625 µg/mL): Detektion über SA-PR PJRS27 mit c = 2 µg/mL

- Für Maus monoklonale Antikörper ((ab 1 µg/mL, dann 0,25 µg/mL, 0,0625 µg/mL): Ziege anti Maus IgG PE mit 1:500 Verdünnung

**Material:**

Assay: Pox-Multiplex (18-Plex)

Beads Lot: 09/22 (gekoppelt September 2022, JL, RM)

Konzentration: **2000 Beads/µL**

Assay-Puffer: 1% BSA/PBS, \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Protokoll: Eigenes Protokoll wegen verschiedener notwendiger Nachweisreagenzien, aber eng angelehnt an das Protokoll des Serologischen Assays

* Vorlegen von 50 µL Beadmix je Well mit 1000 Beads je Beadsorte je Well
* Zugabe von jeweils 50 µL Antikörperverdünnungen je Well
* Platte lichtgeschützt für 60 Minuten bei RT auf Schüttler bei 750 rpm inkubieren
* Platte waschen mit Bead-Waschprogramm „3×Beads“
* Jeweils 100 µL Nachweisreagenzien mit unten angegebenen Konzentrationen zugeben
* Platte lichtgeschützt für 60 Minuten bei RT auf Schüttler bei 750 rpm inkubieren
* Platte waschen mit Bead-Waschprogramm „3×Beads“
* Beads in jeweils 100 µL Assaypuffer je Well resuspendieren (1 min bei 750 rpm anschütteln)

**Proteine:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bead-region** | **Bezeichnung** | **Nachweisantikörper** | **Konzentration** | **Markierung** |
| **20** | Ziege anti-Human IgG Fc-Gamma | - | - | - |
| **08** | Humanes Serumalbumin | - | - | - |
| **55** | A29 | A1/40/1/5/17 QM | 1,66 mg/mL | Keine |
| **89** | A27L | A1/40/1/5/17 QM | 1,66 mg/mL | Keine |
| **81** | A35R | Ziege-Anti-A33R-Bio | 0,279 mg/mL | Biotin |
| **33** | A33R | Ziege-Anti-A33R-Bio | 0,279 mg/mL | Biotin |
| **42** | B6 | Maus anti B5R | 1 mg/mL | Keine |
| **26** | B5R | Maus anti B5R | 1 mg/mL | Keine |
| **52** | E8 | Ziege-Anti-D8-Bio | 0,302 mg/mL | Biotin |
| **36** | M1 | Ziege-Anti-L1-Bio | 0,186 mg/mL | Biotin |
| **15** | L1R | Ziege-Anti-L1-Bio | 0,186 mg/mL | Biotin |
| **07** | D8L | Ziege-Anti-D8-Bio | 0,302 mg/mL | Biotin |
| **59** | H3L | Ziege-Anti-H3-Bio | 0,364 mg/mL | Biotin |
| **82** | ATI-C | Maus anti His | 1 mg/mL | Keine |
| **38** | ATI-N | Maus anti His | 1 mg/mL | Keine |
| **54** | A5L | Maus anti His | 1 mg/mL | Keine |
| **48** | VACV Lysat | VIG | - | Keine |
| **67** | Hep2 Lysat | VIG | - | Keine  e |

**In der Durchführung war Hep2 als ID 62 angegeben, es war ID 67, wurde nachträglich korrigiert.**

Insgesamt sollen also 8 verschiedene Antikörper in jeweils 3 Verdünnungen getestet werden. Zusätzlich wird noch eine Negativkontrolle je verwendetem Detektionsantikörper (Anti-Human-PE, anti-Maus-PE, SA-PE) benötigt, also insgesamt 27 Wells, die mit dem Bead-Mix belegt werden müssen.

**Antikörper**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Hersteller** | **Konzentration** | **Lot** | **Lagerort** |
| **1** | A1/40/1/5/17 QM | RKI | 1,66 mg/mL | Keine | TK1 Fach 2 Box 14.11 |
| **2** | Maus anti B5R NR-429 | BEI Resources | 1 mg/mL | Keine | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **3** | 6x His Tag mAb (H8) | Invitrogen | 1 mg/mL | TD264974/11.10.2018 AB | TK1 Fach 2 Box 12.06 |
| **4** | Ziege-Anti-A33R-Bio | RKI | 0,279 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **5** | Ziege-Anti-D8-Bio | RKI | 0,302 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **6** | Ziege-Anti-L1-Bio | RKI | 0,186 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **7** | Ziege-Anti-H3-Bio | RKI | 0,364 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **8** | VIG | BEI Resources | - | Keine | ZBS1 |

**Detektionsantikörper**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Lot** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
| **1** | Goat Anti-Mouse IgG Fc-gamma PE | 160754 | 0,5 mg/mL | 1:500 | ZBS3-KS5 Fach 1 Box 300 |
| **2** | Goat Anti-Human IgG PE | 141758 | 0,5 mg/mL | 1:500 | ZBS3-KS5 Fach 2 Box 233 |
| **3** | SA-PE PJRS27 | 746-027/ 28.04.21 PaD | 2,07 mg/mL | 1:1000 | ZBS3-KS1 Schublade rechts Box 124 Raum 95 |

**Plattenlayout Antikörper**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **A** | A1/40/1  1 µg/mL | Anti His  0,04 µg/mL | Anti L1-Bio  10 µg/mL | VIG  1:2500 |
| **B** | A1/40/1  0,2 µg/mL | Blank anti Mouse | Anti L1-Bio  2 µg/mL | VIG  1:12500 |
| **C** | A1/40/1  0,04 µg/mL | Anti A33R-bio  10 µg/mL | Anti L1-Bio  0,4 µg/mL | Blank anti Human |
| **D** | Anti B5R  1 µg/mL | Anti A33R-Bio  2 µg/mL | Anti H3-Bio  10 µg/mL |  |
| **E** | Anti B5R  0,2 µg/mL | Anti A33R-Bio  0,4 µg/mL | Anti H3-Bio  2 µg/mL |  |
| **F** | Anti B5R  0,04 µg/mL | Anti D8-Bio  10 µg/mL | Anti H3-Bio  0,4 µg/mL |  |
| **G** | Anti His  1 µg/mL | Anti D8-Bio  2 µg/mL | Blank SA-PE |  |
| **H** | Anti His  0,2 µg/mL | Anti D8-Bio  0,4 µg/mL | VIG  1:500 |  |

**Plattenlayout Detektionsantikörper**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **A** | Anti-Maus PE | Anti-Maus PE | SA-PE | Anti-Human PE |
| **B** | Anti-Maus PE | Anti-Maus PE | SA-PE | Anti-Human PE |
| **C** | Anti-Maus PE | SA-PE | SA-PE | Anti-Human PE |
| **D** | Anti-Maus PE | SA-PE | SA-PE |  |
| **E** | Anti-Maus PE | SA-PE | SA-PE |  |
| **F** | Anti-Maus PE | SA-PE | SA-PE |  |
| **G** | Anti-Maus PE | SA-PE | SA-PE |  |
| **H** | Anti-Maus PE | SA-PE | Anti-Human PE |  |

**Verdünnung des Bead-Mixes**

**Achtung: die beiden Beads welche von Rebecca Surtees gekoppelt wurden (#48, #62) sind wahrscheinlich auf 1000 Beads/µl eingestellt. Dann wird davon das doppelte Volumen benötigt (29 µl statt 14,5 µl) -> Nachschauen wie eingestellt.**

Beads #48 und #62 jeweils die Kopplung mit 20 µg Protein verwenden (es wurden verschiedene Proteinmengen gekoppelt).

Ansatz für 27 Well, also für 29 Well ansetzen:

* 1450 µL ansetzen -> je ID 1:100 bei 2000 Beads je µL
  + 14,5 µL je Beadregion = 18 \* 14,5 = 261 µL (Regionen #48 und #62 voraussichtlich 29 µl)
  + 1189 µL Assaypuffer

**Verdünnung der Antikörper**

Die Antikörper werden mit der doppelten Konzentration angesetzt, da bei dem Assay-Setup 50 µl Bead-Mix mit 50 µl Antikörper gemischt werden, was eine Weitere 1:2 Verdünnung darstellt.

* A1/40/1/5/17 c = 1,66 mg/mL, soll 1 µg/mL, also 1:1660, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 1:100 Vorverdünnung: 2 µL Antikörper + 198 µL Assaypuffer c = 16,6 µg/mL
  + Für c = 2 µg/mL (im Assay final 1 µg/ml) 1:8,3 Verdünnung
    - 24 µL Antikörpervorverdünnung + 176 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer (1:5 Verdünnungsreihe)
* Maus anti-B5R c = 1 mg/mL, soll 1 µg/mL, also 1:1000, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 1:100 Vorverdünnung: 2 µL Antikörper + 198 µL Assaypuffer c = 10 µg/mL
  + Für c = 2 µg/mL (im Assay final 1 µg/ml) 1:10 Verdünnung
    - 20 µL Antikörpervorverdünnung + 180 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* Maus anti-His-Tag c = 1 mg/mL, soll 1 µg/mL, also 1:1000, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 1:100 Vorverdünnung: 2 µL Antikörper + 198 µL Assaypuffer c = 10 µg/mL
  + Für c = 2 µg/mL (im Assay final 1 µg/ml) 1:10 Verdünnung
    - 20 µL Antikörpervorverdünnung + 180 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-A33R-Bio c = 0,279 mg/mL, soll 10 µg/mL, also 1:27,9, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen.
  + 14,3 µL Antikörper + 186 µL Assaypuffer (Für 20 µg/ml (final im Assay 10 µg/ml))
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-D8-Bio c = 0,302 mg/mL, soll 10 µg/mL, also 1:30,2, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 13,2 µL Antikörper + 187 µL Assaypuffer (Für 20 µg/ml (final im Assay 10 µg/ml))
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-L1-Bio c = 0,186 mg/mL, soll 10 µg/mL, also 1:18,6, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 21,5 µL Antikörper + 178,5 µL Assaypuffer (Für 20 µg/ml (final im Assay 10 µg/ml))
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-H3-Bio c = 0,364 mg/mL, soll 10 µg/mL, also 1:36,4, jeweils 200 µL je Verdünnung ansetzen
  + 11 µL Antikörper + 189 µL Assaypuffer (Für 20 µg/ml (final im Assay 10 µg/ml))
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer
* VIG soll 1:500 als erste Verdünnung (Verdünnung 1:250, final im Assay 1:500)
  + 1 µL Antikörper + 249 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 50 µL Vorverdünnung + 200 µL Assaypuffer

**Verdünnung der Detektionsantikörper**

Benötigtes Volumen je Detektionsantikörper

* Anti-Maus IgG PE 10 Wells je 100 µL benötigt, also 1000 µL benötigt, also 1100 µL ansetzen, 1:500 Verdünnung
  + 2,2 µL Antikörper + 1098 µL Assaypuffer
* SA-PE 13 Wells ja 100 µL benötigt, also 1300 µL benötigt, also 1500 µL ansetzen, 1:1000 Verdünnung
  + 1,5 µL SA-PE + 1499 µL Assaypuffer
* Anti-Human IgG PE 4 Wells je 100 µL benötigt, also 400 µL, also 500 µL ansetzen, 1:500 Verdünnung
  + 1 µL Antikörper + 499 µL Assaypuffer