Versuchsplanung: 06.10.2022

Versuchsdurchführung:

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL

**Kopplungskontrolle der rekombinante Pockenvirusproteine**

**Hintergrund:**

Nachdem im ersten Versuch die Ergebnisse für VIG auf den anti human IgG noch nicht den Erwartungen entsprachen, soll in diesem Versuch ein kleines Panel an humanen Seren gemessen werden. Hierdurch soll untersucht werden, ob das Problem nur in diesem Versuch auftrat oder ob VIG nicht funktioniert.

**Übersicht:**

18 Bead-Sets

Assaydurchführung: Angepasster Standard-Serologischer Assay

**Material:**

Assay: Pox-Multiplex (18-Plex)

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

Konzentration: **2000 Beads/µL (Bis auf VACV und Hep-2 Lysate)**

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

Protokoll: Serologischer\_In-House\_ELISA\_MPXV\_V04.docx

* 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** |
| **20** | Ziege anti-Human IgG Fc-Gamma |
| **08** | Humanes Serumalbumin |
| **55** | A29 |
| **89** | A27L |
| **81** | A35R |
| **33** | A33R |
| **42** | B6 |
| **26** | B5R |
| **52** | E8 |
| **36** | M1 |
| **15** | L1R |
| **07** | D8L |
| **59** | H3L |
| **82** | ATI-C |
| **38** | ATI-N |
| **54** | A5L |
| **48** | VACV Lysat |
| **67** | Hep2 Lysat |

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**

| **Nummer** | **Probe** | **Titer\_IgG** | **Titer\_IgM** | **Titer\_IgG\_WH** | **Titer\_IgM\_WH** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | P-21-023-001-02 | 20 | 0 |  |  |
| 2 | P-20-002-001-02 | 5120 | 5120 |  |  |
| 3 | P-20-154-001-01 | 320 | 0 |  |  |
| 4 | P-20-167-001-03 |  |  |  |  |
| 5 | P-20-162-001-01 | 1280 | 1280 |  |  |
| 6 | P-19-057-001-20 | 5120 | 80 |  |  |
| 7 | P-19-057-001-27 | 1280 | 80 |  |  |
| 8 | P-19-057-001-58 | 320 | 80 |  |  |
| 9 | P-19-020-001-02 | 0 | 0 |  |  |
| 10 | P-19-055-001-02 | 1280 | 80 |  |  |

**Plattenlayout Seren**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** |
| **A** | **VIG 100** | **2 100** | **4 100** | **6 100** | **8 100** | **10 100** |  |  |
| **B** | VIG 500 | 2 500 | 4 500 | 6 500 | 8 500 | 10 500 |  |  |
| **C** | VIG 2500 | 2 2500 | 4 2500 | 6 2500 | 8 2500 | 10 2500 |  |  |
| **D** | **1 100** | **3 100** | **5 100** | **7 100** | **9 100** | **Buffer** |  |  |
| **E** | 1 500 | 3 500 | 5 500 | 7 500 | 9 500 |  |  |  |
| **F** | 1 2500 | 3 2500 | 5 2500 | 7 2500 | 9 2500 |  |  |  |
| **G** |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **H** |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Verdünnung der Antikörper/Seren**

**-> In normaler Platte (Assay-Platte)**

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.

* VIG und Seren soll 1:100 als erste Verdünnung (Verdünnung 1:50, final im Assay 1:100)
  + 2 µL Antikörper / Serum + 98 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 25 µL Vorverdünnung + 100 µL Assaypuffer

Kommentar FT: wenn Stepper nicht auf 98 µl eingestellt werden kann, auf 100 µl stellen.

Durchführung:

In Zeilen A und D je 98 (oder 100) µl Assay-Puffer vorlegen

Seren/Antikörper nach Layout zugeben

Mit Mehrkanalpipette mischen

In Zeilen B/C und E/F je 100 µl Assaypuffer vorlegen

Mit Mehrkanalpipette jeweils nach Layout 25 µl in nächste Spalte transferieren und mischen

Von A -> B -> C

Von D -> E -> F

**Bead-Mixes**

Kommentar: die Beads welche von Rebecca Surtees gekoppelt wurden sind vermutlich noch nicht in der Konzentration eingestellt, sie sind etwas höher konzentriert als die auf 2000 Beads/µl eingestellten. Vermutlich sind sie noch in den 500 µl au dem Kopplungsprotokoll.

Beads #48 und #67 jeweils die Kopplung mit 20 µg Protein verwenden (es wurden verschiedene Proteinmengen gekoppelt).

Ansatz für 34 Well, also für 37 Wells ansetzen:

* 1850 µL ansetzen -> je ID 1:100 bei 2000 Beads je µL
  + 18,5 µL je Beadregion = 18 \* 18,5 = 333 µL (alle Bead-Regionen gleich)
  + 1517 µL Assaypuffer

**Detektionsantikörper**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Lot** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
| **1** | Goat Anti-Human IgG PE | 141758 | 0,5 mg/mL | 1:500 | ZBS3-KS5 Fach 2 Box 233 |

Benötigtes Volumen je Detektionsantikörper

* Anti-Human IgG PE 4 Wells je 100 µL benötigt, also 3400 µL, also 4000 µL ansetzen, 1:500 Verdünnung
  + 8 µL Antikörper + 4000 µL Assaypuffer