Versuchsplanung: 13.10.2022

Versuchsdurchführung:

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL

**Kopplungskontrolle der rekombinanten Pockenvirusproteine**

**Hintergrund:**

Nachdem im ersten Experiment die Kopplungskontrolle für die biotinylierten Antikörper die Signale etwas schwach waren, soll dieses Teilexperiment hier noch einmal wiederholt werden. Hierbei sollen die Konzentrationen der polyklonalen Antikörper noch etwas höher angesetzt werden (beginnen bei 40 µg/mL, dann Verdünnungen in 1:4 Stufen). Auch das SE-PE soll etwas höher konzentriert eingesetzt werden (4 µg/mL)

**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 = 4 µg/mL

**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)

**Beads:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **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 (20 µg) | VIG | - | Keine |
| **67** | Hep2 Lysat (20 µg) | VIG | - | Keine  e |

Insgesamt sollen hier 4 verschiedene Antikörper in jeweils 4 Verdünnungen getestet werden. Zusätzlich wird noch eine Negativkontrolle ( SA-PE) benötigt, also insgesamt 17 Wells, die mit dem Bead-Mix belegt werden müssen.

**Antikörper**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Hersteller** | **Konzentration** | **Lot** | **Lagerort** |
| **1** | Rabbit-Anti-A33R-Bio | RKI | 0,279 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **2** | Ziege-Anti-D8-Bio | RKI | 0,302 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **3** | Rabbit-Anti-L1-Bio | RKI | 0,186 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |
| **4** | Ziege-Anti-H3-Bio | RKI | 0,364 mg/mL | Biotin | Raum 95 TK Box Antikörper |

**Detektionsantikörper**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Lot** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
| **1** | SA-PE PJRS27 | 746-027/ 28.04.21 PaD | 2,07 mg/mL | 1:500 | ~~ZBS3-KS1 Schublade rechts Box 124 Raum 95~~ Angebrochenes Aliquot in Serologie Working Box |

**Plattenlayout Antikörper**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **A** | Anti A33R-bio  40 µg/mL | Anti L1-Bio  40 µg/mL | Blank SA-PE |  |
| **B** | Anti A33R-bio  10 µg/mL | Anti L1-Bio  10 µg/mL |  |  |
| **C** | Anti A33R-Bio  2 µg/mL | Anti L1-Bio  2 µg/mL |  |  |
| **D** | Anti A33R-Bio  0,4 µg/mL | Anti L1-Bio  0,4 µg/mL |  |  |
| **E** | Anti D8-Bio  40 µg/mL | Anti H3-Bio  40 µg/mL |  |  |
| **F** | Anti D8-Bio  10 µg/mL | Anti H3-Bio  10 µg/mL |  |  |
| **G** | Anti D8-Bio  2 µg/mL | Anti H3-Bio  2 µg/mL |  |  |
| **H** | Anti D8-Bio  0,4 µg/mL | Anti H3-Bio  0,4 µg/mL |  |  |

**Plattenlayout Detektionsantikörper**

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

**Verdünnung des Bead-Mixes**

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

Ansatz für 17 Well, also für 19 Well ansetzen:

* 950 µL ansetzen -> je ID 1:100 bei 2000 Beads je µL
  + 9,5 µL je Beadregion = 18 \* 9,5 = 171 µL
  + 779 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.

* Rabbit-Anti-A33R-Bio c = 0,279 mg/mL, soll 80 µg/mL, also 1:3,4875, jeweils 100 µL je Verdünnung ansetzen.
  + 28,7 µL Antikörper + 71 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 25 µL Vorverdünnung + 75 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-D8-Bio c = 0,302 mg/mL, soll 80 µg/mL, also 1:3,775, jeweils 100 µL je Verdünnung ansetzen
  + 26,5 µL Antikörper + 73 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 25 µL Vorverdünnung + 75 µL Assaypuffer
* Rabbit-Anti-L1-Bio c = 0,186 mg/mL, soll 80 µg/mL, also 1:2,325, jeweils 100 µL je Verdünnung ansetzen
  + 43 µL Antikörper + 67 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 25 µL Vorverdünnung + 75 µL Assaypuffer
* Ziege-Anti-H3-Bio c = 0,364 mg/mL, soll 80 µg/mL, also 1:4,55, jeweils 100 µL je Verdünnung ansetzen
  + 22 µL Antikörper + 78 µL Assaypuffer
  + Weitere Verdünnungen dann jeweils 25 µL Vorverdünnung + 75 µL Assaypuffer

**Verdünnung der Detektionsantikörper**

Benötigtes Volumen je Detektionsantikörper

* SA-PE 17 Wells ja 100 µL benötigt, also 1700 µL benötigt. 2000 µL ansetzen, 1:500 Verdünnung
  + 4 µL SA-PE + 2000 µL Assaypuffer