Versuchsplanung: 01.11.2022

Versuchsdurchführung:

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL

**Kopplungskontrolle der rekombinanten Pockenvirusproteine**

**Hintergrund:**

In Experiment Pox 16 wurden die insgesamt 18 Antigene neu an Beads gekoppelt da die vorherige Charge zur Neige ging. In den bisherigen Assays hat sich herausgestellt, dass die Referenzprobe VIG Antikörper gegen alle Antigene enthält. Daher reicht eine Verdünnungsreihe de VIG für den ersten Kopplungskontroll-Assay aus. Die Beiden Kopplungschargen werden jeweils mit der Verdünnungsreihe vermessen.

**Material:**

18 Bead-Sets

Aus Charge 09/22 (erste Kopplung)

Aus der ersten Charge wurden ein paar (3?) Bead-Sets vollständig aufgebraucht und fehlen in diesem Vergleich, die verbliebenen Bead-Sets werden mit der neuen Charge verglichen.

Aus Charge 10/22 (neue Kopplung).

**Beads:**

|  |  |
| --- | --- |
| **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 (20 µg) |
| **67** | Hep2 Lysat (20 µg) |

**2 Bead-Mixe ansetzen, je für 16 Wells**

**„Mix Alt“:** Beads aus erster Kopplung (Charge 09/22)

765 µl Assay-Puffer

+ von Jeder Bead-ID 9 µl (die leeren von der ersten Charge einfach auslassen)

Bitte notieren welche fehlen (leer sind)

**„Mix Neu“:** Beads aus neuer Kopplung (wird Charge 10/22)

740 µl Assay-Puffer

+ von Jeder Bead-ID 9 µl (die leeren von der ersten Charge einfach auslassen)

Bitte notieren welche fehlen (leer sind)

**VIG Verdünnungsreihe: in Eppis Ansetzen**

|  |  |
| --- | --- |
| **Probe** | **Verdünnung** |
| VIG 1 | 100 |
| VIG 2 | 400 |
| VIG 3 | 1600 |
| VIG 4 | 6400 |
| VIG 5 | 25600 |
| VIG 6 | 102400 |
| VIG 7 | 409600 |
| VIG Blank | keine |

**VIG** soll 1:100 als erste Verdünnung (Verdünnung 1:50, final im Assay 1:100) angesetzt werden

**392 µl Assay-Puffer**

**+ 8 µl VIG**

Weitere Verdünnungen dann 1:4 Verdünnungen (400 µl ansetzen)

**300 µl Assay-Puffer**

**+ 100 µl Vorherige Verdünnung**

**Insgesamt 7 Verdünnungen** ansetzen

+ Blank (nur Assay-Puffer, z.B. 300 µl)

**Assay-Layout:**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Bead-Mix "Alt"** | | **Bead-Mix "Neu"** | |  |  |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **A** | VIG 1 | VIG 1 | VIG 1 | VIG 1 |  |  |
| **B** | VIG 2 | VIG 2 | VIG 2 | VIG 2 |  |  |
| **C** | VIG 3 | VIG 3 | VIG 3 | VIG 3 |  |  |
| **D** | VIG 4 | VIG 4 | VIG 4 | VIG 4 |  |  |
| **E** | VIG 5 | VIG 5 | VIG 5 | VIG 5 |  |  |
| **F** | VIG 6 | VIG 6 | VIG 6 | VIG 6 |  |  |
| **G** | VIG 7 | VIG 7 | VIG 7 | VIG 7 |  |  |
| **H** | Blank | Blank | Blank | Blank |  |  |

**Durchführung:**

Nach Layout je Well 50 µl Bead-Mix vorlegen

Nach Layout je Well 50 µl der VIG-Verdünnungen zugeben

Durchführung wie serologischer Assay

Inkubation 1 Stunde bei 750 rpm, lichtgeschützt

Waschen mit Programm Beads\_3X\_FT

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Lot** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
|  | Goat Anti-Human IgG PE  Jackson/Dianova 109-115-098 | 141758 | 0,5 mg/mL | 1:500 | In Arbeitsbox, weiterer in  ZBS3-KS5 Fach 2 Box 233 |

**Ansatz:**

3600 µl Assay-Puffer

+ 7,2 µl Anti-Human-PE

Je Well 100 µl, Inkubation 1 Stunde bei 750 rpm, Waschen. Je Well 100 µl Assay-Puffer für Readout**Assay 2: Test für Anti-His-Tag-Antikörper**

Hintergrund: sehr viele unserer rekombinanten Proteine haben einen His-Tag welcher gerne für die Aufreinigung angehängt wird. Dieser kann auch für die Ladungskontrolle verwendet werden.

Die Antigene im Affenpocken-Assay haben alle so einen His-Tag.

Unser bisheriger anti-His-Tag-Antikörper hat bei den Corona-Antigenen nicht gut funktioniert und sehr unterschiedliche Signale für die einzelnen S1- und RBD-Antigene geliefert obwohl diese sehr Ähnlich sind. Wir haben einen neuen Anti-His-Tag Antikörper gekauft welcher in diesem Experiment mit unserem bisherigen verglichen wird.

**Beads: nur neu gekoppelte:**

|  |  |
| --- | --- |
| **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 (20 µg) |
| **67** | Hep2 Lysat (20 µg) |

**Bead-Mix für 32 Wells (Mit Überschuss Ansatz für 36 Wells)**

**1476 µl Assay-Puffer** (2x 738 µl pipettieren)

**+ von jeder Bead-ID 18 µl** (18x18 µl = 324 µl)

**Antikörper:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kurz** | **Name** | **Hersteller** | **Produkt#** | **Lot** | **Spezies** | **Konzentration** | **Lagerort** |
| **H8** | 6x His Tag mAb (H8) | Invitrogen (Pierce) | MA1-21315 | TD264974 | Maus IgG2b | 1 mg/ml | TK1, Box 12.06 |
| **Penta** | Penta His | Invitrogen | P-21315 | 2507857 | Maus IgG1 | 200 µg/ml | KS5 (97) Box 300 |

**Der zweite Antikörper (Penta-His) muss noch gelöst und aliquotiert werden.**

Lösen **in 500 µl sterilem Wasser** (aus Flasche mit Alu-Deckel) unter Sterilwerkbank.

Anschließend auf **Taumelroller für 20 Minuten**

Davon **10 Aliquots a 50 µl** erstellen.

**Antikörper Verdünnungen für Assay:**

Erste Verdünnung jeweils auf 2 µg/ml

**H8:** 499 µl Assay-Puffer

+ 1 µl Antikörper H8

**Penta:** 199 µl Assay-Puffer

+ 1 µl Antikörper Penta-His

Von jedem der **beiden Antikörper eine 1:4 Verdünnungsreihe** ansetzen:

In Eppis oder Platte (Achtung: Volumina sind für Assay Platte zu groß, für Deep-Well-Platte sehr klein).

-> Besser in Eppis ansetzen.

Jeweils 150 µl Asay-Puffer vorlegen

+ 50 µl von vorheriger Verdünnung

Je 7 Verdünnungsstufen

+ Blank (nur Puffer)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Antikörper** | **Verdünnung** | **Konzentration [µg/ml]** |  | **Antikörper** | **Verdünnung** | **Konzentration [µg/ml]** |
| H8 - 1 | Start | 2 |  | Penta - 1 | Start | 2 |
| H8 - 2 | 1:4 | 0,5 |  | Penta - 2 | 1:4 | 0,5 |
| H8 - 3 | 1:16 | 0,125 |  | Penta - 3 | 1:16 | 0,125 |
| H8 - 4 | 1:64 | 0,03125 |  | Penta - 4 | 1:64 | 0,03125 |
| H8 - 5 | 1:256 | 0,00781 |  | Penta - 5 | 1:256 | 0,00781 |
| H8 - 6 | 1:1024 | 0,00195 |  | Penta - 6 | 1:1024 | 0,00195 |
| H8 - 7 | 1:4096 | 0,00049 |  | Penta - 7 | 1:4096 | 0,00049 |
| Blank | Keine | 0 |  | Blank | Keine | 0 |

**Assay-Layout:**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Antikörper H8 | | Antikörper Penta | |  |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **A** | H8 - 1 | H8 - 1 | Penta - 1 | Penta - 1 |  |
| **B** | H8 - 2 | H8 - 2 | Penta - 2 | Penta - 2 |  |
| **C** | H8 - 3 | H8 - 3 | Penta - 3 | Penta - 3 |  |
| **D** | H8 - 4 | H8 - 4 | Penta - 4 | Penta - 4 |  |
| **E** | H8 - 5 | H8 - 5 | Penta - 5 | Penta - 5 |  |
| **F** | H8 - 6 | H8 - 6 | Penta - 6 | Penta - 6 |  |
| **G** | H8 - 7 | H8 - 7 | Penta - 7 | Penta - 7 |  |
| **H** | Blank | Blank | Blank | Blank |  |

**Durchführung:**

Je Well 50 µl Bead-Mix vorlegen (4 Spalten)

Je Well 50 µl der Antikörper-Verdünnung nach Layout zugeben.

Inkubation 1 Stunde bei 750 rpm, lichtgeschützt

Waschen mit Programm Beads\_3X\_FT

**Sekundär-Antikörper:**

**Anti-Mouse-PE**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Lot** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
| **1** | Goat Anti-Mouse IgG Fc-gamma PE  Jackson/Dianova 115-116-071 | 160754 | 0,5 mg/mL | 1:500 | In Arbeitsbox, weiterer in  ZBS3-KS5 Fach 2 Box 300 |

**Ansatz:**

3600 µl Assay-Puffer

+ 7,2 µl Anti-Moaus-PE

Je Well 100 µl

Inkubation 1 Stunde bei 750 rpm

Waschen.

Je Well 100 µl Assay-Puffer für Readout