Versuchsplanung: 19.12.2022

Versuchsdurchführung:

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL

**Kopplungskontrolle der rekombinanten Pockenvirusproteine**

**Hintergrund:**

In Experiment Pox 23 wurde eine neue Charbe Beads für den Pox-Assay gekoppelt. Diese werdenmit der vorherigen Charge verglichen. 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:**

20 Bead-Sets

Aus Charge 10/22 (zweite Kopplung)

Aus Charge 12/22 (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) |
| **76** | Anti-human IgM |
| **78** | Anti-Human-IgA |

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

**„Mix Alt“:** Beads aus zweiter Kopplung (Charge 10/22)

720 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 12/22)

720 µl Assay-Puffer

+ von Jeder Bead-ID 9 µl

**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