Versuchsplanung: 12.01.2023

Versuchsdurchführung:

Assay: Pox-Multiplex

Operatoren: JL

**Beads einstellen**

**Achtung: aufgrund des doppelten Kopplungsansatzes werden die Beads auf 4000 Beads/µl eingestellt.**

**Neu gekoppelte Beads werden Charge 01/23.**

**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 |

Bead-Mix für Count:

Kurz zentrifugieren (Spin-Down) damit alle Flüssigkeit unten ist

Gut vortexen (Stärke 10, mindestens 10 Sekunden).

Unmittelbar vor Pipettieren nochmals vortexen.

Möglichst präzise pipettieren und Pipettenspitze abstreifen.

**690 µl Assay-Puffer**

**+ von jeder Bead-ID 3 µl** (insgesamt 20 Bead-IDs)

Davon auf einer Assay-Platte auf 6 Wells je 100 µl auftragen (z.B. Spalte 1, Wells A1 bis G1)

In Bioplex auslesen mit folgenden Einstellungen:

Count: 10‘000 Beads (nicht erreichbare Zahl)

Time-Out: 60 Sekunden

Volumen: 50 µl

**Einstellen auf 4000 Beads/µl**

Berechnen wie hoch die Konzentration ist:

Berechnung des benötigten Volumens für gewünschte Konzentration (diesmal 4000 Beads/µl):

Einstellen:

Beads kurz Zentrifugieren (sehr kurz, nur Spin-Down damit keine Flüssigkeit mehr im Deckel ist)

Beads in Magnetständer stellen

2 Minuten an Magnet sammeln lassen

Überstand vorsichtig abnehmen

**Neu berechnetes Volumen an PBS/TBN zugeben**

Label anbringen mit Charge 01/23 und Konzentration 4000 beads/µl

**Kopplungskontroll-Assay**

**Material:**

20 Bead-Sets

Aus Charge 12/22 (Aktuelles bead-Set)

Aus Charge 01/23 (neue Kopplung).

**Achtung: unterschiedliche Konzentration der Beads**

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

**Mix „Charge 12/22“:**

**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 „Charge 01/23“:** Beads aus neuer Kopplung

**810 µl** Assay-Puffer

+ von Jeder Bead-ID **4,5 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:**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Mix "Charge 12/22"** | | **Mix "Charge 01/23"** | |  |  |
|  | **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