Versuchsdurchführung: 11.07.2023

Assay: Pox-Multiplex im Rahmen der SPox-Studie

Operatoren: SesA

**SPox: Pox-Multiplex-Assay**

Experiment SPox \_01

**Hintergrund**

Dieses Protokoll beschreibt die Versuchsdurchführung für die Messung der Seren aus der SPox-Studie mit Hilfe des Pox-Multiplex-Assays. Alle Seren sollen jeweils auf IgG- und IgM-Antikörper untersucht werden. Jedes Serum soll in zwei Verdünnungen (1:100 und 1:1000) gemessen werden. Als Standard wird VIG in einer Verdünnunsreihe vermessen. Insgesamt können je Platte also 20 Proben vermessen werden. Wenn zwei Platten gleichzeitig bearbeitet werden können also je Versuchstag insgesamt 40 Proben untersucht werden.

**Anweisungen zur Experimentnummerierung und Daten-Ablage**

Das Assay-Layout ist für 40 Seren ausgelegt welche auf 2 Platten à 20 Seren aufgeteilt werden.

**Material:**

**Beads Lot:** SPox 01

Konzentration: **4000 Beads/µl**

Assay-Puffer: 1% BSA/PBS, 30.1.2023 TR

Goat Anti-Human **IgG** PE Lot: 135535

Donkey anti-Human **IgM**, Fc5µ, PE Lot: 155462

Protokoll: 03\_Bioplex\_Serologischer\_Assay\_Pox\_V01

**Durchführung in Kurzform**

* Wichtig: die Verdünnungen von Proben und Standards werden nach Layout in einer halben Deep-Well-Platte (Spalten 1-6) angesetzt, im Assay werden nach Layout je 50 µl in Spalten 1-6 und ebenfalls in Spalten 7-12 transferiert.
* Vorlegen von 50 µl Beadmix je Well mit 1000 Beads je Beadsorte je Well
* Zugabe von jeweils 50 µl Antikörperverdünnungen je Well (Spalten 1-6 und 7-12)
* Platte lichtgeschützt für 60 Minuten bei RT auf Schüttler bei 750 rpm inkubieren
* Platte waschen mit Bead-Waschprogramm „3×Beads“
* Jeweils 100 µl Nachweisreagenzien (anti-human IgG PE, anti-human IgM PE) 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 100 µl Assaypuffer je Well resuspendieren (1 min bei 750 rpm anschütteln)

**Beads:**

**Notieren welche Lot verwendet wurde -> Siehe Ordner: Material, die aktuelle Charge ist „SPox 01“.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Bead-region** | **Bezeichnung Antigen** |
| 1 | **8** | HSA |
| 2 | **20** | ahIgG |
| 3 | **76** | ahIgM |
| 4 | **7** | D8L |
| 5 | **15** | L1R |
| 6 | **26** | B5R |
| 7 | **33** | A33R |
| 8 | **36** | M1 |
| 9 | **38** | ATI-N |
| 10 | **42** | B6 |
| 11 | 48 | VACV Lysat |
| 12 | **52** | E8 |
| 13 | **54** | A5L |
| 14 | **55** | A29 |
| 15 | **59** | H3L |
| 16 | **67** | Hep2 Lysat |
| 17 | **81** | A35R |
| 18 | **82** | ATI-C |
| 19 | **89** | A27L |

**Insgesamt 19 Bead-IDs**

**Plattenlayout: 2 Platten à 12 Seren**

**Platte 1 (Proben 1-20)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **A** | **NK**  **100** | **1**  **100** | **5**  **100** | **9**  **100** | **13**  **100** | **17**  **100** | NK  100 | 1  100 | 5  100 | 9  100 | 13  100 | 17  100 |
| **B** | **NK 1000** | **1**  **1000** | **5**  **1000** | **9**  **1000** | **13**  **1000** | **17**  **1000** | NK 1000 | 1  1000 | 5  1000 | 9  1000 | 13  1000 | 17  1000 |
| **C** | **Blank** | **2**  **100** | **6**  **100** | **10**  **100** | **14**  **100** | **18**  **100** | Blank | 2  100 | 6  100 | 10  100 | 14  100 | 18  100 |
| **D** | **VIG 500** | **2**  **1000** | **6**  **1000** | **10**  **1000** | **14**  **1000** | **18**  **1000** | VIG 500 | 2  1000 | 6  1000 | 10  1000 | 14  1000 | 18  1000 |
| **E** | **VIG 2000** | **3**  **100** | **7**  **100** | **11**  **100** | **15**  **100** | **19**  **100** | VIG 2000 | 3  100 | 7  100 | 11  100 | 15  100 | 19  100 |
| **F** | **VIG 8000** | **3**  **1000** | **7**  **1000** | **11**  **1000** | **15**  **1000** | **19**  **1000** | VIG 8000 | 3  1000 | 7  1000 | 11  1000 | 15  1000 | 19  1000 |
| **G** | **VIG 32000** | **4**  **100** | **8**  **100** | **12**  **100** | **16**  **100** | **20**  **100** | VIG 32000 | 4  100 | 8  100 | 12  100 | 16  100 | 20  100 |
| **H** | **VIG 128000** | **4**  **1000** | **8**  **1000** | **12**  **1000** | **16**  **1000** | **20**  **1000** | VIG 128000 | 4  1000 | 8  1000 | 12  1000 | 16  1000 | 20  1000 |

**Seren-Verdünnungen: Das Layout besteht aus 2 identischen Blöcken, nur Spalten 1-6 ansetzen.**

**Im Assay je 50 µl nach Layout in Spalten 1-6 UND Spalten 7-12 transferieren.**

**Platte 2 (Proben 21-40)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **A** | **NK**  **100** | **21**  **100** | **25**  **100** | **29**  **100** | **33**  **100** | **37**  **100** | NK  100 | 21  100 | 25  100 | 29  100 | 33  100 | 37  100 |
| **B** | **NK 1000** | **21**  **1000** | **25**  **1000** | **29**  **1000** | **33**  **1000** | **37**  **1000** | NK 1000 | 21  1000 | 25  1000 | 29  1000 | 33  1000 | 37  1000 |
| **C** | **Blank** | **22**  **100** | **26**  **100** | **30**  **100** | **34**  **100** | **38**  **100** | Blank | 22  100 | 26  100 | 30  100 | 34  100 | 38  100 |
| **D** | **VIG 500** | **22**  **1000** | **26**  **1000** | **30**  **1000** | **34**  **1000** | **38**  **1000** | VIG 500 | 22  1000 | 26  1000 | 30  1000 | 34  1000 | 38  1000 |
| **E** | **VIG 2000** | **23**  **100** | **27**  **100** | **31**  **100** | **35**  **100** | **39**  **100** | VIG 2000 | 23  100 | 27  100 | 31  100 | 35  100 | 39  100 |
| **F** | **VIG 8000** | **23**  **1000** | **27**  **1000** | **31**  **1000** | **35**  **1000** | **39**  **1000** | VIG 8000 | 23  1000 | 27  1000 | 31  1000 | 35  1000 | 39  1000 |
| **G** | **VIG 32000** | **24**  **100** | **28**  **100** | **32**  **100** | **36**  **100** | **40**  **100** | VIG 32000 | 24  100 | 28  100 | 32  100 | 36  100 | 40  100 |
| **H** | **VIG 128000** | **24**  **1000** | **28**  **1000** | **32**  **1000** | **36**  **1000** | **40**  **1000** | VIG 128000 | 24  1000 | 28  1000 | 32  1000 | 36  1000 | 40  1000 |

**Seren-Verdünnungen: Das Layout besteht aus 2 identischen Blöcken, nur Spalten 1-6 ansetzen.**

**Im Assay je 50 µl nach Layout in Spalten 1-6 UND Spalten 7-12 transferieren.**

**Plattenlayout Sekundärantikörper**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Anti-IgG** | | | | | | **Anti-IgM** | | | | | |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **A** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **B** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **C** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **D** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **E** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **F** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **G** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |
| **H** | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgG | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM | Anti-IgM |

**Seren**

Die folgenden Seren sollen gemessen werden.

**NK-Serum: DS-2**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nummer** | **Probe** | **Platte** |
| **1** | SPox-0001 | Platte 1 |
| **2** | SPox-0002 | Platte 1 |
| **3** | SPox-0003 | Platte 1 |
| **4** | SPox-0004 | Platte 1 |
| **5** | SPox-0005 | Platte 1 |
| **6** | SPox-0006 | Platte 1 |
| **7** | SPox-0007 | Platte 1 |
| **8** | SPox-0008 | Platte 1 |
| **9** | SPox-0009 | Platte 1 |
| **10** | SPox-0010 | Platte 1 |
| **11** | SPox-0011 | Platte 1 |
| **12** | SPox-0012 | Platte 1 |
| **13** | SPox-0013 | Platte 1 |
| **14** | SPox-0014 | Platte 1 |
| **15** | SPox-0015 | Platte 1 |
| **16** | SPox-0016 | Platte 1 |
| **17** | SPox-0017 | Platte 1 |
| **18** | SPox-0018 | Platte 1 |
| **19** | SPox-0019 | Platte 1 |
| **20** | SPox-0020 | Platte 1 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nummer** | **Probe** | **Platte** |
| **21** | SPox-0021 | Platte 2 |
| **22** | SPox-0022 | Platte 2 |
| **23** | SPox-0023 | Platte 2 |
| **24** | SPox-0024 | Platte 2 |
| **25** | SPox-0025 | Platte 2 |
| **26** | SPox-0026 | Platte 2 |
| **27** | SPox-0027 | Platte 2 |
| **28** | SPox-0028 | Platte 2 |
| **29** | SPox-0029 | Platte 2 |
| **30** | SPox-0030 | Platte 2 |
| **31** | SPox-0031 | Platte 2 |
| **32** | SPox-0032 | Platte 2 |
| **33** | SPox-0033 | Platte 2 |
| **34** | SPox-0034 | Platte 2 |
| **35** | SPox-0035 | Platte 2 |
| **36** | SPox-0036 | Platte 2 |
| **37** | SPox-0037 | Platte 2 |
| **38** | SPox-0038 | Platte 2 |
| **39** | SPox-0039 | Platte 2 |
| **40** | SPox-0040 | Platte 2 |

Es sollte noch eine Standardisierte Dokumentation der Gemessenen Seren etabliert werden, z.B. Ablage in einer Exceltabelle nach definiertem Muster -> Beispiel angelegt -> mit Daniel Stern absprechen

**Verdünnung der Antikörper/Seren**

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. Je Antikörper und Verdünnung werden 3 x 50 µl, also 150 µl benötigt. Mindestens jeweils 250 µl, mindestens jedoch 2 µl pipettieren, da sonst der Verdünnungsfehler zu groß wird.

**NK (Negativ Kontrolle): DS2**

**Well A1** NK 100: Erste Verdünnung 1:50 (final im Assay 1:100)

**10 µl SeCoV-1036 + 490 µl Assay-Puffer**

**-> Mischen**

**Well B1** NK 1000: Zweite Verdünnung: 1:10

**40 µl der NK-Verdünnung + 450 µl Assay-Puffer**

**-> Mischen**

**Blank:**

**Well C1 Assay-Puffer**, z.B. 400 µl

**VIG Verdünnungsreihe:**

**Wells D1-H1, nach jeder Verdünnung mischen**

**VIG** soll 1:500 als erste Verdünnung eingesetzt werden (Verdünnung 1:250, final im Assay 1:500)

**Well D1 3 µl + 747 µl Assaypuffer**

**-> Mischen**

Weitere Verdünnungen In serieller Verdünnungsreihe 1:4 (600 µl ansetzen)

**Well E1, F1, G1, H1 150 µl Vorverdünnung + 450 µl Assaypuffer**

**-> Mischen**

Insgesamt 5 Verdünnungsstufen ansetzen **(siehe Layout)**

**Verdünnung der inaktivierten Seren für den IgG-/ und IgM-Nachweis**

**Seren** sollen 1:75 als erste Verdünnung angesetzt werden. Die Triton-Inaktivierung beinhaltet bereits eine kleine Verdünnung (75 µl Serum + 25 µl Triton-Puffer). Da der Bead-Mix eine weitere 1:1 Verdünnung darstellt, wird eine 1:37,5 Verdünnung angesetzt, im finalen Assay ergibt sich eine 1:100 Verdünnung.

**#, 100:** 1:37,5 Verdünnung

**10 µL Serum + 365 µL Assay-Puffer**,

**-> Mischen**

**#, 1000:** weitere 1:10 Verdünnung

**40 µL Verdünnung + 360 µL Assay-Puffer**

**-> Mischen**

**Bead-Mix**

**Bead-Mix für 2 Platten:**

Ansatz **für 2 volle 96-Well-Platten** + Überschuss (für insgesamt 208 Wells):

* 10,4 ml ansetzen -> je ID 1:200 bei 4000 Beads/µl
  + **9,40 ml Assaypuffer**
  + **52 µl je Beadregion** = 19 \* 52 = 988 µl (alle Bead-Regionen gleich)

**Detektionsantikörper**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr** | **Nachweisantikörper** | **Hersteller** | **Produkt-Nr.** | **Konzentration** | **Einsatz im Assay** | **Lagerort** |
| **1** | Goat Anti-Human **IgG** PE | Jackson / Dianova | 109-115-098 | 0,5 mg/mL | 1:500 | In Arbeitsbox, weiterer in  ZBS3-KS5 Fach 2 Box 233 |
| **2** | Donkey anti-Human **IgM**, Fc5µ, PE | Jackson / Dianova | 709-116-073 | 0,5 mg/mL | 1:500 | In Arbeitsbox, weiterer in  ZBS3-KS5 Fach 1 Box 300 |

**Notieren welches Lot verwendet wurde**

Benötigtes Volumen je Detektionsantikörper 5000 µl, also jeweils 5500 µl ansetzen

**Für 2 Platten** doppelte Menge plus größeren Überschuss: 11000 µl ansetzen

* **Anti-Human IgG PE** 1:500 Verdünnung
  + 22 µl Antikörper + 11, 0 ml Assaypuffer
* **Anti-Human IgM PE** 1:500 Verdünnung
  + 22 µl Antikörper + 11,0 ml Assaypuffer

Die **Detektionsantikörper sind lichtempfindlich**, da sie einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten.

Entsprechend müssen die Antikörper bis zur Verwendung und zur Zwischenlagerung lichtgeschützt gelagert werden.