**170725 Peptidtests Bindungsmuster**

- 6 Mikrotiterplatten: 3x 3D-Epoxy, transparent, Charge …, ID 170725-I - bis 170725-III  
 3x 3D-NHS, weiß, Charge …, ID 170725-I bis 170725-III

- Liganden: Fetuin neue Charge vom 09.05.17 10 mg/ml in H2O  
 Neutravidin 5 mg/ml in H2O  
 Peptid 7 P7 KKK-FYDPDVFY  
 Peptid 16 P16 KKK-FYDYDVFY   
 Peptid 39 P39 KKK-FYGYDVFF  
 Peptid 41 P41 KKK-LYGYDVFF  
 Peptid 42 P42 KKK-FYGYDVAF  
 Peptid 44 P44 KKK-FYDMDVFY  
 🡪 alle Peptide sind in Stocklösungen á 10 mg/ml vorgelöst (TK 1.S.040)

**1. Immobilisierung**

- Immobilisierungspuffer: NaHCO3 pH 8.5  
- Verdünnung : Peptide auf 1 mg/ml 360 µl + 3240 µl   
 Fetuin auf 0.3 mg/ml 108 µl Fetuin + 3492 µl Puffer  
 Neutravidin auf 0.1 mg/ml 36 µl + 1764 µl Puffer  
- Immobilisierung Reihenweise (A – Fetuin, B1-B6 – Neutravidin, B8-B12 Puffer, C – P7 usw.), 50 µl/well  
- benötigtes Volumen pro Ligand: 3.8 ml (3.6 + 0.2 Totvolumen)  
- nach Zugabe Abdecken mit Klebefolie, kurz Schütteln auf dem Thriller @600 rpm  
- ü.N. in KS stellen (13:30 Uhr)  
- 26.07. um 9:30 aus KS genommen:  
- jeweils Platten I gewaschen durch einfaches Ausspülen unter dem Wasserhahn mit H2Odest - jeweils Platten II & III gewaschen nach Waschprotokoll: Waschprotokoll: gewaschen 1x NaHCO3 100 µl/well, 2x H2O 100 µl/well, jeweils kurz dazwischen auf den Thriller bei 400 rpm geschüttelt - alle Platten getrocknet im N2-Strom

- jeweils Platten I & II vakuumverpackt und im KS gelagert - direkt weitergearbeitet jeweils mit den Platten III

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **A** | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin | Fetuin |
| **B** | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer |
| **C** | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 | P7 |
| **D** | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 | P16 |
| **E** | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 | P39 |
| **F** | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 | P41 |
| **G** | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 | P42 |
| **H** | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 | P44 |

**2. Blocking**

- Platten III (je 1x 3D-NHS, 1x 3D-Epoxy)  
- Zugabe PolyAn Blocking Solution 100 µl/well, Inkubation 1 h 37 °C im TS  
- anschließend gewaschen 1x Washing Solution 1, 1x Washing Solution 2, 1x Washing Solution 3, 1x H2O je 100 µl und kurz geschüttelt auf dem Thriller @400 rpm  
- getrocknet im N2-Strom

**3. Virustest Inkubationszeit**

- Test mit den Platten:   
 3D-Epoxy, transparent, Charge 161118?, ID 170725-III   
 3D-NHS, white, Charge 161118?, ID 170725-III

- Zugabe von 50 µl/well SL6b 10 µg/ml in PBST zu den wells B1-B6, Inkubation 5 min auf Thriller @400 rpm, dann Waschen 1x PBST 100 µl, 2x H2O 100 µl, Trocknen im N2-Strom  
- anschließend pro Platte Zugabe X31-3-634 (Labelling vom 25.07.17) in 1:50 Verdünnung, 50 µl/well in den Spalten 1, 2, 3, 7, 8, 9 (48 wells 🡪 2.5 ml Viruslösung ansetzen (50 µl + 2450 µl PBST)  
- gefüllte Platte einmal am Omega Scannen (Programm Dye634altern2 mit Gain 2000) 🡪 als Referenzierung für spätere Auswertung

- Inkubation bei 37 °C im TS  
- Entnahme der Viruslösung und Waschen 1x PBST 100 µl, 2x H2O 100 µl (ohne Trocknen) spaltenweise, zwischendurch weiterinkubieren bei 37 °C:   
 Spalte 1 nach 30 min   
 Spalte 7 nach 60 min (67 min)  
 Spalte 2 nach 120 min  
 Spalte 8 nach 180 min  
 Spalte 3 nach ca. 20 h  
 Spalte 9 nach ca. 44 h  
- deutliche Verdunstung in Spalte 9 sichtbar (28.07. 24 °C 54%)  
- Platte komplett waschen, trocknen, Scannen am Omega

Ergebnisse: - generell uneinheitlich und hoher Hintergrund weiterhin  
 - systematische Signalzunahme nur bei SL6b und P7, P41 (NHS)  
 - Signalhöhen auf Epoxy extrem gering 🡪 Scan am Tecan

**4. Analyse mittels Tecan**

- ab 31.07.17  
- Ergebnisse: *170731 Peptidtests Bindungsmuster Tecan Auswertung.xlsx*  
🡪 systematische Fehler durch spalten-/reihenweises Scannen (aufgrund Krümmung der Platte) 🡪 am Tecan muss wellweise gescannt werden (Programm für Greiner 96er ist angelegt mit automatischer Fokussierung)

🡺 generell wird mit dem Tecan kein besseres S/N erreicht als am Plattenreader

🡺 Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Viren in MTPs macht so keinen Sinn (zu geringes S/N)  
 🡪 nochmals mit stark gelabelten Viren (mit 1000facher Farbstoffmenge von Bernhard   
 170809) ausprobieren, ansonsten auf enzymatische Formate umsteigen

**5. Inkubation mit stark gelabeltem Virus**

- 25.08.17  
- X31-1/2-634 gelabelt am 09.08.17 mit 1000facher NHS-Dye-Konzentration  
- Verdünnung der Viruslösung 1:50 in PBST, Inkubation auf 3D-Epoxy und 3D-NHS Platten ID 170725-III in den Spalten 4&10 (16x 50 µl 🡪 800 µl)  
- Inkubation 3 h bei 37 °C im TS 🡪 danach Referenzscan am Omega  
- anschließend gewaschen, 2x PBST, 1x H2O 🡪 gescannt am Plattenreader

…

**6. Virusinkubation und NA-Star**

- 07.09.17  
- Zugabe 4 µg/ml X31-alt in PBST in Spalten 5 und 11 je 50 µl  
- Inkubation 3 h 37 °C  
- Erstellung eines Referenzwells mit 50 µl 4 µg/ml X31-alt (B10)  
- Durchführung NA-Star Assay: - Zugabe NA-Star Substrat, 50 µl einer 1:5000 Verdünnung (10 µl   
 1:1000 + 40 µl Assay Buffer)  
 - Inkubation 1 h 37 °C nach kurzem Schütteln  
 - Injektion und Messung der Chemilumineszenz am MTP-Reader,   
 Programm NA-Star  
- Ergebnisse:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Doppelbestimmung** | |  |  |
|  | **1** | **2** | **MW** | **STABW** |
| **Fetuin** | 169524 | 105026 | 137275 | 45607 |
| **SL6b/Puffer** | 107550 | 44955 |  |  |
| **P7** | 256916 | 108632 | 182774 | 104853 |
| **P16** | 194687 | 123391 | 159039 | 50414 |
| **P39** | 135952 | 106540 | 121246 | 20797 |
| **P41** | 109387 | 108553 | 108970 | 590 |
| **P42** | 112784 | 66713 | 89749 | 32577 |
| **P44** | 96910 | 79839 | 88375 | 12071 |
| **PC** | 455050 |  |  |  |

🡪 signifikante Signale vorhanden, aber teils sehr hohe Differenzen bei Doppelbestimmung  
🡪 Problem hier möglicherweise:   
 - Platten absichtlich nicht getrocknet, unterschiedliche Totvolumina  
 - ggf. Virusmenge unterschiedlich aufgrund Heterogenität der Analytlösung  
 🡪 Homogenisieren? Wenn ja, wie?

**7. Wiederholung Virusinkubation und NA-Star**

- 18.09.17  
- neue Platte 3D-NHS white I  
- Zugabe je 50 µl 4 µg/ml X31-alt in Spalten 1/2/7/8 in PBST  
 in Spalten 3/4/9/10 in HBSP50  
- Inkubation 37 °C in TS  
- 3x gewaschen, Zugabe 50 µl Assay-Buffer und 10 µl NA-Star Substrat 1:1000  
- Inkubation 37 °C in TS  
- Zugabe Accelerator und Messung am Omega (Gain 2500, Programm NA-Star Inj.)  
- Ergebnisse:

- sehr hoher Hintergrund (Puffer) bei beiden Versuchsreihen  
 - Signalschwankungen zumeist in akzeptabler Spannweite (N = 4 jedoch teilweise keine   
 Signale in Spalte 3)  
 - Platte war nicht geblockt, daher möglicherweise Widerspruch zu den Ergebnissen aus 6.

**8. weitere Reproduzierbarkeitsversuche**

- 19.09.17  
- zunächst weiteres Blocking:   
 a) 5 % Milchpulver in PBST, Platte 3D-NHS white II, Spalten 1-3 & 7-9 (je 100 µl, 1 h 37 °C   
 Inkubation, gewaschen 2x PBST, 1x H2O, getrocknet)  
 b) PolyAn-Blocking Buffer, Platte 3D-NHS white I, Spalten 5, 6, 11, 12 (je 100 µl, 1 h 37 °C   
 Inkubation, gewaschen WI – WII – WIII – H2O, getrocknet)

- für Bindungsversuche alle drei Platten verwendet  
- Zugabe 4 µg/ml X31-alt: 3D-NHS white I Spalten 5, 6, 11, 12 PolyAn geblockt  
 3D-NHS white II Spalten 1, 2, 7, 8 Milchpulver geblockt  
 3D-NHS white III Spalten 6, 12 PolyAn geblockt  
- Inkubation 1 h 37 °C, gewaschen 3x PBST  
- Zugabe NA-Star Substrat 1:1000, 1 h Inkubation bei 37 °C (Achtung: bei Platte II zunächst nur kurz inkubiert, Messung abgebrochen)  
- Anschließend mit Standardprogramm NA-Star Inj. gemessen  
- Ergebnisse: - siehe *170919 Virusbindungstest blocking.xlsx* - PolyAn-Blocking hilft offenbar nicht wirklich viel  
 - ggf. verkürzte Inkubationszeiten mit mehr Substrat verwenden  
 - Virus in Milchpulver inkubieren und mehr Substrat verwenden  
 - Lumineszenzsignale weiterhin mit hohen Schwankungen 🡪 Viren homogenisieren?

**9. NA-Star mit MP- und HSA-Blocking**

- 21.09.17  
- weiteres Blocking von 3D-NHS white II mit 5 % Milchpulver in PBST in den Spalten 4-6 und 10-12 (je 100 µl/well, Inkubation 1 h 37 °C)  
- gewaschen 2x PBST, 1x H2O, getrocknet  
- Zugabe X31-alt 4 µg/ml (50 µl/well) in 5 % Milchpulver in PBST (Spalten 4, 5, 10) bzw. in 2 % HSA in PBST (Spalten 6, 11, 12)  
- Inkubation zunächst 1 h 37 °C, dann im KS ü.N.  
- am nächsten Tag gewaschen mit PBST 3x, ohne Trocknen Zugabe NA-Star Assaybuffer 50 µl/well sowie 10 µl NA-Star Substrat 1:100 10 µl/well  
- Inkubation 1 h 37 °C, Messung am Omega mit Programm NA-Star Inj.  
- Ergebnisse:

- teils wieder sehr uneinheitliche Signale trotz Dreifachbestimmung (insb. SL6b, P16, P41)  
 - Positivkontrolle Fetuin scheint zu funktionieren  
 - HSA-Blocking bringt insgesamt reproduzierbarere Ergebnisse