**170918 Peptidtests Bindungsmuster II**

- Wiederholung Immobilisierung vom 25.07.18  
- 2 Mikrotiterplatten:

- 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 9 P9 KKK-FYGYDVAF  
 Puffer  
 🡪 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 (125 + 1125 µl)   
 Fetuin auf 0.3 mg/ml (37.5 + 1212.5 µl)   
 Neutravidin auf 0.1 mg/ml (62.5 + 1187.5 µl)   
- Immobilisierung Reihenweise (A – Fetuin, B – Neutravidin, usw.), 50 µl/well  
- benötigtes Volumen pro Ligand: 800 µl  
- nach Zugabe Abdecken mit Klebefolie, kurz Schütteln auf dem Thriller @600 rpm  
- ü.N. in KS stellen   
- 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, eingeschweißt

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **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 | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b | Neutr + SL6b |
| **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** | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer | Puffer |

**2. Immobilisierung SL6b**

- 25.09.17  
- Zugabe SL6b 10 µg/ml (neu von Dextra) in PBST in Reihe 2, kurz Schütteln, Inkubation 5 min @RT, waschen, N2-trocknen

**3. Blocking SP 1-6**

- Zugabe 2 % HSA in PBST (Spalten 1-3) bzw. 2 % HSA in NaHCO3 pH 8.5 (Spalten 4-6) je 100 µl  
- Inkubation 1 h 37 °C TS  
- waschen 2 x PBST, 1x H2O, trocknen

**4. Inkubation X31-alt in HSA und NA-Star**

- Zugabe 4 µg/ml X31-alt in 2 % HSA in PBST 50 µl/well, kurz Schütteln  
- Inkubation 1 h 37 °C TS  
- gewaschen 3x PBST  
- Zugabe 50 µl NA-Star Assay Buffer pro well sowie 10 µl NA-Star Substrat 1:100  
- Inkubation 1 h 37 °C  
- Zugabe Accelerator und Messung am Plattenreader mittels Programm NA-Star Inj.  
- Ergebnisse:

-

**5. Wiederholung Blocking/Inkubation HSA**

- 26.09.17  
- MTP 170918 Bindungstests II Platte I  
- Zugabe 2 % HSA in PBST (Spalten 7-9) bzw. 5 % HSA in PBST (Spalten 10-12) je 100 µl  
- Inkubation 1 h 37 °C TS  
- waschen 2 x PBST, 1x H2O, trocknen

- Zugabe 4 µg/ml X31-alt in 2 % HSA in PBST 50 µl/well, kurz Schütteln  
- Inkubation 1 h (?) 37 °C TS  
- gewaschen 3x PBST  
- Zugabe 50 µl NA-Star Assay Buffer pro well sowie 10 µl NA-Star Substrat 1:100  
- Inkubation 1 h 37 °C  
- Zugabe Accelerator und Messung am Plattenreader mittels Programm NA-Star Inj.