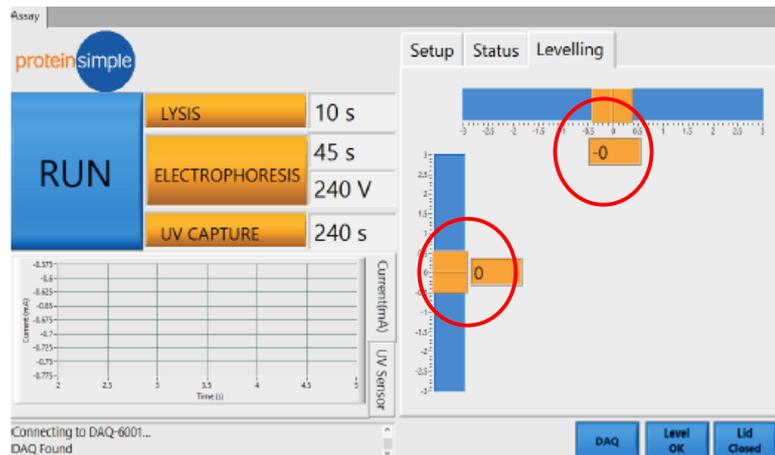
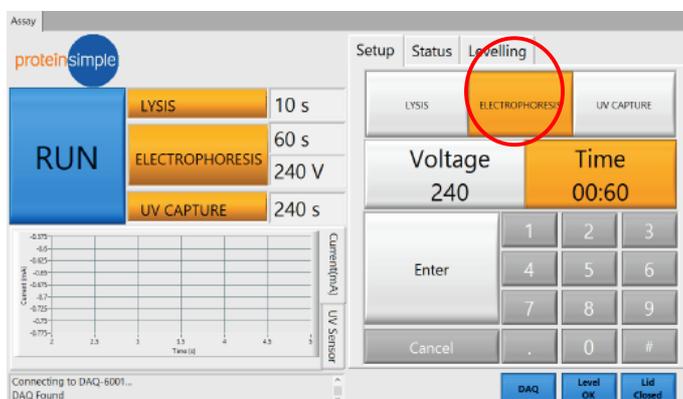


## 仪器准备

1. 插入电源线。先打开 Milo 背面开关，再打开正面开关。
2. 等 Milo 开机后，检查 Leveling，确保 Leveling 在  $0 \pm 0.5$  以内（尽量接近 0，万一中间超过 0.5，程序会自动停止）。



3. 点击右侧 ELECTROPHORESIS 更改参数，电泳时间根据分子量设定。



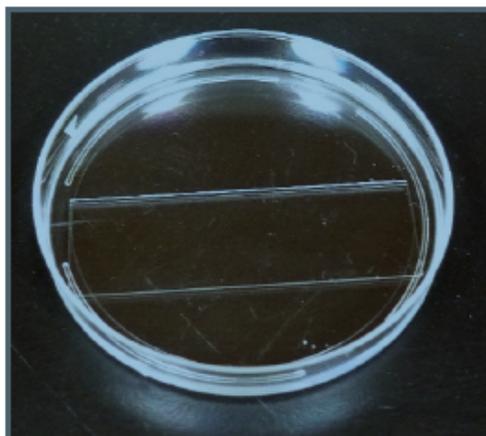
Target MW	Electrophoresis Time
10–30 kDa	45 seconds
30–80 kDa	60 seconds
80–175 kDa	90 seconds

4. 打开盖子，放入电泳槽（电泳槽无方向）。



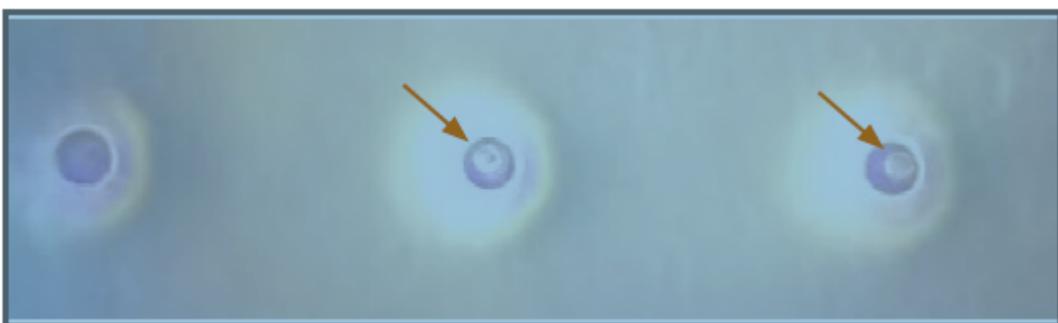
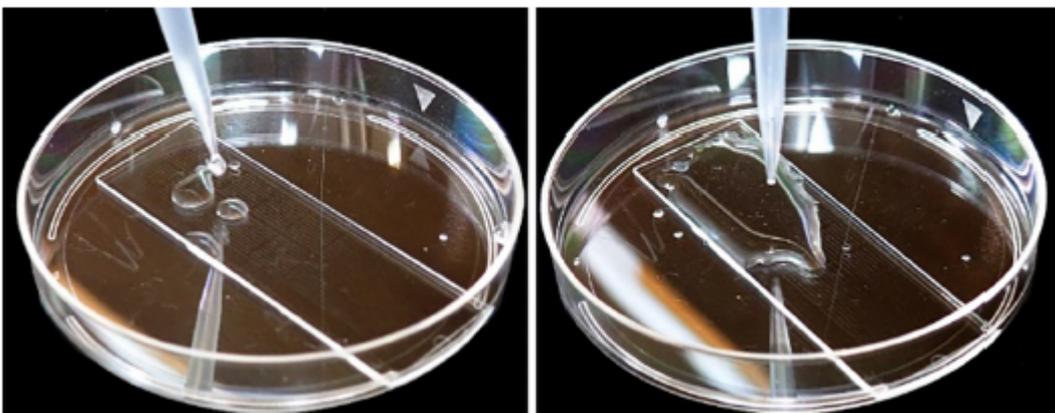
## 水化芯片

1. 戴上乳胶手套，用肥皂水搓洗冲干，去掉潜在粉末。
2. 取出 Milo 试剂盒。用去离子水配制 50 mL 1 X Suspension Buffer。1 X Suspension Buffer 可室温长期保存。
3. 取一干净的 10 cm dish，将芯片正面朝上（注意 proteinsimple 的 logo 在左边，可以看出来芯片的编号）放入培养皿中。
4. 加入 15 mL 1 X Suspension Buffer，室温水化 20 分钟到 4 小时。

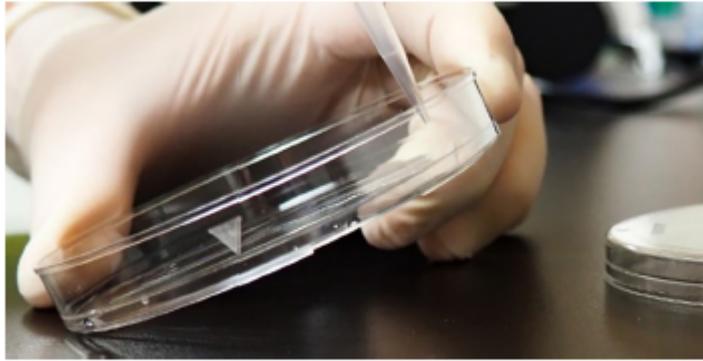


## 滴加细胞

1. 细胞消化后，500 g 离心 10 min，去除培养基。
2. 加入 5 mL 1 X Suspension Buffer 吹打均匀，进行细胞计数。
3. 根据细胞浓度，从 5mL 里吸取  $10^4$ - $10^5$  个细胞，离心后加入 1 mL 1 X Suspension Buffer 重悬。最终制成  $10^5$  个细胞/mL 的单细胞悬液。
4. 将培养皿中的 1 X Suspension Buffer 水化 buffer 吸去（可以直接倾倒）。
5. 从左到右将单细胞悬液滴到芯片上，确保整张芯片都被单细胞悬液覆盖。
6. 室温静置 5-20 分钟，显微镜下观察细胞数量（一般一行 40 个孔内有 5-7 个孔内有细胞比较合适）。
7. 静置时保持芯片水平，避免晃动影响细胞沉降。



8. 将培养皿切斜 45 度，从底部将细胞悬液吸去。
9. 从顶部加入 1 mL 1 X Suspension Buffer，将芯片表面未沉降入孔的细胞洗去，重复洗 1-2 次。



10. 显微镜下检查未落入小孔的细胞是否冲洗干净，并观察单细胞的孔数。

## 裂解电泳

1. 往 Milo 的电泳槽左边加入 300  $\mu$ L Lysis/Run Buffer，避免引入气泡。
2. 芯片正面朝上，由左向右加入电泳槽，避免引入气泡。
3. 将剩余的 Lysis/Run Buffer 到入电泳槽内，立即关上盖子，迅速点击 RUN。
4. 实验结束后，取出芯片，放入干净 10cm dish。电泳槽冲洗晾干，下次备用。

## 孵育一抗

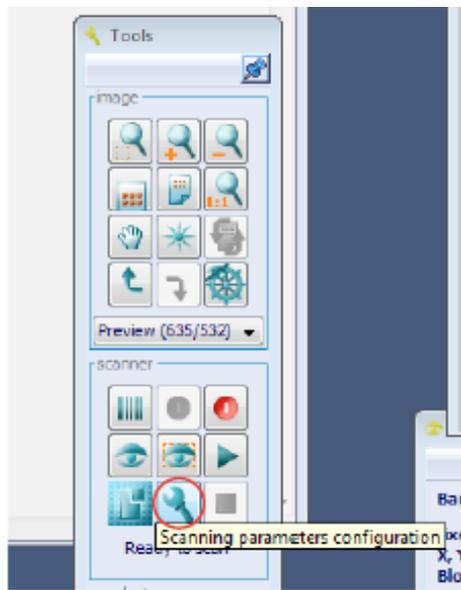
- 1-1. 如果马上一抗杂交，培养皿里加入 15 mL 1 X Wash Buffer，振荡 10 分钟弃去，共 2 遍。
- 1-2. 如果第二天一抗杂交，培养皿里加入 15 mL 1 X Wash Buffer，振荡 10 分钟弃去，共 2 遍。再加入 15 mL 1 X Wash Buffer，4°C 冰箱过夜。
- 1-3. 如果暂不杂交，芯片可用去离子水冲洗三次，室温晾干存放。下次杂交前，用 15 mL 1 X Wash Buffer 水化 10 分钟。
2. 一抗用 Antibody Diluent 2 稀释到 1:10 ( 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )，共 80  $\mu\text{L}$ 。
3. 将一抗溶液滴加至孵育槽上。
4. 将芯片正面朝下覆盖在孵育槽上。
5. 在孵育槽的两边放上湿润的海绵，盖上培养皿的盖子。室温孵育 2 小时。也可一抗 4°C 过夜。
6. 取出芯片，正面朝上放入 10cm dish。加入 15 mL 1 X Wash Buffer，振荡 10 分钟弃洗液，共三次。

## 孵育二抗

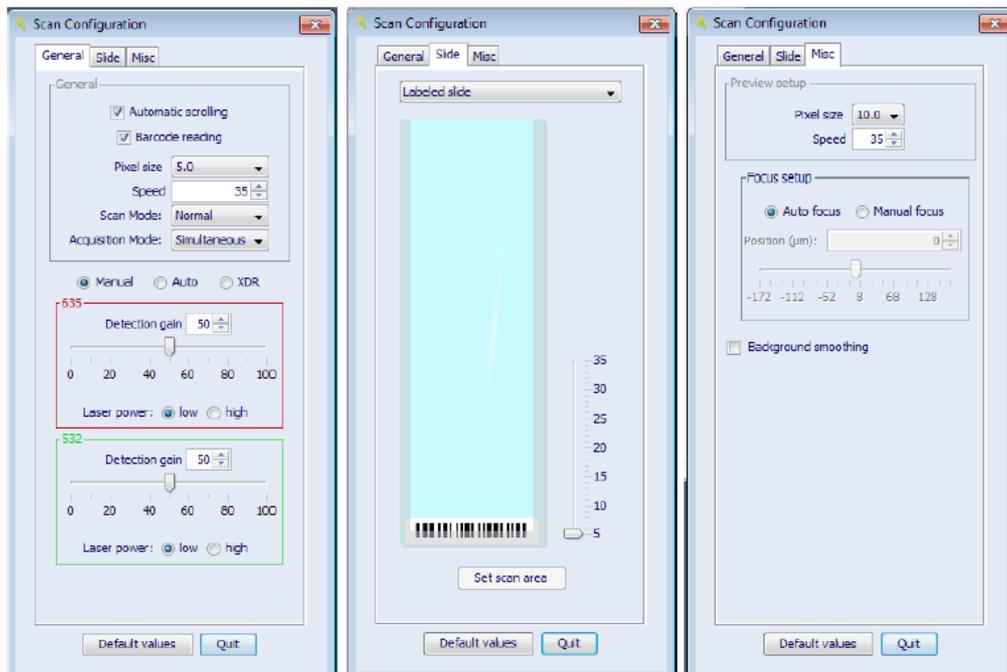
1. 二抗用 Antibody Diluent 2 稀释到 1:20 ( 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ), 共 80  $\mu\text{L}$ 。
2. 将二抗溶液滴加至孵育槽上。
3. 将芯片正面朝下覆盖在孵育槽上。
4. 在孵育槽的两边放上湿润的海绵，盖上培养皿的盖子。室温孵育 2 小时。  
注意用锡箔纸避光。
5. 取出芯片，正面朝上放入 10cm dish。加入 15 mL 1 X Wash Buffer，振荡 15 分钟弃洗液，共三次。注意用锡箔纸避光。
6. 取出芯片，边缘与无尘纸接触去除残余洗液，再用去离子水漂洗 3 次。
7. 取出芯片，室温避光晾干。或装入 50 mL 离心管，500 g 离心 5 分钟甩干。
8. 芯片可室温避光保存，或直接进行扫描。

## 芯片扫描

1. 打开扫描仪后侧电源。
2. 双击 Mapix 软件，并点击 Scanner-Connect 连接。
3. 连接后等待 10 分钟以上，进行仪器预热。
4. 将芯片正面朝上插入扫描仪中，点击 Scan Configuration。



5. 按下图参数进行芯片扫描。Gain 值可根据实际信号强弱进行调节。信号太强要调低，太弱要调高。



6. 扫描结束后取出芯片。注意手指先从芯片下方将芯片拨出，再从两侧捏住，将芯片取出。
7. 长时间不扫描时，点击 Scanner-Disconnect 关掉激光光源，节省光源寿命。