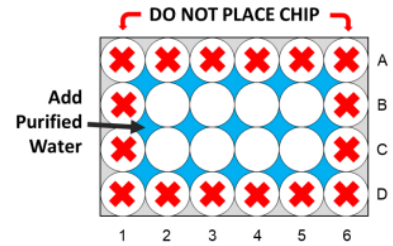


Nanoview Quick Manual – Sample preparation

※ 주의! 모든 chip은 prescan 후에 샘플 인큐베이션을 진행한다. (Prescan 방법 참고)

A. Sample incubation

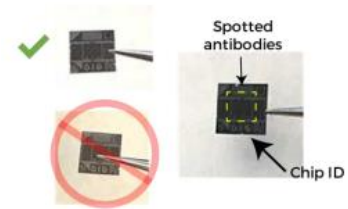
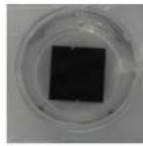
1. 오른쪽의 그림과 같이 24 well plate의 well 사이 공간에 증류수를 반 정도 채워 넣는다 (샘플 용매의 증발 방지). 이 때, 증류수가 well 안으로 들어가지 않도록 주의한다.



2. Exoview 분석 chip을 well 안에 넣는다. 이 때, chip이 well에 닿지 않도록 하며, 분석하는 부분이 위를 향하게 놓는다 (아래 왼쪽 그림). Chip을 옮길 때에는 가장자리를 잡아 옮기며, 중간에 항체가 있는 부분을 건드리지 않도록 한다 (아래 오른쪽 그림).



Incorrect because touching walls of well



3. 적정량으로 희석된 샘플의 35 μ l를 분석 칩 표면에 공기방울이 생기지 않도록 천천히 dropping 한다. 이 때, pipette tip이 분석 칩 표면에 닿지 않도록 주의한다. (주의; 혹시, dropping 후에 공기방울이 생길 경우, 1 μ l pipette tip으로 살짝 공기방울을 제거한다.)

4. 24 well plate의 뚜껑을 닫은 후에, 알루미늄 호일로 plate를 덮어주고 (샘플 용매의 증발 방지), 16 시간 (overnight) 인큐베이션을 진행한다. (상온에서 가능, No shaking)

B. Immuno-Fluorescence (IF) Staining

1. 16 시간 (overnight) 인큐베이션을 진행한 후에, Exoview 분석 키트 내의 **Solution A**를 사용하여 washing을 진행한다.
2. 1000 μ l (1 ml)의 **Solution A**를 인큐베이션이 끝난 칩의 well에 넣은 후 orbital shaker를 사용하여 약 140 ~ 150 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.
3. 이후, 750 μ l를 제거하고 다시 750 μ l의 **Solution A**를 넣은 후에 orbital shaker를 사용하여 약 150 ~ 160 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.
4. 위의 washing step을 총 3회 반복한다.
5. 3회 후, 750 μ l를 제거한 후 (well 안에는 250 μ l가 남음), 250 μ l의 Ab-dye labeling agent를 각 샘플에 첨가한다.

-> **Ab-dye labeling agent 제조방법** (스탠다드 키트의 항체/형광 (Ab/FL; Anti-CD 81/G, -CD 63/R, -CD 9/B)의 경우)

5.1. 분석하는 샘플의 개수 (칩의 개수) x 260 μ l의 diluted labeling agent 양 (total volume; **T**)이 필요하다.

5.3. 총 양에 대해 **1:600**의 비율로 **Ab/FL**를 **Blocking agent**에 넣어 혼합물을 만든다. (**T/600**에 대한 Ab/FL 양을 넣어준다.)

5.4. 혼합된 Ab-dye labeling agent을 분석 칩이 있는 각 well에 **250 μ l**씩 첨가한다.

예) 9개의 분석칩을 인큐베이션 한 경우,

labeling agent 양 (total volume; **T**) = 9 chips x 260 μ l = 2340 μ l

→ 2340 μ l + 3.9 μ l of Anti-CD 81/G + 3.9 μ l of Anti-CD 63/R + 3.9 μ l of Anti-CD 9/B의 혼합용액을 사용.

6. 외부의 빛을 차단 한 채로 1시간동안 인큐베이션을 진행한다. (Under gently shaking (~ 70 rpm))
7. 1시간 인큐베이션 후에, 500 μ l의 **Solution A**를 각 샘플에 처리한 후, 바로 750 μ l를 제거한다. 그리고 다시 750 μ l의 **Solution A**를 각각 첨가한 후, orbital shaker를 사용하여 약 150 ~ 160 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.
8. 그 후, 750 μ l를 제거하고, 750 μ l의 **Solution B**를 첨가한 후 orbital shaker를 사용하여 약

150 ~ 160 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.

9. 이어서 750 μ l를 제거하고, 750 μ l의 **Solution B**를 첨가한 후 orbital shaker를 사용하여 약 150 ~ 160 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.

10. 위와 같이 **Solution B**를 이용하여 washing step을 총 3회 반복한다.

11. 끝으로 750 μ l를 제거하고, 750 μ l의 증류수를 첨가한 후 orbital shaker를 사용하여 약 140 ~ 150 rpm에서 3분 동안 washing을 진행한다.

C. Chip drying

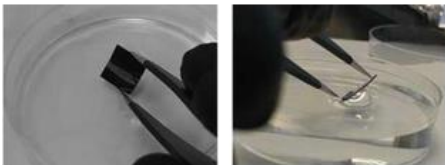
1. 우선 증류수가 들어있는 10 cm의 petri dish를 준비한다.

2. Well 안에 있는 chip을 수평이 유지되도록 오른쪽 그림과 같이 들어올려 증류수가 들어있는 dish로 이동시킨다.



Chip transfer using flat tip tweezers

3. 아래의 그림과 같이 Dish로 옮겨진 chip의 가장자리 부분을 tweezer로 잡은 후에, 45도 각도를 준 상태로 천천히 들어올린다. 그리고, wipe 등에 chip의 바닥이 아래로 가도록 올려놓는다.



Chip being pulled out at 45° angle

4. 이 과정은 별도의 video를 통해 영상으로 확인이 가능하다.

Nanoview Quick Manual – Sample Measurement

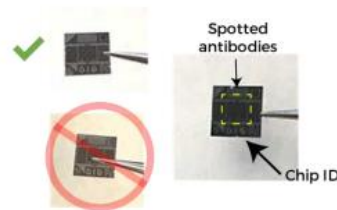
※ chip을 reading 하기 전에 kit의 USB 내의 chipfile (lot ID or plate ID folder)을 분석 컴퓨터에 복사하여 저장한다.

※ 모든 분석 chip은 prescan 후에 샘플 인큐베이션을 진행한다.

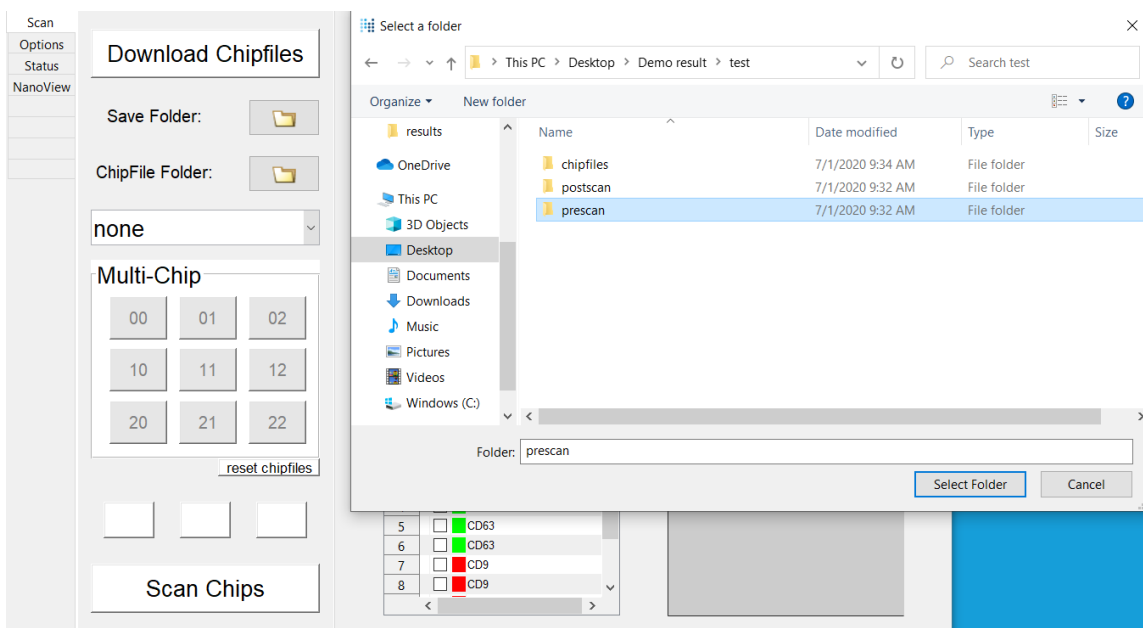
A. Prescan

1. Exoview R-100의 전원을 켜고, 컴퓨터에서 Reading 프로그램 nScan  을 실행시킨다.

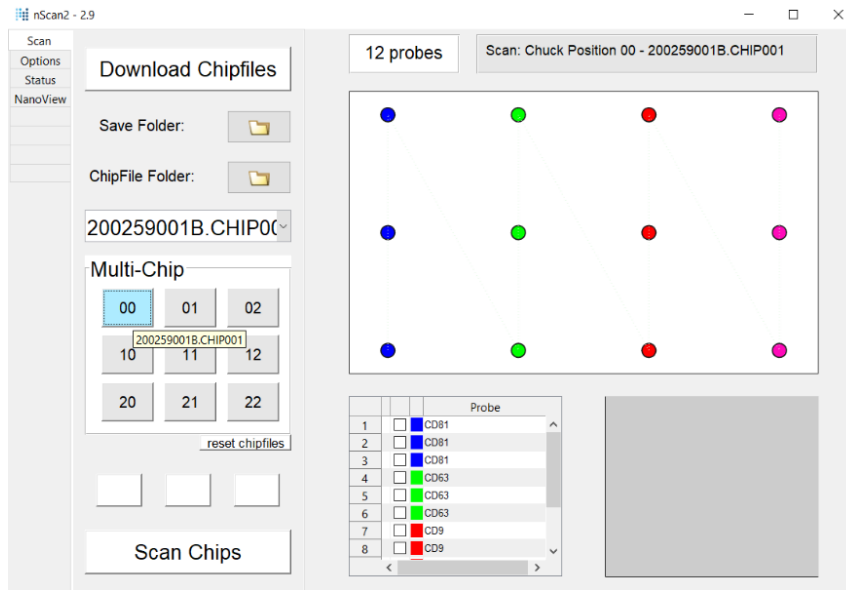
2. Kit 내의 chip을 꺼내어 오른쪽 그림과 같이 chip ID (하단의 번호)가 user 쪽을 향하도록 chuck 위에 올려 놓고, 커버로 덮어준다. 이때, 아래의 그림과 같이 chip의 가장자리를 잡아 옮겨서 올려놓고, 가운데 항체가 있는 부분을 건드리지 않도록 한다.



3. nScan의 “Open Door To Load Chips” 지시에 따라, Nanoview R-100의 앞쪽 문을 열어준다. (stage 이동이 100 %가 될 때까지 기다린다. 앞쪽 문을 열지 않거나, 이동이 100 %가 되기 전에는 save 등이 click이 안된다.) 그리고, Save folder를 클릭하여 원하는 곳에 prescan 저장 폴더를 생성시킨 후 저장 위치를 선택한다.



4. 이어서, chipfile folder를 클릭하여 사전에 복사해서 저장했던 chip파일을 아래의 그림과 같이 오픈한 후에, chuck 위의 chip의 위치와 매칭시켜 nScan 상에서 하나씩 전부 선택을 해준다.

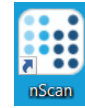


5. Chip의 선택이 완료가 되면, chuck을 Exoview의 스테이지에 올린 후에 (파란색 점이 오른쪽 위를 향하게 올린다) 'Scan Chips'를 클릭한 후에, 스테이지가 100 %이동을 하게 되면, nScan의 지시에 따라 Exoview의 앞 문을 닫는다.

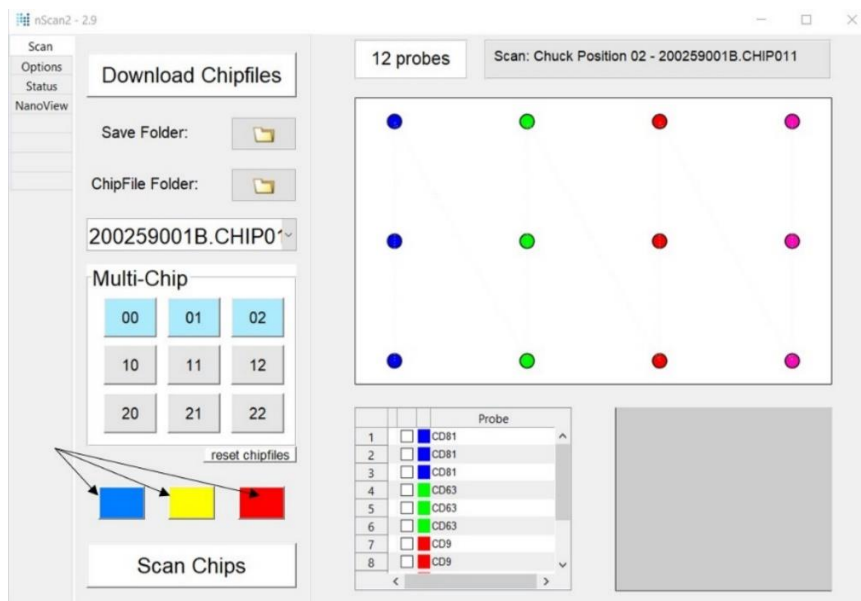


6. Reading이 시작되면, reading time이 표시가 되며, 결과는 자동으로 prescan folder에 저장이 된다.

B. Post scan



1. Exoview R-100의 전원을 켜고, 컴퓨터에서 Reading 프로그램 nScan 을 실행시킨다.
2. 샘플 인큐베이션 과정이 끝난 chip을 prescan 경우와 같이 chip ID (하단의 번호)가 user 쪽을 향하도록 chuck 위에 올려 놓고, 커버로 덮어준다. 이 때, chip의 가장자리를 잡아 옮겨서 올려놓고, 가운데 항체가 있는 부분을 건드리지 않도록 한다. (A. prescan 2를 참고)
3. 그리고 nScan의 "Open Door To Load Chips" 지시에 따라, Nanoview R-100의 앞쪽 문을 열어준다. (stage 이동이 100 %가 될 때까지 기다린다. 앞쪽 문을 열지 않거나, 이동이 100 %가 되기 전에는 save 등이 click이 안된다.) 그리고, Save folder를 클릭하여 원하는 곳에 post scan 저장 폴더를 생성시킨 후 저장 위치를 선택한다. (A. prescan 3을 참고)
4. 이어서, chipfile folder를 클릭하여 사전에 복사해서 저장했던 chip파일을 오픈한 후에, chuck 위의 chip의 위치와 매칭시켜 nScan 상에서 하나씩 전부 선택을 해준다. (A. prescan 4를 참고)
5. 그 후, 아래의 그림과 같이 형광 분석을 위해서 multi-chip 아래의 세 블록을 모두 클릭하여 활성화시킨다.



6. Chuck을 Exoview의 스테이지에 올린 후에 (파란색 점이 오른쪽 위를 향하게 올린다) 'Scan Chips'를 클릭한 후에, 스테이지가 100 %이동을 하게 되면, nScan의 지시에 따라 Exoview의 앞문을 닫는다. (A. prescan 5를 참고)
7. Reading이 시작되면, reading time이 표시가 되며, 결과는 자동으로 post scan folder에 저장된다.