

Funcionalización de cantilevers

1. Poner los chips en las pinzas
2. Desgasificar el agua Milli-Q. (Ultrasonidos+Bomba)
3. **Pirafña 15 min** → 10 ml de ácido sulfúrico + 5 ml de peróxido
 - (Introducir el peróxido al ácido sulfúrico)
 - Diluir el resto hasta 120 ml
4. Lavar bien los chips con Agua Milli-Q, secarlos con papel y la pistola. (Muy seco!)
5. Llevar los chips con las pinzas a la máquina de **ozono**, además del porta
 - Poner los chips (sin pinzas) en el porta dentro de la máquina
 - Sacar el oxígeno con la bombona (Dejar abierta la válvula) 2 min
 - Cerrar la válvula y la bombona. Programar **15 min** y START
6. Mientras tanto preparar el Tiol
 - Concentración pozos de **Tiol (SH-PEG-NH₂): 100 µg/ml (Cada pozo 500 µl)**
$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$
 - Alícuota (25 µl de 100 mg/ml) : $100 \text{ mg/ml} \cdot 25 \text{ µl} = 1 \text{ mg/ml} \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 2.5 \text{ ml}$
→ **Añadir 2475 µl de Agua Milli-Q desgasificada a la alícuota**
 - $1 \text{ mg/ml} \cdot V_1 = 100 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml} \cdot 2000 \text{ µl} \rightarrow V_1 = \underline{200 \text{ µl}}$ (de la anterior:
1 mg/ml) + **1800 µl Agua desgasificada**
 - Poner en los pozos y subirlo arriba a la máquina de ozono
7. Poner los chips de la máquina de ozono en las pinzas e introducirlos en los pozos.
Tapar con film los pozos y dejarlos **1h 25°C 600 rpm [Tiol (SH-PEG-NH₂)]**
8. Preparar el Sulfo-SMCC
 - Concentración pozos **Sulfo-SMCC+PBS: 2 mg/ml (300-400 µl por chip)**
 - 3.6 mg de Sulfo-SMCC + 1.8 ml de PBS
9. Tras la hora del Tiol lavar con agua milli-Q, secar con papel y la pistola e introducir los chips en los pozos con **el Sulfo-SMCC + PBS 2h.N₂ (bolsa) y sin luz**
10. Preparar la fibronectina.
 - **Añadir 575 µl de PBS a cada alícuota de fibronectina** → Total 625 µl (2chips/alícuota)
 - Poner en cada pozo unos 300-500 µl de fibronectina
11. Tras las dos horas del Sulfo-SMCC+PBS lavar dos veces con PBS, agua milli-Q y secar con papel y pistola.
12. Dejar las pinzas en los pozos, cerrando con film, **3h 25°C 300 rpm [fibronectina]**
13. Dejar los chips en eppendorf con PBS, cerrar con film, hasta que se vayan a usar.
14. Lavar el chip con agua milli-Q, secar con la pistola, poner film en la cajita y dejar los chips a usar.

PBS

- 1) Poner la pastilla de PBS en un falcon con agua milli-Q y dejar en los rollos que se disuelva.
- 2) Una vez disuelta completar con agua milli-Q hasta los 200 ml. Introducir la mezcla en otro recipiente con el agitador y cerrar la tapa.
- 3) PHmetro:
 - a. Calibrar primero: Encender
 - b. Quitar el tapón de arriba y abajo
 - c. Cal → PH → 1º tampón → Cal → Limpiar y secar la punta → Hacer lo mismo con los otros dos tampones
 - d. Después de calibrar ponemos el PBS y pulsamos PH (debe estar entre 7.4-7.8)

Sulfo SMCC

2 chips (400 um/chip): $0.4 \text{ ml} \cdot 2 \text{ mg/ml} = 0.8 \text{ mg}$ → **2 chips: 1.6 mg : 0.8 ml**
3 chips (400 um/chip): $0.4 \text{ ml} \cdot 2 \text{ mg/ml} = 0.8 \text{ mg}$ → **3 chips: 2.4 mg : 1.2 ml**
4 chips (400 um/chip): $0.4 \text{ ml} \cdot 2 \text{ mg/ml} = 0.8 \text{ mg}$ → **3 chips: 3.2 mg : 1.6 ml**