

## **EQUIPO: PLATAFORMA DE CLONAJE ROBOTIZADA DE 2000mm**

### **Ficha técnica:**

- Robot con una mesa de trabajo útil de al menos 2000 mm.
- El sistema robótico deberá incluir dentro de la mesa de trabajo, 3 brazos (1 brazo de pipeteo de 8 canales, 1 brazo de pipeteo de 96 canales y 1 brazo para la logística de placas y racks).
- Los 3 brazos deberán poder trabajar de forma simultánea e independiente para obtener una mayor productividad en los procesos.
- Capaz de desarrollar de forma automatizada los protocolos nº 1,3, 4 y 6 del documento HTP CLONING PROTOCOL, anexo I.
- Los equipos anexos/incluidos en la plataforma tendrán la configuración detallada en los documentos anexo II, III y IV.

### **Brazo de pipeteo de 8 canales:**

- La tecnología de manipulación de líquidos de este brazo deberá ser hidráulica, pudiendo utilizar diferentes líquidos de sistema: agua, DMSO, alcohol etílico, etc..... Todo el material en contacto con el líquido de sistema deberá ser resistente a la lejía para poder realizar trabajos de desinfección si así fuera necesario.
- Los 8 canales deberán ser independientes entre sí permitiendo detección individual de volumen. Los canales se deberán poder expandir entre ellos desde 9 a 38 mm para poder acceder de forma simultánea al material fungible de uso en el laboratorio de destino. En concreto se deberá poder acceder de forma simultánea a 8 tubos Falcón de 50 ml.
- Se deberá entregar con un juego (8) de jeringas de volumen acorde con las necesidades del laboratorio aunque el usuario tendrá la posibilidad de poder elegir entre otros rangos de volúmenes para poder operar en otros rangos entre 500 nl y 5 ml. Debe existir la posibilidad de configurar cada uno de los 8 canales con un volumen de jeringa diferente.
- Cada uno de los 8 canales deberá ir equipado con una válvula solenoide que permita la dispensación de pequeños volúmenes sin contacto con el líquido existente en reservorio de destino con gran precisión.
- El sistema deberá venir configurado para utilizar puntas fijas teflonadas y lavables aunque deberá permitir la coexistencia de cualquier configuración mixta con puntas desechables en caso de que fuera necesario.
- Deberá existir la posibilidad de utilizar puntas fijas para la perforación de septa o tapones de goma, pudiendo así poder acceder a tubos tapados sin necesidad de destaponarlos. El sistema debe permitir la detección de volumen después de de la perforación del tapón.
- El robot debe poder pipetear en diferentes formatos de microplacas (6, 24, 48, 96, 384 o 1536 pocillos). Se debe demostrar la capacidad de re-alineación (o verificación de la correcta alineación) de las puntas de forma automática después de cada proceso de pipeteo dentro de la plataforma de trabajo en caso de que fuera necesario.



#### **Brazo de pipeteo de 96 canales:**

- El Brazo de pipeteo de 96 canales deberá permitir configuraciones de carga inferiores a 96 puntas (1, 4, 6, 8, 16, 24, etc...) sobre un rack completo de puntas, para aumentar la versatilidad del mismo.
- Volumen de trabajo: 1-200 ul.
- El brazo debe trabajar con racks de puntas apiladas (al menos 8 racks) con el fin de ahorrar espacio sobre la mesa de trabajo. El brazo de logística de placas y racks de puntas deberá soportar los trabajos de logística de puntas apiladas.
- Este brazo debe tener la posibilidad de utilizar tanto puntas desechables como puntas fijas lavables en el mismo protocolo de trabajo. El cambio de uno a otro sistema debe ser automático y sin necesidad de intervención manual del usuario.

#### **Brazo de logística de placas:**

- El brazo debe funcionar de manera simultánea e independiente al resto de los brazos de pipeteo del equipo.
- El brazo debe permitir poder acceder más allá de la parte lateral, trasera y delantera del equipo para poder integrar accesorios externos al sistema robótico siendo accesibles por este mismo. Debe permitir también poder acceder debajo de la mesa de trabajo para aumentar la capacidad de integración de periféricos.
- El brazo debe tener capacidad de rotación de, al menos, 270 °.
- Con la estación robótica se deberán entregar al menos 30 posiciones para almacenamiento de microplacas y 24 posiciones para almacenamiento de placas de 12/24 pocillos. Todas ellas deben estar fuera de la mesa de trabajo, con el fin de no quitar espacio interior de trabajo, aunque deberán ser accesibles al brazo de logística de placas cuando sea necesario su uso en determinados protocolos.

#### **Software:**

- El SW debe permitir, además de realizar todas las operaciones de manipulación de líquidos, controlar todos los periféricos integrados: Agitadores orbitales, sistemas Peltier, sistemas de purificación por vacío, etc...
- El SW debe permitir la monitorización del equipo remotamente (intranet/Internet) mediante dispositivos de uso cotidiano (iPod Touch, iPhone, etc...).
- Deberá poderse ejecutar el SW y controlar todas las opciones del equipo mediante pantalla táctil, sin necesidad del uso de ratón ni teclado. Además se deberán poder definir protocolos de pipeteo instantáneos, mediante dicha pantalla táctil, sin necesidad de ningún tipo de programación.

#### **Equipos en la plataforma:**

- Agitador orbital con calefacción para:
  - Capacidad: 1000 gr.



- Velocidad de rotación: 100-1500 rpm para microplate y 100-1200 para deep well plates.
- Tipo de movimiento: orbital (horario y antihorario).
- Temperatura: desde RT hasta 80°C.
- Calefactor para incubación:
  - Capacidad: 2 placas.
  - Sistema de calefacción tipo Peltier.
  - Temperaturas alcanzables por los bloques: desde -10°C hasta 100°C.
  - Sistema capaz de gestionar diferentes temperaturas en las dos posiciones.
- Sistema de filtración por vacío + bomba:
  - El sistema deberá poder utilizar gran variedad de placas de filtración/purificación.
  - Caudal de flujo de la bomba: 34 l/min.
  - Vacío final:< 8 mbar (absoluto).
  - Debe ser controlado por el SW del equipo.
- Lector de código de barras:
  - Sistema capaz de realizar la lectura del código de barras de las placas en usode durante el proceso. Esta lectura debe estar automatizada, sin necesidad de intervención del usuario.
- Sistema de almacenamiento:
  - De hasta 18 deep well plate y 32 microplates.
- Soportes:
  - 3 unidades para 4 placas MPS.
  - 1 unidad para hasta 3 contenedores de 100ml.
  - 1 unidad para hasta 8 tubos falcon de 50ml.
- Adaptadores:
  - 2 unidades para placas PCR de 96 pocillos.
  - 1 unidad para tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Lámpara ultravioleta con temporizador para la activación automática del ciclo de esterilización.

**Ordenador para el control y gestión de todo el sistema.**

Dimensiones máximas externas: (altura x fondo x largo): 1200 mm x 780 mm x 2100 mm

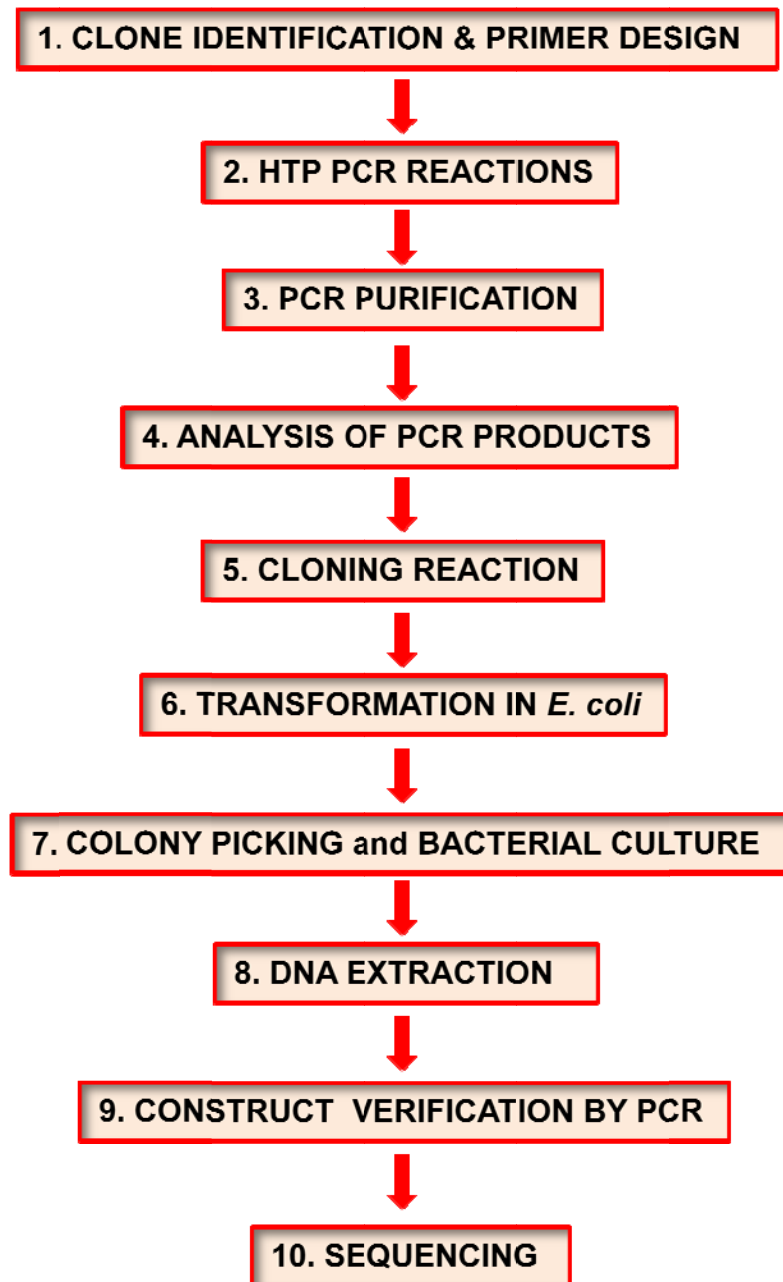
Alimentación eléctrica: 100-240 VAC (frecuencia 50-60 Hz)

Consumo: 1.200 VA

Cantidad:1



## HTP CLONING PROTOCOL



## 1. CLONE IDENTIFICATION & PRIMER DESIGN

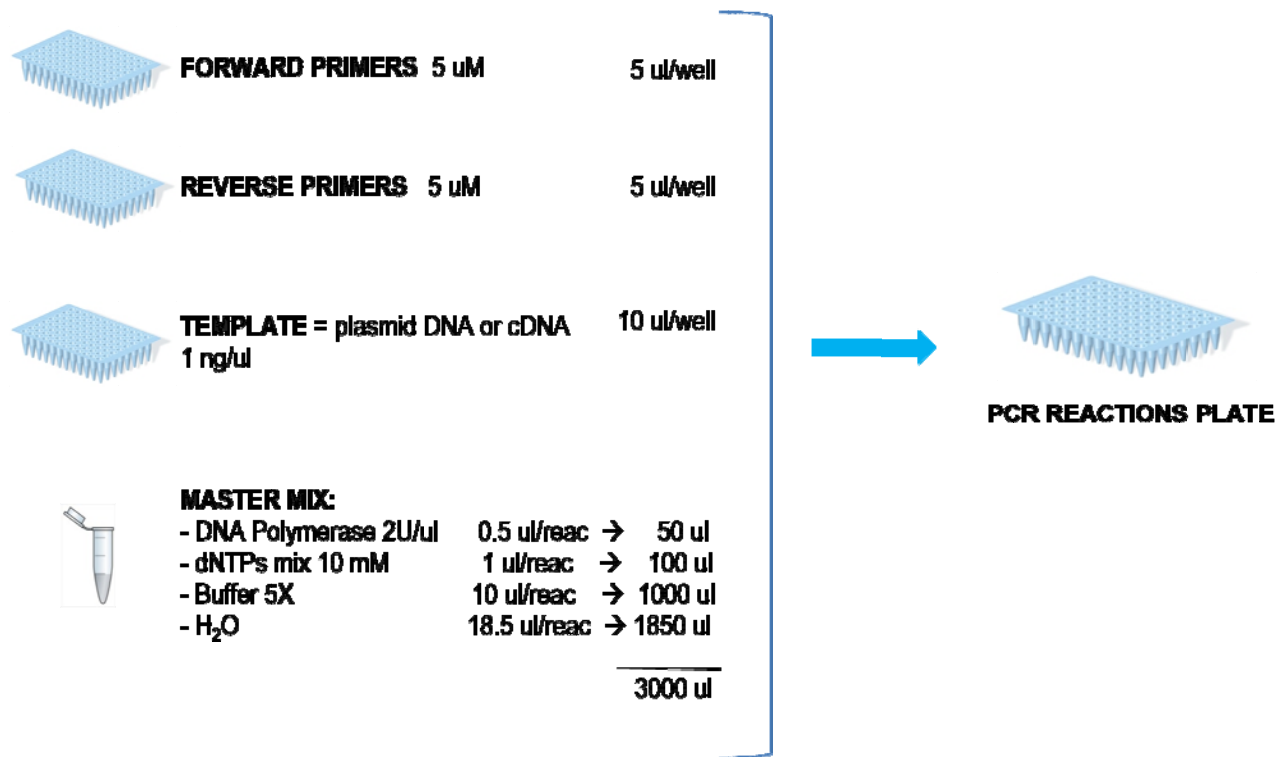
The target sequences of interest are analyzed by bioinformatics tools (@ DNA and protein level). The appropriate primers are automatically designed according to the cloning strategy of choice. The primers are ordered in 2 separate 96-well plates, one for the Forward primers and one for the Reverse ones. The template plasmid DNA , genomic DNA or cDNA are prepared and aliquot in a 96-well plate.

## 2. HTP PCR REACTIONS

### PROTOCOL n° 1: PRIMERS DILUTION & PCR SET UP

The targets of interest are amplified from plasmid DNA or cDNA by PCR reactions performed in 96-well plates using a Thermocycler (DNA engine DYAD from BIORAD).

The first step is dilute the primers stocks from 100  $\mu$ M to 5  $\mu$ M.



The robot should be able to dispense 5  $\mu$ l/well of the two primers, 10  $\mu$ l/well of Template and 30  $\mu$ l/well of the Master Mix to reach a total volume of 50  $\mu$ l/well.

### 3. PCR PURIFICATION

The PCR products have to be treated with the enzyme DpnI, to get rid of the parental DNA and avoid aspecific background. The DpnI enzyme can be added **manually** with a dispensing pipette and the reaction can be performed in the Thermocycler for 2 hrs at 37°C.

### PROTOCOL n° 2: PCR PRODUCTS PURIFICATION

This protocol has been already implemented with the **Zephir robot (Caliper)** in 96 well format, using the kit MultiScreen PCR<sub>μ96</sub> from Millipore.

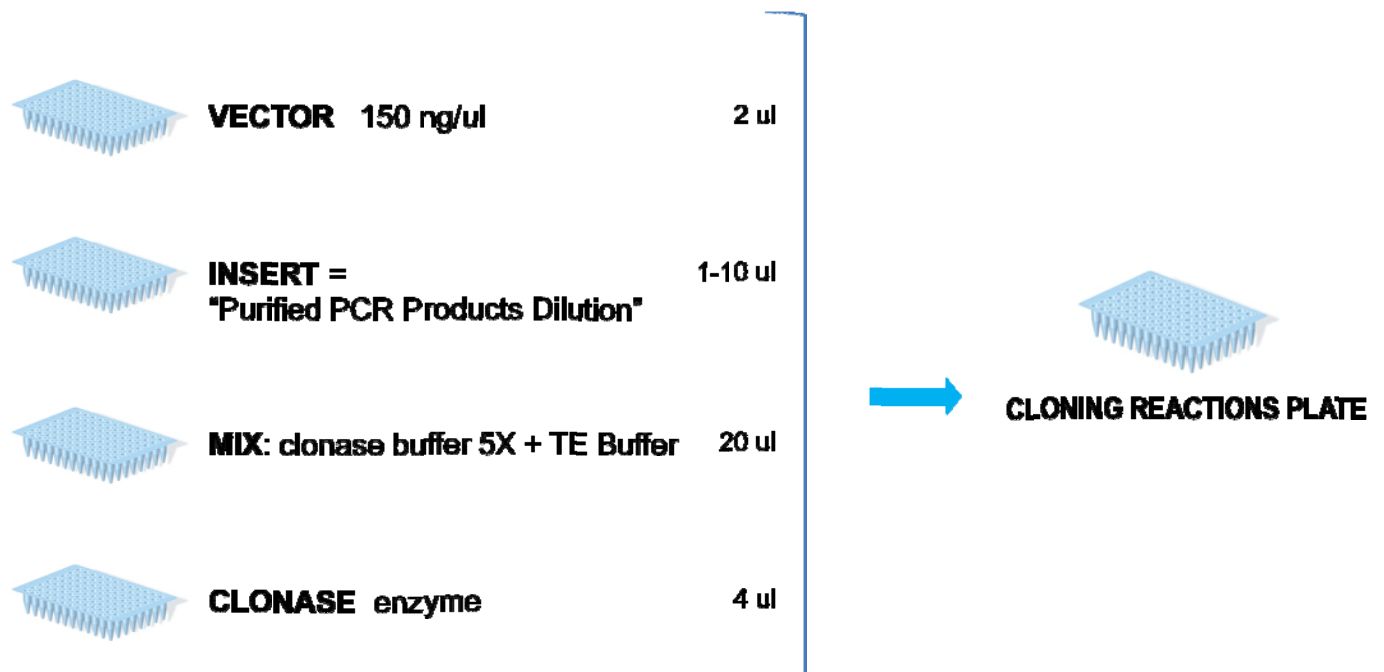
### 4. ANALYSIS OF PCR PRODUCTS

The 96 PCR reactions will be then analyzed in order to assess quality and quantity of the products obtained, using the machine **LabChip GXII** from Caliper. The results will be shown as an excel file. The robot should be able to spot the positive samples and transfer them to a new 96-well plate called "Purified PCR Products Stock".

### 5. CLONING REACTION

### PROTOCOL n° 3: CLONING

The cloning reactions consist in one incubation step between "insert" and "vector" at different temperatures and time according to the chosen cloning strategy.



The VECTOR, the MIX and the CLONASE plates will be prepared **manually**.

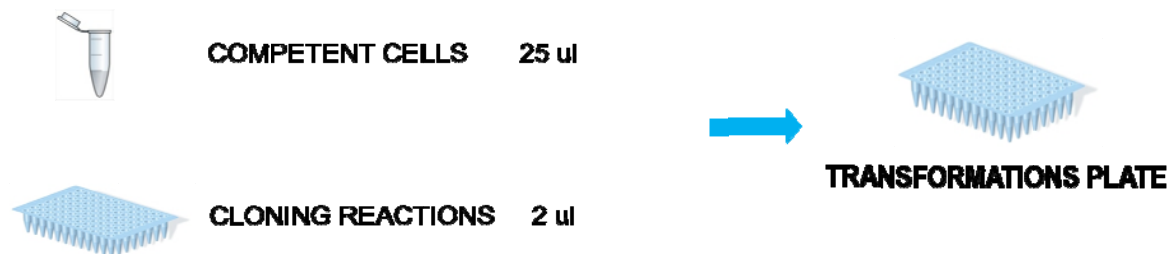
The INSERT plate should be prepared by the robot, diluting the “Purified PCR Products Stock” to the appropriate working concentrations.

In the case we will use the Gateway cloning strategy after incubation at 25°C for 1 hr the samples should be treated with the **PROTEINASE K** 2 ul/well for 10 min at 37°C. The enzyme can be provided in a 96-well plate.

## 6. TRANSFORMATION IN *E. coli*

### PROTOCOL n° 4: TRANSFORMATION & PLATING

The cloning reactions are transformed into super-competent *E. coli* cells using the **heat shock method**. The cells are kept in -80°C freezer in aliquots of 1 ml, once defrozen they must be kept in a cold station at 4°C, the robot should dispense 25 ul in each well.



Incubation 30 min at 4°C in a cold station (Peltier)



Incubation 3' at 37°C in a hot station (Peltier)



+ 100 ul of SOC

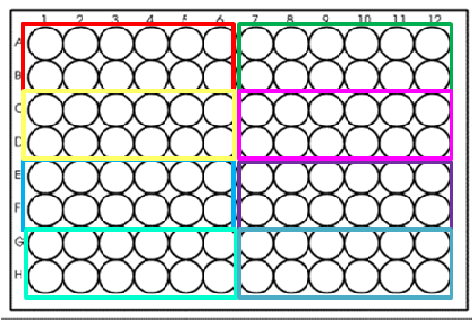


Incubation 45 min at 37°C in a hot station (Peltier)

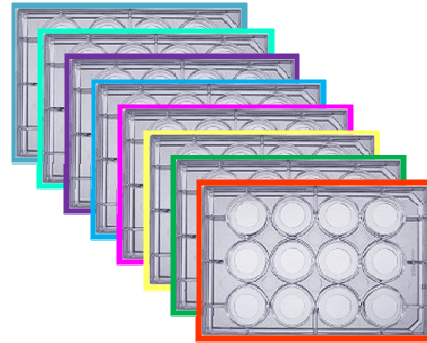




Plate 50 ul of each transformation and shake 900 rpm 30 sec



**TRANSFORMATIONS PLATE**



**8 x 12-well LB Agar plate**

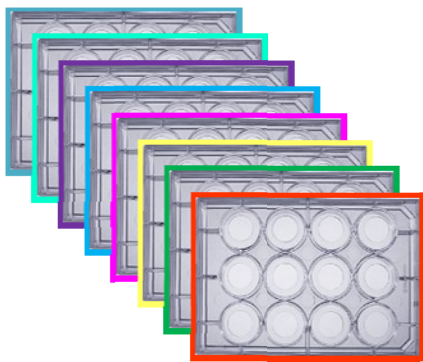


Incubation over night at 37°C  
in INCUBATOR

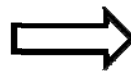
## 7. COLONY PICKING and BACTERIAL CULTURE

This step can be performed **manually**.

Two colonies per reaction are "picked" to prepare small scale bacterial cultures in 96-well plates.



**8 x 12-well LB Agar plate**



**96-well plate (1 ml LB/well)**



**COLONY A & COLONY B**

The plates are incubated over night at 37°C in a special shaker which can reach 900 rpm.



## 8. DNA EXTRACTION by HTP MINI-PREP

### PROTOCOL n° 5: MINI-PREPS

This protocol has been already implemented with the **Zephir robot (Caliper)** in 96 well format, using the Montage kit from Millipore.

## 9. CONSTRUCT VERIFICATION BY PCR

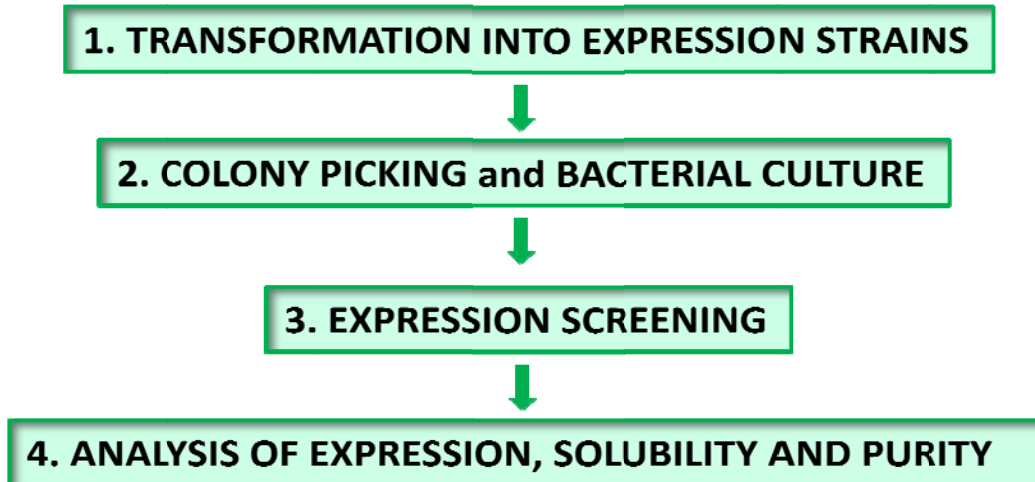
Same procedure as in **PROTOCOL n° 1: PRIMERS DILUTION & PCR SET UP**, but in this case we will use universal primers according to the vector used for the cloning and the template will be the DNA extracted with the mini-prep protocol.

The PCR reactions will be then analyzed in order to assess quality of the products obtained, using the machine **LabChip GXII** from Caliper. The results will be shown as an excel file. The robot should be able to spot the positive samples and transfer them to a new 96-well plate called.

## 10. SEQUENCING

The positive clones are send to sequencing to verify the nucleic sequence of the insert.

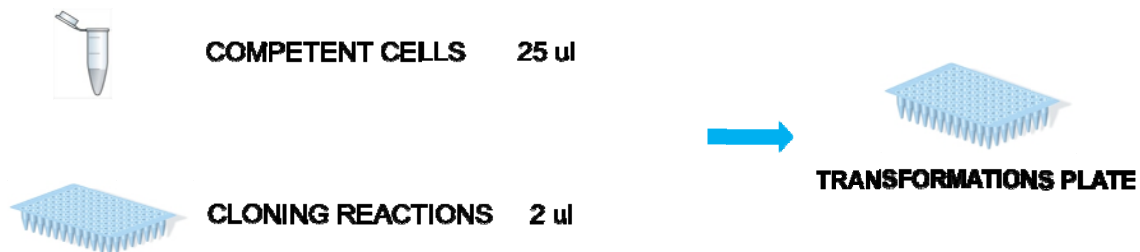
# HTP EXPRESSION SCREENINGS



## 1. TRANSFORMATION INTO EXPRESSION STRAINS

### PROTOCOL n° 4: TRANSFORMATION & PLATING

The cloning reactions are transformed into super-competent *E. coli* cells using the **heat shock method**. The cells are kept in -80°C freezer in aliquots of 1 ml, once defrozen they must be kept in a cold station at 4°C, the robot should dispense 25 ul in each well.



**Incubation 30 min at 4°C in a cold station (Peltier)**



**Incubation 3' at 37°C in a hot station (Peltier)**



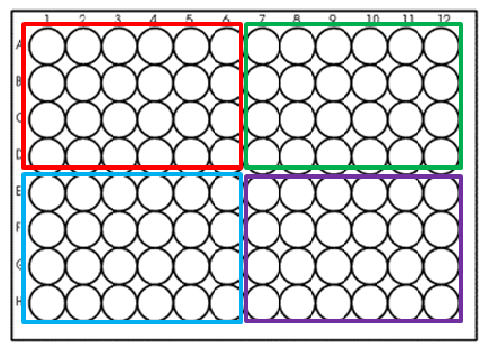
**+ 100 ul of SOC**



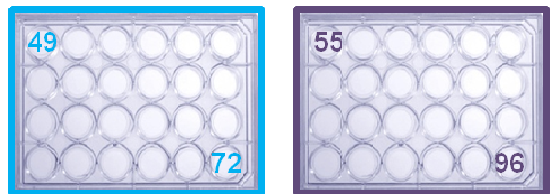
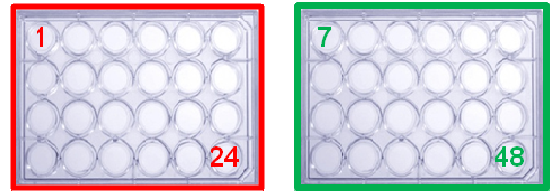
**Incubation 45 min at 37°C in a hot station (Peltier)**



**Plate 50 ul of each transformation and shake 900 rpm 30 sec**



**TRANSFORMATIONS PLATE**



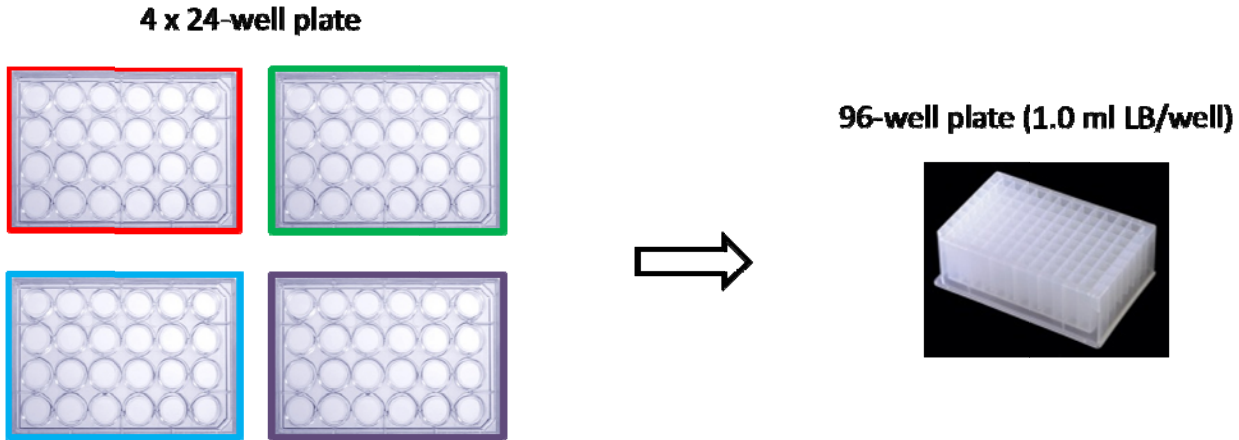
**4 x 24-well LB Agar plate**



**Incubation over night at 37°C  
in INCUBATOR**

## 2. COLONY PICKING and BACTERIAL CULTURE

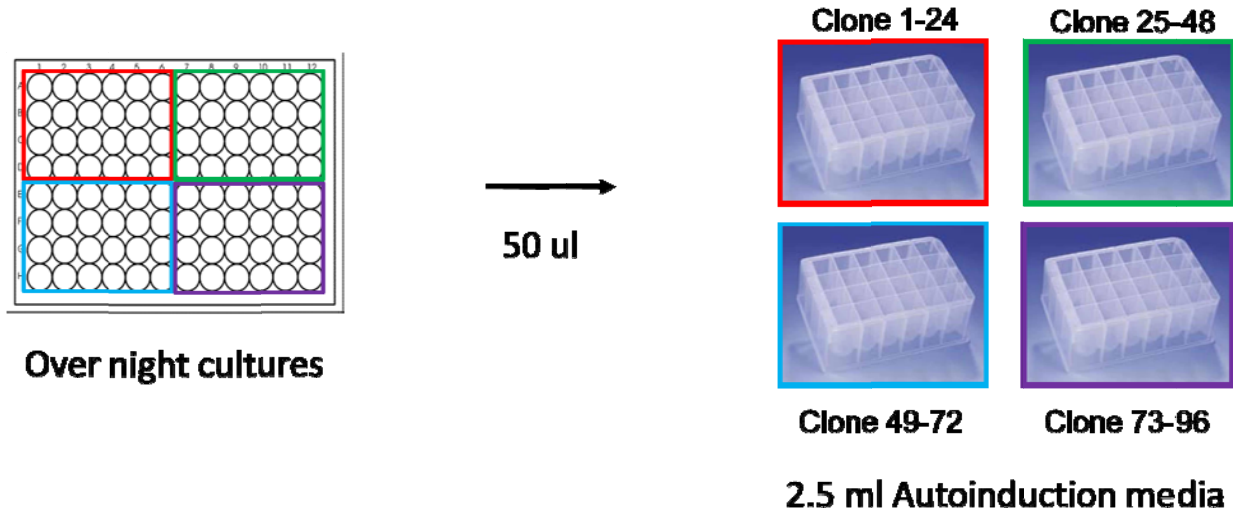
This step can be performed **manually**.  
One colony is "picked" to prepare small scale bacterial cultures in 96-well plate.



The plates are incubated over night at 37°C shaking at 900 rpm in **INCUBATOR**.

## 3. EXPRESSION SCREENING

The over night cultures are used to inoculate fresh cultures for the expression screening in 24-well format. This step can be done **manually** with a special multichannel pipette.



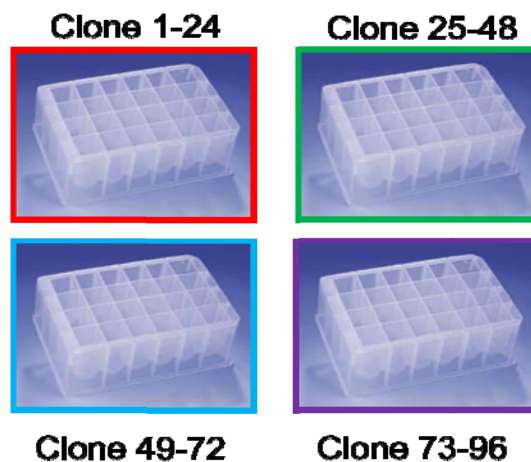
## 4. ANALYSIS OF EXPRESSION AND SOLUBILITY

### PROTOCOL n° 6: EXPRESSION ANALYSIS

The bacterial cultures are then treated to check if the proteins of interest have been expressed correctly. In this protocol we will need to automate the following steps:

- A. Thaw bacterial cells, resuspend in lysis buffer to disrupt the cells by treatment with Lysozyme
- B. Purify protein by in-batch affinity chromatography with Nickel-NTA resin, we will use a filtration plate so we will need a **vacuum station**.
- C. Check the presence and the solubility of the proteins by SDS-PAGE analysis

A.



+ 800 ul/well lysis buffer with Lysozyme

1 hr @ 4°C shaking

Transfer into a 96-well plate



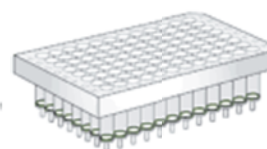
**B.** + 50 ul /well Nickel-NTA resin (50% slurry)



Incubation 10' @ RT shaking



Transfer into a 96-well filtration plate



+ 800 ul/well washing buffer



+ 190 ul/well elution buffer  
in a collection plate

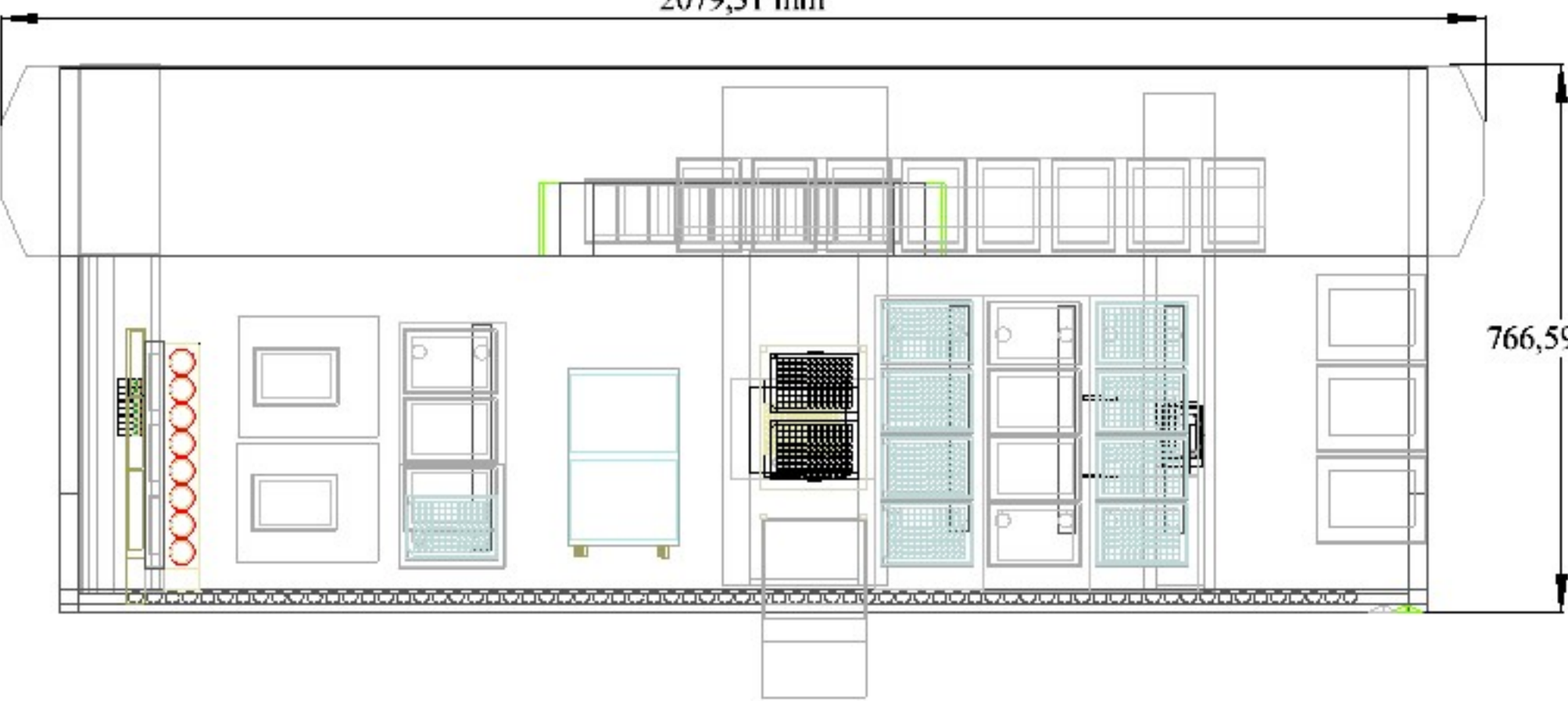


**C.** Protein analysis and quantification  
by LabChip GXII

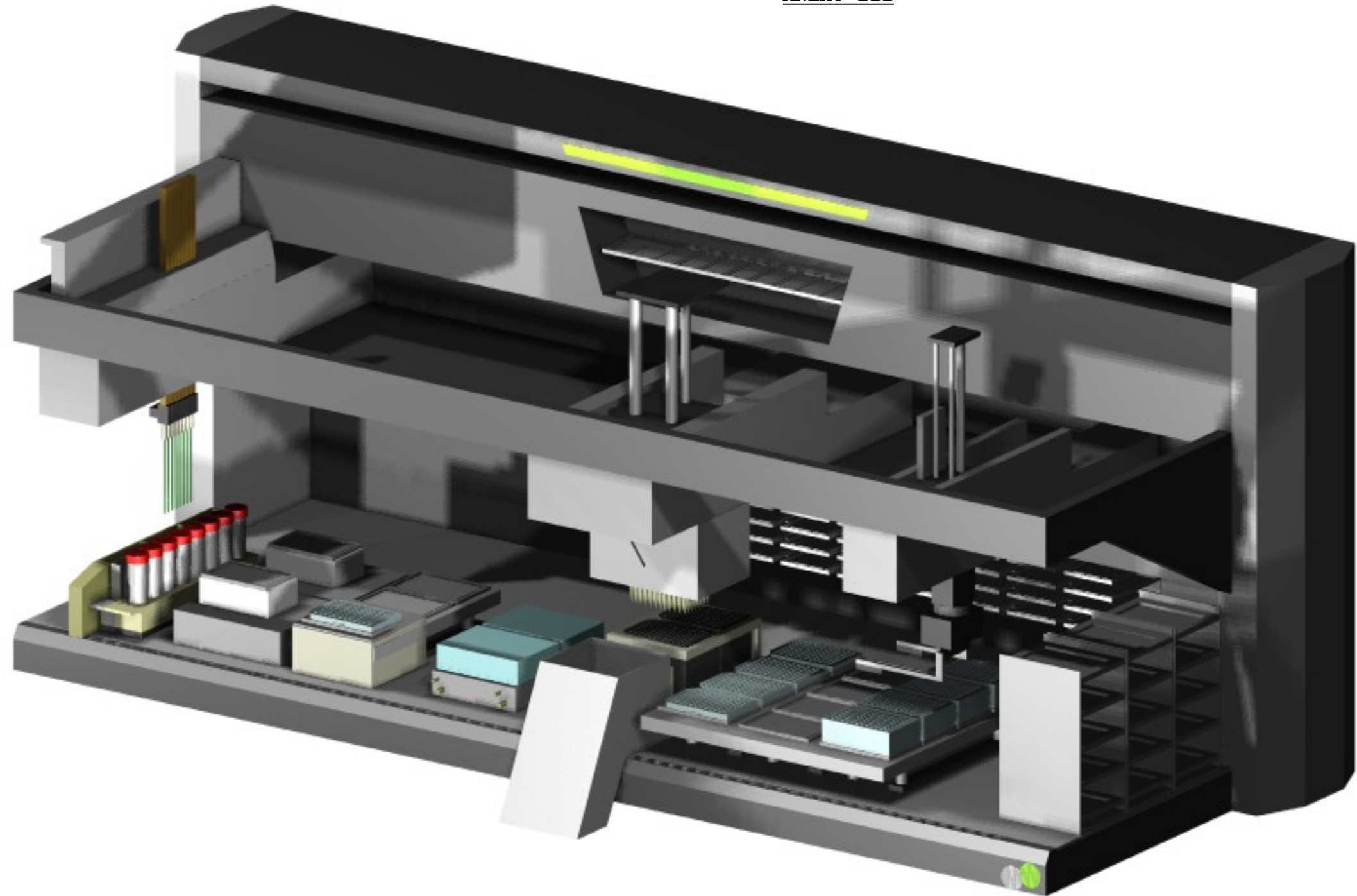
ANEXO II

2079,31 mm

766,59 mm



ANEXO III





ANEXO IV

