

Inicio

Protocolos Opentrons Covid-19

**Versión 1.3**

12 de junio de 2020

Control de Versiones.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Versión** | **Fecha** | **Autor** | **Descripción** |
| 1.0 | 08/06/2020 | CovidRobots | Versión inicial |
| 1.1 | 10/06/2020 | CovidRobots | Correcciones Titulación  Columnas de volumen de llenado |
| 1.2 | 11/06/2020 | CovidRobots | Nextera DNA Flex NGS Library Prep: Cleanup Libraries |
| 1.3 | 12/06/2020 | CovidRobots | Mejoras y correcciones |

Índice.

[1 Dispensación de buffer de lisis. 4](#_Toc42785815)

[1.1 Para extracción por kPCR. 4](#_Toc42785816)

[1.2 Para extracción por Abbott. 5](#_Toc42785817)

[1.3 Para extracción por EasyMag. 6](#_Toc42785818)

[2 KingFisher Nuevo. 7](#_Toc42785819)

[2.1 KingFisher Nuevo – Lisis 7](#_Toc42785820)

[2.2 KingFischer Nuevo – Wash y Elución 8](#_Toc42785821)

[3 KingFisher Antiguo. 9](#_Toc42785822)

[3.1 KingFisher Antiguo – Lisis. 9](#_Toc42785823)

[3.2 KingFisher Antiguo – Beads. 10](#_Toc42785824)

[3.3 KingFicher Antiguo – Wash y Elución. 11](#_Toc42785825)

[4 Preparación placas de master mix. 12](#_Toc42785826)

[4.1 Preparación placas de master mix. 12](#_Toc42785827)

[5 Dispensación de eluidos a la placa de PCR. 13](#_Toc42785828)

[5.1 Dispensación de eluidos a la placa de PCR. 13](#_Toc42785829)

[6 Titulación serología. 14](#_Toc42785830)

[6.1 Titulación serología 1/2. 14](#_Toc42785831)

[6.2 Titulación serología 1/5. 15](#_Toc42785832)

[7 Nextera DNA Flex NGS Library Prep: Cleanup Libraries 16](#_Toc42785833)

[7.1 Nextera DNA Flex NGS Library Prep: Cleanup Libraries 16](#_Toc42785834)

[8 Anexo. 18](#_Toc42785835)

# Dispensación de buffer de lisis.

## Para extracción por kPCR.

Dispensación de buffer de Lisis.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Buffer de lisis | 1 x Falcon 50ml | 28,8 ml | 40 ml | 8 |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Tubos 1,3 cm diametro | 4 racks aluminio de 24 tubos | 4, 5, 7, 11 |

#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p1000s, dispensar 300 µL de buffer de lisis a tubos de plástico cónicos de dimensiones 7,5 cm de alto x 1,3 cm de diámetro. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

## Para extracción por Abbott.

Dispensación de buffer de Lisis.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

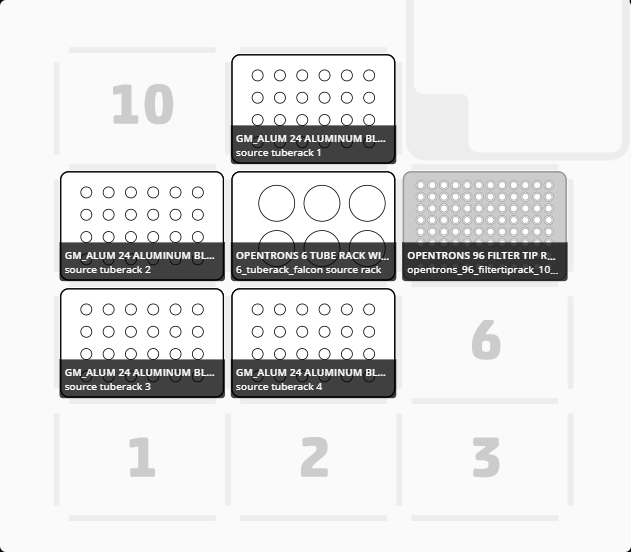
#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Buffer de lisis | 1 x Falcon 50ml | 48 ml | > 50 ml | 8 |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Tubos 1,3cm diametro | 4 racks aluminio de 24 tubos | 4, 5, 7,11 |

#### Configuración desk.



#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p1000s, dispensar 500 µL de buffer de lisis a tubos de plástico cónicos de dimensiones 7,5 cm de alto x 1,3 cm de diámetro. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

## Para extracción por EasyMag.

Dispensación de buffer de Lisis.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

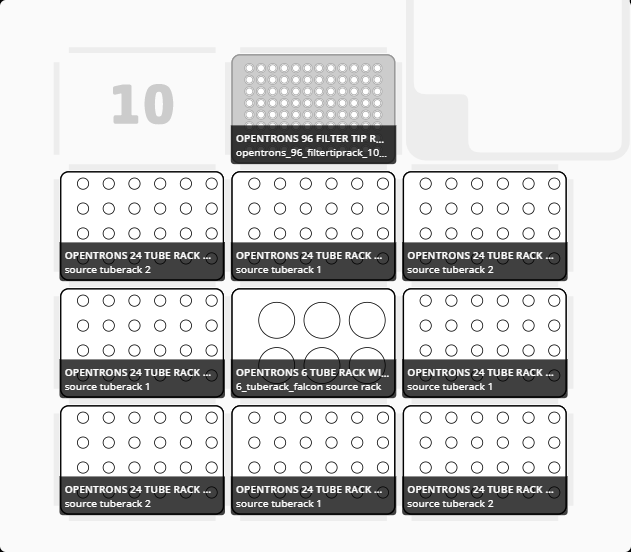
#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Buffer de lisis | 4 x Falcon 50ml | 4 x 38,4 ml | 4 x 45 ml |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Tubos 1,0 cm diametro | 8 racks de 24 tubos Starsted |  |

#### Configuración desk.



#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p1000s, dispensar 800 µL de buffer de lisis a tubos Sarstedt (dimensiones: 4,5 cm de alto x 1 cm de diámetro). Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

# KingFisher Nuevo.

Estos protocolos se ocupan de la dispensación de placas para extractor KingFisher según el protocolo nuevo.

## KingFisher Nuevo – Lisis

Dispensación de Proteinasa-K y buffer de Lisis.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Proteinasa K | Tubo 2ml | 960 µL |  |  |
| Mezcla de lisis | 2 x Falcon 50ml | 52,8 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa destino | 1 x Kingfisher Deep-well 96 plate |  |

#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p20s, dispensar 10 µL de proteinasa K en cada uno de los 96 pocillos de la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate” (Ref: 95040450. Thermofisher. Dimensiones de la placa: 12,8x8,5x4,3 cm). Necesarias puntas de 20 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

Con la pipeta p1000s, dispensar 550 µL de la mezcla de lisis hasta la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Pipetear lentamente porque la mezcla es viscosa. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

## KingFischer Nuevo – Wash y Elución

Este protocolo se ocupa de la dispensación de placas para extractor KingFisher según el protocolo nuevo.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-2 WASH | p1000 Single Channel  p300 Multi Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Lavado 1 | 4 x Reservorio 12 canales | 48,0 ml |  |  |
| Lavado 2 – Etanol 80% | 7 x Reservorio 12 canales | 96,0 ml |  |  |
| Buffer elución | 1 x Reservorio 12 canales | 4,8 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa Wash-1 | 1 x Kingfisher Deep-well 96 plate |  |
| Placa Wash-2 | 1 x Placa wash 96 |  |
| Placa Elución | 1 x Placa elución 96 |  |

#### Pasos a seguir.

##### Preparación placa Wash1:

Con la pipeta p300m, punta nueva, dispensar 500 µL (200 µL x 2 + 100 µL) de Solución de Lavado 1 a la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

##### Preparación placa Wash2:

Con la pipeta p300m, punta nueva, dispensar 1000 µL (200 µL x 5) de etanol al 80% a la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

##### Preparación placa de elución:

Con la pipeta p300m, puntas nuevas, dispensar 50 µL de buffer de elución a placa de elución “Kingfisher 96 plate 200 µL” (Ref: 97002540. Dimensiones: 12,4x8,2x1,5 cm). Necesarias puntas de 200 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

# KingFisher Antiguo.

Estos protocolos se ocupan de la dispensación de placas para extractor KingFisher según el protocolo antiguo.

## KingFisher Antiguo – Lisis.

Dispensación de buffer de Lisis.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Mezcla de lisis | 2 x Falcon 50ml | 67,2 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa destino | 1 x Kingfisher Deep-well 96 plate |  |

#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p1000s, dispensar 700 µL de la mezcla de lisis hasta la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Pipetear lentamente porque la mezcla es viscosa. Necesarias puntas de 1000 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

## KingFisher Antiguo – Beads.

Dispensación de magnetic beads.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-1 LISIS | p1000 Single Channel  p20 Single Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Mezcla de “beads” | 2 x Tubos 2 ml | 1.920 µL |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa destino | 1 x Kingfisher Deep-well 96 plate |  |

#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p20s, dispensar 20 µL de la mezcla de “beads” desde a la placa de lisis. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

## KingFicher Antiguo – Wash y Elución.

Este protocolo se ocupa de la dispensación de placas para extractor KingFisher según el protocolo antiguo.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| EXTRACCION-2 WASH | p1000 Single Channel  p300 Multi Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Lavado 1 | 4 x Reservorio 12 canales | 57,6 ml |  |  |
| Lavado 2 – Etanol 80% | 6 x Reservorio 12 canales | 76,8 ml |  |  |
| Buffer elución | 1 x Reservorio 12 canales | 8,7 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa Wash-1 | 2 x Kingfisher Deep-well 96 plate |  |
| Placa Wash-2 | 2 x Placa wash 96 |  |
| Placa Elución | 1 x Placa elución 96 |  |

#### Pasos a seguir.

##### Preparación placa Wash1:

Con la pipeta p300m, punta nueva, dispensar 300 µL (150 µL x 2) de Solución de Lavado 1 a la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Necesarias puntas de 200 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

##### Preparación placa Wash2:

Con la pipeta p300m, punta nueva, dispensar 400 µL (200 µL x 2) de Solución de Lavado 2 a la placa “Kingfisher Deep-well 96 plate”. Necesarias puntas de 300 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

##### Preparación placa de elución:

Con la pipeta p300m, puntas nuevas, dispensar 90 µL de buffer de elución a placa de elución “Kingfisher 96 plate 200 µL”. Necesarias puntas de 200 µL para el pipeteo. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

# Preparación placas de master mix.

## Preparación placas de master mix.

Preparación placas de master mix.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| PCR-1 | p20 Single Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Master mix | 2 x Tubos 20 ml | 1.920 µL |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placas de PCR | TBD |  |

#### Pasos a seguir.

Con la pipeta p20s, dispensar 20 µL de master mix desde a cada pocillo de las

* placas de PCR Applied biosystems fast 96-well reaction plate (0,1 mL) (Ref: 4346907. Dimensiones: 12,4x8,2x1,7 cm) o a
* placas de 0,2 mL Agilent technologies mx 3000p 96-well PCR detection plates (Ref: 06653412. Dimensiones: 12,4x8,2x2,3 cm)

Es necesario 1 tubo Sarstedt para cada media placa, 2 tubos para pipetear una placa completa. La placa debe permanecer en termobloque en frio mientras se dispensa la mezcla. Necesarias puntas de 20-200 µL. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

# Dispensación de eluidos a la placa de PCR.

## Dispensación de eluidos a la placa de PCR.

Dispensación de eluidos a la placa de PCR.

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| PCR-2 | p20 Multi Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
|  |  |  |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
|  |  |  |

#### Pasos a seguir.

Dispensar 5 µL de eluido desde:

* placa de elución multipocillo “Kingfisher 96 plate 200 µL” (Ref: 97002540. Dimensiones: 12,4x8,2x1,5 cm) o desde
* placa de elución de Versant kPCR (Agilent technologies mx 3000p 96-well PCR detection plates. Ref: 06653412. Dimensiones: 12,4x8,2x2,3 cm)

Hasta:

* placa de PCR Applied biosystems fast 96-well reaction plate (0,1 mL) (Ref: 4346907. Dimensiones: 12,4x8,2x1,7 cm) o a
* placa de PCR de 0,2 mL Agilent technologies mx 3000p 96-well PCR detection plates (Ref: 06653412. Dimensiones: 12,4x8,2x2,3 cm) según necesidad, respetando las posiciones de los pocillos.

Necesarias puntas de 20 µL. Las placas de PCR deben permanecer en frío durante el proceso.

**NOTA:** Se podrá hacer con la mitad de los tubos, es decir, 48.

# Titulación serología.

## Titulación serología 1/2.

Titulación serología 1/2

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| TBD | P300 Multi Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Muestras | Placa 96 pocillos | 60 µL |  |  |
| Diluyente | 4 x Reservorio 12 canales | 4,8 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Titulacion | Placa 96 pocillos |  |

#### Pasos a seguir.

Dispensar 50 µL de diluyente en cada pocillo de la placa de destino. Se podrán retirar puntas del tiprack para llenar solo determinadas filas, en caso de haber menos de 8 muestras (una columna completa). Necesarias puntas de 20-200 µL. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

Dispensar 50 µL de las muestras en la primera columna de la placa de destino. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso. Dilución 1/2.

Mezclar bien la primera columna, aspirando 50 µL desde casi el fondo del pocillo y dispensándolo desde algo debajo de la boca del mismo, cinco veces.

Dispensar 50 µL de la primera columna en la segunda, y mezclar. Repetir para el resto de las columnas.

## Titulación serología 1/5.

Titulación serología 1/2

|  |  |
| --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** |
| TBD | P300 Multi Channel |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Muestras | Placa 96 pocillos | 80 µL |  |  |
| Diluyente | 4 x Reservorio 12 canales | 5,04 ml |  |  |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Titulacion | Placa 96 pocillos |  |

#### Pasos a seguir.

Dispensar 80 µL de diluyente en la primea columna de la placa de destino. Dispensar 50 µL de diluyente en el resto de los pocillos de la placa de destino. Se podrán retirar puntas del tiprack para llenar solo determinadas filas, en caso de haber menos de 8 muestras (una columna completa). Necesarias puntas de 20-200 µL. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso.

Dispensar 20 µL de las muestras en la primera columna de la placa de destino. No se tienen que cambiar las puntas durante este paso. Dilución 1/5.

Mezclar bien la primera columna, aspirando 50 µL desde casi el fondo del pocillo y dispensándolo desde algo debajo de la boca de este, cinco veces.

Dispensar 50 µL de la primera columna en la segunda, y mezclar aspirando 50 µL desde casi el fondo del pocillo y dispensándolo desde algo debajo de la boca del mismo, cinco veces. Repetir para el resto de las columnas.

# Nextera DNA Flex NGS Library Prep: Cleanup Libraries

## 

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Robot** | **Pipetas** | **Módulos** |
| WALL-E | P300 Multi Channel  P20 Single Channel | Módulo magnético GEN2 |

#### Origen.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Origen** | **Labware** | **Volumen Total** | **Volumen llenado** | **Slots** |
| Placa PCR 96 (**TAGP**) | NEST 96 Well Plate 200 µL | > 45 µL |  | 1 |
| ‘Piscina’ de 12 canales | NEST 12 Reservoir 15 ml  - Canal 1: SPB  - Canal 2: RSB  - Canales 3, 4, 5, 6: Etanol 80%  ***Basura:***  - Canales 8, 9, 10, 11, 12 | 7.776 µL  3.072 µL  4 x 9,6 ml | TBD  TBD  4 x 10 ml | 3 |

#### Destino.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Destino** | **Labware** | **Slots** |
| Placa MIDI 96 | Abgene 96 Well Plate 800 µL | 1 |
| Placa PCR 96 (**FPCR**) | NEST 96 Well Plate 200 µL | 1 |

#### Pasos a seguir.



1. Activar el módulo magnético. Esperar 5 min.
2. Transferir 45 µL de sobrenadante de cada pocillo de la placa **TAGP** a la placa MIDI 96, en ranura 2. Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo. Desechar las puntas tras este paso.
3. Mezclar SPB, en el canal 1 del reservorio de 12 canales, 10 veces. Necesarias nuevas puntas de 200 µL.
4. Transferir 81 µL de SPB, desde el canal 1 del reservorio a la placa MIDI 96, en slot 2, para todas las columnas de la placa MIDI, y mezclar 10 veces con 70 µL. Desechar las puntas tras este paso.
5. Desactivar el módulo magnético.
6. Incubar a temperatura ambiente. Tiempo = 5 min.

***PAUSA***

1. Descartar placa **TAGP** original, mover placa MIDI al módulo magnético, poner nueva placa PCR en ranura 2.

***REANUDAR***



1. Activar el módulo magnético. Esperar 5 min. Mantener activado.
2. Desechar 120 µL de sobrenadante de la placa MIDI al canal 12 del reservorio de 12 canales (total 11,5 ml). Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo. Desechar las puntas tras este paso.
3. Transferir 200 µL de Etanol de los canales 5 y 6 del reservorio de reactivos, a cada pocillo de la placa MIDI (total 2 x 9,6 ml). Esperar 30 segundos. Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo.
4. Desechar 200 µL de cada pocillo de la placa MIDI a los canales 10 y 11 del reservorio. No es necesario desechar las puntas.
5. Transferir 200 µL de Etanol de los canales 3 y 4 del reservorio de reactivos, a cada pocillo de la placa MIDI. Esperar 30 segundos. Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo. Desechar las puntas tras este paso.
6. Desechar **206** µL de cada pocillo de la placa MIDI a los canales 9 y 10 del reservorio. Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo. Desechar las puntas tras este paso.
7. Esperar 5 minutos.
8. Desactivar módulo magnético.
9. Añadir 32 µL de RSB a cada pocillo de la placa MIDI, desde el canal 2 del reservorio de reactivos. Mezclar 10 veces. Necesarias nuevas puntas de 200 µL para el pipeteo. Desechar las puntas tras este paso.
10. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente
11. Activar el módulo magnético. Mantener activado.
12. Esperar 2 minutos.
13. Dispensar 30 µL de elución, desde cada pocillo la placa MIDI a nueva placa PCR (**FPCR**) situada en la ranura 2.

**Nº total de puntas usadas**: 768 = 8 cajas x 96

# Anexo.

Los robots intentan conectarse a una red WiFi llamada “opentrons” con clave “GM2020covid”.