

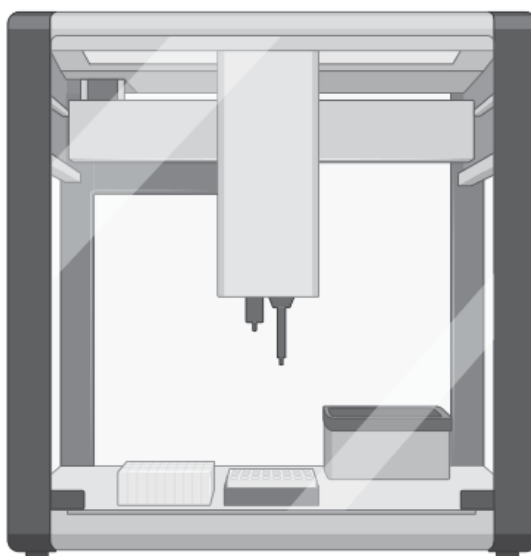
Máster en Biotecnología Avanzada

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Automatización y puesta a punto de protocolos de un laboratorio con el Opentrons OT-2

Automatización e posta a punto de protocolos dun laboratorio co Opentrons OT-2

Automation and fine-tuning of laboratory protocols with Opentrons OT-2



Carlos Vázquez Labrada

Febrero, 2021

Director empresa: Antón Vizcaíno Hermida

Director académico: Manuel Becerra Fernández

**Automatización y puesta a punto de protocolos de un
laboratorio con el Opentrons OT-2**

**Automatización e posta a punto de protocolos dun laboratorio
co Opentrons OT-2**

**Automation and fine-tuning of laboratory protocols with
Opentrons OT-2**

Carlos Vázquez Labrada

Febrero, 2021

Firmado por 32722363X Carlos Vázquez Labrada el día 10/01/2022 con un certificado emitido FNMT usuarios

D. Antón Vizcaíno Hemida y D. Manuel Becerra Fernández, en calidad de tutores del alumno D. Carlos Vázquez Labrada, autorizan la presentación y defensa de este trabajo fin de máster ante el Tribunal Evaluador.

Signed by VIZCAINO
HERMIDA ANTON -
47363590N on 10/02/2022
with a digital
certificate produced by
AC FNMT Usuarios

**BECERRA
FERNANDEZ
Z MANUEL
- DNI
32820909R**

Firmado digitalmente por BECERRA
FERNANDEZ MANUEL - DNI
32820909R
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A
CORUÑA, ou=CERTIFICADO
ELECTRONICO DE EMPLEADO
PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=19292,
serialNumber=IDCES-32820909R,
sn=BECERRA FERNANDEZ,
givenName=MANUEL, cn=BECERRA
FERNANDEZ MANUEL - DNI
32820909R
Fecha: 2022.02.09 19:24:20 +01'00'

Agradecimientos

Quería agradecer a mi tutor de empresa, Antón Vizcaíno, por la oportunidad ofrecida y por toda la ayuda con este trabajo. También a Jaime Imaz, por su ayuda con la elaboración de los protocolos, a Graciela Estévez, por su ayuda con el análisis estadístico, y a todo el laboratorio, Abraham Parceró, Andrea Freijeiro, Antía Fuentes, Belén Carro y Olga Sánchez, por su predisposición y ayuda a lo largo de mi estancia en la empresa. Asimismo, quería agradecer a mi tutor académico, Manuel Becerra, por ayudarme a encontrar esta oportunidad.

ÍNDICE	
RESUMEN:	1
PALABRAS CLAVE:	1
RESUMO:	2
PALABRAS CHAVE:	2
SUMMARY:	3
KEY WORDS:	3
INTRODUCCIÓN:	4
OBJETIVOS:	9
MATERIAL Y MÉTODOS:	9
1.- Diseño de material específico	9
2.- Elaboración de protocolos	11
A. Preparación PCR:	14
B. Purificación:	17
C. Cuantificación:	18
D. qPCR:	19
E. Multiplex:	20
F. Dispensación fluorocromos:	21
G. Pool:	22
3.- Medición de la duración de los protocolos	22
4.- Determinación de las diferencias entre el pipeteo manual y el OT-2	22
RESULTADOS:	23
1.- Diseño de material específico	23
2.- Elaboración de protocolos	23
3.- Medición de la duración de los protocolos	23
4.- Determinación de las diferencias entre el pipeteo manual y el OT-2	25
DISCUSIÓN:	27
CONCLUSIÓN:	30
BIBLIOGRAFÍA:	30

RESUMEN:

La secuenciación de alto rendimiento se ha convertido en una herramienta clave en proyectos de investigación que requieran trabajar con ácidos nucleicos gracias a la reducción de costes y tiempo, así como por sus múltiples aplicaciones. En un laboratorio de genética se puede llegar a trabajar con cientos o miles de muestras y, dado que la preparación de genotecas para la secuenciación de alto rendimiento tiene muchos protocolos repetitivos, es necesario optimizar procesos mediante la automatización. Por ello, un robot de manipulación de líquidos puede ser una gran ayuda. En el presente estudio se han desarrollado, puesto a punto y optimizado protocolos específicos utilizando el robot de pipeteo Opentrons OT-2, que destaca por su flexibilidad y por ser de código abierto. Se diseñaron protocolos para preparaciones de PCR, purificaciones de ácidos nucleicos y cuantificaciones de ADN, entre otros. Los resultados indican que este robot tiene un rendimiento inferior al pipeteo manual, aunque de funcionar de manera autónoma podría ahorrar mucho trabajo en protocolos sencillos. Sin embargo, para protocolos complejos, como la purificación, se necesita una gran precisión de posicionamiento, por lo que sería necesario utilizar plásticos de laboratorio (puntas de pipeta, placas de PCR...) elaborados con gran precisión y sin imperfecciones. En cuanto a la reproducibilidad, nuestros resultados indican que puede ser mejor que el pipeteo manual.

PALABRAS CLAVE:

Automatización de laboratorio, robots de manipulación de líquidos, HTS, genómica, preparación de genotecas.

RESUMO:

A secuenciación de alto rendimento convertiuse nunha ferramenta chave en proxectos de investigación que requiran traballar con ácidos nucleicos grazas á redución de costes e tempo, así como polas súas múltiples aplicacións. Nun laboratorio de xenética pódese chegar a traballar con centos ou miles de mostras e, dado que a preparación de xenotecas para a secuenciación de alto rendimento ten moitos protocolos repetitivos, é necesario optimizar procesos mediante á automatización. Por isto, un robot de manipulación de líquidos pode ser unha gran axuda. No presente estudio desenroláronse, puxéronse a punto e optimizáronse protocolos específicos utilizando un robot de pipeteo Opentrons OT-2, que destaca pola súa flexibilidade e por ser de código aberto. Diseñáronse protocolos para as preparación de PCR, purificacións de ácidos nucleicos e cuantificacións de ADN, entre outros. Os resultados indican que este robot ten un rendimento inferior ao pipeteo manual, aínda que de funcionar de maneira autónoma podería aforrar moito traballo en protocolos sinxelos. Sen embargo, para protocolos complexos, como a purificación, necesítase unha gran precisión de posicionamento, polo que sería necesario utilizar plásticos de laboratorio (puntas de pipeta, placas de PCR ...) elaborados con gran precisión e sen imperfeccións. En canto á reproducibilidade, os nosos resultados indican que pode ser mellor co pipeteo manual.

PALABRAS CHAVE:

Automatización de laboratorio, robots de manipulación de líquidos, HTS, xenómica, preparación de xenotecas.

SUMMARY:

High-throughput sequencing has become a key tool in research projects that require working with nucleic acids due to its cost and time reduction, as well as its multiple applications. In a genetics laboratory, hundreds or thousands of samples can be worked with and, since the preparation of gen libraries for high-throughput sequencing has many repetitive protocols, it is necessary to optimize processes through automation. Therefore, a liquid handling robot can be a great help. In the present study, specific protocols were developed, tuned and optimized using the Opentrons OT-2 pipetting robot, which is notable for its flexibility and open source. Protocols were designed for PCR preparations, nucleic acid purifications and DNA quantifications, among others. The results indicate that this robot has a lower performance than manual pipetting, although if operated autonomously it could save a lot of work in simple protocols. However, for complex protocols, such as purification, high positioning precision is required, so it would be necessary to use laboratory plastics (pipette tips, PCR plates...) made with high precision and without imperfections. Regarding reproducibility, our results indicate that it can be better than manual pipetting.

KEY WORDS:

Laboratory automation, liquid handling robots, HTS, genomics, library preparation.

INTRODUCCIÓN:

La secuenciación de alto rendimiento (High-Throughput Sequencing o HTS) o secuenciación masiva es un conjunto de técnicas que nos permiten leer paralelamente y de forma masiva millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación. En comparación con Sanger, la metodología original de secuenciación, estas técnicas son mucho más rápidas y baratas (Park & Kim, 2016). Gracias a esto, las también conocidas como técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing o NGS), abrieron un nuevo abanico de posibilidades en la investigación biológica y nos permiten estudiar sistemas biológicos a un nivel sin precedentes (van Dijk *et al.*, 2014). Así, hoy en día son una tecnología clave y se está convirtiendo en una herramienta rutinaria en cualquier proyecto de investigación (Goodwin *et al.*, 2016). Aunque siguen apareciendo diferentes plataformas prometedoras como la secuenciación por nanoporos (Oxford NANopore Technologies), que se basa en el tránsito de una molécula de ADN a través de un poro mientras se lee la secuencia a través de las variaciones de una corriente eléctrica, actualmente es Illumina con una serie de plataformas (iSeq, MiSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq y NovaSeq) la predominante del sector gracias a que ofrece el mejor rendimiento y el menor coste por base (van Dijk *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019). Esta emplea una estrategia de amplificación en puente, mediante la cual las moléculas individuales de ADN se adhieren primero a una celda de flujo y luego se amplifican localmente en un grupo clonal (Gu *et al.*, 2019). A esto le sigue una secuenciación por síntesis en la que se van añadiendo nucleótidos terminadores reversibles marcados de forma diferente con fluoróforos que luego se escinden para permitir la incorporación de la siguiente base (van Dijk *et al.*, 2014).

Una de las grandes aplicaciones es la secuenciación de genomas completos (Whole Genomic Sequencing o WGS) con una rapidez excepcional, lo que nos permite utilizarla para múltiples fines como el diagnóstico clínico, sobre todo en genética humana, (Bick *et al.*, 2017) o en el campo de la microbiología para secuenciar genomas completos tanto de bacterias como de virus o patógenos fúngicos (Hasman *et al.*, 2014). En este sentido, la HTS ofrece numerosas ventajas en el campo de la metagenómica al realizar un muestreo imparcial, lo que permite una amplia identificación de patógenos tanto conocidos como inesperados o incluso el descubrimiento de nuevos organismos (Gu *et al.*, 2019). Muchas veces no es necesario secuenciar todo el genoma y se realiza la secuenciación del exoma, las regiones codificantes del genoma; o amplicones, en los que se amplifican regiones determinadas del genoma mediante PCR. Esto permite que se puedan secuenciar más

muestras individuales dentro de una carrera de secuenciación, con lo que aumentamos tanto la profundidad como la amplitud de un estudio genómico (Goodwin *et al.*, 2106). Estas técnicas son muy útiles para estudios de DNA metabarcoding para detectar variantes de enfermedades o para la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano en una única muestra con varias especies, un método muy utilizado para estudiar la filogenia y la taxonomía, lo que nos permite evaluar la diversidad bacteriana en diversos entornos (Kennedy *et al.*, 2014) y también la identificación de especies en productos de alimentación, como en productos cárnicos y avícolas en los que se suele cometer fraude alimentario mediante la sustitución de especies (Xing *et al.*, 2019). También se utiliza en el estudio de las variantes genéticas de regiones multicopia heterogéneas como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que afectan significativamente al riesgo de padecer diversas enfermedades, especialmente las autoinmunes (Naito & Okada, 2021). Otra aplicación muy interesante es el análisis del transcriptoma (RNA-Seq) con el objetivo de determinar y cuantificar tanto los genes como la expresión de los transcritos, explorar el splicing alternativo, los sitios de poli(A) o los exones de cassette (Wang *et al.*, 2009). Asimismo, también se emplea la secuenciación bisulfito en estudios de epigenética con el objetivo de identificar patrones de metilación del ADN o zonas de interacción proteína-ADN (ChIP-seq) (Goodwin *et al.*, 2016). El genotipado por secuenciación (GBS) es otro método basado en el genotipado de alto rendimiento de un gran número de individuos en un gran número de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que se puede utilizar para la caracterización de germoplasma, mejora genética o mapeo de rasgos en una variedad de organismos diversos (De Donato *et al.*, 2013).

Por todo esto, la secuenciación de alto rendimiento es muy utilizada en cualquier proyecto de investigación que requiera trabajar con ácidos nucleicos. Teniendo en cuenta que en un laboratorio de genómica se puede llegar a trabajar con cientos o miles de muestras a la vez, es imprescindible optimizar ciertos procesos mediante la automatización de protocolos repetitivos de laboratorio, ya que estas tareas requieren un tedioso y laborioso trabajo de muchas horas de pipeteo manual.

Llegados a este punto, una solución es la automatización de estos procesos mediante un robot pipeteador (Tegally *et al.*, 2020). En el caso particular de este trabajo, se trata de un robot de la marca Opentrons (figura 1); un robot muy flexible, bastante sencillo de utilizar, económico y de código abierto, ya que sus aplicaciones, protocolos y hardware están a disposición del

público. Está compuesto por una plataforma con 11 ranuras y un contenedor de residuos y permite la manipulación de diferentes volúmenes de líquidos (entre 1-1000 μl) con micropipetas de uno y ocho canales, el cambio de puntas, la mezcla y manipulación de placas de 96 pocillos o el alicuotado de líquidos. Además, se pueden acoplar un módulo magnético (bloque con unos imanes que permite hacer purificaciones de ácidos nucleicos usando microesferas magnéticas mediante el método de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI), Hawkins *et al.*, 1994), un módulo de temperatura (placa caliente y fría que mantiene a los reactivos a temperaturas entre 4 °C y 95 °C), un módulo termociclador y un módulo de filtro HEPA (permite llevar a cabo protocolos sensibles a la contaminación). En cuanto a su rendimiento, tiene un error aleatorio (acercarse al "valor real" o a lo que se quiere conseguir) del 15% en 1 μl , una precisión o error sistemático (capacidad de obtener lo mismo una y otra vez) de 5% en 1 μl , y puede llenar una placa de 96 pocillos en 22 segundos (Opentrons, 2021b). Se pueden crear protocolos fácilmente con una interfaz de código abierto (*protocol designer*), se pueden diseñar los protocolos con una API de Python (Opentrons, 2021c) o se pueden utilizar protocolos ya hechos en su librería. Para utilizar material de laboratorio diferente al recomendado por Opentrons es necesario definir sus medidas en otra interfaz, *custom labware creator* (Opentrons, 2021d), y luego añadir este material específico a los protocolos. Esta es una de sus principales ventajas, ya que esta flexibilidad permite crear y utilizar materiales personalizados. Así, de manera sencilla se pueden crear protocolos 100% adaptados a las necesidades de los protocolos. En conclusión, este robot podría ahorrar tiempo, aumentar el rendimiento, la reproducibilidad y la precisión en comparación con el pipeteo manual, y mejorar la información sobre lo que se ha hecho y cuándo (Opentrons, 2021a). Además, hay una gran comunidad para compartir fácilmente protocolos y reproducir los resultados de los demás. Por todo esto, es un candidato ideal para flujos de trabajo científicos que incluyan la preparación de muestras para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la preparación de genotecas para la HTS o la purificación de ácidos nucleicos, además de protocolos en otros campos que puedan requerir de tediosos y repetitivos pasos de pipeteo.

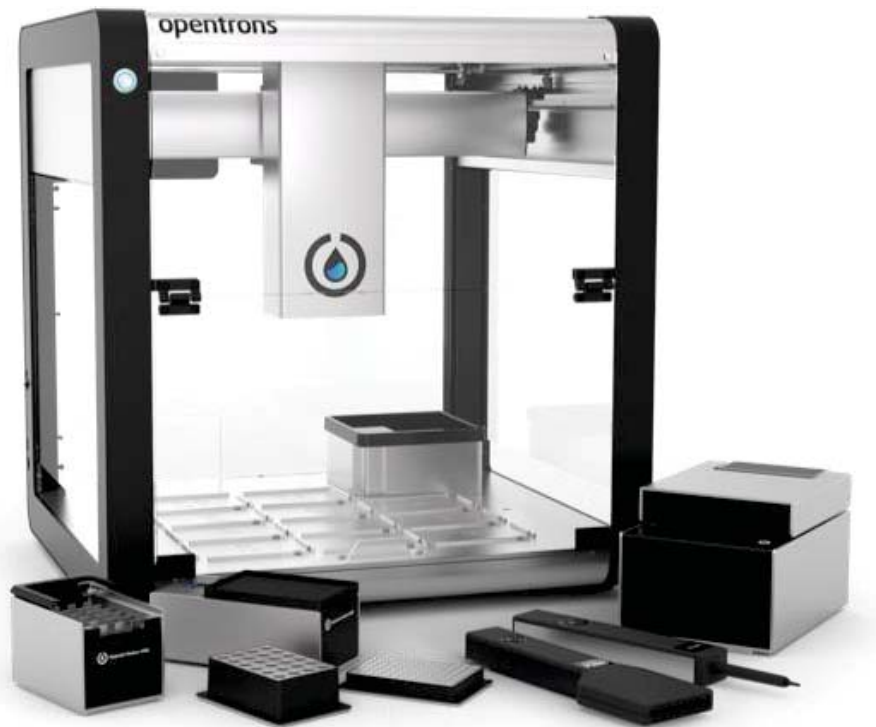


Figura 1. Robot Opentrons con sus módulos y pipetas. Tomada de: Opentrons, 2021e.

Estas técnicas son habituales para llevar a cabo la secuenciación masiva, que generalmente consta de los pasos de preparación de genotecas, secuenciación y análisis de los datos (Hess *et al.*, 2020). El primer paso es necesario para que las moléculas puedan ser secuenciadas, por lo que es muy importante obtener bibliotecas genéticas de alta calidad (Head *et al.*, 2014). El protocolo estándar empezaría con los pasos de fragmentación y reparación de extremos. La fragmentación se puede realizar mediante métodos mecánicos como la sonicación o con enzimas de restricción para la obtención del inserto. Después, se obtendrían extremos romos con una polimerasa y se marcaría con una adenina el extremo 3' en un proceso llamado A-tailing para que se unan los adaptadores. A continuación, con la ayuda de una ligasa, se une el adaptador (oligonucleótido que hibrida con los extremos complementarios en la matriz de oligos de la flow cell) que consta del índice (un oligonucleótido que sirve de etiqueta para reconocer las muestras) y los primers. A esto le sigue la selección de fragmentos específicos para refinar el tamaño de la biblioteca, eliminando adaptadores u otros artefactos de la preparación de la biblioteca (Quail *et al.*, 2008). Este flujo de trabajo se resume en la Figura 2.

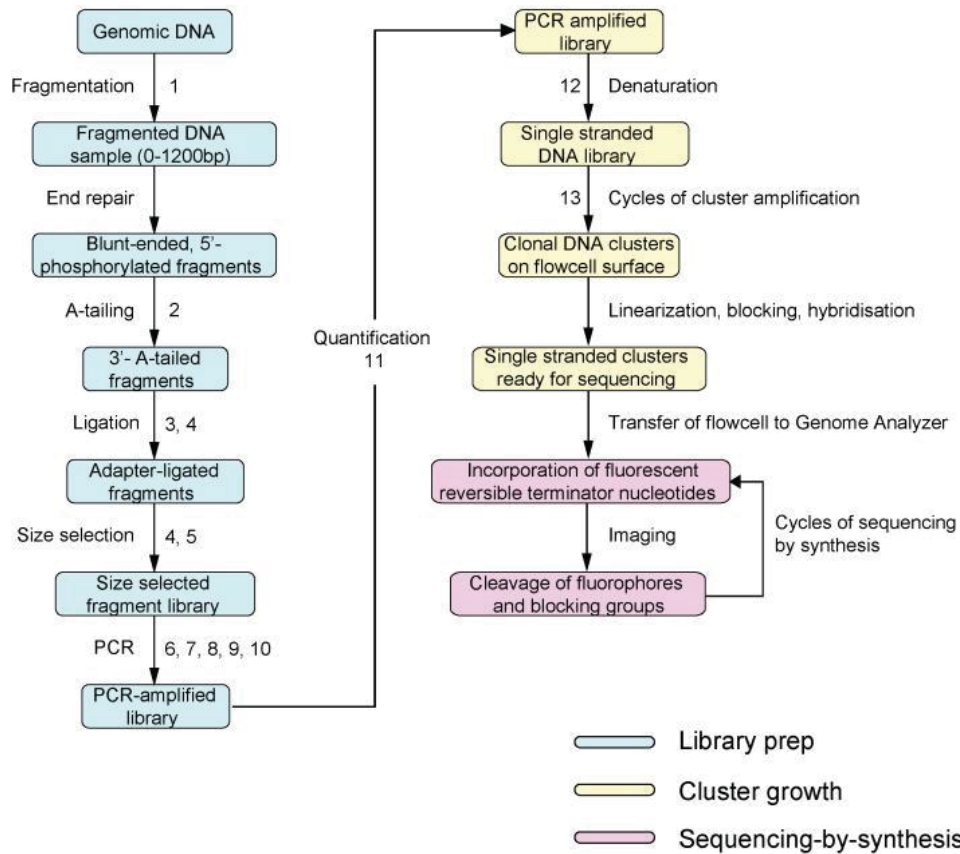


Figura 2. Etapas de preparación de genotecas en un flujo de trabajo de secuenciación Illumina. Tomada de: Quail *et al.*, 2008.

Para refinar el tamaño de la genoteca, se pueden utilizar microesferas magnéticas, columnas o geles, aunque mayoritariamente es la primera opción la elegida. La purificación mediante microesferas magnéticas (inmovilización reversible en fase sólida -SPRI-) tiene dos pasos: unión específica del ADN a la matriz inorgánica y recuperación del ADN de la matriz. Para el primer paso se utiliza un kit con perlas magnéticas en el que un imán atrae a las perlas para separarlas de las soluciones en las que se encuentran suspendidas. Previamente se añade una solución amortiguadora a pH ácido que permite cargar positivamente a las perlas, favoreciendo la unión de ADN. Además, se hacen lavados con etanol para eliminar la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente. Las proteínas y lípidos tienen baja afinidad por las perlas y son eliminados con soluciones de lavado a pH fisiológico. Las perlas son retenidas en la pared del microtubo con el imán, mientras que la solución con los contaminantes se elimina por pipeteo. Después, para recuperar el ADN de la matriz, se utiliza una solución básica de tampón para neutralizar la carga de las perlas. El ADN se separa de

las perlas y transfiere a otro tubo, mientras que las perlas continúan siendo retenidas por el imán (Figura 3) (Hawkins *et al.*, 1994; Oberacker *et al.*, 2019).

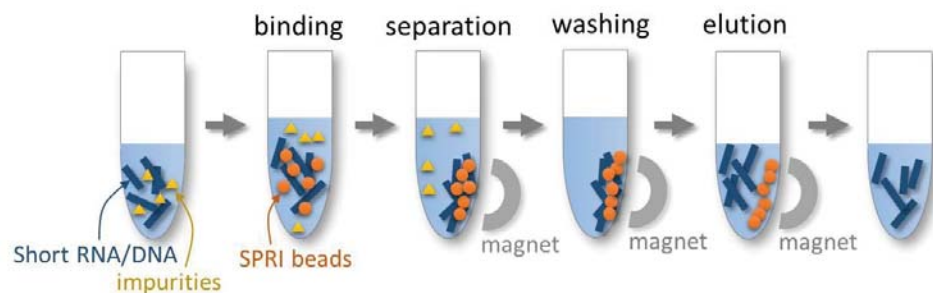


Figura 3. Pasos para una purificación de ácidos nucleicos con perlas magnéticas. Tomada de: Biodynami, 2021.

Una vez que el ADN ya está purificado, es necesario cuantificar la concentración de este. Esto es importante para poder mezclar todas las muestras equimolarmente antes de cargarlas en el secuenciador, ya que las diferencias de concentración molar entre genotecas agrupadas pueden dar lugar a una cobertura incompleta de las bibliotecas con menos concentración (Hess *et al.*, 2020) o a sesgos en el número final de lecturas obtenidas para cada muestra. Esta cuantificación se realiza habitualmente mediante fluorimetría (Qubit, Thermo Fisher Scientific) que refleja exactamente la cantidad de ADN bicatenario presente en la muestra mediante el uso de un fluoróforo que se intercala en la doble cadena (Mardis & McCombie, 2017). La concentración de las bibliotecas genómicas también se puede cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (Robin *et al.*, 2016).

OBJETIVOS:

Desarrollar, poner a punto y optimizar protocolos específicos utilizando el robot de pipeteo Opentrons OT-2 y evaluar su viabilidad en un laboratorio de genética.

MATERIAL Y MÉTODOS:

1.- Diseño de material específico

El OT-2 está adaptado para usar ciertos modelos de material plástico habitual en un laboratorio de biología molecular (reservorios, placas de pocillos, cajas de puntas, soportes para tubos...), además de los módulos comentados previamente (magnético, de temperatura, termociclador, filtro HEPA). Además de este material de laboratorio, el OT-2 utilizado

cuenta con 4 pipetas: dos pipetas monocanal que manipulan volúmenes entre 1-20 μl (p20) y entre 20-300 μl (p300) y dos multicanales (8 canales) que manipulan entre 1-20 μl (p20-8) y entre 20-300 μl (p300-8). El OT-2 no tiene sensores internos, solamente reconoce las posiciones XZY que se le programan, por tanto, es importante medir bien el material que no sea estándar para que las partes móviles no colisionen con los materiales. Así, el primer paso fue medir las distancias de todo el material de laboratorio que no fuese propio de Opentrons. Se midieron placas de 96 pocillos, cajas de puntas de pipetas de 10, 100 y 200 μl y diferentes gradillas. Las medidas se especificaron en el *custom labware creator*, una interfaz gráfica en la que se van añadiendo las diferentes medidas y en la que se genera un archivo que después se puede incorporar a los diferentes protocolos. En esta interfaz se crean estas definiciones aportando la longitud, anchura, altura, número de filas y columnas, volumen, diámetro, profundidad del pocillo y el espacio entre pocillos. Así, el OT-2 tiene las medidas exactas del material de laboratorio para calcular sus movimientos de manera acorde. Además de esto, se contactó con una empresa de diseño y fabricación de piezas 3D para producir réplicas del material de laboratorio y también para producir y diseñar nuevas piezas necesarias para ciertos protocolos. En este sentido, se pidieron réplicas de gradillas para tubos tipo eppendorf de 1,5 ml (figura 4B) y de su soporte (figura 4D) y por otro lado, se encargó el diseño de un adaptador para las cajas de puntas utilizadas (sirve para puntas de 10, 100 y 200 μl , figura 4A), un soporte con paredes para poder meter hielo (figura 4E), gradillas para tubos de 0,5 mL (figura 4C) y adaptadores para la placa del módulo magnético.

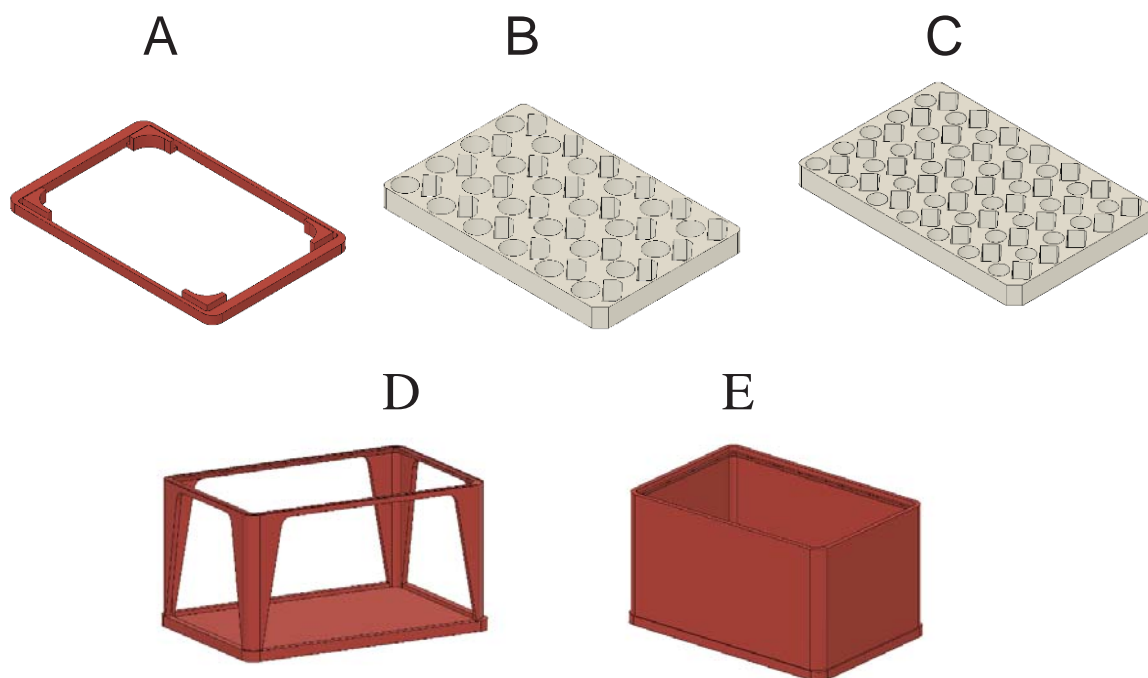


Figura 4. **A:** Adaptador para cajas de puntas de 10,100 y 200 μ l. **B:** Gradilla para tubos tipo eppendorf. **C:** Gradillas para tubos de 0,5 ml. **D:** Soporte de gradillas. **E:** Soporte de gradillas con paredes. Cedidas por: Callón, J., 2021.

2.- Elaboración de protocolos

Para la elaboración de los diferentes protocolos se utilizaron dos métodos: *protocol designer* y la API de Python. Esta última es un entorno de trabajo diseñado por Opentrons para facilitar la escritura de protocolos automatizados (Opentrons, 2021c). Para trabajar con ella, se utilizó PyCharm y Spyder, que son entornos de desarrollo integrado (IDE) utilizados en programación de computadoras, específicamente para el lenguaje Python. Ambos métodos permiten utilizar tanto el material personalizado como el propio de Opentrons y añadir los módulos. Además, en ambos se pueden personalizar los ajustes avanzados, en los que se pueden añadir o modificar diferentes comandos (Tabla 1).

Tabla 1. Comandos que se pueden utilizar en los ajustes avanzados de *protocol designer* y la API de Openrons.

Flow rate	Para modificar la tasa de flujo de aspiración y dispensación dentro de los límites de cada pipeta
Tip position	Para modificar la altura a la que aspira y dispensa
Well order	Para modificar el orden en el cual el robot aspira los pocillos seleccionados
Mix	Para realizar una mezcla antes y después de la aspiración y la dispensación
Delay	Para agregar una pausa entre dos pasos
Touch tip	Para que después de cada aspiración y dispensación toca en los lados del pocillo para evitar que se quede líquido en la punta
Air gap	Para que aspire aire y así evitar que se pierda líquido en las transferencias
Blowout	Para que se mueva el émbolo de las pipetas más allá de sus toques habituales para eliminar completamente cualquier líquido restante de la punta
Changed tip	Para programar el cambio de puntas.

Sin embargo, Python permite un mayor grado de personalización, ya que existen más comandos como el `move to` (mover la pipeta a un sitio determinado) o la modificación del `flow rate` del `blowout`. Desde Python también se pueden importar archivos `.csv` para trabajar con ellos y crear variables y condicionales muy útiles a la hora de automatizar protocolos que varían. En este aspecto, para poder enviar archivos al robot utilizamos SSH (Secure Shell), que es un programa para el acceso remoto a un servidor por medio de un canal seguro. Una vez establecidas las claves requeridas, podemos controlar y conectarnos al OT-2 mediante una línea de comandos (PowerShell), y utilizar el comando SCP (Secure Copy Protocol) para enviar archivos al OT-2. Por otro lado, la interfaz gráfica de *protocol designer* es más accesible ya que es muy intuitiva y permite visualizar tanto el material de

laboratorio y los volúmenes que se van a utilizar (Figura 5), como los ajustes avanzados (Figura 6).

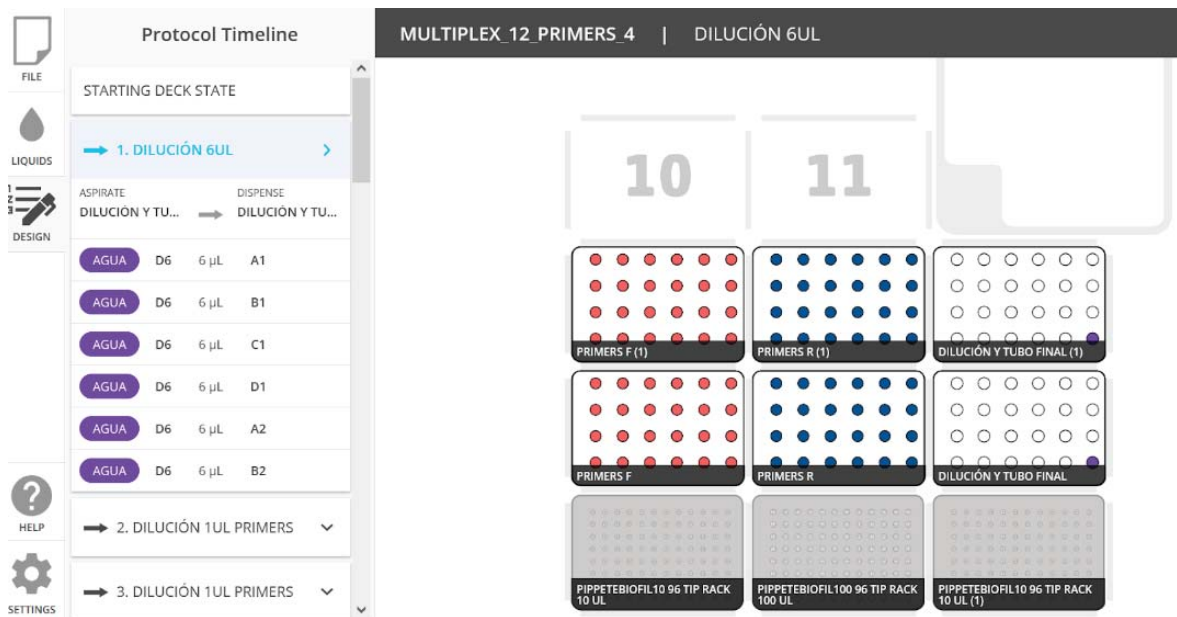


Figura 5. Interfaz gráfica de *protocol designer* en la que se puede ver el material de laboratorio, sus volúmenes y transferencias.

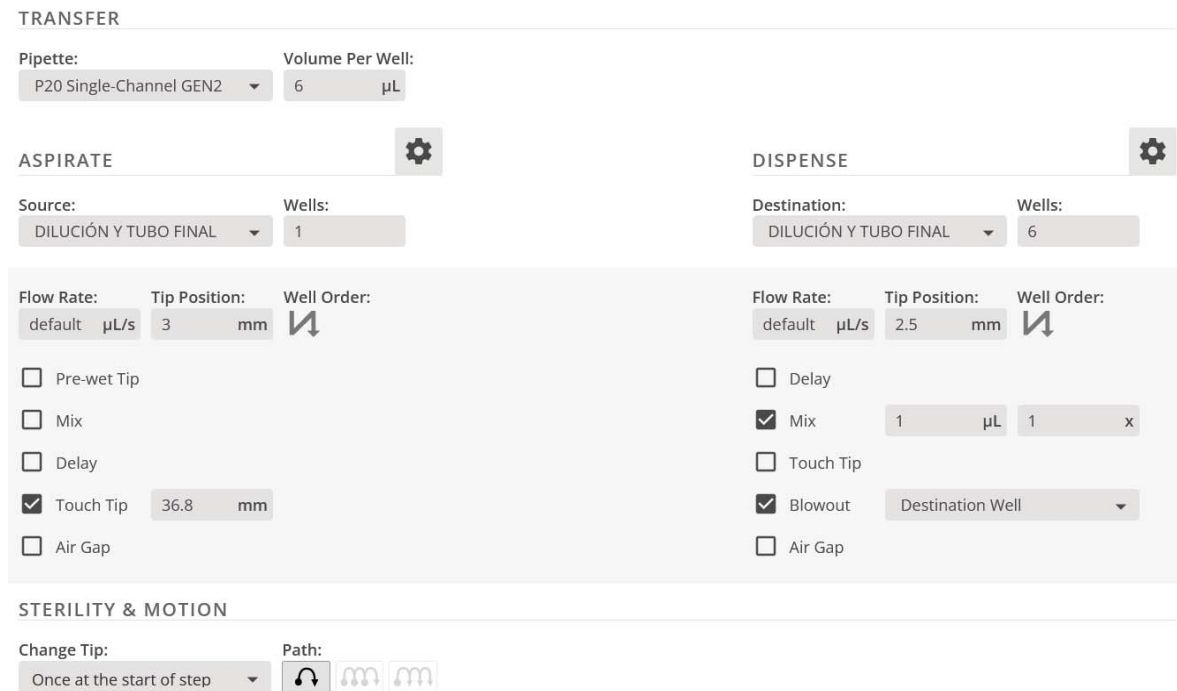


Figura 6. Interfaz gráfica de *protocol designer* en la que están desplegados los ajustes avanzados.

Inicialmente se realizaron todos los protocolos con *protocol designer*, excepto en los que se importaban archivos .csv, ya que la elaboración de los protocolos resulta más sencilla. Sin embargo, después de comprobar ciertos protocolos en los que se dispensaba 1 μl , se observó que había pocillos en los que quedaba volumen en las puntas, así que después de probar los métodos de *blowout* y *touch tip* con *protocol designer*, tuvimos que realizarlos todos con Python para poder modificar principalmente tanto la tasa de flujo como la altura a la que se realizaba el *blowout*, para que lo hiciese en el fondo del pocillo y no arriba. Además, a la hora de solucionar ciertos problemas que van surgiendo, Python es la mejor opción ya que es más personalizable y tiene más comandos.

Los protocolos que se desarrollaron fueron los siguientes:

A. Preparación PCR:

Para la preparación de la PCR se diseñaron varios protocolos en los pasos que se podían automatizar más fácilmente.

A.1. Dispensación de la mezcla de PCR:

Se trata de una transferencia de la mix de PCR desde un tubo tipo eppendorf a una placa de 96 pocillos usando una punta por placa. Se diseñó para diferentes números de muestra, desde 48 pocillos hasta 96, de 8 en 8, para dos volúmenes, 22.5 y 11.3 μl y hasta para 5 placas. Para la dispensación de 22.5 μl , el tiempo del protocolo es de 11 minutos por placa y utiliza la p300 (pipeta monocal de 300) con las puntas de 100 μl , mientras que para la dispensación de 11.3 μl , al no tener puntas de 20 μl adaptadas al robot, hubo que programar dos transferencias con las puntas de 10 μl , una de 5 μl y otra de 6.3 μl , y se dispensa con la p20 (pipeta monocal de 20), por lo que tardó 26 minutos por placa. Para mejorar este tiempo, se añadió un paso intermedio, en el que se dispensaba la mix desde el eppendorf a una nueva placa, y desde ahí se dispensaba a las placas con la p20-8 (pipeta multicanal de 20), con lo que se consiguió reducir el tiempo a 6 minutos (Figura 7). Esto se podría realizar también para la dispensación de 22,5 μl .



Figura 7. Protocolo de dispensación de mix para 96 muestras.

Una vez comprobado el protocolo, se observó que al dispensar quedaban algunos microlitros en la punta de las pipetas, y en ciertas ocasiones no aspiraban el volumen. Teniendo en cuenta que las puntas que se utilizan no son de muy buena calidad, es posible que en ciertas ocasiones no se rompa la tensión superficial y no se aspire el volumen. Para solucionar estos problemas, se añadieron pasos de *mix* antes de aspirar para intentar romper la tensión superficial, y se modificó la altura a la que se realiza el *blowout*, para que lo haga sumergido en líquido y así evitar que se queden gotas en las puntas. Además, se aumentó la tasa de flujo del *blowout* de la pipeta p20-8 para que se realizase con más fuerza, pasando de 7.6 $\mu\text{l/s}$ a 20 $\mu\text{l/s}$.

A.2. Dispensación de ADN:

Se diseñó para la transferencia de 1.3 y 2.5 μl de ADN desde una placa de 96 pocillos a una placa de 96 pocillos con la mix ya incorporada (ver protocolo A.1). Esta transferencia se realiza con la pipeta multicanal p20-8, cambiando de punta en cada dispensación, por lo que se utilizan 96 puntas por placa. Así, el máximo sería 3 placas con ADN, 3 con mix, y 3 con las cajas de puntas (Figura 8). Se diseñó también para muestras desde 48 a 96. El tiempo medio por placa es de 5 minutos. Como en el protocolo A.1, se añadió el paso de *mix* y *blowout* cambiando su altura y tasa de flujo por el mismo motivo. Además, al ser volúmenes muy bajos, se añadió el paso de *air gap* para que no se pierda nada de volumen en la

transferencia y sea más preciso. La placa resultante estará lista para cargar en el termociclador para realizar la PCR1.

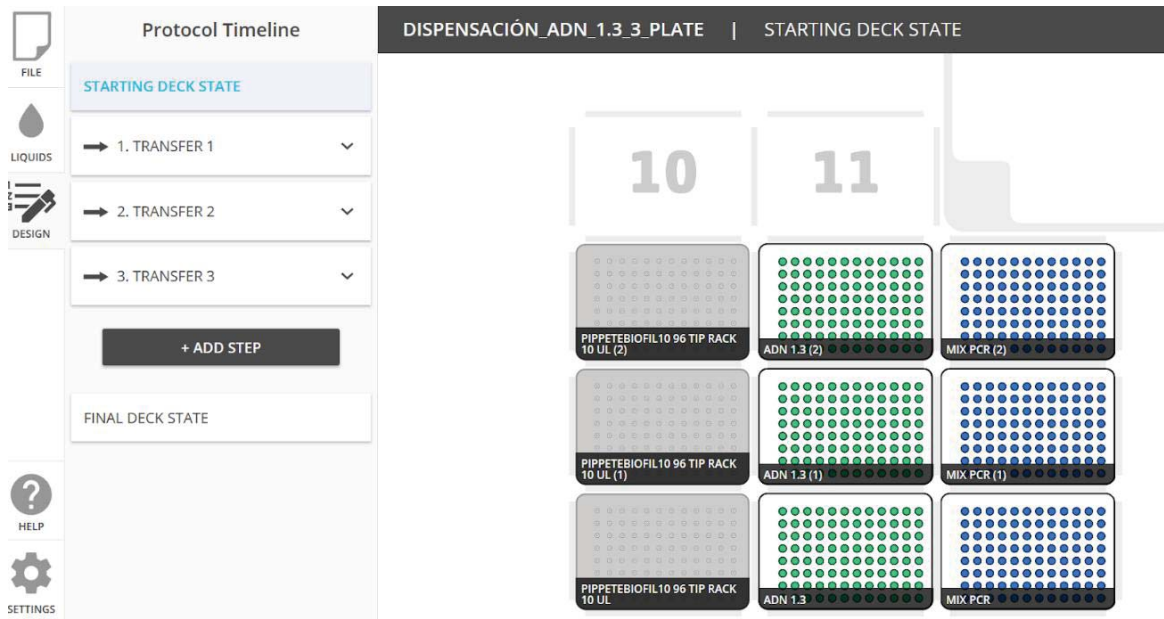


Figura 8. Protocolo de dispensación de ADN para 96 muestras.

A.3. Dispensación PCR1 e índices:

Este protocolo se diseñó para transferir 2.5 µl de los índices y 2.5 µl del producto de la PCR1 (ver A.1 y A.2) a las placas de PCR2. Se utiliza la p20-8 con puntas de 10 µl. Se puede realizar para dos placas de PCR2 como máximo, y el tiempo de duración es de 10 minutos para una placa de PCR2 (Figura 9). También se añadieron los pasos anteriores comentados en los protocolos A.1 y A.2.

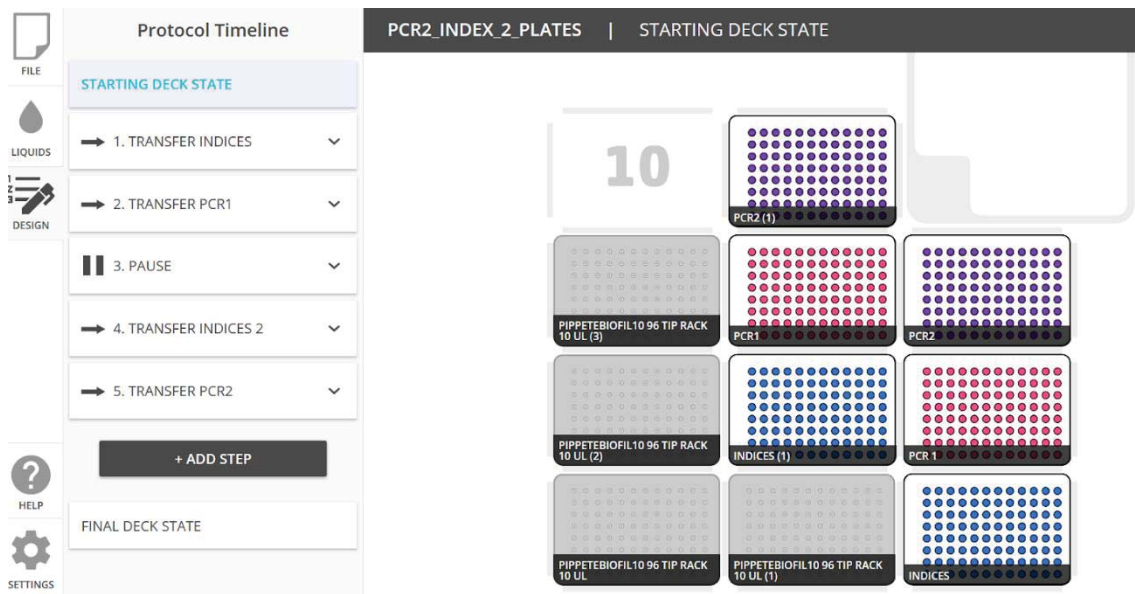


Figura 9. Protocolo de dispensación PCR1 e índices para 96 muestras.

B. Purificación:

Este seguramente sea el protocolo más complejo, ya que las purificaciones con perlas magnéticas son muy sensibles. Es el único en el que se utiliza el módulo magnético, que es un bloque con unos imanes que se pueden subir y bajar para atraer a las perlas o microesferas magnéticas. Se utilizan las pipetas p300-8 y p20-8 con las puntas de 200 y 10 µl respectivamente. Al utilizar las perlas magnéticas, modificamos las tasas de flujo de aspiración y dispensación y la altura a la que se realizaban para intentar no aspirar ninguna perla en las puntas y añadimos pasos de touch tip y blowout para que no dejase ninguna gota en las puntas. También añadimos air gaps, ya que la baja densidad del etanol puede provocar goteo en las puntas. Para empezar, se realiza una mezcla en una placa de 96 pocillos que contiene las microesferas con la muestra y se hace una pausa de 5 minutos para que hibriden las microesferas con la muestra. A continuación, se suben los imanes del módulo magnético sobre el que está la placa y se hace una pausa de 4 minutos para que se haga el pellet. Lo siguiente es eliminar 25 µl de sobrenadante desde la placa hasta un reservorio. Después se transfieren 150 µl de etanol desde el reservorio a la placa, que se eliminan de nuevo al reservorio. Se repite el paso de echar etanol y retirarlo, se baja un poco el imán y se hace una pausa de 1 minuto para que sequen las microesferas. Después, se baja del todo el imán y se hace una pausa de 7 minutos para que se evapore bien todo el etanol. Una vez hecho esto, se dispensan 22 µl de buffer desde el reservorio a toda la placa y se hace una pausa de 5 minutos para que eluya. Se sube el imán y se espera 4 minutos para que se

forme el pellet. Para finalizar, se recoge el eluido en dos pasos de transferencia de 9 μl cada uno intentando no aspirar perlas. El eluido se lleva a una nueva placa vacía, donde tendremos 18 μl de la muestra purificada. Este protocolo utiliza 672 puntas de 200 μl (7 racks de 96) y 96 puntas de 10 μl y tiene una duración de 1 hora y 42 minutos para 96 muestras (Figura 10).



Figura 10. Protocolo de purificación para 96 muestras.

C. Cuantificación:

Este protocolo se realizó con las pipetas monocanales de p300 y p20 usando las puntas de 200 y 10 μl respectivamente. Primero se dispensan 199 μl de mix (en proporción 199 μl de buffer y 1 μl de fluoróforo por muestra) desde un tubo tipo Falcon a 35 tubos de 500 μl (cada gradilla soporta 35 tubos, figura 3C). A continuación, se dispensa 1 μl desde una placa de 96 pocillos a los tubos de 500 μl , que ya se podrían cuantificar en el Qubit. Para que la dispensación de 1 μl se realizara correctamente se modificó la altura del blowout para que la hiciera en el fondo del pocillo, y se aumentó la tasa de flujo del blowout. Se puede realizar una cuantificación de una placa entera, dispensando en 32 tubos en tres gradillas. Este protocolo tiene una duración de 60 minutos para 96 muestras (Figura 11).



Figura 11. Protocolo de purificación para 96 muestras.

D. qPCR:

Para la preparación de la qPCR se diseñó el protocolo para la dilución de las muestras. Se usan las pipetas de p20 y p300 y las puntas de 10 y 100 μ l respectivamente. Primero se transfiere desde un tubo falcon 99 μ l de buffer a todos los tubos eppendorf y después se transfiere 1 μ l desde cada eppendorf con muestra a tres eppendorf con buffer, ya que por cada muestra se hacen 3 réplicas. A continuación, se dispensa 1 μ l de cada réplica a otros tubos eppendorf con el buffer ya incorporado, con lo que tendríamos la dilución 1:10000, y si quisiéramos la 1:1000000, dispensamos otra vez 1 μ l a otros tubos eppendorf con el buffer ya incorporado. Se diseñó para 12 y 6 muestras y para una dilución 1:10000 y 1:1000000, en función de la concentración de las muestras (figura 12). Se utilizaron gradillas con paredes (figura 3E) para poder meter hielo y así evitar perder volumen.

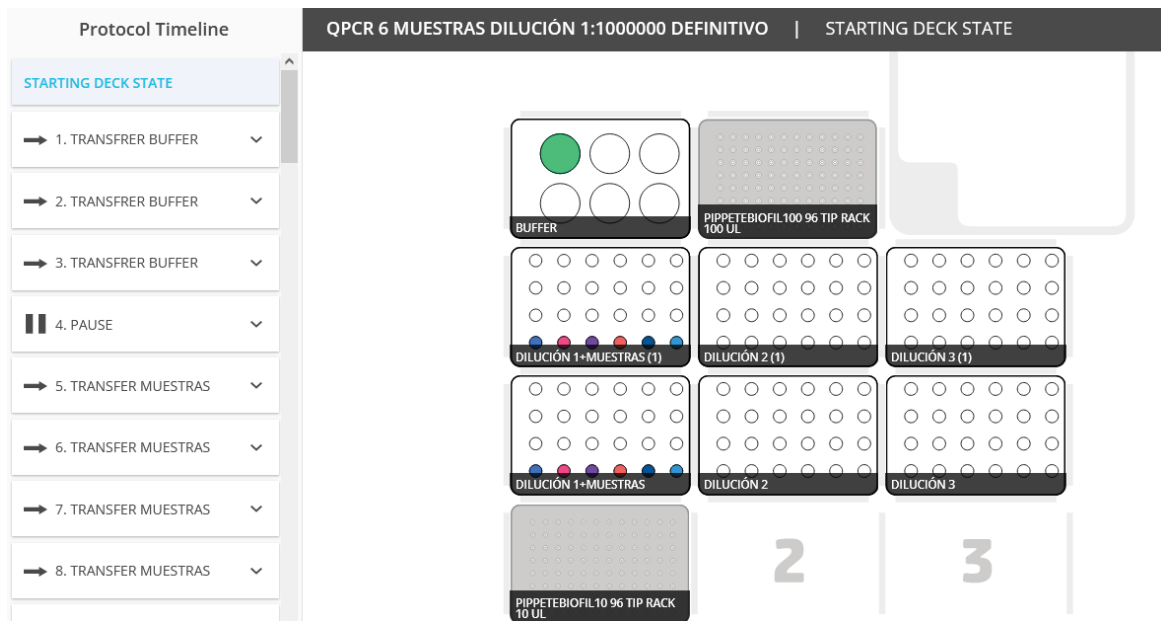


Figura 12. Protocolo de qPCR para 12 muestras con dilución 1:1000000.

E. Multiplex:

Este protocolo se diseñó para preparar una multiplex con las parejas de primers reverse y forward. Se realizaron dos protocolos dependiendo de si se utilizan 3 o 4 parejas de primers. Se utilizan las pipetas p20 y p300 monocanales y las puntas de 10 y 100 µl. Primero se realizó una dilución 1:10 de los primers R y después se transfiere agua al tubo final, al cual se añaden después 1 µl de los primers F y 1 µl de la dilución de los primers R (figura 13). A continuación, habría que dispensar los fluorocromos al tubo final, pero como es diferente en función de si son 3 o 4 parejas de primers, se importó el CSV en donde viene esta información (ver protocolo 6).

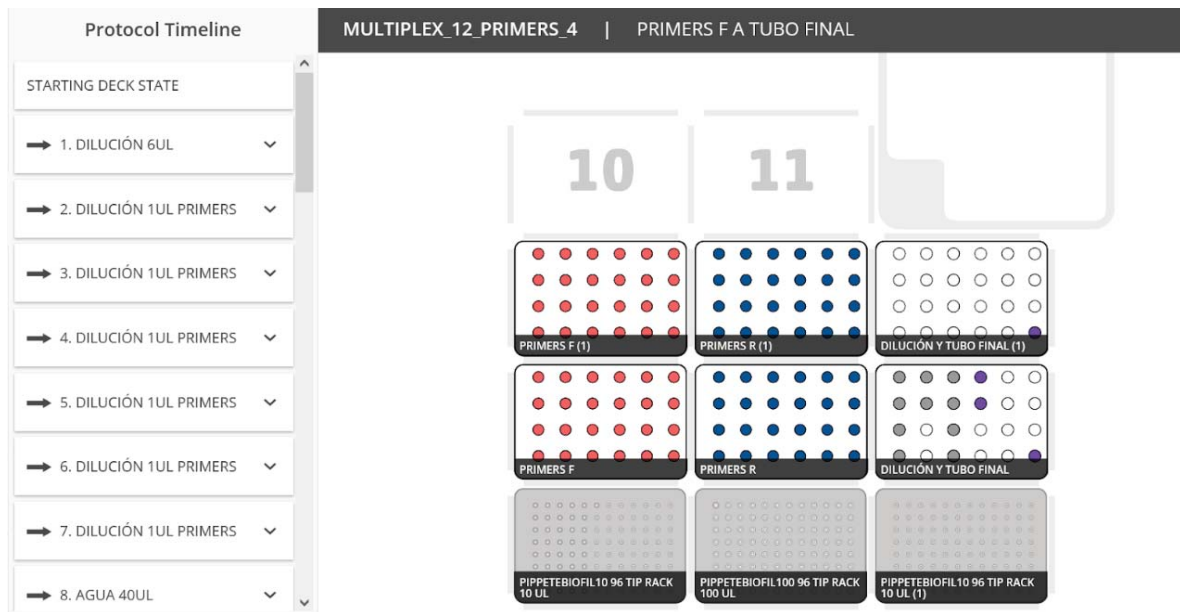


Figura 13. Protocolo de preparación de multiplex.

F. Dispensación fluorocromos:

En el CSV tenemos una tabla en la que se indica que fluorocromo (FAM, HEX y NED) va con cada primer y hay que dispensar 1 μ l por cada fluorocromo-primer (figura 14). Por esto, agrupamos estas columnas, para que dispensara 1 o 2 μ l en función de las parejas, ya que cuando hay 4 parejas un fluorocromo se repite. Así, generamos el archivo con las columnas agrupadas y lo enviamos al robot. Después, creamos un protocolo en el que usamos este archivo para que dispensara 1 o 2 μ l de cada fluorocromo en función de la multiplex. Se usa la pipeta p20 con las puntas de 10 μ l, cambiando de punta en cada transferencia, y el tiempo para 15 muestras sería 15 minutos.

Multiplex	Locus	Forward	Reverse	Label	Amplicon size
1	AG_Cno_485	AGTCCAGCGGGT	AGAAGCTTTGCATTCACCTTGG	FAM	127
	AG_Cno_369	CCCAAATATGCA	ACGTTTCCCTCCAGTCAGAG	FAM	291
	AG_Cno_474	TGGACTCCTCTT	CTCCACACCCATCGTCAGA	HEX	92
	AG_Cno_469	CCGCTCCATCAG	GGGCTGGAGAATTTCTCTT	NED	222
2	AG_Cno_030	GGTGAAGGTGGA	CAACCATTCTGGAGGAACT	FAM	95
	AG_Cno_092	AAGGGATGAGGG	ACCTATTTCCCTTCTGTTGTCC	FAM	245
	AG_Cno_371	GCTCTGCTTGGT	ATGCACACGCCTGAGACAC	HEX	116
	AG_Cno_331	GAGAGCAGAGCA	GGCAGAGAGGGAGAGAGGA	NED	178
3	AG_Cno_462	GGACAAGGGTGT	CTTGCGTATGGAGGTGTCAA	FAM	99
	AG_Cno_327	CAGTGGACGGAA	CGCATGTGTGCTGTAGACCT	HEX	195
	AG_Cno_430	CGGTGACACTGAT	GACTGAACCACAGCAGGG	NED	93

Figura 14. Ejemplo de la tabla excel que se importaba al robot.

G. Pool:

Este protocolo se realiza para que vaya la misma cantidad de moléculas de cada muestra al secuenciador, por lo que teniendo en cuenta la cuantificación, se calcula el volumen que tiene que ir de cada muestra. Este cálculo se realiza en un excel que nos devuelve una columna con los volúmenes y en función de esto, se juntan las muestras más concentradas en un eppendorf y las menos concentradas en otro eppendorf. Así, modificamos el excel para añadir una columna con una etiqueta en función de su destino. Después, con el paquete pandas en Python nos quedamos con esas columnas y generamos un archivo que enviamos al robot. Generamos el protocolo, que se trata de una transferencia desde una placa de 96 a dos eppendorfs, pero cada transferencia con un volumen distinto. Se utiliza la pipeta p20 con puntas de 10, cambiando de punta tras cada transferencia. Al ser poco volumen, añadimos los pasos de `air gap` y `blowout` para que aspire y dispense correctamente. Este protocolo tiene una duración de 39 minutos para 96 muestras.

3.- Medición de la duración de los protocolos

Para calcular los tiempos de los protocolos se utilizó un estimador desarrollado por Opentrons en la API de python, utilizando el comando `opentrons_simulate e-`. Conocer el tiempo es importante para poder saber cuándo va a acabar el protocolo y para saber cuándo el/la técnico/a que manipule el robot tiene que realizar alguna acción, ya que en determinados casos hay que vaciar los residuos, o cambiar o reponer algún material. Estos resultados los comparamos con el tiempo real de los protocolos y así calculamos un porcentaje de error del estimador, ya que es una función todavía experimental de Opentrons (tabla 2). Además, medimos el tiempo de los protocolos realizados con pipeteo manual para compararlos con los del robot y así ver el rendimiento del equipo (tabla 2).

4.- Determinación de las diferencias entre el pipeteo manual y el OT-2

Con el objetivo de medir las diferencias, si existieran, entre los resultados de un protocolo real realizado a mano, con ese mismo protocolo llevado a cabo por el OT-2, se planteó el siguiente experimento:

Se cuantificaron 32 muestras de ADN con el OT-2 (protocolo C de la sección anterior) y con pipeteo manual e hicimos dos réplicas con cada método para poder evaluar la consistencia del pipeteo. Se realizó el proceso de cuantificación con el OT-2 y a mano, utilizando la misma receta patrón y las mezclas de reacción igual de frescas. Una vez añadido el buffer con el fluorocromo y el ADN, se cuantificó en el Qubit, usando el High-Sensitivity dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific). Los resultados los analizamos mediante una prueba t de Student. En este caso, realizamos una prueba t dependiente para muestras apareadas para comprobar la hipótesis nula de que no hay diferencias entre las medias realizadas con el robot y las manuales. El cálculo de este estadístico lo realizamos con el software Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

RESULTADOS:

1.- Diseño de material específico

Se comprobó que el material diseñado encajaba dentro de las ranuras del robot y que era completamente funcional. El adaptador (figura 4A) encaja perfectamente con las diferentes cajas de puntas, los soportes (figura 4D y 4E) encajan bien con las gradillas (figura 4B y 4C), y en estas encajan los tubos perfectamente. El movimiento de las pipetas en este material diseñado fue preciso.

2.- Elaboración de protocolos

Todos los protocolos mencionados en la sección de Material y Métodos están a disposición del tribunal para su revisión y evaluación, pero no se harán públicos, dado que la empresa donde se ha desarrollado este trabajo fin de máster, AllGenetics, prefiere mantener su confidencialidad. Están disponibles tanto los realizados con *protocol designer* como los realizados con la API de Python.

3.- Medición de la duración de los protocolos

Como se puede ver en la tabla 2, la precisión del estimador varía bastante dependiendo del protocolo y en algunos protocolos la estimación es muy errónea. Los protocolos en los que no se cambia de punta por cada dispensación, como en las dispensaciones de mix, suele infraestimar el tiempo del protocolo. En los protocolos que utiliza la pipeta multicanal o en los que se programa el cambio de puntas por cada dispensación, la estimación es más precisa, con un porcentaje de error del entre el 10 y el 20%.

Tabla 2. Comparación entre el tiempo real del robot y el esperado por el estimador. Los métodos air gap y move to no los incluye el simulador. Tiempos de realización de los protocolos con pipeteo manual y del robot, solo se calculó el tiempo de pipeteo, sin contar con la preparación del material o el etiquetado. Los protocolos marcados con *, no disponemos de los tiempos de pipeteo manual.

Protocolos	Nº de muestras	Estimador (minutos)	Robot (minutos)	Porcentaje de error (%)	Manual (minutos)	Diferencia (minutos)
Dispensación Mix PCR 11,3 µl (p-20)	96	15	26	42,3	5,5	20,5
Dispensación Mix PCR 11,3 µl (p-300 y p-20-8)	96	4	6	33,3	5,5	0,5
Dispensación Mix PCR 22.5 µl	96	4	11	63,3	5,5	5,5
Dispensación ADN	96	5	5	0	2,5	2,5
Dispensación PCR1 e Índices	96	10	10	0	7.4	2.6
Purificación	96	93	102	8,8	96	6
Cuantificación	96	48	60	20	20	40
qPCR	6	27	29	6,9	*	*
Multiplex	6	18	21	14,3	*	*
Dispensación fluorocromos	15	13	15	13,3	*	*
Pool	96	32	39	17.9	30	9

Por otra parte, de los resultados de la tabla 2, se puede ver que el robot tiene un rendimiento menor al de los pipeteos manuales, sobre todo en protocolos en los que se utilizan las pipetas monocanal como la cuantificación, el pool, o la dispensación de mix. Sin embargo, en los protocolos en los que se utilizan las pipetas multicanal, como en la dispensación de ADN, índices y purificación, los tiempos se igualan bastante.

4.- Determinación de las diferencias entre el pipeteo manual y el OT-2

En la tabla 3 podemos ver los resultados de las cuantificaciones realizadas con el robot y las manuales, así como las medias de las réplicas. En general, en las cuantificaciones con el robot los resultados son más altos. También observamos que el robot no pudo aspirar volumen en 3 pocillos, dos de ellas en la muestra 8, que decidimos eliminar del análisis, ya que ese pocillo tenía poco volumen y en la cuantificación manual obteníamos un resultado poco coherente. El otro pocillo que no aspiró, la muestra 31 en la réplica 2, se repitió posteriormente para incluir esa muestra al experimento.

Tabla 3. Resultados de las cuantificaciones.

Nº de muestra	R1 Robot	R2 Robot	Media Robot	R1 Manual	R2 Manual	Media manual
1	28,6	28,8	28,7	28,4	28	28,2
2	26,6	28,8	27,7	28,4	26	27,2
3	31	29	30	27,4	27	27,2
4	27,6	29,2	28,4	26,8	28,6	27,7
5	35,4	36,8	36,1	33,2	32,8	33
6	35,4	34,8	35,1	31,4	31,4	31,4
7	13,9	14,3	14,1	13,4	13,2	13,3
8	Out of range	Out of range	Out of range	89,2	75	82,1
9	11,9	13,8	12,85	12,6	12,3	12,45
10	29,4	31	30,2	28,2	28,8	28,5
11	30,6	32,8	31,7	32	30,8	31,4
12	23	21,2	22,1	21,6	20	20,8
13	36,4	36,8	36,6	32,2	29,8	31
14	19,5	19,8	19,65	19,7	19,5	19,6
15	18,8	16,9	17,85	18	16,7	17,35
16	0,37	0,376	0,373	0,454	0,424	0,439
17	28	22,4	25,2	28,4	24	26,2
18	27	25,2	26,1	28,2	27,6	27,9
19	35,4	28,4	31,9	24,2	25,4	24,8
20	34,8	31,2	33	27,8	29	28,4
21	32,6	30,8	31,7	30	28,4	29,2
22	24,2	31,6	27,9	28,6	27	27,8
23	29,2	25,8	27,5	23,2	22,6	22,9
24	24,2	28	26,1	29,4	26,2	27,8
25	34,8	25	29,9	23	22,8	22,9
26	28,4	29,6	29	30	26,6	28,3
27	30,2	28,4	29,3	26,8	23,8	25,3
28	34	28	31	25,4	24,6	25
29	27,2	28,4	27,8	29,2	26,2	27,7
30	29	30,6	29,8	25,8	28,4	27,1
31	30,2	28,6	29,4	26,2	26	26,1
32	0,3	0,282	0,291	0,264	0,252	0,258

Los resultados de la prueba t de Student entre las réplicas del robot y manual se pueden ver en la tabla 4 y 5 respectivamente.

Tabla 4. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas realizadas con el robot.

	R1 Robot	R2 Robot
Media	26,386129	25,6986452
Varianza	84,5784978	77,4776548
Observaciones	31	31
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	30	
Estadístico t	1,13497834	
P(T<=t) una cola	0,13268577	
Valor crítico de t (una cola)	1,69726089	
P(T<=t) dos colas	0,26537154	
Valor crítico de t (dos colas)	2,04227246	

Tabla 5. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas realizadas manualmente.

	R1 Manual	R2 Manual
Media	24,5231613	23,6830968
Varianza	65,9552394	61,8970674
Observaciones	31	31
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	30	
Estadístico t	2,95927576	
P(T<=t) una cola	0,00298487	
Valor crítico de t (una cola)	1,69726089	
P(T<=t) dos colas	0,00596974	
Valor crítico de t (dos colas)	2,04227246	

Por último, podemos ver en la Tabla 6 los resultados de la prueba t de Student para las medias del robot y las manuales y en la figura 15 una comparación entre ambas.

Tabla 6. Resultados de la prueba t para medias de dos muestras emparejadas.

	Media Robot	Media manual
Media	26,0423871	24,103129
Varianza	78,18458711	63,3016194
Observaciones	31	31
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	30	
Estadístico t	4,427273651	
P(T<=t) una cola	5,83437E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1,697260887	
P(T<=t) dos colas	0,000116687	

Valor crítico de t (dos colas) 2,042272456
Intervalo de confianza 0,8945671

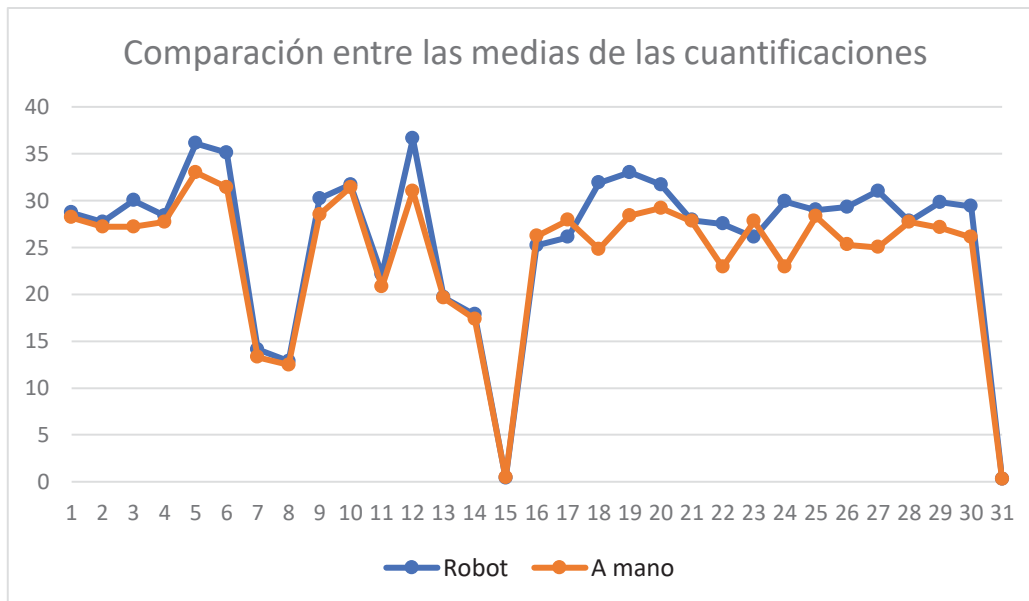


Figura 15. Gráfico comparando los resultados de las medias entre las cuantificaciones realizadas con el robot y las realizadas manualmente.

DISCUSIÓN:

La tecnología de secuenciación de ADN ha ido evolucionando a lo largo de los años y, hoy en día, se han convertido en herramientas rutinarias en los laboratorios gracias al aumento de su rendimiento y la reducción de sus costes (Goodwin *et al.*, 2016). Así, en un laboratorio de genética la preparación de genotecas para la secuenciación de alto rendimiento (HTS) conlleva muchas horas de pipeteo manual, por lo que un sistema automatizado de manipulación de líquidos puede facilitar la realización de protocolos complejos, aumentar la reproducibilidad, el rendimiento, ahorrando tiempo (Jemt, A., *et al.*, 2016). Sin embargo, para su implementación, hay que tener en cuenta ciertos puntos dependiendo de las posibilidades y requerimientos de cada laboratorio (Tegally *et al.*, 2020).

En este caso, vemos que el OT-2 ofrece un rendimiento (Tabla 3) inferior al del pipeteo manual, ya que el robot tarda más tiempo por muestra que una persona en los protocolos diseñados. Para grandes empresas, en las que es importante un alto rendimiento, puede que este robot se quede un poco pequeño y puedan invertir en sistemas de mayor rendimiento. Sin embargo, para laboratorios pequeños, un rendimiento medio-bajo puede llegar a ser de

gran ayuda (Tegally *et al.*, 2020). Así, si el protocolo está bien optimizado y puede realizarlo de manera autónoma, nos permitiría ahorrar mucho tiempo y evitar errores humanos y lesiones que causa el esfuerzo repetitivo (Storch *et al.*, 2020).

Si el ahorro de tiempo es un factor relevante, aún es más importante la precisión y exactitud del robot, ya que en protocolos de genómica se trabaja con volúmenes muy pequeños y a veces no se tiene mucha cantidad de muestra, por lo que no hay casi margen para los errores de pipeteo (Tegally *et al.*, 2020). Desde Opentrons, aseguran que su pipeta monocal (p-20) tiene una precisión de 5% en 1 μ l (Opentrons, 2021b), mientras que las pipetas manuales afirman tener un coeficiente de variación por debajo de 2,5% en 1 μ l (VWR), aunque estos resultados son difíciles de alcanzar dependiendo del personal y las técnicas utilizadas. Por ejemplo, el robot Agilent Bravo NGS asegura un coeficiente de variación del 11% frente al 18% del pipeteo manual (Agilent Technologies, 2017). En nuestros resultados, vemos que las cuantificaciones realizadas con el robot tienen una mejor reproducibilidad que las realizadas a mano (tablas 5 y 6), ya que el análisis realizado indica que en las cuantificaciones realizadas con el robot no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las muestras (p-valor= 0,26537154, tabla 5) replicadas, mientras que para las realizadas a mano hay diferencias estadísticamente significativas (p-valor=0,00596974, tabla 6). Sin embargo, en las hechas con el robot vimos que en 3 pocillos las puntas no pudieron aspirar al no romper la tensión superficial. Si comparamos las medias del robot con las manuales, el resultado obtenido (tabla 7) fue que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias (p-valor=0,000116687, tabla 7) y se estima que la diferencia de medias (Robot-Manual) es 1,94. Con una confianza del 95% podemos afirmar que la diferencia media entre las mediciones con robot y manuales está entre 1,04 y 2,83. Esto quiere decir que el humano o el robot pipetean consistentemente mal, aunque para disponer de datos más robustos, seguramente necesitaríamos realizar más réplicas para poder comparar mejor los resultados del robot con los manuales. Una posible explicación puede ser la calibración de las pipetas o errores puntuales que se pueden dar en el pipeteo manual. Sin duda, un aspecto a mejorar son las puntas utilizadas, ya que para protocolos complejos como el de purificación se necesita una gran precisión en el posicionamiento, que no podemos conseguir debido a la irregularidad de las puntas, y en protocolos más sencillos como el de cuantificación, seguimos teniendo errores eventuales en la aspiración. Otros robots para mejorar el coeficiente de variación y así la reproducibilidad, cuentan con puntas

conductoras para detectar los niveles de líquido dispensado, aunque su coste también se eleva considerablemente (Hamilton Company, 2021).

Por otro lado, una característica muy positiva de este robot es la flexibilidad. Al ser de programación de código abierto, nos permite diseñar protocolos muy diferentes, lo cual es una gran ventaja a la hora de adaptarse a nuevas necesidades del laboratorio (Camacho-Martínez *et al.*, 2021). Además, puedes añadir los módulos comentados a la estación de trabajo en función de tus requerimientos. Otro factor muy importante son los consumibles que pueden utilizarse, ya que en muchos robots solo tienes la posibilidad de utilizar los propios de su marca, lo cual suele aumentar los costes y en casos de desabastecimiento puede ser un problema importante (Posteraro *et al.*, 2020). En cambio, con el OT-2, como vimos puedes añadir tus consumibles siempre que cumplan unas medidas. Esta capacidad de adaptarse a diferentes consumibles, protocolos y necesidades es una gran ventaja.

Otro punto muy importante es la facilidad de uso. En este caso, vimos que teníamos tres opciones. Por un lado, el *protocol designer*, aunque es muy intuitivo, en nuestro caso fue insuficiente para modificar ciertos parámetros, por lo que si se llega a mejorar puede ser una herramienta muy útil para personas sin conocimientos informáticos. También tenemos la APY de Python, que nos permite realizar los protocolos lo más personalizados posibles, y aunque no es muy complicada, no es tan intuitiva y requiere un tiempo para familiarizarse con el lenguaje. Por último, tenemos la opción de usar protocolos hechos por el equipo de Opentrons o contratar su servicio de elaboración de protocolos, que dependiendo de nuestras posibilidades económicas puede ser una opción útil. En definitiva, a diferencia de otros robots, permite su utilización a trabajadores no especializados (Jessop-Fabre & Sonnenschein, 2019)

Por último, un factor relevante en el proceso de elaboración de genotecas es la contaminación (Hess *et al.*, 2020). En este aspecto, sería un punto para mejorar la papelera, en la que se acumulan con cierta facilidad las puntas y pueden llegar a desbordar, pudiendo contaminar las placas. Por otra parte, la incorporación del módulo de filtro HEPA es una opción interesante para evitar cualquier tipo de contaminación.

CONCLUSIÓN:

La preparación de genotecas para la secuenciación masiva requiere protocolos complejos y mucha mano de obra. Una solución puede ser la automatización mediante robots manipuladores de líquidos. Según los resultados obtenidos, para poder optimizar los protocolos complejos como la purificación con el robot OT-2 tendríamos que contar con otras puntas que sean más regulares. Por otro lado, para protocolos más sencillos como las preparaciones de PCR o la cuantificación, podemos trabajar con estas puntas, aunque podamos tener eventuales fallos al no romper la tensión superficial en pocillos con poco volumen. En la cuantificación, a pesar de que los datos no parecen muy replicables entre métodos, como lo único que nos interesa aquí es la cuantificación relativa entre muestras y no tanto los valores absolutos, creemos que las cuantificaciones en el robot son válidas para la realización de un pool.

En definitiva, parece que las soluciones de automatización dentro de un laboratorio de genética molecular son interesantes y prometedoras, pero requieren un esfuerzo de puesta a punto y optimización que es necesario conocer de antemano para valorar si su implementación resulta coste-efectiva para cada caso concreto.

BIBLIOGRAFÍA:

- Agilent Technologies. Fast, accurate sequencing starts here Accelerate your NGS success with automated sample prep. [Monografía en internet]. USA. 2017.[acceso en 27 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-4431EN.pdf>.
- Bick, D., Fraser, P. C., Gutzeit, M. F., Harris, J. M., Hambuch, T. M., Helbling, D. C., Jacob, H. J., Kersten, J. N., Leuthner, S. R., May, T., North, P. E., Prisco, S. Z., Schuler, B. A., Shimoyama, M., Strong, K. A., Van Why, S. K., Veith, R., Verbsky, J., Weborg, A. M., Jr, Wilk, B. M., Willoughby, R.E., Jr, Worthey, E.A. & Dimmock, D. P. (2017). Successful Application of Whole Genome Sequencing in a Medical Genetics Clinic. *J of pedi Genet.* 6(2): 61–76.
- Biodynami. SPRI Beads (microRNA & Oligo Purification) [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://biodynami.com/product/spri-beads-microrna-oligo-purification/>
- Callón, J. (2021). Piezas de impresión 3D [Imagen]. Imprenta 3D.
- Camacho-Martínez, P., Martín-Gutiérrez, G., Peñalva, G., Merino-Díaz, L., & Lepe, J. A. (2021). Optimización y adecuación de la capacidad diagnóstica para la realización de grandes volúmenes de RT-PCR de SARS-CoV-2. *Enf Infec y Micro Clíni.*
- De Donato, M., Peters, S.O., Mitchell, S.E., Hussain, T. & Imumorin, I.G. (2013). Genotyping-by-Sequencing (GBS): A Novel, Efficient and Cost-Effective Genotyping Method for Cattle Using Next-Generation Sequencing. *PL ONE.* 8(5): e62137
- Goodwin, S., Mcpherson, J.D. & Mccombe, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 17:333–35.

- Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *An rev of path.* 14: 319–338.
- Hamilton Company. Microlab STAR Liquid Handling System [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/platforms/microlab-star>
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C.A., Frimodt-Moller, N., & Aarestrup, F.M. (2014) Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 52:3136.
- Hawkins, T.L., O'Connor-Morin, T., Roy, A. & Santillan, C. (1994). DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Res.* 22 (21): 4543-4544
- Head, S.R., Komori, H.K., LaMere, S.A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D.R. & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotech.* 56: 61-64
- Hess, J.F., Kohl, T.A., Kotrová, M., Rönsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S. & Paust, N. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotech.* 41: 107537.
- Jemt, A., Salmén, F., Lundmark, A., Mollbrink, A., Navarro, J. F., Ståhl, P. L., Yucel-Lindberg, T. & Lundeberg, J. (2016). An automated approach to prepare tissue-derived spatially barcoded RNA-sequencing libraries. *Scien report.* 6(1): 1-9.
- Jessop-Fabre, M. M., & Sonnenschein, N. (2019). Improving reproducibility in synthetic biology. *Fron in Bioengi and Biotech.* 7: 18.
- Kennedy, K., Hall, M.W., Lynch, M.D., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J.D. (2014). Evaluating bias of illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Appl Environ Microbiol.* 80(18):5717–22.
- Mardis, E. & McCombie, W.R. (2017). Library Quantification: Fluorometric Quantitation of Double-Stranded or Single-Stranded DNA Samples Using the Qubit System. *Cold Spr Har Proto.* 2017(6): 094730
- Naito, T. & Okada, Y. (2021). HLA imputation and its application to genetic and molecular fine-mapping of the MHC region in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.*
- Oberacker, P., Stepper, P., Bond, D. M., Höhn, S., Focken, J., Meyer, V., Schelle, L., Sugrue, V.J., Jeunen, G.J., Moser, T., Hore, S.R., von Meyenn, F., Hipp, K., Hore, T.A. & Jurkowski, T. P. (2019). Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS bio.* 17(1): e3000107.
- Opentrons. Introducing Automation to Your Lab. [Monografía en internet]. USA. 2019. [acceso en 27 de diciembre de 2021a]. Disponible en: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjnh8zT6IP1AhV3iv0HHZpIB9IQFnoECAIQAO&url=https%3A%2F%2Fopentrons.com%2Fpublications%2Fultimate-guide-to-choosing-a-pipetting-robot-for-lab-automation.pdf&usg=AOvVaw1vSO1vavEP2yzjHT3iDI-1>
- Opentrons. Meet the OT-2 [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021b]. Disponible en: <https://opentrons.com/ot-2>
- Opentrons. OT-2 Python Protocol API Version 2 [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021c]. Disponible en: <https://docs.opentrons.com/v2/>
- Opentrons. Custom Labware Creator BETA [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021d]. Disponible en: <https://labware.opentrons.com/create/>
- Opentrons. Open-source Lab Automation, starting at \$5,000 [sede web] [acceso en 27 de diciembre de 2021e] Disponible en: <https://opentrons.com/>

- Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Intern Neur J.* 20(Suppl 2): S76–S83.
- Posteraro, B., Marchetti, S., Romano, L., Santangelo, R., Morandotti, G. A., Sanguinetti, M., & Cattani, P. (2020). Clinical microbiology laboratory adaptation to COVID-19 emergency: experience at a large teaching hospital in Rome, Italy. *Clini Micro and Infec.* 26(8): 1109-1111.
- Quail, M. A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P. J., Durbin, R., Swerdlow, H., & Turner, D. J. (2008). A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Natu methods.* 5(12): 1005–1010.
- Robin, J. D., Ludlow, A. T., LaRanger, R., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2016). Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. *Scien repo.* 6(1): 1-10.
- Storch, M., Haines, M. C., & Baldwin, G. S. (2020). DNA-BOT: a low-cost, automated DNA assembly platform for synthetic biology. *Synthetic Biol.* 5(1): ysaa010.
- Tegally, H., San, J.E., Giandhari, J. & De Oliveira, T. (2020) Unlocking the efficiency of genomics laboratories with robotic liquid-handling. *BMC Geno.* 21: 729.
- van Dijk, L.H., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 30: 418-426.
- van Dijk, L.H., Jaszczyszyn, Naquin, D., Y., Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 34: 666-681.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet Jan.* 10(1): 57-63.
- Xing, R.R.; Wang, N.; Hu, R.R.; Zhang, J.K.; Han, J.X.; Chen, Y. (2019). Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach. *Food Cont.* 101: 173–179.