

## Manual de operación de la estación robotizada cBot Illumina para construcción de clusters de librerías genéticas

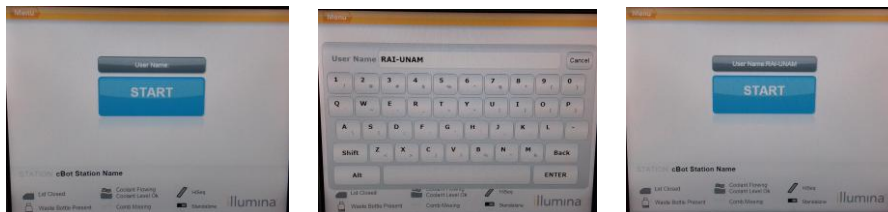


Adherirse al siguiente procedimiento para operar el equipo:

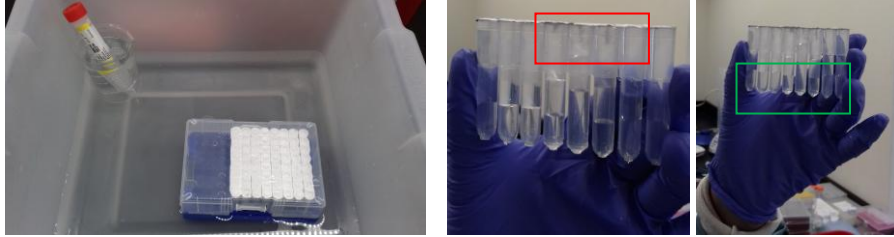
1. Encender el equipo presionando el botón en la parte inferior derecha del mismo, después presionar el botón de encendido ubicado en la parte frontal del lado izquierdo junto a los puertos USB, esto iniciará el software de operación.



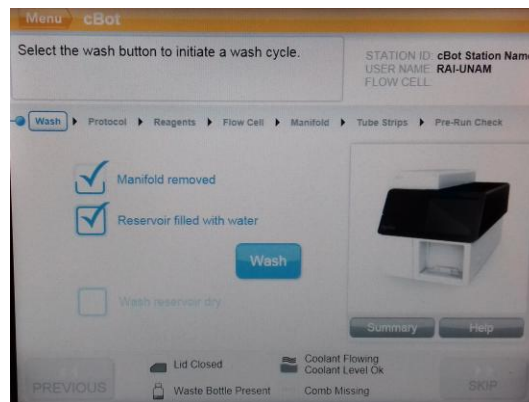
2. Una vez iniciado el software introducir el nombre del usuario y dar enter.



3. El rack de reactivos y el buffer HT1 se almacenan a  $-20^{\circ}$ , colocarlos durante unos 40 minutos en un baño con agua a temperatura ambiente y hasta que los reactivos se encuentren todos en estado líquido, verificar que no queden **trozos de hielo** y que todos los strips de reactivos tengan el **mismo volumen**.



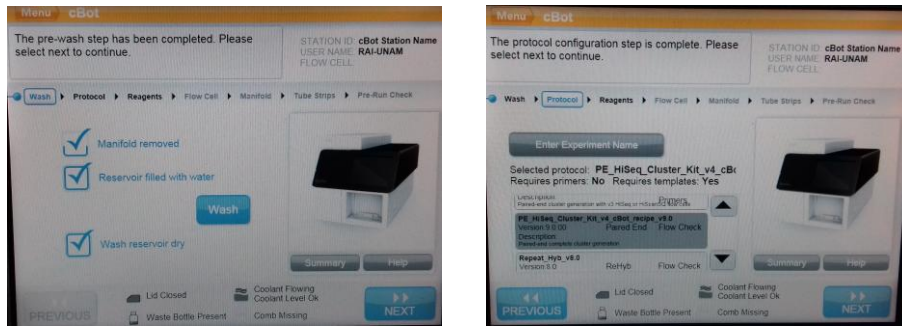
4. Enseguida el equipo requiere un lavado antes de iniciar la construcción de clusters, levantar la cubierta y el seguro de el área de desechos del cBot ubicado hasta el fondo de la plataforma de clusterización, llenar con agua miliq hasta el primer nivel y dar click en los recuadros que indican Manifold removed y Reservoir filled with water, después enter en Wash y esperar a que se lleve a cabo el lavado.



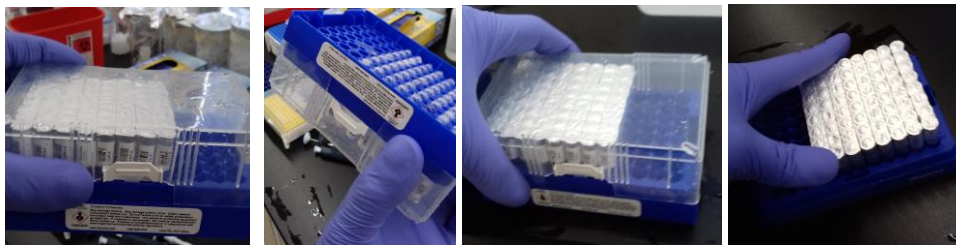
5. Terminado el lavado secar el área de desechos con un kimwipe sin tocar los orificios de drenaje ya que la fibra del papel puede migrar hacia ellos y tapan el sistema de tuberías, abrir la compuerta en la parte frontal y eliminar los desechos en un bote especial para formamida, desechar de acuerdo al protocolo indicado por el Biólogo Abdalá Rodríguez Assad.



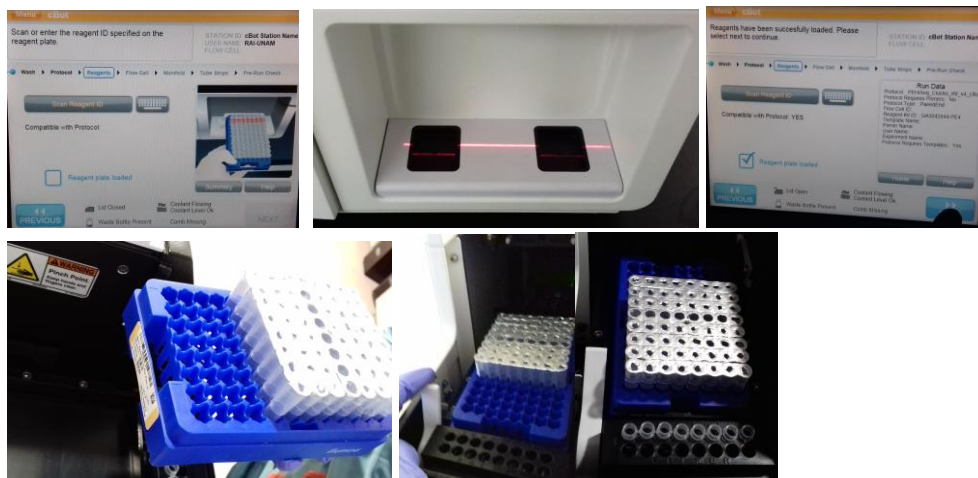
6. Dar click en el recuadro de Wash reservoir dry y en Next, en la ventana siguiente seleccionar el tipo de protocolo que se va a usar, para corridad de High Output es el PE-HiSeq Cluster v4 cBot r cipe v9.0 y dar click en Next.



7. Invertir el rack de reactivos diez veces de arriba abajo y dar un vortex ligero, verificar que los strips con reactivos est n bien asegurados dentro del rack presion ndolos en la parte superior, dar un vortex ligero y eliminar el exceso de agua golpeando ligeramente el rack contra una superficie sólida, algunos sugieren perforar el foil de aluminio de los tubos con una punta nueva para cada hilera, presionar los tubos con reactivos para asegurarlos en el rack.



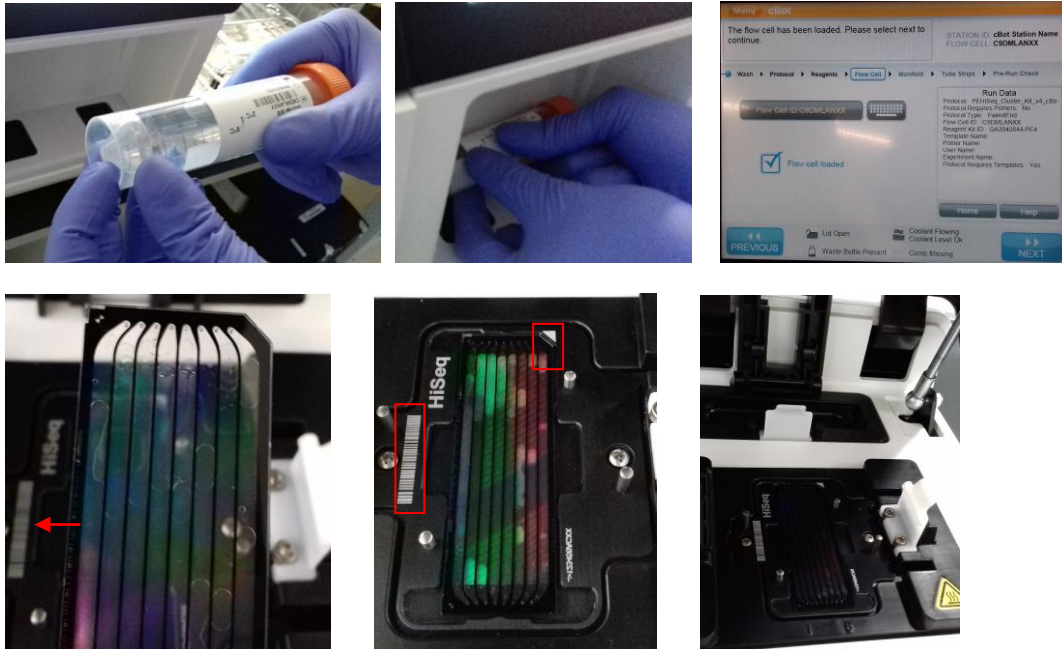
8. El equipo solicita escanear el rack de reactivos, escanear el rack en la parte frontal del cBot dando click en Scan reagent ID, colocar el rack con el código de barras hacia dentro del cBot, bajar la palanca blanca a la izquierda del rack para asegurarlo en su posición.



- Sacar la celda de flujo de su tubo con unas pinzas y tomarla de los lados, lavar los restos del buffer de sales con agua miliq y secar la celda con kimwipes, posteriormente colocar un poco de etanol al 70% sobre la superficie de la celda y eliminar con cuidado los restos de sales del buffer, guardar el tubo y el buffer pues en caso de que hubiera algún problema con la clusterización esta puede guardarse de nuevo en dicho buffer, verificar a contraluz que no queden restos de sales sobre la superficie de la celda ya que interferirían con la toma de fotografías en el secuenciador.

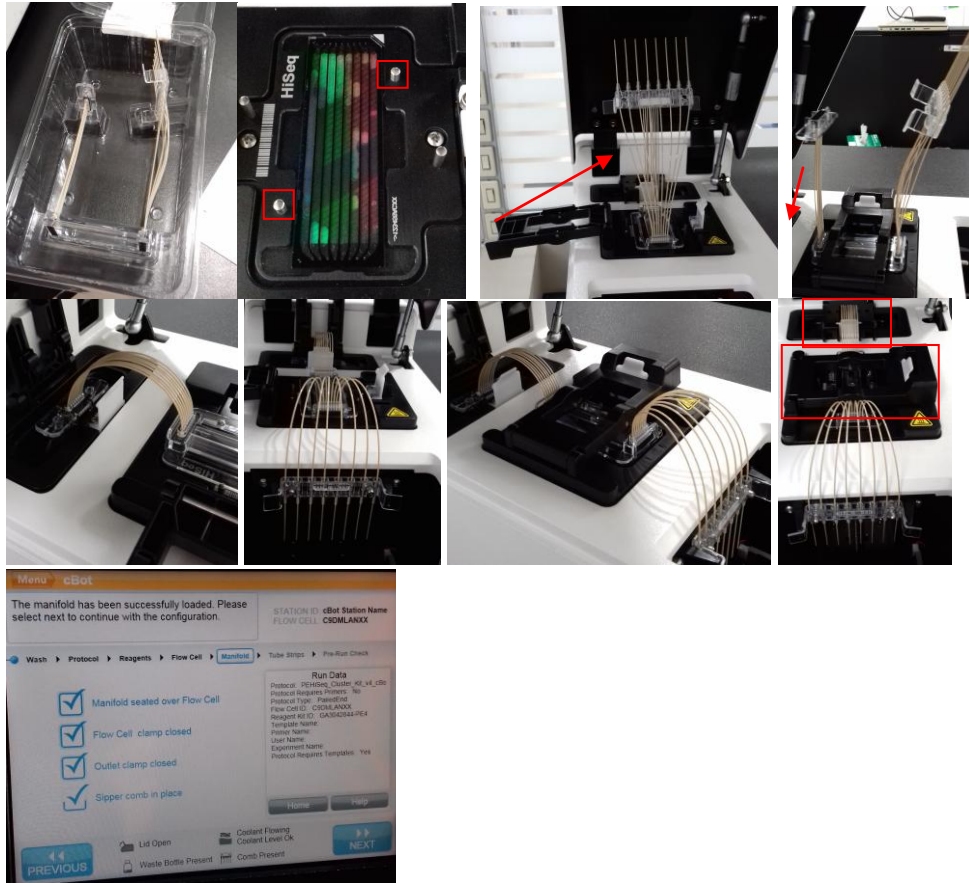


- Escanear el código de barras de la celda de flujo y colocarla con los orificios boca abajo en el área central del cBot de modo que el código de barras de la celda quede del lado del ícono de código de barras de la plataforma y la muesca superior derecha embone correctamente.

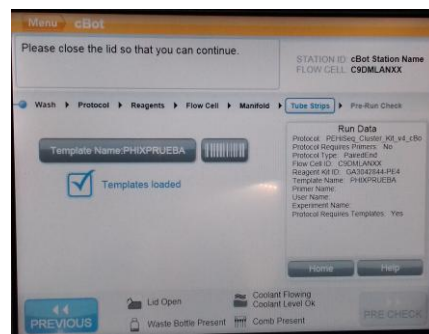




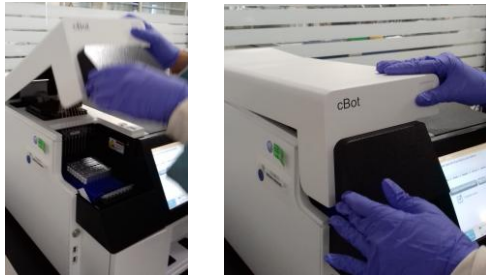
- Colocar el manifold sobre la flow cell de modo que embone en los seguros metálicos, cerrar el seguro del manifold (flow cell clamp) y bajar primero las mangueras de desechos y hacer que embonen en los seguros metálicos de la parte del fondo de la plataforma (donde se efectuó el lavado), cerrar el clamp de desechos, después bajar las mangueras para reactivos y colocar el peine en los seguros metálicos en la parte de enfrente, dar click manualmente en los recuadros de manifold, outlet clamp y sipper comb .



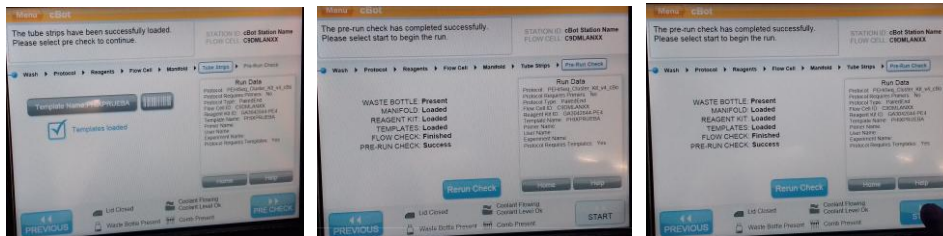
- Colocar los templates en la hilera frontal de la gradilla del equipo, enumerar los tubos en dirección 1 – 8 en función del número de muestras pero colocarlos sobre la gradilla frontal del cBot en dirección 8 – 1 en donde dice templates, verificar antes y después de la corrida que el volumen de los templates sea el mismo y que al terminar haya disminuido uniformemente, también verificar el volumen de los reactivos fila por fila de la gradilla, al inicio debe ser el mismo y al final debe haber disminuido el mismo volumen. Dar click en next.



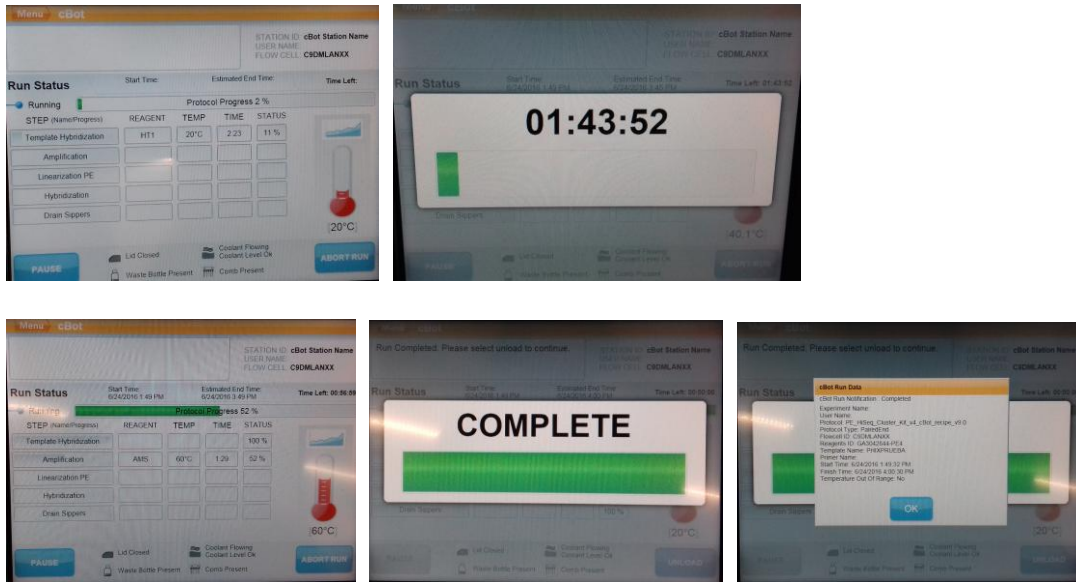
13. Una vez realizadas las verificaciones y colocados los reactivos y las muestras cerrar la tapa del cBot.



14. Dar click en Prerun check y esperar a que el equipo realice todas las verificaciones necesarias, en caso de que haga falta alguna corrección el equipo lo indicará (p.ej. si el rack de reactivos se colocó con el código de barras hacia el usuario, y no hacia dentro del aparato no lo leerá y marcará error), verificar la fuente de error y corregirla, después dar en Rerun check, si todo está bien el equipo dará la opción de comenzar la clusterización de la celda, dar click en start.



15. Monitorear la progresión de la clusterización, suele tardar entre 2 y 4 horas, la pantalla indica el estatus del experimento, si no es exitosa dar click en Abort run, existe la opción de reclusterizar la celda, verificar si las muestras son las correctas y cargar de nuevo, si es exitosa el ensayo continuará hasta que el equipo indique que ha concluido, proseguir la secuenciación en el HiSeq 2500 de acuerdo al protocolo del ensayo.



16. Una vez terminado el ensayo desmontar el equipo, primero el rack de reactivos, guardarlo o desecharlo en la bolsa blanca, vaciar los residuos en un recipiente y entregarlos al Biol. Abdalá Rodríguez Assad, quitar primero las mangueras del manifold de residuos abriendo el seguro y colocando un dedo sobre las mangueras antes de desensamblarlo para que al soltarse no salpique al usuario, después quitar el seguro de la celda de flujo y el peine de reactivos del manifold, quitar la cubierta de la celda con cuidado de no desprenderla de la plataforma, después quitar la celda de flujo, verificar que los volúmenes de reactivos y de los templates hayan disminuido uniformemente, dar un lavado final con agua miliq.

