

Beschreibung des automatisierten Experiments – Teil I

1. Systemübersicht

Das automatisierte System besteht aus:

- Einem nivellierten Gehäuse mit einem On-Site-Computer, der es dem Benutzer ermöglicht, das Experiment jederzeit zu bedienen und den Status zu überwachen; muss mit der Datenbank verbunden sein und Daten aus der Datenbank visualisieren können.
- Einer Position zum Einsetzen und Entfernen von drei Gestellen (siehe Gestell-Eigenschaften unten) durch den Bediener, ohne den sterilen Zustand des Systems zu beeinflussen. Die Gestelle werden durch Magnete oder andere langlebige Haltevorrichtungen an definierten Positionen fixiert, damit der Roboter die Platten zuverlässig greifen kann. Vorzugsweise sollten die Gestelle innerhalb des sterilen Laminar Flow platziert werden.
- Plattengreifer, der Platten verschiedener Hersteller im 96- und 384-Well-Format greifen kann.
- OD600 plate reader für 96- und 384-Well-Platten, muss Daten in der On-Site-Datenbank speichern können, muss einen beheizbaren Deckel haben, um Kondensation am Deckel zu entfernen, und muss Schütteln (linear und orbital) durchführen können.
- Ein System zum Entfernen des Deckels einer Platte, zum sterilen Aufbewahren des Deckels und zum Wiederaufsetzen des Deckels auf die Platte.
- Mehrkanaldispenser (mindestens 4 Kanäle, 10–1000 µL Bereich, kompatibel mit 96- und 384-Well-Platten, muss sterile Flüssigkeiten dispensieren können / muss reinigbar sein, muss Silicone Öl dispensieren können (Sigma-Aldrich 378321 Viskosität 10 cSt bei 25°C, PDMS, Polydimethylsiloxane)).
- Pipettierkopf (dessen Aspirationsposition der Spitzen vom Benutzer auf definierte Punkte innerhalb des Wells gesetzt werden kann, einschließlich Bottom-Aspiration. Cherry-picking muss möglich sein).
- Lagerkapazität für mindestens 40 × 384-Well-Platten mit Deckeln; Pipettenspitzen sowie mindestens 10 × 96-Well-Platten mit Deckeln.
- Ein Bereich zum Sammeln von Abfall (L2-sicher, Verbrauchsmittel, usw.).
- 2 herausnehmbare Inkubationsgestelle für insgesamt mindestens 40 × 384-Well-Platten.
- 1 herausnehmbares Ausgabegestell für mindestens 20 entweder 384-Well- oder 96-Well-Platten.
- Lager- und Handhabungsmöglichkeit für 96-Well-Platten.
- Persistente, stromausfallsichere, redundante Datenbank zur vollständigen Nachverfolgung des Experimentzustands, zugänglich sowohl On-Site als auch Off-Site (z. B. Büro).

Umweltanforderungen

- Betrieb in einer vollständig geschlossenen, sterilen Umgebung (mindestens ISO 5) mit Laminar Flow und Überdruck beim Öffnen der Türen.
- Ausgestattet mit mehreren UV-Lichtquellen zur vollständigen Dekontamination.
- Arbeitsbereich wird von einer oder mehreren fernsteuerbaren Kameras überwacht.
- Kameradaten werden 1 Monat gespeichert und sind für Troubleshooting zugänglich.
- Fehlermeldungen während des Laufs werden per E-Mail gesendet, um schnelles Troubleshooting auch außerhalb der Kernarbeitszeiten zu ermöglichen.
- Der Roboter stoppt die Arbeit, wenn der Arbeitsbereich durch einen Menschen betreten wird (Sicherheitsfunktion).

2. Datenmanagement-Prinzipien

Für **jedes Well** müssen folgende Daten persistent gespeichert werden:

- Eindeutige Platen ID (inklusive Experiment ID)
- Well-Position
- Raw OD600 Werte (alle Zeitpunkte)
- Blank-korrigierte Werte (falls zutreffend)
- Logischer Status:
 - „blank“
 - „keep“
 - „ignore“
 - „ready for cherry-picking“
 - „cherry-picked“
 - „selected“
- Cherry-picking Historie (Source–Destination Mapping)
- Zeitstempel und Tagesindizes

Die Datenbank sollte bereitstellen:

- Menschlich lesbare Reports
- Einfaches Filtern und Well-Tracking
- Exportfunktion der Daten als .csv-Dateien
- 24/7 Zugriff (auch wenn kein Experiment läuft)
- Eine mehrstufige Struktur, die Daten in entsprechende vom Benutzer definierte Ordner/Ebenen organisiert
- Enthält alle gesammelten Daten

Alle Experimentphasen müssen restart-sicher sein. Jede Datendatei wird nach jeder neuen Information gespeichert, um Datenintegrität nach Stromausfällen oder Geräteausfällen zu gewährleisten. Beispiel: Wenn der Strom ausfällt und wiederkehrt, muss das Experiment an der Stelle fortgesetzt werden können, an der der Stromausfall aufgetreten ist. Die Daten sollten auf einem RAID-1-System (oder besser) gespeichert werden. Externe Festplatten können hierfür verwendet werden.

I.1 Einrichten eines Experiments

Anfangsbedingungen

Ein Mensch registriert ein neues Experiment in der Datenbank durch Angabe von:

- Eindeutige Experiment-ID
- Experiment-Code (3 Zeichen und/oder Zahlen in Groß- oder Kleinschreibung)
- Metadaten (Probenherkunft, Datum, Benutzer usw.)
- Anzahl der 384-Well-Platten, die Teil dieses Experiments sind (1–40)

Dispenser Kanal Konfiguration

- Kanal 1: Media + Sample Mischung
- Kanal 2: Medium only
- Kanal 3: Silicone oil (Sigma-Aldrich 378321 Viskosität 10 cSt bei 25°C, PDMS, Polydimethylsiloxane)
- Kanal 4+: Optional

Plate Supply

- 1–40 384-Well-Platten werden in Vorratsgestellen bereitgestellt (mit Deckel gelagert).
- Das System muss sowohl 384-Well- als auch 96-Well-Platten unterstützen.
- Platten müssen während der Lagerung steril gehalten werden.

Loading Procedure (Durchgeführt X-mal, X = 1–40)

Für jede Platte:

1. Roboter entnimmt eine 384-Well-Platte mit dem Greifer aus dem Vorratsgestell.
2. Platte wird zum Dispenser Deck transferiert.
3. Deckel wird entfernt und in eine definierte temporäre Deckelposition gelegt, wobei er steril bleibt.
4. Reihe A wird mit 10–40 µL Medium (Blank control + Sterile control) ohne Luftblasen befüllt.
5. Reihen B–P werden mit 10–40 µL Sample + Medium ohne Luftblasen befüllt.
6. Alle Wells werden mit 10–20 µL Silikonöl überschichtet, ohne Luftblasen einzubringen.
7. Deckel wird wieder auf die Platte gesetzt.
8. Platte wird in das herausnehmbare Inkubationsgestell transferiert.
9. Plattenstatus und Ladebestätigung werden in die Datenbank geschrieben.

Der Vorgang wird wiederholt, bis X Platten geladen sind.

I.2 Initiale Zwei-Wochen-Messphase

Initiale Well-Zustände

- Reihe A → Status: „blank“
- Alle anderen Wells → Status: „keep“

Tägliche Messprozedur (14 aufeinanderfolgende Tage)

Für jede Platte (insgesamt X Platten):

1. Platte aus dem Inkubationsgestell entnehmen.
2. Zum plate reader transferieren.
3. Deckel entfernen.
4. OD600 für alle Wells messen.
5. Mittleren OD600 der Blank-Wells (Reihe A) berechnen.
6. Wenn OD600 von Reihe A $> 0,1$ → pausieren und Mensch informieren: „sterility issue check“
7. Für jedes Well mit Status „keep“:
 - OD600 mit $2 \times$ mittlerem Blank-OD oder benutzerdefiniertem Wert vergleichen.
 - Wenn $OD600 > 2 \times$ Blank-Mittelwert oder benutzerdefinierter Wert:
 - Status auf „ignore“ setzen.
8. Speichern:
 - OD Werte als Rohdaten
 - Blank OD als Rohdaten und berechneter mittlerer Blank OD
 - Statusänderungen
 - Zeitstempel und Tagesindex
9. Deckel wieder auf Platte setzen.
10. Platte zurück in ursprüngliche Rack-Position stellen.

Täglich wiederholen für 1–14 Tage.

Am Ende der zweiwöchigen Messphase:

- Datenbank enthält vollständige Messhistorie.
 - Inkubationsgestelle werden entfernt und anderweitig inkubiert.
 - Experiment wird pausiert und andere Experimente können zwischendurch durchgeführt werden.
-

I.3 Neustart nach zwei Monaten

Initialisierung

1. Roboter lädt gespeicherte Well-Zustände aus der Datenbank.
2. Mensch gibt OD600 Selection Threshold vor.
3. Mensch stellt beide Inkubationsgestelle bereit.

Messprozedur

Für jede Platte:

1. Platte entnehmen.
2. Zum Reader transferieren.
3. Deckel wenn nötig entfernen.
4. OD600 in allen Wells messen.
5. OD600 Rohwerte speichern.
6. Deckel ggf. wieder aufsetzen.
7. Platte zurück ins Gestell stellen.

Selektion

Für jedes Well:

- Wenn Status = „keep“
- UND OD600 > mensch-definierter Threshold
- Status wird auf „ready for cherry-picking“ gesetzt.

Roboter meldet Anzahl der bereiten Wells an den Menschen.

Mensch entscheidet:

- Cherry-picking starten und danach Inkubation fortsetzen
- Inkubation ohne Cherry-picking fortsetzen

I.4 Cherry-Picking Prozedur

Vorbereitung der 96-Well-Platten

Für Y benötigte 96-Well-Platten:

1. Platte aus Vorrat entnehmen.
2. Deckel entfernen, steril halten.
3. Reihe A mit 50–100 µL sterilem Medium füllen (Blank control + Sterility control).
4. Restliche Wells mit 50–100 µL Medium füllen.
5. Vorbereitungsevent in Datenbank speichern.

Transferprozedur

Für jedes Well mit Status „ready for cherry-picking“:

1. Entsprechende 384-Well-Platte entnehmen.
2. Deckel entfernen.
3. 30 µL vom Boden des Source Wells aspirieren.
4. In ein eindeutiges Destination Well in der 96-Well-Platte (außer Reihe A) dispensieren.
5. Source Well Status auf „cherry-picked“ setzen.
6. Source–Destination Mapping in Datenbank speichern.
7. Wiederholen, bis alle Wells übertragen wurden.
8. Deckel wieder auf 384-Well-Platte setzen.
9. 384-Well-Platte zurück ins Inkubationsgestell stellen.

Nach Abschluss:

- Deckel auf 96-Well-Platte setzen.
 - 96-Well-Platten im Ausgabegestell lagern.
-

I.5 Inkubation der Kandidat-96-Well-Platten

Für jede Kandidatenplatte (1–20 Tage, Entscheidung durch Mensch):

Täglich:

1. Platte entnehmen.
2. Zum Reader transferieren.
3. Deckel entfernen.
4. OD600 messen.
5. Mittleren Blank berechnen (Reihe A).
6. Wenn mittlerer Blank $> 0,1$ → pausieren und Mensch informieren „potential sterility issue“.
7. Blank von allen anderen Wells abziehen.
8. Werte in Datenbank speichern.
9. Deckel wieder aufsetzen.
10. Platte zurück ins Gestell stellen.
11. Daten grafisch anzeigen: OD600 Verlauf über Zeit für jedes Well separat.

Mensch weist Plattenstatus zu:

- „ready“
- oder „continue incubation“

Platten mit Status „ready“ werden zu „master plates“.

I.6 Masterplattenausgabe

Für jede Platte mit Status „ready“:

1. Masterplatte entnehmen.
2. Neue 96-Well Kultivierplatte entnehmen → „backup plate“.
3. Deckel der Backupplatte entfernen.
4. Alle Wells der Backupplatte mit 100 µL Medium füllen.
5. Deckel der Masterplatte entfernen.
6. 40 µL aus jedem Master Well in entsprechendes Backup Well transferieren.
7. Deckel wieder auf Backupplatte setzen.
8. 96-Well PCR Plate entnehmen.
9. 5 µL aus jedem Master Well in PCR Plate transferieren.
10. Deckel wieder auf Masterplatte setzen.
11. Mapping in Datenbank speichern.
12. Master, Backup und PCR Plates an Menschen über Ausgabegestell übergeben.
13. Masterplatte als „completed“ markieren.

Wiederholen, bis keine „ready“-Platten mehr vorhanden sind.

I.7 Weitere Neustarts (6 Monate und 1 Jahr, ggf. anpassbar)

Bei jedem Neustart:

1. Well-Zustände aus Datenbank laden.
 2. OD600 Messung durchführen (wie in I.3).
 3. Neuen mensch-definierten Threshold anwenden.
 4. Wells, die:
 - Status „keep“ haben
 - nicht „cherry-picked“ sind
 - Threshold überschreiten→ werden zu „ready for cherry-picking“.
 5. Cherry-picking durchführen (I.4).
 6. Platten zurück ins Gestell stellen.
 7. Alle Updates persistent speichern.
-

I.8 Finales Cherry-Picking von Stämmen

Nachdem die Sanger 16S rRNA Gene Sequencing durchgeführt und ausgewertet wurde (In-House AI System), wählt der Mensch Wells aus, die den Status „strain_experiment code_#column_#row“ in der Datenbank erhalten. Die Datenbank ändert den logischen Status dieser Wells auf „selected“.

- Z 96-Well „Master Plates“ werden über das Output rack an den Roboter übergeben.
 1. Masterplatte entnehmen.
 2. Neue 96-Well Kultivierplatte entnehmen → „strain plate“.
 3. Deckel der Strain Plate entfernen.
 4. Alle Wells der Strain Plate mit 50 µL Medium füllen.
 5. 100 µL aus jedem Master Well mit Status „selected“ in die Strain Plate transferieren (Zählung n = 1–96).
 6. In Datenbank speichern, welche Historie jedes Strain Plate Well hat.
 7. Wenn keine „selected“ Wells mehr in Masterplatte und n < 96 → Masterplatte zurück ins Kultiviergestell und nächste Masterplatte holen → zurück zu Schritt 6.
 8. Wenn n = 96 → Deckel auf Strain Plate setzen und Strain Plate ins Ausgabegestell stellen.
 9. Wiederholen, bis keine Masterplatte mit Wells im Status „selected“ mehr vorhanden ist.
 10. Strain Plates über Ausgabegestell an Menschen übergeben.
-

I.9 Allgemeine technische Einschränkungen

1. Alle Volumina müssen innerlich plattenspezifischer Limits benutzeranpassbar sein.
2. Alle Pipettierschritte müssen:
 - Luftblasenbildung vermeiden
 - Bottom aspiration verwenden, wo erforderlich
 - Optionalen Slow dispense Modus enthalten
3. Alle Phasen müssen Neustart-sicher sein.