

## Textuelle Beschreibung des automatisierten Experiments – Teil II

### 1. Systemübersicht

Das automatisierte System zur Durchführung von Teil II muss in der Lage sein, eine Vielzahl von Aufgaben auf Basis molekularbiologischer Kits von Drittanbietern auszuführen. Allgemeine Merkmale:

- Vollständig geschlossen
- Nicht steril, jedoch muss eine Dekontamination über integrierte UV-Lichter möglich sein
- Platz für ein zusätzliches automatisiertes Phasenkontrastmikroskop
- Geeignet für NGS und andere molekularbiologische Arbeiten
- Möglichkeiten zur Kühlung von Platten und Reaktionsgefäßen (0.5, 1.5 und 2 ml)

### 2. Datenmanagement-Prinzipien

Es ist wichtig, die Proben-IDs des Sanger-Sequenzierungsansatzes mit den Wells zu verknüpfen, aus denen die Proben stammen (Teil I). Sobald die Sanger-Daten verarbeitet wurden, entscheidet der Mensch, welche Wells ausgewählt werden; diese erhalten dann im Datenbanksystem den logischen Status „selected“. Diese Wells bekommen eine Stammkennung im Format „strain\_experiment code\_#column\_#row“.

### 3. Aufgaben und Reaktionssysteme (Kits)

Jede Aufgabe sollte als separates Experiment durchgeführt werden. Der Mensch liefert Eingaben, z. B. wie viele Reaktionen durchgeführt werden. Beispielsweise, wie viele 96-Well-PCR-Platten für die 16S-rRNA-Gen-PCR bereitgestellt werden.

#### 16S-rRNA-Gen-PCR

Die PCR wird mit einem Primerpaar für alle Reaktionen durchgeführt sowie mit einem vom Menschen vorbereiteten Mastermix, der diese Primer enthält (DreamTaq von ThermoFisher). Der Mastermix (ca. 5,5 ml) wird vom Menschen bereitgestellt und muss in einem oder mehreren Gefäßen gekühlt werden.

#### PCR-Aufreinigung

Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (<https://www.mnnet.com/de/nucleospin-gel-and-pcr-clean-up-mini-kit-fuer-gelextraktion-undpcr-clean-up-740609.50>) oder eine äquivalente magnetische Bead-basierte Methode.

#### Qubit-Messungen

1× dsDNA BR Kit (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33265>)

#### Whole-Genome-Amplifikation

Qiagen REPLI-g Single Cell Kit (<https://www.qiagen.com/deus/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcrdpcr/preamplification/repli-g/repli-g-single-cell->

[kit?catno=150343](#)); bis zum Debranching (T7-Verdau) wird nur  $\frac{1}{4}$  des Reaktionsvolumens verwendet, danach das volle Volumen.

### **Oxford-Nanopore-Sequenzierung – Bibliotheksvorbereitung**

Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) <https://store.nanoporetech.com/eu/native-barcoding-kit-24-v14.html>