

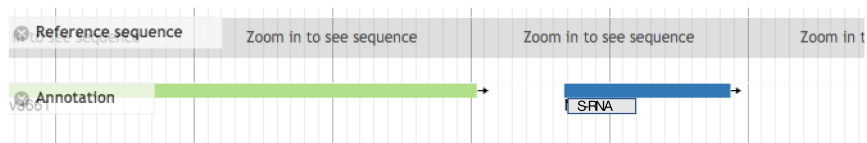
ANEXO 2. DESARROLLO DEL CONTROL POSITIVO PARA LA DETECCIÓN DEL BIOMARCADOR sRNA MTS2823 de *Mycobacterium tuberculosis*

Este dispositivo genético fue diseñado para expresar directamente el sRNA de *M. tuberculosis*. Para ello, se seleccionó el plásmido pBADGIII que tiene como característica que se induce con arabinosa. En primer lugar, se realizó una amplificación del sRNA empleando primers que flanquearan la región completa de 300 pb, localizada en la región genómica 4100641 y 4101198 del genoma de MTB y localizada entre los genes Rv3661 - Rv3662c del listado de Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>)

Posteriormente, se introdujeron sitios de restricción para la enzima Pst1 en el fragmento amplificado mediante PCR

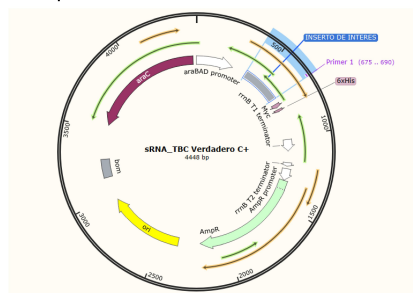
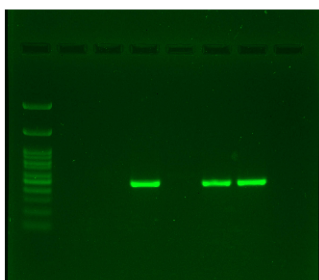
El vector fue cortado con la misma enzima y se procedió a ligar el amplificado del sRNA con el vector

CONSTRUCCIÓN DEL CONTROL POSITIVO DEL s-RNA DE *Mycobacterium tuberculosis*



Se diseñaron primers forward y reverse flanqueando el sRNA y con sitios de restricción para la enzima Pst1

El fragmento amplificado fue donado en el vector de expresión araBADGIII

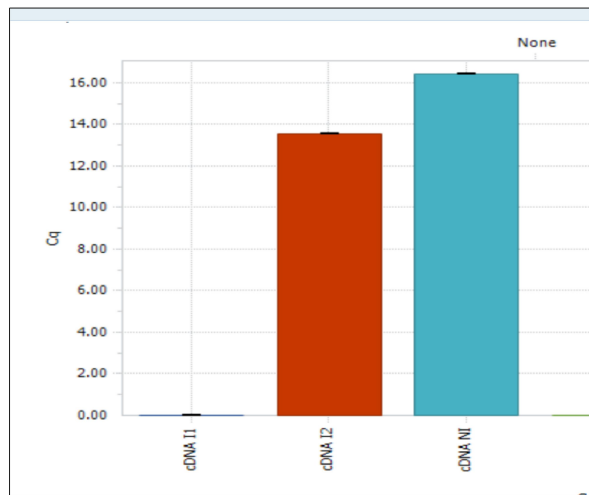


La orientación y la secuencia del fragmento clonado del sRNA de Mtb fue confirmado mediante la reacción de qRT-PCR previamente estandarizada sobre DNA total de *Mycobacterium tuberculosis* y mediante secuencia Sanger.

EXPRESIÓN DEL sRNA EN EL VECTOR pBADGIII

El plásmido que contiene el control positivo (pBADGIII-sRNA), fue inducido en fase logarítmica con arabinosa, las células de *E. coli* fueron lisadas y luego de

tratamiento con DNAsa, se extrajo el RNA total. Luego de purificación, se llevo acabo la transcripción reversa para construir el cDNA. Como se puede observar en la figura, los resultados evidencian la detección del sRNA. La barra roja es el clon inducido y la azul el clon sin inducir, el carril uno es el control negativo correspondiente al plásmido sin inserto.



Amplificación del control positivo (RNA total de E. coli con el clon del sRNA empleando la sonda No 1

A partir del RNA total purificado del clon pBADIII-sRNA inducido con arabinosa, se realizaron los primeros estudios de sensibilidad de la qRT-PCR-TB-Biomarker. Como se puede observar en la grafica se detectan 3,5 pico gramos/ul del sRNA.

Curva de calibración a partir de RNA total

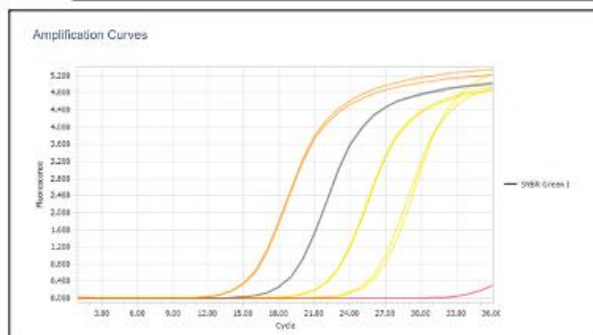
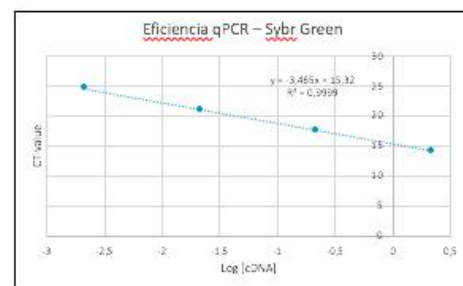


Figura 1. Sensibilidad de detección por qPCR para el sRNA-TBC- Sybr Green

Concentración inicial: 3,56 ng/μl

Log [cDNA]	Ct	N -copias
0,330	14,22	6641000000
-0,6695862	17,59	6641000000
-1,6695862	21,07	6641000000
-2,6695862	24,61	6641000000



Estos resultados nos indican que el control positivo está listo para ser incluido en el Kit diagnóstico.

Aún tenemos que determinar si el kit contendrá el pBADIII-sRNA de MTB o si por el contrario se incluirá el RNA total como control (+).

CONFIDENCIAL