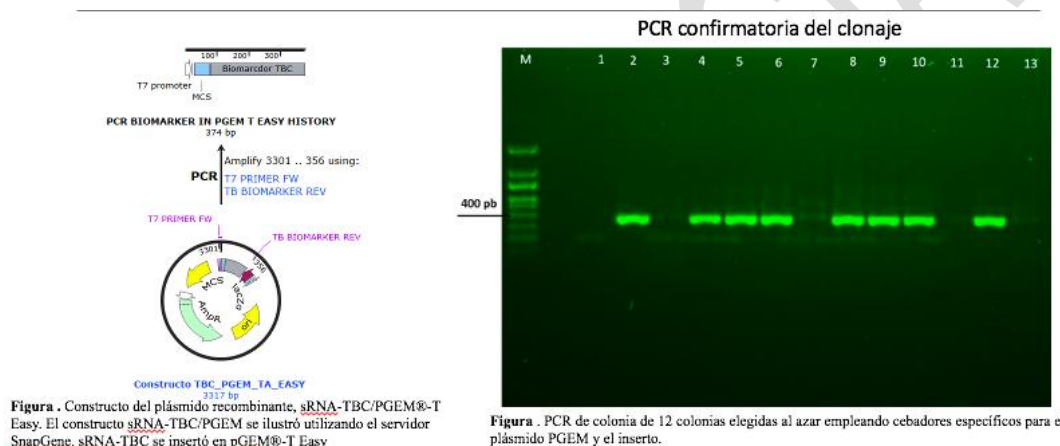


ANEXO 3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) DEL sRNA DE Mycobacterium tuberculosis EN CONDICIONES DE LABORATORIO

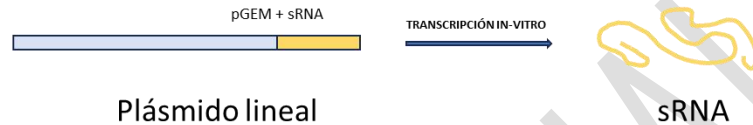
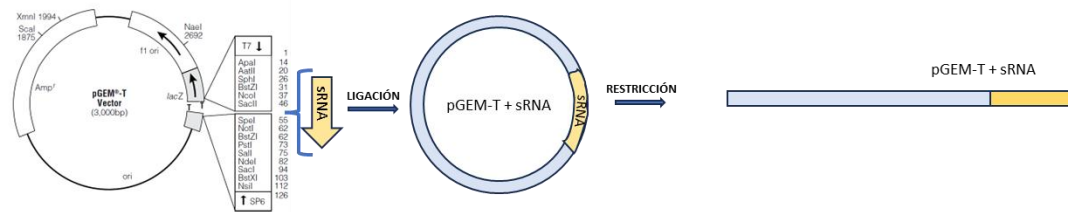
Con el fin de determinar el límite de detección del sRNA de Mycobacterium tuberculosis, se llevaron a cabo experimentos de transcripción “in vitro” que aseguran la expresión y purificación exclusivamente del sRNA. Para ello se empleó el kit megascript t7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific).

Inicialmente, el fragmento de 300 pb correspondiente a la totalidad del sRNA fue sub-clonado en el vector pGEMT Easy Vector (Thermo Fisher Scientific). Este vector se caracteriza porque el fragmento insertado queda bajo el control del promotor T7 de la RNA polimerasa del virus T7. Otra característica del vector es que tiene un sitio múltiple de clonaje que facilita su linearización lo que asegura que la RNA polimerasa transcriba solamente el inserto clonado.



Una vez confirmada la orientación y la secuencia completa del fragmento por Sanger, el plásmido fue purificado con el kit miniprep de Quiagen, posteriormente se linearizó con la enzima PstI y se llevó a cabo la transcripción in vitro como lo muestra la figura a continuación:

pGEM[®]-T Vector Map and Sequence Reference Points



Como resultado de la transcripción obtuvimos 86 µg del sRNA de Mtb.

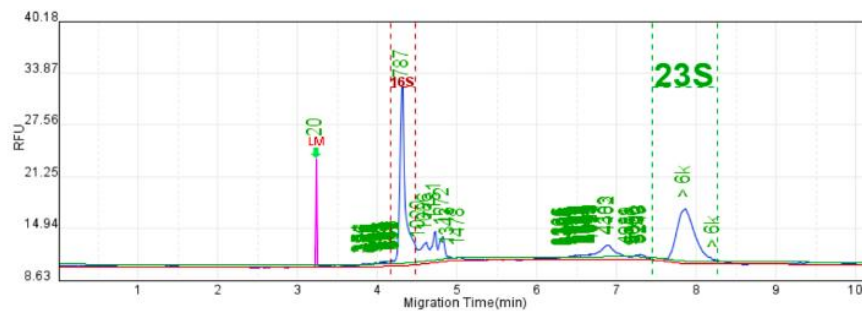
Tabla . Cuantificación por Qubit 2.0 de una dilución 1:10 del RNA (sRNA-TBC y Control positivo) obtenido de la transcripción *in vitro*.

Muestra	Concentración
RNA- sRNA-TBC	1720 ng/µl
RNA- Plantilla Control	>1000 ng/ml

Con el fin de determinar su integridad y pureza, se realizaron pruebas empleando electroforesis capilar en un Bioptic (Taiwan). De acuerdo con la migración en el capilar, observamos una banda mayoritaria que asumimos corresponde al sRNA (375 pb), no está degradado y se encuentra en alta pureza.

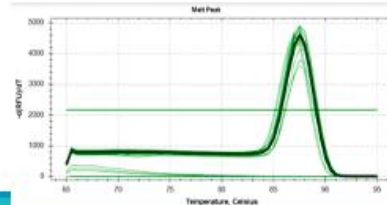
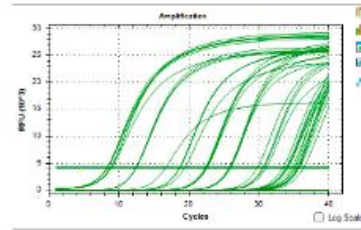
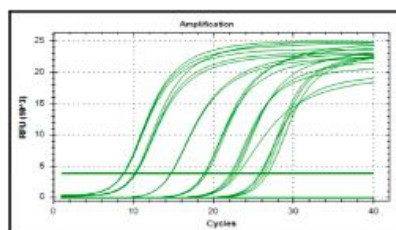
Integridad del RNA – sRNA-TBC

RQN: 7.73



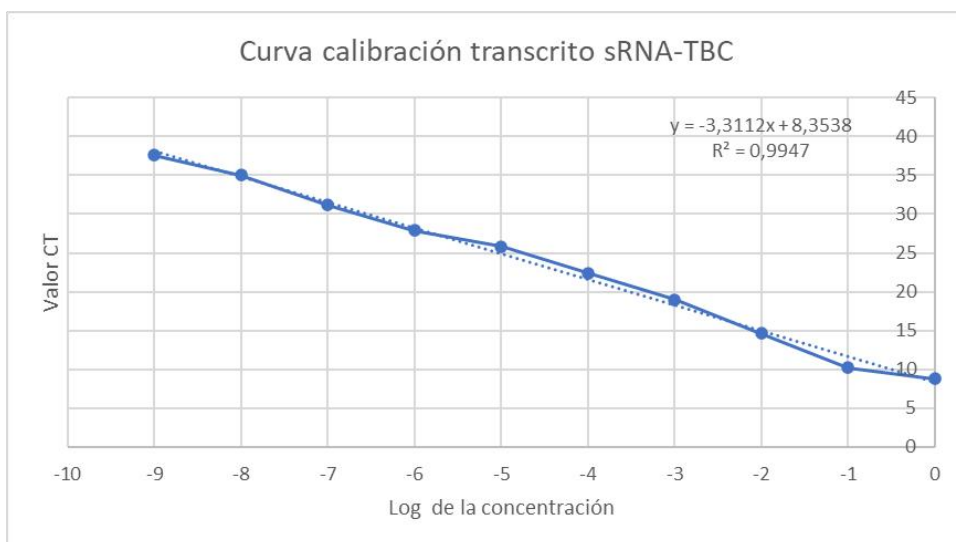
Una vez obtenido el sRNA de Mtb, se procedió a determinar el LOD realizando diluciones seriadas en H₂O. La concentración inicial fue de 10 ng/50 µl y de esta dilución inicial se realizaron 11 diluciones en base 10 por triplicado. Para la qRT-PCR se tomaron 5 µl de cada dilución.

Curva de calibración del control positivo sRNA-TBC



LOD: 0,001 femtogramos (fg)

A continuación, se obtuvo la curva de calibración para determinar el LOD.



Curva de calibración del transcrito sRNA-TBC generada del constructo PGEM/sRNA-TBC. Se realizaron once (11) diluciones seriadas con factor de 10 a partir de 1 ng/μl del transcrito sRNA-TBC. Los datos corresponden al CT vs Concentración inicial (expresada en escala logarítmica) de cada dilución. Mediante regresión lineal se obtuvo el coeficiente de regresión y la pendiente que describe la línea recta.

Concentración ng/μl	LOG[RN A]	Promedio CT
1	0	8,7633333
0,1	-1	10,2233333
0,01	-2	14,6466667
0,001	-3	18,9566667
0,0001	-4	22,3733333
0,00001	-5	25,8333333
0,000001	-6	27,9266667
0,0000001	-7	31,1633333
0,00000001	-8	35,03
0,000000001	-9	37,6233333

Límite de Detección: LOD

Límite de cuantificación	Concentración en femtogramos (fg)
Curva de calibración con el ARN extraído del vector PGEM	0,001fg/μl

Como se puede concluir, el LOD de la prueba de qPCR bajo condiciones de laboratorio es altamente sensible, con un límite de detección de 0.001 fg/μl.