

## ANEXO 1.

### Metodología empleada para la detección del Biomarcador tipo sRNA TB

#### Detección del biomarcador en muestras biológicas.

#### 1. Procesamiento de la muestra para inducción y extracción de ARN según tipo de muestra

##### 1.1 Muestras con bacilo presente: esputo, líquido pleural, jugo gástrico (inducción)

##### 1.1.1 Inducción Esputos, líquido pleural y jugo gástrico en solución de estrés:

- a. Se toman 5 ml de la muestra, los espuestos, líquido pleural o jugo gástrico previamente inactivados con NaOH, N-acetil-L-cisteína y citrato de sodio y se incuban a 37°C toda la noche
- b. Luego de la incubación se toma 1 ml de la muestra, se procede a centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
- c. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 120 µl de solución de estrés (Palmitato de sodio 0.001% (p/v); Estearato de sodio 0.001% (p/v); Oleato de sodio 0.001% (p/v)) (Ver Anexo 1)
- d. Una vez resuspendido el pellet este se deja en incubación a temperatura ambiente por 4 horas.
- e. Transcurrido este tipo de incubación, se centrifuga a 13.000 rpm por 10 minutos.
- f. Finalmente se recupera el sobrenadante para los posteriores ensayos de detección.

##### 1.2 Muestras con ARN presente: orina, plasma, suero (biomarcador circulante)

Para este tipo de muestra se emplea el kit Quick-cfRNA Serum & Plasma Kit de Zymo Research™ siguiendo el protocolo de indicado por la casa comercial. Brevemente, se empleará un volumen de 500 µl del fluido corporal, bien sea orina, plasma o suero y se seguirá el siguiente procedimiento:

- a. Centrifugar las muestras  $\geq 12.000 \times g$  durante 15 minutos para eliminar los restos celulares y el precipitado.
- b. En un nuevo tubo cónico de 15 ml, añada 200 µl de Quick-cfRNA™ Digestion Buffer por 200 µl de muestra (plasma, suero u otros fluidos biológicos) y mezcle pipeteando. Si el volumen de la muestra de entrada es  $\geq 1,5$  ml, utilice un tubo cónico de 50 ml.
- c. Añadir 10 µl de Proteínasa K por cada 200 µl de muestra y mezclar bien agitando en vórtex durante 10 segundos. Incube a 37 °C durante 2 horas.
- d. Añadir un volumen de Quick-cfRNA™ Binding Buffer a la muestra digerida y mezclar bien agitando en vórtex durante 10 segundos.

- e. Añadir 1,5 volúmenes de isopropanol al 100% a la mezcla del paso 4 y mezclar bien agitando en vórtex durante 10 segundos.
- f. Pasar toda la mezcla por la columna Spin-Away™ mediante centrifugación  $\geq 12.000 \times g$  durante 30 segundos.
- g. Añadir 600  $\mu\text{l}$  de tampón RNA Prep Buffer y centrifuge como en el paso anterior hasta que todo el líquido pase completamente a través del filtro Spin-Away™.
- h. Transfiera el filtro Spin-Away™ a un tubo de recogida y centrifúguelo durante 2 minutos para eliminar el tampón residual. Coloque el filtro en un nuevo tubo de microcentrifuga (no suministrado).
- i. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de tampón RNA Recovery Buffer directamente al filtro Spin-Away™. Incube durante 3 minutos y centrifugue. ¡Guarde el flujo que paso por el filtro!
- j. Añadir 300  $\mu\text{l}$  de etanol (95-100%) al flujo. Mezclar pipeteando y transferir a una columna Zymo-Spin™ IC en un nuevo tubo de recogida. Centrifugar y desechar el flujo.
- k. Añadir 400  $\mu\text{l}$  de RNA Prep Buffer a la columna. Centrifugue y deseche el flujo.
- l. Añadir 700  $\mu\text{l}$  de RNA Prep Buffer a la columna. Centrifugue y deseche el flujo.
- m. Añadir 400  $\mu\text{l}$  de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugue durante 2 minutos para garantizar la eliminación completa del tampón de lavado. Transfiera la columna a un tubo de microcentrifuga limpio (no suministrado).
- n. Añadir 15  $\mu\text{l}$  de agua libre de DNAasa/RNAasa directamente a la matriz de la columna, incube durante 2 minutos y centrifugue para eluir el ARN.

## 2. Detección del biomarcador mediante RT-qPCR

Una vez obtenido el ARN se procede a realizar la transcripción reversa (RT) y la qPCR. La transcripción reversa se realiza en dos pasos. Para la síntesis de cDNA se emplea el protocolo de transcripción ExcelRT™ Reverse transcription kit (SMOBIO) y se siguen todas las especificaciones indicadas en este kit. La síntesis de cDNA se realiza mediante los reactivos que se detallan en la tabla 1 y 2.

Tabla 1. El Volumen total de la reacción es 20 de  $\mu\text{l}$ .

Mezcla A	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
RNA total	X (1 ng-2 $\mu\text{g}$ )
dNTP Mix (10mM)	1
100 $\mu\text{M}$ hexámeros al azar	1
Agua tratada DEPC	
	A un volumen de 10 $\mu\text{l}$

Mezclar bien; incubar a 75°C/5 min. Colocar en hielo al menos 1 min.

Tabla 2. Preparación de la mezcla para la síntesis del cDNA (Mezcla B)

Buffer 5X RT Buffer (DTT)	4 $\mu\text{l}$
---------------------------	-----------------

Agua tratada DEPC	4 µl
Inhibidor RNasa RNAok™	1 µl
ExcelRT™ Reverse Transcriptasa	1 µl
Volumen final	10 µl

Para la síntesis del cDNA, unir la mezcla A y B en un solo tubo e incubar según las siguientes condiciones: 25°C/10 min seguido de 50°C/50 min y finalmente terminar la reacción a 85°C/5 min y mantener a 4°C. Si el cDNA no se va a emplear inmediatamente, almacenar a -20°C.

PCR cuantitativa en tiempo real del biomarcador.

Posterior a la síntesis del cDNA se llevó a cabo la amplificación del sRNA- TBC de interés mediante el sistema de sonda TaqMan y el equipo LightCycler96 (Roche) o cualquier equipo para realizar qPCR. La secuencia de los iniciadores y sonda empleados para la detección son los siguientes:

Dir\_1 sRNA-TBC  
5'TGAGGCCAAGGCTCGAT'3  
Rev\_2 sRNA-TBC  
5'GTCGATGCCATCTGCTGTTC'3  
Sonda\_1 sRNA-TBC  
5'AGAAGTGTGCGGGTCTGCGTAAT'3

Las condiciones de reacción para la amplificación del sRNA-TBC se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración y volumen de los componentes de la master Mix por reacción de amplificación. Volumen de reacción: 25 µl

Componente	Concentración final	1 RX - µl
Mix QuantaBio	1X	12.5
D-primer	0.4 µM	1
R-primer	0.4 µM	1
Sonda	0.2 µM	0.5
H <sub>2</sub> O	-	-
cDNA	-	5
Total	-	25

ANEXO 1.

CORPORACIÓN CORPOGEN

SOLUCIÓN ESTRÉS TUBERCULOSIS

Tampón citrato 25 mM – pH 4.5

Formulación: ácido cítrico 13 mM – citrato de sodio 12 mM

Cantidades para 200 ml:

Ácido cítrico – $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ – 210,14 g/mol	546 mg
Citrato trisódico dihidratado – $Na_3C_5H_5O_7 \cdot 2H_2O$ – 294,10 g/mol	706 mg

Preparación:

Medir 180 ml de agua desionizada.

Pesar en una balanza analítica las cantidades del ácido y la sal.

Añadir y disolver completamente en el agua.

Llevar a un volumen final de 200 ml

Medir el pH con un potenciómetro – Debe estar alrededor de  $4.5 \pm 0.1$

Si es necesario, ajustar a pH 4,5 usando para ello HCl 1M o NaOH 1M

Esterilizar por autoclave o filtración por membrana esterilizante.

Revisar pH después del autoclave

Conservar refrigerado

### Soluciones ácidos grasos

Se usan las sales sódicas de los ácidos grasos, solubilizadas independientemente en etanol al 50% (v/v) y tampón citrato 25 mM pH 4.5

Formulaciones:

- Palmitato de sodio 0.5% (p/v); etanol al 50% (v/v); tampón citrato 25 mM pH 4.5
- Estearato de sodio 0.5% (p/v); etanol al 50% (v/v); tampón citrato 25 mM pH 4.5
- Oleato de sodio 0.5% (p/v); etanol al 50% (v/v); tampón citrato 25 mM pH 4.5

### Preparación

Volumen = 5 ml.

Medir 2.5 ml. de tampón citrato 50 mM en un tubo de ensayo con tapa.

Pesar 25 mg de palmitato de sodio.

Añadir el palmitato al tubo con el tampón citrato.

Añadir 2.5 ml. de etanol absoluto.

Tapar el tubo

Calentar en un baño de agua a 55°C.

Agitar el tubo en un vortex o por inversión hasta completa disolución.

Esterilizar por filtración en caliente (55°C) a través de un filtro esterilizante de 0,22 m

Recibir en un tubo de ensayo estéril con tapa

Conservar a temperatura ambiente.

En caso de no poder esterilizar, prepararlas bajo las mejores condiciones de esterilidad y guardar las soluciones en congelación.

Las sales en las soluciones se insolubilizan al enfriarse, por lo que es necesario calentarlas cuando se vaya a usar.

Proceder de la misma forma para el caso del oleato y estearato.

### Solución de estrés

La solución de estrés se prepara a partir de las soluciones individuales de las tres sales de los ácidos grasos usando como diluyente el tampón citrato 50 mM pH 4.5.

Formulación:

Palmitato de sodio 0.001% (p/v)

Estearato de sodio 0.001% (p/v)

Oleato de sodio 0.001% (p/v)

Tampón citrato 50 mM  
Etanol 0,1% (v/v)

Preparación para 50 ml:

Preparar bajo condiciones de esterilidad

- Medir 50 ml. de tampón citrato 50 mM pH 4.5
- Calentar a 55°C en un baño de agua las tres soluciones madres de las sales de los ácidos grasos hasta completa disolución. Comprobar visualmente.
- Medir en caliente 100 ml de cada una de las soluciones y añadirlas al tampón citrato.
- Agitar bien manualmente
- Conservar la solución de estrés refrigerada.

Da una solución un poco opalescente.

Calentar a 37°C antes de usar.