

Estandarización de la técnica DIAPOPS para la detección cuantitativa del biomarcador sRNA de *Mycobacterium tuberculosis*

La técnica Diapops (Detection of Immobilized, Amplified Product in a One Phase System), fue modificada con el fin de identificar el biomarcador. La técnica tiene como principio unir una sonda de captura y luego sobre la placa incluir todos los reactivos necesarios para hacer una PCR en placa que se detecta mediante el conjugado Biotina/Streptavidina

Las modificaciones que se realizaron fueron unir la sonda de captura con un NH₂ modificado en el extremo 5' a las placas de Covalink™, posteriormente se agrega el RNA blanco y se hibrida la placa a 62°C, luego de lavados se agrega la sonda de detección y se revela con estreptavidina.

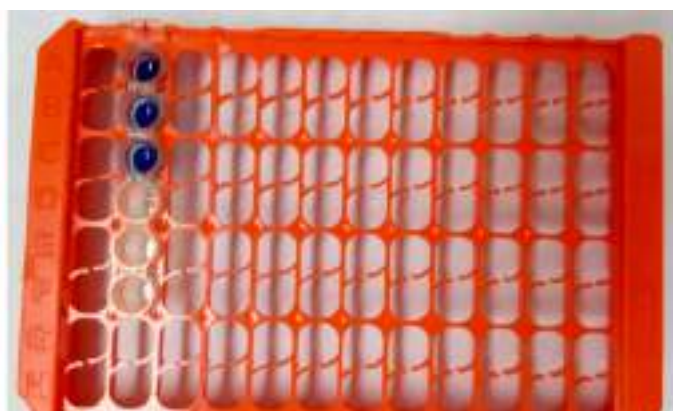
Resultados: luego de múltiples ensayos no logramos obtener un resultado positivo, no tenemos una explicación clara de porque el sistema no funciona, es posible que la sensibilidad de la reacción este por debajo de los límites de detección del biomarcador.

Condiciones ensayo 1

Buffer de hibridación	Reactivo de bloqueo	Soluciones de lavado	Dilución sonda de detección	Dilución estreptavidina
Formamida	Buffer DIAPOPS	NaOH 0.4 M Tween 20 0.25%	Buffer formamida	Buffer DIAPOPS

Resultados esperados ensayo 1: En los pozos en los que se añadió el Control Positivo esperabamos tener una coloración azul mientras en los del Control Negativo (ausencia de DNA blanco) esperabamos un color transparente.

Resultados obtenidos ensayo 1:



Todos los pozos tienen coloración azul intensa

A2: 94,8 ng/ul
B2: 47,4 ng/ul
C2: Control negativo

Condiciones ensayo 2

Buffer de hibridación	Reactivo de bloqueo	Soluciones de lavado	Dilución sonda de detección	Dilución estreptavidina
TMAC	KPL en SSC	NaOH 0.4 M Tween 20 0.25% 0.1X SSC 0.1%Tween PBS 0.05% Tween 0.1%	TMAC	PBS 0.05% Tween 0.1% + BR

Resultados esperados ensayo 2: En los pozos en los que se añadió DNA deberían tener una coloración azul mientras en los que había ausencia de este fueran incoloros.

Resultados obtenidos ensayo 2:



Todos los pozos tienen coloración azul

A2: 94,8ng/ul
B2: 47,4ng/ul
C2: Control negativo
D2: Control negativo

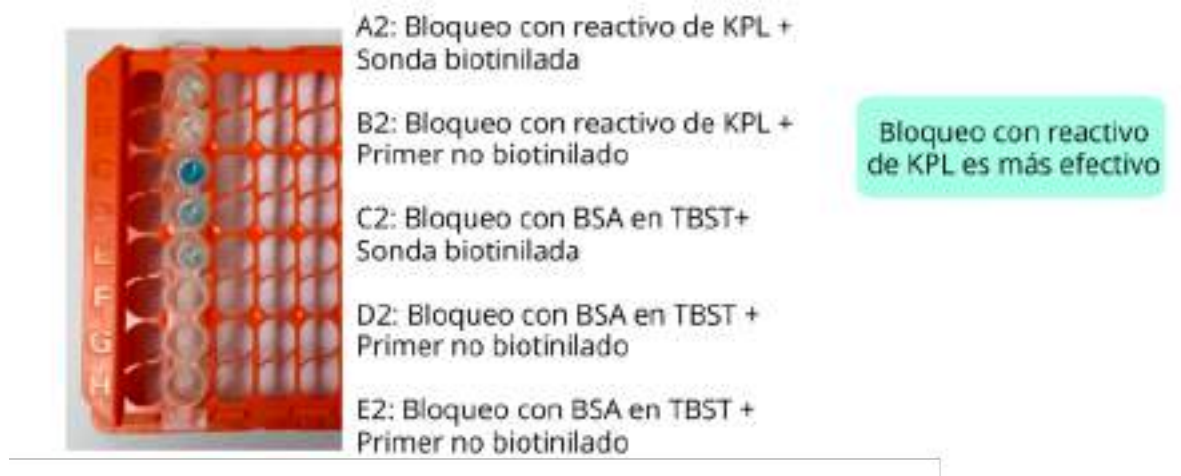
Condiciones ensayo 3: Se desea evaluar la efectividad del bloqueo y los lavados. En este ensayo a ningún pozo se le agrego DNA.

Buffer de hibridación	Reactivo de bloqueo	Soluciones de lavado	Dilución sonda de detección	Dilución estreptavidina
TMAC	KPL BSA en TBST	NaOH 0.4 M Tween 20 0.25% 0.1X SSC 0.1%Tween PBS 0.05%	TMAC	Reactivo de bloqueo de KPL BSA

		Tween 0.1%		
		Biotin whash		
		KPL		

Resultados esperados ensayo 3: Todos los pozos deberían ser incoloros después del proceso de revelado por la ausencia de DNA

Resultados obtenidos ensayo 3: Azul tenue para los pozos bloqueados con KPL



Condiciones ensayo 4

Buffer de hibridación	Reactivo de bloqueo	Soluciones de lavado	Dilución sonda de detección	Dilución estreptavidina
TMAC	KPL	Tris HCL NaCl tween NaOH 0.2 M Tween 0.1% SSC 0.5 X 0.1 tween	SSC 5X, Tween 0.1 %, 0.5% Br	Tris HCL NaCl tween + BR

Resultados esperados ensayo 4: En los pozos en los que se añadió DNA deberán tener una coloración azul mientras en los que había ausencia de este fueran incoloros.

Resultados obtenidos ensayo 4:



En ningún pozo se observa coloración azul

Condiciones ensayo 5:

Buffer de hibridación	Reactivo de bloqueo	Soluciones de lavado	Dilución sonda de detección	Dilución estreptavidina
Formamida	KPL	Tris HCL NaCl tween NaOH 0.2 M Tween 0.1% SSC 0.5 X 0.1 tween	Buffer formamida+ BR	Tris HCL NaCl tween + BR

Resultados esperados ensayo 5: En los pozos en los que se añadió DNA deberán tener una coloración azul mientras en los que había ausencia de este fueran incoloros.

Resultados obtenidos ensayo 5:



Todos los pozos tienen coloración azul