

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis*,
M. bovis y *M. bovis* BCG mediante amplificación por
círculo rodante con sondas *padlock***

Tesis que presenta

Alan Ytzeen Martínez Castellanos

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Rubén López Revilla

Asesores:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2014



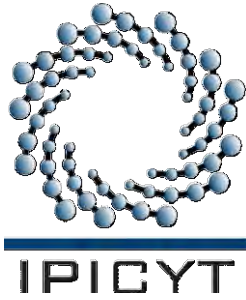
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Diagnóstico molecular de Mycobacterium tuberculosis, M. bovis y M. bovis BCG mediante amplificación por círculo rodante con sondas padlock***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alan Ytzeen Martínez Castellanos** y aprobada el **ocho de julio del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 285503).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 118 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2014, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alan Ytzen Martínez Castellanos

sobre la Tesis intitulada:

Diagnóstico molecular de Mycobacterium tuberculosis, M. bovis y M. bovis BCG mediante amplificación por círculo rodante con sondas padlock

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla


El Jurado, después de deliberar, determinó


APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2014.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARIA ACADEMICA

A MODO DE DEDICATORIA

*Algunos nacen idiotas, otros aprenden a serlo,
otros se hacen los idiotas y tratan de convencernos.
puedes pensar los que quieras, hoy no te salva la aritmética,
todo el mundo tiene un porcentaje de idiotez en su genética.*

*Pa' separarnos con la arrogancia de que en el mundo somos el centro,
mejor unificarnos con el idiota que todos llevamos dentro.
Cristóbal Colón descubrió América por pura coincidencia,
por eso, para ser idiota se requiere inteligencia.
La idiotez tiene sus puntos a favor:
es la única enfermedad en donde el enfermo no sufre,
excepto todos a su alrededor.*

*Hacer buenas preguntas ayuda a que no sea contagiosa,
la idiotez es colectiva cuando nadie se cuestiona las cosas.
Ésta enfermedad no te permite mentir, porque se te nota,
por eso, cuando estás enamorado, sonríes como un idiota.
Los idiotas se sienten seguros con todo lo que comentan,
porque hablan lo que saben, y lo que no saben, se lo inventan.
Aunque suene raro, a los idiotas los escucho,
pa' tener a un listo que no dice nada, prefiero a un idiota que hable mucho
y de todo lo que hable, alguna buena idea habré escuchado,
de ésas que el sabio se guardó, por temor a ser juzgado.*

*Entre todos los trabajos que un empleado ejecuta,
el trabajo más idiota es el que no se disfruta.
Poco entendimiento y mucha explicación agota,
uno es más inteligente cuando piensa como idiota.
Simplificas las respuestas de éste mundo complicado.
Mientras el sabio se preocupa, el idiota es relajado.*

*Aunque también la idiotez puede ponerte nervioso,
no hay nada más preocupante, que un idiota peligroso.
Su arma más peligrosa es desinformar a la gente,
son idiotas peligrosos con cara de presidentes.
Aquí nadie es perfecto, todos cometemos errores,
hace falta ser idiotas pa' aprender a ser mejores.*

- René Pérez.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada y antes que todo al Dr. Rubén López Revilla, por otorgarme el beneficio de la duda a mi llegada a su grupo de trabajo.

A la Biol. Mireya SánchezGarza (Mire), por su invaluable apoyo técnico en la realización e interpretación de los experimentos.

A Gloria López Niño por su apoyo en la preparación de materiales para los experimentos.

A mis compañeros de generación, de grupo y de laboratorio, Mariel, Julio, Byanka, Patricia, Claudia, David, Julián y Maritere, cuyos comentarios y cuestionamientos, a veces disfrazados de plática informal, contribuyeron significativamente en la planeación y desarrollo de la etapa experimental de este trabajo.

A mi familia y amigos. Mi madre (Lilia), mi hermana (Meztli), mi novia (Claudia) y mi tía (Guadalupe), Luis Alberto(el Marce), Armando (el Jefe), Lilia (La MAESTRA... sí, así con mayúsculas), Yvonne (Solecito), Roberto (el Kawa) y su esposa Sandra, Norma (Patito), Mariana (la Doctora), Marizel y Mariel (sí, otra vez).

...y a google.com, por existir.

CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS.....	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	III
COPIA DEL ACTA DEL EXAMEN.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
Tuberculosis humana y bovina.....	1
Diagnóstico molecular de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i>	2
Amplificación por círculo rodante basada en sondas <i>padlock</i>	3
Objetivo y etapas del proyecto.....	6
RESULTADOS.....	7
Validación in silico de las sondas SP5'.....	7
Prueba de SP5'RD4 en mezclas de RCA con blancos alternos: pDZ110 (circular) o amplicón RD4-401 (lineal).....	8
<i>pDZ110 circular como blanco</i>	8
<i>RCA con diluciones seriadas de pDZ110</i>	9
<i>RCA con el amplicón RD4+ (lineal) como blanco</i>	10
Monómeros de 101 pb en mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 incubadas 2.5 o 18 h con o sin hexámeros adicionales.....	10
Mezclas de RCA RD9-361/SP5'RD9 con tiempos variables de ligación.....	11
Sensibilidad de la RCA con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv/SP5'RD1.....	12
Cinética de producción de monómeros en mezclas RD4+/SP5'RD4.....	13
Monómeros de las sondas generados en mezclas de RCA con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	13
Monómeros de las sondas generados en mezclas de RCA con DNA de <i>M. bovis</i> AN5	14
DISCUSIÓN.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Criterios para el diseño de los elementos espaciadores y los brazos de las sondas..	17
<i>Elementos espaciadores</i>	17
<i>Brazos</i>	17
Monómeros lineales esperados.....	18
Armado de las sondas <i>padlock</i> 5' (SP5').....	18
Estructura secundaria de las sondas.....	19
Características de las sondas adquiridas y las soluciones empleadas.....	19
Amplicones RD4+ y RD9+.....	20
DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>M. bovis</i> AN5 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20
Ligación.....	21
Amplificación por círculo rodante.....	21

Restricción de concatémeros	21
Electroforesis en geles de agarosa	22
REFERENCIAS.....	22

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Validación <i>in silico</i> de las sondas.....	26
Tabla 2. Secuencia del amplicón RD4-401 de pDZ110.....	27
Tabla 3. Fluorescencia relativa de las bandas de DNA de las muestras del amplicón de 100 pb aplicadas al gel.....	28
Tabla 4. Regresión lineal de las muestras del amplicón de 100 pb.....	29
Tabla 5. Masa de los monómeros estimada por densitometría de las bandas de mezclas de RCA RD4+/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales.....	30
Tabla 6. Bandas observadas en las mezclas de RCA con SP5'RD4 o SP5'RD9 y los amplicones respectivos	31
Tabla 7. Diluciones logarítmicas del DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en mezclas de RCA con SP5'RD1 para determinar el número mínimo de copias de genoma detectables.....	32
Tabla 8. Masa de los monómeros estimada por densitometría de las bandas en mezclas RD4/SP5'RD4 incubadas por diferentes tiempos.....	33
Tabla 9. Bandas generadas en mezclas de RCA con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9 que fueron tratadas con <i>Eco RI</i>	34
Tabla 10. Elementos espaciadores diseñados	35
Tabla 11. Bandas de DNA esperadas en mezclas de RCA con las sondas candidato y diferentes genomas blanco	36
Tabla 12. Secuencias del flanco izquierdo e iniciales de los extremos 5' de las regiones RD1, RD4 y RD9 seleccionadas como brazos de anclaje y extensión de las sondas <i>padlock</i> SP5'	37
Tabla 13. Características de las sondas adquiridas.....	38

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Regiones de diferenciación en el genoma de <i>M. bovis</i> BCG (Pasteur 1173P2) [38].	39
Fig. 2. Algoritmo del ensayo de PCR multiplex anidada/semianidada desarrollado en nuestro laboratorio para diferenciar <i>M. bovis</i> de otras especies del CMTB [19].	40
Fig. 3. Estructura de una sonda <i>padlock</i> circularizable [39].	41
Fig. 4. Etapas de la RCA con sondas <i>padlock</i> [39].	42
Fig. 5. Diagrama del método propuesto para diferenciar <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> y BCG por RCA isotérmica con sondas <i>padlock</i> .	43
Fig. 6. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD1 a 37° C y 60° C	44
Fig. 7. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD4 a 37° C	45
Fig. 8. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD4 a 60° C	46
Fig. 9. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD9 a 37° C	47
Fig. 10. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD9 a 60° C	48
Fig. 11. Mezclas de RCA pDZ110/SP5'RD4 intactas y tratadas con <i>Eco RI</i>	49
Fig. 12. Mezclas de RCA con diluciones seriadas de pDZ110 y SP5'RD4 y tratadas con <i>Eco RI</i>	50
Fig. 13. Mezclas de RCA RD4-401pb/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales, tratadas con <i>Eco RI</i>	51
Fig. 14. Mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 tratadas con <i>Eco RI</i>	52
Fig. 15. Intensidad relativa de las bandas de monómeros en las mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales	53
Fig. 16. Bandas de monómeros en mezclas de RCA RD9-361/SP5'RD9 con 30, 60 y 120 min de ligación y 18 h de amplificación	54
Fig. 17. Bandas de monómeros en mezclas RD4/SP5'RD4 o RD9/SP5'RD9 tratadas con <i>Eco RI</i>	55
Fig. 18. Bandas de tamaños menores que las de los monómeros en mezclas de RCARD4/SP5'RD4 y RD9/SP5'RD9	56
Fig. 19. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con SP5'RD1 y diluciones logarítmicas de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	57
Fig. 20. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con SP5'RD4 y cuatro copias del amplicón RD4+ (401 pb) incubadas desde 32 hasta 1080 min	58
Fig. 21. Curva tipo con DNA del amplicón RD4+(401 pb) para estimar el contenido de monómeros dsSP5'RD4-401 generados en mezclas de RCA	59
Fig. 22. Cinética de la producción de monómeros de SP5'RD4 en mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4	60
Fig. 23. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9, tratadas con <i>Eco RI</i>	61
Fig. 24. Tamaño de las bandas principales de DNA en mezclas de RCA con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9, tratadas con <i>Eco RI</i>	62

Fig. 25. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>M. bovis</i> AN5 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9.....	63
Fig. 26. Orientación de los componentes de las sondas <i>padlock</i>	64
Fig. 27. Patrones electroforéticos esperados para los monómeros generados por restricción de los concatémeros con <i>Eco RI</i>	65
Fig. 28. Estrategia empleada para el diseño de las sondas <i>padlock</i>	66

RESUMEN

Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG mediante amplificación por círculo rodante con sondas *padlock*

CONTEXTO. El diagnóstico de la tuberculosis (TB) zoonótica requiere métodos rápidos, confiables y accesibles que distingan *Mycobacterium bovis* en la población humana de alto riesgo, pues los métodos microbiológicos tradicionales para diferenciar las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) son laboriosos y toman varias semanas. Los métodos moleculares para identificar *M. bovis* se basan en la persistencia de diversas regiones de diferenciación (RD) en los genomas del CMTB. La amplificación por círculo rodante (RCA) basada en sondas *padlock* circularizables dirigidas a secuencias específicas es un método de amplificación de ácidos nucleicos de nueva generación. El objetivo de este estudio fue desarrollar sondas *padlock* que distingan segmentos específicos de las regiones de diferenciación RD1, RD4 y RD9 de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG. MÉTODOS. Utilizamos las secuencias del flanco izquierdo y el inicio del extremo 5' de las regiones RD1, RD4 y RD9 de *M. tuberculosis* y elementos espaciadores de diferente longitud para construir tres sondas *padlock* denominadas SP5'RD1, SP5'RD4 y SP5'RD9. Las sondas armadas fueron validadas *in silico* para descartar la generación de productos de amplificación inespecíficos y la formación de asas de cadena doble en los brazos de captura y extensión que pudiesen interferir con su ligación e hibridación a las secuencias blanco. Posteriormente, ensayamos primero la RCA en mezclas que contenían la sonda SP5'RD4 y una construcción de DNA circular con el inserto RD4+o el amplicón lineal RD4+. Después determinamos el número mínimo de copias de la secuencia blanco detectables y la cinética de la RCA. RESULTADOS. Los ensayos con SP5'RD4 y el vector de DNA circular con el inserto RD4+ generaron monómeros con la longitud unitaria del vector plasmídico, en tanto que con el amplicón lineal generaron los monómeros esperados; en ensayos ulteriores con todas las sondas SP5' no empleamos blancos de DNA circular sino lineales (i.e., amplicones o DNA genómico del CMTB). Los ensayos con DNA de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5 generaron los monómeros esperados para las tres sondas y pudieron detectar desde tres copias de genomas del CMTB en 5 h (90 min para la ligación, 120 min para la RCA, 90 min para la restricción y 120 min para el análisis electroforético). CONCLUSIONES. Este trabajo es el primero que emplea exitosamente sondas *padlock* para diferenciar especies del CMTB mediante análisis de las regiones RD1, RD4 y RD9. Sondas *padlock* adicionales podrían aplicarse al diagnóstico de otras infecciones y condiciones determinadas genéticamente.

PALABRAS CLAVE: *Mycobacterium bovis*, Regiones de diferenciación, Amplificación por círculo rodante, Sondas *padlock*.

ABSTRACT

Molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG by rolling circle amplification with *padlock* probes

BACKGROUND. Diagnosis of zoonotic TB requires fast, reliable and accessible methods to distinguish *Mycobacterium bovis* among high-risk human population, because traditional microbiological methods to differentiate species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) are laborious and take several weeks. Molecular methods to identify *M. bovis* are based on the persistence of several MTC genomic regions of differentiation (RD). Rolling circle amplification (RCA) based on circularizing *padlock* probes directed to specific sequences is an isothermal nucleic acid amplification method of new generation. The aim of this study was to develop *padlock* probes with the ability to distinguish specific segments of the RD1, RD4 and RD9 regions from *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG. METHODS. The left flank and the beginning of the 5'ends of RD1, RD4 and RD9 sequences from *M. tuberculosis* and three spacer elements of different length were used to design three *padlock* probes designated SP5'RD1, SP5'RD4 and SP5'RD9. Armed probes were validated *in silico* to discard the generation of nonspecific amplification products and double stranded loop formation in the capture and extension arms that could interfere with their ligation and hybridization to target sequences. RCA assays were first performed in mixtures containing SP5'RD4 and either a circular DNA vector with the RD4+ insert or the lineal RD4+amplicon. The lowest number of detectable target copies and kinetics were determined later. RESULTS. Essays with SP5'RD4 and the circular DNA vector containing the RD4+ insert generated unit length monomers of the plasmid vector, whereas those with the linear amplicon generated the expected monomers; in further essays with all SP5' probes no circular but linear DNA targets (i.e., amplicons or MTC genomic DNA) were used. Essays with genomic DNA from the *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* AN5 reference strains generated the expected monomers and could detect down to three MTC genome copies in 5 h (90 min for ligation, RCA for 120 min, 90 min for restriction and 120 min for electrophoretic analysis). CONCLUSIONS. This work is the first to successfully use *padlock* probes to differentiate MTC species through analysis of the RD1, RD4 and RD9 regions. Additional *padlock* probes may be also applied to diagnose other infections and genetically determined diseases and conditions.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, Regions of differentiation, Rolling circle amplification, *Padlock* probes.

INTRODUCCIÓN

Tuberculosis humana y bovina

La tuberculosis (TB) es la infección pulmonar o extrapulmonar activa o latente de humanos causada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), el cual está constituido por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canettii* y *M. mungi*. Cada especie tiene diferente interés epidemiológico, rango de hospederos, virulencia y patrones de farmacorresistencia [1,2].

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) estima que en 2009 hubo 9.4 millones de casos nuevos y 1.3 millones de defunciones por TB en personas VIH negativas y aproximadamente 400,000 defunciones en personas VIH positivas. A estas cifras hay que añadir 511,000 casos nuevos de TB resistente a múltiples fármacos (MRD-TB) ocurridos globalmente y al menos un caso de TB extensamente resistente a fármacos (XRD-TB) en más de 50 países, México incluido [3].

Las especies más relevantes del CMTB son *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Aunque *M. tuberculosis* es la causa más frecuente de TB en humanos, también se han registrado casos en gatos y perros domésticos [4]. *M. tuberculosis* es un organismo aeróbico en tanto que *M. bovis* es microaerofílico y requiere una atmósfera suplementada con CO₂ al 5-10% [5]. *M. africanum*, prevalente en África, causa TB en humanos y primates [6]. *M. microti* causa TB en roedores pequeños pero no significativamente en humanos [7]. *M. bovis* causa TB

en bovinos y tiene el más amplio rango de hospederos del CMTB, que incluye a los humanos [8].

La infección por *M. bovis* es la primera causa de TB zoonótica (i.e., TB humana transmitida por animales) y ocurre principalmente en países en desarrollo donde la pasteurización de los productos lácteos y los programas de control animal son deficientes o nulos [9].

El diagnóstico de TB zoonótica requiere métodos rápidos, confiables y accesibles que distingan *M. bovis* entre la población de alto riesgo, pues los métodos microbiológicos tradicionales para diferenciar las especies del CMTB son laboriosos y generan resultados después de varias semanas [10].

Como la prevalencia de TB extrapulmonar por *M. bovis* es 19 veces mayor que la de TB pulmonar, especialmente en niños [11], es probable que en el estado de San Luis Potosí rebase el 8% de los casos de TB pulmonar, sobre todo en menores de 15 años. Por estas razones nos hemos propuesto desarrollar métodos moleculares para reforzar el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de la TB humana de origen bovino, especialmente entre los sujetos de mayor riesgo [12].

Diagnóstico molecular de *M. tuberculosis* y *M. bovis*

La espoligotipificación, que detecta ciertos espaciadores de las secuencias nucleotídicas de repetidos directos (DR, siglas de *direct repeat*), se usa ampliamente en estudios de epidemiología molecular y permite diferenciar *M. bovis* de otros miembros del CMTB [13]. Por otra parte, los métodos moleculares que diferencian *M. tuberculosis* de *M. bovis* incluyen a los que detectan

mutaciones en los genes *pncA* y *oxyR* [14] y *mtp40* [15] y a los que amplifican las regiones de diferenciación (RD, siglas de *regions of differentiation*) [1].

Los métodos moleculares para identificar *M. bovis* se basan en la persistencia de diversas RD de los genomas de las especies del CMTB. Un método basado en PCR convencional utiliza la región RD7, ausente en *M. bovis* [16]. Un segundo método, de PCR en tiempo real, emplea una sonda que hibrida con la región RD4 [17]. Otro, de PCR multiplex basado en la delección de la región RD4 característica de *M. bovis* identifica *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. microtti* y diferencia *M. tuberculosis* tanto de *M. bovis* como del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Fig. 1) [18].

En nuestro laboratorio Mariel Domínguez Zepahua desarrolló recientemente un método de PCR multiplex ultrasensible [19] basado en el de Pinsky y Banaei [18] para identificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG. Este método (Fig. 2) consta de dos mezclas de PCR multiplex directas (designadas PCRM-D1 y PCRM-D2) seguidas de las mezclas de reacción multiplex anidadas/semianidadas correspondientes (designadas PCRM-A1 y PCRM-A2), y permite detectar una copia del genoma de *M. tuberculosis* y utiliza 15 veces menos oligonucleótidos que el de Pinsky y Banaei [18].

Amplificación por círculo rodante basada en sondas *padlock*

La amplificación por círculo rodante (RCA, siglas de *rolling circle amplification*) basada en sondas *padlock* circularizables y el método de amplificación por ramificación (RAM, siglas de *ramification amplification method*) representan una

nueva generación de métodos de amplificación e hibridación de ácidos nucleicos que emplean sondas dirigidas a secuencias blanco específicas.

La RCA normalmente resulta en el crecimiento lineal de productos que amplifican hasta varios miles de veces la secuencia blanco [20]. Los productos de RCA de cadena sencilla pueden amplificarse todavía más con una ronda adicional (RCA-RCA o amplificación círculo-círculo). En esta modalidad los productos de la primera amplificación pueden digerirse con una endonucleasa de restricción para generar monómeros que se ligan para formar círculos secundarios amplificados adicionalmente en la segunda ronda de RCA [21].

Las sondas *padlock* son sondas de DNA de cadena sencilla con tres regiones. Dos de ellas corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3', complementarias a la secuencia blanco; la tercera es la región espaciadora genérica colocada entre ambas (Fig. 3) [22,23]. Tras la hibridación de la sonda con la secuencia blanco los extremos 5' y 3' se yuxtaponen y la incubación con DNA ligasa genera una molécula circular covalentemente cerrada (Fig. 4) [22]. La sonda *padlock* cerrada permanece hibridada a la molécula blanco, lo cual permite eliminar eficientemente a las sondas que no se unieron para mejorar la relación señal-ruido.

El aumento de sensibilidad en la detección de los productos de amplificación se basa en RCA de la sonda circularizada y cerrada. Este esquema emplea un iniciador único complementario a la región espaciadora de la sonda y una DNA polimerasa con actividad de desplazamiento. La polimerasa extiende por muchos ciclos al iniciador unido a la sonda circularizada y desplaza la cadena recién sintetizada para producir DNA de cadena sencilla como un concatémero

muy largo que consta de múltiples repeticiones en tándem de la secuencia de la sonda, el cual puede alcanzar hasta 500,000 pares de bases [20,23,24,25].

Los métodos RAM y RCA con sondas *padlock* ofrecen ventajas significativas sobre otras técnicas pues la rápida unión de secuencias análogas a las complementarias en el DNA de cadena sencilla y el desplazamiento de la cadena recién sintetizada por la DNA polimerasa permiten que la reacción se lleve a cabo en condiciones isotérmicas [26].

La ligación requiere hibridación precisa de ambos extremos de la sonda con la secuencia blanco y permite detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), pues ambos extremos de la sonda pueden ser ligados sin importar la naturaleza de la molécula blanco (DNA o RNA) y elimina la necesidad de transcripción reversa para detectar RNA. La circularización de la sonda sobre la secuencia blanco permite además la localización exacta de la señal generada por RCA. Al conjugar la sonda a una proteína blanco (un anticuerpo, por ejemplo), la señal de la proteína conjugada puede ser amplificada eficientemente [27].

Estas características hacen que la RCA y el RAM sean fácilmente adoptables para su uso rutinario pues implican menos problemas relacionados con el control de calidad de la PCR y la calibración de los instrumentos para la detección e identificación de agentes infecciosos y cáncer, el diagnóstico genético neonatal y diversos procedimientos forenses [23,24].

Cintha Rodríguez Ortiz estableció en nuestro laboratorio las condiciones para identificar genomas de VPH16 incompletos mediante RCA con la polimerasa phi29 suplementada con hexámeros aleatorios [28]. En el presente estudio— basado en la amplificación isotérmica de las regiones de diferenciación RD1, RD4

y RD9— generamos un nuevo método de detección y diferenciación molecular de las especies del CMTB rápido y sensible y con perspectivas de aplicación para mejorar el diagnóstico y elevar el impacto de las campañas de prevención y control de la TB por *M. bovis* en el ganado y en humanos.

Objetivo y etapas del proyecto

El objetivo del proyecto fue desarrollar un método de amplificación isotérmica por RCA con sondas *padlock* que distinga segmentos específicos de las regiones de diferenciación RD1, RD4 y RD9 de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG con perspectivas de aplicación por ser rápido y sensible.

La estrategia constó de seis etapas (Fig. 5):

1. **Seleccionar las secuencias candidato de las regiones RD1, RD4 y RD9** del CMTB compatibles para diseñar sondas *padlock* potencialmente útiles para diferenciar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.
2. **Diseñar los elementos de las sondas *padlock*** de las regiones RD1, RD4 y RD9 (secuencias de anclaje, de extensión y espaciadoras).
3. **Determinar la especificidad de las sondas *padlock*** candidato mediante el análisis *in silico* de sus elementos y adquirir las sondas validadas.
4. **Establecer las condiciones generales de los ensayos de RCA** (composición de las mezclas, incubación para la ligación y amplificación) con la sonda SP5'RD4 empleando como blanco el inserto RD4-401 contenido en pDZ110 (circular) o el amplicón RD4-401 (lineal) para

obtener los monómeros esperados mediante restricción de los concatémeros y determinar la cinética de la RCA.

5. **Determinar la sensibilidad de la RCA** con sondas *padlock*:
 - a. Número mínimo de copias del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv detectables.
 - b. Tiempo mínimo de incubación de mezclas SP5'RD4/RD4-pDZ110.
6. **Generar los monómeros esperados de las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 y SP5'RD9** en mezclas de RCA con DNA genómico de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5.

RESULTADOS

Validación in silico de las sondas SP5'

Para descartar la generación de productos de amplificación inespecíficos, las tres sondas candidato y las secuencias que podrían ser generadas por yuxtaposición y ligación de los brazos de captura y extensión de cada sonda fueron analizadas con *BLASTn v2.2.28* [29] sobre la colección de secuencias del NCBI [30]. En todos los casos obtuvimos solamente las asociaciones esperadas con cada componente y con las sondas completas (Tabla 1).

Una vez armadas las sondas modelamos las estructuras secundarias que cada una formarían en solución, tomando especialmente en cuenta las asas de cadena doble en las regiones terminales de los brazos de captura y extensión, que

podrían impedir tanto la ligación como su correcta alineación con las secuencias complementarias del DNA blanco.

Las estructuras secundarias fueron modeladas con el programa MFold [31], considerando que cada sonda estaría en presencia de $\text{Na}^+ 1 \text{ M}$ a dos temperaturas: 60° C para la hibridación con el DNA blanco y 37° C para la ligación y la RCA.

Como la mayoría de las estructuras predichas a 37° C y 60° C no formarían asas en las regiones terminales de los brazos de captura y extensión (Figs. 6-10), decidimos adquirir las sondas validadas de esta manera.

Prueba de SP5'RD4 en mezclas de RCA con blancos alternos: pDZ110 (circular) o amplicón RD4-401 (lineal)

pDZ110 circular como blanco

La construcción pDZ110, derivada de pGEM, tiene una longitud de 3,416 pb (PM: $650 \times 3,461 \approx 2,249,650 \text{ Da}$) y contiene el inserto RD4-401 [32], complementario a los brazos yuxtapuestos de la sonda SP5'RD4.

La migración de la banda más cercana al origen generada en la mezcla de RCA coincidió con la de la mezcla control de pDZ110 sin sonda y tratada con *Eco RI*. Sólo en la mezcla que contenía pDZ110/SP5'RD4 y fue tratada con *Eco RI* apareció una banda tenue del tamaño esperado (101 pb) para el monómero lineal de cadena doble *dsSP5'RD4*, además de las bandas principales de alto peso molecular (Fig. 11, carril 5).

Aunque en estas mezclas aparecieron bandas tenues del tamaño de los monómeros esperados, las bandas principales parecieron corresponder a monómeros lineales de pDZ110 derivados de concatémeros de longitud completa del plásmido circular.

RCA con diluciones seriadas de pDZ110

Para determinar la sensibilidad de las mezclas de RCA pDZ110/SP5'RD4 (i.e., número mínimo de copias de pDZ110 detectables electroforéticamente), utilizamos diluciones seriadas de la pDZ110 para obtener 10^5 a 10^3 copias de pDZ110/ μ L. En las mezclas con estas adiciones se llevó a cabo la ligación de la sonda seguida de incubación para la RCA por 18 h y finalmente de tratamiento con *Eco RI*.

El electroferograma (Fig. 12) mostró bandas de productos de DNA barridos de tamaño mayor al esperado y sólo la mezcla con la dilución más alta (10^3 copias de pDZ110/ μ L) contenía un producto de ~ 320 pb (carril 4). En estas condiciones los productos principales de RCA parecieron por tanto corresponder a monómeros lineales de pDZ110 de longitud completa amplificados a partir del plásmido circular.

Estos hallazgos llevaron a descartar el uso de pDZ110 u otros plásmidos circulares como blanco de las sondas SP5' en las mezclas de RCA y sugirieron que los blancos adecuados para el montaje deben ser lineales (i.e., DNA genómico auténtico de micobacterias o amplicones lineales derivados de los insertos de las regiones RD a las sondas que portan las construcciones derivadas de pGEM correspondientes).

RCA con el amplicón RD4+ (lineal) como blanco

La longitud del amplicón lineal RD4+ es de 401 pb (PM: $650 \times 401 \approx 260,650$ Da) y sus primeros 40 pb son complementarios a los brazos yuxtapuestos de la sonda SP5'RD4 (Tabla 2).

La restricción con *Eco RI* de las mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 produjo una banda principal del tamaño esperado para el monómero (Fig. 13), por lo cual decidimos continuar usando el amplicón RD4+ como blanco de SP5'RD4, así como los demás amplicones correspondientes para el montaje de la RCA con el resto de las sondas.

Monómeros de 101 pb en mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4

incubadas 2.5 o 18 h con o sin hexámeros adicionales

Para determinar el efecto del tiempo de incubación y de la adición de hexámeros a las mezclas de RCA estándar cuantificamos la masa de monómeros generados en mezclas incubadas 2.5 o 18 h con o sin hexámeros adicionales mediante densitometría de las bandas presentes en el gel al que aplicamos tanto muestras de las mezclas de RCA como de un amplicón de 100 pb.

Con los datos de contenido (ng) e intensidad relativa de las bandas de muestras con concentraciones conocidas del amplicón de 100 pb, por regresión lineal obtuvimos la ecuación de la recta y calculamos la masa de los monómeros de SP5'RD4 (Tablas 3 y 4).

El electroferograma de las mezclas tratadas con *Eco RI* mostró una banda principal del tamaño esperado para SP5'RD4 con ambos tiempos de incubación, aunque más intensa en las mezclas con hexámeros adicionales (Fig. 14).

Las mezclas de RCA incubadas 2.5 h produjeron en promedio 493 ng de monómeros, casi tres veces menos que los 1,368 ng promedio producidos en las mezclas incubadas 18 h (Tabla 5). De manera análoga, la adición de hexámeros a las mezclas de RCA aumentó 5.9 veces la producción de monómeros esperados para SP5'RD4.

La máxima cantidad de monómeros fue producida en mezclas de RCA incubadas 18 h con hexámeros adicionales (Fig. 15), por lo cual decidimos seguir empleando estas condiciones en los experimentos subsiguientes.

Mezclas de RCA RD9-361/SP5'RD9 con tiempos variables de ligación

En esta etapa empleamos mezclas con SP5'RD9 y el amplicón RD9+ (361 pb) purificado como blanco y ensayamos 30, 60 y 120 min de incubación para ligar la sonda. En todos los casos obtuvimos las bandas principales esperadas y bandas tenues de menor tamaño (Fig.16).

Para incrementar la resolución de las bandas de los monómeros utilizamos un gel de agarosa al 3% en el cual cargamos como referencia la banda de la mezcla de RCA RD4-401/SP5'RD4 restringida (Fig. 17) y con el programa QuantityOne 4.5.0 (BioRad; Hercules, CA, USA) determinamos el tamaño de las bandas (Fig. 18).

En ambos casos los tamaños de las bandas principales correspondieron a los esperados para las sondas (Tabla 6), por lo cual las bandas de menor tamaño,

que podrían ser artefactuales o productos de amplificación parcial, no afectan la especificidad de las sondas.

Sensibilidad de la RCA con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv/SP5'RD1

El siguiente paso permitió determinar el número mínimo de copias del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv requerido para la RCA. Para llevarlo a cabo empleamos mezclas con un contenido fijo de SP5'RD1 y diluciones logarítmicas seriadas de la solución madre del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (1,470 ng/ μ L) con las cuales obtuvimos 3.1×10^7 -3.1 genomas/ μ L en las mezclas (Tabla 7).

Suplementamos las mezclas de soluciones de la sonda y de las diluciones de DNA con el resto de los componentes de la RCA y después de incubarlas las tratamos con *Eco RI*.

El electroferograma de los productos de restricción mostró bandas del tamaño esperado en todos los carriles (Fig. 19). En dos de los carriles observamos además un producto de amplificación de tamaño mucho mayor al esperado, que podría corresponder a la amplificación de un plásmido de DNA circular de *M. tuberculosis* H37Rv, como el que acaba de ser descubierto en *M. abscessus* por Matsumoto et al. [33].

Con este resultado concluimos que las mezclas de RCA con SP5'RD1 detectan desde tres genomas de *M. tuberculosis* H37Rv por mezcla y esperamos una sensibilidad similar en las mezclas con las sondas SP5'RD4 y SP5'RD9.

Cinética de producción de monómeros en mezclas RD4+/SP5'RD4

Para determinar el tiempo mínimo necesario para generar monómeros RD4+ detectables por electroforesis preparamos mezclas con 5 copias/ μL del amplicón RD4+ derivado de pDZ110 y 6.022×10^{10} moléculas de sonda/ μL y las suplementamos con el resto de los componentes para la ligación que se llevó a cabo durante 90 min.

Probamos cinco mezclas de RCA compuestas de esta manera, las incubamos a 30°C y tomamos muestras de 5 μL cada 16 min durante las primeras 5 h de incubación y la última muestra a las 18 h para someterlas a restricción con *Eco RI* y cargarlas en un gel SB-agarosa al 2%.

En las muestras de mezclas incubadas hasta 64 min obtuvimos bandas de los tamaños esperados, cuya intensidad aumentó significativamente a los 120 min (Tabla 8, Fig. 20).

Este resultado indica que 2 h de incubación bastan para la RCA con nuestras sondas, y que tiempos mayores producen más de 100 ng de DNA, equivalentes a más de 10^{12} copias de las sondas (Figs. 21 y 22).

Monómeros de las sondas generados en mezclas de RCA con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv

En esta etapa probamos las tres sondas con DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

El electroferograma de las mezclas de RCA restringidas con *Eco RI* mostró las bandas principales esperadas para los monómeros de las tres sondas (Fig.

23). En las mezclas de SP5'RD4 y SP5'RD9 observamos bandas adicionales de tamaño menor al esperado, similares a las obtenidas en las mezclas con los amplicones respectivos (Fig. 24 y Tabla 9).

Estos resultados indican que las sondas se unen a las secuencias complementarias en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y amplifican los concatémeros correspondientes.

Monómeros de las sondas generados en mezclas de RCA con DNA de *M. bovis* AN5

En esta etapa probamos las tres sondas con DNA de *M. bovis* AN5.

El electroferograma de las mezclas de RCA restringidas con *Eco RI* mostró la banda principal esperada para los monómeros de SP5'RD9 (Fig. 25). En las mezclas con SP5'RD1 y SP5'RD4 no observamos las bandas correspondientes a los monómeros de estas sondas.

En este experimento incluimos además una mezcla de ligación con la misma concentración de DNA de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la sonda SP5'RD4 para verificar la ausencia de generación de productos amplificación inespecíficos. En el electroferograma no observamos banda alguna y por ello descartamos que la sonda SP5'RD4 se haya hibridado, ligado y amplificado.

Los resultados anteriores indican que las sondas se unen específicamente a sus secuencias complementarias en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5 y amplifican únicamente los concatémeros correspondientes.

DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero que emplea exitosamente sondas *padlock* para diferenciar especies del CMTB con el enfoque evolutivo propuesto por Brosch, basado en la presencia o ausencia de las regiones RD [34].

Para el estudio diseñamos las sondas *padlock* apropiadas para diferenciar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG mediante el ensayo de las regiones RD1, RD4 y RD9. Desarrollamos las condiciones apropiadas para amplificar los concatémeros correspondientes mediante RCA de las sondas *padlock* con DNA blanco lineal y la separación electroforética de los monómeros obtenidos por restricción con *Eco* RI.

Las pruebas de las sondas con DNA genómico de las cepas de referencia —*M. tuberculosis*H37Rv y *M. bovis*AN5—demostraron la elevada sensibilidad del método, capaz de detectar desde tres copias de genomas del CMTB en 5 h (90 min para la ligación, 120 min para la RCA, 90 min para la restricción y 120 min para el análisis electroforético).

Las bandas de tamaños menores a los esperados observadas en algunos ensayos con DNA genómico podrían corresponder a productos de amplificación de las sondas o de un plásmido pequeño, como el que fue encontrado recientemente por Matsumoto et al. en *M. abscessus* [33]. Aunque la RCA evita la amplificación de las sondas no circularizadas, en experimentos iniciales observamos que la presencia de moléculas circulares de DNA favorece su propia amplificación e inhibe la amplificación de las sondas probablemente a través del secuestro de los hexanucleótidos y la DNA polimerasa Phi29 empleada.

Nuestros resultados demuestran la utilidad y especificidad de las sondas diseñadas para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*. Planeamos continuar los ensayos con DNA de *M. bovis* BCG y luego someter a prueba el método con muestras de DNA de los aislados locales de nuestro banco de DNA de *M. tuberculosis* y *M. bovis* que provienen de humanos y ganado bovino.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basadas en RCA como la desarrollada en este trabajo constituyen una alternativa ventajosa sobre las técnicas tradicionales de PCR por la alta sensibilidad, especificidad y rendimiento que hemos demostrado, además de su bajo costo. El costo estimado de cada reacción bajo las condiciones finales desarrolladas es de unos 50 pesos mexicanos (i.e., alrededor de 4 dólares estadounidenses).

Mediante el diseño de sondas *padlock* adicionales apropiadas y usadas en condiciones similares a las aquí descritas, los resultados obtenidos en este trabajo podrán extenderse al diagnóstico de otros agentes infecciosos y de diversas enfermedades y condiciones determinadas genéticamente (traslocaciones cromosomales, polimorfismos de un solo nucleótido, etc.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios para el diseño de los elementos espaciadores y los brazos de las sondas

Elementos espaciadores

Longitud: 50-70 nucleótidos (nt). Ausencia de complementariedad a cualquier región de los genomas blanco (i.e., *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG). No formar estructuras secundarias con los brazos de anclaje y extensión de las sondas. Poseer un sitio único de restricción para *Eco RI*.

Para conformar tres elementos espaciadores de diferente tamaño con un sitio de restricción *Eco RI* único diseñamos las secuencias P5421, P5466 y P5416, basadas en las sondas empleadas por Bandaru para la detección de polimorfismos del gen *rpoB* [35].

La longitud original de dos de los espaciadores fue modificada para asegurar una clara separación electroforética de los monómeros esperados por restricción de los concatémeros generados en mezclas de RCA a partir del DNA de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Tabla 10).

Brazos

Para diseñar los brazos de anclaje y extensión empleamos las secuencias de los extremos 5' y 3' (i.e., las regiones limítrofes de cada RD), calculamos el contenido

de GC y la Tm y estimamos las probables estructuras secundarias de cada sonda completa.

Brazo de anclaje. Longitud: 20-21 nt. Secuencia complementaria a la parte inicial consecutiva al flanco izquierdo de la región RD correspondiente. No formar estructuras secundarias con el elemento espaciador, con el brazo de anclaje o consigo mismo.

Brazo de extensión. Longitud: 20–21 nt. Secuencia complementaria al flanco izquierdo vecino al inicio de la región RD correspondiente. No formar estructuras secundarias con el elemento espaciador, con el brazo de anclaje o consigo mismo.

Monómeros lineales esperados

Las tres sondas candidato fueron diseñadas para producir monómeros lineales de tamaños característicos mediante restricción de los concatémicos con *Eco RI*. Los tamaños esperados (en nucleótidos) de los productos de restricción son: RD1, 91 nt; RD4, 100 nt; RD9, 111 nt (Figs. 26, 27 y Tabla 11).

Armado de las sondas *padlock* 5' (SP5')

Utilizamos las secuencias del flanco izquierdo y el inicio de los extremos 5' de cada RD registradas en GenBank (Números de acceso: RD1, U35019.1; RD4, AJ003103.1; RD9, Y8604.1)(Fig. 28) [36]. Las secuencias seleccionadas para formar los brazos de las sondas SP5' de cada RD se muestran en la Tabla 12.

Una vez ligados covalentemente, los extremos yuxtapuestos de los brazos de anclaje y extensión de cada sonda generarían secuencias de 40-42 pb. La longitud de los brazos ligados sumada a la del elemento espaciador sería diferente para cada RD, de manera que pudieran diferenciarse los productos de restricción derivados de los concatémeros amplificados con cada sonda mediante su separación electroforética en geles de agarosa.

Para descartar la generación de productos de amplificación inespecíficos las tres sondas candidato y las secuencias generadas por yuxtaposición y ligación de los brazos de captura y extensión de cada sonda fueron analizadas con *BLASTn v2.2.28* [29] sobre la colección de secuencias del NCBI [30].

Estructura secundaria de las sondas

Las probables estructuras secundarias a 37° C y 60° C de las secuencias de las sondas SP5' para las regiones RD1, RD4 y RD9 fueron modeladas con el programa *MFold* [31] considerando que estarían en soluciones con Na⁺ 1M.

Características de las sondas adquiridas y las soluciones empleadas

Las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 y SP5'RD9 (Tabla 13) deberían tener el extremo 5'fosforilado y el extremo 3' monohidroxilado. Una vez diseñadas y validadas *in silico*, las pedimos a Integrated DNA Technologies (San Diego CA, USA) y las recibimos en septiembre de 2013.

El contenido de los viales de cada sonda liofilizada (20 nmolas) fue disuelto con 1 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) para obtener soluciones madre de

concentración 20 μM (1.2044×10^{13} moléculas/ μL). A partir de cada solución madre preparamos criotubos con 100 μL de diluciones 1:20 para obtener soluciones 1 μM (6.022×10^{11} moléculas/ μL).

Amplicones RD4+ y RD9+

Los amplicones lineales RD4+ (401 pb) y RD9+ (361pb) fueron obtenidos mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados por Domínguez-Zepahua a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv [19].

Dichos amplicones fueron purificados mediante precipitación con acetato de sodio y etanol absoluto en frío, lavados con etanol al 70%, disueltos en TE y almacenados a -20°C hasta su utilización.

DNA de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Utilizamos DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. bovis* AN5 (100ng/ μL) del biobanco de nuestro laboratorio. El DNA de *M. bovis* AN5 proviene del lisado de un cultivo provisto por Mariel Domínguez-Zepahua [19].

El cultivo de *S. aureus* ATCC 25923 fue donado por el cepario bacteriano de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. El DNA se extrajo mediante lisis alcalina con SDS-proteinasa K, se purificó con fenol-cloroformo y se lavó con etanol al 70% frío para ser finalmente disuelto en TE y almacenado a -20°C hasta su uso. La solución con el DNA de *S. aureus* alcanzó una concentración final de 100 ng/ μL

Ligación

Las mezclas de ligación de 17 μL contenían 1 μL de la solución de sonda SP5'100 μM , 1 μL de DNA blanco y 15.51 μL de agua destilada estéril. Se incubaron a 94° C por 4 min y luego a 65° C por 10 min para permitir la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria. Cada mezcla luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue suplementada con 2 μL de buffer de ligación (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) y 200 UI de ligasa de T4 (New New England Biolabs; Ipswich, MA, USA). La ligación se llevó a cabo durante 90 min a 25° C y la mezcla se calentó después a 65° C por 10 min para inactivar la ligasa.

Amplificación por círculo rodante

Para la RCA de las sondas circularizadas utilizamos el kit Templphi-100 (GE Healthcare Life Sciences; Buckinghamshire, UK) como sigue: 1 μL de la mezcla de ligación fue suplementada con 5 μL de buffer de muestra e incubada 3 min a 95° C; a esta mezcla añadimos 5 μL de buffer de reacción, 0.2 μL de la mezcla con polimerasa Phi29, 0.6 μL de dNTPs 492 μM y la llevamos a un volumen final de 20 μL con agua destilada estéril. La mezcla completa fue incubada a 30° C por 18 h, al cabo de las cuales la polimerasa fue inactivada por calentamiento a 65° C durante 15 min.

Restricción de concatémeros

Preparamos mezclas de restricción con 1 μL de la mezcla de RCA correspondiente, buffer de restricción 1 \times (New England Biolabs; Ipswich, MA,

USA), 20 UI de *Eco RI*(New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) y agua destilada estéril para un volumen final de 50 µL. Las mezclas fueron incubadas 90 min a 37° C y seguidas de inactivación térmica por 20 min a 65° C.

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de restricción fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa(Invitrogen, Grand Island, NY, EE UU) al 2% de 6.5×10×0.5 cm con buffer de borato sódico [37] corridos a 120 V por 80 min. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0.1 µg/mL (Promega, Madison, WI, EE UU) durante 20 min.

Las imágenes de los geles teñidos y transiluminados con luz UV fueron capturadas en un fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad; Hercules, CA, USA) y analizadas con la suite QuantityOne (BioRad; Hercules, CA, USA).

Los datos de concentración y los cálculos de intensidad y longitud de las bandas de DNA (en pb), así como los datos de los experimentos del efecto de la concentración y el tiempo de incubación fueron graficados y analizados en Excel.

REFERENCIAS

1. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, et al. (2002) Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J Clin Microbiol 40: 2339-2345.
2. Pounder JI, Anderson CM, Voelkerding KV, Salfinger M, Dormandy J, et al. (2010) Mycobacterium tuberculosis complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 67: 101-105.
3. OMS/WHO (2010) Estadísticas sanitarias mundiales 2010. Organización Mundial de la Salud. pp. 77.

4. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, et al. (1996) Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 34: 2734-2740.
5. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, et al. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-7882.
6. Thorel MF (1980) Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle* 61: 101-104.
7. Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SN, Gow BL (1994) Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 42: 135-145.
8. Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 36: 411-436.
9. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, et al. (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4: 59-70.
10. Tyrrell FC, Budnick GE, Elliott T, Gillim-Ross L, Hildred MV, et al. (2012) Probability of negative mycobacterium tuberculosis complex cultures based on time to detection of positive cultures: a multicenter evaluation of commercial-broth-based culture systems. *J Clin Microbiol* 50: 3275-3282.
11. Dankner WM, Davis CE (2000) *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 105: E79.
12. Lopez-Rocha E, Juarez-Alvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, et al. (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in San Luis Potosi, Mexico. *BMC Res Notes* 6: 172.
13. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, et al. (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.
14. Scorpio A, Zhang Y (1996) Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat Med* 2: 662-667.
15. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME (1991) Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 29: 2163-2168.
16. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL (2003) PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 41: 1637-1650.
17. Taylor GM, Worth D, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research* 3: 12.
18. Pinsky BA, Banaei N (2008) Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2241-2246.

19. Domínguez-Zepahua MI (2012) Diagnóstico molecular de la tuberculosis bovina. Tesis de maestría en ciencias en biología molecular. San Luis Potosí, S.L.P.: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. 35 p.
20. Baner J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U (1998) Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res* 26: 5073-5078.
21. Dahl F, Baner J, Gullberg M, Mendel-Hartvig M, Landegren U, et al. (2004) Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4548-4553.
22. Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, et al. (1994) Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 265: 2085-2088.
23. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, Li H (1998) Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene* 211: 277-285.
24. Zhang DY, Zhang W, Li X, Konomi Y (2001) Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification. *Gene* 274: 209-216.
25. Fire A, Xu SQ (1995) Rolling replication of short DNA circles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4641-4645.
26. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, et al. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 19: 225-232.
27. Thomas DC, Nardone GA, Randall SK (1999) Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 123: 1170-1176.
28. Rodríguez-Ortiz CA (2013) Posibles deleciones del oncogen E6. Tesis de maestría en ciencias en biología molecular. San Luis Potosí, S.L.P.: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.
29. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214.
30. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, et al. (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24: 1757-1764.
31. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31: 3406-3415.
32. Domínguez-Zepahua MI (2014) Diagnóstico molecular de la tuberculosis bovina. Tesis de doctorado en ciencias en biología molecular (en proceso). San Luis Potosí: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
33. Matsumoto CK, Bispo PJ, Santin K, Nogueira CL, Leao SC (2014) Demonstration of plasmid-mediated drug resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol*.
34. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, et al. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3684-3689.

35. Bandaru VMK (2012) Development of a multiplex molecular method for identification of extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis by padlock probes. Uppsala: Uppsala University. 33 p.
36. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. (2013) GenBank. Nucleic Acids Res 41: 27.
37. Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. BioTechniques 36: 214-217.
38. Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne IP (2007). Paris, France: Institut Pasteur.
39. Porreca GJ, Zhang K, Li JB, Xie B, Austin D, et al. (2007) Multiplex amplification of large sets of human exons. Nat Methods 4: 931-936.

Tabla 1. Validación *in silico* de las sondas

Sonda	Elemento	nt	Hits BLASTn
SP5'RD1	Espaciador P5466-ms	51	0
SP5'RD4	Espaciador P5421	59	0
SP5'RD1	Espaciador P5416-M	71	0
SP5'RD1	Brazos yuxtapuestos	40	178 ^a
SP5'RD4	Brazos yuxtapuestos	42	108 ^a
SP5'RD9	Brazos yuxtapuestos	40	183 ^a
SP5'RD1	Sonda completa	91	0
SP5'RD4	Sonda completa	102	0
SP5'RD9	Sonda completa	111	0

^a Hits significativos sólo en micobacterias.

Tabla 2. Secuencia del amplicón RD4-401 de pDZ110

1	AGAAGCGCAA CACTCTTGGA GTACCTGCGC TTGCAGAGAT caaatagggc gcatgggtca
61	gcatagtaca ggtcgctcgcg catctttgat gcatcggaat aagatgtcag gcaattaaaa
121	gagaagccac ggcgactcgc ggcattcagc atgtcgagcg tcgcttcgat gtgagcgcac
181	cattccgtgt ccaacgattt cagacgaaca ttgaatattc cactcgcgac gctatagtcc
241	gcctcccgat ctatgcgcgc cgcgcagatg aagtctgcgt tcgcccgacc ttcgaaacgt
301	agtgcggccg cgcgcaccat ttcgggggag acgtcgatgc cggtgtaatc agttttgaag
361	ccacgcgcat ctaggtagtc cagtagagcc ccatagccac a

Con letras mayúsculas la secuencia de 40 nt complementaria a los brazos de SP5'RD4.

Tabla 3. Fluorescencia relativa de las bandas de DNA de las muestras del amplicón de 100 pb aplicadas al gel

Muestra			Unidades de intensidad relativa (UI)
ng/μL	μL	ng	
186.63	4	746.5	128.06
37.67	4	150.7	117.85

Tabla 4. Regresión lineal de las muestras del amplicón de 100 pb

Parámetro	Valor
Pendiente	0.0172
Ordenada al origen	115.265

Tabla 5. Masa de los monómeros estimada por densitometría de las bandas de mezclas de RCA RD4+/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales

Incubación	Mezcla de RCA	Muestras (4 μ L)	
		UI	ng
2.5 h	Estándar	120.4	300.9
	Hexámeros adicionales	127.1	685.8
18 h	Estándar	131.8	964.6
	Hexámeros adicionales	145.6	1771.9

Tabla 6. Bandas observadas en las mezclas de RCA con SP5'RD4 o SP5'RD9 y los amplicones respectivos

Carril	Muestra	Banda	Tamaño (pb)
1	Escalera 50 pb	1	400.0
		2	300.0
		3	250.0
		4	200.0
		6	150.0
		7	100.0
		8	50.0
2	RD4+/SP5'RD4	1	102.4
		2	80.0
		3	60.8
3	RD9+/SP5'RD9	1	112.5
		2	91.7
4	Escalera 100 pb	1	400.0
		2	300.0
		3	200.0
		4	100.0

Tabla 7. Diluciones logarítmicas del DNA de *M. tuberculosis* H37Rv en mezclas de RCA con SP5'RD1 para determinar el número mínimo de copias de genoma detectables

ID	ng/ μ L	Factor de dilución	Genomas/ μ L ^a
1	1470	1	3.09×10^7
2	147	10	3.09×10^6
3	14.7	10^2	3.09×10^5
4	1.47	10^3	3.09×10^4
5	1.47×10^{-1}	10^4	3,090
6	1.47×10^{-2}	10^5	309
7	1.47×10^{-3}	10^6	30.9
8	1.47×10^{-4}	10^7	3.09

^a 1 μ L de cada dilución fue aplicado a las mezclas de RCA.

Tabla 8. Masa de los monómeros estimada por densitometría de las bandas en mezclas RD4/SP5'RD4 incubadas por diferentes tiempos

Tiempo (min)	Intensidad media (U)	Concentración (ng/μL)	Masa (ng)
48	60.22	ND	ND
64	66.04	ND	ND
80	70.98	ND	ND
96	84.18	24.20	96.80
112	84.54	26.78	107.11
128	87.14	45.34	181.37
144	93.67	91.88	367.52
160	100.13	137.89	551.56
176	110.04	208.47	833.89
192	123.38	303.60	1214.39
208	136.26	395.32	1581.29
224	130.67	355.54	1422.18
240	162.96	585.64	2342.57
256	137.83	406.52	1626.09
272	147.75	477.22	1908.87
288	134.25	381.05	1524.21
1080	243.41	1158.91	4635.63
Std1	106.69	195.30	781.20
Std2	211.69	870.40	3481.60
Std3	233.23	1138.20	4552.80

ND, No detectable.

Std1-3, cantidades conocidas del amplicón de 100 pb que fueron aplicadas.

Tabla 9. Bandas generadas en mezclas de RCA con *M. tuberculosis* H37Rv y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9 que fueron tratadas con *Eco RI*

Carril	Muestra	Banda	Tamaño (pb)
1	Escalera 50 pb	1	300.0
		2	250.0
		3	200.0
		4	150.0
		5	100.0
		6	50.0
2	SP5'RD1/ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	96.0
3	SP5'RD4/ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	104.2
		2	81.5
		4	64.7
4	SP5'RD9/ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	113.7
		2	93.5
5	Escalera 100 pb	1	300.0
		2	200.0
		3	100.0

Tabla 10. Elementos espaciadores diseñados

Clave	Secuencia 5'-3' ^a	nt
P5466- ms ^b	GCACTAACTGGTCTGTCAGTGAATTCAGCTCCTCAGTAATAGTGTC TTACA	51
P5421	TTTAGTAGCCGTGACTATCGAGTGTGAATTCAGCTCCTCAGTAATA GTGTCTTACTTTT	59
P5416-M ^c	TTCGTGCCTTGGTATGCAGCTCCTCAGGAATTCGGGAGTGTATGC AGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACGC	71

^aLos sitios de restricción para *Eco RI* están resaltados en amarillo.

^b Secuencia 10 nt más corta que la de Bandaru [35].

^c Secuencia 10 nt más larga que la de Bandaru [35].

Tabla 11. Bandas de DNA esperadas en mezclas de RCA con las sondas candidato y diferentes genomas blanco

Genoma blanco	SP5'RD1 (91 nt)	SP5'RD4 (100 nt)	SP5'RD9 (111 nt)
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+
<i>M. bovis</i>	+	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	-	-	-
Otras especies del CMTB	V	+	-

+, presente; -, ausente; V, variable (≠ 91 nt).

Tabla 12. Secuencias del flanco izquierdo e iniciales de los extremos 5' de las regiones RD1, RD4 y RD9 seleccionadas como brazos de anclaje y extensión de las sondas *padlock* SP5'

Región	Brazo	Secuencias(5'-3')^a	nt	%GC	Tm (° C)	Posición (H37Rv)
RD1	Anclaje	CTGGTCGACGATTGGCACAT	20	55	62.82	4350266-4350285
	Extensión	GATCGTGGGTGCCGCCGGGG	20	80	76.38	4350246-4350265
RD4	Anclaje	ACCTGCGCTTGACAGAGATCAA	21	52	64.11	1696017-1696037
	Extensión	GAAGCGCAACACTCTTGGAGT	21	52	60.4	1695996-1696016
RD9	Anclaje	ACGTGTAGGTCAGCCCCATC	20	60	60.76	2329938-2329957
	Extensión	ACGGGTCGCCGCTGGCAACC	20	75	74.23	2329918-2329937

^a Tomadas de Benson et al. [36].

Tabla 13. Características de las sondas adquiridas

Sonda	Características	
SP5'RD1	Lote	116717990
	Tamaño	90 nt
	Peso molecular	27908.9
	Contenido de GC	53.3%
	Contenido del vial	20 nmolas (558 µg)
SP5'RD4	Lote	116717991
	Tamaño	101 nt
	Peso molecular	31212.1
	Contenido de GC	45.0%
	Contenido del vial	20 nmolas (624 µg)
SP5'RD9	Lote	116719035
	Tamaño	111 nt
	Peso molecular	34259.0
	Contenido de GC	56.7%
	Contenido del vial	20 nmolas (685 µg)

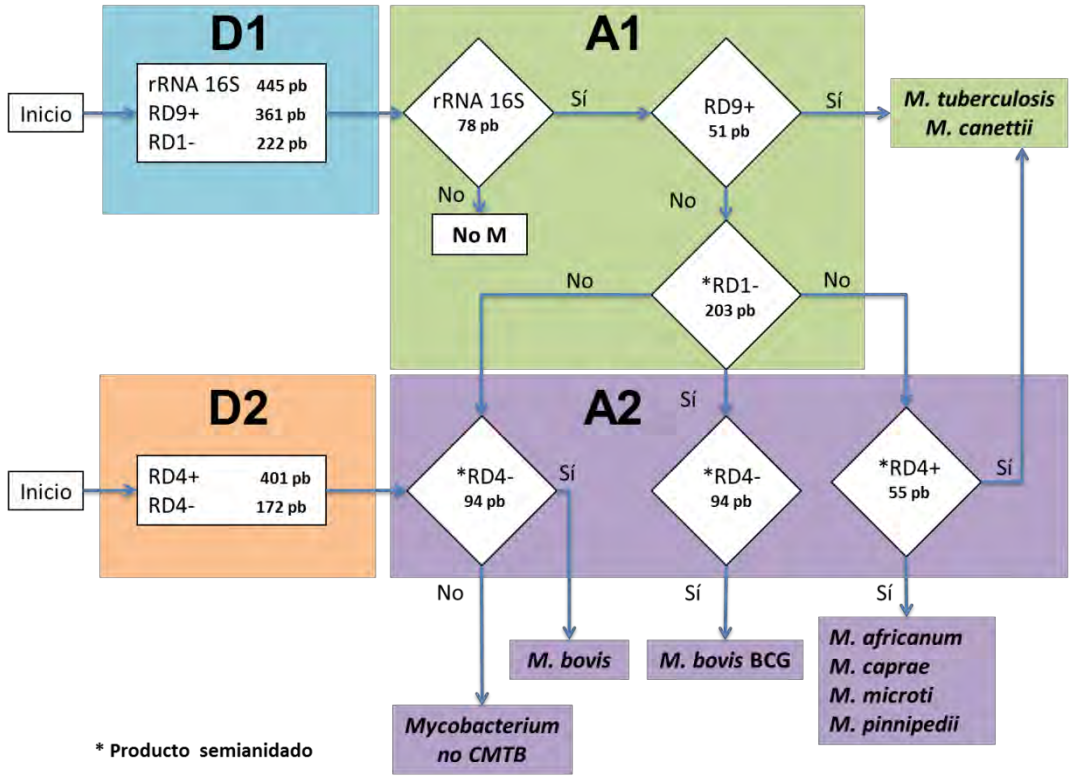


Fig. 2. Algoritmo del ensayo de PCR multiplex anidada/semianidada desarrollado en nuestro laboratorio para diferenciar *M. bovis* de otras especies del CMTB [19].

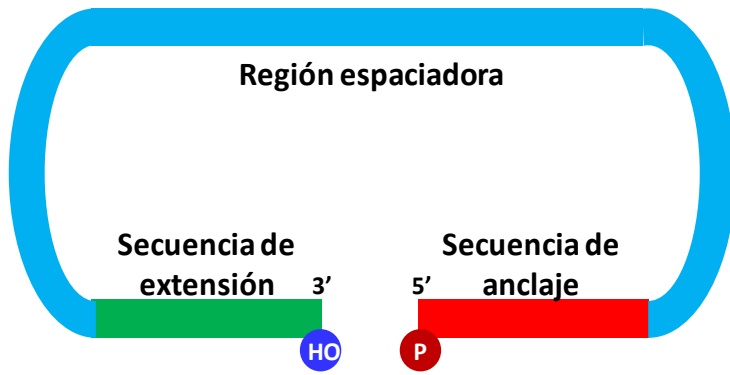


Fig. 3. Estructura de una sonda *padlock* circularizable [39].

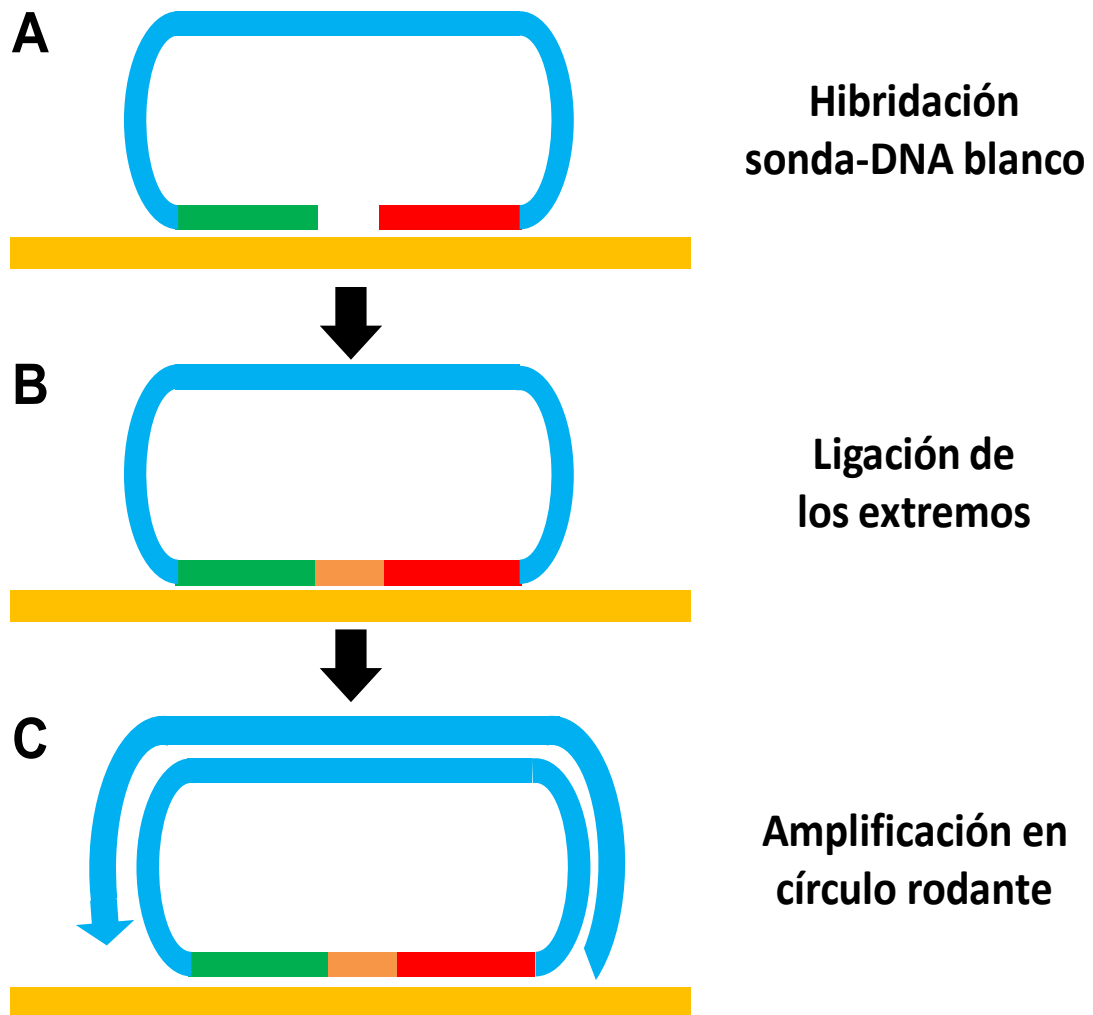


Fig. 4. Etapas de la RCA con sondas *padlock* [39].

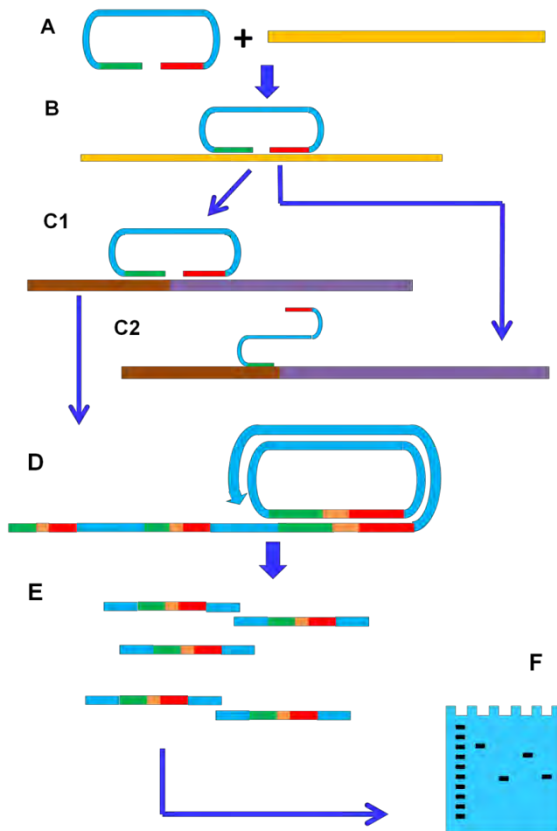


Fig. 5. Diagrama del método propuesto para diferenciar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y BCG por RCA isotérmica con sondas *padlock*

(A) La RCA contiene el DNA blanco y las sondas *padlock* en las condiciones apropiadas. (B) El primer paso consiste en la hibridación de los brazos de captura y extensión de las sondas *padlock* con las secuencias complementarias presentes en el DNA blanco. (C1) Si ambos brazos de la sonda hibridan con el DNA blanco la sonda es circularizada y sus extremos sellados covalentemente con DNA ligasa. (C2) Si la secuencia del DNA complementa sólo uno de los brazos de la sonda *padlock*, la sonda no se circulariza ni puede ser sellada por la ligasa. (D) Cada sonda circularizada y sellada sirve de molde para que la RCA genere un concatémoro lineal de cadena doble compuesto por múltiples copias en tándem de la sonda *padlock*. (E) Los monómeros son liberados por restricción de los concatémeros generados previamente. (F) Los productos de restricción (monómeros de cadena doble de la sonda circularizada) se someten a análisis electroforético en geles de agarosa.

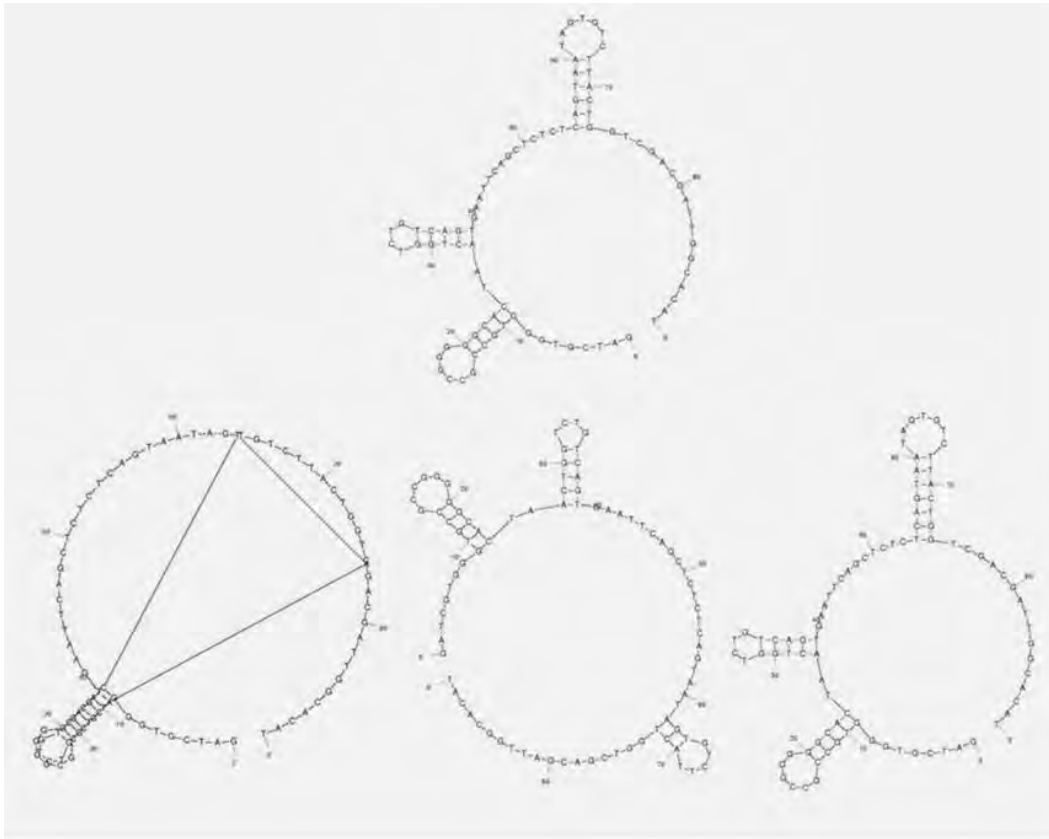


Fig. 6. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD1 a 37° C y 60° C

La imagen superior corresponde a la única estructura predicha a 37° C; las inferiores a las estructuras predichas a 60° C.

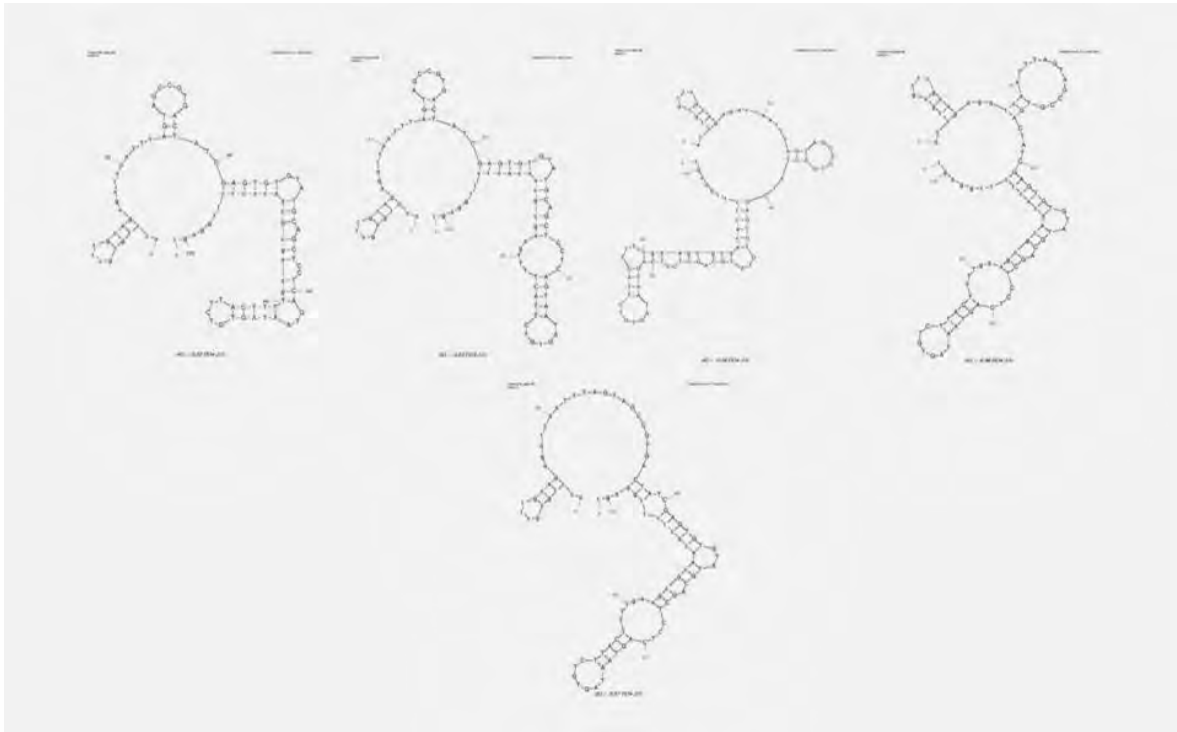


Fig. 7. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD4 a 37° C

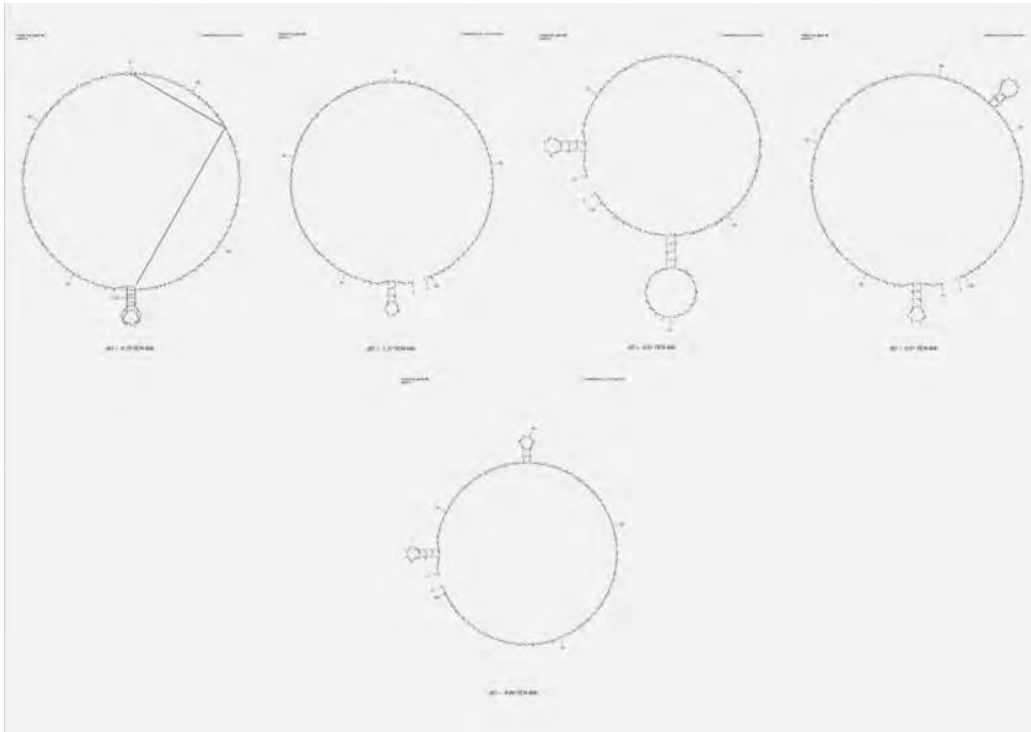


Fig. 8. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD4 a 60° C

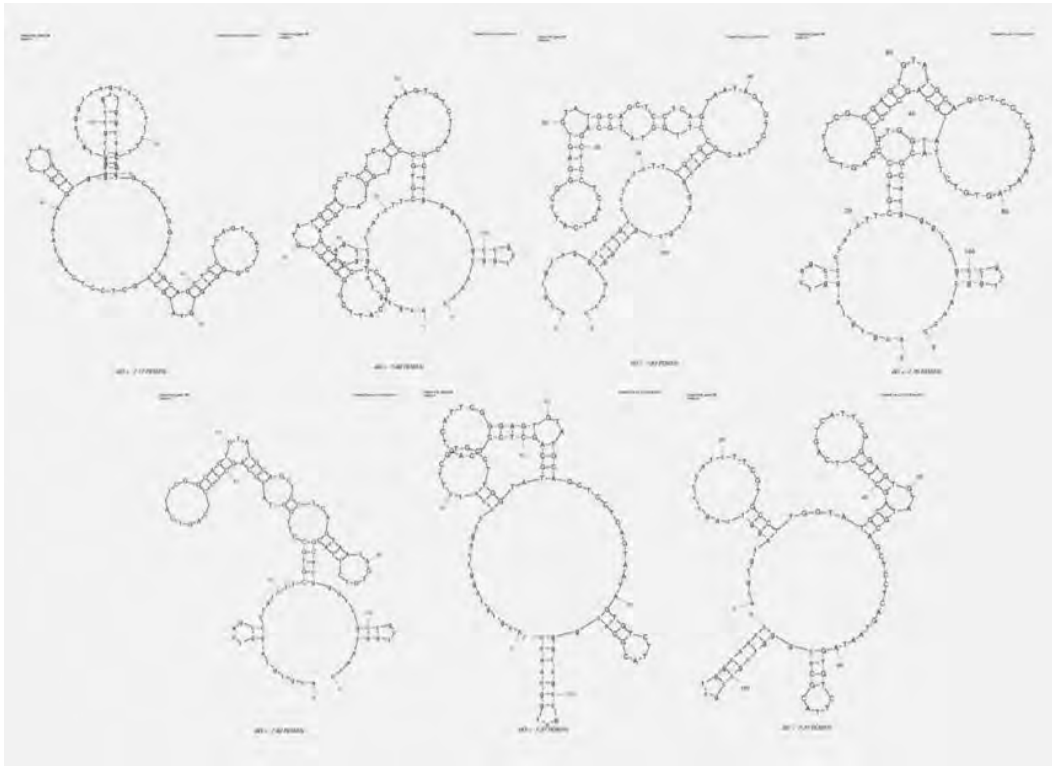


Fig. 9. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD9 a 37° C

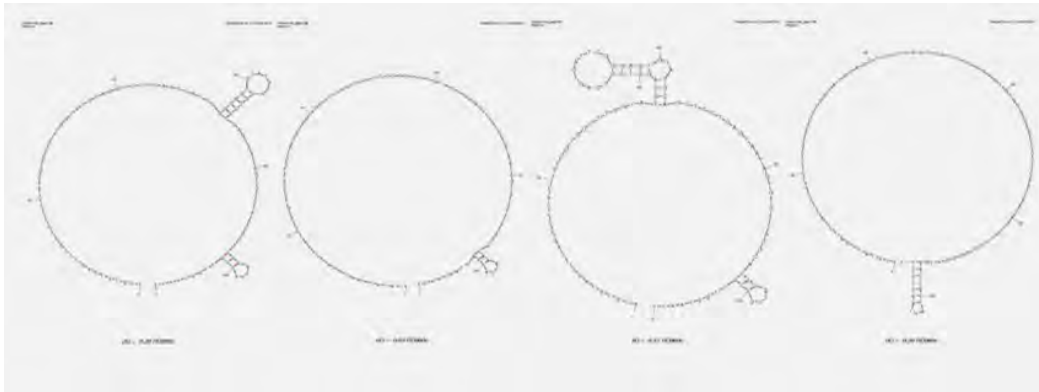


Fig. 10. Estructuras secundarias hipotéticas de la sonda SP5'RD9 a 60° C

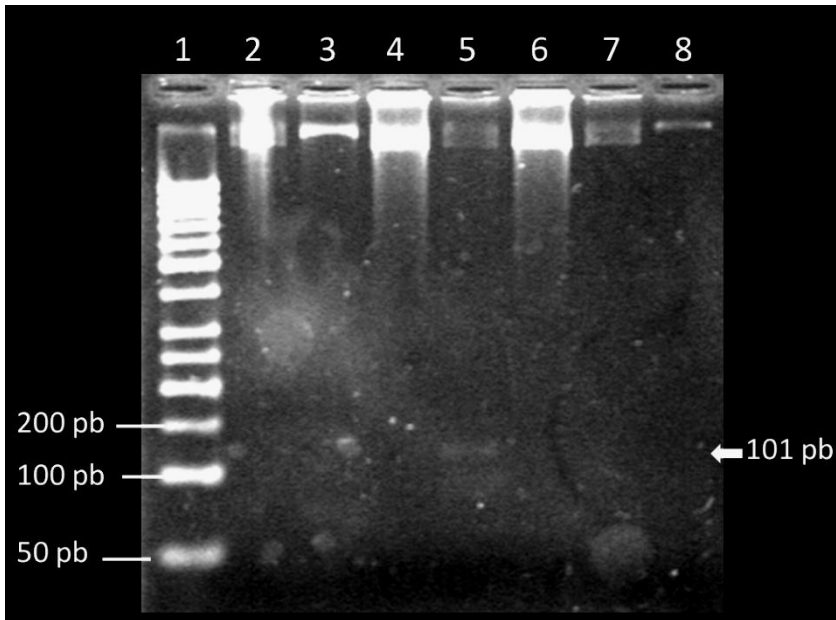


Fig. 11. Mezclas de RCA pDZ110/SP5'RD4 intactas y tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla de RCA con pGEM vacío, intacta. Carril 3, mezcla de RCA con pGEM vacío, tratada con *Eco RI*. Carril 4, mezcla de RCA con SP5'RD4, intacta. Carril 5, mezcla de RCA SP5'RD4, tratada con *Eco RI*. Carril 6, mezcla de RCA sin DNA, intacta. Carril 7, mezcla de RCA sin DNA, tratada con *Eco RI*. Carril 8, pGEM vacío, tratado con *Eco RI*.

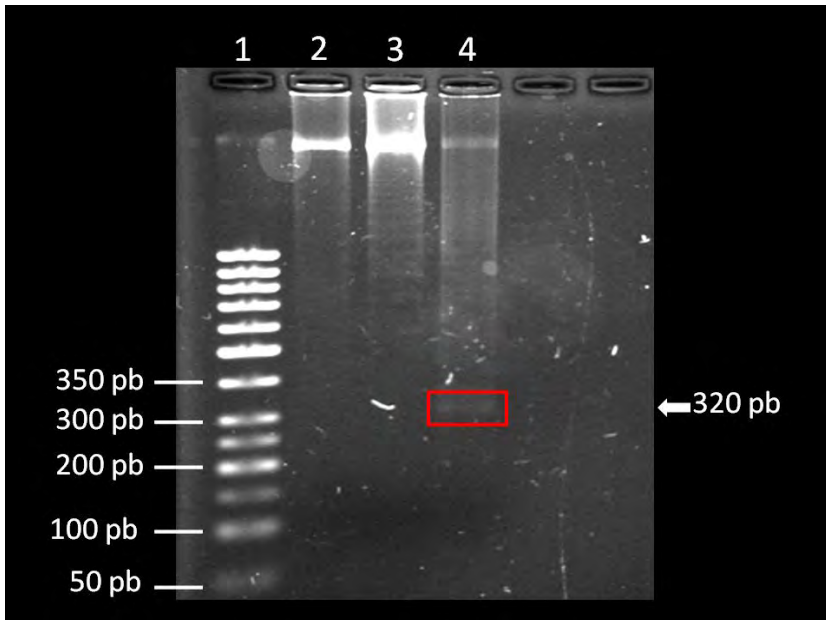


Fig. 12. Mezclas de RCA con diluciones seriadas de pDZ110 y SP5'RD4 y tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Muestras de 6 μL . Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla de RCA con SP5'RD4 (10^5 Copias de pDZ110/ μL). Carril 3, mezcla de RCA con SP5'RD4 (10^4 Copias de pDZ110/ μL). Carril 4, mezcla de RCA con SP5'RD4 (10^3 Copias de pDZ110/ μL).

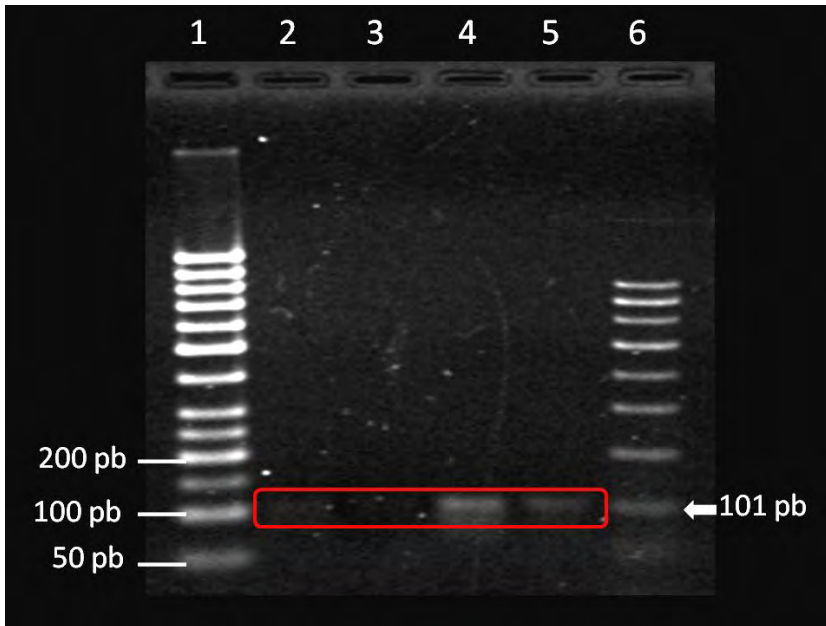


Fig. 13. Mezclas de RCA RD4-401pb/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales, tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 1.5% de 5 mm de espesor. Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla con hexámeros adicionales incubada 2.5 h. Carril 3, mezcla sin hexámeros adicionales incubada 2.5 h. Carril 4, mezcla con hexámeros adicionales incubada 18 h. Carril 5, mezcla sin hexámeros adicionales incubada 18 h. Carril 6, escalera de 100 pb.

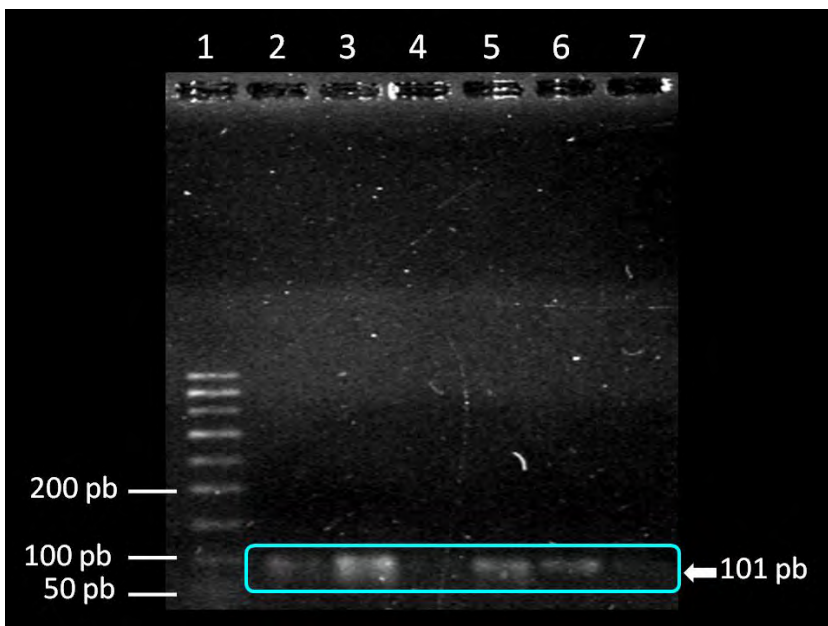


Fig. 14. Mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 1.5% de 5 mm de espesor. Mezclas de RCA con amplicón RD4-401 pb, con o sin hexámeros adicionales e incubadas 2.5 o 18 h. Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera de 50 pb. Carril 2, sin hexámeros adicionales, 2.5 h. Carril 3, con hexámeros adicionales, 2.5 h. Carril 4, sin hexámeros adicionales, 18 h. Carril 5, con hexámeros adicionales, 18 h. Carril 6, 746.5 ng de amplicón-100 pb. Carril 7, 150.7 ng de amplicón 100-pb.

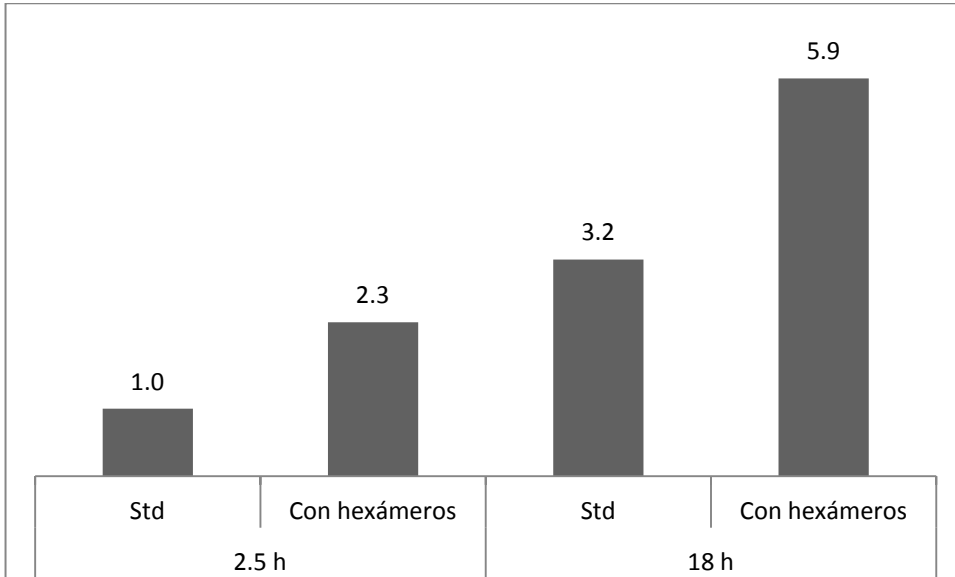


Fig. 15. Intensidad relativa de las bandas de monómeros en las mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4 incubadas 2.5 h o 18 h con o sin hexámeros adicionales

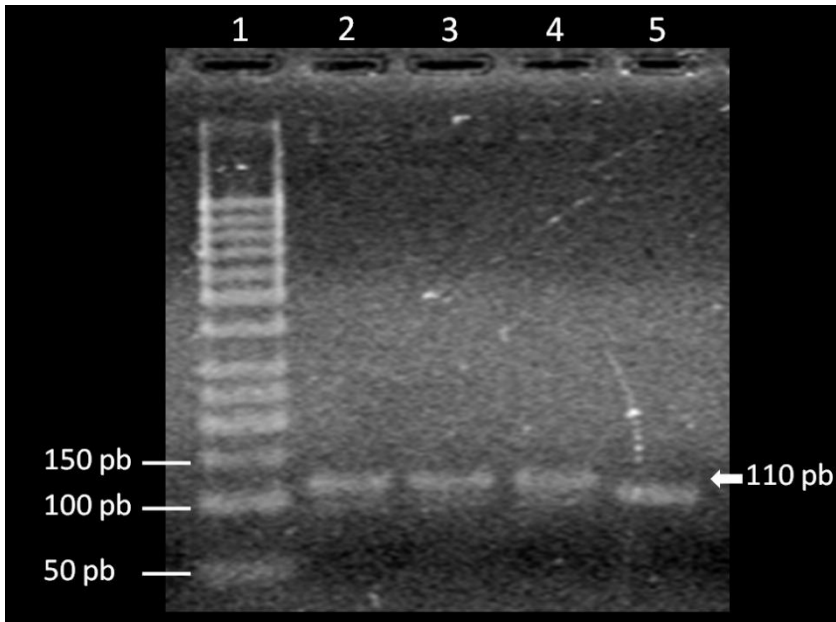


Fig. 16. Bandas de monómeros en mezclas de RCA RD9-361/SP5'RD9 con 30, 60 y 120 min de ligación y 18 h de amplificación

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 5 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla de RCA, 30 min de ligación. Carril 3, mezcla de RCA, 60 min de ligación. Carril 4, mezcla de RCA, 120 min de ligación. Carril 5, amplicón de 100 pb (186 ng/ μ L).

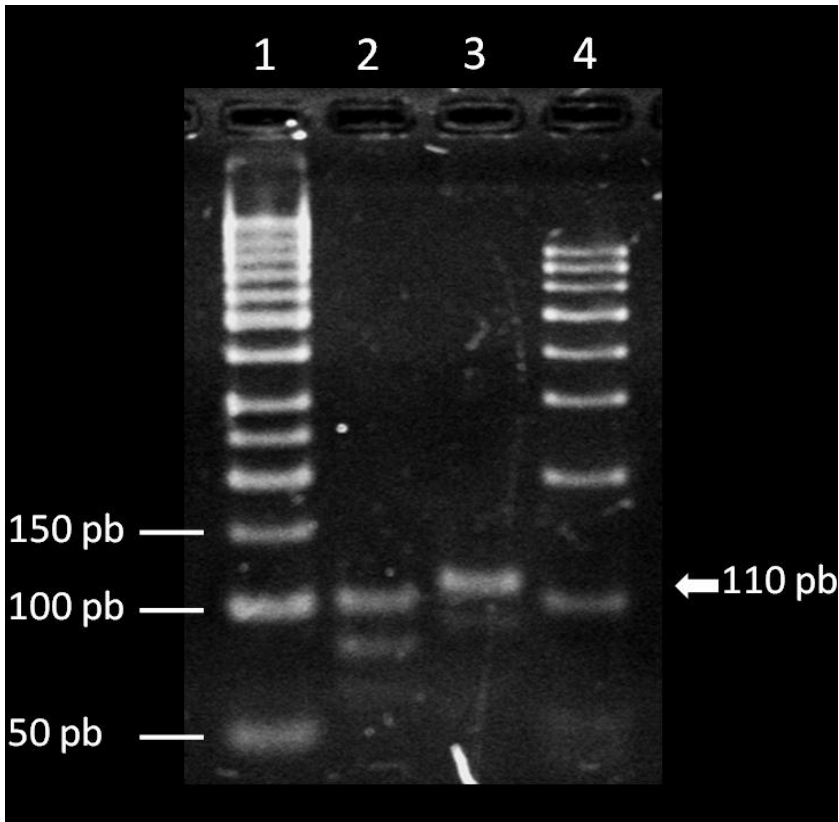


Fig. 17. Bandas de monómeros en mezclas RD4/SP5'RD4 o RD9/SP5'RD9 tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 3% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA con los amplicones RD4 o RD9 y las sondas respectivas, incubadas 18 h con hexámeros adicionales. Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla RD4/SP5'RD4. Carril 3, mezcla RD9/SP5'RD9. Carril 4, escalera 100 pb.

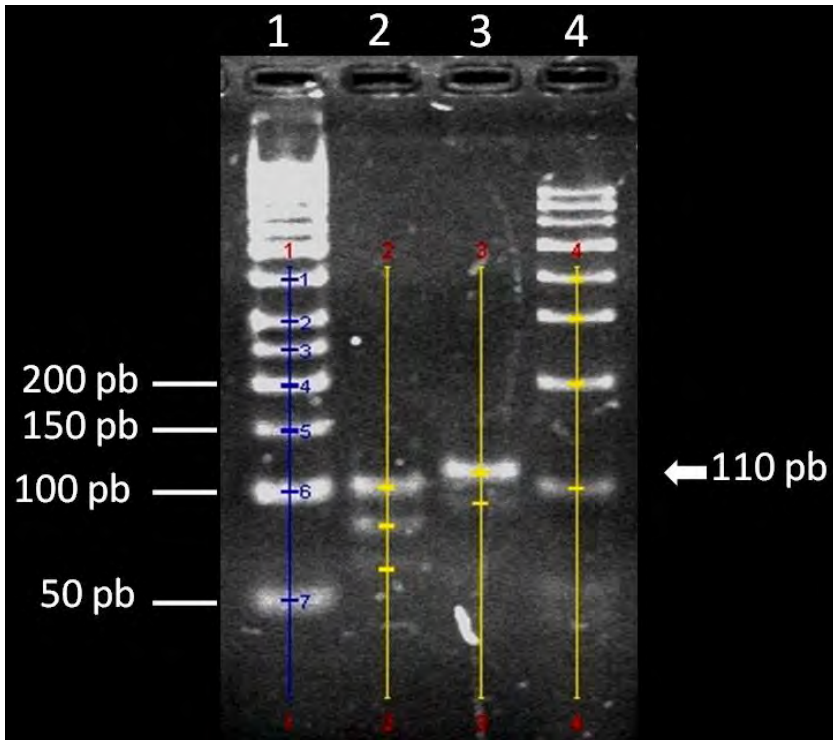


Fig. 18. Bandas de tamaños menores que las de los monómeros en mezclas de RCARD4/SP5'RD4 y RD9/SP5'RD9

Gel SB-agarosa al 3% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA con los amplicones RD4 o RD9 incubadas 18 h con hexámeros adicionales. Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, mezcla RD4/SP5'RD4. Carril 3, mezcla RD9/SP5'RD9. Carril 4, escalera 100 pb.

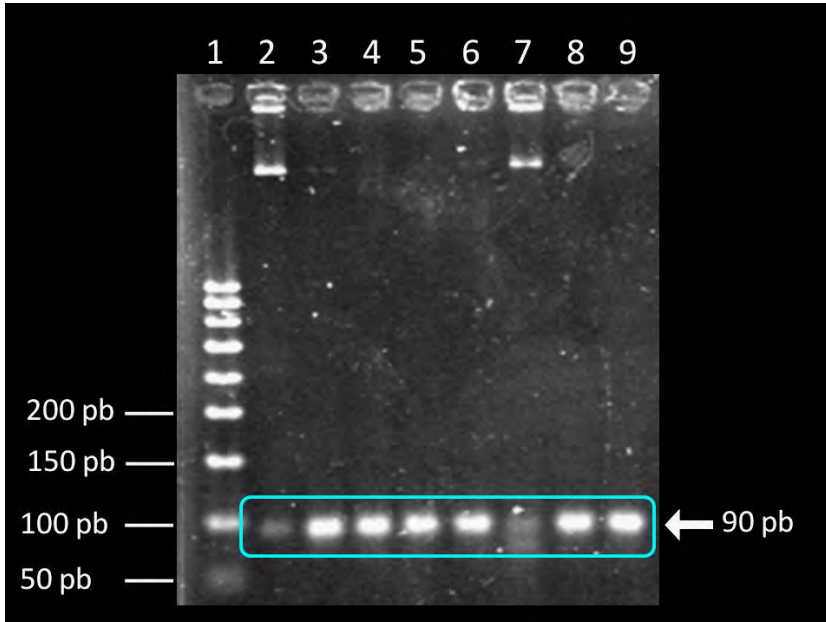


Fig. 19. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con SP5'RD1 y diluciones logarítmicas de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv

Gel SB-agarosa al 3% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h con hexámeros adicionales.

Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carriles 2-9, Mezclas de RCA con diluciones logarítmicas seriadas de copias del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 2, 3.09×10^7 copias. Carril 3, 3.09×10^6 . Carril 4, 3.09×10^5 copias. Carril 5, 3.09×10^4 copias. Carril 6, 3.09×10^3 copias. Carril 7, 3.09×10^2 copias. Carril 8, 30.9 copias. Carril 9, 3.09 copias.

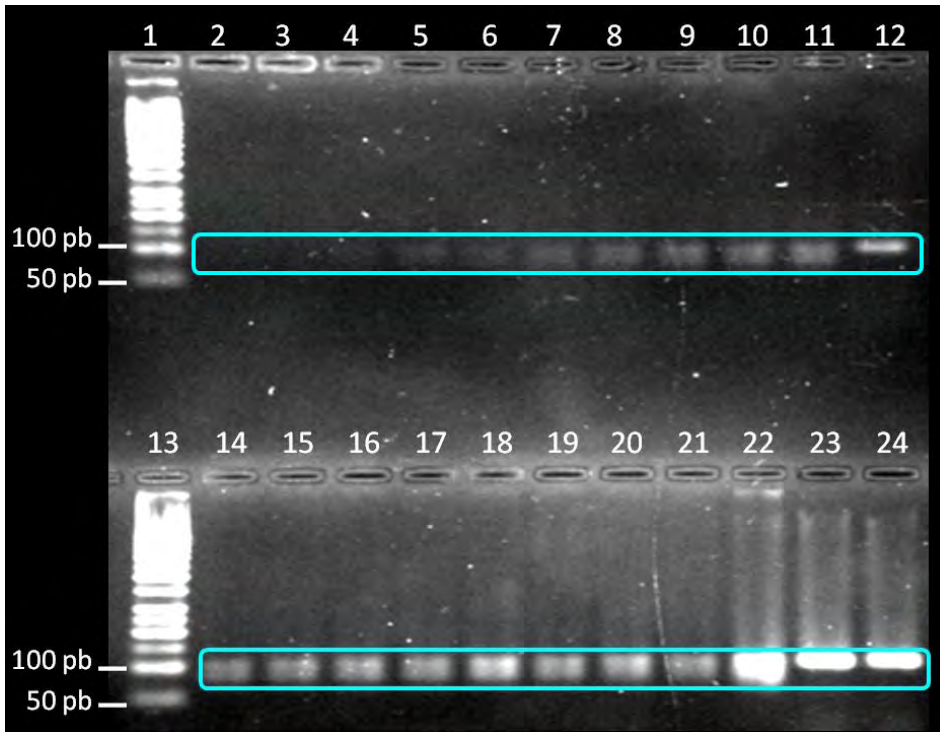


Fig. 20. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con SP5'RD4 y cuatro copias del amplicón RD4+ (401 pb) incubadas desde 32 hasta 1080 min

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 5 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carriles 2-12 y 14-22, Mezclas de RCA con SP5'RD4 y cuatro copias del amplicón RD4+ incubadas por tiempos variables. Carril 2, 16 min. Carril 3, 32 min. Carril 4, 48 min. Carril 5, 64 min. Carril 6, 80 min. Carril 7, 96 min. Carril 8, 112 min. Carril 9, 128min. Carril 10, 144 min. Carril 11, 160min. Carril 12, Amplicón 100 pb (195 ng/ μ L). Carril 13, escalera 50 pb. Carril 14, 176 min. Carril 15, 192 min. Carril 16, 208 min. Carril 17, 224 min. Carril 18, 240 min. Carril 19, 256 min. Carril 20, 272 min. Carril 21, 288 min. Carril 22, 1080 min. Carril 23, Amplicón 100 pb (1138 ng/ μ L). Carril 24, Amplicón 100 pb (870 ng/ μ L).

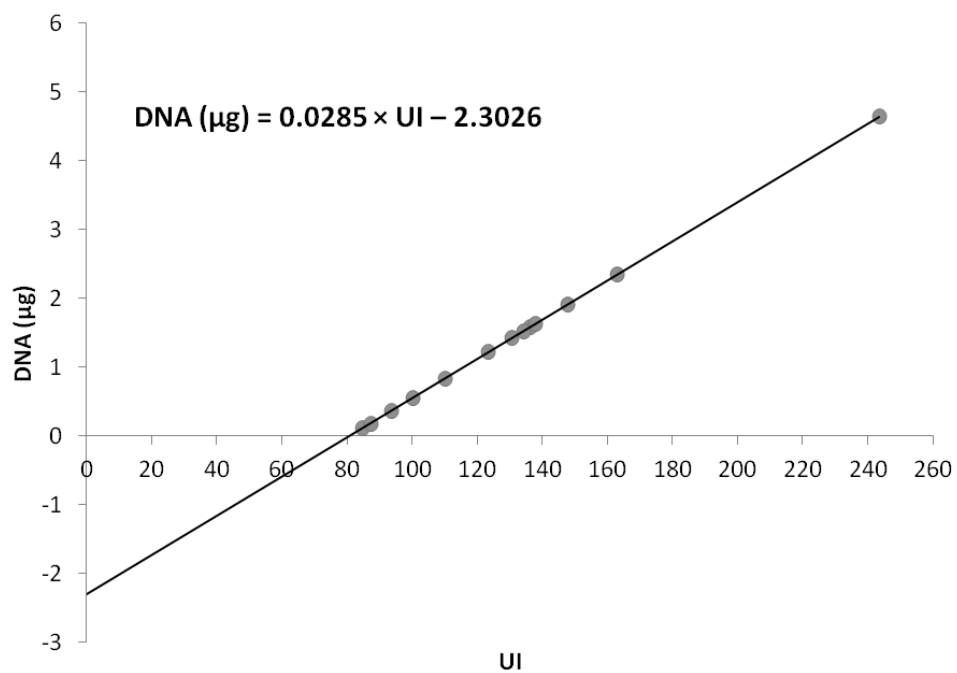


Fig. 21. Curva tipo con DNA del amplicón RD4+(401 pb) para estimar el contenido de monómeros dsSP5'RD4-401 generados en mezclas de RCA

Intensidad relativa (UI) vs. masa estimada (μg) en las bandas principales de DNA observadas en mezclas RD4-401/SP5'RD4 incubadas por tiempos variables.

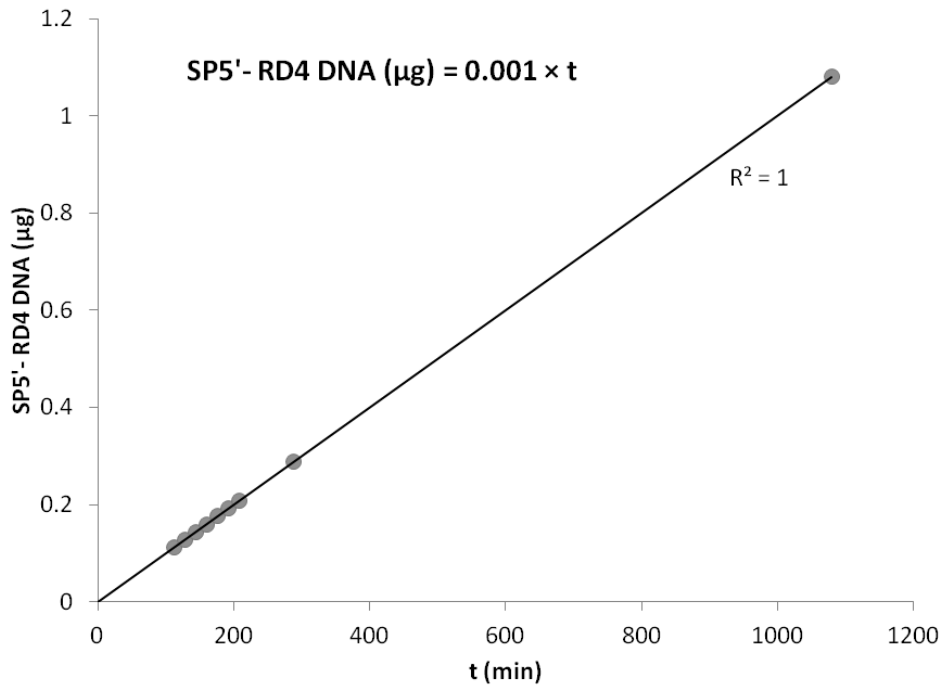


Fig. 22. Cinética de la producción de monómeros de SP5'RD4 en mezclas de RCA RD4-401/SP5'RD4

Masa estimada de monómeros SP5'RD4 (μg) en función del tiempo de incubación (0-1080 min).

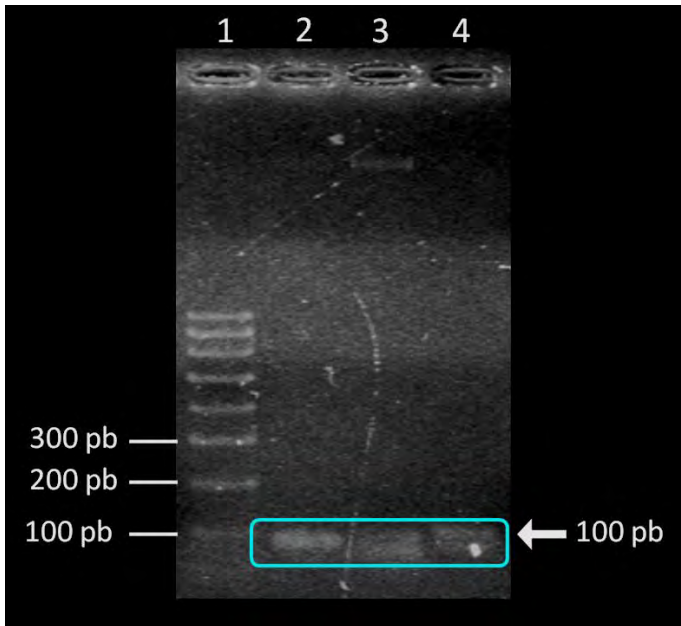


Fig. 23. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9, tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h con hexámeros adicionales.

Muestras de 5 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, SP5'RD1. Carril 3, SP5'RD4. Carril 4, SP5'RD9.

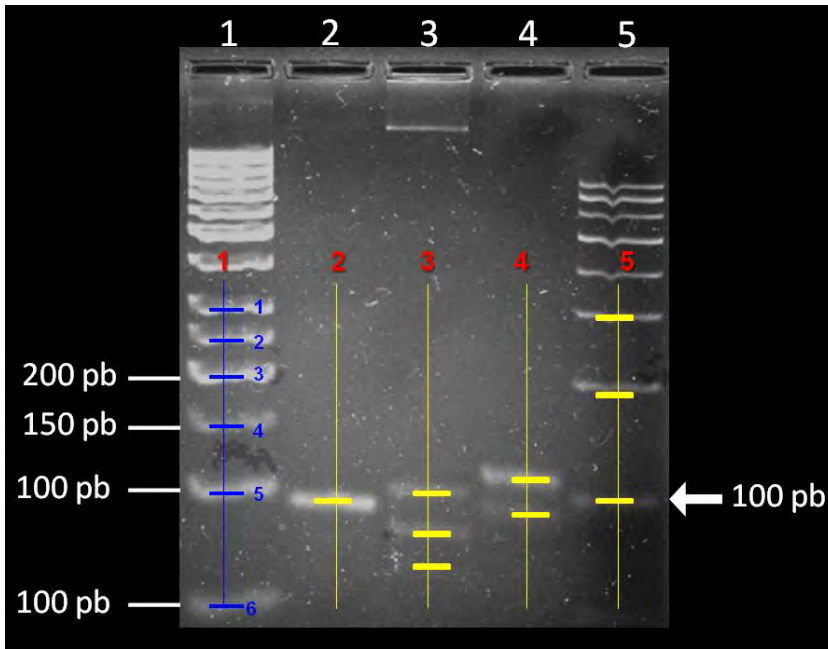


Fig. 24. Tamaño de las bandas principales de DNA en mezclas de RCA con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9, tratadas con *Eco RI*

Gel SB-agarosa al 3% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h con hexámeros adicionales.

Muestras de 6 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carril 2, SP5'RD1. Carril 3, SP5'RD4. Carril 4, SP5'RD9. Carril 5, escalera 100 pb.

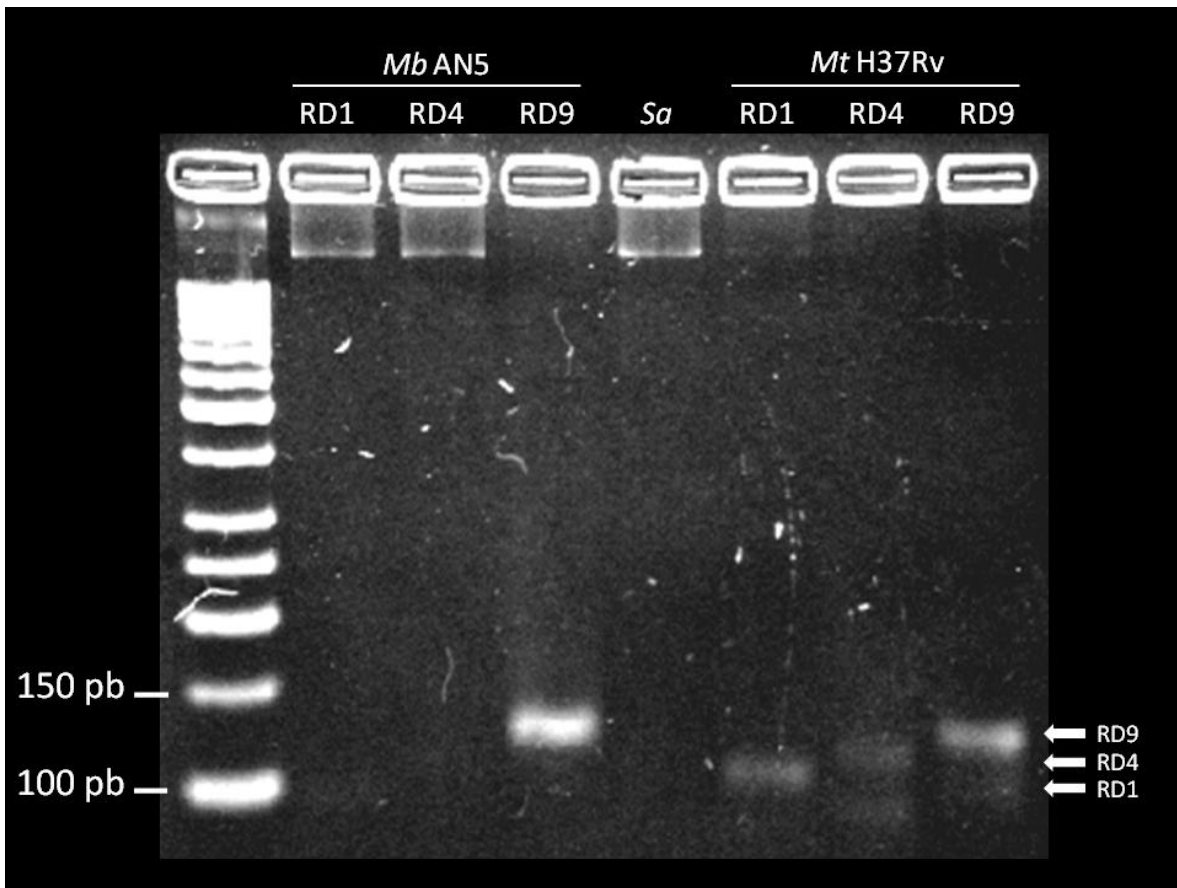


Fig. 25. Bandas de monómeros en mezclas de RCA con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y *S. aureus* ATCC 25923 y las sondas SP5'RD1, SP5'RD4 o SP5'RD9

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h con hexámeros adicionales tratadas con *Eco* RI. Muestras de 5 μ L. Carril 1, escalera 50 pb. Carriles 2-4, Mezclas con *M. bovis* AN5. Carril 2, SP5'RD1. Carril 3, SP5'RD4. Carril 4, SP5'RD9. Carril 5, mezcla de *Sa*/SP5'RD4. Carriles 6-8, Mezclas con *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 6, SP5'RD1. Carril 7, SP5'RD4. Carril 8, SP5'RD9.

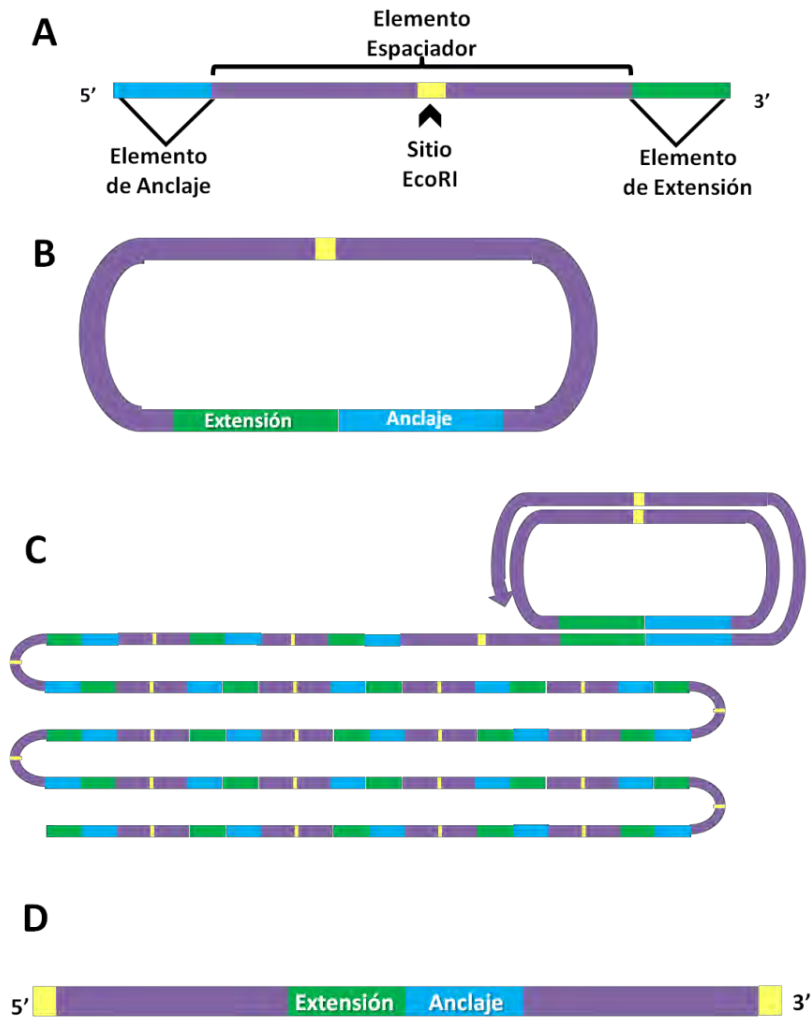


Fig. 26. Orientación de los componentes de las sondas *padlock*

(A) Estructura lineal de la sonda. (B) Sonda circularizada y sellada por ligación de los brazos de captura y extensión yuxtapuestos. (C) Generación del concatémero lineal durante la RCA. (D) Monómero obtenido por restricción del concatémero con *Eco RI*.

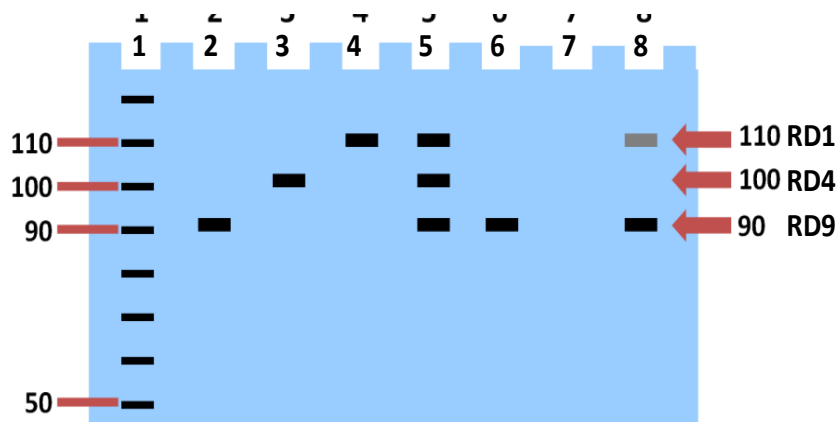


Fig. 27. Patrones electroforéticos esperados para los monómeros generados por restricción de los concatémeros con *Eco RI*

Carril 1, Escalera de 10 pb. Carril 2, Monómero de RD1 (90 pb), Carril 3, Monómero de RD4 (100 pb). Carril 4, Monómero de RD9 (110 pb). Carril 5, Patrón de *M. tuberculosis* (90, 100 y 110 pb). Carril 6, Patrón de *M. bovis* (90 pb). Carril 7, Patrón de *M. bovis* BCG (sin bandas). Carril 8, Patrón de otras micobacterias del CMTB (90 pb y alguna otra banda (gris) de tamaño variable).

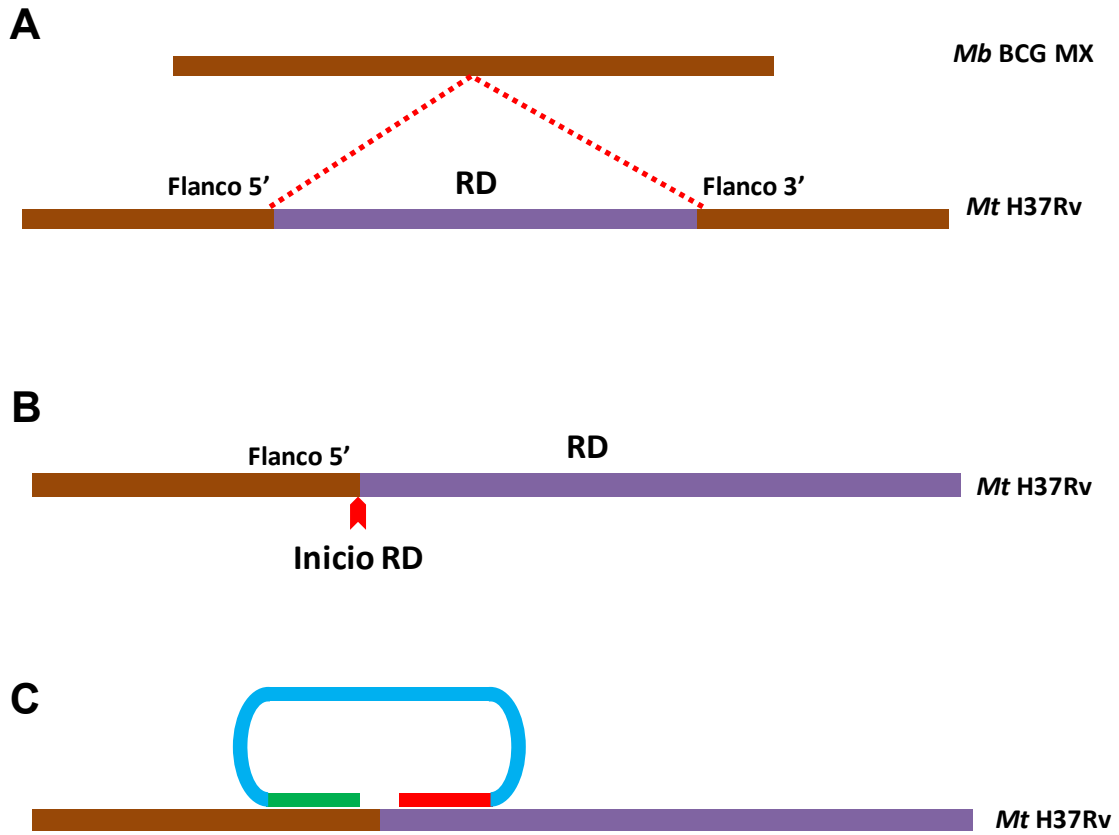


Fig. 28. Estrategia empleada para el diseño de las sondas *padlock*

Mt, *M. tuberculosis*. *Mb*, *M. bovis*.