IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

La proteomica applicata alla caratterizzazione antigenica della *Brucella*

Progetto: Brucella melitensis -biotyping and differential diagnostic- (EMIDA Brucmel)

Chiara Di Pancrazio - Teramo, 15 giugno 2016

Sala Convegni “V. Prencipe” - CIFIV

Partner del progetto

1. **Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"** - Italia;
2. **Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"** – Italia;
3. **Veterinary Research Institute of Thessaloniki (NAGREF)** – Grecia;
4. **Kimron Veterinary Institute (Kimron)** – Israele.

Progetto EMIDA

Obiettivi Approccio Proteomico

- Caratterizzazione proteomica dei ceppi di campo di *B. melitensis* e il ceppo vaccinale *B. melitensis* Rev.1
- Analisi sierologiche per individuare :
  - **animali infetti** da *B. melitensis vs* **animali vaccinati** con il ceppo *B. melitensis* Rev. 1 – ***DIVA strategies*** –
- Identificazione di determinanti antigenici capaci di discriminare:
  - **animali infetti** da *B. melitensis vs* **animali infetti da patogeni "cross-reattivi"** (*E. coli O157:H7, Y. enterocolitica O:9*).

Scopo del progetto

Identificazione di nuove proteine antigeniche:

- Analisi delle proteine di membrana di *Brucella spp*., *B. melitensis* Rev.1 e batteri “cross-reattivi”.
- Identificazione e caraterizzazione delle proteine immunogeniche.
- Sintesi di proteine come antigeni ricombinanti e analisi sierologiche.

Risultati Analisi Bioinformatica

Analisi di numerosi geni appartenenti a:

Brucella spp., *B. mel.* Rev.1 , e batteri “cross-reattivi”

Identificati 6 geni

Risultati Analisi Bioinformatica

Risultati analisi molecolari (PCR)

Proteine	Rev.1		*Brucella spp*		Cross-reattivi	
	Bioinfo.	PCR	Bioinfo.	PCR	Bioinfo.	PCR
D0B7Y2 (Sugar ABC transporter)	-	+	+	+	+	-
Q8YIL0 (Periplasmic dipeptide transport protein)	-	+	+	+	+	*E.coli* O157:H7
Q8YCE2 (Sugar binding periplasmic protein BMEII0590)	+	+	+	+	-	-
rpoB (DNA-dependent RNA polymerase beta chain)	+	+	+	+	-	-
sodC (Copper/Zinc superoxide dismutase IL gene)	+	+	+	+	-	-
rplL gene (50S ribomosal proteins L7/L12)	+	+	+	+	-	-

Produzione antigeni ricombinanti

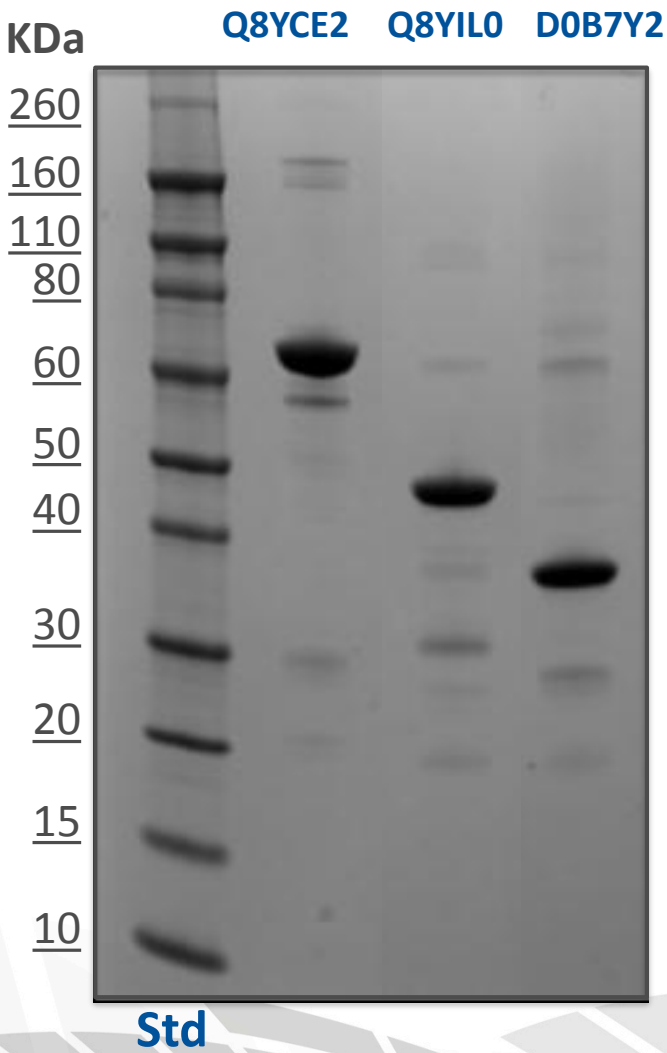
Antigeni ricombinanti di *B. melitensis*:

- **D0B7Y2** (*Sugar ABC transporter*)
- **Q8YIL0** (*Periplasmic dipeptide transport protein*)
- **Q8YCE2** (*Sugar binding periplasmic protein BMEII0590*)

vettore pGs21a e sistema di espressione cellule *E. coli* BL21 (GenScript)

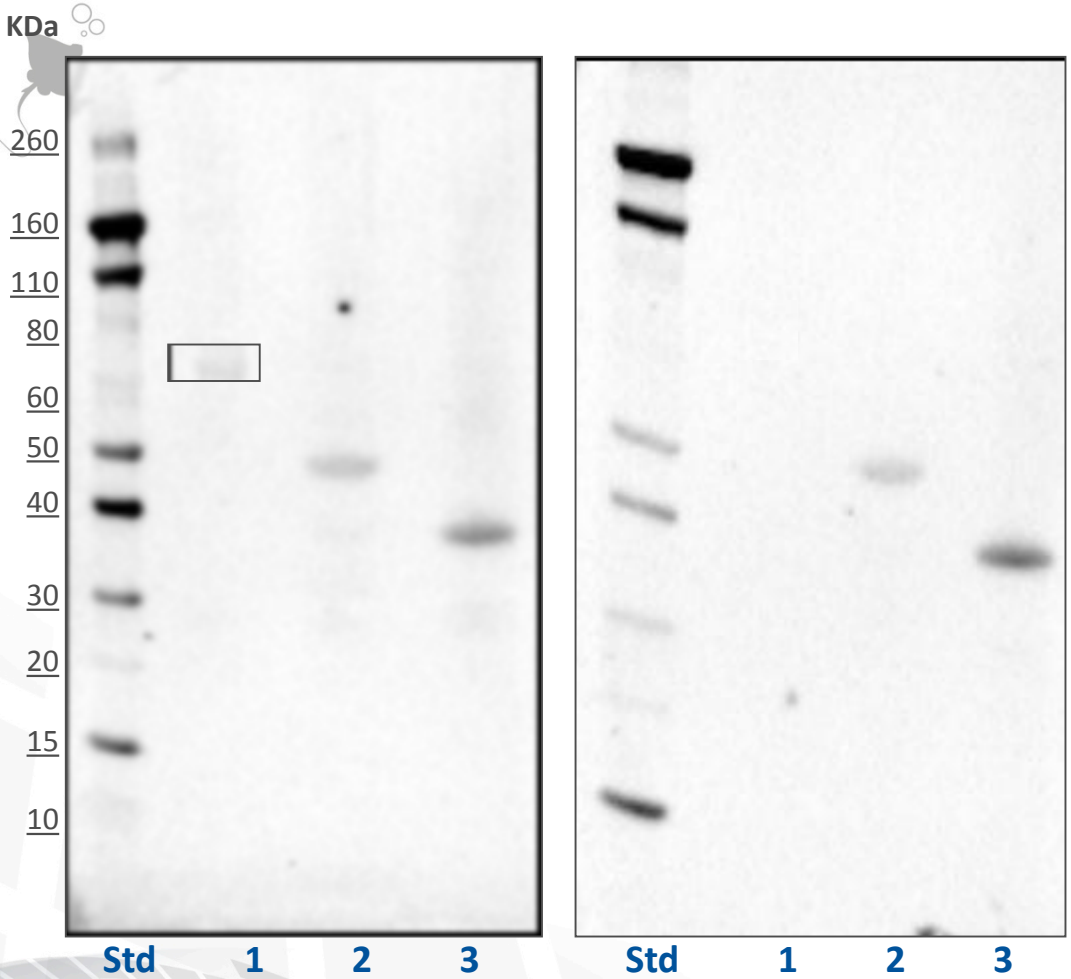
Produzione antigeni ricombinanti

SDS-PAGE proteine ricombinanti



Produzione antigeni ricombinanti

Risultati Immunowestern blotting



Siero Ovino Positivo *B. mel.* Siero Ovino Negativo

1. Q8YCE2 *
2. Q8YIL0
3. D0B7Y2

Ab secondario:
Mab-HRP 8C9E7 anti IgG-ovine (IZSAM)

Sistema rivelatore:
ECL

Analisi Proteomica

Risultati NAGREF

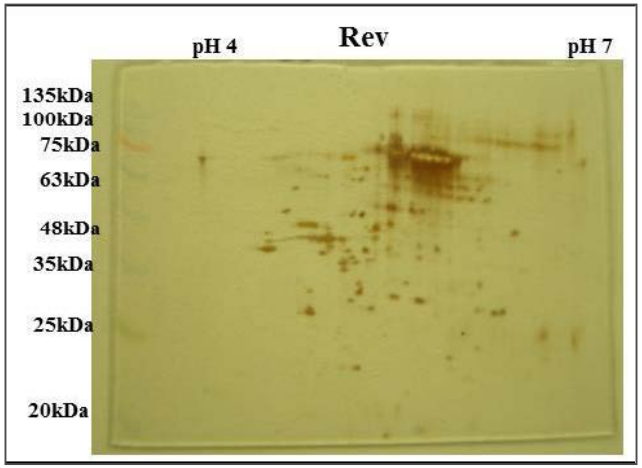
Sviluppo di un protocollo di estrazione delle **proteine periplasmiche** di *B. melitensis* (NAGREF) e analisi 2DE:

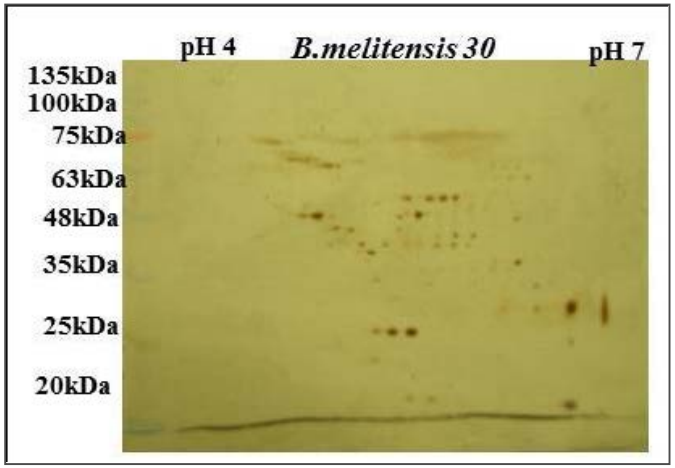
- 20 ceppi di campo di *B. melitensis* –Grecia;
- 1 ceppo di campo di *B. melitensis* –Italia;
- 1 ceppo vaccinale *B. melitensis* Rev.1;
- batteri cross-reattivi *Y. enterocolotica* O:9 e *E. coli* O157:H7.

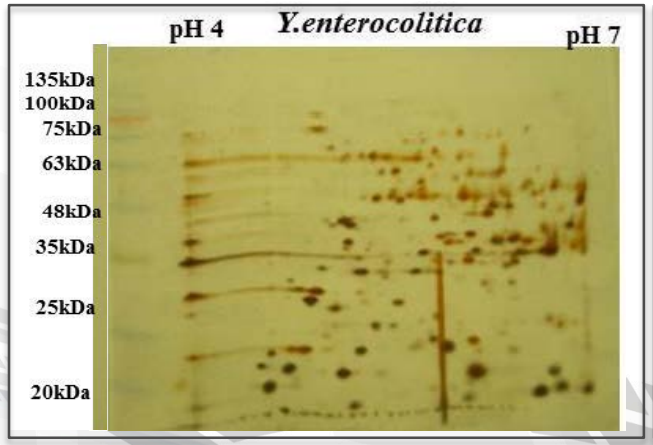
Analisi Proteomica

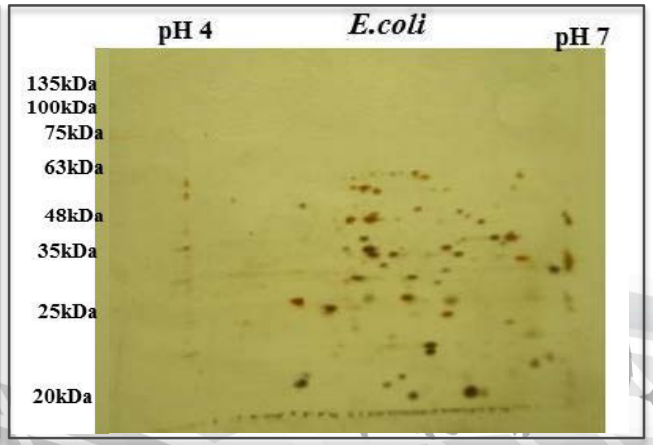
Risultati NAGREF

	B. melitensis vs Rev.1	*B. melitensis* vs batteri cross-reattivi
pI	5.5-6	5.5-7
MW (KDa)	48-75	17-48









Analisi Proteomica

Protocollo di estrazione

del **proteoma totale**

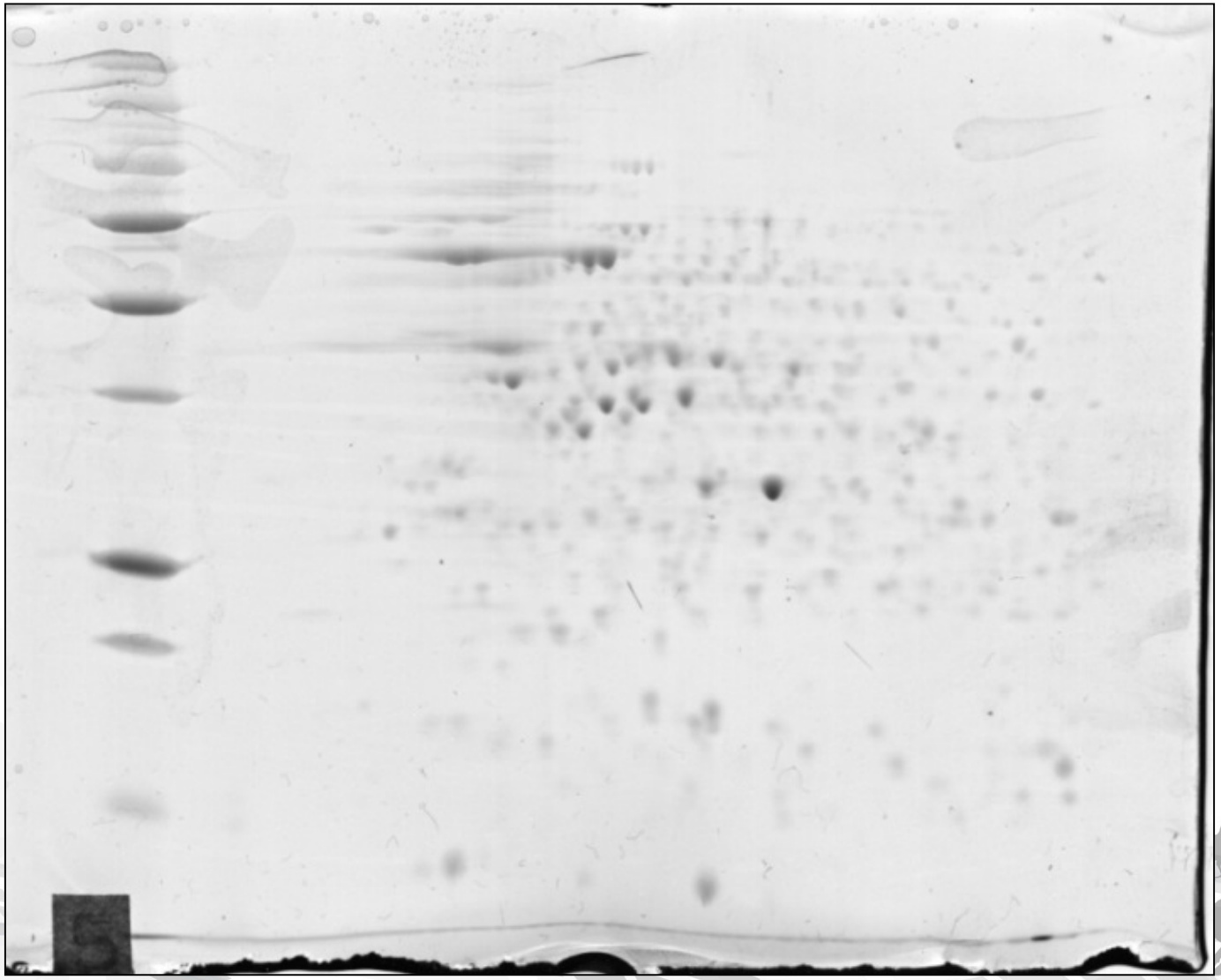
sviluppato dall'IZSAM in collaborazione con l'Unità di Proteomica del Ce.S.I.

(Università "D'Annunzio" – Chieti)

(Al Dahouk *et al.* 2013).

2DE del proteoma totale

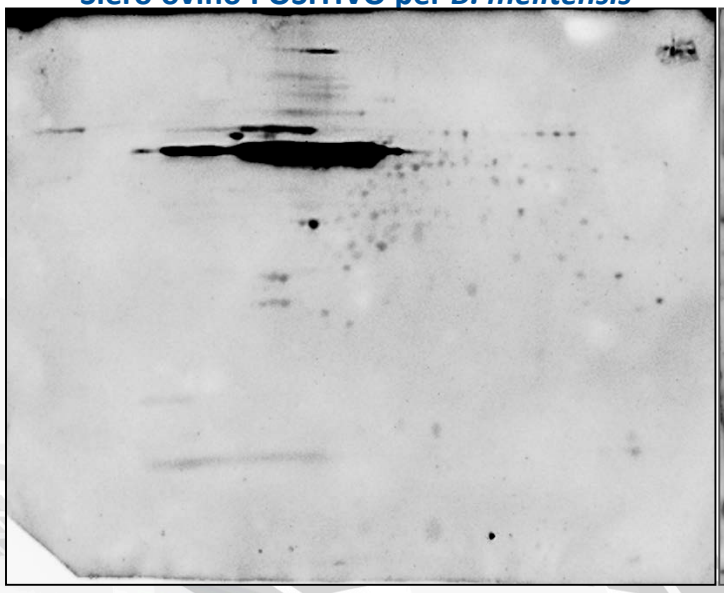
Colorazione con Blue di Comassie



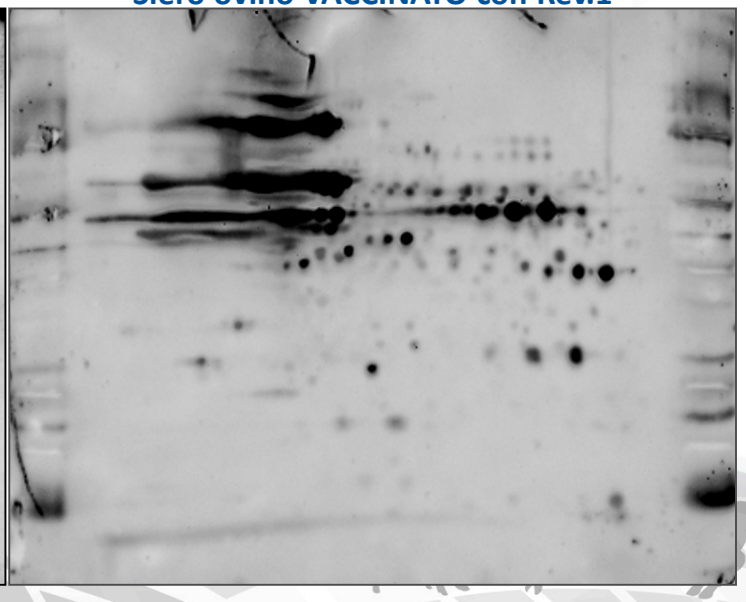
Analisi Immunowestern blotting

Siero ovino NEGATIVO

Siero ovino POSITIVO per *B. melitensis*



Siero ovino VACCINATO con Rev.1



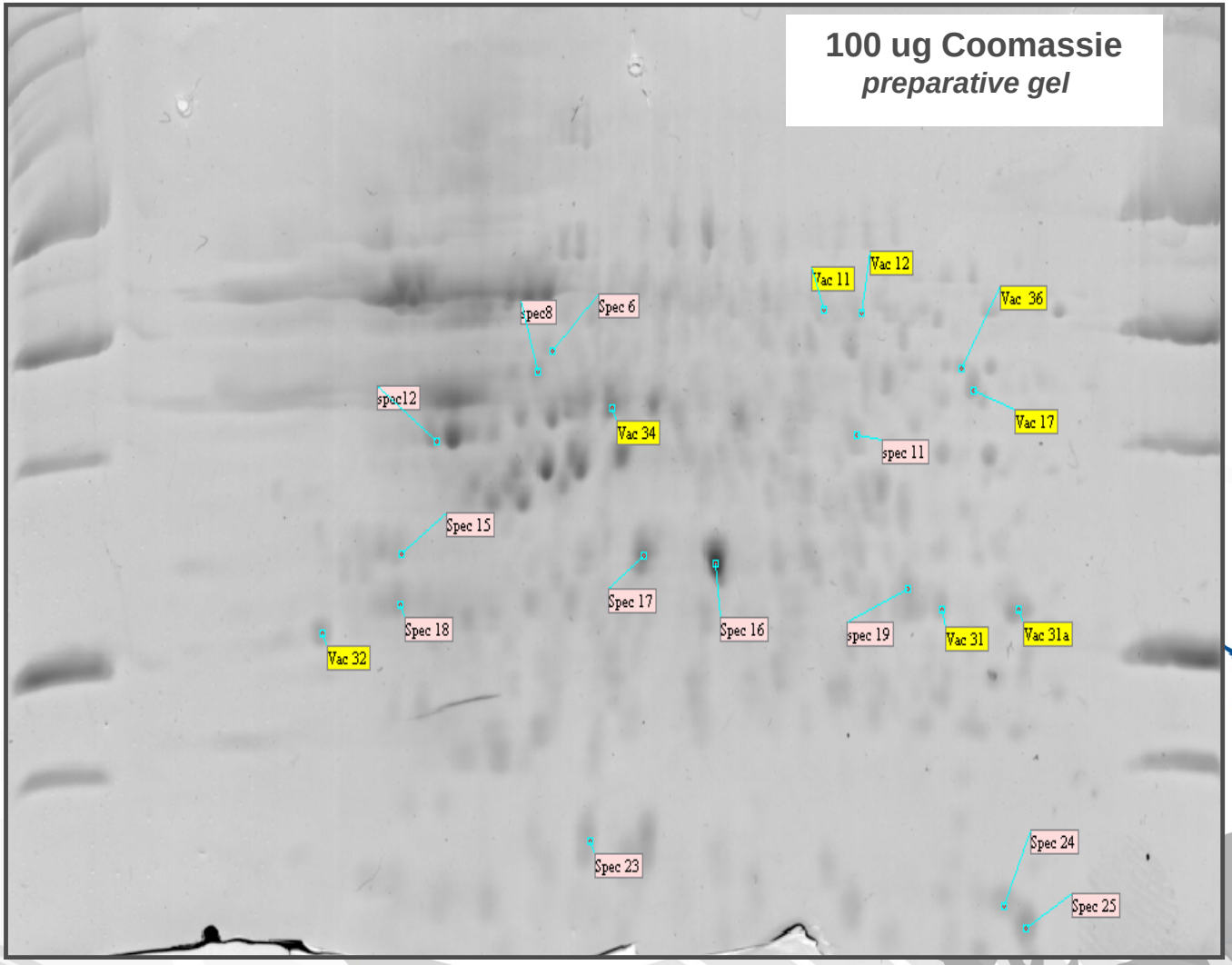
Spots *B. mel. vs* Rev.1

4 ← IPG 4-7 → 7

180

KDa

10



Confronto sieri ovini positivi per *B. melitensis vs* sieri ovini vaccinati Rev.1

Analisi Proteomica

Gli spots proteici che mostravano un livello di intensità significativo sono stati escissi dal gel e analizzati usando un approccio **PMF** (***P****eptide* ***M****ass* ***F****inger printing*) utilizzando uno spettrometro di massa (MALDI-TOF/TOF).

Analisi MALDI-TOF/TOF

Proteine unicamente identificate dai **Sieri di Animali Infetti da *B. melitensis***

Diff	FileName Spec SWISS PROT/NCBI	pI teo	MW teo	Score	Sequence coverage %	LIFT-TOF/FOT Parental	Score Combined Tof-Tof	Sequence
12	**SP39** Probable sugar-binding peripalsmic protein OS = *Brucella abortus* biovar 1 (strain 9-941)	5,16	45290	125	41	1860.9803 1254.5852	63	K.KPGEDFVCMR.Y + Oxidation (M) R.VTAGNAPTAVQMLGFDIR.D
16	**BCSP** 31kDa immunogenic protein	6.92	34252	136	40	1709.9733 1261.6625 1032.5184	156	R.LLATLYPETIHIVAR.K K.AEHLKPGPAGER. K.VLWNEDTR.K
18	***gi\17984597*** ribose-binding periplasmic protein precurs	5.60	31030	83	32	1953.0521 1417.7133	110	K.SVAIILDPANADGSVGAVKR.A K.VGGFDGSPDAIAAIK.A
17	**BCSP** 31kDa immunogenic protein	6.92	34252	110	46	1515.7647 1709.9956 1820.9532	239	R.LLATLYPETIHIVAR.K R.VSLDEPGSGTIVDAR.I K.LDSATSSLGIPLHPGAER.F

Analisi MALDI-TOF/TOF

Proteine unicamente identificate dai **Sieri di Animali Vaccinati con Rev.1**

Diff	FileName Spec SWISS PROT/NCBI	pI teo	MW teo	Score	Sequence coverage %	LIFT-TOF/FOT Parental	Score Combined Tof-Tof	Sequence
11	***gi\492965089*** isocitrate lysase	5.61	47027	170	32	957.5303 1338.6704 2339.1391	236	R.RFAEAVHK.A M.TDFYSLIPSAPK.G K.LLTSDIDERDQPFVDYEAGR.T
12	***gi\490827792*** isocitrate lysase	5.70	46993	127	32	949.4856 1296.5878 1543.8260	210	K.GRFDGIER.A R.DQPFVDYEAGR.T R.LAADVMGTPLIVAR.T + Oxidation (M)
31	***gi\489056931*** enoyl-CoA hydratase	5.92	28312	172	82	1008.6227 1713.7913 2151.1359	260	R.DLPKPLIGR.I MNDFETLHIAVDHR.G R.LVHALGAPIDEAVIDMTLTR.L + Oxidaztion (M)

CONCLUSIONI (I)

- Sono state identificate proteine unicamente riconosciute da **animali infetti da *B. melitensis*.**

- Sono state identificate proteine esclusivamente individuate da **animali vaccinati con *B. mel.* Rev.1.**

CONCLUSIONI (II)

- Sono state individuate proteine in grado di distinguere gli animali realmente **infetti da *B. mel.*** da quelli **infetti dai batteri "cross-reattivi".**

Futuri studi

ARIMNet_2 Project: Improvement of epidemiological and serological tools for diagnosis and control of Brucellosis in the Mediterranean region (BrucMedNet).

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

GRAZIE PER L'ATTENZIONE