



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale



Brucella spp. Microarray

Reparto di Ricerca e Sviluppo Biotecnologie

12 ottobre 2012

Alfreda Tonelli

BSc, MSc



Brucella spp. Microarray

- Identifica la specie
- Evidenzia l'assenza o presenza di batteri che danno una risposta immunologica crociata
es: Yersinia enterocolitica O9, E. coli O157 etc.
- Differenzia organismi filogeneticamente simili
es: Agrobacterium spp., Rhizobium spp. etc.
- Evidenzia i geni di virulenza
- Identifica altre specie di germi abortigeni
es: Listeria monocytogenes, Campylobacter fetus, Anaplasma spp. etc.



Brucella spp. Microarray

- Geni Housekeeping sono:

- Universali nella specie
- In condizioni di crescita specifica il gene non deve mutare per adattarsi alle condizioni specifiche di crescita dell'organismo
- non devono trasferirsi in modo orizzontale



Brucella spp. Microarray

Esempi di geni Housekeeping

- *16SrRNA* (presenza in abbondanza nel genoma batterico)
 - Regioni variabili vengono usate per la distinzione (<http://rdp.cme.msu.edu/>)
- *hsp60* (groEL or chaperonins)
- *gyrB* (DNA gyrase)
- *rpoB* (DNA-directed RNA polymerase)



Brucella spp. Microarray



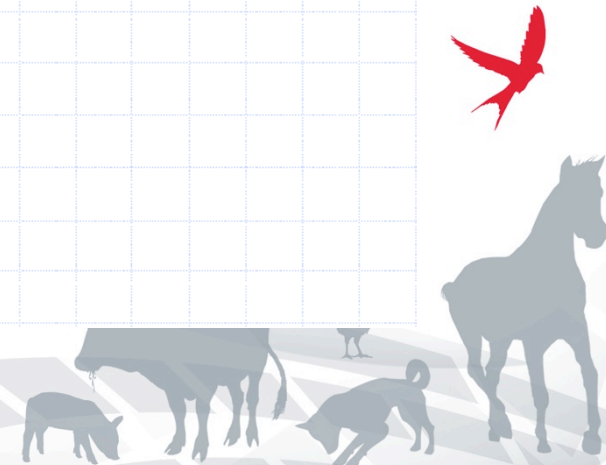
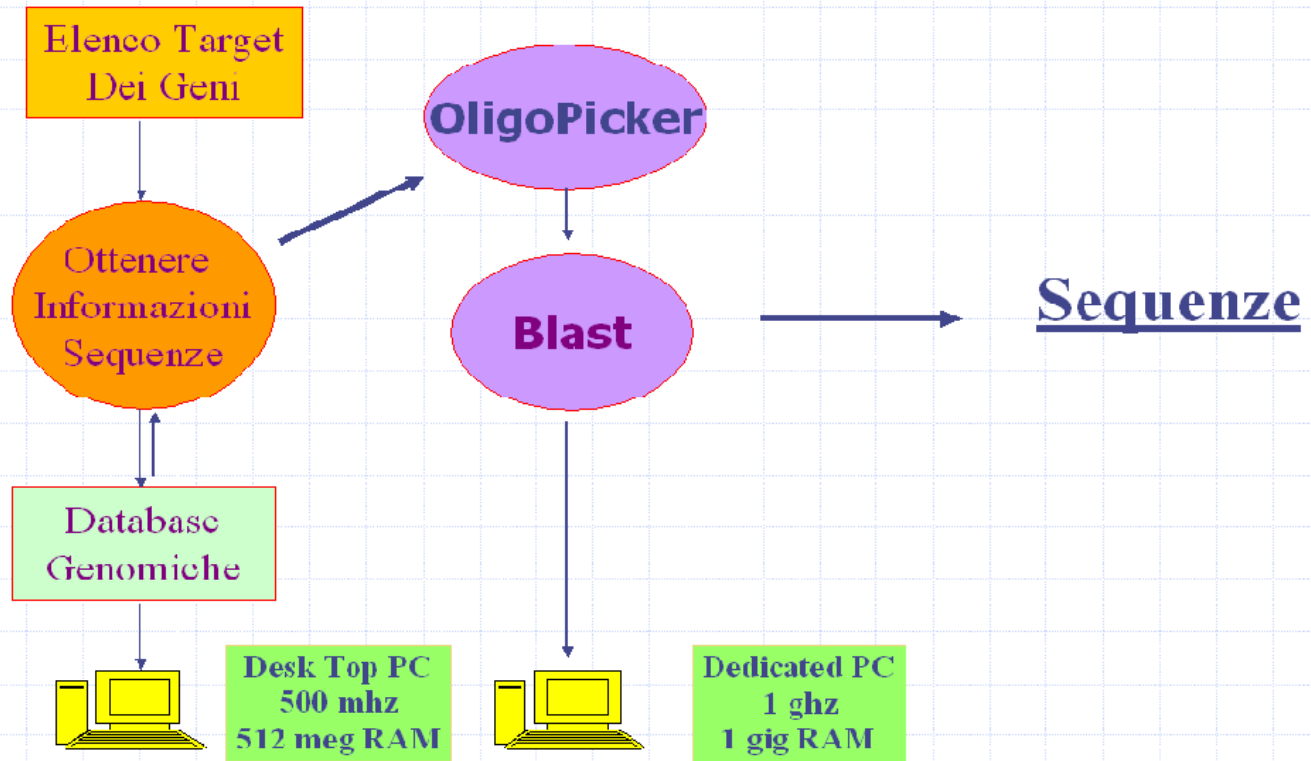
Geni di virulenza

- VFDB (Virulence Factor Database)
(<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Brucella>)
- Phidias Bioinformatics Portal
(<http://www.phidias.us/bbp/bruvirf/index.php>)



Brucella spp. Microarray

Microarray Design



Brucella spp. Microarray

- Le Sequenze sono scelte con OligoPicker (1)
- Le Sequenze sono valutate con

- BLAST del National Center for Biotechnology Research (NCBI)

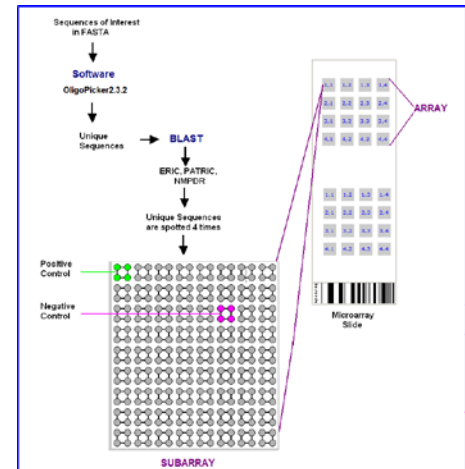
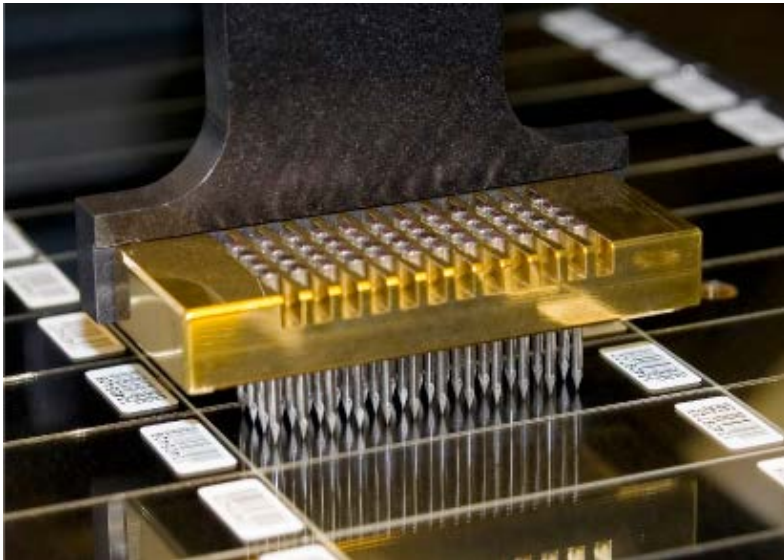
Blast http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

- BLAST del Broad Institute

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/brucella_group/Blast.html?sp=Sblast



Brucella spp. Microarray

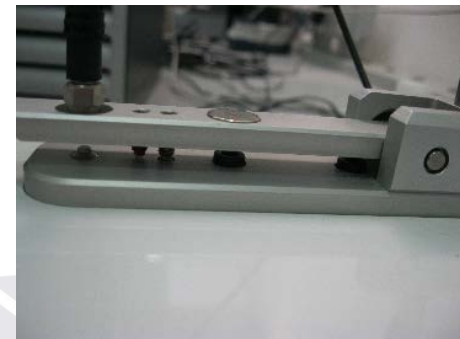


Brucella spp. Microarray

Maxwell® 16 Cell DNA Purification kit (Promega)

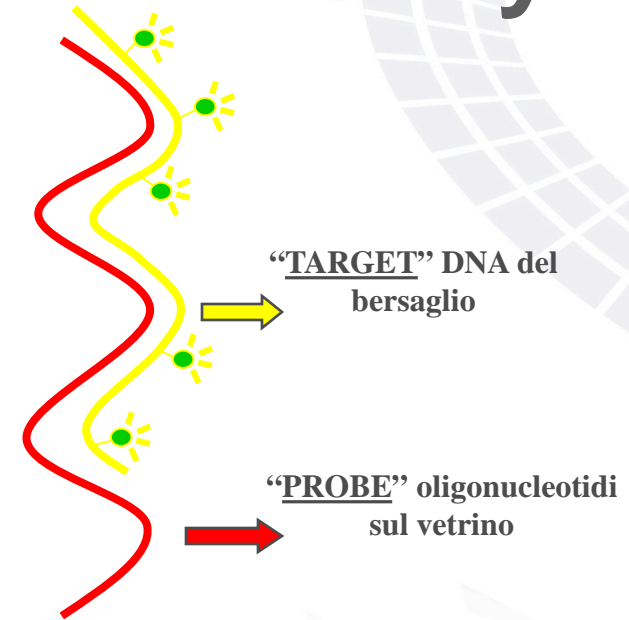


Misurare la quantità del DNA (NanoDrop)



Brucella spp. Microarray

Amplificazione del DNA
BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System
Amersham Cy3-dCTP

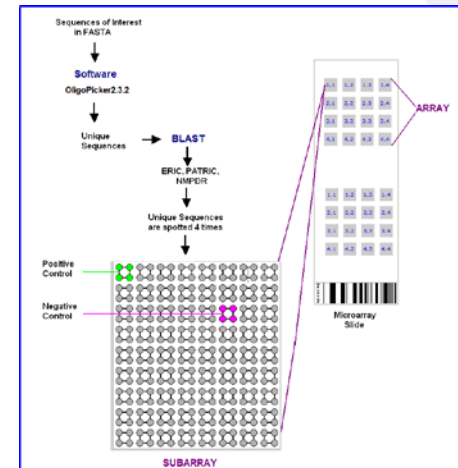


Misurare la quantità di DNA marcato (NanoDrop)
Calcolare l’incorporazione del fluorochrome nel campione
http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/percent_inc.html



Brucella spp. Microarray

DNA marcato viene posto su vetrino



Ibridazione del DNA “overnight” (SlideBooster)

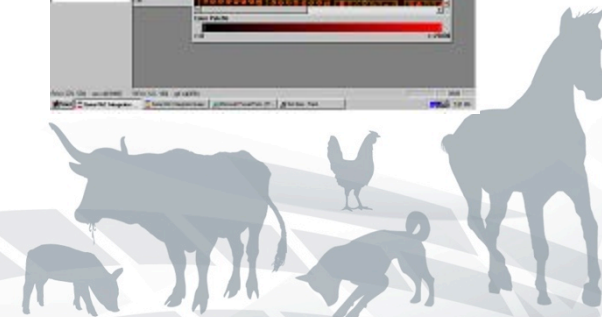
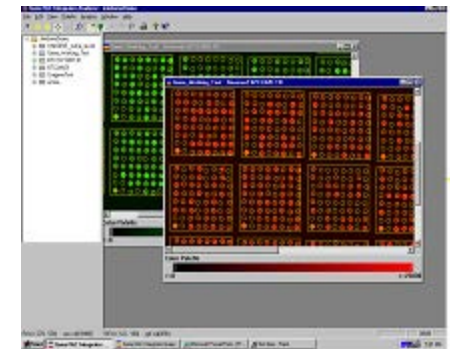


Brucella spp. Microarray

Il vetrino viene scansionato con uno scanner (Perkin Elmer) con il software: ScanArray Express



L'intensità di fluorescenza viene quantificata con software: QuantArray (Packard Biosciences)





Brucella spp. Microarray

Number	Array	R Array	Ci Row	Column	Name	X Location	Y Location	ch1	Intens	ch1	Background
85	1	1	8	1	cjcdia70	1180	3350	65535			158,1194
86	1	1	8	2	cjcdia70	1390	3350	64505,8			113,329362
87	1	1	8	3	cjcdia70	1590	3350	63302,2			148,507462
88	1	1	8	4	cjcadf70	1790	3350	65535			125,507462
89	1	1	8	5	cjcadf70	1990	3350	58875,4			132,940292
90	1	1	8	6	cjcadf70	2200	3350	52088,5			131,194031
91	1	1	8	7	cjdu70	2390	3350	65477,6			121,328362
92	1	1	8	8	cjdu70	2590	3350	53785,9			118,432838
93	1	1	8	9	cjdu70	2800	3350	44436,1			77,791046
103	1	1	9	7	cjciab70	2400	3550	46992,2			91,104477
104	1	1	9	8	cjciab70	2600	3550	31824,5			111,402985
105	1	1	9	9	cjciab70	2800	3550	28335,4			66,895523
106	1	1	9	10	cjcdtc70	2990	3550	64726,5			90,492538
107	1	1	9	11	cjcdtc70	3200	3550	45088,9			85,671638
108	1	1	9	12	cjcdtc70	3400	3550	42539,3			100,731346
112	1	1	10	4	cj1431	1790	3750	12021,6			109,388062
113	1	1	10	5	cj1431	1990	3740	11299,6			114,791046
114	1	1	10	6	cj1431	2200	3750	11510,2			84,447762
115	1	1	10	7	cj1429	2380	3750	33254,4			82,925377
116	1	1	10	8	cj1429	2590	3750	29635,3			109,462685
117	1	1	10	9	cj1429	2790	3750	27074,3			94,029954
121	1	1	11	1	cjflpe70	1190	3950	65535			164,253738
122	1	1	11	2	cjflpe70	1390	3950	61364			156,029846
123	1	1	11	3	cjflpe70	1590	3950	46825,6			217,522385
124	1	1	11	4	cjflpe70	1790	3950	65535			175,582092
125	1	1	11	5	cjflpe70	1990	3950	65529,4			90,970146
126	1	1	11	6	cjflpe70	2190	3950	65421,9			117,014923
133	1	1	12	1	cjflha270	1190	4160	65535			176,462538
134	1	1	12	2	cjflha270	1400	4160	64946,9			240,253738
135	1	1	12	3	cjflha270	1590	4150	53333,3			260,4776
136	1	1	12	4	cjflgl70	1790	4150	65535			170,059708
137	1	1	12	5	cjflgl70	1990	4150	64253,8			129,447754
138	1	1	12	6	cjflgl70	2200	4150	62031,1			103,791046
139	1	1	12	7	cjflgh70	2390	4150	65535			98,597015
140	1	1	12	8	cjflgh70	2590	4150	54799,4			131,194031
141	1	1	12	9	cjflgh70	2800	4150	46258,4			130,2388
142	1	1	12	10	cjflga70	2990	4150	65535			193,940292
143	1	1	12	11	cjflga70	3190	4170	65535			139,104477
144	1	1	12	12	cjflga70	3390	4150	65535			173,447754
508	1	3	7	4	ccorp70	10790	3070	65535			166,343277
509	1	3	7	5	ccorp70	10990	3060	62996,5			163,641795
510	1	3	7	6	ccorp70	11200	3070	58859,7			133,652246
517	1	3	8	1	cj1192	10190	3280	19588,4			173,865677
518	1	3	8	2	cj1192	10390	3280	19488			137,164185
519	1	3	8	3	cj1192	10600	3280	19737,9			113,835823
520	1	3	8	4	cjdl170	10790	3280	43907,7			86,253731
521	1	3	8	5	cjdl170	11000	3280	28233,7			136,985077
522	1	3	8	6	cjdl170	11200	3280	25504,1			145,059708
535	1	3	9	7	cj31	11400	3480	31714,6			91,208954
536	1	3	9	8	cj31	11600	3470	26198,9			81,507462
537	1	3	9	9	cj31	11810	3470	21365,6			87,611938
538	1	3	9	10	cj1191	12000	3470	32255,6			88,8806
539	1	3	9	11	cj1191	12200	3470	21422,9			68,910446
540	1	3	9	12	cj1191	12410	3470	19874,9			78,850746
541	1	3	10	1	cj1415	10190	3680	44503,8			152,462692
542	1	3	10	2	cj1415	10390	3680	31753,7			220,289508
543	1	3	10	3	cj1415	10600	3680	28160			122,358208
544	1	3	10	4	cj1313a	10800	3670	11710,9			78,805969
545	1	3	10	5	cj1313a	10990	3670	11282,2			76,417908
546	1	3	10	6	cj1313a	11200	3680	10164			57,641792
547	1	3	10	7	cj1144	11200	3670	40516,8			64,417908
548	1	3	10	8	cj1144	11600	3670	38919,4			60,208954
549	1	3	10	9	cj1144	11800	3680	37234,2			81,402985
553	1	3	11	1	cjps470	10200	3880	13858,9			133,522385
554	1	3	11	2	cjps470	10400	3880	13133,7			151,671646
555	1	3	11	3	cjps470	10600	3880	14259,9			66,253731
565	1	3	12	1	cjflaq70	10190	4090	65535			207,164185
566	1	3	12	2	cjflaq70	10390	4080	47188,5			122,289508
567	1	3	12	3	cjflaq70	10600	4080	48334,3			145,7612
568	1	3	12	4	cjflab70	10800	4090	63685			98,835823
569	1	3	12	5	cjflab70	10990	4070	49483,6			95,9403



- BrlzP-Db
 - Cold fusion
 - Cluster 3.0 (2)
 - Java Treeview (3)
- Elaborati manualmente
 - Cluster 3.0 (2)
 - Java Treeview (3)



Brucella spp. Microarray

BrlzP-Db

- Analizza in tempo reale il patogeno d'interesse
- Profilo d'ibridazione del campione viene comparato al profilo dei ceppi di riferimento



Brucella spp. Microarray

Hierarchical Clustering

Metodo

- Pairwise average-linkage
- Pairwise maximum-linkage
- Pairwise single-linkage
- Pairwise centroid-linkage



Brucella spp. Microarray

Hierarchical Clustering

Distance Metric

- Euclidean
- Pearson Correlation
 - Centered
 - Uncentered
- Spearman Correlation
- Manhattan
- Kendall's τ
- City-Block
- Absolute value of the correlation



Brucella spp. Microarray

Ceppi di riferimento

- Elaborati manualmente
 - Cluster 3.0 (2)
 - Java Treeview (3)
- Distanza: uncentered Pearson correlation
- Metodo: average linkage clustering metric

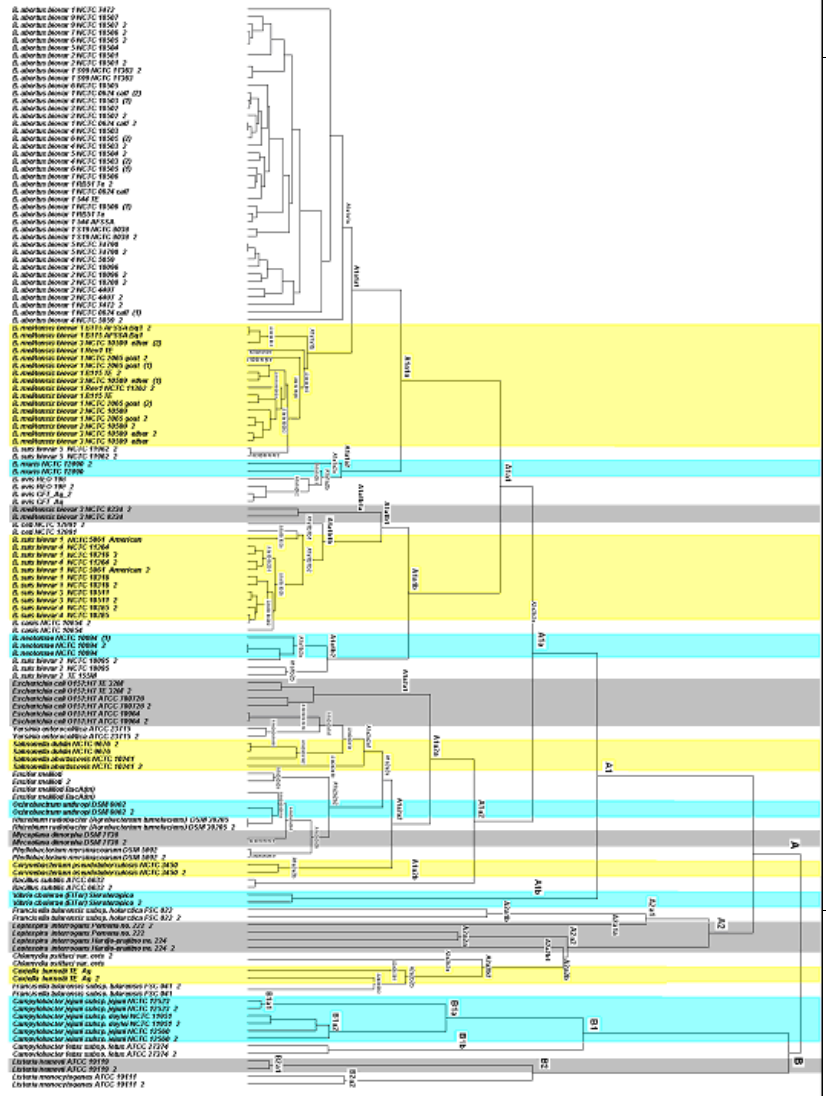




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

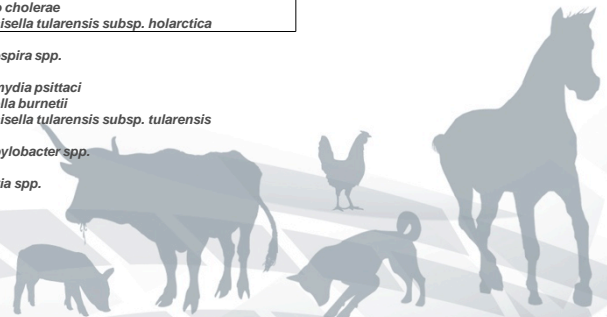
Brucella spp. Microarray

CRN Brucellosi
Centro di Referen



Brucella spp.

- E. Coli
- Yersinia enterocolitica
- Salmonella spp.
- Ensifer meliloti
- Ochrobactrum anthropi
- Rhizobium radiobacter
- Mycoplasma dimorpha
- Phyllobacterium myrsinacearum
- Bacillus subtilis
- Vibrio cholerae
- Francisella tularensis subsp. holarctica
- Leptospira spp.
- Chlamydia psittaci
- Coxiella burnetii
- Francisella tularensis subsp. tularensis
- Campylobacter spp.
- Listeria spp.



Brucella spp. Microarray

Futuro

Vetrino

- Aggiungere sequenze per le biovarianti

Database

- Aggiungere algoritmi di Apprendimento
 - Decision Trees
 - Neural Networks
 - Naïve Bayes
 - Support Vector Machines
 - Wavelet



Brucella spp. Microarray

Futuro

Protocollo

- Diminuire i tempi d'ibridazione
 - time from sample to detection 8 hours (4,5)

Strumentazione

- Cambiare la chimica
 - strumentazione diversa - portabile
 - diminuire i costi dei reattivi



Brucella spp. Microarray

InDevR (6)



Alere Technologies (7)



- (1) Xiaowei Wang and Brian Seed (2003) Selection of Oligonucleotide Probes for Protein Coding Sequences. *Bioinformatics* 2003 May 1; 19(7):796-802. <http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker/>
- (2) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998 Dec 8;95(25):14863-14868.
- (3) Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization
- (4) Mehlmann, M., Bonner, A.B., Williams, J.V., Dankbar, D.M., Moore, C.L., Kuchta, R.D., Podsiad, A.B., Tamerius, J.D., Dawson, E.D. & Rowlen, K.L. 2007, "Comparison of the MChip to viral culture, reverse transcription-PCR, and the QuickVue influenza A+B test for rapid diagnosis of influenza", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 4, pp. 1234-1237.
- (5) Dankbar, D.M., Dawson, E.D., Mehlmann, M., Moore, C.L., Smagala, J.A., Shaw, M.W., Cox, N.J., Kuchta, R.D. & Rowlen, K.L. 2007, "Diagnostic microarray for influenza B viruses", *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 5, pp. 2084-2090.
- (6) <http://indevr.com/wp-content/uploads/2011/10/ampliPHOX-Product-Sheet-Rev-11B.pdf>
- (7) <http://alere-technologies.com/en/products/lab-solutions/platform-components/arraymate.html>

