



## **Análisis de la expresión genética mediante microarray del sistema regulador de dos componentes BvrS/BvrR de *Brucella abortus***

Cristina Viadas<sup>1</sup>, María Cruz Rodríguez<sup>2</sup>, Félix J. Sangari<sup>2</sup>, Juan M. García-Lobo<sup>2</sup> y Ignacio López-Goñi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, Pamplona, España

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, España

Los genomas completos de *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* las especies más importantes desde un punto de vista sanitario dentro del género *Brucella*, han sido secuenciados y anotados, y presentan un grado de sintenia e identidad de secuencias superior al 95%. Los marcos de lectura abiertos (ORF) de *B. melitensis* fueron re-anotados, amplificados y clonados mediante el sistema *GATEWAY Cloning Technology* (Invitrogen) dando lugar a una colección ordenada de 3.258 clones que constituyen el ORFeoma de *Brucella*, todos ellos clonados en el mismo vector pDONR201. A partir de este ORFeoma se construyó un microarray con productos de PCR. Para ello, se aislaron y purificaron los 3.258 plásmidos recombinantes mediante el sistema *Plasmid Miniprep 96* (Millipore); los genes de *Brucella* se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos attI1 (caagttgtacaaaaagcaggc) y attI2 (ccacttgtacaagaaagctgg) y mediante el sistema *PCR Super Mix* (IQ<sup>TM</sup> Supermix de Bio-Rad); los productos de PCR se purificaron mediante el sistema *PCRU 96 Cleanup* (Millipore), y se comprobó su pureza y concentración mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la construcción del microarray, los productos de PCR se impresionaron por contacto empleando el robot *MicroGrid II 610* (Genomic Solutions) sobre soportes de cristal aminosilanizados (*Ultra GAPS Coated Slides*, Corning Life Sciences). Cada producto de PCR se imprimió por duplicado. El array incluyó además 192 controles: (i) control negativo de solución de impresión sin DNA; (ii) control negativo con un fragmento del gen *porB* (*protochlorophyllide oxidoreductase B*) de *Arabidopsis thaliana*; (iii) control positivo de expresión con un fragmento del gen IF-1 constitutivo de *Brucella* (BMEI1671). El array final tuvo un total de 7.680 puntos, representando el 96,4 % del genoma anotado de *B. melitensis*.

Con objeto de analizar los genes controlados por el sistema regulador de dos componentes BvrS/BvrR de *B. abortus*, se ha analizado la expresión genética del mutante en el gen regulador *bvrR* de *Brucella* en comparación con la de la cepa parental control. Se extrajeron los RNAs mediante el sistema *RNeasy Mini* (Qiagen), *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) y *Protect Bacteria Reagent* (Ambion). Los RNAs mensajeros enriquecidos con *MICROBExpress* (Ambion) se amplificaron mediante el *Kit MessageAmpII-Bacteria* (Ambion), que lleva a cabo una poliadenilación del mRNA, transcripción reversa de síntesis de cDNA y transcripción *in vitro* de la síntesis de aRNA (RNA antisentido) marcado con 5'-3' aminoallyl-UTP (Ambion). Se conjugaron las sondas de aRNA con el fluoróforo Cy3 y los arrays se hibridaron en condiciones estándar. Se realizaron tres réplicas biológicas y dos técnicas. Las imágenes fluorescentes se generaron mediante escaneo empleando el sistema *GenePix 4100A* (Amersham Bioscience). Las intensidades obtenidas se corrigieron, normalizaron y analizaron mediante los programas R y Bioconductor dando como resultado la identificación de grupos de genes con expresión diferencial estadísticamente significativa.