



BIOCHIP ELECTRÓNICO PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PRINCIPALES VIRUS Y BACTERIAS PATÓGENOS DE LA PATATA

Ruiz-García, A. B.²; Olmos, A.²; Arahál, D. R.¹; Antúnez, O.¹; Martínez-Bono, B.¹; Llop, P.¹; Pérez-Ortín, J. E.¹; López, M. M.²; Cambra, M.²

¹Universidad de Valencia

²IVIA, Moncada, Valencia



- Cultivo de gran importancia económica
- Virus y bacterias producen grandes pérdidas
- Programas de selección sanitaria de la patata de siembra
- Análisis de tubérculos mediante técnicas ELISA
- Objetivo: método de detección basado en chips de DNA

Chips electrónicos

- Procedimientos electrónicos



Deposición de la sonda

Deposición de la muestra

Hibridación

Detección

Sistema robotizado de Nanogen

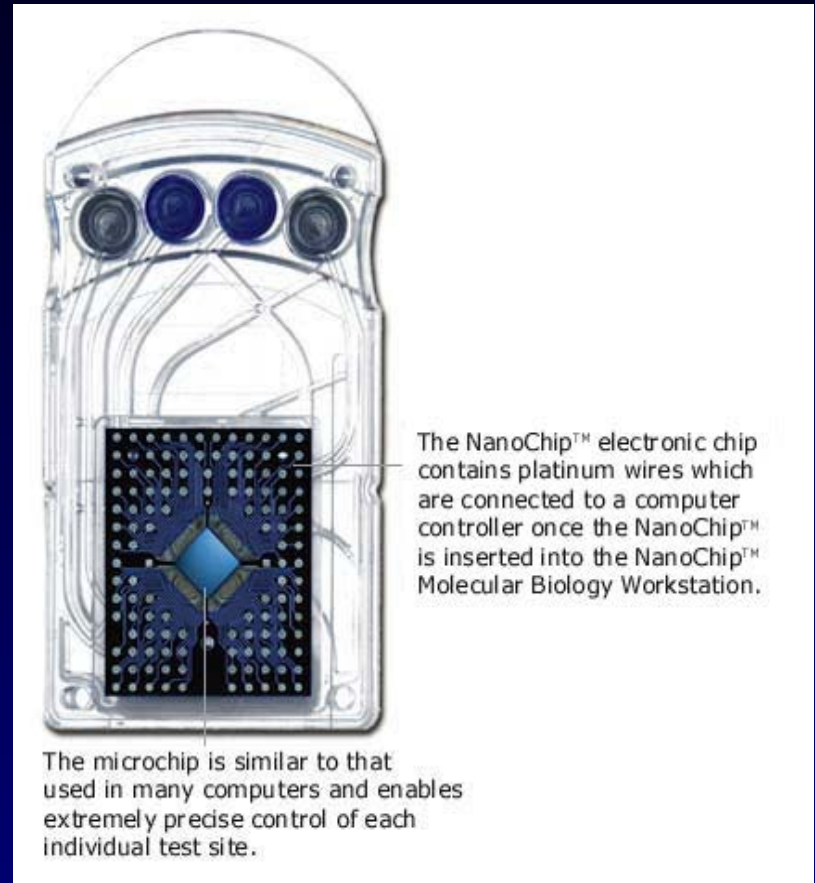
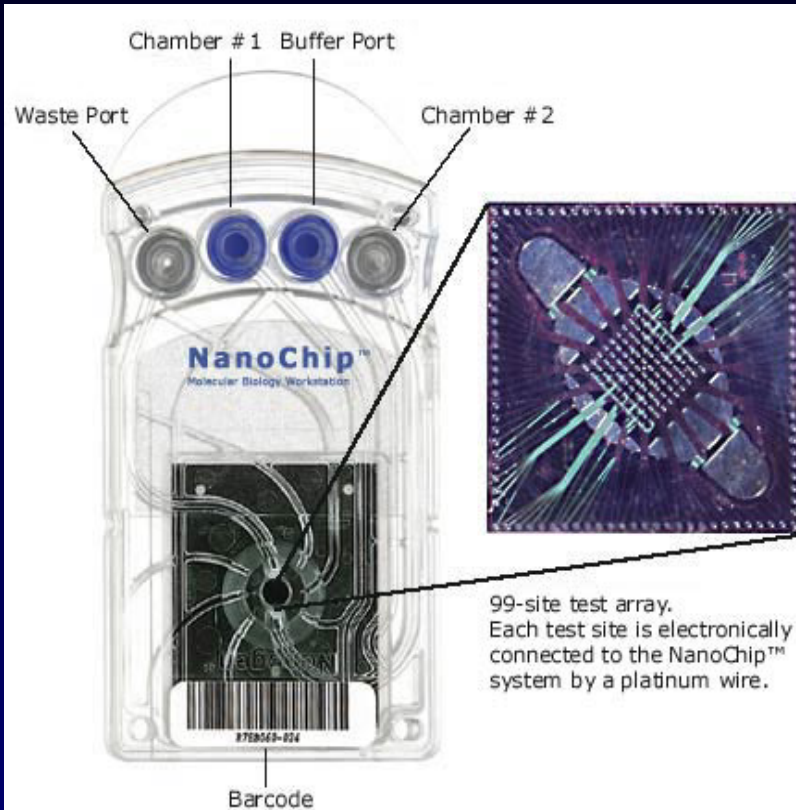


Robot de fabricación e
hibridación de chips

Robot de lectura de chips

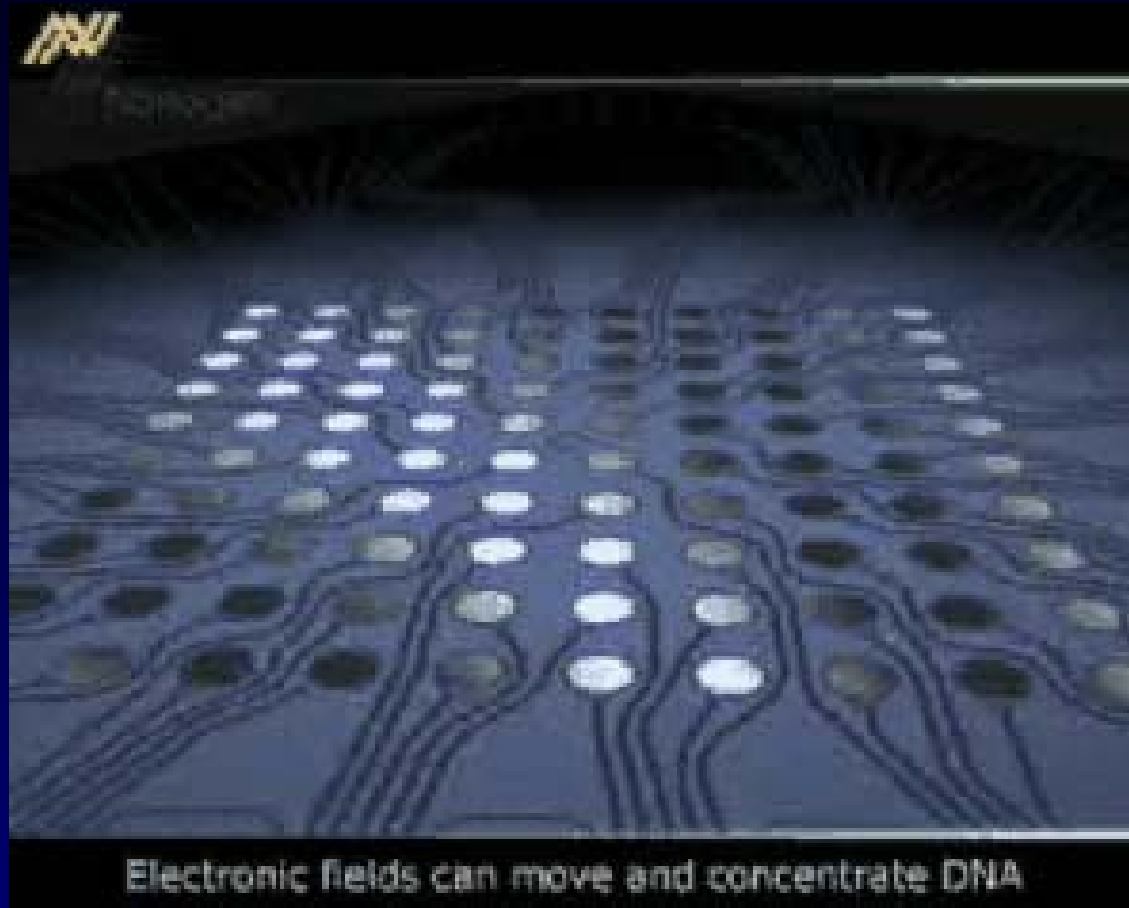
Ordenador y software de control

El Chip de Nanogen





El Chip de Nanogen





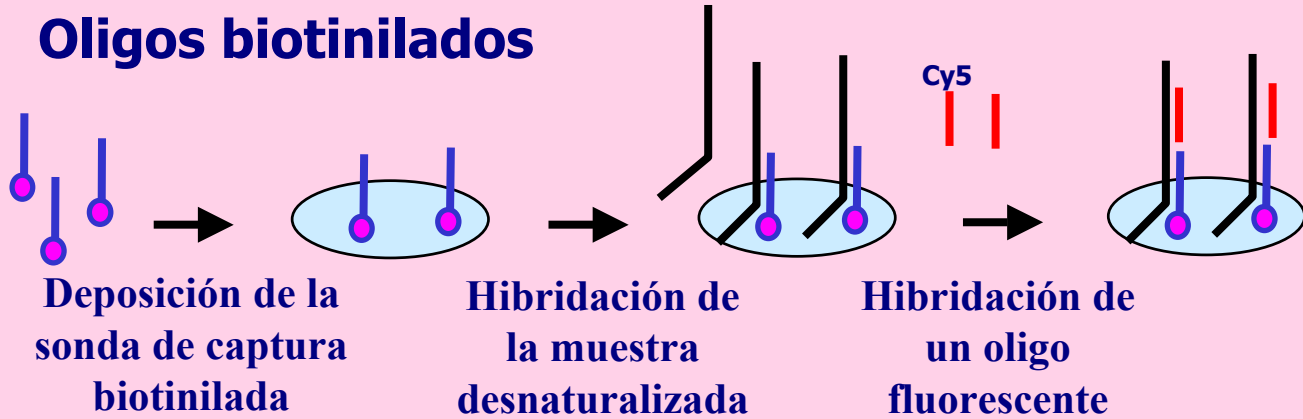
Ventajas del sistema

- Control de las condiciones de hibridación simultáneo a la detección
 - Temperatura
 - Restricción iónica
 - Restricción eléctrica
- La restricción eléctrica permite aplicar condiciones diferentes a cada punto
- Posibilidad de detectar diferencias de un solo nucleótido

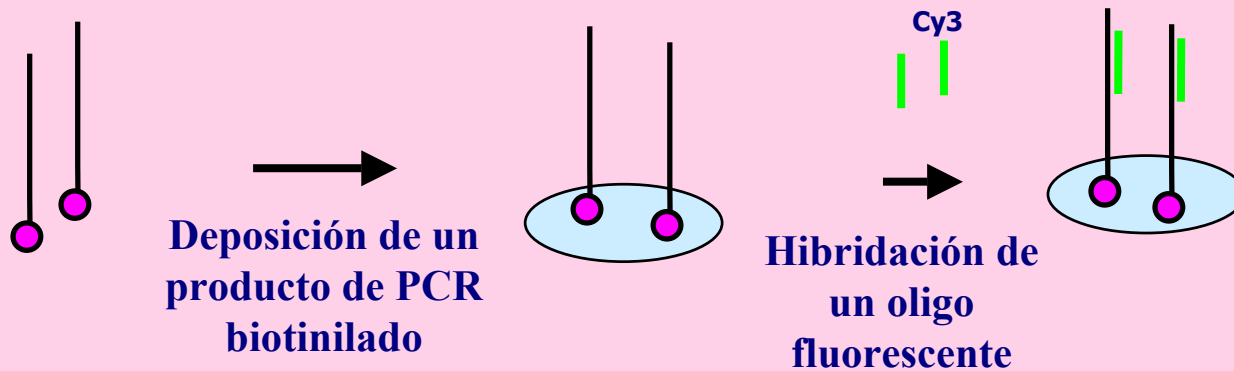


Métodos de ensayo

Oligos biotinilados



Amplicones biotinilados





DetECCIÓN DE PATÓGENOS



Virus

- ✓ PVY
- ✓ PVX
- ✓ PLRV

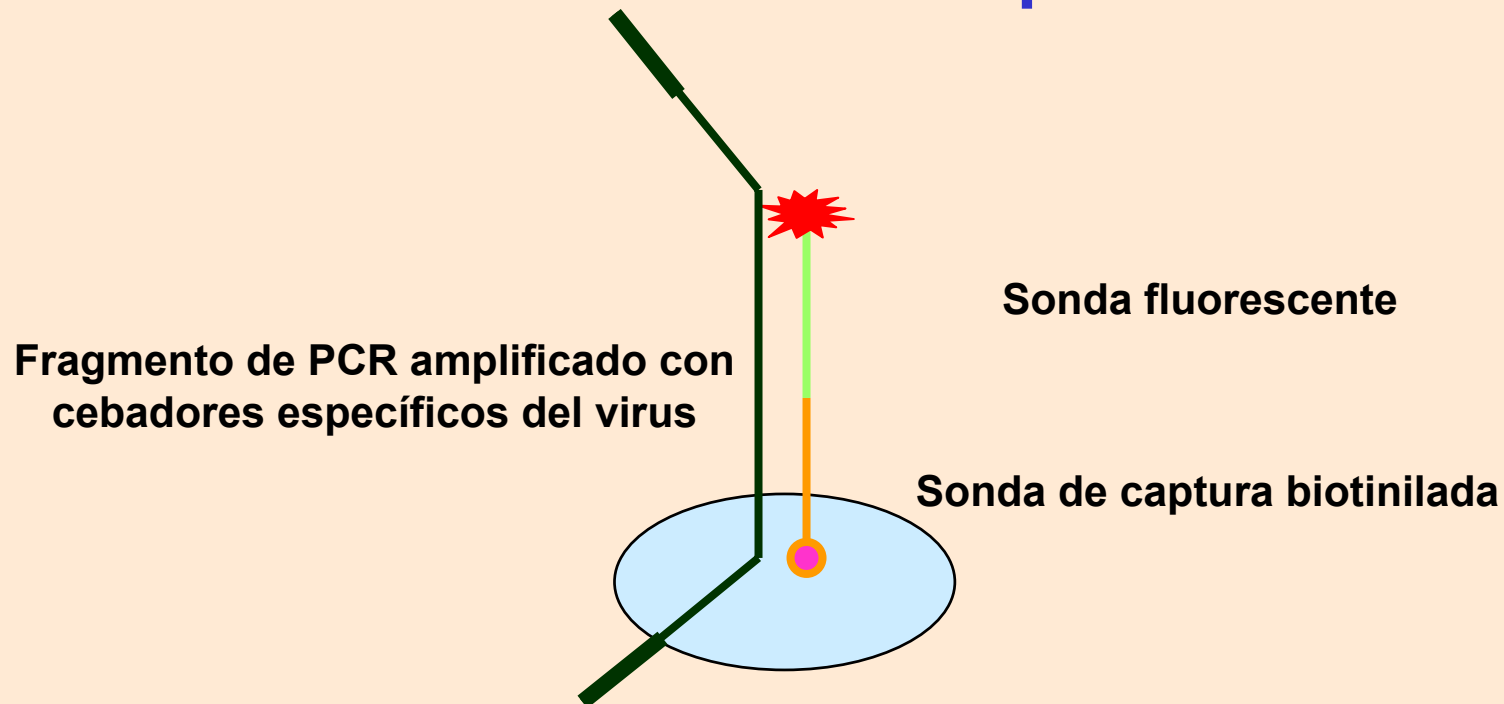
Bacterias

- ✓ *Ralstonia solanacearum*
- ✓ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
- ✓ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
- ✓ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*
- ✓ *Pectobacterium chrysanthemi*



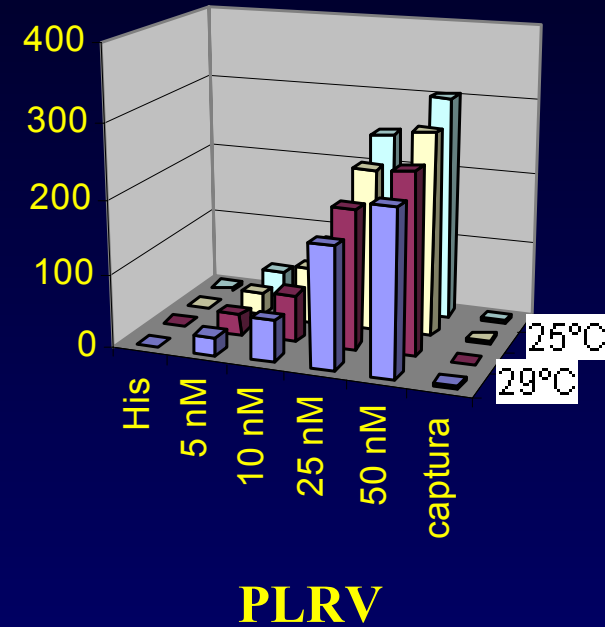
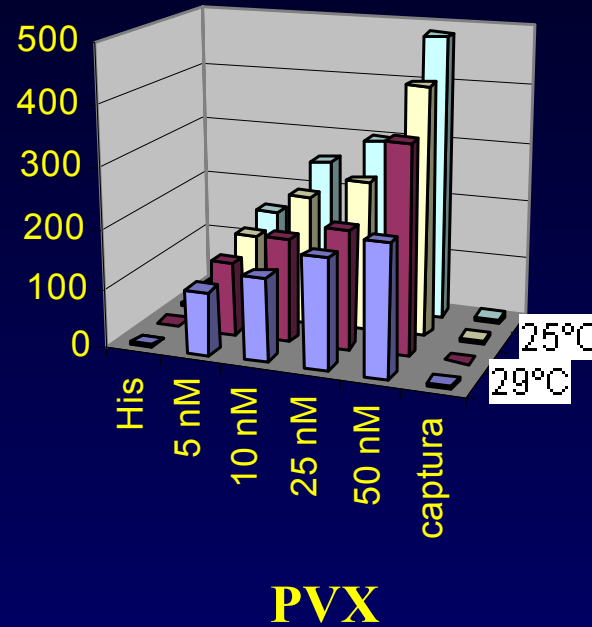
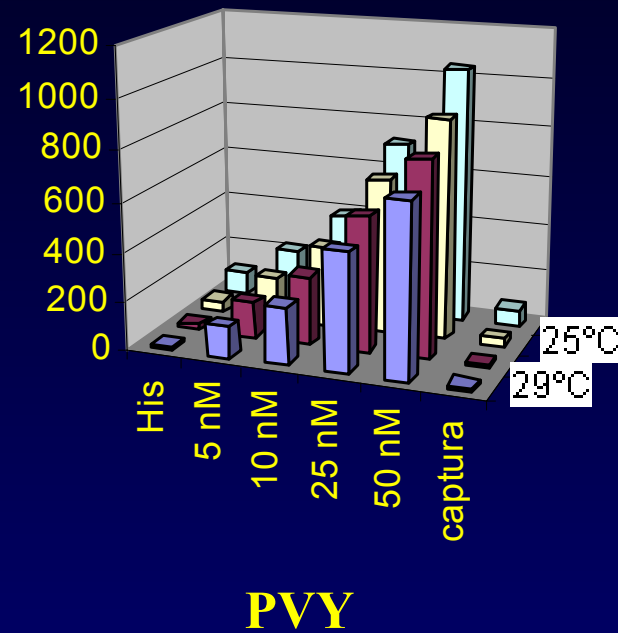
Detección de virus

Extracto vegetal → **RNA** → **RT-PCR multiplex** → **Nanochip**





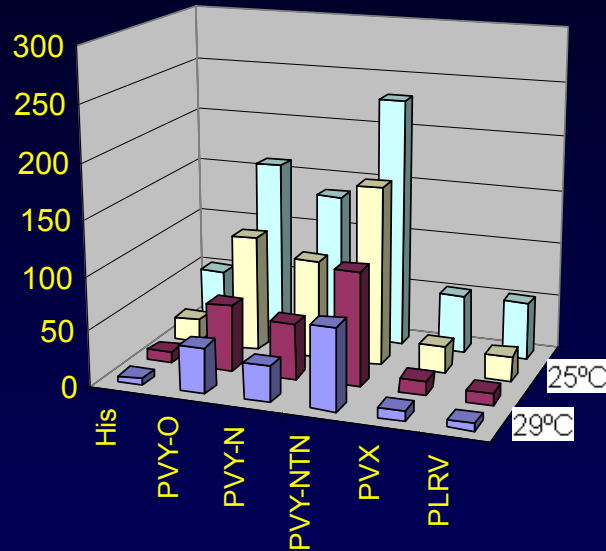
Detección de virus



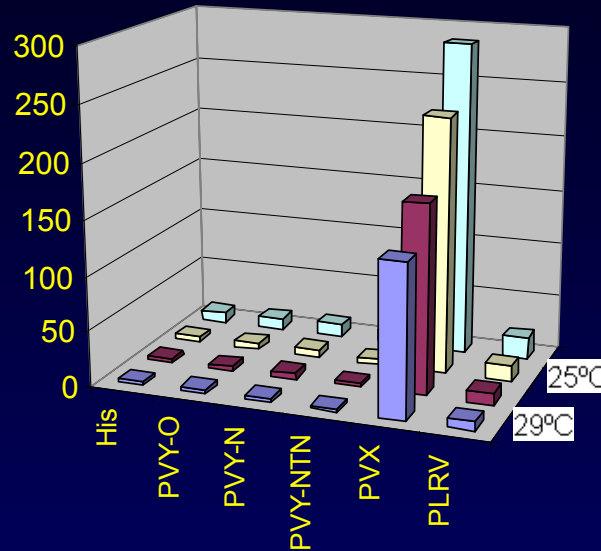


Deteccción de virus

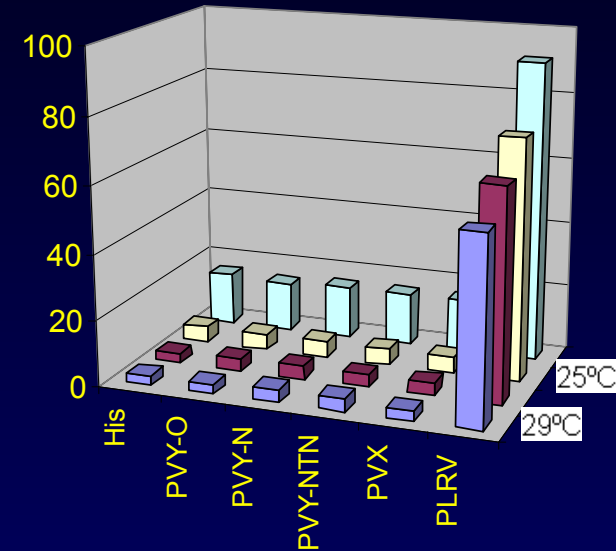
Pruebas de especificidad



PVY



PVX



PLRV

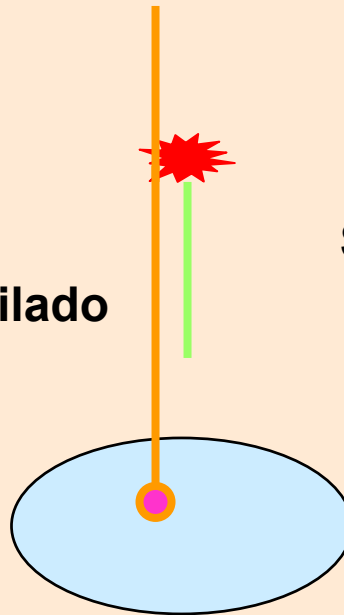


Caracterización de PVY

Extracto vegetal → **RNA** → **RT-PCR** → **Nanochip**

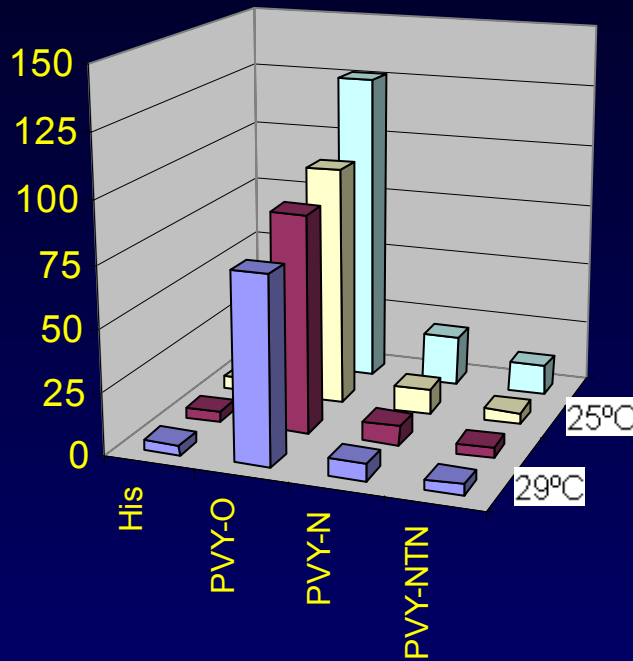
Producto de PCR biotinilado

Sonda fluorescente

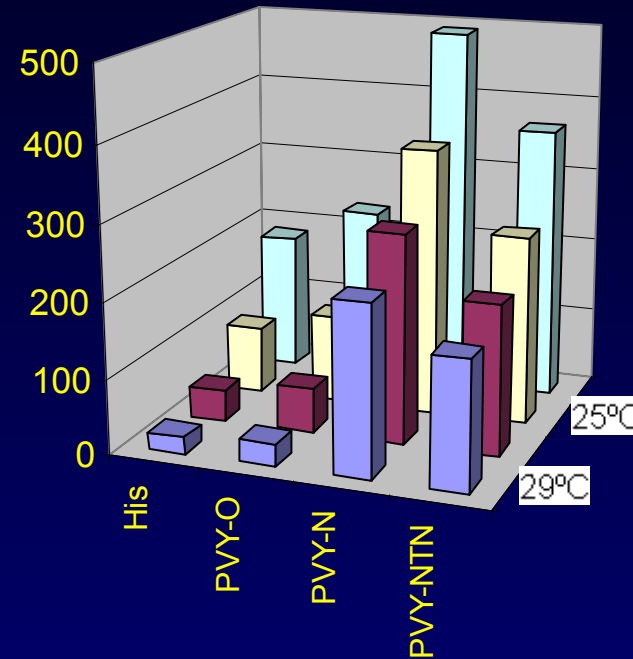




Caracterización de PVY



PVY⁰



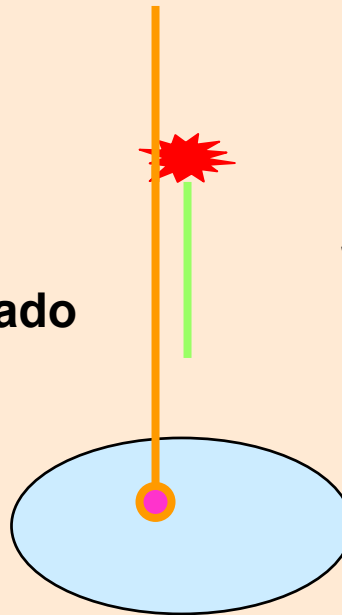
PVY^{N/NTN}



Detección de bacterias

Extracto vegetal → **DNA** → **PCR** → **Nanochip**

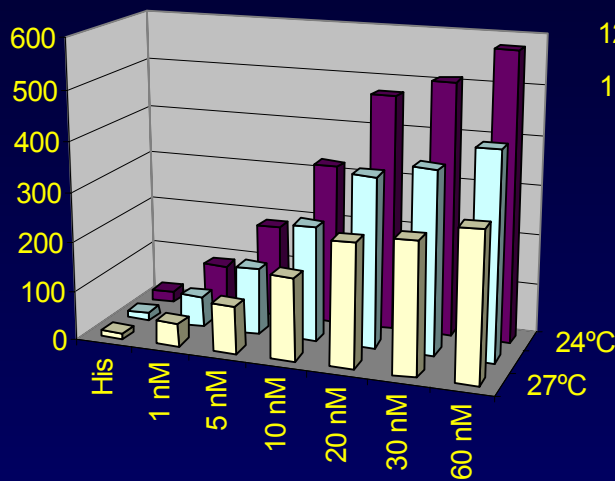
Producto de PCR biotinilado
rDNA 16S



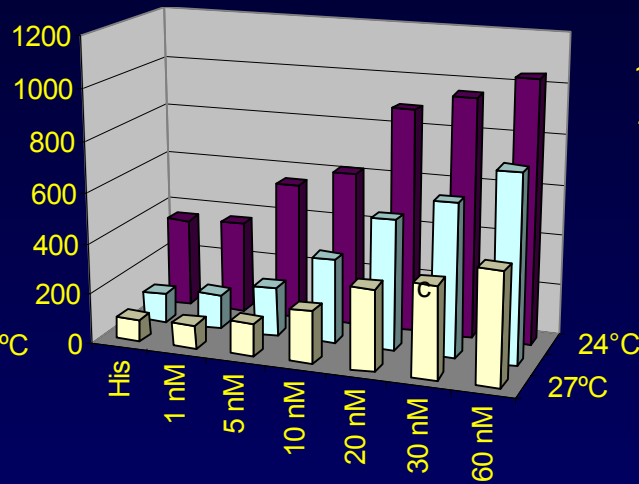
Sonda fluorescente



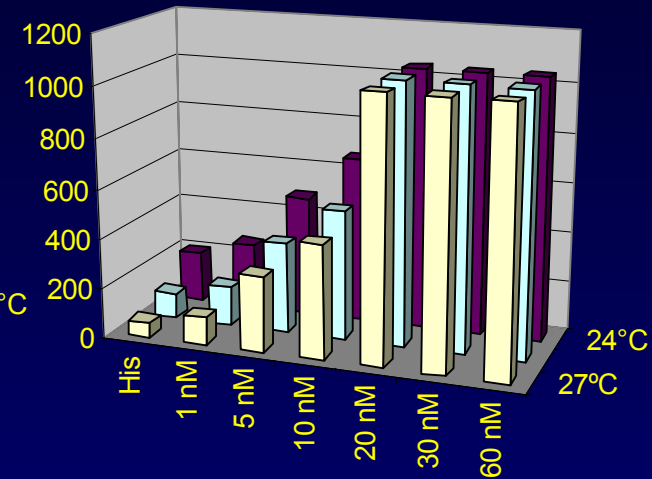
Detección de bacterias



Ralstonia solanacearum



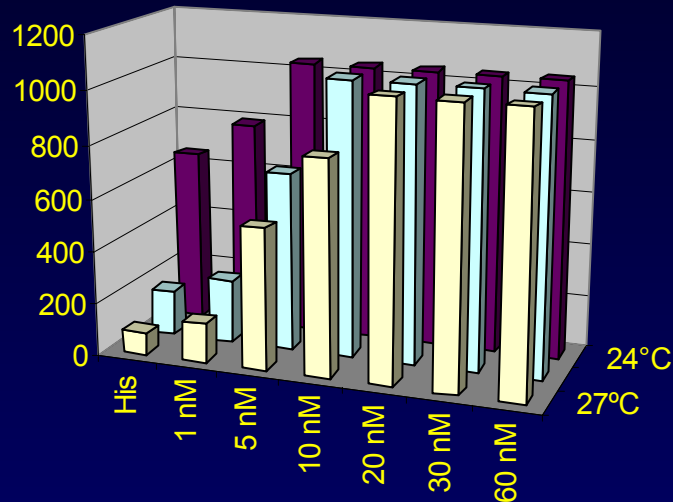
Pectobacterium carotovorum
subsp. *carotovorum* y *atrosepitum*



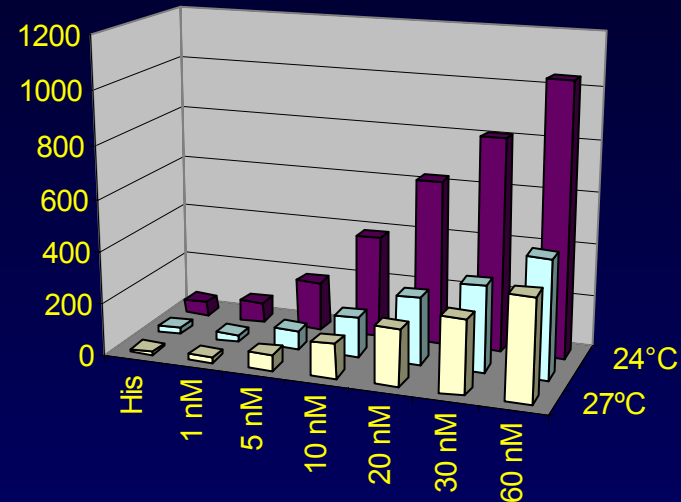
Pectobacterium carotovorum
subsp. *carotovorum*



Detección de bacterias



Clavibacter michiganensis
subsp. *sepedonicus*



Pectobacterium chrysanthemi



Conclusiones

- ✓ Se ha diseñado un **Nanochip** capaz de detectar simultáneamente los virus **PVY, PVX y PLRV**. El análisis del chip se lleva a cabo en **un único ensayo en multiplex** para los tres virus. Además el sistema de Nanogen permite diferenciar entre las razas de PVY, **PVY⁰ y PVY^{N/NTN}**.
- ✓ Se ha diseñado un **Nanochip** capaz de detectar simultáneamente las bacterias ***Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *atrosepticum*, *Pectobacterium chrysanthemi* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus***.
- ✓ Esta tecnología ofrece una **alternativa interesante** para el **diagnóstico molecular** de patógenos de patata, si se consigue simplificar el ensayo y abaratar el coste.