



УДК 578.832.1А.083

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЙ МИКРОЧИП ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А

© 2010 г. В. А. Рябинин^{*,#}, Е. В. Костина^{*}, А. А. Неверов^{**}, Г. А. Максакова^{*}, А. Н. Синяков^{*}

^{*}Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

^{**}Лаборатория разработки методов Центра оценки и исследований биопрепаратов, Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами, США

Поступила в редакцию 19.08.2009 г. Принята к печати 16.12.2009 г.

Разработан олигонуклеотидный микрочип для типирования нейраминидазы вируса гриппа А. Отбор зондов микрочипа включал в себя нахождение аминокислотных последовательностей, специфичных для определяемого подтипа нейраминидазы, исходя из которых проводился расчет олигонуклеотидных зондов с последующей дополнительной селекцией наиболее специфичных и представительных зондов. Для определения каждого подтипа нейраминидазы использовалось от 19 до 24 олигонуклеотидных зондов. При тестировании микрочипа на 19 образцах вируса гриппа А с наиболее распространенными подтипами нейраминидазы (N1 и N2) наблюдалось однозначное типирование 18 из них и лишь один изолят не был идентифицирован.

Ключевые слова: вирус гриппа А; нейраминидаза; микрочипы; типирование; диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа типа А, циркулирующий среди людей, домашних и диких животных, представляет существенную опасность из-за возможности возникновения пандемии гриппа в связи с появлением штаммов с новыми антигенными свойствами. Примером тому является появление штаммов вируса птичьего гриппа H5N1, патогенного по отношению к домашним птицам и человеку, а также варианта вируса свиного гриппа H1N1, распространяющегося в настоящее время. Важным в процессе диагностирования гриппа А является определение его субтипа, который характеризуется антигенными свойствами двух поверхностных белков – гемагглютинина и нейраминидазы [1]. В настоящее время описано 16 субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы [2, 3]. Обычно применяемая методика типирования гриппа А включает в себя выделение вируса, его иммунохимическое определение по стандартным методикам или определение методом ПЦР в реальном времени [4] с последующим частичным или полным секвенированием генов гемагглютинина и нейраминидазы. Такая схема весьма длительна и поэтому проводятся исследования по созданию диагностических систем, позволяющих ускорить процесс серотипирования.

Перспективным и достаточно интенсивно развивающимся в последние несколько лет направлением диагностики вирусов является создание диагностических микрочипов. В основном используются два типа микрочипов – секвенирующие и гибридизационные. В первом случае применение микрочиповых и микрореакторных систем дает возможность осуществить секвенирование последовательностей гемагглютинина и нейраминидазы и провести отнесение вируса гриппа к определенному серотипу [5–7]. Более распространен вариант гибридизационных микрочипов, в которых используется набор олигонуклеотидных зондов, образующих дуплексы с ДНК, кодирующей определяемый белок, меченой, например, флуоресцентной меткой [8–12]. В этих работах рассмотрены как специализированные гибридизационные чипы, связанные с определением ограниченного количества подтипов гриппа [8, 12], так и чипы, позволяющие типировать значительную часть вариантов гемагглютинина или нейраминидазы вируса гриппа [6]. Есть варианты серотипирования с использованием наработки ампликонов с типоспецифичными праймерами на определенные субтипы нейраминидазы или гемагглютинина, что способствует повышению специфичности метода, но усложняет саму процедуру типирования [10]. Следует отметить, что при всех вариантах гибридизационных микрочипов эффективность анализа в существенной степени обусловлена методикой нахождения зондов, специфичных к анализируемой ДНК.

Используемые сокращения: SSC – 0.15 М NaCl, 0.015 М цитрат натрия, рН 7.0; Cy3 – флуоресцентный цианиновый краситель.

[#] Автор для связи (тел.: (3832) 363-51-73, факс: (3832) 363-51-53; эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).

Нахождение специфических зондов достаточно просто для геномных последовательностей, сильно различающихся по структуре, например, при нахождении родоспецифических зондов. Так, отличить вирус оспы от вируса герпеса не представляет большого труда [13]. Задача существенно осложняется при анализе близких по структуре геномных последовательностей. И тут выбор зондов на определенный подтип микроорганизма становится затруднительным. Особенно сложным является выбор зондов при большом числе анализируемых последовательностей — нескольких сотнях и тысячах, когда стратегия выбора зондов и анализа результатов играет первостепенную роль.

В литературе описаны различные подходы и программы расчета [см., например, 14–20] для анализа последовательностей ДНК и отбора специфических зондов. Прямой поиск специфических зондов с использованием традиционных методов расчета зачастую требует длительного времени. Отбор зондов может упроститься при первоначальной селекции специфических структур на основе белковых последовательностей микроорганизмов. Такой подход был предложен в работах [16, 20], но его преимущества не были реализованы в полной мере из-за значительных различий в структуре белковых и нуклеотидных последовательностей детектируемых микроорганизмов. Наибольшего эффекта такой вариант расчета олигонуклеотидных зондов может достичь при анализе близких по структуре последовательностей ДНК, таких, как, например, последовательности ДНК вирусов гриппа А и В.

В рамках настоящей работы нами предложен метод отбора зондов для создания гибридационного микрочипа для типирования нейраминидазы вируса гриппа А.

Всего известно девять субтипов нейраминидазы и, учитывая сравнительно небольшую протяженность гена нейраминидазы (примерно 1500 п.о.), нахождение наборов зондов, специфических к каждому из девяти подтипов нейраминидазы, является сложной задачей, что обусловлено, с одной стороны, значительной гомологией генов нейраминидазы разных подтипов, а с другой, относительно большой гетерогенностью последовательностей ДНК для каждого из подтипа нейраминидазы в зависимости от подтипа гемагглютинина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор олигонуклеотидных зондов для определения подтипа нейраминидазы проводился с использованием собственного программного обеспечения в два этапа. Первый этап включал в себя отбор специфических аминокислотных последовательностей, характерных для определяемого подтипа, но отсутствующих в других белковых последовательностях анализируемого набора белков. Такой вариант от-

бора представляется нам принципиально важным, так как именно структура белка определяет свойства микроорганизма. Кроме того, это позволяет существенно упростить последующий отбор олигонуклеотидных зондов. На втором этапе проходил отбор олигонуклеотидных зондов исходя из структуры пептидов.

Работа по расчету зондов проводилась в следующем порядке:

- Отбор белковых и ДНК-последовательностей исходя из базы данных GenBank.
- Отбор пептидов, общих для определяемого субтипа нейраминидазы.
- Удаление из полученного набора пептидов тех, что присутствуют в белковых последовательностях других подтипов нейраминидазы.
- Расчет олигонуклеотидных зондов исходя из структуры пептидов.
- Отбор наиболее представительных олигонуклеотидных зондов.
- Удаление из полученного набора олигонуклеотидных зондов тех, введение в которые одной или двух точечных замен дают зонд, характерный для других подтипов нейраминидазы.
- Отбор олигонуклеотидных зондов с оптимальной температурой плавления дуплекса, образуемого зондом и анализируемой ДНК.

В работе были использованы данные GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) по нейраминидазе вируса гриппа А по март 2008 г. Как видно из табл. 1, наиболее представлены подтипы N1 и N2, остальные подтипы присутствуют в существенно меньшей степени. Кроме того, внутри выборки для нейраминидазы различные подтипы гемагглютинина представлены различным образом. Так, нейраминидаза первого типа N1 в наибольшей степени представлена подтипами гемагглютинина H1 и H5, тогда как некоторые из подтипов гемагглютинина представлены незначительно (H4, H10, H12) или не присутствуют совсем (H8, H13, H14, H15).

В полученной из базы данных выборке для каждого серотипа нейраминидазы (набор для всех субтипов гемагглютинина) выявляли идентичные участки последовательности длиной в 7 а.о. (предварительный анализ показал, что выбор более длинных пептидов снижает число олигонуклеотидных зондов определяемого подтипа, а более короткие недостаточно специфичны). При анализе рассматривались только последовательности длиной не менее 200 а.о. Поскольку найти общие пептиды для абсолютно всех белков конкретного серотипа не удастся (как в силу вариабельности белковой последовательности, так из-за того, что в GenBank представлены частично секвенированные последовательности), то отбирались пептиды, содержащиеся в не менее чем 90–95% белков.

Таблица 1. Количество анализированных изолятов для различных серотипов нейраминидазы вируса гриппа типа А

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Всего
H1	1140	140	2	0	2	4	1	1	2	1292
H2	12	96	23	1	9	0	3	3	16	163
H3	14	2394	10	0	3	50	0	105	2	2578
H4	4	14	4	4	4	72	1	15	2	120
H5	1295	108	43	0	0	1	3	2	1	1453
H6	150	86	5	1	14	10	0	0	3	269
H7	61	89	80	3	1	0	32	0	2	268
H8	0	0	0	12	1	0	0	3	0	16
H9	9	661	3	0	3	3	0	1	0	680
H10	2	0	2	2	4	3	21	6	2	42
H11	8	8	7	7	0	7	0	2	32	71
H12	1	0	0	0	18	0	0	0	1	20
H13	0	3	1	1	0	12	0	1	2	20
H14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
H15	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5
Всего	2696	3599	180	31	60	162	61	141	68	6998

На следующем этапе анализа производили селекцию пептидных наборов, характеризующих серотипы нейраминидазы, — из полученных наборов удаляются пептиды одной и той же структуры, принадлежащие к наборам разных серотипов. Таким образом, получили девять наборов 7-членных пептидов, характеризующих определенный подтип нейраминидазы.

В качестве примера ниже приведена аминокислотная последовательность нейраминидазы изолята A/California/UR06-0552/2007 (H1N1). Аминокислотные последовательности, выделенные серым цветом, характерны для 90% анализируемых последовательностей нейраминидазы первого типа N1, но отсутствуют у всех остальных подтипов нейраминидазы (N2–N9). Всего найдено 89 7-членных пептидов.

MNPNQKIITIGSISIAIGIISLMLQIGNIISIWAS-
 HSIQTGSQNHTGICNQRITTYENSTWVNHTYV-
 SINNTNVVAGKDKTSVT **LAGNSSLC** SISGWAIV-
 TKDNSIRIGSKGDVFI **REPFTSCSHLECRTEFLT** -
QGALUNDKHSNGTIVKDRSPYRALMSCPLGEA -
PSFYNSK **FESVAWSASACHDC** **MG** **WLTIGISGP** -
DN **GAVAVLKYNGIIT** **ETIKSWKKR** **ILRTOESEC** -
 VCVNGSCFTIMTDGPSNGAASYKIFKIEKGV-
 TKSIELNAPNF **HYEECSYPTDGTVM** **CVCRDN** -
WHGSNRPWYSEFNQNL **DYQIGYICSGVFGDNP** -
R **PKDGGKGCNPVTVDGADGVKGFYSY** **KYGNQ** -
VWIGRTKS **NRLRK** **GFEMIWDPNGW** **DTDSD** -
 FSVKQDVVAI **TDWSGYSGSFVQHPPLTGLDCIR** -
PCFWVEI **VRGLPRENATITWTS** **SGSSISFCGV** **DSD** -
 TAN **WSWPDGA** **ELPFTIDK**.

На следующей стадии набор 7-членных пептидов переводили в наборы 21-членных олигонуклеотидов, кодирующих эти пептиды. Очевидно, что если пептиды отличаются сдвигом лишь на одну-две аминокислоты, то соответствующие им наборы олигонуклеотидных зондов будут давать практически одинаковую информацию о субтипе нейраминидазы анализируемой ДНК-последовательности и возникает необходимость выбора одного из наборов олигонуклеотидных зондов.

Рассмотрим в качестве примера фрагмент LAGNSSLC (выделен подчеркиванием), представленный двумя 7-членными пептидами — LAGNSSL и AGNSSLC. Для этих пептидов были найдены наборы, состоящие из 51 и 43 олигонуклеотидных зондов, соответственно (табл. 2). Из этих двух наборов олигонуклеотидов отбирался лишь один исходя из следующих критериев:

1. Из нескольких наборов олигонуклеотидных зондов отбирался тот, в котором первый олигонуклеотидный зонд содержится в максимальном количестве.

2. Если параметры пункта 1 были одинаковы, то выбирался набор, в котором доля первых двух олигонуклеотидов наибольшая.

3. Если параметры пунктов 1 и 2 были одинаковы, то отбирался набор, в котором количество зондов было меньшим.

4. Если же параметры пунктов 1–3 были одинаковы, то использовался произвольный набор олигонуклеотидных зондов — обычно первый.

Этим условиям соответствует пептид LAGNSSL, кодируемый 51 олигонуклеотидной последовательностью. Из них зонд № 1 (TTAGCGGGCAATTCATCTCTT) присутствует в 1043 последователь-

Таблица 2. Олигонуклеотидные зонды (5'–3') для нейраминидазы первого типа, соответствующие пептидам LAGNSSL и AGNSSLС

№	LAGNSSL	№	AGNSSLС
1	TTAGCGGGCAATTCATCTCTT-(1043)*	1	GCGGGCAATTCATCTCTTTGC-(1022)
2	TTGGCCGGCAATTCATCTCTT-(708)	2	GCCGGCAATTCATCTCTTTGT-(769)
3	TTAGCCGGCAATTCATCTCTT-(121)	3	GCAGGCAATTCCTCTCTGT-(94)
4	CTAGCAGGCAATTCCTCTCTC-(98)	4	GCCGGCAATTCATCTCTTTGC-(76)
5	CTAGCCGGCAATTCCTCTCTT-(62)	5	GCCGGCAATTCCTCTCTTTGC-(69)
6	TTAGCGGGCAATTCCTCTCTC-(61)	6	GCGGGCAATTCCTCTCTGT-(67)
7	TTGGCAGGCAATTCGTCTCTT-(37)	7	GCGGGCAATTCATCTCTTTGT-(41)
...
42	CTAGCAGGTAATTCCTCTCTT-(1)	42	GCGGGTAATTCCTCTCTGT-(1)
43	CTAGCAGGCAATTCCTCTCTC-(1)	43	GCGGGAAATTCATCTCTTTGC-(1)
44	CTAGCAGGCAACTCCTCTCTC-(1)		
45	TTGGCCGGTAATTCATCTCTT-(1)		
46	TTAGCCGGCAATTCATCTCTC-(1)		
47	CTAGCGGGCAACTCCTCTCTC-(1)		
48	TTGGCCGGCAATTCATCTCTC-(1)		
49	CTAGCGGGCAATTCATCTCTC-(1)		
50	CTAGCAGGCAATTCCTCTCTA-(1)		
51	TTAGCGGGAAATTCATCTCTT-(1)		

* В скобках приведено число последовательностей ДНК, содержащих данный олигонуклеотидный зонд.

ностях, а TTGGCCGGCAATTCATCTCTT (№ 2) в 708 последовательностях из общего числа ДНК-последовательностей, равного 2696. Для остальных зондов эти величины существенно меньше. В том случае, когда протяженность непрерывного фрагмента белка велика, например, REPFISCSHLE-CRTFFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSP (см. аминокислотную последовательность изолята A/California/UR06-0552/2007(H1N1)), то для исключения потери информации отбирались варианты со сдвигом пептидной последовательности на 3–7 а.о.

Принципы выбора наборов олигонуклеотидных зондов для остальных подтипов нейраминидазы (N2–N9) были те же самые, что и для описанного выше случая. Очевидно, что общее число олигонуклеотидных зондов для всего набора пептидов слишком велико и может достигать нескольких тысяч. Многие из них представляют всего лишь одну последовательность ДНК (см. табл. 2), поэтому следующим этапом явился отбор из исходного полного набора зондов наиболее оптимальной по размеру выборки олигонуклеотидов (20–24 зонда), позволяющей с наибольшей вероятностью определять субтип нейраминидазы. На первый взгляд достаточно выбрать наиболее часто встречающиеся зонды. Но при таком подходе могут быть отобраны зонды только для нейраминидазы с наиболее представленными субтипами гемагглютинина. Это обусловлено процессом коэволюции белков вируса гриппа

А – изменения в одном гене сопровождаются изменениями в других генах – в результате имеет место зависимость структуры гена нейраминидазы от субтипа гемагглютинина [21, 22]. Поэтому в случае нейраминидазы первого типа (табл. 1), представленной в основном субтипом H1N1, – 1140 последовательностей из 2696 (42%) и H5N1 – 1295 последовательностей (48%), при таком подходе будут выбраны зонды, определяющие ДНК нейраминидазы субтипов гриппа H1N1 и H5N1.

Для уменьшения влияния фактора разной представленности нейраминидазы первого типа различными подтипами гемагглютинина использовался следующий прием (рис. 1). Из полного набора зондов (Probe_Total) отбирался наиболее представительный (Probe_1-1) для полного набора ДНК-последовательностей (Seq_0). На следующей стадии из полного набора последовательностей ДНК отбрасывались все те, которые содержат первый зонд (Probe_1-1) и получали набор Seq_1. Для этого набора находили наиболее представительный олигонуклеотидный зонд (Probe_1-2). Из набора Seq_1 отбрасывали последовательности, содержащие зонд Probe_1-2, и получали набор Seq_2. Операции повторяли до получения зондов Probe_1-3, Probe_1-4, Probe_1-5, Probe_1-6. На следующей стадии из набора Probe_Total отбрасывали первые шесть зондов (Probe_1-1) – (Probe_1-6) и из оставшихся олигонуклеотидных зондов отобрали по той же схеме еще

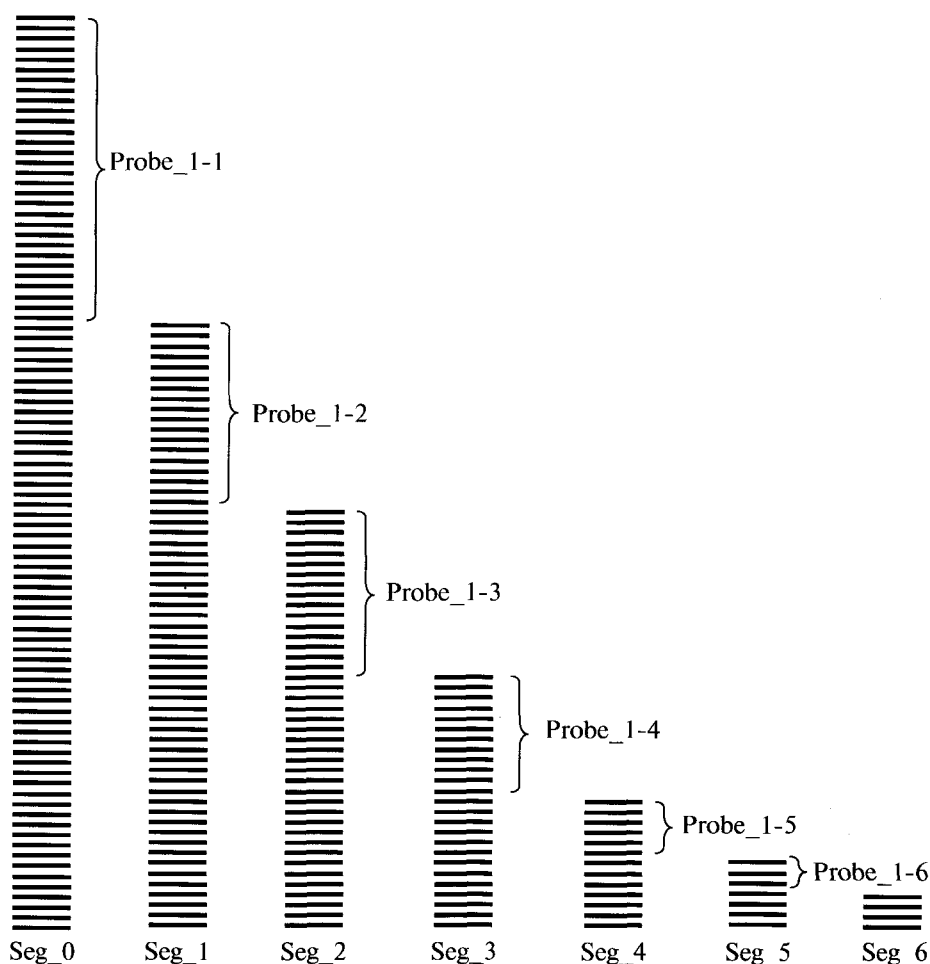


Рис. 1. Схема селекции олигонуклеотидных зондов.

шесть зондов, используя в качестве стартовой полный набор ДНК (Seq_0) и получали еще один набор зондов (Probe_2-1) – (Probe_2-6). Операцию повторяли еще 3 раза и получали еще три набора по шесть зондов. Структуры полученных 30 зондов приведены в табл. 3. Следует отметить, что в случае малого количества последовательностей ДНК (например, для нейраминидазы четвертого типа, представленной 31 последовательностью) уже Probe_1-1–Probe_1-3 определяли исходный набор ДНК. Тогда для нахождения большего количества зондов (20–24) расчет проводился не пять, а большее число раз.

Как видно из представленных данных (табл. 3), по мере увеличения числа итераций число наиболее представительных зондов падает с 1257 до 1107, тогда как количество наименее представительных зондов возрастает с 33 до 111. Возможны и другие варианты селекции зондов. Например, для более полного учета последовательностей ДНК, представленных в малой степени (таких, как H8N1, H10N1 и т.д.), можно модифицировать описанный выше подход – в процессе расчета из полного набора ДНК-последовательностей (Seq_0) исключить

те, что содержат больше заданного числа зондов (N_{tr}). Варьируя значение этого параметра, можно изменять долю зондов, определяющих нейраминидазу первого типа в последовательностях ДНК, представленных небольшим набором.

Чем меньше значение N_{tr} , тем большее число последовательностей ДНК из полного набора будет иметь не менее N_{tr} -зондов в своем составе, тогда как при больших значениях этого параметра расчет будет проводиться фактически по первому варианту. В рассматриваемом нами случае для всех оставшихся субтипов нейраминидазы использовался набор из 30 олигонуклеотидных зондов.

Для того чтобы уменьшить возможное число ложноположительных результатов, олигонуклеотидные зонды тестировались на их присутствие в последовательностях других серотипов при введении одной или двух точечных замен. В табл. 3 приведен первичный набор олигонуклеотидных зондов для определения нейраминидазы первого типа. Часть из этих зондов при введении одной или двух точечных замен давала зонд, характерный для дру-

Таблица 3. Структуры олигонуклеотидных зондов для типирования нейраминидазы первого типа

Зонд (5'–3')	Число последовательностей ДНК, содержащих зонд*	Наличие совершенного зонда или зонда с мутациями в последовательностях других серотипов нейраминидазы**	
Probe_1-1 ***	CAAGAGTCTGAATGTGCATGT	1257	1(2) N2 13(2) N3 2(2) N4 1(1) + 1(2) N6 12(1) + 10(2) N7 2(2) N9
Probe_1-2	TTTGAGATGATTTGGGATCCT	922	1(1) N2
Probe_1-3	GGGAGTTTTGTCCAGCATCCA	183	1(0) N2
Probe_1-4 ***	GGTAATGGTGTTTGGATAGGA	91	8(2) N4 1(0) + 2(2) N2
Probe_1-5	ATAACAGACACTATCAAGAGT	54	1(0) N2
Probe_1-6 ***	GGCAATGGTGTTTGGATAGGA	33	8(2) N4 1(1) N2
Probe_2-1	AAAGGGTTTTTCATTTAAATAC	1143	1(1) N2
Probe_2-2	AGTGGGAGCAGCATTTCTTTT	827	1(0) N2
Probe_2-3 ***	GCAAGTGCTTGCCATGATGGC	242	5(2) N8 1(0) N2
Probe_2-4	CACTATGAGGAATGCTCCTGT	164	1(2) N2
Probe_2-5	GCAAGTGCTTGTCATGATGGC	109	1(1) + 1(2) N2
Probe_2-6 ***	TGCAGGGACAACCTGGCATGGT	43	15(2) N7 1(1) N2
Probe_3-1	ATAGGATATATATGCAGTGGA	1139	
Probe_3-2	TGGGTGTCTTTTAAATCAAAAC	803	
Probe_3-3	GAGTGCTCCTGTTATCCTGAT	219	1(1) + 1(2) N2
Probe_3-4	AAATACGGCAATGGTGTTTGG	129	1(1) N2
Probe_3-5	GGGTACATATGCAGTGGGGTT	101	1(2) N2
Probe_3-6	AGACCTTGCTTCTGGGTTGAA	67	
Probe_4-1 ***	TGGTTGACAATTGGAATTTCT	1112	1(2) N4 1(2) N2
Probe_4-2 ***	GAATGTTCCCTGTTACCCAGAC	774	5(2) N5
Probe_4-3	TGCTCCTGTTATCCTGATGCT	225	1(1) N2
Probe_4-4 ***	TGCAGGGATAATTGGCATGGC	144	8(2) N7 35(1) + 16(2) N9
Probe_4-5	ATAGGGTACATATGCAGTGGG	102	
Probe_4-6	ATAGGATACATCTGCAGTGGG	84	
Probe_5-1	GGATATATATGCAGTGGAGTT	1107	
Probe_5-2	GGAAGTTTCGTTCAACATCCT	739	
Probe_5-3 ***	TTTGAATGATTTGGGATCCA	210	1(2) N2 3(2) N4
Probe_5-4	AATCGACCTTGGGTGTCTTTT	122	1(2) N2
Probe_5-5	AGTGGGAGCAGCATTTCTTTT	114	1(1) N2
Probe_5-6	CCATACAACCTCAAGGTTTGG	111	1(1) N2

* Общее число последовательностей ДНК, использованных в расчетах, равно 2623.

** В скобках приведено количество точечных замен в зонде. Например, "1(0) N2" – есть 1 совершенный зонд для последовательности нейраминидазы 9 типа; "35(1) + 16(2) N9" означает, что 35 и 16 последовательностей нейраминидазы 9 типа содержат олигонуклеотидный зонд, образованный из тестируемого зонда введением одной или двух точечных замен соответственно.

*** Зонды, не используемые в дальнейшем.

гих серотипов нейраминидазы (N2, N3, ..., N9). Поэтому они исключались из набора.

Обращает на себя внимание то, что многие совершенные зонды и зонды с одной или двумя мутациями содержатся в последовательностях нейраминидазы второго типа, хотя при достаточно большой выборке N2 число таких последовательностей мало и не превышает 1–3. Анализ данных по нейраминидазе второго типа показывает, что единственной последовательностью, для которой характерны эти зонды, является нейраминидаза N2 вируса Influenza A/mallard duck/Minnesota/1979, отнесенная к субтипу H3N2. В действительности же в этой последовательности отсутствуют зонды (и совершенные, и с одной или двумя мутациями), определяющие нейраминидазу второго типа, тогда как есть четыре совершенных зонда, относящихся к нейраминидазе типа 1. Поэтому можно предполагать, что для данного штамма проведено ошибочное отнесение. Аналогичная ситуация наблюдается и для изолята Influenza A/Equine/New Market/79, отнесенного к подтипу H3N3. В действительности, это серотип N8 (в этой последовательности отсутствуют зонды для N3, но есть пять зондов, характерных для N8).

Следующая стадия — изменение протяженности зондов для частичного выравнивания температур плавления дуплексов, образуемых зондом и анализируемой ДНК. Следует подчеркнуть, что для этого не ставились слишком жесткие условия и интервал температур плавления был выбран равным 10°C. В большей части варьирование протяженности зонда заключалось либо в удлинении, либо в укорачивании зонда на 1–2 нуклеотида за счет константной части кодона аминокислоты. Модифицированный зонд подвергался проверке на наличие в последовательностях других подтипов. Такого рода модификация, как было обнаружено при тестировании, практически не сказывается на результатах анализа — число определяемых последовательностей практически не изменяется, как не изменяется и специфичность зонда. С учетом этого были отобраны зонды для определения всех девяти подтипов нейраминидазы (табл. 4). Количество зондов для определения конкретного серотипа нейраминидазы варьировалось от 19 до 24. В общей сложности был отобран 191 зонд.

Важную роль играет возможность использования этих зондов для типирования субтипов нейраминидазы, представленных в базе данных GenBank после марта 2008 г., т.е. последовательностей ДНК, не использованных для расчета зондов. Для примера в табл. 5 приведены результаты тестирования зондов на нейраминидазу первого типа (см. табл. 4) на последовательностях ДНК нейраминидазы первого типа, депонированных в GenBank в январе–марте 2009 г. Картина распределения несколько отличается для этих двух наборов ДНК. Если в наборе, использованном для расчета зондов, наиболее

представительны последовательности, характеризующиеся 5–6 зондами, то в тестируемом наиболее представлены последовательности, характеризующиеся 3–4 зондами. Но в целом рассчитанные зонды пригодны для типирования нейраминидазы первого типа — более 98% последовательностей ДНК определяются не менее чем двумя зондами.

Исходя из приведенных выше расчетов, был сконструирован микрочип, включающий девять строк, каждая из которых содержит зонды для определенного подтипа нейраминидазы.

Зонды содержали на 3'-конце аминоксильный линкер, с помощью которого их иммобилизовали на поверхности стеклянного слайда, модифицированного фенилдиизотиоцианатом [23]. В качестве маркера границ микрочипа использовался олигонуклеотид (dT)₈, несущий на 3'-конце аминоксильный линкер, а на 5'-конце — флуоресцентный краситель Tamra.

При проведении анализа первоначально нарабатывали кДНК с использованием в качестве матрицы РНК вируса гриппа А. На следующей стадии получали ампликоны гена нейраминидазы (с одновременным введением флуоресцентной метки Су3), используемые в дальнейшем для гибридизации. Поскольку зонды выбирались исходя из набора полных последовательностей нейраминидазы, то необходимо было наработать ампликоны, представляющие полноразмерный ген нейраминидазы. При выборе универсальных для всех подтипов нейраминидазы праймеров за основу были взяты описанные в работе [24] и укороченные нами с 5'-конца последовательности NA_F1 и NA_R2 (см. “Эксперимент. часть”). Для повышения специфичности и уровня наработки продукта дополнительно были выбраны универсальные внутренние праймеры NA_R1 и NA_F2, разбивающие ген нейраминидазы на два фрагмента протяженностью ~830 и ~600 п.о. Таким образом, в ПЦР использовали две пары праймеров NA_F1 + NA_R1 и NA_F2 + NA_R2.

Ввиду весьма высокой гетерогенности нуклеотидной последовательности сегмента подбор внутренних праймеров осуществлялся, как и при выборе зондов, двухступенчато. Первоначально, на основании анализа всех представленных в базе последовательностей нейраминидазы выбирали консервативный 7-членный пептид, который затем переводили в вырожденную нуклеотидную последовательность, соответствующую набору 21-членных олигонуклеотидов, кодирующих этот пептид. Амплификацию проводили в асимметричном режиме для получения преимущественно одноцепочечных продуктов для последующей гибридизации на микрочипе.

Разработанный микрочип тестировали на образцах, представляющих наиболее распространенные подтипы нейраминидазы — N1 (10 образцов) и N2 (9 образцов) (табл. 6).

Таблица 4. Структура олигонуклеотидных зондов (5'–3') для выявления серотипов 1–9 нейраминидазы вируса гриппа А

№	N1	N2	N3
1	TTTGAGATGATTTGGGATCCT	TATGGAACAGGCTCATGGCCT	AATAGTATAGTTACTTTCTGT
2	GGGAGTTTTGTCCAGCATCCA	CAAGTGTGCATAGCATGGTCC	GTGTCAAACAATGATTTGGTCA
3	АТААСАGАСАСТАТСАAGAGT	TGCATCAACAGGTGTTTTTAT	ACTAAACACAGCAATGGAACC
4	AAAGGGTTTTCAITTAATAAC	TCTGGGTATTCTGGTATATTC	GCTCCTGTACTTGGGAACACTAC
5	AGTGGGAGCAGCATTTCCTTT	GGAGTGAAGGGTGGGCCTTT	GATGGCCCTGCTGCTAATAGT
6	CACTATGAGGAATGCTCCTGT	GGCTCATGGCCTGATGGGGCG	GATGGCCCAGCGGCTAATAGT
7	GCAAGTGCTTGTATGATGGC	AAATGTTATCAATTTGCACTT	TTTACAAGGACAATGCAATA
8	ATAGGATATATATGCAGTGGGA	GGAGTGAAGGATGGGCCTTT	TCATGTGATTTCCCAAGTAAT
9	TGGGTGTCTTTTAATCAAAAC	CTTTTGATGAACGAATTGGGT	TCATGTGATTTCCCAAGCAAT
10	GAGTGCTCCTGTTATCCTGAT	AGTTATGTGTGCTCAGGACTT	AACAGACCTTGGATGAGAATC
11	AAATACGGCAATGGTGTFTTG	ACCTATGGAACAGGCTCATGG	GTTTTCAATAATGACTGGTCC
12	GGGTACATATGCAGTGGGGTT	AAATGTTACCAATTTGCACTT	AACAGTATAGTTACTTTCTGT
13	AGACCTTGCTTCTGGGTTGAA	TGGGTGACAAGAGAACCTTAT	ATGACAGACTCCATTAATCA
14	TGCTCCTGTTATCCTGATGCT	TCTGGTATTTTCTCTGTTGAA	ATGACAGACTCCATCAAATCA
15	ATAGGGTACATATGCAGTGGG	AGTTATGTGTGCTCAGGGCTT	TTTCATAAGGACAATGCAATA
16	ATAGGATACATCTGCAGTGGG	ACTGATGGAAGTGCATCAGGA	AGAATCAACAACGAGACTATA
17	GGATATATATGCAGTGGAGTT	GTTAGATGTGTTTGACAGAGAC	TGGTCTTTTGCCCTCGCCAA
18	GGAAGTTTCGTTCAACATCCT	TCCAGTTATGTGTGCTCAGGA	ACCATCAAAGACAGGACACCG
19	AATCGACCTTGGGTGTCTTTT	CGCTCAGGTTATGAGACTTTC	TCTTGGACAAGCAATAGTATA
20	AGTGGGAGCAGCATTTCCTTT	AACATAACAGAGATAGTGTAT	GACGGGAAAGAGTGGATGCAT
21	CCATACAACCTCAAGGTTTGAG	TCCAGTTATGTGTGCTCAGGG	TGTTTCCAGCCTTGCTTCTAT
22			AACAGGCCTTGGATGAGGATT
23			GCTCCAGTACTGGGTAATTAC
24			ACAGATGGCCCTGCTGCTAAT
№	N4	N5	N6
1	AATGGTGTACAGGATATTATA	TGGTCTGGGATGATGGAGCA	TGGCATGATGGTGTGCTGAAATC
2	TCATGGCCCGATGGCGCTCTG	AATGGAATGAATAGACCAATT	TGGCACGATGGGGCTGAAATC
3	TCGTGGCCTGATGGCGCTCTG	AACGGAATGAATAGACCAATT	TCAGCAACAGGAATGACACTA
4	ATGATAAGAGGGCAGCCTAAA	AATGGAATGAACAGACCAATT	GGATCATGGTCTTGGCATGAT
5	TGCGTGTGTCAAGATGAGTTT	TTTTGTGGTGTTTCAAGTGAG	ATTGTCAACAACCAGAACTGG
6	TTCAGCTTTAGATATGGAGAT	TGGAACGGAATGAATAGGCCA	TGTGAAGTAAACTCATGGCAC
7	TGTTCCCTGTTACCCAAGTGGG	AATGGGATGAATAGACCAATA	GGAGGGAGCCCAGATCCTGGC
8	CCATGGATAAGATTCAACAGT	AGCATTTGGACCTCTAGTAGC	GCATTCATAGACTACTGGGCA
9	TTCAGCTTTAGATATGGGGAT	AACGGAATGAATAGGCCAATT	TCAGCTACAGGAATGACACTA
10	ATAACAAGCTTGTGCTCAATA	AGCATTTGGACTTCAAGTAGC	TGGCATGATGGTGTGCTGAGATC
11	TCATGGCCTGATGGCGCTCTG	AGCATTTGGACTTCTAGTAGC	GGATCGTGGTTCATGGCATGAT
12	ATATGGTTTAGCCATTACAAC	AATGGAATGAACAGACCAATC	GCGTTCATCGATTATTGGGCT
13	CCTTTGAGCAAGGACAATGGG	GCTTATGCTGTTATTCAATTAT	CCAGTAGTCATGACAGATGGC
14	GGTAGTAGTATTGCGTTCTGT	TTTCAGGGAGGTCACATTGAA	GGATCTTGGTTCATGGCATGAT
15	TGGTCTGCCACTGCATGCAGC	AGTGTATGGGCAGGAAGGACA	AATAGACCAGTAATCACTATA
16	GAGACAACAGGCAGGAATTGC	TTCTGTGGTGTTCAGTGAG	AGCATTTGTAGCTCTCTGTGGA
17	AATTACTACAATGAGACTTTT	TGGAATGGAATGAATAGACCA	AATTCCTGGTTGGGAAGGACC
18	CCCTTCATATCGTGTTCATT	TTTTGTGGTGTTCAGCGAG	AAAGTCCCAAATGCAGAAACC
19	GGTAGTAGTATTGCATTCTGT	TTTTGTGGTGTTCAGTGAG	ATTAATGCATTTGCAGGGAC
20		GTTCCATGTTTCTGGCTGGAA	ATTGTCAACAACCAAACTGG
21			AAAGAGAGTAGTGTACTGTGG
22			ATAAGTTGGGAAATGGGTCAA

Таблица 4. Окончание

№	N7	N8	N9
1	GCAACAGCTACAGTATACTAT	AGCTCCATTGTGTGATGTGTGGA	GATGGGGCTAAAAATAGAGTAC
2	AACTTATGATAGGAATCTCA	CAATTTACTGGTTCATGCACT	ACTATAAATTCATGGCACATA
3	AGTGGATTTGAAATGCTGAAG	GGATCTTTCACTCTGCCAGTA	GATGGGGCTAAAAATAGAGTAT
4	AGTGGATTCGAAATGCTGAAA	ACGATATGGACCTCAAGTAGC	TCATCACCACCCACAGTATAC
5	GAATGCTCCTGTTACGGACAC	AGCTCCATTGTAATGTGTGGA	ATGTGTTCCAGCACAGAATTC
6	ACCATTAGAAACAAGCACTCA	GGATACGGTGTAAGGTTTC	TTCACAGATGGGTCTGCCACT
7	AGATTTGGGGAAAGTGAACAA	GAATCATCATGCACTTGCATT	TGCTATAGAGCATGCTTCTAT
8	GAATGTTCTTGTATGGTCAT	CCAATTTCCAAGATAATGGA	TGCTACCGAGCGTGTPTTAT
9	TGCTATAACCCCTGTTTCTAT	ACAATCTGGACTTCCAGCAGC	ATACACGATAGGTCCCAGTAT
10	AGTGGTTTTGAGATGTTGAAG	GATGGGAAGAAGTGGATGACA	TGCAGGTTCTATGCTCTCAGC
11	CTTACAACCACTATTTAAACA	ACAATCTGGACTTCCAGTAGC	ACCCAAATAAGTAACACCAAC
12	TGGCAAGGGGCTAACAGACCA	ACAATATGGACCTCTAGCAGC	TTCAGTACGGTTCTGCTACT
13	GAATGCTCTTGTATGGGCAC	GATACTCCAAGAGGGGAAGAT	AATCCCCGACCGAATGACCCA
14	AACTGTTGATAGGAATTTCA	GATGGACCAGCAAACAGACAA	CGCGGAAGACCTAAAGAGGAC
15	GAATGCTCCTGTTATGGACAC	GACAATTTGACAGGAACCAAC	CTAAAGGTGCCAATGCATTG
16	ACAATCAGAAACAAGCATTCA	GACACTCCAAGAGGAGAAGAT	AATACGTGGGCCCGAAACATA
17	TGCTACAACCCCTGTTTCTAT	GGGCAATCACCCAATGTGTAC	GTATTAACACTGACTGGAGT
18	GGCCGCACAATAAGTCCTCGT	GGTTCCTTCACATTGCCGTT	CGTGGGAGACCAAAGGAGGAT
19	AGTGGATTCGAAATGTTGAAA	GACAACCTGGACTGGAACCAAC	CGTGGGAAGACCCAAGGAGGAC
20	AGATTTGGAGAAAGCGAACAA	CCTTTCTCCAAGGACAATGGA	
21	CTCACTACCACAATAAAAACA	GGGTATGGTGTAAGGCTTC	
22		CCCTTTCCAAGACAACGGA	
23		GACACTCCTAGGGGAGAGGAT	
24		CCAATTTGTTCTTGTTCGCCA	

Таблица 5. Эффективность типирования нейраминидазы первого типа на последовательностях, представленных в GenBank до марта 2008 г. и в январе—марте 2009 г.

Число зондов, характерных для последовательности ДНК нейраминидазы первого типа	Число последовательностей, определяющихся данным количеством зондов*	
	Депонированы до марта 2008 г.	Депонированы в январе—марте 2009 г.
0	20 (0.8)	1 (0.3)
1	27 (1.0)	3 (0.9)
2	58 (2.2)	32 (10.2)
3	127 (4.8)	80 (25.5)
4	431 (16.4)	79 (25.2)
5	813 (31.0)	22 (7)
6	682 (26.0)	46 (14.6)
7	319 (12.2)	33 (10.5)
8	112 (4.3)	17 (5.4)
9	33 (1.3)	0 (0)
Всего последовательностей	2622	313

* В скобках приведена доля последовательностей в процентах от общего числа использованных последовательностей ДНК.

Для оценки результатов микрочипового типирования использовалась средняя флуоресценция спота (Y_μ), равная сумме интенсивностей флуоресценции спотов подтипа μ , деленная на число спотов этого подтипа.

$$Y_\mu = \left(\sum_i^{N_\mu} I_i^\mu \right) / N^\mu,$$

где I_i^μ — интенсивность флуоресценции i -го спота для подтипа μ , N^μ — число спотов для μ -го подтипа нейраминидазы.

Ошибка расчетов определялась исходя из вариации в интенсивности флуоресценции маркерных спотов, расположенных в левой и правой колонках микрочипа (помечены на рис. 2 черным цветом). Эта ошибка является интегральной и включает в себя все ошибки, связанные с приготовлением раствора олигонуклеотида для печати и печатью микрочипа.

На рис. 3 представлены примеры результатов гибридизации, типичные для первого и второго подтипов нейраминидазы. Из этих рисунков видно, что подтипы нейраминидазы определяются достаточно однозначно. Из 19 исследованных образ-

цов 18 были идентифицированы и лишь для одного (A/ST. PETERSBURG/8/06 (H1N1)) провести отнесение к определенному субтипу не удалось, поскольку для этого изолята значения средних значений флуоресценции для N1 и N2 были близки по величине.

Следует отметить, что варьирование температуры гибридизации в интервале от 50 до 60°C не сказывается в существенной степени на гибридизационной картине и распределении средней флуоресценции спота. Увеличение температуры гибридизации выше 60°C, хотя и уменьшает количество неспецифично светящихся спотов, но приводит к падению общего уровня флуоресценции, что негативно влияет на результаты обсчета данных. В свою очередь, проведение гибридизации при температуре ниже 50°C отрицательно сказывается на специфичности связывания ДНК с олигонуклеотидными зондами, что проявляется в выравнивании значений средней флуоресценции спотов.

Таким образом, на основе рассчитанных олигонуклеотидных зондов разработан микрочип, позволяющий определять субтип нейраминидазы гриппа типа А. Эксперименты показали практически однозначную идентификацию нейраминидазы первого и второго типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотидные зонды и праймеры были синтезированы на синтезаторе ASM-800 (ООО "Биоссет", Новосибирск) по стандартной методике. Печать микрочипов осуществляли на стеклянных фенилизотиоцианатных слайдах методом контактной печати на споттере Odyssey Calligrapher (BioRad) пином 360 мкм. На каждом слайде распо-

Таблица 6. Список изолятов вируса гриппа А, использованных в работе

Изолят	Субтип
A/PR8/34	H1N1
A/WSN/1933	H1N1
A/NEW CALEDONIA/20/91VR 116	H1N1
A/NEW CALEDONIA/20/99	H1N1
A/TEXAS/36/91	H1N1
A/TEXAS/36/91 X-113	H1N1
A/SOLOMON ISLANDS/3/06	H1N1
A/SOLOMON ISLANDS/3/06 IVR-145	H1N1
A/ST. PETERSBURG/8/06	H1N1
A/ST.PETERSBURG/8/2006 X-163	H1N1
A/SYDNEY/05/97	H3N2
A/SYDNEY/05/97 IVR-108	H3N2
A/WISCONSIN/67/05	H3N2
A/WISCONSIN/67/05 X PR/8 X-161	H3N2
A/WY/03/03 X A/PR/8/34	H3N2
A/WYOMING/03/2003	H3N2
A/NEW YORK/55/04	H3N2
A/NY/55/04 X PR/8 X-157A	H3N2
A/WUHAN	H3N2

лагалось 4 эквивалентных микромассива зондов, пригодных для одновременной гибридизации четырех образцов. Микромассив состоял из 9 строк, каждая из которых содержала зонды для одного типа нейраминидазы, а также маркерный олигонуклеотид (dT)₈ – Tamra (рис. 2).

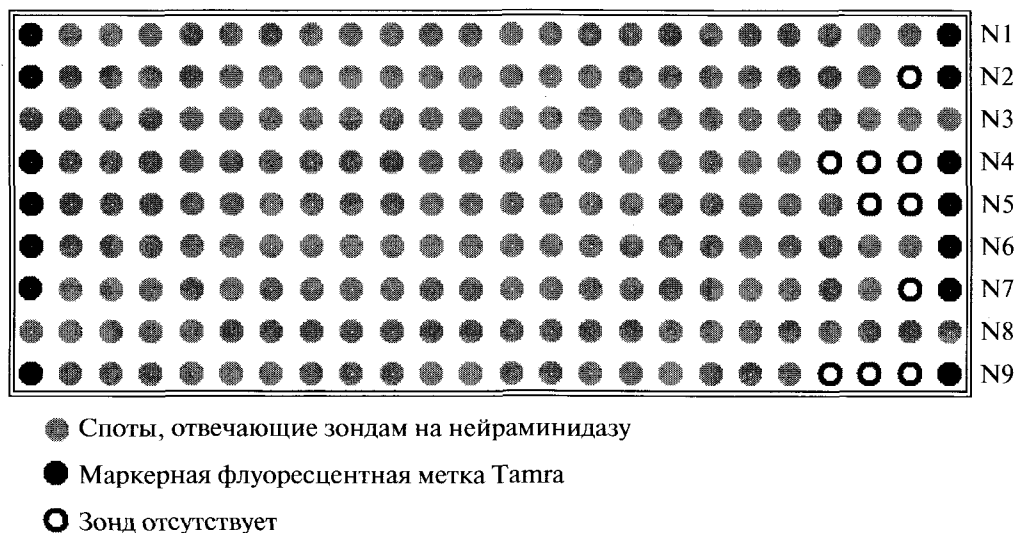


Рис. 2. Микрочип формата 24 × 9 спотов; каждая строка соответствует определенному подтипу нейраминидазы (N1–N9).

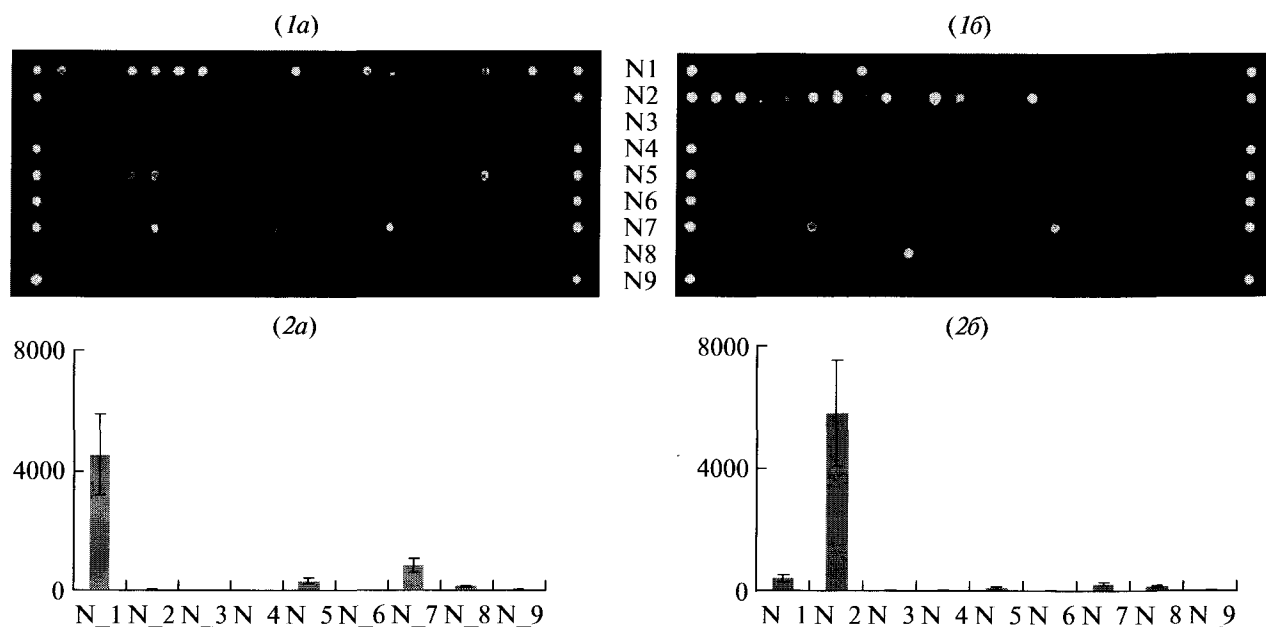


Рис. 3. Картина гибридизации ампликонов нейраминидазы вируса гриппа А изолятов A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) (1a) и A/WYOMING/03/2003 (H3N2) (1б) на микрочипе (55°C, 2 ч) и соответствующие им гистограммы распределения средней флуоресценции спотов (2a, 2б).

Геномную РНК выделяли из 140 мкл клеточной культуры (титр вируса 10^5 – 10^7 pfu/мл) с использованием набора QIAquick Viral RNA Kit (QIAGEN, Valencia, Ca).

Обратную транскрипцию проводили следующим образом: смесь, содержащую 1 мкл праймера GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGG (20 мкМ), 9 мкл РНК (из экстрагированного объема 80 мкл) и 2 мкл dNTP (10 мМ) нагревали 10 мин при 65°C, охлаждали во льду. Добавляли 4 мкл 5х кДНК-буфера, 1 мкл 0.1 М дитиотреита, 1 мкл (40 ед.) ингибитора рибонуклеазы (RNAzin, Promega), 1 мкл воды, 1 мкл обратной транскриптазы ThermoScript (Invitrogen, Carlsbad, CA). Смесь центрифугировали и инкубировали 55°C – 5 мин, 60°C – 55 мин.

Для амплификации фрагментов гена нейраминидазы использовали следующие пары праймеров – (5'–3'):

NA_F1 STATAGGGAGCAAAAGCAGGAGT и
NA_R1 – TAACAGGARCAYTCTCCTARTG;
NA_F2 CAYTAYGAGGARTGYTCCTGTТАиNA_R2
CACTATAGAAGTAGAAACAAGGAGTTTTT.

Длина нарабатываемых ампликонов составляла ~830 и ~600 п.о. соответственно. Для получения преимущественно одноцепочечной ДНК проводили ПЦР в асимметричном режиме [13]. Состав реакционной смеси (50 мкл, указаны конечные концентрации): буфер для ПЦР Qiagen (1.5 мМ MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, Трис-НCl, рН 8.7), MgCl₂ – 1.5 мМ, 200 нМ dATP, dCTP, dGTP, 70 нМ dTTP, 100 нМ dUTP-Су₃, 80 нМ прямой праймер, 1 мкМ обрат-

ный праймер, 1.25 ед. Hot Start Taq-полимеразы (Qiagen) и 2 мкл раствора ДНК. ПЦР проводили в термоциклере iCycler (BioRad), используя следующий протокол: 95°C – 15 мин, затем 35 циклов 94°C – 30 с, 52–55°C – 30 с, 72°C – 1 мин 10 с. Контроль наработки ампликона осуществляли электрофорезом в 1% агарозном геле с окрашиванием этидийбромидом. Флуоресцентно-меченные ампликоны очищали от избытка меченых трифосфатов на гель-фильтрующих колонках Qiagen, высушивали досуха на вакуумной центрифуге при 60°C и использовали для гибридизации.

Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл 2х гибридизационного буфера (1х гибридизационный буфер: 6х SSC, 5х раствор Денхардта, 0.1% Твин-20) и прогревали перед нанесением на слайд 2 мин при 97°C, охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в гибридизационной камере фирмы "ArrayIt", Sunnyvale при температуре 55–60°C в течение 2 ч. Затем слайд последовательно отмывали в растворах 6х SSC, 2х SSC + 0.1% SDS, 2х SSC и 1х SSC, центрифугировали и сканировали на сканере Scan Array Express 2.0 (Perkin-Elmer) при длине волны возбуждающего лазера, равной 543 нм. Изображение анализировали с использованием программы ScanArray Express, входящей в математическое обеспечение сканера.

Работа выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (проект № 3803).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Контрольный вопросник ВОЗ для планирования готовности к пандемии гриппа (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Checklist_RUS.pdf).
2. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press, 2005.
3. Fouchier R.A.M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D.M.E. // J. Virol. 2005. V. 79. P. 2814–2822.
4. Hoffmann B., Depner K., Schirrmeyer H., Beer M. // J. Virol. Methods. 2006. V. 136. P. 200–209.
5. Liu R.H., Lodes M.J., Nguyen T., Siuda T., Slota M., Fuji H.S., McShea A. // Anal. Chem. 2006. V. 78. P. 4184–4193.
6. Lodes M.J., Suci D., Elliott M., Stover A.G., Ross M., Caraballo M., Dix K., Crye J., Webby R.J., Lyon W.J., Danley D.L., McShea A. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 1209–1218.
7. Lin B., Blaney K.M., Malanoski A.P., Ligler A.G., Schnur J.M., Metzgar D., Russell K.L., Stenger D.A. // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 443–452.
8. Li J., Chen S., Evans D.H. // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 696–704.
9. Sengupta S., Onodera K., Lai A., Melcher U. // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. P. 4542–4550.
10. Han X., Lin X., Liu B., Hou Y., Huang J., Wu S., Liu J., Mei L., Jia G., Zhu Q. // J. Virol. Methods. 2008. V. 152. P. 117–121.
11. Gall A., Hoffmann O.B., Harder T., Grund C., Hoper D., Beer M. // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47. P. 327–334.
12. Dawson E.D., Moore C.L., Smagala J.A., Dankbar D.M., Mehlmann M., Townsend M.B., Smith C.B., Cox N.J., Kuchta R.D., Rowlen K.L. // Anal. Chem. 2006. V. 78. P. 7610–7615.
13. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.V., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Sinyakov A.N. // J. Med. Vir. 2006. V. 78. P. 1325–1340.
14. Neverov A.A., Riddell M.A., Moss W.J., Volokhov D.V., Rota P.A., Lowe L.E., Chibo D., Smit S.B., Griffin D.E., Chumakov K.M., Chizhikov V.E. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 3752–3759.
15. Wernersson R., Junkcer A.S., Nielsen H.B. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 2677–2691.
16. Jabado O.J., Liu Y., Conlan S., Quan P.L., Hegyi H., Lussier Y., Briese T., Palacios G., Lipkin W.L. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36 (1): e3.
17. Hall T.A. // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
18. Array Designer (<http://www.premierbiosoft.com/dnami-croarray>).
19. Oligos4Array (http://www.ocimumbio.com/web/arrays/array_design.asp).
20. Altschul S.F. // J. Mol. Biol. 1991. V. 219. P. 555–565.
21. Ghedin E., Sengamalay N.A., Shumway M., Zaborsky J., Feldblyum T., Subbu V., Spiro D.J., Sitz J., et al. // Nature. 2005. V. 437. P. 1162–1166.
22. Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., Finkelstein D.B., Xu X., Wang J., Ma J., Fan Y., Rakestraw K.M., Webster Robert G., Hoffmann E., Krauss Scott L., Zheng J., Zhang Z., Naeve C. W. // Science. 2006. V. 311. P. 1576–1580.
23. Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J., Wang R., Smith L.M. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5456–5465.
24. Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. // Arch. Virol. 2001. V. 146. P. 2275–2289.

Oligonucleotide Microarray for Subtyping of Influenza Virus A Neuraminidase

V. A. Ryabinin^{a, #}, E. V. Kostina^a, A. A. Neverov^b, G. A. Maksakova^a, A. N. Sinyakov^a[#]Phone: +7 (3832) 363-51-73; fax: +7 (3832) 363-51-53; e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru^aInstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentieva, 8, 630090 Novosibirsk, Russia^bLaboratory of Method Development, Center of for Biologics Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, USA

Microarray for influenza A neuraminidase subtyping was presented. Selection of oligoprobes proceeded in two steps. First step included selection of peptides specific for each subtype of neuraminidase. At the second step oligoprobes were calculated using found peptides structures with the subsequent additional selection of the most specific and representative probes. From 19 to 24 probes were used for determination of each subtype of neuraminidase. Microchip testing for 19 samples with the most widespread types (N1 and N2) specifies in unequivocal definition 18 of them and only one isolate has not been identified.

Key words: influenza virus A; neuraminidase; microarray, typing; diagnostics