

## Разработка системы субтипирования вирусов гриппа на основе ДНК микрочипов\*

Хазан Александра Александровна<sup>1</sup>, Плотникова Марина Александровна<sup>2</sup>, Егоров Владимир Валерьевич<sup>3</sup>, Васин Андрей Владимирович<sup>1,3</sup>

студент; студент; м.н.с.; с.н.с, к.б.н.

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный политехнический университет; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет);

<sup>3</sup>НИИ группа РАМН. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: vasin@influenza.spb.ru

Вирусы гриппа типа А, субтипирование которых основано на антигенных различиях внешних гликопротеинов: гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА), и вирусы гриппа типа В занимают важную роль среди вирусных причин возникновения острых респираторных заболеваний человека. Ежегодные возвратные эпидемии гриппа, включая недавние случаи заражения людей вирусом гриппа птиц, сочетающиеся с высокой степенью генетической вариабельности разных штаммов вирус, обуславливают необходимость разработки эффективных, точных и быстрых методов субтипирования вирусов гриппа, а также идентификации отдельных штаммов. Одним из подходов, позволяющих проводить скрининг исследуемых образцов на присутствие или отсутствие большого разнообразия вирусов в рамках одного анализа, является использование микрочипов (microarrays), на которые нанесены штамм-специфические олигонуклеотидные пробы. Целью данного исследования является создание олигонуклеотидного микрочипа, который можно использовать для быстрого и точного типирования и субтипирования вирусов гриппа. Типичный microarray анализ состоит из 4 этапов: печати чипа, получения меченой пробы, гибридизации пробы на чипе и сканирования с последующим анализом достоверности полученных результатов гибридизации. Олигонуклеотидные пробы, иммобилизованные на поли-L-лизиновые или аminosилановые субстраты в 3xSSC буфере методом контактной печати на споттере SpotArray24 (Perkin-Elmer, USA), были подобраны для специфического выявления генов НА1, НА3, НА5 и NA1, NA2 вирусов гриппа типа А. Дизайн специфических проб был осуществлен с использованием последовательностей, взятых из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>), и программы OligoWiz 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/OligoWiz2/>). Вирусные РНК подвергали обратной транскрипции (ОТ), а полученные кДНК продукты метили флюоресцентной цианиновой меткой (Cy3). Cy3-меченые ампликоны гибридизовали с олигонуклеотидами на поверхности микрочипа. Результаты гибридизации визуализировали на флюоресцентном сканере ScanArray Express (Perkin-Elmer, USA). Предварительный анализ референс-штаммов вирусов гриппа A/Moscow/10/99 и A/New Caledonia/20/99 показал, что разрабатываемый метод на основе ДНК микрочипов может быть использован для быстрой и достоверной идентификации всех субтипов вирусов гриппа А на основе продуктов ОТ вирусной РНК. Исследования продолжаются в настоящее время.

### Литература

1. Sengupta S., Onodera K., Lai A., Melcher U. (2003) Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization // J.Clin.Microb. 41(10), 4542-4550.
2. Bryant P.A., Venter D., Robins-Browne R., Curtis N. (2004) Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases // THE LANCET Infectious Diseases, 4, 100-111.
3. Wang, D., L. Coscoy, M. Zylberberg, P. C. Avila, H. A. Boushey, D. Ganem, and J. L. DeRisi (2002) Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens // Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 99, 15687–15692

\* Работа осуществлялась при поддержке гранта регионального общественного фонда содействия отечественной медицине 2006 года и гранта 2006 года для молодых кандидатов наук Санкт-Петербурга