



## УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МИКРОЧИП ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА А

© 2012 г. Е. В. Костина\*, В. А. Рябинин, Г. А. Максакова, А. Н. Синяков

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 15.12.2011 г. Принята к печати 26.01.2012 г.

Создан микрочип для определения субтипа вируса гриппа типа А, функционирующий по принципу “один спот – один субтип”. Каждый спот содержит набор олигонуклеотидных зондов, специфичных для определенных субтипов гемагглютинина и нейраминидазы, а также матриксного белка (маркера на вирус гриппа А). Надежность предложенного варианта чипа такая же, как и у созданного нами ранее полноразмерного микрочипа для отдельного типирования гемагглютинина и нейраминидазы. Для визуализации изображения использовали мечение анализируемой нуклеиновой кислоты флуоресцентным красителем, а также биотином с последующей фиксацией в системе стрептавидин-коллоидное золото и проявлением с использованием солей серебра. Во втором случае для анализа изображения применялся обычный планшетный сканер, что существенно упрощает процедуру типирования вируса гриппа.

*Ключевые слова:* вирус гриппа А; микрочипы; типирование; диагностика

### ВВЕДЕНИЕ

Грипп А является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний. За последнее столетие вирус гриппа А являлся причиной пандемий гриппа в 1918–1920, 1957–1958, 1968–1969, 2009 годах [1]. Кроме того, локальные вспышки заболевания неоднократно фиксировались в различных регионах мира. Очевидно, что возможность определения субтипа вируса гриппа на ранних стадиях развития пандемии или эпидемии является важной для предотвращения распространения инфекции и уменьшения последствий заболевания. Актуальность этой проблемы отражена в работах [2, 3]. В последние годы в литературе рассматривался ряд вариантов микрочипов для типирования вируса гриппа [4–12]. Использовались как секвенирующие [4–6], так и гибридационные микрочипы [7–12].

Гибридационные микрочипы, описанные в вышеприведенных работах, в основном не являлись универсальными и предназначались для определения только части субтипов нейраминидазы и гемагглютинина. Лишь в работе [6] представлен микрочип, позволяющий типировать все подтипы гемагглютинина (за исключением субтипа Н16) и нейраминидазы. Данный вариант микрочипа, созданный с использованием техно-

логии CombiMatrix Corp. (генерацией олигонуклеотидных зондов непосредственно на поверхности слайда), содержал несколько тысяч зондов и имел весьма высокую стоимость, поэтому создание более простого, но столь же информативного микрочипа является важной задачей.

Ранее нами были созданы два варианта микрочипа для типирования вируса гриппа А [13–16]. Первый вариант представляет собой два микро-массива, на одном из которых проводилось определение всех субтипов нейраминидазы [13, 15], а на втором – всех субтипов гемагглютинина [14, 15]. Размер этих микро-массивов составлял 9 × 24 и 16 × 24 спота, соответственно. Количество гибридационных зондов, рассчитанных с помощью разработанной нами компьютерной программы [13, 15] для определения каждого субтипа гемагглютинина или нейраминидазы, варьировалось от 19 до 24.

Таким образом, общее число спотов для типирования гриппа составляло около 600. Этот вариант микрочипа универсален и позволяет типировать вирус гриппа А независимо от организма хозяина и географического распространения. Второй вариант чипа более специализирован и включает в себя дискриминирующие зонды, характерные только для субтипов вируса гриппа А, опасных или потенциально опасных для человека, а именно: зонды для субтипов Н1, Н2, Н3, Н5, Н7, Н9 гемагглютинина и субтипов N1, N2, N3, N7 нейраминидазы, а также зонды, выявляющие ген матриксного белка вируса гриппа А [16]. Размер этого микрочипа

Сокращения: 1×SSC – 0.15 М NaCl, 0.015 М цитрат натрия, рН 7.0; TAMRA – флуоресцентный краситель тетраметилродамин.

\* Автор для связи тел.: (тел.: (3832)363-51-72, эл. почта: kostinaelena@mail.ru).

10 × 24 спота и общее число спотов равнялось 240. Достоверность определения субтипа вируса гриппа с использованием таких чипов весьма высока и достигает 90–95% [15].

Следует сказать, что полноразмерный вариант микрочипа важен при первоначальном тестировании рассчитанных олигонуклеотидных зондов, но может оказаться излишне объемным для проведения рутинных анализов. Кроме того, при наработке ампликона используются достаточно дорогие флуоресцентные нуклеозидтрифосфаты или меченные флуоресцентной меткой праймеры, а для визуализации картины гибридизации – специальные флуоресцентные сканеры. Уменьшение вклада этих двух параметров в стоимость анализа может сделать такого рода микрочип коммерчески более привлекательным. Настоящая работа посвящена решению этой задачи.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отнесение анализируемого изолята гриппа к определенному субтипу гемагглютинина или нейраминидазы с использованием полноразмерного варианта универсального микрочипа (микрочип первого поколения) проводилось по двум параметрам: по средней флуоресценции спотов, характерной для определенного субтипа, и по числу спотов, уровень флуоресценции которых превышает среднее значение и которые принимаются во внимание как значимые споты [13–16]. Главную роль в этом случае играет первый параметр, тогда как второй может указывать на наличие ложноположительных результатов и полезен в случае неоднозначных результатов анализа. Источником ложноположительных результатов может являться высокий уровень фоновой флуоресценции (в этом случае число значимых спотов для всех подтипов может оказаться близким по значению), либо слишком высокая флуоресценция одного из спотов (тогда средняя флуоресценция спотов будет слишком высока, но при этом количество значимых спотов будет мало).

Проанализировав полученные данные, мы пришли к выводу, что исключив зонды, которые дают или могут давать ложноположительные результаты, можно создать микрочип существенно меньшего размера. Для этого, используя эквимлярную смесь олигонуклеотидных зондов, характерных для одного субтипа гемагглютинина или нейраминидазы, можно напечатать лишь один спот. Каковы преимущества и недостатки данного подхода?

• К явным преимуществам относится малый размер чипа. Если при использовании “большого” микрочипа для определения нейраминидазы, гемагглютинина и матриксного белка необходимо напечатать около 600 спотов, то данный вари-

ант требует всего 27 спотов: 17 – для определения субтипа гемагглютинина, включая зонды на свиной пандемический грипп 2009 года, 9 – для определения субтипа нейраминидазы и 1 – для определения гена матриксного белка.

• Это влечет за собой уменьшение геометрических размеров самого микромассива, что позволяет расположить большее их число на слайде или провести повторную печать спотов, что, в свою очередь, должно повысить статистическую достоверность получаемых результатов.

• Теоретически это должно повысить чувствительность метода, поскольку ДНК из всего объема анализируемого раствора должна локализоваться в пределах одного спота, а не распределяться между 19–24 спотами.

• Микромассив столь малого размера может использоваться в микрофлюидных системах для детектирования вируса гриппа А и определения его субтипа.

Каковы возможные проблемы при использовании такого рода микрочипов?

• Недостатком такого подхода может оказаться возникновение ложноположительного сигнала в результате неспецифичного связывания анализируемой ДНК и зондов спота. Эта ошибка может быть исключена путем использования данных по гибридизации на полноразмерном микрочипе и удаления из набора зондов тех, которые дают постоянный и значительный уровень флуоресценции независимо от определяемого субтипа вируса гриппа.

• Другой возможный вариант внесения ошибки в результат анализа – проблемы качества печати. Если в случае полноразмерного микрочипа ошибка в печати одного или двух спотов из 19–24 используемых зондов не будет существенно сказываться на конечных выводах о субтипе анализируемого изолята гриппа, то при использовании одного спота, содержащего весь набор зондов, ошибка может оказаться фатальной. Поэтому микрочип должен содержать повторные споты, что позволит исключить такую возможность.

В целом же такого рода вариант микрочипа выглядит весьма привлекательным, и его преимущества перевешивают его возможные и вполне устранимые недостатки. В настоящей работе представлены результаты применения этого варианта для анализа ряда изолятов вируса гриппа А.

На первом этапе работы нами были проанализированы результаты предыдущих экспериментов по использованию полноразмерного микрочипа. В результате было показано, что для ряда спотов нейраминидазы наблюдается высокий уровень флуоресценции, который слабо зависит от субтипа анализируемого образца. При анализе последовательностей зондов выяснилось, что причина интенсивной флуоресценции этих спотов свя-

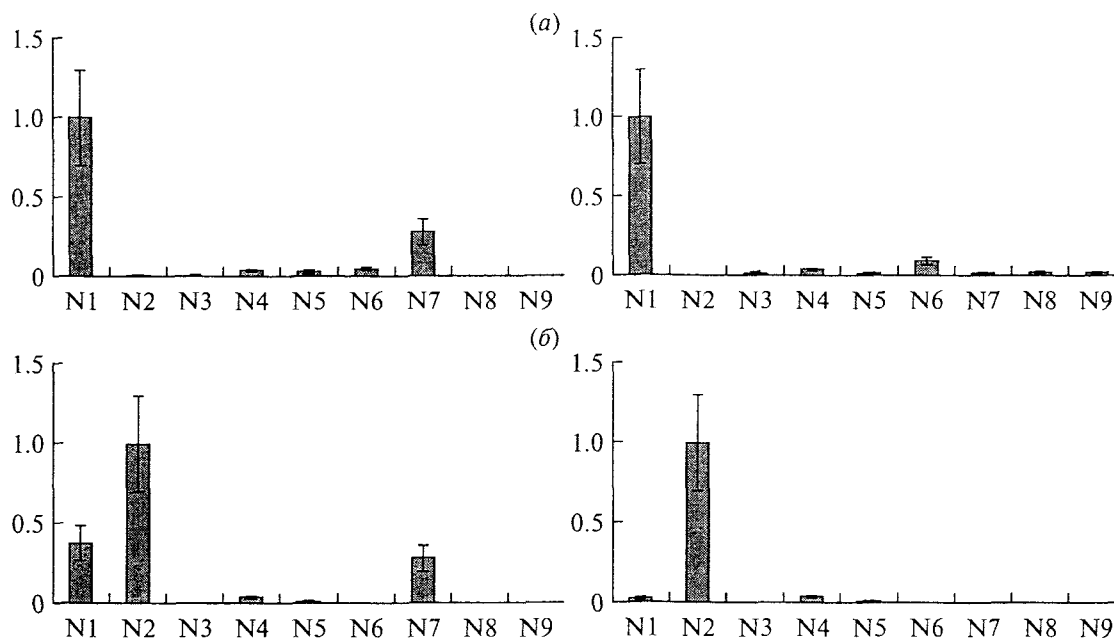


Рис. 1. Гистограммы, полученные при типировании нейраминидазы изолятов гриппа H1N1 (A/TEXAS/36/91 X-113) (а) и H2N2 (A/Chicken/Novosibirsk region/326/05) (б). Приведена средняя флуоресценция спотов. Гистограммы слева отвечают анализу полного набора спотов, справа – рассчитанные с исключением трех спотов для субтипа N1 и двух спотов – для субтипа N7.

зана со способом получения ампликонов, используемых для гибридизации. Для повышения эффективности наработки ампликона ген нейраминидазы был разбит на две части, и при этом интенсивные сигналы флуоресценции наблюдались для зондов, частично перекрывающихся с внутренними вырожденными праймерами.

Наибольшая интенсивность наблюдалась для двух зондов, использованных для типирования нейраминидазы N7, и трех зондов, характерных для нейраминидазы N1. При сравнительном анализе структуры зондов перекрывание также выявлялось для одного из зондов, характерного для нейраминидазы N4, и одного – для N5. Хотя в этом случае ложноположительные сигналы незначительны, тем не менее эти зонды были также исключены. В целом, из полных наборов для типирования нейраминидазы, приведенных в работах [13, 15], были исключены зонды следующей структуры (5'–3'; нумерация зондов соответствует таковой, приведенной в работе [15]):

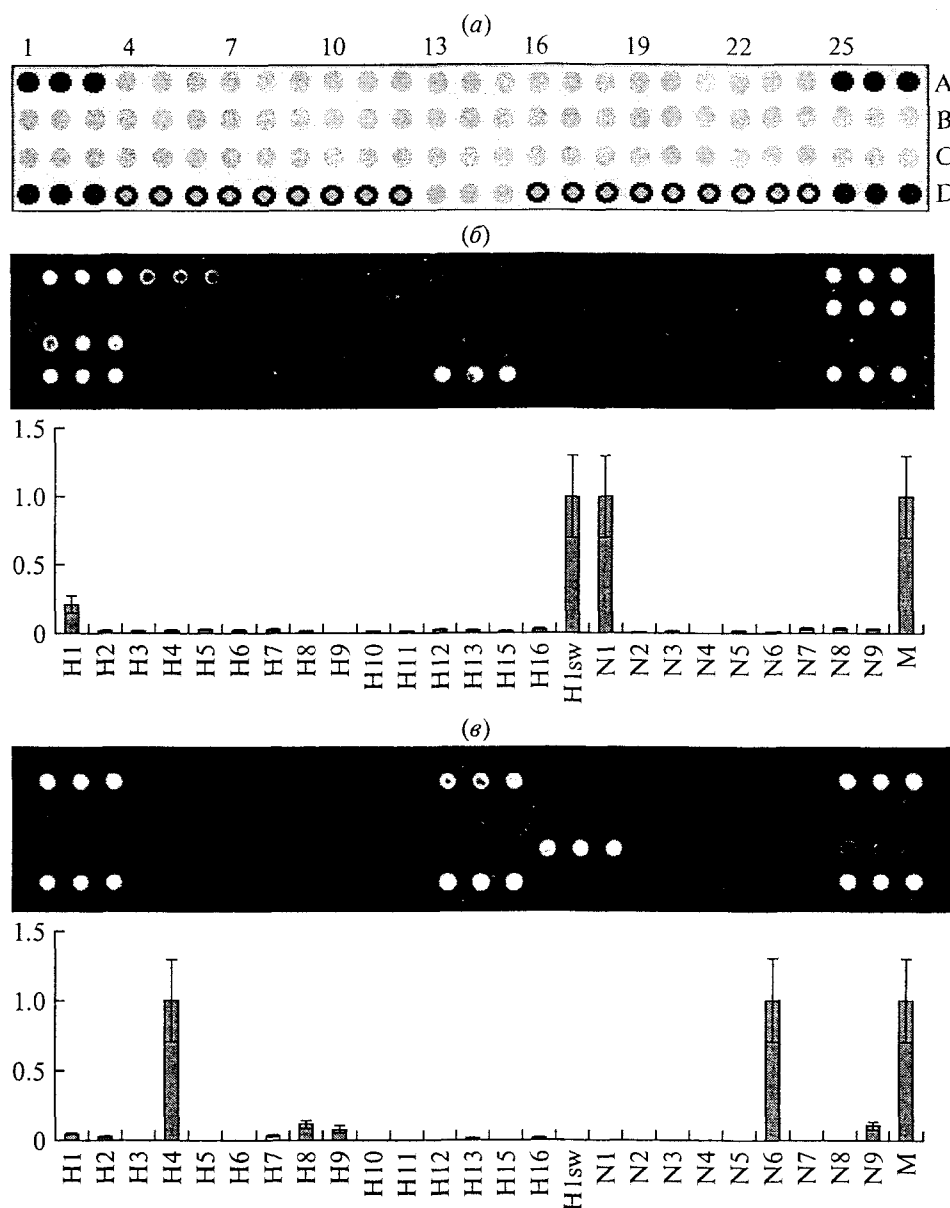
N7 #5 GAATGCTCCTGTTACGGACAC  
 N7 #15 GAATGCTCCTGTTATGGACAC  
 N1 #5 GCAAGTGCTTGTTCATGATGGC  
 N1 #11 AAATACGGCAATGGTGTTTGG  
 N1 #15 ATAGGGTACATATGCAGTGGG  
 N4 #7 TGTTCCCTGTTACCCAAGTGGG  
 N5 #14 TTTCAGGGAGGTCACATTGAA

В результате число зондов, приведенных в работах [13, 15] для определения субтипа нейрамини-

дазы N1, уменьшилось с 22 до 19, N4 – с 19 до 18, N5 – с 20 до 19, N7 – с 19 до 17. Вместе с тем, исключение этих зондов из расчета не сказывается на результатах анализа изолятов с нейраминидазой N1 или N7, что видно на примере изолята вируса сезонного гриппа H1N1 (рис. 1а). Слева приведена гистограмма, рассчитанная с использованием всех спотов, справа – с исключением 3-х спотов для субтипа N1 и 2-х – для субтипа N7. При анализе субтипов, отличных от N1 или N7, исключение при построении гистограммы указанных выше спотов повышало достоверность типирования, что показано на примере изолята H2N2 на рис. 1б.

Аналогичным образом было проведено тестирование зондов, типизирующих гемагглютинин. Ложноположительно флуоресцирующих спотов в этом случае не обнаружено. Но анализ показал, что один из зондов, используемый для типирования гемагглютинина H16 (5'-GAAAGAGGATTGTTTGGTGCA-3', #17 в работе [15]), перекрывается 6-ю основаниями с внутренним праймером. Этот зонд также был исключен из используемого набора.

При подготовке растворов смеси олигонуклеотидных зондов для печати они смешивались в эквимольных количествах так, чтобы суммарная концентрация составляла 70 нмоль/мл. Микрочип представлял собой набор спотов, в который, кроме типизирующих зондов на нейраминидазу, гемагглютинин и матриксный белок (в трех повторах), были включены маркерные споты, содержа-



**Рис.2.** Дизайн микрочипа размером  $27 \times 4$  спота (а), и гибридационные картины и гистограммы, полученные при определении субтипа изолятов гриппа Pandemic flu H1N1 (A/Ekaterinburg /01/2009) (б) и H4N6 (A/Domestic Duck/Novosibirsk region/41/05) (в). Приведена средняя флуоресценция спотов. М – ген матричного белка гриппа А.

а: (A1–A3; A25–A27; D1–D3; D25–D27) – маркер; (D4–D12; D16–D24) – буфер; (A4–A6) – H1; (A7–A9) – H2; (A10–A12) – H3; (A13–A15) – H4; (A16–A18) – H5; (A19–A21) – H6; (A22–A24) – H7; (B1–B3) – H8; (B4–B6) – H9; (B7–B9) – H10; (B10–B12) – H11; (B13–B15) – H12; (B16–B18) – H13; (B19–B21) – H15; (B22–B24) H16; (B25–B27) – H1sw; (C1–C3) – N1; (C4–C6) – N2; (C7–C9) – N3; (C10–C12) – N4; (C13–C15) – N5; (C16–C18) – N6; (C19–C21) – N7; (C22–C24) – N8; (C25–C27) – N9; (D13–D15) – М.

шие октатимидилат с красителем Tamra (12 повторов), и споты с печатью гибридационного буфера для оценки фоновой флуоресценции (отрицательный контроль, 18 повторов). Общее число спотов составило 108. Дизайн микрочипа размером  $27 \times 4$  приведен на рис. 2а.

На рис. 2б и 2в в качестве примера приведены гибридационные картины, полученные при анализе изолятов гриппа А субтипов H1N1 (пандемического 2009) и H4N6, соответственно. Во

всех случаях интенсивность флуоресценции спотов матричного белка была достаточно высока (более чем в 10 раз превышала флуоресценцию спотов отрицательного контроля), что позволяет отнести анализируемые образцы к вирусу гриппа А.

Как видно из рис. 2, отнесение изолята к определенному субтипу можно проводить визуально. В случае пандемического H1N1 гриппа 2009 также наблюдается незначительная флуоресценция спотов гемагглютинина, соответствующих сезон-

ному гриппу H1N1, что является результатом высокой гомологии нуклеотидных последовательностей сезонного и свиного гриппа. Тем не менее, отличия в уровнях флуоресценции достаточно велики, и с учетом возможной ошибки отнесение изолята к свиному гриппу H1N1 является неоднозначным. Таким образом, представленный универсальный микрочип с минимальным количеством спотов способен давать такую же информацию, что и полноразмерный микрочип.

Вторая задача, поставленная в данной работе, — нахождение альтернативного и более простого варианта для анализа картины гибридизации. Для этого нами был рассмотрен подход, при котором для мечения в процессе амплификации используется биотин [17]. После проведения гибридизации слайд обрабатывается раствором конъюгата стрептавидина с коллоидным золотом, в результате чего в качестве метки в структуру ДНК вводится золото. При дальнейшей обработке слайда солями серебра в восстановительных условиях происходит выпадение серебра в районе локализации ДНК, несущей золото. Образующаяся бляшка (серебряное зеркало) может регистрироваться как визуально, так и с использованием обычного планшетного сканера. Этот вариант является альтернативой визуализации картины гибридизации с использованием флуоресцентной метки. Для введения биотиновой метки в структуру ДНК в процессе амплификации можно использовать два метода: вносить праймеры, несущие на 5'-конце остаток биотина, или применять биотинилированный уридинтрифосфат. В первом случае эффективность амплификации выше за счет использования немодифицированных трифосфатов, во втором случае наработка ампликона несколько затруднена, но при этом увеличивается количество молекул биотина, включенных в структуру ДНК.

Нами было проведено сравнение картин гибридизации флуоресцентно меченых и биотинилированных ампликонов. При амплификации в одинаковых условиях использовалось эквимольное количество праймеров, содержащих на 5'-конце либо флуоресцентную метку TAMRA, либо биотин. Таким образом, предполагалось, что количество ампликонов, несущих каждую из меток, одинаково. Для гибридизации на микрочипе использовали равные объемы каждого из ампликонов. Слайд или сканировали на флуоресцентном сканере, или проявляли изображение, используя систему стрептавидин-коллоидное золото — соли серебра, и сканировали с помощью планшетного сканера, соответственно. При использовании неочищенного ампликона, меченого TAMRA, уровень фоновой флуоресценции был довольно высок, что затрудняло количественную оценку результатов (данные не приводятся). В то же время, использование неочищенного ампликона с био-

тином позволяло получить качественные картины гибридизации (рис. 3). Можно сделать вывод, что использование в качестве метки биотина упрощает как процедуру подготовки образца, так и сканирование, и является хорошей альтернативой флуоресцентному мечению.

Таким образом, предложен микрочип второго поколения для типирования вируса гриппа А, по достоверности результатов аналогичный полноразмерному микрочипу, а также методика визуализации картины гибридизации с использованием нефлуоресцентной метки и стандартного планшетного сканера.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотидные зонды и праймеры были синтезированы на синтезаторе ASM-800 (ООО “Биоссет”, Новосибирск) по стандартной методике. Печать микрочипов осуществляли на стеклянных фенилдиизотиоцианатных слайдах методом контактной печати на споттере Odissey Calligrapher (“BioRad”) пином 360 мкм. На каждом слайде располагалось 4 эквивалентных микромассива зондов, пригодных для одновременной гибридизации четырех образцов. Микромассив состоял из 4 строк, и помимо типизирующих зондов содержал также маркерные олигонуклеотиды (dT)<sub>8</sub>–TAMRA и (dT)<sub>8</sub>–BIOTIN (рис. 2а). Печать микрочипа, гибридизацию ДНК и анализ изображения проводили аналогично описанному ранее [15].

Выделение геномной РНК, проведение обратной транскрипции и набор праймеров для амплификации описаны в работе [15]. Для получения преимущественно одноцепочечной ДНК проводили ПЦР в асимметричном режиме в двух вариантах.

Вариант 1: состав реакционной смеси (50 мкл): буфер для ПЦР “Qiagen” (1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Трис-НСl, рН 8.7), MgCl<sub>2</sub> – 1.5 мМ, 200 нМ dATP, dCTP, dGTP, 70 нМ dTTP, 100 нМ dUTP-Cy5, 80 нМ прямого праймера, 800 нМ обратного праймера, 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°C–55°C – 30 с, 72°C – 1 мин. 10 с.

Вариант 2: состав реакционной смеси (50 мкл): буфер для ПЦР “Qiagen” (1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Трис-НСl, рН 8.7), MgCl<sub>2</sub> – 1.5 мМ, 200 нМ dNTP, 80 нМ прямого праймера, 800 нМ обратного праймера, несущего на 5'-конце биотин или TAMRA, 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

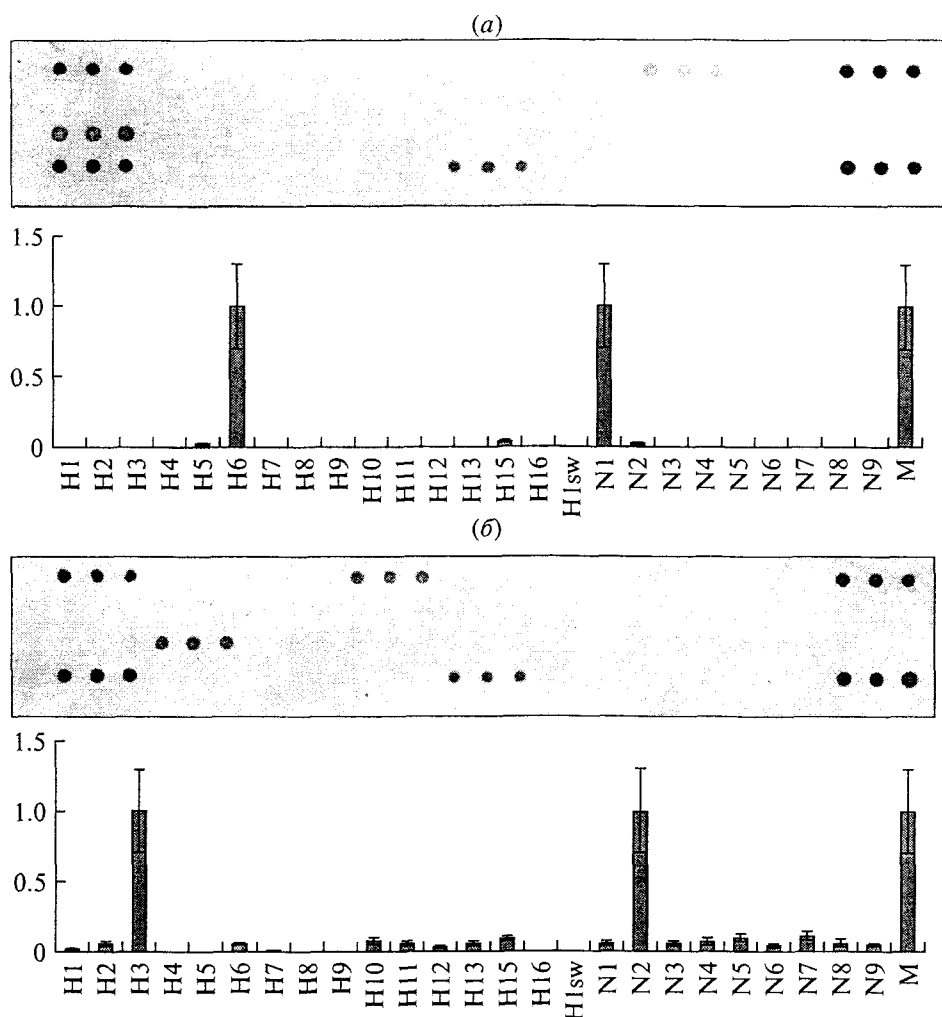


Рис. 3. Гибридационные картины и гистограммы, полученные с использованием ампликонов, меченных биотином, при определении субтипа изолятов гриппа A/mallard/Irkutsk/165/08 (H6N1) (a) и A/Aichi/2/68 (H3N2) (б). Приведено среднее значение сигнала для каждого субтипа. М – ген матричного белка гриппа А.

35 циклов  $94^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$ ,  $52^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$ ,  $72^{\circ}\text{C} - 1\text{ мин } 10\text{ с}$ .

Контроль наработки ампликона осуществляли электрофорезом в 1% агарозном геле с окрашиванием этидий бромидом. Флуоресцентно-меченные ампликоны очищали от избытка меченых трифосфатов на гель-фильтрующих колонках с носителем Sephadex G-50, высушивали досуха на вакуумной центрифуге при  $60^{\circ}$  и использовали для гибридизации. В варианте ПЦР с использованием меченых праймеров очистку ампликонов не проводили.

Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл  $2\times$  гибридационного буфера ( $1\times$  гибридационный буфер:  $6\times$  SSC,  $5\times$  раствор Денхардта, 0.1% Tween 20) и прогревали перед нанесением на слайд 2 мин при  $97^{\circ}\text{C}$ , охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в гибридационной камере фирмы AggrayIt, Sunnyvale при температуре  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов. За-

тем слайд последовательно отмывали в растворах  $2\times$  SSC + 0.1% SDS,  $1\times$  SSC и центрифугировали.

В варианте с использованием флуоресцентной метки слайд сразу после отмывки сканировали на сканере Scan Array Express 2.0 ("Perkin Elmer") при длинах волны возбуждающего лазера 543 нм или 633 нм. Изображение анализировали с использованием программы ScanArray Express, входящей в математическое обеспечение сканера.

В варианте с использованием метки с биотином перед сканированием проводили следующие дополнительные процедуры:

На каждый микромассив наносили раствор, содержащий Gold Labeled Streptavidin и Gold Streptavidin Dilute Buffer (Gold Labeled Streptavidin System, KPL, США) в соотношении 1 : 5. Слайд накрывали покровным стеклом, оставляли на 30 мин при комнатной температуре, затем отмывали последовательно  $2\times$ SSC + 0.1% SDS;  $1\times$  SSC + 0.1% SDS и центрифугировали. На каж-

дый микромассив наносили проявляющий раствор (Sigma, США), накрывали покровным стеклом и оставляли на 15 мин при комнатной температуре до проявления. Покровное стекло убрали, слайд промывали дистиллированной водой и центрифугировали. Детекцию проводили либо визуально, сравнивая экспериментальный результат с теоретически ожидаемой картиной, либо сканировали на планшетном сканере Epson Perfection V500 Photo.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Potter C.W., Jennings R.* // *J. Infect.* 2011. V. 63. P. 252–259.
2. *Chin J., Koh G., Lee D.-Y.* // *J. R. Soc. Interface.* 2010: V. 7. P. 1033–1047.
3. *Vijaykrishna D., Smith G.J.D.* // *Nature* V. 473. P. 519–522.
4. *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.
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. *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.
8. *Li J., Chen S., Evans D.H.* // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 696–704.
9. *Gall A., Hoffmann B., Harder T., Grund C., Hoper D., Beer M.* // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47. P. 327–334.
10. *Sengupta S., Onodera K., Lai A., Melcher U.* // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 4542–4550.
11. *Zhang F., Zou M., Li J., Xue Q.* // *Viral Immunol.* 2011. V. 24 P. 403–407.
12. *Li J., Chen S., Evans D.H.* // *Clin. Microbiol.* 2001. V. 39 P. 696–704.
13. *Ryabinin V.A., Kostina E.V., Neverov A.A., Maksakova G.A., Sinyakov A.N.* // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry.* 2010. V. 36. P. 634–644. (*Рябинин В.А., Костина Е.В., Неверов А.А., Максакова Г.А., Сняков А.Н.* // *Биоорган. химия.* 2010. Т. 36. С. 688–699).
14. *Ryabinin V.A., Kostina E.V., Maksakova G.A., Sinyakov A.N.* // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry.* 2010. V. 36. P. 779–782. (*Рябинин В.А., Костина Е.В., Максакова Г.А., Сняков А.Н.* // *Биоорган. химия.* 2010. Т. 36. С. 849–852).
15. *Ryabinin V.A., Kostina E.V., Maksakova G.A., Neverov A.A., Chumakov K.M., Sinyakov A.N.* // 2011. *PLoS ONE* 6(4): e17529. doi:10.1371/journal.pone.0017529.
16. *Kostina E.V., Ryabinin V.A., Agafonov A.P., Ternovoi V.A., Sinyakov A.N.* // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry.* 2011. V. 37. P. 644–646. (*Костина Е.В., Рябинин В.А., Агафонов А.П., Терновой В.А., Сняков А.Н.* // *Биоорган. химия.* 2011. Т. 37. С. 715–717).
17. *Alexandre I., Hamels S., Dufour S., Collet J., Zammattéo N., De Loungueville F., Gala J.-L., Remacle J.* // *Colorimetric silver detection of DNA microarrays.* // *Analytical biochemistry.* 2001. V. 295. P. 1–8.

## The Second Generation Universal Oligonucleotide Microarray for Subtyping of Influenza Virus A

E. V. Kostina<sup>#</sup>, V. A. Ryabinin, G. A. Maksakova, A. N. Sinyakov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentieva, 8, Novosibirsk, Russia, 630090*

<sup>#</sup>Phone: +7 (383) 363-51-72; e-mail: kostinaelena@mail.ru

The microchip for influenza A subtyping was developed, functioning on a principle “one spot – one subtype”. Each spot contains the set of oligonucleotide probes, specific for a particular subtype of hemagglutinin, neuraminidase or matrix gene. Reliability of the proposed chip version is the same as for earlier created in our group full-size microchip for separate hemagglutinin and neuraminidase subtyping. To visualize the image, analyzed DNA can be labeled by either fluorescent dye or biotin with the further fixation in system streptavidin-gold nanoparticles and image development by silver precipitation. In the second case common version of scanner can be used for the image analysis, that essentially simplifies procedure of influenza A subtyping.

*Keywords: influenza virus A; microarray, typing; diagnostics.*