

УДК 578.578.82/83

**ПРОТОТИП ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ПАТОГЕНОВ I ГРУППЫ, ОТНОСЯЩИХСЯ К СЕМЕЙСТВАМ ARENA- И  
FILOVIRIDAE**

©2014 г. И. В. Жирнов\*, В. А. Рябинин\*, А. Н. Синяков\*<sup>#</sup>, В. А. Терновой\*\*,  
А. Н. Шиков\*\*

*\*Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8*

*\*\*ФГУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Новосибирская обл., Кольцово*

Поступила в редакцию 19.02.2014 г. Принята к печати 05.03.2014 г.

Предложен прототип олигонуклеотидного микрочипа для определения вирусов Lassa, Junin, Machupo, Guanarito (семейство Arenaviridae) и вирусов Ebola и Marburg (семейство Filoviridae). Для расчёта гибридизационных зондов и праймеров был использован оригинальный подход, основанный на анализе аминокислотных последовательностей вирусных белков (нуклеокапсидного белка для вирусов Junin, Guanarito, Machupo и РНК-зависимой РНК-полимеразы для вирусов Lassa, Ebola и Marburg) с последующим перекодированием выявленных уникальных пептидов в соответствующие им наборы олигонуклеотидов.

*Ключевые слова: аренавирусы, филовирусы, микрочипы, малобороздочный лиганд, диагностика.*

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения к патогенам I группы относят инфекционные агенты, ассоциированные с тяжёлыми и часто летальными заболеваниями у человека, для которых в большинстве случаев не существует эффективных лечебных и профилактических мер [1]. В данную группу, в частности, включены вызывающие геморрагические лихорадки вирусы Lassa (LASV), Junin (JUNV), Machupo (MACV), Guanarito (GTOV) и вирусы Ebola (EBOV) и Marburg (MARV). Быстрая

---

<sup>#</sup>Автор для связи (тел.: (3832) 330-46-53, факс: (3832) 333-36-77; эл. почта: [sinyakov@niboch.nsc.ru](mailto:sinyakov@niboch.nsc.ru)).

лабораторная диагностика в тех случаях, когда может возникнуть предположение об инфекциях, ассоциированных с указанными патогенами, очень важна в развёртывании системы противоэпидемических мероприятий. Вследствие этого актуальной задачей представляется разработка диагностических тест-систем, посредством которых возможно быстрое и точное выявление соответствующих инфекционных агентов.

Патогены I группы часто диагностируются серологически [2]. При использовании для диагностики быстро появляющихся в крови больных IgM тестирование осложняется кроссгибридизацией между различными видами аренавирусов. Значительно более селективны нейтрализующие антитела, однако такие антитела появляются слишком поздно для ранней диагностики. Например, в крови больных, зараженные вирусом Ласса, нейтрализующие антитела не образуются на протяжении нескольких недель. В то же время смерть при заражении патогенами I группы часто наступает на 7–10 день после инфицирования.

Тесты, основанные на использовании цепной полимеразной реакции (ПЦР), можно использовать значительно раньше появления нейтрализующих антител в организме больного.

Такие тесты были разработаны в ряде работ [3, 4]. Этот метод также имеет существенные недостатки. Из-за высокой вариабельности вирусов практически для каждого штамма определяемого вируса требуется использовать свой собственный диагностический тест, содержащий праймеры для проведения амплификации и флуоресцентный зонд для выявления ампликона. Например, для выявления вирусов Lassa, Junin, Machupo, Guanarito, Ebola и Marburg в работе [4] используется 41 вид диагностических наборов. Т.е. для определения конкретного вида вируса при лабораторном тестировании необходимо провести 41 анализ, что очень затратно требует значительного времени исследованием.

Перспективным и достаточно интенсивно развивающимся в последние годы направлением диагностики является создание аналитических микрочипов. За короткое время это направление нашло приложение в различных областях: от исследований фундаментальных проблем молекулярной биологии и молекулярной эволюции до практического применения в медицине, фармакологии, экологии и судебно-медицинской экспертизе [5, 6].

Возможность параллельного анализа одного образца на множестве дискриминирующих зондов микрочипа представляется особенно важной для диагностики инфекций, ассоциированных с патогенами I группы, поскольку данный подход позволяет значительно снизить время анализа.

К настоящему времени разработан метод выявления вируса Lassa [7], использующий ПЦР с последующей гибридацией полученных ампликонов на микрочипе. Микрочип содержит 47 зондов длиной от 24 до 34 нуклеотидных звеньев, типизирующих все известные штаммы вируса Lassa. Такой способ позволяет одновременно определять все штаммы вируса Lassa, что значительно экономит время анализа. Недостатком этого метода является то, что он позволяет определить только вирус Lassa и не определяет другие вирусы, относящиеся к патогенам I группы.

Арена- и филовирусы могут быть также обнаружены с помощью GreeneChipVr [8]. Микрочипы этого типа содержат 60-членные олигонуклеотиды в качестве типизирующих зондов. Обычно для типирования выбирались три мишени в геноме вируса, включая нуклеотидные последовательности структурных белков. Подготовка образца и его анализ является довольно трудоемким и длительным процессом, включающим выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции с рассеянной затравкой, содержащей праймер для последующей амплификации кДНК, два раунда ПЦР – один для амплификации полученной кДНК, второй для введения специфической последовательности, необходимой для комплиментарного взаимодействия с дендримерами, содержащими флуоресцентные метки. Для анализа результатов гибридизации используется специальная программа. В целом диагностика с помощью GreeneChipVr, довольно дорога. К тому же использование в качестве гибридизационных зондов 60-членных олигомеров с неизбежностью приводит к потере специфичности зондов [9, 10].

Для преодоления проблем, связанных со специфичностью определения вирусных патогенов, фирмой «Аффиметрикс» (США) и Институтом Пастера (Франция) был создан универсальный ресеквенирующий микрочип PathogenID v2.0 [11]. Этот микрочип используется для выявления ряда высоко патогенных вирусов, в том числе принадлежащих к патогенам I группы. При этом достоверность определения вирусов с помощью этого микрочипа колеблется от очень хорошей (>97%, Lassa virus Guinea) до низкой (28.7%, Lassa virus Ivory Coast). Авторы отмечают, что с помощью данного микрочипа невозможно определить некоторые высоко дивергентные варианты вирусов [11].

В целом, несмотря на ряд очевидных достоинств микрочипов GreeneChipVr и PathogenID, эти универсальные микрочипы дороги в эксплуатации и не всегда обладают необходимой селективностью и достоверностью при определении патогенов I группы.

Целью настоящей работы являлось создание прототипа узкоспециализированного гибридизационного микрочипа, способного выявлять только патогены I группы.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Эффективность микрочиповой диагностики, основанной на гибридизации анализируемой ДНК с дискриминирующими олигонуклеотидными зондами, зависит от правильного выбора последних. Задача поиска зондов решается достаточно просто для сильно различающихся по первичной структуре геномных последовательностей, например, при нахождении родоспецифичных зондов, и в большинстве случаев не представляет каких-либо проблем [12]. Однако задача поиска дискриминирующих зондов существенно осложняется при анализе близких по структуре нуклеотидных последовательностей, что, в частности, имеет место в случае одинаковых генов внутри семейства (Arena- или Filoviridae). Помимо этого, в отношении подбора зондов для дискриминации указанных патогенов имеют место дополнительные сложности, связанные с высокой вариабельностью геномов в пределах одного вида.

В Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН был разработан новый подход для расчёта гибридизационных олигонуклеотидных зондов в случае высоковариабельных вирусных геномов, основанный на анализе последовательностей вирусных белков. Данный метод был успешно использован для типирования вируса гриппа А [13]. Этот же подход было решено использовать в настоящей работе при расчёте гибридизационных зондов в целях создания олигонуклеотидного микрочипа для выявления целевых инфекционных агентов. Фактически этот подход основан на поиске антигенных детерминант анализируемых вирусных белков.

Работа по расчёту зондов включала в себя следующие этапы:

- Сбор данных по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям для JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV.
- Отбор пептидных фрагментов вирусного белка, выбранного для анализа, являющихся общими для всех штаммов и изолятов данного патогена.
- Удаление из полученного набора пептидов тех, что присутствуют в аминокислотных последовательностях других целевых вирусов.
- Расчёт олигонуклеотидных зондов исходя из структуры отобранных пептидов.
- Отбор оптимальной по размеру выборки олигонуклеотидных зондов, позволяющей с наибольшей вероятностью определять данный вирус.
- Удаление из полученного набора олигонуклеотидных зондов тех, введение в которые одной или двух точечных замен приводит к зондам на другие целевые вирусы.
- Отбор олигонуклеотидных зондов с оптимальной (входящей в определённый интервал) температурой плавления дуплекса, образуемого зондом и анализируемой ДНК.

В работе были использованы данные GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и Protein Sequence Database For Pathogenic Arenaviruses (<http://epitope.liai.org:8080/projects/arena>) [14]

по нуклеокапсидному белку и РНК-зависимой РНК-полимеразе (для JUNV, MACV, GTOV и LASV соответственно) и данные GenBank по РНК-зависимой РНК-полимеразе для EBOV и MARV. Выбор анализируемого белка во всех случаях определялся фактором наибольшей представительности соответствующих аминокислотных последовательностей в используемых базах данных.

В полученных из баз данных выборках аминокислотных последовательностей для всех штаммов и изолятов каждого из целевых вирусов выявляли идентичные участки длиной в 7 а.о. (согласно данным работы [12], выбор более длинных пептидов снижает количество зондов, общих для определяемого вируса, а выбор более коротких приводит к менее специфичным зондам). Поскольку нахождение общих пептидов для абсолютно всех штаммов и изолятов каждого из целевых вирусов оказалось невозможным (как в силу вариабельности аминокислотных последовательностей, так и из-за наличия в базах данных частично секвенированных последовательностей), то отбирались пептиды, присутствующие в не менее чем 90% анализируемых аминокислотных последовательностей для каждого из патогенов.

На следующем этапе производили селекцию пептидных наборов, полученных для JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV. При этом из соответствующего набора для каждого вируса удаляли пептиды, присутствующие в анализируемых аминокислотных последовательностях других целевых патогенов. Полученные шесть наборов 7-членных пептидов, специфических для JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV, переводили в набор 21-членных олигонуклеотидов, кодирующих эти пептиды. Из полученных наборов нуклеотидных последовательностей с использованием описанной в работе [12] схемы селекции зондов получали наборы олигонуклеотидов, обеспечивающих дискриминацию целевых вирусов.

Для уменьшения числа возможных ложноположительных результатов полученный набор олигонуклеотидных зондов для каждого из патогенов тестировали на наличие в нём структур, введение в которые одной или двух точечных замен приводят к зондам, характерным для других целевых вирусов (подобные структуры в дальнейшем исключались из набора).

Частичное выравнивание температур плавления дуплексов, образуемых анализируемой ДНК и отобранными олигонуклеотидными зондами, достигалось изменением протяжённости (укорачивании или удлинении) последних. Используемый в настоящей работе температурный интервал, был выбран равным 2 градусам (от 60 до 62°C). Модифицированные подобным образом зонды для каждого из патогенов также подвергали проверке на их наличие в последовательностях кДНК других целевых вирусов.

В соответствии с изложенными выше принципами были отобраны шесть наборов олигонуклеотидных зондов для определения JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV (табл. 1). Количество зондов для определения конкретного целевого вируса варьировалось от 7 до 25. В общей сложности было отобрано 94 зонда.

Таблица 1

Создание микрочиповой диагностической тест-системы для дискриминации целевых вирусов имеет смысл только при возможности проведения на известном этапе анализа мультиплексной ПЦР. Критическим моментом в данной ситуации является число используемых праймеров. В случае большого количества праймеров резко увеличивается вероятность нежелательных взаимодействий между ними, что, в свою очередь, крайне снижает эффективность мультиплексной ПЦР. Универсальные праймеры для амплификации целевых фрагментов генома арена и филовирюсов содержат значительное количество точек вырождения, что приводит к большой гетерогенности этих праймеров. Число индивидуальных олигонуклеотидов, входящих в состав универсальных праймеров, может превышать 1500 единиц. Общее число олигонуклеотидов, вводимых в реакцию амплификации заданного участка ДНК, можно значительно снизить, уменьшая их длину и, соответственно, число точек вырождения в них. Однако использование данного подхода приводит к уменьшению температуры плавления гетеродуплексов, образованных праймерами и матрицей, что, в свою очередь, также негативно сказывается на эффективности ПЦР.

Одним из способов стабилизации ДНК-дуплексов является комплексообразование их со сиквенспецифичными малобороздочными лигандами [15]. Нами были впервые получены конъюгаты олигонуклеотидов с А-Т-специфичными малобороздочными лигандами [16], получившими широкое распространение при проведении ПЦР. Для повышения температуры плавления ДНК-дуплексов, образованных мишенью и амплификационными праймерами в данном случае было решено использовать двухцепочечные олигопиррольные лиганды, с антипараллельной ориентацией олигокарбоксамидных цепей [17], поскольку такие лиганды обеспечивают наибольшую термостабильность дуплексов.

Указанный подход позволил существенно сократить (за счёт значительного увеличения термостабильности гибридных ДНК-дуплексов) длину используемых в качестве праймеров олигонуклеотидов и, как следствие, общее их число.

Для синтеза конъюгатов были использованы укороченные олигодезоксирибонуклеотиды (длиной от 15 до 22 нт.), содержащие на 5'-конце квартет из трех (А или Т) и одного (G или С) оснований. К 5'-концу этих олигонуклеотидов ковалентно присоединяли малобороздочный лиганд  $H-\gamma-Py-Py-Py-\gamma-Py-Py-Py-\beta-Dp$ , синтезированный по ранее предложенной методике [18].

Формула

Формула

Структура полученных конъюгатов приведена в (табл. 2). Полученные конъюгаты были разделены на две группы: соответствующие прямым (33 структуры) и обратным (32 структуры) праймерам. Производные олигодезоксирибонуклеотидов, входящие в одну группу, объединяли в эквимольных количествах и использовали в ПЦР. В ПЦР использовали одновременно все синтезированные праймеры для амплификации патогенов I группы. Амплификацию (с одновременным введением флуоресцентной метки Cy5) проводили в асимметричном режиме для получения преимущественно одноцепочечных продуктов для последующей гибридизации на микрочипе.

Таблица 2

Конфигурация использованного в настоящей работе микрочипа, содержащего зонды для JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV, приведена на рис. 1.

рис. 1.

Олигонуклеотидные зонды содержали на 3'-конце аминогексильный линкер, с помощью которого их иммобилизовали на поверхности стеклянного слайда, модифицированного фенилдиизотиоцианатом [19]. В качестве контроля печати слайдов был выбран маркерный олигодезоксирибонуклеотид (dT)<sub>8</sub>, несущий флуоресцентную метку Cy5 на 5'-конце и аминогексильную группу в качестве линкера на 3'-конце.

Разработанный прототип микрочипа был тестирован на образцах, представляющих собой ампликоны фрагмента гена нуклеокапсидного белка вирусов JUNV (штамм XJ#44), GTOV (штамм VHF-1750), MACV (штамм Carvallo) и ампликоны фрагмента гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов LASV (штамм CSF), MARV (штамм Popp) и ZEBOV (*Zaire ebolavirus*, штамм Mayinga).

Для оценки результатов микрочипового определения в настоящей работе была использована величина средней флуоресценции спотов ( $Y$ ), равная отношению суммы интенсивностей флуоресценции спотов, отвечающих зондам для данного вируса, к числу этих спотов [12]:

$$Y = \left( \sum_i^N I_i \right) / N,$$

где  $I_i$  – интенсивность флуоресценции  $i$ -го спота для данного вируса,  $N$  – число спотов, отвечающих зондам для данного вируса.

рис. 2.

На рис. 2 представлены примеры полученных картин гибридизации, а также соответствующие гистограммы распределения средней флуоресценции спотов. Из приведённых примеров видно, что с использованием разработанного прототипа микрочипа возможна однозначная дискриминация целевых вирусов. Наблюдаемая в некоторых случаях кросс-гибридизация с неспецифическими зондами не снижает достоверность интерпретации данных по причине значительной (на порядок) разницы между значениями величин средней флуоресценции спотов. Ранее было установлено [19], что ДНК человека, ДНК обезьян и

кДНК вируса кори не дают неспецифических реакций при проведении ПЦР с амплификационными праймерами для филовирусов.

Нами было дополнительно проверено влияние суммарной ДНК человека на специфичность выявления целевых вирусов. С этой целью 0.5–5.0 мкг суммарной ДНК человека вводили в ПЦР в присутствии праймеров для амплификации целевых вирусов. Полученную реакционную смесь, содержащую флуоресцентную метку, гибридизовали с типизирующими зондами микрочипа. При этом не было выявлено неспецифической гибридизации. Аналогичным образом не было выявлено неспецифической гибридизации с типизирующими зондами микрочипа реакционной смеси, полученной при амплификации 0.5 – 5.0 мкг кДНК вируса кори.

Мы оценили аналитическую чувствительность микрочиповой идентификации вируса Эбола, которую определяли с использованием десятикратных разведений положительных контрольных образцов, полученных из культуральной вирусосодержащей жидкости с известным ЦПД-титром вируса. Предел чувствительности микрочипового определения анализируемых образцов составлял  $2 \cdot 10^4$  ген-эквивалентов в анализируемом образце.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о применимости разработанного ранее метода выбора типизирующих зондов на основании анализа белковых последовательностей [13] для создания прототипа олигонуклеотидного микрочипа для диагностики фило- и ареновирусов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали плазмидные ДНК pCR2.1 (Invitrogen, США), и pUC18 (Медиген, Россия), ДНК человека (Медиген, Россия). Для молекулярной трансформации применяли клетки *E. coli* линии TOP 10 (Invitrogen, США). В качестве контроля использовали кДНК вируса кори (изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2) Изолят вируса кори был получен из носоглоточного смыва больного. В экспериментах также использовали 2,2'-дипиридилдисульфид (Aldrich), трифенилфосфина (Fluka), dUTP-Cy5 (Биосан, Россия), Taq-полимеразу (СибЭнзим, Россия).

Олигонуклеотидные зонды и праймеры были синтезированы на синтезаторе ASM-800 (ООО “Биоссет”, Новосибирск) по стандартной методике. Печать микрочипов осуществляли на стеклянных фенилизотиоцианатных слайдах [20] методом контактной печати на споттере "BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer" (BioRad, США). На каждом слайде располагалось 3 эквивалентных микромассива зондов, пригодных для одновременной гибридизации 3 образцов. Формат субэрея (микромассива зондов) составил  $12 \times 11$  спотов (рис. 1) при диаметре каждого спота, равном 360 мкм.



Положительные контрольные образцы для детекции вирусов Марбург и Эбола были получены методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидами pCR 2.1, включающими вставки ДНК-фрагментов, соответствующих участку гена L вирусов Марбург и Эбола [19], с последующим выделением и очисткой плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Для детекции ареновирусов положительные контрольные образцы были получены на основе рекомбинантной плазмиды pUC, несущей вирусспецифические вставки. Культивирование вирусов и получение кДНК проводили как описано в [19].

В работе использовали клетки Vero, полученные из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», и питательную среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла MEM x 2ABK) производства ГНЦ ВБ «Вектор». Вирус культивировали в стационарном режиме на монослой клеток Vero в культуральных флаконах объемом 1 л. Множественность заражения составляла 0.01–0.1 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. После этого монослой клеток заливали 150 мл питательной среды Игла MEM x 2ABK, содержащей 0.06 % глутамина, 2 % эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотика (бензилпенициллин – 100 ед./мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). Клетки инкубировали при температуре 37 °С до появления цитопатического действия вируса, в среднем 5 сут. Культуральную вирусосодержащую жидкость использовали для выделения РНК вируса.

Предварительную инактивацию образцов и выделение РНК проводили в условиях, регламентированных МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Вирусную РНК выделяли из культуральной вирусосодержащей жидкости с использованием набора реагентов «Комплект реагентов для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» (НПФ Литех, Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией по применению.

В качестве контрольных образцов, не содержащих ДНК JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV, были использованы: кДНК вируса кори (изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2) и ДНК человека.

Для амплификации фрагментов целевых генов были использованы праймеры, конъюгированные с малобороздочным карбоксамидопиррольным лигандом [18] (см. “Результаты и обсуждение”).

**Синтез конъюгатов** осуществляли по следующей методике: к обезвоженному осадку цетавлоновой соли олигодезоксирибонуклеотида (0.2 мкмоль), несущего на 5'-конце фосфатную группу, добавляли 15 мг трифенилфосфина, 15 мг 2,2'-дипиридилдисульфида и 7-8 мг 4,4'-*N,N*-диметиламинопиридина. Смесь растворяли в 100 мкл DMSO, перемешивали в течение 20 мин, после чего добавляли 2 мг карбоксамидопиррольного лиганда Н- $\gamma$ -Ру-Ру-Ру- $\gamma$ -Ру-Ру-Ру- $\beta$ -Dr и 2–3 мкл диизопропилэтиламина. Далее реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и оставляли на 20 ч при комнатной температуре. Конъюгат осаждали добавлением 1.2 мл 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, после чего проводили центрифугирование в течение 5 мин при 14000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок 3 раза промывали 0.5 мл ацетона, высушивали досуха на воздухе и растворяли в 1 мл бидистиллированной воды. Выделение производного олигодезоксирибонуклеотида после синтеза проводили методом офВЭЖХ на хроматографе "Aglient 1100 Series" (Aglient Technologies, США). Использовали линейный градиент концентрации ацетонитрила (от 0 до 70%) в водном растворе 20 мМ ацетата триэтиламония в течение 40 мин (скорость элюции 2 мл/мин, хроматографическая колонка RP-C18, 4×250 мм, размер частиц 10 мкм).

Для получения преимущественно одноцепочечных форм ампликонов ПЦР проводили в асимметричном режиме [11]. Длина нарабатываемых ампликонов составляла ~370–480 п.о. ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, имеющей следующий состав (указаны конечные концентрации): 1× SE-буфер (СибЭнзим, РФ) для Taq-полимеразы (60 мМ Tris-HCl, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1% Тритон X-100, pH 8.5), 200 нМ dATP, dCTP, dGTP, 70 нМ dTTP, 50 нМ dUTP-Cy5, 130 нмоль прямых праймеров и 1300 нмоль обратных праймеров, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мкл раствора кДНК, содержащего от 2 10<sup>3</sup> до 2 10<sup>6</sup> ген-эквивалентов вируса и 1 ед. акт. Taq-полимеразы. ПЦР проводили в термоциклере "iCycler" (BioRad, США), используя следующий протокол: 95°C – 3 мин, затем 35 циклов 95°C – 45 с, 65°C – 30 с, 72°C – 1 мин. Контроль прохождения реакции осуществляли методом горизонтального гель-электрофореза в 1.5% агарозном геле в 1× буфере TAE (40 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 7.6) окрашиванием этидий бромидом. Флуоресцентно-меченные ампликоны очищали от избытка dUTP-Cy5 с использованием гель-фильтрующих колонок (Qiagen, Германия), высушивали досуха при 60°C в вакуумном концентраторе "DNA 120 SpeedVac" (ThermoSavant, США) и использовали для гибридизации.

Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл бидистиллированной воды, добавляли 10 мкл 2× гибридизационного буфера (1× гибридизационный буфер: 6× SSC (0.9 М NaCl, 0.09 М цитрат натрия, 3 мМ EDTA), 5× раствор Денхардта, 0.1% Твин-20), прогревали перед нанесением на слайд в течение 5 мин при температуре 97°C и охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в гибридизационной камере (ArrayIt, США) при температуре 67°C в течение 1.5 ч. Далее слайд последовательно отмывали в растворах 6×

SSC, 2× SSC + 0.1% SDS, 2× SSC и 1× SSC и высушивали центрифугированием.

Сканирование слайда проводили на сканере "ScanArray Express 2.0" (PerkinElmer, США) при длине волны возбуждающего лазера, равной 633 нм. Компьютерный анализ результатов сканирования осуществляли с использованием программы "ScanArray Express v.4" (PerkinElmer).

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» в рамках проекта «Разработка метода нефлуоресцентной микрочиповой диагностики».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2004.
2. *Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A.* // Arch. Virol. 1981. V. 67. P. 71–74.
3. *Gibb T.R., Norwood D.A. Jr., Woollen N., Henchal E.A.* // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 4125–4130.
4. *Trombley A.R., Wachter L., Garrison J., Buckley-Beason V.A., Jahrling J., Hensley L.E., Schoepp R.J., Norwood D.A., Goba A., Fair J.N., Kulesh D.A.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010. V. 82. P. 954–960.
5. Microarrays in Clinical Diagnostics / Ed. Joos T.O., Fortuna P. Methods in Molecular Medicine 2005. V. 144. Humana Press Inc.
6. *Lagraulet A.* // Journal of Laboratory Automation 2010. V. 15: P. 405–413.
7. *Ischlager S.O., Gunther S. J.* // Clin. Microbiol. 2012. V. 50. P. 2496–2499.
8. *Palacios G., Quan P.-L., Jabado O.J., Conlan S., Hirschberg D.L., Liu Y., Zhai J., Neil Renwick N., Hui J., Hegyi H., Grolla A., Strong J.E., Towner J.S., Geisbert T.W., Jahrling P.B., Buchen-Osmond C., Ellerbrok H., Sanchez-Seco M.P., Lussier Y., Formenty P., Stuart T. Nichol S.T., Feldmann H., Briese T., Lipkin W.I.* // Emerging Infectious Diseases 2007. V. 13. P. 73–81.
9. *Milton C., Rimour S., Missaoui M., Biderre C., Barra V., Hill D., Mone A., Gagne G., Meier H., Peyretailade E., Peyret P.* // Bioinformatics. 2007. V. 23. P. 2550–2557.
10. *Rimour S., Hill D., Milton C., Peyret P.* // Bioinformatics. 2005 V. 21. P. 1094–10103.
11. *Filippone C., Marianneau P., Murri S., Mollard N., Avsic-Zupanc T., Chinikar S., Despres P., Caro V., Gessain A. Berthet N., Tordo N.* // Clin. Microbiol. Infect. 2013. V. 19. E118–E128.
12. *Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Sinyakov A.N.* // J. Med. Virol. 2006. V. 78. P. 1325–1340.
13. *Ryabinin V.A., Kostina E.V., Maksakova G.A., Neverov A.A., Chumakov K.M., Sinyakov A.N.* // PloS ONE. 2011. V. 6. № 4. e17529.
14. *Bui H.H., Botten J., Fussedder N., Pasquetto V., Mothe B., Buchmeier M.J., Sette A.* // Immunome Research. 2007. V. 3. P. 1–8.
15. *Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Surovaya A.N., Nikitin S.M., Krylov A.S., Retchinsky V.O., Mikhailov M.V., Beabealaschvilli R.S., Gottikh B.P.* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983 V.47. P. 367–378.
16. *Sinyakov A.N., Lokhov S.G., Kutuyavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B.* // J. of American Chemical Society. 1995. V. 117. № 17. P. 4995–4996.
17. *Mrksich M., Wade W.S., Dwyer T.J., Geierstanger B.H., Wemmer D.E., Dervan P.B.* // PNAS. 1992. V. 89. P. 7586–7590.

18. *Рябинин В.А., Синяков А.Н.* // Биорг. химия. 1998. Т. 24. С. 601–607.
19. *Шиков А.Н., Терновой В.А., Семенцова А.О., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.* / Патент РФ № 2458143.
20. Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J., Wang R., Smith L.M. // Nucleic Acids Research. 1994. V. 22. P. 5456–5465.
21. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976.

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидных зондов (5'→3') для выявления вирусов JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV и MARV.

№	JUNV
1	TGTTGAGATGGCATTGTTCCAACCTGC
2	CTGTTGAAATGGCATTGTTCCAACCTGCA
3	ACTGACCCTGTTGAGATGGCATTGTTC
4	ACCGATCCTGTTGAGATGGCATTGTTC
5	CCACTGATCCTGTTGAGATGGCATTGTTC
6	GCTACTGATCCTGTTGAGATGGCATTGTTC
7	CGATGACATCAGGAAGTTGTTTGACCTCCAT
8	ATCAGAGAGGCAGTGGGGAAACTC
9	GTCATTAGAGAGGCAGTGGGGAAACTC
10	CTGTCATTAGAGAAGCAGTGGGGAAACTC
11	TTTGCTGCCTCCAGACATGGTTGT
12	CATCAGAGAAGCAGTGGGGAAACTTGAC
13	CTTGCTGCCTCCAGACATGGTTGT
14	GATGACATCAGGAAGCTGTTTGACCTCC
15	CGATGATATCAGGAAGCTGTTTGACCTCCAT
16	GGAAGCTATTTGACCTCCATGGAAGAAGAGATCT
17	CAGGAAACTATTTGACCTCCATGGAAGAAGAGATCT
18	GACCCTGTTGAGATGGCGTTGTTC
	GTOV
1	TCAAATCTTTCTGAAATGCAAGAAGCGATCGTAAAGG
2	TTGGCAGTTTTCCAACCTTCTTCAGGAAAC
3	TTGGCTGTTTTCCAACCTTCCACAGGAAA
4	GAGCTGGCAGTTTTCCAACCTTCTTCAG
5	ATCAGACTATCAAATCTTTCTGAAATGCAAGAAGCGATC
6	CATCAGATTGTCAAATCTTTCTGAAATGCAAGAAGCGATC
7	TCTCTGAGATGCAAGAGGCAATTGTGAAAG
8	GAGTTGGCAGTATTCCAACCTTCTTCAGG
9	TTGGCAGTTTTCCAACCTTCTTCAGG
10	CCTCAGGAAATTATGTGCACTGTTTCAGAAAACCTC
11	GGAGTTAGCAGTTTTTCAACCTTCTTCAGGAAACT
12	TCTGAGATGCAAGAAGCAATCATAAAGGAAGCAATG
13	TTGGCAGTTTTCCAACCTTCTTCAGGAAA
14	GAGTTGGCAGTGTTCACCTTCTTCAG
15	TATGTGCACTGTTTCAGAAAACCTCATGATGAGAA
16	ATCAGACTATCAAACCTTTCTGAAATGCAAGAGGCG
17	TGAAATGCAAGAAGCGATCATAAAGGAAGCAATGAAGAA
	MACV
1	GCTGTAAAGAAGTTAGACCCCAAAATACACTGTG
2	CCAGCCAATAAGCATTATATTCAGTGTTTAGAAAGCCACAT
3	ATCAGCCAGTCAATAAGCATTATATTCAGTGTTTAGAAAGCC
4	AAGATATGGTGATTACAACCTCAAGGTTCTGACGACATAAG
5	ACAAGACATGGTGATTACAACCTCAAGGTTCTGAC
6	CACAAGATATGGTGATTACAACCTCAAGGTTCTGACG
7	CTTACTGCCACAAGATATGGTGATTACAACCTCAAGG
8	GGTTTACTACCACAAGATATGGTGATTACAACCTCAAGGTT
9	GACATGGTGATCACAACCTCAAGGTTCTGATGA
10	CAAGATATGGTGATCACAACCTCAAGGTTCTGATGAC
11	GCCAGCCAACAAGCATTATATTCATTGTTTTAGAAAGCC

12	GTTGTATCAACCAGCCAACAAACATTACATTCACTGT
13	CTGTAAAGAAGTTAGATCCCACAAATACACTGTGGCT
14	GCTGTAAAGAAGTTAGACCCCCTAATACACTGTG
15	CTGTAAAGAAGTTGGATCCCACAAACACACTGT

LASV

1	TGCTATCCTTTCCATGAAATTGAATGTTTCATTGGCAC
2	CACACGTCTCCTACAGTATGGATCACAGTAAGT
3	AGTTATCAGGGAGTTGCCTGAACAACGA
4	TTGGCACATGTCTCCTATAGCATGGATCATAGTAAGT
5	GAATGTTTCTTTAGCTCATGTTTCCTACAGCATGGATC
6	TACAGTTATCAGGGAGTTGCCTGAACAATGAGA
7	GAGTTTGCAACTATCAGGTAGTTGTTTAAACAATGAGAGAGAG
8	AATGAAGCTGAATGTCTCATCGGCACATGT
9	CTTATCAATGAAGCTGAATGTCTCATCAGCACATGTTTC
10	CATTGACTCTGCAATTATCTGGGAGTTGTTTAAATAGTGAGAAAG
11	AGTTTGCAATTGTCAGGGAGTTGTTTGAACAAC
12	GCGCTAAGTATGCAATTGTCAGGCAGTTGTTTAAAT
13	CCTTGGCTCATGTGTCTTACAGTATGGATCATAGT
14	TAAGCCTACAGTTATCAGGGAGTTGCCTGAAT
15	GGTTGTCTTGTCAAAGACTTGCAGGCA
16	GCTATCTTGTCTATGAAACTCAATGTCTCTTTGGCACA
17	CAGTTGTCAGGGAGTTGTCTCAATAATGAGAAGG
18	ATGTTTCATTGGCACATGTCTCCTATAGTATGGATCATAGT
19	CTCATTGGCACATGTGTCTTATAGCATGGATCATAG
20	GAATGTCTCTTTAGCACATGTCTCTTATAGTATGGACCAC
21	GAATGTCTCATCAGCACATGTTTCATATAGCATGGATCA
22	GAATGTGTCTCTAGCGCATGTCTCTTATAGTATGGATC
23	CTGAATGTTTCTTTAGCTCATGTTTCCTATAGCATGGATCATAG
24	TGAATGTCTCATCGGCACATGTATCATATAGTATGGAC
25	GAGGCATTGAGTTTGCAATTGTCAGGTAGTTG

EBOV

1	ACACAAGTGATGATTTTGGTGAGCATGCC
2	CACACAAGTGATGATTTTGGTGAGAATGCTACTGTTAGA
3	GAATTCACAGCTCCCTTCATCAAATATTGCAACCA
4	AGATATGAGTTTACAGCACCTTTTATAGAATATTGCAACCGTTG
5	GCCACAGTTAGAGGGAGTAGCTTTGTAAGTATTGA
6	CGTGAGCAAAAAGAAAGCTTATTGCATCAAGCAT
7	ACTGTTAGAGGCAGCAGTTTTGTTACCGA
8	CACCACACAAGTGACGATTTTCGGTGA
9	GCCACAGTTAGAGGGAGTAGTTTTGTAAGTATTGATTTAG
10	AAGCATCCTGGCACCATAACAAGTGATGATTT
11	CAAGCATCTTGGCATCATACGAGTGATGATTTTC
12	AGCGCGAGCAAAAAGAAAGCCTTTTG

MARV

1	TTCTTGGCACCACAATTCAGCAAGCATAG
2	TGGATGCATTTCTTAATACCACTATGCTATATGCATGTCAG
3	GAATGCCATAGTAAGAGGTGCAAGTTTTGTTACTGATC
4	GGGAACAGAAAGAAGCTTTATTACATCAGGCTTCTTG
5	CTTGCCTCCGATATGAATTTACACGGCATTTCATA
6	CGCCTCCGATATGAATTTACACGGCATTTCATA
7	CGCTATAGTAAGGGGTGCAAGTTTTGTTACTGATC

**Таблица 2.** Последовательности использованных в работе праймеров (5'→3').

№	Последовательность праймера (5'→3')*	Тип праймера	Вирус(-ы)
1	ACAAGTGTTCGATTTAAA	Прямой	JUNV, GTOV, MACV
2	ACAAGTGTTCGATTTAAC		
3	AAGTGTTCGATTTAACTG		
4	ACAAGTGTTCGATTTAAATG		
5	ACAAGTATCGATTTAAATG		
6	ACAAGTGTTCGATTTATAT		
7	ACAAGTGTTCGATCTGA		
8	ACAAGTATTGACCTGA		
9	ACAAGCATTGATCTGA		
10	ACTAGCATTGATCTGA		
11	ACAAGTGTTCGATCTAAC		
12	ACAATGTTCGATCTAAC		
13	AAGTGTTCGATTTGACAA		
14	ACAAGTGTTCGATTTG		
15	ACAAGTATTGATCTGAC		
16	AGTTTAAGATCTCTTCTC	Обратный	JUNV
17	AGTTTAAGATCCCTTCT		
18	TCAACCAGCTTAAGAT		
19	TAACATCAACCAGTTTG		
20	AGTTTAAGATCTCTTCTTC		
21	AACAGTGCCTGACTGAA	Обратный	GTOV
22	TGAACAGTAATAACTGAAC		
23	TGAACAGTGATAACTGA		
24	TGAACAGTGATGACT		
25	TTGAACAGTGACAAC		
26	TGATGACTGAATTTTGT		
27	AATCTGCTGATCATAGA	Обратный	MACV
28	TTTGTTGATCATAGAGTC		
29	TTTGCTGATCATAGAGT		
30	AATGTTAAAGAATTTGTGTTT	Прямой	LASV
31	TATGTTAAAGAATCTTTGTTTT		
32	ATGTTGAAGAATCTCTG		
33	AATGCTAAAAAACTTATGTTT		
34	AATGTTAAAAAACTTGTGTT		
35	AATGCTGAAGAATTTGT		
36	AATGTTGAAGAATTTATGT		
37	AATGTTGAAGAATTTGTG		
38	AATGCTTAAAAATCTCTGT		
39	ATGTTAAAAAACCTGTGT		
40	TATGTTAAAAAACCTTTGC		
41	TATGTCAGCTTGCAA	Обратный	LASV
42	AATCACGTCCTTTGA		
43	TGATATCTGCTTGCA		
44	TAGTCCCTCCCTTTA		
45	TATCAGCTTGCAAGT		
46	AATCTCTCCCTTTGATG		
47	AATCCCTCCCTTTTATATC		
48	AATCTCTCCCTTTAATGTC		
49	AATCCCTCCCTTTTATAT		
50	ATCAGCTTGATGATCAT		



51	ATCAGCTTGTAAGTCA	Обратный	LASV
52	ATGATGGTTGTCACT	Прямой	EBOV, MARV
53	TGATGGTAGTTACGG		
54	ATGATGGTTGTTACTG		
55	ATGATGGTTGTCACA		
56	TGATGGTAGTCACAG		
57	ATGATGGTTGTGACA		
58	ATGATGGTTGTAACAG		
59	TGTTATACATTGATTATCAC	Обратный	EBOV, MARV
60	AATGCACTGATTGTC		
61	TGATACATTGATTATCCC		
62	TGTAATACATTGATTATCCC		
63	AGTTATACATTGATTGTCA		
64	TGTTATACATTGGTTATCA		
65	TGATGCATTGATTATCA		

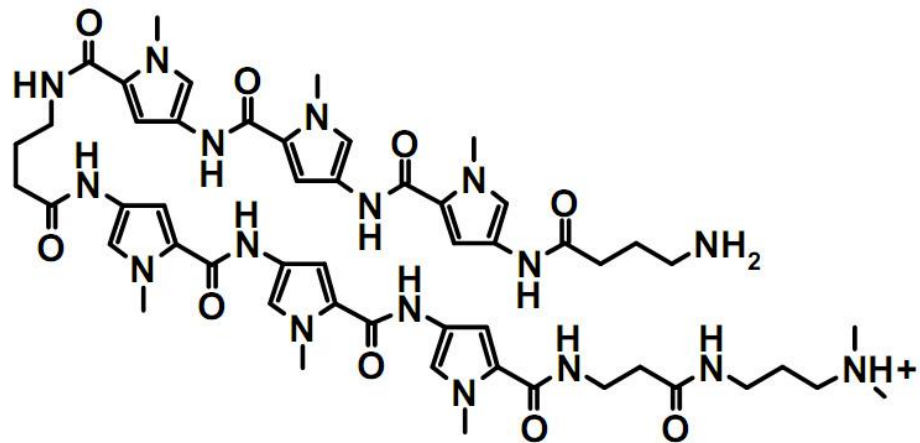
\* – каждый праймер содержит на 5'-конце ковалентно присоединенный лиганд H- $\gamma$ -Pu-Pu-Pu- $\gamma$ -Pu-Pu-Pu- $\beta$ -Dp.

## Подписи к рисункам

**Рис. 1.** Микрочип формата 12×11 спотов для определения патогенов I группы, относящихся к семействам *Arena-* и *Filoviridae*. Каждая строка содержит зонды для определения соответствующего вируса (JUNV, GTOV, MACV, LASV, EBOV или MARV).

**Рис. 2.** Картины гибридизации ампликонов фрагмента гена нуклеокапсидного белка вирусов JUNV (штамм XJ#44) (a), GTOV (штамм VHF-1750) (б), MACV (штамм Carvallo) (в) и ампликонов фрагмента гена РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов LASV (штамм CSF) (г), ZEBOV (штамм Mayinga) (д), MARV (штамм Popp) (е) на микрочипе (67°C, 1.5 ч) и соответствующие им гистограммы распределения средней флуоресценции спотов ( $Y$ , в относительных единицах).

Ошибка измерения определялась как среднее отклонение, рассчитанное в соответствии с описанной [21].



Структура карбоксамидопиррольного лиганда Н- $\gamma$ -Pyr-Pyr-Pyr- $\gamma$ -Pyr-Pyr-Pyr- $\beta$ -Drp

Формула

# **A Prototype of Oligonucleotide Microarray for Detection of Pathogens Relating to Arena- and Filoviridae Families**

**I. V. Zhirnov\***, **V. A. Ryabinin\***, **A. N. Sinyakov\*<sup>#</sup>**, **V. A. Ternovoy\*\***, **A. N. Shikov\*\***

<sup>#</sup>*Phone: +7 (383) 363-51-73, e-mail: sinyakov@niboch.nsc.ru*

*\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,*

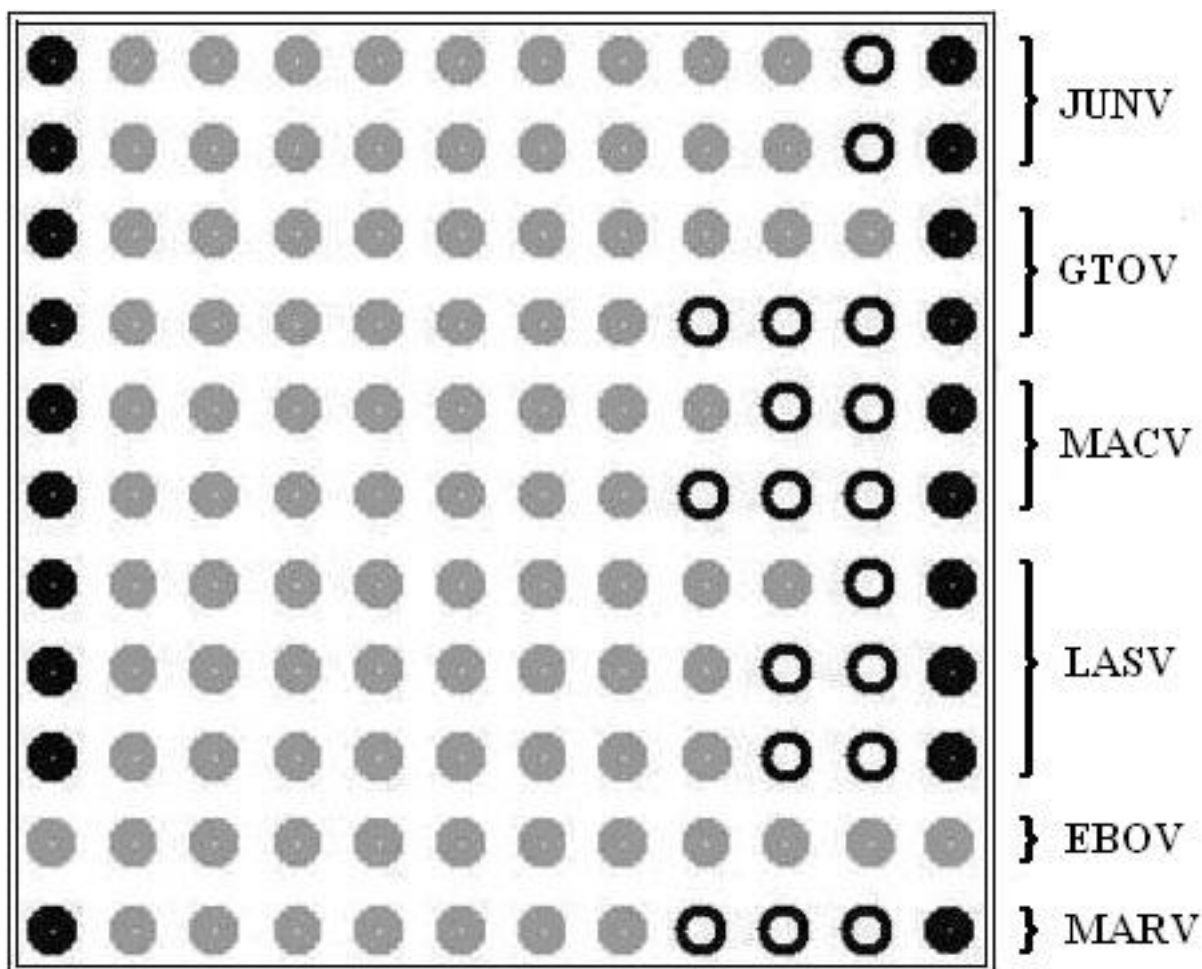
*prosp. Lavrentieva, 8, Novosibirsk 630090, Russia*

*\*\*Department of Molecular Virology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",*

*Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia*

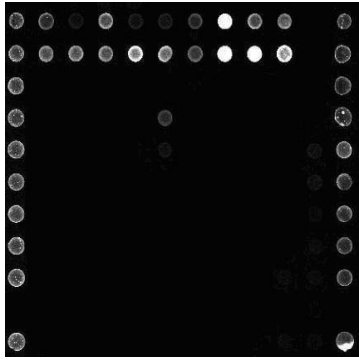
A prototype of oligonucleotide microarray for detection of Lassa, Junin, Machupo, Guanarito viruses (Arenaviridae family), Ebola and Marburg viruses (Filoviridae family) was presented. An original approach founded on virus proteins (nucleocapsid protein for Junin, Guanarito, Machupo viruses and RNA-dependent RNA-polymerase for Lassa, Ebola и Marburg viruses) amino acid sequences analysis with subsequent transform of revealed unique peptides into due sets of oligonucleotides was used to design probes for hybridization and primers.

*Keywords: arenaviruses, filoviruses, microarray, minor groove DNA-binding ligand, diagnostics*

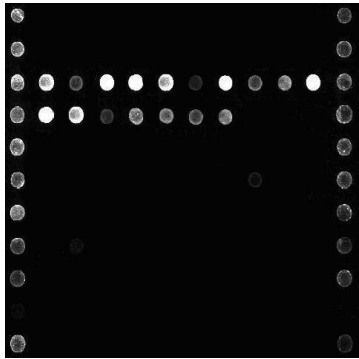
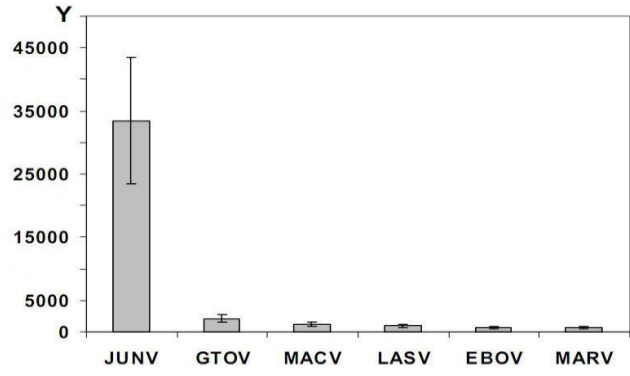


- Споты, отвечающие вирусоспецифическим зондам
- Споты, отвечающие маркерному олигонуклеотиду
- Зонд отсутствует

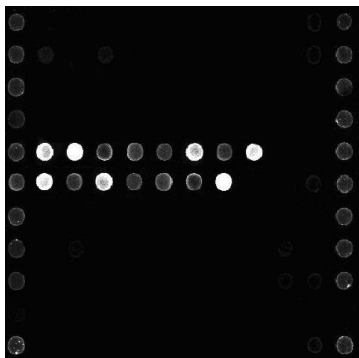
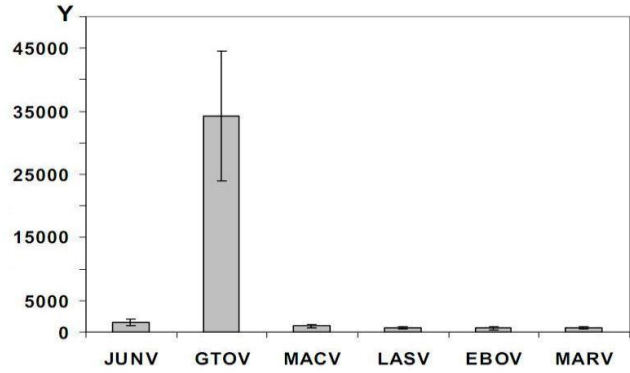
Рис. 1



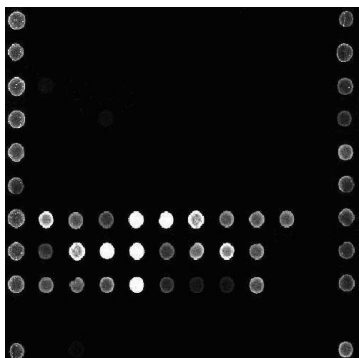
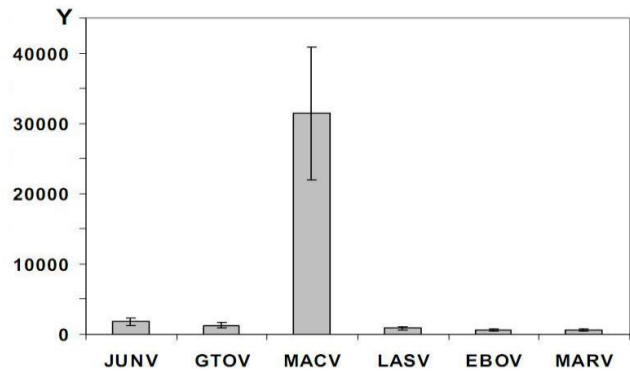
(a)



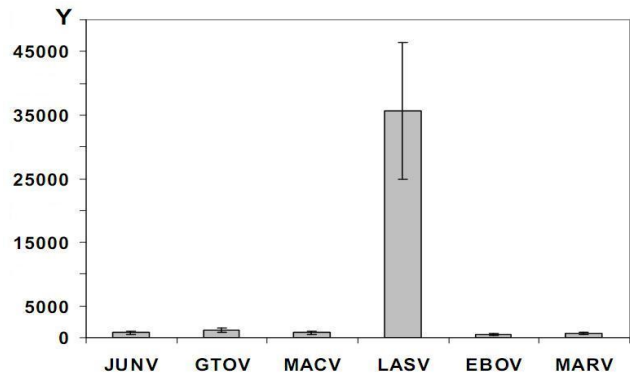
(b)

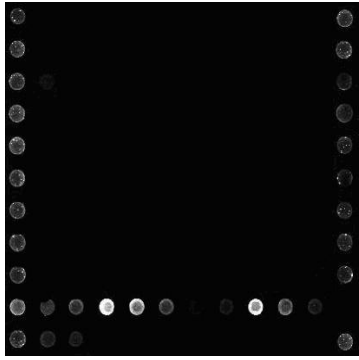


(c)

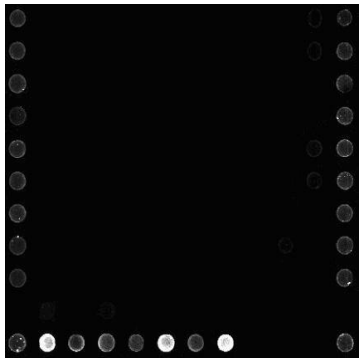
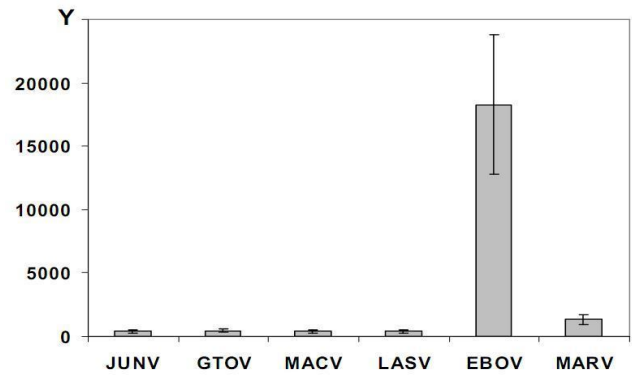


(d)





(д)



(e)

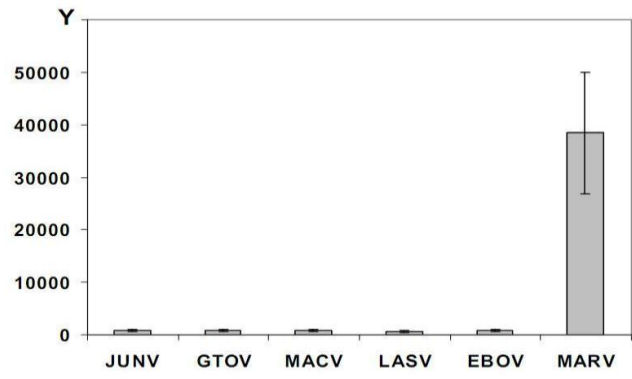


Рис. 2