

А. В. Васин<sup>1</sup>, Н. Т. Сандыбаев<sup>2</sup>, М. А. Плотникова<sup>1</sup>, С. А. Клотченко<sup>1</sup>, О. В. Червякова<sup>2</sup>, В. М. Строчков<sup>2</sup>,  
Э. Т. Тайлакова<sup>2</sup>, О. А. Темкина<sup>1</sup>, А. В. Бродская<sup>1</sup>, Я. А. Забродская<sup>1</sup>, К. П. Никуленков<sup>1</sup>, В. В. Егоров<sup>1</sup>,  
Ж. К. Кошеметов<sup>2</sup>, А. Р. Сансызбай<sup>2</sup>, О. И. Киселев<sup>1</sup>

## Универсальный диагностический олигонуклеотидный микрочип для определения и субтипирования вирусов гриппа А человека и ЖИВОТНЫХ

<sup>1</sup>ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>РГП "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан

В работе представлен диагностический олигонуклеотидный микрочип для субтипирования вирусов гриппа А (ВГА) человека и животных. Предложен универсальный метод флюоресцентного мечения геномных сегментов всех известных подтипов ВГА, состав буфера гибридизации, а также программное обеспечение для обработки получаемых результатов. Результаты анализа 48 штаммов ВГА человека и животных, принадлежащих к 18 разным подтипам, позволили однозначно типировать все штаммы и субтипировать 45 штаммов.

Ключевые слова: вирус гриппа А; гемагглютинин; нейраминидаза; микрочип; молекулярная диагностика.

A. V. Vasin<sup>1</sup>, N. T. Sandybaev<sup>2</sup>, M. A. Plotnikova<sup>1</sup>, S. A. Klotchenko<sup>1</sup>, O. V. Chervyakova<sup>2</sup>, V. M. Strochkov<sup>2</sup>,  
E. T. Taylakova<sup>2</sup>, O. A. Temkina<sup>1</sup>, A. V. Brodskaya<sup>1</sup>, Y. A. Zabrodskaya<sup>1</sup>, K. P. Nikulenkov<sup>1</sup>, V. V. Egorov<sup>1</sup>,  
J. K. Koshemetov<sup>2</sup>, A. R. Sansyzbay<sup>2</sup>, O. I. Kiselev<sup>1</sup>

### Universal diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses

<sup>1</sup> Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeiskiy, Republic of Kazakhstan

The diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses (IAVs) was developed. We proposed a simple method of the fluorescent labeling of genomic segments of all known IAVs subtypes, the composition of the hybridization buffer, as well as the software of the data processing. 48 IAVs strains of different subtypes were analyzed using our microarray. All of them were identified, while 45 of 48 strains were unambiguously subtyped.

Key words: influenza A virus; hemagglutinin; neuraminidase; microarray; molecular diagnosis.

### Введение

Грипп – острое инфекционное заболевание человека и животных, этиологическим агентом которого являются одноименные РНК-содержащие вирусы трех типов – А, В и С, принадлежащие семейству Orthomyxoviridae. Геном вирусов гриппа А (ВГА), представляющих наибольшую эпидемиологическую опасность, состоит из 8 отдельных сегментов (-)РНК, кодирующих не менее 11 белков. ВГА классифицируют на подтипы на основе антигенных различий поверхностных гликопротеинов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). Природным резервуаром всех известных подтипов ВГА (Н1–16 и N1–9) являются водоплавающие птицы. В человеческой популяции циркулирует только 3 подтипа НА (Н1–3) и 2 подтипа NA (N1–2), однако высокая степень изменчивости ВГА, а также возможность реассортации вирусных сегментов при коинфекции разными штаммами могут приводить к появлению таких новых "нетипичных" для данной популяции вирусных вариантов, как, например, H5N1 или H1N1<sub>pdm09</sub> [1].

Ежегодные эпидемии гриппа и потенциальная угроза возникновения новых пандемий обуславливают необходимость разработки и совершенствования методов, позволяющих проводить быструю и точную идентифи-

кацию и субтипирование вирусных штаммов в клинических образцах [2]. В настоящее время для этой цели широко применяют стандартные иммунологические методы или методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одним из наиболее перспективных и относительно доступных подходов к высокопроизводительному определению вирусного подтипа является предложенная в 1990-е годы технология биологических микрочипов [10]. В последние годы появился целый ряд работ по созданию микрочипов для детекции и субтипирования ВГА [3, 4, 7, 9, 11].

Ранее мы также провели дизайн олигонуклеотидного микрочипа для субтипирования ВГА H5N1 человека, а затем и для субтипирования всех известных подтипов ВГА человека и животных [8, 12]. Кроме того, мы предложили способ получения флюоресцентно меченой вирусной кДНК, используемой для анализа на микрочипе, путем амплификации геномных сегментов РНК с помощью универсальных для всех подтипов ВГА праймеров к высококонсервативным концевым областям этих сегментов. Использование таких праймеров позволяет унифицировать разрабатываемые микрочипы и избавить от необходимости использования наборов мультиплексных праймеров, специфических только для определенных подтипов ВГА.

Контактная информация:

Васин Андрей Владимирович, канд. биол. наук, e-mail: vasin@influenza.spb.ru

В данной работе мы предложили методику субтипирования ВГА с использованием олигонуклеотидного биочипа, выбрали условия проведения гибридизации флюоресцентно меченой вирусной кДНК на биочипе и проверили его специфичность на примере вирусных штаммов 18 подтипов ВГА из разных хозяйств. Также мы разработали программное обеспечение для быстрого и простого анализа результатов.

### Материалы и методы

В работе использовали 47 охарактеризованных штаммов ВГА человека и животных, среди которых А/Алматы/1/98 (H1N1), А/Алматы/5/98 (H1N1), А/Алматы/32/98 (H1N1), А/Астрахань/72/08 (H1N1), А/Брисбейн/59/07 (H1N1), А/Воронеж/4/08 (H1N1), А/Калифорния/07/09 (H1N1<sub>ndm09</sub>), А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/свинья/31/76 (H1N1), А/утка/Альберта/35/76 (H1N1), А/Хабаровск/74/77 (H1N1), А/Египет/96/02 (H1N2), А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), А/Сингапур/1/57 (H2N2), А/утка/Германия/215/73 (H2N3), А/Брисбейн/10/07 (H3N2), А/Виктория/3/75 (H3N2), А/Новосибирск/1/08 (H3N2), А/Самара/68/08 (H3N2), А/Сидней/5/97 (H3N2), А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6), А/ворон/Иркутск/402/08 (H3N8), А/лошадь/Алматы/26/07 (H3N8), А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), А/серебристая чайка/Иркутск/111/05 (H3N8), А/утка/Калифорния/72 (H3N8), А/чирок-свистунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8), А/малая поганка/Алаколь/791/04 (H4N6), А/голубая чернеть/Актау/1455/06 (H4N6), А/лысуха/Актау/1454/06 (H4N6), А/утка/Чехословакия/56 (H4N6), А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H5N1), А/курица/Курган/5/05 (H5N1), А/лебедь-шипун/Мангистау/3/06 (H5N1), А/скворец/Костанай/233/07 (H5N1), А/утка-широконоска/Костанай/58/07 (H5N1), А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), А/крачка/Южная Африка/59 (H5N3), А/утка/Сингапур/F119/97 (H5N3), А/серебристая чайка/Сарма/51с/06 (H6N1), А/утка/Нидерланды/00 (H7N3), А/Алматы/331/06 (H7N7), А/каспийский тюлень/1/00 (H7N7), А/Гонконг/1073/99 (H9N2), А/сизая чайка/Иркутск/121/08 (H9N7), А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6), А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3).

**Печать микроочипов.** Олигонуклеотидные зонды, содержащие аминоклипер ("ДНК-Синтез", Россия), в трехкратном SSC-буфере в концентрации около 300 нг/мкл наносили на альдегидный субстрат (Vantage Aldehyde Slides, "CEL Associates", США) методом контактной печати с использованием споттера SpotBot® 3 Personal Microarrayers ("Arrayit Corporation", США). После печати слайды оставляли на ночь в споттере, затем проводили ковалентную пришивку зондов с помощью УФ-облучения в кросслинкере BioLink ("Biometra", Германия) при 0,09 Дж/см<sup>2</sup>.

**Выделение РНК.** Тотальную РНК экстрагировали из зараженного материала реагентом TRIzol ("Invitrogen", США) в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрацию полученной РНК проверяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 ("NanoDrop Technologies", США).

**Аmplификация вирусной РНК.** Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с помощью набора SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System ("Invitrogen", США) в соответствии с инструкцией производителя. Для мультисегментной амплификации использовали универсальную пару праймеров, подобранную к концевым высококонсервативным областям, которые имеют во всех геномных сегментах ВГА (MBTuni-12 и MBTuni-13) [5]. Амплификацию проводили, как описано ранее

[12]. Флюоресцентное мечение пробы осуществляли путем прямого встраивания Cy5-dCTP ("ДНК-Синтез", Россия) непосредственно в процессе ОТ-ПЦР, реакционная смесь при этом дополнительно содержала 33 мкМ 1 мМ Cy5-dCTP.

**Гибридизация.** К 1 мкл ПЦР-смеси, содержащей Cy5-кДНК, добавляли раствор для гибридизации, довели общий объем до 50 мкл Milli-Q H<sub>2</sub>O и прогревали в твердотельном термостате при 99°C 2 мин, затем охлаждали во льду 2 мин и сразу наносили на микроочип. Параллельно этому олигонуклеотидные зонды на микроочипе денатурировали кипячением слайда в Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 мин с последующей инкубацией в 96% этаноле при 20°C в течение 1 мин, после чего слайд высушивали центрифугированием при 300 g 2 мин. Гибридизацию проводили с использованием рамки на 16 субэппреев FAST® Frame ("Whatman", США) в течение 2 ч при 37°C с перемешиванием при 250 об/мин в термошейкере Biosan PST-60 HL plus ("BioSan", Латвия). После этого проводили отмывку слайда от раствора для гибридизации и несвязавшихся молекул пробы, затем слайд высушивали на центрифуге.

Сканирование микроочипов проводили на сканере ScanArray Express ("PerkinElmer", США) с разрешением 5 мкм и при значении PMT в пределах 60–90. Флюоресцентное сканирование для метки Cy5 осуществляли при длине волны возбуждения 650 нм и длине волны регистрации 670 нм. Получаемые изображения обрабатывали с использованием программы ScanArray Express 3.0 ("PerkinElmer", США).

### Результаты и обсуждение

Представленный в работе микроочип предполагает детектирование и субтипирование ВГА по геномным сегментам, кодирующим HA и NA. На начало 2011 г. в базе данных GenBank было представлено примерно по 23 000 полноразмерных нуклеотидных последовательностей HA 16 подтипов и NA 9 подтипов. Множественное выравнивание вышеуказанных последовательностей, выполненное в программе MAFFT [6], а также результаты последующего филогенетического анализа в программе Jalview [13] позволили разделить их на кластеры внутри каждого из подтипов HA и NA. Для практически всех последовательностей каждого кластера были найдены полностью идентичные участки, к которым в программе OligoWiz 2.0 [14] подобрали оптимальные по физико-химическим свойствам комплементарные олигонуклеотидные зонды. Таким образом, для каждого из подтипов HA и NA составили наборы зондов, содержащие от одной до шести последовательностей. Всего подобрали около 70 зондов, их нуклеотидные последовательности были приведены ранее [8]. Отнесение штаммов ВГА к определенному подтипу осуществляли при условии гибридизации исследуемой пробы хотя бы с одним зондом из набора, характеризующего конкретный вирусный подтип.

Олигонуклеотидные зонды синтезировали и иммобилизовали на микроочип для дальнейшего проведения контрольных испытаний и отработки всех этапов подготовки пробы и ее гибридизации (рис. 1). Микроочип состоял из 16 идентичных массивов точек, расположенных в виде матрицы размером 2 на 8. В свою очередь каждый массив содержал точки, напечатанные в виде матрицы 20 на 12, диаметр каждой точки составлял 200 нм. Все зонды для субтипирования HA и NA, а также зонды, выявляющие консервативные для всех подтипов ВГА нуклеотидные последовательности M2-белка и белка NP, выбранные в качестве положительного контроля присутствия ВГА в анализируемой пробе, наносили в трех

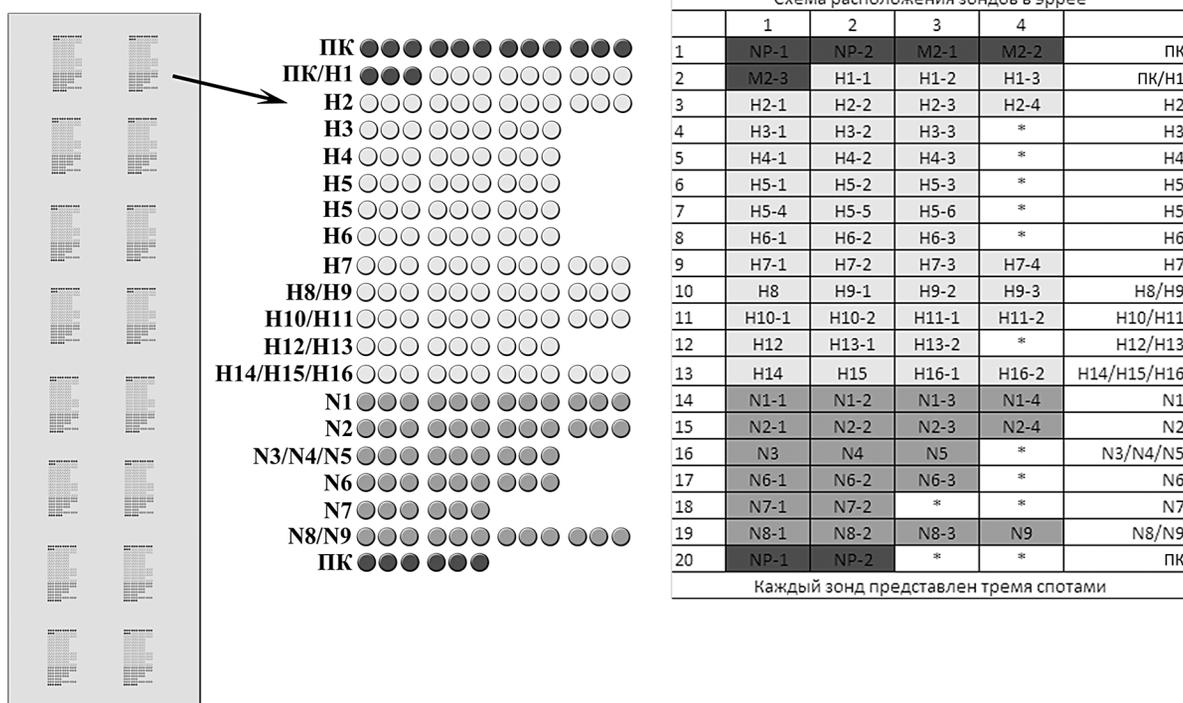


Рис. 1. Схема расположения олигонуклеотидных зондов на биочипе для субтипирования ВГА.

повторах, обеспечивающих статистическую достоверность получаемых при анализе данных.

Специфичность взаимодействия олигонуклеотидов, иммобилизованных на подложке микрочипа, с анализируемой флюоресцентно меченой пробой во многом зависит от условий проведения гибридизации. Гибридизационный раствор помимо непосредственно меченой кДНК должен содержать формамид для снижения температуры плавления ДНК-дуплекса, солевой буфер, детергент и забивочный реагент. На первом этапе исследования провели оптимизацию состава буфера для гибридизации. Для этого использовали различные солевые буферы: PBS, SSC, раствор Денхардта, коммерческие буферы для ревертазы ("Promega", США) и ULTRAHyb® буфер ("Ambion", США). В качестве забивочных реагентов выбрали бычий сывороточный альбумин (BCA), желатин, неспецифическую дрожжевую tPHK и Cot-1 ДНК человека. В экспериментах варьировал процентный состав компонентов разных буферов, а также оценивали влияние наличия детергента SDS различной процентности на результат гибридизации. Оптимальным для разрабатываемого микрочипа выбрали гибридизационный буфер, содержащий 20% формамид, 1% BCA, трехкратный SSC-буфер и 1% SDS. Оптимальный объем продукта одностадийной ОТ-ПЦР, содержащего анализируемую флюоресцентно меченую Су5-кДНК, составлял 1–2 мкл на каждые 50 мкл гибридизационной смеси. Оптимальную температуру для гибридизации выбрали равной 37°C, время гибридизации 2 ч. После этого проводили отмывку слайда от гибридизационного буфера и несвязавшихся молекул пробы. По итогам экспериментов по оптимизации серии отмывок решили остановиться на следующем алгоритме: трехкратный SSC-буфер – 2 мин, однократный SSC-буфер – 2 мин. Затем гибридизационную рамку снимали и слайд отмывали целиком в Milli-Q H<sub>2</sub>O 2 мин, после чего сушили в центрифуге при 300 g в течение 2 мин и сканировали на флюоресцентном сканере.

Для оценки специфичности разработанного микрочипа проводили гибридизационный анализ проб ВГА, охарактеризованных ранее методами ОТ-ПЦР и иммуноферментного анализа в РГП "НИИ проблем биологической безопасности" КН МОН РК и ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России. В качестве референсных отобрали 47 штаммов ВГА человека и животных, принадлежащих к 18 различным подтипам. При тестировании микрочипа на выбранных 47 изолятах ВГА однозначно субтипировали 45 образцов. Для них достоверно значимый уровень флюоресценции наблюдали только для точек, соответствующих специфическим подтипам ВГА, тогда как величина интенсивности флюоресценции для всех остальных точек находилась на значительно меньшем уровне или была сопоставима с погрешностью (рис. 2; дана выборка из 12 разных подтипов ВГА).

Для количественной оценки регистрируемого сигнала, получаемого после гибридизации на микрочипе, проводили расчет величины интенсивности флюоресценции каждой точки с помощью программы ScanArray Express 3.0. На выходе программа выдает матрицу данных, для анализа которых мы разработали программу MArrAnalyzer. За величину интенсивности флюоресценции зонда принимали медианное значение флюоресценции трех точек, соответствующих этому зонду, исключая величину флюоресценции фона. Программа MArrAnalyzer, адаптированная под разрабатываемый микрочип для субтипирования ВГА, позволяет автоматически анализировать данные, получаемые после обработки изображения флюоресценции точек на микрочипе, и выдавать однозначный ответ в формате "да/нет" с учетом пороговых значений. Анализируемый штамм относили к определенному подтипу ВГА, если величина интенсивности флюоресценции зонда была сравнима с флюоресценцией положительных контролей M2 и NP. С использованием программы MArrAnalyzer по результатам сканирования микрочипов после проведения гибридизационного анализа флюоресцентно меченых

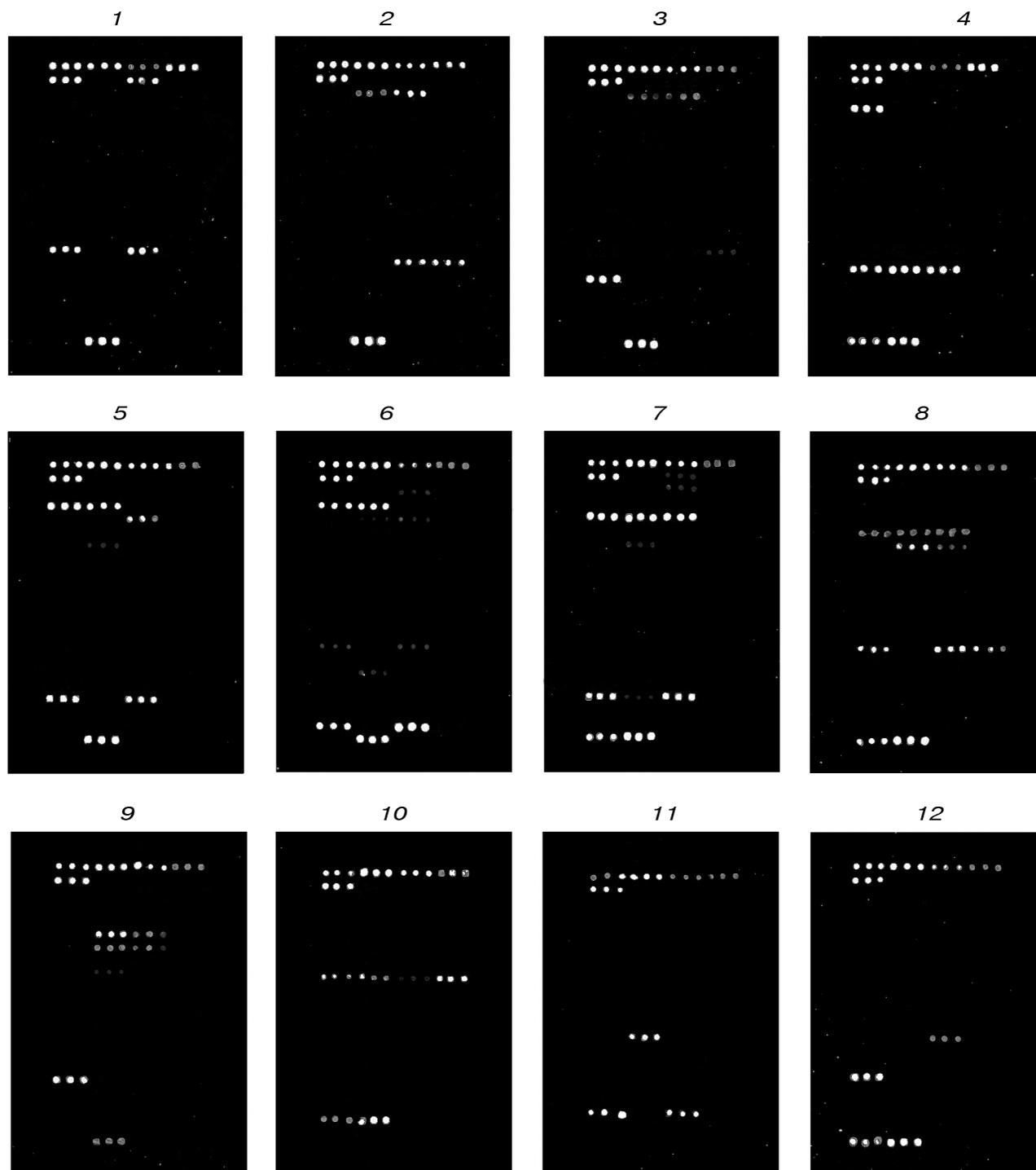


Рис. 2. Результаты сканирования микрочипов после проведения гибридационного анализа флуоресцентно меченых проб, полученных от образцов различных подтипов ВГА.

Здесь и на рис. 3: 1 – А/утка/Альберта/35/76 (H1N1); 2 – А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2); 3 – А/утка/Германия/215/73 (H2N3); 4 – А/Самара/68/08 (H3N2); 5 – А/чирок-грескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6); 6 – А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8); 7 – А/утка/Чехословакия/56 (H4N6); 8 – А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H5N1); 9 – А/крачка/ЮА/59 (H5N3); 10 – А/Алматы/331/06 (H7N7); 11 – А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6); 12 – А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3).

проб ВГА определили величину интенсивности флуоресценции зондов и построили гистограммы (рис. 3; графики соответствуют изображениям флуоресценции точек, представленных на рис. 2).

Из анализируемых 47 штаммов 2 определялись неоднозначно. Так, например, несмотря на то, что штамм А/утка/Германия/215/73 (H2N3) (рис. 3, № 3) достоверно был отнесен к НА второго подтипа, величина интенсивности флуоресценции набора зондов, характеризующих

данный подтип, была значительно ниже, чем у положительных контролей. В случае более высоких значений неспецифической флуоресценции субтипирование этого штамма было бы затруднено. Кроме того, для некоторых однозначно субтипированных штаммов на фоне высокого специфического сигнала наблюдали и незначительную неспецифическую флуоресценцию. Однако более тонкий подбор условий гибридации позволит минимизировать неспецифический сигнал.

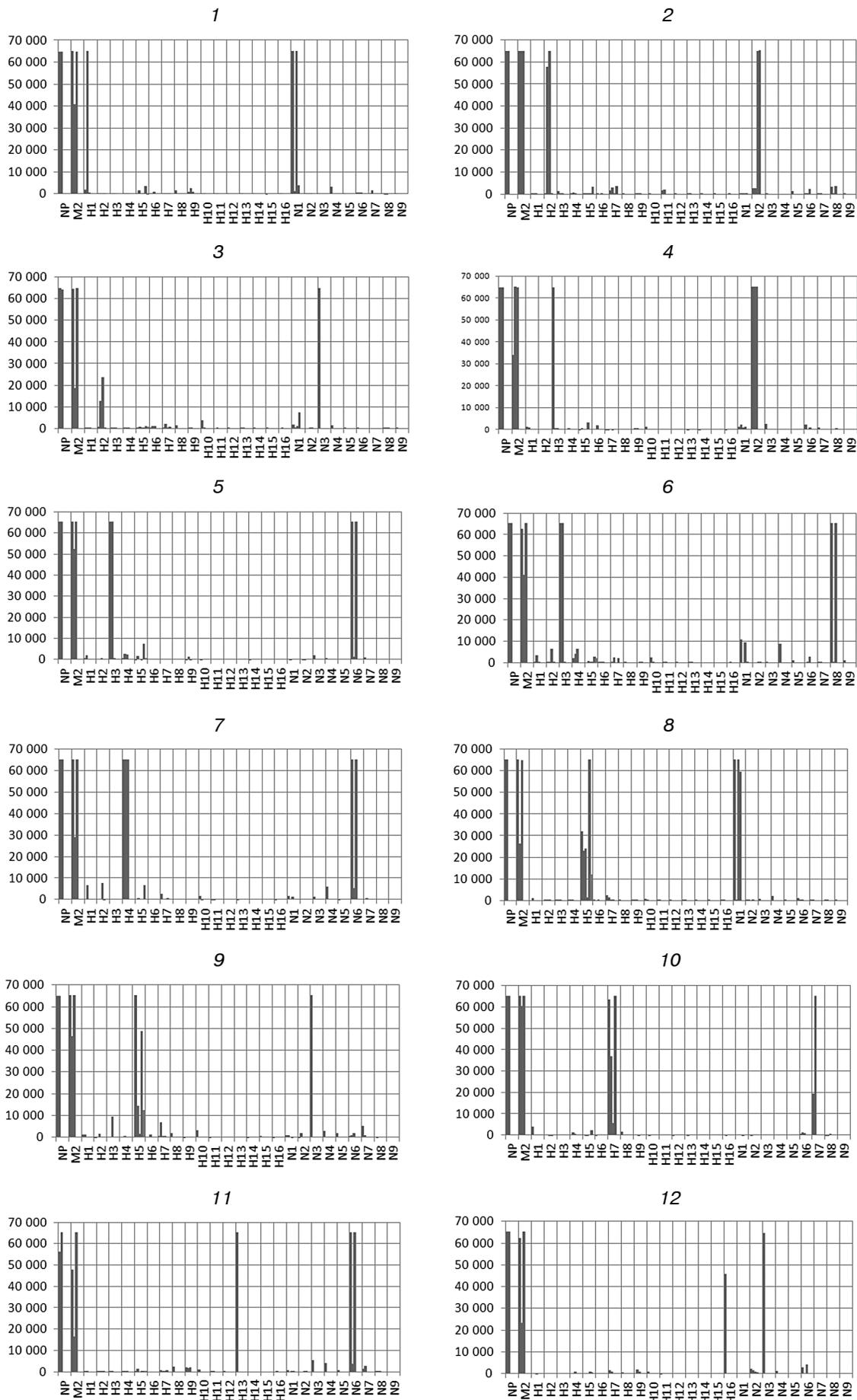


Рис. 3. Гистограммы величин интенсивности флуоресценции зондов, полученных с помощью программы MArrAnalyzer по результатам обсчета данных после обработки изображения флуоресценции точек (см. рис. 2).

Использование олигонуклеотидных биочипов для субтипирования ВГА с высокой чувствительностью дает возможность проводить одновременные детекцию, типирование и субтипирование десятков образцов в рамках одного эксперимента. Чувствительность разработанного биологического микрочипа сопоставима со стандартным анализом на основе ОТ-ПЦР, при этом методом гибридизации на микрочипе субтипировали даже те пробы, ампликоны которых электрофоретически не выявлялись. При анализе в ОТ-ПЦР брали 50 пкг вирусной РНК. В дальнейшем предполагается определить аналитическую чувствительность разработанного микрочипа. Следует отметить, что описанный метод позволяет при необходимости проводить скрининг не только по НА и NA, но и по всем остальным генам ВГА. Единственным недостатком предложенного метода можно считать невозможность однозначного субтипирования ВГА разных подтипов при коинфекции.

Проведение мероприятий комплексного надзора за гриппом, а также его профилактики и лечения требует создания чувствительных, надежных, высокопроизводительных и быстрых методов определения подтипов ВГА. Одним из таких подходов является активно развивающийся метод диагностических биологических микрочипов, который в скором будущем может перейти из научных лабораторий в медицинскую практику.

*Исследование выполнено при поддержке КН МОН РК и Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8121 от 23.10.2012.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Kiselev O. I.* Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1v-2009. СПб.: Димитрейд График Групп; 2011.
2. *Debouck C., Goodfellow P. N.* DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat. Genet.* 1999; 21(1): 48–50.
3. *Fesenko E. E., Kireyev D. E., Gryadunov D. A.* et al. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. *Influenza Other Respi. Viruses.* 2007; 1(3): 121–9.
4. *Han X., Lin X., Liu B.* et al. Simultaneously subtyping of all influenza A viruses using DNA microarrays. *J. Virol. Methods.* 2008; 152(1–2): 117–21.
5. *Hoffmann E., Stech J., Guan Y.* et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2001; 146(12): 2275–89.
6. *Katoh K., Asimeno G., Toh H.* Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol. Biol.* 2009; 537: 39–64.
7. *Kessler N., Ferraris O., Palmer K.* et al. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5): 2173–85.
8. *Klotchenko S. A., Vasin A. V., Sandybaev N. T.* et al. Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses. *J. Physiol. Conf. Ser.* 2012; 345(012041): 1–8.
9. *Li J., Chen S., Evans D. H.* Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(2): 696–704.
10. *Lysov Y., Florentiev V., Khorlin A.* et al. A new method to determine the nucleotide sequence by hybridizing DNA with oligonucleotides. *Proc. Acad. Sci. USSR.* 1988; 303: 1508–11.
11. *Sengupta S., Onodera K., Lai A.* et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4542–50.
12. *Vasin A. V., Sandybaev N. T., Plotnikova M. A.* et al. Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications. *J. Physiol. Conf. Ser.* 2011; 291(012006): 1–6.
13. *Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M.* et al. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009; 25(9): 1189–91.
14. *Wernersson R.* Probe design for expression arrays using OligoWiz. *Methods Mol. Biol.* 2009; 529: 23–36.

#### REFERENCES

1. *Kiselev O. I.* Genome of Pandemic Influenza A/H1N1–2009/10 Virus. St. Petersburg; 2011 (in Russian).
2. *Debouck C., Goodfellow P. N.* DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat. Genet.* 1999; 21(1): 48–50.
3. *Fesenko E. E., Kireyev D. E., Gryadunov D. A.* et al. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. *Influenza Other Respi. Viruses.* 2007; 1(3): 121–9.
4. *Han X., Lin X., Liu B.* et al. Simultaneously subtyping of all influenza A viruses using DNA microarrays. *J. Virol. Methods.* 2008; 152(1–2): 117–21.
5. *Hoffmann E., Stech J., Guan Y.* et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2001; 146(12): 2275–89.
6. *Katoh K., Asimeno G., Toh H.* Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol. Biol.* 2009; 537: 39–64.
7. *Kessler N., Ferraris O., Palmer K.* et al. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5): 2173–85.
8. *Klotchenko S. A., Vasin A. V., Sandybaev N. T.* et al. Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2012; 345(012041): 1–8.
9. *Li J., Chen S., Evans D. H.* Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(2): 696–704.
10. *Lysov Y., Florentiev V., Khorlin A.* et al. A new method to determine the nucleotide sequence by hybridizing DNA with oligonucleotides. *Proc. Acad. Sci. USSR.* 1988; 303: 1508–11.
11. *Sengupta S., Onodera K., Lai A.* et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10): 4542–50.
12. *Vasin A. V., Sandybaev N. T., Plotnikova M. A.* et al. Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2011; 291(012006): 1–6.
13. *Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M.* et al. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009; 25(9): 1189–91.
14. *Wernersson R.* Probe design for expression arrays using OligoWiz. *Methods Mol. Biol.* 2009; 529: 23–36.

Поступила 05.07.12