

А.Н.Шиков¹, Е.И.Сергеева¹, О.К.Демина¹, В.А.Терновой¹, В.В.Рябинин², Е.В.Костина²,
Е.М.Малкова¹, А.Н.Синяков², А.П.Агафонов¹

РАЗРАБОТКА ДНК-БИОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СУБТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;

²Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Разработан ДНК-биочип для определения субтипов вируса гриппа А, патогенных для человека. Микрочип способен определять Н1, Н3, Н5-субтипы гемагглютинина (включая Н1-субтип гемагглютинина пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009)) и N1, N2-субтипы нейраминидазы вируса гриппа. Полученный микрочип был успешно апробирован на штаммах высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1, пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), сезонных вирусах гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2.

Ключевые слова: вирус гриппа А, биочип, субтипирование вируса гриппа.

A.N.Shikov¹, E.I.Sergeeva¹, O.K.Demina¹, V.A.Ternovoy¹, V.V.Ryabinin², E.V.Kostina², E.M.Malkova¹,
A.N.Sinyakov², A.P.Agaphonov¹

Development of DNA-Biochip for Identification of Influenza A Virus Subtypes

¹State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo;

²Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

Developed was the DNA-biochip to identify subtypes of influenza A virus, pathogenic for humans. Microchip was capable of detecting H1, H3, H5-subtypes of hemagglutinin (including H1-subtype of pandemic A/H1N1(2009) influenza virus) and neuraminidase subtypes N1,N2 of influenza virus. This microchip was successfully tested on the strains of A/H5N1 highly pathogenic avian influenza virus, A/H1N1(2009) pandemic influenza virus, A/H1N1 and A/H3N2 seasonal influenza viruses.

Key words: A influenza virus, biochip, subtyping of influenza virus.

Вирус гриппа типа А принадлежит семейству *Orthomyxoviridae*. Субтипирование вируса гриппа происходит согласно антигенной специфичности поверхностных гликопротеинов – гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA), в настоящее время известно 16 субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы [6]. Только комбинация из трех субтипов гемагглютинина вируса гриппа (Н1, Н2 и Н3) и двух субтипов нейраминидазы (N1 и N2) вызывали эпидемии и пандемии в прошлом [1]. Самой известной масштабной пандемией считается пандемия испанского гриппа (Н1N1) в 1918 г., жертвами которого стали по разным данным от 20 до 50 млн человек [4]. За ней следуют пандемии азиатского гриппа (Н2N2) в 1957 г. и гонконгского (Н3N2) в 1968 г., унесшие около 4 и 1 млн человеческих жизней соответственно [10]. В 2003 г. внимание человечества было приковано к новому высокопатогенному варианту гриппа птиц Н5N1, летальность для людей при котором достигает 60 % [5]. Опасения пандемии не подтвердились, однако периодические случаи заражения людей этим вариантом вируса гриппа регистрируются в Египте, Таиланде, Китае, Индонезии, Камбоджи, Вьетнаме, Турции [http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_12_09/en/index.html].

Весной 2009 г. появился новый вариант вируса гриппа Н1N1sw [3], содержащий в своем составе фрагменты геномов вирусов гриппа человека, птиц и свиней. В июне этого же года ВОЗ объявила о пандемии гриппа, вызванного этим вариантом

вируса [http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html]. Для своевременного реагирования и введения мероприятий, препятствующих быстрому распространению высокопатогенных вариантов вируса гриппа птиц и пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), в настоящее время остро встал вопрос о дифференциальной диагностике вируса гриппа и его субтипировании.

Основными методами субтипирования в настоящее время являются серологические (реакция торможения гемагглютинации – РТГА), а также методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако вследствие высокой скорости изменчивости поверхностных гликопротеинов НА и NA могут возникать трудности в субтипировании. По этой причине актуально использовать дополнительные методы диагностики, а также их комбинации для получения достоверного результата.

В настоящий момент детекция на основе ДНК-биочипа является одним из альтернативных методов дифференциальной диагностики вируса гриппа, так как этот метод позволяет совместить производительность метода амплификации нуклеиновых кислот и широкие возможности скрининга с помощью микрочипа. Ранее в литературе описывались попытки создать на основе ДНК-биочипов систему для детекции и субтипирования вируса гриппа [2, 7, 6].

Целью работы явилась оригинальная разработка ДНК-биочипа, выявляющего 6 субтипов (Н1, в том числе Н1sw пандемического вируса гриппа

A/H1N1(2009), H2, H3, H5, H7, H9) гемагглютинаина и 3 субтипа (N1, N2, N3) нейраминидазы для дифференциальной диагностики данных субтипов вируса гриппа типа А.

Материалы и методы

Штаммы вируса гриппа. В работе использовались штаммы вируса гриппа типа А: A/Aichi/2/68(H3N2), A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1), A/Novosibirsk/1/09(H1N1), A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1)v. Штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) был получен из НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва, а A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) – из НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург. Вирусы сезонного гриппа A/Novosibirsk/1/09(H1N1) и пандемического гриппа A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1) v выделены в ГНЦ ВБ «Вектор». Все штаммы были наработаны на культуре клеток MDCK (Madin Darby Canine Kidney), полученной из отдела клеточных технологий ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки культивировались в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при температуре 37 °С. Для поддержания культуры клеток использовали питательную среду DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 2 ммоль/л глутамина («Sigma-Aldrich», США) и антибиотиков: 100 мкг/мл пенициллина и 100 МЕ/мл стрептомицина.

Получение препаратов вируса гриппа типа А. Для исследования были использованы препараты вирусов, приготовленные следующим образом: на 5-е сутки после заражения из культуральных сосудов отбирали культуральную вируссодержащую жидкость (КВЖ). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 6000 g при температуре 4 °С в течение 10 мин, а к надосадочной жидкости добавляли полиэтиленгликоль – ПЭГ 6000 до конечной концентрации 8 % (масса/объем). Суспензию перемешивали в течение 1 ч при температуре 4 °С и затем центрифугировали 20 мин при 1000 g. Полученный осадок ресуспендировали в STE буфере (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,8) и наносили на градиент, состоящий из 10–60 % растворов сахарозы. Центрифугирование проводили в течение 4 ч при 150000 g. Фракции, содержащие по результатам реакции гемагглютинации (РГА) максимальное количество вируса гриппа, использовали для анализа.

Экстракция РНК и синтез кДНК вируса гриппа типа А. Вирусную РНК выделяли из объема 50 мкл с использованием коммерческого набора «РибоСорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции производителя. Комплиментарная ДНК синтезировалась на матрице суммарной РНК с использованием синтетического праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAAGCAGG-3', универсального для всех субтипов вируса гриппа. Синтез проводился в 20 мкл раствора, состоящего из 1 мкл праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAAGC

AGG-3' (20 мкМ), 9 мкл РНК и 2 мкл dNTP (10 mM) нагревали 10 мин при температуре 65 °С, охлаждали во льду, добавляли 4 мкл 5x кДНК буфера, 1 мкл 0,1 M DTT, 1 мкл РНКзина (40 а.е.), 1 мкл воды, 1 мкл обратной транскриптазы ThermoScript («Invitrogen», США). Смесь центрифугировали и инкубировали при температуре 55 °С – 5 мин, при 60 °С – 55 мин.

Изготовление микрочипов для субтипирования вируса гриппа типа А. Печатаемая микрочипы, зонды наносили на стеклянные, содержащие изотиоцианатную группу, слайды методом контактной печати на споттере BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer («BioRad», США).

Использованные для амплификации фрагменты генов нейраминидазы, гемагглютинаина, М1 белка матрикса пары праймеров приведены в таблице. Длина нарабатываемых ампликонов составляла ~830 и 600 нуклеотидов для гена нейраминидазы, ~600 и 800 нуклеотидов для гена гемагглютинаина и ~900 нуклеотидов для гена М1 соответственно.

Для получения флуоресцентно меченных ампликонов проводили ПЦР в асимметричном режиме. Состав реакционной смеси (50 мкл): буфер для ПЦР (1,5 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, трис-HCl, pH 8,7) («Qiagen», Германия), 1,5 mM MgCl₂, 200 nM dATP, dCTP, dGTP, 70 nM dTTP, 100 nM dUTP-Cy3, 80 nM прямого праймера, 1 мкМ обратного праймера, 1,25 ед. Hot Start Taq-полимеразы («Qiagen», Германия) и 2 мкл раствора кДНК. ПЦР проводили в термоциклере iCycler («BioRad», США), используя следующий протокол: 95 °С – 15 мин, затем 35 циклов: 94 °С – 30 с; 52–55 °С – 30 с; 72 °С – 10 с, финальная элонгация – 72 °С – 1 мин. Контроль прохождения ПЦР осуществляли электрофоретически, используя 1 % агарозный гель. Флуоресцентно меченные ампликоны очищали от избытка меченых трифосфатов на гель-фильтрующих колонках («Qiagen», Германия), высушивали досуха на вакуумной центрифуге при температуре 60 °С.

Гибридизация анализируемых ампликонов. Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл 2-кратного гибридационного буфера (1-кратный гибридационный буфер: 6x SSC, 5x раствор Денхардта, 0,1 % Tween 20) и прогревали перед нанесением на слайд 2 мин при температуре 97 °С, а затем охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в гибридационной камере («ArrayIt», США) при температуре 55–60 °С в течение 2 ч. Затем слайд последовательно отмывали в растворах 6x SSC, 2x SSC + 0,1 % SDS, 2x SSC и 1x SSC, центрифугировали и сканировали на сканере Scan Array Express 2.0 («Perkin Elmer», США) при длине волны возбуждающего лазера $\lambda = 543$ нм.

Результаты и обсуждение

Первая публикация о разработке ДНК-биочипа была в журнале Science в 1995 г. [11], за 15 лет этот

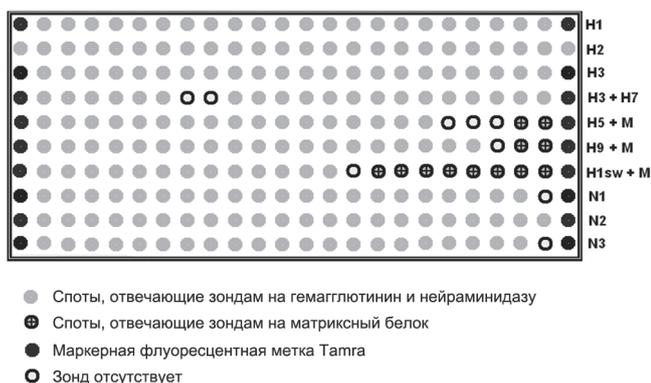


Рис. 1. Структура биочипа для идентификации субтипов вируса гриппа А, потенциально опасных для человека

метод занял значительное место в области биосенсорных технологий. В настоящее время ДНК-биочипы широко используются в исследовании нуклеиновых кислот и белков, современные ДНК-биочипы позволяют проводить количественные исследования экспрессии генов и точечных мутаций.

В мире разработаны биочипы для идентификации и типирования энтеровирусов [12], субтипирования вируса гриппа [2, 7, 6], генотипирования вируса кори [9], дифференциальной диагностики микозов [8] и другие.

В данной работе представлен метод выявления вируса гриппа и субтипирования гемагглютинина (субтипов Н1, в том числе Н1sw пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), Н2, Н3, Н5, Н7, Н9) и 3 субтипа (N1, N2, N3) на основе оригинального ДНК-биочипа. На рис. 1 представлена схема разработанного биочипа.

Нанесение зондов осуществляли на стеклянные, содержащие изотиоцианатную группу, слайды. Каждый слайд содержал 6 эквивалентных микромассивов зондов (микроэррей). Средний диаметр спотов (ячеек микрочипа с иммобилизованными зондами) был ~360 мкм, расстояние между спотами ~760 мкм. Формат микроэррея составлял 24×10 спотов. Печать проводилась из 384-луночного планшета (24×16).

На рис. 1 приведено расположение зондов на планшете и, соответственно, в микроэррее. В край-

ние ячейки каждой строки планшета, за исключением строки В, добавлялся маркерный зонд, несущий на 3'-конце аминокислотную группу, необходимую для иммобилизации на поверхности слайда, а на 5'-конце – флуорофор на основе тетраметилродамина (Tamra), позволяющий визуализировать границы субэррея и определять качество печати чипа.

Каждый микромассив ДНК-биочипа, предназначенный для субтипирования одного штамма вируса, содержит зонды выявляющие Н1, Н1sw, Н2, Н3, Н5, Н7, Н9-субтип гена гемагглютинина и N1, N2, N3-субтип гена нейраминидазы, а также зонды, выявляющие ген М1 вируса гриппа типа А. Последние зонды используются для подтверждения, что анализируемый вирус относится именно к типу А. Левый и правый края микроэррея образуют споты, содержащие флуоресцентную метку. Они предназначены для контроля печати слайда и позиционирования спотов при измерении их флуоресценции. Один микрочип может содержать до 6 микромассивов зондов. Таким образом, на одном микрочиповом слайде можно проанализировать 6 различных изолятов вируса гриппа.

Принципиальная схема субтипирования генов вируса гриппа А на микрочипе включает следующие стадии:

- из анализируемого образца выделяют суммарную РНК;

- с использованием универсального праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGG-3', специфичного к РНК вируса гриппа типа А, получают кДНК;

- с помощью праймеров 5'-СТАТАGGGAGCAA AAGCAGGAGT-3' и 5'-САСТАТАГААГТАГАААС ААГГАГТТТТТТ-3', специфичных к гену нейраминидазы, из кДНК путем проведения ПЦР получают полноразмерный ампликон гена нейраминидазы вируса гриппа типа А;

- полученный ампликон реамплифицируют в асимметричном режиме с праймерами NA_F1 и NA_R1, NA_F2 и NA_R2 (таблица) и метят путем введения флуоресцентной метки в его состав;

- аналогичным образом, используя праймеры HA_F1 и HA_R1, HA_F2 и HA_R1 (таблица), полу-

Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных при разработке ДНК-биочипа для субтипирования вируса гриппа

Праймер	Длина*	Структура праймера (5' – 3')	Ген
NA_F1	23	СТАТАGGGAGCAAAAGCAGGAGT (1 (2))	NA
NA_R1	22	ТААСAGGARCYTCTCARTG	
NA_F2	23	САУТАYGAGGARTGYTCTCTGTTA 1	
NA_R2	30	САСТАТАГААГТАГАААСААГГАГТТТТТТ 12	
HA_F1	28	GACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGGGG	HA
HA_R1	23	TCWATRAANCCNGCDATDGCCHCC	
HA_F2	23	GGDGCHATHGCNGGNTTYATWGA	
HA_R2	34	GGTGACACTATAGAAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	
M_T7_F	38	GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	M1
M_SP6_R	43	GACATTTAGGTGACACTATAGAAGTAGAAACAAGGTAGTTTT	

*Длина праймера в нуклеотидах.

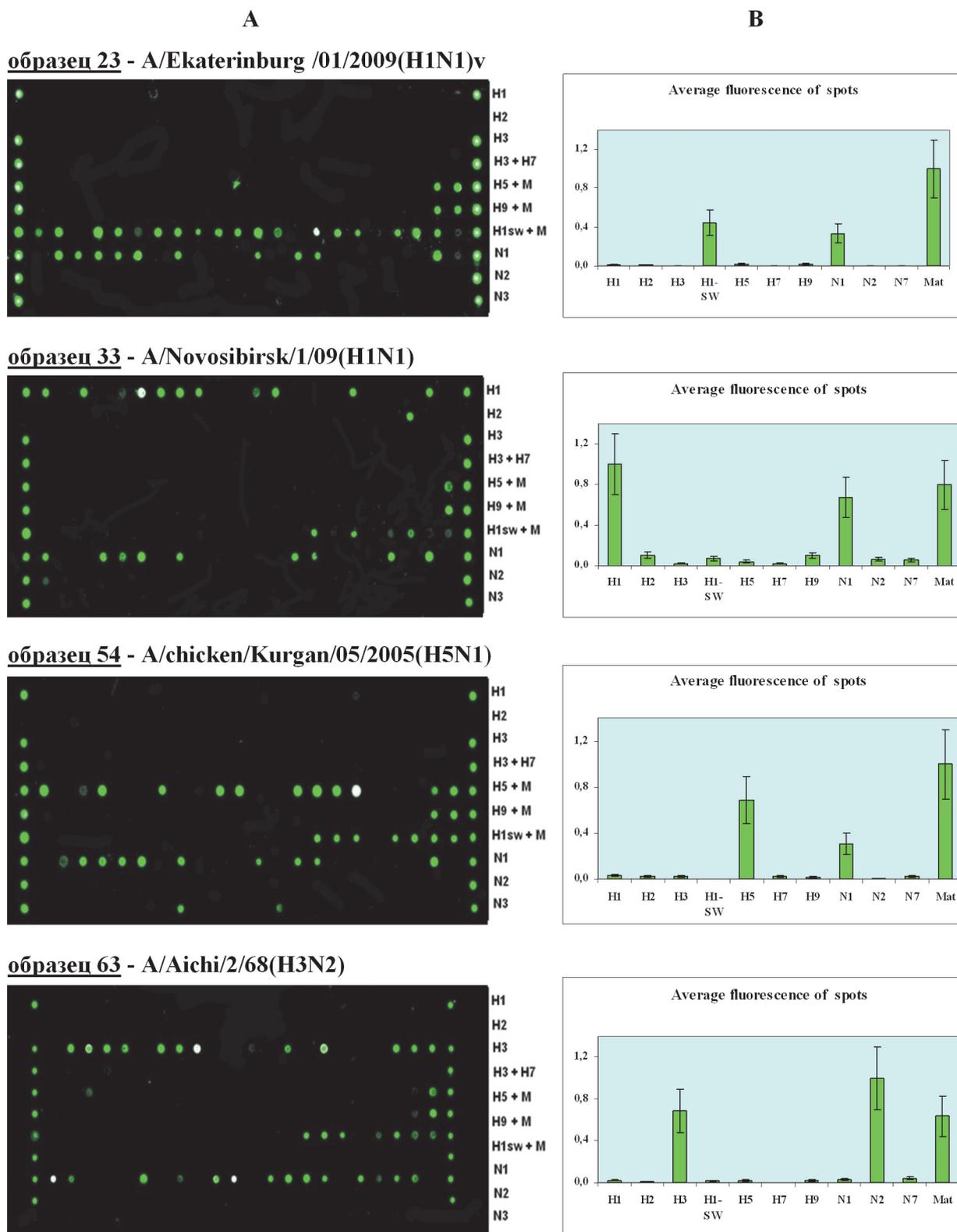


Рис. 2. Результаты анализа субтипироваемых штаммов гриппа:

A – гибридационный паттерн анализируемого штамма. *B* – результаты субтипирования после подсчета среднего значения флуоресцирующих спотов. *H1, H2, H3 H1v* (субтип пандемического вируса гриппа 2009), *H5, H7, H9* – субтипы гена гемагглютинина, *N1, N2, N7* – субтипы гена нейраминидазы, *Mat* – маркер гена матричного белка

чают флуоресцентно меченные ампликоны гена гемагглютинина;

- используя праймеры M_T7_F и M_SP6_R (таблица), получают флуоресцентно меченные ампли-

коны гена M1 белка матрикса вируса гриппа типа A; - на следующей стадии проводят гибридацию смеси полученных ампликонов с дискриминирующими зондами, входящими в состав разработанного

микрочипа;

- анализ результатов гибридизации проводят с помощью сканера микрочипов и программы ScanArray Express («Perkin-Elmer», США).

Для объективного представления результатов гибридизации на микрочипе проводили анализ результатов сканирования чипа не визуально, а инструментально. С этой целью нами после проведения сканирования проводился анализ флуоресценции спотов с использованием программы ScanArray Express («Perkin-Elmer», США). Результаты анализа представляются в виде гистограммы. При определении субтипа вируса гриппа определяли среднее значение флуоресценции спота каждого субтипа. Экспериментально установлено, что такой подход дает лучшие результаты при оценке соотношения сигнал/шум.

При помощи созданного ДНК-биочипа были проанализированы кодированные пробы вируса гриппа типа А субтипа Н3N2 (штамм А/Аichi/2/68(Н3N2)), субтипа Н5N1 (штамм А/chicken/Kurgan/05/2005(Н5N1)), субтипа Н1N1 (штамм А/Novosibirsk/1/09 (Н1N1)) и пандемического вируса гриппа А субтипа Н1N1 (А/Еkaterinburg/01/2009(Н1N1)v). Анализируемые образцы были успешно субтипированы с помощью разработанного микрочипа (рис. 2).

При исследовании анализируемых проб значение специфической флуоресценции достоверно превышало значение фоновой ($P < 0,05$). Кроме того, во всех образцах достоверно детектирован М ген.

Таким образом, был разработан ДНК-биочип, выявляющий сезонные штаммы вируса гриппа Н1N1 и Н3N2 субтипов, высокопатогенный вирус гриппа птиц субтипа Н5N1 и пандемический вариант вируса гриппа субтипа Н1N1(2009). Преимуществом используемого микрочипа является одновременное субтипирование анализируемого изолята вируса гриппа со всеми возможными зондами, специфическими для каждого субтипа гемагглютинина и нейраминидазы. Показана принципиальная возможность использования для диагностики и субтипирования высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1, пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), сезонных вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 ДНК-биочипа. Наличие специфических зондов для Н7 и Н9-субтипов вируса гриппа потенциально позволяет разработанному микрочипу выявлять и эти субтипы. Очевидна необходимость оценки чувствительности полученного метода в последующей работе. При дальнейшем усо-

вершенствовании данная разработка является перспективной как дополнительный, альтернативный метод субтипирования вируса гриппа типа А. Также этот метод имеет перспективы для использования его в практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burke A. Cunha* Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2004; 18:141–55.
2. *Fesenko E.E., Kireyev D.E., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V., L'vov D.K. et al.* Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. *Influenza Other Respi Viruses.* 2007; 1(3):121–9.
3. *Garten R.J., Davis C. T., Russell C.A. et al.* Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009; 325:197–8.
4. *Gottfredsson M., Halldorsson B., Jonsson S. et al.* Lessons from the past: Familial aggregation analysis of fatal pandemic influenza (Spanish flu) in Iceland in 1918. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 2008; 105:1303–8.
5. *Guleria R., Kumar J., Mohan A., Wig N.* Influenza A: from highly pathogenic H5N1 to pandemic 2009 H1N1. Epidemiology and clinical features. *Indian J. Microbiol.* 2009; 49:315–9.
6. *Huang Y., Tang H., Duffy S., Hong Y., Norman S., Ghosh M. et al.* Multiplex Assay for Simultaneously Typing and Subtyping Influenza Viruses by Use of an Electronic Microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(2):390–6.
7. *Kessler N., Ferraris O., Palmer K., Marsh W., Steel A.* 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. *Leinberger D.M., Schumacher U., Autenrieth I.B., Bachmann T.T.* Development of a DNA Microarray for Detection and Identification of Fungal Pathogens Involved in Invasive Mycoses. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4943–53.
9. *Neverov A.A., Riddell M.A., Moss W.J., Volokhov D.V., Rota P.A. et al.* Genotyping of Measles Virus in Clinical Specimens on the Basis of Oligonucleotide Microarray Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:3752–9.
10. *Peiris J.S.M., Menno D.J., Guan Y.* Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health. *Clin. Microbiol.* 2007; 20(2):243–67.
11. *Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270:467–70.
12. *Susi P., Hattara L., Waris M., Luoma-aho T., Siitari H., Hyypiä T., Saviranta P.* Typing of Enteroviruses by Use of Microwell Oligonucleotide Arrays. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:1863–70.

Authors:

Shikov A.N., Sergeeva E.I., Demina O.K., Ternovoy V.A., Malkova E.M., Agaphonov A.P. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Ryabinin V.V., Kostina E.V., Sinyakov A.N. Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine. Novosibirsk, Russia.

Об авторах:

Шиков А.Н., Сергеева Е.И., Демина О.К., Терновой В.А., Малкова Е.М., Агафонов А.П. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Рябинин В.В., Костина Е.В., Сияков А.Н. Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Новосибирск

Поступила 24.11.11.