

## ДИЗАЙН ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА А/Н5N1.

Вирусы гриппа (ВГ) человека типов А и В ежегодно инфицируют около 15% населения планеты, во многих случаях являясь причиной тяжелых форм респираторных заболеваний. Повторяющиеся эпидемии, генетическая вариабельность белков оболочки вируса, способность к изменчивости и широкому распространению, а также угроза возникновения новых пандемий в связи с появлением в циркуляции новых высокопатогенных штаммов А/Н5N1 свидетельствуют о необходимости создания быстрых, эффективных и надежных методов определения подтипов ВГ и идентификации различных штаммов [1, 2]. Технология микрочипов (microarray) является одним из наиболее эффективных современных методов для одновременного выявления присутствия множества различных вирусов в исследуемом образце [3].

Для выявления ВГ человека А/Н5N1 в качестве мишеней, наносимых на модифицированную поверхность предметного стекла (слайда), в данной работе использовались специально подобранные олигонуклеотиды, способные к высокоспецифичной гибридизации с генами гемагглютинина (НА5), нейраминидазы (NA1) и матриксного белка (MP1). Для ВГ человека А/Н5N1 на июнь 2007 года было полностью известно 73 кодирующих последовательности гена НА5, 138 последовательностей для гена NA1 и 120 кодирующих последовательностей для гена MP1. Все нуклеотидные последовательности генов НА5 (NA1, MP1) были проанализированы с целью выявления минимального числа олигонуклеотидных сайтов (длиной от 40 до 60 нуклеотидов), которые можно было бы использовать в качестве универсальных олигонуклеотидных мишеней в случае присутствия любого из зарегистрированных ВГ человека А/Н5N1 в исследуемом образце. Анализ проводился с использованием программ MEGA3.1 (выравнивание, филогенетический анализ, нахождение гомологичных сайтов) и Oligowiz2.0 (расчет независимых параметрических коэффициентов, позволяющих выбрать оптимальный олигонуклеотид).

Олигонуклеотиды, подобранные к генам НА5, NA1 и MP1 были проверены с помощью программы Blast [4] на предмет возможной гомологии со всеми зарегистрированными последовательностями базы данных GenBank. Подобранные олигонуклеотиды не имели высокой степени гомологии с какими-либо человеческими генами или генами других вирусов.

Таким образом, для выявления ВГ человека А/Н5N1 было подобрано 6 олигонуклеотидов, теоретически выявляющих до 90% секвенированных ВГ данного подтипа (для генов НА5 подобрано два олигонуклеотида, каждый длиной в 51 нуклеотидов, для генов NA1 — три длиной в 50, 49 и 47 нуклеотидов, и для генов MP1 — один олигонуклеотид длиной в 41 нуклеотидов).

Также были экспериментально определены оптимальные параметры печати микрочипов на споттере SpotArray24 (Perkin Elmer, USA).

Подобранные олигонуклеотиды были синтезированы для дальнейшей экспериментальной проверки их специфичности и подбора оптимальных условий гибридизации проб на созданном микрочипе.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Bryant P, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. THE LANCET Infectious Diseases – 2004 – V.4. – P.100-111.

2. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila P, Boushey H, Ganem D, DeRisi J. Proc. Nat. Acad. Sci. – 2002 – V.99. – P.15687–15692.
3. Townsend M, Smagla J, Dankbar D, Moore S. Journal of Clinical Virology – 2006 – V.44. – P.2836-2871.
4. [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov).