

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО БИОЧИПА

Клотченко С.А.^{1,2}, Теперева К.С.¹, Бурылев В.В.², Плотникова М.А.¹, Смирнова Т.Д.¹,
Егоров В.В.¹, Чеботкевич В.Н.², Васин А.В.¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения и
социального развития РФ, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17,
(812)346-10-80, vasin@influenza.spb.ru

²ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии» ФМБА РФ, 193024, г. Санкт-Петербург, 2-я Советская улица, д. 16,
(812)717-29-58, vitnikcheb@mail.ru

Резюме

По результатам многочисленных исследований показано, что более 90 процентов населения инфицированы одним или несколькими штаммами клинически значимых герпесвирусов. Если у иммунокомпетентных людей герпесвирусных инфекций (ГВИ) чаще протекают доброкачественно, то у иммунокомпрометированных пациентов (при СПИДе у онкогематологических больных и др.) герпесвирусы вызывают тяжелые заболевания, часто со смертельным исходом. По данным Всемирной Организации Здравоохранения смертность от ГВИ среди всех вирусных заболеваний находится на втором месте (15,8 %) после гепатитов (35,8 %). Они требуют быстрой диагностики и безотлагательного этиотропного лечения. Отличительным признаком всех представителей этой группы является их длительное нахождение в клетках в латентном состоянии без клинических проявлений. Так как клиническая диагностика ГВИ трудна, а часто и невозможна, используются различные лабораторные методы, в основном полимеразная цепная реакция. В работе предложен новый метод диагностики герпесвирусов человека (ВГЧ) с применением технологии олигонуклеотидных биочипов. Разработанный биочип позволяет проводить одновременную детекцию восьми ВГЧ: вирусов простого герпеса 1 и 2-го типов (ВПГ-1 и 2), вируса опоясывающего лишая (ВЗВ), вируса Эпштейна — Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ) и герпесвирусов 6, 7 и 8 типов (ВГЧ-6, 7 и 8). Созданный лабораторный образец биочипа специфично выявляет как контрольные образцы ДНК герпесвирусов, накопленных на культивируемых клетках человека, так и клинические образцы ДНК пациентов с ГВИ. Данный метод может найти применение для ранней диагностики врожденных герпесвирусных инфекций, у новорожденных детей группы риска и мониторинга пациентов при трансплантации органов и тканей.

Ключевые слова: герпесвирусы, олигонуклеотидный биочип, ПЦР, молекулярная диагностика.

DETECTION OF HERPESVIRUSES USING OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAY

Klotchenko S.A.^{1,2}, Tepereva K.S.¹, Burylev V.V.², Plotnikova M.A.¹, Smirnova T.D.¹, Egorov V.V.¹, Chebotkevich V.N.², Vasin A.V.¹

¹*Research Institute of Influenza of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

²*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia*

Abstract

The literature data revealed that more than 90 percent of population are infected with one or more strains of clinically important herpesviruses. Herpesvirus infections are not severe in immunocompetent patients, while in immunocompromised patients this agents caused very severe often life-threatening infections . The number of Herpesvirus infections are the second largest (15,8%) after hepatitis (35,8%) according WHO data. They require rapid diagnosis and prompt treatment. Since the clinical diagnostics of herpesvirus infections is complicated and often impossible, various laboratory methods, mainly polymerase chain reaction, are used. In this paper we proposed a new method for human herpesvirus diagnostics using oligonucleotide microarray technology. The developed biochip allows simultaneous detection of eight human viruses: Herpes simplex virus 1 and 2 types (HSV-1 and 2), Varicella zoster virus (VZV), Epstein–Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV) and Herpesviruses 6, 7 and 8 types (HHV 6, 7 and 8). The laboratory sample biochip specifically identifies the control samples of DNA of herpesviruses accumulated in cultured human cells as well as the clinical samples of DNA of patients with herpesvirus infections. The method can be used in monitoring of infection in different group of immunocompromised patients.

Key words: herpesviruses, oligonucleotide microarray, PCR, molecular diagnostics

Введение

Герпесвирусы относятся к семейству *Herpesviridae*, состоящему из трех подсемейств: альфагерпесвирусы (*Alphaherpesvirinae*), бетагерпесвирусы (*Betaherpesvirinae*) и гаммагерпесвирусы (*Gammaherpesvirinae*), а также группы неклассифицируемых вирусов. Разделение на подсемейства основано на характере

репликации вирусов, круге хозяев, белковом составе вириона и структуре генома [1]. Вирусы герпеса широко распространены в природе и инфицируют в основном млекопитающих и птиц, однако существенная часть неклассифицируемых вирусов имеет хозяев среди пресмыкающихся, земноводных, рыб, моллюсков и даже грибов.

У человека выделяют восемь видов вирусов герпеса (ВГЧ-1—8), вызывающих разные по тяжести процесса заболевания [2]: вирусы простого герпеса типов 1 и 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2), вирус опоясывающего лишая (ВЗВ), вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ), цитомегаловирус (ЦМВ), вирусы герпеса человека 6, 7 и 8-го типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7 и ВГЧ-8, соответственно).

Отличительным признаком всех герпесвирусов является их длительное нахождение в клетках в латентном состоянии без клинических проявлений. По результатам многочисленных исследований установлено, что к восемнадцати годам более 90 % городского населения инфицированы одним или несколькими штаммами клинически значимых ВГЧ [3].

Если у иммунокомпетентных людей ГВИ чаще протекают доброкачественно, то у иммунокомпрометированных пациентов (при СПИДе у онкогематологических больных и др.) герпесвирусы вызывают тяжелые заболевания, часто со смертельным исходом. По данным Всемирной Организации Здравоохранения смертность от ГВИ среди всех вирусных заболеваний находится на втором месте (15,8 %) после гепатитов (35,8 %).

Разнообразие и широкая распространенность ВГЧ обуславливают необходимость создания чувствительных универсальных методов лабораторной молекулярной диагностики, позволяющих обнаруживать вирусные молекулы ДНК, РНК или белка, либо регистрировать специфический иммунный ответ организма на наличие вируса. В настоящее время для диагностики ГВИ применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), а также выделение вирусов на культуре тканей. Наиболее точным и быстрым способом обнаружения ВГЧ считается ПЦР-диагностика, однако и она не лишена недостатков.

Наиболее перспективным подходом к диагностике вирусных инфекций является метод молекулярных биочипов, который по сравнению с вышеперечисленными методами дает возможность диагностики нескольких сотен генов вирусов в рамках одного эксперимента. Создание диагностических микрочипов стало возможным благодаря прогрессивному развитию методов гибридизации в молекулярной биологии, расширению применения флуоресцентной микроскопии в клеточной биологии и систематизации накопления данных о геномных последовательностях различных организмов [4]. Эффективность применения микрочипов обусловлена возможностью параллельного

проведения большого числа специфических взаимодействий молекул биополимеров. При этом удастся в достаточно простых экспериментах собрать и обработать на отдельных элементах биочипа огромное количество биологической информации [4].

Цель работы - создание лабораторного образца диагностического олигонуклеотидного биочипа для выявления вирусов герпеса человека.

Материалы и методы

В работе использовали стерильную пластиковую посуду “Axygen” (США), реактивы производства “Serva” (США), “Sigma” (США), “Invitrogen” (США), ферменты производства “Promega” (США), “Fermentas” (Литва) и «Медиген» (Россия). Олигонуклеотиды и модифицированные дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ) заказывали в компании “ДНК-Синтез” (Россия). Культуры клеток Vero, NC-37, FLECH 385 предоставлены лабораторией клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ; клинический материал (пробы крови, слюны, мочи и ликвора) получены от пациентов клиники Российского НИИ гематологии и трансфузиологии. Олигонуклеотидные зонды и праймеры подбирали в программах “OligoWiz 2.1” [5] и “Primer-BLAST” [6], соответственно; специфичность выбранных последовательностей проверяли в программе BLAST [7].

Выделение ДНК. ДНК выделяли методом фенольной экстракции по стандартной методике [8]. Измерение концентрации ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop (“NanoDrop Technologies”, США).

Полимеразная цепная реакция. Реакцию проводили в 30 мкл реакционной смеси (5 ед. Taq-полимеразы в 1× Taq-буфере, 4 mM MgCl₂, 250 мкМ дНТФ, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, 2 мкл ДНК) в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 94 °C — 5 мин; 42 цикла: 94 °C — 20 сек, 57,5 °C — 20 сек, 72 °C — 20 сек; 72 °C — 7 мин. ПЦР для выявления β-актина человека проводили в тех же условиях по программе: 94 °C — 5 мин; 28 циклов: 94 °C — 1 мин, 59 °C — 1 мин, 72 °C — 1 мин; 72 °C — 7 мин. Последовательности использованных в работе праймеров приведены в табл. 1.

Электрофорез ДНК. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в 1 % агарозном геле с использованием 1× трис-боратного буфера в камере Mini-Sub Cell GT (“Bio-Rad”, США). Гели документировали с помощью системы Kodak Image Station (“Kodak”, США).

Печать биочипа. Олигонуклеотидные зонды (в концентрации 300 нг/мкл в 3× SSC-буфере) иммобилизовали на альдегидные слайды [Vantage Aldehyde Slides](#) методом контактной печати с использованием иглы 946MP4 на споттере SpotBot® 3 Protein Edition

(“ArrayIt”, США) в условиях 55 % влажности при температуре +18 °С. По окончании печати слайды оставляли на ночь в споттере при комнатной температуре, после чего облучали ультрафиолетом при 254 нм (0,09 Дж/см²). Проверку качества печати проводили методом рассеивающего сканирования при длине волны 633 нм на флуоресцентном сканере ScanArrayExpress (“PerkinElmer”, США). Слайды хранили при температуре +4 °С.

Подготовка флуоресцентно меченых кДНК и проведение гибридизации с биочипом. Флуоресцентное мечение кДНК проводили в процессе ПЦР, как описано выше, за исключением того, что в реакционную смесь вместо 250 мкМ смеси дНТФ добавляли по 250 мкМ дАТФ, дТТФ, дГТФ, 100 мкМ дЦТФ и 17 мкМ Cy5-дЦТФ. Получаемые Cy5-кДНК проверяли путем электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле с последующей регистрацией флуоресценции с помощью фотосистемы Kodak Image Station при длине волны 670 нм. Далее к Cy5-кДНК добавляли 5 мкл 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), 7,5 мкл 20× SSC-буфера, 5 мкл 1 % додецилсульфата натрия (SDS), 10 мкл 99 % формамида, доводили объем до 50 мкл dH₂O и инкубировали в твердотельном термостате при 99 °С 2 мин, затем охлаждали во льду 2 мин. Параллельно денатурировали олигонуклеотиды на биочипе путем кипячения слайда в dH₂O 1 мин, затем слайд инкубировали в 96 % этаноле (с –20 °С) 1 мин и высушивали центрифугированием при 300 g 2 мин на центрифуге 5804 R (“Eppendorf”, Германия) в роторе A-2-DWP для микропланшет. Гибридизацию с биочипом проводили с использованием рамок производства “Whatman” (США) в течение 2 часов при 37 °С с перемешиванием при 250 об/мин в термошейкере Biosan PST-60 HL plus (“BioSan”, Латвия). После гибридизации слайды отмывали в 3× SSC-буфере 2 мин и 1× SSC-буфере 2 мин. Затем рамку снимали, слайд отмывали в dH₂O 2 мин и высушивали центрифугированием.

Компьютерная обработка полученных результатов. Сканирование микрочипов проводили на сканере ScanArray Express с разрешением 5 мкм при значении PMT равном 90, длине волны возбуждения 650 нм и длине волны регистрации 670 нм. Обработку получаемых флуоресцентных изображений проводили с использованием программы “ScanArray Express 3.0” (“Perkin-Elmer”, США).

Результаты и обсуждение

Геном вирусов герпеса кодирует около 50 базовых белков, при этом число открытых рамок считывания у разных типов вируса может достигать 90 [9]. Большинство базовых генов отвечает за процессы репликации вирусной ДНК, а также сборки и выхода зрелых вирионов из клетки, при этом наибольшую гомологию последовательностей среди абсолютно всех известных типов вирусов герпеса наблюдают для ДНК-полимеразы,

дезоксисуридин трифосфатазы и субъединицы терминазы [10]. В работе в качестве мишени для типирования ВГЧ выбрали ген ДНК-полимеразы, как один из наиболее консервативных генов герпесвирусов. К нуклеотидным последовательностям вирусной полимеразы восьми типов ВГЧ, представленных в базе данных GenBank [11], подобрали тип-специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды, комплементарные соответствующим амплифицируемым областям (табл. 1). Анализ выбранных последовательностей в программе BLAST [7] не выявил неспецифической гомологии с какими-либо другими последовательностями.

Таблица 1. Последовательности праймеров и олигонуклеотидных зондов для специфического выявления ДНК-полимераз восьми типов ВГЧ.

Тип вируса герпеса	Ген ДНК-полимеразы	Номер в базе данных GenBank	олигонуклеотидный зонд (5'→3')		зонд, н. ампли-кон, п.н.	T _m
			прямой праймер (F, 5'→3')	обратный праймер (R, 5'→3')		
ВГЧ-1 (ВПГ-1)	UL30	X14112	CAAAACTTTTACAACCCCTAC		21	50
			GCCTTGTTTGA GGCAAAACT	GAAATTCATCG CATTCGCTA	113	53
ВГЧ-2 (ВПГ-2)	UL30	Z86099	GTGCGACGAATTTCGATTT		19	51
			GCCGGCAGAAC TTCTACAAC	GTCAGACCCAG AAGCGTGAT	445	57
ВГЧ-3 (ВЗВ)	ORF28	AY548171	TAGTCAATGTTTAAAGACAGC		21	48
			TGTTCCCTCCTCG GTGATTTT	CGAGAACGCAT CCCTTATGT	425	55
ВГЧ-4 (ВЭБ)	BALF5	AJ507799	TTGTTCGAAATAATGATCCAC		20	48
			ATCAAAGAGGC ACTGGAGGA	AGCCTACAAGA GCACCCAGA	256	57
ВГЧ-5 (ЦМВ)	UL44	AY446894	GTACAACGAGATGTCCTTAG		20	50
			CCTTGACACTG TACGGCAGA	GTTGAGGACCT GGTGCTTTC	556	56
ВГЧ-6	U38	X83413	TTCTGCTAATTCATAGTTATG		21	45
			TCGCATTAGTC ACAGCCTTG	GAATCTGGCTC ACCTTAGCG	224	55
ВГЧ-7	U38	AF037218	TCTTTTGATAAGACTGAAGAC		21	47
			TGCTTGCTTGT AGGCAGAAA	GTTCCCGATGG TATCCAAAA	135	54
ВГЧ-8	ORF9	AF148805	ATTTAGCTTCCAGACTGATA		20	48
			TTCCACCCACC TACTTCCAG	GAGGACGTGGG TCAGGTTTA	329	56

конт- роль	АСТВ	NM_001101	TCCTGTGGCATCCACGAAACTACC TTCAACTCCATCATGAAGTGTGAC GTGGACA		55	70
			GAAGATCCTCA CCGAGCGCG	AGCACTGTGTT GGCGTACAG	327	59

Олигонуклеотидные зонды синтезировали и иммобилизовали на биочип, как описано в разделе «Методы». Каждый слайд состоял из 16-ти идентичных массивов точек (рис. 1), содержащих восемь выявляющих ВГЧ зондов и два контрольных зонда. Олигонуклеотид, комплементарный последовательности гемагглютинирина вируса гриппа А, был выбран в качестве отрицательного контроля (ОК) [12]. Олигонуклеотид, комплементарный кДНК β-актина человека, был выбран для положительного контроля (ПК) прохождения гибридизации. Диаметр спотов составлял около 150 мкм, все зонды были нанесены в пяти повторностях.

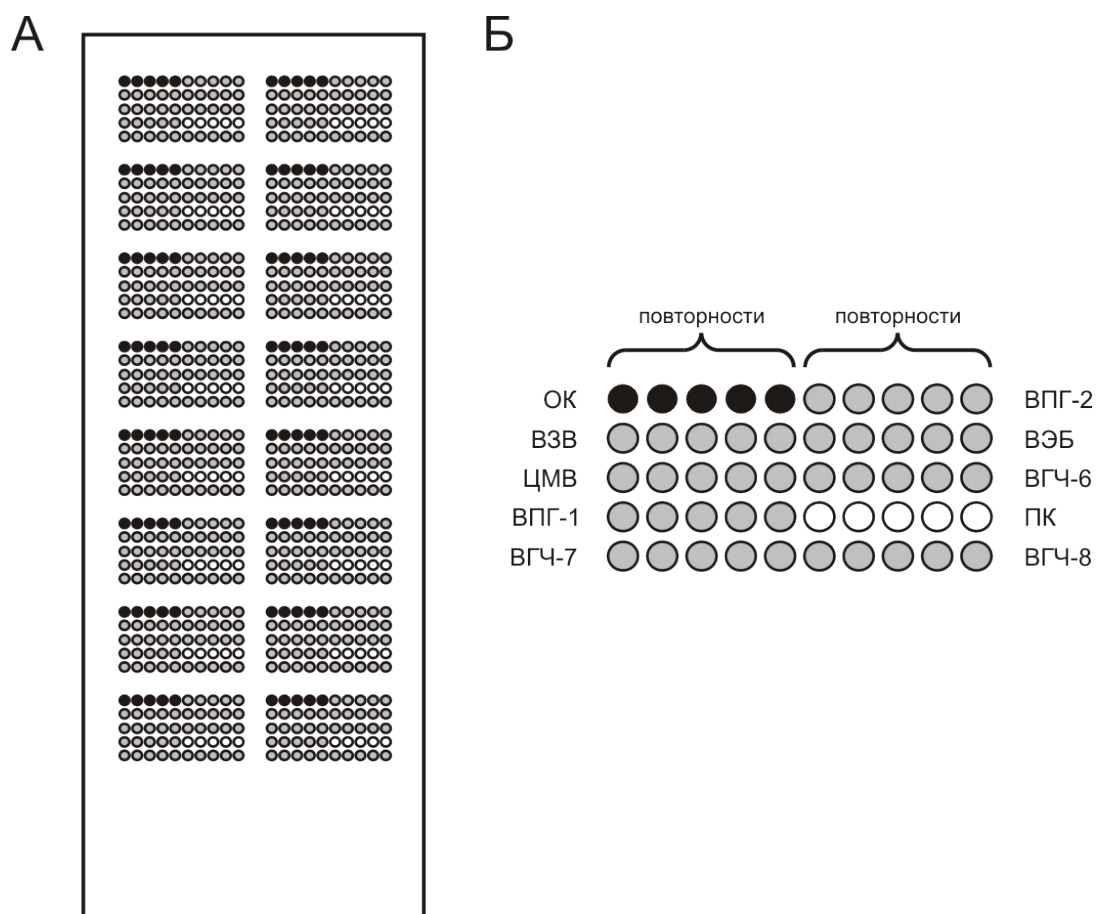


Рисунок 1. Биочип для выявления ВГЧ. А — общая схема биочипа, состоящего из 16-ти идентичных массивов. Б — схема расположения точек в массиве. Обозначения

типов ВГЧ приведены в соответствии с табл. 1. ОК — отрицательный контроль, ПК — положительный контроль.

Для экспериментальной проверки специфичности праймеров и олигонуклеотидных зондов использовали клеточные линии человека, содержащие ВГЧ: лимфобласты периферической крови внешне здорового донора, имеющие в каждой клетке в среднем 60 копий генома ВЭБ (клетки NC-37); клетки почки зеленой мартышки, содержащие ВПГ-1 (Vero); клетки фибробластов легких человека (FLECH 385), содержащие ЦМВ. Из вышеприведенных клеток выделяли ДНК и проводили ПЦР с ВГЧ-специфическими праймерами, в качестве контроля использовали праймеры на β -актин.

На рис. 2А представлены результаты электрофоретического разделения полученных продуктов ПЦР. Видно, что ампликоны соответствуют расчетной длине: 113 п.н. для ВПГ-1, 256 п.н. для ВЭБ и 556 п.н. для ЦМВ. Флуоресцентное мечение вирусной ДНК проводили в процессе ПЦР при тех же условиях, за исключением того, что в реакционную смесь добавляли дЦТФ, конъюгированные с цианиновым красителем Cy5. Данные, представленные на рис. 2Б, показывают, что при использовании фильтра для детекции метки Cy5 видны зоны, соответствующие продуктам ПЦР ВПГ-1, ВЭБ и ЦМВ. Анализ этого же геля после окрашивания бромистым этидием подтвердил наличие соответствующих зон во всех анализируемых пробах (рис. 2В).

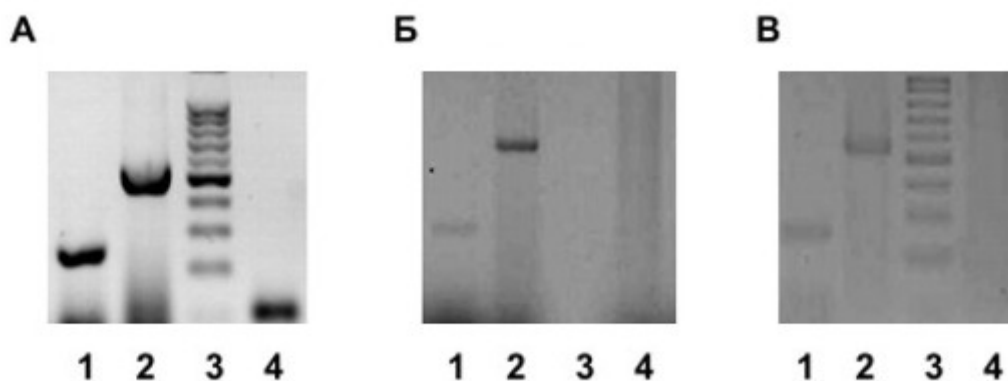


Рисунок 2. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР (А) и Cy5-меченых продуктов ПЦР (Б, В) с тип-специфическими праймерами к гену ДНК-полимеразы ВГЧ. 1 — ВЭБ (клетки NC-37, 256 п.н.), 2 — ЦМВ (клетки FLECH 385, 556 п.н.), 3 — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000 п.н., 4 — ВПГ-1 (клетки Vero, 113 п.н.). А, В — гели окрашены бромистым этидием и документированы при 365 нм, Б — гель документирован при 670 нм.

Вирусные флуоресцентно меченые кДНК, полученные методом ПЦР, гибридизовали с биочипом. Качественный анализ картины флуоресценции, представленной на рис. 3, показал, что Су5-кДНК специфически связываются с иммобилизованными на биочипе олигонуклеотидными зондами. Для контроля в каждую пробу добавляли амплификат, содержащий флуоресцентно меченую кДНК β -актина.

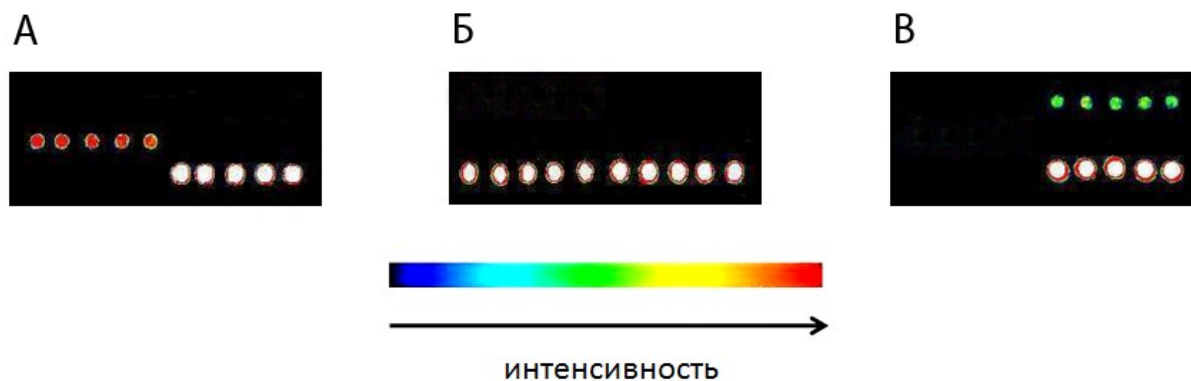


Рисунок 3. Флуоресцентное сканирование биочипа после гибридизации с Су5-мечеными продуктами ПЦР с тип-специфическими праймерами к гену ДНК-полимеразы ЦМВ (А), ВПГ-1 (Б) и ВЭБ (В), полученными из клеток FLECH 385, Vero и NC-37, соответственно.

Сканирование проводили с разрешением 5 мкм при длинах волн 650/670 нм (возбуждение/регистрация), РМТ = 90. Схема расположения точек соответствует рис. 1Б (ряды 2—4), в правом нижнем углу — 5 точек с зондами к β -актину.

На следующем этапе работы была поставлена задача исследовать возможность использования разработанного олигонуклеотидного биочипа для диагностики ГВИ у онкогематологических больных. В качестве клинического материала были взяты пробы, полученные от пациентов с диагностированными ГВИ. Для выделения ДНК было отобрано пять проб крови от больных, у которых с помощью сертифицированных наборов реактивов для амплификации компании «ИнтерЛабСервис» методом ПЦР был обнаружен геном ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6, и одна проба из спинномозговой жидкости, в которой был обнаружен геном ВЗВ (рис. 4).

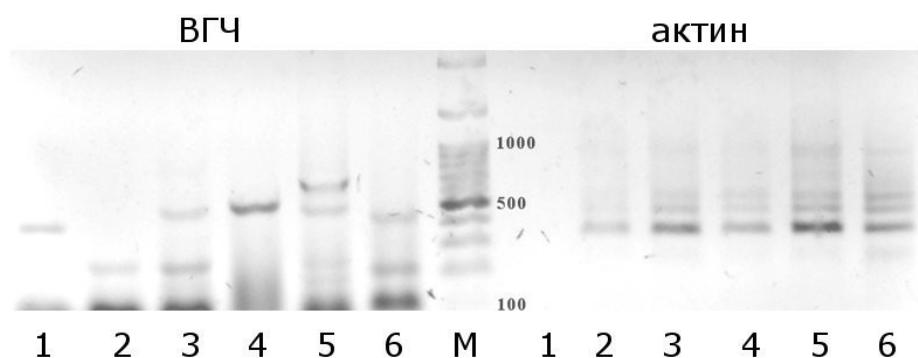


Рисунок 4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР со специфическими праймерами к гену ДНК-полимеразы ВЗВ (пациент 1, 425 п.н.), ВЭБ (пациенты 2 и 3, 256 п.н.), ЦМВ (пациенты 4 и 5, 556 п.н.), ВГЧ-6 (пациент 6, 224 п.н.) и β -актина (пациенты 1—6, 327 п.н.). М — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000, 1500, 3000 п.н.).

Далее проводили гибридизацию флуоресцентно меченых кДНК с биочипом. Из рис. 5 видно, что кДНК, полученные из проб пациентов, инфицированных ВЗВ, ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6, специфически связываются с соответствующими олигонуклеотидными зондами. В качестве контроля в каждую пробу добавляли амплификат, содержащий флуоресцентно меченую кДНК β -актина. Таким образом, разработанный образец олигонуклеотидного биочипа может быть использован для диагностики ГВИ у больных.

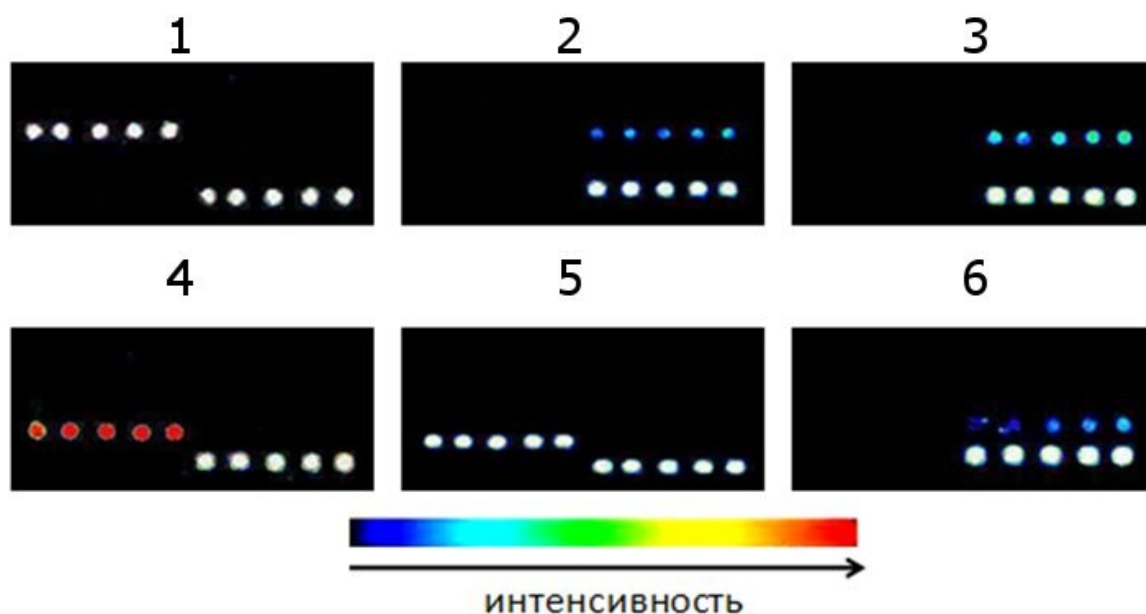


Рисунок 5. Флуоресцентное сканирование биочипа после гибридизации с Су5-мечеными продуктами ПЦР с тип-специфическими праймерами к гену ДНК-полимеразы ВЗВ

(пациент 1), ВЭБ (пациенты 2 и 3), ЦМВ (пациенты 4 и 5) и ВГЧ-6 (пациент 6).

Сканирование проводили с разрешением 5 мкм при длинах волн 650/670 нм (возбуждение/регистрация), РМТ = 90. Схема расположения точек соответствует рис. 1Б (ряды 2—5), в правом нижнем углу — 5 точек с зондами к β -актину.

Представленная в работе методика, основанная на технологии олигонуклеотидных биочипов, позволяет проводить высокочувствительное определение восьми известных типов ВГЧ. Лабораторный образец биочипа специфично выявляет как контрольные образцы ДНК герпесвирусов, накопленных на культивируемых клетках человека, так и вирусные ДНК в клинических образцах пациентов с ГВИ. Предложенный метод в дальнейшем может быть использован как в клинических, так и лабораторных исследованиях.

Литература

1. Львов Д. К. и др. Медицинская вирусология. Руководство // М.: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2008. – 656 с.
2. Букринская А. Г. Вирусология // М.: «Медицина». – 1986. – 336 с.
3. Исаков В. А. Герпесвирусные инфекции человека: Руководство для врачей // СПб: «СпецЛит». – 2006. – 303 с.
4. Мирзабеков А. Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века // Вестник РАН. – 2003. – т. 73, № 5. – С. 412—422.
5. Wernersson R., Nielse H. B. OligoWiz 2.0 – integrating sequence feature annotation into design of microarray probes // Nucleic Acids Res. – 2005. – v.33. – P.611–615.
6. Rozen S., Skaletsky H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers // Methods Mol. Biol. – 2000.- v. 132. – P.365–386.
7. McGinnis S., Madden T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools // Nucleic Acids Res. – 2004. v.32. – P.20–25.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование // М.: «Мир». – 1984. – 480 с.
9. Davison A. J., Eberle R., Hayward G. S. Family Herpesviridae. In Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses // London: Academic Press. – 2005. – P.193–212.
10. Киселев О. И. и др. Вопросы общей вирусологии: Учебное пособие // СПб: СПбГМА им. И. И. Мечникова. – 2007. – 374 с.

11. *Benson D. A. , Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W.* GenBank // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – v.39. – P.32–37.
12. *Vasin A. V., Sandybaev N. T., Plotnikova M. A., Klotchenko S. A., Chervyakova O. V., Stochkov V. M., Taylakova E. T., Elpaeva E. A., Komissarov A. B., Egorov V. V., Koshemetov J. K., Kiselev O. I., Mamadaliev S. M.* Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications // *Journal of Physics: Conference Series.* – 2011. – v.291 (012006). – P.1–5.