

В.А.Терновой<sup>1,2</sup>, А.В.Семенцова<sup>1</sup>, Е.В.Чуб<sup>1</sup>, О.В.Пьянков<sup>1</sup>, В.Б.Локтев<sup>1,3,4</sup>, А.П.Агафонов<sup>1</sup>

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЕ xMAP-МУЛЬТИПЛЕКСИРОВАНИЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК, ВКЛЮЧАЯ ЭБОЛА

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация; <sup>2</sup>Томский государственный университет, Томск, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация;

<sup>4</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация

Разработан олигонуклеотидный суспензионный биочип на основе технологии xMAP для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных вирусных инфекций – филовирусов Эбола и Марбург и аренавирусов Ласса, Хунин и Мачупо. Предложенный подход позволяет детектировать до 100 вирусных геном-эквивалентов в пробе. Чувствительность и специфичность олигонуклеотидного биочипа составляет 100 % при использовании лабораторных панелей положительных и отрицательных образцов. Полученные результаты показывают, что xMAP-мультиплексирование для обнаружения и идентификации тропических геморрагических лихорадок, включая Эбола, не уступает по чувствительности традиционному методу ОТ-ПЦР в реальном времени и может быть использовано для оценки вирусной нагрузки, а также в будущем может быть легко расширено как для анализа новых вирусных агентов, так и для выявления критических мутаций в вирусных геномах.

*Ключевые слова:* xMAP, филовирусы, Эбола, Марбург, аренавирусы, Ласса, Хунин, Мачупо, ПЦР.

V.A.Ternovoy<sup>1,2</sup>, A.V.Sementsova<sup>1</sup>, E.V.Chub<sup>1</sup>, O.V.P'yankov<sup>1</sup>, V.B.Loktev<sup>1,3,4</sup>, A.P.Agafonov<sup>1</sup>

## Highly Effective xMAP Multiplex Assay for the Detection and Identification of Hemorrhagic Fever Agents, Including Ebola Virus

<sup>1</sup>State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation; <sup>2</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation; <sup>3</sup>Institute of Cytology and Genetics, RAS Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation; <sup>4</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Developed has been the oligonucleotide liquid biochip based on xMAP technology, designed for the laboratory detection of particularly dangerous viral pathogens such as *Ebola* and *Marburg* filoviruses, and *Machupo*, *Junin*, and *Lassa* arenaviruses. The suggested approach allows for the detection of up to 100 viral genome equivalents in a sample. The sensitivity and specificity of oligonucleotide biochip is 100 % when the laboratory panels of positive and negative samples are used. These results indicate that the xMAP multiplexing for the detection and identification of tropical hemorrhagic fever agents, including Ebola virus, is not inferior to the conventional method such as real-time RT-PCR and can be applied for evaluation of viral load, and further on can easily be expanded for both the analysis of new viral agents and for the detection of critical mutations in viral genomes.

*Key words:* xMAP, *filoviridae*, Ebola, Marburg, arenaviruses, Lassa, Junin, Machupo, PCR.

Геморрагические лихорадки – группа острых вирусных природно-очаговых болезней, характеризующихся развитием универсального капилляротоксикоза, проявляющихся интоксикационным и геморрагическим синдромами с поражением различных органов и систем организма. В настоящее время известны 17 вирусов, относящихся к 4 семействам и вызывающих вирусные геморрагические лихорадки [1, 4, 9]. Носителем возбудителей в природных очагах являются дикие животные (грызуны, сумчатые, приматы, птицы и др.) и инфицированные люди; в последнем случае болезнь принимает черты антропонозной инфекции [3, 4, 6, 10]. Восприимчивость к геморрагическим лихорадкам высокая. Смертность составляет от 1–10 до 50–70 % и более. Геморрагическим лихорадкам свойственно очаговое распространение преимущественно в субтропических и тропических странах [3].

Лихорадка Эбола впервые идентифицирована как самостоятельная болезнь в Заире в 1976 г. Тогда в этой стране от неизвестной ранее болезни умерли более 90 % заболевших. Затем был зарегистрирован ряд вспышек болезни. В 1995 г. погибли 245 человек, в 2001 г. в Уганде в течение 4 недель погибли 145 заболевших. В 2013–2015 гг. зарегистрирована самая

крупная вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), унесшая более 11000 тыс. жизней. Эпидемия охватила сразу несколько стран Западной Африки.

Вирусы Марбург и Эбола сходны по своей морфологии, но отличаются по антигенной структуре. Впервые лихорадка Марбург была обнаружена в 1967 г. в Европе в городах Марбург, Франкфурт-на-Майне и Белград. Источником инфекции были признаны ввезенные из Уганды в Марбург африканские зеленые марышки. Зарегистрирован 31 случай болезни и 7 смертельных исходов. В дальнейшем вспышки геморрагической лихорадки Марбург происходили в Конго, Анголе, Уганде. С 1998 по 2000 год в Конго зарегистрировано 154 больных и умерло 128 человек. В 2004 г. во время вспышки в Анголе заболели лихорадкой Марбург 266 человек, из них умерло 244. В 2009 г. в США зарегистрирован завозной случай лихорадки Марбург [11].

Современные методы лабораторной диагностики позволяют эффективно выявлять маркеры филовирусных инфекций, например, РНК вируса (метод ПЦР), антигены и антитела (метод ИФА) [1]. Серологический диагноз путем выявления IgM антител в крови больных возможен только на пятый день

[2, 5, 6]. Значительный импульс в разработке средств индикации и идентификации агентов, вызывающих геморрагические лихорадки, придали биотеррористические акты в США в 2001 г. Одна из наиболее перспективных платформ – микрочиповая технология [8]. Существует две основные разновидности микрочиповой диагностической технологии – с использованием планарных чипов и чипов на основе микрофлюидики, которые, в свою очередь, делятся на гелевые и жидкие биочипы (xMAP – Multi-Analyte Profiling). Принцип xMAP-технологии заключается в том, что на поверхность полистерольных микросфер иммобилизуются олигонуклеотиды. При добавлении анализируемого образца комплементарная таргетная ДНК в образце формирует дуплекс с олигонуклеотидом на микросфере. Если анализируемый образец предварительно помечен флуоресцентной меткой, то в результате генерируется сигнал, свидетельствующий о наличии в пробе соответствующего объекта. Количество флуоресцирующих микросфер свидетельствует о количестве кДНК в образце.

В настоящее время биологические микрочипы широко используются в диагностике *in vitro* [7, 14]. Микрочиповые технологии нашли широкое применение во многих лабораториях мира. В то же время применение жидких биочипов гораздо дешевле планарных. Открытость платформы позволяет использовать тест-системы различных производителей на одних и тех же ридерах. Высокая мультиплексированность позволяет одновременно проводить скрининг большого числа образцов по множеству маркеров (более 100 маркеров в одном образце).

Целью данной работы являлась разработка отечественного средства специфической индикации и лабораторной диагностики возбудителей особо опасных вирусных инфекций – вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Хунин и Мачупо с использованием платформы жидких олигонуклеотидных суспензионных биочипов.

### Материалы и методы

Клетки Vero были получены из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки культивировали с использованием среды Игла MEM.

В работе использованы вирусы Эбола, Марбург, Ласса, Хунин и Мачупо из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор». Культивирование вируса проводили в стационарном режиме на монослой клеток в пластиковых культуральных флаконах. Множественность заражения монослоя составляла 0,01–0,1 ЛД<sub>50</sub> на 1 клетку. Культуральную среду после проявления ЦПД использовали для выделения РНК вируса.

Нуклеиновые кислоты вирусов выделяли из образцов при помощи набора «Литех» (Россия) согласно инструкции по применению. ПЦР проводили на амплификаторах T100 и CFX96 («BioRad», США). Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации проводили с использованием системы капиллярного электрофореза MultiNA «Shimadzu». Фрагменты кДНК очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit («Qiagen», США), клонировали в плазмиду pCR2.1 («Invitrogen», США).

Амплификацию ДНК проводили методом, описанным ранее [12, 13]. Амплификаты для реакции гибридизации получали путем амплификации с биотинилированным по 5'-концу антисмысловым праймером. Все образцы вирусной кДНК, использованные в работе, были предварительно секвенированы. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI Genetic Analyzer 3130xl (ABI, США). Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием базы данных NCBI Mega BLAST. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программы Lasergen 7.0 и приложения AlignX программного пакета Vector NTI 11 (Informax, США).

В работе использованы микросферы Luminex (США) MagPlex beads, 6,5 μm. Для иммобилизации ДНК-олигонуклеотидных зондов на микросферы использовали 5'-аминозамещенные ДНК-олигонуклеотиды с 6-атомным спейсером (Синтол, Россия). Каждый вирусспецифический зонд иммобилизовали на определенном типе микросфер (BioRad, США), отличающихся между собой профилем флуоресценции. Для этого карбоксилированные микросферы 1·10<sup>6</sup> в объеме 25 мкл 50 мМ MES (Sigma, США) буфера (рН 4,5) активировали с использованием 10 мМ EDC (Pierce, США) в присутствии 0,1 нМ ДНК-зонда. Реакцию проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Микросферы отделяли от не связавшихся компонентов центрифугированием, отмывали последовательно растворами 0,02 % Tween-20 и 0,1 % SDS (Sigma, США). Для блокирования не связавшихся с зондом активных групп и дальнейшего хранения микросферы ресуспендировали в 10 мМ Tris-EDTA буфере рН 8,0 (Sigma, США). Определение точной концентрации микросфер проводили с использованием камеры Горяева. Микросферы, несущие различные ДНК-зонды, смешивали в равных пропорциях.

Биотинилированные амплификаты ДНК гибридизовали с микросферами, несущими вирусные ДНК-зонды. В реакцию объемом 50 мкл брали 3 мкл исследуемой ПЦР-смеси и 5000 микросфер каждого типа. После предварительной денатурации 1 мин при 95 °С, гибридизацию проводили в присутствии 4,5 М ТМАС (Acros, США) в 50 мМ Трис-ЭДТА буфере (рН 8,0) при постоянной температуре 55 °С в течение 15 мин. После внесения конъюгата стрептавидина с R-фикоэритрином (Invitrogen, США) и дополнительной инкубации в течение 5 мин при 55 °С реакционную смесь непосредственно подвергали анализу на приборе BioPlex 200 (BioRad, США). Анализировали не менее 100 микросфер каждого типа. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Bio-Plex Manager TM 4.0 (BioRad, США).

### Результаты и обсуждение

С использованием известных к настоящему моменту последовательностей геномных РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Хунин и Мачупо из базы данных GenBank проведен дизайн уникальных специфиче-

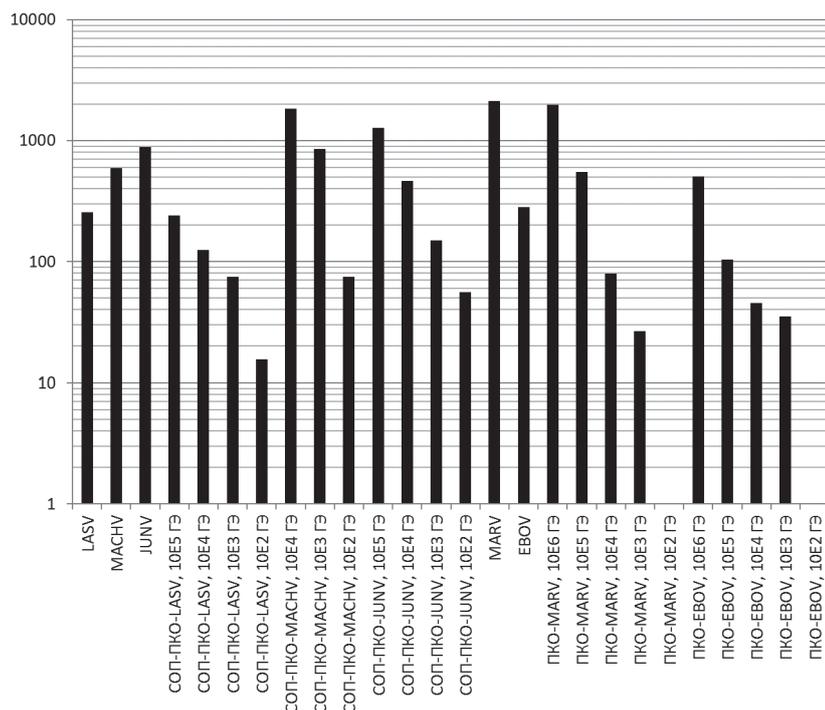
ческих диагностических праймеров и гибридизационных зондов, которые использовали для формирования диагностической панели на платформе хМАР. В качестве отрицательных контрольных образцов использовали генетический материал вирусов Западного Нила (штамм Vol-4), японского энцефалита (штаммы Пекин и Джагар), желтой лихорадки (штамм Дакар), гриппа H5N1 (штамм A/duck/Kurgan/08/2005), гриппа H1N1 (штамм A/Ekaterinburg/01/2009), SARS (штамм Frankfurt), аденовирусов 2-го и 5-го серотипов, энтеровирусов (CoxB6, CoxA7 и Ent71), ДНК человека, ДНК обезьян (павиан сфинкс, черный хохлатый павиан, макака резус, павиан гамадрил, белорукий гиббон, японская макака, зеленая маргышка и колобус восточный).

Каждый тип ДНК-зонда ковалентно иммобилизован на полимерные флуоресцентные микросферы, отличающиеся между собой профилем флуоресценции. Микросферы, несущие различные ДНК-зонды, смешивали и гибридизовали с ПЦР-продуктами от образцов различных вирусов. Реакцию гибридизации осуществляли в присутствии 3 М тетраметиламмония хлорида (ТМАС). В его присутствии температура плавления ДНК-дуплексов становится в основном функцией длины олигонуклеотида и мало зависит от GC-состава [15]. Нам удалось оптимизировать условия проведения реакции и получить достоверно различающиеся результаты без предварительной обработки образца после амплификации, доведя срок реакции гибридизации до 15–20 мин, а также устранить процедуру промывок перед считыванием результатов, что позволило уменьшить общее время всех процедур. При проведении анализа через кювету проходило не менее 100 микросфер каждого типа. Данные по интенсивности флуоресценции каждой из микросфер измеряли отдельно с последующей статистической обработкой по всей выборке, что по-

зволяет получать и анализировать статистически достоверные данные.

На рисунке представлена гистограмма интенсивности флуоресценции специфичных ДНК-зондов на поверхности микросфер после гибридизации с меченым продуктом амплификации, полученным для геномной РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо и Хунин в мультиплексном варианте. В экспериментах с использованием инфицированных культур клеток продемонстрирована возможность технологии жидких олигонуклеотидных микрочипов хМАР при регистрации комплексов ДНК матрица-олигонуклеотидный зонд, образовавшихся в ходе реакции гибридизации сенсорных микросфер с присутствующими в растворе фрагментами вирусспецифической ДНК пяти вирусов: Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо и Хунин. При этом ДНК-фрагменты каждого из вирусов формировали комплексы на микросфере определенного вида с иммобилизованными на ее поверхности олигонуклеотидными зондами. Для повышения чувствительности перед гибридизацией использовали процедуру амплификации вирусспецифической кДНК. Это позволило повысить чувствительность системы до  $10^2$  геном-эквивалентов анализируемых вирусных патогенов в образце. Отрицательные контрольные образцы не гибридизовались ни с одним из зондов. Неспецифического или перекрестного взаимодействия выбранных праймеров и зондов с другими вирусами и гетерологичной ДНК и РНК не зарегистрировано.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хМАР-мультиплексирование для обнаружения и идентификации тропических геморрагических лихорадок, включая возбудителя Эбола, не уступает по чувствительности традиционному методу ОТ-ПЦР в реальном времени. Количественная регистрация сигнала от каждой микросферы может быть использова-



Гистограмма интенсивностей флуоресценции в результате гибридизации специфичных ДНК-зондов на поверхности микросфер с меченым продуктом амплификации:

EBOV – Эбола; MARV – Марбург; LASV – Ласса; MACHV – Мачупо; JUNV – Хунин; ПКО – положительный контрольный образец. По оси абсцисс – медиана интенсивности флуоресценции (MFI) по выборке из 100 проанализированных микросфер с вирусспецифическими зондами. По оси ординат – вирусные образцы с известным титром от  $10^5$  до  $10^2$  ГЭ на миллилитр, ПКО из образцов вирусов из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». MFI всех отрицательных контрольных образцов меньше 1 (данные не приведены)

на для оценки вирусной нагрузки в исследуемом образце. При этом важно подчеркнуть, что накопление информации об уровне сигнала от 100 и более микросфер позволяет кардинально улучшить решение проблем статистической обработки положительного и отрицательного сигнала. При анализе панелей положительных и отрицательных образцов установлено, что разработанный биочип обеспечивает 100 % чувствительность и специфичность при аналитической чувствительности до 10<sup>2</sup> геном-эквивалентов высокопатогенных для человека фило- и аренавирусов. Время проведения анализа сравнимо со временем проведения ПЦР. Кроме того, разработанная технология жидких биочипов для диагностики особо опасных вирусных патогенов обладает рядом преимуществ по сравнению с общепринятыми методами детекции вирусных патогенов. Это возможность одновременного анализа наличия генетического материала различных вирусных патогенов в одном эксперименте, высокая чувствительность и специфичность проведения анализа, высокая достоверность и возможность накопления большого массива экспериментальных данных в автоматическом режиме, небольшое время проведения анализа. Разработанный xMAP жидкий микрочип для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных вирусных инфекций (филовирусов Эбола и Марбург и аренавирусов Ласса, Хунин и Мачупо) может быть в будущем легко расширен как для анализа новых вирусных агентов, так и для выявления критических мутаций в их геномах.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рудзевич Т.Н., Терновой В.А., Казачинская Е.И., Разумов И.А., Чепурнов А.А., Локтев В.Б., Нетесов С.В. Выявление антигенных детерминант на N-конце белка VP35 вируса Эбола с помощью коротких рекомбинантных фрагментов этого белка. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2003; 2:38–41.
2. Чепурнов А.А., Терновой В.А., Даданева А.А., Дмитриев И.П., Сизикова Л.П., Волчков В.Е., Кудоярова Н.М., Рудзевич Т.Н., Нетесов С.В. Иммунобиологические свойства белка VP24 вируса Эбола, экспрессируемого в рекомбинантном вирусе осповакцины. *Вопр. вирусол.* 1997; 42(3):115–20.
3. Ambrosio A., Saavedra M., Mariani M., Gamboa G., Maiza A. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum. Vaccin.* 2011; 7:694–700.
4. Charrel R.N., de Lamballerie X. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 2010; 140:213–20.
5. Chepurnov A.A., Ternovoy V.A., Tuzova M.N., Chernukhin I.V. Suppressive effect of Ebola virus on T cell proliferation in vitro is provided by a 125-kDa GP viral protein. *Immunology Lett.* 1999; 68:257–61.
6. Hastie K.M., Kimberlin C.R., Zandonatti M.A., MacRae I.J., Saphire E.O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 39 to 59 exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 2011; 108:2396–01.
7. Irizarry R.A., Bolstad B.M., Collin F., Cope L.M., Hobbs B., Speed T.P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(4):e15.
8. Keller K.L., Iannone M.A. Multiplexed microspherebased flow cytometric assays. *Exp. Hematol.* 2002; 30:1227–37.
9. Moraz M.L., Kunz S. Pathogenesis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(1):49–59.
10. Racska L.D., Kraft C.S., Olinger G.G., Hensley L.E. Viral Hemorrhagic Fever Diagnostics. *Clin Infect Dis.* 2015; DOI: 10.1093/cid/civ792.
11. Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. P. 1409–48.
12. Volchikov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A.,

Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology.* 1995; 214:421–30.

13. Volchikov V.E., Chepurnov A.A., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H.-D. Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology.* 2000; 277:147–55.

14. Wu Z., Irizarry R.A., Gentleman R., Martinez M.F. A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J. Am. Stat. Assoc.* 2004; 99:909–17.

15. Wood W.I., Gitschier J., Lasky L.A., Lawn R.M. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 198; 2(6):1585–88.

#### References

1. Rudzевич Т.Н., Терновой В.А., Казачинская Е.И., Разумов И.А., Чепурнов А.А., Локтев В.Б., Нетесов С.В. [Detection of antigen determinants at N-terminus of Ebola virus VP35 protein, using short recombinant fragments of this protein]. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* 2003; 2:38–41.
2. Chepurnov A.A., Ternovoy V.A., Dadanava A.A., Dmitriev I.P., Sizikova L.P., Volchikov V.E., Kudoyarova N.M., Rudzевич T.N., Netesov S.V. [Immunobiological properties of Ebola virus VP24 protein, expressed in recombinant vaccinia virus]. *Vopr. Virusol.* 1997; 42(3):115–20.
3. Ambrosio A., Saavedra M., Mariani M., Gamboa G., Maiza A. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum. Vaccin.* 2011; 7:694–700.
4. Charrel R.N., de Lamballerie X. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 2010; 140:213–20.
5. Chepurnov A.A., Ternovoy V.A., Tuzova M.N., Chernukhin I.V. Suppressive effect of Ebola virus on T cell proliferation in vitro is provided by a 125-kDa GP viral protein. *Immunology Lett.* 1999; 68:257–61.
6. Hastie K.M., Kimberlin C.R., Zandonatti M.A., MacRae I.J., Saphire E.O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 39 to 59 exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 2011; 108:2396–01.
7. Irizarry R.A., Bolstad B.M., Collin F., Cope L.M., Hobbs B., Speed T.P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(4):e15.
8. Keller K.L., Iannone M.A. Multiplexed microspherebased flow cytometric assays. *Exp. Hematol.* 2002; 30:1227–37.
9. Moraz M.L., Kunz S. Pathogenesis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(1):49–59.
10. Racska L.D., Kraft C.S., Olinger G.G., Hensley L.E. Viral Hemorrhagic Fever Diagnostics. *Clin Infect Dis.* 2015; DOI: 10.1093/cid/civ792.
11. Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. P. 1409–48.
12. Volchikov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology.* 1995; 214:421–30.
13. Volchikov V.E., Chepurnov A.A., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H.-D. Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology.* 2000; 277:147–55.
14. Wu Z., Irizarry R.A., Gentleman R., Martinez M.F. A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J. Am. Stat. Assoc.* 2004; 99:909–17.
15. Wood W.I., Gitschier J., Lasky L.A., Lawn R.M. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 198; 2(6):1585–88.

#### Authors:

**Ternovoy V.A.** State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”; Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. Tomsk State University; Tomsk, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru  
**Sementsova A.V., Chub E.V., P'yankov O.V., Agafonov A.P.** State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru  
**Loktev V.B.** State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”; Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. Institute of Cytology and Genetics, RAS Siberian Branch; Novosibirsk, Russian Federation. Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

#### Об авторах:

**Терновой В.А.** Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. Томский государственный университет; Российская Федерация, Томск. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

**Семенцова А.В., Чуб Е.В., Пьянков О.В., Агафонов А.П.** Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

**Локтев В.Б.** Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. Институт цитологии и генетики СО РАН; Российская Федерация, Новосибирск. Новосибирский государственный университет; Российская Федерация, Новосибирск. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 10.07.15.