

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Российский Государственный Медицинский Университет федерального агентства по

здравоохранению и социальному развитию»

Медико-биологический факультет

Кафедра биофизики

Хайрулин Рамиль Ратмирович

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Клонирование и экспрессия рекомбинантного белка E1

вируса краснухи на основе бактериальных векторов

экспрессии

Зав. кафедрой биофизики, проф.,
д.б.н. Осипов А.Н.

Куратор, доц. кафедры биофизики,
к.б.н. Корепанова Е.А.

Зав. лаб. генетики ДНК-содержащих
вирусов, к.б.н. Ярулин В.Р.

Научный руководитель
к.б.н. Ярулин В.Р.
зав. лаб. генетики ДНК-содержащих
вирусов ГУ НИИ ВС им.
И.И. Мечникова РАМН

Москва 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
КЛАССИФИКАЦИЯ ТОГАВИРУСОВ	7
ЭТИОЛОГИЯ	10
СТРУКТУРА ВИРУСА	13
Строение вириона	13
Геном вируса краснухи	14
Структурные белки	16
Капсидный белок (С)	17
Гликопротеины оболочки Е1 и Е2	18
Неструктурные белки	19
ПАТОГЕНЕЗ КРАСНУХИ	21
Синдром врожденной краснухи	23
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	27
ВАКЦИНАЦИЯ	31
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
МАТЕРИАЛЫ	35
МЕТОДЫ	38

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
Клонирование и выделение фрагментов генома вируса краснухи	44
Выбор векторной системы для экспрессии рекомбинантных белков, содержащих ген E1 вируса краснухи	47
Создание векторной системы, предназначенной для экспрессии в клетках <i>E. coli</i> рекомбинантного белка E1	48
Исследование векторной системы на экспрессию в клетках <i>E. coli</i> рекомбинантного белка E1	50
ВЫВОДЫ	54
БЛАГОДАРНОСТИ	55
ПРИЛОЖЕНИЕ	56
ПОИСК СТАТЕЙ	60
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	61

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Иммуноблотинг - современный высокочувствительный иммунохимический метод идентификации вирусных антигенов. Метод основан на комбинации гель-электрофореза и реакции антиген-антитело.

кД – килодальтон

нм – нанометр

ОРС – открытая рамка считывания

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Рестриктаза – эндонуклеаза рестрикции

РНК – рибонуклеиновая кислота

Сайт рестрикции – участок ДНК, узнаваемый специфической рестриктазой

СВК – синдром врожденной краснухи

ЦПД – цитопатическое действие

ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

Экспрессия гена – сопряженный процесс транскрипции и трансляции, в результате которого синтезируется белковый продукт данного гена

Эукариоты – организмы, клетки которых имеют выраженное ядро и хромосомы, в частности клетки млекопитающих

SDS – додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Краснуха является чрезвычайно распространенным вирусным заболеванием. Протекает обычно как умеренно выраженная вирусная острая инфекция и характеризуется сыпью и лихорадкой. Поражает главным образом детей. Наиболее серьезное осложнение, связанное с вирусом краснухи – это синдром врожденной краснухи (СВК), возникающий при инфекции у женщин в период беременности. Около 85% новорожденных, родившихся у матерей, перенесших краснуху в 1 триместре беременности, приобретают СВК. Инфекция плода вирусом краснухи, осложненная СВК, приводит к порокам развития: врожденным порокам сердца и других органов, катаракте, глухоте, косоглазию, задержке умственного развития и т.д. Врожденная инфекция носит хронический характер (от 6 мес. до 3 лет) и впоследствии может приводить к диабету и краснушному подострому склерозирующему панэнцефалиту (ПСПЭ). Доля восприимчивых женщин детородного возраста варьируется в широких пределах от 5% в Кувейте до 60% в городах Панамы и отражает эпидемиологические и социально-экономические различия в изученных популяциях (WHO.INT, 2007).

Краснуха встречается у людей, живущих на всех континентах и, несмотря на впечатляющие успехи программ вакцинации населения в экономически развитых странах, эта инфекция еще далека от ликвидации даже среди цивилизованной части населения Земли.

Использование ДНК для иммунизации – это новый подход, интенсивно разрабатываемый в последние годы. Для этого конструируются плазмиды, включающие все регуляторные элементы (промоторы, энхансеры, терминаторы, участки прикрепления рибосом), необходимые для экспрессии клонированного гена в эукариотических клетках. Эти плазмидные ДНК вводятся различными способами в клетки эукариотического организма. Неспособные размножаться в эукариотах, эти

ДНК, тем не менее, обеспечивают синтез клонированного рекомбинантного белка, вызывающего иммунизацию макроорганизма. Метод ДНК-иммунизации дешев, в организме человека синтезируется только клонированный белок без других побочных продуктов. Этот метод исключает опасность инфицирования вакцинным штаммом вируса, отпадают многие дорогостоящие контроли, используемые в производстве живых и инактивированных вакцин.

Целью настоящей работы являлось клонирование и экспрессия иммунологически наиболее важного белка Е1 вируса краснухи в эукариотических клетках и дальнейшее получение его в препаративных количествах. Это позволит использовать данный рекомбинантный белок, как в целях иммунодиагностики, так и в целях иммунопрофилактики. Использование такого белка повысит чувствительность и селективность диагностических тест-систем, резко снизив стоимость анализа.

В связи с этим в задачи работы входило:

1. Выделение гена белка Е1 вируса краснухи из ранее клонированной плазмиды рSPO2.
2. Получение рекомбинантной плазмиды рEX1-E1 Rub, способной синтезировать белок Е1, слитый с β -галактозидазой.
3. Экспрессия полученной плазмиды в клетках *E. coli* POP2136 гиперпродукции рекомбинантного белка.
4. Проверка экспрессируемого белка в иммунохимических тестах (иммуноблотинг и др.).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

КЛАССИФИКАЦИЯ ТОГАВИРУСОВ

Вирус краснухи (*Rubella virus*) является единственным представителем рода *Rubivirus* семейства *Togaviridae* (Тогавирусов) (Matthews R.E.F., 1982). Название *togavirus* произошло от латинского слова «*toga*», что в переводе означает плащ или кожух (Murphy F.A. et al., 1995). Тогавирусы представляют обширную группу, включающую более 90 вирусов. Семейство содержит 4 рода (Рис.1). Род альфа-вирусов включает 21 вирус, различающихся по антигенным свойствам. Типичными представителями рода являются вирус Синдбис, вирусы восточного, западного и венесуэльского энцефаломиелитов лошадей. Род флавивирусов объединяет 57 типов вирусов, почти все они размножаются в комарах и клещах. Среди них существуют четыре антигенные подгруппы, к которым относятся: вирусы клещевого, японского энцефалита, желтой лихорадки и вируса Денге. К роду рубивирусов относится только возбудитель краснухи. К роду пестивирусов – возбудители диареи коров, лихорадки свиней.

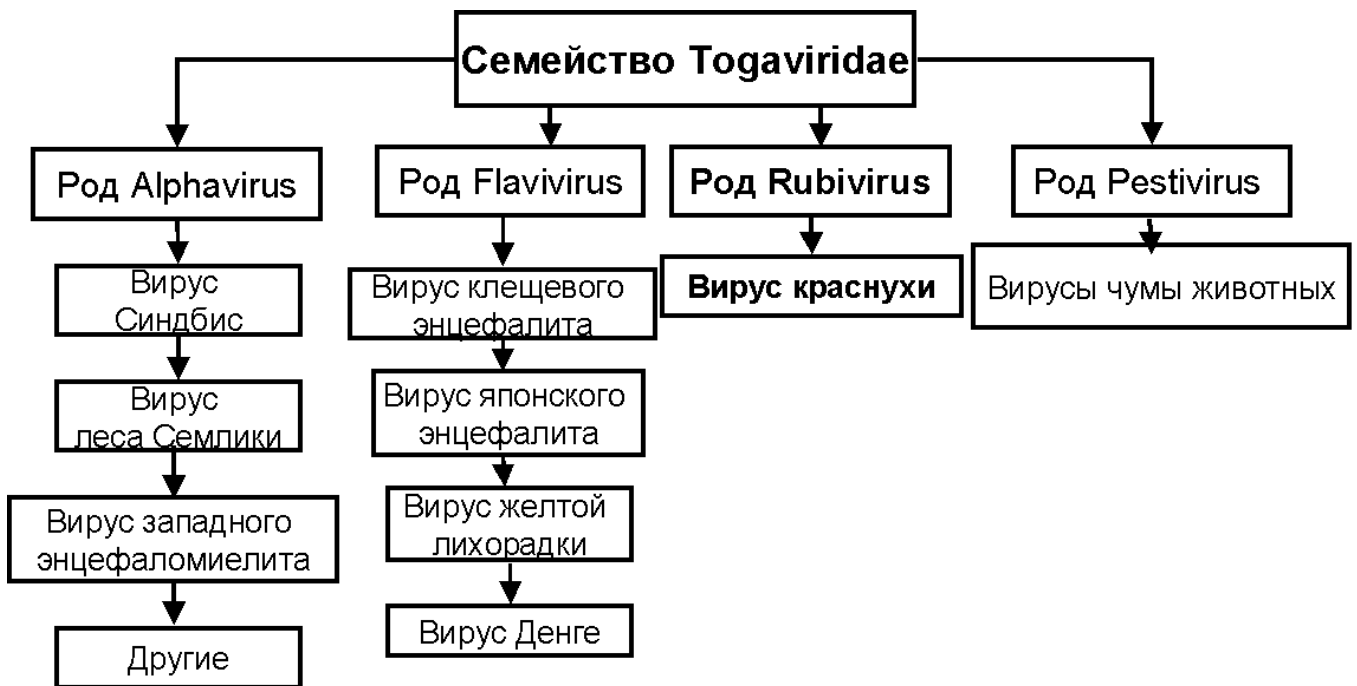


Рис. 1 Семейство *Togaviridae*

Все альфа- и большинство флавивирусов имеют несколько хозяев и циркулируют в природе между позвоночными и членистоногими. Все альфа-вирусы экологически связаны с комарами, однако среди них есть группа вирусов, не передающихся членистоногими. Единственным хозяином вируса краснухи является человек. Вирусы рода пестивирус поражают собак, коров, свиней, овец, коз и вызывают у них заболевания с поражением мукозных мембран. В пределах родов тогавирусы связаны общими антигенами, но между родами антигенных связей нет. Общие характеристики семейства *Togaviridae* представлены в Табл. 1.

Вирусные компоненты	Свойства
Вирион	Сферическая частица диаметром 60-70 нм, нуклеокапсид икосаэдрической формы. Бислойная липопротеиновая оболочка с гликопротеинами E1, E2 и иногда E3.
Геном	Однонитевая (+)-цепь РНК размером от $3 \cdot 10^6$ до $4 \cdot 10^6$ Да. Две ОРС: на 5'-конце располагаются ОРС неструктурных белков и на 3'-конце – ОРС структурных белков.

Табл. 1 Общие характеристики семейства *Togaviridae*.

ЭТИОЛОГИЯ

Вирусная этиология краснухи была доказана в 1938 году японскими исследователями Гиро и Такаси (Hiro J. et al., 1938), которые сообщили о заражении детей краснухой путем введения им носовых смывов, профильтрованных через фильтры Беркефельда и Зейтца.

Краснуха – чисто антропогенное заболевание, однако она может инфицировать человека (Anderson S.G., 1949; Hiro J. et al., 1938), обезьян (Parkman P.D. et al., 1966), кроликов (Belcourf R.J. et al., 1965; Selzer G., 1965), хомяков (Oxford J.S. et al., 1966), хорьков (Cusumaon J.A. et al., 1964), куриные и утиные эмбрионы (Fuccillo D.A. et al., 1965). Она размножается во многих видах первично триспинизированных и перевиваемых клеточных культур различного происхождения, часто не вызывая видимых цитопатических изменений (Parkman P.D. et al., 1964b; Sordoc Y., 1971). Однако только в весьма ограниченном количестве культур проявляется видимое цитопатическое действие (ЦПД) вируса краснухи, которое зависит от техники культивирования, от штамма вируса и от др. (Анджапаридзе О.Г. и др., 1975).

До появления живой ослабленной вакцины краснуха носила эндемичный характер со вспышками каждые 6-9 лет во всех странах мира, включая РФ, а в некоторых с более короткими интервалами, 3-5 лет (Parkman P.D., 1999). В невакцинированных группах населения краснуха в основном встречается у детей, а там, где дети привиты, краснуха может встречаться у подростков и взрослых (неоднократные вспышки наблюдались в военных казармах (Buescher E.L., 1965), интернатах и других закрытых группах). Среди всех заболевших около 90% составляют дети, преимущественно в возрасте от 3 до 7 лет (Vesikari T. et al., 2007).

В рамках борьбы с краснухой и ее осложнениями большое значение приобретает изучение молекулярной эпидемиологии, мониторинг генотипирование циркулирующих штаммов вируса. Для генотипирования и филогенетического анализа вируса краснухи используется ген иммунологически наиболее важного белка E1 (Claus C. et al., 2006; Frey T.K. et al., 1998). До сих пор большинство изученных вирусов краснухи из Европы, Азии и Северной Америки образуют большую группу (генотип I) с максимальной дивергенцией на нуклеотидном уровне – 5% (Du-Ping Zheng et al., 2003). Небольшая часть изолятов из Азии (Китая и Индии) (Katow S. et al., 1997), куда в прошлом входила Италия (Zheng D.P. et al., 2003), образует отдельную группу, отличающуюся на 8-10% от генотипа I, и отнесена к генотипу II (Frey T.K. et al., 1998; Vosma T.J. et al., 1996). Штаммы, выделенные в России с 1967 по 1997 гг., отнесли к IIВ или III генотипу. Эта группа осталась достаточно стабильной, за 30 лет дивергенция составила около 2% нуклеотидных замен (Du-Ping Zheng, Ярулин В.Р. и др., 2005).

Дети до 1 года болеют очень редко в связи с наличием у них иммунитета, полученного от матери трансплацентарно. Но если мать не болела краснухой или она не привита, ребенок может заболеть и на первом году жизни. На спаде заболеваемости краснухой болеют почти исключительно дети, тогда как в период эпидемического подъема растет число заболевших среди взрослых.

Особую тревогу вызывает устойчивый рост доли взрослого населения среди заболевших, следствием чего является увеличение числа случаев синдрома врожденной краснухи, проявляющегося врожденными уродствами, связанными с внутриутробным заражением вирусом краснухи (Бекзентеев Р.Р., 1999). Всего, по данным ВОЗ, ежегодно во всем мире

краснуха калечит около 300000 детей (Children Vaccination Initiative Forum, 2006).

Вовлечение в эпидемический процесс взрослого населения на территории России обусловлено «прослойкой» лиц, не имевших контакта с вирусом краснухи в детском возрасте, а значит не имеющих иммунитета. Согласно опубликованным данным, доля серонегативных составляет от 10,2% до 28,3% (Vauloup-Fellous C. et al., 2007). Таким образом, в России практически каждая четвертая женщина рискует заразиться краснухой во время беременности.

СТРУКТУРА ВИРУСА

Строение вириона

Структура вириона представляет собой сферическую частицу, диаметр которой определен в ультратонких срезах методом электронной микроскопии и равен 60-70 нм (Рис. 2) (Frey T.K., 1994; Strauss J.H. et al., 1994). Молекулярная масса вириона составляет 3500 кД. Константа седиментации – 300-400S. На поверхности вириона имеются выступы-пепломеры длиной 5-6 нм. Обязательный компонент вириона – липопротеидная оболочка, формирующаяся из плазматической мембраны зараженной клетки (содержание липидов – 24,5% на 1 грамм вирусного белка). Как и у других представителей тогавирусов, липидная оболочка вируса краснухи состоит из фосфолипидов и холестерина. Внутри оболочки содержится капсид икосаэдрической формы, содержащий вирусную РНК.



Рис. 2 Схематическая структура участка вируса краснухи (Schidt M., 2000).

В состав вириона входят три вирусспецифических полипептида: два оболочечных гликопротеина E1 и E2, составляющие пепломеры, и негликозилированный капсидный белок (С) (Tzenq W.P. et al., 2006; Murphy F.A., 1980). По данным Но-Terry, Oker-Blom и соавт., при электрофорезе в SDS-ПААГ разрешаются не три, а четыре структурных

белка вируса краснухи: E1 (55-63 кД), E2a (47 кД), E2б (42-45 кД) и С (30-35 кД) (Ho-Terry L. et al., 1986; Oker-Blom С., 1984). Установлено, что E2a и E2б – формы одного и того же полипептида, различающиеся по степени гликозилирования.

Вирион легко разрушается под действием детергентов, ультрафиолетовых лучей (Booth J.C. et al., 1972), в кислой (при pH ниже 5,8) и щелочной (pH выше 8,1) среде, неустойчив при комнатной температуре, но хорошо сохраняется при замораживании, особенно при температуре минус 70°C (Марданлы С.Г. и др., 2005).

Структура генома вируса краснухи

Геном вируса краснухи представляет собой однонитевую (+)-цепь РНК длиной 9755 н., которая в репликативном цикле является матричной, то есть служит для создания дочерних копий (Рис. 3) (Dominguez G. et al., 1990). Вирус краснухи имеет самое большое содержание G+C оснований (69,5%) из всех известных на сегодняшний день РНК содержащих вирусов (Dominguez G. et al., 1990; Pugachev K.V. et al., 1997; Takkinen K. et al., 1988; Vidgren G. et al., 1987). Молекулярная масса – 3200-3800 кД. РНК вируса краснухи обладает инфекционными свойствами и в бесклеточной системе ведет себя как мРНК, то есть для инициации инфекционного цикла в данном случае не требуются вирионные энзимы.

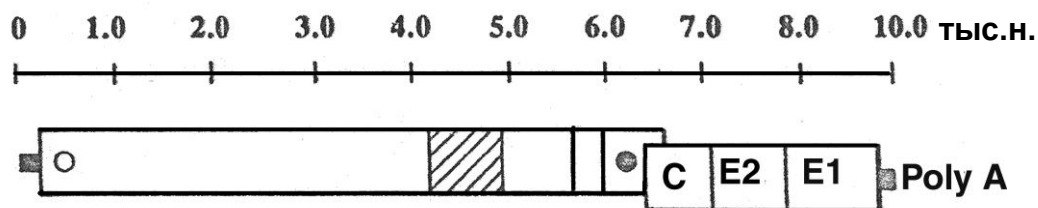


Рис. 3 *Схема строения генома вируса краснухи.*

На 3'-конце молекулы РНК вируса краснухи находится poly(A)-последовательность; 5'-конец «кэпирован» 7-метилгуазином.

Аналогичная структура концевых участков молекулы характерна для большинства эукариотических мРНК.

Геномная РНК вируса краснухи содержит две большие открытые рамки считывания (ОРС), функционально связанные с репликацией вирусной РНК. 5'-концевая часть генома представлена ОРС длиной 6345 н., которая кодирует вирусные неструктурные белки p150 и p90, а 3'-концевая ОРС имеет длину 3189 н. и кодирует структурные белки E1, E2 и капсидный белок (C) (Liang Y. et al., 2000; Yao J.D. et al., 1998).

Соответственно, в клетках, зараженных вирусом краснухи, определяются два вида однонитчатых РНК: 49S, идентичная вирионной, и 26S, которая является промежуточной, содержащей $\frac{1}{3}$ последовательностей 49S-РНК. После первичной репликации 49S-РНК образуется матрица минус-РНК, она может быть транскрибирована либо с 3'-конца с образованием 49S-плюс-РНК, либо на внутреннем участке с образованием субгеномной 26S-плюс-РНК.

49S-плюс-РНК может связываться и рибосомами и транслироваться с образованием неструктурных белков; связываться с репликативным комплексом и транскрибироваться с образованием новых минус-цепей матрицы; связываться с капсидными белками для упаковки в

нуклеокапсид. Когда количество иницирующих комплексов ограничено, связывающий участок для синтеза 26S-РНК успешно конкурирует с участком для инициации 49S-РНК и ограничивает доступ к нему.

Структурные белки

Гены, кодирующие основные структурные белки, расположены на субгеномной 26S-РНК в направлении 5' → 3' в следующем порядке: ген капсидного белка (С) – ген белка Е2 – ген белка Е1. Продуктом трансляции 26S-РНК является полипептид-предшественник структурных белков р110, который процессируется с образованием капсидного белка (С) и полипептида-предшественника поверхностных гликопротеинов Е2 и Е1 (Рис. 4) (Oker-Blom С. et al., 1983; Kalkkinen N. et al., 1984; Oker-Blom С., 1984). Капсидный белок (С) транслируется как первая часть полипротеина, содержащего все три структурных белка вируса. Он отделен от следующего белка (Е2) сигнальной пептидазой, которая расщепляет после Е2 сигнальной последовательности. По данным Suomalainen и соавт., эта последовательность является частью капсидного белка (С) в зрелом вирионе (Suomalainen M. et al., 1990).

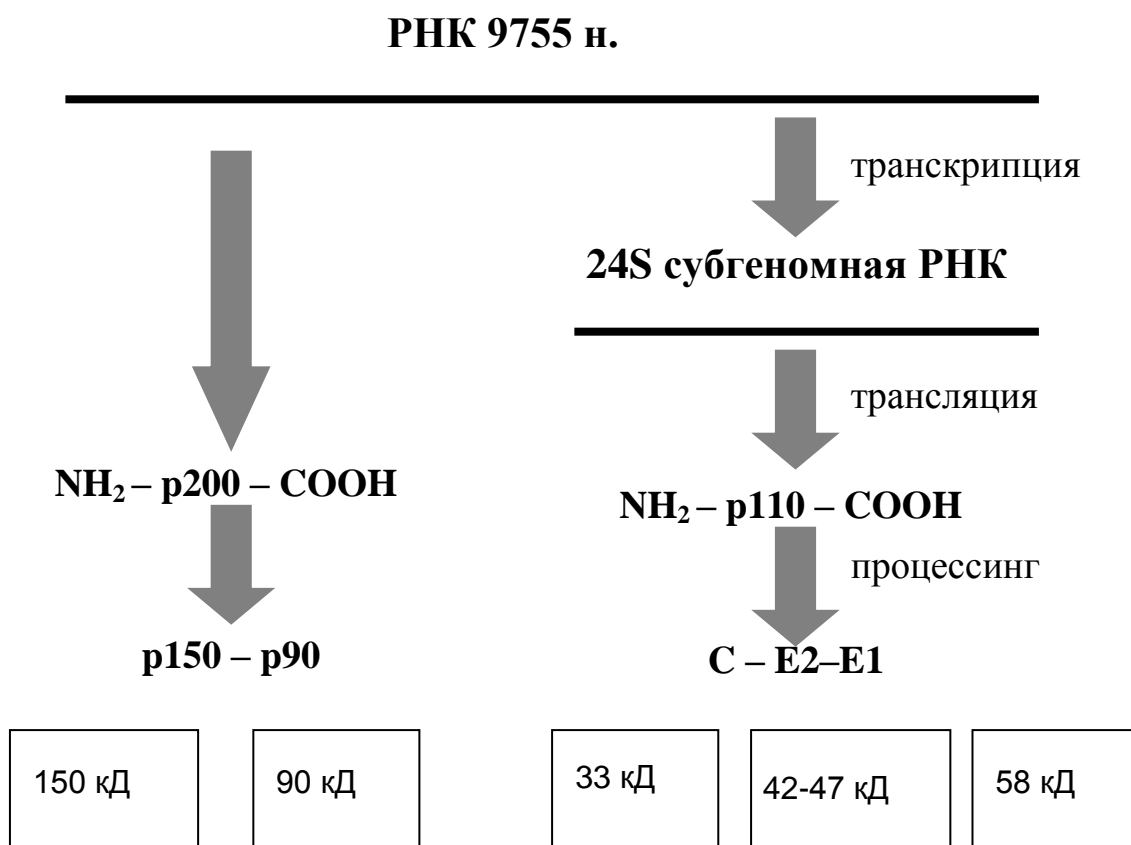


Рис. 4 Структура генома и трансляция генов вируса краснухи.

Капсидный белок (С)

В регулировании функции геномной РНК важную роль играет капсидный белок (С), представляющий собой негликозилированный, фосфорилированный, дисульфид-связанный гомодимер с варьируемой по данным разных авторов молекулярной массой от 33 до 38 кД, подобный коровым частицам вируса краснухи (Bowden D.S. et al., 1984; Marr L.D. et al., 1991; Oker-Blom C. et al., 1983; Vaheri A. et al., 1972). Эти данные были подтверждены электронной микроскопией с меткой иммунным золотом при использовании моноклональных антител к капсидному белку (С) вируса краснухи. Кроме того, коровые частицы вируса были связаны также с митохондриями. Авторы отмечали, что взаимодействие капсидного белка (С) вируса краснухи с митохондриями является уникальным среди семейства тогавирусов.

Капсидный белок (С) содержит кластеры пирролидин-альфа-карбоновой кислоты и остатки аргинина, участвующие в связывании с геномной РНК вируса краснухи и формировании вирусного нуклеокапсида (Bowden D.S. et al., 1989; Frey T.K., 1994). В частности, описан 28-аминокислотный домен, содержащий большое количество основных остатков и являющийся непосредственно вовлеченным в связывание с геномной РНК (Liu Z. et al., 1996). Однако, взаимодействие С-белка с вирусной РНК зависит не только от плотности основных остатков, так как обнаружены и другие основные области в капсидном белке (С), которые также связывались с вирусной РНК, но хуже. Это ставит под вопрос вовлечение других областей белка в формирование нуклеокапсида. В геноме вируса краснухи есть участок размером 29 н., находящийся в области 347-375 н.п. от начала, который взаимодействует с капсидным белком (С), хотя до конца не ясно, является ли он достаточным условием для компактизации генома (Liu Z. et al., 1996).

Гликопротеины оболочки E1 и E2

Гликопротеины оболочки E1 и E2 имеют трансмембранный гидрофобный сегмент, который закрепляет их на бислое липиде клетки-хозяина.

Функции структурных вирусных белков различны. Белок E1 является гемагглютинином и содержит 481 аминокислотный остаток (Ho-Terry L. et al., 1990). При использовании моноклональных антител установлено, что в составе белка E1, наиболее важного в антигенном отношении, имеются 6 близко расположенных эпитопа, ответственных за взаимодействие с вируснейтрализующими и гемагглютинирующими антителами к вирусу краснухи (Terry G.M. et al., 1988; Terry G.M. et al., 1989). Эта область характеризуется высокой степенью консервативности и, по мнению авторов, может быть использована для создания стандартных

синтетических антигенов при конструировании диагностических препаратов и вакцин.

Гликопротеид E2 содержит по крайней мере один эпитоп, на который вырабатываются вируснейтрализующие антитела. Тем не менее, в опытах на волонтерах, иммунизированных рекомбинантными вирусами вакцины, содержащими каждый из структурных белков вируса краснухи, было выявлено, что белок E1 является более сильным иммуногеном (Chaye Y. et al., 1992). Выработка противовирусных антител происходит в основном именно на этот полипептид.

Неструктурные белки

Продукт трансляции 49S-РНК – полипептид-предшественник неструктурных белков p200, необходимый для репликации вируса, который подвергается процессингу при помощи вирусспецифической папаиноподобной протеазы, с расщеплением на p150 и p90 (Рис. 4) (Fornig R.Y. et al., 1995). Процессинг p200 происходит в последовательности NH₂ – p150 – p90 – COOH.

Для оценки роли неструктурных белков в синтезе вирусной РНК в инфекционный кДНК-клон вируса краснухи вводили панель мутаций, оказывающих различные дефектные воздействия на процессинг p200 (Liang Y. et al., 2000). Оказалось, что мутации, полностью блокирующие расщепление p200 (G 1152S и G 1101S) или значительно снижавшие интенсивность этого процесса (G 1301 A), вели к потере инфекционности вируса. Мутации (R 1299 A и G 1300 A), частично повреждающие процессинг p200, снижали интенсивность вирусной репликации. Авторы подчеркивали, что все мутанты синтезировали «-»-нить РНК с той же интенсивностью, что и «дикий» тип, но уровень синтеза «+»-нити РНК был резко снижен. Следовательно, нерасщепленный p200 является

необходимым для синтеза «-»-нити РНК, в то время как продукты его расщепления – р150 и р90 – обеспечивают синтез «+»-нити РНК.

ПАТОГЕНЕЗ КРАСНУХИ

Краснуха – воздушно-капельная инфекция. Попавший в организм вирус сначала репродуцируется, попав в шейные лимфатические узлы, и там размножается. Затем вирус поступает в кровь – наступает фаза вирусемии и распространения вируса с их фиксацией в клетках системы мононуклеарных фагоцитов, особенно – в силу своего дерматотропизма – в эпителии кожи. Здесь развивается очаговая воспалительная реакция, в патогенезе которой имеются и компоненты иммунного воспаления, что приводит к появлению пятнисто-папулезной сыпи розового цвета (Cooper L.Z. et al., 1985). Сыпь держится 2-3 дня, исчезая, не оставляет пигментации и шелушения кожи. В этот период, как правило, увеличиваются регионарные лимфатические узлы, особенно затылочные и заднешейные (Wolinsky J.S., 1996).

На фоне появления сыпи в крови больных нарастает содержание вируснейтрализующих IgM-антител, через 10-14 дней их титр достигает максимума, а через 1 месяц они исчезают. После исчезновения сыпи появляются IgG-антитела, их титр достигает максимума к 8-9 неделе заболевания и сохраняется длительное время.

Больные краснухой считаются заразными после появления у них сыпи, хотя они могут выделять вирус в период от 7 дней до появления сыпи и в течение 14 дней после ее высыпания. В 25%–50% случаев инфекция протекает бессимптомно.

Краснуху принято считать легким заболеванием. Однако такое определение справедливо для течения этой инфекции у детей. Заболевание у взрослых людей характеризуется более тяжелым течением (нередко протекает с длительной лихорадкой, суставным синдромом, а также развитием органной патологии) (Horstmann D.M., 1970).

Самым частым осложнением при краснухе являются поражения суставов (Reef S.E. et al., 2002). Этому осложнению особенно подвержены девочки-подростки и женщины, причем артралгии и артриты встречаются у трети всех заболевших краснухой. При тяжелых формах болезни поражается центральная нервная система, что приводит к развитию менингита и энцефалита.

При широком распространении бессимптомных форм инфекции у взрослых (от 30 до 70%) проблематичным остается предупреждение заражения краснухой беременных женщин (Best J.M. et al., 1990; Sever J.L. et al., 1983). Наибольший риск развития уродств при заражении матери в первом триместре беременности, в период формирования эмбриона, когда уродства возникают в 60% случаев, во 2-м месяце – 25%, в 3-7 мес. – 10% (Kontarovich R.A. et al., 1979; Нисевич Л.Л. и др., 1992). Поэтому краснуха в этот период является показанием для прерывания беременности.

Синдром врожденной краснухи

История изучения врожденной краснухи начинается с блестящего клинического наблюдения австралийского офтальмолога Норманном Греггом. Уже в первой опубликованной работе (1941) Грегг приводит обширное описание типичных для краснухи аномалий развития, таких как катаракта, микрофтальм, ретинопатия, нистагм, помутнение роговицы, пороки сердца, низкий вес при рождении и плохое питание, дерматиты и высокая смертность при развитии (Gregg N.M., 1941). Несколько позднее им была отмечена и глухота. Нейе, Бланк представили данные, согласно которым небольшие размеры и вес детей, больных краснухой, связан с уменьшенным по сравнению с нормой числом клеток в различных органах (Naeye R.L. et al., 1965).

Заражение беременных происходит через дыхательные пути. После начального периода размножения вируса в месте внедрения развивается вирусемия. Вирусы проникают из межворсинчатых пространств в сосудистую систему плода с последующей диссеминацией в органах-мишенях, в т.ч. и в плаценте. Последняя служит источником вируса для плода. При этом, чем длительнее вирусемия у беременной, тем больше вероятность поражения плода. Вирусы с током крови могут достигать околоплодные оболочки, абсорбироваться на них, инфицировать околоплодные воды, а затем и плод. Инфицирование околоплодных вод может произойти из родовых путей при повреждении околоплодных оболочек, нисходящим путем через фаллопиевы трубы. Плод может инфицироваться околоплодными водами различным путем: при аспирации и заглатывании инфицированных околоплодных вод, через кожные покровы и конъюнктиву глаз.

Проникая в клетки эмбриона, вирусная РНК заменяет клеточную РНК, передающую генетическую информацию в аппарат, воспроизводящий клеточный белок. Это приводит к извращению

нормального клеточного обмена и синтеза белков, что и обуславливает гибель эмбриона или возникновение пороков развития. Дальнейший процесс определяется гестационным возрастом плода ко времени заражения. В период до 8-й недели беременности (если беременная больна краснухой) инфекция развивается у 50-80% плодов. Если инфицирования беременной произошло во II триместре беременности, заражаются не более 10-20% плодов. В III триместре заражение плода происходит относительно редко (Афанасьев Н.Н., 2006).

Неблагоприятное влияние краснухи на плод проявляется не только тератогенным действием. Краснуха в ранний период беременности в 10-40% случаев может привести к спонтанным абортam, в 20% – к мертворождению. Постнатальная смертность обусловлена пороками сердца, сепсисом и общим недоразвитием.

Классическая триада дефектов (триада Грегга), связанных с врожденной краснухой, включает катаракту, пороки сердца и нейросенсорную глухоту, однако описаны также многие другие аномалии (Cooper L.Z., 1975). Они приведены в Табл. 3. Выраженные случаи устанавливаются сразу после рождения, в то время как более скрытые (как инсулинозависимый диабет) могут проявиться лишь через несколько месяцев или позже.

Частые признаки	Редкие
<p>Нейросенсорная глухота</p> <p>Незаращение боталлова протока или/и дефект межжелудочковой перегородки</p> <p>Стеноз легочного ствола</p> <p>Аортальный стеноз</p>	<p>Помутнение роговицы</p> <p>Глаукома</p> <p>Хориоретинит</p> <p>Аномалии дерматоглифики</p> <p>Генерализованная лимфаденопатия</p> <p>Недостаточность гормона роста</p>

<p>Коарктация аорты</p> <p>Тетрада Фалло</p> <p>Катаракта</p> <p>Ретинопатия</p> <p>Микрофтальм</p> <p>Менингоэнцефалит</p> <p>Микроцефалия</p> <p>Замедленное умственное развитие</p> <p>Замедление психомоторных реакций</p> <p>Нарушение речи центрального происхождения</p> <p>Низкая масса тела при рождении</p> <p>Гепатоспленомегалия</p> <p>Периферический стеноз бронхиального дерева</p> <p>Поражение костной ткани</p> <p>Сахарный диабет</p> <p>Тромбоцитопеническая пурпура</p> <p>Крипторхизм</p> <p>Паховая грыжа</p>	<p>Гемолитическая анемия</p> <p>Гепатит</p> <p>Гипотиреоз</p> <p>«Болезнь позднего развития»</p> <p>Патология миокарда</p> <p>Выраженная миопия</p> <p>Пневмония</p> <p>Патология щитовидной железы</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Табл. 3 Клинические проявления СВК.

Россия до последнего времени относилась к числу стран, где массовая вакцинация населения против краснухи не проводилась до 1998 года. В этих условиях вопросы совершенствования системы эпидемиологического надзора и контроля за краснушной инфекцией, включая организацию вакцинопрофилактики и консультативно-диагностического обслуживания беременных женщин в целях

предупреждения СВК, приобретает особую актуальность (Краснуха. Синдром врожденной краснухи, 1998; Семериков В.В. и др., 2002).

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

В 1965 г. Грин и в 1969 г. Форбес опубликовали данные эксперимента, задачей которого было исследование восприимчивости к краснухе при разных способах заражения (Forbes J.A., 1969). Эти опыты в какой-то мере объясняют особенности эпидемиологии краснухи. Случайного однократного контакта с больным краснухой обычно недостаточно для заболевания, и этим краснуха отличается от таких инфекционных заболеваний, как корь, ветряная оспа, эпидемиологический паротит (Gordon J.E. et al., 1967).

Склонность краснухи распространяться преимущественно среди тесно контактирующих групп населения накладывает отпечаток на эпидемиологию этой инфекции (Анджапаридзе О.Г. и др., 1975). Заболеваемость краснухой среди населения проявляется преимущественно в виде отдельных вспышек в организованных коллективах.

Самая большая из эпидемий краснухи была зафиксирована в США в 1964-1965 гг. Она охватила 23 штата, и, по неполным данным, за время эпидемии краснухой переболело около 2 млн. человек. Из 500 наблюдаемых во время эпидемии беременных женщин 2,4% заболели СВК (Sever J.L. et al., 1969). Частота ее в среднем во время эпидемии составила 20 случаев на каждую 1000 беременных. Для сравнения, в межэпидемический период с 1959 по 1964 г. на каждые 10 тыс. беременных приходилось только 4-8 случаев заболеваний краснухой. Считают, что в результате этой эпидемии около 20 тыс. детей родились с врожденными уродствами (Isenogle J.P. et al., 2006).

Сейчас ситуация также серьезна. Ежегодно в мире регистрируется более 300 тыс. детей с СВК, из них в РФ от 150 до 500 тыс. больных краснухой (Зверев В.В., 1999).

Выделение краснухи в группу инфекций, заболеваемость которыми должна быть резко снижена путем массовой вакцинации, обусловлено тем, что частота данного заболевания в РФ одна из самых высоких в Европе (Фисенко Ю.Ю., 2006).

В нашей стране официальная регистрация краснухи осуществляется с 1979 года, регистрация СВК введена в 1991 году (Беляков В.Д. и др., 1989; Болотовский В.М., 1993; Robertson S. et al., 1997). Многолетняя динамика заболеваемости краснухой за анализируемый период характеризовалась неравномерным распределением по годам. Анализ внутригодовой динамики заболеваемости краснушной инфекцией выявил зимне-весеннюю сезонность. Сезонный подъем начинается в январе и заканчивается в июне (Семериков В.В. и др., 2005).

В Российской Федерации краснуха была введена в календарь прививок в 1998 году, но вакцинация не проводилась по причине отсутствия средств на вакцину (Lialina L.V. et al., 2001). Поэтому наблюдалась высокая заболеваемость краснухой, часто достигавшая уровня эпидемии (Рис. 5).

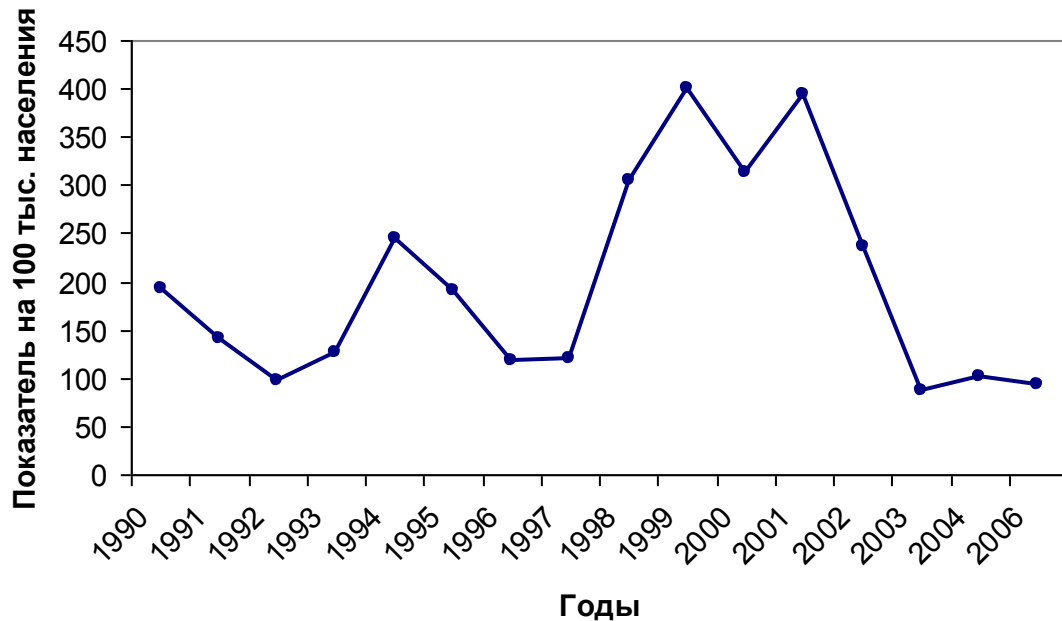


Рис. 5 *Динамика заболеваемости краснухой населения в Российской Федерации (с 1990 по 2006 гг.) (Ясинский А.А. и др., 2005).*

По данным Федерального центра Госсанэпиднадзора, в 1998 г. в РФ показатель заболеваемости краснухой составлял 305,3 на 100 тыс. населения. При этом в 1998 г. в Москве отмечался самый высокий показатель заболеваемости – 971,3 на 100 тыс. населения (Гайдамович С.Я. и др., 2001).

В 1999 и 2001 гг. в РФ имели место чрезвычайно интенсивные периодические подъемы заболеваемости краснухой. В 2001 г. показатель в целом по РФ составлял 396,0 на 100 тыс. населения, а в ряде регионов (Республика Саха (Якутия), Амурская, Сахалинская и другие области) – 1000-1900, в Немецком автономном округе – 2842. По данным ВОЗ в 2002 г. показатель заболеваемости краснухой по сравнению с таким же периодом 2001 г. начал снижаться в среднем в 1,7 раза и составил 236,4 на 100 тыс. населения (О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2002 году: Государственный доклад, 2003). За 9 мес. 2003 г. он снизился еще на 64,9%, достигнув минимального за

последние годы показателя – 77,7 на 100 тыс. населения (Зверев В.В., Юминова Н.В., 2004), что явилось результатом довольно высокого уровня охвата вакцинацией против краснухи декретированных возрастных групп населения. Заболеваемость краснухой в РФ в 2006 г. составила 92,62 на 100 тыс. населения, а всего по РФ – 133201, дети до 14 лет 386,5 на 100 тыс. населения.

Анализ многолетней динамики заболеваемости краснухой населения города (по данным ТУ Роспотребнадзора по г. Москве) свидетельствует о том, что после первоначального снижения этот показатель стабилизировался на уровне более 50 случаев на 100 тыс. населения. Однако в последние два года отсутствует тенденция к дальнейшему снижению уровня заболеваемости во всех возрастных группах. Это свидетельствует о сохранении достаточно большой неиммунной прослойки, в первую очередь среди детей (Фисенко Ю.Ю., 2006).

ВАКЦИНАЦИЯ

Иммунизация против краснухи преследует основной целью профилактику заболевания у беременных женщин, которое создает угрозу инфицирования плода и рождения ребенка с синдромом врожденной краснухи.

В начале 60-х годов мир стоял перед проблемой создания эффективной и безопасной краснушной вакцины. Созданные к этому времени вакцины либо были недостаточно эффективны, либо вызывали много побочных реакций.

В 1962 году в США двумя группами исследователей, работавших независимо друг от друга, было сообщено о выделении вируса краснухи от больных детей. Уэллер и Нивэй (Weller T.H. et al., 1962) сообщили о цитопатогенном действии агента, выделенного ими на культурах амниона человека от больного краснухой. После Паркмэн, Бушер и Артенстайн (Parkman P.D. et al., 1962) впервые применили для выделения вируса первичные культуры почки зеленой мартышки. А в 1966 году разработали первую живую аттенуированную вакцину, HPV-77, методом пассажа RV-77 на клетки почки зеленой мартышки (Parkman P.D. et al., 1966). В 1969 году, после пассажа HPV-77 на фибробласты эмбриона утки, HPV-77 DE-5 стала первой вакциной против краснухи, запатентованной для использования в США. Вскоре стали появляться другие живые аттенуированные вакцины, и одна из них RA – 27/3, которая легла в основу программы вакцинации в большинстве развитых стран (Cooper L.Z. et al., 1985; Parkman, P. D., 1999; Wolinsky J.S., 1996). Вакцина была первоначально лицензирована в Европе (Plotkin S.A. et al., 1969) и в 1979 г. в США. Вакцина из этого штамма оказалась слабореактогенной, высокоиммуногенной и обеспечивала надежную защиту от инфекции (Plotkin S.A. et al., 1999).

В настоящее время в мировом масштабе, за исключением Японии и Китая, используется вакцинный штамм RA 27/3 вируса краснухи, культивируемый на диплоидных клетках человека (Frey T.K. et al., 1993; Pugachev K.V. et al., 1997; World Health Organization, 2000).

Для проведения прививок используют как ассоциированные вакцины (корь – паротит – краснуха – MMR), так и моновакцины (Иммунопрофилактика, 2003). При этом первые назначают детям с 12-месячного возраста, а вторые – в основном для селективной иммунизации девочек в возрасте 13 лет и женщин групп риска.

Календарь прививок России предусматривает проведение прививок против краснухи в 12-15 мес., 6 лет и 13 лет (девочки).

Зарегистрированные в России вакцины представлены в Табл. 4.

Вакцинные препараты	Компоненты	Другие вещества
Приорикс (Глаксо Смит Кляйн)	Аттенуированный вирус кори штамм Шварц (1000 ТЦД-50); Аттенуированный вирус паротита RIT 43/85, производный штамма Jeryl Lynn (1700 ТЦД-50); Аттенуированный вирус краснухи штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ТЦД-50).	Неомицин В сульфат 25 мкг; Белок куриных яиц.
MMR (Мерк Шарп Доум)	Аттенуированный вирус кори штамм Edmonston (1000 ТЦД-50); Аттенуированный вирус паротита штамм Jeryl Lynn (2000 ТЦД-50); Аттенуированный вирус краснухи штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ТЦД-50).	Неомицин В сульфат 25 мкг; Белок куриных яиц; Гидролизированный желатин.
Вакцина против краснухи живая аттенуированная лиофилизированная	Аттенуированный вирус краснухи, штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ЦПД-50)	

(Индия)		
Эрвевакс (Глаксо СмитКляйн)	Аттенуированный вирус краснухи штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ЦПД-50)	Неомицин В сульфат 25 мкг
Рудивакс (Пастер-Мерье)	Аттенуированный вирус краснухи штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ЦПД-50)	Неомицин 25 мкг
Вакцина против кори, паротита, краснухи живая аттенуированная лиофилизированная термостабильная (Индия)	Аттенуированный вирус кори, штамм Эдмонстон-Загреб (1000 ЦПД-50); Аттенуированный вирус паротита, штамм Л-Загреб (5000 ЦПД-50); Аттенуированный вирус краснухи, штамм Wistar RA 27/3 М (1000 ЦПД-50)	Неомицин 10 мкг; Желатин 2,5%; Сорбитол 5,0%.

Табл. 5 Живые вакцинные препараты (Вакцинопрофилактика в учреждениях здравоохранения. Вакцинация против гриппа, 2005).

Используя ту или иную стратегию вакцинопрофилактики, многие страны добились значительных успехов в борьбе с краснухой и ее последствиями. Так, например, в США менее чем за 20 лет применения вакцины заболеваемость краснухой снизилась на 99%, а число случаев врожденной краснухи уменьшилось с 67 случаев в 1970 г. до 2 – в 1988 г. Панамериканская организация здравоохранения в 2003 году запланировала элиминацию краснухи и СВК к 2010 году (Meeting of Ad-Hoc Panel of Experts on Rubella and Measles, 2004). Успешно решают эту проблему и многие европейские страны (Швеция, Финляндия, Норвегия и др.).

В России вакцинация против краснухи начала проводиться с 1998 года. Учитывая высокую эффективность и безопасность краснушной вакцины, Европейское региональное бюро ВОЗ в 1998 году приняло в качестве одной из целей программы «Здоровье 21» следующее: «К 2010 году или ранее частота СВК должна быть снижена до уровня менее 0,01 на 1000 родов живым ребенком» Охват вакцинацией составляет от 40% до

90% в разных регионах. Начало вакцинации пришлось на период максимального эпидемического подъема 1999-2001 годов. Масштабы вакцинации увеличиваются, и в скором времени будет проводиться полная национальная вакцинация против краснухи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

Бактериальные штаммы и плазмиды

Использованные в работе бактериальные штаммы представлены в Табл. 5. Плазмиды для клонирования представлены в Табл. 6.

Наименование	Характеристика	Источник получения
<i>E. coli</i> MC 1061 (Silhavy T.J. et al., 1984)	F ⁺ , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7696, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , Δ (<i>lac</i>)X74, <i>rpsL</i> (Str ^r), <i>hsdR2</i> , (r _k -m _k ⁺), <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>	Коллекция лаборатории ДНК- содержащих вирусов ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН
<i>E. coli</i> POP 2136	F ⁺ , <i>endA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> , <i>mal</i> , CI857, <i>malPQ</i> , λ imm	Коллекция лаборатории ДНК- содержащих вирусов ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН

Табл. 5 Штаммы *E. Coli*, использованные в работе.

Наименование	Характеристика	Источник получения
pSPO2	Плаزمида, содержащая последовательность структурных белков вируса краснухи	Коллекция лаборатории ДНК- содержащих вирусов ГУ НИИ ВС им. И.И.

		Мечникова РАМН
pEX1	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков в клетках <i>E. coli</i>	Коллекция лаборатории ДНК-содержащих вирусов ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН
pGEM-3	Вектор для клонирования	Коллекция лаборатории ДНК-содержащих вирусов ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН

Табл. 6 *Плазмиды.*

Реактивы

В работе использованы отечественные и импортные реактивы производства фирм «Difco» (США), «Pharmacia» (Швейцария), «МВІ Fermentas» (США), «Promega» (США), соответствующие квалификациям о.с.ч., ч.д.а. и х.ч. Дистиллированную воду дополнительно очищали на системе для очистки воды «Simplicity 185» («Millipore», Франция).

Ферменты

Эндонуклеазы рестрикции HindIII, EcoRI, PstI, BamHI, SmaI (фирм «Promega», «МВІ Fermentas») использовали согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Питательные среды

Жидкая и агаризованная среда LB (бактотриптон 1%, дрожжевой экстракт 0,5%, NaCl 1%, бактоагар 1,5%); а также LB с добавлением антибиотика ампициллина 70 мг/мл.

МЕТОДЫ

Получение культуры компетентных клеток *E. coli*

Культуру компетентных клеток получали в соответствии с описанными методами (Маниатис Т. и др., 1984) и инструкции фирмы-производителя («МВІ Fermentas», США).

Культуру клеток сеяли в среде TransformAid™ С-Medium («МВІ Fermentas», США) во флаконах и инкубировали при 37°C в термостатируемой качалке при частоте 200 об/мин в течение 12-24 часов.

Отбирали ночную культуру, добавляли в среду TransformAid С-Medium и инкубировали при 37°C в термостатируемой качалке при частоте 200 об/мин в течение 20 мин. Затем центрифугировали в настольной центрифуге 5415 («Eppendorf», ФРГ) в течение 1 мин. при 11000 об/мин. Далее удаляли надосадочную жидкость.

Клеточный осадок ресуспендировали в растворе TransformAid™ Т-Solution и инкубировали 5 мин. при 4°C.

Раствор TransformAid™ Т-Solution (500 мкл):

Т-Solution (А) 250 мкл

Т-Solution (В) 250 мкл

Центрифугировали 1 мин. при 11000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость.

Затем добавляли раствор TransformAid™ Т-Solution, ресуспендируем и инкубируем в течение 5 мин. при 4°C.

Трансформация компетентных клеток плазмидными ДНК

Трансформацию компетентных клеток проводили в соответствии с описанными методами (Маниатис Т. и др., 1984) и инструкции фирмы-производителя («МВІ Fermentas», США).

Реакцию проводили в стерильных центрифужных пробирках объемом 10 мл. К компетентным клеткам добавляли плазмидную ДНК и инкубировали в течение 5 мин. при 4°C.

Различные разведения клеток высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB с Ar в концентрации 70 мкг/мл методом растирания и инкубировали при 37°C в течение 12-24 часов.

Эффективность трансформации компетентных клеток составляет 10^5 - 10^6 колоний на мкг ДНК.

Выделение и очистка плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК в минипробах проводили по методу щелочного лизиса (Маниатис Т. и др., 1984) и инструкции фирмы-производителя («МВІ Fermentas», США).

В микропробирки разливали буфер А рН 8,0 для лизиса с предварительно растворенным лизоцимом (5 мг/мл).

Буфер А:

Глюкоза	50 мМ
Трис-НСІ рН 8,0	20 мМ
ЭДТА	10 мМ
Лизоцим	5 мг/мл

Бактериальную культуру 1/8 – 1/32 сектора, выращенную на чашке Петри, ресуспендировали в буфере А. Инкубировали при комнатной

температуре 5-10 мин.. Затем добавляли свежеприготовленный буфер В, осторожно перемешивая.

Буфер В:

SDS	1%
NaOH	0,2 N

Инкубировали 5 мин. на холоде.

Добавляли холодный 5 М КАс, рН 4,8, осторожно перемешивали и инкубировали при +4°C 10 мин. Смесь центрифугировали в настольной центрифуге 5415 («Eppendorf», ФРГ) в течение 1 мин. при 13000 об/мин. Переносили надосадочную жидкость в новую пробирку.

К надосадку добавляли 2,5-3 объема изопропилового спирта, хорошо перемешивали и инкубировали при -20°C в течение 60 мин. для формирования осадка. После чего плазмидную ДНК осаждали центрифугированием в течение 4 мин. при 13000 об/мин.

Добавляли 70% этиловый спирт, инкубировали 5 мин. при комнатной температуре. Осаждали центрифугированием в течение 1-2 мин. при 13000 об/мин, убирали надосады. Затем высушивали осадок, поместив пробирки на 5 мин. в вакуумный испаритель.

Осадки ДНК растворяли в буфере STE (в зависимости от величины осадка) и перемешивали на вортексе (ИКА-Labortechnik, ФРГ).

Буфер STE:

Трис-НСl, рН 8,0	10 мМ
NaCl	100 мМ
ЭДТА, рН 8,0	1 мМ

Для удаления примесей РНК в препарате плазмидной ДНК раствор обрабатывали РНКазой, добавляя 1/100 объема раствора в концентрации 5 мг/мл, и инкубировали в течение 30 мин. при 37°C.

Затем добавляли 1/10 объема раствора холодного 5 М КАс, рН 4,8 и 2,5-3 объема изопропилового спирта, хорошо перемешивали и инкубировали при -20°С в течение 60 мин. для формирования осадка.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофоретическое исследование препаратов ДНК проводили по методу, описанному в руководстве (Маниатис Т. и др., 1984).

Электрофорез плазмидной ДНК в агарозном геле проводили для оценки полноты протекания реакции рестрикционного гидролиза и лигирования, а также для идентификации плазмид по их размерам. Использовали 1% агарозный гель из агарозы фирмы «Pharmacia» (Швейцария). Для приготовления геля и проведения электрофореза применяли буфер 1xTBE (рН 8,0):

Трис-борат	0.89М
Борная кислота	0.89М
ЭДТА (рН 8.0)	0.02М

и 5x буфер для нанесения проб: 50% глицерин, по 0.025% бромфенолового синего и ксилолцианола (Маниатис Т. и др., 1988) в присутствии бромистого этидия (1 мкг/мл) (Sharp P.A. et al., 1973).

В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК фага Lambda, обработанную рестриктазой PstI («МВІ Fermentas», США).

После проведения электрофореза гели фотографировали в проходящем УФ свете на УФ-трансиллюминаторе («Vilber Lourmat», Франция).

Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970) в 7,5% разделяющем SDS-полиакриламидном геле и Трис-глициновом буфере (0,025М Трис, 0,192М глицин, 0,1% SDS). Буфер для образцов содержал 0,0625М Трис, 2,3% SDS, 1% 2-меркаптоэтанола, 10% глицерина, 0,05% бромфенолового синего. Для проведения электрофореза использовали прибор производства фирмы «Bio-Rad» (США).

После окончания электрофореза гель помещали в раствор 7% уксусной кислоты для фиксации белков на 10 мин., а затем окрашивали в растворе, содержащем 0,1% Кумасси R-250, 7% уксусной кислоты и 25% этилового спирта 20 мин. при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель отмывали раствором 7% уксусной кислоты и 25% этилового спирта.

Иммуноблотинг

Иммобилизацию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили по ранее описанному методу (Towbin H. et al., 1979) на оборудовании и по рекомендации фирмы «Pharmacia» (Швеция). Полноту электропереноса контролировали окрашиванием мембран в течение 5 мин. 0,2% раствором Ponso-S в 3% растворе ТХУ. Избыток красителя отмывали дистиллированной водой. Для полного удаления красителя мембрану затем промывали буфером TBS-T (20мМ Трис-HCL pH7,5, 150мМ NaCl, 0,05% Твин-20) до окончательного исчезновения окрашивания.

Свободные центры связывания нитроцеллюлозы блокировали инкубированием мембраны в течение 1 часа при комнатной температуре в растворе, содержащем 5% сухого обезжиренного молока в TBS-T. Затем мембрану помещали в раствор TBS-T с добавлением 5%-ого лизата E.coli, содержащий сыворотку к рекомбинантному антигену, и инкубировали в

течении 1 часа при 37°C на термостатируемой качалке. По окончании инкубации мембрану отмывали TBS-T и погружали в раствор моноклональных антител мыши к IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Инкубировали 40 мин. при 37°C на термостатируемой качалке и вновь отмывали три раза в буфере TBS-T. Тщательно удаляли остатки буфера и проявляли реакцию раствором субстрата (0,04% тетраметилбензидин и 0,006% H₂O₂ в растворе 50мМ Трис-HCL pH 7,5) в течение 10-15 мин. при комнатной температуре без доступа света. Мембрану промывали водой, удаляли остатки влаги фильтровальной бумагой и высушивали на воздухе.

Описание ряда методик, конкретные условия постановки экспериментов, состав отдельных растворов приводятся при изложении полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и выделение фрагментов генома вируса краснухи

Исходная плазмида pSPO2 была сконструирована на основе вектора экспрессии pGEM-3 в лаборатории ДНК-содержащих вирусов НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН. В полилинкер длиной 57 п.н. плазмиды pGEM-3 ранее были встроены кодирующие последовательности структурных генов белков E1, E2 и капсидного белка (С) вируса краснухи (Рис. 13 Приложения).

Строение и рестриктная карта плазмиды pGEM-3 показана на Рис. 12 Приложения.

Для трансформации pSPO2 использовали штамм *E. coli* MC1061, созданный для экспрессии плазмидных векторов, содержащих промотор P_R (Stanley K.K. et al., 1984). Клетки этого штамма рекомбинантны по гену репрессора фага λ, несущего температурочувствительную мутацию. Поэтому в них активность промотора P_R, регулируемого репрессором, зависит от температуры, что важно для обеспечения возможности индукции экспрессии плазмидных генов с этого промотора.

Трансформанты сеяли на чашки с ампициллином и выращивали при температуре 32°C. Клоны, содержащие рекомбинантную плазмиду pSPO2, пересеивали на чашки с ампициллином. Плазмиду идентифицировали методом гидролиза эндонуклеазами рестрикции EcoRI, BamHI, SmaI, HindIII. На Рис. 6 показаны результаты рестрикционного анализа плазмиды pSPO2.

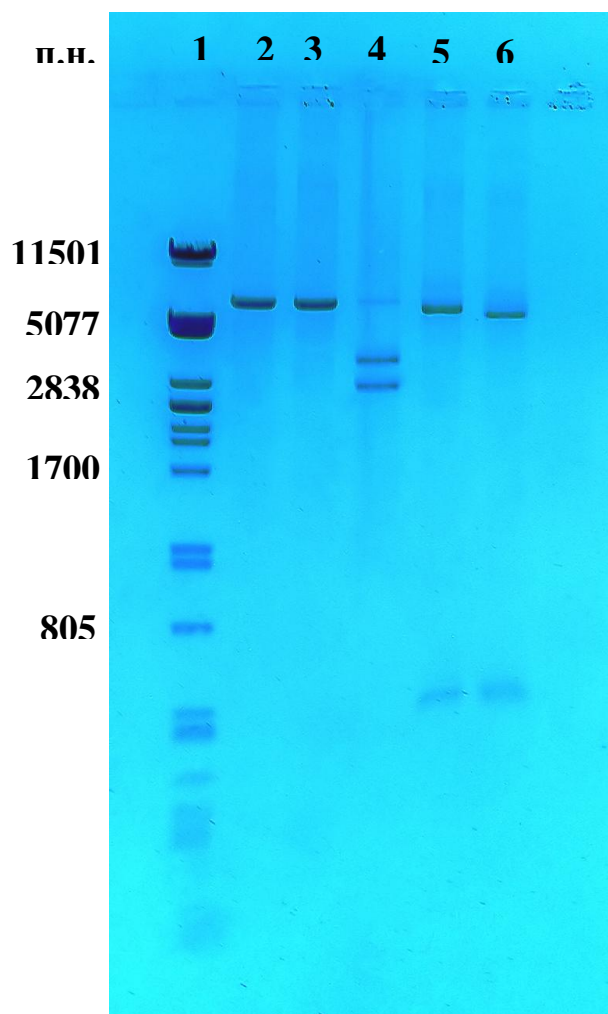


Рис. 6 Рестрикционный анализ плазмиды *pSPO2*. Электрофорез в 2% агарозном геле: 1 - λ *PstI* маркер, 2 – гидролиз эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, 3 – *BamHI*, 4 – *EcoRI* + *HindIII*, 5 – *SmaI*, 6 – *SmaI* + *HindIII*.

Далее методом гидролиза эндонуклеазами рестрикции *PstI*, *EcoRI* и *HindIII* получили четыре фрагмента плазмиды *pSPO2*: *PstI*-*PstI* (ген белка *E1*) с длиной 1536 п.н., *HindIII*-*EcoRI* – 2816 п.н., *EcoRI*-*PstI* – 1728 п.н. и *PstI*-*HindIII* – 8 п.н. Результаты рестрикции плазмиды *pSPO2* показаны на Рис. 7.

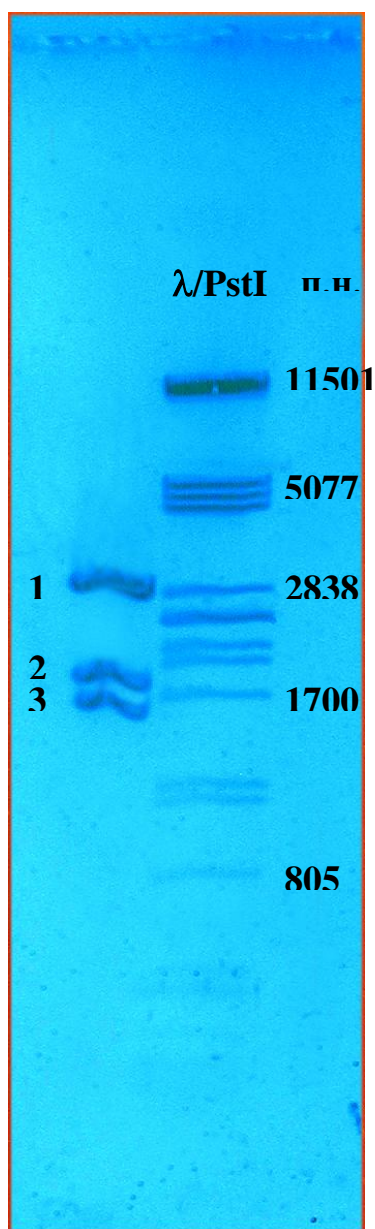


Рис. 7 Гидролиз плазмиды *pSPO2*. Электрофорез в 2% агарозном геле: 1 – *HindIII-EcoRI* фрагмент, 2 – *EcoRI-PstI* фрагмент, 3 – *PstI-PstI* фрагмент, $\lambda/PstI$ – маркер.

Выбор векторной системы для экспрессии рекомбинантных белков, содержащих ген E1 вируса краснухи

Для получения препаративных количеств рекомбинантных белков в клетках *E.coli*, необходимых для оценки их антигенных свойств, мы выбрали систему векторов экспрессии pEX1-3, позволяющих синтезировать рекомбинантные белки во всех трех рамках считывания (Stanley K.K. et al., 1984). Экспрессия в системе pEX находится под контролем правого промотора бактериофага λ , который, в свою очередь, регулируется температурочувствительным репрессором бактериофага λ , кодируемого мутантным геном cIts857, с операторным участком. Когда клетки растут при температуре 30-32°C, репрессор связан с оператором и блокирует экспрессию. Повышение температуры до 39-42°C приводит к инактивации репрессора, что позволяет РНК-полимеразе связаться с промотором и начать транскрипцию гена. В результате последующей трансляции синтезируются значительные количества рекомбинантного белка.

Рекомбинантные плазмиды pEX1, pEX2, pEX3, позволяющие синтезировать рекомбинантные белки во всех трех рамках считывания (Pettersson R.F. et al., 1983), содержат в 3'-конце гена *LacZ* полилинкер длиной 35 н.п., в который можно вставить последовательности ДНК для экспрессии. Образующийся в результате экспрессии рекомбинантный белок содержит в своем составе β -галактозидазу *E.coli*, молекулярный вес которой составляет 118 кД. Это обстоятельство, а также то, что промотор фага λ обеспечивает мощную экспрессию, приводит к тому, что экспрессируемый продукт составляет значительную часть суммарного бактериального белка. В клетках он накапливается в виде нерастворимых агломератов, называемых также «тельцами включения». Образование продукта в виде телец включений является очень удобным, т.к. во-первых,

не оказывает токсического действия на клетку и позволяет ей достаточно долго и в большом количестве синтезировать чужеродный белок. Во-вторых, такой нерастворимый продукт легко выделяется и очищается от остальных клеточных белков.

Создание векторной системы, предназначенной для экспрессии в клетках *E. coli* рекомбинантного белка E1

Для выбора правильной рамки считывания была использована программа Vector NTI 9.1.0. Учитывая структуру гена E1, была выбрана рекомбинантная плазмида pEX1 длиной 5783 п.н. (Рис. 14 Приложение).

Для конструирования плазмиды pEX1-E1 Rub плазмиду pEX1 гидролизовали эндонуклеазой рестрикции PstI, сайт рестрикции которой находится в полилинкере длиной 36 п.н.. После чего, вектор экспрессии pEX1 лигировали вместе с тремя фрагментами гена вируса краснухи: ген белка E1 (PstI–PstI) длиной 1536 п.н., HindIII–EcoRI – 2816 п.н. и EcoRI–PstI – 1728 п.н. Лигазной смесью, содержащей в составе генома температурочувствительный ген бактериофага λ cIts857, а именно, клетки штамма PLT90 (Пат 2043409 РФ), трансформировали штамм POP *E. coli*. Трансформанты пересеивали на чашки с ампициллином и выращивали при температуре 32°C. Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с геном белка E1 в двух ориентациях, пересеивали на чашки с ампициллином. Рекомбинантные плазмиды анализировали методом гидролиза эндонуклеазой рестрикции PstI. На Рис. 8 показан результат рестрикционного анализа плазмиды pEX1-E1 Rub.

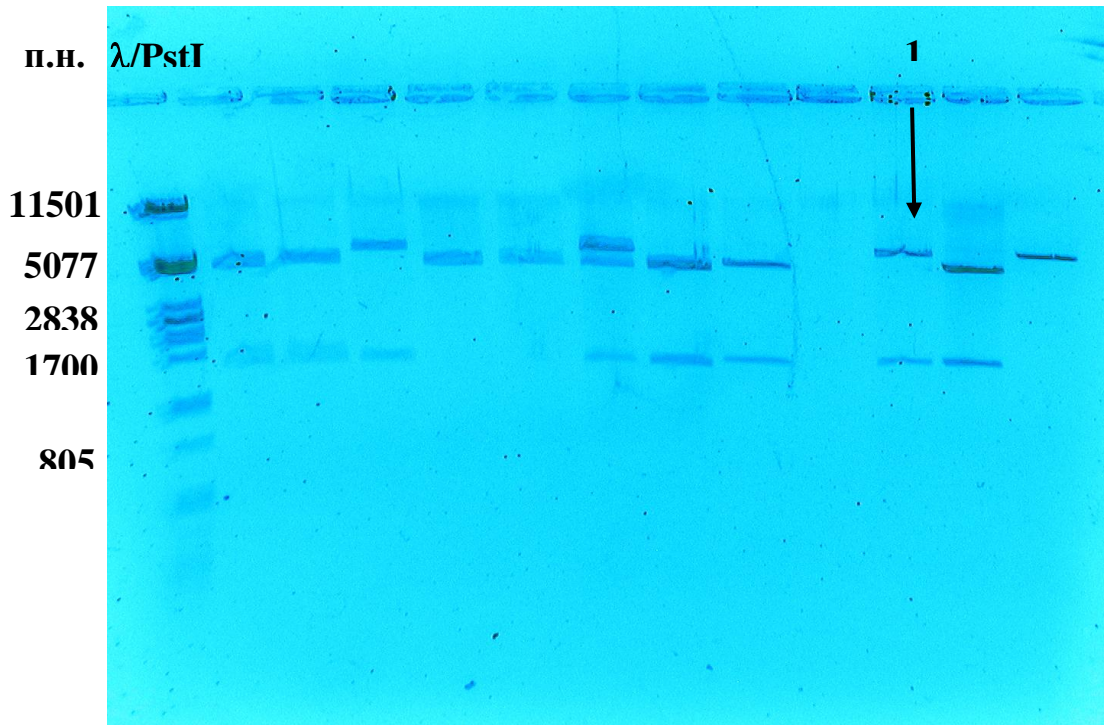


Рис. 8 Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *PstI* плазмиды pEX1-E1 Rub. Электрофорез в 2% агарозном геле: 1 – плазида pEX1-E1 Rub, λ /*PstI* – маркер.

Так как вставка PstI-PstI фрагмента могла пройти в двух вариантах, были выбраны клоны со встроенным фрагментом. После чего, методом гидролиза эндонуклеазой рестрикции BamHI, был получен клон с той ориентацией гена E1, которая нас интересует (Рис. 9). Этому клону дали название pEX1-E1 Rub (Рис. 15 Приложение).

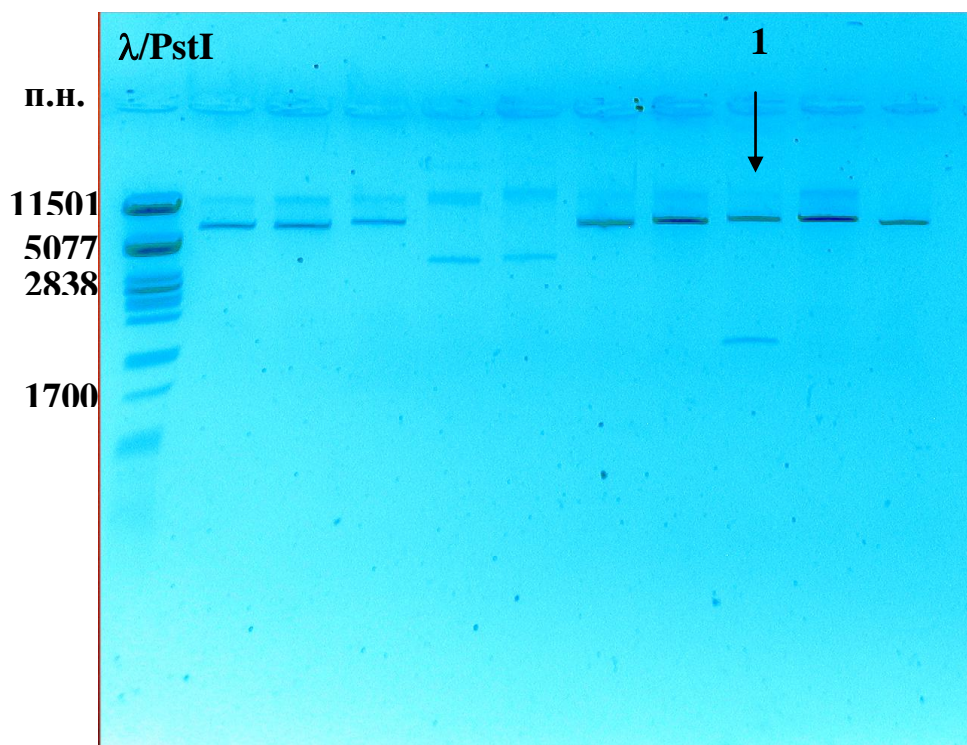


Рис. 9 Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI плазмиды *pEX1-E1 Rub*. Электрофорез в 2% агарозном геле: 1 – плазида *pEX1-E1 Rub*, λ /*Pst*I – маркер.

Исследование векторной системы на экспрессию в клетках *E. coli* рекомбинантного белка E1

Несмотря на то, что результаты рестрикционного анализа подтвердили правильность структуры плазмиды *pEX1-E1 Rub*, ее способность экспрессировать активный белок, в частности, сохранность рамки считывания кодирующих последовательностей, нуждалась в проверке. Чтобы оценить свойства белковых продуктов полученной плазмидной конструкции, отобранные клоны трансформантов выращивали на твердой среде LB с 70 мкг/мл ампициллином в течение ночи при 32°C. Затем индуцировали экспрессию плазмидных генов с промотора P_R

повышением температуры культивирования до 42°C, и выращивали при этой температуре в течение 2 часов. Клетки разрушали добавлением к культуре лизоцима, фракцию телец включений собирали центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl рН 8,0 и 10мМ ЭДТА. Состав продуцируемых белков оценивали методом электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии SDS (Рис. 10) по Лэммли.

Результаты электрофореза показали, что в составе клона, трансформированного плазмидой рEX1-E1 Rub, обнаруживается продукт, молекулярная масса которого составила 172 кД, и, очевидно, являющийся гибридной молекулой белка E1 с β -галактозидазой. Масса кодируемой вектором рEX1 β -галактозидазы соответственно равна 118 кД.

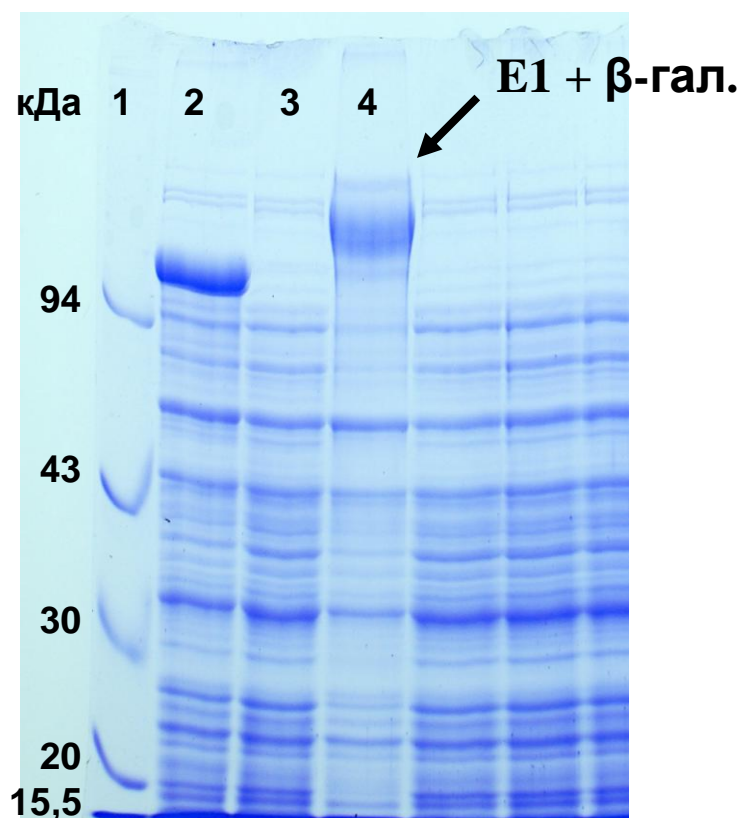


Рис. 10 Электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле:

- 1 – маркер;
- 2 – суммарные белки из клеток штамма *E.coli* POP2136, трансформированного плазмидой *pEX1*. Экспрессия β -галактизидазы;
- 3 – суммарные белки из клеток штамма *E.coli* POP2136, трансформированного плазмидой *pEX1-E1 Rub* до термоиндукции;
- 4 – суммарные белки из клеток штамма *E.coli* POP2136, трансформированного плазмидой *pEX1-E1 Rub* после термоиндукции. Экспрессия рекомбинантного белка *E1* с β -галактизидазой.

Для выявления рекомбинантного белка *E1*, а также, для подтверждения антигенной активности белка использовали метод иммуноблотинга. Как видно из представленных данных (Рис. 11), рекомбинантный белок с молекулярной массой 172 кД специфически

взаимодействует с антителами сыворотки кролика, полученной к белку E1 вируса краснухи.

Кроме того, в ходе данного эксперимента подтвердилось, что до начала индукции в клетках не обнаруживаются продукты плазмидных генов, контролируемых промотором P_R . Их репрессия, в обычных для роста *E. coli* POP2136 условиях (32°C), позволяет бактериям эффективно размножаться, не затрачивая энергию на синтез рекомбинантного белка, что необходимо для наращивания биомассы.

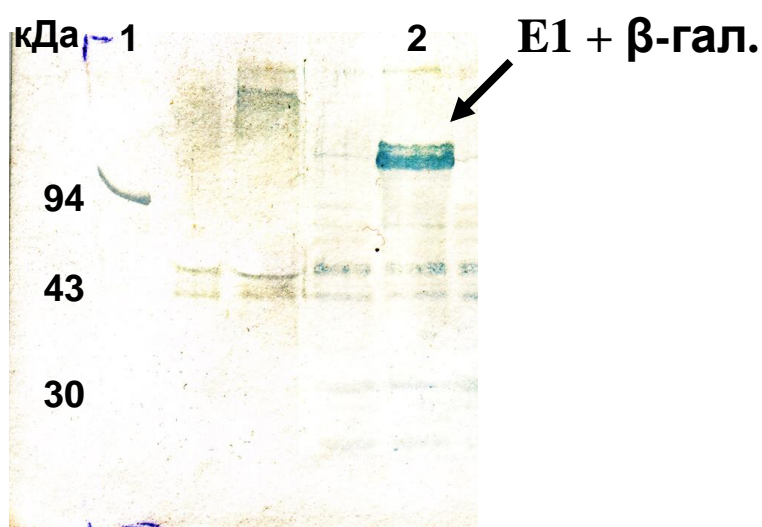


Рис. 11 Иммуноблотинг:

1 – маркер;

2 – рекомбинантный белок E1 с β-галактозидазой (реакция с сывороткой кролика, полученной к белку E1 вируса краснухи).

ВЫВОДЫ

1. Выделен ген белка E1 вируса краснухи из раннее клонированной плазмиды pSPO2.
2. Получена рекомбинантная плазида pEX1-E1 Rub, способная синтезировать белок E1, слитый с β -галактозидазой в клетках *E. coli*.
3. Экспрессия полученной плазмиды в клетках *E. coli* POP2136 обеспечивает гиперпродукцию рекомбинантного белка с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной.
4. Показано, что экспрессируемый полученной плазмидой рекомбинантный белок содержит антигенные детерминанты вируса краснухи и обладает способностью взаимодействовать с антителами специфичными к белку E1.
5. Разработанные подходы позволяют получать рекомбинантный белок E1 в препаративных количествах и использовать, как в целях иммунопрофилактики, так и в целях создания высокочувствительных и селективных диагностических тест-систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит за оказанную помощь и советы в проведении данной работы и обсуждении полученных результатов сотрудников ГУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН: зам. директора по научной работе, д.б.н. Юминову Н.В., сотрудника лаборатории клонирования вирусных геномов Титаева А.В., с.н.с. лаборатории генной терапии вирусных инфекций, к.б.н. Файзулова Е.Б., к.х.н. Борисову О.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ

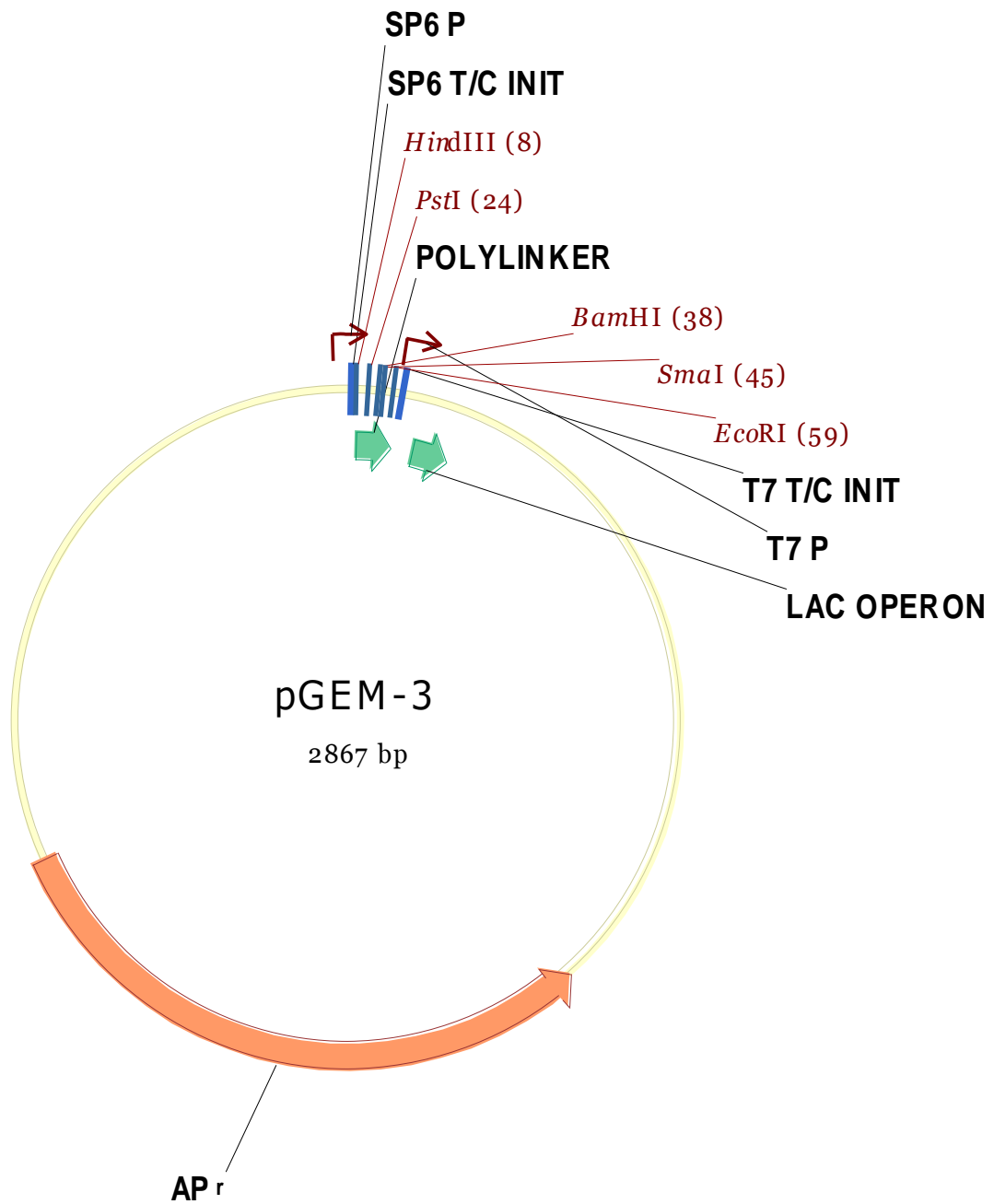


Рис. 12 Структура и рестриктивная карта плазмиды pGEM-3. T7 T/C INIT, SP6 T/C INIT – сайты инициации транскрипции; T7 P, SP6 P – промоторы.

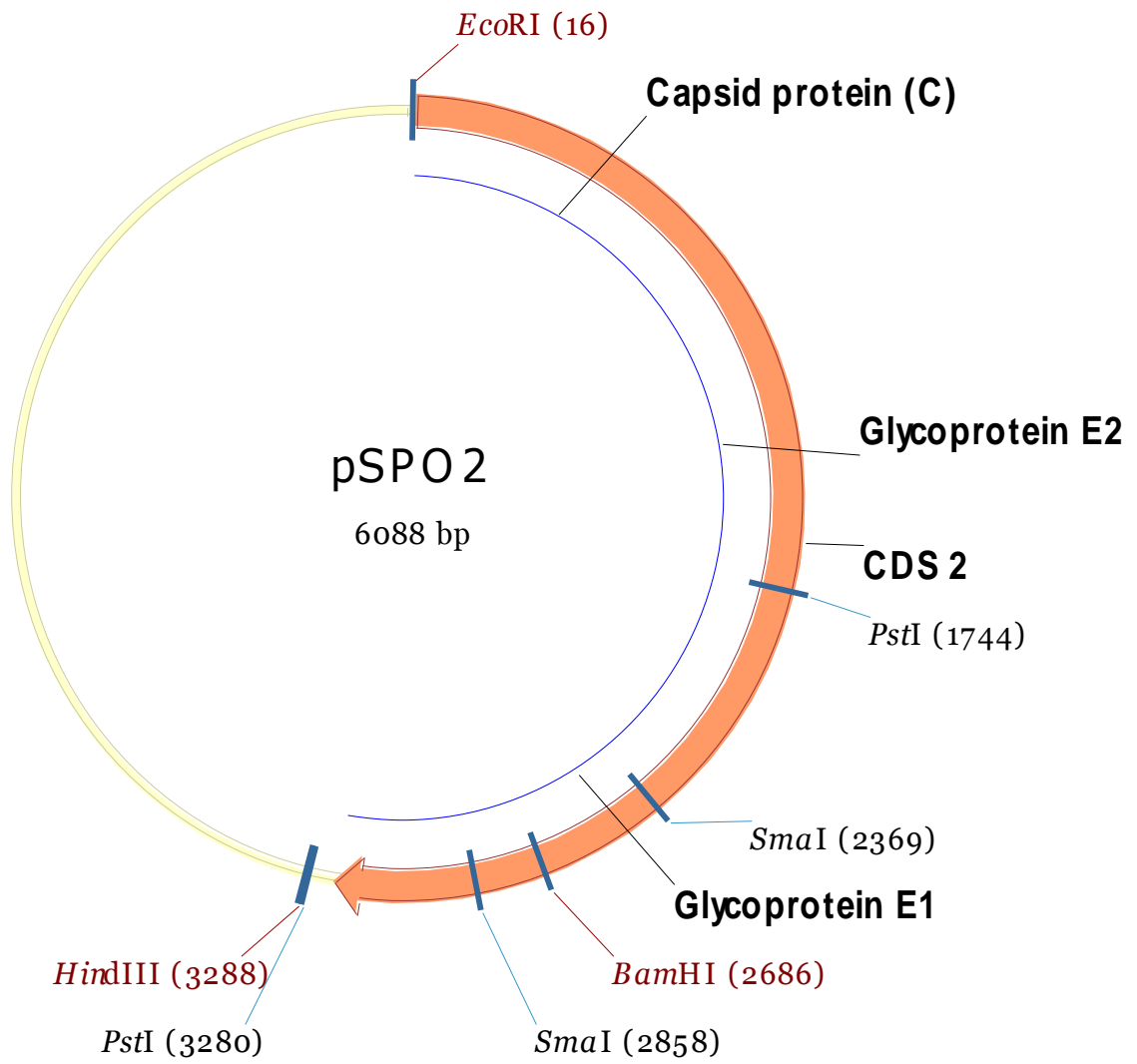


Рис. 13 Структура и рестрикционная карта плазмиды pSPO2.

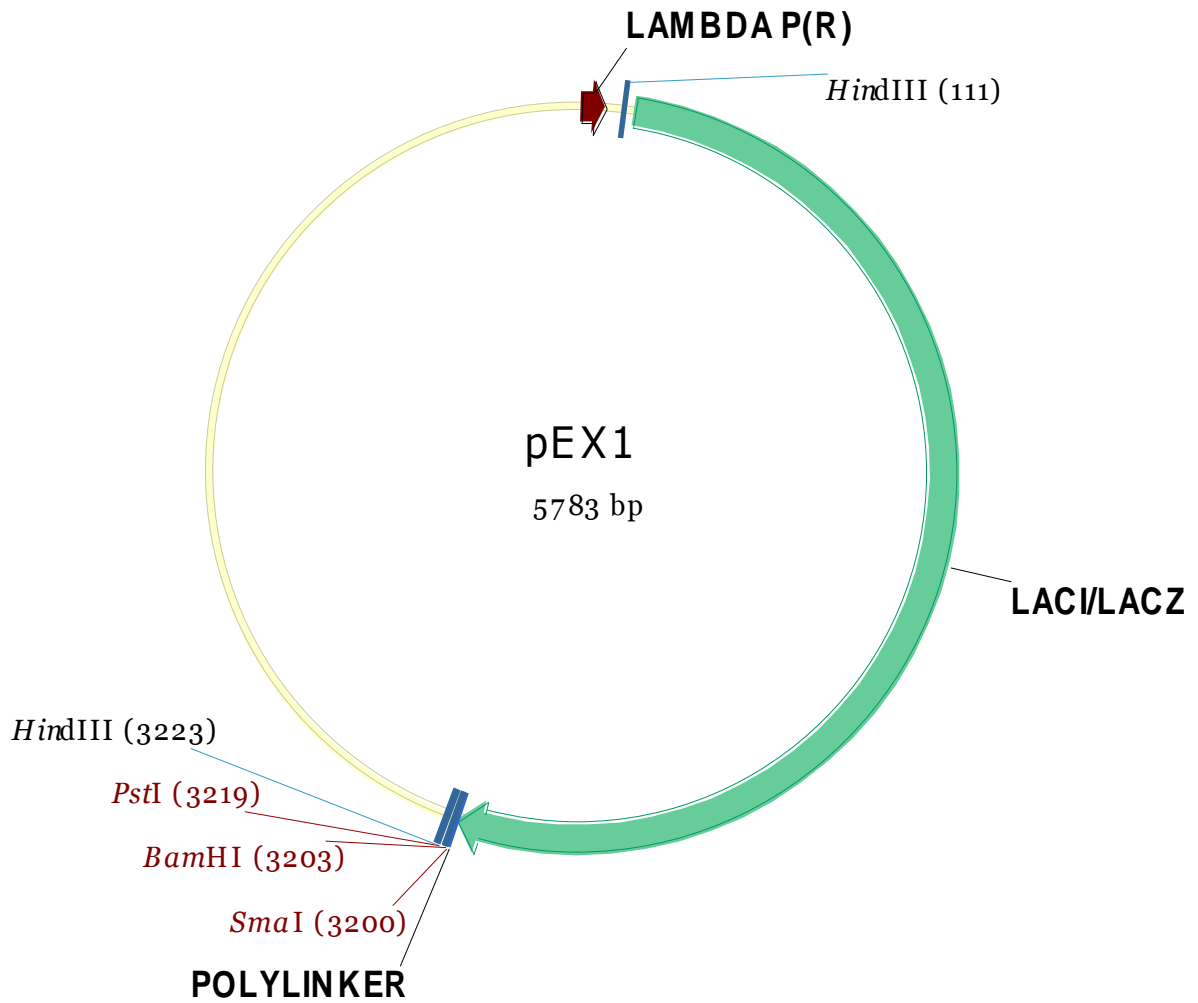


Рис. 14 Структура и рестрикционная карта плазмиды pEX1. LAMBDA P(R) – правый промотор фага λ , LACI/LACZ – открытая рамка считывания β -галактозидазы.

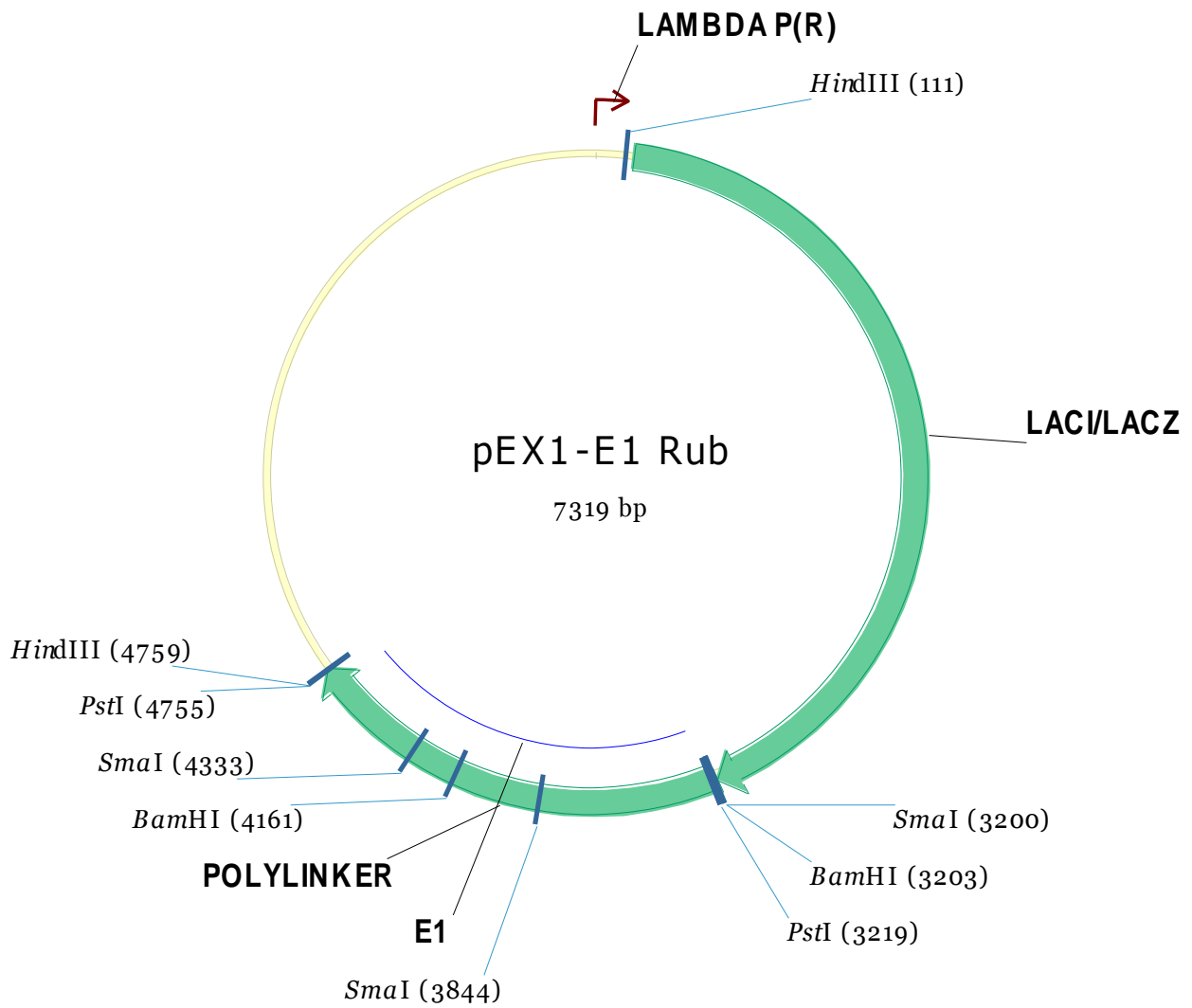


Рис. 15 Структура и рестрикционная карта плазмиды pEX1-E1 Rub. LAMBDA P(R) – правый промотор фага λ , LACI/LACZ – открытая рамка считывания β -галактозидазы.

ПОИСК СТАТЕЙ

Для поиска статей в международной системе PubMed были использованы ключевые слова: “rubella virus” and E1. Результаты поиска составили 181 статья с 1983 по 2007 год.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анджапаридзе О.Г., Червонский Г.И. // Краснуха // М., 1975, Стр. 102.
2. Афанасьев Н.Н. // Врожденная краснуха // Мать и Дитя в Курбассе, 2006, 2, 25, Стр. 8-11.
3. Бекзентеев Р.Р. // Прививка, которая остановит трагедию врожденной краснухи // Вакцинация, 1999, т. 1, 1.
4. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. // Эпидемиология // М., 1989, Стр. 214-218.
5. Болотовский В.М. // Краснуха // Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. Под ред. В.И. Покровского, М., 1993, Стр. 229-233.
6. Вакцинопрофилактика в учреждениях здравоохранения. Вакцинация против гриппа // Под ред. Зуевой Л.П., СПб, 2004, Стр. 36.
7. Гайдамович С.Я., Ткаченко А.В., Ларичев В.Ф., Алесеев С.Б., Бутенко А.М., Филатов Ф.П., Науменко М.Г., Русанова А.В., Красильников И.В. // Показатели гуморального иммунитета к вирусу краснухи у жителей Москвы в 1998-1999 гг. // Вопросы вирусологии, 2001, 3, Стр. 26-30.

8. Зверев В.В. // Средства профилактики краснухи и их экономический эффект // Вакцинация, 1999, т. 1, 1.
9. Зверев В.В., Юминова Н.В. // Проблемы кори, краснухи и эпидемического паротита в Российской Федерации // Вопросы вирусологии, 2004, 3, Стр. 8-11.
10. Иммунопрофилактика // (Справочник) под ред. Таточенко В.К., Озерецковского Н.А., Москва, 2003, Стр. 61-65.
11. Краснуха. Синдром врожденной краснухи: Информационный сборник. 2-е изд., доп. Pasteur Merieux Connaught. М., 1998, Стр. 23.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // Пер. с англ. М., 1984.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // Пер. с англ., М., 1988.
14. Марданлы С.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. // Краснуха // г. Электрогорск, 2005, Стр. 28.
15. Нисевич Л.Л., Бахмут Е.В., Миракилова А.М. // Клинические проявления врожденной краснухи // Педиатрия, 1992, N. 10, Стр. 6-11.
16. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2002 году: Государственный доклад // М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003, Стр. 221.

17. Семериков В.В., Лаврентьева И.Н., Таточенко В.К., Нисевич Л.Л., Фельдблюм И.В. // Краснуха // Пермь-Санкт-Петербург-Москва: ИПК «Звезда», 2002, Стр. 175.
18. Семериков В.В., Фельдблюм И.В., Казакова И.В., Трушков А.Г. // Эпидемиологическая характеристика краснушной инфекции в период проведения селективной вакцинопрофилактики и оценка эффективности работы консультативно-диагностического центра по профилактике врожденной краснухи // Вакцинопрофилактика, 2005, 5, Стр. 30-37.
19. Тихонова Н.Т. и др. // Вакцинопрофилактика краснухи // М., 1998, Стр. 24-27.
20. Учайкин В.Ф. // Почему надо прививать против краснухи // Вакцинация. Информ. бюл., 1999, т. 1, 1, Стр. 4.
21. Фисенко Ю.Ю. // Иммуноструктура населения Москвы к краснухе в условиях плановой вакцинопрофилактики // Вакцинопрофилактика, 2006, 5, Стр. 52-55.
22. Ясинский А.А., Котова Е.А., Чернявская О.П., Ершов А.Е., Перевощикова А.Л. // Вакцинопрофилактика управляемых инфекционных заболеваний в Российской Федерации (1995-2004 годы) // Вакцинопрофилактика, 2005, 5, Стр. 8-14.
23. Anderson S.G. // J. Immunol., 1949, v. 62, P. 29.

24. Belcourf R.J., Wong F.C., Walcroft M.J. // *Canad. J. publ. Hlth.*, 1965, v. 56, P. 253.
25. Best J.M., Banatvala J.E. // Rubella. In: Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Pattison J.R. (eds) // *Principles and practice of clinical virology*, 2nd edn. John Wiley, Chichester, 1990, P. 337-374.
26. Booth J.C., Stern H. // Photodynamic inactivation of rubella virus // *J. Med. Microbiol.*, 1972, v. 5, P. 515-528.
27. Bosma T.J., Best J.M., Corbett K.M., Banatvala J.E., Starkey W.G. // Nucleotide sequence analysis of a major antigenic domain of the E1 glycoprotein of 22 rubella virus isolates // *J. Gen. Virol.*, 1996, 77, P. 2523-2530.
28. Bowden D.S., Westaway E.G. // Rubella virus products and their distribution in infected cells // *Subcell. Biochem.*, 1989, 15, P. 203-231.
29. Bowden D.S., Westaway E.G. // Rubella virus: structural and nonstructural proteins // *J. Gen. Virol.*, 1984, 65, P. 933-943.
30. Buescher E.L. // Behavior of rubella virus in adult populations // *Aech. ges. Virusforsch.*, 1965, v. 16, P. 470-476.
31. Chaye H.H., Mauracher C.A., Tingle A.J., Gillam S. // Cellular and humoral immune responses to rubella virus structural proteins E1, E2, and C // *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 9, P. 2323-2329.
32. Children Vaccination Initiative Forum, 15, 2006.

33. Clarke D.M., Loo T.M., J. Hui P. Chong, S. Gillam // Nucl. Acids Res., 1987, v. 15, P. 3041-3057.
34. Claus C., Hofmann J., Uberla K., Liebert U.G. // Rubella virus pseudotypes and a cell-cell fusion assay as tools for functional analysis of the rubella virus E2 and E1 envelope glycoproteins // J. Gen. Virol., 2006, 87, Pt. 10, P. 3029-37.
35. Cooper L.Z. // Congenital rubella in the United States // Progress in Clinical and Biological Research, 1975, v. 3, AR Liss, New York , P. 1-21.
36. Cooper L.Z., Buimovici-Klein E. // Rubella // Virology, Raven Press, New York, N.Y., 1985, P. 1005-1020.
37. Cusumaon J.A., Butler N.R., Plotkin S.A. // Brit. med. J., 1964, v. 2, P. 155.
38. Dominguez G., Wang C.Y., Frey T.K. // Sequence of the genome RNA of rubella virus: Evidence for genetic rearrangement during Togavirus evolution // Virology, 1990, 177, P. 225-238.
39. Du-Ping Zheng, Frey T.K., Icenogle J., Katow S., Abernathy E.S., Song K.-J., Xu W.-B., Yarulin V. // Global Distribution of Rubella Virus Genotypes // Emerg. Infect. Dis., 2003, v. 9, 12, P. 1525-1530.
40. Du-Ping Zheng, Ярулин В.Р., Зверев В.В., Ильясов Ю.Ю. // Особенности генотипов вируса краснухи, циркулирующего в

России // Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии, 2005, 6, Стр. 19-23.

41. Forbes J.A. // Rubella: historical aspects // Am. J. Dis. Child., 1969, v. 118, P. 5-11.
42. Forng R.Y., Frey T.K. // Identification of the Rubella Virus Nonstructural Proteins // Virology, 1995, 206, P. 843-853.
43. Frey T.K. // Molecular biology of rubella virus // Adv. Virus. Res., 1994, v. 44, P. 69-160.
44. Frey T.K., Abernathy E.S. // Identification of strain-specific nucleotide sequences in the RA27/3 rubella virus vaccine // J. Infect. Dis., 1993, 168, P. 854-864.
45. Frey T.K., Abernathy E.S., Bosma T.J., Starkey W.G., Corbett K.M., Best J.M. // Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961-1977 // J. Infect. Dis., 1998, 178, P. 642-650.
46. Fuccillo D.A., Gitzee K.R., Rhodes A.J. // Canad. med. Ass. J., 1965, v. 92, P. 126.
47. Gordon J.E., Ingalls T. H. // Rubella: epidemiology, virology and immunology. Am. J. Med. Sci., 1967, 253, P. 349-373.
48. Gregg N.M. // Congenital cataract following German measles in the mother // Tr. Ophthalm. Soc. Auct., 1941, 3, P. 35-46.
49. Hiro J., Tasaka S. // Mschr. Kinderheilk, 1938, Bd 76, S. 328.

50. Horstmann D.M. // Rubella and rubella syndrome clinical epidemiology and prospects for control by vaccination // *S. Afr. Med. J.*, 1970, v. 44, P. 383-387.
51. Ho-Terry L., A. Cohen, P. Londesboroug // Rubella virus wild-type and RA27/3 strains: a comparison by polyacrylamide-gel electrophoresis and radioimmune precipitation // *J. Med. Microbiol.*, 1982, v. 15, 3, P. 393-398.
52. Ho-Terry L., Terry G.M., Cohen A., Londesborough P. // Immunological characterisation of the rubella E 1 glycoprotein. Brief report // *Arch. Virol.*, 1986, 90, 1-2, P. 145-152.
53. Ho-Terry L., Terry G.M., Londesborough P. // Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction // *J. Gen. Virol.*, 1990, 71, Pt. 7, P. 1607-1611.
54. Icenogle J.P., Frey T.K., Abernathy E., Reef S.E., Schnurr D., Stewart J.A. // Genetic analysis of rubella viruses found in the United States between 1966 and 2004: evidence that indigenous rubella viruses have been eliminated // *Clin. Infect. Dis.*, 2006, 43, Suppl. 3, P. 133-40.
55. Kalkkinen N., Oker-Blom C., Pettersson R.F. // Three genes code for rubella virus structural proteins E1, E2a, E2b and C // *J.Gen.Virol.*, 1984, 65, P. 1549-1557.

56. Katow S., Minahara H., Fukushima M., Yamaguchi Y. // Molecular epidemiology of rubella by nucleotide sequences of the rubella virus E1 gene in three East Asia countries // *J. Infect. Dis.*, 1997, 176, P. 602-616.
57. Kontarovich R.A., Volodina N.I., Teleshevskaya E.A. // Congenital rubella in the USSR // *Bull. Wid. Hlth Org.*, 1979, v. 53, N. 3, P. 445-452.
58. Laemmli U.K. // Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, 227, P. 680-685.
59. Lialina L.V., EpiNorth // Saint Petersburg Pasteur Institute // Russia, 2001.
60. Liang Y., Gillam S. // Mutational analysis of the rubella virus nonstructural polyprotein and its cleavage products in virus replication and RNA synthesis // *J. Virol.*, 2000, 74, 11, P. 5133-5141.
61. Liang Y., Yao J., Gillam S. // Rubella virus nonstructural protein protease domains involved in trans- and cis-cleavage activities // *J. Virol.*, 2000, 74, 12, P. 5412-5423.
62. Liu Z., Yang D., Qiu Z., Lim K.T., Chong P., Gillam S. // Identification of Domains in Rubella Virus Genomic RNA and Capsid Protein Necessary for Specific Interaction // *J. Virol.*, 1996, 70, 4, P. 2184-2190.
63. Marr L.D., Sanchez A., Frey T. K. // Efficient in vitro translation and processing of rubella virus structural proteins in the presence of microsomes // *Virology*, 1991, 180, P. 400-405.

64. Matthews R.E.F. // Intervirology, 1982, v. 17, P. 1-199.
65. Meeting of Ad-Hoc Panel of Experts on Rubella and Measles // EPI Newsletter, 2004, XXVI, No2, P. 1-3.
66. Murphy F.A. // Togavirus morphology and morphogenesis // In W. Schlesinger (ed.), The togaviruses. Academic Press, Inc., New York, N.Y., 1980, P. 241-326.
67. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo T.M., Summers M.D. // Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) // Arch. Virol., 1995, S10, P. 1-586.
68. Naeye R.L., Blanc W. // Pathogenesis of congenital rubella // J.A.M.A., 1965, v. 194, 12, P. 1277.
69. Oker-Blom C. // The gene order for rubella virus structural proteins is: NH₂-C-E₂-E₁-COOH // J.Virol., 1984, 51, P. 354-358.
70. Oker-Blom C., Kalkkinen N., Kääriäinen N., Pettersson R.F. // Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E₁, E_{2a} and E_{2b} // J.Virol., 1983, 46, P. 964-973.
71. Oxford J.S., Schild G.C. // Virology, 1966, v. 28, P. 760.
72. Parkman P.D. // Making vaccination policy: the experience with rubella // Clin. Infect. Dis., 1999, 28, P. 140-146.
73. Parkman P.D., Buescher E.L., Artenstein M.S. // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1962, v. 111, P. 225.

74. Parkman P.D., Meyer H.M., Kirschstein R.L., Hoops H.E. // Attenuated rubella virus. I. Development and laboratory characterization // N. Engl. J. Med., 1966, 275, P. 569-574.
75. Parkman P.D., Mudnon F.K., McCown J.M. // Studies on rubella. II. Neutralization of virus // J. Immunol, 1964b, v. 93, P. 608-617.
76. Petterson R.F. et al. // Rev. Infect. Dis., 1986, v. 7, P. 140-149.
77. Pettersson R.F., Lundstrom K., Chattopadhyaya J.B., Josephson S., Philipson L., Kaariainen L. and Palva I. // Gene, 1983, 24, P. 15-27.
78. Plotkin S.A., Farkuhar J.D., Katz M., Bauer F. // Am. J. Dis. Child., 1969, 118, P. 178-185.
79. Plotkin S.A., Orenstein W. (eds) // Vaccines. 3rd ed. W.B. Saunders Company, 1999, P. 409-439.
80. Pugachev K.V., Abernathy E.S., Frey T.K. // Genomic sequence of the RA27/3 vaccine strain of rubella virus // Arch. Virol., 1997, v. 142, P. 1165-1180.
81. Reef S.E., Frey T.K., Theall K., Abernathy E., Burnett C.L., Icenogle J. // The changing epidemiology of rubella in the 1990s, on the verge of elimination and new challenges for control and prevention // JAMA, 2002, 287, P. 464-72.
82. Robertson S., Cutts F., Samuel R., Diaz-Ortega J. // Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries, Part 2: vaccination against rubella // Bull WHO, 1997, 75, P. 69-80.

83. Rubella in colleges. - United States, 1983-1984 / CDC // MMWR, 1985, 34, P. 228-231.
84. Schidt M. // Recombinant structural proteins of rubella virus // Academic dissertation, 2000, P. 49.
85. Selzer G. // S. Afr. med. J., 1965, v. 39, P. 1028.
86. Sever J.L., London W.P. // Viruses and embryos // Teratology, 1969, v. 2, P. 39-46.
87. Sever J.L., Tzan N.R., Shekarchi I.C., Madden D.L. // Rapid latex agglutination test for rubella antibody // J. Clin. Microbiol., 1983, 17, 1, P. 52-54.
88. Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. // Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose // Biochemistry, 1973, 12, P. 3055.
89. Silhavy T.J. et al. // Experiments with Gene Fusions // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, P. xi-xii.
90. Sordoc Y. // Date recente in problema rubeolei // St. Cerc. Inframicrobiol., 1971, v. 22, P. 53-85.
91. Stanley K.K., Luzio J.P. // Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins // The EMBO J., 1984, 3, v. 6, P. 1429-1434.

92. Strauss J.H., Strauss E.G. // The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution // *Microbiol. Rev.*, 1994, v. 58, P. 491-562.
93. Sullivan E.M., Burgess M.A., Forrest J.M. // *Common Dis. Intell.*, 1999, 8, P. 209-214.
94. Suomalainen M., Garoff H., Naron M.D. // The E2 signal sequence of rubella virus remains part of the capsid protein and confers membrane association in vitro // *J. Virol.*, 1990, 64, 11, P. 5500-5509.
95. Takkinen K., Vidgren G., Ekstrand J., Hellman U., Kalkkinen N., Wernstedt C., Pettersson R.F. // Nucleotide sequence of the rubella virus capsid protein reveals an unusually high G/C content // *J. Gen. Virol.*, 1988, 69, P. 603-612.
96. Terry G.M., Ho-Terry L., Londesborough P., Rees K.R. // A bio-engineered rubella E1 antigen // *Virology*, 1989, 104, P. 63-75.
97. Terry G.M., Ho-Terry L., Londesborough P., Rees K.R. // Localization of the rubella E1 epitopes // *Arch. Virol.*, 1988, 98, P. 189-197.
98. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. // Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets procedure and some applications // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, P. 4350-4359.
99. Tzenq W.P., Frey T.K. // C-E1 fusion protein synthesized by rubella virus DI RNAs maintained during serial passage // *Virology*, 2006, 356, 1-2, P. 198-207.

100. Vaheri A., Hovi T. // Structural and proteins units of rubella virus // J. Virol., 1972, 9, P. 10-16.
101. Vauloup-Fellous C., Granjeot-Keros L. // Humoral immune response after primary rubella virus infection and after vaccination // Clin. Vaccine Immunol., 2007, 14, 5, P. 644-647.
102. Vesikari T., Baer M., Willems P. // Immunogenicity and safety of a second dose of measles-mumps-rubella-varicella vaccine in healthy children aged 5 to 6 years // *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2007, 26, 2, P. 153-158.
103. Vidgren G., Takkinen K., Kalkkinen N., Kääriäinen L., Pettersson R.F. // Nucleotide sequencing of the genes coding the membrane glycoproteins E1 and E2 of rubella virus // *J. Gen. Virol.*, 1987, 68, P. 2347-2357.
104. Weller T.H., Neva F.A. // *Ibid.*, 1962, v. 111, P. 215.
105. WHO.INT, 2007.
106. Wolinsky J.S. // Rubella // *Virology*, 3rd ed., Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., 1996, v. 1., P. 899-929.
107. World Health Organization // Preventing congenital rubella syndrome // *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 2000, v.75, P. 289-96.
108. Yao J.D., Yang P. Chong, Hwang D., Liang Y., Gillam S. // Proteolytic processing of rubella virus nonstructural proteins // *Virology*, 1998, 246, P. 74-82.

109. Zheng D.P., Zhu H., Revello M.G., Gerna G., Frey T.K. // Phylogenetic analysis of rubella virus isolated during a period of epidemic transmission in Italy, 1991-1997 // *J. Infect. Dis.*, 2003, 187, P. 1587-1597.