

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”**

Факультет біотехнології і біотехніки
(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології
(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

зі спеціальності 6.051401 Біотехнологія
(код та назва напрямку підготовки або спеціальності)

на тему: Технологія виробництва рекомбінантного білка gr 120 ВІЛ-1.
Дільниця підготовки посівного матеріалу.

Виконавля: студентка 4 курсу, групи БТ-11
(шифр групи)

Фесюк Олена Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник ст.викл. Ліновицька Віта Михайлівна

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Консультанти Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Розділ 6 доц., к.т.н. Орленко А.Т.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали)

Рецензент ст.викл. к.т.н. Жукова В.С.

(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

Проблема ВІЛ-інфекції на сьогоднішній день є актуальною для світової спільноти, а масштаби поширення вірусу імунодефіциту людини набули глобального характеру і постають реальною загрозою соціально-економічному розвитку більшості країн світу.

На сьогоднішній день вакцина проти ВІЛ відсутня. Сучасні методи противірусної терапії не забезпечують одужання хворих на СНІД, лише подовжують тривалість та підвищують якість їх життя. Основна роль у обмеженні розповсюдження цього захворювання належить профілактичним заходам.

Оскільки ранній період ВІЛ-інфекції часто є безсимптомним, то надзвичайно важливим є вчасне виявлення хвороби та розробка сучасних методів діагностики ВІЛ. Серед найбільш відомих методів діагностики ВІЛ-інфекції можна виділити полімеразну ланцюгову реакцію та імуноферментний аналіз (ІФА). За допомогою ІФА в сироватці та плазмі крові людини виявляють безпосередньо антигенні вірусні частки, а також різні види антитіл.

Для виробництва імуноферментних тест систем одним з необхідних компонентів є поверхневий білок ВІЛ. Отримання цього білку можливе завдяки застосуванню генно-інженерних біотехнологій.

Тому метою дипломного проекту є розробка технології виробництва рекомбінантного білку gp120 ВІЛ-1, що є компонентом тест-системи для імуноферментного аналізу.

Завдання для дипломного проекту:

1. Підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білка.
2. Провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.
3. Розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва.

4. Скласти матеріальний баланс виробництва, обрати технологічну і апаратурну схему.

5. Обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки..

6. Провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва, методи їх попередження.

Білок gp120 є поверхневим білком вірусу імунодефіциту людини, відповідає за зв'язування з CD4 рецептором і відіграє ключову роль в проникненні вірусу в клітину. Амінокислотна послідовність gp120 становить 481 амінокислотний залишок, теоретична ізоелектрична точка – 9,05. За природою gp120 – глікопротеїн: має 25 глікозильованих ділянок.

Цільовий продукт – рекомбінантний білок gp120, що кодується геном env-1 ВІЛ-1, отриманий за допомогою генно-модифікованого штаму *Escherichia coli*, застосовують для виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення IgG до вірусу імунодефіциту людини 1 та 2 типів в сироватці або плазмі крові людини методом імуноферментного аналізу, а також в лабораторних досліджень. Продукт не може бути використаний як лікарський засіб, сільськогосподарський або пестицидний продукт, харчова добавка. Безпосереднього впливу на організм білок не має.

Продуцент - рекомбінантний штам *Escherichia coli*, який має всі типові для свого виду морфолого-цитологічні, фізіолого-біохімічні та культуральні ознаки, але модифікований плазмідною трансформацією, що дозволяє продукувати чужорідний gp120 білок.

Біосинтез цільового продукту відбувається класичним способом синтезу будь-якого білку, тобто послідовно відбуваються процеси транскрипції, процесингу, трансляції і модифікації білка. Особливістю біосинтезу рекомбінантного білка gp120 є те, що необхідно створити певні умови для індукції біосинтезу. Для цього застосовується 2-х фазне культивування з індукуванням експресії гену.

Для реалізації виробництва складено технологічну схему, що складається зі стадії допоміжних робіт, основного технологічного процесу та знешкодження відходів та викидів.

Також було підбрано апаратурну схему виробництва рекомбінантного білку gp120, що враховують особливості технології даного виробництва та включають параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.

Стадії основного технологічного процесу починаються зі стадії відновлення музейної культури.

Для цього за допомогою мікробіологічної петлі музейні штами в асептичних умовах висівають на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем та інкубують при температурі 32 °С протягом 18-24 години. Після цього виконують пересівання культури з чашок Петрі в пробірки з напіврідким агаризованим поживним середовищем, культивують їх при температурі 32°С протягом 18-24 годин, потім поміщають їх на збереження при $(4\pm 1)^\circ\text{C}$.

Отриману відновлену музейну культуру в пробірці розсівають у колби на 1 л зі стерильним середовищем, де і відбувається напрацювання культури I генерації. Культуру інкубують при температурі 32°С до $\text{ОГ}590 \sim 0,85-0,90 \text{ ОО}$ (експоненційна фаза росту) протягом 6-7 годин .

Отримання культури II генерації здійснюється аналогічним шляхом, що і I генерації. Пересівання відбувається з колб на 1 л в бутлі на 10 л.

В інокулятор (25 л) вносять 12 л стерильного поживного середовища і додають 1,3 л первинної бульйонної культури, закривають і культивують при температурі 32°С 7 годин.при інтенсивній аерації та перемішуванні. По досягненні значення $\text{ОГ}450=0,7-0,8 \text{ ОО}$ культивування зупиняють.

На всіх етапах підготовки посівного матеріалу проводять перевірку на мікробіологічну чистоту і морфологічну однорідність посівного матеріалу.

Далі інокулюм перекачується до виробничого ферментера. Виробничий синтез є двостадійним. Напрацювання культури відбувається у ферментері на 50 л також з інтенсивною аерацією та перемішуванням при температурі 32 С.

По досягненні значення $OG_{600}=0,95-1$ ОО, яке залишається постійним протягом однієї години (стаціонарна фаза росту мікроорганізмів), культивування зупиняють.

Після ферментації культуральна рідина об'ємом по 6 літрів центрифугують і зважують. Біомасу ешеріхії коли піддають дії розчину для лізису біомаси, який містить в своєму складі детергент, потім піддається обробці розчином лізоциму, механічним руйнуванням шляхом заморожування-розморожування, обробкою біомаси розчином ДНК-ази. Тільця-включення відокремлюють від лізованої біомаси центрифугуванням та віддають багатократному процесу відмивання у спеціальних розчинах. Після цього тільця-включення розчиняють та осад цільового білка висолують сульфатом амонію, після чого осад білка відмивають та ресуспендують. Перед очисткою розчин білка висвітлюють центрифугуванням та супернатант наносять на хроматографічну колонку очищуючи способом метал-хелатної хроматографії. Елюент, який містить цільовий рекомбінантний білок переносять в змішувач в якому розводять до концентрації 8 мкг/мл у буферному розчині. Кінцевий продукт розливають у флакони на 10 мл, фасують маркують, та відвантажують до складу.

Оскільки завданням даного проекту була розробка ділянки отримання посівного матеріалу, було підібрано і спроектовано посівний апарат для накопичення мікробної маси штаму.

До ферментеру висувається ряд вимог для створення оптимальних умов росту бактеріальної культури:

- підтримання певного значення рН;
- забезпечення аерації та інтенсивне диспергування повітря;
- відвід тепла, що виділяється в процесі ферментації;
- забезпечення стерильності.

Виходячи з вищезазначених умов та вимог, і спираючись на літературні дані, було вирішено обрати в якості інокулятора циліндричний апарат об'ємом 25 л з еліптичним днищем та кришкою, що оснащений мішалкою і барботером

для аерації культуральної рідини. Для процесу перемішування була обрана відкрита шестилопатева турбінна мішалка, яка використовується для забезпечення інтенсивного перемішування рідин, а також при необхідності рівномірного диспергування газу в рідині, що актуально для культивування аеробної культури *Escherichia coli*. Посівний апарат оснащений сорочкою з холодним теплоносієм, в якості якого обирають воду. Сорочка має штуцери для вводу і виводу теплоносія.

Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра.

Проведений розрахунок підтверджує надійність обраної конструкції та забезпечення відповідного контролю параметрів.

На основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів нами передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці та пожежної безпеки. Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежобезпеки та екологічної безпеки.

Висновок

1. В дипломному проекті розглянуто технологію виробництва рекомбінантного білку gp120 ВІЛ-1 методом глибинного культивування продуцента *Escherichia coli*, дільниця підготовки посівного матеріалу.

2. Розглянуто систематичне положення, морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні особливості продуценту та поширення в природі та запропоновано схему отримання високопродуктивного штаму *Escherichia coli*

3. Наведено характеристику кінцевої продукції, сировини, матеріалів, що використовується на виробництві. Здійснено опис технологічного процесу з зазначенням контрольних точок, де розглянуті об'єкти та методи контролю на виробництві. Відповідно до технологічної схеми обрана апаратурна схема виробництва, яка дозволяє отримати продукт належної якості.

4. На основі літературних джерел було запропоновано проект конструкції посівного апарату з механічним перемішувачем та

барботером для отримання посівного матеріалу. Розрахований апарат забезпечує ефективну аерацію та диспергування повітря, перемішування культуральної рідини в інокуляторі з метою забезпечення рівномірного протікання процесу росту та розмноження. Були проведені технологічні розрахунки, які обумовили та підтвердили доцільність використання обраної конструкції посівного апарату.

5. Проект був виконаний з урахуванням правил та вимог охорони праці, протипожежної безпеки та екологічної безпеки. На основі аналізу шкідливих небезпечних факторів передбачені засоби і заходи створення на спроектованому об'єкті безпечних умов праці і пожежної безпеки.