

**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 MOMP  
*Chlamydia trachomatis*. Дільниця біосинтезу

Виконав (-ла): студент (-ка) 4 курсу, групи БТ-11  
(шифр групи)

Кравченко Олена Вадимівна  
(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

*Chlamydia trachomatis* – облигатний внутрішньоклітинний паразит, що є причиною широкого спектру людських захворювань. Найбільш поширеними серед них є трахома, лімфогранульома та уrogenітальні хламідіози, що передаються статевим шляхом і є особливо небезпечними для репродуктивної системи організму. Щороку у світі реєструється до 100 млн. чоловік, заражених хламідіозом. Вчасне виявлення збудника хвороби відіграє значну роль у запобіганні її поширення.

Виражений поліморфізм клінічних проявів значно ускладнює діагностику захворювань, викликаних *C.trachomatis*. Високою специфічністю та ефективністю серед інших діагностичних методів вирізняється імуноферментний аналіз.

Оскільки отримання нативного білка з клітин хламідій є досить складним та дорогим процесом, що супроводжується потенційною небезпекою, на сучасному етапі використовуються рекомбінантні білки – аналоги антигену збудника хвороби.

Мета дипломного проекту - розробити технологію виробництва рекомбінантного аналога антигену *Chlamydia trachomatis* для виготовлення діагностичних тест-систем та наукових досліджень.

Завданням дипломного проекту було:

1. Підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білка.
2. Розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва.
3. Провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.
4. Надати характеристику сировини, матеріалів, напівпродуктів, що використовуються у виробництві, скласти матеріальний баланс стадії біосинтезу, обрати технологічну й апаратурну схему.

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

6. Провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва, надати перелік методів їх попередження.

Цільовим продуктом виробництва є рекомбінантний білок - аналог С-кінцевого фрагменту зрілого білка МОРР (Major Outer Membrane Protein) *C.trachomatis*. Кінцева речовина являє собою білок з молекулярною масою 39,5 кДа.

Готовий продукт – розчин рекомбінантного білка МОРР *C.trachomatis* кінцевої концентрації 100 мкг/мл, розлитий у флакони по 2 мл.

Цільовий білок отримується за допомогою рекомбінантного штаму *E.coli*, модифікованого плазмідною трансформацією.

Схема хімічних перетворень відповідає схемі біосинтезу білка за класичним механізмом. Для запуску механізму біосинтезу рекомбінантного білка МОРР *C.trachomatis* необхідно індукувати експресію клонованих генів термічним шляхом.

Схема створення високопродуктивного штаму-продуцента цільового білка включає наступні етапи:

1. Виділення фрагмента ДНК *C.trachomatis*.
2. Конструювання плазмідного гена.
3. Розрізання фрагмента ДНК та плазмідного гена за допомогою рестриктази.
4. Зшивання фрагмента ДНК та плазмідного вектора за допомогою ДНК-лігази.
5. Отримання компетентних клітин *E.coli*.
6. Трансформація клітин *E.coli* рекомбінантною ДНК.
7. Клонування молекул рекомбінантної ДНК за допомогою реплікації *in vivo*.
8. Скринінг клонів.
9. Відбір клонів для отримання посівного матеріалу.

Для трансформації клітин використовується плазміда, що включає в себе термолабільний промотор. Виробничий біосинтез цільового білка двостадійний. Культура *E.coli* культивується до певного значення оптичної густини, після чого для індукції синтезу білка МОР *S.trachomatis* необхідно нагріти культуральну рідину до 42°C і підтримувати температуру сталою.

В дипломному проекті наведено перелік сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві кінцевого продукту, розраховано матеріальний баланс стадії біосинтезу.

Технологія включає санітарну підготовку виробництва, приготування деіонізованої води, стерильного повітря, посуду та поживних середовищ. Етапи основного технологічного процесу починаються з відновлення музейної культури у пробірках. Напрацювання первинної матричної культури відбувається у колбах, вторинної матричної культури – в інокуляторі. Двостадійний виробничий біосинтез цільового білка проходить у ферментері на 50 літрів, після чого біомаса відділяється від культуральної рідини центрифугуванням. Біомаса піддається обробці розчином для лізису, концентратом розчину лізоциму, механічному руйнуванню методом заморожування-розморожування, обробці концентратом розчину ДНКаз та ультразвуком. Відділені від лізованої біомаси тільця включення піддаються багатократному відмиванню. За допомогою металхелатної хроматографії отримується цільовий білок зі ступенем очистки не менше 95%. Розчин білка МОР *S.trachomatis* розводиться до концентрації 100 мкг/мл буфером та розливається у флакони по 2 мл.

Викиди в атмосферу, тверді та рідкі відходи з усіх етапів виробництва піддаються знешкодженню.

Для виробничого біосинтезу було обрано конструкцію ферментеру об'ємом 50 літрів, що дає можливість отримати необхідну кількість цільового білка за один виробничий цикл. Для обігріву культуральної рідини апарат оснащений сорочкою, у яку подається теплоносій. При створенні фази теплового шоку середовище необхідно нагріти на 10°C і підтримувати цей

режим за допомогою регуляції температури теплоносія. Площі теплообміну обраного апарату достатньо для створення оптимальних умов біосинтезу.

Забезпечення інтенсивної масопередачі кисню з газової фази клітинам в ферментері досягається активною аерацією та перемішуванням середовища. Стерильне повітря подається до апарату через газорозподільник-барботер з продуктивністю 30 м<sup>3</sup>/год. Рівномірний розподіл газу по усьому об'єму біореактора забезпечується установленою турбінною мішалкою діаметром 100 мм та частотою обертання 200 об/хв. Апарат є герметичним та сконструйованим таким чином, щоб його можна було мити та стерилізувати гострою парою після виробничого циклу.

Для даного ферментера розраховано конструктивні розміри та наведено тепловий баланс процесу біосинтезу за різних температурних режимів.

Технологічна частина проекту показує, що на виробництві використовуються рухомі механічні пристрої, які працюють за рахунок споживання електроенергії, відбуваються різні екзотермічні процеси, передбачено використання трубопроводів. В процесі підготовки до виробництва цільового продукту використовуються речовини, небезпечні для здоров'я працівників.

При розробці проекту було враховано усі необхідні вимоги з охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проведено необхідні розрахунки і виконано розробку заходів щодо забезпечення здорових та безпечних умов праці, пожежної безпеки.

По дипломному проекту можна зробити наступні висновки:

1. В проекті розглянута технологія виробництва рекомбінантного білка МОР *Chlamydia trachomatis*.

2. Як продуцент цільового білка обрано штам *Escherichia coli* та запропоновано схему його отримання з використанням методів генної інженерії, а саме плазмідної трансформації.

3. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва рекомбінантного білка з урахуванням особливостей культивування обраного продуцента.

4. Наведено характеристику кінцевого продукту, сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються в даному виробництві.

5. Розраховано матеріальний баланс стадії біосинтезу рекомбінантного білка МОРР *C.trachomatis*.

6. З урахуванням потреб культури в інтенсивній аерації та особливостей температурного режиму обрано конструкцію ферментера об'ємом 0,05 м<sup>3</sup> для проведення виробничого біосинтезу, наведено конструктивний та тепловий розрахунки, що підтверджують придатність обраного обладнання для даного виробництва.

7. Розглянуто вимоги до охорони праці та навколишнього середовища, проведено аналіз шкідливих та небезпечних факторів, запропоновано шляхи їх усунення.