

**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
TnpATreponemapallidum. Дільниця біосинтезу

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

Марченко Аліса Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник доц., к.с.-г.н. Дехтяренко Наталія Віталіївна
(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 асист. Зубченко Л. С.
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

У даний час сифіліс поширений в багатьох країнах що розвиваються і в деяких районах Північної Америки і Європи, в тому числі і на території країн СНД та України. Бліда спірохета має від помірної до високої ймовірність передачі під час контакту між сприйнятливим і зараженим статевим партнером. У поєднанні з тим фактом, що лікування інфікованих людей на початковій стадії інфекції знижує термін дії передачі, це підвищує переваги необхідності ранньої точної серодіагностики сифілісу.

Тести, використовувані для серологічної діагностики сифілісу можна розділити на дві категорії: нетрепонемні та трепонемні. Нетрепонемні тести засновані на складній суміші антигенів, що складається зі спиртового розчину кардіоліпіну, холестерину і очищеного лецитину. При інфікуванні блідої спірохетою продукуються антитіла, які реагують з цією сумішшю антигенів. Нетрепонемні тести широкодоступні, недорогі, зручно виконувати скринінг великого числа зразків, і вони підходять для визначення ефективності лікування. Тим не менш, вони не позбавлені недоліків, які включають в себе відсутність чутливості на початку раннього сифілісу, який є позитивним при мікроспіюванні у темному полі та пізньому сифілісі і наявність близько 1-2% помилково-позитивних осіб серед здорової популяції.

Трепонемні тести для діагностики сифілісу засновані на виявленні антитіл проти антигенів до *T. pallidum*, продукованих після зараження. РПГА-тест (реакція пасивної гемаглютинації) широко використовується в Європі в якості скринінгового тесту, зазвичай в поєднанні з нетрепонемними аналізами, а також в якості підтверджуючого тесту. У деяких випадках може бути отриманий невеликий відсоток хибно позитивних результатів.

Імунологічні тести на основі рекомбінантних антигенів *T. pallidum* є більш специфічними і такими ж чутливими, як в аналізах на основі нативного антигену, і можуть розглядатися як передові скринінг-тести.

Білок TmpA*Treponemapallidum* є мембранним антигеном блідої спірохети, який використовують при виробництві тест-систем для серологічної діагностики сифілісу, особливо він використовується для діагностики раннього сифілісу і значно підвищує чутливість системи.

Метою даного дипломного проекту є розробка технології отримання рекомбінантного білка TmpA*Treponemapallidum* за допомогою штам-продуцента *Escherichiacoli*K-12 W3110.

Завданням даного дипломного проекту є: характеристика біологічного агента *Escherichiacoli*K-12 W3110; опис біохімічних основ виробництва цільового білка; опис основних методів отримання промислових продуцентів; складання та опис технологічної схеми виробництва рекомбінантного білка TmpA*T.pallidum*; розрахунок та проектування ферментеру для ведення біосинтезу а також складання апаратурної схеми виробництва; опис вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки.

*E.coli*K-12 W3110 володіє типовими морфологічними ознаками, характерними для *E.coli*та родини *Enterobacteriaceae*. Це грам-негативна бактерія, клітини якої мають паличкоподібну форму з заокругленими кінцями, розміри 0,4-0,8 мкм в ширину та 1-3 мкм в довжину. Не утворює ендоспор, рухлива бактерія. На щільних середовищах утворює пласкі сухі каламутні колонії. Є хемоорганогетеротрофом, здатна рости на простих середовищах с солями та одним джерелом вуглецю. Типовий мезофіл: нижня границя росту +10 °С, верхня +49 °С, оптимальна температура +37°С.

E. coli можна культивувати як в аеробних (у присутності кисню), так і в анаеробних (без кисню) умовах. Однак для оптимальної продукції рекомбінантних білків її зазвичай вирощують в аеробних умовах. Штам *Escherichiacoli*K-12 W3110 є одним з найстаріших лабораторних штамів кишкової палички K-12. Дикий тип був вилікуваний від λ-бактеріофагу та F-плазмід, також цей штам містить плазмідний вектор pR2M6-TmpA-His, різновид плазмідирPF-15, яку використали для трансформації даного штам для продукування білка TmpA.*E. coli* є звичайним компонентом нормальної

кишкової мікрофлори людини й багатьох хребетних та безхребетних тварин. Вона постійно виявляється й у зовнішньому середовищі – в ґрунті, воді, на різних предметах.

TmpA (Treponemal membrane protein A) – це мембранний ліпопротеїн *Treponema pallidum* або блідої спірохети (збудника сифілісу), який володіє антигенними властивостями. Цільовим продуктом даного виробництва є рекомбінантний білок TmpA, який продукується *Escherichia coli* K-12 W3110 і є аналогом білка TmpA *Treponema pallidum*. Має молекулярну масу близько 42 кДа. У *E. coli* цей білок накопичується як розчинний цитоплазматичний білок у тільцях включення. Особливістю рекомбінантного білка TmpA є наявність гістидинового тегу з 6 залишків гістидину, що розташований з С-кінця. Така модифікація не впливає на антигенні властивості білку, при цьому вона дозволяє білку утворювати хелатні комплекси з іонами Ni^{2+} , що значно полегшує хроматографічну очистку.

Цільовий продукт цього виробництва є білком, тому його синтез як у *T. pallidum*, так і у *E. coli* відбувається за класичним шляхом біосинтезу білка. Проте, особливістю його біосинтезу, є необхідність індукції експресії генів, відповідальних за синтез цього білка, тобто наявність регуляції біосинтезу.

Ген білка розташований у плазміді pR2M6, що є модифікацією плазміди pPF-15. Він містить триптофановий оперон у якості промотера, який активується за умови нестачі триптофану. Регуляція експресії відбувається за механізмом аттенуації, так як цей оперон містить гени ферментів, що задіяні у біосинтезі триптофану, білок починає експресуватися у клітині за умови нестачі цієї амінокислоти у поживному середовищі. У технології біосинтезу реалізується у 2 етапи – спочатку накопичення біомаси, а потім накопичення цільового білку.

Кінцевим продуктом виробничої технології є очищений концентрований розчин білку у буферному розчині у флаконах по 10 мл. Буферний розчин, у якому врівноважений білок має наступний склад: 0,1

М NaH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 8 М сечовини, рівень рН 7. Концентрація білку складає 10 мкг/мл.

Штам-продуцент, що використовується у даному проекті був створений за наступною схемою. Вихідний штам мікроорганізму – *Escherichiacoli*K-12 W3110. Донорна ДНК була отримана з лімфи м'якого шанкру пацієнта, хворого на сифіліс та очищена. Після цього була використана полімеразна ланцюгова реакція для ізоляції та багатократного збільшення копій гену. Ампліфікована ДНК була ферментативно розщеплена на одиничні гени та вшита у бактеріальний плазмідний вектор pR2M6, що є модифікацією плазмиди pPF-15.

Плазмідний вектор pPF-15 несе триптофановий промотор та термінатор T4 і призначений для виробництва *invitro* діагностичних рекомбінантних антигенів, як N-кінцевих частин химерних білків, з першими 58 амінокислотними залишками людського інтерлейкіну-2 (IL-2). Для включення 6-His тегу в TmpA білок на C-кінці, ген TmpA був клонований у векторі pR2M6, модифікація pPF-15 з кодуючим 6-His доменом з 3'-кінця вбудованого гену.

Технологічний процес виробництва рекомбінантного білка TmpA починається з допоміжних робіт, які включають в себе санітарну підготовку виробництва, підготовку поживного середовища, підготовку посівного матеріалу, а також містить стадії основного технологічного процесу, стадії пакування, маркування готового продукту та стадії знешкодження відходів.

Ведення біосинтезу відбувається на поживному середовищі M9 з додаванням глюкози та триптофану у ректорі об'ємом 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,6, з перемішуванням турбінною мішалкою та аерацією за допомогою барботеру. Біосинтез проводиться за температури $+37^\circ\text{C}$ та атмосферному тиску.

Після біосинтезу біомаса відділяється центрифугуванням та піддається дезінтеграції ультразвуком та обробкою лізоцимом. Далі відбувається центрифугування з відділенням решток клітин від розчину білку, який

подається на очистку до хроматографічної колонки за допомогою метал-афінної хроматографії. Очищений білок врівноважується у буфері та розливається у флакони.

Даний дипломний проект був виконаний з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва на основі даних вивчення і аналізу шкідливих виробничих факторів.

Отже, можна зробити наступні висновки:

1. Охарактеризовано *E.coli* як біологічний агент, її морфолого-цитологічні та фізіолого-біохімічні ознаки, систематичне положення. Крім того, було порівняно *E.coli* з іншими можливими продуцентами цільового білку, та обґрунтовано вибір *Escherichiacoli*K-12 W3110 як штаму-продуценту.

2. Наведено характеристику кінцевого продукту та механізму його біосинтезу з описанням особливостей будови рекомбінантного білка та індукції його експресії при культивуванні. Також було описано основні методи очистки продукту та пояснено технологічні рішення, що використовуються у даному проекті.

3. Представлено генетичну карту *E.coli*, детально описаний механізм експресії цільового білку. Описано типові методи створення високопродуктивних промислових штамів, запропоновано схему та опис створення *Escherichiacoli*K-12 W3110 як продуценту рекомбінантного білка *TmpATreponemapallidum*.

4. У технологічній частині проекту представлена технологічна схема отримання цільового білка з описанням стадій допоміжних робіт, проведення біосинтезу та очистки цільового продукту та наведений її опис з переліком контрольних точок. Також була представлена апаратурна схема виробництва, розрахований матеріальний баланс стадії біосинтезу та опис цільового білка як кінцевої продукції виробництва.

5. В дипломному проекті було обрано, спроектовано та розраховано ферментер для проведення біосинтезу.

6. На основі даних вивчення і аналізу шкідливих виробничих факторів проектом передбачено вимоги охорони праці, пожежної та екологічної безпеки виробництва