

**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 отримання рекомбінантного білка G1 вірусу простого герпесу 1-го типу. Дільниця виділення білка

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

Паршиков Віталій Олександрович  
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник ст. викл. Дзигун Лариса Петрівна  
(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. Щурська К.О.  
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Київ – 2015 року

## АНОТАЦІЯ

Вірус простого герпесу (ВПГ) – представник ДНК-вмісних вірусів родини герпесвірусів. Відомо, що герпетичні інфекції відносяться до числа найбільш поширених. Згідно з дослідженнями вірус простого герпесу першого типу (ВПГ-1) присутній більш ніж у 90%, а генітальний герпес (ВПГ -2) приблизно у 15% населення Землі.

Незважаючи на істотний прогрес медичної науки, діагностика і лікування герпетичних інфекцій продовжує залишатися серйозною проблемою. З метою забезпечення потреби у біологічному матеріалі для діагностики і наукових досліджень ВПГ-1 і ВПГ-2, в початкових дослідженнях цього захворювання використовували лізати вірусів. Цей метод пов'язаний з певним рівнем небезпеки при роботі з вірусом і характеризується невеликою кількістю високоспецифічних для певного виду вірусу нативних білків-антигенів.

Тому з розвитком генної інженерії (і технології рекомбінатних організмів зокрема), з'явився новий спосіб отримання необхідних функціональних високомолекулярних сполук. Так за допомогою про- (*E.coli*) та еукаріотичних систем (*S.cerevisiae*) стало можливим отримання в імуногенній формі білків-антигенів різноманітних вірусних інфекційних захворювань, що викликаються такими представниками, наприклад, як *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Herpesviridae Simplexvirus*, гепатит С та ін. Використання систем експресії рекомбінатних штамів мікроорганізмів дозволяє відносно безпечно і за невеликий проміжок часу отримувати велику кількість визначених білків-антигенів, що можуть бути використані в діагностиці, лікуванні і дослідженнях вірусних інфекцій.

Метою даного дипломного проекту є розробка технології промислового виробництва рекомбінантного білка G1, що є білком аналогом глікопротеїна gG-1 *Herpesviridae Simplexvirus*.

Основними завданням даного проекту є: підбір і характеристика промислового продуцента для виробництва рекомбінантного білка; обґрунтування схеми отримання продуцента, що використовується в проекті; розгляд основних

фізико-хімічних характеристик кінцевого продукту та біохімічних основ виробництва; складання матеріального балансу дільниці виділення білка; розробка апаратурної та технологічної схем виробництва; обґрунтування вибору конструкції центрифуги на стадії виділення тілець включення, здійснення технологічного і конструктивного розрахунку; проведення аналізу шкідливих та небезпечних факторів виробництва, методів їх попередження.

Кишкова паличка (*Escherichia coli*) є найбільш вивченим продуцентом рекомбінантних білків. Зважаючи на невибагливість *E.coli* щодо складу поживного середовища, температурного режиму і здатності до швидкого росту як в аеробних, так і в анаеробних умовах, даний продуцент є найбільш вигідним з точки зору економічної доцільності і рівня продукції кінцевого продукту. В ідеальних умовах, клітини *E.coli*, можуть подвоюватися кожні 20 хвилин. У такому випадку, можна було б виробляти мільйон клітин *E.coli* з однієї батьківської клітини протягом приблизно 7 годин. Швидке зростання означає, що як експерименти, так і виробничий біосинтез за участю кишкової палички можуть бути зроблені швидко, зручно і дешево.

Кишкова паличка є хемогетеротрофом, що здатен використовувати для росту будь-який з великої кількості цукрів та амінокислот. Проте зростання багатьох штамів інгібується у присутності окремих амінокислот, таких як серин, валін або цистеїн.

*E.coli* культивується в багатьох поживних бульйонах, що містять амінокислоти, солі, вітаміни, мікроелементи та джерело вуглецю: в такому середовищі час регенерації в логарифмічній фазі росту при температурі 37°C сягає приблизно 20 хв.

Цільовим продуктом даного виробництва є біотехнологічний препарат, а саме – рекомбінатний білок-аналог поверхневому білку ВПГ-1. Ступінь чистоти цільового продукту сягає більше 95,5%. Інші сторонні компоненти – це білки та інші компоненти, які мають подібну молекулярну масу. Біологічно активних речовин, які можуть вплинути на якість кінцевого продукту в препараті немає.

Препарат розливається у вигляді стерильного і фільтрованого чистого розчину в ампули ємністю 1 мл. Концентрація білку-антигену 1мг/мл. Білок міститься у трис-буферному розчині 25мМ-ого HCl рН 7,2, 1мМ ЕДТА і 50% гліцерину. Термін зберігання при температурі -70°C – 1 рік.

Для конструювання рекомбінантного штаму *E.coli* для отримання цільового продукту (рекомбінантного білка G-1) існує достатньо методів і теоретичних досліджень, які в основному засновані на трансформації клітин кишкової палички за допомогою плазмідних векторів різноманітних варіацій і набору нуклеаз.

Особливістю використання в якості продуценту рекомбінантного штаму *E.coli* BL21 є те, що для індукції процесу синтезу цільового рекомбінантного білка після накопичення біомаси (у стаціонарній фазі росту), проводять процес термоіндукції (фаза термошоку – ТП7.2). При цьому до культуральної рідини додають попередньо розігріте в термостаті до 52°C поживне середовище. Температуру культивування змінюють з 32°C на 42°C. Тривалість фази термошоку – 4 години.

Цільовий продукт призначений для:

- використання в медичних лабораторних дослідженнях вірусу простого герпесу;
- як чутливий до IgG і IgM компонент тест-системи для визначення ВПГ-1 за принципом методу імуноферментного аналізу або вестерн-блота з мінімальними проблемами специфікації;
- в клінічній діагностиці.

Продукт – стерильна прозора і чиста рідина без видимих зважених часток, що розливається у флакони в буферному розчині (25мМ Трис-HCl, 1мМ ЕДТА, 50% гліцерин) по 2 мл, в якому концентрація цільового білку складає 1мг/мл. Флакони закупорені гумовими пробками і алюмінієвими ковпачками.

Характеристика продукції:

- концентрація білка 1 мг/мл;
- чистота білка більше 95%;
- без консервантів;

- білок містить 6 залишків гістидину на С-кінці;

Технологічний процес даного виробництва складається з:

- допоміжних робіт, що включають санітарну підготовку виробництва, підготовку персоналу, підготовку виробничих приміщень, підготовку інвентарю, обладнання та комунікацій, підготовку стерильного посуду, приготування поживних середовищ, отримання посівного матеріалу;
- стадій основного технологічного процесу що включають виробничий біосинтез виділення тілець включення, відмивання тілець включення, хроматографічну очистку білка, отримання кінцевої форми продукту, розлив розчину білка у стерильні флакони
- , пакування, маркування і відвантаження готової продукції;
- переробка відходів;
- знешкодження відходів.

Оскільки метою роботи була розробка ділянки виділення білка, то НАМИ було розраховано проточну трубчасту центрифугу, що використовується на етапі відділення тілець включення.

Обрано конструкцію проточної трубчастої суперцентрифуги з діаметром ротора 150мм і максимальним коефіцієнтом розділення 15835. Центрифуга оснащена змійовиком для охолоджуючого теплоагента і системою нагнітання. Проведені конструктивні розрахунки, розраховано потужність за суспензією і підтверджено надійність експлуатації обраної центрифуги.

Апарат був обраний з огляду на ефективність і швидкість розділення високомолекулярних суспензій.

## ВИСНОВКИ

В даному дипломному проекті вдосконалено технологію виробництва рекомбінантного білка G1 (ВПГ-1).

1. В якості продуцента обрано рекомбінантний штам *E.coli* BL21, що був модифікований за допомогою плазмідної трансформації. В даній генетичній конструкції транскрипція клонованого гена контролюється промотором гена 10 фага T7. Викладено загальну схему селекції мікроорганізму

2. Обрано технологічну та апаратурну схему виробництва рекомбінантного білка G1, що враховує такі особливості продуценту як необхідність термоіндуkcії синтезу цільового білка і додаткова стадія хроматографічної очистки у разі накопичення продукту в розчинній формі. Також надано характеристику сировини та матеріалів, що використовуються у виробництві, характеристику кінцевої продукції, її пакування і маркування. Наведено точки і методи контролю виробництва.

3. Обрано поживне середовище LB №1 для вирощування посівного матеріалу *E.coli* BL2 та середовище H15 для виробничого біосинтезу рекомбінантного білка G1.

4. Складено матеріальний баланс на стадію виділення продукту.

5. Обрано конструкцію проточної трубчатої суперцентрифуги з діаметром ротора 150мм і максимальним коефіцієнтом розділення 15835. Центрифуга оснащена змійовиком для охолоджуючого теплоагента і системою нагнітання. Проведені конструктивні розрахунки, розраховано потужність за суспензією і підтверджено надійність експлуатації обраної центрифуги.

6. Даним дипломним проектом передбачено врахування всіх вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проаналізовано шкідливі та небезпечні для здоров'я персоналу фактори виробництва та запропоновано методи їх уникнення в умовах виробництва.