

**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 NS3

білку вірусу гепатиту С . Дільниця виділення і очистки цільового продукту

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

Романюк Олександр Вікторович  
(прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник доц., к.с.-г.н. Дехтяренко Н.В.  
(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

Вчені вважають, що через кілька десятиліть головною небезпекою для здоров'я людини складуть вірусні гепатити. Між тим, до теперішнього часу багато людей не обізнані про небезпеку цих інфекційних захворювань .

Гепатит С посідає перше місце в переліку чинників, що провокують хронічні захворювання печінки, випереджаючи гепатит В, алкоголь і навіть СНІД. Характерною особливістю вірусу гепатиту С є його множинні генотипи, штами, які допомагають інфекції адаптуватися, зберігатися і тривалий період часу уникати імунній відповіді .

За даними доповіді Всесвітньої асоціації охорони здоров'я (ВООЗ), щонайменше 170 мільйонів чоловік, тобто більше 2,8% населення земної кулі, хронічно інфіковано вірусом гепатиту С. Ця цифра майже в п'ять разів перевищує кількість інфікованих ВІЛ - вірусом, який викликає СНІД .

На сьогоднішній день для діагностики ураження вірусним гепатитом С у дітей і дорослих використовується два види тестів. Один з них виявляє антитіла до вірусу гепатиту С, інший - РНК вірусу гепатиту С, присутність якого вказує на активну інфекцію вірусом гепатиту С.

Після первинної діагностики лікарі можуть також провести третій тест для визначення генотипу вірусу у даного пацієнта.

Кількісний тест ПЛР допомагає визначити вірусне навантаження - кількість вірусу в крові, але якщо рівень РНК вірусу гепатиту С надзвичайно малий, він може повністю його пропустити і видати дані про те, що РНК ВГС не визначається.

Якісний тест ПЛР на РНК вірусу гепатиту С дає позитивний або негативний результат, вказує на наявність або відсутність РНК вірусу гепатиту С. Він є найбільш чутливим з двох тестів і може визначити така мала кількість вірусу, яке кількісний тест зазвичай пропускає. Тим не менш, якісний тест не визначає вірусне навантаження - кількість вірусу, циркулюючого в крові.

Дослідники продовжують роботу над створенням ефективної вакцини проти гепатиту С, проте до її появи пройдуть роки. Основною проблемою є різноманітність мутацій вірусу гепатиту С.

Вакцини проти гепатиту С поки не існує, проте останні розробки вчених дозволяють сподіватися, що незабаром у всіх, інфікованих HCV, з'явиться ефективні для протидії вірусу ліки .

З огляду на те, що на винайдення вакцини може піти чимало часу, розробка ефективних та недорогих тестів для діагностики вірусу гепатиту С стає пріоритетним завданням не тільки вітчизняної та світової фармакології та імунології, але і в першу чергу біотехнології.

Тому метою проекту була розробка технології виробництва рекомбінантного NS3 білка вірусу гепатиту С.

Завданням дипломного проекту є:

1. Провести пошук та охарактеризувати високопродуктивний штам для виробництва рекомбінантного білку.
2. Провести аналіз біохімічних основ виробництва.
3. Розглянути основні методи отримання промислових штамів та запропонувати схему отримання продуценту.
4. На основі отриманих даних розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва рекомбінантного білку.
5. Провести розрахунок та розробити конструкцію хроматографічної колони для очищення розчину NS3 білку.
6. Передбачити заходи і засоби щодо забезпечення здорових умов праці та пожежної безпеки на виробництві.

У першому розділі «Характеристика біологічного агента» на основі аналізу літературних даних в якості продуцента для проведення технологічного процесу запропоновано штам *Escherichia coli pop2136*, який вирізняється своїми високими технологічними показниками та продукує NS3 білок.

Стабільні властивості штаму *Escherichia coli pop2136*, що не

змінюються при зберіганні, в процесі культивування та при впливі екстремальних чинників дозволяють судити про його промислову придатність.

Проаналізовано систематичне положення штаму, морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні та серологічні ознаки, місця поширення штаму в природі.

Встановлено, що згідно визначника бактерій Берджі штам *Escherichia coli* рор 2136 відноситься до групи «факультативно анаеробні грамвід'ємні палички». Клітини розміром 0,4—0,8 x 1—3 мкм, на щільних середовищах бактерії утворюють плоскі опуклі каламутні колонії з рівними або злегка хвилястими краями (3-5 мм в діаметрі)

Основними джерелами вуглецевого живлення для *Escherichia coli* зазвичай слугують глюкоза чи гліцерин. Желатину не розріджують. Мальтозу не зброджують.

Добре росте на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ). Росте на агарі Хоттінгера складу: перевар по Хоттінгеру, натрій хлорид, агар, LB середовищі.

Враховуючи економічні міркування, для стадії біосинтезу запропоновано використовувати LB середовище.

У другому розділі «Біохімічні основи виробництва» наведено характеристику кінцевого продукту, його компонентний склад, методи очистки та механізми впливу на організм людини.

Даний кінцевий продукт є рекомбінантним білком та використовується в імунологічних сироватках .

Методом кінцевої очистки цільового продукту обрано очищення на хроматографічній колонці, оскільки саме такий спосіб дозволяє провести очистку з максимальним виходом рекомбінантного білку.

Вважають, що антитіла до NS3 можуть бути самостійним діагностичним маркером, їх тривала присутність у значній концентрації має прогностичне значення – вказує на високу загрозу хронізації.

**У третьому розділі «Методи отримання промислових продуцентів»** обґрунтовано основні методи створення високопродуктивних промислових продуцентів та запропоновано схему отримання продуценту, що використовується в роботі.

Природні штами мікроорганізмів в основному низькопродуктивні. Тому в мікробіологічній промисловості застосовують селекційні методи: індукований мутагенез, штучний добір, методи генної та клітинної інженерії.

Схема отримання продуцента, що використовується в роботі включає наступні етапи: отримання лізату фага P1 (вирощування клітин в бульйоні LB, додавання частинок фага P1, адсорбція фага на клітинах, інкубація та центрифугування) та проведення трансдукції за допомогою отриманих фаголізатів.

**У четвертому розділі «Технологічна частина»** охарактеризовано кінцеву продукцію виробництва - кінцевий цільовий продукт являє собою рекомбінантний поліпептид з молекулярною масою 33.2кД та використовується для виготовлення тест систем.

Здійснено перелік та коротку характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів, які використовуються на виробництві.

Обрано технологічну схему виробництва та наведено опис технологічного процесу, що складається з наступних стадій:

1) Допоміжні роботи:

- санітарна підготовка виробництва, що включає підготовку миючих та дезинфікуючих розчинів, підготовку персоналу, підготовку обладнання і комунікацій, підготовку виробничих приміщень;

- підготовка повітря;

- підготовка води деіонізованої;

- приготування поживного середовища.

2) Стадій основного технологічного процесу:

- підготовка посівного матеріалу;

- напрацювання культури;
- виробничого біосинтезу;
- відділення біомаси центрифугуванням;
- отримання рекомбінантних білків антигенів;
- центрифугування;
- хроматографічної очистки білків;
- фасування розчину білка.

2) Стадії пакування, маркування, відвантаження готового продукту.

3) Стадії знезараження відходів та промислових викидів.

Відповідно до технологічної схеми виробництва розроблено апаратурну схему.

Складено матеріальний баланс виробництва на один виробничий цикл.

Здійснено перелік усіх контрольних точок на виробництві, які забезпечують належну якість продукції.

**У п'ятому розділі «Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу»** обрано та обгрунтовано конструкцію хроматографічної колони з метою очищення NS3 білка.

Розрахована хроматографічна колонка має об'ємну продуктивність до 500 м<sup>3</sup>/год, внутрішній діаметр 0,6 м, висоту 1800 мм.

Обгрунтовано вибір загальнозаводського обладнання.

**У шостому розділі «Охорона праці»** на основі даних щодо шкідливих та небезпечних виробничих факторів передбачено заходи і засоби з охорони праці для забезпечення пожежної та екологічної безпеки на підприємстві, а також безпечних умов праці.

## ВИСНОВКИ

1. В проекті наведені, основні промислові продуценти для біосинтезу рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С, обрано в якості основного промислового продуценту штам *e.coli* pop2136, вказані основні морфолого – цитологічні, культуральні, серологічні та фізіолого-біохімічні ознаки промислового продуцента, описано його поширення в природі.

2. Описана схема хімічних перетворень в процесі біосинтезу рекомбінантного білку NS3 вірусу гепатиту С, наведена характеристика продукту та компонентного складу біотехнологічного препарату.

Запропоновані методи очистки NS3 білку вірусу гепатиту С. Вказані, механізми впливу продукту на біохімічні процеси.

3. Представлена, генетична вивченість *E.coli* як промислового продуцента, вказана наявність генетичних карт, наведена вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез білку.

Запропоновано метод створення високопродуктивного промислового продуценту, наведена блок схема отримання промислового продуценту.

4. Наведена характеристика готової продукції. Обрано технологічну схему отримання NS3 білку вірусу гепатиту С, розрахований матеріальний баланс виробництва та визначені основні контрольні точки. Створено апаратурну схему виробництва рекомбінантного білку.

5. Розраховано іонобмінну колону для очищення NS3 білку, наведений гідравлічний, технологічний та конструктивний розрахунки.

6. Передбачені на основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів засоби та заходи щодо створення у виробничих зонах здорових і безпечних умов праці, пожежної безпеки.