

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК \_\_\_\_\_

## МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності 8.05140101 – промислова біотехнологія  
(код та назва спеціальності)

на тему: Розробка тест-системи для діагностики уrogenітального хламідіозу  
на основі рекомбінантного білку МОР *Chlamydia trachomatis*

Студент групи БТ-31м Бобров Іван Євгенович  
(шифр групи) (прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник проф., д.ф.-м.н., Литвинов Г.С.  
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: доц., к.т.н. Орленко А.Т.  
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

## ВСТУП

### ***Актуальність теми***

Протягом останніх десятиліть серед захворювань людини неупинно зростає частка антропонозних хламідіозів [1, 2]. Особливо важливого значення набули уrogenітальні хламідійні інфекції, які належать до найбільш розповсюджених захворювань, що передаються статевим шляхом [3]. Вони вражають як чоловіків, так і жінок, часто діагностуються у новонароджених, чинять значний негативний вплив на репродуктивне здоров'я і часто стають причиною безпліддя. За даними ВОЗ, щорічно уrogenітальним хламідіозом заражається 89 млн людей у світі [4].

Проблема хламідіозів має важливе соціально-економічне значення. Успішна боротьба з цим захворюванням можлива лише за умови його своєчасного виявлення, яке, у свою чергу, пов'язане зі значними симптоматичними труднощами [5].

### ***Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами***

Виконана робота пов'язана із науково-дослідною діяльністю науково-виробничої компанії ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД» та її ключовими дослідницькими програмами.

### ***Мета й завдання дослідження***

Метою даної роботи є вдосконалення технології виробництва вже існуючої ІФА тест-системи для діагностики уrogenітального хламідіозу, виявлення нових фактів, висновків, рекомендацій, закономірностей впливу виробничого процесу на якість кінцевої тест-системи.

Основні завдання роботи:

- вивчити структуру поверхневих антигенів *C. trachomatis*;
- вивчити технологію очищення цільового білку;
- оптимізувати режим культивування та склад поживного середовища з метою отримання найбільшого виходу тілець-включень;
- вивчити основні біологічні характеристики трансформанта *E. coli* MOMP-R;

– дослідити розроблену тест-систему на чутливість щодо аналогів, що випускаються підприємством.

### ***Об'єкт дослідження***

Об'єктом дослідження є тест-система на основі рекомбінантного білка МOMP *Chlamydia trachomatis*.

### ***Предмет дослідження***

Закономірності отримання тест-системи для діагностики урогенітального хламідіозу на основі рекомбінантного білка МOMP *Chlamydia trachomatis*.

### ***Методи дослідження***

Мікробіологічні та молекулярно-біологічні методи, зокрема: культивування трансформованої *E. coli* МOMP-R, оброблення біомаси трансформованої *E. coli* МOMP-R, виділення та очистки тілець-включень, аналітичний електрофорез загальної ДНК у агарозному гелі, мікробіуретове визначення білку, аналітичний електрофорез білків у ПААГ. Методи геноміки, протеоміки математичної статистики оброблення експериментальних результатів.

### ***Наукова новизна одержаних результатів***

Проведені дослідження показали, що нова тест-система DIA-Chlamydia+ від ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД» за своєю специфічністю, чутливістю та відтворюваністю результатів (діагностичною ефективністю) не поступається попередній комерційній версії підприємства (DIA<sup>®</sup>-Chlamydia, Україна), і рекомендується для серологічної діагностики інфекцій, викликаних *C. trachomatis*, у практичній медицині.

### ***Практичне значення одержаних результатів***

Отримані результати мають важливе практичне значення, оскільки можуть бути безпосередньо впроваджені у виробничий процес підприємства, що спеціалізується на виготовленні ІФА тест-систем.

### ***Апробація результатів дисертації***

Апробація результатів дисертації проводилась в лабораторних умовах у серії дослідів.

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

## Методи дослідження

Основними методами дослідження, що були використані в роботі, є:

1. Методика культивування трансформованої *E. coli* МОМР-Р. Досліджувався процес культивування штаму-продуценту рекомбінантного білка МОМР-Р, вплив параметрів технологічного процесу на вихід біомаси та цільового білку.
2. Методика обробки біомаси трансформованої *E. coli* МОМР-Р. Досліджувалися різні способи обробки отриманої біомаси штаму-продуценту рекомбінантного білка МОМР-Р з метою її максимальної деструкції та виділення цільової сполуки з клітин.
3. Методика очищення тілець-включень. Досліджувалася зміна чистота рекомбінантного білка МОМР-Р на різних стадіях очищення із застосуванням органічних розчинників та хроматографії.
4. Методика проведення електрофорезу загальної ДНК у агарозному гелі. Досліджувався вміст загальної ДНК у біомасі клітин-продуцентів.
5. Мікробіуретовий метод визначення білку. Досліджувалася концентрація розчинів з рекомбінантним білком МОМР-Р різного ступеня чистоти, отриманих після лізису культивованої біомаси.
6. Методика проведення електрофорезу білків у ПААГ. Включала в себе два етапи.
  - 6.1. Методика приготування вихідних розчинів. Досліджувалися умови, необхідні для постановки електрофорезу білків з метою визначення відносної концентрації, чистоти та вмісту домішок у розчинах з рекомбінантним білком МОМР-Р, отриманих у процесі виробництва тест-системи.
  - 6.2. Методика постановки електрофорезу. Проводилось власне визначення даних параметрів у розчинах з рекомбінантним білком МОМР-Р, отриманих у процесі виробництва тест-системи.

## Результати та їх обговорення

На основі наведених вище результатів на базі ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД» (Україна, м. Київ) було розроблено комерційну імуноферментну тест-систему для виявлення видоспецифічних імуноглобулінів G та A до *C. trachomatis* у сироватці крові людини методом ІФА DIA<sup>®</sup>-Chlamydia.

Для цього було вивчено основні закономірності культивування штаму трансформованої *E. coli* МОМР-R та проведено електрофорез розчинів лізованої біомаси даного штаму різних ступенів очистки (рис. 1).

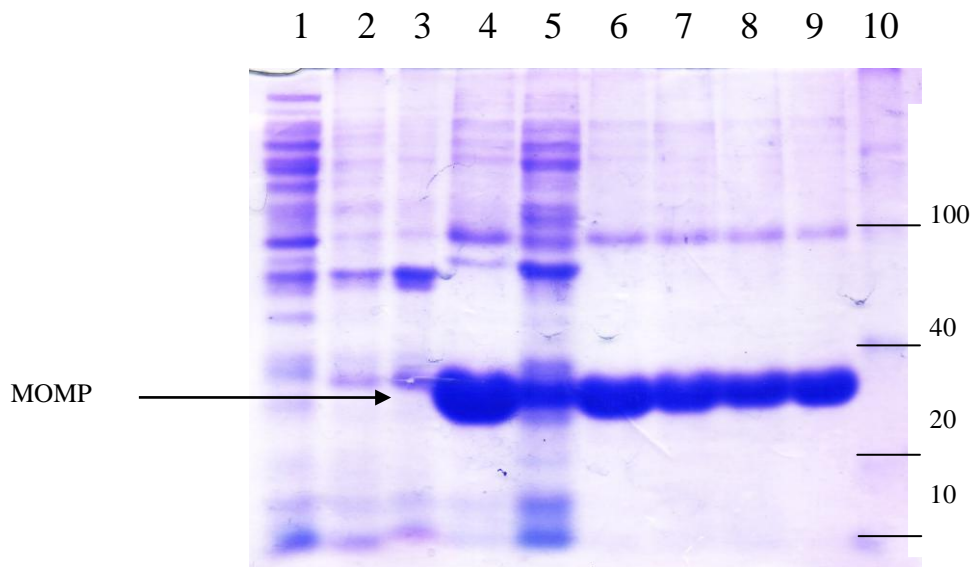


Рис. 1. Виявлення МОМР-протеїну шляхом електрофорезу білків штаму трансформованої *E. coli* МОМР-R:

1 – супернатант після осадження тілець-включень з лізату; 2 – перше промивання; 3 – друге промивання; 4 – тільця включення МОМР (розведення 1:10); 5 – хроматографічний просок; 6 – МОМР після елюції (серія 1), хроматографічна очистка; 7 – МОМР після елюції (серія 2), хроматографічна очистка; 8 – МОМР після елюції (серія 3), хроматографічна очистка; 9 – МОМР після елюції (серія 021-13), хроматографічна очистка; 10 – маркер молекулярної ваги (10-250 кДа).

Використання високоочищеного видоспецифічного рекомбінантного антигену дозволило створити тест-систему DIA-Chlamydia+ (модифікована версія стандартної тест-системи, що виробляється ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД», Київ), що володіє високою чутливістю 96,7 % і специфічністю (99%).

## ВИСНОВКИ

У роботі на основі результатів, отриманих на базі ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД» (Україна, м. Київ), було розроблено комерційну імуноферментну тест-систему для виявлення видоспецифічних імуноглобулінів IgG та IgA до *Chlamydia trachomatis* у сироватці крові людини методом ІФА DIA<sup>®</sup>-Chlamydia. У процесі розробки тест-системи була проведена порівняльна оцінка різних антигенів *C. trachomatis* вітчизняного виробництва.

У роботі застосовані сучасні мікробіологічні, молекулярно-біологічні та статистичні методи досліджень.

Показана перспективність застосування в якості сенсibiliзуючого антигену для імунологічних планшетів видоспецифічного рекомбінантного білка *C. trachomatis* (С-кінцевий фрагмент МOMP-білка *C. trachomatis*).

Проведені дослідження показали, що нова тест-система DIA-Chlamydia+ від ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД» за своєю специфічністю, чутливістю та відтворюваністю результатів (діагностичною ефективністю) не поступається попередній комерційній версії підприємства (DIA<sup>®</sup>-Chlamydia, Україна), і може бути рекомендована для серологічної діагностики інфекцій, викликаних *C. trachomatis*, у практичній медицині.

## КЛЮЧОВІ СЛОВА

CHLAMYDIA TRACHOMATIS, УРОГЕНІТАЛЬНИЙ ХЛАМІДІОЗ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, МОМР, ТЕСТ-СИСТЕМА, РЕКОМБІНАНТНИЙ БІЛОК

## ПУБЛІКАЦІЇ

Результати проведеної роботи опубліковані у збірці тез ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» присвяченій 170 річниці з дня народження Іллі Мечникова. УДК: 616.987-07. Переваги імуноферментного аналізу перед іншими методами діагностики урогенітального хламідіозу. Бобров І. Є.