

**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**

з напрямку підготовки \_\_\_\_\_ **6.051401 Біотехнологія** \_\_\_\_\_  
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до *Treponema pallidum*. Дільниця біосинтезу \_\_\_\_\_

Виконав: студент 4 курсу, групи \_\_\_\_\_ **БТ-21** \_\_\_\_\_  
(шифр групи)

\_\_\_\_\_ **Болячевець Олена Олександрівна** \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник \_\_\_\_\_ **проф. каф. Пром. Біотехнології, д.ф.-м.н.Литвинов Г.С.** \_\_\_\_\_  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Консультант \_\_\_\_\_ **Розділ 5** \_\_\_\_\_ **доц., к.т.н. Ружинська Л.І.** \_\_\_\_\_  
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_ **к.т.н., ст. викладач Козар М.Ю.** \_\_\_\_\_  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

Сифіліс- це хронічна інфекція, що викликається бактеріями *Treponema pallidum*. Захворювання характеризується різноманітною клінічною картиною на різних стадіях інфекції.

Пряма детекція збудника сифілісу *Treponema pallidum* на деяких стадіях захворювання утруднена. Культивування блідих трепонем на штучних поживних середовищах пов'язане з великими труднощами і пов'язано, як правило, з втратою патогенності. Використання рекомбінантних антигенів - один із способів вивчення повної амінокислотної послідовності білків патогенних штамів *T. pallidum*. Крім того, рекомбінантні аналоги імунодомінантних білків блідої трепонемі стандартні і безпечні. Рекомбінантні антигени - аналоги імунодомінантних білків *T. pallidum* мають високу діагностичну значимість, що дозволяє використовувати їх для створення імунодіагностикумів.

Своєчасна діагностика і адекватне лікування призводить до повного одужання.

Отже, створення імуноферментних тест-систем за допомогою рекомбінантних білків є досить **актуальним**.

Тому **метою** даного дипломного проекту є вдосконалення технології виробництва імуноферментної тест-системи для визначення антитіл до *Treponema pallidum*, що отримується за допомогою рекомбінантних аналогів білків блідої трепонемі. Рекомбінантні білки отримані з *Escherichia coli*. *E. coli* є дуже добре вивченим промисловим об'єктом, має високу продуктивність та широко застосовується у виробництві рекомбінантних білків.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Обрати штам продуценту для отримання рекомбінантних білків-антигенів.
2. Розглянути основні морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості продуценту.

3. Проаналізувати основні методи отримання промислового продуценту та запропонувати схему отримання продуценту.

4. Запропонувати технологічну та апаратурну схему виробництва імуноферментної тест-системи для визначення антитіл до *Treponema pallidum* та скласти матеріальний баланс для стадії біосинтезу.

5. Обґрунтувати вибір конструкції для здійснення процесу ферментації, підібрати загальнозаводське обладнання та зробити розрахунок ферментера для отримання біомаси *Escherichia coli*.

У першому розділі детально розглянуто основні промислові продуценти. Наведено характеристику продуцента – *Escherichia coli*, його морфолого-цитологічні, культуральні особливості та фізіолого-біохімічні (Кишкова паличка – факультативний анаероб, оптимальною температурою для її росту є 37 °С, найбільш сприятливий рН середовища 7,4. Стійкість *E.coli* до дії зовнішніх факторів – звичайна для аспорогенних бактерій. В зовнішньому середовищі (воді, ґрунті) вона виживає в залежності від конкретних умов протягом декількох місяців). Щодо морфолого-цитологічних особливостей: *E.coli* – це дрібні (довжиною 2-3 мкм, шириною 0,5-0,7 мкм) грамнегативні палички з заокругленими кінцями. Ультраструктура подібна до інших грамнегативних бактерій. В мазках вони розташовуються хаотично, не утворюють спор, перитрихи (джгутики відходять по периметру бактерії). Кишкові палички рухливі. Деякі штами мають мікрокапсулу, пілі. Середня маса клітини *E.coli* біля  $2 \cdot 10^{-12}$  г, що відповідає молекулярній вазі  $10^{12}$  дальтон. Особливу увагу також приділено серологічним ознакам *Escherichia coli*. Також зазначено його поширення в природі: резервуаром кишкової палички в природі є людина, товста кишка якої заселена різними біотипами цього мікроорганізма з моменту переходу дитини на змішане харчування, приблизно з кінця першого року життя. Кількість *E.coli* в 1г випорожнень коливається від кількох мільйонів до 1-3 млрд. особин. Протягом життя людини відбувається багаторазова зміна біотипів кишкової палички в кишечнику. Певну роль в цьому процесі відіграє

режим харчування, перенесені інфекції, лікування хімпрепаратами, антибіотиками та інші фактори. В природніх умовах кишкова паличка існує в кишечнику домашніх тварин, птахів, диких ссавців, рептилій, риб та багатьох безхребетних.

У другому розділі наведено біохімічні основи виробництва, а саме надано характеристику кінцевого продукту- рекомбінантних білків pTr17 та pTr47 – аналогів антигенів *Treponema pallidum*. Розглянута схема хімічних перетворень, характерна для *Escherichia coli*. Встановлено, що в *E.coli*, що росте в аеробних умовах в середовищі з глюкозою, близько 50% глюкози окислюється до CO<sub>2</sub>. Представлена характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології. Методом очищення цільового рекомбінантного білку є афінна хроматографія, що має наступні переваги перед іншими типами хроматографії: швидкий процес очищення, можливість застосування різних елюючих агентів для одержання високоочищених фракцій макромолекул, значне концентрування зразка. Кінцевий вихід білку складає 70%, а ємність матриці становить 1 мг / мл. Білок в подальшому використовують в діагностиці сифілісу разом панеллю позитивних і негативних сироваток. Показані механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси, представлені основи методу ІФА. Також наведено схему імунологічної реакції, яка відбувається в лунках планшета при проведенні аналізу. В ході інкубації імуносорбенту з випробуваної сироваткою при наявності в ній антитіл до даного антигену відбувається їх зв'язування в комплекс «антиген-антитіло».

У третьому розділі наведені генетичні особливості біологічного об'єкту, представлена генетична карта *E. coli*, наведено детальний опис геному *E.coli*. Щодо створення високопродуктивного промислового продуценту, то найбільш поширеним методом генної інженерії є метод отримання рекомбінантних плазмід. Для плазмід характерно стабільне існування в нехромосомному стані в бактеріях. Представлена схема отримання

продуцента, що використовується в роботі: рестриктазно-лігазний метод. Конструювання експресійних векторів проводили з використанням плазміди рЕТ-24(+). Вектори були отримані в результаті реакції лігування вставки - продукту ПЛР та плазміди рЕТ-24(+). Культуру *E.coli* штаму BL21(DE3) вирощують на стандартному L-бульйоні, який містить 0,2% глюкози при  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Наведено блок-схему отримання продуцента рекомбінантних білків рTr17 та рTr47 *E.coli* BL21(DE3)/рЕТ-24(+). Основними етапами отримання продуцента є конструювання гібридної плазміди та трансформування цими плазмідами клітин *E.coli*.

Четвертий розділ присвячений технологічній частині проекту. Надано повну характеристику кінцевого продукту із зазначенням фізико-хімічних показників, а також особливостей кінцевої продукції. В даному розділі детально відтворена характеристика контрольних точок, матеріалів та напівпродуктів, які використовуються у виробництві. Описано всі стадії технологічного процесу (допоміжні роботи; основні стадії технологічного процесу; пакування, маркування та відвантаження готової продукції). Наведений матеріальний баланс стадії виробничого біосинтезу. Матеріальний баланс складено для стадії культивування *E.coli* на один цикл виробництва. Оскільки об'єм ферментера складає  $0,01\text{ м}^3$ , а коефіцієнт заповнення – 0,5, об'єм культуральної рідини в апараті складає  $0,005\text{ м}^3$ .

У п'ятому розділі обґрунтовано вибір конструкції для здійснення процесу культивування біомаси продуценту рекомбінантних білків *E.coli*. У даному проекті передбачено використання ферментеру з механічним перемішуванням барботажного типу. Проведення культивування *E.coli* передбачає забезпечення інтенсивного перемішування та аерації середовища для кращого доступу кисню. Обраний ферментер забезпечений пристосуваннями для достатньої аерації і перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальним приладами. Таким чином обрано ферментер з сорочкою та барботером, об'ємом  $0,01\text{ м}^3$  та лопатевою мішалкою. Переваги використання лопатевої

мішалки: вирівнювання температур середовища; швидкість перемішування та розчинення, інтенсивне перемішування в повному обсязі апарата; можливість досягнення рідиною найбільш віддалених точок апарату; ефективне перемішування в'язких рідин. Здійснено підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату та проведено розрахунок ферментеру, а саме конструктивний та тепловий розрахунки, за допомогою яких визначено розмір мішалки, потужність електроприводу, розміри барботеру та теплове навантаження апарату.

Також в роботі представлено технологічну та апаратурну схеми технології виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до збудника сифілісу *Treponema pallidum*. Графічна частина виконана у відповідності до діючої нормативно-технічної документації.

Висновки:

1. У дипломному проекті було розглянуто продуцент *Escherichia coli*, що дає змогу отримувати рекомбінантні білки– аналоги антигенів *Treponema pallidum* і вдосконалено технологію виробництва імуноферментної тест-системи для визначення антитіл до *Treponema pallidum* (збудник сифілісу).
2. Розглянуто особливості виробництва даної тест-системи, характеристику її компонентного складу, а також, методи очистки рекомбінантних білків– аналогів антигенів *Treponema pallidum*, та механізм їхньої дії при діагностиці захворювання.
3. Запропоновано використовувати штам-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3) з гібридними ДНК, що отримано рестриктазно-лігазним методом за рахунок рекомбінатної плазміди рЕТ-24(+).
4. Встановлено найбільш сприятливі умови для культивування штаму-продуценту *Escherichia coli* рекомбінантних білків: температура 32°C, аерація, постійне перемішування 120 об/хв.
5. Розраховано та запропоновано конструкцію апарату для проведення процесу ферментації. Було обрано ферментер з сорочкою, об'ємом 0,01

$\text{м}^3$ , лопатевою мішалкою та частотою обертання мішалки  $-2 \text{ с}^{-1}$ .

Технологічні, конструктивні розрахунки та технічна характеристика апарату, наведені в даній роботі, підтверджують правильність вибору технологічного обладнання.