

**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 рекомбінантного рекомбінантного
білка gr41 ВІЛ-1. Дільниця підготовки посівного матеріалу

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

Мінакова Єлизавета Геннадіївна
(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Керівник ст. вик. Ліновицька В.М.
(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 доц., к.т.н. Шурська К.О.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Київ – 2016 року

ВІЛ-інфекція залишається головною проблемою громадської охорони здоров'я. Україна залишається в категорії країн з концентрованою стадією епідемії ВІЛ-інфекції, яка зосереджена серед окремих груп населення високого ризику інфікування ВІЛ. Отже, питання швидкої діагностики цього захворювання гостро стоїть і в нашій країні, і в світі.

За допомогою генетичного конструювання мікроорганізмів можливе отримання білків аналогів оболонки вірусу ВІЛ, які використовуються при виробництві імуноферментних тест-систем та наукових досліджень

Метою даного дипломного проекту є розробка технології виробництва рекомбінантного білка gp41 ВІЛ-1, який є структурним в оболонці вірусу та відповідає за його проникнення в клітини

Новизна даного проекту полягає в тому, що було розроблено лінію виробництва рекомбінантного білка gp41 з автоматизованим процесом підготовки посівного матеріалу.

Для досягнення поставленої мети було поставлено наступні завдання: вивчити морфолого-фізіологічні, культуральні особливості продуценту; запропонувати методи отримання промислового продуценту; розробити оптимальну технологію виробництва продукту та підібрати відповідне обладнання; скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва; розрахувати апарат, який би задовольняв усі умовам підготовки посівного матеріалу, виконати його креслення, передбачити всі необхідні вимоги щодо охорони праці та охорони навколишнього середовища на виробництві рекомбінантного білка gp41 ВІЛ-1.

В якості продуцента виступає анаеробні грамнегативні мікроорганізми виду *Escherichia coli*. Клітини являють собою палички з закругленими кінцями довжиною 2-3 мкм і шириною 0,6 мкм. Спор і капсул не утворюють. Кишкові палички (*Escherichia coli*) стійкі в зовнішньому середовищі, тривалий час зберігаються в ґрунті, воді. Добре переносять висушування. Кишкові палички мають здатність до розмноження в харчових продуктах, особливо в молоці. Швидко гинуть при кип'ятінні і дії дезінфікуючих засобів.

Кишкова паличка - класичний об'єкт молекулярної генетики, на якому досліджені найбільш принципові проблеми організації генетичного матеріалу

Цільовий білок отримують за допомогою рекомбінатного штаму *E.coli*, модифікованого плазмідною трансформацією. Для запуску механізму біосинтезу рекомбінантного білка gp41 необхідно індукувати експресію клонованих генів термічним шляхом.

По закінченню виробничого культивування для відділення клітин від культуральної рідини можна використовувати метод фільтрації, центрифугування та сепарування. В даному виробництві розділення проводять центрифугуванням з подальшим використанням осаду, представленого клітинами продуценту. Антигенні властивості білка gp41 полягають в утворенні антитіл в крові інфікованої людини, що запускає механізм хвороби.

За допомогою генно-інженерних методів створюються рекомбінантні молекули ДНК, сконструйовані *in vitro* у відповідності з певними науковими цілями. Рекомбінантні молекули ДНК складаються з фрагменту гена, що кодує цільовий продукт, та вектора. Для клонування фрагментів чужорідної ДНК в клітинах обраного продуцента *E.coli* можуть бути використані чотири типи векторів: плазміди, косміди, бактеріофаг λ та бактеріофаг M13. Олігонуклеотиди для отримання gp41 обробляли ДНК-кіназою, змішували в еквівалентні-молярної співвідношенні, інкубували при -95°C 30 хв і нагрівали до 15°C протягом 2 год в термостаті, додавали ДНК-лігазу і інкубували ніч при 15°C . Цільовий фрагмент ДНК гес gp41 ампліфікували за допомогою праймерів N1 і N2, гідролізували рестриктазою BamHI і очищали електрофорезом в 1% -ний агарозі. Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli*.

В даному проекті було наведено характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.

Також був розрахований матеріальний баланс стадії підготовки посівного матеріалу.

Виробничим процесам передують ряд допоміжних робіт, які включають в себе підготовку деіонізованої води, технологічного повітря, стерилізацію обладнання, санітарну підготовку працівників, приготування поживних середовищ для відтворення музейної культури, підготовки посівного матеріалу, виробничого культивування, підготовка розчинів.

Підготовка посівного матеріалу здійснюється на середовище LB, яке містить всі необхідні компоненти для швидкого росту продуцента. Виробниче культивування проводять на середовище H15. Цільовий продукт виділяють за допомогою центрифугування, розчинення клітинних стінок. Методом очищення рекомбінантних білків, який і використовується в даному виробництві, є метод металохелатної хроматографії з використанням нікельсефарози. В якості хроматографічної фази використовується сефароза з імобілізованою нікельнітрилтриоцтовою кислотою. – Ni-NTA Готовий продукт фасують в стерильні ампули.

Всі стадії виробничого процесу проходять технологічний та мікробіологічний контроль. В роботі описано методи контролю кожної стадії.

Оскільки завданням даного проекту була розробка ділянки підготовки посівного матеріалу було підібрано і спроектовано ферментер для виробничого культивування мікробної маси обраного штаму-продуценту.

До ферментеру висувається ряд вимог для створення оптимальних умов росту бактеріальної культури:

- підтримання певного значення рН=6,5;
- барботування повітрям;
- забезпечення стерильності.

Обраний ферментер об'ємом 10 л задовольняє поставленим умовам. Ферментер оснащений барботером для підводу повітря. Апарат оснащений установкою для термометра, заміром тиску, датчиком рН-метра. Проведений розрахунок підтверджує надійність обраної конструкції та забезпечення відповідного контролю параметрів. Також було підібрано апаратурну та

технологічну схему лінії виробництва рекомбінантного білка gp41 ВІЛ-1, що враховують особливості технології даного виробництва та включають параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.

У виробництві знаходяться в обігу шкідливі, пожежо-, вибухонебезпечні, токсичні, горючі речовини і матеріали. На виробництві використовується електрична, механічна, теплова енергія, вакуум. Транспорт сировини та готової продукції представлений конвеєрами та трубопроводами. Проект виконано за вимогами охорони праці, пожежної безпеки та екології.

Висновки:

1. В дипломному проекті розглянута технологія виробництва рекомбінантного білка gp 41 ВІЛ-1.

2. Як продуцент цільового білка обрано штам *Escherichia coli* та запропоновано схему його отримання з використанням методів генної інженерії, а саме плазмідної трансформації.

3. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва рекомбінантного білка з урахуванням особливостей культивування обраного продуцента.

4. Наведено характеристику кінцевого продукту, сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються в даному виробництві.

5. Розраховано матеріальний баланс стадії підготовки посівного матеріалу рекомбінантного білка gp 41 ВІЛ-1.

6. З урахуванням потреб культури в інтенсивній аерації та особливостей температурного режиму обрано конструкцію ферментера об'ємом $0,01 \text{ м}^3$ для проведення підготовки посівного матеріалу, наведено конструктивний та тепловий розрахунки, що підтверджують придатність обраного обладнання для даного виробництва.

7. Розглянуто вимоги до охорони праці та навколишнього середовища, проведено аналіз шкідливих та небезпечних факторів, запропоновано шляхи їх усунення.