

**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 білка HBcore вірусу  
гепатиту В. Дільниця біосинтезу

Виконала: студентка 4 курсу, групи БТ-21  
(шифр групи)

Нечасва Яна Олегівна  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник ст. викл. Ліновицька Віта Михайлівна  
(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 професор, д.т.н. Саблій Л.А.  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

Гепатит В є однією з найпоширеніших інфекційних хвороб в світі. Труднощі у боротьбі з гепатитом В значною мірою визначаються існуванням при цій інфекції хронічних вірусоносіїв. У світі налічується близько 250-300 мільйонів носіїв вірусу, при цьому даний показник продовжує збільшуватись з ростом населення планети. Одним із основних напрямків запобігання розповсюдженню гепатиту В є своєчасна діагностика даного захворювання. Серед методів лабораторної серологічної діагностики гепатиту В найбільш поширеним є використання тест-систем, призначених для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність IgG та IgM антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В методом імуноферментного аналізу. Одним із компонентів таких тест-систем є білок HBcore.

Отже, актуальність виробництва рекомбінантного HBcore пов'язана з потребою в тест-системах для діагностики гепатиту В.

Метою дипломного проекту є модернізація технології виробництва рекомбінантного білка HBcore, що може бути використаний для створення імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл класів IgG та IgM до вірусу гепатиту В у сироватці або плазмі крові людини.

Завдання для дипломного проекту:

1.Провести пошук та охарактеризувати обраний продуцент для виробництва рекомбінантного білка.

2.Розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва.

3.Провести аналіз промислових методів створення високопродуктивних продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.

4.Скласти матеріальний баланс, контроль виробництва, на основі отриманих даних розробити технологічну і апаратурну схему виробництва рекомбінантного білку.

5.Обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки, підібрати загальнозаводське

обладнання.

У першому розділі «Характеристика біологічного агента» на основі аналізу літературних даних в якості продуцента запропоновано штам *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS з жорсткою регуляцією експресії.

Продуцент мультиепітопного HBcore білку *E. coli* BL21(DE3) pLysS є стандартним за морфолого-цитологічними, культуральними, фізіолого-біохімічними ознаками. Основними джерелами вуглецевого живлення для *E. coli* зазвичай слугує глюкоза. Враховуючи економічні міркування, для стадії виробничого культивування запропоновано використовувати середовище *LB*.

При використанні даного продуценту можна застосовувати метод одноступінчатого очищення цільового білку, що значно здешевлює виробництво. Як вектор використано плазмиду pET21a, що містить полігістидинову мітку, що забезпечує можливість хроматографічного способу очищення за допомогою Ni-NTA. В плазміді pET21a застосовано промотор РНК-полімерази T7, що запускає експресію рекомбінантного білку. Експресія геномної копії РНК-полімерази T7 знаходиться під контролем lac репресора. Тому культивування обраного продуценту проходить в дві фази: у першій фазі накопичується біомаса, у другій фазі – за рахунок внесення у культуральне середовище індуктора ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозида відбувається експресія рекомбінантного білку.

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

Кінцевим продуктом є рекомбінантний білок, що отримують в результаті культивування *E. coli* BL21(DE3) pLysS, трансформованих плазмідною pET21a з геном, що кодує гМЕНВ, який є мультиепітопним білком вірусу гепатиту В.

Мультиепітопний білок складається з одного поліпептидного ланцюга та містить чотири епітопи, кожен з яких представлений у трьох копіях для

збільшення їх концентрації, що може збільшити чутливість та специфічність тест-системи.

Оскільки білок NBscore накопичується всередині клітини у вигляді тілець включень, то перед очисткою, клітини руйнують, використовуючи центрифугування, лізис біомаси буфером та обробку ультразвуком. Кінцева очистка цільового продукту проводиться на хроматографічній колонці, оскільки саме такий спосіб дозволяє провести очистку з максимальним виходом рекомбінантного білку, чому сприяє наявність у білку NBscore полігістидинової мітки.

У третьому розділі «Методи отримання промислових продуцентів» обґрунтовано створення високопродуктивних промислових продуцентів та запропоновано схему отримання продуценту, що використовується в роботі. Адже природні мікроорганізми, як правило, володіють низькою продуктивністю для промислових масштабів. Тому для мікробіологічних виробництв важливим є створення високопродуктивних штамів мікроорганізмів.

До основних способів, що забезпечують підвищення синтезу цільового продукту можна віднести як методи традиційної селекції, так і методи генетичної інженерії. До методів традиційної селекції відносять: індукований мутагенез, гібридизацію, селекцію та ступінчастий добір, зміни в системі регуляції – введення індукторів, зниження кількості репресора тощо. Для отримання чужорідних для продуценту білків у роботі запропоновано використання методів генетичної інженерії.

Для отримання продуценту рекомбінантного NBscore як вектор використовують плазмиду pET21a з клонованою повнорозмірною послідовністю гена NBscore. Трансформація бактеріальних клітин рекомбінантною плазмідною здійснюється у розчині  $\text{CaCl}_2$ .

У четвертому розділі «Технологічна частина» представлено характеристику кінцевої продукції виробництва, наведено опис технологічного процесу, матеріальний баланс, контроль виробництва.

Кінцевий цільовий продукт являє собою розчин рекомбінантного НВscore з молекулярною масою 21 кД та ступенем очистки 95%; розчин білку розлитий у флакони об'ємом по 1 мл.

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:

Допоміжні роботи:

- санітарна підготовка виробництва, що включає підготовку персоналу, миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку виробничих приміщень;

- підготовка обладнання і комунікацій;

- підготовка повітря;

- підготовка очищеної води;

- підготовка флаконів;

- підготовка закупорювальних матеріалів;

- приготування поживних середовищ.

Стадій основного технологічного процесу:

- підготовка посівного матеріалу;

- виробниче культивування;

- відділення біомаси центрифугуванням;

- заморожування біомаси;

- лізис біомаси;

- обробка біомаси ультразвуком;

- центрифугування;

- хроматографічна очистка;

- приготування буферного розчину рекомбінантного НВscore.

Стадія контролю якості готової продукції

Стадії розливу та укупорки флаконів.

Стадії пакування, маркування, відвантаження готової продукції.

Стадія знезараження відходів.

Відповідно до технологічної схеми виробництва розроблено апаратурну схему.

Складено матеріальний баланс виробництва на одну стадію виробничого біосинтезу на серію продукту.

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

У п'ятому розділі «Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу» обрано та обґрунтовано конструкцію ферментеру. Для культивування *E. coli* при виробництві рекомбінантного білка обрано ферментер об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>, що забезпечує всі умови для максимального виходу цільового продукту: температуру культивування 37°C, інтенсивне перемішування 250 об/хв, аерацію у розрахунку один об'єм повітря на один об'єм поживного середовища, асептики.

Обґрунтовано вибір загальнозаводського обладнання.

Висновки:

1. У дипломному проекті запропоновано модернізовану технологію виробництва рекомбінантного білка НVcore методом глибинного культивування.

2. Обґрунтовано вибір штаму-продуценту цільового білку - *E.coli* BL21 (DE3) pLysS.

3. За допомогою сервера ProtParam проаналізовано амінокислотну послідовність НVcore білку та наведено його основні характеристики.

4. Описано метод створення продуценту плазмідною трансформацією.

5. Обрано технологічну схему, що враховує особливості культивування продуценту, виділення та очищення цільового білка в одну стадію. Складено матеріальний баланс стадії виробничого біосинтезу. Представлено апаратурну схему виробництва.

6. Обґрунтовано вибір конструкції ферментера об'ємом  $0,1 \text{ м}^3$ , з барботером та механічним перемішуючим пристроєм пропелерного типу. Розрахований апарат дозволяє ефективно проводити процес біосинтезу у виробничих масштабах. Технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки підтверджують надійність та працездатність апарату.

7. Даний дипломний проект був виконаний з урахуванням основних правил та вимог охорони праці та промислової безпеки.