

**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 втробництва імуноферментного набору для виявлення IgG-антитіл до Chlamydomonas reinhardtii. Дільниця біосинтезу рекомбінантного білка-антигену.

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

Поліщук Ірина Віталіївна  
(прізвище, ім'я, по батькові) \_\_\_\_\_ (підпис)

Керівник доц., д.б.н. Галкін Олександр Юрійович  
(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. Щурська К. О.  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) \_\_\_\_\_ (підпис)

На даному етапі розвитку фармацевтичної промисловості, важливою ланкою забезпечення здоров'я населення виступає якісна діагностика причини захворювання. Різноманіття діагностичних методів досягло свого критичного значення, тим не менше завдання пошуку методу для ефективної діагностики інфекційних захворювань залишається не вирішеним.

Після імунологічної революції 1990-х років особлива увага приділяється імунологічним методам діагностики, які базуються на специфічному визначенні антигенів чи антитіл. Технологія ІФА(імуноферментного аналізу) вперше була опублікована в 1971 шведськими вченими, *Peter Perlmann* та *Eva Engvall*, під назвою *ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)*. Так, ELISA став першим аналізом, який широко використовували для діагностики вірусу імунодефіциту людини, завдяки його високій чутливості. Згідно статистичним даним, кількість використаних тест системи збільшується у величезних кількостях, що пов'язано з уніфікацією, стандартизацією, спрощенням процедури проведення ІФА.

До суттєвих переваг ІФА аналізу відносять високу чутливість(від 0,05 нг/мл), необхідність мінімальних об'ємів дослідного матеріалу, стабільність при зберіганні, можливість автоматизації всіх етапів процесу, а також низьку собівартість тест-системи.

Основними областями застосування ІФА-аналізу є діагностика інфекційних захворювань людей, дослідження епізоотологічної ситуації серед сільськогосподарських тварин, визначенні потенційних алергенів у продуктах харчування, токсичних речовин в складі лікарських препаратів, визначенні онкомаркерів, гормонів.

На сьогодні визначають два шляхи розвитку технології ІФА-аналізу. По перше, це розширення об'єктів дослідження, а по друге удосконалення методу аналізу внаслідок чого техніка його проведення суттєво спрощується, скорочується час проведення, зменшується кількість реагентів, відбувається пошук нових маркерів. Так, в 2012 році, в якості хромогену було використано наночастинку, що дозволило неозброєним оком реєструвати результати

аналізу. Можливість використання в якості реагентів для тест-систем рекомбінантних білків виводить ІФА аналіз на якісно новий рівень. Таким чином вдається уникнути процедури виділення антитіл та антигенів із небезпечного біологічного матеріалу та отримати більш чисті та стабільні білки.

Метою дипломного проекту є розробка технології отримання імуноферментного набору для виявлення *IgG*-антитіл до *Chlamydia psittaci*. *C. psittaci* є збудником орнітозів(псітакозів) у птахів, які можуть передаватися і людині. Смертність спричинена цим захворюванням наносить значні економічні збитки фермам та домашнім господарствам. *C. Psittaci* проявляється діареєю, млявістю, гіпертермією, виділенням з очей, зменшенням несення яєць та приросту маси. В діагностиці псітакозів існують певні труднощі, так як захворювання може перебігати без симптомно, а симптоми є дуже специфічними та можуть відрізнятися у особин різного віку. Тим більше, на даний момент не існує жодної тест-системи, яка дозволяла б діагностувати *C. psittaci*. Для діагностики псітакозів застосовують тест-системи для визначення *C.trachomatis*, розроблені для застосування на людях на основі ліпополісахариду, тобто можливо визначити лиш родину збудника. Для досягнення відповідної мети було поставлено наступні завдання:

1. Обрати ефективну систему експресії для біосинтезу рекомбінантного білка, за результатами літературного пошуку визначитися з високопродуктивним штамом-продуцентом.

2. Запропонувати білок видоспецифічний для *C. Psittaci*, що дозволить розробити тест-систему специфічну до виду, а не до роду, як було розроблено раніше.

3. Охарактеризувати екзогенне та ендогенне накопичення продукту, провести огляд стратегії екзогенного накопичення цільового білку-антигену.

4. Провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових

продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.

5. Визначитися з складом поживного середовища, параметрами культивування, апаратурним оснащенням для економічного виходу продукту.

6. На основі отриманих даних розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва.

7. Обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

8. Провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва, надати перелік методів їх попередження.

Для отримання рекомбінантного білку-антигену *C.psittaci* доцільно в якості системи експресії обрати прокаріотичний організм *E.coli BLR(DE3)*. Він є невибагливим у поживних середовищах, високопродуктивним за біомасою та цільовим продуктом, швидким у генерації. На даний момент добре вивчена наявність генетичних карт, дослідження механізмів біосинтезу цільового продукту, вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу, що спрощує процес отримання рекомбінантного білку.

Для синтезу рекомбінантного білку-антигену в даній роботі обрано варіабельну ділянку білку *MOMP VD4-2*, яка є видоспецифічною для *C.psittaci*.

Цільові гени були синтезовані хімічно-ферментативним методом. Для біосинтезу рекомбінантного білку-антигену використовуємо вектор нового покоління *pET* - найбільш потужне на даний час системе для клонування та експресії рекомбінантних білків в *E.coli*. Гени, що кодують білок *VD4-2*, клонуються в плазміді *pET* під контролем транскрипційних та трансляційних сигналів сильного фагу *T7*, таким чином експресія індукується надходженням *T7* РНК-полімерзи в реципієнтну клітину.

Вектор *pET-44 Ek/LIC*, який містить афінний таг *Nus•Tag*, що дозволяє отримати цільовий білок злитий з білком NusA – найбільш розчинним білком

з усіх 4000 білків *E.coli*. Екзогенне накопичення продукту забезпечується контрольованим порушенням цілісності зовнішньої мембрани, яке не викликає загибель клітин за рахунок додавання в середовище культивування гліцину або Тритона X-100. При цьому спостерігається вивільнення білків в позаклітинне середовище.

Результати досліджень показують що температурний режимом вирощування бактерійної культури при сталій температурі 37°C майже при всіх значеннях концентрації внесеного індуктора сприяє накопиченню білку у вигляді тілець включень, тоді як культивування за температури нижче 30°C сприяє накопиченню розчинного білку. Перша фаза від моменту внесення інокуляту в поживне середовище триває 7 годин. Культивування клітин здійснюють в ферментері на середовищі LB з ампіциліном(50 мкг/мл) за температури 30°C в умовах інтенсивної аерації (39 л/хв) для накопичення біомаси, при перемішуванні (151 об/хв) до досягнення клітин оптичної густини 0.6–0.8 оптичних одиниць при довжині хвилі 600 нм. Після цього відбувається внесення індуктора. Оптимальним часом біосинтезу для максимального виходу розчинної фракції цільового білка є 3 години після внесення індуктора. Індукція експресії здійснюється додаванням 0,3 мМ ПТГ(ізопропіл-β-D-1-тіога лактопіранозида), дана концентрація індуктора забезпечує максимальний вихід розчинного білка (0,41 мг/мл). Контроль експресії здійснюється за допомогою електрофорезу в 12,5%-ном поліакриламідном гелі.

Кінцевою продукцією даного проекту є імуноферментний набір для виявлення IgG-антитіл до *Chlamydomophila psittaci*. Набір складається з планшету з полістиролу на 96 лунок, на поверхні якого сорбований рекомбінантний білок-антиген *C.psittacci*, кон'югату - пероксидази із моноклональним IgG до *C. Psitacci*, набору референс стандартів, проявочного, промивочного та стоп розчинів.

Відповідно до завдання дипломного проекту було зпроектовано ділянку біосинтезу рекомбінантного білку-антигену, а саме ферментер. Для біосинтезу

рекомбінантного білку-антигену було обрано ферментер об'ємом 63 л. Конструкція апарату вдало задовільняє основні вимоги для біосинтезу цільового білка. Так, аерація здійснюється барботером, перемішування забезпечується лопатевою мішалкою з швидкістю обретаання 2, 67 с<sup>-1</sup>, охолодження забезпечується сорочкою, в яку подається вода.

Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежної безпеки та екологічної безпеки. На основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів нами передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці. Також передбачені заходи з безпеки в надзвичайних ситуаціях.

В процесі розробки проекту було зроблено такі висновки:

1. У ході виконання дипломного проекту розроблено технологію отримання імуноферментного набору для виявлення IgG-антитіл до *Chlamydia psittaci*. В якості антигену обрано видоспецифічний білок VD4-2, який являє собою варіабельний домен MOMP.

2. Для біосинтезу рекомбінантного білку-антигену підібрано прокаріотичну систему експресії представлену *E.coli BLR*.

3. *E.coli BLR* трансформується вектором *pET-44 Ek/LIC*, що забезпечує біосинтез рекомбінантного білку VD-2. Регуляторні елементи необхідні для контролю рівня експресії, представлені промотором T7 РНК полімерази.

4. Проблема ендогенності та нерозчинності продукту вирішується за рахунок використання вектора з *Nus•Tag* послідовністю та додаванням до середовища культивування розчину гліцину.

5. Виробниче культивування умовно можна розділити на два процеси: накопичення біомаси та біосинтез, який починається зі внесенням індуктора експресії ШТГ.

6. Для біосинтезу обрано ферментер об'ємом 63 л з механічним перемішувачем - лопатевою мішалкою та барботером.

7. Набір складається з планшету з полістиролу на 96 лунок, на поверхні якого сорбований рекомбінантний білок-антиген VD4-2 *C.psittaci*, готовий до

використання, кон'югату ферментного, набору референс-стандартів, проявочного розчину, стоп-розчину, водного розчину сірчаної кислоти та промивочного розчину. Компоненти набору розфасовані в скляні флакони, закупорені гумовими пробками з алюмінієвими ковпачками, і упаковані в коробки. Планшет знаходиться в закритій упаковці з фольги з вологопоглинаючим елементом, також під вакуумом.