

**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 *Toxoplasma gondii*. Дільниця біосинтезу химерного рекомбінантного білка

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

Письменна Марія Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові) _____ (підпис)

Керівник проф., д.ф-м.н. Литвинов Григорій Сергійович
(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 д.т.н., професор Саблій Л.А.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Toxoplasma gondii є облигатним внутрішньоклітинним паразитом - збудником захворювання на токсоплазмоз, який вражає клітини всіх ссавців, у тому числі людей.

Токсоплазмоз широко розповсюджений у багатьох регіонах світу, особливо в тропічних. Виявлено, що інвазованість населення північних областей земної кулі перебуває в межах 4–11 %, а в тропічних регіонах сягає до 70%. За середніми підрахунками токсоплазмозом інфіковані 20–30 % населення Землі.

У здорових людей захворювання на токсоплазмоз, як правило, протікає безсимптомно. Натомість у пацієнтів з ослабленим імунітетом (зокрема хворих на СНІД) - проходить в тяжкій формі, яка може викликати енцефаліт з летальними наслідками. Крім того, зараження первинною інфекцією під час вагітності може призвести до викиднів або патологічного стану плода.

Потреба в ранній діагностиці потенційно хворих або первинно інфікованих токсоплазмозом вагітних жінок, діагностування вродженої інфекції у новонароджених та людей з різними формами імунодефіциту обумовлює актуальність розробки тест-системи для виявлення токсоплазмозу.

Наявні комерційні аналізи не забезпечують достатньої чутливості і специфічності задля постановки остаточного діагнозу. Тому актуальним є виготовлення специфічних, чутливих та інноваційних діагностичних систем на основі білкових агентів *T.gondii*.

Задля досягнення 100% чутливості та специфічності тест-системи DIA[®]-Тохо-IgG в якості антигену застосовують химерні рекомбінантні білки ЕС2, ЕС3 і ЕС4, які експресуються в *E.coli*.

Метою дипломного проекту була розробка технології виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до *Toxoplasma gondii*.

Завданнями дипломного проекту були:

1. Підібрати та охарактеризувати основні продуценти химерного рекомбінантного білка, навести морфолого-цитологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.

2. Навести характеристику рекомбінантного білка та його очистку афінною хроматографією, розглянути механізм впливу химерного рекомбінантного білка на біохімічні процеси.

3. Охарактеризувати методи отримання промислових продуцентів *E.coli* та розробити схему отримання продуцента рекомбінантного антигену.

4. Навести характеристику імуноферментної тест-системи DIA[®]-Тохо-IgG, охарактеризувати сировину, матеріали та напівпродукти, що використовуються при виробництві тест-системи, скласти матеріальний баланс, розробити технологічну і апаратурну схему та описати технологічний процес виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до *Toxoplasma gondii*, навести контроль якості виробництва біотехнологічного продукту.

5. Обґрунтувати вибір ферментеру з механічним перемішуючим пристроєм, провести технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

В ході виконання дипломного проекту було охарактеризовано *Escherichia coli* в якості основного продуцента химерного рекомбінантного білка *Toxoplasma gondii*, наведено основні морфолого-цитологічні, культуральні, фізико-біохімічні ознаки штаму-продуценту. Зазначено основні переваги *E. coli* в порівнянні з високоактивним штамом *T.gondii*, що застосовується при виробництві природного антигену, а саме: короткий життєвий цикл *E. coli*, розшифрований геном, простота генетичних маніпуляцій, здатність розмножуватись простим поділом на мінімальних ПС, короткий час генерації, висока швидкість росту та можливістю легкого досягнення високої густини культури, здатність утримувати більше 50% чужорідного білка та рости як в аеробних, так і в анаеробних умовах.

Цільовим продуктом виробництва є химерні рекомбінантні білки *Toxoplasma gondii*, злиті з глутатіон-сульфо-трансферазою, молекулярною масою 110,4; 152,6 і 130 кДа для GST-EC2, GST-EC3 і GST-EC4 відповідно.

Послідовності ДНК EC2, EC3 і EC4 (SEQ ID 27, 29 і 31, відповідно), розщеплюють рестриктазами SpeI і NotI. Розщеплені ДНК були клоновані в векторі pGEX-SN, що був попередньо розщеплений SpeI і NotI ендонуклеазами, щоб генерувати продукти реакції синтезу на карбокси-кінці білка GST. Отримані плазмиди були використані для трансформації компетентних клітин *E.coli*.

Рекомбінантні білки GST-EC2, GST-EC3 і GST-EC4 були експресовані в цитоплазмі трансформованих клітин *E.coli* та очищені за допомогою афінної хроматографії з використанням глутатіон-сефарози у відповідності до інструкцій виробника.

Очищений рекомбінантний продукт розбавлений до концентрації 1 мг/мл за допомогою PBS зберігають при -20°C до використання. Вихід очищених продуктів бактеріальної культури становить 8 мг/л, 5 мг/л і 4 мг/л для химерних антигенів GST-EC2, GST-EC3 і GST-EC4 відповідно.

Стабільність рекомбінантного білка в розчинах, термостабільність, здатність маркувати білки, не впливаючи на силу взаємодій АГ-АТ, покращена здатність діагностувати вроджений токсоплазмоз у новонароджених та максимальна чутливість тест-систем з застосуванням химерних білків є основними перевагами для застосування таких білків-антигенів при комерційному виробництві.

Експресія білку відбувається при нарощенні клітинної біомаси трансформованої *E.coli* на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину або ампіциліну. Антибіотик інгібує ріст сторонньої мікрофлори та накопичення їх метаболітів, що в свою чергу унеможливорює вплив цих факторів на рівень експресії генів. Під час проходження експресії додаємо структурний аналог лактози IPTG, що призводить до активації лактозного

оперону, і на ДНК, внаслідок проходження транскрипції та трансляції, розпочинається синтез тРНК та білку.

Наступним етапом виділення білку є його очищення від структурних елементів клітин штаму-продуценту та сторонніх білків. До розчинених в розчині фосфатного буферу трансформованих клітин, що містять експресований білок, додаємо інгібітор серинових протеїназ PMSF та лізоцим, що руйнує клітинну стінку бактерій. Витримуємо та додаємо Triton-100 або дезоксихолат Na, що руйнує плазматичну мембрану, та ДНК-азу. Після наведених вище маніпуляцій, використовуємо остаточне руйнування клітин ультразвуком. Всі вище згадані операції проводяться за низької температури з метою запобігання активації протеаз та попередження білкової деградації. Після центрифугування розчину з деградованими клітинами супернатант додаємо до глутатіон-сефарози та інкубуємо за низької температури впродовж 1 години для забезпечення зв'язування цільового протеїну з афінним сорбентом. Останнім етапом розділення химерних рекомбінантних білків є аналіз компонентів суміші білків за молекулярною масою за допомогою електрофорезу.

Для отримання химерного рекомбінантного білка використовуємо глибинний метод культивування в умовно-асептичних умовах. Аби забезпечити біотехнологічне виробництво відповідною кількості рекомбінантного білка обираємо ферментер об'ємом 0,05м³. Основним конструктивним елементом даного ферментеру є механічний перемішувач пристрій – лопатева мішалка з частотою обертання 120 об/хв. Лопатева мішалка забезпечує достатню для факультативного анаеробу *E.coli* інтенсивність транспорту кисню, високий рівень диспергації газової фази нерозчинних субстратів та гомогенність взаємодіючих фаз.

Площа поверхні теплообміну забезпечує ефективне підведення тепла для обігріву культуральної рідини. Для підтримання в культуральній рідині оптимальної температури біосинтезу білка ферментер оснащено сорочкою, яку подається теплоносії. Асептичні умови в ферментері досягаються

шляхом додавання в поживне середовище антибіотику канаміцину або ампіциліну, що інгібує ріст сторонньої мікрофлори та накопичення їх метаболітів.

Для даного ферментера розраховано конструктивні розміри та наведено тепловий баланс процесу біосинтезу за оптимальних температурних режимів.

По дипломному проекту можна зробити наступні висновки:

1. В дипломному проекті розглянута технологія виробництва імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до *Toxoplasma gondii*.
2. Охарактеризовано *Escherichia coli* в якості основного продуцента химерних рекомбінантних білків *Toxoplasma gondii* та наведено схему отримання промислового штаму шляхом гібридизації та плазмідної трансформації.
3. Розроблено технологічну схему виробництва імуноферментної тест-системи DIA[®]-Тохо-IgG та апаратурну схему отримання і афінної хроматографічної очистки химерного рекомбінантного білка *T. gondii*.
4. Наведено характеристику імуноферментної тест-системи DIA[®]-Тохо-IgG, охарактеризовано сировину, матеріали та напівпродукти, що використовуються при виробництві тест-системи.
5. Складено матеріальний баланс на серію готової продукції для стадії біосинтезу рекомбінантного білка.
6. Обґрунтовано вибір ферментеру об'ємом 0.05м³ з лопатевою мішалкою, проведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.