

Opis przedmiotu usługi:

usługa opracowania systemu produkcji i oczyszczania białka Stx2eB w systemie ekspresyjnym E. coli

1. Wymagania ogólne:

- a. Zawarcie warunkowej umowy wykonania usługi (realizacja umowy po otrzymaniu przez przedsiębiorstwo finansowania projektu).
- b. Wykonanie usługi w okresie 01.01.2026 - 30.09.2026r.
- c. Wykonanie usługi własnymi środkami i zasobami ludzkimi. Brak możliwości podwykonawstwa.
- d. Wyznaczenie kierownika badań posiadającego doświadczenie i dorobek naukowy w zakresie biologii molekularnej i sekwencjonowaniu mikrobiologicznego nowej generacji, obejmującego przygotowanie i analizę danych, w celu zapewnienia wysokiej jakości procesów badawczych.
- e. Udokumentowane doświadczenie w pracy z systemami produkcji i oczyszczania białek.
- f. Zakup wszystkich niezbędnych materiałów i odczynników do przeprowadzenia usługi po stronie Usługodawcy.
- g. Przedmiot umowy musi być zrealizowany w standardowych warunkach laboratoryjnych bez konieczności prowadzenia ekspresji w warunkach chłodniczych czy w szczepach wymagających specjalistycznych mediów lub suplementów. Ponadto sekwencjonowanie musi zostać wykonane w laboratorium certyfikowanym przez producenta technologii, zgodnie z jego standardami jakości.

2. Przedmiot usługi:

Etap I w terminie do 31.05.2026 – Opracowanie systemu ekspresji:

- I.1. Zaprojektowanie oraz pozyskanie plazmidu ekspresyjnego zawierającego gen Stx2e podjednostka beta (Stx2eB), zoptymalizowanego pod kątem kodonów dla E. coli.
Uwaga: Zamawiający dopuszcza wprowadzenie metki tagującej do białka Stx2eB wyłącznie pod warunkiem, że jej obecność nie wpływa na strukturę konformacyjną ani funkcjonalność białka istotną dla jego dalszego zastosowania. Decyzja o zastosowaniu lub braku zastosowania metki będzie podejmowana przez Zamawiającego na podstawie analizy zaproponowanego rozwiązania przez Wykonawcę.
- I.2. Przeprowadzenie klonowania molekularnego lub pozyskanie syntetycznego genu i jego umieszczenie w wektorze ekspresyjnym (preferowana oporność na ampicylinę, indukcja IPTG). Sprawdzenie poprawności sekwencji wklonowanej lub całego plazmidu sekwencjonowaniem.
- I.3. Transformacja wybranego szczepu E. coli (testowanie min. 4 szczepów – preferowane: BL21 i inne bez wymogu niestandardowych warunków hodowli; ale niestandardowe tylko w uzasadnionych przypadkach).
- I.4. Sekwencjonowanie szczepu bakteryjnego wyselekcjonowanego do produkcji białka Stx2eB z wykorzystaniem technologii umożliwiającej uzyskanie długich odczytów sekwencyjnych, o jakości nie gorszej niż oferowana przez technikę Oxford Nanopore wraz z pełną analizą bioinformatyczną obejmującą składanie genomu, korekcję błędów oraz ocenę jakości otrzymanej sekwencji.

I.5. Opracowanie warunków ekspresji obejmujących:

- dobór pożywek (min. 3),
- optymalizację temperatury (RT–37°C),
- moment indukcji (OD), stężenie IPTG (0–500 µM),
- czas ekspresji (1,5–24 h),
- metodę lizy bakterii (enzymatyczna/sonikacja).

I.5. Dostarczenie dokumentacji z optymalizacji oraz osiągnięcie minimalnej wydajności ekspresji białka w formie rozpuszczalnej: 5 mg/litr hodowli bakteryjnej.

Rozliczenie etapu I następuje po potwierdzeniu osiągnięcia zakładanej wydajności ekspresji białka Stx2eB w formie rozpuszczalnej.

Wykonawca przekaże Zamawiającemu:

- kompletny wektor ekspresyjny z sekwencją plazmidu,
- szczep ekspresyjny E. coli z wprowadzonym plazmidem wraz z kompletną sekwencją genomu bakteryjnego oraz adnotacją funkcjonalną obejmującą m.in identyfikację genów oporności i elementów mobilnych.
- protokoły dotyczące prowadzenia hodowli,
- dokumentację zawierającą wyniki analizy wydajności ekspresji białka Stx2eB, obejmującą m.in. dane z analizy ilościowej (np. SDS-PAGE, Western blot, HPLC) wraz z opisem zastosowanych metod pomiaru i interpretacją wyników
- pełnię praw intelektualnych do opracowanych rozwiązań.

Etap II w terminie do 30.09.2026 – Oczyszczanie białka, diafiltracja, formulacja

II. 1. Opracowanie metody oczyszczania białka Stx2eB z wykorzystaniem chromatografii (dobór kolumn, buforów, warunków przepływu). Preferowana praca na systemach Akta.

II.2. Przeprowadzenie procesu oczyszczania białka bez stosowania etapów proteolitycznego odcinania domen/białek fuzyjnych.

II.3. Oczyszczenie białka z endotoksyn (LPS), np. z użyciem kolumn z polimiksyną B.

II.4. Diafiltracja i sformułowanie końcowego buforu umożliwiającego dalsze wykorzystanie białka do immunizacji kur.

II.5. Dostarczenie min. 100 mg oczyszczonego białka Stx2eB o czystości $\geq 95\%$, wraz z dokumentacją procesową i wynikami oceny czystości.

Rozliczenie etapu II następuje po osiągnięciu czystości docelowej ($\geq 95\%$) i dostarczeniu wymaganej ilości białka.

Wykonawca przekaże Zamawiającemu:

- kompletny wektor ekspresyjny z sekwencją plazmidu,
- szczep ekspresyjny E. coli z wprowadzonym plazmidem,
- protokoły dotyczące prowadzenia hodowli i oczyszczania białka,
- dokumentację zawierającą wyniki analizy czystości (np. SDS-PAGE, HPLC) i wydajności procesu oczyszczania białka, obejmującą opis zastosowanych metod, dane ilościowe oraz interpretację wyników,
- pełnię praw intelektualnych do opracowanych rozwiązań.