

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ VE İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

PROJE ADI: AĞIR METALLER VE BAKTERİ

TAKIM ADI: CALLISTO TAKIMI

TAKIM ID: 422341

TAKIM SEVİYESİ: FİKİR KATEGORİSİ-LİSE SEVİYESİ

TAKIM ÜYELERİ: AZRA GÖKDEMİR, DAMLA ÇAĞIĞAN

DANIŞMAN: ATİYE ÖZLEM ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....	3
2. Problem/Sorun.....	3
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem.....	5
5. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	8
6. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	9
7. Uygulanabilirlik.....	10
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar).....	10
9. Riskler.....	10
10. Proje Ekibi.....	11
11. Kaynakçalar.....	11

Proje Özeti:

Günümüzde, fabrika faaliyetleri gibi eylemlerin sonucunda doğada ağır metaller birikmektedir. Cd^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+1} gibi metaller uzun vadede insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Projemiz kapsamında, fabrikaların atık sularında birikmiş olan, çevreyi ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen ağır metallerin giderimini sağlamaya yönelik olarak, birçok memelide bulunan metal tutucu *MT1A* geninin klonlama yolu ile siyanobakterilere aktarması ve bu sayede Zn^{+2} başta olmak üzere Cd^{+2} ve Cu^{+1} metallerinin giderimi amaçlanmıştır.

MT1A geni tarafından kodlanan Metallothionein (*MT1A*) proteini metal bağlayıcı özelliğinden dolayı Cu^{+1} , Zn^{+2} ve az miktarda Cd^{+2} ağır metallerini detoksifiye edebilmektedir. Projemizde, böbrek hücresinde ifade edildiği bilinen bu gene ait mRNA dizisinin RNA izolasyonu ile elde edilmesi ve klasik klonlama metodu ile hedef proteinin ifadesine olanak sağlayan bir bakteri ekspresyon vektörüne (*pet30a*) aktarılması planlanmıştır. Bu sayede, *MT1A* proteinini kodlayan bu vektörün aktarıldığı hücrede *MT1A* proteininin ifade edilmesi mümkün olacaktır. *MT1A* proteinini içeren bu genin metal giderimini sağlamak için bakteriye aktarımı sağlanacaktır. Ağır metal giderimi için siyanobakterilerin kullanılması planlanmıştır.

Problem (Sorun):

Cd^{+2} , Ar , Pb^{+2} , Hg , Zn^{+2} gibi çevrede en fazla toksisiteye neden olan ağır metallerin kullanım alanı oldukça geniştir. Örneğin, Cd^{+2} metali otomotiv ve metal endüstrisinde, kadmiyum kaplamalarında (elektrik, elektronik, uzay sanayii), boya endüstrisinde, plastik-sentetik elyaf sanayii ve televizyon tüplerinde, Zn^{+2} metali ise otomotiv, azotlu gübre, cam, çimento, petrol gibi yerlerde kullanılmaktadır. Aynı zamanda termik enerji ve çelik endüstrisinde de yaygındır. Bu gibi alanlarda ağır metallerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Ağır metallerin topraktaki fazla konsantrasyonu toprakta ağır metal kirliliği oluşturur. Fabrika atıklarının denizlere ve göllere atılması ile ağır metaller su ekosisteminde yaşayan canlılarda birikerek insan vücuduna ulaşmaktadır. Ağır metallerin insan vücuduna girmesiyle birtakım rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir. Bunların yüksek dozları insanın yaş, beslenme, genetik bağışıklık gibi etkenlere bağlı bir şekilde farklı hastalıklarla ve hatta kanserle sonuçlanabilmektedir. Kadmiyum alımı ishal gibi akut gastrointestinal etkilere neden olurken çinko fazlalığı düşük iyi kolesterol seviyesi ve bakır eksikliğine neden olur. Bakır metalininin fazlalığı nefes almada güçlük, düzensiz kalp atışı ve düşük kan basıncına sebep olabilmektedir. (Güner, 2014)

Çözüm:

Proje, ağır metallerin ekosistem dengesine ve insan sağlığına olan zararları problemine Zn^{+2} , Cu^{+1} ve Cd^{+2} gibi metallerin sudan arındırılması ile çözüm üretmektedir. Bu probleme yönelik bazı çözümler bulunmaktadır. Toprağın yıkanması, köpüklü yüzdürme, fiziksel ekstraksiyon gibi fiziksel çözümler yetersiz kalabilmektedir. (Arlı, 2006) İlgili ağır metale yönelik özgün çalışmalar yapılması daha fazla yarar sağlayacaktır. Dolayısıyla, bu projede özellikle Zn, Cu, Cd gibi ağır metallerin ortamdan arıtılması sağlanarak çevreye verilen zararın önüne geçilmeye çalışılmaktadır.

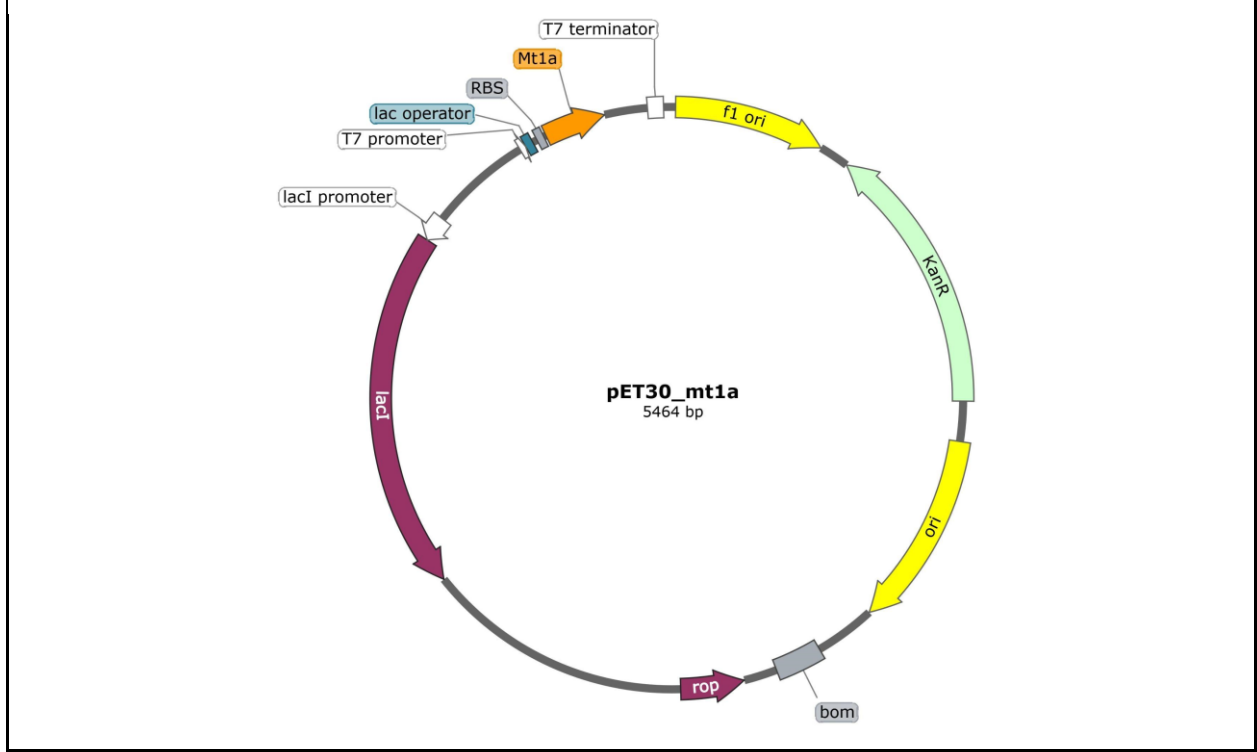
Proje ile aynı zamanda ülkemizde ağır metal kirliliğinin arttığı bölgelerden biri olan Ergene Nehri'nin kirlenmesine çözüm getirilebilir. *Bölgede yaşayan bireylerde ağır metal kirliliğinden kaynaklanan böbrek, mesane, prostat kanseri gibi hastalıklar artış göstermektedir.* Aynı zamanda son yıllarda hızlı endüstrileşme ve yerleşmenin etkisinde kalan İzmit (Kocaeli) tarafında ağır metal kirliliğinin Türkiye Toprak Kirliliği Kontrol Yönetmeliği limit değerlerinin üstüne çıktığını göstermektedir. Bu kirliliğin başlıca kaynakları egzoz ve sanayi emisyonları ile katı atık yakma tesisleridir. (Özkul, 2008) Sanayileşmenin ön planda tutulduğu bu bölgelerde proje uygulanabilir ve çözüm noktasında katkı sağlar. Bu amaçla, ağır metal giderimi konusunda literatürde ön plana çıkan *MT1A* proteininin siyanobakterilerde ifade edilmesi ve bu sayede çevredeki ağır metal giderimine katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

Metallotioninler küçük molekül ağırlıklı (6-7 kDa), sistein amino asiti açısından zengin, metal iyonlarının gideriminde ve hücresel homeostazide görevli proteinlerdir.

Projemizde, *MT1A* protein ifadesi için *MT1A* geni bakteri hücrelerinde protein ifadesine olanak sağlayan pet30a vektörüne ligasyon temelli olarak klonlanacaktır. *MT1A* proteinini kodlayan mRNA dizisi, *MT1A* proteininin amino asit dizisi ve tasarlanan vektöre ait harita Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: İnsan Metallotionin (*MT1A*) proteinini kodlayan mRNA dizisi (186 bç) ve *MT1A* proteininin amino asit dizisi (61 aa)

mRNA dizisi	ATGGACCCCAACTGCTCCTGCGCCACTGGTGGCTCCTGCACCTGCACTGG CTCCTGCAAATGCAAAGAGTGCAAATGCACCTCCTGC AAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCATGAGCTGTGCCAAGTGTGCCAG GGCTGCATCTGCAAAGGGGCATCAGAGAAGTGCAGCTGCTGTGCCTGA
Amino asit dizisi	MDPNCSCATGGSCCTCTGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPMSCAKCAQGCICKG ASEKCSCCA



Hedef mRNA'nın pet30a bakteriyel protein ifade vektörüne klonlanması amacıyla tasarlanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu primer dizileri ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Klonlama İçin Tasarlanan PCR Primerleri

pET30a_mt1a_F:	GTACTAACATATGGACCCCAACTGCTCC
pET30a_mt1a_R:	CGCGGATCCTCAGGCACAGCAGCTG

Yöntem:

Proje yapımı temel olarak 4 aşamada planlanmıştır. Özetle aşamalar şu şekildedir:

Birinci aşamada çevre kirliliği olan ağır metal kirliliğinin giderimini sağlayabilecek bu projenin kullanılabilirliği, ihtiyaç durumu, benzer örneklerinin olup olmadığı konularında bilgi alınarak ön araştırma yapılmıştır. Ardından, proje danışmanı olarak seçtiğimiz Biyoloji öğretmenimiz Atiye Özlem Çakır ile projenin yapılma olasılığı ve gereken ön bilgilerle ilgili fikir alışverişi yapılmıştır. İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Prof. Dr. Gizem Dinler Doğanay ile iletişime geçilerek uygulanabilirlik konusunda görüş alınmıştır. Laboratuvar desteği talep edilmiştir.

İkinci aşamada yapılan işlemler ise şu şekildedir: Birinci aşamada aldığımız olumlu dönüşler ile deney aşamasına başlanmıştır. *MT1A* geninin klonlanması amacıyla, PCR primerleri tasarlanmış ve sentez ettirilmiştir. Primer dizileri Tablo 2’de verilmiştir. *MT1A* geninin aktif olduğu bilinen (proteinatlas.org) insan böbrek hücresinden (HEK293T, ATCC, CRL-3216) total RNA izolasyonu yapılmış, elde edilen RNA’dan daha sonra ters transkripsiyon ile total cDNA sentezi yapılmış, elde edilen RNA %2’lik agaroz jelde TAE tampon çözeltisi ile yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 1).

Üçüncü aşamada, *MT1A* geninin klonlamada gerekli restriksiyon enzimi tanıma ve kesme bölgelerini de içerecek şekilde çoğaltılabilmesi için PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada buffer çözeltisine cDNA, ileri (F) ve geri (R) primerler, nükleotitler ve DNA polimeraz enzimi eklenerek PCR işlemi gerçekleştirilmiş, PCR işleminin ve elde edilen bantın boyutunun kontrol edilmesi amacıyla, 5 µl PCR örneği %2’lik agaroz jelde TAE tampon çözeltisi içerisinde yürütülmüş, elde edilen bant jel görüntüleme sistemi ile UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 2-3-4).

Tablo 3: PCR Koşulları

10x Reaksiyon Buffer	2 µl
50 µM MgCl ₂	0.75 µl
pET30a_mt1a_F primer	0.6 µl
pET30a_mt1a_R primer	0.6 µl
pfu DNA polimeraz	0.5 µl
cDNA	2 µl
dNTP	1 µl
dH ₂ O	12.55 µl

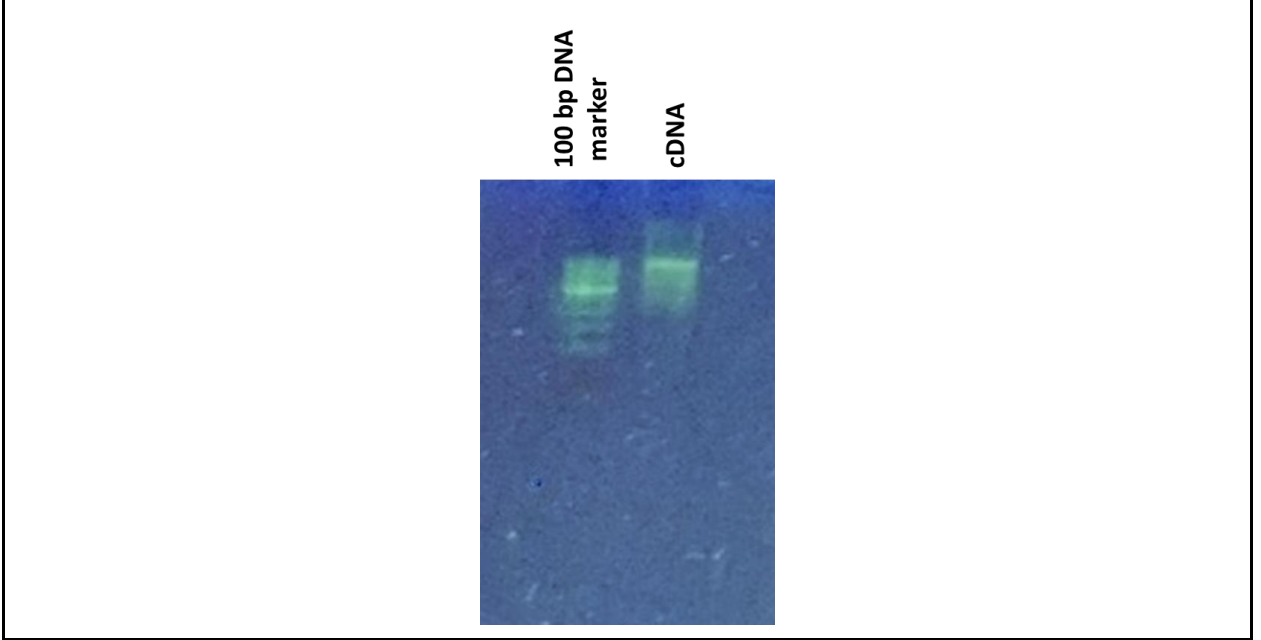
MT1A geninin klonlanması amacıyla kullanılan pet30a vektörü ve PCR reaksiyonu sonucu elde edilen *MT1A* PCR ürünü BamHI ve NdeI restriksiyon enzimleri ile 3 saat boyunca 37 C’de kesilmiştir. Reaksiyon koşulları Tablo 4’te verilmiştir. Restriksiyon enzimi kesimi sonucu yapışkan uçları oluşturulan PCR reaksiyonu sonucu elde edilen bant jelden kesilmiş ve NucleoSpin® Gel and PR Clean-up Kiti (MN) ile temizlenerek restriksiyon enzimi kesimine hazırlanmıştır.

Tablo 4: Vektör ve PCR Ürünü Restriksiyon Enzimi Kesim Koşulları

pet30a Vektör Kesimi	
Ndel restriksiyon enzimi	1 µl
BamHI restriksiyon enzimi	1 µl
pet30a Vektörü	1500 ng
10x Reaksiyon tamponu	5 µl
dH2O	50 µl'ye tamamlayacak kadar
PCR Ürünü Kesimi	
Ndel restriksiyon enzimi	1 µl
BamHI restriksiyon enzimi	1 µl
PCR ürünü	40 µl
10x Reaksiyon tamponu	5 µl
dH2O	50 µl'ye tamamlayacak kadar

Örneklerin ölçümü yapıldıktan sonra tüpe yerleştirildi. NucleoSpin® Gel and PR Clean-up kiti ile gen izolasyonu sağlandı. Ardından foto spektrum aletiyle DNA ve protein değerlerinin ölçümü yapıldı.

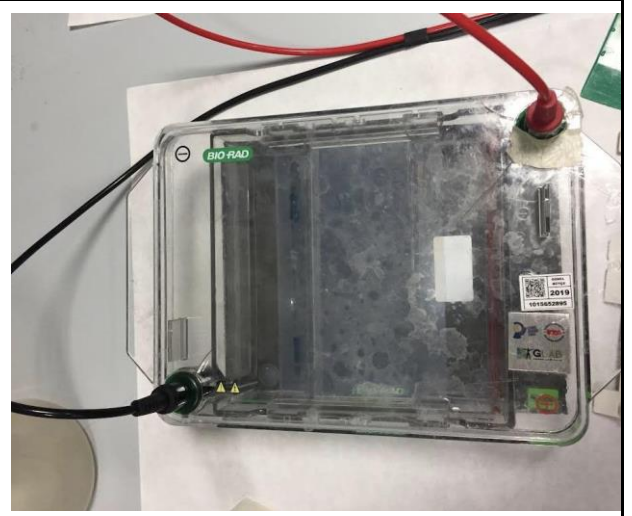
Dördüncü aşamada yapılan işlemler ise şu şekildedir; Ligasyon aşamasına geçilerek gen ligaz enzimi ile vektöre bağlandı. Sonrasında 10 µl ligasyon ürünü ile 100 µl DH5 Alpha hücresi birleştirildi. Karışım 3 dakika buzda bekledikten sonra 30 dakika boyunca ısıtılarak ısı şoku yapıldı. Ardından karışım sıcak odada 1 saat boyunca bekletildi. Transformasyon işlemi bittikten sonra elde edilen ürün agara sürüldü ve 16 saat boyunca inkübasyonda bekletildi. (Şekil 5) Oluşan bakteri kolonileri gözlemlendi. (Şekil 6)



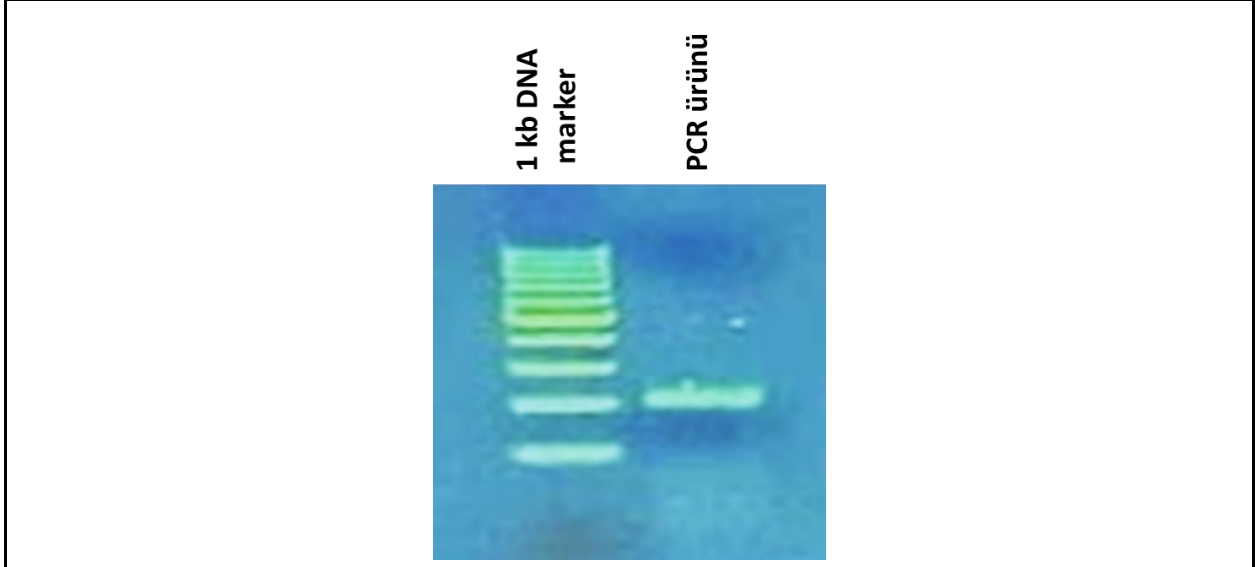
Şekil 1: cDNA sentezi sonucu elde edilen ürünün UV ışını altında incelenmesi



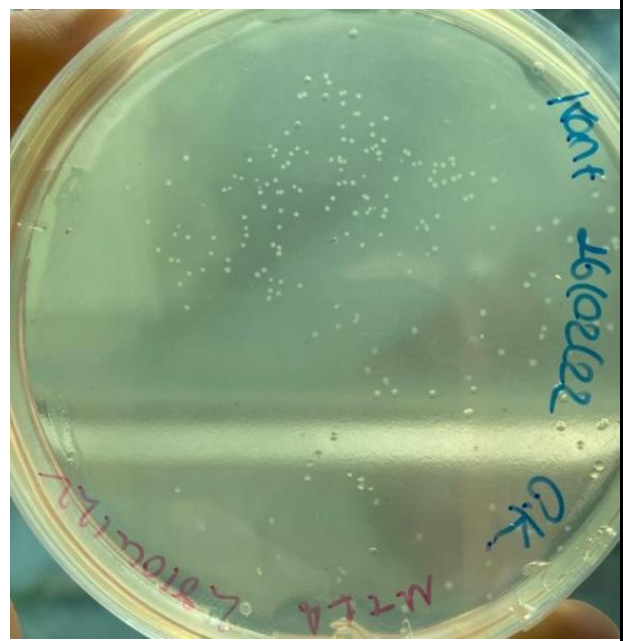
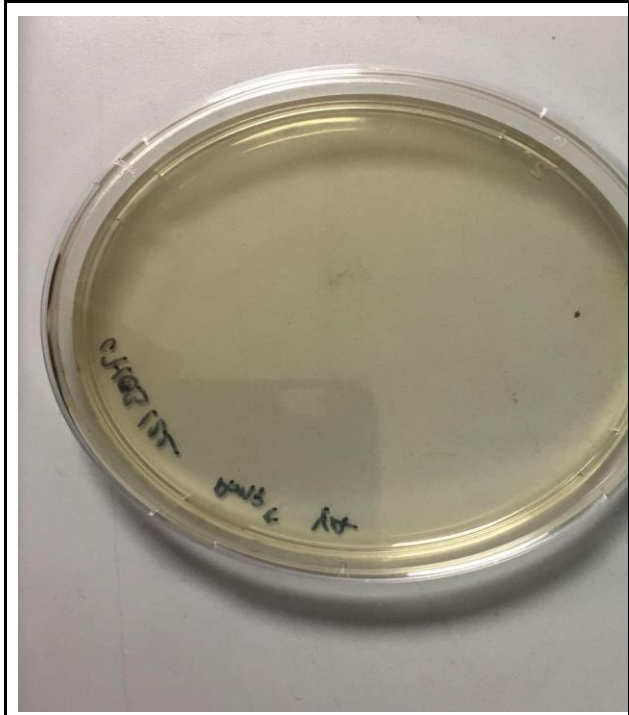
Şekil 2: TAE buffer çözeltisi ve agaroz eklenilerek oluşturulan jel



Şekil 3: DNA bandının elektroforez aracılığıyla hazırlanan jelde yürütülmesi



Şekil 4: Jele yürütülen DNA bandının UV ışını altında incelenmesi



Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması:

Projenin tahmini maliyeti 630 TL + kullanılan cihazların maliyetidir.

Projede kullanılan cihazlar hazır bulunmakta olduğundan fiyatları dahil edilmemiştir. Ekipmanın hazır olduğu durumda, bütçenin önemli kısımlarını genin izole edilme aşamaları oluşturmaktadır. Ürünün oluşturulduğu ve uygulamaya döküldüğü aşamalarda oluşan maliyetler birbirini dengelemektedir. Projenin en az maliyetle uygulanabilir hale getirilmesi amaçlandığından maliyetli yöntemler yerine laboratuvar alanında kolayca ulaşılabilecek malzemelerle çalışmak tercih edilmiştir. Aynı zamanda metal bağlayıcı bir genin üretimini yapmadan memelilerde bulunan metal bağlayıcı *MT1A* genin aktifliği tespit edilerek bu genin bakteriye aktarımı yapılmıştır. Böylece bir aşamayı atlayarak projenin daha düşük maliyetle yapılması ve geliştirilmesi planlanmıştır.

Projede Kullanılan Malzemeler:

- Tae Buffer Çözeltisi (50 TL)
- Agaroz (50 TL)
- Agar (50 TL)
- 100 µl DH5 Alpha hücresi
- Ligaz Enzimi (50 TL)
- NucleoSpin® Gel and PR Clean-Up Kiti (80 TL)
- PCR Kiti (50 TL)
- cDNA Primerleri (300 TL)
- PCR Cihazı
- Elektroforez Cihazı
- Santrifüj Cihazı
- İnkübatör Cihazı

İŞİN TANIMI	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran
Literatür Taraması	X	X						
Proje Fikri Oluşturma			X	X				
Çalışmaların Geliştirilmesi					X	X		
Test Edilmesi/Kullanılabilir Hale Getirilmesi							X	X

Not: Proje devam etmektedir. Projenin test edilme ve sonrasında kullanılabilir hale getirilme aşamaları Mayıs ve Haziran aylarında yapılmak üzere planlanmıştır.

Yenilikçi (İnovatif) Yönü:

Proje, takım üyelerinin özgün fikirlerinden ve beyin fırtınası sonucunda ortaya çıkarak orijinal bir boyut kazanmıştır. Projenin inovatif yönlerinden biri üretiminin kolay olması ve maliyetin uygun olmasıdır. Aynı zamanda, fabrikaların açık kullanımına sunularak projeye yenilikçi bir özellik kazandırılmaktadır. Bakteriye gen transferi yapılarak küresel bir probleme özgün bir şekilde çözüm önerisi getirilmektedir. Genetiği değiştirilmiş bakterilerin, fabrikalar ve yerel yönetimler tarafından “metal bağlayıcı bakteri kiti” halinde temin edilebilmesi amaçlarımız arasındadır. Projemizi benzer projelerden ayıran özellik ise; metal giderimini sağlayan bir genin üretimini yapmadan, metal bağlayıcı proteine sahip genin memeli böbrek hücrelerinden alınması ile bakteriye aktarımıdır. Böylece deney aşamaları hızlandırılmış, projenin hayata daha kolay ve az maliyetle geçirilmesi planlanmıştır.

Uygulanabilirlik:

Proje hayata geçirilebilecek durumdadır. Bu alanda uzman olan kişiler tarafından incelenip uygun bir proje olarak görülürse ağır metal kirliliğinin arttığı bölgelerde metal yoğunluğunu azaltmak amacıyla kullanılabilir. Üretilen bakteri kitleri, ticari ürün şeklinde

satışa sunularak, ticari bir ürün haline gelebilir.Faydalı bir model oluşturulması için geliştirilebilir. Fikir önerisi uygulamaya geçtikten sonra patentlenebilir.

Projenin yaygınlaşmasını sağlamak için bulunulan ilçeden başlamak üzere tanıtımlar yapmak, bölgesel veya ülke genelinde farklı yarışmalara, sergilere katılmak amaçlanmıştır.

Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Problemi yaşayanlar, genellikle metal sektöründe çalışmalar yürüten fabrikalardır. Dolayısıyla metal endüstrisi kapsamında çalışmalar ve üretimler yapan fabrikalar (uzay sanayisi, otomotiv vb.) projenin hedef kitesidir. Cd, Zn, Co metalleri derişimi fazla olan sulara yakın fabrika ve o bölgelerin belediyeleri de hedef kitesidir. Özellikle son yıllarda Türkiye'deki ağır metal kirliliğinin arttığı bölgelerde bulunan fabrikalar kullanıcı olarak düşünölmektedir.

Riskler:

Projenin olumsuz etkileyebilecek bir durum görölmemektedir. Laboratuvar alanında gerekli olan malzemelere ulaşılabilir. Doğru teknikler ve malzemeler kullanılarak projenin yapım aşaması tamamlanabilir. Moleküler bir çalışma olduğundan kullanılan malzemelerin miktarlarını ayarlamaya ve doğru tekniği kullanmaya dikkat edilmelidir. Aksi takdirde istenilen değerlere ulaşamaz. Genin aktarıldığı vektörü taşıyan bakterilerin büyümesi kanamisin antibiyotiğı ile sağlanır. Fakat vektörün geni içine almadan yeniden kapanma ihtimali olabilir. Dolayısıyla hücrenin patlatılıp bir PCR işlemi daha yapıldıktan sonra jelde yürütölmesi gerekebilir. Böylece genin aktarılıp aktarılmadığı tespit edilir.

Proje Ekibi:

TAKIM LİDERİ: AZRA GÖKDEMİR

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeye İlgili Tecrübesi
AZRA GÖKDEMİR	Fikir Oluşturma, Ürün Tasarımı	Özel Darüşşafaka Lisesi, Fen-Matematik Alanı, 11.Sınıf	Yok
DAMLA ÇAĞIĞAN	Fikir Oluşturma, Ürün Tasarımı	Özel Darüşşafaka Lisesi, Fen-Matematik Alanı, 11.Sınıf	Yok

Kaynakçalar:

1. Arlı, S. (2006). *Arıtma çamurlarındaki ağır metallerin bitkilerle giderimi* (Master's thesis, Sakarya Üniversitesi).
2. Güner, U. (2014). Toksikoloji. Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, 2, 186-189.
3. Kayaaltı, Z., Aliyev, V., & Söylemezoğlu, T. (2011). The potential effect of metallothionein 2A- 5 A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(1), 1-7.
4. Sciskalska, M.; Ołdakowska, M.; Milnerowicz, H. Importance of Genetic Polymorphisms in MT1 and MT2 Genes in Metals Homeostasis and Their Relationship with the Risk of Acute Pancreatitis Occurrence in Smokers—Preliminary Findings. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5725. <https://doi.org/10.3390/ijms22115725>
5. Si, M., Lang, J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J Hematol Oncol* 11, 107 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>
6. Talukder, M., Bi, S. S., Jin, H. T., Ge, J., Zhang, C., Lv, M. W., & Li, J. L. (2021). Cadmium induced cerebral toxicity via modulating MTF1-MTs regulatory axis. *Environmental Pollution*, 285, 117083.
7. ÖZKUL, C. (2008). İzmit (Kocaeli) civarında endüstrileşmenin toprak ağır metal derişimine etkisi. *Uygulamalı Yerbilimleri Dergisi*, 7(2), 1-9.