

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBRİNOLİTİK ENZİM OLAN NATTOKİNAZ'IN *ASPERGİLLUS ORYZAE*'DE
ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Diclehan GÜNDÜZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBRİNOLİTİK ENZİM OLAN NATTOKİNAZ'IN *ASPERGİLLUS ORYZAE*'DE
ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Diclehan GÜNDÜZ
215309003**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215309003 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Diclehan GÜNDÜZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "FİBRİNOLİTİK ENZİM OLAN NATTOKİNAZ'IN *ASPERGİLLUS ORYZAE*'DE ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Dr. Öğr. Üyesi CEM ALBAYRAK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammed Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 5 Temmuz 2023
Savunma Tarihi : 12 Haziran 2023



Sevgili aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca yanımda olan Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL'a Gen sentezi için vektör dizaynında emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Cem ALBAYRAK'a Enzimin aktivite tayini için yardımlarını bizden esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa TUNALI'ya

Enzimin aktivite tayini için laboratuvarında bize çalışma imkanı sunan Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER'e

Çalışmalarımda bana süpervizörlük yapan Ar. Gör. Elif KARAMAN'a

Yardım ve destekleri için çalışma arkadaşım Cennet DAMA'ya

Her zaman yanımda olan tüm Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü araştırmacı ve çalışanlarına

Tezimi 20220604 numaralı proje ile destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Desteklerini benden esirgemeyen arkadaşım Beyza KİNSİZ'e

Bana her türlü desteği ve sevgiyi gösteren aileme, özellikle abim Ali GÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

Temmuz 2023

Diclehan Gündüz
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Diclehan Gündüz

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
BEYAN.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	x
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE METOD.....	7
3.1 Kompetent Hücre Hazırlama.....	9
3.1.1 Kompetent hücre hazırlama materyal	9
3.1.2 Kompetent hücre hazırlama metod	9
3.2 Genin Kompetent Bakteri'ye Transformasyonu	10
3.2.1 Genin kompetent bakteri'ye transformasyonu materyal	10
3.2.2 Genin kompetent bakteri'ye transformasyonu metod	12
3.3 Bakteride Koloni Seçme	13
3.3.1 Bakteride koloni seçme materyal	13
3.3.2 Bakteride koloni seçme metod	13
3.4 Midiprep Plazmit İzolasyonu	14
3.4.1 Midiprep plazmit izolasyonu materyal.....	14
3.4.2 Midiprep plazmit izolasyonu metod.....	14
3.5 Restriksiyon Enzimleri Plazmit Kesimi (Digestion).....	15
3.5.1 Restriksiyon enzimleri plazmit kesimi (Digestion) materyal	15
3.5.2 Restriksiyon enzimleri plazmit kesimi (Digestion) metod	15
3.6 DNA Ekstraksiyon	16
3.6.1 DNA ekstraksiyon materyal	16
3.6.2 DNA ekstraksiyon metod.....	16
3.7 Aspergillus Transformasyonu	17
3.7.1 Aspergillus transformasyonu materyal	17
3.7.2 Aspergillus transformasyonu metod	18
3.8 Aspergillus'ta Koloni Seçme	18
3.8.1 Aspergillus'ta koloni seçme materyal.....	18
3.8.2 Aspergillus'ta koloni seçme metod.....	19
3.9 Aspergillus'ta Protein Ekspresyonu	19
3.9.1 Aspergillus'ta protein ekspresyonu materyal.....	19
3.9.2 Aspergillus'ta protein ekspresyonu metod.....	21
3.10 Protein Saflaştırma	24

3.10.1 Protein saflaştırma materyal.....	24
3.10.2 Protein saflaştırma metod.....	25
3.11 SDS-PAGE ile Protein Tayini.....	27
3.11.1 SDS-PAGE ile protein tayini materyal	27
3.11.2 SDS-PAGE ile protein tayini metod	29
3.12 Western Blot ile Protein Tayini.....	30
3.12.1 Western Blot ile protein tayini materyal	30
3.12.2 Western Blot ile protein tayini metod	30
3.13 Ekstra Çalışmalar Materyal- Metod	31
3.14 PBS ile Tampon Değişimi (Buffer Exchange).....	32
3.14.1 PBS ile tampon değişimi materyal	32
3.14.2 PBS ile tampon değişimi metod	32
3.15 Bradford Protein Assay	32
3.15.1 Bradford Protein Assay materyal	32
3.15.2 Bradford Protein Assay metod	33
3.16 Protrombin Zamanı Testi (PT) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini.....	34
3.16.1 Protrombin zamanı testi (PT) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini materyal.....	34
3.16.2 Protrombin zamanı testi (PT) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini metod..	34
3.17 Fibrin Bakımından Zengin Titanyum Tüpler (T-PRF) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini	35
3.17.1 Fibrin bakımından zengin titanyum tüpler (T-PRF) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini materyal.....	35
3.17.2 Fibrin bakımından zengin titanyum tüpler (T-PRF) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini metod.....	35
4.BULGULAR.....	37
4.1 Kompetent Hücre Hazırlama Bulgusu	37
4.2 Genin Kompetent Bakteri'ye Transformasyonu Bulgusu.....	37
4.3 Bakteride Koloni Seçme Bulgusu	38
4.4 Midiprep Plazmit İzolasyonu Bulgusu.....	38
4.5 Restriksiyon Enzimleri Plazmit Kesimi (Digestion) Bulgusu	39
4.6 DNA Ekstraksiyon Bulgusu	39
4.7 Aspergillus Transformasyonu Bulgusu.....	39
4.8 Aspergillus'ta Koloni Seçme Bulgusu	40
4.9 Aspergillus'ta Protein Ekspresyonu Bulgusu.....	40
4.10 Protein Saflaştırma Bulgusu.....	41
4.11 SDS-PAGE ile Protein Tayini Bulgusu	44
4.12 Western Blot ile Protein Tayini Bulgusu	44
4.13 Ekstra Çalışmalar Bulgusu	45
4.14 PBS ile Tampon Değişimi (Buffer Exchange) Bulgusu	45
4.15 Bradford Protein Assay Bulgusu.....	45
4.16 Protrombin Zamanı Testi (PT) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini Bulgusu.	45
4.17 Fibrin Bakımından Zengin Titanyum Tüpler (T-PRF) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini Bulgusu.....	46
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

KISALTMALAR

NTK	: Nattokinaz
CD	: Czapek-Dox
DPY	: Dekstrin, pepton, yeast içeren sıvı besiyeri
GRAS	: Genel olarak güvenilir
PC	: Pozitif Kontrol
NC	: Negatif Kontrol
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
Amp	: Ampisilin
BSA	: Bovin Serum Albumin
NFW	: Nükleaz İçermeyen Su
dH₂O	: Distile su
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>A. oryzae</i>	: <i>Aspergillus oryzae</i>
LB	: Luria Bertani
TE	: Tris-EDTA
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IMAC	: Immobilize Metal Affinite Kromatografisi
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
<i>P. pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
UV	: Ultraviyole
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PT	: Protrombin Zamanı
T-PRF	: Titanyum ile Hazırlanmış Zengin Fibrin
TCA	: Trichloro acetic acid

SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
mg	: Miligram



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1 : Restriksiyon Enzim Kesimi için kullanılan hesaplama.	15
Tablo 2 : Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.....	45



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 : Plazmit ve gen dizaynı	11
Şekil 2 : <i>Aspergillus oryzae</i> 'de ekspresyon başlatma	21
Şekil 3 : Protein ekspresyonu Metod 1	22
Şekil 4 : Protein ekspresyonu Metod 2	22
Şekil 5 : Protein ekspresyonu Metod 3	23
Şekil 6 : Protein ekspresyonu Metod 4	23
Şekil 7 : Western Blot analizinde blotlama aşamasında cihaza yerleşim şekli.....	31
Şekil 8 : 96 kuyucuklu plakada standart ve örneklerin işaretlenmesi	33
Şekil 9 : PT Testi görüntüleri	34
Şekil 10 : T-PRF ile Aktivite Tayini görüntüleri	36
Şekil 11 : 09.01.2023 tarihli NTK Bakteri Transformasyonu LB+Amp Plaka görüntüleri	37
Şekil 12 : Koloni seçim sonrası görüntüleri	38
Şekil 13 : NTK Elektroforez jel bandının UV altındaki görüntüsü	39
Şekil 14 : Transformasyon sonrası CD plakalarda <i>A. oryzae</i> NTK Kolonileri ve Kontrol grubu	39
Şekil 15: <i>Aspergillus</i> 'ta seçilen kolonilerin inkübasyon sonrası görüntüleri	40
Şekil 16 : NTK hücreleri büyük ölçekli ekspresyon görüntüsü	40
Şekil 17 : Ekspresyon sonrası <i>Aspergillus</i> 'ların süzülmesi	41
Şekil 18 : Çapraz Akışlı Filtrasyon cihazından örneklerin geçirilmesi.....	42
Şekil 19 : NTK proteinin SDS-PAGE'de görüntüsü	44
Şekil 20 : NTK proteinin Western Blot'ta görüntüsü	44
Şekil 21 : Fibrin parçalarının, kontrol ve enzim olan mikrosantrifüj tüplerindeki görüntüleri	46

FİBRİNOLİTİK ENZİM OLAN NATTOKİNAZ'IN *ASPERGILLUS* *ORYZAE*'DE ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

ÖZET

Dünyadaki ölümlerin büyük bir kısmı trombotik hastalık kaynaklıdır. Trombotik hastalıklar, kan hastalığı olarak bilinse de günümüzdeki yaygın birçok hastalığın sebebi olabilir; bunların içinde en ciddi ve ölüme sebep veren hastalıklardan biri de kardiyovasküler hastalıklardır. Bu hastalıkların tedavisi için uzun yıllardır antikoagülan ve antiplatelet ilaçlar kullanılmaktadır, ancak bu ilaçlar trombozu çözmede yeterli etki göstermemektedirler. Fakat fibrinolitik enzimler, kan damarı içindeki fibrin pıhtısını parçalama ve pıhtı üzerinde hareket etme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle fibrinolitik enzimler, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok trombotik hastalığın tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Nattokinaz adlı bir fibrinolitik enzim, *Bacillus subtilis natto*'nun *aprN* geni tarafından kodlanır. Nattokinaz, soya fasulyesi ürünü natto'nun fermantasyonu sırasında *Bacillus subtilis* tarafından üretilir. Nattokinaz, trombolitik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve ileri çalışmalar için umut vadeden bir enzimdir. Nattokinaz, antitrombotik, antihipertansif, antikoagülan, anti-aterosklerotik ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Ayrıca nattokinaz, birçok ülkede “nutrasötik” olan doğal bir üründür. Oral uygulamaya uygun olup kanıtlanmış bir güvenlik profiline sahiptir, kullanımı ucuzdur ve diğer farmasötik ürünlere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Nattokinaz enziminin *Aspergillus oryzae*'de üretilmesi ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışma literatürde bir ilk niteliğindedir. *A. oryzae*, kolay kültüre edilebilme, optimize edilebilme, hızlı büyüme, güçlü protein salgılama yeteneklerine sahiptir. Ayrıca *A. oryzae*, yüksek verimli, güvenli ve düşük maliyetli olması nedeniyle bu çalışma için seçilmiştir. Son zamanlarda, enzim üretiminde konak hücre olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun sebebi ise *A. oryzae*'nin amilolitik ve proteolitik enzimler gibi büyük miktarlarda hidrolitik enzim üretebilme yeteneğidir. Bu yetenek sayesinde *A. oryzae*, homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

Bu çalışmada Nattokinaz geni, C-Terminaline 8xHis-tag etiketlenerek, *Aspergillus* kodon optimizasyonuna uyarlanmış ve Amilaz genine füzyon edilmiş şekilde GenScript tarafından sentezlenmiştir. Ardından kalsiyum klorür yöntemi ile kompetent bakteriye (*Escherichia coli* One Shot) transforme edilmiştir. Ampisilin dirençli LB besiyerinden koloni seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit, restriksiyon enzimleriyle doğrusal hale getirilmiş ve Agaroz Jel Elektroforezi yapılmıştır. Jelden hedef DNA tespit edilerek ve izolasyonu yapılarak *A. oryzae*'e transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Protoplast Aracılı Transformasyon). Örnekler CD Agar plakalarına ekilmiş ve 5-7 gün 30°C'de inkübe edilmiştir. Koloniler SDS-PAGE'de kontrol edilmiştir. Seçilen koloniler DPY besiyerinde kültür edilmiş ve 5-7 gün 30°C'de inkübe edilerek ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ekspresyonu tamamlanan proteinlerin saflaştırılması için IMAC metodu kullanılmıştır.

Ekspresyon kontrolü ve protein analizi için SDS-PAGE ve ardından Western Blot yapılarak protein saptanmıştır. Yapılan Western Blot sonucunda, Nattokinaz enziminin füzyon şekilde üretimi ve saflaştırılmasının başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda 106.66 mg/L NTK enzimi üretilmiştir. İki adet aktivite testi yapılmıştır. Protrombin zamanı testinde, NTK'nın pıhtılaşmayı yaklaşık 8sn yavaşlattığı, pıhtılaşma yüzdesini ciddi oranda düşürdüğü ve INR sonucunda pıhtılaşmayı ciddi oranda yavaşlattığı görülmüştür. Yapılan diğer aktivite testi ise titanyum tüplerde kandan elde edilmiş fibrin parçalarının enzim olan mikrosantrifüj tüplerine aktarılması ve parçalanmanın olup olmadığını gözlemek esasına dayanır. Gözlem sonucunda 5-7 gün içinde fibrinin tamamen parçalandığı görülmüştür. Yapılan aktivite testleri sonucunda NTK'nın biokatif bir enzim olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus oryzae*, Fibrinolitik enzim, Nattokinaz, Protein saflaştırma, Protein üretimi, Transformasyon



PRODUCTION AND PURIFICATION OF FIBRINOLYTIC ENZYME NATTOKINASE IN *ASPERGILLUS ORYZAE*

SUMMARY

A significant portion of deaths worldwide are caused by thrombotic diseases. Although thrombotic diseases are known as blood disorders, they can be the underlying cause of many common diseases today, with cardiovascular diseases being one of the most severe and life-threatening conditions among them. For the treatment of these diseases, anticoagulant and antiplatelet drugs have been used for many years, but they are not sufficiently effective in resolving thrombosis. However, fibrinolytic enzymes have the ability to break down fibrin clots within blood vessels and move on the clot. Therefore, fibrinolytic enzymes play a crucial role in the treatment of many thrombotic diseases, especially cardiovascular diseases. One such fibrinolytic enzyme is Nattokinase, which is encoded by the *aprN* gene of *Bacillus subtilis natto*. Nattokinase is produced by *Bacillus subtilis* during the fermentation of the soybean product natto. Nattokinase is a promising enzyme used in the treatment of thrombotic and cardiovascular diseases, exhibiting antithrombotic, antihypertensive, anticoagulant, anti-atherosclerotic, and neuroprotective effects. Additionally, Nattokinase is a natural product considered a "nutraceutical" in many countries. It is suitable for oral administration, has a proven safety profile, is cost-effective, and provides several advantages compared to other pharmaceutical products. Therefore, our study aims to produce and purify the Nattokinase enzyme in *Aspergillus oryzae*. This study is the first of its kind in the literature. *A. oryzae* possesses easy culturing and optimization, rapid growth, and strong protein secretion abilities. Furthermore, *A. oryzae* has been chosen for this study due to its high efficiency, safety, and low cost. Recently, it has been utilized as a host cell for enzyme production. This is attributed to *A. oryzae*'s ability to produce large quantities of hydrolytic enzymes such as amylolytic and proteolytic enzymes. This ability makes *A. oryzae* an important source for both homologous and heterologous enzyme production.

In this study, the Nattokinase gene was synthesized by GenScript, with the C-terminal region tagged with 8xHis-tag and adapted to *Aspergillus* codon optimization. It was then transformed into competent bacteria (*Escherichia coli* One Shot) using the calcium chloride method. Colony selection was performed from ampicillin-resistant LB medium, followed by plasmid isolation. The plasmid was linearized using restriction enzymes, and agarose gel electrophoresis was conducted. Target DNA was identified and isolated from the gel for transformation into *A. oryzae* (Protoplast-Mediated Transformation). Samples were inoculated onto CD Agar plates and incubated at 30°C for 5-7 days. Colonies were checked using SDS-PAGE, and selected colonies were cultured in DPY medium and incubated at 30°C for 5-7 days to allow for protein expression. Subsequently, the expressed proteins were purified using the IMAC method. Expression control and protein analysis were performed using SDS-

PAGE followed by Western Blot to detect the protein. The Western Blot results demonstrated the successful fusion production and purification of the Nattokinase enzyme. 106.66 mg/L of NTK enzyme was produced as a result of the study. Two activity tests were conducted. In the prothrombin time test, it was observed that NTK slowed down coagulation by approximately 8 seconds, significantly reduced the percentage of clot formation, and significantly slowed down coagulation according to the INR result. The other activity test involved transferring fibrin fragments obtained from blood into microcentrifuge tubes containing titanium and observing whether fragmentation occurred. The observation revealed that fibrin was completely broken down within 5-7 days. Based on the results of the activity tests, it has been proven that NTK is a biocatalytic enzyme.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Fibrinolytic enzyme, Nattokinase, Protein purification, Protein production, Transformation



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada artan sağlık sorunları ve ölümlerle birlikte ilaçlara ve yeni tedavi yöntemlerine olan ihtiyaç artmış durumdadır. Bu nedenle, insanlar yaşam kalitesini artırmak amacıyla yeni tedavi yöntemlerini araştırmaktadırlar. Kalp krizlerinin yaygınlaşması, damar tıkanıklığı ve buna bağlı hastalıkların artış göstermesi, özellikle COVID-19 ve benzeri hastalıkların ortaya çıkması, fibrinolitik enzimlere olan ihtiyacı artırmaktadır. Çünkü bu hastalıklar, doğrudan veya dolaylı olarak fibrinoliz sürecini etkiler ve kan sulandırıcı gibi ilaçların kullanılmasını zorunlu kılar.

Fibrinolitik enzimler, fibrinoliz sürecinde rol oynayan, fibrin pıhtılarını çözen ve parçalayan enzimlerdir. Fibrinoliz, vücutta pıhtılaşma sonucu oluşan fibrinlerin parçalanması sürecidir. Bu sürecin normal şekilde işlemesi, sağlığımız için son derece önemlidir. Fibrinolitik enzimler, kan damar tıkanıklığının önlenmesi, tromboembolik hastalıkların tedavisi, pıhtılaşma bozukluklarının tedavisi, yara iyileşmesi ve doku onarımı gibi süreçlerde önemli rol oynarlar. Fibrinolitik enzimler genel olarak iki kategoriye ayrılır. Birinci kategori, plazminojen aktivatörleridir ve fibrin pıhtılarına direkt olarak etki edip çözebilme yeteneğine sahiptirler. Bunlar; Plazmin, lumbrokinaz ve nattokinaz gibi fibrinolitik enzimlerdir. İkinci kategori ise fibrinoliz destekleyici enzimlerdir ve direkt olarak fibrine etki edebilme özelliğine sahip değildirler.

Nattokinaz, fibrinolitik bir enzimdir ve *Bacillus subtilis natto*'nun *aprN* geni tarafından kodlanır. Nattokinaz, soya fasulyesi ürünü olan natto'nun fermentasyonu sırasında *B. subtilis* tarafından üretilir. Asya ülkelerinde uzun yıllardır gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Nattokinaz, kan pıhtılarının çözülmesi, kan akışının iyileştirilmesi, kardiyovasküler hastalıkların tedavi edilmesi ve inflamasyonun azalması gibi sağlık alanında birçok faydaya sahiptir. Nattokinaz, antitrombotik, antihipertansif, antikoagülan, anti-aterosklerotik ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Bu çalışmada nattokinaz, üretimindeki verimliliğin artırılması ve artan pazar talebinin karşılanması amacıyla *Aspergillus oryzae* mantarında heterolog olarak üretilmiştir. *A. oryzae* mantarı, amilaz, proteazlar, sulfatazlar, nükleazlar, fosfatazlar ve transglikozidazlar gibi birçok enzimi içermektedir. FDA tarafından genellikle güvenli kabul edilen *A.*

oryzae, büyük miktarda hidrolitik enzim üretme yeteneğine sahiptir. Bilimsel ve endüstriyel açıdan da büyük öneme sahiptir. Aynı zamanda *A. oryzae* mantarının, biyoteknolojik araştırmalar için de büyük bir potansiyeli vardır. Bu mantar, genetik mühendislik teknikleri kullanılarak daha verimli bir şekilde fibrinolitik enzimlerin üretimine olanak tanır. Özellikle nattokinaz gibi önemli bir enzim, *A. oryzae* mantarı tarafından heterolog olarak üretilebilir. Bu süreç, mantarın doğal enzim üretim kapasitesini kullanarak yüksek verimli ve düşük maliyetli nattokinaz ürünleri elde etmeyi mümkün kılar. Ayrıca, *A. oryzae*'nin biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılması, yeni tedavi yöntemleri ve ilaçların geliştirilmesinde önemli bir adım olabilir.

Bu çalışmada, nattokinaz'ın *Aspergillus oryzae*'de üretilmesi ve saflaştırılması amaçlanmaktadır. Protein üretimi için hızlı, güvenli, yüksek verimli ve düşük maliyetli yöntemler aranmaktadır ve *A. oryzae*, bu gereklilikleri karşılayabilecek avantajlara sahiptir. Bu çalışma, sağlık alanında kullanılan etkili, güvenli, kaliteli ve düşük maliyetli bir nattokinaz ürününün elde edilmesini hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Dünyadaki ölümlerin büyük bir kısmı trombotik hastalıklardan kaynaklıdır. Trombotik hastalıklar, kan hastalığı olarak bilirse de günümüzdeki yaygın birçok hastalığın sebebinde yer alır. En ciddi olanlardan ve ölüme sebep veren hastalıklardan biri de kardiyovasküler hastalıklardır. Kardiyovasküler hastalıkların büyük bir kısmını, koroner kalp hastalığı, periferik arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, romatizmal kalp hastalığı, doğuştan kalp hastalığı, derin ven trombozu ve pulmoner emboli oluşturmaktadır. Bu tip hastalıklarda damar içinde kan pıhtıları oluşur ve bu yüzden akut miyokard enfarktüsü ve felç gibi vakalara çokça rastlanır. Bu hastalıkların tedavisi için uzun yıllardır antikoagülan ve antiplatelet ilaçlar kullanılmaktadır fakat bu ilaçlar trombozu çözmede yeterli etkide değillerdir [1]. Fakat fibrinolitik enzimler, kan damarı içindeki fibrin pıhtısını parçalayabilme ve pıhtı üzerinde hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Bu sebeple kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok trombotik hastalığın tedavisi için önemlidir.

Fibrinolitik enzimler pıhtı önleyici enzimler olarak adlandırılır ve etki mekanizması bakımından iki kategoriye ayrılırlar. Birinci kategori plazminojen aktivatörleridir. Bunlara doku plazminojen aktivatörü (t-PA), alteplaz, reteplaz, tenekteplaz, ürokinaz (u-PA), streptokinaz ve anistreplaz gibi enzimler örnek verilebilir. Bu enzimler, son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazminojen aktivatörlerinin görevi plazminojeni, oluşan fibrin pıhtısını parçalayarak aktif plazmine dönüştürmektir [2]. İkinci kategori, doğrudan etkili fibrinolitik enzimler olan plazmin benzeri enzimlerdir ve plazminojen aktivasyonu gerektirmez. Pıhtıya doğrudan etki ederek çözme yeteneğine sahiptir. Bunlara plazmin, lumbrokinaz ve nattokinaz örnek verilebilir.

Nattokinaz, *Bacillus subtilis natto*'nun *apr N* geni tarafından kodlanan fibrinolitik bir enzimdir. Nattokinaz soya fasulyesi ürünü natto'nun fermantasyonu sırasında *B. subtilis* tarafından üretilir [3]. Natto, Asya ülkelerinde binlerce yıldır tüketilen geleneksel bir yemektir, bu kadar yıl yaygın kullanılmasına rağmen natto'nun terapötik etkisi bilinmiyordu. 1987 yılında nattoda, güçlü fibrinolitik özelliğe sahip bir enzim keşfedilmiş ve ismine nattokinaz denilmiştir [4]. Bu çalışma Asya ülkelerinde

ve ABD’de yürütülen nattokinaz çalışmalarına öncelik etmiştir. Birkaç çalışma, yüksek düzeyde natto tüketiminin kardiyovasküler hastalık ölüm riskini azalttığını, özellikle iskemik kalp hastalıklarından kaynaklanan ölüm riskini azalttığını bildirmiştir [5]. Başka çalışmalarda ise olgun nattokinaz’ın bir alkalın proteaz olduğunu ve bu enzimin, natto'nun en aktif bileşenini içerdiğini ve kardiyovasküler sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Nattokinaz sadece güçlü fibrinolitik etkiye değil aynı zamanda güçlü antitrombotik aktiviteye de sahiptir [6-8]. Nattokinaz fibrin parçalayıcı özelliğe sahiptir bu sebeple birçok hastalığın tedavisi için son zamanlarda talep gören bir gıda takviyesine dönüşmüştür. Nattokinaz, in vivo çalışmaları mümkün olan en iyi şekilde yürütülen tek mikrobiyal fibrinolitik terapötik enzimdir [9]. Nattokinaz’ın en benzersiz özelliği ise kardiyovasküler hastalıklarla ilgili birçok önleyici ve hafifletici farmakolojik etkiye sahip olmasıdır. Nattokinaz; antitrombotik, antihipertansif, antikoagülan, anti-aterosklerotik ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Literatürde benzer farmakolojik özelliklere sahip başka bir ilaç bulunmamaktadır. Ayrıca nattokinaz, dünyanın birçok ülkesinde “nutrasötik” olarak kabul edilen doğal bir üründür; oral uygulamaya uygundur, kanıtlanmış bir güvenlik profiline sahiptir; kullanımı ucuzdur ve diğer farmasötik ürünlere göre birçok avantaj sağlar [10]. Nattokinaz, subtilisin E (%99.5) ve subtilisin J (%99.3) gibi diğer subtilisinlerle büyük oranda benzerlik gösterir fakat diğerlerine kıyasla fibrine karşı daha yüksek substrat özgüllüğü sergiler ve terapötik uygulamalar için daha uygun hale gelir [11,12]. In vitro çalışmalar, Nattokinaz'ın üstün bir trombolitik enzim olduğunu ve plazminden altı kat daha aktif olduğunu doğrulamıştır [13]. Nattokinaz, kan damarlarında uzun bir yarı ömre sahiptir bu da yan etkisinin az olmasını sağlar. Kanıtlanmış güvenlik ve seri üretim kolaylığına sahip olması ve diğer fibrinolitik proteazlar ile karşılaştırıldığında ise daha etkili fakat daha az yan etkiye sahip olması en önemli avantajlarından. Kanama, mide ülseri, hipertansiyon, Alzheimer hastalığı ve vitreoretinal bozuklukların tedavisi de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [14,15]. Bu çalışmalar nattokinaz’ın, kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için ve COVID-19’un önlenmesi ve tedavisi için kullanılabilecek yeni nesil ilaç olma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir [10]. Dünya çapında nattokinaz kan pıhtılaşmasının önlenmesi, kan sulandırıcı, kan dolaşımının iyileştirilmesi gibi nedenlerden dolayı tüketiciler tarafından tablet ve kapsül şeklinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda endüstriyel üretimde düşük maliyetli olması nattokinazın avantajlarından.

Nattokinaz *Bacillus subtilis* protein uzunluğu 381 aminoasittir; 29 aminoasit sinyal peptid, 77 aminoasit propeptid ve 275 aminoasit olgun nattokinaz içerir [16]. Olgun nattokinaz sistein içermeyen ve disülfid bağları olmayan 27 kDa'lık bir serin proteazdır [17,18]. Nattokinaz esas olarak mikrobiyal fermantasyon yoluyla elde edilirken, gelişen teknolojiler ile *B. subtilis* WB800, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Spodoptera frugiperda* ve *Pseudomonas sp.* TKU015 gibi çeşitli heterolog ekspresyon sistemleri kullanılarak da eksprese edilmiştir [19-25]. Başka bir çalışmada ise ökaryotik bir konak olarak *Pichia pastoris*'de nattokinaz ekspresyon ve saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Bu araştırma yapılan diğer çalışmalara nazaran daha yüksek verimde ve kalitede nattokinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise in vivo çalışmalarda nattokinaz'ın trombolitik aktivitesine bakılmıştır [14]. Nattokinaz; *B. subtilis* WB8000/pANk 'de optimizasyon sonrası 600 mg/l [19], *E. coli*'de 49,3 mg/L [21], *B. licheniformis*' de 232,6 mg/L [24] ve *P. pastoris*'de erlen çalkalamalı fermentasyonda 320 mg/l [14] üretimi gerçekleştirilmiştir. *L. lactis* 'de nattokinazın yaklaşık %94'ü kültüre edilmiş fakat üretilen nattokinazın verimi düşükmüş, bunun başlıca sebebi ise *L. lactis* ile *B. subtilis* organizmalarının proteaz içeriği ve optimizasyon koşullarının farklılığı olarak düşünülmektedir. [20]. Nattokinazın birçok organizmada başarılı ekspresyonu gerçekleştirilmesine rağmen aktif protein elde edilebilmesi konusunda bazı güçlükler olmuştur. Öncelikle ekspresyonu gerçekleştirmeye çalışılan konak canlı prokaryotik ise bazı post-translasyonel modifikasyon özelliklerinin olmaması sebebiyle eksprese olan protein, aktif ve fonksiyonel bir protein olamamıştır. *E. coli*'de yüksek verimlilikte nattokinaz üretimi gerçekleştirilmesine rağmen protein inklüzyon cisimciği olarak üretilmiştir ve aktif protein eldesi için ekstra birçok çalışma yapılması zorunluluğu doğurmuştur [21]. Ökaryotik canlı olan *P. pastoris*'de üretimi gerçekleşmiş ve aktif protein elde edilmiş olan bir çalışmada ise yüksek verim elde edilmesine rağmen *P. pastoris*, GRAS kategorisinde olmadığı için güvenlik riski oluşturabilmektedir [14]. Aynı zamanda yapmış olduğumuz literatür taramasında nattokinazın *Aspergillus oryzae*'de daha önce çalışılmadığını görmekteyiz. *A. oryzae*, ökaryotik canlı olması, dolayısıyla post-translasyonel modifikasyonları yapabiliyor olması bunun yanısıra GRAS olarak yani güvenli olarak kabul edilmesi avantajlarına sahip olması gerekçeleriyle bu çalışma için ekspresyon sistemi olarak seçilmiştir. Bu çalışmada yüksek verimde, güvenli ve kaliteli bir nattokinaz ürünü elde etmeyi hedeflemekteyiz. Ayrıca yapmış olduğumuz ek araştırmalarda Nattokinaz; *B. subtilis*

WB8000/pANk' de %54,17 verimle, *P. pastoris* 'de %60'tan fazla bir verim elde edilmiştir [19,14]. Aspergillus, mantarlar aleminin ve Trichocomaceae familyasının bir üyesidir. Aspergillus'lar diğer mantar türlerinin aksine filamentli-ipliksi yapılı mantarlardır. 200 farklı mantar türünden oluşmuş ve dünyanın her yerine yayılmıştır. En yaygın türleri; *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae* ve *A. niger* 'dir. Yakın zamanda bazı Aspergillus türlerinin genom dizisi çıkarılmıştır. *A. oryzae* genomu ise Japon Biyoteknoloji firması tarafından 2006 yılında dizilenmiştir; 8 kromozom, 12.074 gen ve yaklaşık 37 milyon baz çiftinden oluştuğu görülmüştür [26]. *A. oryzae*, bin yıldan daha uzun bir süredir geleneksel Çin ve Japon mutfağında çeşitli gıdaların fermantasyonu amacıyla kullanılmıştır. *A. oryzae*, sarı koji küfü olarak da bilinir. *A. oryzae*; amilaz, proteazlar, sulfatazlar, nükleazlar, fosfatazlar ve transglikozidazlar gibi birçok enzimi içerir. FDA tarafından genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilmiş aynı zamanda da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da desteklenmiştir [27]. *A. oryzae* ekspresyon sistemi, 1988 yılında rekombinant protein üretimi için kullanılmaya başlanmıştır [28]. *A. oryzae*, amilolitik ve proteolitik enzimler gibi büyük miktarda hidrolitik enzim üretme yeteneğine sahiptir bu sebeple bilimsel ve endüstriyel açıdan büyük bir öneme sahiptir. *A. oryzae* gen diziliminin tamamlanması ile gen ekspresyon mekanizmaları açısından kullanılması hızla ilerlemiştir. Aspergilluslar gelişen teknoloji ile birincil ve ikincil metabolitlerin üretilmesi amacıyla kullanılmaktadırlar ve bu sebeple ticari öneme sahiptirler [29]. Aspergilluslar ökaryotik canlılardır bu sebeple glikolizasyon ve translasyon sonrası modifikasyon özelliğine sahiptir, bunlar aktif protein üretimi için önemli özelliklerdir. Aynı zamanda *A. oryzae*, kolay kültüre ve optime edilebilme, hızlı büyüme, güçlü protein salgılama yeteneklerine sahiptir. Protein üretimi için kısa sürede, güvenli, yüksek verim ve maliyetin az olması aranan koşullardır ve *A. oryzae* sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

- Çapraz Akış Filtrasyonu, Sartonet (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya)
- Sartocon Slice 200, 10kD Ultrafiltre Membranı (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya)
- Mikro Santrifüj, Thermo MICROCL21R (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Santrifüj, Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri)
- Santrifüj filtre üniteleri, Amicon Ultra -15 10,000 MWCO (Merck, Almanya)
- Yatay Submarin Elektroforez, HE99X (GE Healthcare Bio-Sciences, Amerika Birleşik Devletleri)
- Dikey Elektroforez, miniVE (GE Healthcare Bio-Sciences, Amerika Birleşik Devletleri)
- Elektroforez Güç Sağlayıcısı, GE Healthcare EPS301 (GE Healthcare Bio-Sciences, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar Buzdolabı (+4°C), Thermo Scientific Forma FRGL4S04V (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar Buzdolabı (+4°C), Mediline (Liebherr, Almanya)
- Laboratuvar Buzdolabı (-20°C), Thermo Scientific Forma FFGL2320V (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar Buzdolabı (-80°C), Thermo Scientific Forma 8900 Serisi (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Western Blotlama cihazı, TE70 PWR Semidry Blotter (Amersham Biosciences, Birleşik Krallık)
- WesternBright™ Sirius HRP Solüsyon Western Blotlama Tespit Kiti (Advansta, Amerika Birleşik Devletleri)
- Nitrosellüloz Blotlama Membranı 0,45µm, Amersham™ Protran™ (GE Healthcare Bio-Sciences, Amerika Birleşik Devletleri)
- Western görüntüleme cihazı, Fusion Solo 5 (Vilber, Fransa)
- Vorteks Karıştırıcısı, IP42 (İsolab, Almanya)

- Mini Santrifüj- Spin (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri)
- Witeg Su banyosu, WB-11 (Witeg, Almanya)
- Mikroskop, Leica DM750 (Leica Microsystems, Almanya)
- Thermo Scientific, NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Çalkalamalı İnkübatör, Infors HT / Ecotron (Tek bölmeli) (Infors HT, İsviçre)
- Çalkalamalı İnkübatör, Infors HT / Multitron (Çok bölmeli) (Infors HT, İsviçre)
- Etüv, İnkübatör, Thermo Scientific, Heratherm IMC18 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar Çalkalayıcısı, Benchrocker™ 2D (Benchmark Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Isıtmalı Manyetik karıştırıcı / 230V, 50-60 Hz (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar Tartısı, OHAUS PA4102 (OHAUS, Amerika Birleşik Devletleri)
- Buharlı Sterilizatör, Otoklav, STR5510 S, 250 litre (Eryiğit, Türkiye)
- Biyogüvenlik Kabini, Thermo Scientific Maxisafe 2020 1.5 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Vakum Pompası, Knf / N022AN.18 (KNF, Almanya)
- Isıtıcı Blok, Thermo Scientific Drybath Std 4blck 200-240V (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- pH metre, HANNA / HI2002 (HANNA, Amerika Birleşik Devletleri)
- UV Spektrofotometre, UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Japonya)
- Tüp Döndürücü / 88881002 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

Yukarıda çalışma boyunca kullanılan cihaz ve ürünlerin listesi verilmiştir. Ayrıca kullanılan kit ve kimyasallar, materyaller içerisinde verilmiştir.

3.1 Kompetent Hücre Hazırlama

3.1.1 Kompetent hücre hazırlama materyal

Hücre: *E. coli* One Shot gliserol stok (daha önce laboratuvarımızda var olan)

Sarf malzeme: 250 mL erlenmeyer, öze, 1000 µl mikropipet ve mikropipet ucu, 50 mL falkon, 1,5 mL mikrosantrifüj tüp, spektrofotometre küveti

Cihaz: Spektrofotometre cihazı, Santrifüj, Çalkalamalı inkübatör, Biyogüvenlik kabini, Isıtıcı blok

Hazırlananlar:

- LB Broth Besiyeri:

LB Broth Powder, Miller (Bio Basic, Kanada). 100 mL için 2,5 gram LB Broth toz kimyasalı tartıldı, dH₂O ile hazırlandı. pH 7.5'a ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı. Steril koşullarda +4°C'de saklandı.

- Soğuk 0.1 M CaCl₂, Soğuk 0.1 M CaCl₂ / %15 Gliserol:

Kalsiyum Klorür Dihidrat (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri), Gliserol biyoteknoloji için (BioShop, Kanada)

Diğer: Buz

3.1.2 Kompetent hücre hazırlama metod

Bu çalışmada Kompetent *E. coli* One Shot hazırlanmıştır.

1. Daha önce laboratuvarımızda var olan *E. coli* One Shot Gliserol stoktan (-80 °C) öze ile bir parça alındı ve 5 mL LB besiyerine (50 mL falkon içinde) daldırılarak karıştırıldı.
2. 180-200 rpm, 37°C çalkalamalı inkübatörde bir gece büyütüldü.
3. Ertesi sabah, içinden 1 mL örnek alındı ve 100 mL LB besiyerine (250 mL erlenmeyer içinde) aşılandı.
4. 180-200 rpm, 37°C çalkalamalı inkübatörde 1,5-3 saat çalkalandı. 1 saat sonrasında biyogüvenlik kabininde örnek alındı ve Spektrofotometre cihazında OD₆₀₀'de absorbans ölçüldü. İdeal absorbans 0,4 – 0,5 olarak kabul edildiği için bu sonuç alınana kadar örnek aynı koşullarda çalkalanmaya devam edildi, 20 dk da bir absorbans ölçüldü.
5. Hücreler buza koyuldu, 10 dk bekletildi. Sonrasında örnek 50 mL'lik falkonlara bölündü.
6. 6.000 rpm, 3 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı.

7. Süpernatant atıldı, hücreye 10 mL soğuk 0.1 M CaCl (+4°C) eklendi ve pelet yavaşça çözüldü.
8. Hücre 20 dk buzda bekletildi.
9. 6.000 rpm, 3 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı.
10. Süpernatant atıldı, pelet 5 mL soğuk 0.1 M CaCl / %15 Gliserol ile çözüldü.
11. Elde edilen kompetent hücre 100-300 µl olacak şekilde 1,5 mL mikrosantrifüj tüplere bölündü, -80 °C'de saklandı.

Aynı yöntem ile Kompetent *E. coli* TOP10 da hazırlanmıştır.

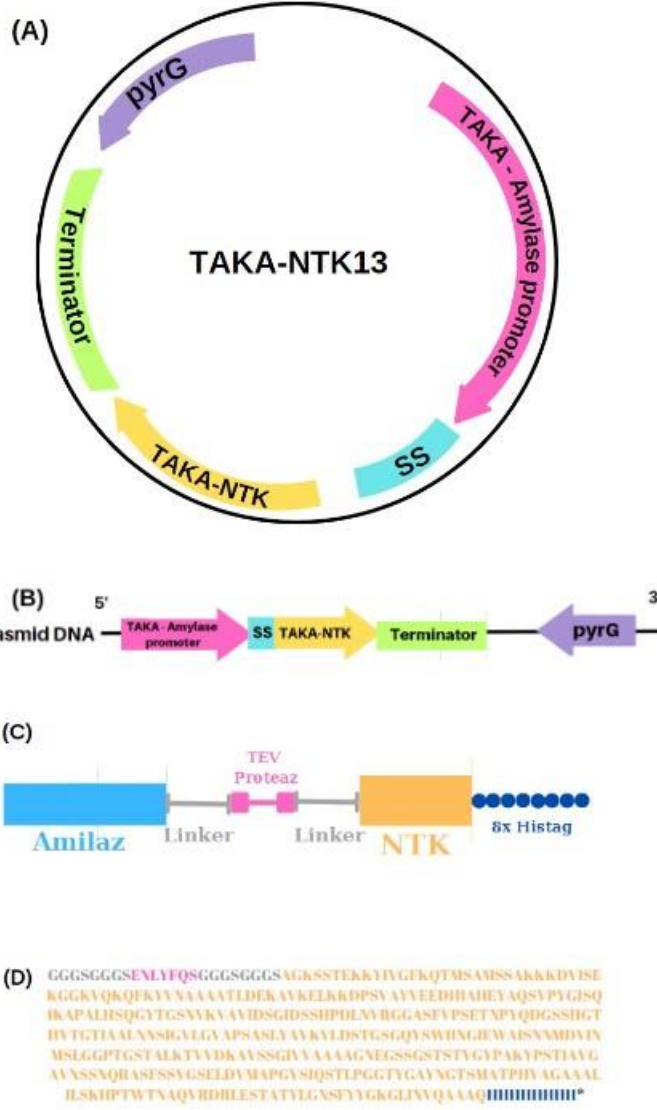
3.2 Genin Kompetent Bakteri'ye Transformasyonu

3.2.1 Genin kompetent bakteri'ye transformasyonu materyal

Hücre: Kompetent *E. coli* One Shot

Nattokinaz geni (TAKA Amilaz ile füzyon halde sentezlenen gen, GenScript, Amerika Birleşik Devletleri)

Şekil 1'de gösterildiği üzere NTK geni, linker yani bağlayıcı diziler ile TAKA Amilaz genine bağlanmıştır. Tasarlanan yeni gen dizisi, PUC19 vektör omurgasına bağlanmıştır. Plazmit içerisine aktarılan gen, GenScript firması tarafından *Aspergillus oryzae* kodon optimize şekilde sentezlenmiştir.



Şekil 1 : Plazmit ve gen dizaynı A) Nattokinaz için tasarlanan plazmidin sirküler şekli B) Plazmidin doğrusal şekli C) TAKA-NTK bölgesi D) Tasarlanan NTK'nın protein dizisi.

Sarf malzeme: Mikropipet ve mikropipet ucu, 1,5 mL mikrosantrifüj tüp, yayıcı, parafilm, rek

Cihaz: Mini santrifüj- Spin, Biyogüvenlik kabini, Çalkalamalı inkübatör, Isıtıcı blok

Hazırlananlar:

- LB Broth Besiyeri
- LB+Amp plaka

100 mL için 2,5 gram LB Broth Powder, 1,5 gram Agar (Bacteriological Grade (BioShop, Kanada) tartıldı, dH₂O ile hazırlandı. pH 7.5'a ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı. Otoklav sonrası 100 µl Ampisilin (100 mg/ mL hazırlandı, Ampisilin

sodyum tuz, biyokimya için, BioFroxx, Almanya) eklendi. Petri kabına döküldü ve donması beklendi. Steril koşullarda +4°C’de, parafilmlenerek saklandı.

Diğer: NFW (Nükleaz içermeyen su, moleküler biyoloji için su, BioFroxx, Almanya),
Buz

3.2.2 Genin kompetent bakteri’ye transformasyonu metod

Bu çalışmada GenScript’ten gelen Nattokinaz geninin, Kompetent *E. coli* One Shot organizmasına transformasyonu yapılmıştır.

1. Nattokinaz geni, GenScript firmasından *Aspergillus oryzae* kodon optimize şekilde sentezletirildi, liyofilize halde gelen gen 4 ng idi.
2. Gene kısa spin atıldı.
3. Kabinde 40 µl NFW alındı ve 4 ng genin içine koyuldu, yavaşça pipetaj yapıldı. (Deney sonrası kalan gen -20°C’de saklandı).
4. 2 adet 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde 100 µl alikotlanan kompetent *E. coli* One Shot ve gen buza koyuldu ve erimesi beklendi.
5. Eridikten sonra 1 µl gen alınıp birinci 100 µl kompetent *E. coli* One Shot’a koyuldu ve yavaşça pipetaj yapıldı.
6. İkinci 100 µl kompetent *E. coli* One Shot, kontrol olarak kullanılacağı için içerisine gen koyulmadı.
7. İki mikrosantrifüj tüpü de 30 dk buzda bekletildi.
8. İki mikrosantrifüj tüpü de 45 sn 42 °C ısıtıcı bloğa koyuldu.
9. İki mikrosantrifüj tüpü de 2 dk buzda bekletildi.
10. Biyogüvenlik kabininde iki mikrosantrifüj tüpüne de önceden alikotlanan 500 µl LB koyuldu ve birkaç defa pipetaj yapıldı, sonra mikrosantrifüj tüpleri parafilmlendi.
11. 200 rpm, 37°C, 1 saat çalkalamalı inkübatörde rek içinde çalkalandı.
12. 1 saat sonra hücreler inkübatörden alındı, LB+Amp plakalara yayıldı.
1 adet LB+Amp plakasına kontrol mikrosantrifüj tüpünden 60 µl koyuldu.
4 adet LB+Amp plakasına gen olan mikrosantrifüj tüpünden 20-100 µl arasında örnek koyuldu.

Aynı yöntem ile NTK geni, Kompetent *E. coli* TOP10 ve Kompetent *E. coli* Mach1 bakterilerine de transforme edilmiştir.

3.3 Bakteride Koloni Seçme

3.3.1 Bakteride koloni seçme materyal

Hücre: Bakteri transformasyonu yapılmış LB+Amp plakalarındaki hücreler

Sarf malzeme: Parafilm, öze, 50 mL falkon, 500 mL erlenmeyer, kriyotüp

Cihaz: +4°C dolap, -80°C dolap, Çalkalamalı inkübatör

Hazırlananlar:

- LB+Amp sıvı besiyeri (LB Broth sıvı besiyeri hazırlandı ve 100 mL için 100 µl Ampisilin eklendi).
- %50 Gliserol [100 mL için; 50 mL Gliserol biyoteknoloji için (BioShop, Kanada), 50 mL steril dH₂O ile karıştırıldı ve otoklavlandı].

3.3.2 Bakteride koloni seçme metod

- Ertesi sabah plakalar inkübatörden alındı, parafilmlelenerek +4°C dolaba kaldırıldı.
- Akşama doğru iki adet (boyutsal olarak büyük ve tek) koloni seçildi.
- Bir koloni özeyle alındı, 5 mL LB+Amp sıvı besiyerine (50 mL falkon içinde) daldırılarak karıştırıldı.
- Diğer koloni özeyle alındı, 100 mL LB+Amp sıvı besiyerine (500 mL erlenmeyer içinde) daldırılarak karıştırıldı.
- Falkon ve erlenmeyer 180 rpm, 30°C’de çalkalamalı inkübatörde bir gece çalkalandı.

Ertesi sabah 5 mL LB+Amp inkübatörden alındı ve bundan gliserol stok alındı.

- 1 adet kriyotüp’e 500’er µl %50 Gliserol koyuldu.
- Üzerlerine 500’er µl büyümüş olan hücreden koyuldu.
- -80 °C’ye kaldırıldı.

100 mL LB+Amp sıvı besiyerinden ise midiprep yapıldı. Bir sonraki metod’da açıklanmıştır.

3.4 Midiprep Plazmit İzolasyonu

3.4.1 Midiprep plazmit izolasyonu materyal

Bu çalışmada bakteri içindeki Plazmit izole edilmiştir.

Örnek: 100 mL LB+Amp sıvı besiyerinde gece boyu inkübe olan örnek

Sarf malzeme: 50 mL falkon, mikropipet ve mikropipet ucu, 15 mL falkon

Cihaz: Santrifüj, Su banyosu, Nanodrop

Kit: QIAGEN Plazmit İzolasyonu Kiti (QIAGEN, Almanya)

Diğer: Buz, TE tampon çözeltisi

3.4.2 Midiprep plazmit izolasyonu metod

1. Ertesi gün 100 mL LB+Amp sıvı besiyerinde gece boyu inkübe olan örnek inkübatörden alındı.
2. Örnek 50 mL'lik falkonlara bölündü, 6.000xg, 15 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı.
3. Süpernatant atıldı, hücreye 4 mL P1/Sulandırma solüsyonu (+4°C) eklendi, homojen olana kadar pelet çözüldü.
4. Hücrenin üzerine 4 mL P2/Lizis solüsyonu eklendi, 4-6 defa ters-düz sallanarak karıştırıldı. Sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. Üzerine 4 mL P3/Nötralizasyon solüsyonu eklendi, 4-6 defa ters-düz sallanarak karıştırıldı. Sonra 15 dk buzda bekletildi.
6. 18.000xg, 30 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı, süpernatant mikropipet ile alındı ve yeni falkona aktarıldı. Pelet atıldı.
7. Yeni falkon 18.000xg, 15 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı, tekrar süpernatant mikropipet ile alındı ve yeni falkona aktarıldı. Pelet atıldı.
8. Aynı zamanda Midiprep kolonu sabit bir yere yerleştirildi, kolondan 4 mL QBT solüsyonu geçirildi (Akış çöpe atıldı).
9. QBT solüsyonu geçirdiğimiz midiprep kolonuna mikropipetle örnek yüklendi (Akış çöpe atıldı).
10. Kolondan 2 defa 10 mL QC (Yıkama) solüsyonu geçirildi (Akış çöpe atıldı).
11. Kolona 5 mL QF solüsyonu (Nükleaz içermeyen su) eklendi, akış 15 mL falkona toplandı (QF solüsyonunu önceden 65 °C'de tutmak verimi artırmaktadır).
12. Falkona 3,5 mL izopropanol (oda sıcaklığında) eklendi, 18.000xg, 30 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı. Dikkatli bir şekilde süpernatant döküldü.

13. Falkona 2 mL %70 etanol (oda sıcaklığında) eklendi, 18.000xg, 10 dk, +4°C'de santrifüj yapıldı. Dikkatli bir şekilde süpernatant döküldü.
14. 5-10 dk falkonun kapağı açık şekilde kurumaya bırakıldı.
15. Kuruduktan sonra falkona 52 µl TE tampon çözeltisi eklendi, yavaşça pipetaj yapıldı.
16. 2 µl örnek alındı ve Nanodrop cihazında konsantrasyon ölçüldü (Blank: 2 µl TE tampon çözeltisi). Kalan örnek -20 °C'de saklandı.

3.5 Restriksiyon Enzimleri Plazmit Kesimi (Digestion)

3.5.1 Restriksiyon enzimleri plazmit kesimi (Digestion) materyal

Örnek: 50 µl midiprep sonrası örnek

Sarf malzeme: 1,5 mL mikrosantrifüj tüpü, mikropipet ve mikropipet ucu, 250 mL erlenmeyer

Cihaz: Isıtıcı blok, Yatay submarin elektroforez, Elektroforez güç sağlayıcısı, Görüntüleme cihazı (Fusion Solo 5)

Hazırlananlar: %1'lik elektroforez agaroz jel için; 100 mL 1x TAE + 1 gram Agaroz (Agarose LE, DNA elektroforezi için, Genaxxon Bioscience, Almanya)

Diğer: Buz, NFW, Cut Smart (New England Biolabs inc, Amerika Birleşik Devletleri), *EcoRI*-HF (New England Biolabs inc, Amerika Birleşik Devletleri), *HindIII*-HF (New England Biolabs inc, Amerika Birleşik Devletleri), Etidyum Bromür (BioShop, Kanada), Loading Buffer 6x (GeneOne, Kore), Belirteç, GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

3.5.2 Restriksiyon enzimleri plazmit kesimi (Digestion) metod

Tablo 1 : Restriksiyon Enzim Kesimi için kullanılan hesaplama.

Cut Smart	2 µl
<i>EcoRI</i>	1,2 µl
<i>HindIII</i>	1,2 µl
DNA	5,5 µl
NFW (Nükleaz içermeyen su)	10,1 µl
Total	20 µl

1. Tablo 1’de gösterilen malzemeler hazırlandı. Cut Smart, *EcoRI*, *HindIII*, DNA ve NFW buza koyuldu, erimeleri beklendi.
2. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne 10,1 µl NFW koyuldu. (Total hacim 20 µl olduğu için kalan hacim NFW ile tamamlandı.)
3. Üzerine 2 µl Cut Smart eklendi. (Total hacim 20 µl olduğu için kullanılan Cut Smart 10x’dir, bu yüzden 2 µl eklendi.)
4. Üzerine 5,5 µl DNA eklendi.
5. *EcoRI* ve *HindIII* enzimlerinden 1,2’şer µl eklendi, pipetaj yapıldı.
6. 37 °C ısıtıcı blok’da 2 saat inkübe edildi.
7. 100 mL 1x TAE + 1 gram Agaroz karıştırıldı, mikrodalgada şeffaf olana kadar ısıtılarak çözüldü. Sonrasında içine 3 µl Etidyum Bromür eklendi. Sıvı elektroforez tankına döküldü. 20 dk donması beklendi.
8. 2 saat sonra jelin bir kuyucuğuna, 25 µl örnek (3,5 µl 6x loading buffer + 30 µl örnek pipetaj yapıldı) kuyucuğa yüklendi. Başka bir kuyucuğa 3,5 µl belirteç yüklendi.
9. 400 mA, 120 volt, 2 saat agaroz jel tankında yürütüldü.
10. Sonrasında UV ışını altında bakıldı ve bantta ışığa görünen kısım kesildi, 2 mL mikrosantrifüj tüpüne alındı.

3.6 DNA Ekstraksiyon

3.6.1 DNA ekstraksiyon materyal

Bu çalışmada jelden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

Örnek: Mikrosantrifüj tüpünde olan jeldeki örnek

Sarf malzeme: Mikrosantrifüj tüpü

Cihaz: Tartı, Su banyosu, Vorteks karıştırıcısı, Mikro-Santrifüj, Nanodrop

Kit: Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

Diğer: Buz, NFW

3.6.2 DNA ekstraksiyon metod

1. Boş 2 mL’lik mikrosantrifüj tüpü tartıldı, kesilen jel içine koyuldu ve boş ağırlık çıkarıldı.

**NTK jel ağırlığı: 0,25 gram

2. Mikrosantrifüj tüpüne (100 mg için 100 µl şekilde) 250 µl Binding Buffer (Bağlama Solüsyonu) eklendi.
3. Mikrosantrifüj tüpü 50-60°C 10 dk su banyosunda eritildi (eriyene kadar devam edilmeli). 2-3 dk da bir vortekslendi.
4. Binding Buffer miktarı kadar yani 250 µl izopropanol eklendi, pipetaj yapıldı.
5. GeneJET saflaştırma kolonuna örnek mikropipet ile koyuldu (800 µl'den fazla olmamalı). 13.000 rpm, 1 dk, 20°C'de santrifüj yapıldı. Akış çöpe atıldı.
6. Kolona 700 µl Wash Buffer (Yıkama Solüsyonu) eklendi, 13.000 rpm, 1 dk, 20°C'de santrifüj yapıldı. Akış çöpe atıldı.
7. Kolona bir şey eklenmeden boş şekilde (Wash Buffer'dan arındırmak için) 13.000 rpm, 1 dk, 20°C'de santrifüj yapıldı.
8. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 22 µl Elution Buffer (Elüsyon Solüsyonu-NFW) kolonun tam merkezine eklendi. 13.000 rpm, 1 dk, 20°C'de santrifüj yapıldı.
9. İçinden 2 µl örnek alındı ve Nanodrop cihazında konsantrasyon ölçüldü (Blank: 2 µl NFW). Kalan örnek -20°C'de saklandı.

3.7 Aspergillus Transformasyonu

3.7.1 Aspergillus transformasyonu materyal

Bu çalışmada Aspergillus hücreleri protoplast hale getirilerek, NTK genini içine alabilecek hale getirilmesi aşamaları yapılmıştır. Bu aşama iki günlük bir protokolü kapsamaktadır. Daha önce laboratuvarında yapılan çalışmalarda pyrG geni bakımından delesyona uğratılmış *A. oryzae* RIB40 mikroorganizması kullanılmıştır.

Hücre: pyrG (-) *Aspergillus oryzae* CD Agar stok

Örnek: DNA ekstrakte edilen NTK

Sarf malzeme: Serolojik pipet, mikropipet ve mikropipet ucu, öze, yayıcı, spektrofotometre küveti,

Cihaz: Çalkalamalı inkübatör, İnkübatör, Spektrofotometre

Hazırlananlar: 50 mL 1xDPY+Uridin+Urasil, CD Top Agar, CD+FOA+Uridin+Urasil

5-FOA (5-Fluoroorotic acid, Zymoresearch, Amerika Birleşik Devletleri), Uridin (Biyokimya için uridin, PanReac AppliChem, Almanya), Urasil (Uracil, BioShop, Kanada)

Diğer: Buz, Mikroklot bezi

3.7.2 Aspergillus transformasyonu metod

1. Laboratuvarımızda var olan pyrG (-) *Aspergillus oryzae* CD Agar stok'dan 10 mL %1 Tween 80 (polysorbate 80, Isolab, Almanya) + dH₂O ile sporlar toplandı.
2. Spektrofotometrede OD₆₀₀'de absorbans ölçüldü, çıkan sonuca göre toplanan sporlar, 50 mL 1xDPY+Uridin+Urasil (20 mM uridin, %0.2 urasil) (250 mL erlenmeyer içinde) besiyerine ekildi. 180 rpm, 30°C, bir gece çalkalamalı inkübatörde büyütüldü.
3. Ertesi gün hücreler mikroklot bezi ile süzüldü. TF 1 çözeltisi içinde [50 mM maleik asit (NaOH ile pH 5,5), 0,6 M (NH₄)₂SO₄] ve 5 mg/mL Yatalaz (Takara Bio, Japonya) enzimi inkübasyonu ile protoplastlara dönüştürüldü. 80 rpm, 2-4 saat, 30°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
4. Ardından tekrar mikroklot bezi ile süzüldü. Toplanan protoplastlar, TF 2 çözeltisi içinde [1,2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂, 35 mM NaCl ve 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)] yeniden süspansiyonlandırıldı.
5. DNA protoplast çözeltisine eklenerek karışım, 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi ve ardından TF 3 çözeltisi [60% (w/v) PEG 4000, 50 mM CaCl₂ ve 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)] 1 mL eklendi.
6. Soğutulmuş örnek, oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi, daha sonra CD Top Agar'la karıştırıldı. Karışan örnek seçim plakalarına yayıldı. Aynı koşullarda hazırlanmış bir adet gen içermeyen kontrol hücresi CD+FOA+Uridin+Urasil (20 mM uridin, %0.2 urasil, 1.6 mg/mL 5-FOA) plakasına yayıldı. Plakalar 5-7 gün boyunca 30°C'de inkübe edildi.

3.8 Aspergillus'ta Koloni Seçme

3.8.1 Aspergillus'ta koloni seçme materyal

Örnek: 5-7 gün inkübatörde inkübe olmuş CD plakalar

Sarf malzeme: Pastör pipet

Cihaz: İnkübatör

Hazırlananlar:

CD Agar plaka:

- Sodyum Nitrat, Yüksek saflık (BioMatik, Kanada)
- Potasyum Fosfat Dibazik (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)
- Magnezyum Sülfat Heptahidrat (İsolab, Almanya)
- Potasyum Klorür (Multicell Wisent Bio Products, Kanada)
- Demir(II) Sülfat Heptahidrat %0,001 (Tekkim, Türkiye)
- Sukroz, ACS Grade (Caisson Labs, Amerika Birleşik Devletleri)
- Sodyum Klorür (İsolab, Almanya)

100 mL için; 0,2 gram Sodyum Nitrat, 0,1 gram Potasyum Fosfat Dibazik, 0,05 gram Magnezyum Sülfat Heptahidrat, 0,05 gram Potasyum Klorür, 6 µl Demir (II) Sülfat Heptahidrat, 3 gram Sukroz ve 5 gram Sodyum Klorür tartıldı, dH₂O ile hazırlandı. pH 5.5'a ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı.

3.8.2 Aspergillus'ta koloni seçme metod

1. 5-7 gün inkübe olan CD plakalar inkübatörden alındı, pastör pipet ile 300-400 µl dH₂O ile alınarak pipetin ucuyla küçük hareketlerle koloni sporları toplandı.
2. Toplanan sporlar yeni bir CD Agar plakaya aktarıldı ve yayıldı.
3. 30 °C inkübatöre koyuldu 5-7 gün inkübe edildi.

3.9 Aspergillus'ta Protein Ekspresyonu

3.9.1 Aspergillus'ta protein ekspresyonu materyal

Örnek: 5-7 gün inkübatörde beklemiş CD plakalar

Sarf malzeme: Serolojik pipet, yayıcı, 15 mL falkon, mikrosantrifüj tüp, 100 mL erlenmeyer, 250 mL erlenmeyer, mikropipet ve mikropipet ucu, 0,22 µm şırınga filtre (Syringe Filters, polyethersulfone Diameter: 25mm/pore size:0,45um ve 0,22um İsolab, Almanya)

Cihaz: Çalkalamalı inkübatör, Leica mikroskop, Otoklav, Biyogüvenlik kabini

Hazırlananlar: 1xDPY Besiyeri, 2xDPY Besiyeri, 2xDPY & BSA Besiyeri

1xDPY Besiyeri:

- Dekstrin, Mısırdan, Tip I, Toz (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)

- Polipepton, Bakteriyolojik Pepton (Multicell Wisent Bio Products, Kanada)
- Maya Ekstraktı, Düşük Sodyumlu (Yeast Extract, Multicell Wisent Bio Products, Kanada)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat, analiz için (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)
- Magnezyum Sülfat Heptahidrat, analiz için (İsolab, Almanya)

100 mL için; 2 gram Dekstrin, 1 gram Polipepton, 0,5 gram Maya ekstraktı, 0,5 gram Potasyum Dihidrojen Fosfat ve 0,05 gram Magnezyum Sülfat Heptahidrat tartıldı, dH₂O ile hazırlandı. pH 5.5'e ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı.

2xDPY Besiyeri:

- Dekstrin (Sunar, Türkiye)
- Polipepton, Bakteriyolojik Pepton (Multicell Wisent Bio Products, Kanada)
- Maya Ekstraktı, Düşük Sodyumlu (Yeast Extract, Multicell Wisent Bio Products, Kanada)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat, analiz için (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)
- Magnezyum Sülfat Heptahidrat, analiz için (İsolab, Almanya)
- AntiFoam, Köpük kesici, Sag 471 (Latro Kimya, Türkiye)

100 mL için; 4 gram Dekstrin, 1 gram Polipepton, 0,5 gram Maya ekstraktı, 0,5 gram Potasyum Dihidrojen Fosfat ve 0,05 gram Magnezyum Sülfat Heptahidrat tartıldı, içerisine 100 µl Antifoam eklendi, dH₂O ile hazırlandı. pH 5.5'e ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı.

2xDPY &BSA Besiyeri:

400 mL 2xDPY malzemeleri tartıldı, 370 mL'ye dH₂O ile tamamlandı. pH 5.5'e ayarlandı. Sonrasında otoklavlandı. %0,25 oranında BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Kanada) tartılarak 30 mL'ye dH₂O ile tamamlandı. 0,22 µm şırınga filtresinden geçirildi. Otoklavlanmış ve soğumuş 2xDPY ile karıştırıldı.

Diğer: Thoma lamı

3.9.2 Aspergillus'ta protein ekspresyonu metod



Şekil 2 : *Aspergillus oryzae*'de ekspresyon başlatma.

Şekil 2'de gösterildiği üzere Ekspresyon Başlatma aşamaları:

1. İnkübasyon sonrası inkübatörden CD plakalar alındı.
2. Biyogüvenlik kabininde, serolojik pipetle üzerine 10 mL steril dH₂O eklendi.
3. Yayıcı ile sporlar toplandı ve 15 mL falkona alındı. İçinden 20 µl örnek alındı.
4. 980 µl dH₂O ile 20 µl örnek mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
5. 10 µl'si Thoma lamına konuldu ve 10x mercekte mikroskopta sayım yapıldı.
6. Sayım sonucunda belli bir miktar hücre, 15-20 mL 1xDPY (100 mL erlenmeyer içinde) besiyerine aktarıldı.
7. 180 rpm, 30°C, bir gece çalkalamalı inkübatörde büyütüldü.

Aspergillus'ta protein ekspresyonu 4 farklı metod ile denenmiştir.

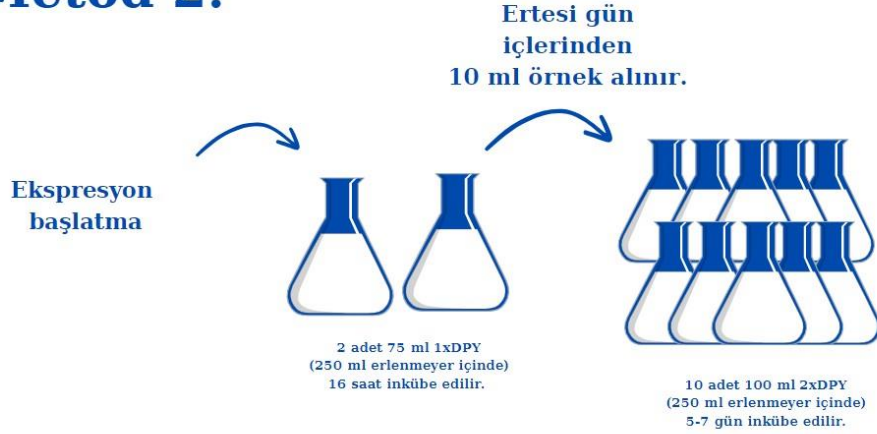
Metod 1:



Şekil 3 : Protein ekspresyonu Metod 1.

Şekil 3'te gösterilen bu metod, 18 farklı NTK kopyasında çalışılmıştır. Buradaki amaç her bir kopyadan ekspresyon sonrasında 60-70 mL süzölmüş ve filtrelenmiş örnek elde etmektir. Küçük hacimde ekspresyon olarak da adlandırılır.

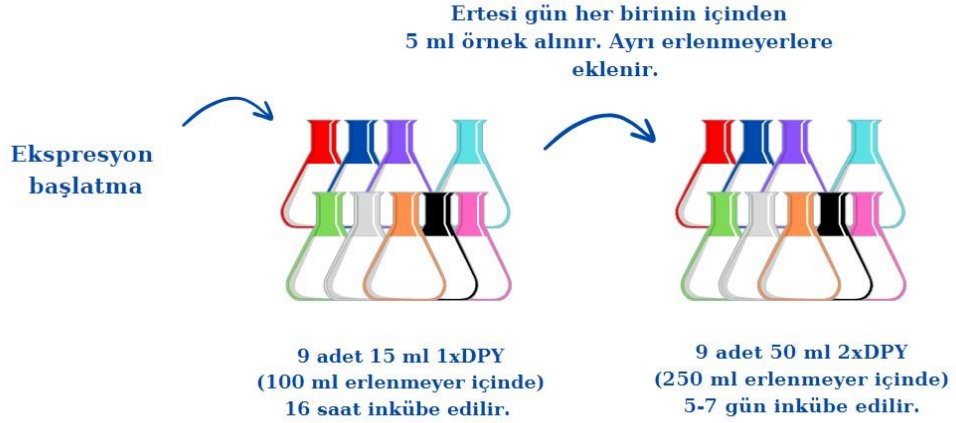
Metod 2:



Şekil 4 : Protein ekspresyonu Metod 2.

Şekil 4'te gösterilen bu metod ile tek bir koloniden başlayarak totalde 1 Litreye kadar süzölmüş ve filtrelenmiş örnek elde edilmektedir. Büyük hacimde ekspresyon olarak da adlandırılır.

Metod 3:



Şekil 5 : Protein ekspresyonu Metod 3.

Şekil 5’te gösterilen bu metod, büyük hacimde ekspresyonda iyi üretim yapmadığı düşünülen hücrenin, tek bir koloniden gelmesine rağmen ayrı koloniymiş gibi eksprese edilmesi, ekspresyon sonrası hücrelerin aynı hacimde birleştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Metod 4:



Şekil 6 : Protein ekspresyonu Metod 4.

Şekil 6'da gösterilen bu metod'da 1xDPY aşaması aynıdır fakat 2xDPY aşamasında BSA eklenir. BSA, proteaz kaynaklı verimin düşmesine karşı eklenerek protein verimini artırmak amacıyla denenmiştir. Benzer bir çalışmada bu yöntem denenmiştir [30].

3.10 Protein Saflaştırma

3.10.1 Protein saflaştırma materyal

Örnek: Ekspresyon sonrası NTK

Sarf malzeme: Whatman filtre kâğıdı, cam huni, 0.22 um vakum filtre (Filteraufsatz 250, rapid filtermax, 250 mL Pes membrane 0.22 um TPP, İsviçre) IMAC kolonu (Spin Column 10 mL, G-Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri) mikropipet ve mikropipet ucu, pastör pipet, beher, mikrosantrifüj tüp

Cihaz: Vakum pompası, Çapraz akış filtrasyonu, Bench çalkalayıcı, +4°C dolap, -20 °C dolap, Sanrifüj, Mikro-santrifüj, Tüp döndürücü

Hazırlananlar: %20 etanol, 0.5 M NaOH, IMAC Yıkama Solüsyonu, IMAC Elüsyon Solüsyonu, IMAC & Üre Yıkama Solüsyonu, IMAC&Üre Elüsyon Solüsyonu, Pull-down Yıkama Solüsyonu, Pull-down Elüsyon Solüsyonu

- Sodyum Fosfat Monobazik (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)
- Sodyum Klorür (İsolab, Almanya)
- İmidazol, biyokimya için (BioFroxx, Almanya)

IMAC Yıkama Solüsyonu için; 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl tartıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

IMAC Elüsyon Solüsyonu için; 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM NaCl, 200 mM İmidazol tartıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

IMAC & Üre Yıkama Solüsyonu için; 100 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 6 M Üre (Ultra saf, MP Biomedicals, LLC, Fransa), 10 Mm Tris ve 200 mM İmidazol tartıldı ve pH 7.9'e ayarlandı.

IMAC&Üre Elüsyon Solüsyonu için; 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 8 M Üre, 500 mM İmidazol tartıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

Pull-down Yıkama Solüsyonu için; 20 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl tartıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

Pull-down Elüsyon Solüsyonu için; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM İmidazol tartıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

Diğer: Sartocoon 10kD Ultrafiltre membran, steril su, buz, nikel rezin (HisPur™ Ni-NTA Resin, Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri), kobalt rezin (HisPur™ Cobalt Resin, Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri), Amicon Ultra -15 10.000 MWCO filtre

3.10.2 Protein saflaştırma metod

Protein Saflaştırma çok aşamalı bir deney sürecidir. Bir tanesi yeterli olabileceği gibi birden fazla saflaştırma yöntemi de kullanılabilir. Metodlar ayrı ayrı aşağıda verilmektedir. Birbirini takip eden metodlar bulgular kısmında detaylı açıklanmıştır.

Süzme ve Filtreleme:

- Ekspresyonu tamamlanmış olan örnekler, steril bir şişeye whatman filtre kağıdı ve huni yardımıyla süzüldü. Böylece partiküllerinden arındırıldı.
- Daha iyi filtrelemek amacıyla 0.22 um vakum filtresi ve vakum pompası ile örnek, yeni bir steril şişeye filtrelendi.

Cross: Çapraz akış filtrasyonu

- Cihaz açılarak hızı 2.0 bar'a ayarlandı.
- Cihaza 10kD membran takıldı.
- Yıkama amacıyla cihazdan 30-40 litre distile su geçirildi.
- Filtrelenen örnek geçirildi, istenilen total hacme kadar konsantre edildi.
- Membranın örnekten temizlenmesi için tekrar 20 litre su ile yıkama yapıldı.
- Sonra 200 mL 0.5 M NaOH solüsyonu geçirildi.
- Daha sonra 30 litre ılık distile su geçirildi.
- Son olarak 200 mL %20 etanol ile yıkandı.
- Membran cihazdan çıkarıldı ve içerisinde %20 etanol bulunan pakete alınarak +4°C'ye kaldırıldı.

IMAC: Immobilize Metal Affinite Kromotografisi

- Kolon bir yere sabitlendi. Kolonu yıkamak amacıyla 200 mL steril su geçirildi.
- Sonra hazırlanan yıkama solüsyonundan bir kolon miktarı kadar geçirildi.

- Kolonun tıpası kapatıldı. Daha sonra rezin miktarı kadar yıkama solüsyonu eklendi.
- Mikropipet ile pipetaj yapılarak rezin toplandı ve örnek bulunan behere eklendi. Beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı.
- Örnek, +4°C’de 2-3 saat bench çalkalayıcısında çalkalanarak inkübe edildi.
- Çalkalama sonrasında örnek, IMAC kolonundan geçirildi. Resin tam olarak toplanana kadar örnek tekrar tekrar kolondan geçirildi. Geçirilen örnek akıştan steril falkona buz üzerinde toplandı.
- Rezinin toplanmış olduğu kolon, 2 kere 15’er mL yıkama solüsyonu ile yıkandı. Akış steril falkonda toplandı.
- Kolonun tıpası kapatıldı. 4 mL elüsyon solüsyonu eklendi. 10 dk bekletildi. Sonra tıpa açıldı, şırınga iğnesi takılarak akış steril falkona toplandı.
- Tekrar kolonun tıpası kapatıldı. 4 mL elüsyon solüsyonu eklendi. 10 dk bekletildi. Sonra tıpa açıldı, şırınga iğnesi takılarak akış steril falkona toplandı (Toplanan örnek sonrasında Amicon filtrede kullanılmıştır).
- Toplanan falkonlardaki örnekler -20 °C’ye kaldırıldı.
- IMAC kolonundan 200 mL steril su geçirildi. Ardından 5 mL %20 etanol geçirildi. Tıpa kapatılarak 5 mL daha %20 etanol eklendi ve +4°C’de saklandı.

Amicon-Santrifüj Filtresi: Örneği konsantre etme amacıyla yapılmıştır.

- Amicon kolonuna-filtresine distile su eklendi, 3.500xg, 5 dk, +4°C’de santrifüjlenerek yıkaması yapıldı.
- Santrifüj sonrası içindeki su döküldü ve yeni distile su eklendi. 3.500xg, 5 dk, +4°C’de santrifüjlenerek ikinci yıkaması yapıldı. İçindeki su döküldü ve yıkama tamamlandı.
- Saflaştırma sonrası elde edilen örnek, amicon kolonuna-filtresine eklendi. 3.500xg, 10 dk, +4°C’de santrifüjlendi. Bu işlem ile istenilen hacime konsantre edilene kadar devam edildi.
- Elde edilen konsantre örnek -20 °C’ye kaldırıldı.
- Başta yapılan amicon yıkama işlemi tekrarlandı. Kolon alt ve üst hacmi tamamen distile su ile doldurularak +4°C’ye kaldırıldı.

Pull-Down saflaştırma:

- 100 µl kobalt rezin, 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- 1000xg, 1 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı (Etanolun uzaklaşması için) mikropipet ile çekilip atıldı.
- Üzerine 400 µl dH₂O eklendi, hafifçe pipetaj yapıldı. 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip atıldı.
- Üzerine 400 µl Yıkama Solüsyonu eklendi, hafifçe pipetaj yapıldı. 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip atıldı.
- 200-1000 µl NTK eklendi.
- 1 saat, +4°C'de tüp döndürücüde hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
- Sonra 10 dk buzda inkübe edildi.
- 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip atıldı.
- 400 µl Yıkama Solüsyonu eklendi. 4-5 defa ters-düz yapılarak karıştırıldı. 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip atıldı.
- Tekrar 400 µl Yıkama Solüsyonu eklendi. 4-5 defa ters-düz yapılarak karıştırıldı. 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip atıldı.
- Üzerine 150-250 µl Elüsyon Solüsyonu eklendi. 10 dk, +4°C'de tüp döndürücüde hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
- 1000xg, 2 dk, +4°C'de santrifüjlendi. Üste kalan sıvı mikropipet ile çekilip toplandı.
- Saflaştırılan örnek -20 °C'de saklandı.

3.11 SDS-PAGE ile Protein Tayini

3.11.1 SDS-PAGE ile protein tayini materyal

Örnek: Ekspresyonun 3. 5. ve 7. günlerinde alınan NTK örnekleri, Saflaştırma sonrası NTK örnekleri

Sarf malzeme: 1,5 mL mikrosantrifüj tüpü, mikropipet ve mikropipet ucu

Cihaz: Mikro santrifüj, Dikey Elektroferez miniVE, Elektroferez Güç sağlayıcısı, Istııcı blok, Spin, Laboratuvar çalkalayıcısı Benchrocker™ 2D

Hazırlananlar:

%15'lik SDS PAGE jeli için;

Ayrırma jeli (Separating)

- 2,8 mL dH₂O, 3 mL Akrilamid (Bio Basic, Kanada), 2 mL 1.5M Tris pH:8.8 [Trizma Baz (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)], 80 µl %10 SDS-Sodyum Dodesil Sülfat (Multicell Wisent Bio Products, Kanada), 80 µl %10 APS- Amonyum persülfat moleküler biyoloji için (BioFroxx, Almanya), 8 µl TEMED biyokimya için (BioFroxx, Almanya)

Birinci kat jeli donmadan baloncuk engelleme amacıyla 500-700 µl 2-Propanol (İsolab, Almanya) koyuldu.

Yığılma jeli (Stacking)

- 1500 µl dH₂O, 405 µl Akrilamid (Bio Basic, Kanada), 375 µl 1.5M Tris pH:6.8 [Trizma Baz (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri)], 30 µl %10 SDS-Sodyum Dodesil Sülfat (Multicell Wisent Bio Products, Kanada), 30 µl %10 APS- Amonyum persülfat moleküler biyoloji için (BioFroxx, Almanya), 3 µl TEMED biyokimya için (BioFroxx, Almanya)

Hazırlandıktan sonra +4°C dolapta saklandı.

10x SDS Running Solüsyonu: 1 litre için;

- 30 gram Trizma Baz (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri), 144 gram Glisin ultra saf (Multicell Wisent Bio Products, Kanada), 10 gram SDS-Sodyum Dodesil Sülfat (Multicell Wisent Bio Products, Kanada),
- 900 mL dH₂O ile 100 mL 10x SDS Running Solüsyonu karıştırıldı ve 1x SDS Running Solüsyonu olarak kullanıldı.

SDS Yıkama ve Boyama Solüsyonları

- Fiksasyon Solüsyonu: %50 metanol (ekstra saf, Tekkim, Türkiye), %10 asetik asit (%100 glacial acetic acid, Merck, Almanya), %100'e dH₂O ile tamamlandı.

- Coomassie Blue Boyası: %0,1 Coomassie Blue (coomassie brilliant blue, Bio Basic, Kanada) %50 metanol (ekstra saf, Tekkim, Türkiye), %10 asetik asit (%100 glacial acetic acid, Merck, Almanya), %100'e dH₂O ile tamamlandı.
- Destaining Solüsyonu: %40 metanol (ekstra saf, Tekkim, Türkiye), %10 asetik asit (%100 glacial acetic acid, Merck, Almanya), %100'e dH₂O ile tamamlandı.

Diğer: 6x Laemmlı Buffer, Belirteç (GangNam-Stain™ Prestained Protein Ladder, Intron Biotechnology, Güney Kore)

3.11.2 SDS-PAGE ile protein tayini metod

1. Ekspresyonun 3. 5. ve 7. günlerinde kültür içinden 1 mL örnek alındı ve 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. (Veya saflaştırma sonrası örnek kullanılmaktadır ve direkt 4.aşamaya geçilmektedir.)
2. 21.000xg, 5 dk, +4°C santrifüj edildi ve partiküller çöktürüldü.
3. Süpernatant alındı ve yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
4. İçerisinden 30 µl örnek alınarak 7 µl 6x Laemmlı buffer ile karıştırıldı. Örnek parafilm ile kapatıldı.
5. 15 dk, 95 °C ısıtıcı blokta bekletildi.
6. O sırada SDS-PAGE tankı hazırlandı ve içerisine %15'lik jel yerleştirildi. Tank 1 litre 1x SDS Runnig Solüsyonu ile dolduruldu.
7. Isınan örneklerin tam karışması için 1-2 saniye spin atıldı.
8. 1 kuyucuğa 3 µl belirteç yüklendi.
9. Diğer kuyucuklara ise 20 µl hazırlanan örnek yüklendi.
10. Cihaz güç kaynağına takıldı, 400 mA, 2-2,5 saat, 120 voltta çalıştırıldı.
11. Bittikten sonra jel istenilen boyutta kesildi.
12. Jel, 40 dk fiksasyon solüsyonu içerisinde bench çalkalayıcısında çalkalandı. Sonra fiksasyon döküldü.
13. Jel, Coomassie boyası'na alındı. 10 sn ısıtıldı, boya içinde 2 saat bench çalkalayıcısında çalkalandı. Sonra boya döküldü.
14. Jel, Destaining solüsyonuna alındı, solüsyon içerisinde 3 saat bench çalkalayıcısında çalkalandı.

Yıkamalar sonrasında Jeldeki bantlar görünür hale gelmiştir.

3.12 Western Blot ile Protein Tayini

3.12.1 Western Blot ile protein tayini materyal

Örnek: Ekspresyonun 3. 5. ve 7. günlerinde alınan NTK örnekleri, Saflaştırma sonrası NTK örnekleri, PC (Pozitif Kontrol, His ile etiketlenmiş, daha önce çalışılmış ve laboratuvarımızda var olan herhangi bir protein), NC (Negatif Kontrol, TAKA Amilaz, His ile etiketlenmemiş)

Sarf malzeme: Whatman Filtre kâğıdı, dikdörtgen kap, makas, şeffaf dosya, mikrosantrifüj tüp, mikropipet ve mikropipet ucu, peçete, %70 etanol,

Cihaz: Western Blotlama cihazı, Western görüntüleme cihazı Fusion Solo 5, Bilgisayar, Laboratuvar çalkalayıcısı Benchrocker™ 2D,

Hazırlananlar:

Transfer Buffer (Towbin):

1 litre Transfer Buffer: 24mM Trizma Baz (Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri), 192 mM Glisin ultra saf (Multicell Wisent Bio Products, Kanada) ve %20 metanol ekstra saf (Tekkim, Türkiye) içermektedir.

TBST Wash Buffer:

1 litre TBST Wash Buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7.4, 1M), %0,9 NaCl Sodyum Klorür (İsolab, Almanya) ve %0,2 Tween 20 (biyokimya için, BioFroxx, Almanya) içermektedir.

Diğer: WesternBright™ Sirius HRP Solüsyon Western Blotlama Tespit Kiti, Nitrosellüloz Blotlama Membranı 0,45um, Amersham™ Protran™, HRP Anti 6x His Tag Antibody Aby 1269

3.12.2 Western Blot ile protein tayini metod

1. Aynı şartlarda SDS-PAGE yapıldı, fakat bir kuyucuğa Pozitif Kontrol (PC), diğer bir kuyucuğa ise Negatif Kontrol (NC) koyuldu.
2. Yürümüş olan jel istenilen boyutta kesildi. Aynı boyda 4 adet Whatman Filtre kâğıdı, 1 adet Nitrosellüloz Blotlama Membranı (NBM) kesildi.
3. Jel, filtre kâğıtları ve NBM transfer buffer'la ıslatıldı. Aynı şekilde Western Blotlama Cihazının da yüzeyi transfer buffer'la ıslatıldı. Şekil 7'deki gibi ıslatılmış olan blotlama cihazının üzerine yerleştirildiler.



Şekil 7 : Western Blot analizinde blotlama aşamasında cihaza yerleşim şekli.

4. Üzerlerine çok az transfer buffer daha eklendi. Cihaz kapağı kapatıldı. MA300, 1,5-2saat, 70 Power elektrik akımıyla cihaz çalıştırıldı, blotlama işlemi yapıldı.
5. Bitince membran dışındakiler çöpe atıldı.
6. Membran üzerinde belirmiş olan belirteç işaretleri tükenmez kalem ile çizildi.
7. Membran alınıp 3 set şeklinde dH₂O, TBST Wash Buffer ile 5'er dk yıkandı. Bu yıkama bench çalkalayıcısının üzerinde çalkalanarak gerçekleştirildi. (Her sette yeni solüsyon kullanılmıştır.)
8. O sırada 40 mL TBST Wash Buffer ile 2 gram süt tozu (Nonfat dried milk powder, PanReac AppliChem, Almanya) karıştırıldı. İyiçe vorteksenerek homojen hale getirildi.
9. Membran bir kapta süt tozuna alındı, bloklama işlemi yapıldı. +4°C'de bench çalkalayıcısında bir gece çalkalandı.
10. Ertesi sabah kaptaki süt tozu döküldü. Membran 5 dk TBST Wash Buffer ile yıkandı.
11. Sonra bir kapta Antibody'nin içine alınarak 3 saat +4°C'de bench çalkalayıcısında çalkalandı.
12. Sonra Antibody -20 °C'ye kaldırıldı.
13. Membran 5'er dk 5 defa TBST Wash Buffer ile yıkandı. (Her seferinde yeni solüsyon kullanılmıştır.)
14. Membran, bir şeffaf dosyanın üzerine alındı, üzerine 1/1 oranında Western blotlama tespit kiti solüsyonları ve dH₂O eklendi.
15. Western görüntüleme cihazına alındı, cihaz etanol ve peçete ile temizlendi. Chemiluminescence ayarında, T4 tablasında, 2 kamera yakınlığında görüntüleme yapıldı.

3.13 Ekstra Çalışmalar Materyal- Metod

Protein yoğunluğunun artırılması amacıyla bazı presipitasyon yani çöktürme çalışmaları denenmiştir.

Etanol ile çöktürme: Ekspresyon sonrası 7. gün protein örnekleri alındı, mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. İki katı hacimde %95 etanol (ekstra saf, Tekkim, Türkiye) eklendi. -80°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi sabah 10.000 rpm, 10dk, +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Üzerine %70 etanol eklendi. 10.000 rpm, 10dk, +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pelet kurumaya bırakıldı. Sulandırmak amacıyla TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisi ile pelet çözüldü.

TCA ile çöktürme: Ekspresyon sonrası 7. gün protein örnekleri alındı, mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Üzerine örneğin 4’de 1’i kadar TCA (Trichloro acetic acid, Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi. -20°C’de bir gece inkübe edildi. Sabah 14.000 rpm, 10dk, +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.

Üzerine 200 µl soğuk %100 aseton eklenerek yıkandı. 14.000 rpm, 10dk, +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Aseton ile yıkama işlemi 3 kere tekrarlandı. Süpernatant atıldı. 95 °C ıstıcı blokta, 5-10 dk inkübe edilerek örnek asetonun uzaklaştırıldı. Daha sonra pelet 50 µl Tris (pH:8.0) ile çözüldü.

3.14 PBS ile Tampon Değişimi (Buffer Exchange)

3.14.1 PBS ile tampon değişimi materyal

Bu yöntem ile saflaştırma sonrası elde edilen örnek, tuzdan arındırılmıştır.

- Sartocoon 10kD Ultrafiltre membran
- PBS Solüsyonu (pH 7.4)
- Santrifüj

3.14.2 PBS ile tampon değişimi metod

1. Saflaştırma sonrası örnek, amicon filtresine eklendi.
2. Üzerine aynı miktarda PBS Solüsyonu eklendi.
3. 3.500xg, 5 dk, +4°C’de santrifüjlendi.
4. Sonra filtreye aynı oranda PBS Solüsyonu eklenerek bu işlem 3 kez tekrarlandı.

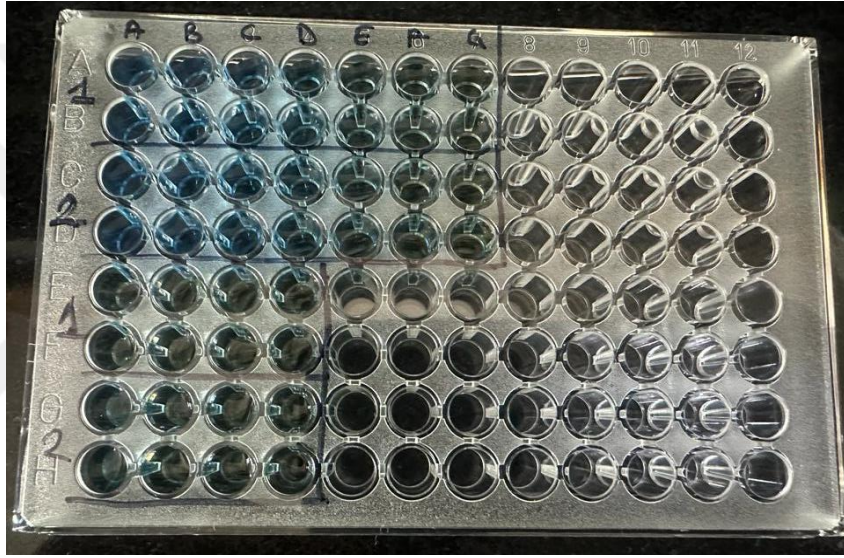
3.15 Bradford Protein Assay

3.15.1 Bradford Protein Assay materyal

Bu çalışma; saflaştırma sonrası üretilen protein miktarını ölçmek için yapılmıştır.

- Comassie (BradFord) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- PBS Solüsyonu (pH 7.4)
- 96 kuyucuklu plaka
- Mikropipet ve mikropipet ucu
- iMark™ Mikroplate Reader (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri)
- Laboratuvar çalkalayıcısı Benchrocker™ 2D
- Tampon değişimi sonrası enzim

3.15.2 Bradford Protein Assay metod



Şekil 8 : 96 kuyucuklu plakada standart ve örneklerin işaretlenmesi.

1. Şekil 8'deki 96 kuyucuklu plaka, kullanılacak örneklere göre işaretlendi.
2. Kullanılacak her kuyucuğa 150 µl Coomassie boyası koyuldu.
3. İlk ve ikinci satırın 6 kuyucuğuna Microplate Standart hazırlama protokolüne göre hazırlanmış olan (0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL) örnekler eklendi ve pipetaj yapıldı.
4. Tampon değişimi sonrası enzimden 200 µl alınıp 200 µl PBS ile karıştırılarak ana stok oluşturuldu.
5. 4 farklı dilüsyon kullanılarak ana stok 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında olacak şekilde PBS ile dilüsyon yapıldı.
6. Elde edilen bu örnekler, iki kopya olacak şekilde daha önce Coomassie boyası konmuş kuyucuklara 150 µl koyuldu ve pipetaj yapıldı.

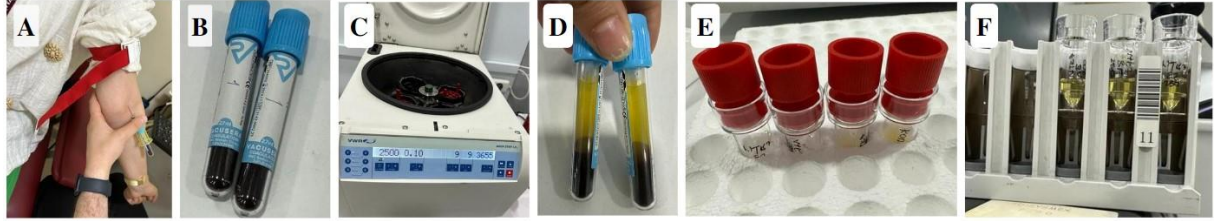
7. Plaka 30 sn bench çalkalayıcısında çalkalandı.
8. Sonra 10 dk çalkalanmadan bırakıldı.
9. Plaka, Microplate Reader cihazına yerleştirildi ve 595nm’de protein ölçüldü.

3.16 Protrombin Zamanı Testi (PT) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini

3.16.1 Protrombin zamanı testi (PT) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini materyal

- 2 adet Mavi kapaklı Sitrat tüp
- VWR Mega Star 1.6 Santrifüj (VWR, Almanya)
- Sysmex Otomatik Kan Koagülasyon Analiz Cihazı (Sysmex Corporation, Japonya)
- Analiz küveti
- Mikropipet ve Mikropipet ucu
- Tampon değişimi sonrası enzim

3.16.2 Protrombin zamanı testi (PT) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini metod



Şekil 9 : PT Testi görüntüleri A) Kan alınması B) Sitratlı tüp örneği C) Kullanılan santrifüj cihazı D) Santrifüj sonrası plazma ayrımı E) Hazırlanmış küvetler F) Küvetlerin cihaza alınması.

Bu çalışma; Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında yapılmıştır.

Şekil 9’da bazı aşamalar görsel olarak verilmiştir.

1. Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hastanesi personeli tarafından benden kan örneği alındı ve 2 adet Mavi kapaklı Sitrat tüplerine koyuldu.
2. 2500xg’de 10 dk santrifüj yapıldı.
3. 4 örnek tasarlandı ve analiz küvetine birinci örnek için santrifüj sonrası elde edilen plazmadan 400 µl alındı ve içerisine enzim koyulmadı.

4. İkinci örnek için küvete 200 µl plazma ve 200 µl enzim koyuldu ve pipetaj yapıldı.
5. Üçüncü ve dördüncü örnekler için küvete 250 µl plazma ve 250 µl enzim koyuldu ve pipetaj yapıldı.
6. Hazırlanan küvetler, Kan Koagülasyon Analiz Cihazına yerleştirildi ve Protrombin (PT) formatında çalıştırıldı.
7. Yaklaşık bir dk sonra sistem otomatik ölçüm yaparak liste oluşturdu.

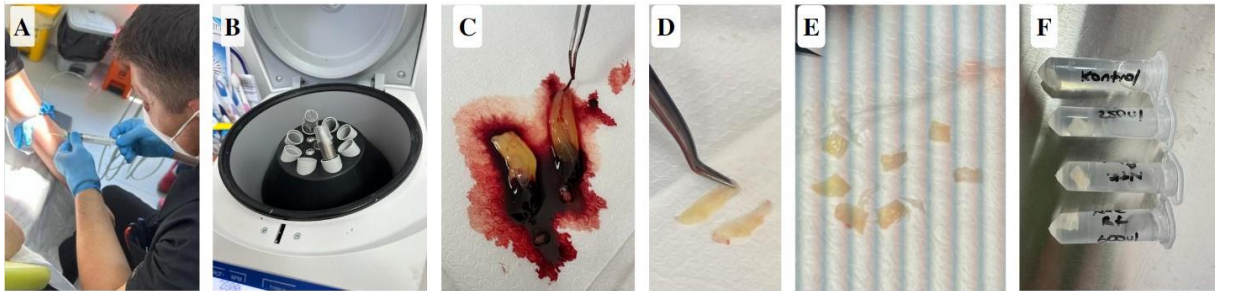
3.17 Fibrin Bakımından Zengin Titanyum Tüpler (T-PRF) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini

3.17.1 Fibrin bakımından zengin titanyum tüpler (T-PRF) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini materyal

Bu çalışma; Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız ve Diş Sağlığı Uygulama ve Araştırma Merkezinde, Prof. Dr. Mustafa Tunalı eşliğinde yapılmıştır.

- Titanyum Tüp
- IntraSpin Santrifüj Cihazı (Intra-Lock International, Inc, Amerika Birleşik Devletleri)
- 2 ml mikrosantrifüj tüp
- Tampon değişimi sonrası enzim
- Serum fizyolojik

3.17.2 Fibrin bakımından zengin titanyum tüpler (T-PRF) ile fibrinolitik enzim aktivite tayini metod



Şekil 10 : T-PRF ile Aktivite Tayini görüntüleri A) Kan alınması B) Titanyum tüplerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi C) Santrifüj sonrası plazma görüntüsü D) Serum fizyolojik yıkaması sonrası fibrin görüntüsü E) Oluşan fibrinin eşit parçalara bölünmesi F) Fibrinlerin mikrosantrifüj tüplerine alınması.

Şekil 10'da bazı aşamalar görsel olarak verilmiştir.

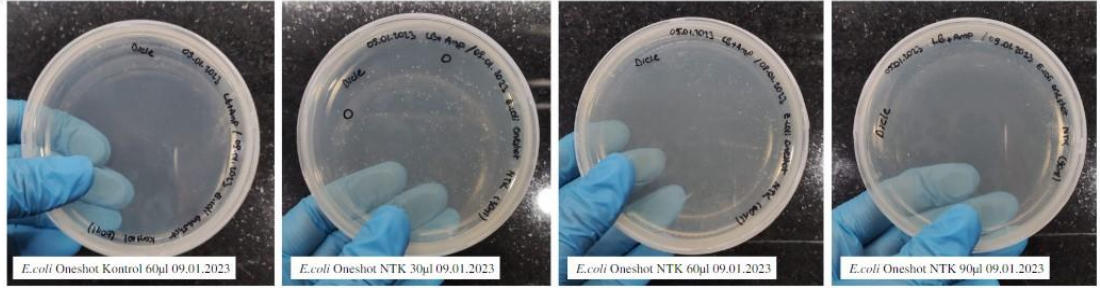
1. Hocamız tarafından benden 20 ml kan alındı ve kan örneği kendi çalışmalarında kullandığı titanyum tüplere aktarıldı [31].
2. 2800 rpm'de 12 dk santrifüj yapıldı.
3. O sırada 2 ml mikrosantrifüj tüplerinde 4 adet örnek hazırlandı. Birinci örnek için mikrosantrifüj tüpüne, 1800 µl serum fizyolojik koyuldu ve enzim koyulmadı. Kontrol olarak kullanıldı.
4. İkinci örnek için mikrosantrifüj tüpüne 100 µl enzim, 1700 µl serum fizyolojik koyuldu.
5. Üçüncü örnek için mikrosantrifüj tüpüne 250 µl enzim, 1550 µl serum fizyolojik koyuldu.
6. Dördüncü örnek için mikrosantrifüj tüpüne 600 µl enzim, 1200 µl serum fizyolojik koyuldu.
7. Santrifüj bittikten sonra kan örneği pens yardımı ile titanyum tüplerden alınıp steril bir alana konuldu.
8. Plazma kısmı ayrılıp, serum fizyolojik ile yıkandı. Oluşan fibrin parçası bistüri yardımıyla eşit parçalara bölündü.
9. Parçalar pens yardımıyla 4 adet mikrosantrifüj tüpe konuldu.
10. Mikrosantrifüj tüpleri parafilmlenerek oda sıcaklığı koşullarında saklandı.
11. 7 gün boyunca gözlemlendi.

4.BULGULAR

4.1 Kompetent Hücre Hazırlama Bulgusu

Hazırlanan Kompetent *E. coli* One Shot ve Kompetent *E. coli* TOP10, bir sonraki aşamada genin bakteriye transformasyonunda kullanılmıştır ve gen büyüebilmiştir. Bu sonuç; kompetent bakterinin başarılı şekilde hazırlandığını göstermektedir.

4.2 Genin Kompetent Bakteri'ye Transformasyonu Bulgusu

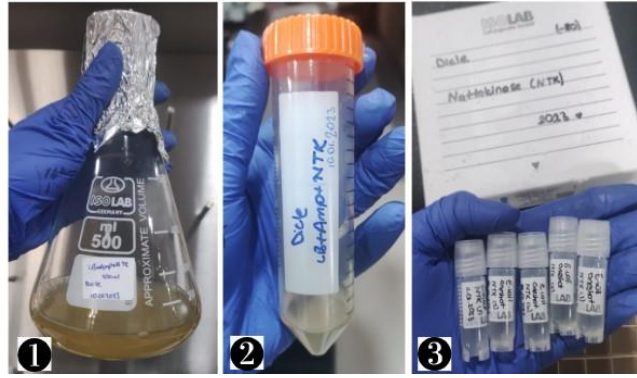


Şekil 11 : 09.01.2023 tarihli NTK Bakteri Transformasyonu LB+Amp Plaka görüntüleri.

Şekil 11'de görüldüğü üzere ertesi sabah NTK, LB+Amp plakalarında büyümüş ve koloni oluşturmuştur. Bu sonuç; yapılan bakteri transformasyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

Aynı yöntem ile NTK geni, Kompetent *E. coli* One Shot, Kompetent *E. coli* TOP10 ve Kompetent *E. coli* Mach1 bakterilerine de transforme edilmiştir. Tek koloni Kompetent *E. coli* One Shot bakteri transformasyonundan alınmıştır. Seçim yapılırken koloninin boyutunun diğerlerine nazaran daha büyük ve gelişmiş olmasına dikkat edilmiştir.

4.3 Bakteride Koloni Seçme Bulgusu



Şekil 12 : Koloni seçim sonrası görüntüleri 1) 100 mL LB+Amp sıvı besiyerinde büyümüş olan hücre görüntüsü 2) 5 mL LB+Amp sıvı besiyerinde büyümüş olan hücre görüntüsü 3) Gliserol stok görüntüsü.

Şekil 12’de görüldüğü üzere 100 mL erlenmeyer ve 50 mL falcon içerisinde LB+Amp besiyerlerinde bulanıklık meydana gelmiştir. Bu bulanıklık bakterilerin ürediğini göstermektedir. Bu sebeple deneyler devam edebilmektedir. Daha sonra kullanılmak amacıyla gliserol stok alınmıştır.

Yukarıda sonucu verilmiş olan örnek *E. coli* One Shot’a atılmış NTK geninden elde edilmiştir. Aynı yöntem ile *E. coli* Mach1 ve *E. coli* TOP10 da denenmiştir. Fakat *E. coli* Mach1’in LB+Amp sıvı besiyerinde verdiği bulanıklık yeterli bulunamamıştır. Buna rağmen Plazmit izolasyonu öncesi santrifüj yapıldı. Bunun sonucunda pelet miktarı yeterli olmadı. Bu sonuçlar doğrultusunda *E. coli* Mach1 ile çalışmaya devam edilmedi. Midiprep Plazmit İzolasyonu aşamasına *E. coli* One Shot ve *E. coli* TOP10’a transforme edilmiş NTK geni ile devam edildi.

4.4 Midiprep Plazmit İzolasyonu Bulgusu

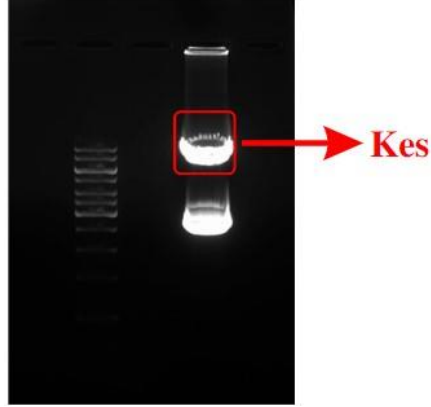
Midiprep Plazmit izolasyonu sonrasında nanodrop cihazında konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.

E. coli One Shot NTK DNA konsantrasyonu: 1835 ng/ μ l

E. coli TOP10 NTK DNA konsantrasyonu: 540 ng/ μ l

Bu sonuçlar doğrultusunda *E. coli* One Shot NTK’ın DNA yoğunluğu fazla olduğu için bir sonraki aşamaya bu DNA ile devam edilmiştir.

4.5 Restriksiyon Enzimleri Plazmit Kesimi (Digestion) Bulgusu



Şekil 13 : NTK Elektroforez jel bandının UV altındaki görüntüsü.

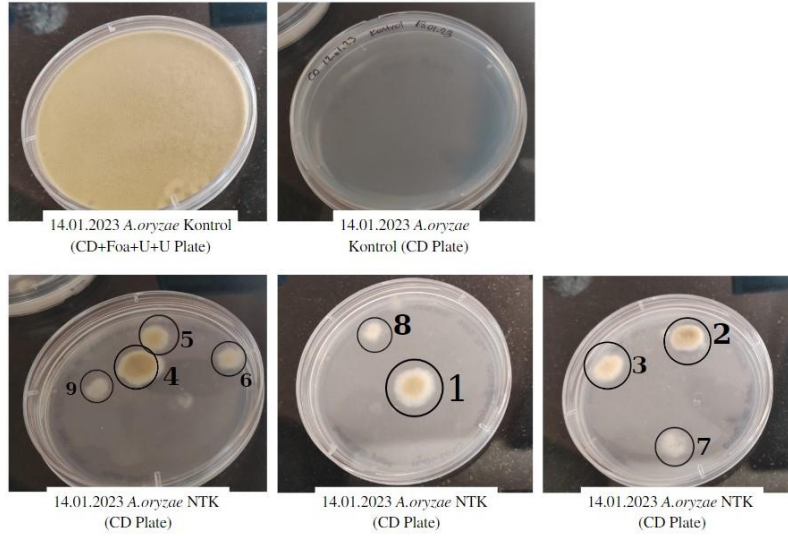
Şekil 13'teki gösterilen bölge UV altında bistüri ile kesilerek jelden alınmıştır ve DNA ekstraksiyonu kesilen bu parçadan elde edilmiştir.

4.6 DNA Ekstraksiyon Bulgusu

Yapılan çalışmada elde edilen ekstrakte örneğin nanodrop ile konsantrasyonu ölçülmüştür.

NTK DNA konsantrasyonu: 105.9 ng/ μ l

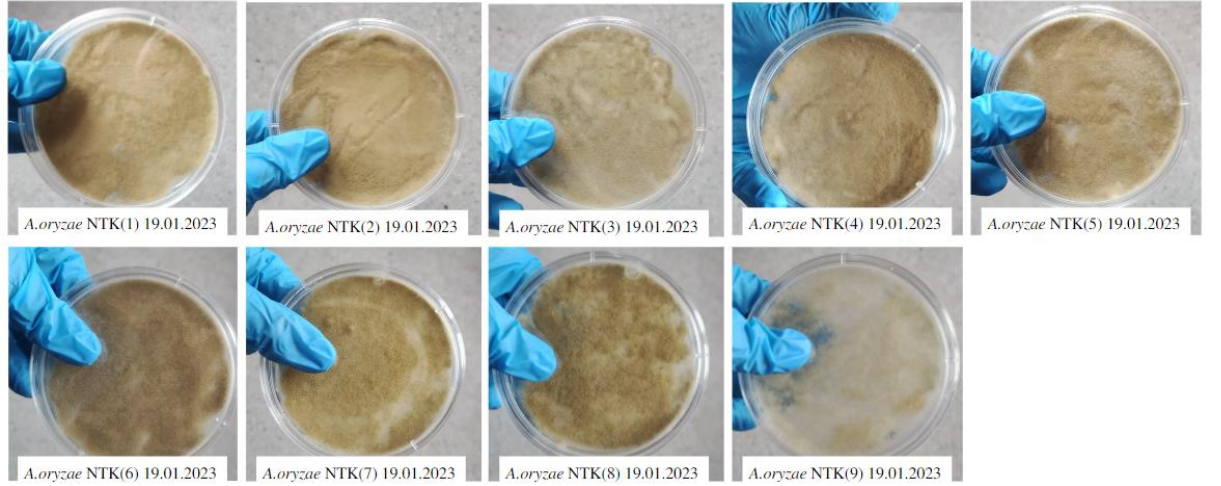
4.7 Aspergillus Transformasyonu Bulgusu



Şekil 14 : Transformasyon sonrası CD plakalarda *A. oryzae* NTK Kolonileri ve Kontrol grubu.

Şekil 14'te görüldüğü üzere *Aspergillus* transformasyonu sonrası Kontrol CD plakasında üreme olmamıştır. NTK geni koyulan CD plakalarında ise üreme olmuş ve toplamda 9 adet koloni büyümüştür. *Aspergillus* transformasyonu işlemi iki defa tekrarlanarak koloni sayısı 18 olmuştur. CD plakalarında kolonilerin oluşması ve kontrol gruplarında ise üreme olmaması transformasyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

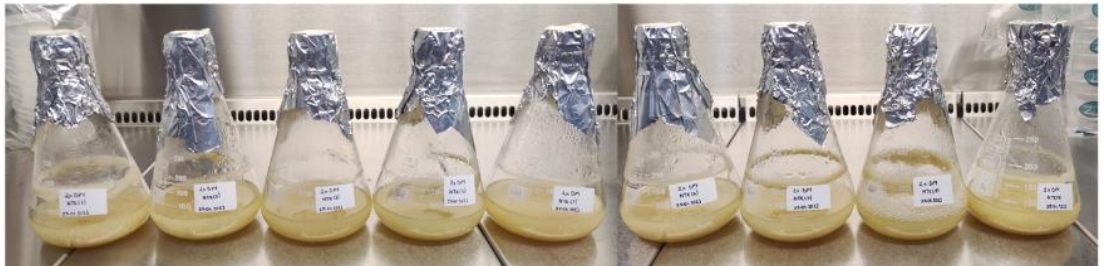
4.8 *Aspergillus*'ta Koloni Seçme Bulgusu



Şekil 15: *Aspergillus*'ta seçilen kolonilerin inkübasyon sonrası görüntüleri.

Şekil 15'te gösterildiği üzere, önceki aşamada seçilen koloniler CD plakalara ekilmiştir. 5-7 gün inkübe olan CD plakalardaki üreme yoğunluğu ideal düzeydedir. Tüm koloniler kullanılarak Ekspresyon aşamasına geçilmiştir.

4.9 *Aspergillus*'ta Protein Ekspresyonu Bulgusu



Şekil 16 : NTK hücreleri büyük ölçekli ekspresyon görüntüsü.

Aspergillus hücreleri 5-7 gün sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir. Bu süreçte protein üretimini kontrol etmek ve en verimli üreme süresini tespit etmek için 3. 5. ve 7. günlerinde örnek alınarak SDS-PAGE yapılmıştır. İdeal süre 6-7 gün olarak belirlenmiştir. Bu sürelerde ekspresyon sonlandırılarak, örnek süzme ve filtreleme işlemleri yapılarak bir sonraki aşama olan protein saflaştırması aşamasına geçilmiştir. Şekil 16'da NTK örneklerinin ekspresyonu görülmektedir. Bu çalışma 18 kolonide yapılmış olup birçok farklı koloni için farklı ekspresyon metodları denenmiştir. Ekspresyon aşaması 4 farklı metod ile denenmiştir. Bu metodlar 3.9.2 numaralı bölümde anlatılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında en iyi sonuç, metod 1'den alınmıştır.

4.10 Protein Saflaştırma Bulgusu



Şekil 17 : Ekspresyon sonrası Aspergillus'ların süzülmesi.

Şekil 17'de görüldüğü üzere ekspresyon sonrası Aspergilluslar, Whatman filtre kâğıdı ve huni yardımıyla süzülmüştür. Bu aşama saflaştırmaya hazırlık aşamasıdır.



Şekil 18 : Çapraz Akışlı Filtrasyon cihazından örneklerin geçirilmesi.

Şekil 18’de görüldüğü üzere total hacimi fazla olan ekspresyonlarda hacimi düşürmek ve konsantrasyonu artırmak amacıyla Çapraz Akışlı Filtrasyon cihazında ultrafiltrasyon işlemi yapılmıştır.

Çalışma boyunca birçok deney grubu oluşturulmuştur. Aşağıda bu deney grupları açıklanmıştır. Ekspresyon sonrası her grupta süzme ve filtreleme işlemi yapılmıştır.

Deney grubu 1: Metod 1 ile ekspresyonu yapılan 18 adet kopya, öncelikle protein saflaştırılması yapılmadan SDS-PAGE ve Western Blot’ta test edildi.

Yapılan test sonucunda 4 kopya ile saflaştırma çalışmaları denendi.

Deney grubu 2: Metod 1 ile ekspresyonu yapılan 4 adet kopya, nikel rezinli IMAC ve ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. Sonrasında SDS-PAGE ve Western Blot’ta test edildi. Yapılan test sonucunda 1 kopya ile farklı ekspresyon ve saflaştırma çalışmaları denendi. Seçilen kopya NTK7 olarak isimlendirildi.

Deney grubu 3: NTK7, CD plaka stoğundan örnek alınarak, metod 1 ile tekrar eksprese edildi. Örneğin 10 mL’si nikel rezinli IMAC ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. Örneğin 1 mL’si ise önce kobalt rezinli pull-down ardından amicon filtre

ile saflaştırıldı. Deney grubundan elde edilen saflaştırılmış örnekler SDS-PAGE ve Western Blot'ta test edildi.

Deney grubu 4: NTK7, CD plaka stoğundan örnek alınarak, metod 2 ile tekrar eksprese edildi. Süzme ve filtreleme sonrasında 900 mL -1 L civarında örnek elde edildi. Örnek hacmi, çapraz akışlı filtrasyon cihazıyla 100 mL'ye dűřürüldü. Sonrasında nikel rezinli IMAC ve ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. SDS-PAGE ve Western Blot'ta test edildi.

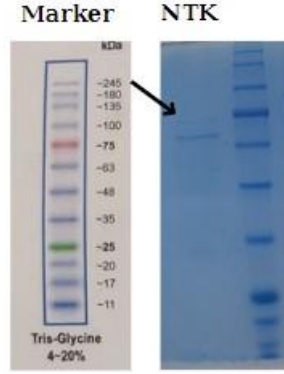
Deney grubu 5: NTK7, CD plaka stoğundan örnek alınarak, metod 3 ile tekrar eksprese edildi. Süzme ve filtreleme sonrasında 450 mL civarında örnek elde edildi. Örnek hacmi, çapraz akışlı filtrasyon cihazıyla 80 mL'ye dűřürüldü. Örneęin 75 mL'si ile kobalt rezinli IMAC ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. Örneęin 1 mL'si ise önce kobalt rezinli pull-down ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. Deney grubundan elde edilen saflaştırılmış örnekler SDS-PAGE ve Western Blot'ta test edildi. Bu deney grubunun amacı küçük boyutta farklı ön kültürler gibi ekspresyona başlanılan örneklerin, ekspresyondan sonra birleştirilmesiydi. Çünkü öngörülene göre NTK ilk gün 15 mL'de verimli büyüyor, sonrasında bu verim 75 mL 2xDPY'da devam ediyor. Ekspresyon sonrası da birleştirilerek yüksek hacimde elde edilmesi sonra ise konsantre edilmesi protein verimini artırabilirdi.

Deney grubu 6: NTK7, CD plaka stoğundan örnek alınarak, metod 2 ile tekrar eksprese edildi. Süzme ve filtreleme sonrasında 900 mL -1 litre civarında örnek elde edildi. Örnek hacmi, çapraz akışlı filtrasyon cihazıyla 50 mL'ye dűřürüldü. Örneęin 15 mL'si önce amicon filtre ile 1 mL'ye konsantre edildi, daha sonra ise nikel rezinli IMAC saflaştırma yapıldı fakat bu çalışmada rezinle inkübasyon süresi 16 saat olarak düzenlendi. Örnek 2 mL rezin ile inkübe edildi. Sonrasında amicon filtre ile saflaştırma yapıldı. Örneęin 1 mL'si ise önce kobalt rezinli pull-down ardından amicon filtre ile saflaştırıldı. Deney grubundan elde edilen saflaştırılmış örnekler SDS-PAGE ve Western Blot'ta test edildi.

Deney grubu 7: NTK7, CD plaka stoğundan örnek alınarak, metod 4 ile tekrar eksprese edildi. Süzme ve filtreleme sonrasında 130 mL civarında örnek elde edildi. Örneğin 15 mL'si önce amicon filtre ile 1 mL'ye konsantre edildi, daha sonra ise nikel

rezinli IMAC saflaştırma yapıldı fakat bu çalışmada rezinle inkübasyon süresi 16 saat olarak düzenlendi. Örnek 2 mL rezin ile inkübe edildi. Sonrasında amicon filtre ile saflaştırma yapıldı.

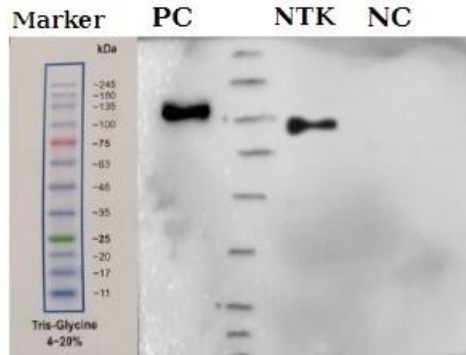
4.11 SDS-PAGE ile Protein Tayini Bulgusu



Şekil 19 : NTK proteinin SDS-PAGE’de görüntüsü.

Şekil 19’da görüldüğü üzere NTK proteininin bulunduğu kuyucukta 75kDa civarında bant çıkmış olması NTK’nın füzyon şekilde üretildiğini göstermektedir. Fakat bant yeteri kadar yoğun değildi. 3.13 numaralı bölümde anlatıldığı üzere bazı yoğunlaştırma çalışmaları denendi.

4.12 Western Blot ile Protein Tayini Bulgusu



Şekil 20 : NTK proteinin Western Blot’ta görüntüsü.

Şekil 20’de görüldüğü üzere PC’de bant çıkmış, NC’de ise bant çıkmamıştır. Bu Western blot çalışmasının doğruluğunu gösterir. Aynı zamanda NTK proteininin bulunduğu kuyucukta 75kDa civarında bant çıkmış olması NTK’nın füzyon şekilde üretildiğini göstermektedir.

4.13 Ekstra Çalışmalar Bulgusu

NTK proteininin daha yoğun şekilde elde edilmesi, SDS-PAGE'de ve Western Blot'ta daha net bant elde etmek amaçlarıyla presipitasyon (çöktürme) çalışmaları yapılmıştır. Fakat bu çalışmalarda proteinin hasar görmüş olabileceği düşünülüyor olup net bir bant alınamamıştır.

4.14 PBS ile Tampon Değişimi (Buffer Exchange) Bulgusu

Tampon Değişimi sonrası 2 mL örnek elde edildi. Bu örnek 3.15, 3.16 ve 3.17 numaralı deneylerde kullanıldı.

4.15 Bradford Protein Assay Bulgusu

Yapılan Bradford Assay sonucunda 75 mL'de yapılan ekspresyon sonucunda 8.00 µg/mL örnek elde edilmiştir. Litre değeri cinsinden bir sonuç verildiğinde bu sonuç 106,66 mg/L değerine eşdeğerdir.

4.16 Protrombin Zamanı Testi (PT) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini Bulgusu

Tablo 2 : Protrombin Zamanı Testi Sonuçları.

Örnek	PT~Sec	PT~%	PT~INR
1. örnek (Kontrol)	10.9	96.3	0.95
2. örnek	18.8	34.1	1.70
3. örnek	18.0	36.6	1.62
4. örnek	14.6	54.1	1.30

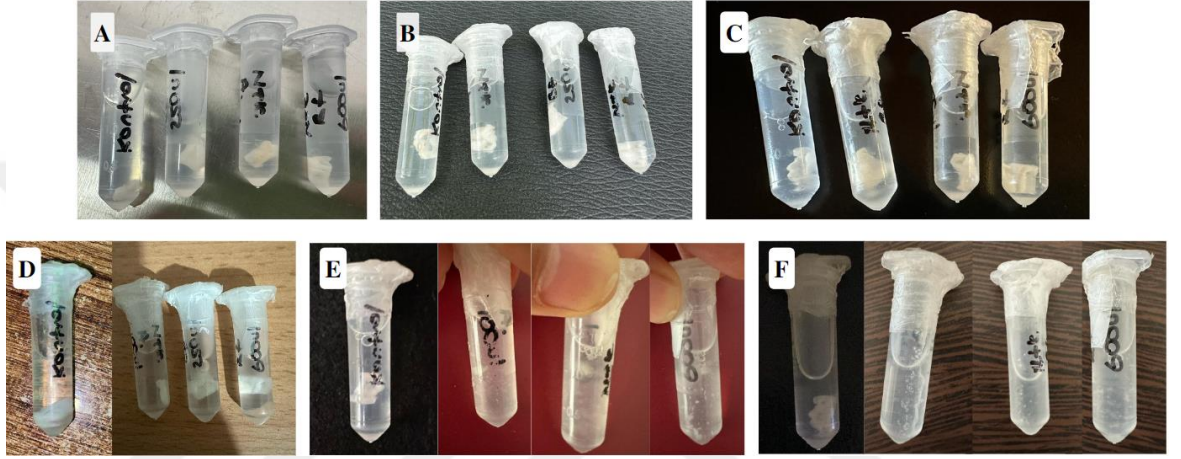
Tablo 2'de gösterildiği üzere Protrombin Zamanı Testi ile trombin oluşumu ölçülmüştür.

PT~Sec için referans değer 10-12.5 sn'dir. Kullanmış olduğumuz kontrolde ise 10.9 sn olarak çıkmıştır. Protrombin zamanı; 2. örnek için 7.9 sn, 3. örnek için 7.1 sn, 4. örnek için ise 3.7 sn gecikmiştir. Bu sonuçlar kullanılan enzimin pıtılaşma zamanını ciddi ölçüde geciktirdiğini göstermektedir.

PT~% için referans değer %85-%100'dür. Kullanmış olduğumuz kontrolde %96.3, 2. örnek için %34.1, 3. örnek için %36.6, 4. örnek için ise %54.1'dir. Bu sonuç, kullanılan enzimin protrombin yüzdesini ciddi ölçüde azalttığını göstermektedir.

PT~INR için referans değer 0.8-1.1'dir. Kullanmış olduğumuz kontrolde ise 0.95, 2. örnek için 1.70, 3. örnek için 1.62, 4. örnek için ise 1.30'dir. Bu sonuçlar doğrultusunda enzim kullanılan örneklerde kanın pıhtılaşması yavaşlamış olarak gözlemlenmektedir.

4.17 Fibrin Bakımından Zengin Titanyum Tüpler (T-PRF) ile Fibrinolitik Enzim Aktivite Tayini Bulgusu



Şekil 21 : Fibrin parçalarının, kontrol ve enzim olan mikrosantrifüj tüplerindeki görüntüleri A) 0. saat görüntüsü B) 12. saat görüntüsü C) 24. saat görüntüsü D) 2. gün görüntüsü E) 5. gün görüntüsü F) 7. gün görüntüsü.

Şekil 21'de görüldüğü üzere fibrin parçaları mikrosantrifüj tüplerine konuldu. 0.saat'te gözlemlendi. 12. ve 24. saatlerde ise farklılık gözlemlenmedi. 2. gün bir örnekte bazı parçalanmaların olduğu gözlemlendi. 3. ve 4. günlerde bu parçalanmalar devam etti ve 5. gün 250 µl enzim konulmuş örnek tamamen çözülmüş, diğer iki örnek ise çoğunlukla çözülmüştü. 7. gün 3 örnek de tamamen çözülmüş ve dibe çökmüştü. Kontrol tüpünde ise bu sürelerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi. Bu sonuçlar; kullanılan NTK enziminin, fibrini çözebildiğini-parçalayabildiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Gen, bakteriye atıldıktan sonra LB+Amp katı ve sıvı besiyerinde normal bir *E. coli* hücresi kadar büyüme göstermemiştir. Yine de *A. oryzae* transformasyonunda kullanılabilir düzeyde gen miktarı elde edilmiş ve transformasyon başarılı şekilde gerçekleşmiştir.

Nattokinaz, daha önce farklı ekspresyon sistemlerinde üretilmiştir fakat *Aspergillus*'ta ilk defa üretilmiştir. Bu sebeple yapılan bu çalışma ilktir. Nattokinaz, sağlık sektörü açısından önemli bir enzimdir ve bu enzimin işlevsel olması gerekmektedir. Aynı zamanda proteinin işlevsel olması proteinin 3 boyutlu katlanmasına bağlıdır. Örneğin, *E. coli*'de üretilen enzimler inklüzyon cisimciği olarak üretilir, katlanma olmaz ve buna bağlı olarak aktif bir protein elde edilmesi zordur. Bu çalışmada katlanmanın doğru olması için *A. oryzae*'nin homolog olarak ürettiği amilaz proteini kullanılmış ve nattokinaz protein dizisine eklenmiştir. Bu şekilde sentezlenen protein aynı zamanda *A. oryzae* kodon optimize şekilde üretilmiştir.

Deneyin sonraki kısmında NTK DNA'sı *Aspergillus oryzae*'e transforme edilmiştir. Bu heterolog bir üretilimdir. NTK geni, *A. oryzae*'nin homolog olarak ürettiği Amilaz proteinine füzyon şekilde tasarlanmıştır. *A. oryzae*'nin NTK içeren geni üretebilmesi için CD agar plakalarda büyütüldü. Sonrasında ise protein üretiminin başlayabilmesi için sıvı besiyerine aktarıldı. Bu aşamada proteinin eksprese edilmesi amaçlandı. 18 adet kopya ile ekspresyon çalışmaları yapıldı. Yapılan ekspresyon çalışmaları çerçevesinde en fazla eksprese eden metod 1 yöntemi idi. Bu durum NTK üretiminin yavaş ve aşamalı gerçekleştirildiğini göstermektedir. 15 mL sıvı besiyerinde büyüyen ertesi gün 75 mL'ye aktarılması protein verimini etkiliyordu. Nitekim Deney 2 grubundan bir örneğin SDS-PAGE ve Western Blot'ta bant oluşturması bize yine metod 1 ekspresyonunun daha verimli olduğunu düşündürdü.

Metod 1 ile iyi eksprese olan kopya ile birçok farklı ekspresyon ve saflaştırma çalışmaları denendi. Bunun sonucu, yine Deney 2 grubu çalışmasının sonucunun daha

verimli olduğunu gösterdi. 1 litre örnek elde edilen çalışmalarda ekspresyon büyük hacimde yani 75 mL’de başlatıldığı için ilk gün yeteri kadar üreyemediği düşünöldü.

Yapılan SDS-PAGE ve Western sonucuna göre NTK saflaştırma sonrası 75 kDa civarında bir bant gösterdi. NTK, füzyon üretildiği için beklenen bant 95 kDa civarındaydı. Bu sonuç NTK’nın üretildiğini fakat dizinin bilinmeyen bir bölgesinden kesildiğini veya NTK’nın glikozillenme yapmış olabileceğini düşündürdü.

Üretilen protein miktarını belirleyebilmek için Bradford Protein Assay çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda üretilen protein miktarı 106,66 mg/L olarak ölçöldü. Literatürde var olan çalışmalar ile karşılaştıracak olursak *B. subtilis* WB8000/pANk ‘de 600 mg/l [19], *E. coli*’de 49,3 mg/L [21], *B. licheniformis*’ de 232,6 mg/L [24] ve *P. pastoris*’de 320 mg/l [14] üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapmış olduğumuz üretim ile *E.coli*’den iki kat daha fazla protein elde etmiş olmamıza rağmen diğer ekspresyon sistemlerinden daha az protein elde edilmiştir. Çalışma protokolünde bazı değişiklikler yaparak üretilen protein miktarının artırılması denenebilir. Üretim düşük olsa da NTK’nın aktivite testleri sonucunda bioaktif bir protein elde edildiği görölmüştür.

Üretimi gerçekleşmiş olan NTK enziminin iki adet aktivite testi yapıldı.

Protrombin zamanı testinde PT~Sec için pıhtılaşmanın yaklaşık 8sn yavaşladığını, PT~% için enzim kullanılan örneklerin PT yüzdesinin ciddi oranda düştüğü, PT~INR için enzim kullanılan örneklerin INR değerlerinin 1.0’ın üzerine çıkarak kan pıhtılaşmasının yavaş olduğunu göstermektedir.

Diğer bir aktivite testi olan titanyum tüpler ile edilmiş güçlü fibrin parçacıklarının, enzim olan tüplere konulması ve 7 gün izlenmesi sonucunda ise, NTK enziminin fibrini parçalayabildiği görölmüştür. Kontrol grubunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarına göre; NTK olarak isimlendirilen füzyon gen, bakteri transformasyonu olarak en etkili *E. coli* One Shot bakterisinde çalışmıştır. Sonrasında bundan alınan plazmit'ten belli aşamalar ile DNA elde edilmiş, bu DNA ile de *Aspergillus* transformasyonu yapılmıştır. Katı agar plakalarda üretilen NTK'lardan 18 adet koloni elde edilmiş olup hepsi ile ekspresyon çalışması yapılmıştır. Ekspresyon aşaması 4 adet metod ile yapılırken, saflaştırma çalışmaları ise 7 adet deney grubu üzerinde yapılmıştır. NTK'nın *A. oryzae* sıvı ekspresyonunun aşamalı olarak gerçekleştiği bu sebeple ilk gün 15 mL ekspresyon, ertesi gün 75 mL'ye aktarılan ekspresyon metodunun daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. 7 gün inkübe olan bu örnekten yapılan saflaştırma çalışmasında ise; önce IMAC ardından amicon filtre ile yapılan saflaştırma yönteminin daha etkili olduğu yapılan testler sonucunda görülmüştür. Bu testler SDS-PAGE ve Western blot'tur ve protein tayini yapılmıştır. SDS-PAGE'de görülen bant ince ve yoğunluğu düşüktür. Fakat protein tayininde Western Blot daha hassas bir tekniktir ve bu deneyde alınan sonuç net ve belirgindir. Bu da SDS-PAGE'deki bandı doğrular niteliktedir. 75kDa civarında alınan bu bant NTK'nın *A. oryzae*'de füzyon şekilde başarılı şekilde üretildiğini göstermektedir.

Yapılan Bradford Protein Assay analizinde, çalışma sonucunda 106.66 mg/L NTK enzimi üretildiği görülmüştür. İki adet aktivite testi yapılmıştır. Protrombin zamanı testinde, NTK'nın pıhtılaşmayı yaklaşık 8sn yavaşlattığı, pıhtılaşma yüzdesini ciddi oranda düşürdüğü ve INR sonucunda pıhtılaşmayı ciddi oranda yavaşlattığı görülmüştür. Yapılan diğer aktivite testi ise titanyum tüplerde kandan elde edilmiş fibrin parçalarının enzim olan mikrosantrifüj tüplerine aktarılması ve parçalanmanın olup olmadığını gözlemlemek esasına dayanır. Gözlem sonucunda 5-7 gün içinde fibrinin tamamen parçalandığı görülmüştür. Yapılan aktivite testleri sonucunda NTK'nın biokatif bir enzim olduğu kanıtlanmıştır.

Üretilen protein miktarını artırabilmek için; gen tasarımında başka bir füzyon protein kullanılması veya ekspresyonun fermentör kullanılarak yapılması gibi bazı değişiklikler yapılabilir. Bu gibi değişiklikler üretilen protein miktarını, SDS-PAGE

ve Western Blot'ta görünen bant yoğunluğunu artırabilir. Böylece daha aktif bir protein elde edilebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Kumar, S. S., & Sabu, A. (2019). Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy. *Therapeutic enzymes: function and clinical implications*, 345-381.
- [2] Kotb, E. (2014). The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi. *Biotechnology progress*, 30(3), 656-672.
- [3] Xu, J., Du, M., Yang, X., Chen, Q., Chen, H., & Lin, D. H. (2014). Thrombolytic effects in vivo of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis. *Acta haematologica*, 132(2), 247-253.
- [4] Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., & Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 43(10), 1110-1111.
- [5] Nagata, C., Wada, K., Tamura, T., Konishi, K., Goto, Y., Koda, S., ... & Nakamura, K. (2017). Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: the Takayama study. *The American journal of clinical nutrition*, 105(2), 426-431.
- [6] Urano, T., Ihara, H., Umemura, K., Suzuki, Y., Oike, M., Akita, S., ... & Takada, A. (2001). The Profibrinolytic Enzyme Subtilisin NAT Purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and Inactivates Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24690-24696.
- [7] Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Fujii, R., Kariya, K., & Nishimuro, S. (1995). Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(10), 1387-1391.
- [8] Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., & Hiratani, H. (1990). Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinases. *Acta haematologica*, 84(3), 139-143.
- [9] Kumar, S. S., & Sabu, A. (2019). Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy. *Therapeutic enzymes: function and clinical implications*, 345-381.

- [10] Derosa, G., Maffioli, P., D'Angelo, A., & Di Pierro, F. (2021). Nutraceutical Approach to Preventing Coronavirus Disease 2019 and Related Complications. *Frontiers in Immunology*, 12.
- [11] Kurosawa, Y., Nirengi, S., Homma, T., Esaki, K., Ohta, M., Clark, J. F., & Hamaoka, T. (2015). A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.
- [12] Peng, Y., Yang, X., & Zhang, Y. (2005). Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(2), 126-132.
- [13] Fujita, M., Ito, Y., Hong, K., & Nishimuro, S. (1995). Characterization of nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis*, 9(3), 157-164.
- [14] Guangbo, Y., Min, S., Wei, S., Lixin, M., Chao, Z., Yaping, W., & Zunxi, H. (2021). Heterologous expression of nattokinase from *B. subtilis natto* using *Pichia pastoris* GS115 and assessment of its thrombolytic activity. *BMC biotechnology*, 21(1), 1-12.
- [15] Dabbagh, F., Negahdaripour, M., Berenjian, A., Behfar, A., Mohammadi, F., Zamani, M., ... & Ghasemi, Y. (2014). Nattokinase: production and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(22), 9199-9206.
- [16] Nakamura, T., Yamagata, Y., & Ichishima, E. (1992). Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (natto). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(11), 1869-1871.
- [17] Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., & Nishimuro, S. (1993). Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and biophysical research*
- [18] Wang, C., Du, M., Zheng, D., Kong, F., Zu, G., & Feng, Y. (2009). Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* B-12. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9722-9729.
- [19] Nguyen, T. T., Quyen, T. D., & Le, H. T. (2013). Cloning and enhancing production of a detergent-and organic-solventresistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800. *Microbial cell factories*,

- [20] Liang, X., Zhang, L., Zhong, J., & Huan, L. (2007). Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(1), 95-101.
- [21] Liang, X., Jia, S., Sun, Y., Chen, M., Chen, X., Zhong, J., & Huan, L. (2007). Secretory expression of nattokinase from *Bacillus subtilis* YF38 in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, 37(3), 187-194
- [22] Li, X., Wang, X., Xiong, S., Zhang, J., Cai, L., & Yang, Y. (2007). Expression and purification of recombinant nattokinase in *Spodoptera frugiperda* cells. *Biotechnology letters*, 29(10), 1459-1464.
- [23] Chiang, C. J., Chen, H. C., Chao, Y. P., & Tzen, J. T. (2005). Efficient system of artificial oil bodies for functional expression and purification of recombinant nattokinase in *Escherichia coli*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4799-4804.
- [24] Cai, D., Wei, X., Qiu, Y., Chen, Y., Chen, J., Wen, Z., & Chen, S. (2016). High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 704- 712.
- [25] Wang, S. L., Chen, H. J., Liang, T. W., & Lin, Y. D. (2009). A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry*, 44(1), 70-76.
- [26] Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., ... & Kikuchi, H. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1157-1161.
- [27] Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., ... & Machida, M. (2007). Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(3), 646-670.
- [28] Aubert, D., Lehmbeck, J., Hansen, M. T., & Hjort, C. (2006). High level *Aspergillus* production of proteins. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 1-2.
- [29] Tanaka, M., & Gomi, K. (2021). Induction and repression of hydrolase genes in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 1237.
- [30] Joosten, V., Gouka, R. J., Van Den Hondel, C. A., Verrips, C. T., & Lokman, B. C. (2005). Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (V_HH s) by *Aspergillus awamori*. *Applied microbiology and biotechnology*, 66, 384-392.

- [31] Ercan, E., Suner, S. S., Silan, C., Yilmaz, S., Siddikoglu, D., Sahiner, N., & Tunali, M. (2022). Titanium platelet–rich fibrin (T-PRF) as high-capacity doxycycline delivery system. *Clinical Oral Investigations*, 26(8), 5429-5438.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Diclehan GÜNDÜZ

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (İng)
- **Yüksek lisans** : 2023, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2021-2022 Tübitak Bursiyeri, 1001 projesi, Biyoteknolojik ve Paratransgenetik Yöntemle Bacillus Mikroorganizmalarının Vektör Tabanlı Hastalıklara Karşı Geliştirilmesi
- 2022-2023 Tübitak Bursiyeri, 1004 projesi, İnflamazom Aracılı Otoenflamatuvar Hastalıkların Takip ve Tedavisine Yönelik Biyogösterge ve İleri Teknoloji Ürünü İlaçların Geliştirilmesi

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Gündüz D., Uysal S. "Production and Purification of Fibrinolytic Enzyme Nattokinase in *Aspergillus Oryzae*" ASES IV. International Scientific Research Conference, İstanbul, Türkiye, 13-14 Mayıs 2023, ss 361-362