

Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 1^η : Μεθοδολογία ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων

Παραδοτέο: D1_P1α

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ (ΟΛΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ – ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ), ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΟΡΝΙΘΕΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟ



Προκειμένου να προσδιοριστούν συγκεκριμένοι μεταβολίτες που σχετίζονται με τη χορήγηση εμπλουτισμένης σε φλαβονοειδή τροφή, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα ολιστικής μελέτης του μεταβολικού προφίλ σε πλάσμα από όρνιθες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα από όρνιθες που είχαν σιτιστεί με εμπλουτισμένη τροφή (α) σε εσπεριδίνη, (β) σε ναρινγίνη και (γ) μάρτυρες σε διαφορετικούς χρόνους από την εκκίνηση λήψης της τροφής (Πίνακας Ι).

Πίνακας Ι. Δειγματοχώρος		
Κωδικός δείγματος	Εμπλουτισμός / Μάρτυρας	Χρόνος
KE1.1-3	Εσπεριδίνη	4 ώρες
KN1.1-3	Ναρινγίνη	4 ώρες
KM1.1-3	Μάρτυρας	4 ώρες
KE2.1-3	Εσπεριδίνη	8 ώρες
KN2.1-3	Ναρινγίνη	8 ώρες
KM2.1-3	Μάρτυρας	8 ώρες
KE3.1-3	Εσπεριδίνη	30 μέρες
KN3.1-3	Ναρινγίνη	30 μέρες
KM3.1-3	Μάρτυρας	30 μέρες

Από τα παραπάνω δείγματα του πίνακα Ι, χρησιμοποιήθηκε αρχικά μικρότερος αριθμός δειγμάτων, αντιπροσωπευτικός από όλες τις κατηγορίες (Πίνακας ΙΙ):

Πίνακας ΙΙ. Δείγματα που αναλύθηκαν		
Κωδικός δείγματος	Εμπλουτισμός / Μάρτυρας	Χρόνος
KE1.2	Εσπεριδίνη	4 ώρες
KN1.1	Ναρινγίνη	4 ώρες
KM1.2	Μάρτυρας	4 ώρες



KE2.2 KE2.3	Εσπεριδίνη	8 ώρες
KN2.1 KN2.3	Ναρινγίνη	8 ώρες
KM2.2 KM2.3	Μάρτυρας	8 ώρες
KE3.4 KE3.6	Εσπεριδίνη	30 μέρες
KN3.3 KN3.4 KN3.6	Ναρινγίνη	30 μέρες
KM3.3	Μάρτυρας	30 μέρες

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στηρίχθηκε στη φασματοσκοπία NMR (Φασματογράφος Varian 600MHz) και συγκεκριμένα στην ακολουθία CPMG (Carr, Purcell, Meiboom and Gill) για την καταστολή των σημάτων των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη καταστολή του σήματος του νερού με την ακολουθία PRESAT. Με την τεχνική αυτή, αποφεύγεται η επιπρόσθετη διαδικασία απομάκρυνσης των πρωτεϊνών με προσθήκη ακετονιτριλίου ή μεθανόλης. Οι παράμετροι των ακολουθιών παρουσιάζονται στον Πίνακα III.

Αρχικά δοκιμάστηκαν 2 τρόποι παρασκευής/προεπεξεργασίας των δειγμάτων.

(α) Σε 150μL πλάσματος προστέθηκαν 550μL διαλύματος φυσιολογικού ορού (saline) σε 10% D₂O και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 16000g για 15 λεπτά στους 10 °C. Από το υπερκείμενο ελήφθησαν 500μL και σε αυτά προστέθηκαν 8.8μL D₂O με εσωτερικό πρότυπο μετά νατρίου άλας TSP-d4 (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid) συγκέντρωσης 5.8 mM. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκο NMR 5mm.

(β) 150μL πλάσματος λυοφιλοποιήθηκαν (~5h). Στο στερεό προϊόν προστέθηκαν 600μL D₂O με εσωτερικό πρότυπο TSP-d4 συγκέντρωσης 0.1 mM και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g στους 4°C για 10 λεπτά και τοποθετήθηκε σε σωληνίσκο NMR 5mm.



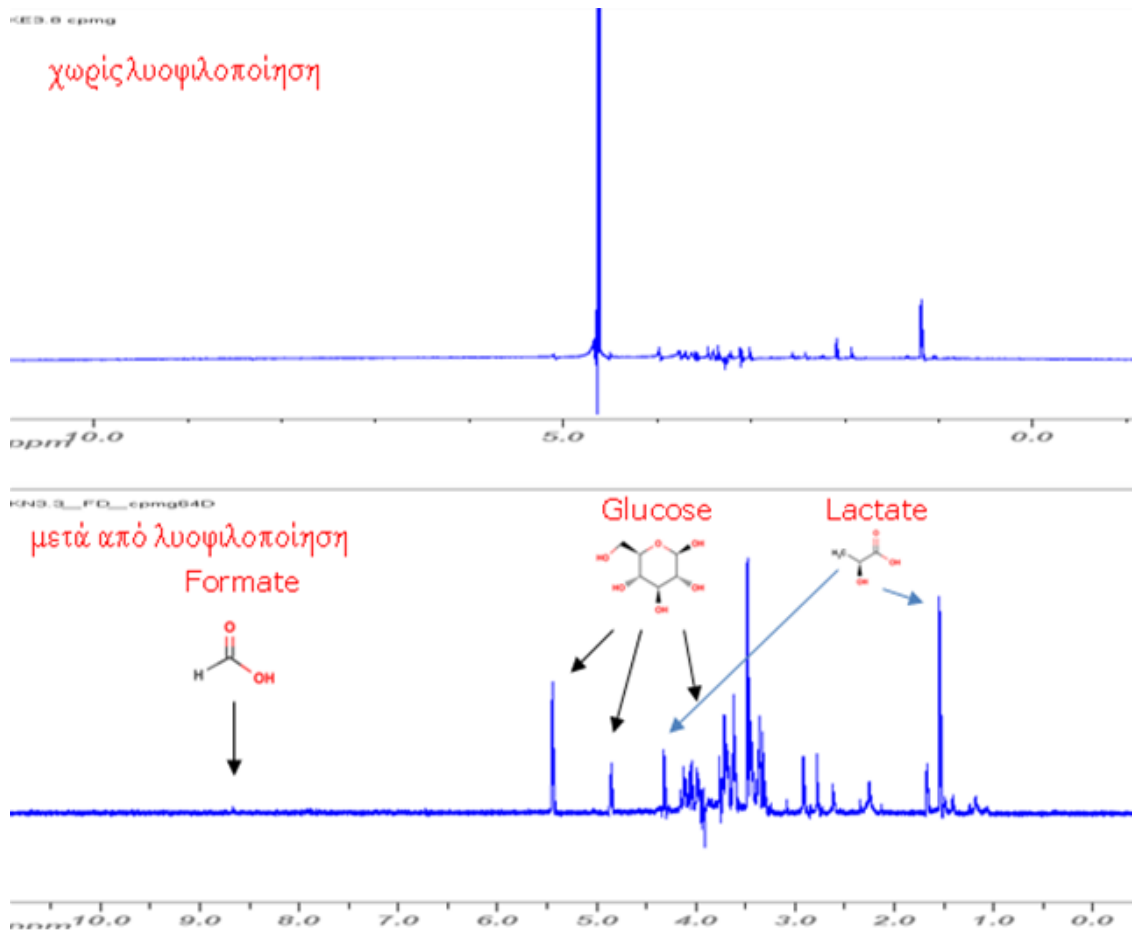
Πίνακας III. Παράμετροι λήψης φασμάτων NMR		
Παράμετρος	Μέθοδος Α	Μέθοδος Β
LOCK	10% D ₂ O	D ₂ O
SW	7225 Hz (-1 to 11 ppm)	
PW90	8-9 us depending on the sample	
SAT PWR	12	2
SAT FRQ	-217 to -221Hz depending on the sample	
SAT DLY	4s	2s
d2	0,08	0,001
bt	0,32	0,2
Relaxation delay	8,5 s	
Number of scans	256	256
Complex points	32K	32K

Σύγκριση των δύο μεθόδων έδειξε ότι ενώ η μέθοδος Α είναι συντομότερη χρονικά, η μέθοδος Β υπερτερούσε στα ακόλουθα σημεία.

- Η λυοφιλοποίηση έδωσε τη δυνατότητα παρατήρησης κορυφών μεταβολιτών που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στο πλάσμα (Σχήμα 3),
- Η απουσία της έντονης κορυφής νερού δεν απαιτούσε μεγάλη ένταση στην ακολουθία καταστολής της (μικρή τιμή SAT PWR) κάτι που είναι απαιτούμενο για την ορθή λήψη της ποσοτικής ακολουθίας CPMG.

Ως αποτέλεσμα, όλα τα φάσματα NMR ελήφθησαν με τη μέθοδο Β.





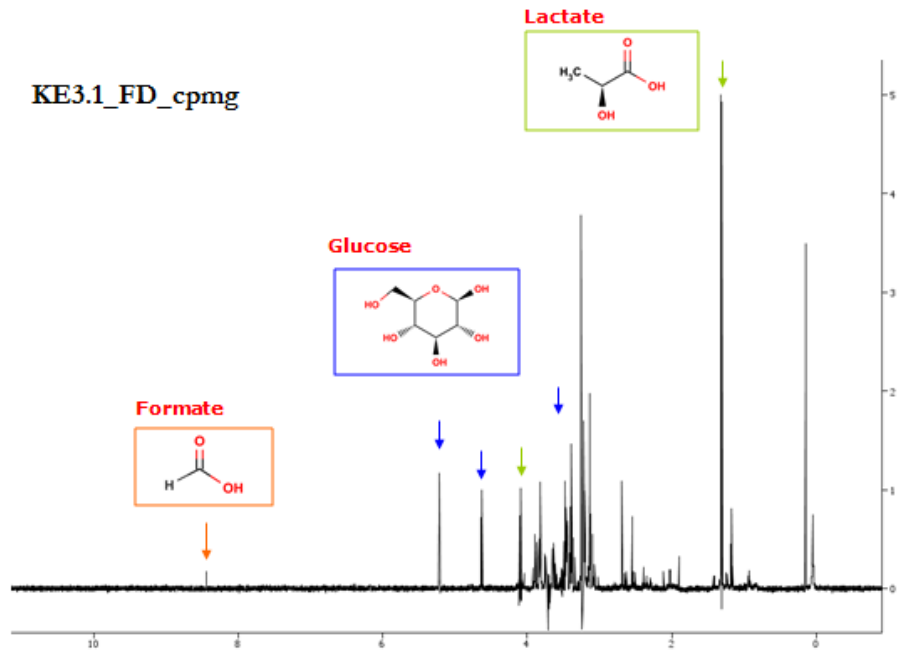
Σχήμα 3: Σύγκριση των μεθόδων προεπεξεργασίας Α και Β.

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

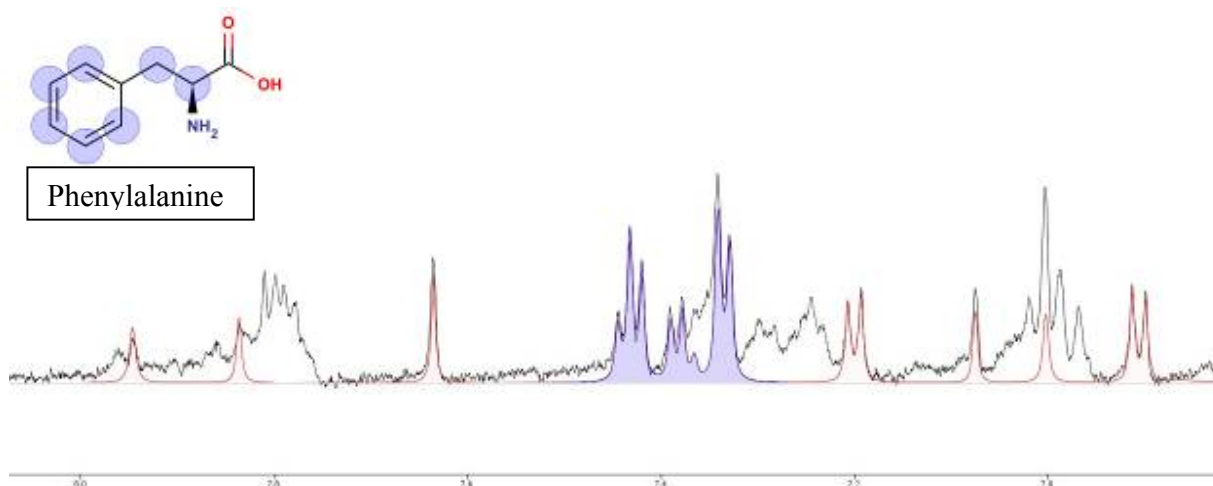
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



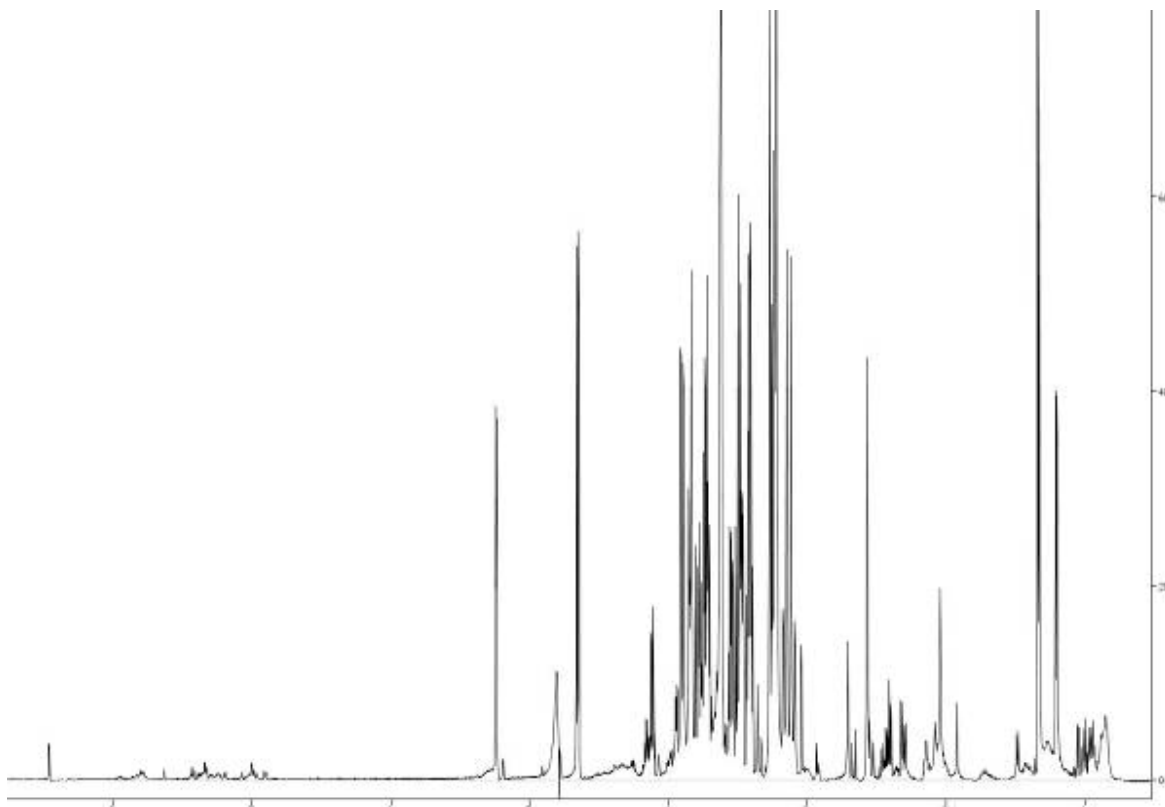
Σχήμα 4: Προσδιορισμός βασικών μεταβολιτών στο φάσμα πρωτονίου του πλάσματος.

Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών στο φάσμα ^1H NMR του πλάσματος χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο λογισμικό NMR Suite 7.5 από την εταιρία Chenomx. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε μέσα από βιβλιοθήκες πρότυπων ουσιών (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Ταυτοποίηση μεταβολιτών στο φάσμα πρωτονίου του πλάσματος με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού, Chenomx NMR Suite 7.5.

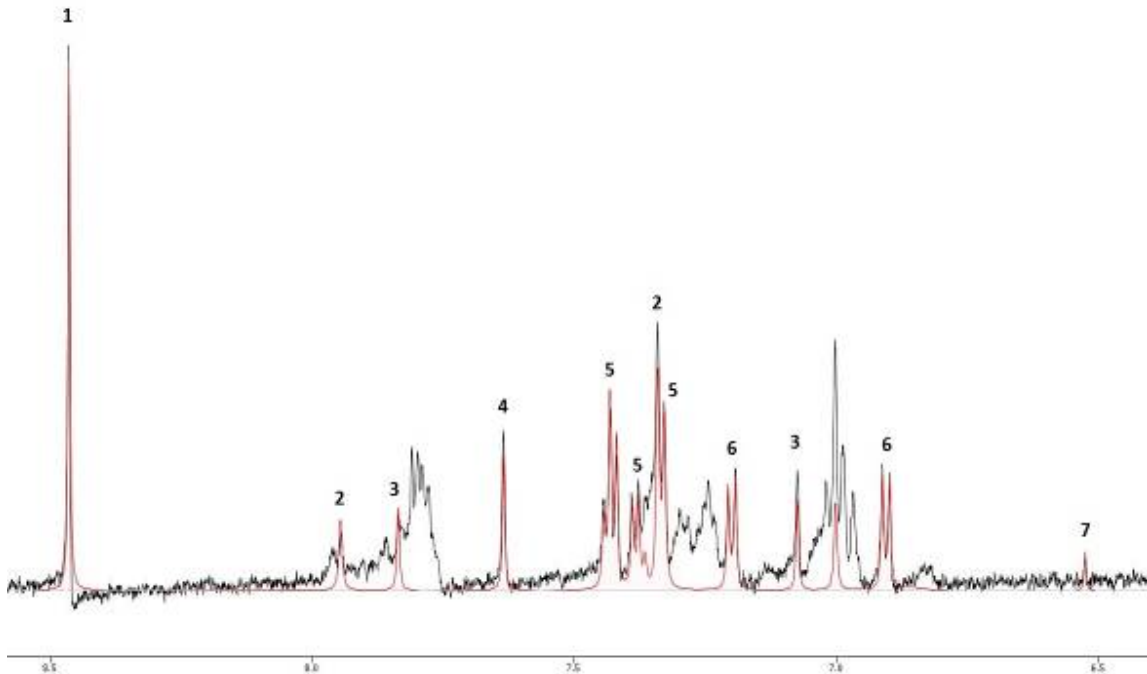
Το φάσμα ^1H NMR του πλάσματος είχε την εικόνα όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.



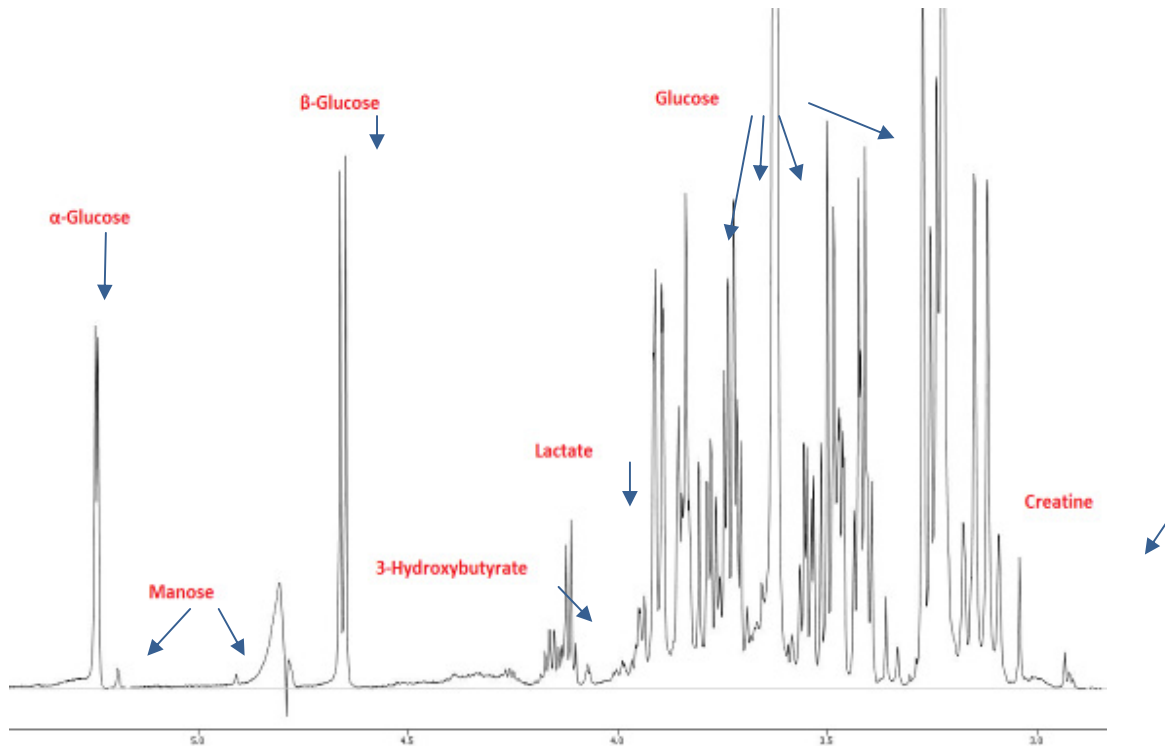
Σχήμα 6: Τυπικό φάσμα ^1H NMR του πλάσματος με χρήση ακολουθίας CPMG.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τρεις διαφορετικές περιοχές αυτού του φάσματος (αρωματική περιοχή Σχήμα 7, γλυκοζιτική Σχήμα 8, αλειφατική περιοχή Σχήμα 9) μεγενθυμένες και με τις αποτιμήσεις των κορυφών ως προς τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν.

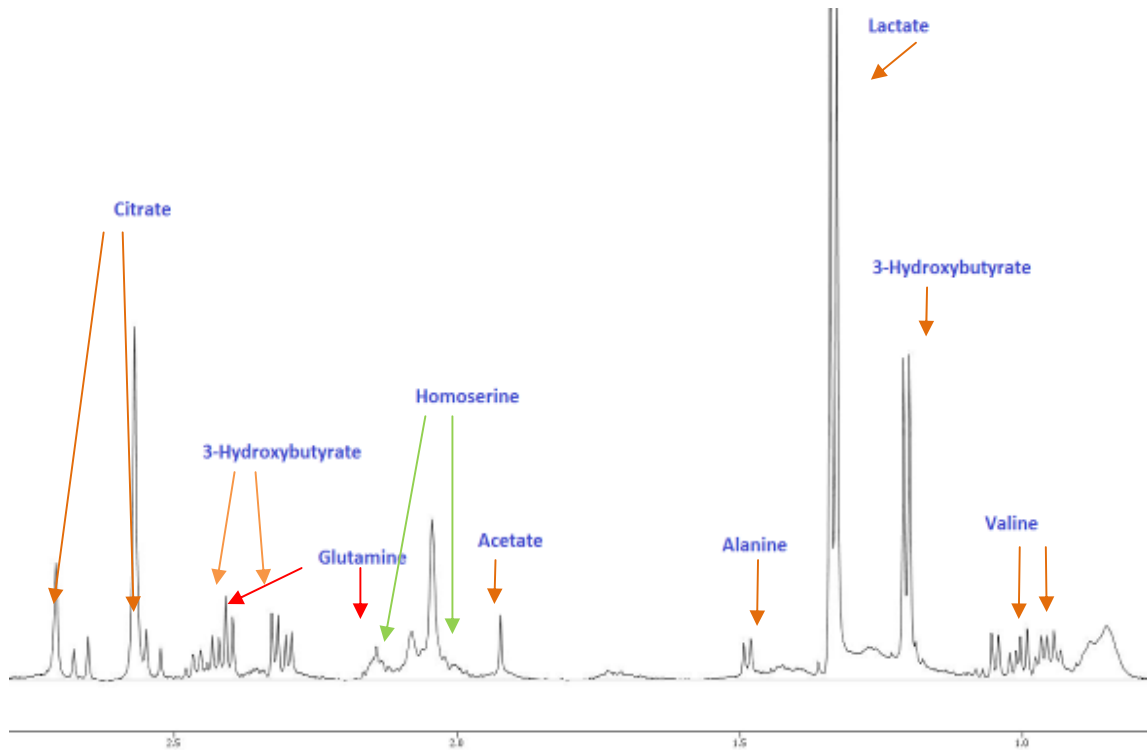




Σχήμα 7: Φάσμα ^1H NMR πλάσματος - αρωματική περιοχή. Αποτίμηση μεταβολιτών: (1) Formate, (2) Carnosine, (3) Histidine, (4) Pyridoxine, (5) Phenylalanine, (6) Tyrosine, (7) Fumarate.

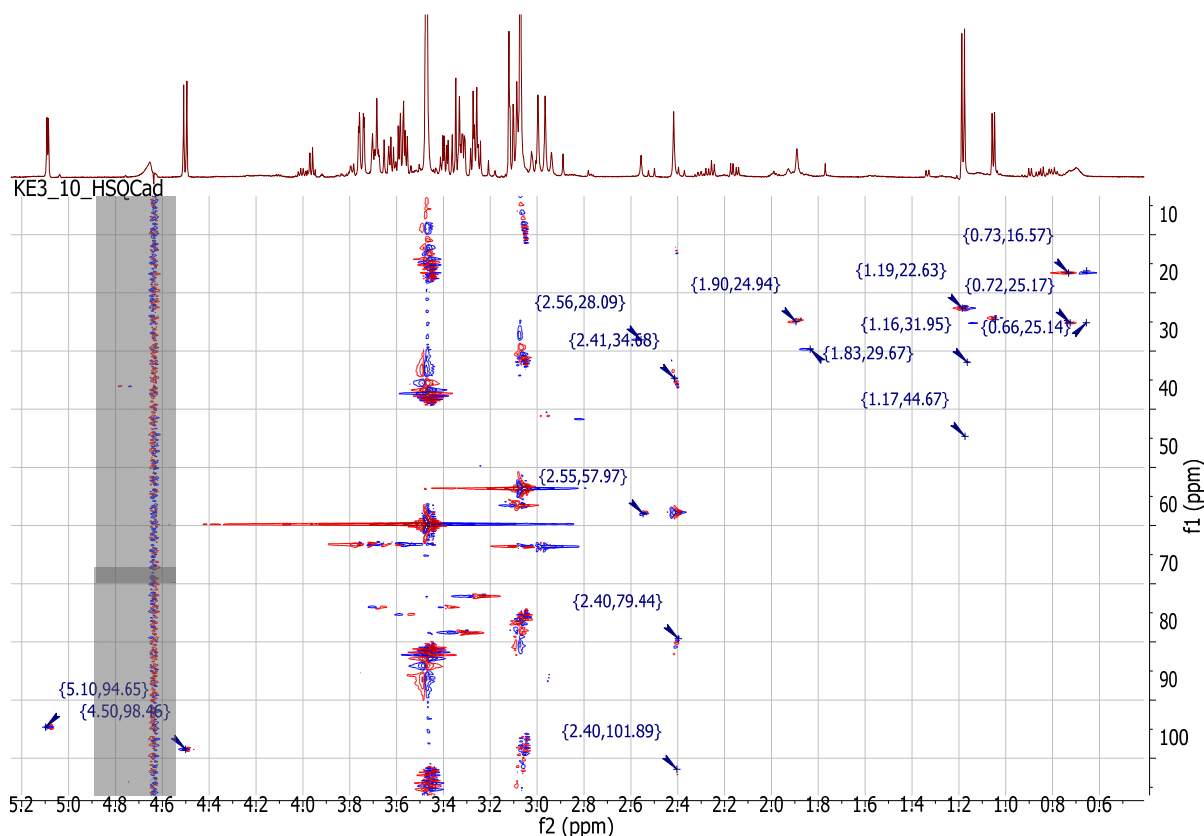


Σχήμα 8: Φάσμα ^1H NMR πλάσματος - γλυκοζιτική περιοχή.



Σχήμα 9: Φάσμα ^1H NMR πλάσματος - αλειφατική περιοχή.

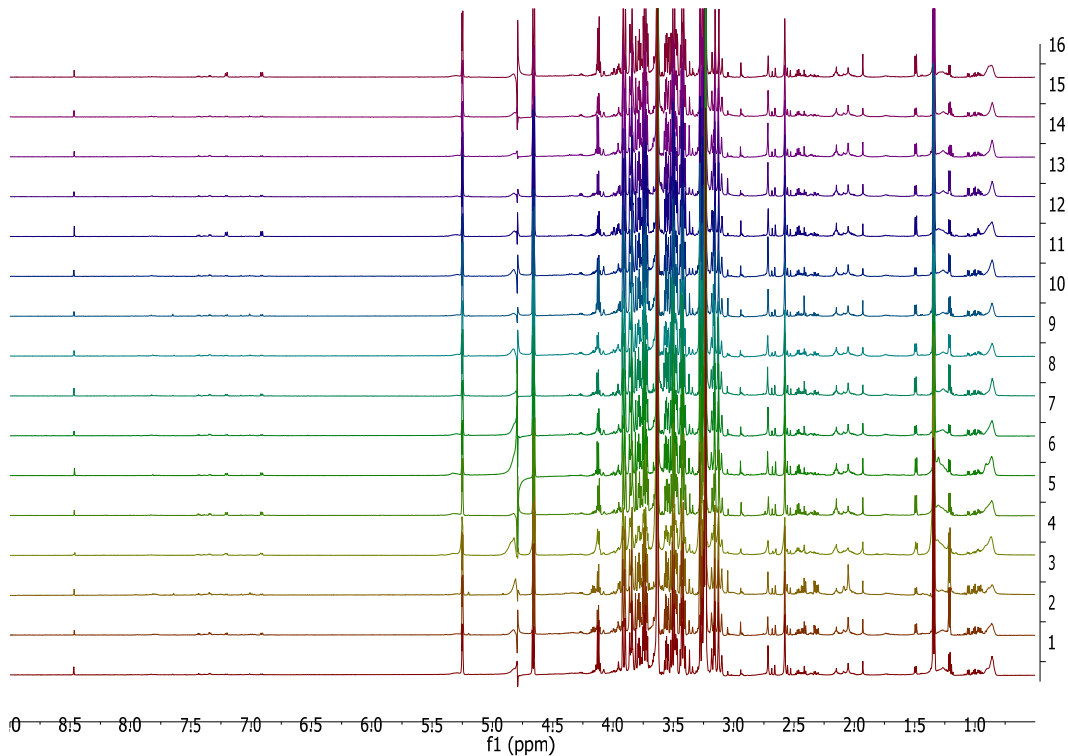
Η διαδικασία θα συνεχιστεί και θα υποστηριχτεί από πειράματα 2D NMR (Σχήμα 10).



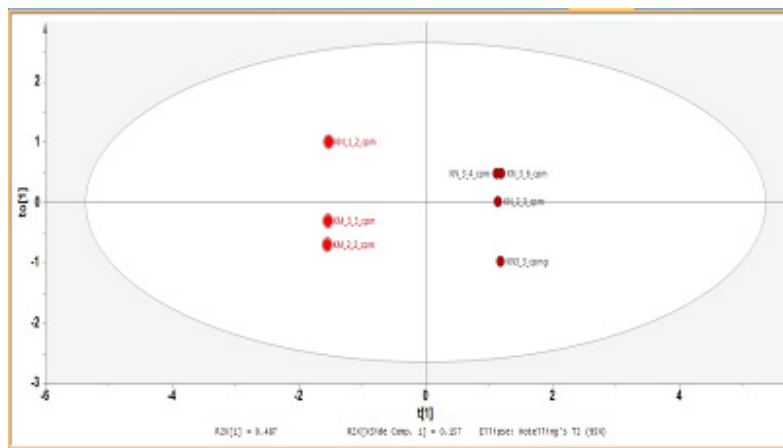
Σχήμα 10: Φάσμα 2D NMR-HSQC πλάσματος.

Για την ολιστική μελέτη, η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MestReNova v8.1.1. Συγκεκριμένα, έπειτα από το μετασχηματισμό Fourier, τη διόρθωση της φάσης και της γραμμής βάσης (Σχήμα 11), εξαλείφθηκαν διαφορές στη χημική μετατόπιση κορυφών λόγω διαφορετικού pH με την ενσωματωμένη ρουτίνα ευθυγράμμισης (alignment). Εν συνεχεία, τα φάσματα τμηματοποιήθηκαν ανά 0,001ppm και οι τιμές των ολοκληρώσεών τους εξήχθησαν ως αρχεία ASCII για περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA), προκειμένου να διερευνηθεί αν υπάρχει κάποια τάση ταξινόμησης (Σχήμα 12).





Σχήμα 11: Επεξεργασία φασμάτων NMR με MestReNova v8.1.1.



Σχήμα 12. PCA των δεδομένων από πλάσμα όπου παρατηρείται τάση διαχωρισμού των δειγμάτων που αφορούν όρνιθες που έχουν λάβει εμπλουτισμένη τροφή με τους μάρτυρες.

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Α. Κομινάκης
Αν. Καθηγητής

Μ. Χαρισμιάδου
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής

