

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

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

*Εργαστήριο Ζωοτεχνίας*

MIS 380231

**Δράση 7<sup>η</sup> : Επίδραση των φλαβονοειδών στην έκφραση γονιδίων**

**Παραδοτέα: D7\_P2**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΔΙΠΛΩΔΗ ΙΣΤΟ, ΣΤΟ ΜΥΪΚΟ ΙΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΗΠΑΡ ΑΜΝΩΝ**



Σκοπός του πακέτου εργασίας ήταν η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τον μεταβολισμό των λιπών μεταξύ πειραματικών ομάδων αμνών από τη δράση 4 και η διαπίστωση πιθανής επίδρασης κάποιας ή κάποιων επεμβάσεων στην έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό τα γονίδια: της αδιπονεκτίνης (*adipoQ*), του ενεργοποιημένου υποδοχέα  $\gamma$  των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (*ppar- $\gamma$* ), και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (*fasn*).

### **Υλικά και μέθοδοι**

#### ***Δειγματοληψία***

Ελήφθησαν δείγματα περινεφρικού λιπώδους ιστού, ήπατος και μυϊκού ιστού από 11 αμνούς από κάθε μια από τις 4 πειραματικές ομάδες (Μάρτυρας-Μ, Εσπεριδίνη-Ε, Ναρινγίνη-Ν και Βιταμίνη Ε-VE) της δράσης 4 (*Επίδραση των φλαβονοειδών στην ποιότητα σφαγίου και κρέατος αμνών*). Τα δείγματα των ιστών κατά την λήψη τους καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως την απομόνωση του RNA.

#### ***Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA***

Από το ήπαρ απομονώθηκε ολικό RNA με τη χρήση του κιτ InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (STRATEC Biomedical, Birkenfeld, Germany). Η ομογενοποίηση και λύση του κοιλιακού λιπώδους ιστού έγινε αρχικά με τη χρήση του αντιδραστηρίου RNAiso Plus (TAKARA Bio Inc.) και στη συνέχεια η απομόνωση και ο καθαρισμός του ολικού RNA έγινε με το κιτ InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (STRATEC Biomedical, Birkenfeld, Germany). Τέλος η απομόνωση του ολικού RNA από τον μυϊκό ιστό έγινε με το αντιδραστήριο RNAiso Plus (TAKARA Bio Inc.). Οι παραπάνω απόμονώσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών και έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των πειραματικών πρωτοκόλλων.

Στη συνέχεια έγινε αντίστροφη μεταγραφή του RNA από το κοιλιακό λίπος σε cDNA με το αντιδραστήριο PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time, Clontech/TAKARA Bio Inc.)



σύμφωνα με τις οδηγίες για SYBR Green Assay και έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των πειραματικών πρωτοκόλλων.

### ***Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση των υπό εξέταση γονιδίων***

Βάσει των διαθέσιμων γονιδιακών και mRNA αλληλουχιών των παραπάνω γονιδίων σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων του cDNA των γονιδίων αυτών με real time PCR χωρίς να ενισχύεται το γενωματικό (g)DNA (Πίνακας 1). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του λογισμικού NCBI-Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και περαιτέρω έλεγχος της καταλληλότητας των εκκινητών *in silico* έγινε ελέγχοντας τις πιθανές δευτεροταγείς δομές του προϊόντος ενίσχυσης με το λογισμικό mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>). Επιπλέον σχεδιάστηκαν εκκινητές και για το γονίδιο της β-ακτίνης (*actb*) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης και τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα δείγματα cDNA από τις έξι πειραματικές ομάδες.

### ***PCR πραγματικού χρόνου***

Διενεργήθηκε μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε 10 δείγματα κάθε πειραματικής ομάδας, εκτός της ομάδας της Βιταμίνης Ε για την οποία έγιναν αναλύσεις σε 9 δείγματα. Για το σκοπό αυτό cDNA ενισχύθηκε με το αντιδραστήριο KAPA SYBR® Fast qPCR Universal (KAPA Biosystems) και τους εκκινητές των επί μέρους γονιδίων στο σύστημα real time PCR 7500 της Applied Biosystems® (Life Technologies), έπειτα από δοκιμασίες βελτιστοποίησης του πειραματικού πρωτοκόλλου. Για την σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς από διαδοχικές αραιώσεις, 1:5 ή 1:3, ενός αρχικού δείγματος cDNA αναφοράς το οποίο ήταν μείγμα από όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Κάθε δείγμα cDNA ενισχύθηκε σε δυο επαναληπτικές αντιδράσεις. Η διόρθωση της έκφρασης κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα cDNA έγινε βάσει της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *actb*. Η



εξαγωγή των αποτελεσμάτων (υπολογισμός κύκλων ουδού, threshold cycles, Ct) έγινε με το λογισμικό 7500 v2.3 (Applied Biosystems®/Life Technologies).

**Πίνακας 1:** Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια: β-ακτίνη (*actb*), της αδιπονεκτίνης (*adipoQ*), του ενεργοποιημένου υποδοχέα γ των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (*ppar-γ*), και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (*fasn*)

Γονίδιο	Όνομα Εκκινητή	GeneBank Accession No	Αλληλουχία	cDNA amplicon size	genomic amplicon size
<i>actb</i>	ovACTB_F ovACTB_R	Sari et al, 2009	GCAAAGACCTCTACGCCAAC TGATCTTGATCTTCATCGTGCT	120bp	-
<i>adipoq</i>	oarAdipoQ_F oarAdipoQ_R	mRNA: KJ159213.1 genomic DNA: NC_019458.1	TCCAGGTCTCGTTGGTCCTA TCCAGTCCCACACTGAATGC	150bp	-
<i>ppar-γ</i>	oarPPARg_F oarPPARg_R	mRNA: AY137204 genomic DNA: NC_019476.1	CCCTTCACCACCGTTGACTT CTCCACTTTGATTGCACTTTGGT	138bp	-
<i>fasn</i>	oarFASN_F oarFASN_R	mRNA: XM_012186804.1 genomic DNA: NC_019468.1	GTTGACTCCCTGAAGAACATCCT ACAGTTCACCAAGCCCACAA	102bp	-

### Στατιστική επεξεργασία

Για τον υπολογισμό του λόγου της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου στην κάθε πειραματική ομάδα ως προς την ομάδα του μάρτυρα (R) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$R = E_{\text{target}}^{\Delta Ct \text{ target (MEAN control - MEAN sample)}} / E_{\text{ref}}^{\Delta Ct \text{ ref (MEAN control - MEAN sample)}}$$

Όπου:

$E_{\text{target}}$ : η αποδοτικότητα της αντίδρασης για το εξεταζόμενο γονίδιο (*adipoq*, *fasn* ή *ppar-γ*)

$E_{\text{ref}}$ : η αποδοτικότητα της αντίδρασης για το γονίδιο της β-ακτίνης

$\Delta Ct \text{ target}$ : Η διαφορά του μέσου κύκλου ουδού (threshold cycle) για το εξεταζόμενο γονίδιο για την ομάδα του μάρτυρα (control) από την πειραματική ομάδα (E, N ή VE)



ΔCt ref: Η διαφορά του μέσου κύκλου ουδού (threshold cycle) για την β-ακτίνη για την ομάδα του μάρτυρα (control) από την πειραματική ομάδα (E, N ή VE)

Η στατιστική επεξεργασία για την σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε με το λογισμικό Relative Expression Software Tool-Multiple Condition Solver (REST-MCS©-version 2) το οποίο χρησιμοποιεί το pair wise fixed reallocation randomisation test© (Pfaffl *et al.* 2002) για τον έλεγχο σημαντικότητας. Ως επίπεδο σημαντικότητας α ορίζεται το 0,05.

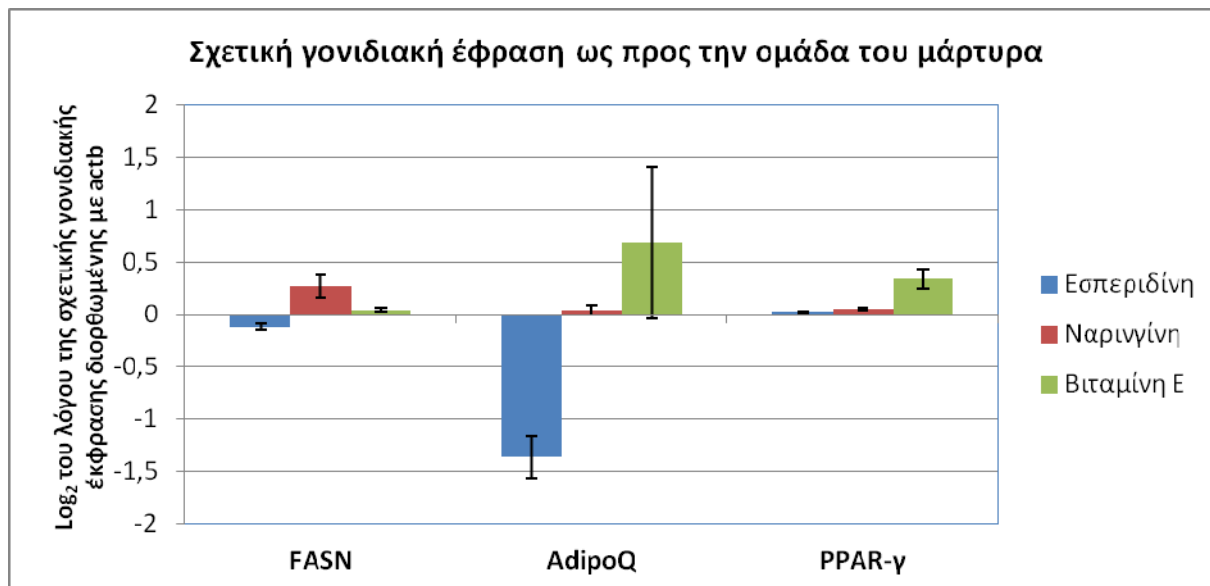
### **Αποτελέσματα**

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα μέσα επίπεδα σχετικής έκφρασης των γονιδίων *adiponectin* (*adipoQ*), *fasn* και *ppar-γ* στο ήπαρ των αμνών των πειραματικών ομάδων E, N και VE ως προς την ομάδα του μάρτυρα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τους λογαρίθμους με βάση το 2 των λόγων της μέσης διορθωμένης έκφρασης κάθε γονιδίου στο λιπώδη ιστό ή στο ήπαρ ορνιθίων από 3 διατροφικές ομάδες ως προς την μέση διορθωμένη έκφραση στην ομάδα του μάρτυρα. Δίδονται και τα στατιστικά σφάλματα. Σε κάθε βιολογικό δείγμα η έκφραση των παραπάνω γονιδίων διορθώθηκε βάσει της αντίστοιχης έκφρασης της β-ακτίνης (*actb*) η οποία που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Ο αριθμός των βιολογικών επαναλήψεων ανά πειραματική ομάδα ήταν n=10 εκτός από την ομάδα της βιταμίνης E όπου n=9. Σε κάθε βιολογικό δείγμα η έκφραση των γονιδίων αναφοράς (*actb*) και ενδιαφέροντος (*adipoq*, *fasn*, *ppar-γ*) μετρήθηκε εις διπλούν.



**Διάγραμμα 1:** Σχετική έκφραση των γονιδίων *adipoq*, *adipor2*, *fasn* και *ppar-γ* στις πειραματικές ομάδες ως προς την ομάδα του μάρτυρα στο ήπαρ.



### Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ φαίνεται ότι η χορήγηση Εσπεριδίνης, Ναρινγίνης ή Βιταμίνης Ε στους αμνούς δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την έκφραση των τριών γονιδίων που μελετήθηκαν (*fasn*, *adipoq* και *ppar-γ*).

Θα ακολουθήσει η μελέτη της έκφρασης των τριών γονιδίων στον λιπώδη και τον μυϊκό ιστό.

### Βιβλιογραφία

Pfaffl M.W., G.W. Horgan & L. Dempfle. 2002. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research. 30(9): E36

Sari, I. P., A. Rao, J. T. Smith, A. J. Tilbrook, and I. J. Clarke. 2009. Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. Endocrinology 150:5549-5556. doi 10.1210/en.2009-0775



Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής  
Λέκτορας

Μ. Χαρισμάδου  
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης  
Ερευνητής

