ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

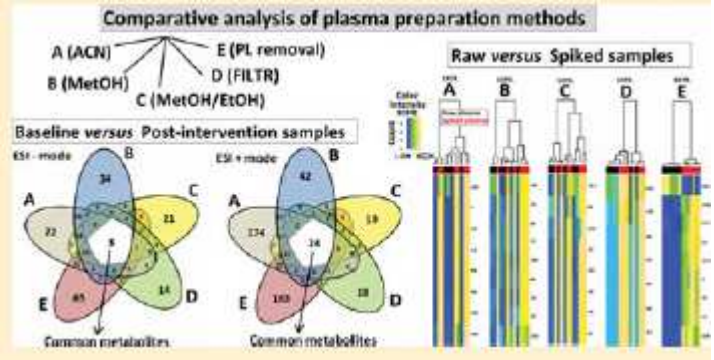
از نشریات معتبر

تجزیه و تحلیل مقایسه ای روش های آماده سازی نمونه برای به کار بردن متابولوم جریان خون پیچیده: هنگامی که حداقل میزان آن نیز زیاد است.

چکیده

آماده سازی نمونه خون قبل از سانتریفیوژ LC-MS متابولیک یکی از چالش برانگیزترین و دارای بخش‌های مستعد خطا از روش‌های تحلیلی است. از طرف دیگر پروتئین‌ها، فسفولیپیدهای موجود در جریان خون به علت اثرات زمینه و پدیده‌های سرکوب یونی شناخته شده هستند، بنابراین تنوع زیستی ایجاد می‌کنند. با این وجود، تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه که بطور معمول استفاده می‌شوند؛ حذف آنها را قبل از تجزیه‌وتحلیل در نظر نگرفته‌اند. نمونه‌های مخلوط پلاسما و سرم استفاده شده به عنوان ماده بیولوژیکی (زیستی) تا حدی به عنوان نمونه‌های خام و تا حدودی نیز مشخص شده با غلظت‌های آشکار یک مخلوط متابولیت (1-5μg/mL) استفاده شده‌اند. پیش از تجزیه‌وتحلیل متابولیکی LC-ESI-qToF-MS هدایتی، نمونه ها در معرض روش‌های آماده سازی مختلف از جمله استخراج با حلال‌های آلی (استونیتریل، متانول و متانول/اتانول)، روش بدون حلال بر پایه غشا و یک روش هیبرید ترکیبی از استخراج حلال و SPE- با حذف غیر مستقیم فسفولیپیدها قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای در میان روش‌های آماده‌سازی نمونه بر اساس ظرفیت برای تعیین ترکیبات درون‌زا (آندوژن) در نمونه‌های خام، تمایز نمونه خام از نمونه‌های خشک شده (تغلیظ شده) و تغییرات متابولیکی آشکار در زندگی واقعی، به دنبال یک دخالت رژیم غذایی بود. سرعت روش، حداقل نمونه بکار رفته، سازش‌پذیری با خودکار شدن و قابلیت اجرا برای مطالعات متابولیکی در مقیاس بزرگ همچنین در نظر گرفته شده است. ترکیب حلال از بین برنده پروتئین و حذف انتخابی فسفولیپیدها مشخص شد که از لحاظ بهبود پوشش متابولیت غیر لیپیدی، استخراج با قابلیت تولید مجدد، سرعت و سازگاری با خودکار شدن، حداقل کردن اثرات زمینه در میان محتمل‌ترین علل برای عملکرد استخراج خوب وابسته با حذف گونه های فسفولیپید، مناسب‌ترین روش است. مزیت اصلی روش‌های استخراج با حلال معمولی پوشش اطلاعاتی متابولیت برای گونه‌های با وزن مولکولی کم لیپیدی بود و استخراج با استونیتریل بطور معمول انتخاب دوم برای آماده سازی نمونه بود. تصفیه بسیار زیاد حداقل روش موثر برای آماده سازی سرم و پلاسما بود؛ بنابراین، استفاده آن بدون یک مرحله استخراج با حلال

نمونه‌ها باید در نظر گرفته شود. با توجه به داده‌های حاضر، هیچ دلیلی برای این اعتقاد وجود ندارد که فدا کردن اطلاعات بر روی ترکیبات لیپیدی یک قیمت بیش از حد بالا برای پرداخت به منظور بدست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد متابولیت‌های غیر لیپیدی LMW است.



تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای روش‌های آماده سازی نمونه

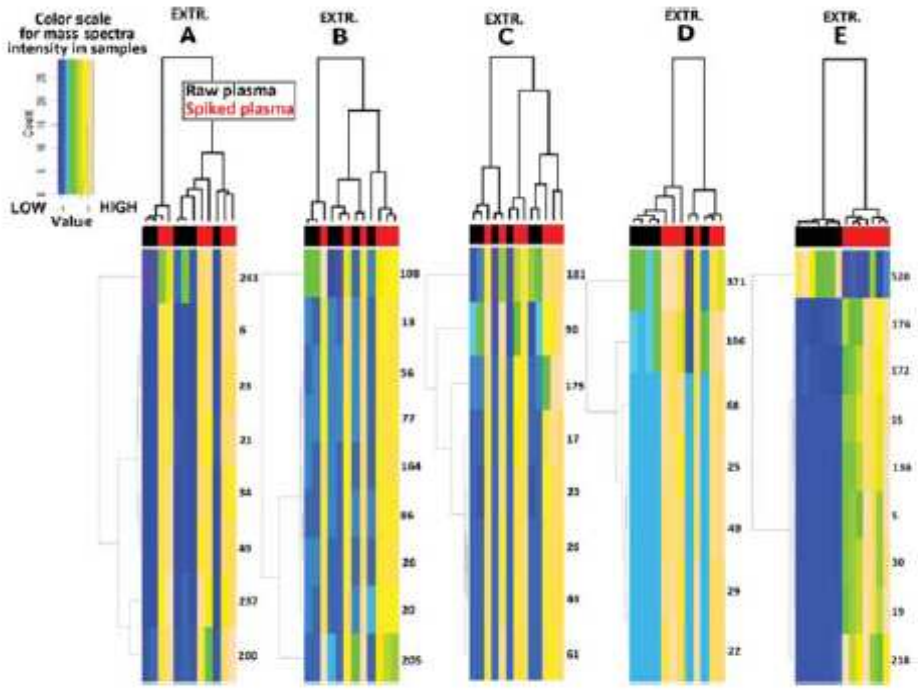
برای اینکه با موفقیت با چالش کشف بیومارکر و فرضیه نسل روبرو شویم، روش‌های تکنولوژی محور مانند متابولومیک‌ها برای ارائه یک بررسی جامع (انگشت نگاری) همه متابولیت‌های با وزن مولکولی پایین (LMW) حاضر در سیستم سلولی و زیستی در یک لحظه معین لازم هستند. تکنیک های کروماتوگرافی مایع / اسپکترومتری جرمی (طیف سنجی جرمی) (LC-MS) به عنوان پایدارترین روش برای آزمایش بزرگترین تعداد متابولیت‌ها در نمونه‌های زیستی تایید شده‌اند؛ با این حال، جهانی سازی یک چالش سنگین است هنگامی که تیمارهای نمونه قبل از تجزیه و تحلیل مورد نیاز باشد. آماده سازی نمونه قبل از جداسازی کروماتوگرافی هنوز یک مرحله تحلیلی مستعد خطا و زمان‌بر است، به ویژه هنگامی که ماتریس‌های زیستی پیچیده مانند جریان‌های خون وجود داشته باشد. درنتیجه، در حال حاضر، هیچ تکنیک جهانی مناسب برای آماده سازی نمونه جریان خون بکار رفته برای انگشت نگاری متابولومیک وجود ندارد. از بین بردن پروتئین حداقل تیمار نمونه مورد نیاز قبل از تجزیه و تحلیل، برای حفظ سلامت سیستم LC-MS و کاهش شدید اثرات زمینه (ماتریس) است، و بطور معمول از طریق آماده سازی با حلال آلی ، از بین بردن پروتئین، (با استفاده از حرارت یا اسید) ، یا از طریق تکنیک های بر پایه غشا مانند تصفیه بسیار زیاد بدست آمده است. با وجود این، تکنیک های آماده سازی نمونه معمولی که انجام می‌شوند به حساب نمی‌آورند که، علاوه بر پروتئین‌ها، ترکیبات دیگر آندوژن (درون زاد)

برای نمونه‌های زیستی یک چالش اصلی در روش‌های تحلیلی زیستی LC-ESI-MS هستند. بالاتر از همه، گونه‌های فسفولیپیدی (بطور عمده گلیسروفسفوگلیکان‌ها ، فسفولپیدهای اصلی در پلاسما) ممکن است در پوشش متابولیت LMW و تکرار پذیری ، به ویژه برای ترکیبات قطبی لطمه وارد کنند، بنابراین تنوع زیستی پنهان کنند. در غیاب گرادیان مناسب فاز متحرک ، آنها در ستون تحلیلی (تسریع تخریب ستون) تجمع می-یابند و به کندی از ستون در جریان‌های تحلیلی بعدی ، همراه با متابولیت‌های دیگر (افزایش تدریجی خط پایه اختلال، القا اثرات زمینه، تغییر مشخصه‌های جداسازی) آزاد می‌شوند. فسفولیپیدها همچنین به علت سرکوب یونی و افزایش پدیده‌ها، برای اثر نامطلوب بر دقت جرم گونه های کمک شوینده (به ویژه در +ES) ، برای تعامل با متابولیت‌های LMW دیگر و اغلب برای ارائه متغیرهای اختلال، با توجه به جنسیت قابل توجه آنها ، فردی یا حتی تنوع مربوط به زمان در خون شناخته شده‌اند. علی رغم این ملاحظات، حذف آنها از جریان‌های خونی قبل از تجزیه و تحلیل متابولیک بی‌هدف هنوز در بررسی نشده است.

هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثرات مشترک و و روش‌های پیشنهادی جدیدبرای استخراج پلاسما و سرم، از طریق کاربرد یک qToF-MS بر پایه جریان متابولومیک است. اثرات سه حلال معمولی بر پایه روش‌های آماده سازی پروتئین، یک تکنیک بدون حلال بر پایه غشا، و ترکیب حلال پروتئین زدایی با حذف فسفولیپیدها از لحاظ کارایی استخراج، حداقل کردن اثرات زمینه، و تکرار پذیری استخراج، در چارچوب دو مطالعه متابولیسم تغذیه ارزیابی شدند. جنبه‌های عملی دیگر، مانند سرعت روش، پیچیدگی و سازگاری با خودکار شدن در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های شیمومتری شامل مقایسه‌های روش داخلی مستقل، تجزیه و تحلیل (متا) درجه دوم در داخل روش، و تعریف ساختاری کمک کننده از لحاظ محاسبات رژیم غذایی مرتبط با نامزدهای بیومارکری می‌باشد.

بخش تجربی

یک بررسی اجمالی از آماده سازی نمونه و یک الگوی (روند کار) متابولیسمی بکار رفته برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای در اطلاعات پشتیبان (تکمیلی) نشان داده شده است (شکل S-1).



شکل 1. نقشه حرارتی منعکس کننده ظرفیت اختلاف نمونه های خام در مقابل خشک شده (1µg/mL) پلاسما با توجه به آماده سازی نمونه ابتدایی (آستانه pvalue = 0.001 ؛ فاصله خوشه پیرسون، حالت یون منفی) . هر سلول رنگی نشان دهنده شدت یک طیف جرمی در یک نمونه، با توجه به مقیاس رنگ در سمت چپ. ردیف‌ها طیف جرمی هستند، و ستون‌ها نمونه‌های خام (سیاه) و خشک (قرمز) پلاسما هستند. نقشه حرارتی ارائه شده از طریق تابع singHeatMap از الگوریتم MAIT بدست آمده است.

حلال‌ها و معرف‌ها. همه حلال‌های آبی با استفاده از آب بسیار خالص تهیه شده از یک سیستم Millipore Milli-Q گرادیانی A10 (Millipore, Bedford, MA, USA) آماده شدند. HPLC بر پایه متانول، o-اسید فسفریک (85٪)، و اسید فرمیک از شرکت شیمیایی Scharlau (Barcelona, Spain) خریداری شد، و LC-MS بر پایه استونیتریل 0.1٪ اسید فرمیک از Fluka خریداری شد. مواد شیمیایی زیر بطور تجاری تهیه شدند: D-L-کارنیتین، L-فنیل آلانین، L-تریپتوفان، گلیکوکنو دی اکسی کولیک اسید، گالیک اسید، اسید سیرینجیک، (-)-اپی‌کاتکین، لوسین، ایزولوسین، اسید پالمتیک، استیل کولین کلرید، استیل-L-کارنیتین هیدروکلرید، 1-O-پالمتیل-sn-گلیسرو-3-فسفوکولین، 1-O-استروئیل-sn-3- فسفوکولین، α-هیدروکسی

بوتیریک اسید (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)، 4-هیدروکسی پوریک اسید (PhytoLab GmbH & Co. KG)، و نارینجین(Extrasynthes, Genay, France).

مخلوط متابولیت 16 جزئی آبی. یک مخلوط استاندارد متابولیت 16 جزئی از ترکیبات مربوطه بیولوژیکی آماده شدند، که شامل سه اسید آمینه، دو کارنیتین، سه اسید آلی، دو آسیل گلیسین گونژوکه، یک استر از اسید استیک و کولین، یک اسید چرب، دو لیزوفسفاتیدیل کولین و دو ترکیب فلاونوئید (جزئیات در اطلاعات تکمیلی آمده است). مخلوط استاندارد برای کنترل کیفی داده‌ها، برای نظارت بر دقت جرم، زمان نگهداری، شدت سیگنال‌ها، و راندگی نهایی در حساسیت ابزاری ، و برای ارزیابی توانایی هر روش آماده سازی نمونه برای برجسته کردن اختلافات در میان نمونه‌های زیستی خشک شده (نمونه های می) ، خشک نشده، بطور مختلف خشک شده استفاده شده است.

نمونه های زیستی. نمونه‌های سرم و پلاسما افراد اهداکنندگان سالم از دو آزمایش با دخالت رژیم ، یعنی در آغاز (T0) و در انتها (T1) به ترتیب یک مطالعه مصرف حاد کاکائو و یک مطالعه مصرف 4 هفته ای شراب قرمز بدست آمدند. جزئیات کامل در مورد طرح مطالعه و جمع آوری نمونه قبلا شرح داده شده است. در هر دو مورد، نمونه‌های زیستی مخلوط شده برای جلوگیری از تغییر پذیری زیستی در تجزیه و تحلیل مقایسه ای در میان روش‌های آماده سازی نمونه بکار رفتند. مقادیر مساوی در -80 درجه سانتی گراد تا زمان تجزیه و تحلیل ذخیره شدند و همانطور که در بعد شرح داده شدها ست پردازش شدند.

آماده سازی نمونه. آماده سازی نمونه‌های سرم و پلاسما بطور جداگانه انجام شدند. در هر دو مورد، برای جلوگیری از تعصب در تهیه نمونه ، آماده سازی نمونه بصورت تصادفی بود. در روز تجزیه و تحلیل، مقادیر مساوی از نمونه های T0 و T1 جمع آوری (مخلوط) شده روی یخ ذوب شدند و متناوبا با مخلوط متابولیت 16 جزئی ، در دو غلظت نهایی (1 و 5μg/mL)، یا با آب Milli-Q (خام) ، برای حفظ فاکتور رقت در تمام نمونه‌ها تغلیظ شدند (خشک شدند). سپس همه مقادیر مساوی (1mL) ، همراه با 20μL از o-اسید فسفریک ، برای شکستن تعاملات بین مولکولی غیر کووالان و حداکثر کردن بازیافت متابولیت‌های که بطور محکم به پروتئین متصل شده‌اند اضافه شدند. نمونه‌ها برای 1 دقیقه ورتکس شدند، برای 10 دقیقه در دمای 4

درجه سانتی گراد ساکن قرار گرفتند، و سپس در معرض روش‌های استخراج متابولیت با توان عملیاتی بالا ، در سه نسخه، برای تهیه تکرارهای فنی ، قرار گرفتند.

استخراج نمونه. نمونه‌ها برای 2 دقیقه به ترتیب با سه برابر حجم استونیتریل (روش A)، متانول (روش B)، یا یک ترکیب از متانول و اتانول به نسبت 50:50 (روش C) ورتکس شدند و در 4 درجه سانتی گراد برای 10 دقیقه برای آماده سازی بیشتر پروتئین نگه داری شدند. مخلوط‌ها سپس در 10000g در 4 درجه سانتی گراد، برای 10 دقیقه، سانتریفیوژ شدند، و مایعات رویی جمع آوری شدند.

اولترافیلتراسیون. در روش D ، حذف پروتئین از طریق رقیق سازی نمونه با حجم سه برابری از آب Milli-Q انجام شد، به دنبال آن اولترافیلتراسیون در 9100g در 4 درجه سانتی گراد برای 1 ساعت، از طریق تصفیه HMT واحدهای موجود در یک غشا سلولزی مختلخل تولیدی با یک حد وزن مولکولی ظاهری 5000Da ، بر طبق دستور العمل کارخانه انجام شد.

استخراج با حلال و SPE- متمرکز بر حذف فسفولیپید. آماده سازی نمونه از طریق استخراج با حلال اسیدی، به دنبال آن استخراج با فاز جامد گلیکوفسفولیپیدها (SPE) (روش E) ، با استفاده از صفحات 96 حفره‌ای Ostro با دریچه‌های فشار (صفحات Ostro ، Waters) انجام شد. یک صفحه Ostro بر روی یک صفحه جمع آوری کننده 96 حفره‌ای در یک دستگاه چند برابر کننده با یک فشار سنج ، و متصل شده به خلاء ثابت شد. نمونه‌ها به داخل حفره ها با یک پیپت انتقال داده شدند، به دنبال آن اسید فرمیک 1٪ در استونیتریل (3:1 حلال / نمونه) برای آماده سازی پروتئین در حفره افزوده شد. مخلوط سپس به سرعت برای افزایش انحلال ترکیبات پلاسما از رسوب پروتئین پلاسما مخلوط شدف و در 4 درجه سانتی گراد برای 10 دقیقه برای ایجاد رسوب بیشتر پروتئین نگه داری شد. خلاء (15in.(~381mm)Hg) سپس برای صفحه Ostro برای 10 دقیقه ، از طریق یک دستگاه چند برابر کننده خلاء بکار رفت، که باعث ایجاد نوک‌های حصیری دریچه ها در صحفه برای باز شدن می‌شود؛ حلال رسوب شامل ترکیبات غیر فسفولیپیدی پلاسما تصفیه شده و در صفحه جمع آوری کننده 96 حفره ای جمع آوری گردید. هیچ استاندارد خارجی به زمینه های نمونه بعد از استخراج افزوده نشد.

همه حلال‌ها در 4 درجه سانتی گراد قبل از استفاده از آنها نگه داری شدند، و همه روش‌ها در یک اتاق سرد انجام شدند، با فرض اینکه در دمای استخراج 4 درجه سانتی گراد و زمان نسبتا کوتاه استخراج (10 دقیقه) ممکن است از تخریب نمونه های زیستی جلوگیری شده و خطر رسوب متابولیت‌ها کاهش می‌یابد. 50µL مقادیر مساوی نمونه استفاده شدند، به جز با استخراج صفحه 96 حفره ای Ostro ، که حداقل حجم نمونه 100µL مورد نیاز بود. با فرض این که پلاسما و سرم ماتریس های 100٪ آبی هستند، حداکثر درصد حلال آلی در نمونه‌های استخراجی در نظر گرفته شد، در کل ، 75٪ بود، به جز برای اولترافیلتراسیون (100٪ آبی). علاوه بر این، لیپولیزاسیون و تبخیر برای خشک کردن دور زده شد، چون بنظر می‌رسد که بخاطر خطر انحلال ناقص باقی مانده های خشک در طی باز سازی دوباره نمونه ، یک مرحله بحرانی و زمان‌بر است. بنابراین، مقادیر مساوی از همه عصاره های نمونه (120µL) به نسبت 1:1 با آب Milli-Q در صفحه تزریق HPLC ، قبل از تجزیه و تحلیل، به منظور کاهش درصد آلی ، و بنابراین، خطر تجمع در ستون و کروماتوگرافی ضعیف رقیق شدند.

کنترل کیفیت (QC) نمونه ها به شرح زیر همچنین قبل از تجزیه و تحلیل انجام شد: QC1 ، نمونه های آب Milli-Q ؛ QC2 ، مخلوط متابولیت 16 جزئی آبی (5µg/mL غلظت نهایی استاندارد) ؛ و QC3 ، انتخاب تصادفی نمونه های زیستی دوباره تزریق شده در وضعیت های مخالف در هر دسته، همراه با توالی تجزیه و تحلیل.

بدست آوردن داده‌های LC-ESI-ToF-MS . کروماتوگرافی مایع بر روی سیستم Agilent HPLC از سری 1200RR با استفاده از یک ستون Phenomenex RP 18 Luna (50mm×2.0mm, 5µm) در 40 درجه سانتی گراد انجام شد. آزمایشات MS بر روی یک چهار قطبی (کوادراپل) هیبرید زمان پرواز (q-QSTAR Elite ToF) (بکار رفته برای سیستم های زیستی / MDS Sciex) تجهیز شده با یک منبع اسپری TurboIon عمل کننده در یک وضعیت‌های یونیزاسیون منفی و مثبت با یک محدوده اسکن 70m/z تا 700m/z انجام شد. شرایط انجام LC-MS از قبل برای انگشت نگاری متابولوم ادرار بهینه شده برای ماتریس های زیستی مختلف ایجاد شده است (جزئیات در اطلاعات تکمیلی ارائه شده است). به خاطر درصد آلی در نمونه های استخراجی، حجم تزریق به منظور حفظ شکل پیک در اوایل شستشوی ترکیبات از تحریفات کاهش

یافت. زمان پرواز (ToF) با اسید توروکولین (یون‌ها در 79.9568 m/z و 514.2844 m/z) (1pmol/µL) و رسپرین (یون‌ها در 195.1651 m/z و 609.2812 m/z) (1pmol/µL)به ترتیب برای کالیبراسیون منفی و مثبت کالیبره شد. قبل از تجزیه و تحلیل، در حداقل دو نمونه QC2 برای بررسی سازگاری سیستم و ثبات RT استاندارد ، شدت سیگنال، و حجم‌های دقیق جرمی تجزیه و تحلیل شدند. مخلوط‌های حلال همچنین به تنهایی تزریق شدند، چون لیست خروج یونی از حلال وابسته ویژگی جرمی در طی تجزیه و تحلیل داده‌های مقایسه‌ای در نظر گرفته نشده بود. بعد از آن، 5 – 10 نمونه زیستی برای تهویه سیستم با مخلوط نمونه (پلاسما یا سرم) تزریق شدند. برای جلوگیری از تعصب احتمالی، یک طرح تصادفی سازی دوباره برای اجرای منظم توالی استفاده شد (~ 10 تزریق در هر مرتبه) ، از طریق تجزیه و تحلیل منظم نمونه‌های QC شامل 30٪ از کل اجراها جدا شدند. هر مخلوط زیستی ، 340 تزریق متوالی بدست آمد (2 × 170 حالات یونیزاسیون). سیستم توسط نرم افزار تحلیلی 2.0 کنترل شد که توسط سیستم های زیستی بکار رفته عرضه شده است (Foster City, CA, USA).

پردازش و تبدیل داده‌ها . همانطور که در اطلاعات تکمیلی نشان داده شده است (شکل S-1)، فایل‌ها داده‌های خام کروماتوگرام به شکل (فرمت) تحلیلی اصلی به ترتیب فرمت‌های (*.wiff) در پیک‌ها (*.peaks) و mzXML (*.mzXML) تبدیل شدند، تا اطمینان حاصل شد فرمت با نرم افزار MarkerView 1.2.1 (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Ontario, Cannada) و با بسته های بر پایه R سازگار است. نرم افزار MarkerView و بسته های پایه ای R سپس بطور موازی، به منظور بکار بردن ابزار جایگزین/ مکمل برای پردازش داده‌ها و تجزیه و تحلیل بیشتر شیمومتری استفاده شدند. گزینه های پیک دریافتی از MarkerView چنین تنظیم شدند: 1.5؛ حداقل عرض پیک طیفی، 1ppm ، حداقل عرض پیک زمان نگهداری ، 3 ثانیه؛ و آستانه اختلال، 5. گزینه‌های تراز پیک چنین تنظیم شدند: زمان نگهداری قابل تحمل ، 0.07 دقیقه؛ جرم قابل تحمل ، 0.02Da ؛ آستانه شدت ، 5. مجموعه داده‌ها قبل از مدل‌های آماری نظارتی و غیر نظارتی (PCA، PCA-DA) بکار روند (MarkerView software version1.2.1) به شکل الگوریتمی و مدرج پارتو (متغیر با توجه به $1\sqrt{SD}$ موزون شد)در آمد. بسته بندی پایه‌ای R در خانه شناخته

شده به عنوان MAIT (شناسایی خودکار متابولیت Toolkit ، اختراع ثبت شده به نام اروپا) برای بکار بردن یک طرح مدولار استفاده شد و تقریبا تمام روند کار متابولومی شامل تشخیص پیک و تفسیر، کاهش ابعاد، و ساخت طیف جرمی، تا یافتن و شناسایی طیف مهم خودکار شده است. تنظیمات بکار رفته در روند کار در طی توسعه MAIT به صورت بهینه برای پردازش داده‌های متابولومی حاصل از ماتریس‌های زیستی، به ویژه بدست آمده تحت شرای آزمایش ما ایجاد شده اند، و شایستگی آنها از طریق بررسی پیک های ایزوتوپ مورد انتظار، ترکیبات اضافی، و یون‌های ایجاد شده از متابولیت‌های استاندارد خشک شده در نمونه‌ها که به درستی در طیف قرار گرفته اند تایید شدند. برای تشخیص پیک، تابع R XCMS توسط روند کار MAIT با استفاده از مجموعه‌های پیش فرض، به جز برای آستانه S/N(snThres=3)، گروه بندی پهنای باند (bwGroup=3) ، و گروه بندی عرض (ضخامت) جرم (mzWidGrou=0.05) بکار رفته است. سپس، تابع R CAMRA برای دسته (خوشه) ویژگی‌های جرمی مختلف حاصل از متابولیت یکسان (شامل یون مولکولی، ایزوتوپ‌های C ، ترکیبات اضافی، و قطعات در منبع) در طیف بکار رفته است. در میان روش‌های کاهش ابعاد پیشهادی توسط روند کار MAIT برای تیمار یون‌ها و بهبود قدرت آماری داده‌های بدست آمده، فاکتور گیری ماتریس غیر منفی بکار رفت ، چون از یک مجموعه داده که متغیرهای ویژگی‌های جرمی در آن می‌باشد به یک ترکیب ماتریس داده‌های کاهش یافته از لحاظ ابعاد طیف تغییر می‌یابد، پس در معرض تجزیه و تحلیل تک متغیره و چند متغیره برای شناسایی طیف مهم (قابل توجه) قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل شیمومتری. استفاده از نرم افزار تجاری بسته های پایه ای R برای مقایسه روش ترکیب شد. نرم افزار MarkerView برای ارزیابی تضمین کیفیت داده‌ها ، اثرات وابسته به کل استخراج ، و در اولین تجزیه و تحلیل مقایسه ای موفق تکنیک‌های آماده سازی نمونه استفاده شد. تجزیه و تحلیل غیر نظارتی (PCA) و نظارتی چند متغیره (PCA-DA) برای ارزیابی اثرات وابسته به کل استخراج انجام شدند. تست های t دانش آموزی تک متغیره بین کلاس‌های نمونه دو به دو برای هر روش استخراجی برای ارزیابی ظرفیت هر روش در تمایز بین نمونه‌های زیستی خام (خشک نشده) ، خشک شده و بطور مختلف خشک شده ($p<0.05$) استفاده شدند. تشخیص متابولیت‌های آندوژن که معمولا در جریان‌های خون حضور دارند برای مقایسه کارایی روش

استخراج بر روی نمونه‌های خام بررسی شدند. بسته های پایه ای R برای مقایسه‌های کلاس نمونه دوتایی و مرتبه دوم XCMS, metaXCMS)) ، ارزیابی متقاطع طبقه بندی نمونه، و شناسایی متابولیت‌های مهم بالا و پایین با دخالت رژیم تنظیم شده به کمک محاسبات، در دو مطالعه متابولیسم تغذیه (خام T0 در مقابل نمونه-های T1) استفاده شدند. نمودار امتیازی PCA ، نقشه حرارتی، نمودار جعبه‌ای و ویژگی‌های نمودار ون در تجسم نتایج مفید بودند.

نتایج و بحث.

تضمین کیفیت داده‌ها. ثبات سیستم کروماتوگرافی در سراسر فاز دریافت داده‌ها ابتدا از طریق PCA مجموعه داده‌های جهانی آزمایش شدند (نمونه های QC و زیستی) و توسط همپوشانی دسته‌ها تایید شدند؛ در غیاب انتقال آشکار (QC1, QC2) یا نمونه خوشه‌ای ساختگی ؛ جداسازی فضایی واضح در میان کلاس‌های نمونه مختلف، بدون توجه به تزریق منظم و تصادفی نمونه (PC1 در مقابل PC2 طرح‌های امتیازی در شکل S-2 در اطلاعات تکمیلی)؛ و موقعیت یابی نمونه‌های QC3 (دوباره تزریق شده در دسته‌ها) متناظر با نمونه‌های که ابتدا تزریق شده اند خاتمه می‌یابد. تنوع تحلیلی در سرتاسر اجراها از طریق نظارت بر ترکیبات متابولیت استاندارد نمونه‌های QC2 تزریق شده همراه با مجموعه داده‌های کامل ، پوشاننده محدوده RT از 0.27 دقیقه (زودتر از شستشوی استاندارد: D-L- کارنیتین) تا 7.30 دقیقه (بعد از شستشوی استاندارد: پالمیتیک اسید) ارزیابی شد. قابلیت تکرار پذیری اجرا به اجرای متابولیت‌های RT و جرم‌های دقیق بطور موفقیت آمیزی معیارهای کیفیت پیشنهادی برای پروتکل تجزیه و تحلیل متابولومی گسترش یافت (زمان واکنش های بین دسته ای و داخل دسته‌ای به بیش از 0.02 دقیقه تغییر می‌یابد، انحراف دقت جرمی به سمت بیش از 5mDa تغییر می‌یابد)، و تنوع شدت سیگنال رضایت بخش بود (نواحی پیک CV<20%) ، به جز برای متابولیت‌های با پاسخ بسیار کم برای یونیزاسیون (پالمیتیک اسید) (جدود S-1در اطلاعات تکمیلی ببینید). هیچ شکست (نقص) دستگاهی نشان دهنده یک کاهش در حساسیت، تغییرات (جابجایی RT ، یا تغییرات در دقت جرمی مشاهده نشد. بنابراین، داده‌ها درباره خوبی و پایدار بودن شرایط عملکردی سیستم HPLC-q-ToF-MS و قابلیت اطمینان داده‌ها برای تجزیه و تحلیل آماری بعدی اطمینان دادند.

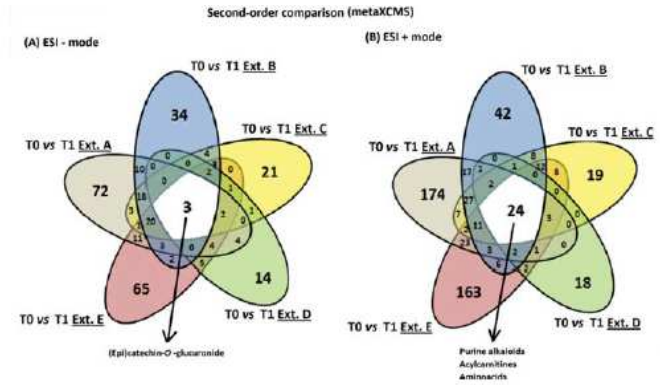
اثرات بر پایه استخراج کلی. خوشه نمونه‌های زیستی در فضای نمودار امتیازات PCA (PC1 در مقابل PC2) به نظر می‌رسد که بیشتر وابسته به روش آماده سازی استفاده شده باشد تا به نوع نمونه‌ها (غیر خشک، خشک، ابتدای مطالعه، پس از تداخل)، که تاثیر استخراج نمونه بر روی تشخیص پروفایل متابولوم نهایی تایید می‌شود (شکل S-2 در اطلاعات تکمیلی ببینید).

اثرات شرایط استخراج ابتدا بر روی RT و نواحی پیکی 16 متابولیت استاندارد خشک شده در نمونه‌های زیستی (اثرات مخلوط زیستی به اضافه اثرات روش) ، در مقایسه با نمونه های آبی (تنها اثرات روش) ارزیابی شدند (جدول S-2 در اطلاعات تکمیلی ببینید).

بطور معمول، یک رفتار مشابه برای نمونه‌های پلاسما و سرم ، در مقایسه با نمونه‌های آبی، مشاهده شد، هرچند پلاسما وابسته با اثرات زمینه بزرگتری برای همه متابولیت‌های آزمایشی بود. استفاده از ماده ضد انعقاد EDTA در طی جداسازی پلاسما از کل خون احتمالا یک نقش در اختلاف مشاهده شده بین دو ماتریس بازی می‌کند، چون EDTA بخاطر اثر شدید بر پاسخ پیک متابولیت‌ها از طریق تجزیه و تحلیل LC-ESI-MS ، به واسطه تحریک اثرات زمینه و اثر بر استخراج نشان می‌دهد.

برای هر دو ماتریس زیستی، آماده سازی نمونه از طریق فن آوری صفحه 96 حفره‌ای (E) حذف گونه‌های لیزوفسفولیپید (پالمیتول-sn-گلیسرو-3-فسفوکولین و استرول-sn-گلیسرو-3-فسفوکولین)، همانطور که انتظار می‌رود تعیین شدند، ولی همچنین یک افزایش شدید در شدت سیگنال (بیش از 30 برابر بالاتر از نواحی زیر پیک) برای اکثر ترکیبات خشک شده باقی مانده، در مقایسه با روش‌های دیگر (CV<20%) مشخص شد. در میان روش‌های استخراج با حلال معمولی آزمایش شده، آماده سازی پروتئین با استونیتریل (A) بطور معمول انتخاب دوم برای آماده سازی نمونه بود، در حالی که اولترافیلتراسیون بدون حلال (D) روشی با حداقل اثربخشی برای آماده سازی پلاسما و سرم ، به ویژه برای استخراج کمتر متابولیت‌های شامل یک زنجیر آلکان هیدروکربن غیر قطبی (لیزوفسفولیپیدها، اسیدهای چرب) یا متابولیت‌های نسبتا چربی دوست (فلاونوئیدها، اسیدهای کولین) ایجاد کرد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که مرحله استخراج با حلال قبلی همیشه قبل از

تصفیه (فیلتراسیون) ، به منظور جلوگیری از چسبیدن ترکیبات کمتر قطبی به دیواره ظرف و برای حداکثر انحلال و پتانسیل‌های تصفیه کردن لازم است.



شکل 2 . دیاگرام‌های ون نشان‌دهنده همپوشانی در میان پنج مقایسه دو به دو بین نمونه ها در ابتدای مطالعه و بعد از دخالت رژیم غذایی (پلاسما T0 در مقابل T1) بدست آمده از هر روش آماده سازی نمونه، به منظور تشخیص ویژگی‌های جرمی مهم وابسته به رژیم تنها تعیین شده بعد از روش‌های آماده سازی نمونه منحصر به فرد از نمونه‌های به اشتراک گذاشته شده در میان روش‌های استخراجی مختلف، در حالت یونی منفی (A) و مثبت (B) . آستانه مشخص شده: p=0.05 ، تغییرات تاخوردن = 1.5 ، دامنه تحمل جرم = 0.02، دامنه تحمل RT = 9 ثانیه.

نمونه‌های خام در مقابل خشک شده (تغلیظ شده). کارایی روش‌های استخراج نمونه سپس برای ظرفیت اختلافات مهم آشکار در میان نمونه‌های زیستی خام و نمونه‌های خشک شده با غلظت‌های مختلف مخلوط ترکیب استاندارد (1 و 5µg/mL) ، و برای دریافت بالاترین تغییر در شدت سیگنال جرمی ، از طریق تست‌های t جفتی ارزیابی شد (جدول S-3 در اطلاعات تکمیلی ببینید). هیچ روشی قادر به ایجاد تغییرات در مقیاس 1ppm برای تشخیص همه متابولیت‌های هدف نیست، و هیچ روش آماده سازی نمونه بهینه‌ای برای اسید پالمیتیک و دو لیزوفسفاتیدیل کولین‌ها، در غلظت های نمونه های خشک شده آزمایش شده تعریف پذیر نبود. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که، اگرچه این غیرقطبی‌ترین کلاس‌های ترکیبات در نمونه‌ها بعد از روش‌های استخراج حلال فراوان‌تر بودند (روش‌های A، B ، و C) ، آنها بطور کمی از طریق حلال‌های آلی که معمولا برای آماده سازی نمونه در مطالعات متابولومی استفاده شده اند ، استخراج نمی‌شوند، که این تایید می‌کند که

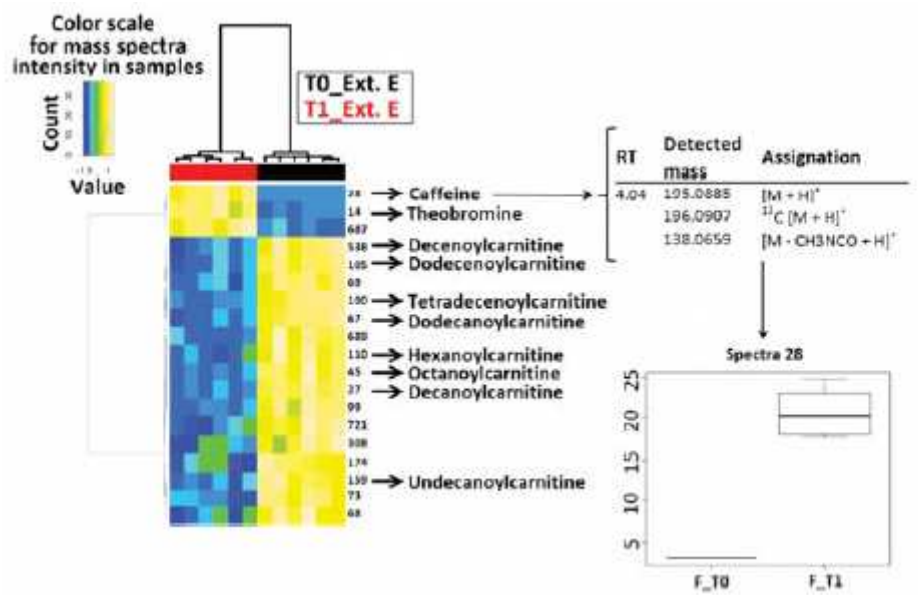
باید احتیاط هنگام ارزیابی متابولیت‌ها در میان بیومارکرهای متابولومی بالقوه نامزد تضمین شود. در مقابل، ترکیب استخراج حلال و SPE مرتبط با حذف فسفولیپیدها (روش E) مناسب‌ترین روش آماده سازی برای تشخیص تغییرات کمی ظریف برای اکثریت متابولیت‌های باقی مانده نظارت شده، به ویژه برای ترکیبات با قطبیت بالا (استونیتریل، استیل- L-کارنیتین، (ایزو) لوسین) و قطبی (L-فنیل آلانین) بود (جدول S-3 در اطلاعات تکمیلی ببینید). تصاویر نقشه حرارتی تایید می‌کند که در کلاس‌های مجزا (خام در مقابل نمونه-های خشک شده) (مثال داده شده در شکل1 ببینید) ف در یک آستانه بسیار مهم ($P<0.001$) به درستی خوشه بندی شد (دسته بندی). (-)-اپی کاسکین، نارینجنین، 4-هیدروکسی هیپوریک اسید، و استیل-L-کارنیتین در میان متابولیت‌های استاندارد مهم‌تر مسئول کلاس جداسازی بودند.

نمونه‌های خام در میان روش‌های مختلف استخراج. نمونه‌های خام در معرض حذف فسفولیپیدها قرار گرفته، بطور قابل توجهی سیگنال‌های با بالاترین شدت برای چندین ترکیب مشاهده شدند، که شامل اسیدهای آمینه، کارنیتین، اسیدهای آلی، و آسیل گلیسین کونژوگه می‌باشند. (لیزو) فسفولیپیدهای مشترک تنها بعد از استخراج حلال کلاسیک (روش‌های A، B ، و C) تشخیص داده شدند، هرچند با تنوع بالا در میان تکرارهای تکنیکی (شکل‌های S-3 و S-4 در اطلاعات تکمیلی ببینید).

نمونه‌های در ابتدای مطالعه در مقابل نمونه‌های بعد از دخالت رژیم. ما در نهایت روش‌های آماده سازی نمونه با توجه به توانایی برای تغییرات متابولومی آشکار به دنبال دخالت یک رژیم مقایسه کردیم. پنج مقایسه بین روشی مستقل بین نمونه‌ها در ابتدای مطالعه و بعد از دخالت یک رژیم (تست t جفتی بین T0 و T1) ابتدا بدست آمد. نتایج بطور مستقل ماتریس‌های داده‌ای بدست آمده از مقایسه‌های بین روشی سپس تحت تجزیه و تحلیل مرتبه دوم (متا) قرار گرفتند، که به منظور تشخیص ویژگی‌های جرمی مهم وابسته به رژیم تعیین شده تنها بعد از روش‌های آماده سازی نمونه منحصر به فرد از آنها در میان روش‌های استخراج مختلف به اشتراک گذاشته شدند. دیاگرام‌های ون در شکل 2 (خروجی‌های گرافیکی metaXCMS) تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای داخل و بین روشی نشان می‌دهد (شکل S-5 در اطلاعات تکمیلی که نشان دهنده خروجی‌ها برای تجزیه و تحلیل نمونه سرمی است ببینید). تغییرات مهم در متابولوم سرم و پلاسما انسان به دنبال مداخلات از طریق همه روش‌های

استخراج نمونه آشکار شدند ($P<0.05$) ، اگرچه متابولیت‌های با اهمیت کم در میان آنها به اشتراک گذاشته شدند. یک لیست از مارکرها بطور آزمایشی در پلاسما به دنبال مصرف حاد کاکائو همانطور که در اطلاعات تکمیلی ارائه شده است شناسایی شدند (جدول S-4). برای هر ترکیب، سطح اهمیت ، و نوع تغییر (افزایش / کاهش) بدست آمده از طریق روش‌های مختلف آماده سازی نمونه ارائه شدند، و یک انتخاب اول برای روش آماده سازی پیشنهاد شد. معمول‌ترین مارکرهای مصرف کاکائو در میان همه روش‌های آماده سازی نمونه ، یعنی آلکالوئیدهای پورین (کافئین و تئوبرومین) و (اپی) کاتسین-O-گلوکورونید، یک متابولیت فاز II پلی فنول-های کاکائو (فلاوین-3-اُسل) به اشتراک گذاشتند. یک کاهش مهم آسیل کارنیتین‌های پلاسما همچنین بدون توجه به روش آماده سازی نمونه مشاهده شد. داده‌های ما مطابق با نتایج اخیر از یک مطالعه تعیین کمیت در مقیاس بزرگ و متابولوم هدف بودند، که یک ارتباط منفی قوی بین مصرف قهوه و غلظت آسیل کارنیتین‌ها در پلاسما مشاهده شد، که این پیشنهاد می‌کند که ترکیبات از طریق هر دو کاکائو و قهوه به اشتراک گذاشته شده (برای مثال، الکالین‌های پورین، نیاسین) ممکن است مسئول این اثرات پلاسما باشند. تجزیه و تحلیل متا از نتایج آشکار کردند که روش‌های استخراج بر پایه استونیتریل (A,E) بیشترین اطلاعات در مورد نمونه می‌دهند، که آنها به عنوان دو تا از بهترین روش‌های انتخابی در مطالعه ما تایید می‌کند. به طور خاص، ترکیب استخراج استونیتریل اسیدی و SPE مرتبط با حذف فسفولیپیدها اولین روش انتخابی برای تعیین تغییرات در ترکیبات معمولی هدف قرار گرفته در مطالعات متابولوم تغذیه ، مانند فاز II و متابولیت‌های مشتق از میکروب از فنل‌های کاکائو، و اسیدهای صفراوی و کونژوگه‌های گلیسین آنها، که محدوده وسیعی از RT و m/z پوشش می‌دهند. شکل 3 یک مثال از مهم‌ترین متابولیت‌های مرتبط با مصرف حاد کاکائو (حالت ESI+)، هنگامی که توسط روش E آماده شده بودند ، نشان میدهند ($P<0.0001$ ، فاصله خوشه پیرسون) . در کنار (اپی) کاتسین -O- گلوکورنید، سه مشتق از سولفات در حالت ESI- ، یعنی ، (اپی) کاتسین-O-سولفات و دو O- متیل-(اپی)کاتسین –O- سولفات، بیومارکرهای از مصرف و حضور آن در ترکیبات زیستی از قبل تشخیص شده است ، شناسایی شدند. علاوه بر این، یک ارتباط منفی قوی بین مصرف کاکائو و یک سری از مصرف متوسط و طولانی رایج بطور خاص از طریق این روش آماده سازی نمونه برجسته شد، که نیاز به توجه بیشتر است، به خاطر تاثیر

بر تغییر و تبدیل کارنتین / آسیل کارنیتین بر روی جنبه های بیشمار متابولیسم کربوهیدرات و لیپید، شامل تنظیم ترشح انسولین از طریق سلول‌های بتا پانکراس و تعیین حساسی بافتی به انسولین.



شکل 3. نقشه حرارتی نشان‌دهنده مثال‌های از متابولیت‌ها بطور مهم مثبت و منفی تنظیم شده در پلاسما به دنبال مصرف حاد کاکائو (P<0.0001؛ فاصله خوشه گذاری پیرسون ؛ حالت یونی مثبت). ردیف‌ها طیف جرمی هستند، و ستون‌ها نمونه‌های پلاسما قبل از مصرف کاکائو (T0) و 2 ساعت بعد از مصرف کاکائو (T1) هستند. یک مثال از شناسایی ساختار مرتبط با محاسبه از طیف جرمی مهم (کافئین). تجسم نقشه حرارتی و نمودار جعبه‌ای به ترتیب بدست آمده حاصل از استفاده توابع singHeatMap و drawBoxplot از الگوریتم MAIT .

حداقل سازی اثرات ماتریس در میان اکثر مواد احتمالی برای عملکرد استخراج مناسب مرتبط با SPE حذف گونه‌های فسفولیپیدی بود. یک شدت پایین‌تر از پیک‌های مرتبط به EDTA (به ترتیب 293.0978m/z و 315.0802 m/z مربوط به EDTA و ترکیب اضافی سدیم ، در حالت یونیزاسیون مثبت) همچنین در همه نمونه‌های پلاسما تحت تاثیر SPE ، در مقایسه با روش‌های دیگر، احتمالا به علت تعاملات داروی ضد انعقاد خود با فاز ساکن صفحه Ostro با 96 حفره مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). علاوه بر این، با درک اهمیت جنسیت، فرد، یا حتی تنوع مرتبط با زمان در سرم / پلاسما، حذف گونه‌های فسفولیپیدی ممکن است به

صرف نظر کردن از متغیرهای اختلال کمک می‌کند و به ما اجازه می‌دهد بطور آشکارتر تغییرات متابولومی ظریف که در خون به دنبال وضعیت‌های زندگی واقعی مانند مصرف مواد غذایی مشاهده کنیم.

حذف گونه‌های فسفولیپیدی هرگز شامل مراحل آماده سازی نمونه تا کنون قبل از انگشت نگاری جریان خون LC-MS متابولیکی استفاده کردیم نیست، احتمال به خاطر اینکه این مولکول‌های LMW واقعا بخشی از متابولوم پلاسما و سرم است و حذف انتخابی آنها یک آگاهی درباره از دست دادن اطلاعات بیان خواهد کرد. با این وجود، این همچنین شناخته شده است که این به ویژه برای اندازه گیری سطوح همه متابولیت‌های موجود در یک نمونه زیستی بطور همزمان، با یک سطح تحلیلی تک امکان پذیر نیست، بنابراین استراتژی‌های تحلیل چندگانه بطور معمول موازی با بکار بردن پیچیدگی متابولوم و افزایش پوشش متابولیت در نمونه های زیستی بکار می‌روند.

با این حال، یک روش استخراج و تشخیص تک برای همه متابولیت‌ها از نمونه های زیستی که از قبل خام شناخته شده‌اند، و استخراج‌های تک مرحله‌ای جداکننده لایه‌های لیپوفیل و هیدروفیل در نظر گرفته شده برای روش‌های تحلیلی مجزا همچنین ، برای بهره برداری بهینه نمونه پیشنهاد شده است. در این سناریو، هنگامی که در نظر می‌گیریم که یک رشته در حال ظهور و ساکن بر - اومیک‌ها (لیپومیک‌ها) اکنون برای مقابله با تنوع لیپیدی می‌آید و بطور کامل به تجزیه و تحلیل مقیاسی سطح- سیستم‌ها از همه لیپیدها و نیمه‌های تعامل کننده موجود در یک نمونه زیستی اختصاص داده شده است، هیچ دلیلی برای این اعتقاد وجود ندارد که فداکاری اطلاعات روی ترکیبات لیپیدی قیمت بسیار بالایی برای پرداخت به منظور بدست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد متابولیت‌های غیر لیپیدی LMW است.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، ما یک روند کاری متابولومی برای مقایسه اثرات روش‌های معمولی و اخیرا پیشنهاد شده برای استخراج جریان خون بکار بردیم. بطور خلاصه (جدول 1) ، اگرچه هیچ تکنیک جهانی مناسب برای تشخیص بهینه همه انواع متابولیت‌های LMW موجود نیست، ترکیب استخراج حلال و SPE مرتبط با حذف فسفولیپیدها برای (a) بهبود سیگنال پاسخ اکثر متابولیت‌های LMW غیر لیپیدی از جریان‌های خون ، در

مقایسه با دیگر تکنیک های آماده سازی نمونه دیگر آزمایش شده، احتمالا از طریق کاهش گونه‌های تداخل زمینه و حداقل سازی پدیده‌های سرکوب یونی؛ (b) حذف یک کلاس از متابولیت‌ها (فسفولیپیدها) که بطور کمی استخراج نمی‌شوند از طریق حلال‌های آلی که بطور مشترک در متابولوم‌ها استفاده شده‌اند ، ممکن است متغیرهای اختلال حاصل از اهمیت جنسیت، شخص، یا حتی تنوع مرتبط با زمان در خون ارائه می‌شوند، و در میان ترکیبات هدف از یک خود ساکنی " اومیک " (لیپدوامیک ها) هستند؛ (c) یک روش سریع و ملایم ساده است که اجازه آماده سازی چندین نمونه بطور همزمان می‌دهد، بنابراین با کنترل کننده‌های مایع رباتیک و خودکار قابل مقایسه هستند را آشکار کرد. قطعا، از دست دادن اطلاعات درباره تنوع فسفولیپیدها و دیگر گونه-های لیپیدی LMW در جریان‌های خون نیازمند بررسی، به ویژه در موارد بهره برداری نمونه است و یک اجرا بیشتر از تکنولوژی Ostro برای بازیافت فسفولیپید به دنبال EPS باید طراحی شود.

criteria	Method A (acetonitrile)	Method B (methanol)	Method C (methanol/ethanol)	Method D (solvent-free filtration)	Method E (acidic acetonitrile + SPE)
extraction repeatibility (CV %)[a]	15 (11)	10 (10)	9 (8)	13 (12)	12 (12)
extraction efficiency[b]	3-fold higher (2)	3-fold higher (2)	3-fold higher (2)	lowest	4-fold higher (5)
detection of 1 ppm-scale changes[c]	39%	44%	33%	44%	55%
detection of real-life diet-related metabolic changes[d]:					
amino acids	moderate	poor	poor	moderate	high
purine alkaloids	moderate	moderate	moderate	moderate	high
flavan-3-ols and microbial-derived metabolites	poor	poor	poor	poor	high
acylcarnitines	high	moderate	moderate	poor	moderate
fatty acids (C8–C18)	high	moderate	poor	very poor	poor
bile acids/bile acids glycine conjugates	poor	moderate	poor	very poor	high
simplicity	moderate	moderate	moderate	high	moderate
speed	moderate	moderate	moderate	low	high
environmentally friendly	moderate	moderate	moderate	high	moderate
instrumentation needed	lab centrifuge	lab centrifuge	lab centrifuge	lab centrifuge	vacuum system and manifold
compatibility with automation	low	low	low	high	high
key factors to be optimized/ major drawbacks	extraction repeatibility; poor automation	extraction efficiency; poor automation	extraction efficiency; poor automation	extraction efficiency; solvent extraction required	loss of PL[e]

جدول1. ارزیابی کلی از تکنیک های آماده سازی نمونه

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی