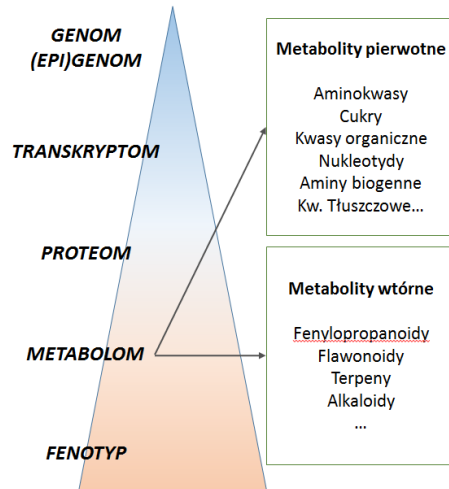


Metabolomika

- Jest to dziedzina nauki, która bada w sposób ilościowy i jakościowy niskocząsteczkowe związki pochodzenia naturalnego – endogenne metabolity, które tworzą metabolom.
- Wraz z genomiką, transkryptomiką, proteomiką zaliczana jest do biologii systemów.



Podejścia w metabolomice

Metabolomika niecelowana

- Analizie podlegają wszystkie metabolity, które zostały wyekstrahowane z próbki i są możliwe do zbadania wybraną techniką instrumentalną.
- Profile metabolomiczne porównywane są pomiędzy wariantami eksperymentalnymi w celu zobrazowania różnic między różnymi stanami biologicznymi organizmu.
- Bardzo często podejście niecelowane generuje kolejne pytania badawcze i hipotezy.

Metabolomika celowana

- Analiza jest ukierunkowana tylko na określony metabolit lub panel metabolitów np.: auksyny, panel fitohormonów, aminokwasy biogenne.
- Metoda została zoptymalizowana i zwalidowana w celu uzyskania optymalnego odzysku dla określonego metabolitu lub grupy metabolitów.
- Bardzo zawężona analiza odpowiada na konkretne pytanie badawcze.

Zastosowanie:

- Poszukiwanie biomarkerów np.: chorób lub ekspozycji
- Poszukiwanie nowych punktów uchwytu terapii
- Poszukiwanie szlaków zmienionych w danych warunkach eksperymentalnych

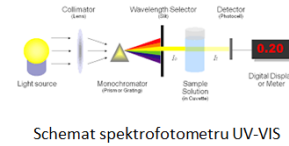
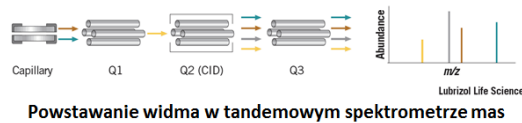
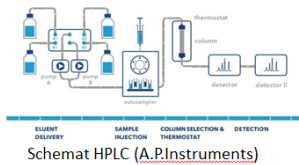
Zastosowanie:

- Walidacja biomarkerów
- Monitorowanie konkretnych metabolitów w szlakach
- Kontrola jakości produktów rolnych

Techniki stosowane w metabolomice

Techniki separacyjne	Spektrometria mas	Techniki spektroskopowe
Służą do rozdzielenia składników mieszaniny wykorzystując zjawisko podziału między fazę stacjonarną i ruchomą lub migracji w polu elektrycznym.	Służą do pomiaru stosunku masy do ładunku (m/z) zjonizowanego analitu oraz fragmentacji jonów w celu analizy jakościowej i ilościowej.	Metody analityczne, które badają oddziaływanie promieniowania z materia/analitytem.
<ul style="list-style-type: none"> • Chromatografia gazowa • (Ultra)wysokosprawna chromatografia cieczowa • Chromatografia jonowymienna • Elektroforeza kapilarna 	<ul style="list-style-type: none"> • Niskorozdzielcza spektrometria mas (pojedynczy kwadrupol, pułapka jonowa) • Niskorozdzielcza tandemowa spektrometria mas (potrójny kwadrupol) • Wysokorozdzielcza spektrometria mas (TOF, Orbitrap, FTICR) • Hybrydowa spektrometria mas (łączy nisko i wysokorozdzielczy analizator: qTOF, Q-exactive MS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego • Spektroskopia Ramana • Spektroskopia IR • Spektroskopia UV-VIS

Techniki stosowane w metabolomice



- 1) Za pomocą elektrospreju lub elektrozpylacza wyciek z kolumny jest **rozpylany** i **jonizowany**.
- 2) **Kwadrupol**: powstałe jony są kierowane do pierwszego analizatora - kwadrupola, który działa jak filtr mas. Jony są odfiltrowane zgodnie ze stosunkiem masy do ładunku (np. tylko jony z zakresu 100-1000) a następnie kierowane są do drugiego analizatora - orbitrapa.
- 3) **Orbitrap** to dwie elektrody zewnętrzne i jedna wewnętrzna. Jon trafiając między te elektrody jest przyspieszany i zaczyna oscylować przemieszczając się wzdłuż osi. Częstotliwość oscylacji jonów jest proporcjonalna do wartości m/z . Poruszająca się wzdłuż analizatora wiązka wytwarza różnice potencjałów między elektrodami zewnętrznymi.
- 4) Sygnał ten jest przekształcany w widmo masowe przy pomocy **Transformacji Fouriera**.

Pracownia Laboratorium Multiomiki IGR PAN

Ultrawysokosprawy chromatograf ciekowy

Detektor fotodiodowy

Wysokorozdzielczy hybrydowy spektrometr masowy



Wysokosprawy chromatograf ciekowy

Niskorozdzielczy spektrometr masowy – pułapka jonowa

Preparatywny chromatograf ciekowy

Przygotowanie próbki

1. Ręczna homogenizacja materiału w ciekłym azocie
2. Homogenizacja w młynie kulowym przez 30 s przy częstotliwości 27 Hz.



Ekstrakcja materiału

3. Tkanka (50 mg) była ekstrahowana przy użyciu 1 ml 80 % metanolu (LC-MS, Merck) z dodatkiem wzorców wewnętrznych (0.1 µg/ml):

- formononetyna,
- myo-inositol,
- d₅-glicyna.

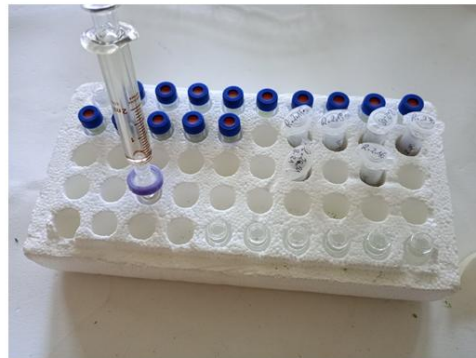
4. Próbkę były wytrząsane przez 15 min z rozpuszczalnikiem, a następnie ekstrakcja była wspomagana ultradźwiękami przez 5 min.



Ekstrakcja materiału

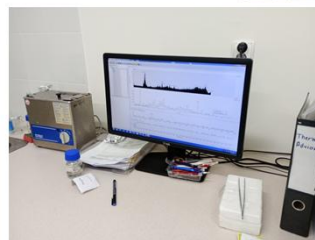
5. Próbkę były następnie wirowane z prędkością 15 000 rpm przez 15 min w temperaturze 4 °C.

6. Następnie supernatanty zostały przefiltrowane przez sączki strzykawkowe PTFE o śr. porów 0.22 µm i śr. zewnętrznej 14 mm do fiolek chromatograficznych.



Analiza UPLC-HRMS

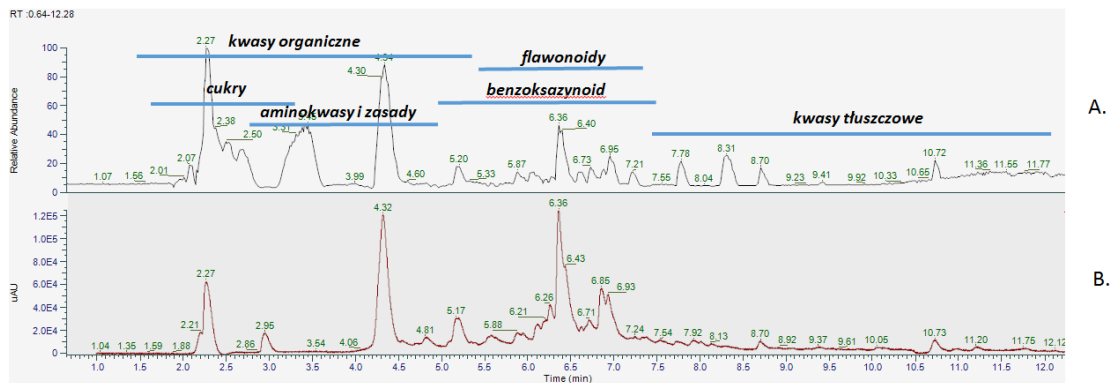
- Rozdział chromatograficzny:
 - UPLC-Acquity (Waters)
 - Kolumna HSS T3 (150 x 2.1 mm, 1.7 µm)
 - Temperatura kolumny 40 °C, temperatura autosamplera 4 °C
 - Gradient dwuskładnikowy (A: 0.1 % kwasu mrówkowego w wodzie, B: acetonitryl)
- Detekcja PDA przy długości fal 250-550 nm
- Detekcja MS:
 - Źródło HESI-II (podgrzewany elektrospray)
 - Tryb jonizacji ujemny i dodatni z fragmentacją (FullMS-ddMS²)





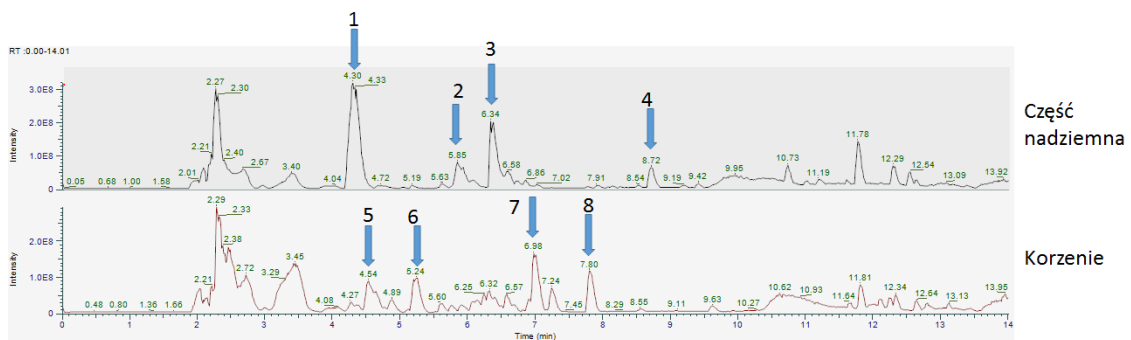
Metabolom - pszenicy

Główne grupy związków występujące w próbce QC (mieszanka wszystkich próbek)



Chromatogramy uzyskane techniką UPLC-HRMS (chromatogram pików bazowych) oraz techniką UPLC-PDA (detekcja przy 254 nm).

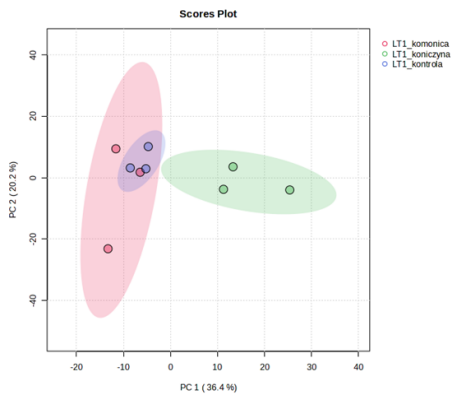
Korzenie a części nadziemne pszenicy



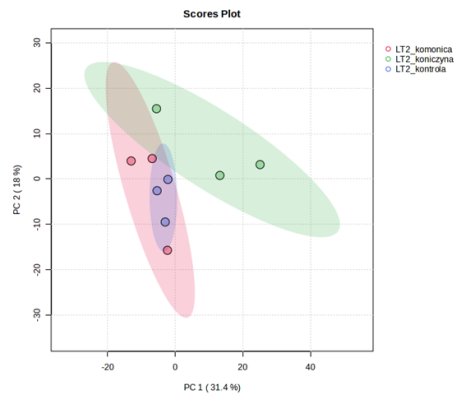
Przykładowe związki różniące części nadziemne i korzenie: 1 - kwas akwitowy, 2 - glukuronid kwasu ferulowego, 3 - apigenin 6-C-glucoside 8-C-araboside, 4 - nieznany lignan, 5 - piccin, 6 - O-heksozyd DIBOA, 7 - O-heksozyd HDMBOA, 8 - kwas nonanodiowy

Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

Pierwszy punkt czasowy



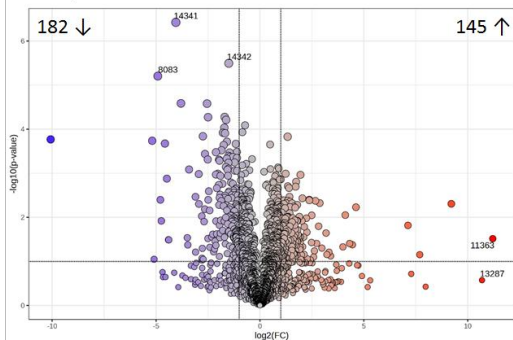
Drugi punkt czasowy



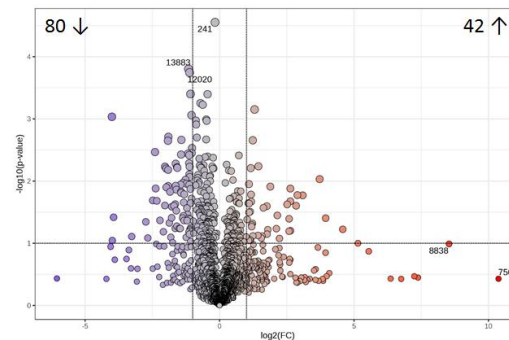
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

Punkt czasowy

Konieczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

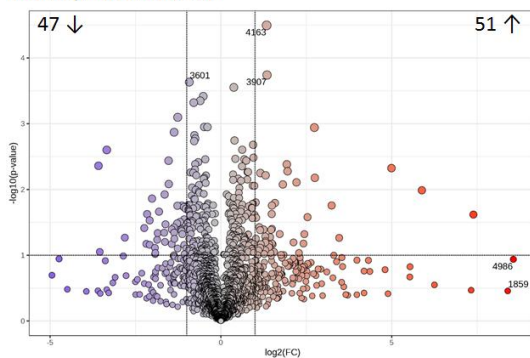


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

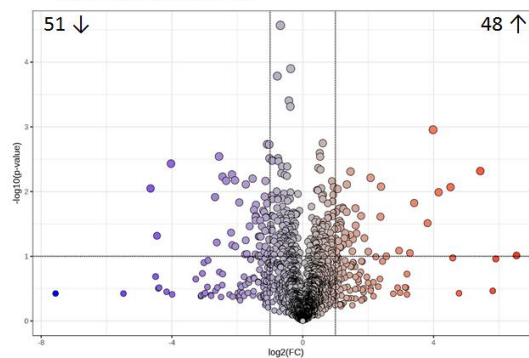
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej pszenicy

2. Punkt czasowy

Konieczyna vs. Kontrola

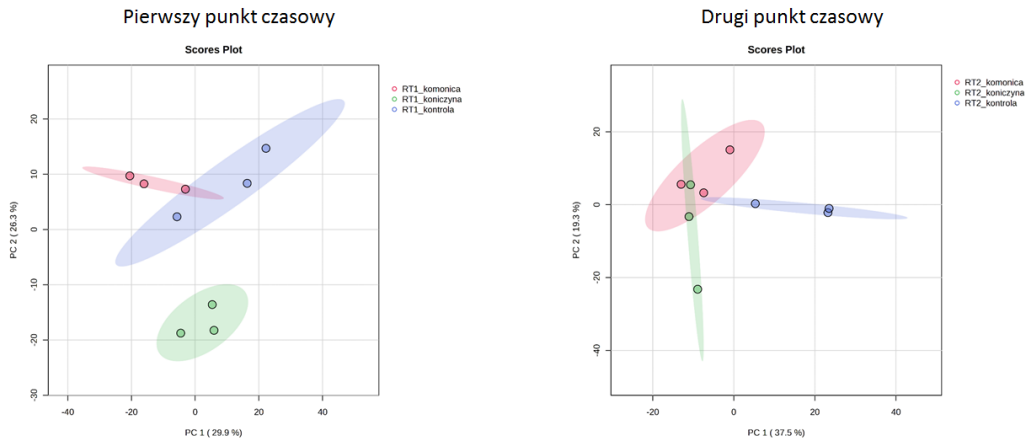


Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

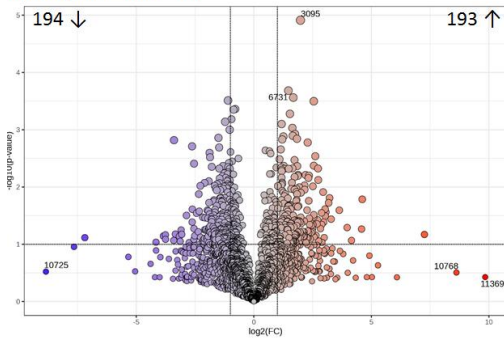
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy



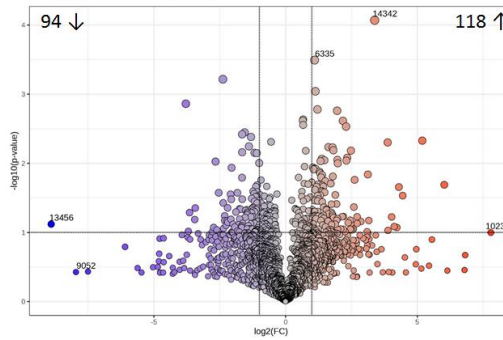
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy

1. Punkt czasowy

Koniczna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

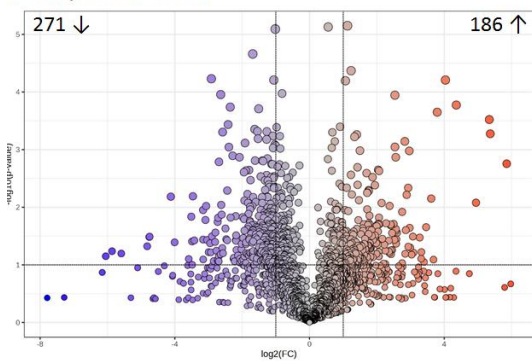


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

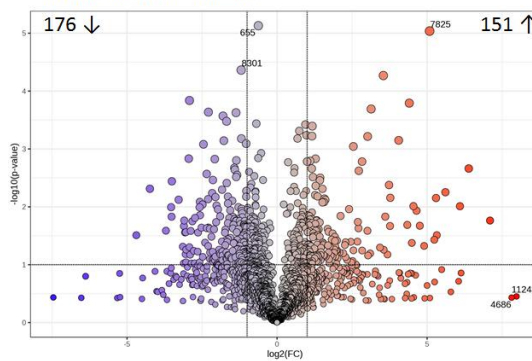
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach pszenicy

2. Punkt czasowy

Koniczna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

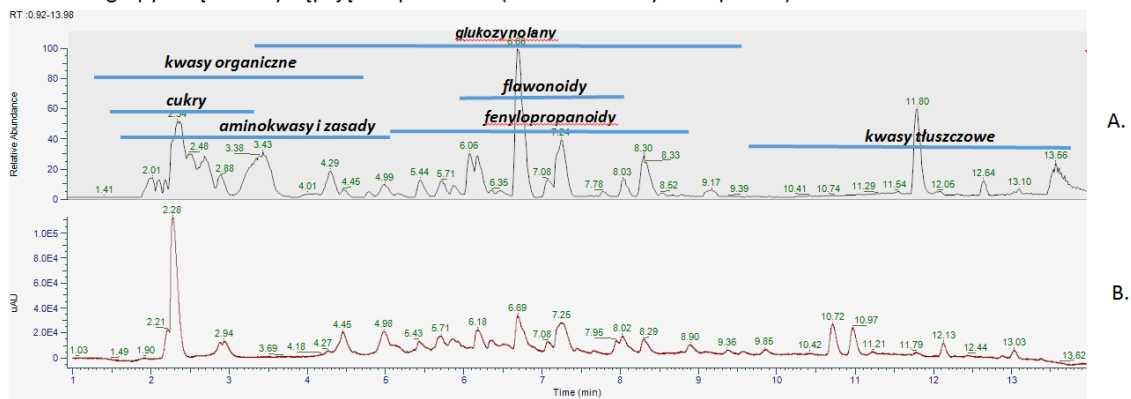


Metabolom rzepaku

Glukozytolany

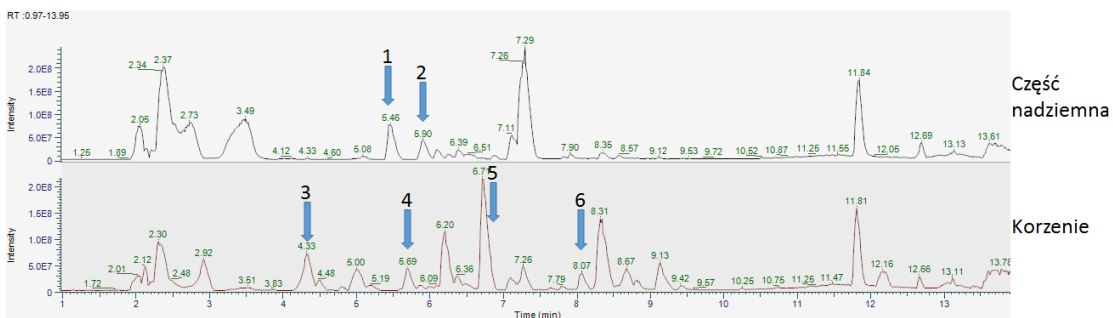
Metabolom - rzepaku

Główne grupy związków występujące w próbce QC (mieszanka wszystkich próbek)



Chromatogramy uzyskane techniką UPLC-HRMS (chromatogram pików bazowych) oraz techniką UPLC-PDA (detekcja przy 254 nm).

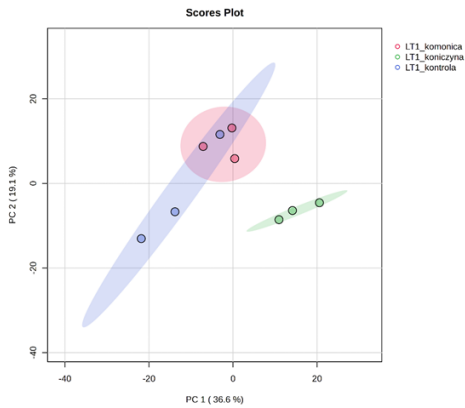
Korzenie a części nadziemne rzepaku



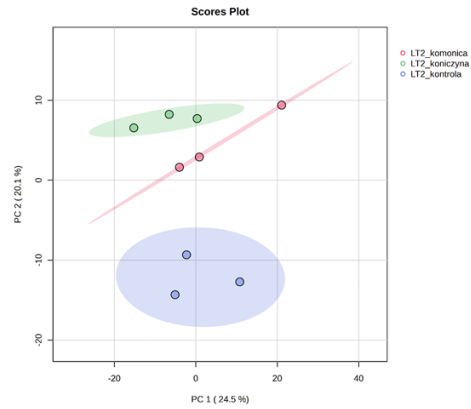
Przykładowe związki różnicujące części nadziemne i korzenie: 1 – skopolina, 2 – ramnozyd skopoletyny, 3 – $C_9H_{16}N_2O_5S$, 4 – glukobrasycyna, 5 – metoksyglukobrasycyna, 6 – kwas N-feruloyloasparaginowy

Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

Pierwszy punkt czasowy



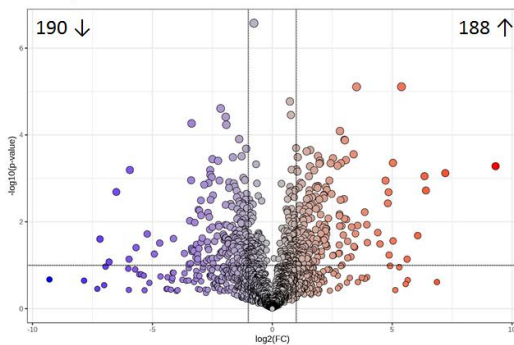
Drugi punkt czasowy



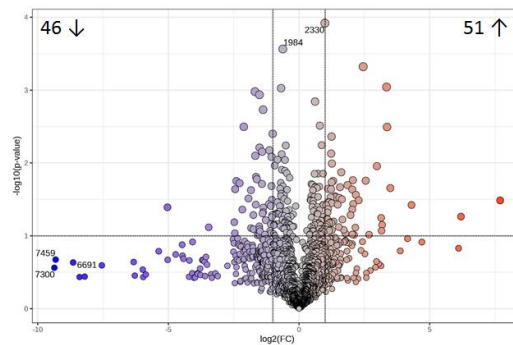
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

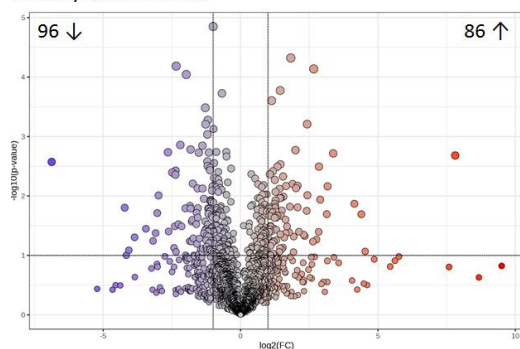


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

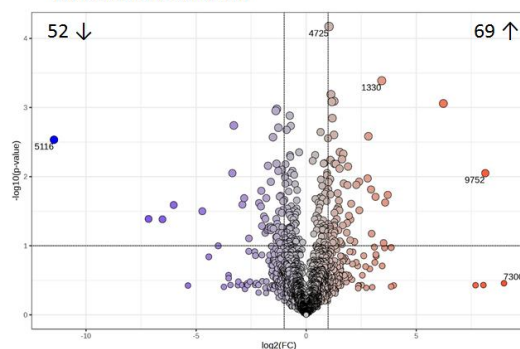
Zmiany zawartości metabolitów w części nadziemnej rzepaku

2. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola

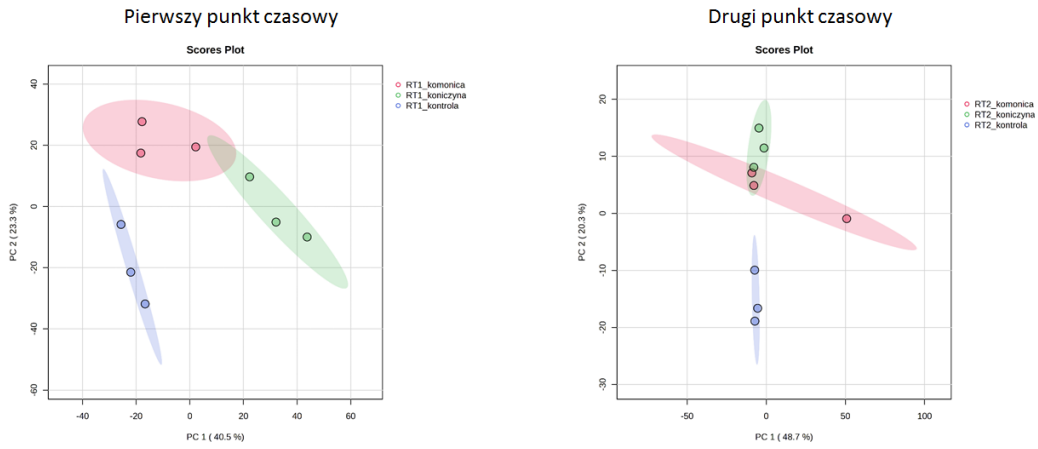


Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

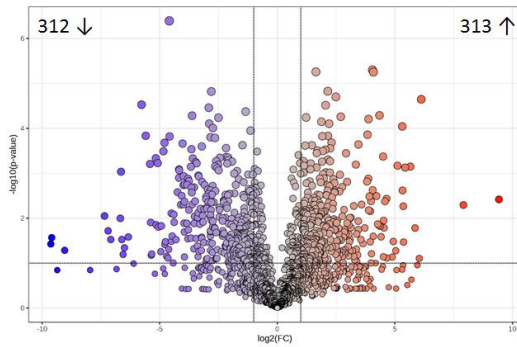
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku



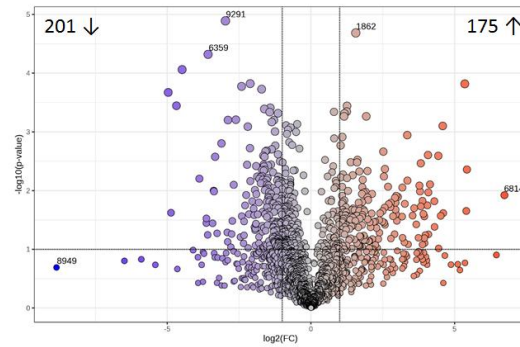
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku

1. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola

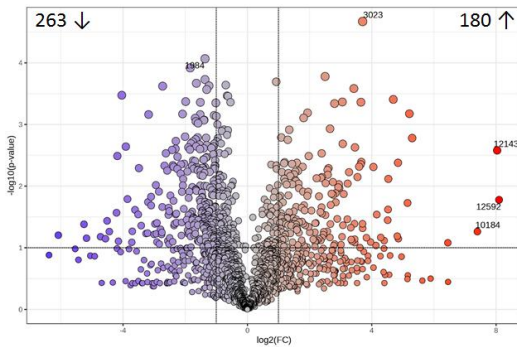


Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

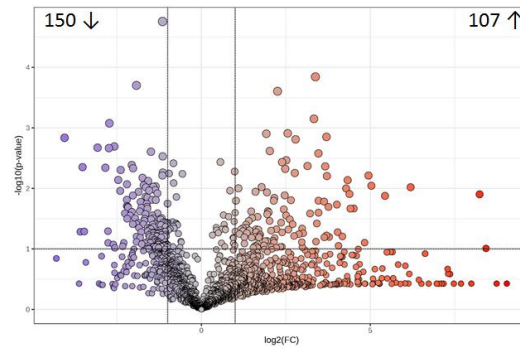
Zmiany zawartości metabolitów w korzeniach rzepaku

2. Punkt czasowy

Koniczyna vs. Kontrola



Komonica vs. Kontrola



Wykresy przedstawiają liczbę statystycznie istotnych pików chromatograficznych w obu wariantach ($p \leq 0.01$)

Statystycznie istotna liczba metabolitów różniących próbki:

 Spadek  Wzrost

Część nadziemna:

Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	182	145
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	80	42
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	47	51
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	51	48

System korzeniowy:

Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	194	193
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	94	118
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	271	186
Pszenica w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	176	151

Część nadziemna:

Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	190	188
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	46	51
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	96	86
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	52	69

System korzeniowy:

Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T1	312	313
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T1	201	175
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z koniczyną T2	263	180
Rzepak w siewie czystym vs pszenica z komonicą T2	150	107

Podsumowanie

Metabolizm roślin plonu głównego rosnących w mulczu jest w warunkach początkowego wzrostu odmienny od warunków wzrostu roślin w tradycyjnej uprawie orkowej.