

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Πρωτεωμική ανάλυση γάλακτος όνου (*Equus asinus*)

Σταύρος Κ. Πρωικάκης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα

2020

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Πρωτεωμική ανάλυση γάλακτος όνου (*Equus asinus*)

“Proteomic analysis of donkey’s milk (*Equus asinus*)”

Σταύρος Κ. Πρωικάκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Καψοκεφάλου Μαρία, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Πρωτεωμική ανάλυση γάλακτος όνου (*Equus asinus*)

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεωμική (proteomics) αποτελεί το ερευνητικό πεδίο το οποίο ασχολείται με την ανάλυση σε μεγάλη κλίμακα του πρωτεώματος, δηλαδή των συνολικών πρωτεϊνών οι οποίες περιέχονται σε ένα βιολογικό δείγμα. Η πρωτεωμική χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό περίπλοκων και εξειδικευμένων τεχνικών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η φασματομετρία μάζας και η βιο-πληροφορική, με σκοπό το διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η εφαρμογή της πρωτεωμικής προσφέρει τεράστιες δυνατότητες για την κατανόηση των λειτουργιών οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η πρωτεωμική χαρτογράφηση του γάλακτος όνου μέσω υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την διαδοχική φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (LC-MS/MS), μια σύγχρονη μέθοδος πρωτεωμικής ανάλυσης που χαρακτηρίζεται από υψηλή ανάλυση και διακριτικότητα. Για τη διεξαγωγή της μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα γάλακτος όνου εμπορικά διαθέσιμα. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών και κατόπιν αναλύθηκαν με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Η εις βάθος πρωτεωμική ανάλυση οδήγησε την ταυτοποίηση 633 πρωτεϊνών. Με βιοπληροφορική μετα-ανάλυση οι πρωτεΐνες ομαδοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες όπως, την μοριακή λειτουργία τους και τη βιολογική τους διεργασία. Επιπλέον διερευνήθηκε το γενικό διατροφικό προφίλ του γάλακτος όνου προκειμένου να μελετηθεί συνολικά ως προς τα χαρακτηριστικά του και τα οφέλη που ενδέχεται να παρέχει στην υγεία του ανθρώπου. Το σύνολο της γνώσης που παράγεται από τη συγκεκριμένη μελέτη οδήγησε στη δημιουργία μιας πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων και δύναται να αποτελέσει βάση αναφοράς για περαιτέρω μελέτες.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: γάλα, όνος, γάλα όνου, πρωτεΐνες ορού, πρωτεωμική ανάλυση

Proteomic analysis of donkey's milk (*Equus asinus*)

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Quality Control & Hygiene

ABSTRACT

Proteomics is the field of research that deals with the large-scale analysis of the proteome, namely the total proteins that are in a biological sample. Proteomics use a combination of complicated and specialized techniques, including two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, and bioinformatics, to separate, characterize, and quantify proteins. The application of proteomics offers enormous possibilities for understanding the functions of any biological sample.

The aim of the present study was the proteomic mapping of donkey's milk by liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), a modern method of proteomic analysis characterized by high resolution and discretion. For the experiment, commercially available milk samples were collected from three different companies. The samples were isolated from the proteins and then analyzed by LC-MS / MS.

In-depth proteomic analysis revealed the identification of 633 proteins. By bioinformatics meta-analysis, grouping of 633 distinct proteins was achieved based on two categories which are : 1) molecular function, 2) biological process. In addition, the general nutritional profile of milk is discussed in order to study in general terms its characteristics and the benefits it may provide to human health. Finally, all the knowledge generated by this study leads to the creation of a protein database and can be a reference base for further studies.

Scientific area: Human nutrition

Key words: milk, donkey, donkey's milk, whey proteins, proteomics, analysis, equus asinus

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Πρωτεωμική ανάλυση γάλακτος όνου (*Equus asinus*)» εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα Πρωτεωμικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.), από τον Αύγουστο του 2020 έως το Δεκέμβριο του 2020.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Ελευθέριο Δροσινό, Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ.Π.Α για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του όσο και με το Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. με ένα πολύ ενδιαφέρον και ανερχόμενο αντικείμενο μελέτης. Δηλώνω ιδιαίτερα τυχερός που συνεργάστηκα μαζί του καθώς το πάθος του και η αγάπη του για τον τομέα των τροφίμων είναι έκδηλα και αποτελούν έμπνευση για εμένα. Ακόμη ευχαριστώ θερμά τόσο τον Επίκουρο Καθηγητή του Γ.Π.Α κ. Αθανάσιο Μαλλούχο για το ζήλο που έδειξε όσον αφορά τον τομέα της ανάλυσης τροφίμων, όσο και την Καθηγήτρια κ. Μαρία Καψοκεφάλου για τις γνώσεις που μου έδωσε στο κομμάτι της διατροφής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το Μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Αθανάσιο Αναγνωστόπουλο ο οποίος εργάστηκε στο κομμάτι των αναλύσεων της παρούσας εργασίας και την τεχνολόγο κ. Αγγελική Παπαδοπούλου για την βοήθειά της στα πρώτα μου βήματα προσαρμογής στο εργαστήριο.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τον Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα Α', κ. Γεώργιο Τσάγκαρη, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του καθώς ήταν ο συνδετικός κρίκος για να ασχοληθώ με τη μελέτη των πρωτεϊνών. Αποτελεί μέντορα για εμένα, καθώς παρά το μεγάλο φόρτο εργασίας του ήταν δίπλα μου να με συμβουλευσει σε βήμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Συμπληρωματικό υλικό

Πίνακες

Πίνακας 1: Επιστημονική ταξινόμηση του όνου

Πίνακας 2: Κατανομή πληθυσμού όνων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Πίνακας 3: Κατανομή πληθυσμού όνων ανά γεωγραφικό διαμέρισμα.

Πίνακας 4: Σύσταση γάλακτος ανθρώπου, όνου και αγελάδας

Πίνακας 5: Σύσταση λιπιδίων επί του συνολικού λίπους στο γάλα όνου

Πίνακας 6: Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (g/kg λίπους) στο γάλα όνου και το γάλα ανθρώπου

Πίνακας 7: Σύσταση αμινοξέων σε γάλα όνου και ανθρώπου

Πίνακας 8: Σύσταση γάλακτος ανθρώπου, όνου και αγελάδας για μέταλλα

Πίνακας 9: Σύσταση βιταμινών σε γάλα όνου και γάλα ανθρώπου

Πίνακας 10: Σύσταση πρωτεϊνών ορού σε γάλα όνου

Πίνακας 11: Απορρόφηση προτύπων διαλυμάτων BSA

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάλυσης LC-MS/MS

Εικόνες

Εικόνα 1 . Στρατηγικές προσέγγισης του πρωτεώματος

Εικόνα 2. 2D-GE πηκτή ηλεκτροφόρησης

Εικόνα 3. Χρωματογράφημα

Εικόνα 4. Στήλες αντίστροφης φάσης HPLC

Εικόνα 5. Οργανολογία φασματομέτρου μάζας

Εικόνα 6. MALDI

Εικόνα 7. ESI

Εικόνα 8. Orbitrap

Εικόνα 9. Coomassie Blue

Εικόνα 10. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Bradford κατασκευασμένη με χρήση Coomassie Blue-G250 και της BSA της Bio-rad.

Εικόνα 11. Διάγραμμα που απεικονίζονται ο αριθμός των πρωτεϊνών σε κάθε κατηγορία που σχετίζεται με τη μοριακή λειτουργία

Εικόνα 12. Διάγραμμα που απεικονίζονται ο αριθμός των πρωτεϊνών σε κάθε κατηγορία που σχετίζεται με τη βιολογική διεργασία

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1 Ωμικές Τεχνολογίες	9
1.1.1 Ολιστική ανάλυση	9
1.1.2 Πρωτεωμική	9
1.2 Στρατηγικές μελέτης πρωτεωμικής	10
1.3 Τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων.....	11
1.3.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	12
1.3.2.1 Χρωματογραφία	14
1.3.2.2 Υγρή χρωματογραφία.....	15
1.3.2.3 Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία	16
1.4 Ο ρόλος της φασματομετρίας μάζας στην πρωτεωμική.....	17
1.4.1 Οργανολογία	18
1.4.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	18
1.4.3 Πηγή Ιόντων.....	19
1.4.3.1 Εκρόφηση με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα.....	19
1.4.3.2. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό	20
1.4.4 Αναλυτής μαζών και ανιχνευτής	21
1.4.5 Σύστημα κενού	23
1.4.6 Υπολογιστικό σύστημα	23
1.5 Equus Asinus.....	25
1.5.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	25
1.5.2 Γενετική	25
1.5.3 Χρησιμότητα.....	26
1.5.4 Ο πληθυσμός των όνων στην παγκοσμίως και στην Ελλάδα.....	26
1.5.5 Διατροφή του όνου	28
1.5.6 Αναπαραγωγή	29
1.5.7 Κυοφορία- Γαλακτοπαραγωγή.....	30
1.5.8 Εκτροφή όνων και διάθεση του γάλακτός τους στην αγορά.....	30
1.6 Γάλα όνου	32
1.6.1 Γενικά για το γάλα όνου	32
1.6.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου σε σχέση με άλλα είδη	32
1.6.2.1 Ολικά στερεά και τέφρα.....	32
1.6.2.2 Λιπαρά.....	33

1.6.2.3 Πρωτεΐνες.....	37
1.6.2.4 Λακτόζη και ολιγοσακχαρίτες	39
1.6.2.5 Μέταλλα	41
1.6.2.6 Βιταμίνες	42
1.7 Πρωτεΐνες ορού.....	44
1.7.1 α-λακταλβουμίνη	44
1.7.2 β-γαλακτογλοβουλίνη	45
1.7.3 Λακτοφερίνη.....	46
1.7.4 Λυσοζύμη	47
2.Υλικά και Μέθοδοι	49
2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για LC-MS/MS.....	49
2.2 Απομόνωση των πρωτεϊνών.....	49
2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	49
2.4 Καθαρισμός των πρωτεϊνών.....	51
2.5 LC-MS/MS	53
2.6 Επεξεργασία δεδομένων και βιοπληροφορική ανάλυση	53
3. Αποτελέσματα	54
4. Συζήτηση.....	106
5. Βιβλιογραφία.....	110

1. Εισαγωγή

1.1 Ωμικές Τεχνολογίες

1.1.1 Ολιστική ανάλυση

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη των φασματοσκοπικών τεχνικών ανάλυσης και της υπολογιστικής ισχύος έχει κάνει εφικτή την προοπτική η οποία έως πρόσφατα θεωρούνταν ανέφικτη: την ολιστική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, δηλαδή, την ανάλυση δειγμάτων με στόχο τη λήψη του πλήρους μοριακού περιεχομένου του δείγματος, μια «συνολική χαρτογράφηση» των συστατικών του. Ολιστική ανάλυση σημαίνει στην πράξη ότι επιλέγεται μια μέθοδος η οποία μπορεί να συλλέξει δεδομένα, πλούσια σε πληροφορίες, χωρίς αρχικές προεπιλογές για την ανίχνευση των ορισμένων συστατικών (Θεοδωρίδης κ.α., 2015). Πεδίο εφαρμογής των ολιστικών αναλυτικών τεχνολογιών είναι οι μελέτες των υπο-ενοτήτων της βιολογίας συστημάτων, τα οποία προσεγγίζονται με τις ωμικές τεχνολογίες: γονιδιωματική, πρωτεωμική, μεταβολωμική κλπ. Όσο προχωράμε από το DNA στο RNA, στις πρωτεΐνες και στη συνέχεια στους μεταβολίτες, η πολυπλοκότητα του συστήματος αυξάνεται και η μελέτη τους γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη. Η συνδυαστική μελέτη διαφόρων ωμικών τεχνολογιών παράγει ολιστικές-συνολικές πληροφορίες για το σύνολο των αλληλεπιδράσεων τους, με την δυναμική αυτών να αποδικνείται ιδιαίτερα πολύτιμη και αξιόλογη σε πολλούς τομείς της βασικής ή εφαρμοσμένης έρευνας, οδηγώντας έτσι στην έννοια της συστημικής βιολογίας. (Κοροβέση, 2019).

1.1.2 Πρωτεωμική

Η πρωτεωμική είναι η συστηματική μεγάλης κλίμακας ανάλυση των πρωτεϊνών. Βασίζεται στην έννοια του πρωτεώματος (proteome) σαν ένα ολοκληρωμένο σύνολο πρωτεϊνών που παράγονται από ένα συγκεκριμένο κύτταρο, ιστό ή οργανισμό, είτε σαν έναν ολοκληρωμένο κατάλογο πρωτεϊνών, ή σαν μια ομάδα/πίνακα πρωτεϊνών που παράγονται υπό ορισμένες συνθήκες. Οι πρωτεΐνες σχετίζονται σχεδόν με κάθε βιολογική διεργασία, συνεπώς μια περιεκτική ανάλυση των πρωτεϊνών του κυττάρου παρέχει μια μοναδική, γενική οπτική που δείχνει πως αυτά τα μόρια αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται για να δημιουργήσουν και να διατηρήσουν ένα βιολογικό σύστημα λειτουργικό. Τα κύτταρα αντιδρούν σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα με το να ρυθμίζουν τα επίπεδα και την δράση των πρωτεϊνών τους, έτσι ώστε αλλαγές στο πρωτέωμα είτε ποιοτικές είτε ποσοτικές, παρέχουν μια στιγμιαία εικόνα των κυτταρικών λειτουργιών. Το πρωτέωμα είναι μια πολύπλοκη δυναμική οντότητα υπό την έννοια αλληλουχίας, δομής, αφθονίας, σταθερότητας, τοπολογίας, τροποποίησης, αλληλεπίδρασης και βιοχημικής λειτουργίας των συστατικών του, παρέχοντας μια πλούσια και ποικίλα πηγή δεδομένων (Twyman, 2013). Το πρωτέωμα σε αντίθεση με το γονιδίωμα είναι δυναμικό και μεταβάλλεται κάθε στιγμή σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των βιολογικών συστημάτων με το περιβάλλον τους, λόγω της επίδρασης εξωγενών παραγόντων ή παθολογικών καταστάσεων.

1.2 Στρατηγικές μελέτης πρωτεωμικής

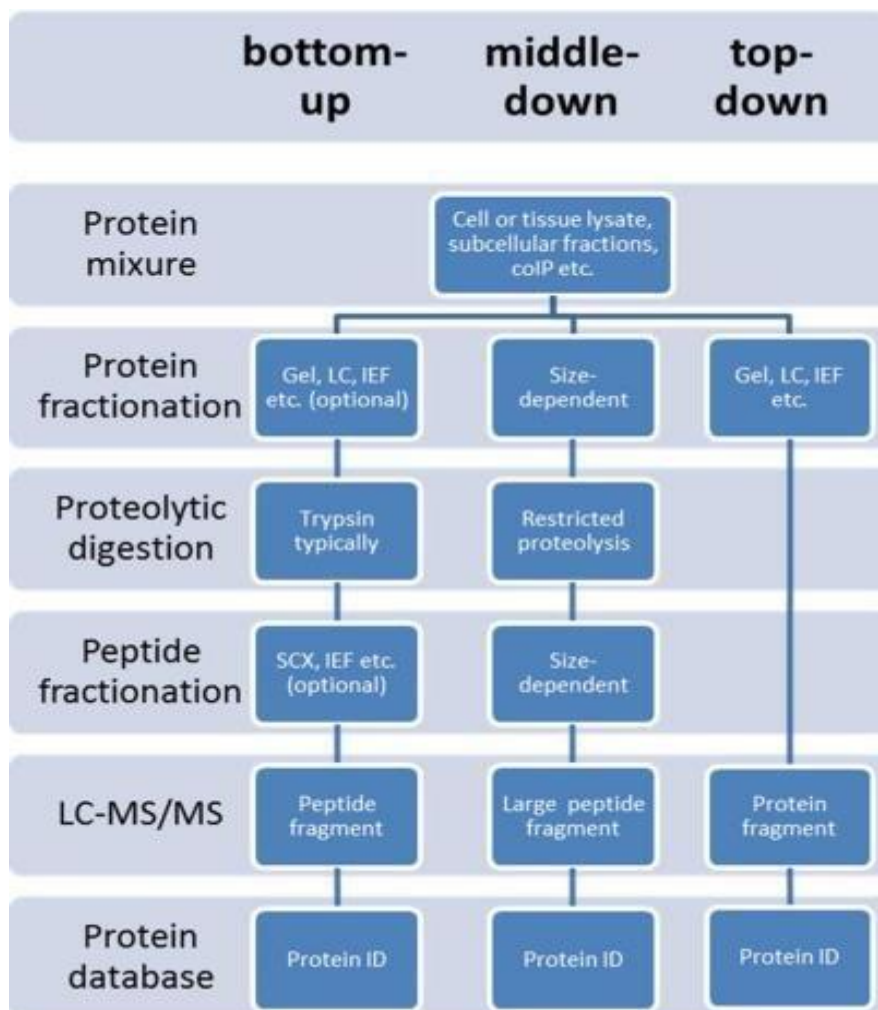
Οι κύριες στρατηγικές προσεγγίσεις πειραμάτων πρωτεωμικής ανάλυσης με χρήση φασματομετρίας μάζας είναι η «bottom-up», η «top-down» και η «middle-down» πρωτεωμική. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η στρατηγική που ακολουθήθηκε είναι η «bottom-up».

Η προσέγγιση «bottom-up» αναφέρεται στο χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών μέσω των πεπτιδίων που απελευθερώνονται μετά από πέψη της πρωτεΐνης με χρήση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων. Σε ένα τυπικό πείραμα πρωτεωμικής, οι απομονωμένες πρωτεΐνες πρώτα πέπτονται πλήρως σε πεπτίδια και στη συνέχεια τα παραγόμενα πεπτίδια υποβάλλονται σε ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων επιτυγχάνεται μετά από σύγκριση θεωρητικών φασμάτων μάζας που δημιουργούνται μετά από εικονική πέψη κατάλληλης Βάσης Δεδομένων με τα πειραματικά φάσματα μάζας του δείγματος (Link et al, 1999; Wolters et al, 2001; Yates, 2004). Η κύρια πρόκληση σε αυτήν την προσέγγιση είναι ότι το μίγμα των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά ετερογενές με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες και γίνεται πιο πολύπλοκο όταν κατακερματιστεί σε πεπτίδια, καθώς κάθε πρωτεΐνη μπορεί να παράγει από 20 έως 50 πεπτίδια ανάλογα με το μέγεθός της. Έτσι, μία υποθετική σκόπιμη αύξηση της πολυπλοκότητας του μίγματος φαίνεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Ωστόσο, η επιλεκτική πέψη με κάποια πρωτεάση φαίνεται να ομαλοποιεί τη βιοχημική ετερογένεια των πρωτεϊνών και να δημιουργεί ένα λιγότερο ετερογενές μίγμα όταν υπάρχουν πολλές μορφές πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ακόμη η υψηλή διακριτική ικανότητα των τεχνικών της πολυδιάστατης χρωματογραφίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να μη φορτίζεται το φασματόμετρο μάζας με μεγάλο αριθμό πεπτιδίων ανά κλάσμα. Εδώ πρέπει να σημειώσουμε ότι για τον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας πρωτεΐνης απαιτείται η ταυτοποίηση ενός μικρού μόνο αριθμού πεπτιδίων.

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της πολυπλοκότητας που προκύπτει από τον κατακερματισμό του μίγματος πρωτεϊνών σε πεπτίδια, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής της προσέγγισης «top-down». Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό πρωτεϊνών που δεν έχουν υποστεί πρωτεολυτική πέψη. Σε αυτήν τη μέθοδο επιλέγονται ολόκληρες πρωτεΐνες για ανάλυση και παράγονται κλάσματα μετά τη σύγκρουση των ίδιων των πρωτεϊνών μεταξύ τους αντί να υποστούν πέψη. Η προσέγγιση αυτή λοιπόν μας προσφέρει πλεονεκτήματα ως προς την απόκτηση περαιτέρω γνώσεων όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών αλλά και τη μείωση της πολυπλοκότητας των αποτελεσμάτων. Ο περιορισμός έγκειται στο μέγεθος των παραγόμενων πρωτεϊνών καθώς ένα κλασσικό αξιόπιστο φασματόμετρο έχει ανώτατο όριο τα 50KDa (περίπου 500 αμινοξέα).

Από το συνδυασμό των δύο παραπάνω προσεγγίσεων προκύπτει μία ακόμη προσέγγιση με το όνομα «middle down». Σε αυτή τη μέθοδο αναλύονται μεγαλύτερα πεπτιδικά θραύσματα από την «bottom-up» περιορίζοντας έτσι τον πεπτιδικό πλεονασμό μεταξύ των πρωτεϊνών αλλά και συνδυάζοντας την περαιτέρω γνώση για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις χωρίς τις προκλήσεις της προσέγγισης «top-down».

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 1) φαίνονται τα βήματα που ακολουθεί η κάθε στρατηγική προσέγγιση σε ένα πείραμα πρωτεωμικής ανάλυσης.



Εικόνα 1 . Στρατηγικές προσέγγισης του πρωτεώματος (Zhang et al, 2013)

1.3 Τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων

Τα τελευταία χρόνια με την πρόοδο της τεχνολογίας και με τις βελτιώσεις στα φασματομέτρα μάζας, από την άποψη της ευαισθησίας και της ανάλυσης, παρουσιάστηκε η ευκαιρία να εντοπίσουν πρωτεΐνες σε πολύ χαμηλή αφθονία (Qian et al, 2006). Παρ'όλα αυτά, καθίσταται προφανές ότι μια πλήρης και αναπαραγώγιμη ανίχνευση της περιεκτικότητας πολύπλοκων δειγμάτων σε πρωτεΐνες είναι πραγματικά δύσκολο να ληφθεί. Δύο είναι οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική για την ανάλυση των πρωτεϊνών. Αυτές είναι οι μέθοδοι που βασίζονται στα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης και αυτές που βασίζονται σε χρωματογραφικές μεθόδους (Camerini et al, 2015).

1.3.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

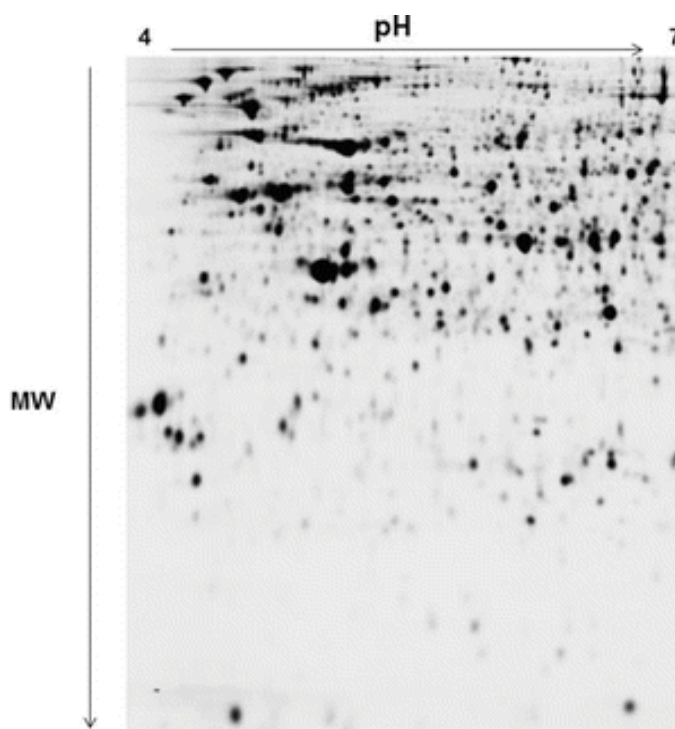
Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (2D-GE) είναι μια τεχνική που έχει περιγραφεί για πρώτη φορά το 1975 από τον O'Farrell (O'Farrell, 1975). Έκτοτε, πολλές μελέτες έχουν συμβάλει στη βελτίωση της απόδοσης του 2D-GE, αλλά η αρχή παραμένει η ίδια στην πρώτη διάσταση. Οι πρωτεΐνες αρχικά διαχωρίζονται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο με ισοηλεκτρική εστίαση και σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος στη δεύτερη διάσταση. Δεδομένου ότι αυτές οι δύο παράμετροι δεν σχετίζονται, είναι πιθανό να επιτευχθεί μια σχεδόν ομοιόμορφη κατανομή πρωτεϊνικών κηλίδων σε ένα δισδιάστατο πήκτωμα. Ο προκύπτων χάρτης κηλίδων πρωτεϊνών μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτύπωμα των πρωτεϊνών του δείγματος που αναλύθηκε (Baggerman et al, 2005). Ο αριθμός των κηλίδων που μπορούν να ανιχνευθούν σε 2D-GE είναι πολύ υψηλός καθώς χιλιάδες σημεία μπορούν να απεικονιστούν και μεταξύ αυτών μπορούν επίσης να διακριθούν διαφορετικές ισομορφές ή διαφοροποιημένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ίδιας πρωτεΐνης (Εικόνα 2). Οι κηλίδες σε 2D-GE μπορούν να ανιχνευθούν με χημικές διαδικασίες χρώσης (coomassie blue ή χρώση με άργυρο). Με αυτήν τη διαδικασία, αντί για περιγραφή του πρωτεϊνικού περιεχομένου, μια συγκριτική ανάλυση επιτρέπει την ταυτοποίηση διαφορετικών εκφρασμένων ή νέων διακριτών πρωτεϊνών σε πληθώρα δειγμάτων. Αξιολογώντας τις συντεταγμένες των σημείων στους χάρτες δύο διαστάσεων και την ένταση της χρώσης κάθε κηλίδας μπορούν να ληφθούν τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες. Η αναπαραγωγικότητα του διαχωρισμού είναι ένα κρίσιμο σημείο για μια σωστή σύγκριση και συχνά απαιτείται η χρήση λογισμικού για την ευθυγράμμιση των χαρτών δύο διαστάσεων και την αποκάλυψη των διαφορών τους. Εκτός από τις παραδοσιακές μεθόδους χρώσης, τον άργυρο και το κυανό της κουμασίνης, η χρήση αντισωμάτων επιτρέπει μια πιο ειδική ανίχνευση κηλίδων, εκμεταλλευόμενη την ειδικότητα αντιγόνου-αντισώματος. Αυτή είναι η στρατηγική που χρησιμοποιείται για την ανοσοπρωτεωμική, ιδίως για τη μελέτη αυτοάνοσων ασθενειών ή για την αναζήτηση φυσικών αντισωμάτων που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα κατά των όγκων (He et al, 2007).

Η τεχνική της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης εμφανίζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η ευκολία απεικόνισης των πρωτεϊνών του δείγματος, η ταυτοποίηση μεταμεταφραστικών αλλαγών, η εύκολη συγκριτική μελέτη του πρωτεώματος μεταξύ δύο δειγμάτων και η έκφραση ποσοτικών διαφορών μεταξύ των πρωτεϊνών τους.

Μια εναλλακτική πρωτεωμική στρατηγική που βασίζεται στο 2D-GE είναι η διαφορική ηλεκτροφόρηση σε γέλη (DIGE): τα δείγματα πρωτεΐνης επισημαίνονται με διαφορετικές βαφές φθορισμού και αναμιγνύονται μαζί πριν από τη φόρτωση του 2D-GE (Alban et al, 2003). Με αυτή τη διαδικασία, τα προς σύγκριση δείγματα διαχωρίζονται υπό πανομοιότυπες πειραματικές συνθήκες και τα αντίστοιχα σημεία μπορούν να διακριθούν χάρη σε διαφορετικά φάσματα διέγερσης / εκπομπής, επιτρέποντας άμεση ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση των κηλίδων πρέπει να ταυτοποιηθούν με ανάλυση φασματομετρίας μάζας (MS) με δακτυλικό αποτύπωμα μάζας πεπτιδίου (PMF) ή με διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS / MS). Η πρώτη μεθοδολογία είναι γενικά αποτελεσματική για την ταυτοποίηση μονών και πολύ

καθαρών πρωτεϊνών και επομένως είναι γενικά εφαρμόσιμη στην ανάλυση κηλίδων από 2D-GE (Henzel et al, 1993; Pappin et al, 1993; Yates et al, 1993; Mann et al, 1993).

Συνήθως, η ακριβής ανάλυση MS αποκαλύπτει την παρουσία περισσότερων από μία πρωτεϊνών σε κάθε σημείο του πηκτώματος δυο διαστάσεων. Τα προβλήματα διαχωρισμού αφορούν την παρουσία υψηλής αφθονίας πρωτεϊνών στα δείγματα, με αποτέλεσμα οι χαμηλότερες σε συγκέντρωση πρωτεΐνες να μην εμφανίζονται διακριτά στο πηκτώμα. Παρ' όλο που η διδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις πρωτεωμικής, εξαιτίας των προβλημάτων στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών, δεν είναι εφαρμόσιμη σε όλες τις περιπτώσεις. Οι πρωτεΐνες με ακραίες τιμές ισοηλεκτρικού σημείου ($pI < 3$ ή $pI > 10$) καθώς και οι πρωτεΐνες με είτε πολύ χαμηλό μοριακό βάρος ($< 10kDa$) είτε πολύ υψηλό ($> 200kDa$) δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν. Επιπλέον, η χαμηλή διαλυτότητα ορισμένων πρωτεϊνών στο νερό, όπως για παράδειγμα είναι οι υδρόφοβες μεμβρανικές πρωτεΐνες, θα μπορούσε να αποτρέψει τη χρήση 2D-GE. Επίσης, πριν από την ανάλυση MS, οι κηλίδες πρέπει να καταταμηθούν ενζυματικά, ως εκ τούτου προκύπτουν περιορισμοί που σχετίζονται με το βήμα ανάκτησης των πεπτιδίων, γεγονός που όλα τα πρωτόκολλα που βασίζονται στην ηλεκτροφόρηση πηκτής οφείλουν να λαμβάνουν υπόψη. Τέλος, ο χρόνος που απαιτείται για μια πρωτεϊνική ανάλυση που βασίζεται στο 2D-GE είναι σημαντικός ενώ ακόμα απαιτείται εκτενής χειροκίνητος χειρισμός, καθώς για την απόκτηση καλής επαναληψιμότητας απαιτείται η εκτέλεση του ίδιου πειράματος (2D-GE) πολλές φορές στις ίδιες συνθήκες (Lopez et al, 2007). Συμπερασματικά πρόκειται για μια χρονοβόρα τεχνική, χρήσιμη σε πολλούς τομείς πρωτεωμικής όπου απαιτείται λήψη αποτελέσματος η 2D-GE αλλά μη εφαρμόσιμη σε κάποιους άλλους όπως για παράδειγμα η κλινική πρωτεωμική.



Εικόνα 2. 2D-GE πηκτής ηλεκτροφόρησης

1.3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια σειρά άλλων μεθόδων πρωτεωμικής για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που σχετίζονται με προσεγγίσεις με βάση το πήκτωμα που περιγράφονται προηγουμένως. Μέσω των πρόσφατα αναπτυγμένων τεχνικών πρωτεωμικής μπορούν να αναλυθούν υδρόφοβες πρωτεΐνες καθώς και πεπτίδια που είναι περιορισμοί στην 2DE (Yates et al, 2009). Αυτές οι προσεγγίσεις χρησιμοποιούν χρωματογραφία συζευγμένη με παράλληλη φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών από πεπτίδια που λαμβάνονται από την ενζυματική πέψη ενός ολόκληρου εκχυλίσματος πρωτεϊνών. Εν ολίγοις, στις χρωματογραφικές τεχνικές που είναι συζευγμένες με φασματομετρία μάζας, δεν είναι η πρωτεΐνη αυτή καθ'αυτή που διαχωρίζεται και αναγνωρίζεται. Αντ' αυτού, οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πεπτίδια με τη χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων και στη συνέχεια, αυτά τα πεπτίδια διαχωρίζονται με χρωματογραφία και εισέρχονται στο φασματομέτρο μάζας. Η φασματομετρία μάζας αυτών των πεπτιδίων επιτρέπει τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του αρχικού δείγματος με τη χρήση μεθόδων και προσεγγίσεων βιοπληροφορικής. Δεδομένου ότι τα πεπτίδια μπορούν να διαχωριστούν ευκολότερα με υγρή χρωματογραφία από τις πρωτεΐνες, μια πρωτεωμική ανάλυση που βασίζεται σε πεπτίδια μπορεί να επιτευχθεί πολύ ταχύτερα, φθηνότερα και πιο αξιόπιστα από μια πλήρη ανάλυση με βάση το πήκτωμα 2D-GE (Baggerman et al, 2005).

1.3.2.1 Χρωματογραφία

Χρωματογραφία ονομάζουμε οποιαδήποτε τεχνική διαχωρισμού κατανέμει τα συστατικά ενός μείγματος ανάμεσα σε μια στατική φάση και μια κινητή φάση. Ανάλογα με την κινητή φάση η χρωματογραφία χωρίζεται σε αέρια και υγρή. Υπάρχουν πολλές μορφές χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται στην πρωτεωμική όπως:

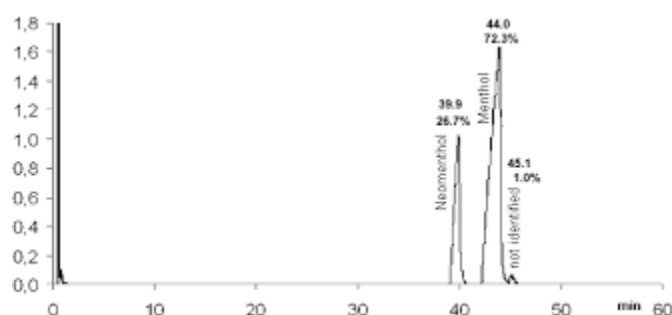
- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης, όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθος τους
- Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το φορτίο τους
- Χρωματογραφία συγγένειας, όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση την ικανότητα πρόσδεσής τους με έναν ειδικό υποκαταστάτη (ligand)
- Υδρόφοβη χρωματογραφία όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση την υδροφοβικότητά τους

Θεωρητικά με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων μια πρωτεΐνη μπορεί να απομονωθεί πλήρως. Πρακτικά κάτι τέτοιο, τις περισσότερες φορές, είναι ανέφικτο καθώς οι πρωτεΐνες δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά εξαιτίας της μη ομοιόμορφης ροής της κινητής φάσης (Meletis et al, 2011). Παρ'όλα αυτά, όλες οι μορφές χρωματογραφίας βασίζονται στην ίδια αρχή. Ένα μείγμα μορίων διαλυτοποιείται σε έναν διαλύτη αποτελώντας την κινητή φάση. Καθώς η φάση αυτή κινείται πάνω στη στατική τα συστατικά του μείγματος μπορούν να αλληλεπιδρούν τόσο με τα μόρια της στατικής όσο και με τα μόρια της κινητής φάσης.

Ανάλογα με την ισχύ αυτής της αλληλεπίδρασης μεταβάλλεται η ταχύτητα μετακίνησης των συστατικών του μείγματος με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται και να εκλύονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

1.3.2.2 Υγρή χρωματογραφία

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός βασίζεται σε φυσικοχημικές ιδιότητες όπως το μέγεθος, το φορτίο και η υδροφοβικότητα. Στην υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography-LC) που χρησιμοποιείται στην πρωτεωμική ή στατική φάση είναι συνήθως ένα πορώδες υλικό με τη μορφή πακεταρισμένων σωματιδίων εντός μιας στήλης. Η κινητή φάση είναι ένα διάλυμα που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια (ανάλογα με την περίπτωση) και ρέει μέσα από τη στήλη είτε με βαρύτητα (LC) είτε υπό πίεση (HPLC). Η κινητή φάση είναι πάντα υγρή ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή. Σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία του διαχωρισμού παίζει η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Το χρωματογράφημα (εικόνα 3) μας δίνει σημαντικές πληροφορίες όπως τον αριθμό και τη θέση των χρωματογραφικών κορυφών σε σχέση με το χρόνο έκλυσης, στοιχεία που μας δίνουν μια εικόνα για την πολυπλοκότητα του μείγματος και την ποιοτική σύστασή του (σε σύγκριση με πρότυπα). Επιπλέον από το εμβαδό που καταλαμβάνει η κορυφή κάθε συστατικού παίρνουμε πληροφορίες για τη συγκέντρωσή του στο διάλυμα. Όταν το σύστημα είναι συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας, μέσω ταυτοποίησης των φασμάτων των πεπτιδίων επιτυγχάνεται αναγνώριση των πρωτεϊνών (Korfmacher, 2005).



Εικόνα 3. Χρωματογράφημα

Η υγρή χρωματογραφία χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, τη χρωματογραφία κανονικής φάσης και τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση συνήθως αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου και είναι πολική, ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική. Οι πολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρότερα στη στατική φάση και συνεπώς οι μη-πολικές ενώσεις εκλύονται πρώτες από τη στήλη.

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, μεγάλες αλυσίδες υδρογονάνθρακα βρίσκονται προσδεμένες στην επιφάνεια του υποστρώματος καθιστώντας τη στατική φάση μη πολική. Η κινητή φάση είναι πολική. Μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα αλληλεπιδρούν ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλύονται νωρίτερα. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η πιο

κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της υγρής χρωματογραφίας. Περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με χρωματογραφία αντίστροφης

φάσης βρίσκουν οι στήλες C18 οι οποίες περιέχουν οκταδεκυλοσιλάνιο ($R=C_{18}H_{37}$) ως στατική φάση. Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προηγούνται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία μπορούμε να ισχυριστούμε ότι «τα όμοια διαχωρίζουν τα όμοια», που εφαρμόζεται εδώ με την έννοια ότι πολικές στήλες απαιτούνται για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων και το αντίστροφο (Καρκαλούσος, 2015). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με στερεή στατική φάση (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Στήλες αντίστροφης φάσης HPLC

1.3.2.3 Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία

Οι λόγοι που καθιστούν την υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) τόσο διαδεδομένη είναι η ευαισθησία της, η ακρίβεια της σε ποσοτικούς προσδιορισμούς και η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικώς ευαίσθητων ουσιών ενδιαφέροντος (Κωνσταντουράκη κ.α., 2018). Ενώσεις που αναλύονται με την μέθοδο αυτή είναι τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα φυτοφάρμακα, οι υδρογονάνθρακες, οι υδατάνθρακες, τα φάρμακα κ.α. (Skoog et al, 2006).

Στην αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) που χρησιμοποιείται στην πρωτεωμική η αρχή διαχωρισμού είναι η υδροφοβικότητα. Το γεγονός ότι η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια πίεσης μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιούμε στήλες με σημαντικά μικρότερη διάμετρο και να παίρνουμε πιο ακριβείς διαχωρισμούς. Η RP-HPLC είναι μια από τις πιο σημαντικές μεθόδους στην πρωτεωμική καθώς παρουσιάζει υψηλή διαχωριστική ικανότητα και επειδή μπορεί να συνδυάσει διαφορετικές στατικές φάσεις με ένα μεγάλο εύρος ρυθμιστικών διαλυμάτων, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα πραγματοποίησης πολύπλοκων διαχωρισμών. Η RP-HPLC χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό πεπτιδίων μετά την ενζυμική πέψη τους μέσω θρυψίνης και τις περισσότερες φορές συνδυάζεται με φασματόμετρο μάζας τύπου ESI (ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού) ή με σύζευξη δύο αναλυτών μάζας (LC-MS/MS) με σκοπό την πληρέστερη ταυτοποίησή τους.

Πιο συγκεκριμένα η κύρια πρωτεωμική προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων βασίζεται σε χρήση υγρής χρωματογραφίας. Στην πρωτεωμική η υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται πιο συχνά από τις άλλες μορφές χρωματογραφίας

εξαιτίας της ευελιξίας και της συμβατότητάς της με τη φασματομετρία μάζας. Σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση πηκτής, η υγρή χρωματογραφία είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό τόσο πρωτεϊνών όσο και πεπτιδίων, και μπορεί επομένως να εφαρμοστεί προγενέστερα της 2D-GE για να προ-κλασματώσει το δείγμα, και μετά την 2D-GE για να διαχωρίσει τα πεπτιδικά μίγματα από απλές αποκομμένες κηλίδες, ή αντίστοιχα αντί για την 2D-GE σαν την κυρίαρχη τεχνολογία διαχωρισμού πρωτεϊνών/πεπτιδίων. Με αυτήν τη μεθοδολογία πράγματι τα πεπτιδία διαχωρίζονται και κατακερματίζονται επιτρέποντας ακριβέστερη ταυτοποίηση πρωτεΐνης, ιδιαίτερα σε σύνθετα μίγματα. Τα φασματόμετρα μάζας έχουν ένα ανώτατο όριο ανίχνευσης μάζας, οπότε οι πρωτεΐνες συνήθως μετατρέπονται σε πεπτιδία πριν το διαχωρισμό τους ώστε τα κλάσματα να μπορούν να εισέλθουν κατευθείαν στο φασματόμετρο μάζας, παρόλο που αυτό παράγει μεγάλο αριθμό πεπτιδικών τμημάτων (fragments). Επομένως όπως στην 2D-GE, οι πολυδιάστατοι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές χρησιμοποιούνται ώστε να διαχωρίζουν πεπτιδικά μίγματα. Εναλλακτικά οι LC μέθοδοι μπορούν να εκμεταλλευτούν διαφορετικές αρχές διαχωρισμού, όπως το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα, και τη συγγένεια για συγκεκριμένους υποκαταστάτες (ligands). Προκειμένου να έχουμε ανώτερη ισχύ κλασματοποίησης πεπτιδίων και συνεπώς μεγαλύτερο αριθμό των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, ένας συνδυασμός δύο διαδοχικών διαδικασιών διαχωρισμού, ο πολυδιάστατος διαχωρισμός, έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο πλεονεκτικός.

Το μεγάλο πλεονέκτημα των χρωματογραφικών τεχνικών είναι ότι παρέχουν ποικιλία μεθόδων για ανάλυση ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών. Επιπλέον ο συνδυασμός τους με τη φασματομετρία μάζας μας παρέχει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Οι μέθοδοι αυτές είναι σε μεγάλο βαθμό αυτοματοποιημένες με αποτέλεσμα να περιορίζεται σημαντικά ο ρόλος του χρήστη. Τα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι ότι δεν μας παρέχουν μια οπτική απεικόνιση των πρωτεϊνών όπως η 2D-GE και ότι ο εξοπλισμός τους είναι ακριβός.

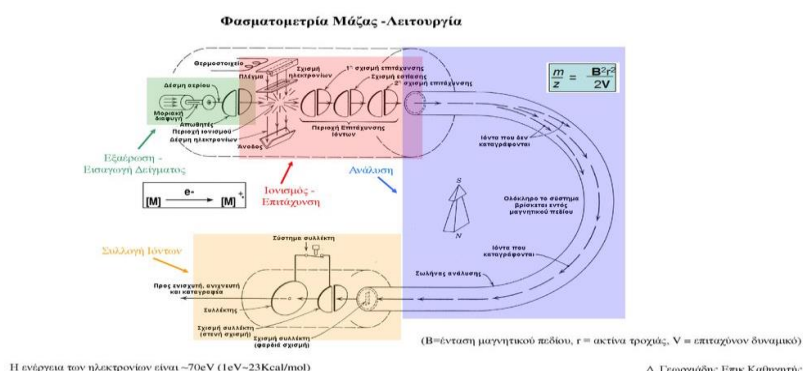
1.4 Ο ρόλος της φασματομετρίας μάζας στην πρωτεωμική

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μάζας ατόμων ή μορίων. Η φασματομετρία μάζας βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων, στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και μέτρησης της μάζας τους. Ο διαχωρισμός των παραγόμενων φορτισμένων σωματιδίων γίνεται με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι η καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε m/z (φάσμα μαζών). Η χρήση της φασματομετρίας μάζας ξεκίνησε τα πρώτα χρόνια του προηγούμενου αιώνα και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τον προσδιορισμό της ατομικής μάζας των στοιχείων. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι ορισμένα στοιχεία εμφάνισαν αρκετές μάζες γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη ισοτόπων. Στη συνέχεια η φασματομετρία μάζας αφιερώθηκε στον προσδιορισμό όλων των ισοτόπων κάθε στοιχείου. Σήμερα συμβαίνει το αντίστροφο: οι μάζες προσδιορίζονται και χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της στοιχειακής σύνθεσης ανόργανων ενώσεων. Η εξέλιξη δύο τεχνικών MS (ηλεκτροψεκασμού- ESI και ιοντισμού εκρόφησης από μήτρα μέσω λέιζερ- MALDI) στα τέλη του 1980 για το σχηματισμό άθικτων μοριακών ιόντων έκανε τα πολυπεπτιδία προσβάσιμα σε μαζική φασματομετρική ανάλυση.

Αυτό βοήθησε την ανάπτυξη νέων αναλυτών μάζας σχεδιασμένους για την αντιμετώπιση των προκλήσεων της ανάλυσης πρωτεϊνών και πρωτεωμάτων (Domon et al, 2006). Η φασματομετρία μάζας (MS) εξελίσσεται ολοένα και περισσότερο και μετατρέπεται στην κύρια μέθοδο για την ανάλυση πρωτεϊνών κατ' επέκταση που βασίζεται στη φασματομετρία μάζας είναι ένας κλάδος που συνεχώς αναπτύσσεται, κάτι που φαίνεται από το γεγονός πως η ανακάλυψη και η ανάπτυξη μεθόδων ιοντισμού πρωτεϊνών βραβεύθηκε με Νόμπελ Χημείας το 2002 (Aebbersold et al, 2003).

1.4.1 Οργανολογία

Το φασματόμετρο μάζας (Εικόνα 5) αποτελείται από τα εξής τμήματα: 1) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος που συχνά πραγματοποιείται υπό αέρια ή υγρή μορφή, 2) την πηγή ιόντων όπου το δείγμα μετατρέπεται σε ιόντα, 3) τον αναλυτή μάζας όπου τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο m/z , 4) τον ανιχνευτή στον οποίο συλλέγονται τα ιόντα μετά το διαχωρισμό και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα, 5) το σύστημα υψηλού κενού το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού και 6) το υπολογιστικό σύστημα που παρέχει το κατάλληλο λογισμικό για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος.



Εικόνα 5. Οργανολογία φασματομέτρου μάζας

Στα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε το υβριδικό φασματόμετρο μάζας "Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Thermo Scientific™". Τα χαρακτηριστικά του φασματομέτρου αυτού θα αναλυθούν περαιτέρω καθώς συνδυάζεται ο τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μάζας Orbitrap™ Thermo Scientific™ με την τεχνολογία πηγής ιόντων Velos Pro™ Thermo Scientific™. Ο συνδυασμός αυτός επιφέρει υψηλή ανάλυση, ταχύτητα, ευαισθησία και πληροφορία συμπληρωματικής θραυσματοποίησης των ιόντων.

1.4.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο χωρίς την διατάραξη του κενού. Στην περίπτωση εισαγωγής στερεών ή μη πτητικών υγρών χρησιμοποιείται ένας μεταλλικός ή υάλινος σωλήνας που ονομάζεται ακροφύσιο και εισέρχεται στην πηγή ιόντων. Σε περίπτωση που το φασματόμετρο μάζας

συνδέεται με χρωματογραφικό σύστημα τότε χρησιμοποιούνται ειδικές διατάξεις ποικίλης πολυπλοκότητας που εξασφαλίζουν συνεχή ροή από υγρούς ή αέριους χρωματογράφους προς το φασματόμετρο.

1.4.3 Πηγή Ιόντων

Η πηγή ιόντων παράγει τη δέσμη ιόντων που είναι αντιπροσωπευτική της αρχικής σύστασης του δείγματος και επιταχύνει τη δέσμη ιόντων εντός του αναλυτή μαζών. Συγκεκριμένα η πηγή ιόντων ιονίζει το δείγμα και στη συνέχεια τα φορτισμένα μόρια του δείγματος μεταφέρονται μέσω μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων στον αναλυτή μαζών. Η τεχνική του ιοντισμού επιλέγεται με σκοπό τον καθορισμό του τύπου των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν από το φασματόμετρο μάζας.

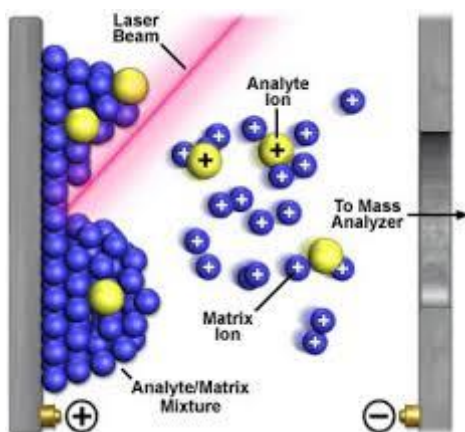
Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι οι πηγές αέριας φάσης στις οποίες το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιονίζεται. Παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν οι πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και οι πηγές χημικού ιοντισμού (CI). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πηγές εκρόφησης στις οποίες το δείγμα, υγρό ή στερεό μετατρέπεται σε ιόντα που βρίσκονται στην αέρια φάση. Παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν οι πηγές βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB), οι πηγές ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI) και οι πηγές στις οποίες ο ιοντισμός γίνεται με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Όλες αυτές οι κατηγορίες πηγών ιόντων διαφέρουν ως προς τον τρόπο που γίνεται ο ιοντισμός αλλά και ως προς τον τρόπο που πραγματοποιείται η θραυσματοποίηση του δείγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κάθε τεχνική να χρησιμοποιείται για διαφορετικά μόρια και να οδηγεί σε διαφορετικές μοριακές μάζες.

1.4.3.1 Εκρόφηση με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα

Η τεχνική εκρόφησης/ιονισμού με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI) είναι μια ήπια μέθοδος ιονισμού η οποία χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας για ανάλυση πρωτεϊνών από πήκτωμα 2D-GE. Στη διαδικασία αυτή το αναλυόμενο πρωτεϊνικό δείγμα αναμειγνύεται με μια οργανική ένωση (matrix) που απορροφά στο μήκος κύματος που εκπέμπει το λέιζερ. Έπειτα το αναλυόμενο δείγμα και το οργανικό μόριο διαλύονται σε οργανικό διαλυτικό μέσο και τοποθετούνται στην ειδική επιφάνεια ενός μεταλλικού δειγματολήπτη όπου αφήνονται μέχρι να ξηρανθούν. Ο διαλύτης εξατμίζεται με αποτέλεσμα να σχηματίζονται κρύσταλλοι του μείγματος μήτρας-πρωτεϊνών (Ρόκα, 2013). Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι τοποθετούνται στο θάλαμο κενού του φασματόμετρου μάζας και εκτίθενται σε υψηλή τάση. Την ίδια στιγμή επάγεται ιοντισμός από πηγή λέιζερ (συνήθως αζώτου), καθώς η ενέργεια του λέιζερ απορροφάται από τους κρυστάλλους και εκπέμπεται από αυτούς με τη μορφή θερμότητας με αποτέλεσμα την ταχεία εξάχνωσή τους, δημιουργώντας ιόντα σε αέρια φάση που κατά κύριο λόγο έχουν φορτίο +1 (Hillenkamp et al, 1991; Karas et al, 1987). Η μέθοδος MALDI (εικόνα 6) χρησιμοποιείται

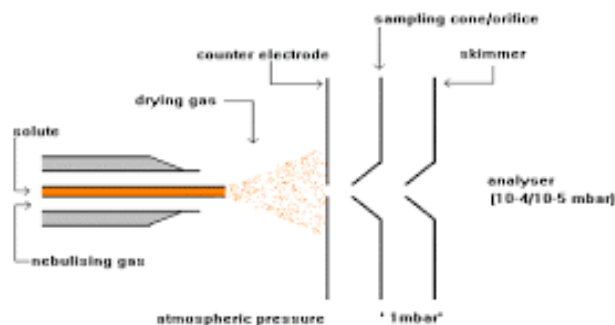
συνήθως για την ανάλυση απλών πρωτεϊνικών μειγμάτων (κηλίδες από πήκτωμα 2D-GE) και συνδέεται τις περισσότερες φορές με αναλυτή μάζας χρόνου πτήσης (TOF).



Εικόνα 6. MALDI

1.4.3.2. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Στην παρούσα εργασία το φασματομέτρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI). Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (εικόνα 7) χαρακτηρίζεται ως μια μέθοδος ιοντισμού κατά την οποία επιτυγχάνεται ιοντισμός των μορίων σε ήπιες συνθήκες (ατμοσφαιρική πίεση) που οδηγούν στη μικρή θραύση αυτών. Σε αυτή τη μέθοδο, το υγρό δείγμα ψεκάζεται μέσα από έναν τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4kV) και σχηματίζεται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων, καθώς το δείγμα πρέπει να βρίσκεται υπό μορφή ιόντων στο διάλυμα πριν την εκρόφηση. Στην συνέχεια λαμβάνει χώρα η αποδιαλύτωση (desolvation) η οποία πραγματοποιείται με ροή αερίου ή μέσω ελαφράς θέρμανσης του τριχοειδούς σωλήνα. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας τα ιόντα διαπερνούν τη σχισμή εισόδου του φασματομέτρου. Η πυκνότητα του ηλεκτρικού πεδίου επιφανειακά των σταγονιδίων οδηγεί σε ελάττωσή τους μέσω εξάτμισης τους, ενώ όταν οι επιφανειακές απωθητικές δυνάμεις Coulomb υπερσχύουν των δυνάμεων επιφανειακής τάσης, οι σταγόνες διασπώνται σε μικρότερες. Με αυτόν τον τρόπο τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μάζας σε μοριακό μέγεθος ενώ τα ουδέτερα μόρια εκροφώνται προς τα έξω. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για μικρά και μεγάλα μόρια, ενώ επιτρέπει παράλληλα την παραγωγή ιόντων όχι μόνο με βαθμό ιοντισμού 1 αλλά και πολλαπλών βαθμών ιοντισμού, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανάλυση μιας μεγάλης ποικιλίας βιολογικών μορίων .



Εικόνα 7. ESI

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί μια καλή τεχνική για την ανάλυση μιας ποικιλίας πολικών και μετρίως πολικών μορίων που μπορούν να ιοντιστούν σε διάλυμα. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοσθεί σε θερμικά ασταθή μόρια λόγω της μικρής θερμοκρασίας ιοντισμού. Είναι μια μέθοδος με καλή ευαισθησία και μπορεί παράλληλα να συνδυασθεί τόσο με υγρή χρωματογραφία όσο και με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Από την άλλη πλευρά ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί μια μέθοδο που επηρεάζεται έντονα από την παρουσία αλάτων στο διαλύτη και δεν εφαρμόζεται σε μη πολικά μόρια. Επιπλέον χαρακτηρίζεται από μικρή ροή κινητής φάσης και ελλοχεύει ο κίνδυνος σχηματισμού ιόντων προσθήκης.

1.4.4 Αναλυτής μαζών και ανιχνευτής

Οι αναλυτές μαζών έχουν την ιδιότητα να διαχωρίζουν τα ιόντα που έχουν παραχθεί στην πηγή ιόντων με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο m/z . Για να επιτευχθεί αυτός ο διαχωρισμός χρησιμοποιείται ο δεύτερος νόμος του Νεύτωνα: $F=m \cdot a$, όπου F είναι η δύναμη που ασκείται στα ιόντα, m είναι η μάζα τους και a η επιτάχυνση που αποκτούν. Το σήμα που καταγράφεται στον ανιχνευτή οφείλεται σε ένα μόνο m/z σε κάθε χρονική στιγμή.

Οι αναλυτές μάζας χαρακτηρίζονται από δύο μεγέθη: την "ακρίβεια της μάζας" (mass accuracy) και τη "διακριτικότητα της μάζας" (mass resolution ή resolving power). Η ακρίβεια μάζας είναι το μέγεθος που δηλώνει την εγγύτητα της πειραματικά μετρούμενης τιμής m/z στη θεωρητική τιμή m/z του ιόντος. Η ακρίβεια μάζας εκφράζεται με δύο τρόπους :

α) Σχετική έκφραση-μέρη ανά εκατομμύριο δηλαδή:

$$\frac{|\text{πειραματική τιμή} - \text{θεωρητική τιμή}|}{\text{θεωρητική τιμή}} \cdot 10^{-6} = \text{ppm}$$

β) Απόλυτη έκφραση με μονάδες μάζας mDa ή mmu όπου:

$$1 \text{ mmu} = 0,001 \text{ u}$$

1 mDa= 0,001 Da

Το άλλο μέγεθος που χαρακτηρίζει έναν αναλυτή μάζας είναι η διακρισιμότητα μάζας (mass resolution, R). Σε ένα φάσμα μαζών, η διακρισιμότητα μάζας ορίζεται ως η παρατηρούμενη τιμή m/z διαιρούμενη με τη μικρότερη διαφορά $\Delta(m/z)$ δύο ιόντων που μπορούν να διαχωριστούν:

$$R = (m/z)/\Delta(m/z) \text{ ή σε ppm} = 10^6 * R$$

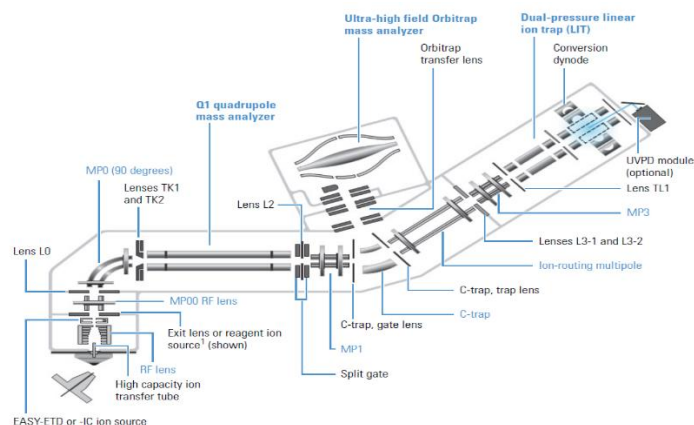
Πιο συγκεκριμένα η διακρισιμότητα μάζας εκφράζει τη διάκριση δύο κορυφών σε ίδια ή περίπου ίδια τιμή του m/z, ενώ η διακριτική αυτή ικανότητα επιτυγχάνεται όταν δεν υπάρχουν παρεμβολές διαφορετικών ιόντων κατά την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου ιόντος.

Συνήθως το Δm εκφράζεται και ως το εύρος της κορυφής σε δεδομένο ποσοστό του ύψους της (50%, 10%, 5%).

Οι αναλυτές μαζών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι οι αναλυτές τύπου δέσμης στους οποίους τα ιόντα επιταχύνονται μέσω ηλεκτρικών ή/και μαγνητικών πεδίων και διαχωρίζονται στο χρόνο και στο χώρο. Τέτοιοι αναλυτές είναι το τετράπολο (quadrupole, Q), ο αναλυτής μαγνητικού τομέα (magnetic sector) και ο αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF). Η δεύτερη κατηγορία είναι οι αναλυτές τύπου παγίδας στους οποίους τα ιόντα παγιδεύονται σε ένα ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο και αυτά ανιχνεύονται από την εκδίωξή τους από το πεδίο ή από την ταλάντωσή τους σε αυτό. Τέτοιοι αναλυτές είναι η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT) και ο αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FTICR).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, το φασματόμετρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει τη μέθοδο LTQ (linear trap quadrupole) η οποία αποτελεί παγίδα ιόντος γραμμικού τετραπόλου, όπως και την τεχνολογία Orbitrap (εικόνα 8). Οι αναλυτές μάζας παγίδας ιόντων χρησιμοποιούν ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία για να παγιδεύουν τα ιόντα, ή χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό στατικών και "υπό" ταλάντωση ηλεκτρικών πεδίων.

Όσον αφορά την τεχνολογία Orbitrap, τα ιόντα από την πηγή αποθηκεύονται σε ιοντική παγίδα και ενίονται σταδιακά στο Orbitrap. Έτσι τα ιόντα ταλαντώνονται γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο κατά μήκος του άξονα z. Με αυτόν τον τρόπο οι τροχιές των ιόντων μετατρέπονται από ελλειπτικές σε ελικοειδείς. Η συχνότητα ταλάντωσής τους είναι αντιστρόφως ανάλογη του λόγου m/z. Για την είσοδο των ιόντων στο Orbitrap είναι απαραίτητη μια κυρτή παγίδα ιόντων (C-trap). Με τις ελικοειδείς τροχιές των ιόντων, αξονικές ταλαντώσεις των δακτυλίων ιόντων ανιχνεύονται από την τρέχουσα εικόνα τους που επάγεται από το εξωτερικό ηλεκτρόδιο το οποίο χωρίζεται σε δύο συμμετρικούς αισθητήρες πρόσκρουσης συνδεδεμένους σε ένα διαφορικό ενισχυτή. Η τεχνολογία Orbitrap χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια μαζών, ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων και χρησιμοποιείται ευρέως στους τομείς της πρωτεωμικής, λιπιδωμικής, μεταβολωμικής αλλά και στην ισοτοπική ανάλυση.



Εικόνα 8. Orbitrap

Η σύζευξη δύο διαδοχικών αναλυτών μάζας αποτελεί τη διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS). Ο πρώτος αναλυτής μάζας απομονώνει τα μοριακά ιόντα του δείγματος και με τη βοήθεια ανιχνευτή καταγράφει τα m/z των διαφόρων ιόντων, ενώ ο δεύτερος αναλυτής θραυσιματοποιεί τα πρόδρομα μοριακά ιόντα σε επιμέρους μικρότερα ιόντα. Στη συνέχεια γίνεται καταγραφή των m/z των θραυσμάτων. Οι δύο αναλυτές χωρίζονται από ένα θάλαμο προσκρούσεων όπου συνήθως βρίσκεται ένα αδρανές αέριο το οποίο συγκρούεται με τα πρόδρομα ιόντα και προκαλεί θραύση, ενώ με αυτόν το τρόπο δημιουργείται ένας μεγάλος αριθμός θυγατρικών ιόντων.

1.4.5 Σύστημα κενού

Η ύπαρξη του συστήματος κενού είναι απαραίτητη έτσι ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων και των ελεύθερων σωματιδίων αλλά και για την επιτυχή εγκαθίδρυση υψηλών δυναμικών που χρησιμοποιούνται. Η αποφυγή των συγκρούσεων συμβαίνει λόγω της αύξησης της μέσης ελεύθερης διαδρομής, δηλαδή της μέσης απόστασης που θα διανύσουν τα ιόντα χωρίς να συγκρουστούν με κάποιο άλλο μόριο ή ιόν. Έτσι ένα σύστημα υψηλού κενού εξασφαλίζει ότι η μέση ελεύθερη διαδρομή είναι μεγαλύτερη από την απόσταση μεταξύ του θαλάμου ιοντισμού και του ανιχνευτή μαζών και επίσης ότι η δέσμη ιόντων είναι αντιπροσωπευτική του δείγματος. Το σύστημα κενού είναι δυνατόν να περιλαμβάνει όλη την οργανολογία του φασματομέτρου μάζας ή μόνο τον αναλυτή μαζών και των ανιχνευτή. Το βέλτιστο κενό που μπορεί να επιτευχθεί είναι 10^{-7} Torr.

1.4.6 Υπολογιστικό σύστημα

Το υπολογιστικό σύστημα το οποίο είναι συνδεδεμένο με την οργανολογία του διαχωρισμού των πεπτιδίων, αλλά και με τη φασματομετρία μάζας, επιτρέπει τον έλεγχο κάθε βήματος των οργάνων μέσω του ειδικού λογισμικού το οποίο αποτελεί τις περισσότερες φορές ευρεσιτεχνία και ιδιοκτησία της εταιρείας που προμηθεύει το

μηχάνημα. Μέσω του υπολογιστικού συστήματος πραγματοποιείται λήψη, επεξεργασία και αποθήκευση των δεδομένων ενώ σε συνεργασία με επιπλέον λογισμικά πραγματοποιείται η εξαγωγή των δεδομένων και η βιολογική ερμηνεία τους.

1.5 Equus Asinus

Το ζώο equus asinus στα ελληνικά ονομάζεται όνος, γάιδαρος ή αλλιώς γαϊδούρι (εικόνα 3). Η ταξινόμηση το όνου επιστημονικά φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Επιστημονική ταξινόμηση του όνου

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Chordata
Κλάση	Mammalia
Τάξη	Perissodaktyla
Οικογένεια	Equidae
Γένος	Equus
Είδος	Asinus

1.5.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο όνος είναι μεγαλόσωμο και φυτοφάγο ζώο η μορφολογία του οποίου ποικίλει από φυλή σε φυλή. Το ύψος ακρωμίου των οικόσιτων ζώων κυμαίνεται από 90-150 εκατοστά. Ο όνος χωρίζεται σε τέσσερις τύπους φυλών ανάλογα με το ύψος του ακρωμίου. Ο τύπος της Μεσογειακής μικρόσωμης φυλής με ύψος 90 εκατοστά, γνωστή ως Miniature Mediterranean, ο τύπος Standard με ύψος από 90-120 εκατοστά, ο τύπος, Large Standard από 120-140 εκατοστά και τέλος το Mammoth Stock, με ύψος μεγαλύτερο από 140 εκατοστά. Οι χρωματισμοί του τριχώματος του είναι μαύρο, σκούρο καφέ, γκρι με κάποια λευκά σημεία. Η διάρκεια ζωής τους μπορεί να φτάσει τα 30-50 έτη (Θεοδοσίου, 2012). Αν και το μέγεθός του ποικίλει πολύ μεταξύ των διάφορων φυλών που υπάρχουν, σε γενικές γραμμές είναι ζώο μικρόσωμο σε σύγκριση με το άλογο. Το κεφάλι και τα αφτιά του είναι αναλογικά πολύ μεγάλα. Τα πόδια του είναι λεπτά και οι οπλές του μικρές και πιο ωσειδείς από του αλόγου. Η κατασκευή αυτή των οπλών, το κάνει να περπατάει πολύ σταθερά σε εδάφη πετρώδη και μέρη απόκρημνα. Το νύχι των οπλών αν δεν τρίβεται από το περπάτημα, όπως συμβαίνει σε ζώα που ακόμη ζουν ελεύθερα στη φύση και καλύπτουν καθημερινά μεγάλες αποστάσεις για να εξασφαλίσουν το φαγητό τους, μεγαλώνει, προκαλώντας ζημιά στο εσωτερικό της οπλής και στους τένοντες του ποδιού, επιβαρύνοντας έτσι την ποιότητα ζωής αυτών των ζώων. Ο όνος ενηλικιώνεται, δηλαδή ολοκληρώνεται η μυοσκελετική του ανάπτυξη στα τέσσερά του χρόνια, για αυτό και είναι σωστό να μην γεννάει ούτε να εργάζεται νωρίτερα (Jones, 2010).

1.5.2 Γενετική

Οι όνοι έχουν 62 χρωμοσώματα, εν αντιθέσει με τα άλογα που έχουν 64 (Trujillo et al, 1991). Παρόλα αυτά οι όνοι και το άλογο μπορούν να ζευγαρώσουν και να παράγουν

υβριδικούς απογόνους όπως είναι το μουλάρι. Αυτοί οι απόγονοι έχουν 63 χρωμοσώματα και είναι σχεδόν πάντα στείροι. Είναι σπάνιες οι περιπτώσεις που ένα θηλυκό μουλάρι αφήνει απογόνους (Churcher, 1982). Όλα τα είδη ιπποειδών μπορούν να διασταυρωθούν αλλά αυτό το γεγονός δεν συμβαίνει συνήθως στην άγρια φύση και απαιτεί ανθρώπινη παρέμβαση. Εκτός από το άλογο, ο όνος μπορεί να δώσει υβριδικούς απογόνους και με τη ζέβρα.

1.5.3 Χρησιμότητα

Οι όνοι αποτελούν οικόσιτα ζώα και μπορούν να βοηθήσουν με ποικίλους τρόπους τον άνθρωπο. Χρησιμεύουν ως ζώα που λειτουργούν ως φύλακες σε εκτροφές μικρών μηρυκαστικών (πρόβατα, αίγες, λάμα), ως ζώα συντροφιάς ανθρώπων, ως ζώα εκπαίδευσης μωσαριών και πουλαριών κυρίως όμως ως ζώα εργασίας στη μεταφορά φορτίων, άμαξας, και τέλος χρησιμοποιούνται και για ιππασία. (Rugh D. G., 2002). Στις πιο ανεπτυγμένες χώρες δεν έχουν μεγάλη χρησιμότητα και το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την επιβίωσή τους σε αυτές (Ivanekovic et al, 2009).

1.5.4 Ο πληθυσμός των όνων στην παγκοσμίως και στην Ελλάδα

Σχεδόν 41 εκατομμύρια όνοι αναφέρθηκαν παγκοσμίως το 2006. Η Κίνα είχε τα περισσότερα ζώα με 11 εκατομμύρια, ακολουθούμενη από το Πακιστάν, την Αιθιοπία και το Μεξικό. Ωστόσο, από το 2017, ο κινεζικός πληθυσμός φαίνεται να έχει μειωθεί στα 3 εκατομμύρια, με τους αφρικανικούς πληθυσμούς να είναι επίσης υπό πίεση, λόγω του αυξανόμενου εμπορίου και της ζήτησης για προϊόντα όνου στην Κίνα. Ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν ότι ο πραγματικός αριθμός μπορεί να είναι κάπως υψηλότερος αφού πολλοί όνοι δεν καταμετρώνται (Starkey et al, 1997). Ο αριθμός των φυλών και το ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού για καθεμία από τις παγκόσμιες περιοχές του FAO φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Κατανομή πληθυσμού όνων σε παγκόσμιο επίπεδο (πηγή: FAO, 2006).

Ήπειρος	Αριθμός Φυλών	% του παγκόσμιου πληθυσμού
Αφρική	26	26,9
Ασία-Ειρηνικός	32	37,6
Ευρώπη-Καύκασος	51	3,7
Λατινική Αμερική-Καραϊβική	24	19,9
Μέση Ανατολή	47	11,8
Βόρεια Αμερική-Καναδάς	5	0,1
Σύνολο	185	100

Το 1997 ο αριθμός των όνων στον κόσμο συνέχιζε να αυξάνεται, όπως συνέβαινε σταθερά στο μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας. Παράγοντες που αναφέρθηκαν ότι συνέβαλαν σε αυτό το γεγονός ήταν η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, η πρόοδος στην οικονομική ανάπτυξη και η κοινωνική σταθερότητα σε ορισμένα φτωχότερα έθνη, η μετατροπή των δασών σε αγροκτήματα και εκτάσεις γης, η αύξηση των τιμών των μηχανοκίνητων οχημάτων και των καυσίμων και η δημοτικότητα των όνων ως κατοικίδιων ζώων. Έκτοτε, ο παγκόσμιος πληθυσμός όνων συρρικνώνεται γρήγορα, μειούμενος από 43,7 εκατομμύρια σε 43,5 εκατομμύρια μεταξύ 1995 και 2000, και μόνο 41 εκατομμύρια το 2006. Η μείωση του πληθυσμού είναι πιο έντονη στις ανεπτυγμένες χώρες. Στην Ευρώπη, ο συνολικός αριθμός των όνων μειώθηκε από 3 εκατομμύρια το 1944 σε λίγο περισσότερο από 1 εκατομμύριο το 1994 (Starkey et al, 1997).

Οι εκτιμήσεις του αριθμού των όνων στην Ελλάδα δεν είναι αξιόπιστες καθώς υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών πηγών. Ο πληθυσμός των όνων μειώθηκε κατά 96% μεταξύ 1955 και 2005 (508.000 έως περίπου 21.000). Το 2007 τα επίσημα στοιχεία δείχνουν ένα αριθμό 15483 όνων και 13370 μουλαριών. Σήμερα εκτιμάται ότι ο αριθμός των όνων στην Ελλάδα είναι κάτω από 13000. Οι όνοι στην Ελλάδα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία στους φαινότυπους καθώς και από σημαντική διακύμανση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, με ύψος σώματος που κυμαίνεται από 80 cm έως 150 cm και σωματικό βάρος από 90 κιλά έως 180 κιλά. Όνοι βρίσκονται παντού σε όλη την ελληνική επικράτεια. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η κατανομή του πληθυσμού των όνων στην Ελλάδα:

Πίνακας 3: Κατανομή πληθυσμού όνων ανά γεωγραφικό διαμέρισμα (πηγή ΥΑΑΤ).

Γεωγραφικό Διαμέρισμα	Πληθυσμός όνων
Θράκη	852
Μακεδονία	1725
Θεσσαλία	801
Ήπειρος	1138
Στερεά Ελλάδα	1921
Πελοπόννησος	4436
Νησιά Αιγαίου	1735
Κρήτη	1676
Νησιά Ιονίου	286
Σύνολο	14570

Η μοναδική αναγνωρίσιμη ελληνική φυλή όνων, ο αρκαδικός όνος, ουδέποτε έχει μελετηθεί και είναι άγνωστο αν υπάρχει ακόμα κάποιος πληθυσμός καθαρόαιμων ζώων. Πρόκειται για ελληνικής καταγωγής φυλή που σύμφωνα και με το όνομά της προέρχεται από την Αρκαδία. Είναι μια μικρόσωμη φυλή με ύψος περίπου από 90 έως 120 εκατοστά και βάρος από 90 έως 120 κιλά. Ο χρωματισμός της είναι γκρι με χαρακτηριστικό μαύρο

σταυρό στη ράχη. Δυστυχώς, για τη φυλή αυτή, στην Ελλάδα δεν υπάρχει μέριμνα για τη διατήρηση της καθαρότητας της φυλής, έχοντας σαν αποτέλεσμα να γίνονται αλόγιστες διασταυρώσεις που οδηγούν στην πλήρη αλλοίωση των χαρακτηριστικών του αρκαδικού όνου (Ιωσηφίδου κ.α., 2014).

1.5.5 Διατροφή του όνου

Οι όνοι έχουν περισσότερη αντοχή και ανέχονται μειωμένα τρόφιμα και νερό καλύτερα από άλλα ιπποειδή, καθώς οι όνοι είναι ανθεκτικοί και μπορούν να ζουν περισσότερο από άλλα είδη στις ίδιες συνθήκες. Μπορούν να αντισταθούν στην έλλειψη νερού, έχοντας τη δεύτερη χαμηλότερη απαίτηση νερού ανά μονάδα βάρους πίσω από την καμήλα. Οι όνοι βόσκουν γρασίδι, φλοιό, φύλλα, κλαδιά και ρίζες προτιμώμενων ειδών φυτών, ακόμη και κρεόσωτους θάμνους σε περιοχές ερήμων- όχι απαραίτητα επειδή είναι πεινασμένα, αλλά επειδή τους αρέσουν. Χρειάζονται χαρακτηριστικά λιγότερα τρόφιμα από ένα άλογο παρόμοιου μεγέθους ενώ χρειάζονται και λιγότερη πρωτεΐνη στη διατροφή τους. Καθώς είναι ζώο της ερήμου, επιβιώνει τρώγοντας λιτά, ξερά χόρτα και ελάχιστο καρπό. Γενικά είναι απλό ζώο στη διατροφή του. Όταν η διατροφή του εξαρτάται από τον άνθρωπο, χρειάζεται προσοχή να μην είναι ελλιπής αλλά ούτε και υπερβολική και αυτό έχει να κάνει με την δραστηριότητα του ζώου. Ένα ζώο που δουλεύει σκληρά (όπως οι όνοι στη Σαντορίνη) χρειάζεται οπωσδήποτε καλής ποιότητας χόρτο και καρπό καθημερινά. Αν πάλι δεν δουλεύει, κινδυνεύει από τον πολύ καρπό ή το πράσινο χόρτο καθώς αυτά έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και σε σάκχαρα. Κι αυτό γιατί παίρνει ενέργεια ενώ δεν κάνει κάτι για να την κάψει. Εάν η τροφή περιέχει σιτηρά, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι χαμηλότερο από 12%. Ένας υγιής όνος που δεν εργάζεται, μπορεί να έχει σαν βασική τροφή άχυρο και ως συμπλήρωμα χόρτο που κόβεται νωρίς την άνοιξη (τσαϊρι) σε αναλογία 2/1. Ο σανός από βρώμη που πολλοί συνηθίζουν να δίνουν, μπορεί να αντικαταστήσει το τσαϊρι τον χειμώνα αλλά θεωρείται βαρύς για τους καλοκαιρινούς μήνες. Τέλος, οι όνοι δεν πρέπει να τρέφονται υπερβολικά.

Οι όνοι μπορεί να αρρωστήσουν, προσλαμβάνοντας τροφή πλούσια σε αλφάλφα (*Medicago sativa*) ή λαμβάνοντας ποσότητες πλούσιας βλάστησης ανοιξιάτικου γρασιδιού, και μπορεί να αναπτύξουν ενδονυχίτιδα, μια οδυνηρή φλεγμονή των οπλών. Η ενδονυχίτιδα οφείλεται πολλές φορές στην εσφαλμένη διαίτα του ζώου λόγω άγνοιας του ιδιοκτήτη. Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε ότι η καταστροφή της οπλής ενός όνου σημαίνει πάρα πολύ κακή ποιότητα ζωής για αυτόν. Επιπλέον πρέπει να αποφεύγεται η βόσκηση ορισμένων δηλητηριωδών φυτών όπως: η αλογοουρά, η φτέρη, το ροδόδεντρο, το κώνειο και ο ίταμος.

Στην άγρια φύση οι όνοι βόσκουν από την αυγή μέχρι αργά το πρωί και συνεχίζουν τη βοσκή αργά το απόγευμα. Ξεκουράζονται δηλαδή το μεσημέρι και γύρω στα μεσάνυχτα. Ένα υγιής μικρός όνος που δεν εργάζεται, μπορεί να έχει σαν βασική τροφή άχυρο και συμπλήρωμα τσαϊρι σε αναλογία 2/1. Ο σανός από βρώμη, μπορεί να αντικαταστήσει το τσαϊρι τον χειμώνα αλλά θεωρείται βαρύς για τους καλοκαιρινούς μήνες.

Οι όνοι μπορούν να επιβιώσουν με λίγο νερό και μπορούν ακόμη και να αντέξουν περιορισμένες ποσότητες αλμυρού νερού. Κανονικά, ένας ενήλικας όνος που έχει αναπτυχθεί πλήρως απαιτεί νερό από 10 έως 25 λίτρα την ημέρα, αλλά μπορεί να αντέξουν έως 30% αφυδάτωση και να ανακτήσουν αυτήν την απώλεια όταν το νερό θα γίνει διαθέσιμο, χωρίς υπερβολική κατανάλωση. Ο όνος είναι ιδιαίτερα απαιτητικός στο νερό του αφού για να πιει θα πρέπει να είναι οπωσδήποτε πάντα καθαρό. Ακόμα ο όνος είναι ένα τόσο ιδιότροπο ζώο με το νερό που μπορεί να αρνηθεί να πιει νερό επειδή έχουν πιει από το ίδιο δοχείο άλλα ζώα, ακόμη και άλλοι όνοι. Στην άγρια φύση αντέχουν μερικές φορές για 2-3 ημέρες χωρίς νερό. Ωστόσο, τα νεαρά πουλάρια και οι θηλάζουσες γαϊδούρες πρέπει να βρίσκονται κοντά στο νερό προκειμένου να πίνουν καθημερινά. Τα πουλάρια μπορούν να ξεκινήσουν να μασουλούν φυτά σε 5 ημέρες όταν εκτοξεύονται τα δόντια κοπής τους και περιηγούνται τακτικά στη βλάστηση κοντά στην ηλικία των 2 εβδομάδων, αλλά αυτό εξαρτάται και από το γάλα της μητέρας τους.

1.5.6 Αναπαραγωγή

Οι θηλυκοί όνοι φτάνουν στη σεξουαλική ωριμότητα σε ηλικία 1,5 έτους, αλλά συνήθως δεν αναπαράγονται μέχρι τα 2-3 έτη και μπορούν να συνεχίσουν να αναπαράγονται για άλλα 15 χρόνια ή περισσότερο. Η πιο γόνιμη ηλικία των θηλυκών όνων είναι τα 4 έτη. Μερικά αρσενικά 9 μηνών μπορούν να παράγουν σπέρμα, αλλά όλα τα αρσενικά είναι σεξουαλικά ώριμα έως τα 2 έτη. Οι όνοι είναι ζώα που έχουν την ικανότητα να ζευγαρώσουν ανά πάσα στιγμή μέσα στο έτος (Grinder et al, 2006).

Ο οιστρικός κύκλος του όνου έχει παρατηρηθεί ότι κυμαίνεται από 20-40 ημέρες. Συνήθως διαρκεί 23-30 ημέρες. Ο οίστρος διαρκεί 6-9 ημέρες και η ωοθυλακιόρρηξη 5-6 ημέρες, μετά την έναρξη του οίστρου. Κατά τη φάση του οίστρου, η συμπεριφορά της γαϊδούρας χαρακτηρίζεται από άνοιγμα και κλείσιμο του στόματος με εκτεταμένο το λαιμό, μάσηση με έντονη σιελόρροια, κλείσιμο ματιών, ούρηση και σήκωμα της ουράς.

Τα θηλυκά φωνάζουν για να καλέσουν συντρόφους κατά τη διάρκεια του οίστρου. Η δραστηριότητα ζευγαρώματος αυξάνεται σταδιακά έως και 2 ημέρες πριν από την ωορρηξία των θηλυκών. Τα θηλυκά στον οίστρο συχνά υιοθετούν μια χαρακτηριστική στάση με τα πόδια τους ανοιχτά, και την ουρά τους να κρατιέται σε γωνία 45°. Ταυτόχρονα πραγματοποιούν χαρακτηριστικές κινήσεις με το στόμα τους. Τα αρσενικά πλησιάζουν από πίσω και μυρίζουν τα θηλυκά γεννητικά όργανα. Συχνά το αρσενικό φωνάζει για να καταλάβει το θηλυκό πως ξεκινά η σεξουαλική αλληλεπίδραση. Το θηλυκό είθισται να κλωτσά το αρσενικό με τελετουργικό τρόπο και να απομακρύνεται από αυτό με αργό καλπασμό. Το αρσενικό ακολουθεί το θηλυκό για περίπου 20 μέτρα. Έπειτα σταματούν και το θηλυκό σπρώχνει προς τα πίσω το αρσενικό. Το αρσενικό επιβιβάζεται και μαζί κάνουν μερικά κυκλικά βήματα. Η διείσδυση γίνεται αμέσως, πολλές φορές αδέξια και η εκσπερμάτωση λαμβάνει χώρα μετά από αρκετές πυελικές ωθήσεις. Όταν ολοκληρωθεί η σεξουαλική πράξη, το αρσενικό κατεβαίνει και το θηλυκό αφήνει μια έκκριση από το αιδοίο του. Το αρσενικό μυρίζει την έκκριση και κάνει μια χαρακτηριστική κίνηση με το κεφάλι του γνωστή ως αντίδραση Flehmen (άνοδος του άνω χείλους με ταυτόχρονη κίνηση προς τα

πάνω του κεφαλιού) ένδειξη ότι βρήκε τη μυρωδιά της έκκρισης ενδιαφέρουσα. Έπειτα ουρεί πάνω σε αυτήν. Και τα δύο ζώα στη συνέχεια επιστρέφουν για βοσκή ή για περιήγηση (Yilmaz et al, 2012).

1.5.7 Κυοφορία- Γαλακτοπαραγωγή

Η κύηση διαρκεί κατά μέσο όρο 365-370 ημέρες και γενικά μεταξύ 300 και 420 ημερών. Το γεγονός που προκαλεί τόσο μεγάλο εύρος κύησης δεν είναι ακόμα γνωστό. Τα θηλυκά γεννούν συνήθως μόνο ένα πουλάρι. Μόνο το 1,7% των κυήσεων του όνου οδηγεί σε δίδυμα, αλλά και τα δύο τα δίδυμα επιβιώνουν μόνο στο 14% των περιπτώσεων. Μετά τον τοκετό, σε 9-10 ημέρες παρουσιάζει νέα φάση οίστρου, αλλά λόγω της φροντίδας του νεογέννητου, απωθείται το αρσενικό. Μετά από 2-3 οιστρικούς κύκλους δέχεται ξανά επιβίβαση. Το μέσο βάρος ενός νεογέννητου όνου είναι περίπου 25 κιλά.

Το πουλάρι λαμβάνει γάλα, μέχρι τους 4-6 πρώτους μήνες της ζωής του. Μετά από το συγκεκριμένο διάστημα, αρχίζει σταδιακά η φάση του απογαλακτισμού, η οποία δεν ενδείκνυται να ξεκινήσει, πριν τους 3 μήνες.

Η γαλακτική περίοδος του όνου, διαρκεί συνολικά, περίπου 10 μήνες. Το πουλάρι, μετά τους 4-6 μήνες από τη γέννησή του, αρχίζει να λαμβάνει κανονική τροφή, αλλά συνεχίζει να θηλάζει, από τη μητέρα του. Οι εκτροφές των όνων, δεν χαρακτηρίζονται από εντατικότητα, τα ζώα βρίσκονται όλα μαζί, σε ένα περιφραγμένο χώρο, συνεπώς, το πουλάρι μένει όλο το διάστημα της ζωής του μαζί με τη μητέρα του και δεν αποχωρίζονται με τον απογαλακτισμό.

Οι πρωινές αρμέξεις δίνουν μικρότερα ποσοστά γάλακτος από τις απογευματινές (Salimei, 2004). Επίσης ο ιδανικός αριθμός αρμέξεων στον όνο είναι τρεις αρμέξεις ανά ημέρα, ανά τρεις ώρες. Η ημερήσια παραγωγή γάλακτος κυμαίνεται συνήθως από 170mL έως 850mL, ενώ είναι πιθανόν να φτάσει το 1.5L. Τα πουλάρια αποχωρίζονται από τη γαϊδούρα τρεις ώρες πριν την πρώτη άρμεξη (Doreau et al, 1991). Στην πράξη, έχει εφαρμοστεί και άλλη μέθοδος άρμεξης, από Έλληνες παραγωγούς, με τις γαϊδούρες να αποχωρίζονται από τα πουλάρια κατά τη διάρκεια της νύκτας, την ακολουθούμενη ημέρα αμέλγονται και επιστρέφουν στα πουλάρια για να θηλάσουν, μέχρι την επόμενη νύκτα. Η μέση ετήσια ποσότητα είναι 482 ± 36 λίτρα. Η μέση διάρκεια αρμέγματος 295 ± 12 μέρες.

1.5.8 Εκτροφή όνων και διάθεση του γάλακτός τους στην αγορά

Στην Ελλάδα, η συστηματική εκτροφή όνων, βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, καθώς ο αριθμός των ονοτρόφων δεν ξεπερνά τους πέντε εκτροφείς. Οι εκτροφές βρίσκονται σε διάφορα σημεία ανά την Ελλάδα, όπως στις Σέρρες, την Καρδίτσα, την Έδεσσα, το Άργος. Η δυναμικότητα τους αφορά κατά μέσο όρο τα 30 ζώα και ο προσανατολισμός τους είναι κυρίως γαλακτοπαραγωγικός. Οι εξοπλισμοί των μονάδων είναι περιορισμένοι, χωρίς τη χρήση ειδικής τεχνολογίας, καθώς οι αμέλειες γίνονται χειρωνακτικά. Η χρήση αμελκτικών

συστημάτων, τα οποία υπάρχουν στην Ευρώπη, δεν έχει επεκταθεί στη χώρα μας, λόγω του μικρού αριθμού των εκτροφών, αλλά και λόγω του κόστους των μηχανημάτων. Η στέγαση των ζώων γίνεται σε υπόστεγα, χωρίς την αναγκαιότητα βαριών κατασκευών, καθώς πρόκειται για ανθεκτικά ζώα στις διάφορες ακραίες θερμοκρασίες. Η εκτροφή του όνου θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και βιολογική, καθώς, δεν υπάρχει κάποια μορφή εντατικότητας και δεν γίνονται ιδιαίτεροι χειρισμοί. Οι Έλληνες παραγωγοί γάλακτος όνου, αντιμετωπίζουν σοβαρά προβλήματα στη διάθεση του προϊόντος και γενικά στη διαχείρισή του, καθώς η αγροτική πολιτική που ακολουθείται για αυτό το προϊόν, δεν ευνοεί την προώθησή του και την καθοδήγηση των παραγωγών. Το προϊόν διατίθεται κυρίως σε εμπόρους για την παραγωγή καλλυντικών, τα οποία προωθούνται στην εγχώρια αγορά. Το φρέσκο γάλα, μένει αδιάθετο και συνεπώς καταψύχεται και προωθείται για άλλες χρήσεις, καθώς δεν υπάρχει μεγάλη ζήτηση για κατανάλωσή του. Το γάλα όνου δεν εμπίπτει στις καταναλωτικές συνήθειες του κοινού, καθώς δεν έχει προωθηθεί, σε καμία περίπτωση. Η ημερησία παραγωγή γάλακτος, κατά μέσο όρο, είναι 12 λίτρα και η τιμή που πετυχαίνουν κυμαίνεται στα 12-25 ευρώ ανά λίτρο γάλακτος.

1.6 Γάλα όνου

1.6.1 Γενικά για το γάλα όνου

Με τον όρο γάλα εννοούμε το έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών, που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μία ορισμένη ηλικία (Παπανδρέου, 2008). Το γάλα ποικίλλει στη σύνθεση και τις ιδιότητές του σημαντικά μεταξύ του εκάστοτε είδους. Στην ανθρώπινη διατροφή, το φρέσκο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πολύτιμες πηγές πρωτεΐνης, λίπους και ενέργειας, και αποτελούν σημαντικό μέρος των καθημερινών γευμάτων. (Gantner et al, 2015).

Το γάλα όνου αποκτά όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον λόγω της ξεχωριστής του σύνθεσης, λαμβάνοντας υπόψη κάποιες πρόσφατες μελέτες που επικεντρώθηκαν σε πιθανά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου (El-Hatmi et al, 2015). Επιπλέον τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση του γάλακτος όνου είναι αρκετά όμοια με αυτή του ανθρώπινου γάλακτος (Pilla et al, 2010). Επίσης, το γάλα όνου βρίσκει εφαρμογή σε διάφορα καλλυντικά όπως κρέμες προσώπου σώματος, σαμπουάν, κρέμες χεριών και σαπούνια.

1.6.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όνου σε σχέση με άλλα είδη

Στον παρακάτω πίνακα σύμφωνα παρουσιάζεται η σύσταση του γάλακτος όνου, αγελάδας και ανθρώπου ανά διαστήματα σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Jenness et al, 1970; Solaroli et al, 1993; Mariani et al, 1993, Salimei, 1999; Guo et al., 2007; Malacarne et al., 2002; Park et al, 2007; Giosuè et al, 2008; Hassan et al., 2009; Potočnik et al, 2011; Salimei and Fantuz, 2012; Čagalj et al, 2014; Gantner et al, 2015).

Πίνακας 4: Σύσταση γάλακτος ανθρώπου, όνου και αγελάδας

Γάλα	Ολικά στερεά (g/100g)	Λιπαρά (g/100g)	Πρωτεΐνες (g/100g)	Λακτόζη (g/100g)	Τέφρα (g/100g)	Ενέργεια (KJ/100g)
Άνθρωπος	10-13	2,1-4,0	0,9-1,9	6,3-7,0	0,2-0,3	270-290
Όνος	8-12	0,3-1,8	1,4-2,0	5,8-7,4	0,3-0,5	160-180
Αγελάδα	12-13	3,3-6,4	3,0-4,0	4,4-5,6	0,7-0,8	270-280

1.6.2.1 Ολικά στερεά και τέφρα

Το γάλα όνου είναι πλουσιότερο σε νερό και έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία από το γάλα μηρυκαστικών. Το ανθρώπινο γάλα έχει μέση περιεκτικότητα σε ξηρά ύλη (11,7 g / 100 ml), η οποία βρίσκεται μεταξύ των τιμών του όνου και του αγελαδινού γάλακτος (περίπου 9,5 και 12,5 g / 100 ml, αντίστοιχα) (Martini et al, 2014b). Η μέση περιεκτικότητα σε τέφρα στο γάλα όνου είναι 0,36%, κάτι που μοιάζει περισσότερο με το

ανθρώπινο (περίπου 0,22%) από το αγελαδινό γάλα (περίπου 0,76%) (Vincenzetti et al, 2008). Η τέφρα στο αγελαδινό γάλα είναι διπλάσια από το γάλα όνου ενώ, η χαμηλότερη ποσότητα ανόργανων συστατικών στο γάλα όνου μειώνει το φορτίο των μετάλλων για τα νεφρά. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την επίδραση του παράγοντα της γαλακτικής περιόδου στο γάλα όνου (Guo et al, 2007;) παρατηρήθηκε ότι υπήρχε σημαντική μεταβλητότητα στις τιμές των ολικών στερεών και της τέφρας.

1.6.2.2 Λιπαρά

Από την άποψη των μακροσυστατικών, το γάλα όνου διαφέρει από το ανθρώπινο γάλα ως προς την περιεκτικότητα σε λιπίδια. Το μέσο ποσοστό λιπαρών στο γάλα όνου κυμαίνεται από 0,30-1,8%, ενώ το ποσοστό λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο γάλα είναι κατά μέσο όρο 3,1%. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια δίνει στο γάλα όνου χαμηλότερη ενεργειακή τιμή σε σύγκριση με το ανθρώπινο γάλα και το γάλα αγελάδος.

Τα λιπίδια στο γάλα διασκορπίζονται σε μορφή γαλακτωματοποιημένων σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια λίπους γάλακτος επικαλύπτονται με μια βιολογική μεμβράνη που προκύπτει από το μηχανισμό για την έκκριση σφαιριδίων λίπους από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου (Lopez et al., 2008). Οι μεμβράνες αυτές είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκεροφωσfolιπίδια, σφιγγολιπίδια, χοληστερόλη, ένζυμα και άλλα συστατικά (Keenan et al, 1995).

Επιπλέον, δεδομένου ότι τα μικρότερα σφαιρίδια λίπους έχουν περισσότερες μεμβράνες ανά μονάδα όγκου λίπους, τα μικρότερα σφαιρίδια λίπους στο γάλα όνου μπορεί να συμβάλουν στην υψηλότερη πρόσληψη της μεμβράνης σφαιριδίων λίπους γάλακτος (MFGM). Τα MFGM είναι επίσης η κύρια πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), φωσfolιπιδίων και χοληστερόλης στο γάλα (Martini et al, 2013).

Το γάλα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά συνήθως περιέχει μεγαλύτερα σφαιρίδια λίπους από το γάλα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά (El-Zeini, 2006). Έτσι, η σχετική επιφάνεια είναι σημαντικά μεγαλύτερη για τα μικρότερα σφαιρίδια λίπους σε σχέση με τα μεγαλύτερα σφαιρίδια λίπους (Ménard et al, 2010). Επίσης, υπάρχει μια θετική, γραμμική σχέση μεταξύ του μεγέθους του λίπους και της περιεκτικότητας σε λιπαρά γάλακτος. Ο σχηματισμός μεγαλύτερων σφαιριδίων λίπους κατά τη σύνθεση του λίπους γάλακτος εξηγείται από τους περιορισμούς στην παραγωγή της μεμβράνης σφαιριδίων λίπους γάλακτος όταν τα λιπιδικά σφαιρίδια τυλίγονται κατά την έκκρισή τους από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου. Συμπεραίνεται ότι η μεμβράνη σφαιριδίων λίπους γάλακτος θα μπορούσε να είναι περιοριστικός παράγοντας στο σχηματισμό σφαιριδίων μικρού λίπους σε γάλα πολύ υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά.

Όσον αφορά τα φυσικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων, τα σφαιρίδια λίπους γάλακτος όνου είναι πολύ μικρά, σε αντίθεση με το γάλα από μηρυκαστικά ζώα το οποίο έχει παραπάνω από το διπλάσιο μέγεθος σφαιριδίων. Αυτό το χαμηλό μέγεθος των σφαιριδίων λίπους υποδεικνύει μια μεγαλύτερη επιφάνεια διαθέσιμη για τη δράση της λιπάσης, η

οποία θα μπορούσε να συμβάλει στην υψηλότερη πεπτικότητα του γάλακτος όνου (Martini et al, 2016).

Τα σφαιρίδια λίπους αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες είναι εστέρες γλυκερόλης και λιπαρών οξέων. Προσδιορισμός της ποσότητας τριακυλογλυκερών, ελεύθερων λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων στο γάλα από διάφορα θηλαστικά, ήταν ο στόχος πολλαπλών μελετών (Doreau and Martin-Rosset, 2002; Jensen et al, 1990; Malacarne et al, 2002; Park et al, 2007; Uniacke-Lowe, 2011; Claeys et al, 2014). Οι τριακυλογλυκερόλες αποτελούν μόνο το 80-85% του λίπους σε γάλα από φοράδες και όνους, ενώ η περιεκτικότητα σε τριακυλογλυκερόλη σε λίπος γάλακτος από μηρυκαστικά (αγελάδα, βουβάλια, πρόβατα και αίγες) και γυναίκες είναι πολύ μεγαλύτερες (97-98%; Claeys et al., 2014). Επίσης, υπάρχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (9,5%) και φωσφολιπίδια (5-10%) στο γάλα φοράδων και όνων σε σύγκριση με το γάλα από μηρυκαστικά και γυναίκες (0,5-1,5% των φωσφολιπιδίων και 0,7-1,5% των ελεύθερων λιπαρών οξέων). Λόγω της πιθανής αντι-καρκινογόνου επίδρασης των φωσφολιπιδίων, ειδικά λόγω προστατευτικής δράσης της σφιγγομυελίνης έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου (Berra et al, 2002), το γάλα από αυτά τα ιπποειδή θα μπορούσαν να θεωρηθεί ως ένα λειτουργικό τρόφιμο (Gantner et al, 2015).

Το γάλα όνου είναι πλούσιο σε φωσφολιπίδια ανά μονάδα λίπους (Contarini et al, 2017). Ωστόσο, δεδομένης της χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, τα φωσφολιπίδια ανά λίτρο γάλακτος είναι, γενικά, χαμηλότερα στο γάλα όνου από ό,τι στο ανθρώπινο γάλα (42,8–97,1 mg/L έναντι 98–474 mg/L, αντίστοιχα). Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο φωσφολιπίδιο και στα δύο γάλατα (19–38,4% και 10–18% των συνολικών φωσφολιπιδίων σε ανθρώπους και όνους, αντίστοιχα). Αντιθέτως, τα κύρια φωσφολιπίδια γάλακτος στον άνθρωπο είναι η σφιγγομυελίνη (28,9-43,3% των συνολικών φωσφολιπιδίων) (Cilla et al, 2016), ενώ στους όνους, τα κύρια φωσφολιπίδια είναι φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (17-23% των φωσφολιπιδίων) και φωσφατιδυλοχολίνη (10-18% των φωσφολιπιδίων) (Contarini et al, 2017).

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει τριγλυκερίδια που αποτελούνται από αλυσίδες από 36 έως 54 άτομα άνθρακα. Παρομοίως, αυτά του όνειου γάλακτος αποτελούνται από αλυσίδες 30 έως 54 ατόμων άνθρακα. Και στα δύο γάλατα, η πλειονότητα των τριγλυκεριδίων (περίπου 35% στους ανθρώπους και 22% στους όνους) αποτελείται από 52 άτομα άνθρακα (Gastaldi et al, 2010). Επιπλέον, στο γάλα όνου η θέση των λιπαρών οξέων στον σκελετό της γλυκερόλης είναι πολύ παρόμοια με αυτή στο ανθρώπινο γάλα.

Από την άποψη των λιπιδικών κλασμάτων, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) περιέχονται στο λίπος του όνου σε παρόμοιες ποσότητες με το ανθρώπινο γάλα (περίπου 57 και 45 g / 100 g λίπους, αντίστοιχα) και χαμηλότερα από το αγελαδινό γάλα (περίπου 71 g / 100g λίπους) (Ragona et al, 2016; Picciano, 2001; Gastaldi et al, 2010). Η ποσότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) είναι επίσης παρόμοια στο όνειο και στο ανθρώπινο γάλα (περίπου 43 και 55 g / 100 g λίπους, αντίστοιχα) και υψηλότερη σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (περίπου 29 g / 100 g λίπους), ενώ η αναλογία UFA/SFA στον όνο είναι (0,92) μεταξύ ανθρώπινου (1,22) και αγελαδινού γάλακτος (0,41). Τα τριγλυκερίδια όμως του όνειου γάλακτος έχουν υψηλότερο βαθμό ακορεστότητας από τα τριγλυκερίδια μητρικού γάλακτος, λόγω της μεγαλύτερης παρουσίας πολυακόρεστων μακράς αλυσίδας, ενώ στο

ανθρώπινο γάλα υπάρχουν κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Η περιεκτικότητα σε κορεσμένα τριγλυκερίδια (περίπου 12%) από την άλλη πλευρά, είναι παρόμοια και στα δύο γάλατα. Από θρεπτική άποψη, το γάλα όνου οδηγεί σε χαμηλότερη πρόσληψη SFA, περίπου 3,02 g / L, ενώ το SFA είναι κατά μέσο όρο 13,95 και 26,27 g / L στο ανθρώπινο και αγελαδινό γάλα αντίστοιχα. Επιπλέον, παρά το ότι είναι πλούσιο σε UFA, το γάλα όνου παρέχει περιορισμένη ποσότητα λίπους, επομένως η συνολική πρόσληψη UFA ανά 1 λίτρο γάλακτος είναι χαμηλότερη από το ανθρώπινο και το αγελαδινό γάλα (περίπου 2,28 έναντι 17,05 έναντι 10,73 g / l αντίστοιχα) (Picciano, 2001; Ragona et al, 2016). Ο παρακάτω πίνακας παραθέτει με ποσοστά επί του συνολικού λίπους τη λιπιδική σύσταση του γάλακτος όνου (Martemucci et al, 2012):

Πίνακας 5: Σύσταση λιπιδίων επί του συνολικού λίπους στο γάλα όνου

Σύνθεση λιπιδίων	Γάλα όνου
Κορεσμένα (SFA, %)	51.98 ± 5.13
Ακόρεστα (UFA, %)	48.02 ± 2.97
Μονοακόρεστα (MUFA, %)	28.00 ± 3.91
Πολυακόρεστα (PUFA, %)	20.02 ± 2.04
n-3 (%)	7.12 ± 1.96
n-6 (%)	12.90 ± 2.13
n-3/n-6	0.59 ± 0.08
Ακόρεστα/ Κορεσμένα (UFA/SFA)	0.92 ± 0.07

Όσον αφορά την αναλογία n-3/n-6, οι τιμές στη βιβλιογραφία για το γάλα όνου κυμαίνονται από 0,51 έως 0,67, ενώ στους ανθρώπους, κυμαίνεται από 0,10 έως 0,20 (Luukkainen et al, 1994; Makrides et al, 1995). Το ενδιαφέρον για την αναλογία n-3/n-6 προέρχεται από στοιχεία που δείχνουν ότι αυτή η αναλογία μπορεί να δώσει μακροπρόθεσμες πληροφορίες για την μεταβολική υγεία των ενηλίκων. Σε προ-απογαλακτισμένους ποντικούς, οι υψηλοί λόγοι n-3/n-6 στο πλάσμα νεογνών έχει παρατηρηθεί ότι ρυθμίζουν την πιθανότητα και τη μελλοντική αντοχή στην παχυσαρκία στην ενήλικη ζωή (Rudolph et al, 2018).

Ο πίνακας της διπλανής σελίδας παραθέτει την περιεκτικότητα ορισμένων λιπαρών οξέων ανά κιλό λίπους στο γάλα όνου και το ανθρώπινο γάλα (Contarini et al, 2017; Martemucci et al, 2012; Martini et al, 2014a; Yuhas et al, 2006; Altomonde et al, 2019):

Πίνακας 6: Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (g/kg λίπους) στο γάλα όνου και το γάλα ανθρώπου

Λιπίδια (g/Kg λίπους)	Γάλα όνου	Γάλα ανθρώπου
C8:0	24.5-40.3	1.6-2.8
C10:0	59.9-98	14.6-25.3
C16:0	200-220	190-230
C18:1	110-280	210-360
C18:2ω6	90-170	123-139
C18:3ω3	20-140	8-11
C20:4ω6	3-88	2-12
C20:5ω3	0.1-7	0-11
C22:6ω3	0.3-0.4	<1 έως >10

Μία ομοιότητα μεταξύ του ανθρώπινου γάλακτος και του όνου είναι ότι διαθέτουν χαμηλή ποσότητα λιπιδίων μικρής αλυσίδας (SCFA) ειδικά όσον αφορά αλυσίδες με λιγότερα από 8 άτομα άνθρακα. Εμφανίζουν ωστόσο ομοιότητα και στο γεγονός ότι διαθέτουν υψηλές ποσοτήτες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (Martini et al, 2015; Yuhas et al, 2006). Τα πιο κοινά SCFA είναι τα C8:0 και C10:0 που κυμαίνονται από 1,6 έως 2,8 g/kg και από 14,6 έως 25,3 g/kg λίπους, αντίστοιχα, στο ανθρώπινο γάλα. Στο γάλα όνου το C8:0 κυμαίνεται από 40,3 έως 24,5 g/kg λίπους και το C10:0 από 98 έως 59,9 g/kg (Martemucci et al, 2012; Martini et al, 2016). Αυτή η ομοιότητα είναι σημαντική για τα βρέφη, καθώς η παρουσία ή η ανεπάρκεια των SCFA επηρεάζει την παθογένεση ορισμένων ασθενειών (αυτοάνοσες, φλεγμονώδεις ασθένειες) και τα SCFA φαίνεται να έχουν επίσης αντιμικροβιακή δράση και αντιφλεγμονώδη δράση στο έντερο (Tan et al, 2014). Το C16:0 είναι, σε απόλυτους όρους, το πιο συμπτυκνωμένο κορεσμένο λιπαρό οξύ στα δύο γάλατα (200 έως 220 και 190 έως 230 g/kg λίπους σε γάλα όνου και ανθρώπινο γάλα, αντίστοιχα) (Martemucci et al, 2012; Martini et al, 2014b; Yuhas et al, 2006).

Η μέση περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (C18:1) στο γάλα όνου (110 έως 280 g/kg λίπους) είναι συγκρίσιμη με το αγελαδινό γάλα και είναι χαμηλότερη από το ανθρώπινο γάλα που έχει περίπου διπλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (210 έως 360 g /kg λίπους). Αντίθετα, το λινελαϊκό οξύ (C18:2ω6) είναι παρόμοιο στο γάλα όνου και στο ανθρώπινο γάλα (90 έως 170 g/kg λίπους, 123 έως 139 g/kg αντίστοιχα) και υψηλότερο από το αγελαδινό γάλα (περίπου 20 g /kg λίπους) (Gastaldi et al, 2010; Yuhas et al, 2006; Pegolo et al, 2017). Από το γάλα όλων των ζώων εκτροφής, το γάλα όνου έχει τις πλουσιότερες πηγές α-λινολενικού οξέος (C18:3ω3) (20-140 g/kg λίπους), σε υψηλότερες ποσότητες από ότι το ανθρώπινο γάλα (8-11 g/kg λίπους) και το αγελαδινό γάλα (περίπου 5,6 g/kg λίπους). Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε DHA (εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ) στο γάλα όνου (0,3 έως 0,4 g/kg λίπους) είναι πολύ λίγο σε σχέση με τις μέσες τιμές που αναφέρθηκαν στο ανθρώπινο γάλα (1 έως δέκα g/kg λίπους), ενώ στο αγελαδινό γάλα, δεν είναι ανιχνεύσιμο. Επιπλέον, το γάλα όνου δεν αποτελεί σημαντική πηγή αραχιδονικού οξέος (C20:4ω6). Ωστόσο η περιεκτικότητα σε αραχιδονικό οξύ του γάλακτος όνου είναι συγκρίσιμη με εκείνη του ανθρώπινου γάλακτος (περίπου 3 g/kg λίπους και 3 έως 12 g/kg, αντίστοιχα) (Koletzko et al, 2001; Martini et al, 2013). Το αραχιδονικό οξύ είναι ένα σημαντικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών

(Martini et al, 2013). Παρόλα αυτά η αναγκαιότητα παροχής αραχιδονικού οξέος κατά την παιδική ηλικία παραμένει αμφιλεγόμενη και δεν έχουν καθοριστεί συγκεκριμένες τιμές. Επομένως, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, ιδιαίτερα στα μωρά που τρέφονται με δίαιτα αποκλειστικά σε γάλα, η πρόσληψη λιπιδίων πρέπει να προσαρμοστεί, τόσο ως προς τη συνολική όσο και ως προς την ποιοτική πρόσληψη (Tesse et al, 2009; Swar 2011).

Η περιεκτικότητα των λιπιδίων στο γάλα όνου μεταβάλλεται έντονα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Ισχυρές διακυμάνσεις υπάρχουν και στη σύσταση των λιπιδίων όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα (Martemucci et al, 2012):

1.6.2.3 Πρωτεΐνες

Η μέση συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του γάλακτος του ανθρώπου και του όνου είναι παρόμοια (1,42 και 1,63 g / 100 ml, αντίστοιχα) και είναι περίπου το ήμισυ εκείνης του αγελαδινού γάλακτος (3,25 g / 100 ml) (Martini et al, 2014b; Vincenzetti et al, 2008). Η χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο γάλα του ανθρώπου και του όνου δεν παράγει υπερβολικό νεφρικό φορτίο στα παιδιά (Businco et al, 2000). Επιπλέον, όχι μόνο η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών αλλά και το προφίλ των κλασμάτων πρωτεΐνης είναι παρόμοιο στο ανθρώπινο γάλα και το γάλα όνου. Στην πραγματικότητα, το ανθρώπινο γάλα και το όνειο περιέχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε καζεΐνες (περίπου 0,4 και 0,7 g / 100 ml γάλακτος, αντίστοιχα) (Ragona et al, 2016) ενώ η συνολική πρωτεΐνη, καθώς και το κλάσμα καζεΐνης βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στα μηρυκαστικά. Στο αγελαδινό γάλα, η συνολική περιεκτικότητα σε καζεΐνη είναι κατά μέσο όρο 2,6 g / 100 ml και είναι περισσότερο από τρεις φορές υψηλότερη σε σχέση με το γάλα όνου. Οι καζεΐνες του γάλακτος όνου υπάρχουν σε διαφορετικά κλάσματα: άλφα S1, άλφα S2, βήτα καζεΐνη και κ-καζεΐνη. Οι καζεΐνες στο γάλα όνου δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο, και τα τέσσερα κλάσματα έχουν ταυτοποιηθεί παρ'όλο που υπάρχουν μόνο λίγα ποσοτικά δεδομένα που αναφέρουν χαμηλή περιεκτικότητα (Bertino et al, 2010). Η β-καζεΐνη είναι το κύριο κλάσμα στο γάλα όνου (περίπου 0,37 g / 100 ml) , ενώ η αS1 και η κ-καζεΐνη βρίσκονται μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Η αS2 καζεΐνη απουσιάζει στο ανθρώπινο γάλα .

Αντίθετα, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος υπάρχουν σε μεγαλύτερη ποσότητα στο ανθρώπινο γάλα και στο όνειο, ενώ χαμηλότερη ποσότητα είναι ανιχνεύσιμη στο αγελαδινό γάλα (περίπου 0,76, 0,64 και 0,57 g / 100 ml, αντίστοιχα). Η β-λακτογλοβουλίνη απουσιάζει στο μητρικό γάλα αλλά υπάρχει στο γάλα αγελάδας και όνου (περίπου 0,32 και 0,27 g / 100 ml, αντίστοιχα) (Caroli et al, 2015; D'Alessandro et al, 2011; Claeys et al, 2014). Η άλφα-γαλακτοαλβουμίνη ευρίσκεται κυρίως στο ανθρώπινο γάλα (περίπου 0,34 g / 100 ml) ακολουθούμενο από γάλα όνου (περίπου 0,21 g / 100 ml) (Chen Q et al, 2016). Αντίθετα, η α-λακταλβουμίνη είναι χαμηλότερη στο αγελαδινό γάλα (περίπου 0,125 g / 100 ml) με ποσότητα λιγότερη και από την υποδιπλάσια σε σύγκριση με αυτήν του ανθρώπινου γάλακτος.

Η λυσοζύμη είναι ένα ισχυρό φυσικό αντιμικροβιακό που βρίσκεται στα σωματικά υγρά καθώς και στο γάλα. In vitro πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει την κακή πεπτικότητα

της λυσοζύμης του γάλακτος όνου από ανθρώπινα γαστρεντερικά ένζυμα (Marletta et al, 2016). Φαίνεται όμως ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να φτάσει στον εντερικό σωλήνα και να ασκήσει επιλεκτική δράση στα βακτήρια του εντέρου (Yvon et al, 2016). Η λυσοζύμη έχει διαφορετικές συγκεντρώσεις στο γάλα διαφορετικών ειδών. Έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε γάλα όνου και είναι περίπου 1,5 g/L και χαμηλότερη ποσότητα στο ανθρώπινο γάλα (περίπου 0,420 g / L) και στο αγελαδινό γάλα (περίπου 0,0013 g/L) (Hameed et al, 2017). Η δραστικότητα της λυσοζύμης ποικίλλει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας κατά μέσο όρο από 4000-5000 U / ml (Pilla et al, 2010) με μέγιστες τιμές στην αρχή της γαλουχίας που πιθανώς προάγει τον χαμηλό αριθμό βακτηρίων του γάλακτος όνου. Η δραστικότητα λυσοζύμης στο ωμό ανθρώπινο γάλα από το μαστό είναι υψηλότερη από το γάλα όνου και το αγελαδινό γάλα (περίπου 39000 U / mL).

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι προϊόντα αποοδόμησης των καζεϊνών παραμένουν στο στομάχι των βρεφών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις πρωτεΐνες ορού (Ngueyen et al, 2015). Έτσι, η μεγάλη διαφορά αναλογίας καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το ανθρώπινο και το όνειο, οδηγεί στη δημιουργία ενός πιο μαλακού πήγματος στους ανθρώπους και στους όνους, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση της πεπτικότητας του γάλακτος. Η αναλογία καζεϊνών/ορού γάλακτος σταθμίζεται περισσότερο προς τις καζεΐνες στο αγελαδινό γάλα (4.6), λαμβάνοντας υπόψη ότι είναι περίπου τέσσερις φορές χαμηλότερη στο γάλα όνου (1,1) και περίπου εννέα φορές χαμηλότερη στο ανθρώπινο γάλα (0,5) (Guo et al, 2007; Ragona et al, 2016). Μελέτες έχουν δείξει ότι η *in vitro* ικανότητα αποικοδόμησης και πεπτικότητας των καζεϊνών και των πρωτεϊνών ορού είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη του γάλακτος αγελάδας (Villoslada et al, 2005). Η πεπτικότητα των πρωτεϊνών είναι επίσης σημαντική δεδομένου ότι η αλλεργιογόνος δράση των πρωτεϊνών των τροφίμων συνδέεται με την επιβίωση του αλλεργιογόνου στη γαστρεντερική οδό (Dupond et al, 2015).

Τέλος, κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, στο γάλα όνου μεταβάλλονται τόσο η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες όσο και οι τιμές που αναφέρονται στην ποσοτική σύσταση της κάθε πρωτεΐνης επί του συνολικού βάρους των πρωτεϊνών (Guo et al, 2007).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το προφίλ αμινοξέων στο γάλα όνου και το ανθρώπινο γάλα (Guo et al, 2007). Οι τιμές αναφέρονται σε g αμινοξέος ανά 100g πρωτεΐνης:

Πίνακας 8: Σύσταση αμινοξέων σε γάλα όνου και ανθρώπου

AMINOΞΕΑ	ΓΑΛΑ ΟΝΟΥ	ΓΑΛΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Asp	8,9	8,3
Ser	6,2	5,1
Glu	22,8	17,8
Gly	1,2	2,6
His	2,3	2,3
Arg	4,6	4,0
Thr	3,6	4,6
Ala	3,5	4,0
Pro	8,8	8,6
Cys	0,4	1,7
Tyr	3,7	4,7
Val	6,5	6,0
Met	1,8	1,8
Lys	7,3	6,2
Ile	5,5	5,8
Leu	8,6	10,1
Phe	4,3	4,4
Try	-	1,8
Απαραίτητα	38,2	40,7
Συνολικά	100	99,8

Στο γάλα όνου, τα συνολικά επίπεδα αμινοξέων και απαραίτητων αμινοξέων είναι αρκετά παρόμοια με αυτά του ανθρώπινου γάλακτος (Guo et al, 2007; Zhang et al, 2013). Ένας υψηλός βαθμός ομοιότητας μεταξύ των δύο ειδών γάλακτος είναι ενδιαφέρων από θρεπτική άποψη καθώς η σύνθεση της βρεφικής τροφής μπορεί να αξιολογηθεί με βαθμολογία αμινοξέων που βασίζεται στη σύνθεση αμινοξέων του ανθρώπινου γάλακτος (Raiten et al, 1998; Zhang et al, 2013). Στο ανθρώπινο γάλα, η συνολική περιεκτικότητα σε αμινοξέα μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (Lönnnerdal et al, 2017). Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με τις εξελισσόμενες ανάγκες του αναπτυσσόμενου βρέφους, αν και η θρεπτική αξία της πρωτεΐνης στο μητρικό γάλα, μετρούμενη από την αναλογία των απαραίτητων αμινοξέων προς τα ολικά αμινοξέα, φαίνεται να είναι σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο προφίλ αμινοξέων του γάλακτος όνου κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, εκτός από τη θρεονίνη και το ασπαρτικό οξύ (Guo et al, 2007).

1.6.2.4 Λακτόζη και ολιγοσακχαρίτες

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που σχηματίζεται από γλυκόζη και γαλακτόζη, είναι ιδιαίτερα παρούσα στο γάλα ανθρώπου και όνου (περίπου 7 g / 100 g), ενώ στα μηρυκαστικά η παρουσία της είναι χαμηλότερη (περίπου 4,6% στο αγελαδινό γάλα) (Martini et al, 2014b; Ballard et al, 2013). Η λακτόζη είναι σημαντική πηγή γαλακτόζης που

χαρακτηρίζεται ως μια βασική πηγή ενέργειας και ένα κρίσιμο δομικό στοιχείο σε σύνθετα μόρια, το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την πρώιμη ανθρώπινη ανάπτυξη. Επιπλέον, η γαλακτόζη μπορεί να είναι ευεργετική σε πολλές ασθένειες, ιδιαίτερα σε αυτές που προσβάλλουν τον εγκέφαλο (Coelho et al, 2015). Η υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη του γάλακτος όνου αυξάνει επίσης τη γευστικότητά του. Η λακτόζη είναι ένας από τους διαιτητικούς παράγοντες που ενεργοποιεί το εντερικό ασβέστιο και συμβάλλει στην απορρόφηση φωσφόρου η οποία είναι σημαντική για την προστασία των οστών και την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Aresco et al, 2015). Αυτό το φαινόμενο λακτόζης έχει παρατηρηθεί σε ζωικά μοντέλα, ενώ υπάρχουν αντιφατικές αναφορές στους ανθρώπους (Kwak et al, 2012). Η λακτόζη παρέχει επίσης ένα υπόστρωμα για την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας και έχει προβιοτικό ρόλο (Yvon et al 2016).

Το ανθρώπινο γάλα είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε ολιγοσακχαρίτες, με μέση περιεκτικότητα 7-12 g / L (Corra et al, 1999; Thurl et al, 2017) και περισσότερους από 200 διαφορετικούς ολιγοσακχαρίτες (Sischo et al, 2017). Οι ουδέτεροι και οι όξινοι ολιγοσακχαρίτες είναι οι κύριοι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος (Barile et al, 2013) με τους πιο συχνούς να είναι 2-φουκόζυλο-λακτόζη (2,6 g / L), διφουκοζυλο-λακτοζυλο-N-εξόζη II (2 g / L) και διφουκοζυλο-λακτοζυλο-N-εξόζη (2,8 g / L) (Thurl et al, 2017). Σε αντίθεση με τους ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος, οι ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος όνου έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό ενώ το συνολικό τους περιεχόμενο δεν είναι γνωστό. Από όσα είναι γνωστά, μόνο τρεις όξινοι ολιγοσακχαρίτες έχουν ποσοτικοποιηθεί σε γάλα όνου, η 3-σιαλυλακτόζη (3-SL), η 6-σιαλυλακτόζη (6-SL) και η δισιαυλο-γαλακτο-N-τετραόζη (DS-LNT). Είναι παρόντες σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων από ό, τι στο ανθρώπινο γάλα. Η 3-SL είναι κατά μέσο όρο 0,014 g / L στο γάλα όνου έναντι 0,20 g / L στο ανθρώπινο, ενώ η 6-SL και η DS-LNT είναι 0,019 και 0,008 g / L αντίστοιχα στο γάλα όνου έναντι 0,33 g / L και 0,50 g / L, αντίστοιχα, στο ανθρώπινο γάλα (Monti et al, 2015; Orlandi et al, 2016; Thurl et al, 2017). Τέλος, σύμφωνα με μελέτη (Massouras et al, 2017), η περιεκτικότητα της λακτόζης στο γάλα όνου φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη γαλακτική περίοδο.

1.6.2.5 Μέταλλα

Στον πίνακα 9 παρουσιάζεται η σύσταση του γάλακτος όνου, αγελάδας και ανθρώπου σε μέταλλα σύμφωνα με διάφορες έρευνες (Roginski et al, 2009; Li et al, 2017; Altomonte et al, 2019):

Πίνακας 8: Σύσταση γάλακτος ανθρώπου, όνου και αγελάδας για μέταλλα

	γάλα όνου	γάλα αγελάδας	γάλα ανθρώπου
Ca (mg/100g)	68,9	122	33
P (mg/100g)	41	93	14
Mg (mg/100g)	8,89	12	4
K (mg/100g)	65,7	152	51
Na (mg/100g)	37	58	15
Fe (mg/100g)	0,15	0,08	0,20
Zn (mg/100g)	0,14	0,53	0,38

Τα μέταλλα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της σκελετικής δομής καθώς και σε πολλές βιολογικές διεργασίες, επομένως είναι θεμελιώδη για τη διατήρηση μιας καλής υγείας. Στη διατροφή των βρεφών, μια ισορροπημένη ποσότητα ανόργανων συστατικών, καθώς και πρωτεΐνης, είναι σημαντική για το νεφρικό φορτίο. Ένα υψηλό νεφρικό φορτίο οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση ούρων και όταν η πρόσληψη υγρών είναι χαμηλή και / ή όταν οι εξωτερικές απώλειες νερού είναι υψηλές, η ικανότητα συγκέντρωσης ουσιών στα νεφρά των βρεφών μπορεί να είναι ανεπαρκής για τη διατήρηση της ισορροπίας του νερού και μπορεί να οδηγήσει σε αφυδάτωση (Brown, 2007).

Η περιεκτικότητα σε ασβέστιο, φώσφορο και μαγνήσιο στο γάλα όνου (68,9mg/100g και 41mg/100g αντίστοιχα) είναι ενδιάμεση μεταξύ ανθρώπινου (33mg/100g και 14mg/100g αντίστοιχα) και αγελαδινού γάλακτος (122mg/100g και 93mg/100g αντίστοιχα). Επίσης, η περιεκτικότητα σε νάτριο και κάλιο στο γάλα όνου (37mg/100g και 65,7mg/100g αντίστοιχα) είναι ενδιάμεση μεταξύ του ανθρώπινου (15mg/100g και 51mg/100g αντίστοιχα) και του αγελαδινού γάλακτος (58mg/100g και 152mg/100g αντίστοιχα) (Fantuz et al, 2012).

Όσον αφορά το Zn, είναι το κύριο μικροστοιχείο στο γάλα όνου και στο ανθρώπινο γάλα (Fantuz et al, 2013). Τα βρέφη, τα παιδιά και οι έφηβοι έχουν αυξημένες απαιτήσεις για ψευδάργυρο και ως εκ τούτου διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εξάντλησης του ψευδαργύρου. Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου κατά τη διάρκεια των περιόδων ανάπτυξης οδηγεί σε αποτυχία ανάπτυξης (IZiNCG, 2004). Τα επιδερμικά, γαστρεντερικά, κεντρικά νευρικά, ανοσοποιητικά, σκελετικά και αναπαραγωγικά συστήματα είναι τα όργανα που επηρεάζονται περισσότερο κλινικά από ανεπάρκεια ψευδαργύρου (Roohani et al, 2013). Η επαρκής πρόσληψη ασβεστίου και η αναλογία ασβεστίου/φωσφόρου, καθώς και το μαγνήσιο και η βιταμίνη D, είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία και την ανάπτυξη των οστών (Loughrill et al, 2017). Η κατάλληλη πρόσληψη ασβεστίου είναι σημαντική, ειδικά σε μωρά που πάσχουν από CMPA και σε αλλεργικά μωρά που τρέφονται με υποκατάστατο

γάλα (σόγιας) και χρειάζονται συμπληρώματα ασβεστίου (Serro et al, 2005). Το γάλα όνου και το ανθρώπινο γάλα εμπίπτουν στο συνιστώμενο εύρος του λόγου ασβεστίου και φωσφόρου (1-2/1) και βρίσκονται επίσης κάτω από το όριο που συνιστά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας που προτείνει αναλογία $Na / K \leq 1$. Συνιστάται χαμηλή αναλογία Na/K , καθώς στα παιδιά παίζει σημαντικό ρόλο στη μελλοντική ανάπτυξη και σοβαρότητα της υπέρτασης. Τέλος οι τιμές των μετάλλων (Na,Mg,Ca,K,P) επηρεάζονται αρκετά από τη γαλακτική περίοδο (Massouras et al, 2017).

1.6.2.6 Βιταμίνες

Παρουσιάζεται η σύσταση του γάλακτος όνου και ανθρώπου σε βιταμίνες σύμφωνα με διάφορες έρευνες στον παρακάτω πίνακα (Allen, 2012; Buss et al, 2001; Fantuz et al, 2012,2013; Gentili et al, 2013; Kamao et al, 2007; Lazarevic et al, 2017; Leaf, 2007; Lima et al, 2014; Martini et al, 2014b, 2018; Salimei et al, 2004; Vincenzetti et al, 2017; Yamawaki et al, 2005; Altomonde et al, 2019):

Πίνακας 9: Σύσταση βιταμινών σε γάλα όνου και γάλα ανθρώπου

Βιταμίνες	Γάλα Όνου (μg/L)	Γάλα Ανθρώπου (μg/L)
B1	210-2550	20-350
B2	40-970	10-550
B3	73-	571-687
B12	1,1-	21-
C	12000-57000	38000-53000
A	17-586	300-2000
D	0-2,3	0,07-
E	59,4-807	1000-9840

Το γάλα όνου έχει συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνη C 12–57 mg/L, παρόμοια με εκείνη του ανθρώπινου γάλακτος (38–53 mg /L) (Buss et al, 2001; Lazarevic et al, 2017; Leaf 2007; Vincenzetti et al, 2017). Η βιταμίνη C βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου, έχει αντιοξειδωτικά αποτελέσματα και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό κολλαγόνου. Επιπλέον, η πρόσληψη βιταμίνης C φαίνεται επίσης να έχει προστατευτικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη ατοπικής δερματίτιδας σε βρέφη υψηλού κινδύνου (Horpu et al, 2005). Το γάλα όνου μπορεί να θεωρηθεί καλή πηγή αυτής της βιταμίνης, καθώς περίπου 500 mL γάλα όνου καλύπτει τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (25 mg) για παιδιά ηλικίας 0-12 μηνών (Leaf, 2007).

Οι βιταμίνες B περιλαμβάνουν μια ομάδα οκτώ υδατοδιαλυτών βιταμινών που διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυτταρική λειτουργία και δρουν ως συν-ένζυμα σε αρκετές μεταβολικές ενζυματικές αντιδράσεις. Όσον αφορά το περιεχόμενο των βιταμινών B, οι τιμές στη βιβλιογραφία ποικίλλουν σημαντικά. Γενικά, οι ποσότητες βιταμίνης B1 (θειαμίνη) και βιταμίνης B3 (νιασίνη) στο γάλα όνου είναι κατά μέσο όρο υψηλότερες από ό, τι στο ανθρώπινο γάλα (Allen, 2012; Claeys et al, 2014; Vincenzetti et al, 2017).

Η βιταμίνη Α αποτελείται από μια ομάδα δραστικών ενώσεων γνωστών ως ρετινοειδή και καροτενοειδή (Gentili et al, 2013). Τα καροτενοειδή βρίσκονται κυρίως στα λαχανικά και μετατρέπονται από τα ζώα σε ρετινόλη με αποτελεσματικότητα που ποικίλλει στα διάφορα είδη. Γενικά, ο μαστικός αδένας προέρχεται από ελεύθερη ρετινόλη από το ήπαρ και, μετά την εστεροποίηση, η ρετινόλη εκκρίνεται στον πυρήνα των σφαιριδίων λίπους γάλακτος (Nozière et al, 2006). Η βιταμίνη Α είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη, την ανοσία, τα επιθηλιακά κύτταρα και την υγεία των ματιών και μπορεί να δώσει σημαντική προστασία έναντι γαστρεντερικών και αναπνευστικών λοιμώξεων (Pereira, 2014; Yao et al, 2016). Αν και η περιεκτικότητα σε ρετινόλη είναι χαμηλότερη στο γάλα όνου από ότι στο ανθρώπινο γάλα (17–586 $\mu\text{g} / \text{L}$ έναντι 300–2000 $\mu\text{g} / \text{L}$) (Claeys et al, 2014; Gentili et al, 2013) η συνιστώμενη πρόσληψη αυτής της βιταμίνης για παιδιά 1-3 ετών είναι 350–400 μg την ημέρα και γενικά δεν υπάρχουν ελλείψεις αυτής της βιταμίνης στις Δυτικές Χώρες (Leaf, 2007). Στο ανθρώπινο γάλα υπάρχει επίσης β-καροτένιο ($63,2 \pm 23,3 \text{ ng} / \text{mL}$ σε ώριμο γάλα) και παρέχει πιθανές πηγές βιταμίνης Α για μωρά.

Η βιταμίνη D είναι μια ομάδα ενώσεων με αντιραχίτικη δραστηριότητα, που παίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοιοστάση ασβεστίου και στον μεταβολισμό των οστών και επίσης δρα ως ορμόνη. Σε βρέφη και παιδιά, συνιστάται πρόσληψη βιταμίνης D 400 και 600 IU αντίστοιχα την ημέρα, (Holick et al, 2011) για την αποφυγή ελλείψεων. Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι η συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνη D στο γάλα όνου (23 $\mu\text{g} / \text{L}$, περίπου 920 IU) είναι υψηλότερη από τις μέσες τιμές που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για το ανθρώπινο γάλα (Altomonte et al, 2019; Við Streygm et al, 2016). Η ποσότητα της βιταμίνης D στο γάλα όνου έχει δείξει εποχιακές διακυμάνσεις, όπως και στο αγελαδινό. Συγκεκριμένα, βρέθηκε υψηλότερη συγκέντρωση βιταμίνης D το καλοκαίρι από ό,τι το χειμώνα, πιθανώς λόγω της διαφορετικής έκθεσης των ζώων στον ήλιο (Salari et al, 2016).

Η βιταμίνη Ε αποτελείται από οκτώ βιολογικές δραστικές μορφές, που αντιπροσωπεύονται από τέσσερις τοκοφερόλες (κορεσμένες ισοπρενοειδείς πλευρικές αλυσίδες) και τέσσερις τοκοτριενόλες (ακόρεστες ισοπρενοειδείς πλευρικές αλυσίδες) με αντιοξειδωτική δράση, κυρίως στις μεμβράνες του γάλακτος. Το γάλα όνου έχει χαμηλότερο επίπεδο α-τοκοφερόλης σε σύγκριση με τα μέσα επίπεδα που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για το ανθρώπινο γάλα (59-807 έναντι 1000-9840 $\mu\text{l} / \text{L}$ αντίστοιχα) (Gentili et al, 2013; Kamao et al, 2007; Lima et al, 2014).

Για τη διακύμανση των τιμών της περιεκτικότητας των βιταμινών στο γάλα όνου κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου δε διαθέτουμε πολλές πληροφορίες. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι η σύσταση των τοκοφερολών στο γάλα όνου δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη γαλακτική περίοδο.

1.7 Πρωτεΐνες ορού

Το κλάσμα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος στο γάλα όνου έχει μερικώς χαρακτηριστεί από τη βιβλιογραφία. Ορισμένες πρωτεΐνες έχουν σημαντικές θρεπτικές ιδιότητες και μπορεί να είναι ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει την ποσότητα των κυριότερων γαλακτοπρωτεϊνών ορού στο γάλα όνου.

Πίνακας 10: Σύσταση πρωτεϊνών ορού σε γάλα όνου

Πρωτεΐνες	Γάλα Όνου
Οροπρωτεΐνες	g/L
α-λακτογλοβουλίνη	0,81-3,1
β-λακτογλοβουλίνη	2,4-5,4
λυσοζύμη	3-4
λακτοφερίνη	0,10-0,13

1.7.1 α-λακταλβουμίνη

Η α-λακταλβουμίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (Mr 14,2 kDa), με θέση σύνδεσης με ιόν Ca^{2+} . Έχει υποτεθεί ότι το γονίδιο της προήλθε 300-400 εκατομμύρια χρόνια πριν από ένα προγονικό γονίδιο λυσοζύμης, με αναπαραγωγή γονιδίων. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η α-λακταλβουμίνη μοιράζεται 40% ταυτότητα ακολουθίας με λυσοζύμη και επίσης η τρισδιάστατη δομή τους είναι πολύ παρόμοια.

Αυτή η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο τομείς: ένα μεγάλο α-ελικοειδές πεδίο και ένα άλλο μικρότερο που αποτελείται από β-πτυχωτό φύλλο. Αυτοί οι δύο τομείς συνδέονται μεταξύ τους με βρόχο δέσμευσης ασβεστίου. Περαιτέρω, συγκρατούνται μαζί από μια δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ του υπολειμματος κυστεΐνης 73 και 91, η οποία σχηματίζει επίσης το βρόχο δέσμευσης ασβεστίου και μια άλλη γέφυρα δισουλφιδίου μεταξύ 61 και 77 υπολειμμάτων κυστεΐνης. Οριστικά, η συνολική δομή της α-λακταλβουμίνης σταθεροποιείται από τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες (Permyakova et al, 2000).

Αυτή η πρωτεΐνη είναι σημαντική για διάφορους λόγους. Πρώτα απ' όλα, η α-λακταλβουμίνη είναι μέρος του ενζυματικού συμπλόκου που ρυθμίζει τη σύνθεση λακτόζης στον αδένα του μαστού και διευκολύνει επίσης την απορρόφηση της λακτόζης στο έντερο. Ωστόσο, η α-λακταλβουμίνη έχει αρκετές άλλες λειτουργίες, μεταξύ άλλων αντιφλεγμονωδών και αντιεπιληπτικών λειτουργιών. Μερικές έρευνες έδειξαν ότι η πρωτεολυτική πέψη της α-λακταλβουμίνης απελευθέρωσε τρία πεπτιδία με βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, δύο θραύσματα ελήφθησαν από την τρυπτική πέψη και το τρίτο ελήφθη με κατακερματισμό της α-λακταλβουμίνης με χυμοτρυψίνη. Αυτά τα πολυπεπτιδία ήταν κυρίως δραστικά έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ ήταν λιγότερο δραστικά σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Εάν η α-λακταλβουμίνη υποστεί πέψη με πεψίνη, τα πολυπεπτιδικά θραύσματα που λαμβάνονται δεν δείχνουν αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Επειδή η α-λακταλβουμίνη που δεν έχει πεπτεί δεν έχει βακτηριοκτόνο

δράση, προτάθηκε ότι πιθανή αντιμικροβιακή λειτουργία της α-λακταλβουμίνης υφίσταται μόνο μετά από μερική πέψη από ενδοπεπτιδάσες (Pelligrini et al, 1999).

Άλλοι ερευνητές βρήκαν μια παραλλαγή αναδίπλωσης της α-λακταλβουμίνης στο ανθρώπινο γάλα με βακτηριοκτόνο δράση έναντι ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών *Streptococcus pneumoniae*. Σε αυτά τα πειράματα, η φυσική α-λακταλβουμίνη μετατράπηκε στην ενεργή βακτηριοκτόνο μορφή με χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων παρουσία λιπαρού οξέος C18: 1 (ελαϊκό οξύ) (Hakansson et al, 2000). Ωστόσο, αυτή η αντιβακτηριακή δράση ήταν επιλεκτική μόνο για τους στρεπτόκοκκους καθώς τα αρνητικά κατά Gram και τα θετικά κατά Gram βακτήρια ήταν ανθεκτικά. Έχει αποδειχθεί ότι η φυσική α-λακταλβουμίνη διαθέτει πολλές κατηγορίες θέσεων σύνδεσης λιπαρών οξέων (Cawthern et al, 1997).

Ορισμένα πολυμερή ανθρώπινα παράγωγά της προκαλούν αύξηση του επιπέδου Ca^{2+} και δρα ως παράγοντας που προκαλεί απόπτωση (Hakansson et al, 1995; Svensson et al, 1999). Στην πραγματικότητα, έχει αποδειχθεί ότι η πολυμερής μορφή της α-λακταλβουμίνης μπορεί να συνδεθεί στην κυτταρική επιφάνεια, να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα και να συσσωρευτεί στους πυρήνες. Περαιτέρω, η άμεση αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια οδηγεί σε απελευθέρωση κυτοχρώματος c, η οποία, με τη σειρά της, ξεκινά την αλληλουχία κασπάσης που εμπλέκεται στην απόπτωση (Cawthern et al, 1997).

Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι στο ανθρώπινο γάλα το σύμπλοκο α-λακταλβουμίνης-ελαϊκού οξέος, που ονομάζεται HAMLET (Human α-lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells) είναι ικανό να προκαλεί επιλεκτική απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας ανεπηρέαστα τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι in vivo επιδράσεις του HAMLET έχουν διερευνηθεί σε ασθενείς και σε κυτταρικές σειρές όγκων και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το HAMLET περιορίζει την εξέλιξη των ανθρώπινων γλοιοβλαστωμάτων σε ένα μοντέλο ξενομοσχεύματος και αφαιρεί τα θηλώματα του δέρματος σε ασθενείς (Vincenzetti et al, 2017). Στα καρκινικά κύτταρα, το HAMLET εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχεται στους πυρήνες όπου συσσωρεύεται. Εδώ, το HAMLET συνδέεται με τις ιστόνες και διαταράσσει την οργάνωση της χρωματίνης (Mossberg et al, 2010). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το όξινο pH στο στομάχι του θηλάζοντος παιδιού μπορεί να προωθήσει το σχηματισμό HAMLET το οποίο συμβάλλει στην προστατευτική επίδραση του θηλασμού κατά των παιδικών όγκων (Mossberg et al, 2010).

1.7.2 β-γαλακτογλοβουλίνη

Η β-γαλακτογλοβουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη με 162 αμινοξέα (Mr 18,4 kDa). Η ακολουθία της και η τρισδιάστατη δομή της (διμερές) δείχνουν ότι είναι μέρος της οικογένειας των λιποκαλινών που περιλαμβάνει μια μεγάλη και διαφοροποιημένη ομάδα από περισσότερες από 50 εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που προέρχονται από μεγάλη ποικιλία ιστών σε ζώα, φυτά και βακτήρια. Μια τυπική λιποκαλίνη αποτελείται από μια πεπτιδική αλυσίδα 160-180 αμινοξέων, διπλωμένη σε 8 αντιπαράλληλα νημάτια που παράγουν ένα β-πτυχωτό φύλλο τοποθετημένο σε μια κωνική δομή που ονομάζεται β-βαρέλι, στην οποία βρίσκεται ο υδρόφοβος θύλακας ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύει διαφορετικά υδρόφοβα

μόρια. Τα μέλη αυτής της οικογένειας χαρακτηρίζονται από κάποιες κοινές μοριακές ιδιότητες όπως την ικανότητα δέσμευσης μικρών υδρόφοβων μορίων, την ικανότητα σύνδεσης σε συγκεκριμένους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και την ικανότητα σχηματισμού συμπλοκών με διαλυτά μακρομόρια. Για αυτούς τους λόγους, οι λιποκαλίνες μπορούν να δρουν ως συγκεκριμένοι μεταφορείς. Εξαιτίας της υψηλής συγγένειας της β-γαλακτογλοβουλίνης με ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και της υψηλής συγκέντρωσής της στο γάλα, έχουν προταθεί διάφορες λειτουργίες για αυτήν την πρωτεΐνη. Εκτός από τη μεταφορά υδρόφοβων μορίων, αυτή η πρωτεΐνη φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση των ενζύμων και στην απόκτηση παθητικής ανοσίας στα νεογνά (Kontopidis et al, 2004). Πρόσφατα αποδείχθηκε (Liang et al, 2008) ότι η β-γαλακτογλοβουλίνη είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με τη ρεσβερατρόλη, μια φυσική πολυφαινολική ένωση με αντιοξειδωτική δράση σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα 1:1 που ενισχύει τη φωτοσταθερότητα και την υδροδιαλυτότητα της ρεσβερατρόλης, βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η β-γαλακτογλοβουλίνη μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα επίσης με φολικό οξύ. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικός φορέας αυτής της σημαντικής βιταμίνης στα τρόφιμα (Liang et al, 2010).

1.7.3 Λακτοφερίνη

Η λακτοφερίνη (Mr 80,0 kDa) που ανήκει στην οικογένεια των τρανσφερινών, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη χηλίωσης σιδήρου και έχει μια δομή αποτελούμενη από δύο ομόλογα πεδία, το καθένα δεσμεύει ένα ιόν σιδήρου (Fe^{3+}) και ένα ανθρακικό ανιόν. Είναι μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει διάφορες λειτουργίες, όπως ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων, άμυνα κατά των μολυσματικών παραγόντων, αντιφλεγμονώδη και καρκινική προστασία, και τελικά μια τροφική δραστηριότητα στον εντερικό βλεννογόνο (Ward et al, 2005). Η λακτοφερίνη υπάρχει κυρίως στο γάλα και επίσης σε μικρές ποσότητες σε εξωκρινικά υγρά όπως σάλιο, δάκρυα, χολή, σπέρμα και χυμός παγκρέατος. Το πλάσμα περιέχει χαμηλή συγκέντρωση λακτοφερίνης φυσιολογικά αλλά κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους αντίδρασης τα ουδετερόφιλα την απελευθερώνουν αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωσή της στο πλάσμα του αίματος. Η συγκέντρωση της λακτοφερίνης είναι αρκετά υψηλή στο ανθρώπινο γάλα σε σύγκριση με το γάλα άλλων ειδών. Ωστόσο, σε όλα τα είδη, η υψηλότερη συγκέντρωση λακτοφερίνης βρίσκεται στο πρωτόγαλα (στο ανθρώπινο πρωτόγαλα είναι περίπου 7,0 g / L) και μπορεί να αυξηθεί στην περίπτωση μόλυνσης του μαστού. Η λακτοφερίνη φαίνεται να διαθέτει δύο διαφορετικούς μηχανισμούς αντιμικροβιακής δράσης. Ο πρώτος μηχανισμός έχει βακτηριοστατική δράση, διότι, χάρη στην υψηλή της συγγένεια με τον σίδηρο, μπορεί να αφαιρέσει αυτό το μέταλλο από βακτήρια που εξαρτώνται από σίδηρο, τα οποία έτσι στερούνται ουσιαστικής θρεπτικής ανάπτυξης. Χάρη στις βακτηριοστατικές του ιδιότητες, λόγω της ικανότητας δέσμευσης σιδήρου, η λακτοφερίνη είναι ικανή να καθυστερήσει την ανάπτυξη σε μια ευρεία μεταβλητότητα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου ενός ευρέος φάσματος θετικών κατά gram και αρνητικών κατά gram βακτηρίων και κάποιου τύπου ζυμών. Ωστόσο, το βακτηριοστατικό αποτέλεσμα είναι συχνά προσωρινό επειδή ορισμένα αρνητικά κατά gram βακτήρια μπόρεσαν να

προσαρμοστούν στις περιοριστικές συνθήκες του σιδήρου μέσω της σύνθεσης χηλικών παραγόντων χαμηλού μοριακού βάρους που είναι σε θέση να απομακρύνουν το σίδηρο από τη λακτοφερίνη. Η δεύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα οφείλεται σε έναν μηχανισμό άμεσης δράσης της λακτοφερίνης που είναι ικανός να καταστρέψει το κυτταρικό τοίχωμα των gram-αρνητικών βακτηρίων, να συνδεθεί με λιποπολυσακχαρίτη A, στις πορίνες και άλλα επιφανειακά μόρια του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων μικροοργανισμών. Η λακτοφερίνη έχει σημαντικό αντιφλεγμονώδη ρόλο που σχετίζεται με τη μικροβιακή πρόκληση. Έχει αποδειχθεί μέσω μελετών σε ζώα ότι η χορήγηση λακτοφερίνης προστατεύει από τη γαστρίτιδα που δρα κατά του ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (Dial et al, 2002). Αυτό το αποτέλεσμα έναντι των λοιμώξεων φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η λακτοφερίνη προάγει την αναστολή αρκετών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNFα), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και η IL-6. Η λακτοφερίνη αυξάνεται σε πολλές φλεγμονώδεις διαταραχές όπως νευροεκφυλιστική ασθένεια, αρθρίτιδα, δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις, φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και σε ασθένειες των πνευμόνων (Ward et al, 2005). Επιπλέον, η λακτοφερίνη, εκτός από τους πολλούς βιολογικούς ρόλους που είναι ήδη γνωστοί, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Cornish et al, 2006).

Από την πέψη της λακτοφερίνης προκύπτουν ορισμένα πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων όπως LF1-11, λακτοφεραμπίνη και λακτοφερρίνη. Όλα αυτά προέρχονται από την N-τερματική περιοχή της λακτοφερίνης και διατηρούνται στη λακτοφερίνη των περισσότερων ειδών. Το πιο σημαντικό πεπτίδιο είναι η λακτοφερρίνη η οποία ασκεί την αντιβακτηριακή της δράση κατά πολλών βακτηρίων, ιών, μυκητιακών παθογόνων και πρωτοζώων. Περαιτέρω, αυτό το πεπτίδιο παρουσίασε και άλλες δραστηριότητες, όπως αναστολή μετάστασης όγκου σε ποντίκια και πρόκληση απόπτωσης σε ανθρώπινα μονοκυτταρικά λευκαϊμικά κύτταρα THP-1 (Sinha et al, 2013).

1.7.4 Λυσοζύμη

Το γάλα όνου περιέχει υψηλότερη ποσότητα λυσοζύμης σε σχέση με την περιεκτικότητα σε λυσοζύμη του ανθρώπινου γάλακτος, ενώ στο κατσικίσιο και το γάλα των βοοειδών αυτή η πρωτεΐνη ουσιαστικά απουσιάζει. Η λυσοζύμη ανήκει στην κατηγορία των υδρολασών και συγκεκριμένα είναι μια γλυκοσιδάση. Έχει μια δομή που αποτελείται από δύο τομείς: ο ένας τομέας αποτελείται ουσιαστικά από α-έλικες και ο άλλος αποτελείται από ένα αντι-παράλληλο β-πτυχωτό φύλλο και δύο α-έλικες. Η τρισδιάστατη διαμόρφωση του μορίου διατηρείται με την παρουσία τριών δισουλφιδικών γεφυρών: δύο τοποθετημένες στον τομέα άλφα-έλικα και μία στο β-φύλλο. Στο εσωτερικό του μέρους υπάρχουν λίγες πολικές περιοχές.

Σύμφωνα με τη βιοδραστική άποψη, αυτό το ένζυμο ασκεί βακτηριοκτόνο δράση, καθώς διαταράσσει το κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών. Η υδρολυτική αντίδρασή της εμφανίζεται μόνο στις ενώσεις οξυγόνου-γλυκοζυλίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 1 της γλυκοζαμίνης και του

άνθρακα 4 του μουραμικού οξέος, προκαλώντας έτσι το σπάσιμο του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.

Σε μια άλλη μελέτη σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του γάλακτος όνου, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της υψηλής περιεκτικότητας σε λυσοζύμη και της αντιβακτηριακής δραστηριότητας κατά της *Listeria monocytogenes* και του *Staphylococcus aureus* (Saric et al, 2014).

Χάρη στη βακτηριοκτόνο δράση του, η λυσοζύμη μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη εντερικών λοιμώξεων στα βρέφη, διευκολύνοντας έτσι την σωστή πέψη και την κανονική απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αυτό το ένζυμο έχει πολλές άλλες φυσιολογικές λειτουργίες όπως αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα, ανοσορυθμιστική δράση και αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η λυσοζύμη αναστέλλει την αγγειογένεση και έχει αντικαρκινική δράση. Πρόσφατες *in vitro* μελέτες έχουν επισημάνει μια αντιπολλαπλασιαστική και αντικαρκινική δράση του γάλακτος όνου κατά των αδενοκαρκινωμάτων ανθρώπινων κυψελιδικών βασικών επιθηλιακών κυττάρων (A549) (Mao et al, 2009). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η λυσοζύμη των ιπποειδών, η οποία, όπως συζητήθηκε προηγουμένως, είναι δομικά ομόλογη με την α-γαλακτοαλβουμίνη, μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με ελαϊκό οξύ που ονομάζεται ELOA (λυσοζύμη και ελαϊκό οξύ ιπποειδών). Αυτό, κατ'αναλογία προς το σύμπλοκο HAMLET, μπορεί να εμφανίζει κυτταροτοξική δράση. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι το ELOA εμφανίζει επίσης βακτηριοκτόνο δράση έναντι των πνευμονιόκοκκων- συγκεκριμένα αυτά τα σύμπλοκα συνδέονται με το *Streptococcus pneumoniae*, προκαλώντας διαταραχές της μεμβράνης του πλάσματος, όπως αποπόλωση και ρήξη, και κατά συνέπεια το ασβέστιο εισέρχεται στα κύτταρα. Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προκαλεί απόπτωση. Επιπλέον, ανάλογα με το HAMLET, η απόπτωση που προκαλείται από ELOA συνοδεύεται από κατακερματισμό DNA σε θραύσματα υψηλού μοριακού βάρους (Clementi et al, 2013). Η λυσοζύμη των ιπποειδών κατέχει επίσης τη θέση δέσμησης ασβεστίου υψηλής συγγένειας της α-γαλακταλβουμίνης, της οποίας η αλληλουχία αμινοξέων διατηρείται σε μεγάλο βαθμό (Mossberg et al, 2010).

1.8 Σκοπός και αντικείμενο μελέτης

Το γάλα του όνου έχει αναγνωρισθεί ως υψηλής βιολογικής αξίας γάλα. Παρ'όλα αυτά, το συνολικό πρωτεωμικό περιεχόμενο του γάλακτος του όνου δεν έχει ταυτοποιηθεί. Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση του πρωτεωμικού περιεχομένου του γάλακτος του όνου. Συγκεκριμένο γάλα όνου εμπορικά διαθέσιμο αναλύθηκε με μεθόδους πρωτεωμικής ώστε να ταυτοποιηθούν με την μεγαλύτερη δυνατή λεπτομέρεια οι πρωτεΐνες που περιέχει.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για LC-MS/MS

Το πειραματικό υλικό της παρούσας εργασίας είναι κατεψυγμένα γάλατα όνου εμπορικά διαθέσιμα από 3 διαφορετικές εταιρίες της χώρας. Από κάθε δείγμα (γάλα) παραλήφθησαν για ανάλυση 2mL που διαμοιράστηκαν με τη σειρά τους σε 2 σωληνάκια 1mL έκαστο. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους-22°C μέχρι την ανάλυσή τους. Η προετοιμασία των δειγμάτων για την LC-MS/MS ανάλυση περιλαμβάνει φυγοκέντριση, προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και καθαρισμό των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα: ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Biofuge Fresco, φωτόμετρο SmartSpec Plus 3000 της Bio-rad ρυθμιζόμενο στα 595 nm και φυγόκεντρος συμπύκνωσης υπό κενό, SpeedVac, Eppendorf Concentrator 5301. Συνολικά αναλύθηκαν 6 δείγματα.

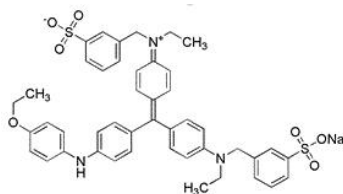
2.2 Απομόνωση των πρωτεϊνών

Τα δείγματα αποψύχονται σε πάγο και στη συνέχεια επαναπογενοποιούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα φυγοκεντρούνται στους 4°C στα 4000g για μία ώρα. Μετά το πέρας της φυγοκεντρίσεως δημιουργούνται 3 φάσεις. Η άνω φάση αποτελεί τη λιπιδική στοιβάδα. Η μεσαία φάση αποτελεί τον ορό του γάλακτος στον οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι πρωτεΐνες ορού και κάποιες διαλυτές καζεΐνες. Η κατωτέρα φάση αποτελείται από αδιάλυτες καζεΐνες. Η φυγοκέντριση έγινε σε ήπιες συνθήκες στους 4°C στα 4000g για μία ώρα. Η μεσαία φάση παραλαμβάνεται για περαιτέρω ανάλυση.

2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα (Bradford, 1976). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο σχηματισμό ενός γαλάζιου συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής κυανού της κουμασίνης (Coomassie Blue-CBB). Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική CBB-G250 (εικόνα 9) της Biorad.

Η χρωστική προσδένεται με τις πρωτεΐνες αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά κυρίως με τα βασικά αμινοξέα τους (λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη). Ακόμη, αλληλεπιδρά με τα υδρόφοβα αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη). Η ελεύθερη μορφή της χρωστικής που δεν έχει συνδεθεί με πρωτεΐνες απορροφά στα 465nm σε αντίθεση με το γαλάζιο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής που απορροφά στα 595nm (Τσεκούρας, 2012). Η ποσότητα αυτού του συμπλόκου είναι ανάλογη της έντασης του γαλάζιου χρώματος και αποτελεί μέτρο της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα (Ανδρίτσος, 2008).



Εικόνα 9. Coomassie Blue

Η μέθοδος Bradford πρόκειται για μια αντικειμενική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών καθώς συνδέεται απευθείας με τα αμινοξέα κάθε πρωτεΐνης. Επιπλέον ο προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford είναι ταχύς, επαναλήψιμος και εμφανίζει μικρή ευαισθησία σε διάφορες χημικές προσμίξεις στο δείγμα (θειικό αμμώνιο, πολυφαινόλες, υδατάνθρακες). Επίσης μπορεί να προσδιορίσει πρωτεΐνες ή πεπτίδια με μοριακή μάζα άνω των 4000Da.

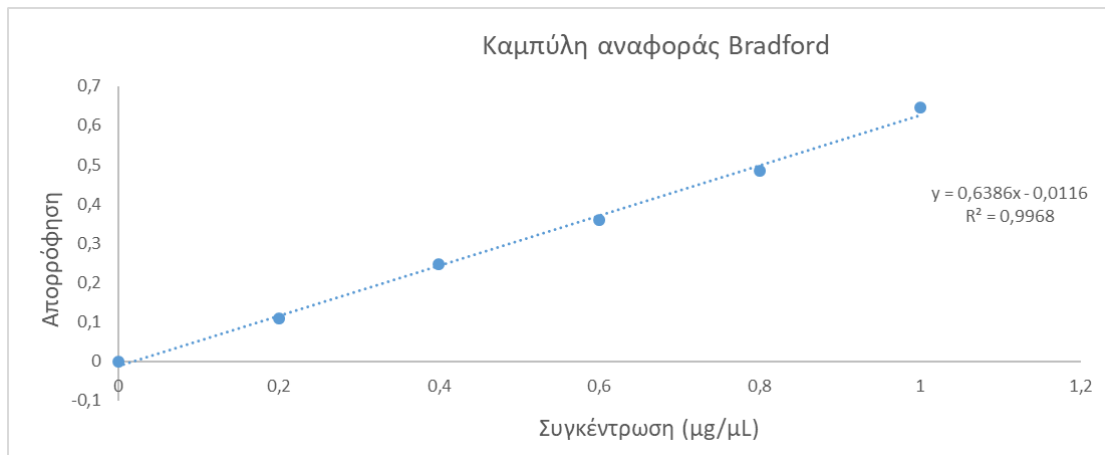
Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι επηρεάζεται από υψηλές τιμές συγκεντρώσεων ιοντικών και μη ιοντικών απορρυπαντικών όπως είναι το Triton X-100 και το δωδεκυλοθειικό νάτριο καθώς και ότι το χρώμα του συμπλόκου ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της πρωτεΐνης. Το τελευταίο γεγονός καθιστά πολύ σημαντική την επιλογή του προτύπου πρωτεΐνης.

Για τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Προκειμένου να προσδιοριστεί πειραματικώς η ποσότητα πρωτεΐνης σε ένα δείγμα είναι απαραίτητο να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς (εικόνα 10). Η καμπύλη κατασκευάζεται με ποσοτικό προσδιορισμό κρυσταλλικής βόειας αλβουμίνης (BSA) σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (πίνακας 11). Η γραμμικότητα του οργάνου (φωτόμετρο SmartSpec Plus 3000 της Bio-rad) κυμαίνεται από 0,2μg/μL έως 1μg/μL.

Αφού κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς της μεθόδου τα διαλύματα παρασκευάστηκαν ως εξής: 5μL από την απομονωμένη μεσαία φάση του κάθε δείγματος (ορός γάλακτος) και προστίθενται 95μL απιονισμένου νερού. Από τον τελικό όγκο των 100μL των διαλυμάτων παραλήφθησαν τα 10μL και μεταφέρθηκαν σε πλαστική κυψελίδα. Παράλληλα παρασκευάζεται και τυφλό διάλυμα που περιείχε μόνο 10μL απιονισμένο νερό. Κατόπιν προστέθηκε 1mL Bradford reagent σε όλα τα διαλύματα των 10 μL και οι κυψελίδες αναδεύονται. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι τιμές της απορρόφησης στα 595 nm και κατόπιν υπολογίστηκαν οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Ο όγκος της μεσαίας φάσης κάθε δείγματος που παραλήφθηκε για περαιτέρω ανάλυση υπολογίστηκε ώστε να αντιστοιχεί με 200μg πρωτεΐνης.

Πίνακας 11: Απορρόφηση προτύπων διαλυμάτων BSA

Πρότυπα διαλύματα BSA	Απορρόφηση (595 nm)	Συγκέντρωση (μg/μL)
1	0	0
2	0.109	0.2
3	0.247	0.4
4	0.359	0.6
5	0.485	0.8
6	0.646	1



Εικόνα 10. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Bradford κατασκευασμένη με χρήση Coomassie Blue-G250 και της BSA της Bio-rad.

2.4 Καθαρισμός των πρωτεϊνών

Ποσότητα δείγματος που περιέχει 400μg πρωτεΐνης, παραλαμβάνεται για περαιτέρω ανάλυση. Προστίθεται 5 φορές ο όγκος του διαλύματος σε ψυχθείσα ακετόνη (-22 °C) στο σωλήνα που περιέχει το δείγμα, αναμιγνύεται με vortex και παραμένει στους -22 °C για όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 13000g στους 4°C, μετά το πέρας της διαδικασίας αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το στώμιο του σωλήνα ανοιχτό με σκοπό την εξάτμιση της ακετόνης που πιθανόν να έχει απομείνει. Ακολούθως προστίθενται 100μL sample buffer (7M ουρίας, 2M θειουρία, 4% CHAPS, 2% Bio-Lyte 3/10 Ampholytes και απιονισμένο νερό) και το δείγμα ομογενοποιείται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο με υπερήχους. Η μέθοδος Bradford επαναλαμβάνεται και λαμβάνεται ο όγκος δείγματος που περιέχει 200 μg πρωτεΐνης για περαιτέρω ανάλυση. Για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών και την πέψη τους σε πεπτίδια χρησιμοποιούνται ειδικά φίλτρα φυγοκέντρωσης Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Merck, Darmstadt, Germany). Προστίθενται 50 μL ιωδοακεταμίδιο και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά υπό σκοτάδι, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρωση 10 λεπτών στα 13000g στους 4°C. Στο μείγμα των πρωτεϊνών προστίθενται 50 μL διαλύματος ουρίας και το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 13000g στους 4°C, ακολουθώντας επανάληψη του βήματος αυτού. Στη συνέχεια προστίθενται 50μL διαλύματος ABC (NH₄HCO₃ 50mM) και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 13000g στους 4°C. Ακολουθεί επανάληψη του σταδίου αυτού. Στη συνέχεια, στο δείγμα προσθέτουμε διάλυμα θρυψίνης 10%v/v (Roche Diagnostics, Basel, Swiss). Αφήνουμε το δείγμα να επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη μέρα. Μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρείται στα 13000g στους 4°C για 10 λεπτά. Προστίθενται 40μL ABC ((NH₄HCO₃ 50mM) και φυγοκεντρείται 15 λεπτά στα 13000g στους 4°C. Τέλος, τοποθετούμε τα σωληνάκια με τα καπάκια ανοιχτά στη

φυγόκεντρο συμπύκνωσης και τα βγάζουμε όταν το περιεχόμενό τους πάψει να είναι υδαρές. Τα δείγματα έπειτα αποθηκεύονται στους 4°C για περαιτέρω ανάλυση.

Καθαρισμός πρωτεϊνών



Εικόνα 11. Διάγραμμα ροής με τα βήματα για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών

2.5 LC-MS/MS

Η ανάλυση LC-MS/MS πραγματοποιήθηκε στο σύστημα αντίστροφης φάσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (1D reversed phase nanoLC) Ultimate-3000 (Dionex, Thermo Scientific, Bremen, Germany) σε συνδυασμό με το υβριδικό φασματόμετρο μάζας Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

Για το σύστημα nanoLC χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα κινητής φάσης:

- 1) 0,1% μυρμηκικό οξύ
- 2) 0,1% μυρμηκικό οξύ και 99,9% ακετονιτρίλιο

6μL από κάθε δείγμα εισήλθαν με ένεση στη χρωματογραφική προστήλη Acclaim PepMap C18 nano 0,1mm × 2cm, 3μm, 100Å με ροή 10μL/λεπτό κινητής φάσης A. Έπειτα από 6 λεπτά αφαλάτωσης, η προστήλη αντικαθίσταται με τη χρωματογραφική στήλη Acclaim PepMap C18 nano 75μm × 50cm, 2μm, 100Å ισορροπώντας με διάλυμα φάσης A. Τα πεπτίδια εκλούστηκαν και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν με σταδιακή διαβάθμιση συγκέντρωσης ξεκινώντας από 2% και φτάνοντας σε 30% φάσης B με σταθερό ρυθμό ροής 300nm ανά λεπτό και συνολική διάρκεια 6 ώρες.

Τα πεπτίδια που εκλούνται ιονίζονται και μεταφέρονται σε σύστημα υπό κενό με ηλεκτροψεκασμό θετικών ιόντων υπό τάση 2,6kV μέσω πηγής ηλεκτροψεκασμού (nano spray ESI). Ο αναλυτής μάζας ρυθμίστηκε για την απόκτηση φασμάτων εύρους από 300 μέχρι 2000 m/z, με ανάλυση 60000 και μέγιστο χρόνο έγχυσης 100ms. Τα 20 πιο έντονα φορτισμένα ιόντα επιλέχθηκαν από κάθε σάρωση για ανάλυση MS/MS θραυσματοποιώντας μέσω HCD (higher-energy collisional dissociation) στο 36% της ενέργειας πρόσκρουσης. Ο δυναμικός αποκλεισμός λαμβάνει χώρα εντός 45 δευτερολέπτων με σκοπό να εμποδιστούν οι επαναληπτικές καταγραφές ίδιων πεπτιδίων.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων και βιοπληροφορική ανάλυση

Τα δεδομένα (*.raw data) από την ανάλυση LC-MS/MS επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) προκειμένου να αντιστοιχηθούν τα φάσματα μάζας στα αντίστοιχα πεπτίδια, ενώ η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μέσω των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μηχανή αναζήτησης Sequest (Thermo Scientific) και την αναθεωρημένη βάση δεδομένων UniProtKB για το είδος equus asinus.

Έχοντας αποκτήσει όλες τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες σε κάθε δείγμα σε αρχείο μορφής .xls, έγινε προσπάθεια κατηγοριοποίησης των πρωτεϊνών μέσω της βάσης δεδομένων UniProtKB. Όσον αφορά την επεξεργασία των δειγμάτων με βιοπληροφορική προσέγγιση, ανακτήθηκαν αυτόματα οι λέξεις κλειδιά της κάθε εγγεγραμμένης πρωτεΐνης στη βάση δεδομένων UniProtKB και έπειτα ομαδοποιήθηκαν και οπτικοποιήθηκαν γραφιστικώς σύμφωνα με το σύστημα GeneOntology (GO).

3. Αποτελέσματα

Προκειμένου να μελετηθούν όσο το δυνατό περισσότερες πρωτεΐνες από το γάλα όνου, λάβαμε 3 ξεχωριστά δείγματα (γάλατα όνου) από διαφορετικές εταιρείες και προχωρήσαμε σε επεξεργασία αυτών των δειγμάτων. Στο τέλος της επεξεργασίας πραγματοποιήθηκε ανάλυση LC-MS/MS καθώς και βιοπληροφορική ανάλυση όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Η παραπάνω πρωτεωμική προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 633 πρωτεϊνών (633 διαφορετικοί κωδικοί καταχωρήσεων στην UniProtKB). Από αυτές τις πρωτεΐνες μόνο οι 5 ταυτοποιήθηκαν στον όνο (*equus asinus*). Οι υπόλοιπες ταυτοποιήθηκαν σε άλλα ζώα επειδή δεν έχει εισαχθεί η ακριβής αλληλουχία τους στη βάση δεδομένων. Από όλες τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, 2 δεν έχουν χαρακτηριστεί. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα της διπλανής σελίδας:

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάλυσης LC-MS/MS

Accession	Description	Coverage	Proteins	Unique Peptides	Peptides	AAs	MW [kDa]	calc. pI
P13613	Beta-lactoglobulin-1 OS=Equus asinus GN=LGB1 - [LACB1_EQUAS]	48,15	1	1	13	162	18,5	4,88
P19647	Beta-lactoglobulin-2 OS=Equus asinus GN=LGB2 - [LACB2_EQUAS]	71,17	1	12	12	163	18,3	4,81
P86273	Beta-casein OS=Equus asinus GN=CSN2 - [CASB_EQUAS]	20,80	4	6	6	226	25,5	5,78
O77811	Lactotransferrin (Fragment) OS=Equus caballus GN=LTF - [TRFL_HORSE]	24,17	10	20	21	695	75,9	7,93
P35747	Serum albumin OS=Equus caballus GN=ALB - [ALBU_HORSE]	20,59	14	14	17	607	68,6	6,34
P00761	Trypsin OS=Sus scrofa - [TRYP_PIG]	16,45	2	3	3	231	24,4	7,18
P08334	Alpha-lactalbumin A OS=Equus caballus - [LALB1_HORSE]	23,58	2	2	4	123	14,2	5,12
P62803	Histone H4 OS=Bos taurus - [H4_BOVIN]	21,36	1	2	2	103	11,4	11,36
P08113	Endoplasmin OS=Mus musculus GN=Hsp90b1 - [ENPL_MOUSE]	17,96	10	8	8	802	92,4	4,82
P86272	Alpha-S1-casein OS=Equus asinus GN=CSN1S1 - [CASA1_EQUAS]	36,14	1	8	8	202	24,4	6,35
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 - [HS90B_HUMAN]	12,29	9	3	6	724	83,2	5,03
P08896	Alpha-lactalbumin B/C OS=Equus caballus - [LALB2_HORSE]	23,58	1	2	4	123	14,2	5,12
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 [CH60_MOUSE]	27,05	6	8	8	573	60,9	6,18

P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Mus musculus GN=Hsp90aa1 - [HS90A_MOUSE]	10,10	6	2	5	733	84,7	5,01
P35761	Dual specificity protein kinase TTK OS=Mus musculus GN=Ttk - [TTK_MOUSE]	2,22	1	1	1	856	96,2	8,19
P06761	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 - [GRP78_RAT]	4,43	38	2	2	654	72,3	5,16
P09103	Protein disulfide-isomerase OS=Mus musculus GN=P4hb - [PDIA1_MOUSE]	22,00	8	7	7	509	57,0	4,88
O35737	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Mus musculus GN=Hnrnph1 - [HNRH1_MOUSE]	12,69	3	1	3	449	49,2	6,30
A5PK61	Histone H3.3C OS=Bos taurus GN=H3F3C - [H3C_BOVIN]	14,71	10	3	3	136	15,4	11,49
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 - [VDAC1_HUMAN]	28,62	5	5	5	283	30,8	8,54
P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Mus musculus GN=Hnrnph2 - [HNRH2_MOUSE]	16,48	4	2	4	449	49,2	6,30
O46674	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Canis familiaris GN=ATP2A2 - [AT2A2_CANFA]	11,94	12	7	7	997	109,6	5,36
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5b - [ATPB_MOUSE]	27,98	5	9	9	529	56,3	5,34
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5a1 - [ATPA_RAT]	19,71	6	7	7	553	59,7	9,19
P13084	Nucleophosmin OS=Rattus norvegicus GN=Npm1 - [NPM_RAT]	21,58	4	4	4	292	32,5	4,77
Q00715	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus - [H2B1_RAT]	14,40	29	2	2	125	14,0	10,36
P80195	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 OS=Bos taurus GN=GLYCAM1 -	4,58	2	1	1	153	17,1	6,68

	[GLCM1_BOVIN]							
P84856	Actin, cytoplasmic 1 OS=Cercopithecus pygerythrus GN=ACTB - [ACTB_CERPYPY]	19,39	8	3	4	361	40,4	5,83
Q9P2E3	NFX1-type zinc finger-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZNF1 - [ZNF1_HUMAN]	0,36	1	1	1	1918	220,1	7,30
P11376	Lysozyme C, milk isozyme OS=Equus caballus GN=LYZ - [LYSC1_HORSE]	23,26	2	3	3	129	14,6	8,09
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6- [K1C10_HUMAN]	23,46	47	9	11	584	58,8	5,21
P09411	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus GN=Pgk1 - [PGK1_MOUSE]	17,99	14	5	5	417	44,5	7,90
Q5E9J1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Bos taurus GN=HNRNPF - [HNRNPF_BOVIN]	8,94	4	2	2	414	45,7	5,49
A5A6M6	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Pan troglodytes GN=KRT1 - [K2C1_PANTR]	19,31	13	8	10	637	65,4	7,81
A2Q0Z1	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Equus caballus GN=HSPA8 - [HSP7C_HORSE]	24,61	31	8	8	646	70,9	5,52
P02739	Serum amyloid A-2 protein OS=Neovison vison GN=SAA2 - [SAA2_NEOVI]	25,58	6	1	4	129	14,4	8,12
P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Mus musculus GN=Atp6v1a - [VATA_MOUSE]	16,69	5	5	5	617	68,3	5,58
Q02053	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Mus musculus GN=Uba1 - [UBA1_MOUSE]	6,52	5	4	4	1058	117,7	5,66
P18892	Butyrophilin subfamily 1 member A1 OS=Bos taurus GN=BTN1A1 - [BT1A1_BOVIN]	3,61	2	2	2	526	59,2	5,20
P85296	Polymeric immunoglobulin receptor (Fragment) OS=Capra hircus GN=PIGR - [PIGR_CAPHI]	100,00	2	1	1	14	1,5	4,50

P19857	Serum amyloid A protein OS=Equus caballus GN=SAA1 - [SAA_HORSE]	35,45	3	2	4	110	12,3	9,09
Q9BUA6	Myosin regulatory light chain 10 OS=Homo sapiens GN=MYL10 - [MYL10_HUMAN]	3,10	1	1	1	226	25,3	5,73
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Gapdh - [G3P_MOUSE]	12,61	12	2	2	333	35,8	8,25
P04256	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpa1 - [ROA1_RAT]	3,13	5	1	1	320	34,2	9,14
Q2KJD0	Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 - [TBB5_BOVIN]	15,54	12	4	4	444	49,6	4,89
P17182	Alpha-enolase OS=Mus musculus GN=Eno1 - [ENOA_MOUSE]	15,90	16	4	4	434	47,1	6,80
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Atp1a1 - [AT1A1_MOUSE]	9,29	7	5	6	1023	112,9	5,45
Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Mus musculus GN=Hyou1 - [HYOU1_MOUSE]	12,61	4	6	6	999	111,1	5,19
Q91YQ5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Mus musculus GN=Rpn1 - [RPN1_MOUSE]	9,38	6	3	3	608	68,5	6,46
Q8R081	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Mus musculus GN=Hnrnpl - [HNRPL_MOUSE]	13,31	2	4	4	586	63,9	8,10
B7VGF9	Alpha-S2-casein OS=Equus asinus GN=CSN1S2 - [CASA2_EQUAS]	30,51	1	6	6	236	27,7	6,23
P80314	T-complex protein 1 subunit beta OS=Mus musculus GN=Cct2 - [TCPB_MOUSE]	13,27	4	4	4	535	57,4	6,40
P08553	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus GN=Nefm - [NFM_MOUSE]	8,61	2	3	3	848	95,9	4,77
Q32L48	Histone H2B type 1-N OS=Bos taurus GN=HIST1H2BN - [H2B1N_BOVIN]	41,27	4	1	5	126	13,9	10,32

O35501	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Cricetulus griseus GN=HSPA9 - [GRP75_CRIGR]	5,89	7	4	4	679	73,7	6,16
Q9Z110	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Mus musculus GN=Aldh18a1 - [P5CS_MOUSE]	3,65	3	2	2	795	87,2	7,55
Q5NVN0	Pyruvate kinase PKM OS=Pongo abelii GN=PKM - [KPYM_PONAB]	9,60	5	1	3	531	58,0	7,88
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 - [K22E_HUMAN]	12,99	15	5	7	639	65,4	8,00
Q29482	Clusterin OS=Equus caballus GN=CLU - [CLUS_HORSE]	14,70	4	6	6	449	52,1	6,10
P16086	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 - [SPTN1_RAT]	2,39	3	4	4	2472	284,5	5,33
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO - [NONO_HUMAN]	10,40	3	3	3	471	54,2	8,95
P27425	Serotransferrin OS=Equus caballus GN=TF - [TRFE_HORSE]	7,37	9	3	4	706	78,0	7,14
P62261	14-3-3 protein epsilon OS=Bos taurus GN=YWHAE - [1433E_BOVIN]	12,55	1	2	2	255	29,2	4,74
O62695	Histone H2A.V OS=Oryctolagus cuniculus GN=H2AFV - [H2AV_RABIT]	7,03	27	1	1	128	13,5	10,58
Q64598	Histone H2A type 1-F OS=Rattus norvegicus - [H2A1F_RAT]	42,31	24	4	6	130	14,2	11,05
Q03517	Secretogranin-2 OS=Mus musculus GN=Scg2 - [SCG2_MOUSE]	15,72	5	4	4	617	70,6	4,75
P14211	Calreticulin OS=Mus musculus GN=Calr - [CALR_MOUSE]	18,99	8	4	4	416	48,0	4,49
P08003	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Mus musculus GN=Pdia4 - [PDIA4_MOUSE]	6,58	3	3	3	638	71,9	5,31
P10160	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Oryctolagus cuniculus GN=EIF5A -	14,94	2	1	1	154	16,8	5,24

	[IF5A1_RABIT]							
P47942	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dpysl2 - [DPYL2_RAT]	9,79	3	3	3	572	62,2	6,38
P01326	Insulin-2 OS=Mus musculus GN=Ins2 - [INS2_MOUSE]	30,00	1	2	2	110	12,4	5,33
A0M8V0	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Canis familiaris GN=CAPZA2 - [CAZA2_CANFA]	21,68	23	3	3	286	33,0	5,85
Q8CAQ8	Mitochondrial inner membrane protein OS=Mus musculus GN=Immt - [IMMT_MOUSE]	5,02	1	2	2	757	83,8	6,61
Q9BPU6	Dihydropyrimidinase-related protein 5 OS=Homo sapiens GN=DPYSL5 - [DPYL5_HUMAN]	1,24	1	1	1	564	61,4	7,20
Q28009	RNA-binding protein FUS OS=Bos taurus GN=FUS - [FUS_BOVIN]	9,36	3	2	2	513	52,3	9,36
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 - [LMNB1_HUMAN]	5,63	3	3	3	586	66,4	5,16
P68365	Tubulin alpha-1C chain OS=Cricetulus griseus GN=TUBA1C - [TBA1C_CRIGR]	16,93	18	4	4	449	49,9	5,10
P86244	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=PRKAR1A - [KAP0_MESAU]	10,78	6	1	1	167	18,8	4,56
Q80X90	Filamin-B OS=Mus musculus GN=Flnb - [FLNB_MOUSE]	3,19	2	4	4	2602	277,7	5,71
P09405	Nucleolin OS=Mus musculus GN=Ncl - [NUCL_MOUSE]	4,81	6	2	2	707	76,7	4,75
Q8VII6	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Mus musculus GN=Sfpq - [SFPQ_MOUSE]	6,87	2	3	3	699	75,4	9,44
P86223	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragments)	18,85	3	1	1	122	13,4	8,27

	OS=Mesocricetus auratus GN=VDAC2 - [VDAC2_MESAU]							
Q9D1J3	SAP domain-containing ribonucleoprotein OS=Mus musculus GN=Sarnp - [SARNP_MOUSE]	20,48	1	1	1	210	23,5	6,65
P18760	Cofilin-1 OS=Mus musculus GN=Cfl1 - [COF1_MOUSE]	25,30	4	2	2	166	18,5	8,09
P97310	DNA replication licensing factor MCM2 OS=Mus musculus GN=Mcm2 - [MCM2_MOUSE]	5,42	2	3	3	904	102,0	5,72
P19096	Fatty acid synthase OS=Mus musculus GN=Fasn - [FAS_MOUSE]	2,28	3	3	3	2504	272,3	6,58
P27773	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Mus musculus GN=Pdia3 - [PDIA3_MOUSE]	13,66	6	5	5	505	56,6	6,21
P06906	Myelin basic protein OS=Pan troglodytes GN=MBP - [MBP_PANTR]	12,87	8	2	2	171	18,5	11,37
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 - [K1C9_HUMAN]	17,98	18	5	6	623	62,0	5,24
P79385	Lactadherin OS=Sus scrofa GN=MFGE8 - [MFGM_PIG]	6,11	1	2	2	409	45,7	6,58
Q61033	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta OS=Mus musculus GN=Tmpo - [LAP2A_MOUSE]	6,20	2	2	2	693	75,1	8,05
P80315	T-complex protein 1 subunit delta OS=Mus musculus GN=Cct4 - [TCPD_MOUSE]	14,84	5	3	3	539	58,0	8,02
Q91V92	ATP-citrate synthase OS=Mus musculus GN=Acly - [ACLY_MOUSE]	6,51	5	4	4	1091	119,7	7,44
P29361	14-3-3 protein zeta/delta OS=Ovis aries GN=YWHAZ - [1433Z_SHEEP]	15,10	3	2	2	245	27,8	4,84
Q3UTJ2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Sorbs2 - [SRBS2_MOUSE]	3,47	3	2	2	1180	132,3	8,53

P22492	Histone H1t OS=Homo sapiens GN=HIST1H1T - [H1T_HUMAN]	5,31	17	1	1	207	22,0	11,71
Q29380	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Sus scrofa GN=VDAC3 - [VDAC3_PIG]	8,13	6	1	1	283	30,6	8,66
P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Homo sapiens GN=ATP1A3 - [AT1A3_HUMAN]	5,92	7	2	3	1013	111,7	5,38
Q6DFW4	Nucleolar protein 58 OS=Mus musculus GN=Nop58 - [NOP58_MOUSE]	11,94	1	3	3	536	60,3	8,34
P37040	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Mus musculus GN=Por - [NCPR_MOUSE]	5,90	2	2	2	678	77,0	5,53
Q2UVX4	Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 - [CO3_BOVIN]	2,35	3	2	3	1661	187,1	6,84
O75533	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens GN=SF3B1 - [SF3B1_HUMAN]	2,22	2	2	2	1304	145,7	7,09
P14873	Microtubule-associated protein 1B OS=Mus musculus GN=Map1b - [MAP1B_MOUSE]	2,80	1	3	3	2464	270,1	4,83
P24406	Transforming protein RhoA OS=Canis familiaris GN=RHOA - [RHOA_CANFA]	12,44	3	1	1	193	21,7	6,58
A2Q0Z0	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Equus caballus GN=EEF1A1 - [EF1A1_HORSE]	5,19	4	1	1	462	50,1	9,01
O35587	Transmembrane protein Tmp21 OS=Mesocricetus auratus GN=TMED10 - [TMEDA_MESAU]	9,59	5	1	1	219	24,8	6,68
O08623	Sequestosome-1 OS=Rattus norvegicus GN=Sqstm1 - [SQSTM_RAT]	5,24	4	1	1	439	47,7	5,17
P05197	Elongation factor 2 OS=Rattus norvegicus GN=Eef2 - [EF2_RAT]	6,53	6	3	3	858	95,2	6,83
O35286	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Mus musculus GN=Dhx15 - [DHX15_MOUSE]	5,03	3	2	2	795	90,9	7,46

Q2NKZ1	T-complex protein 1 subunit eta OS=Bos taurus GN=CCT7 - [TCPH_BOVIN]	6,45	4	2	2	543	59,4	7,20
B2GV06	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Oxct1 - [SCOT1_RAT]	6,73	3	2	2	520	56,2	8,47
Q63081	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 - [PDIA6_RAT]	12,50	4	3	3	440	48,1	5,14
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1 OS=Mus musculus GN=Cltc - [CLH1_MOUSE]	3,22	4	3	3	1675	191,4	5,69
P05765	40S ribosomal protein S21 OS=Rattus norvegicus GN=Rps21 - [RS21_RAT]	16,87	2	1	1	83	9,1	8,51
O19049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Oryctolagus cuniculus GN=HNRNPK - [HNRNPK_RABIT]	9,50	4	3	3	463	50,9	5,54
Q8K4Z5	Splicing factor 3A subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sf3a1 - [SF3A1_MOUSE]	5,56	3	2	2	791	88,5	5,22
Q9WV92	Band 4.1-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Epb41l3 - [E41L3_MOUSE]	10,12	2	4	4	929	103,3	5,31
Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrc1 - [QCR1_MOUSE]	7,29	3	2	2	480	52,8	6,21
P68254	14-3-3 protein theta OS=Mus musculus GN=Ywhaq - [1433T_MOUSE]	7,76	1	2	2	245	27,8	4,78
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus GN=Aldoa - [ALDOA_MOUSE]	14,29	3	2	2	364	39,3	8,09
Q61545	RNA-binding protein EWS OS=Mus musculus GN=Ewsr1 - [EWS_MOUSE]	3,66	2	1	1	655	68,4	9,33
Q08E38	Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Bos taurus GN=PRPF19 - [PRP19_BOVIN]	9,13	3	2	2	504	55,2	6,61
P38650	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dync1h1 - [DYHC1_RAT]	0,84	3	2	2	4644	531,9	6,46

P17918	Proliferating cell nuclear antigen OS=Mus musculus GN=Pcna - [PCNA_MOUSE]	19,92	3	2	2	261	28,8	4,77
Q28141	ATP-dependent RNA helicase A OS=Bos taurus GN=DHX9 - [DHX9_BOVIN]	4,20	3	1	2	1287	141,9	6,89
B3EWD5	Hemoglobin subunit alpha OS=Peromyscus californicus - [HBA_PERCA]	11,35	7	1	1	141	14,9	8,09
Q865C5	Ubiquitin OS=Camelus dromedarius - [UBIQ_CAMDR]	32,89	18	2	2	76	8,6	7,25
A4IF87	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase OS=Bos taurus GN=GNPAT - [GNPAT_BOVIN]	3,68	1	1	1	680	77,6	7,53
P46060	Ran GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RANGAP1 - [RAGP1_HUMAN]	4,09	1	1	1	587	63,5	4,68
P83917	Chromobox protein homolog 1 OS=Mus musculus GN=Cbx1 - [CBX1_MOUSE]	9,19	1	1	1	185	21,4	4,93
P49717	DNA replication licensing factor MCM4 OS=Mus musculus GN=Mcm4 - [MCM4_MOUSE]	3,13	1	1	1	862	96,7	7,20
Q9GL01	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Sus scrofa GN=RPN2 - [RPN2_PIG]	3,82	6	1	1	629	69,2	5,95
O77768	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C OS=Oryctolagus cuniculus GN=HNRNPC - [HNRPC_RABIT]	15,36	3	2	2	306	33,7	5,08
P09582	Arginine esterase OS=Canis familiaris - [ESTA_CANFA]	6,54	1	1	1	260	28,7	7,78
P70699	Lysosomal alpha-glucosidase OS=Mus musculus GN=Gaa - [LYAG_MOUSE]	2,52	2	1	1	953	106,2	5,83
Q8BHN3	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Mus musculus GN=Ganab - [GANAB_MOUSE]	3,28	1	2	2	944	106,8	6,06

Q6P5E4	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Uggt1 - [UGGG1_MOUSE]	2,84	1	2	2	1551	176,3	5,62
Q8BP92	Reticulocalbin-2 OS=Mus musculus GN=Rcn2 - [RCN2_MOUSE]	10,63	2	2	2	320	37,2	4,42
Q4R8C3	Outer dense fiber protein 2 OS=Macaca fascicularis GN=ODF2 - [ODFP2_MACFA]	3,13	1	1	1	638	73,3	7,62
O35658	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=C1qbp - [C1QBP_MOUSE]	10,07	2	2	2	278	31,0	4,92
Q14765	Signal transducer and activator of transcription 4 OS=Homo sapiens GN=STAT4 - [STAT4_HUMAN]	3,61	1	1	1	748	85,9	6,65
Q3UDR8	Protein YIPF3 OS=Mus musculus GN=Yipf3 - [YIPF3_MOUSE]	6,92	2	1	1	347	38,0	5,94
Q9WV02	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Mus musculus GN=Rbmx - [RBMX_MOUSE]	8,18	5	1	2	391	42,3	10,05
O60522	Tudor domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=TDRD6 - [TDRD6_HUMAN]	1,38	1	1	1	2096	236,4	5,25
A6H769	40S ribosomal protein S7 OS=Bos taurus GN=RPS7 - [RS7_BOVIN]	21,13	1	2	2	194	22,1	10,10
P86204	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=HSPA2 - [HSP72_MESAU]	8,85	10	1	1	192	21,3	5,72
D4AE41	RNA binding motif protein, X-linked-like-1 OS=Rattus norvegicus GN=Rbmxl1 - [RML1_RAT]	8,25	7	1	2	388	42,2	9,83
Q8K009	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Aldh1l2 - [AL1L2_MOUSE]	5,74	1	2	2	923	101,5	6,29
Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus	16,24	4	2	2	314	34,4	8,65

	GN=Hadh - [HCDH_MOUSE]							
P17077	60S ribosomal protein L9 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl9 - [RL9_RAT]	14,06	5	1	1	192	21,9	9,95
Q3UP24	NLR family CARD domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Nlrc4 - [NLRC4_MOUSE]	2,64	1	1	1	1024	116,7	6,19
P18085	ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens GN=ARF4 - [ARF4_HUMAN]	11,67	7	1	1	180	20,5	7,14
Q61881	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Mus musculus GN=Mcm7 - [MCM7_MOUSE]	2,09	1	1	1	719	81,2	6,37
Q3ZC10	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Bos taurus GN=SNRPD1 - [SMD1_BOVIN]	17,65	1	1	1	119	13,3	11,56
P15129	Cytochrome P450 4B1 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp4b1 - [CP4B1_RAT]	2,74	1	1	1	511	58,9	8,65
Q62465	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Mus musculus GN=Vat1 - [VAT1_MOUSE]	10,10	3	2	2	406	43,1	6,37
Q5E9D3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial OS=Bos taurus GN=CHCHD3 - [CHCH3_BOVIN]	7,05	3	2	2	227	26,1	8,34
O88544	COP9 signalosome complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Cops4 - [CSN4_MOUSE]	4,43	5	1	1	406	46,3	5,83
P86203	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=NDUFS1 - [NDUS1_MESAU]	10,53	10	1	1	190	20,7	5,26
Q3T0D8	Ragulator complex protein LAMTOR1 OS=Bos taurus GN=LAMTOR1 - [LTOR1_BOVIN]	14,91	4	1	1	161	17,7	5,15
P34955	Alpha-1-antitrypsin OS=Bos taurus GN=SERPINA1 - [A1AT_BOVIN]	5,05	2	2	2	416	46,1	6,52

P11983	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Mus musculus GN=Tcp1 - [TCPA_MOUSE]	6,29	7	2	2	556	60,4	6,16
P46660	Alpha-internexin OS=Mus musculus GN=Ina - [AINX_MOUSE]	3,99	2	1	1	501	55,3	5,40
Q58Y74	Taste receptor cell protein 1 OS=Mus musculus GN=Trcg1 - [TRCG1_MOUSE]	5,70	1	1	1	825	88,9	7,33
P10536	Ras-related protein Rab-1B OS=Rattus norvegicus GN=Rab1b - [RAB1B_RAT]	9,45	8	1	1	201	22,1	5,73
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Pebp1 - [PEBP1_MOUSE]	20,86	1	2	2	187	20,8	5,40
Q9CPQ3	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Mus musculus GN=Tomm22 - [TOM22_MOUSE]	17,61	1	1	1	142	15,5	4,34
Q29RZ0	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ACAT1 - [THIL_BOVIN]	3,55	3	1	1	422	44,9	8,85
Q4G078	mTERF domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Mterfd2 - [MTER2_RAT]	4,61	1	1	1	347	40,4	6,61
P21619	Lamin-B2 OS=Mus musculus GN=Lmnb2 - [LMNB2_MOUSE]	3,86	1	1	1	596	67,3	5,50
Q99020	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Mus musculus GN=Hnrnpab - [ROAA_MOUSE]	6,67	1	1	1	285	30,8	7,91
Q99ME9	Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Gtpbp4 - [NOG1_MOUSE]	3,00	1	1	1	634	74,1	9,52
B4USV4	Cytochrome c OS=Otolemur garnettii GN=CYCS - [CYC_OTOGA]	17,14	6	2	2	105	11,7	9,50
P22985	Xanthine dehydrogenase/oxidase OS=Rattus norvegicus GN=Xdh - [XDH_RAT]	0,98	5	1	1	1331	146,1	7,25
Q9R0P3	S-formylglutathione hydrolase OS=Mus musculus GN=Esd - [ESTD_MOUSE]	7,80	1	1	1	282	31,3	7,12

P82187	Kappa-casein OS=Equus caballus GN=CSN3 - [CASK_HORSE]	7,03	1	1	1	185	21,0	8,41
Q62724	DNA replication licensing factor MCM6 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Mcm6 - [MCM6_RAT]	3,55	4	1	1	507	57,3	5,11
Q17QC0	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Bos taurus GN=PGRMC1 - [PGRC1_BOVIN]	15,98	2	1	1	194	21,6	4,74
P08239	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha OS=Bos taurus GN=GNAO1 - [GNAO_BOVIN]	3,39	18	1	1	354	40,0	5,53
Q9EQJ0	Two pore calcium channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Tpcn1 - [TPC1_MOUSE]	2,94	1	1	1	817	94,4	8,53
Q9CR61	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Ndufb7 - [NDUB7_MOUSE]	13,87	1	1	1	137	16,3	8,18
Q9DB34	Charged multivesicular body protein 2a OS=Mus musculus GN=Chmp2a - [CHM2A_MOUSE]	8,56	1	1	1	222	25,1	5,97
P62157	Calmodulin OS=Bos taurus GN=CALM - [CALM_BOVIN]	14,77	1	1	1	149	16,8	4,22
O14981	TATA-binding protein-associated factor 172 OS=Homo sapiens GN=BTAF1 - [BTAF1_HUMAN]	1,19	1	1	1	1849	206,8	6,52
Q8BI84	Melanoma inhibitory activity protein 3 OS=Mus musculus GN=Mia3 - [MIA3_MOUSE]	2,02	1	2	2	1930	213,5	4,75
Q5R947	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4 OS=Pongo abelii GN=IMP4 - [IMP4_PONAB]	9,62	3	1	1	291	33,7	9,47
P17980	26S protease regulatory subunit 6A OS=Homo sapiens GN=PSMC3 - [PRS6A_HUMAN]	4,56	3	1	1	439	49,2	5,24

P82808	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gfpt1 - [GFPT1_RAT]	2,79	3	1	1	681	76,8	6,84
P04166	Cytochrome b5 type B OS=Rattus norvegicus GN=Cyb5b - [CYB5B_RAT]	23,29	2	1	1	146	16,3	5,06
Q9Z2G6	Protein sel-1 homolog 1 OS=Mus musculus GN=Sel1l - [SE1L1_MOUSE]	2,53	4	1	1	790	88,3	5,57
Q86UU0	B-cell CLL/lymphoma 9-like protein OS=Homo sapiens GN=BCL9L - [BCL9L_HUMAN]	3,00	1	1	1	1499	157,0	8,63
P24050	40S ribosomal protein S5 OS=Rattus norvegicus GN=Rps5 - [RS5_RAT]	9,80	3	1	1	204	22,9	9,64
P17225	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Ptbp1 - [PTBP1_MOUSE]	7,40	5	1	1	527	56,4	8,34
Q8CCK0	Core histone macro-H2A.2 OS=Mus musculus GN=H2afy2 - [H2AW_MOUSE]	5,38	1	1	1	372	40,1	9,69
Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cs - [CISY_MOUSE]	4,96	1	1	1	464	51,7	8,57
P15864	Histone H1.2 OS=Mus musculus GN=Hist1h1c - [H12_MOUSE]	10,85	17	2	2	212	21,3	11,00
P40142	Transketolase OS=Mus musculus GN=Tkt - [TKT_MOUSE]	3,53	2	1	1	623	67,6	7,50
Q5E9B5	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Bos taurus GN=ACTG2 - [ACTH_BOVIN]	8,51	9	1	2	376	41,8	5,48
Q07797	Galectin-3-binding protein OS=Mus musculus GN=Lgals3bp - [LG3BP_MOUSE]	3,12	1	1	1	577	64,4	5,14
Q3ZC13	AP-2 complex subunit mu OS=Bos taurus GN=AP2M1 - [AP2M1_BOVIN]	3,91	2	1	1	435	49,6	9,54
Q9DC69	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufa9 - [NDUA9_MOUSE]	7,16	1	1	1	377	42,5	9,74
Q3SZ43	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 OS=Bos taurus GN=UBE2V2 - [UB2V2_BOVIN]	14,48	6	1	1	145	16,4	8,09

P63028	Translationally-controlled tumor protein OS=Mus musculus GN=Tpt1 - [TCTP_MOUSE]	27,33	1	1	1	172	19,4	4,86
P43274	Histone H1.4 OS=Mus musculus GN=Hist1h1e - [H14_MOUSE]	10,50	8	1	2	219	22,0	11,11
Q60854	Serpin B6 OS=Mus musculus GN=Serpib6 - [SPB6_MOUSE]	6,08	1	1	1	378	42,6	5,74
O00410	Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 - [IPO5_HUMAN]	2,46	2	1	1	1097	123,5	4,94
Q9DCX2	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5h - [ATP5H_MOUSE]	21,74	1	2	2	161	18,7	5,69
P43406	Integrin alpha-V OS=Mus musculus GN=Itgav - [ITAV_MOUSE]	2,59	3	2	2	1044	115,3	5,63
P38029	Alpha-1-antiproteinase 2 OS=Equus caballus - [A1AT2_HORSE]	4,75	1	1	1	421	46,9	5,47
P08955	CAD protein OS=Mesocricetus auratus GN=CAD - [PYR1_MESAU]	1,12	2	1	1	2225	243,0	6,46
P29758	Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Oat - [OAT_MOUSE]	12,98	1	2	2	439	48,3	6,62
Q9D666	SUN domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Sun1 - [SUN1_MOUSE]	2,52	1	1	1	913	101,9	6,81
Q09YI1	Cortactin-binding protein 2 OS=Ovis aries GN=CTTNBP2 - [CTTB2_SHEEP]	1,16	6	1	1	1641	178,1	7,65
O97593	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Bos taurus GN=SMC1A - [SMC1A_BOVIN]	2,35	4	2	2	1233	143,2	7,64

O95716	Ras-related protein Rab-3D OS=Homo sapiens GN=RAB3D - [RAB3D_HUMAN]	8,68	6	1	1	219	24,3	4,93
Q91ZW3	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Mus musculus GN=Smarca5 - [SMCA5_MOUSE]	2,00	2	1	1	1051	121,6	8,15
Q9D855	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 OS=Mus musculus GN=Uqcrb - [QCR7_MOUSE]	13,51	1	1	1	111	13,5	9,11
Q8BMK4	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Mus musculus GN=Ckap4 - [CKAP4_MOUSE]	2,96	1	1	1	575	63,7	5,64
P57759	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Mus musculus GN=Erp29 - [ERP29_MOUSE]	12,21	1	1	1	262	28,8	6,15
Q62826	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Rattus norvegicus GN=Hnrnpm - [HNRPM_RAT]	2,17	2	1	1	690	73,7	8,75
P55735	Protein SEC13 homolog OS=Homo sapiens GN=SEC13 - [SEC13_HUMAN]	6,52	4	1	1	322	35,5	5,48
P62960	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Ybx1 - [YBOX1_MOUSE]	11,18	8	2	2	322	35,7	9,88
Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13 OS=Mus musculus GN=Acot13 - [ACO13_MOUSE]	12,86	2	1	1	140	15,2	8,82
Q3MIC0	60S ribosomal protein L37a OS=Bos taurus GN=RPL37A - [RL37A_BOVIN]	19,57	1	1	1	92	10,3	10,43
Q64152	Transcription factor BTF3 OS=Mus musculus GN=Btf3 - [BTF3_MOUSE]	9,31	2	1	1	204	22,0	9,52
P48678	Prelamin-A/C OS=Mus musculus GN=Lmna - [LMNA_MOUSE]	3,91	1	1	1	665	74,2	6,98
P67778	Prohibitin OS=Mus musculus GN=Phb - [PHB_MOUSE]	7,35	2	1	1	272	29,8	5,76
P15087	Carboxypeptidase E OS=Rattus norvegicus GN=Cpe - [CBPE_RAT]	4,41	2	1	1	476	53,3	5,19
Q2TBS9	WD40 repeat-containing protein SMU1 OS=Bos taurus GN=SMU1 - [SMU1_BOVIN]	5,46	2	1	1	513	57,5	7,18

Q5EA36	RNA-binding protein 14 OS=Bos taurus GN=RBM14 - [RBM14_BOVIN]	3,59	4	1	1	669	69,6	9,67
Q8VEK3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Mus musculus GN=Hnrnpu - [HNRPU_MOUSE]	1,88	2	1	1	800	87,9	6,24
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=PRPF8 - [PRP8_HUMAN]	0,90	2	1	1	2335	273,4	8,84
P54275	DNA mismatch repair protein Msh2 OS=Rattus norvegicus GN=Msh2 - [MSH2_RAT]	1,61	1	1	1	933	104,0	6,07
P61246	40S ribosomal protein S3a (Fragment) OS=Felis catus GN=RPS3A - [RS3A_FELCA]	6,54	4	1	1	260	29,6	9,73
P81125	Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Bos taurus GN=NAPA - [SNAA_BOVIN]	6,10	2	1	1	295	33,2	5,57
Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 - [RL6_HUMAN]	6,94	3	1	1	288	32,7	10,58
Q3ZBU7	Tubulin beta-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBB4A - [TBB4A_BOVIN]	11,49	20	4	4	444	49,6	4,88
P03974	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Sus scrofa GN=VCP PE=1 SV=5- [TERA_PIG]	2,48	4	1	1	806	89,2	5,26
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein OS=Homo sapiens - [RP1BL_HUMAN]	6,52	4	1	1	184	20,9	5,48
P03975	IgE-binding protein OS=Mus musculus GN=lap - [IGEB_MOUSE]	3,95	1	1	1	557	62,7	9,31
Q4PZA2	Endothelin-converting enzyme 1 OS=Mus musculus GN=Ece1 - [ECE1_MOUSE]	3,51	1	1	1	769	87,0	5,91
Q3ZBT6	Transformer-2 protein homolog beta OS=Bos taurus GN=TRA2B - [TRA2B_BOVIN]	5,56	1	1	1	288	33,6	11,25
A6QPY0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Bos taurus GN=DDOST - [OST48_BOVIN]	3,42	6	1	1	439	48,8	5,83
Q9DCM0	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ethe1 -	6,69	1	1	1	254	27,7	7,23

	[ETHE1_MOUSE]							
Q9ULV4	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=CORO1C - [COR1C_HUMAN]	6,12	2	1	1	474	53,2	7,08
P00506	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Sus scrofa GN=GOT2 - [AATM_PIG]	3,49	3	1	1	430	47,4	9,01
P31245	Homeobox protein Hox-A2 OS=Mus musculus GN=Hoxa2 - [HXA2_MOUSE]	7,26	1	1	1	372	40,8	5,81
F6Y5S8	Inositol monophosphatase 3 OS=Callithrix jacchus GN=IMPAD1 - [IMPA3_CALJA]	10,06	4	1	1	358	38,5	6,70
Q99MD9	Nuclear autoantigenic sperm protein OS=Mus musculus GN=Nasp - [NASP_MOUSE]	3,88	1	1	1	773	83,9	4,37
Q62511	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91 OS=Mus musculus GN=Zfp91 - [ZFP91_MOUSE]	4,90	1	1	1	572	63,3	7,49
A4FUD9	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Bos taurus GN=MCM3 - [MCM3_BOVIN]	4,95	4	2	2	808	90,8	5,76
A1A4J1	6-phosphofructokinase, liver type OS=Bos taurus GN=PFKL - [K6PL_BOVIN]	2,44	10	1	1	780	85,2	7,36
Q5R614	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Pongo abelii GN=LARS - [SYLC_PONAB]	2,21	3	1	1	1176	134,5	7,40
Q2KI42	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Bos taurus GN=PSMD11 - [PSD11_BOVIN]	4,27	2	1	1	422	47,4	6,48
P25708	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFV1 - [NDUV1_BOVIN]	3,23	7	1	1	464	50,6	8,07
Q7Z4I7	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 2 OS=Homo sapiens GN=LIMS2 - [LIMS2_HUMAN]	2,05	1	1	1	341	38,9	8,05
Q9DCS3	Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mecr - [MECR_MOUSE]	4,02	1	1	1	373	40,3	9,07

Q3T030	26S protease regulatory subunit 6B OS=Bos taurus GN=PSMC4 - [PRS6B_BOVIN]	4,31	2	1	1	418	47,3	5,21
P35278	Ras-related protein Rab-5C OS=Mus musculus GN=Rab5c - [RAB5C_MOUSE]	11,11	3	1	1	216	23,4	8,41
P26638	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Sars - [SYSC_MOUSE]	5,47	1	1	1	512	58,4	6,30
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OGDH - [ODO1_HUMAN]	3,03	6	1	1	1023	115,9	6,86
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Pc - [PYC_RAT]	2,97	4	2	2	1178	129,7	6,81
O15155	BET1 homolog OS=Homo sapiens GN=BET1 - [BET1_HUMAN]	15,25	3	1	1	118	13,3	9,06
P02584	Profilin-1 OS=Bos taurus GN=PFN1 - [PROF1_BOVIN]	10,00	2	1	1	140	15,0	8,28
P01777	Ig heavy chain V-III region TEI OS=Homo sapiens - [HV316_HUMAN]	15,97	2	1	1	119	12,8	8,50
Q5SUR0	Phosphoribosylformylglycinamide synthase OS=Mus musculus GN=Pfas - [PUR4_MOUSE]	2,09	2	1	1	1337	144,5	5,67
P63209	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Cavia porcellus GN=SKP1 - [SKP1_CAVPO]	10,43	2	1	1	163	18,6	4,54
Q9Z1Z0	General vesicular transport factor p115 OS=Mus musculus GN=Uso1 - [USO1_MOUSE]	2,19	1	1	1	959	106,9	4,93
Q5R7X2	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein OS=Pongo abelii GN=U2SURP - [SR140_PONAB]	1,75	3	1	1	1028	118,2	8,31
P16332	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Mut - [MUTA_MOUSE]	3,21	4	1	1	748	82,8	6,89
Q62415	Apoptosis-stimulating of p53 protein 1 OS=Mus musculus GN=Ppp1r13b - [ASPP1_MOUSE]	3,50	1	1	1	1087	119,1	6,68

O89090	Transcription factor Sp1 OS=Mus musculus GN=Sp1 - [SP1_MOUSE]	3,57	2	1	1	784	80,7	7,34
Q9Z1X4	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Mus musculus GN=Ilf3 - [ILF3_MOUSE]	3,45	1	1	1	898	96,0	8,76
P35980	60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN=Rpl18 - [RL18_MOUSE]	6,91	1	1	1	188	21,6	11,78
P63243	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Bos taurus GN=GNB2L1 - [GBLP_BOVIN]	3,79	1	1	1	317	35,1	7,69
P86234	Tubulin alpha-3 chain (Fragments) OS=Mesocricetus auratus - [TBA3_MESAU]	9,18	16	1	1	196	22,0	5,57
P35293	Ras-related protein Rab-18 OS=Mus musculus GN=Rab18 - [RAB18_MOUSE]	9,22	4	1	1	206	23,0	5,36
P19943	60S acidic ribosomal protein P2 (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=RPLP2 - [RLA2_RABIT]	36,36	4	1	1	44	4,7	6,60
Q58D79	Rab effector Noc2 OS=Bos taurus GN=RPH3AL - [RPH3L_BOVIN]	6,51	1	1	1	292	32,0	8,88
Q9H254	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4 OS=Homo sapiens GN=SPTBN4 - [SPTN4_HUMAN]	1,17	1	1	1	2564	288, 8	6,01
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5c1 - [ATPG_RAT]	4,40	2	1	1	273	30,2	8,84
Q8BHD7	Polypyrimidine tract-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Ptbp3 - [PTBP3_MOUSE]	4,59	2	1	1	523	56,7	9,13
P86216	Triosephosphate isomerase (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=TPI1 - [TPIS_MESAU]	15,43	11	1	1	188	20,3	5,64
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Bos taurus GN=AHSG - [FETUA_BOVIN]	5,85	1	1	1	359	38,4	5,50
P35564	Calnexin OS=Mus musculus GN=Canx - [CALX_MOUSE]	2,71	5	1	1	591	67,2	4,64

P81117	Nucleobindin-2 OS=Mus musculus GN=Nucb2 - [NUCB2_MOUSE]	5,00	1	1	1	420	50,3	5,15
Q2VPQ9	Chromatin modification-related protein MEAF6 OS=Mus musculus GN=Meaf6 - [EAF6_MOUSE]	11,52	3	1	1	191	21,6	9,32
P14519	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Oryctolagus cuniculus GN=SHMT2 - [GLYM_RABIT]	3,17	2	1	1	504	55,9	8,53
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Sdha - [DHSA_RAT]	5,18	4	1	1	656	71,6	7,17
Q9Y3B3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7 OS=Homo sapiens GN=TMED7 - [TMED7_HUMAN]	8,93	2	1	1	224	25,2	6,89
Q9JKX6	ADP-sugar pyrophosphatase OS=Mus musculus GN=Nudt5 - [NUDT5_MOUSE]	6,88	1	1	1	218	24,0	5,48
Q91YW3	DnaJ homolog subfamily C member 3 OS=Mus musculus GN=Dnajc3 - [DNJC3_MOUSE]	4,17	1	1	1	504	57,4	5,85
Q8VE37	Regulator of chromosome condensation OS=Mus musculus GN=Rcc1 - [RCC1_MOUSE]	6,89	1	1	1	421	44,9	8,10
Q9CR68	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Uqcrfs1 - [UCRI_MOUSE]	8,76	1	1	1	274	29,3	8,70
Q9CPT4	UPF0556 protein C19orf10 homolog OS=Mus musculus GN=D17Wsu104e - [CS010_MOUSE]	7,23	2	1	1	166	18,0	6,79
P00366	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Bos taurus GN=GLUD1 - [DHE3_BOVIN]	6,63	1	1	1	558	61,5	7,59
Q68FX7	THO complex subunit 5 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Thoc5 - [THOC5_RAT]	2,05	3	1	1	682	78,6	7,15

B0CM99	High mobility group protein B1 OS=Callithrix jacchus GN=HMGB1 - [HMGB1_CALJA]	6,51	4	1	1	215	24,9	5,74
P45973	Chromobox protein homolog 5 OS=Homo sapiens GN=CBX5 - [CBX5_HUMAN]	6,81	2	1	1	191	22,2	5,86
Q8R0F8	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Fahd1 - [FAHD1_MOUSE]	9,69	1	1	1	227	25,2	7,69
P23198	Chromobox protein homolog 3 OS=Mus musculus GN=Cbx3 - [CBX3_MOUSE]	7,10	2	1	1	183	20,8	5,22
Q4VBD2	Transmembrane anterior posterior transformation protein 1 OS=Mus musculus GN=Tapt1 - [TAPT1_MOUSE]	4,43	1	1	1	564	63,9	8,22
O14602	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal OS=Homo sapiens GN=EIF1AY - [IF1AY_HUMAN]	11,11	5	1	1	144	16,4	5,24
Q99LM2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 OS=Mus musculus GN=Cdk5rap3 - [CK5P3_MOUSE]	6,76	1	1	1	503	57,0	4,83
Q91XV3	Brain acid soluble protein 1 OS=Mus musculus GN=Basp1 - [BASP1_MOUSE]	13,72	1	1	1	226	22,1	4,51
Q5XJV6	Serine/threonine-protein kinase LMTK3 OS=Mus musculus GN=Lmtk3 - [LMTK3_MOUSE]	1,12	1	1	1	1424	150,8	4,88
Q9DCN2	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Mus musculus GN=Cyb5r3 - [NB5R3_MOUSE]	10,30	1	1	1	301	34,1	8,38
A6YRY8	40S ribosomal protein SA OS=Ovis aries GN=RPSA - [RSSA_SHEEP]	7,80	8	1	1	295	32,9	4,93
Q96ST8	Centrosomal protein of 89 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP89 - [CEP89_HUMAN]	1,40	1	1	1	783	89,5	6,80
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPH3 - [HNRH3_HUMAN]	6,07	1	1	1	346	36,9	6,87

Q562R1	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 - [ACTBL_HUMAN]	9,04	7	1	2	376	42,0	5,59
P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 - [RLA0_HUMAN]	4,10	6	1	1	317	34,3	5,97
P20004	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ACO2 - [ACON_BOVIN]	2,05	4	1	1	780	85,3	7,83
P02722	ADP/ATP translocase 1 OS=Bos taurus GN=SLC25A4 - [ADT1_BOVIN]	4,36	7	1	1	298	32,9	9,83
P36536	GTP-binding protein SAR1a OS=Mus musculus GN=Sar1a - [SAR1A_MOUSE]	11,62	3	1	1	198	22,4	6,93
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hspe1 - [CH10_RAT]	13,73	2	1	1	102	10,9	8,92
Q95M12	Legumain OS=Bos taurus GN=LGMN - [LGMN_BOVIN]	2,54	1	1	1	433	49,3	6,60
Q75Q40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Tomm40 - [TOM40_RAT]	4,43	2	1	1	361	37,9	8,35
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 - [ROA3_HUMAN]	4,23	2	1	1	378	39,6	9,01
Q9WTQ5	A-kinase anchor protein 12 OS=Mus musculus GN=Akap12 - [AKA12_MOUSE]	1,66	1	1	1	1684	180,6	4,44
O88342	WD repeat-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Wdr1 - [WDR1_MOUSE]	2,64	3	1	1	606	66,4	6,60
O62829	Protein phosphatase 1A OS=Bos taurus GN=PPM1A - [PPM1A_BOVIN]	3,14	1	1	1	382	42,5	5,25
Q6V1P9	Protocadherin-23 OS=Homo sapiens GN=DCHS2 - [PCD23_HUMAN]	0,79	1	1	1	2916	322,0	4,77
Q6QAT4	Beta-2-microglobulin OS=Ovis aries GN=B2M - [B2MG_SHEEP]	7,63	1	1	1	118	13,5	6,52
Q6A0A9	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Mus musculus	1,35	3	1	1	1112	121,	8,92

	GN=FAM120A - [F120A_MOUSE]						6	
Q02375	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFS4 - [NDUS4_BOVIN]	14,29	2	1	1	175	19,8	10,14
P29562	Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment) OS=Orctolagus cuniculus GN=EIF4A1 - [IF4A1_RABIT]	3,52	4	1	1	398	45,3	5,48
Q2TBX5	Translocon-associated protein subunit delta OS=Bos taurus GN=SSR4 - [SSRD_BOVIN]	7,56	3	1	1	172	18,8	5,78
P63325	40S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus GN=Rps10 - [RS10_MOUSE]	9,09	3	1	1	165	18,9	10,15
Q63755	PR domain zinc finger protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Prdm2 - [PRDM2_RAT]	0,64	2	1	1	1706	187,4	7,84
P19007	Haptoglobin OS=Orctolagus cuniculus GN=HP - [HPT_RABIT]	4,90	16	1	2	347	38,8	6,13
P18708	Vesicle-fusing ATPase OS=Cricetulus griseus GN=NSF - [NSF_CRIGR]	1,61	5	1	1	744	82,5	6,95
O62839	Catalase OS=Sus scrofa GN=CAT - [CATA_PIG]	5,31	1	1	1	527	59,8	6,80
A6QLP7	Translocon-associated protein subunit alpha OS=Bos taurus GN=SSR1 - [SSRA_BOVIN]	5,24	7	1	1	286	32,0	4,45
P02088	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Hbb-b1 - [HBB1_MOUSE]	12,93	1	1	1	147	15,8	7,65
P43275	Histone H1.1 OS=Mus musculus GN=Hist1h1a - [H11_MOUSE]	5,16	2	1	1	213	21,8	10,93
Q9R1K9	Centrin-2 OS=Mus musculus GN=Cetn2 - [CETN2_MOUSE]	9,88	1	1	1	172	19,8	5,00
P19139	Casein kinase II subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Csnk2a1 - [CSK21_RAT]	5,37	4	1	1	391	45,0	7,74
Q66X93	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus	1,21	5	1	1	909	101,	7,18

	GN=Snd1 - [SND1_RAT]						9	
Q5SRX1	TOM1-like protein 2 OS=Mus musculus GN=Tom1l2 - [TM1L2_MOUSE]	4,54	2	1	1	507	55,6	4,82
P49020	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 (Fragment) OS=Cricetulus griseus GN=TMED2 - [TMED2_CRIGR]	6,12	4	1	1	196	22,2	5,17
Q9Y581	Insulin-like peptide INSL6 OS=Homo sapiens GN=INSL6 - [INSL6_HUMAN]	12,68	1	1	1	213	24,8	9,67
P10960	Sulfated glycoprotein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Psap - [SAP_RAT]	2,71	2	1	1	554	61,1	5,25
Q9XSB8	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Canis familiaris GN=TPP1 - [TPP1_CANFA]	1,60	1	1	1	563	61,3	7,06
P00346	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Sus scrofa GN=MDH2 - [MDHM_PIG]	2,96	4	1	1	338	35,6	8,68
P09606	Glutamine synthetase OS=Rattus norvegicus GN=Glul - [GLNA_RAT]	5,36	8	1	1	373	42,2	7,08
P07744	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Mus musculus GN=Krt4 - [K2C4_MOUSE]	1,52	2	1	1	525	56,2	8,15
O75417	DNA polymerase theta OS=Homo sapiens GN=POLQ - [DPOLQ_HUMAN]	0,54	1	1	1	2590	289,4	7,36
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GD12 - [GDIB_HUMAN]	2,70	3	1	1	445	50,6	6,47
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 - [TCPG_HUMAN]	3,30	6	1	1	545	60,5	6,49
Q8BW75	Amine oxidase [flavin-containing] B OS=Mus musculus GN=Maob - [AOFB_MOUSE]	3,27	1	1	1	520	58,5	8,29
P86225	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=IDH3A - [IDH3A_MESAU]	8,96	6	1	1	134	14,9	8,97
O60423	Probable phospholipid-transporting ATPase IK OS=Homo sapiens GN=ATP8B3 - [AT8B3_HUMAN]	2,46	1	1	1	1300	146,7	7,90
P34064	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Rattus norvegicus GN=Psma5 - [PSA5_RAT]	7,88	2	1	1	241	26,4	4,86

P12814	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 - [ACTN1_HUMAN]	1,23	13	1	1	892	103,0	5,41
Q64HZ9	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial OS=Hylobates lar GN=GLUD2 - [DHE4_HYLLA]	3,78	8	1	1	555	60,8	8,40
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus GN=Ppia - [PPIA_RAT]	5,49	5	1	1	164	17,9	8,16
Q9Z277	Tyrosine-protein kinase BAZ1B OS=Mus musculus GN=Baz1b - [BAZ1B_MOUSE]	1,01	1	1	1	1479	170,5	8,60
Q864U1	Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog OS=Bos taurus GN=BRCA1 - [BRCA1_BOVIN]	0,76	1	1	1	1849	206,2	5,58
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein OS=Homo sapiens GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2- [AXA2L_HUMAN]	2,95	8	1	1	339	38,6	6,95
Q91ZA3	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Pcca - [PCCA_MOUSE]	2,21	3	1	1	724	79,9	7,25
Q8BLV3	Sodium/hydrogen exchanger 7 OS=Mus musculus GN=Slc9a7 - [SL9A7_MOUSE]	2,75	1	1	1	726	80,2	6,40
Q3U1J4	DNA damage-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Ddb1 - [DDB1_MOUSE]	2,63	1	1	1	1140	126,8	5,26
P41361	Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 - [ANT3_BOVIN]	2,37	1	1	1	465	52,3	7,33
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PPP1CC - [PP1G_HUMAN]	5,26	7	1	1	323	37,0	6,54
O35691	Pinin OS=Mus musculus GN=Pnn - [PININ_MOUSE]	3,59	1	1	1	725	82,4	7,01
Q80W54	CAAX prenyl protease 1 homolog OS=Mus musculus GN=Zmpste24 -	2,11	1	1	1	475	54,7	6,95

	[FACE1_MOUSE]							
Q62383	Transcription elongation factor SPT6 OS=Mus musculus GN=Supt6h - [SPT6H_MOUSE]	0,70	1	1	1	1726	199,0	4,93
O08749	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dld - [DLDH_MOUSE]	3,14	3	2	2	509	54,2	7,90
Q28372	Gelsolin OS=Equus caballus GN=GSN - [GELS_HORSE]	3,97	4	2	2	731	80,8	5,85
P01870	Ig gamma chain C region OS=Oryctolagus cuniculus - [IGHG_RABIT]	2,17	5	1	1	323	35,4	8,29
P80209	Cathepsin D OS=Bos taurus GN=CTSD - [CATD_BOVIN]	2,05	1	1	1	390	42,5	7,05
Q7Z6M3	Allergin-1 OS=Homo sapiens GN=MILR1 - [MILR1_HUMAN]	6,12	1	1	1	343	38,7	7,77
P86195	Adenylate kinase isoenzyme 1 (Fragments) OS=Mesocricetus auratus GN=Ak1 - [KAD1_MESAU]	21,67	7	1	1	60	6,7	7,18
Q99P72	Reticulon-4 OS=Mus musculus GN=Rtn4 - [RTN4_MOUSE]	1,38	3	1	1	1162	126,5	4,54
Q9Y6R7	IgGfc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP - [FCGBP_HUMAN]	0,50	1	1	1	5405	571,6	5,34
Q8VBT0	Thioredoxin-related transmembrane protein 1 OS=Mus musculus GN=Tmx1 - [TMX1_MOUSE]	4,32	1	1	1	278	31,4	5,29
Q6NVV1	Putative 60S ribosomal protein L13a-like MGC87657 OS=Homo sapiens PE=5 SV=1- [R13AX_HUMAN]	10,78	7	1	1	102	12,1	10,76
A1YVX4	Lysine-specific demethylase 5C OS=Sus scrofa GN=KDM5C - [KDM5C_PIG]	1,25	8	1	1	1516	170,5	5,59

P60324	Nanos homolog 3 OS=Mus musculus GN=Nanos3 - [NANO3_MOUSE]	7,87	1	1	1	178	19,2	8,53
Q64518	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 OS=Mus musculus GN=Atp2a3 - [AT2A3_MOUSE]	1,54	1	1	1	1038	113,6	5,85
Q5R9L8	2-oxoglutarate dehydrogenase-like, mitochondrial OS=Pongo abelii GN=OGDHL - [OGDHL_PONAB]	1,78	2	1	1	1010	114,5	6,99
Q1LZD9	Paraspeckle component 1 OS=Bos taurus GN=PSPC1 - [PSPC1_BOVIN]	2,12	4	1	1	520	58,2	6,99
P03995	Glial fibrillary acidic protein OS=Mus musculus GN=Gfap - [GFAP_MOUSE]	2,56	1	1	1	430	49,9	5,34
E2RH47	40S ribosomal protein S3 OS=Canis familiaris GN=RPS3 - [RS3_CANFA]	3,70	3	1	1	243	26,7	9,66
Q99KW3	TRIO and F-actin-binding protein OS=Mus musculus GN=Triobp - [TARA_MOUSE]	0,60	1	1	1	2014	223,2	8,06
P78395	Melanoma antigen preferentially expressed in tumors OS=Homo sapiens GN=PRAME - [PRAME_HUMAN]	1,77	1	1	1	509	57,9	6,90
Q5JV73	FERM and PDZ domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=FRMPD3 - [FRPD3_HUMAN]	0,33	1	1	1	1810	199,1	8,15
Q02819	Nucleobindin-1 OS=Mus musculus GN=Nucb1 - [NUCB1_MOUSE]	4,58	5	2	2	459	53,4	5,07
D2HC77	Apolipoprotein A-I OS=Ailuropoda melanoleuca GN=APOA1 - [APOA1_AILME]	4,14	2	1	1	266	30,2	5,48
O14578	Citron Rho-interacting kinase OS=Homo sapiens GN=CIT - [CTRO_HUMAN]	0,54	2	1	1	2027	231,3	6,57
P48770	Complement component C9 OS=Equus caballus GN=C9 - [CO9_HORSE]	1,65	3	1	1	547	62,0	5,47
Q62770	Protein unc-13 homolog C OS=Rattus norvegicus GN=Unc13c - [UN13C_RAT]	0,32	1	1	1	2204	249,0	6,15

Q9TTK8	Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Bos taurus GN=CKMT1 - [KCRU_BOVIN]	2,88	4	1	1	416	46,9	8,34
A5A6J2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Pan troglodytes GN=DDX5 - [DDX5_PANTR]	2,61	5	2	2	614	69,1	8,92
P08552	Neurofilament medium polypeptide (Fragment) OS=Sus scrofa GN=NEFM - [NFM_PIG]	2,64	6	1	1	455	52,0	5,24
O70503	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12 OS=Mus musculus GN=Hsd17b12 - [DHB12_MOUSE]	5,13	2	1	1	312	34,7	9,52
P43244	Matrin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Matr3 - [MATR3_RAT]	1,18	3	1	1	845	94,4	6,20
Q62448	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 OS=Mus musculus GN=Eif4g2 - [IF4G2_MOUSE]	1,77	3	1	1	906	102,0	7,14
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 - [DMBT1_HUMAN]	2,49	2	1	1	2413	260,6	5,44
P11798	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha OS=Mus musculus GN=Camk2a - [KCC2A_MOUSE]	2,51	2	1	1	478	54,1	7,08
P01703	Ig lambda chain V-I region NEWM OS=Homo sapiens - [LV105_HUMAN]	10,68	1	1	1	103	10,9	9,29
Q63155	Netrin receptor DCC OS=Rattus norvegicus GN=Dcc - [DCC_RAT]	0,48	3	1	1	1445	157,8	6,79
Q28256	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Canis familiaris GN=GP1BA - [GP1BA_CANFA]	1,03	1	1	1	677	74,1	5,91
Q5R422	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 OS=Pongo abelii GN=ATP6V0A1 - [VPP1_PONAB]	1,31	5	1	1	837	96,2	6,65

Q5RC31	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Pongo abelii GN=ETFA - [ETFA_PONAB]	5,41	2	1	1	333	35,1	8,38
P19234	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Ndufv2 - [NDUV2_RAT]	4,44	2	1	1	248	27,4	6,68
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Mdh1 - [MDHC_RAT]	3,59	3	1	1	334	36,5	6,58
P10686	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plcg1 - [PLCG1_RAT]	0,93	2	1	1	1290	148,5	5,96
O35593	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 OS=Mus musculus GN=Psm14 - [PSDE_MOUSE]	10,97	1	1	1	310	34,6	6,52
P51398	28S ribosomal protein S29, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DAP3 - [RT29_HUMAN]	3,52	1	1	1	398	45,5	8,88
P80147	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Sus scrofa GN=ABAT - [GABT_PIG]	8,80	1	1	1	500	56,6	8,25
Q86YG4	5'-nucleotidase domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=NT5DC4 - [NT5D4_HUMAN]	6,78	1	1	1	428	48,9	6,04
O60733	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2 OS=Homo sapiens GN=PLA2G6 - [PLPL9_HUMAN]	4,84	1	1	1	806	89,8	7,27
O18823	Acyloxyacyl hydrolase OS=Oryctolagus cuniculus GN=AOAH - [AOAH_RABIT]	6,78	1	1	1	575	65,0	7,52
Q5TCS8	Adenylate kinase 9 OS=Homo sapiens GN=AK9 - [KAD9_HUMAN]	0,89	1	1	1	1911	221,3	5,01
Q91VH1	Adiponectin receptor protein 1 OS=Mus musculus GN=Adipor1 - [ADR1_MOUSE]	10,67	2	1	1	375	42,3	7,02

Q8CHC8	ADNP homeobox protein 2 OS=Mus musculus GN=Adnp2 - [ADNP2_MOUSE]	2,40	1	1	1	1165	126,7	9,00
Q9JKW0	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Arl6ip1 - [AR6P1_MOUSE]	17,24	1	1	1	203	23,4	9,32
Q9Y2D8	Afadin- and alpha-actinin-binding protein OS=Homo sapiens GN=SSX2IP - [ADIP_HUMAN]	2,12	1	1	1	614	71,2	6,40
Q70FJ1	A-kinase anchor protein 9 OS=Mus musculus GN=Akap9 - [AKAP9_MOUSE]	0,45	1	1	1	3797	435,9	5,03
P82530	Alpha-crystallin A chain (Fragments) OS=Elephantulus rufescens GN=CRYAA - [CRYAA_ELERU]	27,33	1	1	1	161	18,0	6,01
P51168	Amiloride-sensitive sodium channel subunit beta OS=Homo sapiens GN=SCNN1B - [SCNNB_HUMAN]	6,56	2	1	1	640	72,6	6,30
P20757	Angiotensinogen OS=Ovis aries GN=AGT - [ANGT_SHEEP]	9,24	1	1	1	476	51,3	7,03
Q8WWH4	Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ASZ1 - [ASZ1_HUMAN]	9,26	1	1	1	475	53,4	5,87
Q4KMQ2	Anoctamin-6 OS=Homo sapiens GN=ANO6 - [ANO6_HUMAN]	4,73	1	1	1	910	106,1	7,77
Q7TMA5	Apolipoprotein B-100 OS=Rattus norvegicus GN=Apob - [APOB_RAT]	0,51	1	1	1	4743	535,7	7,42
Q96PS8	Aquaporin-10 OS=Homo sapiens GN=AQP10 - [AQP10_HUMAN]	13,62	1	1	1	301	31,7	6,77
O88533	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase OS=Mus musculus GN=Ddc - [DDC_MOUSE]	3,13	2	1	1	480	53,8	6,60

P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Got1 - [AATC_MOUSE]	3,15	1	1	1	413	46,2	7,14
O35143	ATPase inhibitor, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atpif1 - [ATIF1_MOUSE]	11,32	2	1	1	106	12,2	9,64
Q63563	ATP-binding cassette sub-family C member 9 OS=Rattus norvegicus GN=Abcc9 - [ABCC9_RAT]	2,07	4	1	1	1545	174,0	7,46
P18293	Atrial natriuretic peptide receptor 1 OS=Mus musculus GN=Npr1 - [ANPRA_MOUSE]	3,88	1	1	1	1057	119,0	6,89
Q8NFJ9	Bardet-Biedl syndrome 1 protein OS=Homo sapiens GN=BBS1 - [BBS1_HUMAN]	7,59	1	1	1	593	65,0	7,93
Q12983	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 OS=Homo sapiens GN=BNIP3 - [BNIP3_HUMAN]	23,20	1	1	1	194	21,5	6,80
Q6W2J9	BCL-6 corepressor OS=Homo sapiens GN=BCOR - [BCOR_HUMAN]	2,11	1	1	1	1755	192,1	6,48
Q8K4Z4	Beta-2 adrenergic receptor OS=Cavia porcellus GN=Adrb2 - [ADRB2_CAVPO]	10,05	1	1	1	418	47,0	6,87
P51587	Breast cancer type 2 susceptibility protein OS=Homo sapiens GN=BRCA2 - [BRCA2_HUMAN]	0,88	1	1	1	3418	384,0	6,73
P10287	Cadherin-3 OS=Mus musculus GN=Cdh3 - [CADH3_MOUSE]	4,99	1	1	1	822	90,6	4,79
P13234	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV OS=Rattus norvegicus GN=Camk4 - [KCC4_RAT]	6,54	1	1	1	474	53,1	4,92
P26801	CCAAT/enhancer-binding protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Cebpg - [CEBPG_RAT]	27,33	1	1	1	150	16,4	9,89
Q8VDP4	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 OS=Mus musculus GN=Ccar2 -	2,71	1	1	1	922	102,	5,25

	[CCAR2_MOUSE]						9	
P49454	Centromere protein F OS=Homo sapiens GN=CENPF - [CENPF_HUMAN]	0,25	1	1	1	3210	367,5	5,07
Q9MZT1	Chloride channel protein 1 OS=Canis familiaris GN=CLCN1 - [CLCN1_CANFA]	4,20	1	1	1	976	108,0	6,25
P51789	Chloride channel protein 2 OS=Oryctolagus cuniculus GN=CLCN2 - [CLCN2_RABIT]	4,79	1	1	1	898	98,5	8,48
P79101	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 OS=Bos taurus GN=CPSF3 - [CPSF3_BOVIN]	2,34	3	1	1	684	77,4	5,66
P00451	Coagulation factor VIII OS=Homo sapiens GN=F8 - [F8_HUMAN]	1,74	1	1	1	2351	266,8	7,36
D3YZP9	Coiled-coil domain-containing protein 6 OS=Mus musculus GN=Ccdc6 - [CCDC6_MOUSE]	3,62	2	1	1	469	52,9	7,34
O75534	Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens GN=CSDE1 - [CSDE1_HUMAN]	5,39	3	1	1	798	88,8	6,25
Q8BLX7	Collagen alpha-1(XVI) chain OS=Mus musculus GN=Col16a1 - [COGA1_MOUSE]	3,42	1	1	1	1580	155,7	7,91
P20023	Complement receptor type 2 OS=Homo sapiens GN=CR2 - [CR2_HUMAN]	4,36	1	1	1	1033	112,8	7,52
Q5EA28	CpG-binding protein OS=Bos taurus GN=CXXC1 - [CXXC1_BOVIN]	3,19	1	1	1	658	75,8	8,24
P00567	Creatine kinase B-type OS=Oryctolagus cuniculus GN=CKB - [KCRB_RABIT]	5,77	6	1	1	381	42,6	5,58
Q96RT6	cTAGE family member 2 OS=Homo sapiens GN=CTAGE1 - [CTGE2_HUMAN]	5,64	1	1	1	745	85,2	6,16

P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Cox5a - [COX5A_RAT]	20,55	19	1	1	146	16,1	6,54
P00125	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=CYC1 - [CY1_BOVIN]	4,92	2	1	1	325	35,3	8,98
P28037	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus GN=Aldh1l1 - [AL1L1_RAT]	2,55	2	1	1	902	98,8	5,91
P21917	D(4) dopamine receptor OS=Homo sapiens GN=DRD4 - [DRD4_HUMAN]	9,21	1	1	1	467	48,3	8,34
Q6ZN54	Differentially expressed in FDCP 8 homolog OS=Homo sapiens GN=DEF8 - [DEF8_HUMAN]	7,62	1	1	1	512	58,7	6,52
P97427	Dihydropyrimidinase-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Crmp1 - [DPYL1_MOUSE]	1,75	3	1	1	572	62,1	7,12
Q62951	Dihydropyrimidinase-related protein 4 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Dpysl4 - [DPYL4_RAT]	2,84	2	1	1	564	61,0	6,77
P97821	Dipeptidyl peptidase 1 OS=Mus musculus GN=Ctsc - [CATC_MOUSE]	6,93	1	1	1	462	52,3	6,89
O75077	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23 OS=Homo sapiens GN=ADAM23 - [ADA23_HUMAN]	5,53	1	1	1	832	91,9	7,64
P49718	DNA replication licensing factor MCM5 OS=Mus musculus GN=Mcm5 - [MCM5_MOUSE]	4,37	1	1	1	733	82,3	8,43
Q6IM78	DNA topoisomerase I, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Top1mt - [TOP1M_RAT]	1,01	2	1	1	593	69,0	9,22
Q8BKF1	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Polrmt - [RPOM_MOUSE]	1,99	1	1	1	1207	136,6	9,09

Q96IM9	DPY30 domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=DYDC2 - [DYDC2_HUMAN]	7,91	1	1	1	177	20,6	5,60
Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH14 - [DYH14_HUMAN]	1,20	1	1	1	3507	399,6	6,93
O54714	E3 SUMO-protein ligase PIAS3 OS=Mus musculus GN=Pias3 - [PIAS3_MOUSE]	6,85	3	1	1	628	68,3	7,83
O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1 OS=Mus musculus GN=Slc4a4 - [S4A4_MOUSE]	1,11	2	1	1	1079	121,4	6,84
Q8VHU4	Elongator complex protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=lkbkap - [ELP1_RAT]	3,08	1	1	1	1331	149,1	6,39
P98073	Enteropeptidase OS=Homo sapiens GN=TMPRSS15 - [ENTK_HUMAN]	4,12	1	1	1	1019	112,9	5,03
P58107	Epiplakin OS=Homo sapiens GN=EPPK1 - [EPIPL_HUMAN]	0,67	1	1	1	5090	555,3	5,60
P54281	Epithelial chloride channel protein OS=Bos taurus - [ECLC_BOVIN]	2,10	1	1	1	903	100,2	7,05
Q3TAS6	ER membrane protein complex subunit 10 OS=Mus musculus GN=Emc10 - [EMC10_MOUSE]	17,05	2	1	1	258	27,0	5,91
Q6PH08	ERC protein 2 OS=Mus musculus GN=Erc2 - [ERC2_MOUSE]	1,99	1	1	1	957	110,6	7,03
Q5SXJ3	Fanconi anemia group J protein homolog OS=Mus musculus GN=Brip1 - [FANCJ_MOUSE]	1,28	1	1	1	1174	131,3	7,50
Q4R327	F-box only protein 24 OS=Macaca fascicularis GN=FBXO24 - [FBX24_MACFA]	7,76	1	1	1	580	64,9	8,72

P02676	Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB - [FIBB_BOVIN]	1,50	2	1	1	468	53,3	8,19
Q9MZ06	Fibroblast growth factor-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=FGFBP1 - [FGFP1_BOVIN]	3,85	2	1	1	234	26,2	8,91
Q5RBN1	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A OS=Pongo abelii GN=FNDC3A - [FND3A_PONAB]	2,10	2	1	1	1142	125,6	7,08
B5RHS5	Forkhead box protein I3 OS=Canis familiaris GN=FOXI3 - [FOXI3_CANFA]	11,01	1	1	1	436	44,0	8,40
Q00420	GA-binding protein subunit beta-1 OS=Mus musculus GN=Gabpb1 - [GABP1_MOUSE]	11,49	1	1	1	383	41,3	4,84
Q923B0	Gamma-glutamylaminocyclotransferase OS=Mus musculus GN=Ggact - [GGACT_MOUSE]	28,86	1	1	1	149	17,1	5,29
Q499T2	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase OS=Rattus norvegicus GN=Ifi30 - [GILT_RAT]	7,66	1	1	1	248	27,6	4,81
P48165	Gap junction alpha-8 protein OS=Homo sapiens GN=GJA8 - [CXA8_HUMAN]	9,93	4	1	1	433	48,2	5,27
P80035	Gastric triacylglycerol lipase OS=Canis familiaris GN=LIPF - [LIPG_CANFA]	10,05	1	1	1	398	45,1	6,80
Q8TDV5	Glucose-dependent insulinotropic receptor OS=Homo sapiens GN=GPR119 - [GP119_HUMAN]	13,13	1	1	1	335	36,9	8,82
Q62839	Golgin subfamily A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Golga2 - [GOGA2_RAT]	1,90	3	1	1	998	112,8	4,93
O15218	G-protein coupled receptor 182 OS=Homo sapiens GN=GPR182 - [GP182_HUMAN]	10,64	1	1	1	404	45,3	7,52
Q9BZM3	GS homeobox 2 OS=Homo sapiens GN=GSX2 - [GSX2_HUMAN]	17,11	1	1	1	304	32,0	8,97
O88302	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-15 OS=Rattus norvegicus	4,01	3	1	1	374	43,3	8,05

	GN=Gna15 - [GNA15_RAT]							
Q867B7	Hepatocyte growth factor OS=Canis familiaris GN=HGF - [HGF_CANFA]	3,84	1	1	1	730	83,3	8,12
O35137	Homeobox protein aristaless-like 4 OS=Mus musculus GN=Alx4 - [ALX4_MOUSE]	4,76	1	1	1	399	42,7	8,32
Q05469	Hormone-sensitive lipase OS=Homo sapiens GN=LIPE - [LIPS_HUMAN]	1,95	1	1	1	1076	116,5	6,70
P01622	Ig kappa chain V-III region Ti OS=Homo sapiens - [KV304_HUMAN]	8,26	1	1	1	109	11,8	8,50
Q70EL1	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54 OS=Homo sapiens GN=USP54 - [UBP54_HUMAN]	2,67	1	1	1	1684	187,3	7,28
Q9QY05	Insulin-like peptide INSL6 OS=Mus musculus GN=Insl6 - [INSL6_MOUSE]	3,14	3	1	1	191	22,2	9,28
P17301	Integrin alpha-2 OS=Homo sapiens GN=ITGA2 - [ITA2_HUMAN]	3,73	1	1	1	1181	129,2	5,31
Q9H2X8	Interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=IFI27L2 - [I27L2_HUMAN]	28,46	1	1	1	130	12,4	5,34
Q9N0Y3	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 OS=Canis familiaris GN=MX1 - [MX1_CANFA]	6,54	1	1	1	657	74,8	5,82
Q9MZR1	Interleukin-6 OS=Orctolagus cuniculus GN=IL6 - [IL6_RABIT]	9,96	1	1	1	241	27,0	7,64
Q9QXL2	Kinesin-like protein KIF21A OS=Mus musculus GN=Kif21a - [KI21A_MOUSE]	1,20	2	1	1	1672	186,4	6,27
Q61789	Laminin subunit alpha-3 OS=Mus musculus GN=Lama3 - [LAMA3_MOUSE]	1,14	1	1	1	3330	366,0	6,65
A3RM23	Large structural protein OS=Rabies virus (strain India) GN=L - [L_RABVI]	1,97	3	1	1	2127	242,	8,31

							6	
Q86VQ0	Lebercilin OS=Homo sapiens GN=LCA5 - [LCA5_HUMAN]	5,88	1	1	1	697	80,5	7,68
Q9NZU1	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1 OS=Homo sapiens GN=FLRT1 - [FLRT1_HUMAN]	6,81	1	1	1	646	71,3	6,38
Q3UVD5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6 OS=Mus musculus GN=Lgr6 - [LGR6_MOUSE]	2,79	1	1	1	967	104,2	6,07
A1A5P5	LisH domain-containing protein ARMC9 OS=Rattus norvegicus GN=Armc9 - [ARMC9_RAT]	5,89	1	1	1	730	82,3	6,19
Q99MN1	Lysine--tRNA ligase OS=Mus musculus GN=Kars - [SYK_MOUSE]	2,35	1	1	1	595	67,8	5,94
Q04912	Macrophage-stimulating protein receptor OS=Homo sapiens GN=MST1R - [RON_HUMAN]	2,14	1	1	1	1400	152,2	6,55
O89029	Matrilin-4 OS=Mus musculus GN=Matn4 - [MATN4_MOUSE]	4,65	1	1	1	624	68,9	5,76
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 OS=Homo sapiens GN=MDC1 - [MDC1_HUMAN]	1,39	1	1	1	2089	226,5	5,47
Q9Y4F3	Meiosis arrest female protein 1 OS=Homo sapiens GN=KIAA0430 PE=1 SV=6 - [MARF1_HUMAN]	0,92	1	1	1	1742	192,7	7,87
Q8TEZ7	Membrane progesterin receptor beta OS=Homo sapiens GN=PAQR8 - [MPRB_HUMAN]	10,73	1	1	1	354	40,4	8,35
Q16819	Meprin A subunit alpha OS=Homo sapiens GN=MEP1A - [MEP1A_HUMAN]	2,95	1	1	1	746	84,4	5,72
Q96KJ4	Mesothelin-like protein OS=Homo sapiens GN=MSLNL - [MSLNL_HUMAN]	1,42	1	1	1	702	74,5	7,14
P47802	Metaxin-1 OS=Mus musculus GN=Mtx1 - [MTX1_MOUSE]	13,25	1	1	1	317	35,6	6,18

Q4JIJ3	Methionine synthase OS=Bos taurus GN=MTR - [METH_BOVIN]	1,82	1	1	1	1265	140,4	5,34
Q8N6R0	Methyltransferase-like protein 13 OS=Homo sapiens GN=METTL13 - [MET13_HUMAN]	3,58	1	1	1	699	78,7	6,73
Q5TCX8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4 OS=Homo sapiens GN=MLK4 - [M3KL4_HUMAN]	2,80	1	1	1	1036	113,9	8,73
O35763	Moesin OS=Rattus norvegicus GN=Msn - [MOES_RAT]	3,29	13	1	1	577	67,7	6,54
Q8C570	mRNA export factor OS=Mus musculus GN=Rae1 - [RAE1L_MOUSE]	8,97	1	1	1	368	40,9	7,83
P08911	Muscarinic acetylcholine receptor M5 OS=Rattus norvegicus GN=Chrm5 - [ACM5_RAT]	5,65	1	1	1	531	60,1	9,22
O35682	Myeloid-associated differentiation marker OS=Mus musculus GN=Myadm - [MYADM_MOUSE]	5,31	1	1	1	320	35,3	8,31
Q69ZN6	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta OS=Mus musculus GN=Gnptab - [GNPTA_MOUSE]	3,40	1	1	1	1235	140,9	7,66
Q66X01	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9C OS=Mus musculus GN=Nlrp9c - [NAL9C_MOUSE]	4,18	1	1	1	1004	115,6	7,62
Q91WD5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ndufs2 - [NDUS2_MOUSE]	4,97	1	1	1	463	52,6	6,99
Q6P5H2	Nestin OS=Mus musculus GN=Nes - [NEST_MOUSE]	1,13	1	1	1	1864	207,0	4,34
O54799	Neuromedin-B receptor OS=Mus musculus GN=Nmbr - [NMBR_MOUSE]	10,00	1	1	1	390	43,6	8,35

P12760	Neuromedin-U OS=Rattus norvegicus GN=Nmu - [NMU_RAT]	18,39	1	1	1	174	19,4	9,88
P29476	Nitric oxide synthase, brain OS=Rattus norvegicus GN=Nos1 - [NOS1_RAT]	2,94	2	1	1	1429	160,5	7,12
Q8TBK2	N-lysine methyltransferase SETD6 OS=Homo sapiens GN=SETD6 - [SETD6_HUMAN]	8,88	1	1	1	473	53,2	5,34
Q60974	Nuclear receptor corepressor 1 OS=Mus musculus GN=Ncor1 - [NCOR1_MOUSE]	1,59	1	1	1	2453	270,5	6,93
Q9DBY8	Nuclear valosin-containing protein-like OS=Mus musculus GN=Nvl - [NVL_MOUSE]	1,40	1	1	1	855	94,4	6,35
Q8NGI0	Olfactory receptor 52N2 OS=Homo sapiens GN=OR52N2 - [O52N2_HUMAN]	8,72	1	1	1	321	35,9	8,03
Q9HB75	p53-induced protein with a death domain OS=Homo sapiens GN=PIDD - [PIDD_HUMAN]	2,86	1	1	1	910	99,6	6,43
Q8BHK0	Paraneoplastic antigen Ma2 homolog OS=Mus musculus GN=Pnma2 - [PNMA2_MOUSE]	7,40	1	1	1	365	41,2	5,06
Q99NH2	Partitioning defective 3 homolog OS=Mus musculus GN=Pard3 - [PARD3_MOUSE]	3,23	1	1	1	1333	149,0	7,94
Q3URU2	Paternally-expressed gene 3 protein OS=Mus musculus GN=Peg3 - [PEG3_MOUSE]	1,08	1	1	1	1571	178,8	5,45
Q9H6A9	Pecanex-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=PCNXL3 - [PCX3_HUMAN]	1,43	1	1	1	2034	221,9	6,64
Q9JMC1	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase A OS=Rattus norvegicus GN=Inpp5j - [PI5PA_RAT]	0,70	1	1	1	1001	107,1	9,51
P18669	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 - [PGAM1_HUMAN]	8,27	6	1	1	254	28,8	7,18

Q9JM80	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pag1 - [PHAG1_RAT]	4,25	1	1	1	424	45,9	4,81
Q9HBE1	POZ-, AT hook-, and zinc finger-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=PATZ1 - [PATZ1_HUMAN]	7,42	1	1	1	687	74,0	8,35
Q8IY26	Presqualene diphosphate phosphatase OS=Homo sapiens GN=PPAPDC2 - [PPAC2_HUMAN]	13,56	1	1	1	295	32,2	9,99
Q15751	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1 OS=Homo sapiens GN=HERC1 - [HERC1_HUMAN]	0,58	1	1	1	4861	531,9	6,04
Q5T4B2	Probable inactive glycosyltransferase 25 family member 3 OS=Homo sapiens GN=CERCAM - [GT253_HUMAN]	7,23	1	1	1	595	67,5	6,06
A6NJ78	Probable methyltransferase-like protein 15 OS=Homo sapiens GN=METTLL15 - [MET15_HUMAN]	4,18	2	1	1	407	46,1	8,62
O43861	Probable phospholipid-transporting ATPase IIB OS=Homo sapiens GN=ATP9B - [ATP9B_HUMAN]	2,96	1	1	1	1147	129,2	7,61
Q91V51	Probable tubulin polyglutamylase TLL1 OS=Mus musculus GN=Ttl1 - [TLL1_MOUSE]	5,20	1	1	1	423	49,1	8,72
O35523	Proteasome subunit beta type-9 OS=Mus platythrix GN=Psmb9 - [PSB9_MUSPL]	21,00	1	1	1	219	23,4	5,39
A1A4L6	Protein C-ets-2 OS=Bos taurus GN=ETS2 - [ETS2_BOVIN]	9,36	1	1	1	470	52,6	5,05
DOQ0Y7	Protein cornichon homolog 3 OS=Rattus norvegicus GN=Cnih3 - [CNIH3_RAT]	13,75	2	1	1	160	18,9	6,64
Q3TDN0	Protein dispatched homolog 1 OS=Mus musculus GN=Disp1 - [DISP1_MOUSE]	1,12	1	1	1	1521	170,0	6,84

Q9JJ28	Protein flightless-1 homolog OS=Mus musculus GN=Flii - [FLII_MOUSE]	3,23	1	1	1	1271	144,7	6,06
Q5TBA9	Protein furry homolog OS=Homo sapiens GN=FRY - [FRY_HUMAN]	0,96	1	1	1	3013	338,7	5,99
A4FV37	Protein kinase C delta-binding protein OS=Bos taurus GN=PRKCDBP - [PRDBP_BOVIN]	4,23	3	1	1	260	27,5	6,57
Q8IWE2	Protein NOXP20 OS=Homo sapiens GN=FAM114A1 - [NXP20_HUMAN]	7,82	1	1	1	563	60,7	4,68
P19103	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A OS=Rattus norvegicus GN=Ppp1r1a - [PPR1A_RAT]	16,96	1	1	1	171	18,7	5,41
Q5THK1	Protein PRR14L OS=Homo sapiens GN=PRR14L - [PR14L_HUMAN]	1,95	1	1	1	2151	237,2	6,33
Q9BVR0	Putative HERC2-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=HERC2P3 PE=5 SV=2- [HRC23_HUMAN]	1,38	2	1	1	1158	128,9	6,89
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens GN=NME2P1 PE=5 SV=1- [NDK8_HUMAN]	12,41	12	1	1	137	15,5	8,57
A6NDJ8	Putative Rab-43-like protein ENSP00000330714 OS=Homo sapiens PE=5 SV=3- [RB43L_HUMAN]	6,08	72	1	1	181	20,2	6,54
P46087	Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2 OS=Homo sapiens GN=NOP2 - [NOP2_HUMAN]	2,46	1	1	1	812	89,2	9,23
Q08AI6	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 11 OS=Homo sapiens GN=SLC38A11 - [S38AB_HUMAN]	10,59	2	1	1	406	44,8	6,60
Q9UI25	Putative uncharacterized protein PRO0461 OS=Homo sapiens GN=PRO0461 PE=5	69,84	1	1	1	63	7,0	6,76

	SV=1- [YP002_HUMAN]							
Q9BXR0	Queuine tRNA-ribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=QTRT1 - [TGT_HUMAN]	6,95	1	1	1	403	44,0	7,23
Q15042	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=RAB3GAP1 - [RB3GP_HUMAN]	1,83	1	1	1	981	110,5	5,55
P35282	Ras-related protein Rab-21 OS=Mus musculus GN=Rab21 - [RAB21_MOUSE]	6,76	5	1	1	222	24,1	7,94
Q92766	Ras-responsive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RREB1 - [RREB1_HUMAN]	0,95	1	1	1	1687	181,3	6,98
B0V2N1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S OS=Mus musculus GN=Ptprs - [PTPRS_MOUSE]	1,84	2	1	1	1907	211,8	7,23
B1AUH1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U OS=Mus musculus GN=Ptpru - [PTPRU_MOUSE]	0,97	2	1	1	1446	162,4	6,86
Q9Z2H2	Regulator of G-protein signaling 6 OS=Mus musculus GN=Rgs6 - [RGS6_MOUSE]	8,90	1	1	1	472	54,5	7,42
Q5CZK2	Relaxin-3 OS=Pan troglodytes GN=RLN3 - [REL3_PANTR]	28,87	1	1	1	142	15,3	7,01
Q5VYX0	Renalase OS=Homo sapiens GN=RNLS - [RNLS_HUMAN]	7,02	1	1	1	342	37,8	6,52
Q0II25	Ribonuclease P protein subunit p20 OS=Bos taurus GN=POP7 - [POP7_BOVIN]	27,14	2	1	1	140	15,7	8,94
Q8SPN4	Ribonuclease pancreatic OS=Pygathrix nemaeus GN=RNASE1 - [RNAS1_PYGNE]	10,90	1	1	1	156	17,5	8,95
Q2VL90	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 OS=Sus scrofa GN=CD163 - [C163A_PIG]	4,04	1	1	1	1115	120,4	5,99
Q8BUH8	Sentrin-specific protease 7 OS=Mus musculus GN=Senp7 - [SENP7_MOUSE]	1,83	1	1	1	1037	116,3	6,52

A2VDV2	Serine/threonine-protein kinase 38 OS=Bos taurus GN=STK38 - [STK38_BOVIN]	6,88	1	1	1	465	54,1	7,15
Q5E9G1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'' subunit gamma OS=Bos taurus GN=PPP2R3C - [P2R3C_BOVIN]	2,43	4	1	1	453	53,4	5,24
Q8N8A2	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B OS=Homo sapiens GN=ANKRD44 - [ANR44_HUMAN]	2,01	1	1	1	993	107,5	6,30
Q62388	Serine-protein kinase ATM OS=Mus musculus GN=Atm - [ATM_MOUSE]	1,21	1	1	1	3066	349,2	6,86
O88420	Sodium channel protein type 8 subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Scn8a - [SCN8A_RAT]	1,97	3	1	1	1978	225,0	6,30
Q28644	Sodium channel protein type 9 subunit alpha OS=Oryctolagus cuniculus GN=SCN9A - [SCN9A_RABIT]	2,27	1	1	1	1984	225,6	6,70
A5A6J8	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS=Pan troglodytes GN=ATP1B1 - [AT1B1_PANTR]	4,62	8	1	1	303	35,1	8,53
Q924N4	Solute carrier family 12 member 6 OS=Mus musculus GN=Slc12a6 - [S12A6_MOUSE]	3,74	2	1	1	1150	127,4	7,03
Q1LZI2	Solute carrier family 35 member F3 OS=Mus musculus GN=Slc35f3 - [S35F3_MOUSE]	11,16	1	1	1	421	46,9	9,39
P30938	Somatostatin receptor type 5 OS=Rattus norvegicus GN=Sstr5 - [SSR5_RAT]	11,57	1	1	1	363	39,9	9,44
Q96JI7	Spatacin OS=Homo sapiens GN=SPG11 - [SPTCS_HUMAN]	1,39	1	1	1	2443	278,7	5,97
O75391	Sperm-associated antigen 7 OS=Homo sapiens GN=SPAG7 - [SPAG7_HUMAN]	13,66	2	1	1	227	26,0	7,91

Q9D552	Spermatogenesis-associated protein 17 OS=Mus musculus GN=Spata17 - [SPT17_MOUSE]	1,85	1	1	1	379	45,5	9,67
Q9JIA7	Sphingosine kinase 2 OS=Mus musculus GN=Sphk2 - [SPHK2_MOUSE]	6,97	1	1	1	617	65,6	6,57
Q9QWI6	SRC kinase signaling inhibitor 1 OS=Mus musculus GN=Srcin1 - [SRCN1_MOUSE]	1,60	1	1	1	1250	134,8	9,32
Q9P1V8	Sterile alpha motif domain-containing protein 15 OS=Homo sapiens GN=SAMD15 - [SAM15_HUMAN]	4,01	1	1	1	674	77,1	4,45
P03940	Steroid 21-hydroxylase OS=Mus musculus GN=Cyp21 - [CP21A_MOUSE]	9,03	1	1	1	487	55,3	8,57
Q9ESL0	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2B, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Oxct2b - [SCO2B_MOUSE]	7,69	2	1	1	520	56,6	8,92
Q8WXH5	Suppressor of cytokine signaling 4 OS=Homo sapiens GN=SOCS4 - [SOCS4_HUMAN]	8,18	1	1	1	440	50,6	7,06
Q5ZQU0	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sned1 - [SNED1_RAT]	3,06	1	1	1	1403	151,3	6,51
Q91YE8	Synaptopodin-2 OS=Mus musculus GN=Synpo2 - [SYNP2_MOUSE]	2,76	1	1	1	1087	116,5	7,37
Q95LL3	TBC1 domain family member 22B OS=Macaca fascicularis GN=TBC1D22B - [TB22B_MACFA]	3,17	2	1	1	505	59,0	7,42
Q8NG11	Tetraspanin-14 OS=Homo sapiens GN=TSPAN14 - [TSN14_HUMAN]	2,96	2	1	1	270	30,7	6,84
Q6P4U0	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B OS=Mus musculus GN=Thsd7b - [THS7B_MOUSE]	0,56	1	1	1	1607	179,2	7,64

Q8WZ42	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN - [TITIN_HUMAN]	0,12	1	1	1	34350	3813,7	6,35
Q8C5C9	TPA-induced transmembrane protein homolog OS=Mus musculus - [TTMP_MOUSE]	18,81	1	1	1	218	24,7	4,41
Q9XSC9	Transcobalamin-2 OS=Bos taurus GN=TCN2 - [TCO2_BOVIN]	9,72	1	1	1	432	47,9	9,11
Q62818	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Eif2b2 - [EI2BB_RAT]	12,82	1	1	1	351	38,9	6,20
P46198	Translation initiation factor IF-2, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MTIF2 - [IF2M_BOVIN]	5,78	1	1	1	727	81,7	8,00
Q8CE96	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 OS=Mus musculus GN=Trmt6 - [TRM6_MOUSE]	9,26	1	1	1	497	55,5	6,95
P21643	Tryptophan 2,3-dioxygenase OS=Rattus norvegicus GN=Tdo2 - [T23O_RAT]	3,20	1	1	1	406	47,8	6,55
Q27957	Tubulin polymerization-promoting protein OS=Bos taurus GN=TPPP - [TPPP_BOVIN]	6,42	2	1	1	218	23,5	9,44
Q9BXT4	Tudor domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=TDRD1 - [TDRD1_HUMAN]	2,80	1	1	1	1180	131,9	6,34
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa OS=Homo sapiens GN=SNRNP70 - [RU17_HUMAN]	10,07	1	1	1	437	51,5	9,94
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 - [U520_HUMAN]	1,69	1	1	1	2136	244,4	6,06
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Rattus norvegicus GN=Uchl1 - [UCHL1_RAT]	9,42	2	1	1	223	24,8	5,24

Q7TQI3	Ubiquitin thioesterase OTUB1 OS=Mus musculus GN=Otub1 - [OTUB1_MOUSE]	5,54	2	1	1	271	31,3	4,94
Q14157	Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L - [UBP2L_HUMAN]	2,21	1	1	1	1087	114,5	7,11
Q80W69	Uncharacterized protein C12orf71 homolog OS=Mus musculus - [CL071_MOUSE]	7,64	1	1	1	301	34,7	5,95
P70569	Unconventional myosin-Vb OS=Rattus norvegicus GN=Myo5b - [MYO5B_RAT]	1,03	1	1	1	1846	213,6	6,98
P79114	Unconventional myosin-X OS=Bos taurus GN=MYO10 - [MYO10_BOVIN]	2,10	3	1	1	2052	235,7	6,39
P46939	Utrophin OS=Homo sapiens GN=UTRN - [UTRO_HUMAN]	0,17	1	1	1	3433	394,2	5,33
Q9GL21	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats OS=Canis familiaris GN=UACA - [UACA_CANFA]	3,04	1	1	1	1415	162,4	6,89
Q91W86	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog OS=Mus musculus GN=Vps11 - [VPS11_MOUSE]	4,04	2	1	1	941	107,7	7,01
P50551	Vasodilator-stimulated phosphoprotein OS=Canis familiaris GN=VASP - [VASP_CANFA]	12,76	1	1	1	384	40,4	7,99
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3 OS=Homo sapiens GN=VAMP3 - [VAMP3_HUMAN]	24,00	7	1	1	100	11,3	8,79
Q3U2S8	Voltage-gated hydrogen channel 1 OS=Mus musculus GN=Hvcn1 - [HVCN1_MOUSE]	11,90	1	1	1	269	31,2	7,06
B1ANS9	WD repeat-containing protein 64 OS=Homo sapiens GN=WDR64 - [WDR64_HUMAN]	3,79	1	1	1	1081	123,6	8,19

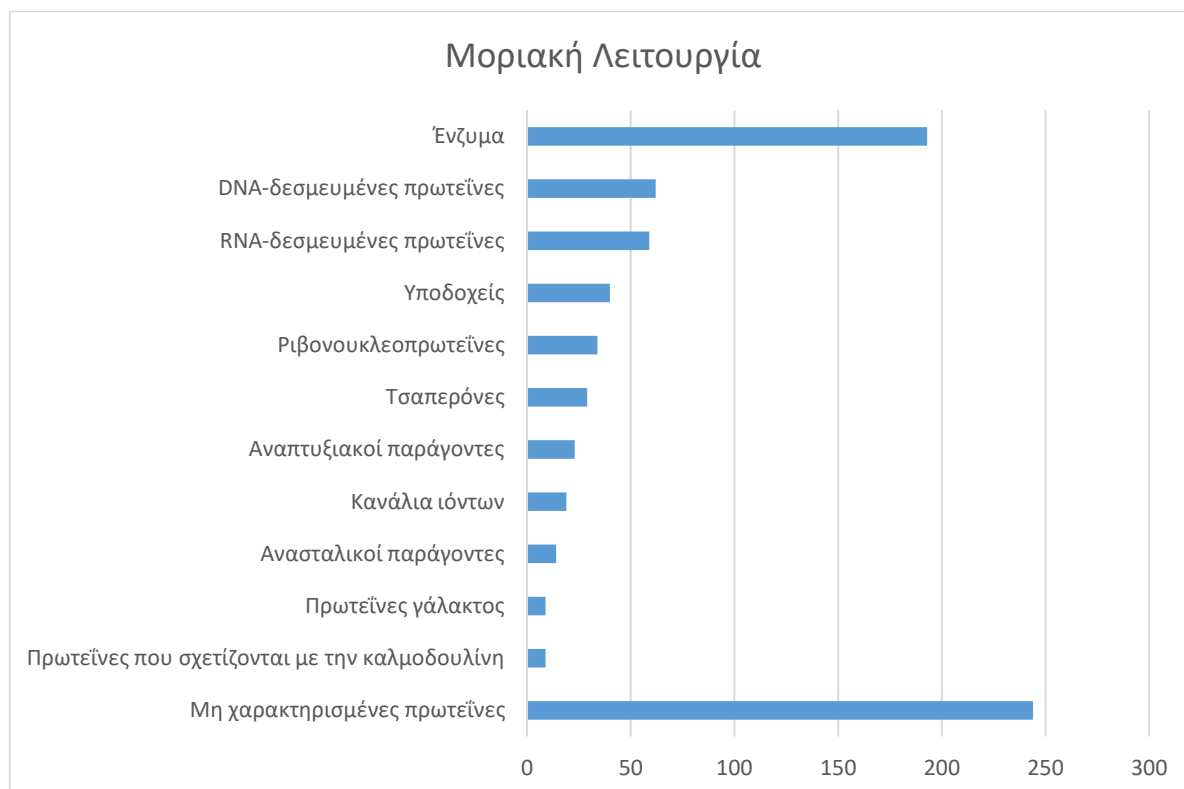
O76024	Wolframin OS=Homo sapiens GN=WFS1 - [WFS1_HUMAN]	3,26	1	1	1	890	100,2	8,05
Q5GH68	XK-related protein 2 OS=Mus musculus GN=Xkrx - [XKR2_MOUSE]	4,68	1	1	1	449	51,7	8,63
Q0VCB0	Zinc finger protein 350 OS=Bos taurus GN=ZNF350 - [ZN350_BOVIN]	8,06	1	1	1	509	57,5	8,79
Q01954	Zinc finger protein basonuclin-1 OS=Homo sapiens GN=BNC1 - [BNC1_HUMAN]	2,82	1	1	1	994	110,9	7,36
Q6X782	Zona pellucida-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Zpbp2 - [ZPBP2_RAT]	10,43	1	1	1	326	36,8	7,09

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν λέξεις κλειδιά της βάσης δεδομένων της UniProtKB με σκοπό να κατηγοριοποιηθούν οι πρωτεΐνες σε ομάδες. Η βάση δεδομένων της UniProtKB διαθέτει λέξεις κλειδιά για τις εξής δέκα κατηγορίες: μοριακή λειτουργία, βιολογική διεργασία, κυτταρική τοπολογία, ποικιλομορφία της κωδικής περιοχής των γονιδίων, αναπτυξιακό στάδιο, ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται η κάθε πρωτεΐνη, μόρια-προσδέτες των πρωτεϊνών, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τεχνικοί όροι αυτών. Στη συγκεκριμένη εργασία οι κατηγορίες που αναλύονται είναι η μοριακή λειτουργία και η βιολογική διεργασία.

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε κωδικό καταχώρησης της UniProtKB καταγράφηκαν οι λέξεις κλειδιά βάσει των 2 παραπάνω κατηγοριών. Για κάθε μια κατηγορία μετρήθηκαν αρχικά οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε κάθε υποκατηγορία και στη συνέχεια για λόγους οπτικοποίησης των διαγραμμάτων ποικίλες κατηγορίες συγχωνεύτηκαν βάσει της συνάφειας της βιολογικής τους ερμηνείας. Αυτό συνέβη με σκοπό τα διαγράμματα να είναι ξεκάθαρα και ευανάγνωστα. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα όπου για κάθε κατηγορία της UniProtKB απεικονίζεται με μπάρες ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών και των 3 δειγμάτων ανά υποκατηγορία.

Όσον αφορά την κατηγορία μοριακή λειτουργία (εικόνα 12), επιλέχθηκαν να απεικονιστούν οι εξής υποκατηγορίες: ένζυμα, DNA-σχετιζόμενες πρωτεΐνες, RNA-σχετιζόμενες πρωτεΐνες, υποδοχείς, ριβονουκλεοπρωτεΐνες, τσαπερόνες, αναπτυξιακοί παράγοντες, κανάλια ιόντων, ανασταλτικοί παράγοντες, πρωτεΐνες γάλακτος, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την καλμοδουλίνη, πρωτεΐνες που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα η μοριακή τους λειτουργία (στο διάγραμμα εμφανίζονται ως μη χαρακτηρισμένες).

Εικόνα 12. Διάγραμμα που απεικονίζονται ο αριθμός των πρωτεϊνών σε κάθε κατηγορία που σχετίζεται με τη μοριακή λειτουργία



Όσον αφορά την κατηγορία βιολογική διεργασία (εικόνα 13), επιλέχθηκαν να απεικονιστούν οι εξής υποκατηγορίες: μεταγραφή, διεργασίες mRNA, μεταφορά ιόντων, μεταφορά πρωτεϊνών, κυτταρικός κύκλος, διαφοροποίηση, ζημιά DNA, ανοσία, κυτταρική πρόσφηση, μεταφορά ηλεκτρονίων, μεταβολισμός λιπιδίων, σύζευξη UBI, βιολογικοί ρυθμοί, απόκριση stress, γλυκόλυση, μη χαρακτηρισμένη βιολογική διεργασία.

Εικόνα 13. Διάγραμμα που απεικονίζονται ο αριθμός των πρωτεϊνών σε κάθε κατηγορία που σχετίζεται με τη βιολογική διεργασία



4. Συζήτηση

Το γάλα όνου από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα αποτελεί ένα ιδιαίτερο γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο είναι πλούσιο σε βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά αλλά διαθέτει και θεραπευτικές ιδιότητες που είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τον άνθρωπο. Η ιστορία αναφέρει ότι η Κλεοπάτρα, βασίλισσα της Αιγύπτου, συνήθιζε να κάνει μπάνιο με γάλα όνου για να βελτιώσει την εμφάνιση του δέρματός της και να μειώσει τις ρυτίδες του προσώπου της. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία πολλών καλλυντικών καθώς έχουν παραχθεί πολλά προϊόντα (σαπούνια, κρέμες, κ.α.). Το γάλα όνου χρησιμοποιείται ευρέως στην αισθητική και την κοσμητολογία, με σκοπό την αντιμετώπιση διαφόρων δερματικών παθήσεων και αλλεργιών

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Η τεχνική αυτή μας παρέχει τη δυνατότητα να πραγματοποιούμε τελευταίας τεχνολογίας πρωτεωμικές αναλύσεις καθώς μας επιτρέπει την ταυτοποίηση του συνόλου των πρωτεϊνών σε ένα βιολογικό δείγμα. Η ανάλυση των πρωτεϊνών έχει προχωρήσει από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D-GE) (Braun et al, 2007) στη χρήση της φασματομετρίας μάζας αποτελώντας την τελευταία λέξη της τεχνολογίας στον τομέα της ταυτοποίησης πρωτεϊνών. Με την πρωτεωμική ανάλυση μελετάμε το σύνολο των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Με την τεχνολογία συνεχώς να προχωρά, μπορούμε πλέον να προβούμε σε αναλύσεις ενός τεράστιου όγκου πρωτεϊνών από ένα πολύ μικρό αρχικό δείγμα και να διευκολυνόμαστε από τις σύγχρονες τεχνικές εξασφαλίζοντας ότι η ανάλυσή μας φέρει τη μέγιστη ακρίβεια. Τεχνικές υψηλής ανάλυσης και διακριτικότητας όπως η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την διαδοχική φασματομετρία μάζας, βελτιώνονται συνεχώς με την πάροδο του χρόνου καθώς συμπλέουν με την αναβάθμιση των τεχνολογικών προδιαγραφών των αναλυτικών οργάνων και την εξειδικευμένη βελτίωση των πρωτοκόλλων προετοιμασίας (Κοροβέση, 2019; Anagnostopoulos et al, 2017).

Το γάλα του όνου έχει αναγνωρισθεί ως υψηλής βιολογικής αξίας γάλα. Παρ'όλα αυτά, πέραν κάποιων υψηλής αφθονίας πρωτεϊνών το συνολικό πρωτεωμικό περιεχόμενο του γάλακτος του όνου δεν είχε ταυτοποιηθεί εκτενώς έως σήμερα. Στη συγκεκριμένη εργασία επιχειρήθηκε η καταγραφή των πρωτεϊνών του εμπορικός διαθέσιμου γάλακτος όνου με μεθόδους πρωτεωμικής ανάλυσης ώστε να ταυτοποιηθούν με την μεγαλύτερη δυνατή λεπτομέρεια όσο το δυνατόν περισσότερες από τις πρωτεΐνες που περιέχει. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα ώστε να απομονωθούν οι πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια επωάσθησαν με θρυψίνη και στη συνέχεια αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας τύπου Orbitrap Elite MS/MS συνδεδεμένη με υγρή χρωματογραφία τύπου nano High Performance (nano HPLC). Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών επετεύχθη μέσω αναζήτησης στη βάση δεδομένων της βιοπληροφορικής πλατφόρμας UniProtKB. Η εφαρμογή της παραπάνω προσέγγισης είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση συνολικά 633 διαφορετικών πρωτεϊνών, που αποτελεί τον μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών για το συγκεκριμένο υλικό. Η καταγραφή των πρωτεϊνών του γάλακτος όνου μας δίνουν μια εικόνα για τη δυναμική της πρωτοποριακής τεχνολογίας LC-MS/MS. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου είχε επιτευχθεί ταυτοποίηση 6.000 πρωτεϊνών από μία και μόνο ανάλυση βιολογικού δείγματος (Anagnostopoulos et al, 2017) χωρίς την προκλασμάτωση δείγματος που αποδεδειγμένα φέρει καλύτερα αποτελέσματα (Sharma et al, 2015).

Στη συνέχεια με στόχο την ανάδειξη των ποιοτικών και βιολογικών χαρακτηριστών του γάλακτος όνου οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες ομαδοποιήθηκαν με βάση τη μοριακή τους λειτουργία και τη βιολογική τους διεργασία. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα ένζυμα αποτελούν την μεγάλη

πλειοψηφία των πρωτεϊνών του όνου γάλακτος. Ακολουθούν οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με νουκλεϊκά οξέα (DNA-σχετιζόμενες πρωτεΐνες, RNA-σχετιζόμενες πρωτεΐνες) και έπονται οι υπόλοιπες κατηγορίες. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι περίπου για το ένα τρίτο των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν δεν έχει χαρακτηριστεί η μοριακή τους λειτουργία. Όσον αφορά τη βιολογική διεργασία που συντελούν οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, εκεί τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών είναι μικρές. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συμβάλλουν στη διαδικασία της μεταγραφής με τις κατηγορίες των διεργασιών mRNA και μεταφοράς ιόντων και πρωτεϊνών να ακολουθούν με μικρές διαφορές. Παρ'όλα αυτά παρατηρούμε και εδώ πως ένα μεγάλο κομμάτι των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών (270 πρωτεΐνες) δεν διαθέτει χαρακτηρισμένη βιολογική διεργασία στη βάση δεδομένων.

Το γάλα όνου έχει πιο κοντινή σύνθεση με το ανθρώπινο γάλα από ότι το μηρυκαστικό γάλα ενώ το φρέσκο ανεπεξέργαστο γάλα όνου κερδίζει ολόένα και μεγαλύτερη δημοσιότητα ως λειτουργικό τρόφιμο. Έχει παρόμοιες ποσότητες πρωτεΐνης και διατροφικό προφίλ με το μητρικό γάλα, καθώς και παρόμοια περιεκτικότητα σε λακτόζη, λινολενικό οξύ, βιταμίνη C και ανόργανα άλατα. Η πεπτικότητα του κλάσματος πρωτεΐνης είναι καλύτερη από τις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος και το μικρότερο μέγεθος των σφαιριδίων λίπους προϋποθέτει επίσης ταχύτερη και καλύτερη πέψη λιπιδίων, ενώ η συνολική περιεκτικότητα λιπιδίων είναι χαμηλότερη από το ανθρώπινο και αγελαδινό γάλα. Ακόμη, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι είναι μια καλή πηγή βιταμίνης D (Altomonde et al, 2018).

Όταν παράγεται υπό κανονικές συνθήκες, το γάλα όνου παρουσιάζει χαμηλό συνολικό αριθμό βακτηρίων (περίπου 4×10^4 CFU/mL) (Corroia et al, 2002) και διατηρεί χαμηλή τιμή ακόμη και κατά τη διάρκεια περίπου 4 ημερών αποθήκευσης (Chiavari et al, 2005; Šarić et al, 2012). Το γάλα όνου περιέχει αρκετές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, όπως τη λυσοζύμη και τη λακτοφερίνη, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερικών λοιμώξεων στο πεπτικό σύστημα και να δρουν έναντι των λοιμώξεων του μαστικού αδένου. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λυσοζύμη του γάλακτος όνου μπορεί να είναι υπεύθυνη για τον χαμηλό αριθμό βακτηρίων που αναφέρεται σχεδόν συνολικά στη βιβλιογραφία και επίσης καθιστά αυτό το γάλα κατάλληλο για την πρόληψη ή τη μείωση των γαστρεντερικών λοιμώξεων των βρεφών. Επιπλέον, η λυσοζύμη έχει και άλλες σημαντικές λειτουργίες (π.χ. ισχυρή μικροβιακή ανασταλτική δραστηριότητα, απενεργοποίηση ορισμένων ιών, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δραστηριότητες) ενώ φαίνεται να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα στην πρώιμη παιδική ηλικία (Salimei et al, 2004; Zhang et al, 2008; Mao et al, 2009; Monti et al, 2007). Η λακτοφερίνη είναι η πρωτεΐνη δέσμευσης του σιδήρου δρα επιπλέον και ως αντιμικροβιακός παράγοντας υδρολύοντας γλυκοσιδικούς δεσμούς βλενογόνων πολυσακχαριτών σε βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Το υψηλό περιεχόμενο της λυσοζύμης καθώς οι άλλες αντιμικροβιακές πρωτεΐνες όπως η α-λακταλβουμίνη και η λακτοφερίνη δίνουν στο ακατέργαστο φρέσκο γάλα όνου μεγάλη διάρκεια ζωής (Brumini et al, 2016). Αν και με χαμηλή περιεκτικότητα σε βακτήρια, στο γάλα όνου δεν αποκλείεται η πιθανή παρουσία παθογόνων ειδών, η οποία υπογραμμίζει τη σημασία της θερμικής επεξεργασίας πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο. Επομένως, υπάρχει ανάγκη παστερίωσης και λήψης αυστηρών μέτρων υγιεινής κατά την παραγωγή και το χειρισμό του γάλακτος όνου. Είναι αναγκαίο να ληφθούν μέτρα ποιοτικού ελέγχου για να διασφαλιστεί ότι το γάλα όνου που πωλείται στην αγορά είναι ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση (Massouras et al, 2020). Υπό αυτές τις προϋποθέσεις, η Ελληνική Εθνική Νομοθεσία (Υπουργική Απόφαση 314/15074/2014, ΦΕΚ 363 / Β / 17/2/2014), απαιτεί τη συμμόρφωση της παραγωγής και της επεξεργασίας γάλακτος υποειδών με τα κριτήρια των ευρωπαϊκών κοινοτικών κανονισμών 2073/2005, 852/2004 και 853/2004.

Το πιο αποδεδειγμένο ευεργετικό αποτέλεσμα του γάλακτος όνου είναι η καλή ανεκτικότητα των παιδιών που πάσχουν από αλλεργία στην πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος (Cow Milk Protein Allergy-CMPA). Πρόσφατη μελέτη (Barni et al, 2018) αναφέρει ότι το 93% των παιδιών με CMPA που υποβλήθηκε σε αγωγή με γάλα όνου δεν έδειξε καμία μορφή αλλεργίας σε αυτό και επομένως μπορεί να θεωρηθεί ως «υποαλλεργικό» γάλα σύμφωνα με τον ορισμό της Αμερικανικής Ακαδημίας Παιδιατρικής (Baker et al, 2000). Άλλη έρευνα (Trinchese et al, 2015) προτείνει επίσης ότι το γάλα όνου μπορεί να ρυθμίσει τα εντερικό μικροβίωμα, το οποίο σύμφωνα με τους ερευνητές (Penders et al, 2013) είναι μια βασική πηγή ανάπτυξης και ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος στην πρώιμη ηλικία και έτσι θα μπορούσε να έχει προληπτικό ρόλο στην ανάπτυξη ατοπικής δερματίτιδας. Πολλές ακόμη κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους έχουν δοκιμάσει την αποτελεσματικότητα του γάλακτος όνου στους ανθρώπους που πάσχουν από ατοπική δερματίτιδα (Vita et al, 2007; Monti et al, 2012; Martini et al, 2018). Οι δοκιμές αυτές έδειξαν ότι το γάλα όνου οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις στην περίπτωση της ατοπικής δερματίτιδας και ότι είναι καλώς ανεκτό από τους ανθρώπους που έχουν αλλεργία στην αγελαδινή πρωτεΐνη.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώνεται ότι το γάλα όνου δεν περιέχει πρωτεΐνες που σχετίζονται με την CMPA, ενώ περιέχει πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία με αποτέλεσμα να μπορεί να θεωρηθεί ως λειτουργικό τρόφιμο. Συνιστάται λοιπόν η χρήση του στην παιδιατρική επειδή θα μπορούσε να είναι καλύτερο υπόστρωμα από το αγελαδινό γάλα για νεογέννητα και βρέφη καθώς είναι εύκολα εύπεπτο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος (α-λακταλβουμίνη, β-λακτογλοβουλίνη, λυσοζύμη, λακτοφερίνη) (Tidona et al, 2014; Aspri et al, 2016). Όμως επειδή το γάλα όνου έχει χαμηλά λιπαρά και χαμηλή θερμιδική αξία ειδικά για τα παιδιά απαιτείται επαρκής αύξηση του λίπους και προσαρμογή σε κάποια περιεκτικότητα όσον αφορά τα λιπαρά οξέα (π.χ. DHA) προκειμένου να ανταποκρίνεται πλήρως στις απαιτήσεις για την κανονική ανάπτυξη των παιδιών .

Μεταξύ των άλλων πλεονεκτημάτων του γάλακτος όνου είναι η ικανότητα ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης, η οποία έχει παρατηρηθεί *in vitro* (Mao et al, 2009), σε ζωικά μοντέλα (Lionetti et al, 2012) και σε μια κλινική μελέτη για ηλικιωμένους (Amati et al, 2010). Άλλες μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι το γάλα όνου αυξάνει τις αντιοξειδωτικές και αποτοξινωτικές ενζυμικές δραστηριότητες (Lionetti et al, 2012) , ενώ η λυσοζύμη από τον όνο έχει παρατηρηθεί ότι καταστέλλει άμεσα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα *in vitro* (Mao et al, 2009). Επιπλέον, οι υπολιπιδαιμικές επιδράσεις, η αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες του σώματος έναντι του σωματικού λίπους, η βελτίωση της ενέργειας, ο μεταβολισμός και ο έλεγχος βάρους έχουν μελετηθεί σε ζώα. Επομένως, αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν τη δυνατότητα χρήσης γάλακτος όνου σε δίαιτες χαμηλών θερμίδων, για ηλικιωμένους και ανθρώπους με δυσλιπιδαιμία. Συνεπώς, το γάλα όνου μπορεί να χαρακτηριστεί ως τρόφιμο που στοχεύει στην υγεία των καταναλωτών. Από τα ευρήματα της εργασία αυτής φαίνεται ότι το γάλα όνου 16 πρωτεΐνες που συμβάλλουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά τα πολλαπλά ωφέλη του γάλακτος όνου, το ανθρώπινο γάλα είναι προφανώς το καλύτερο γάλα για παιδιά κάτω του ενός έτους. Η χημική σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος έχει χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για την παρασκευή υποκαταστάτων μητρικού γάλακτος. Είναι πολύ σημαντικό γεγονός ότι σε αντίθεση με άλλα βρεφικά παρασκευάσματα, η σύνθεση του μητρικού γάλακτος δεν είναι ομοιόμορφη. Σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος εμφανίζονται όχι μόνο σε μεμονωμένες γυναίκες, αλλά και κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας όπως και καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας, ως αποτέλεσμα αλλαγών στη μητρική διατροφή καθώς και άλλων εξωτερικών παραγόντων, όπως είναι η άσκηση και οι μεταβολικές ασθένειες. Το γάλα όνου μπορεί να θεωρηθεί το πλησιέστερο φυσικό γάλα στο

ανθρώπινο γάλα καθώς τα αποτελέσματα που προέκυψαν από επιστήμονες φαίνεται να επιβεβαιώνουν τη θρεπτική αξία αυτού του γάλακτος, γνωστή από την αρχαιότητα σε πολλές χώρες του κόσμου.

Δεδομένου του περιεχομένου του σε διάφορα λειτουργικά συστατικά, όπως διαπιστώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί ως εναλλακτική τροφή που στοχεύει στην υγεία των παιδιών. Λαμβάνοντας υπόψη το μοναδικό θρεπτικό προφίλ και το οικονομικό δυναμικό του, το γάλα όνου θα μπορούσε σίγουρα να αξιοποιηθεί για να ικανοποιήσει τις διατροφικές απαιτήσεις συγκεκριμένων καταναλωτών και να αυξήσει το εισόδημα των ονοτρόφων (Polidori et al, 2009). Μελλοντικές ερευνητικές προκλήσεις θα πρέπει να αφορούν κάποιες βελτιώσεις στη σύνθεση, ιδίως σε σχέση με την περιεκτικότητα σε ενέργεια και λίπος, ώστε να είναι πιο κατάλληλη για παιδιά κάτω των 6 μηνών. Τέλος, απαιτούνται νέες καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε παιδιά και άλλες ευαίσθητες ομάδες καθώς και ανάλυση σε βάθος των κλινικών και μεταβολικών αποτελεσμάτων, με στόχο την καλύτερη ενημέρωση των πιθανών θετικών επιπτώσεων του γάλακτος όνου στην υγεία.

5. Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., Currie, I., 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*, 3(1), 36-44.
- Allen, L. H., 2012. B vitamins in breast milk: Relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Advances in Nutrition*, 3, 362-369.
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., Martini, M., 2019. Donkey and human milk: insights into their compositional similarities. *International Dairy Journal*, 89, 111-118.
- Amati, L., Marzulli, G., Martulli, M., Tafaro, A., Jirillo, F., Pugliese, V., Martemucci, G., D'Alessandro, A.G. Jirillo, E., 2010. Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 864-869.
- Anagnostopoulos, A., Stravopodis, D., Tsangaris, G., 2017. Yield of 6,000 proteins by 1D nLCMS/MS without pre-fractionation. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1047, 92-96.
- Areco, V., Rivoira, M., Rodriguez, V., Marchionatti, A., Carpentieri, A., Tolosa de Talamoni, N., 2015. Dietary and pharmacological compounds altering intestinal calcium absorption in humans and animals. *Nutrition Research Reviews*, 28, 83-99.
- Aspri, M., Economou, N., Papademas, P., 2017. Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food reviews international*, 33(3), 316-333.
- Baggerman, G., Vierstraete, E., De Loof, A., Schoofs, L., 2005. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 8(8), 669-677.
- Baker, S.S., Cochran, W.J., Greer, F.R., Heyman, M.B., Jacobson, M.S., Jaksic, T., Krebs, N.F., Smith, A.E., Yuen, D.E., Dietz, W., Yetley, E., Harris, S.S., Prendergast, A., Grave, G., Hubbard, V.S., Blum-Kemelor, D., Lauer, R.M., Denne, S.C. Kleinman, R., Kanda, P., 2000. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics*, 106, 346-349.
- Ballard, O., Morrow, A., 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 49-74.
- Barni, S., Sarti, L., Mori, F., Muscas, G., Belli, F., Pucci, N., Novembre, E., 2018. Tolerability and palatability of donkey's milk in children with cow's milk allergy. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 29(3), 329-331.
- Berra, B., Colombo, I., Sottocornola, E., Giacosa, A., 2002. Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 11, 193-197.

- Bertino, E., Gastaldi, D., Monti, G., Baro, C., Fortunato, D., Garoffo, L., Coscia A., Fabris C., Mussap M., Conti A., 2010. Detailed proteomic analysis on DM: insight into its hypoallergenicity. *Frontiers in Bioscience*, 2, 526-36.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braun, R., Kinkl, N., Beer, M., Ueffing M., 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1033-1045.
- Brown, K., 2007. Breastfeeding and complementary feeding in children up two years of age. In C. Agostoni, O. Brunser (Eds.), *Issues in complementary feeding*. pp.185-199. Vevey, Switzerland: Nestec Ltd.
- Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G. E., Marletta, D., 2016. Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 1-14.
- Businco, L., Giampietro, P.G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G., Iacovacci, P., Curadi, C., Orlandi, M., 2000. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, 1031-1034.
- Buss, I. H., McGill, F., Darlow, B. A., Winterbourn, C. C., 2001. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatrica*, 90, 813-815.
- Čagalj, M., Brezovečki, A., Mikulec, N., Antunac, N., 2014. Composition and properties of mare's milk of Croatian Coldblood horse breed. *Mljekarstvo*, 64(1), 3-11.
- Camerini, S., Mauri, P., 2015. The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics. *Journal of chromatography A*, 1381, 1-12.
- Caroli, A.M., Bulgari, O., Gigliotti, C., Altomonte, I., Salari F., Martini, M., 2015. Profilo lattoproteico e attività proteasica totale del latte di asina. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 66, 11-16.
- Cawthorn, K.M., Narayan, M., Chaudhuri, D., Permyakov, E.A., Berliner, L.J., 1972. Interactions of α -Lactalbumin with Fatty Acids and Spin Label Analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 30812-30816.
- Chiavari, C., Coloretto, F., Nanni, M., Sorrentino, E., Grazia, L., 2005. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Lait*, 85, 481-490.
- Churcher, C. S., 1982. Oldest ass recovered from Olduvai Gorge, Tanzania, and the origin of asses. *Journal of Paleontology*, 1124-1132.
- Cilla, A., Quintaes, D. K., Barberá, R., Alegría, A., 2016. Phospholipids in human milk and infant formulas: Benefits and needs for correct infant nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1880-1892.
- Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201.

- Clementi, E.A., Wilhelm, K.R., Schleicher, J., Morozova-Roche, L.A., Hakansson, A.P., 2013. A complex of equine lysozyme and oleic acid with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, 8, e80649.
- Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., Vicente, J. B., Rivera, I., 2017. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *Journal of inherited metabolic disease*, 40(3), 325-342.
- Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, E., Nanni, M., Ranieri, P., Belli Blanes, R., Grazia, L., 2002. Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*, 52, 55–60.
- Contarini, G., Pelizzola, V., Scurati, S., & Povolo, M., 2017. Polar lipid of donkey milk fat: Phospholipid, ceramide and cholesterol composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, 16-23.
- Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., Gabrielli, O., 1999. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica*, 88, 89–94.
- Cornish, J., Palmano, K., Callon, K.E., Watson, M., Lin, J.M., Valenti, P., Naot, D., Grey, A.B., Reid, I.R., 2006. Lactoferrin and bone; structure-activity relationships. *Biochemistry and Cell Biology*, 84, 297–302.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Jirillo, E., De Leo, V., 2011. Major whey proteins in donkey's milk: effect of season and lactation stage. Implications for potential dietary interventions in human diseases. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33, 259–265.
- Dial, E.J., Lichtenberger, L.M., 2002. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 113–117.
- Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312 (5771), 212-217.
- Doreau, B., Cerneau, P., 1991. Influence of foodstuff particle size on in situ degradation of nitrogen in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 35(1-2), 69-81.
- Doreau, M., Martin-Rosset, W., 2002. Dairy animals: horse. In H. Roginsky, J. W. Fuquay, P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*. pp. 358-365. London, Amsterdam: Academic Press.
- Dupont, D., Mackie, A.R., 2015. Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 17, 1823–27.
- El-Hatmi, H., Jrad, Z., Salhi, I., Aguib, A., Nadri, A., Khorchani, T., 2015. Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow milk. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 65(3), 159-167.
- El-Zeini, H. M., 2006. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 15(2), 147-153.
- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Piloni, R., Mariani, P., Salimei, E., 2012. Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *International Dairy Journal*, 24, 143–145.

- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Mariani, P., Piloni, R., Salimei, E., 2013. Essential trace elements in milk and blood serum of lactating donkeys as affected by lactation stage and dietary supplementation with trace elements. *Animal*, 7, 1893–1899.
- Gantner, V., Mijić, P., Baban, M., Škrčić, Z., Turalija, A., 2015. The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo/Dairy*, 65(4), 1-9.
- Gastaldi, D., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo, A., Medana, C., Baiocchi, C., Michele, M., Galvano, F., Conti, A., 2010. Donkey's milk detailed lipid composition. *Frontiers in Bioscience*, 2, 537–546.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S., Curini, R., 2013. Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1628-1639.
- Giosuè, C., Alabiso, M., Russo, G., Alicata, M.L., Torrisi, C. 2008. Jennet milk production during the lactation in a Sicilian farming system. *Animal*, 2 (10), 1491-1495.
- Grinder, M. I., Krausman, P. R., Hoffmann, R. S., 2006. Equus asinus. *Mammalian Species*, 794, 1-9.
- Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., Chen, S.W., Dong, M.L., 2007. Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1635-1643.
- Hakansson, A., Svensson, M., Mossberg, A.K., Sabharwal, H., Linse, S., Lazou, I., Lonnerdal, B., Svanborg, C., 2000. A folding variant of alpha-lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 35, 589–600.
- Hakansson, A., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Sabharwal, H., Svanborg, C., 1995. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. USA*, 92, 8064–8068.
- Hameed, A., Hussain, M., Akhtar, S., 2017. Lactation Responses toward Milk Indigenous Enzymes. In: Sekkin S, editor. *Livestock Science: InTech*, pp. 91–108.
- Hassan, Z.M.R., Farahat, A., Abd El-Gawad, M., 2009. Effect of cold storage and heating of camel's milk on functional properties and microstructure in comparison with cow's and buffalo's milk. *Annals of Agricultural Science*, 54, 137-147.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., & Watanabe, C., 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(11), 5011-5015.
- He, Y., Wu, Y., Mou, Z., Li, W., Zou, L., Fu, T., Zhang, A., Xiang, D., Xiao, H., Wang, X., 2007. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 1(3), 336-342.
- Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, H., Weaver, M.C., 2011. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, 1911-1930.

- IZiNCG., 2004. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin*, 25, S99-S203.
- Ivankovic, A., 2009. Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littoral-Dinaric ass. *Mljekarstvo*, 59 (2), 107-113.
- Jeness, R., Sloan, R.E., 1970. The composition of milks of various species: A review. *Dairy Science Abstracts*, 32, 599-612.
- Jensen, R., Ferris, A., Lammi-Keefe, C., Henderson, R., 1990. Lipids of bovine and human milks: a comparison. *Journal of Dairy Science*, 73, 223-240.
- Jones, P. A., 2010. Donkeys for Development (updated edition on CD). Louis Trichardt, South Africa: Donkey Power/Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA) and Agricultural Research Council of South Africa.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F., 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 78, 53-68.
- Kamao, M., Tsugawa, N., Suhara, Y., Wada, A., Mori, T., Murata, K., Nishino, R., Ukita, T., Uenishi, K., Tanaka, K., Okano, T., 2007. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 859, 192-200.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R., Sauerwal, T., 2001. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, 65, 3–18.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., 2004. Invited review: Beta-lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785–796.
- Korfmacher, W. A., 2005. Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug discovery today*, 10(20), 1357-1367.
- Waltraud, K., Grunenfelder, H.P., Broxham, E., 2008. Donkey Breeds in Europe: Inventory, Description, Need for Action, Conservation; *Report 2007/2008*
- Kwak, H. S., Lee, W. J., Lee, M. R., 2012. Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*, 22(2), 147-151.
- Lazarevic, J., Tasic, T., Teodosin Popovic, S., Banjac, V., Djuragic, O., Kokic, B., Čabarkapa, I., 2017. Changes in milk composition of domestic Balkan donkeys' breed during lactation periods. *Acta Technica*, 48, 187-195.
- Leaf, A. A., 2007. Vitamins for babies and young children. *Archives of Disease in Childhood*, 92, 160-164.
- Li, L., Liu, X. Guo, H., 2018. The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. *Food Science and Biotechnology*, 27, 393–400.
- Liang, L., Subirade, M., 2010. Beta-Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication. *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 6707–6712.

- Liang, L., Tajmir-Riahi, H.A., Subirade, M., 2008. Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*, 9, 50–56.
- Lima, M. S. R., Dimenstein, R., & Ribeiro, K. D. S., 2014. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: A literature review. *The Journal of Pediatrics*, 90, 440-448.
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R., 3rd 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 17 676-682.
- Lionetti L, Cavaliere G, Bergamo P, Trinchese G, De Filippo C, Gifuni G., Gaita, M., Pignalosa, A., Donizzetti, I., Putti, R., Di Palo, R., Barletta, A., Mollica, M.P., 2012 . Diet supplementation with donkey milk upregulates liver mitochondrial uncoupling, reduces energy efficiency and improves antioxidant and antiinflammatory defences in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 1596–1600.
- Lönnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S. K., Sauser, J., Destailats, F., 2017. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *The Journal of nutritional biochemistry*, 41, 1-11.
- Lopez, J.L., 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849, 190-202.
- Loughrill, E., Wray, D., Christides, T., Zand, N., 2017. Calcium to phosphorus ratio, essential elements and vitamin D content of infant foods in the UK: Possible implications for bone health. *Maternal & child nutrition*, 13(3), e12368.
- Luukkainen, P., Salo, M. K., Nikkai, T., 1994. Changes in the fatty acid composition of preterm and term human milk from 1 week to 6 months of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 18, 355–360.
- Makrides, M., Simmer, K., Neumann, M., Gibson, R., 1995. Changes in the polyunsaturated fatty acids of breast milk from mothers of full-term infants over 30 wk of lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1231–1233.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., Mariani, P., 2002: Review: protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12, 869-877.
- Mann, M., Højrup, P., Roepstorff, P., 1993. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological mass spectrometry*, 22(6), 338-345.
- Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., Ren, F., 2009. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *International Dairy Journal*, 19, 703–708.
- Marletta, D., Tidona, F., Bordonaro, S., 2016. Donkey Milk Proteins: Digestibility and Nutritional Significance. In: Gigli I, editor. Milk Proteins- From Structure to Biological Properties and Health Aspects. Rijeka: *InTech*, 199–209.

- Martemucci, G., D'Alessandro, A. G., 2012. Fat content, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition. *Lipids in health and disease*, 11(1), 113.
- Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R., Salari, F., 2018. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37.
- Martini, M., Altomonte, I., Manica, E., Salari, F., 2015. Changes in donkey milk 602 lipids in relation to season and lactation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 30–34.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., Caroli, A. M., 2014a. Short communication: Monitoring nutritional quality of Amiata donkey milk: Effects of lactation and productive season. *Journal of Dairy Science*, 97, 6819–6822.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., 2014b. Amiata donkeys: Fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. *Italian Journal of Animal Science*, 13, 123–126.
- Martini, M., Salari, F., Altomonte, I., 2016. The macrostructure of milk lipids: The fat globules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1209–1221.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., 2013. Evaluation of the fatty acid profile from the core and membrane of fat globules in ewe's milk during lactation. *LWT- Food Science and Technology*, 50, 253–258.
- Massouras, T., Bitsi, N., Paramithiotis, S., Manolopoulou, E., Drosinos, E. H., Triantaphyllopoulos, K. A., 2020. Microbial Profile Antibacterial Properties and Chemical Composition of Raw Donkey Milk. *Animals*, 10(11), 2001.
- Massouras, T., Triantaphyllopoulos, K. A., & Theodossiou, I., 2017. Chemical composition, protein fraction and fatty acid profile of donkey milk during lactation. *International Dairy Journal*, 75, 83–90.
- Monti, G., Bertino, E., Muratore, M. C., Coscia, A., Cresi, F., Silvestro, L., Fabris, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Conti, A., 2007. Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr. Allergy & Immunology*, 18 (3), 258- 264.
- Monti G, Viola S, Baro C, Cresi F, Tovo PA, Moro G, Ferrero, M.P., Conti, A., Bertino, E., 2012. Tolerability of donkey's milk in 92 highly-problematic cow's milk allergic children. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 26, 75–82.
- Monti, L., Cattaneo, T. M. P., Orlandi, M., Curadi, M. C., 2015. Capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides in milk from different species. *Journal of Chromatography A*, 1409, 288–291.
- Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C., 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, 120(2), 544-551.
- Mossberg, A.K., Hun Mok, K., Morozova-Roche, L.A., Svanborg, C., 2010. Structure and function of human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes. *FEBS J.*, 277, 4614–4625.
- Ngueyen, T.T.P, Bhandari, B., Cichero, J., Prakash, S., 2015. Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An in vitro study. *Food Research International*, 76, 348–358.

- Noziere, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M., 2006. Ca- rotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 418-450.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021.
- Orlandi, M., Curadi, M. C., Monti, L., Cattaneo, T. M. P., 2016. Sialylated oligosaccharides in mare and ass milk: Preliminary results. *Progress in Nutrition*, 18, 283–287.
- Pappin, D. J., Hojrup, P., Bleasby, A. J., 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology*, 3(6), 327-332.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68 , 88-113.
- Pegolo, S., Stocco, G., Mele, M., Schiavon, S., Bittante, G., Cecchinato, A., 2017. Factors affecting variations in the detailed fatty acid profile of Mediterranean buffalo milk determined by 2-dimensional gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 100, 2564–2576.
- Penders, J., Gerhold, K., Stobberingh, E. E., Thijs, C., Zimmermann, K., Lau, S., Hamelmann, E., 2013. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132, 601-607.
- Pereira, P. C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30, 619-627.
- Permyakova, E.A., Berliner, L.J., 2000. α -Lactalbumin: Structure and function. *FEBS Letters*, 473, 269–274.
- Pelligrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R., 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439–448.
- Picciano, M.F., 2001. Representative values for constituents of human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48, 263–264.
- Pilla, R., Dapra, V., Zecconi, A., Piccinini, R., 2010. Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *The Journal of dairy research*, 77(4), 392.
- Polidori, P., Beghelli, D., Mariani, P., Vincenzetti, S., 2009. Donkey milk production: state of the art. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2), 677-683.
- Potočník, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini, A., 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 61, 107-113.
- Pugh D. G., 2002. Donkey Reproduction. *Annual Convention of AAEP*.
- Qian, W. J., Jacobs, J. M., Liu, T., Camp, D. G., Smith, R. D., 2006. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(10), 1727-1744.
- Ragona, G., Corrias, F., Benedetti, M., Paladini, I., Salari, F., Altomonte, I. , 2016. Amiata donkey milk chain: animal health evaluation and milk quality. *Italian Journal of Food Safety*, 5, 173-178.

- Raiten, D. J., Talbot, J. M., Waters, J. H., 1998. Assessment of nutrient requirements for infant formulas. *The Journal of nutrition*, 128(11), 2059S-2294S.
- Roginski H, Fuqua JW, Fox P.F., 2009. *Encyclopedia of dairy sciences*. Elsevier Science Publishing Co Inc, UK, pp. 458-613.
- Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., Schulin, R., 2013. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(2), 144.
- Salari, F., Altomonte, I., Ribeiro, N. L., Ribeiro, M. N., Bozzi, R., Martini, M., 2016. Effects of season on the quality of Garfagnina goat milk. *Italian Journal of Animal Science*, 15(4), 568-575.
- Salimei, E., 1999: Latte di equide: dalla storia, una proposta dietetica e terapeutica. 1st Congress Nuove acquisizioni in materia di alimentazione, allevamento e allenamento del cavallo sportivo. Campobasso, Italy, March 26, 1999.
- Salimei, E., Fantuz, F., 2012. Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24, 130-142.
- Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Polidori P., Varisco G., 2004. Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Research*, 53 (1), 67-78.
- Šarić, L.C., Šarić, B.M., Mandić, A.I., Torbica, A.M., Tomić, J.M., Cvetković, D.D., Okanović, D.G., 2012. Antibacterial properties of domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, 25, 142–146.
- Šarić, L.C., Šarić, B.M., Kravić, S.T., Plavšić, D.V., Milovanović, I.L., Gubić, J.M., Nedeljković, N.M., 2014. Antibacterial activity of domestic Balkan donkey milk toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food and Feed Research*, 41, 47–54.
- Seppo, L., Korpela, R., Lonnerdal, B., Metsaniitty, L., Juntunen-Backman, K., Klemola, T., Paganus, A., Vanto, T., 2005. A follow-up study of nutrient intake, nutritional status, and growth in infants with cow milk allergy fed either a soy formula or an extensively hydrolyzed whey formula. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 140-145.
- Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C.G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., Kongi, K., Cantuti, L., Hanisch, U.K., Philips, M.A., Rossner, M.J., Mann, M., Simons, M., 2015. Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature Neuroscience*, 18, 1819-1831.
- Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T.P., 2013. Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein. *International Journal of Peptides*, 2013, 390230.
- Sischo, W.M., Short, D.M., Geissler, M., Bunyatratkata, A., Barile, D., 2017. Comparative composition, diversity, and abundance of oligosaccharides in early lactation milk from commercial dairy and beef cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 3883–3892.
- Skoog, D., Holler, J., Crouch, S., 2006. *Principles of Instrumental Analysis, 6th edition*, pp. 936-945.
- Solaroli, G., Pagliarini, E., Peri, C., 1993. Composition and nutritional quality of mare's milk. *Italian Journal of Food Science*, 5, 3-10.

- Starkey, P., Starkey, M., 1997. Regional and World trends in Donkey Populations. Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA).
- Svensson, M., Sabharwal, H., Hakansson, A., Mossberg, A.K., Lipniunas, P., Leffler, H., Svanborg, C., Linse, S., 1999. Molecular Characterization of α -Lactalbumin Folding Variants That Induce Apoptosis in Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 6388–6396.
- Swar, M.O., 2011. Donkey milk-based formula: A substitute for patients with cow's milk protein allergy. *Sudanese Journal of Paediatrics*, 2011, 11, 21-24.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., Macia, L., 2014. The role of short-chain fatty acids. In W. Frederick (Ed.), *Health and disease*, pp 91–119. Massachusetts, NE, USA: Academic Press.
- Tesse, R., Paglialunga, C., Braccio, S., Armenio, L., 2009. Adequacy and tolerance to ass's milk in an Italian cohort of children with cow's milk allergy. *Italian Journal of Pediatrics*, 35, Article 19.
- Thurl, S., Munzert, M., Boehm, G., Matthews, C., Stahl, B., 2017. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews*, 75, 920–933.
- Tidona F., Criscione A., Devold T.G., Bordonaro S., Marletta D., Vegarud, G.E., 2014. Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns: Effects on digestibility. *International Dairy Journal*, 35 (1), 57-62.
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R. B., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., Aceto, S., Gaita, M., Cerino, P., Negri, R., Greco, L., Cani, P.D., Mollica, M.P., 2015. Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26, 1136-1146.
- Trujillo, J.M., Stenius, C., Christian, L.C., Ohno, S., 1991. Chromosomes of the horse the donkey and the mule. *Chromosoma*, vol 2, pp. 243- 248.
- Twyman, R., George, A. 2013. Garland Science (eds). *Principles of proteomics*, vol 2 pp. 51-56.
- Uniacke-Lowe, T., 2011. *Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems*. PhD thesis. Cork: University College Cork.
- Við Streym, S., Højskov, C.S., Møller, U.K., Heickendorff, L., Vestergaard, P., Mosekilde, L., Rejnmark, L., 2016. Vitamin D content in human breast milk: A 9-mo follow-up study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 103, 107-114.
- Villoslada, F., Olivares, M., Xaus, J., 2005. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *Journal of Dairy Science*, 88, 1654–1660.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., Vita, A., 2008. Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*, 106, 640-649.
- Vincenzetti, S., Pucciarelli, S., Polzonetti, V., Polidori, P., 2017. Role of proteins and of some bioactive peptides on the nutritional quality of donkey milk and their impact on human health. *Beverages*, 3(3), 34.

- Vita, D., Passalacqua, G., Di Pasquale, G., Caminiti, L., Crisafulli, G., Rulli, I., Pajno, G.B., 2007. Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: crossover comparison with goat's milk. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18, 594–598.
- Waltraud, K., Grunenfelder, H.P., Broxham, E., 2008. Donkey Breeds in Europe: Inventory, Description, Need for Action, Conservation; Report 2007/2008
- Ward, P.P., Paz, E., 2005. Conneely, O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: A critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2540–2548.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R., 2001. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*, 73, 5683–5690.
- Yamawaki, N., Yamada, M., Kan-no, T., Kojima, T., Kaneko, T., Yonekubo, A., 2005. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, 19, 171-181.
- Yao, Y., Zhao, G., Yan, Y., Mu, H., Jin, Q., Zou, X., Wang, X., 2016. Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk. *Food Research International*, 80, 61-69.
- Yates, J.R., 2004. Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 297–316.
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 49-79.
- Yates, J.R., Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T., 1993. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Analytical biochemistry*, 214(2), 397-408.
- Yilmaz, O., Wilson, R.T., 2013. The domestic livestock resources of Turkey: Notes on donkeys. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(2), 651-656.
- Yuhas, R., Pramuk, K., Lien, E. L., 2006. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. *Lipids*, 41, 851–858.
- Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Haimoud-Lekhal, D.A., 2016. Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition*, 1–12.
- Zhang, X.Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M.L., Ren F.Z. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, 19 (12), 1191-1195.
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.C., Yates, J.R., 2013. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 113, 2343-2394.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ανδρίτσος, Ν., 2008. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΩΤΕΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* Scott A, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΓΠΑ. κεφ 3, σελ. 43-44.

Θεοδοσίου, Ι.Α., 2012. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΟΝΟΥ, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΓΠΑ. κεφ 1, σελ. 4-9.

Θεοδωρίδης, Γ. (κύριος συγγραφέας), Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης Γ., Ζώτου Α. Σαμανίδου, Β., 2015. Βιοαναλυτική Χημεία. Εκδόσεις Κάλλιπος. Βιολογία Συστημάτων, Τεχνολογίες Omics, σελ. 17-21.

Ιωσηφίδου, Κ., Τιμπλή, Τ., 2014. Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΟΝΟΥ ΩΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΗ ΙΔΕΑ, Πτυχιακή Εργασία, ΤΕΙ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΑΚΗΣ. κεφ1, σελ.7.

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ.Ε., Φούντζουλα, Χ., 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. Εκδόσεις Κάλλιπος. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα, σελ. 223-246.

Κοροβέση, Α.Δ., 2019. ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΕΚΠΑ. κεφ1, σελ.1, κεφ5, σελ.49.

Κωνσταντουράκη, Γ.Α, Τουλούπη, Μ., 2018. Προσδιορισμός της φαρμακευτικής ένωσης μετφορμίνης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC και μελέτη της οξειδωτικής διάσπασής της, Πτυχιακή Εργασία, ΕΚΠΑ. κεφ 1, σελ 6.

Παπανδρέου, Χ., 2008. Διαφορές του πρόβειου από το βόειο γάλα και πως αυτές εντοπίζονται, Πτυχιακή Εργασία, ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ. κεφ 1, σελ. 1.

Ρόκα, Λ., 2013. Πρωτεομική προσέγγιση στις τρίχες του φύλλου της ελιάς, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΓΠΑ. κεφ 1, σελ. 27-32.

Τσεκούρας, Β., 2012. Μελέτη της επίδρασης της γήρανσης και του αντιοξειδωτικού τρογλιταζόνη στην οξείδωση κάλλων *Arabidopsis thaliana*. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΓΠΑ. κεφ Β, σελ 14