

Návod pro praktikum „Analýza struktury chromatinu“

Bi9042: Tatiana Vrtíková-Kubičárová, Eva Sýkorová a Jiří Fajkus

1. Izolace buněčných jader z rostlinných tkání

Před začátkem práce je nutno si připravit:

Pracovní roztoky - pufr **5xA**, pufr **1xA**, pufr **B**, pufr **C** (pro uchovávání nebo eventuelně jiný pufr, ve kterém budete pokračovat), Percoll, sterilní glycerol (pokud jádra zamrazujeme)

Laboratorní pomůcky - třecí miska s tloučkem, nádoba na dusík, odměrný válec, kádinka, nálevka, mlynářské hedvábí, centrifugační kyvety nebo Falconky, pipeta 1ml, modré špičky, centrifuga s rotorem odpovídajícím typu kyvet (dát vychladit na 4°C)

Izolace a filtrace probíhá v komorové lednici

1. 10g rostlinné tkáně se důkladně rozetře v třecí misce v tekutém dusíku na prášek. Prášek se přesype do kádinky a zalije postupně 60 ml pufru **A**
2. Obsah se přefiltruje přes mlynářské hedvábí do čisté kádinky nebo přímo do centrifugační kyvety.

Centrifugace probíhá v laboratoři, kyvety se ovšem celou dobu temperují na ledu, nutné mít předem vychlazenou centrifugu na 4°C

3. Kyvety se proti sobě vyváží (na předvážkách) a dají se odstředovat do předem vychlazené centrifugy na 4°C na 12min na 5000RPM
4. Supernatant se slije a sediment se opět rozsuspenderuje v dalších 15ml pufru **A**/kyvetu a opět se nechá odstředovat na 5000RPM/12min/4°C
5. Postup z bodu 4. se opakuje dokud se sediment nezbaví tmavězelených částic (chloroplasty a jejich shluky), které se v supernatantu rozpoznají jako nerozpustné malé okem viditelné částice, obvykle 2x
6. Sediment se rozsuspenderuje v 15ml v pufru **B**/kyvetu a centrifuguje na 7000RPM/10min/10°C
7. Pomocí dávkovací pipety (1 ml) s modrou seříznutou špičkou se odeberou jádra, která plavou na povrchu supernatantu do další čisté centrifugační kyvety. Je nutné dbát na to, aby se neodebraly případné zbytky chloroplastů, které se nepodařilo v předcházejících krocích úplně odstranit. V žádném případě neodebírat sediment ze dna zkumavky (obsahuje zejména škrobová zrna).
8. Odebraná jádra se nechají opět centrifugovat v pufru **B** na 7000RPM/10min/10°C. V tomto kroku se opatrně odebírá roztok pod jádry, až zůstanou na dně samotná jádra.
9. Jádra se mohou buď zamrazit na -70°C nebo se použijí přímo k další analýze. Pro skladování jader na -70°C se k jádrům přidá 1,5 ml pufru **C** a jádra se rozsuspenderují. Suspense jader se rozdělí na aliquoty po 400 µl, ke vzorkům se přidá po 400 µl sterilního glycerolu a promíchá. Pokud se jádra používají dále, převedeme je do příslušného pufru pro další postup.

Pufr A se připravuje z pufru 5xA a přidáním merkptoetanolu a PMSF.

Pufr A

10mM NaCl
10mM MES pH 6.0
5mM EDTA
250mM sacharóza
0,6% Triton X-100

5xA: 50mM NaCl 50mM MES (při naředění na 10mM má pH 6.0) 25mM EDTA 1250mM sacharóza 3% Triton 750µM spermidin

150 μ M spermidin
100 μ M PMSF
20mM merkptoetanol

Pufir B se pripravuje z pufiru A pridáním navážky Percollu.

Pufir B

2,4 g pufiru 5xA
18g Percoll
Těsně před použitím se přidá: 14,2 μ l merkptoetanolu
40 μ l 0,1M PMSF

Pufir C

10mM Tris-Cl pH 7,7
100mM síran amonný
10mM MgCl₂
5mM merkptoetanol

2. Štěpení genomové DNA na nukleozomy mikrokovou nukleázou

Před začátkem práce připravit a zkontrolovat:

Pracovní roztoky - nukleozómový pufir, STOP pufir, fenol ekvilibrovaný pufrem, směs fenol/chloroform/isoamylalkohol, chloroform/isoamylalkohol, MNasa, proteináza K, isopropanol, roztoky pro elektroforézu

Laboratorní pomůcky - termostat na 37°C a 50°C, stolní centrifuga, agarosová elektroforéza

1. čerstvě připravená jádra rozsuspendujeme v nukleozómovém pufiru a rozdělíme na stejné aliquoty (např. 400 μ l), pracujeme na ledu
2. do každého vzorku **kromě vzorku 0** přidáme MNasu na konečnou koncentraci 150U/ml
3. vzorky inkubujeme při 37°C a v jednotlivých časových intervalech (5', 10', 20', 40') reakci zastavíme přidávkem 1 objemu lyzačního roztoku = STOP pufir, vzorek promícháme
4. ke vzorkům přidáme proteinázu K (na konc. 200 μ g/ml) a inkubujeme 1 hodinu při 50°C
5. ke vzorkům přidáme 1 objem fenolu ekvilibrovaného pufrem, promícháme dobře na vortexu až zmléční a centrifugujeme při pokojové teplotě 2 min/14000rpm ve stolní centrifuze
6. odebereme vodní frakci do nové eppendorfky (obvykle je to horní vrstva, ale někdy jsou fáze převrácené), ke vzorkům přidáme 1 objem směsi fenol/chloroform/IAA, promícháme na vortexu a centrifugujeme při pokojové teplotě 1 min/14000rpm ve stolní centrifuze
pozn.: nesnažit se odebrat vodní fázi do úplného konce, aby nebyla znečištěna vysráženými proteiny, v žádném případě neodebírat druhou fázi
7. odebereme vodní frakci do nové eppendorfky, přidáme stejný objem směsi chloroform/isoamylalkohol, vortex, centrifugace při pokojové teplotě 1 min/14000rpm
8. odebereme vodní fázi do nové eppf, změříme si objem vzorku, přidáme 0,6 až 0,8 násobek objemu isopropanolu na srážení
9. vzorky promícháme převrácením a necháme ustát

Pozn.: obě fáze se musí spojit, pokud po ustátí pozorujeme rozdělení dvou fází, je nutno upravit objem vodní nebo isopropanolové frakce, aby se dosáhlo správného poměru smísení, a to přidáním isopropanolu nebo vodního roztoku s přísadkou soli (např. 0,3M acetát sodný, pH 5,5)

10. po 15 min stání při pokojové teplotě centrifugujeme vzorky 15 min/14000rpm při 25°C.

11. odebereme supernatant pipetou a pelet omyjeme 180ul 80%EtOH, opatrně stáhneme ethanol a pelet necháme vyschnout na vzduchu

pozn.: lze opatrně sušit i s použitím vývěvy a exikátoru nebo podobného systému, pozor na přesušení.

12. DNA rozpustíme v 20μl sterilní vody. Připravíme si jednotlivé vzorky pro nanesení - 4μl DNA, 1μl sterilní vody, 1μl 6x loading buffer (obsahuje bromfenolovou a xylencyanolovou modř)

13. Agarosová elektroforéza - nutno si připravit předem gel 2% agarosy v TAE pufru s etidiumbromidem (nebo 3% NuSieve agarosa v TBE pufru) a elektroforetickou vanu s TAE pufrům. Toto lze učinit v mezičase, např. čekání v bodě 4 a 11)

14. nanese do jamek gelu po 6μl připravených vzorků, marker. Elektroforézu můžeme nechat probíhat přes noc do druhého dne při nízké voltáži (30-40V), ráno pak na transiluminátoru zkontrolujeme jak je DNA rozdělena a upravíme voltáž

15. dokumentace gelu na dokumentačním systému nebo foto s červeným filtrem na kinofilm z transiluminátoru

Nukleozómový pufr:

50 mM Tris-Cl pH 8,0
125 mM sacharosa
5 mM MgCl₂
3 mM CaCl₂
10 mM merkaptoethanol
250 μm spermidin
100 μm PMSF

STOP pufr:

1% sarcosyl
0,5 M EDTA pH 8,0
2 M NaCl

Směs chloroform/isoamylalkohol:

24 dílů chloroform
1 díl isoamylalkohol

Směs fenol/chloroform/isoamylalkohol:

1 díl fenol ekvilibrovaný
1 díl směs chloroform/isoamylalkohol

3. Extrakce chromatinových proteinů

1. Pokud se pracuje přímo s nově připravenými jádry, jádra se promyjí 2x v **promývacím pufru** a odstředí 2000g/15min/4°C. (Pozor, aby při odlívání roztoku nedošlo i k vylití jader).
Pokud se pracuje s jádry které byly skladovány na -70°C, nutné nejdřív odstranit pufr C tím, že se po rozmrazení odstředí 2000g/15min/4°C a až pak promývat.
2. Usazená jádra na dně centrif. kyvety se rozsuspendují v 0,14M NaCl+ 10mM Tris-Cl pH 7,5.
3. Přidá se HCl na výslednou 0,25 M koncentraci a směs se nechá míchat v komorové lednici při 4-5°C na kolotoči 2 hod.
4. Vzorek se odstředí opět na 2000g/15min/4°C a odebere se supernatant.
5. K supernatantu se přidá studená kys. trichlóroctová (TCA) na 25% w/v. Vzorek se nechá inkubovat 30min na ledu za občasného promíchání.
6. Vzorek se odstředí 5000g/30min/4°C a odstraní se supernatant
7. Precipitát se promyje 1x v ledovém acetonu s 1M HCl; poměr = 98:1, odstředí se 2000g/15min/4°C a supernatant se odstraní.
8. Precipitát se promyje ještě 2x ledovým acetonem a pokaždé se odstředí 2000g/15min/4°C
9. Vzorky se nechají vysušit volně na vzduchu

Promývací pufr: 75mM NaCl 10mM EDTA 50mM Tris-Cl pH 8

4. Analýza chromatinových proteinů pomocí SDS-PAGE

K nalévání gelu se použije aparatura od BioRad Mini Protean, skla s 0,75mm spacerem.

12,5% running gel (15ml):	6,3 ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1)
	3,8ml 4x running buffer (1,5M Tris-Cl pH 8,8)
	0,15ml 10% SDS
	6ml H ₂ O
	40μl Amonium Persulfát 30% (APS)
	5μl TEMED

Vrchní okraj running gelu se zalije kapkou destilované vody a nechá se zatuhnout. Po ztuhnutí, se voda odsaje filtračním papírem a nalije se stacking vrstva, s 10-komůrkovým hřebínkem.

Stacking gel:	0,88ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1)
	1,66ml 4x stacking buffer (0,5M Tris-Cl pH 6,8)
	66μl 10% SDS
	4,06ml H ₂ O
	20μl APS 30%
	3,3μl TEMED

Na elektroforézu se používá glycinový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3), který získáme ředěním 10x ze zásobního roztoku.

Před nanesením se vzorky denaturují při 95°C / 5 min po přidání denaturační směsi s barvivem, která je připravena buď 2x nebo 4x koncentrovanější. Do první jamky se zpravidla nanáší proteinový marker (nedenaturuje se ani se nepřidává barvička, už je nabarvený od výrobce). V naší laboratoři se používá od firmy Fermentas; do jamky se nanáší 7μl.

2x denaturační barvička (pH 6,8):	0,125M Tris-Cl
	4% SDS
	20% v/v glycerol
	0,2M DTT
	0,02% Bromophenol blue

Na zaputování vzorku do stacking gelu se nastaví 50V, (proud při jednom skle 45mA, při dvou sklech 60 mA). Po zaputování do running gelu se zvýší napětí na 100-150V. Gel necháme běžet do doby, než se bromfenolová barvička přiblíží cca 2-5mm od dolního okraje. Po vypnutí a rozdělení aparatury se skla rozloží a gel se opatrně přemístí do misky, kde se nejdříve opláchnou vodou a potom se barví Coomasie briliantovou modří (**barvicí roztok fy BioRad**, na bázi kys. fosforečné), cca 1-2hod, na třepačce, při nízkých otáčkách. Další 1 hod se zhruba odbarvuje ve vodě. Výsledkem by měly být modře-nabarvené bandy na bezbarvém pozadí.