

Návody pro praktikum „Analýza struktury chromatinu“

Petra Procházková Schrupfová, Miloslava Fojtová

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 jader nebo eventuálně 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 (vychladit na 4°C).

Homogenizace a filtrace probíhá v komorové lednici

1. 10g rostlinné tkáně (mladé listy *Nicotina tabacum*) se důkladně rozetře v třecí misce v tekutém dusíku na prášek. Prášek se přesype do další třecí misky a zalije postupně 60 ml pufru 1xA.
2. Obsah se přefiltruje přes mlynářské hedvábí do kádinky a přelije do centrifugačních kyvet (objem 50 ml).

Centrifugace probíhá v předem vychlazené(4°C) centrifuze v laboratoři, kyvety s homogenátem se celou dobu temperují na ledu.

3. Kyvety se proti sobě vyváží (na předvážkách) a dají se odstřeďovat do předem vychlazené centrifugy na 5 000RPM/12min/4°C.
4. Supernatant se slije a sediment se rozsuspenduje (pomocí odstřižené modré špičky) v dalších 15 ml pufru 1xA (na každou kyvetu). Odstřeďování 5 000 RPM/12 min/4°C.
5. Postup z bodu 4 (promývání puřrem 1xA) se opakuje, dokud se sediment nezbaví tmavě zeleného zabarvení (způsobeného shluky chloroplastů); obvykle jsou třeba další dvě promytí.
6. Sediment se důkladně rozsuspenduje v 15 ml pufru B (na každou kyvetu) a centrifuguje 7 000 RPM/10 min/10°C.
7. Pomocí 1ml pipety s ustřiženou modrou špičkou se jádra flotující na povrchu percollového polštáře odeberou do čisté centrifugační zkumavky. Je nutné dbát na to, aby se neodebraly případné zbytky chloroplastů. Sediment na dně zkumavky obsahuje především škrobová zrna – NEODEBÍRAT!
8. K jádrům se opět přidá 15 ml pufru B (na každou kyvetu), jádra se rozsuspendují, centrifugace 7 000 RPM/10 min/10°C. Po centrifugaci se opatrně odebírá roztok pod jádry, na dně kyvety zůstanou jádra (je třeba zkontrolovat, jestli nejsou na dně centrifugační kyvety škrobová zrna, pokud ano, odebírají se jádra z povrchu stejně jako v bodě 7).

9. $\frac{1}{2}$ jader (jádra z jedné centrifugační kyvety) se použije na analýzu chromatinových proteinů; ke jádrům z druhé centrifugační kyvety se přidá 1 objem (zpravidla 1,5 ml) pufru C, jádra se v něm pomocí sestřižené modré špičky rozsuspendují. Suspenze se rozdělí po 400 μ l do eppendorfek, přidá se 400 μ l sterilního glycerolu a promíchá se. Jádra se v tekutém dusíku přenesou do mrazícího boxu (-70°C), kde se uchovají pro štěpení mikrokokovou nukleázou (pokus proběhne druhý den).

Pufr 1xA se připravuje z pufru 5xA, přidá se PMSF a merkptoetanol.

Pufr 1xA

10mM NaCl

10mM MES pH 6.0

5mM EDTA

250mM sacharóza

0,6% Triton X-100

150 μ M spermidin

těsně před použitím (po naředění pufru 1xA ze zásobního 5xA) se přidá:

PMSF do koncentrace 100 μ M (zásobní roztok 0,1M)

merkptoetanol do koncentrace 20mM (zásobní roztok 14,3M).

Pufr 5xA

50mM NaCl

50mM MES (při naředění na 10mM má pH 6.0)

25mM EDTA

1,25M sacharóza

3% Triton

750 μ M spermidin

koncentrace zásobních roztoků:

5M NaCl

0,5M MES

0,5 M EDTA

prášek (Mr=342,30)

100%

1M spermidin

Pufr B se připravuje z pufru 5xA přidáním navážky Percollu.

Pufr B

2,4 g pufru 5xA

18g Percoll

těsně před použitím se přidá (do tohoto množství):

14,2 μ l merkptoetanolu

40 μ l 0,1M PMSF

Pufr C

10mM Tris-Cl pH 7,7

100mM síran amonný

10mM MgCl₂

5mM merkptoetanol

koncentrace zásobních roztoků:

1M Tris-Cl

2M síran amonný

prášek (Mr=203,31-hexahydrát))

14,3M merkptoetanol

2. Štěpení chromatinu na nukleozómy mikrokokovou nukleázou

Před začátkem práce připravit a zkontrolovat:

Pracovní roztoky - nukleozómový pufr, STOP pufr, směs fenol/chloroform/isoamylalkohol, směs chloroform/isoamylalkohol, MNáza, proteináza K, isopropanol, roztoky pro elektroforézu.

Laboratorní pomůcky - termostat na 37°C a 50°C (termobloček), stolní centrifuga, aparatura na agarózovou elektroforézu.

1. Na ledu přineseme jádra z mrazícího boxu. Po rozmrznutí suspenzi jader centrifugujeme (2 000 g/10 min/4°C), sediment rozsuspendujeme v nukleozómovém pufru. Opět centrifugujeme.
2. Pro experiment použijeme 5 alikvotů suspenze jader (po 400 µl), alikvoty označíme dle doby inkubace s MNázou 0, 5', 10', 20', 40'.
3. Do každého vzorku (kromě alikvoty 0) přidáme MNázu na konečnou koncentraci 150 U/ml (zásobní koncentrace MNázy je 30 000 U/ml)
4. Vzorky inkubujeme v bločku při 37°C 5', 10', 20' a 40'. Reakci zastavíme přidáním 1 objemu (400 µl) STOP pufru, promícháme pipetou.
5. Ke vzorkům přidáme proteinázu K do koncentrace 200 µg/ml (zásobní koncentrace 20 mg/ml), inkubujeme 1 hod / 50°C.
6. Přidáme 1 objem směsi fenol/chloroform/IAA, promícháme na vortexu, centrifugujeme při pokojové teplotě 14 000RPM/5 min.
7. Odebereme vodnou fázi (obvykle horní vrstva) do nové eppendorfky (OPATRNĚ, aby nedošlo ke znečištění vodné fáze mezifází; je lépe o část vzorku přijít, než přenést znečištěnou frakci), přidáme 1 objem směsi chloroform/IAA, vortex, centrifugace při pokojové teplotě 14 000RPM/5 min.
8. Odebereme vodnou fázi do nové eppendorfky, změříme objem, přidáme 0,6 násobek objemu izopropanolu. Opatrně promícháme převrácením, necháme stát 15 minut při pokojové teplotě. Pokud dojde při promíchávání vzorků k oddělení fází, je nutno upravit objem vodné a izopropanolové frakce (přidáním izopropanolu nebo 0,3M octanu sodného pH 5,5).
9. Centrifugujeme 14 000RPM/15 min/laboratorní teplota.
10. Supernatant odebereme pipetou, sediment omyjeme 200 µl 80% etanolu, znovu centrifugujeme (stačí 5 minut). Pipetou odebereme etanol a sediment vysušíme na vzduchu nebo v termostatu při 37°C. Pozor na přesušení, DNA se potom obtížně rozpouští!!
11. DNA rozpustíme ve 20 µl sterilní vody.
12. Pro nanášení na agarózový gel si připravíme: 4 µl DNA, 1 µl sterilní vody, 1 µl 6x nanášecího pufru (obsahuje bromfenolovou a xylencyanolovou modř).
13. Elektroforéza bude probíhat na 2% agarózovém gelu v přítomnosti ethidiumbromidu v 1xTAE pufru. Gel je nutno si připravit předem (např. během inkubace s proteinázou K, bod 5).

14. Do jamek nanese přípravené vzorky DNA a hmotnostní standard. Elektroforéza probíhá při nízké voltáži (20V) přes noc. Ráno na transiluminátoru zkontrolujeme vzorky, případně zvýšíme voltáž a dokončíme elektroforézu.
15. Gel zdokumentujeme na systému LAS3000 (FUJI Film) v kanálu pro detekci signálu ethidiumbromidu.

Nukleozómový pufr:

50 mM Tris-Cl pH 8,0
125 mM sacharóza
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 chloroformu
1 díl isoamylalkoholu

Směs fenol/chloroform/isoamylalkohol:

1 díl ekvilibrovaného fenolu
1 díl směs chloroform/isoamylalkohol

Příprava 2% agarózového gelu:

147 ml 1xTAE pufru (50x TAE: 242 g TRIS-Cl, 100 ml 0,5M EDTA a 10 ml kyseliny octové v konečném objemu 1000 ml; pH 7,7)
3 g agarózy

Rozvařit v mikrovlnné troubě, průběžně VELMI OPATRNĚ (pozor na utajený var) promíchávat. Ochladit pod tekoucí vodou (za stálého promíchávání) na cca 60°C. Přidat 30 μl ethidiumbromidu (zásobní koncentrace 1 mg/ml). Nalít do formy (nezapomenout na hřebínek), nechat zatuhnout.

3. Extrakce chromatinových proteinů

1. Jádra se promyjí 2x v promývacím pufru (množství promývacího pufru záleží na množství vyizolovaných jader)
2-10ml promývacího pufru v 15ml zkumavce/2000g/15min/4°C.
(Pozor, aby při odlívání roztoku nedošlo i k vylití jader).
2. Usazená jádra na dně centrif. kyvety se rozsuspendují v rozsuspendovacím pufru.
3. Přidá se HCl na výslednou koncentraci 0,25 M a směs se nechá míchat v komorové lednici při 4-5°C na kolotoči 1,5-2 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 (navážit prášek). Vzorek se inkubuje 30min na ledu za občasného promíchání.
6. Vzorek se odstředí 5000g/30min/4°C a odstraní se supernatant (odpipetuje)
7. Precipitát se promyje 1x v ledovém acetonu s 1M HCl; poměr = 98:1, odstředí se 2000g/15min/4°C a supernatant se odstraní (odpipetuje).
8. Precipitát se promyje ještě 2x ledovým acetonem a pokaždé se odstředí 2000g/15min/4°C.
9. Vzorky se nechají vysušit volně na vzduchu (asi 10min).
10. Po vysušení vzorky rozpustit v 50ul rozpouštěcího pufru.
11. Koncentraci proteinů změřit spektrofotometricky, dle Bradfordové:
980 ul Bradford + 20 ul (H₂O=blank, vzorek), měření A při 595 nm. Podle již vytvořené kalibrační křivky zjistit koncentraci vzorků (koncentrace vyizolovaných proteinů by měla být 10-20ug/ul).

Promývací pufr:

75mM NaCl
10mM EDTA
50mM Tris-Cl pH 8

Rozsuspendovací pufr:

0,14M NaCl
10mM Tris-Cl pH 7,5

Rozpouštěcí pufr:

10mM fosfátový pufr pH=7,5
3mM EDTA
5%SDS

4. Analýza chromatinových proteinů pomocí SDS-PAGE

K nalévání gelu se použije aparatura od BioRad Mini-Protean, skla s 1mm spacerem.

17% running gel (15ml):

5,7 ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1)
2,5 ml 4x running buffer (1,5M Tris-Cl pH 8,8)
0,1ml 10% SDS
1,7ml H₂O
50μl 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/šířka 1mm.

Stacking gel: 0,88ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1) (AA:crosslinker)
1,66ml 4x stacking buffer (0,5M Tris-Cl pH 6,8)
66μl 10% SDS (sodiumdodecylsulfate, aniontový detergent)
4,06ml H₂O
20μl APS 30% (amonium persulfate, iniciátor)
3,3μl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, katalyzátor)

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.

Do jedné jamky gelu dáváme 5-15ug celkových proteinů. Množství záleží na koncentraci (celkový objem i s denaturační směsí max. 15ul)

Před nanesením se vzorky denaturují při 85°C / 5 min po přidání denaturační směsi s barvivem, tato směs je připravena 2x koncentrovaná. 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 5μl.

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 opláchne vodou a potom se barví Coomasie brilantovou modří (barvicí roztok fy BioRad, na bázi kys. fosforečné), cca 1-2hod, na třepačce, při mírném třepání.

Další asi 1 hod se odbarvuje ve vodě. Výsledkem by měly být modře-nabarvené bandy na bezbarvém pozadí.

Před cvičením je nutné:

1. Pečlivě pročíst protokoly, případné nejasnosti v postupech konzultovat s některým ze cvičících
2. Připravit výpočty pro přípravu roztoků:
 - 100 ml pufru 5xA ze zásobních roztoků (koncentrace zásobních roztoků jsou uvedeny v protokolu)
 - 100 ml pufru 1xA z pufru 5xA (+PMSF a merkaptoetanol)
 - 100 ml pufru C ze zásobních roztoků
 - Kolik HCl (koncentrace zásobního roztoku 35%, 1 litr váží 1,18 kg, $M_r=36,45$) je třeba přidat k 10 ml Rozsuspendovacího pufru (bod 3, Extrakce chromatinových proteinů), aby výsledná koncentrace HCl byla 0,25M.

Cvičení začne v úterý 18. 5. v 8.00 hodin v seminární místnosti v 1. patře A2 (místnost, kde probíhaly přednášky).

První den budete izolovat jádra, extrahovat chromatinové proteiny a připravovat SDS-PAGE.

Druhý den proběhne SDS-PAGE, mezitím provedete štěpení chromatinu MNázou, extrakci DNA a agarózovou elektroforézu. Elektroforéza poběží přes noc, výsledky vám budou zaslány na e-mail. Následné diskuse výsledků jsou možné (a vítané).