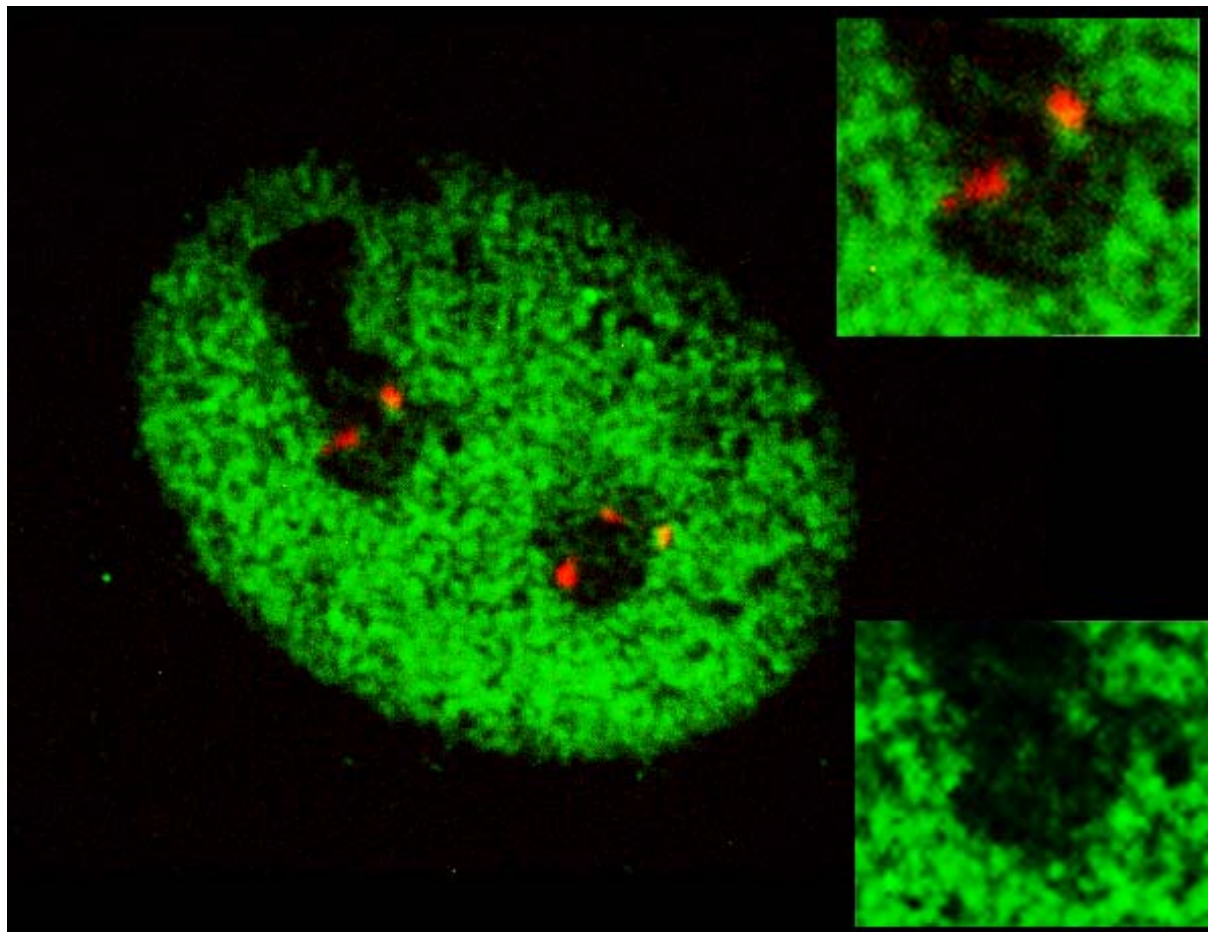


Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky



**Metody používané v Laboratoři molekulární cytologie a
cytometrie**

1. Kultivace a diferenciacie buněk

Laboratoř se zabývá biologií řady buněčných linií i primárních buněčných kultur. *In vitro* byly studovány jak adherentní, tak suspenzní buněčné linie, které byly kultivovány ve vhodných médiích a dále pasážovány, diferencovány a ovlivněny různými činidly, jak je uvedeno v příložených publikacích. Většinou jsme jako diferenciační činidlo používali kyselinu *all-trans* retinovou (RA), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), interleukin 3 (IL-3), nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Pro kultivace suspenzních, převážně leukemických nebo myelomových linií, bylo použito médium RPMI-1640 s 10 % fetálního telecího séra. Adherentní linie se většinou kultivovaly v médiu D-MEM s 10 % fetálního telecího séra. V posledních dvou letech jsme se v laboratoři začali zabývat studiem struktury chromatinu u lidských embryonálních kmenových buněk (hESCs), které se kultivují na podkladové vrstvě myších embryonálních fibroblastů (MEFs). Myší embryonální fibroblasty, izolované a připravené v naší laboratoři, byly kultivovány v médiu D-MEM s 10 % fetálního telecího séra, 500 U/ml penicilinu, 5 mg/ml streptomycinu, na miskách pokrytých 0.1% želatinou. Po dosažení požadované hustoty buněk byl k fibroblastům přidán mitomycin C, po dobu 3 hodin (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo), což bylo nutné k zastavení proliferační aktivity buněk. Poté následovalo důkladné promytí roztokem PBS a k vrstvě MEF buněk byly přidány lidské ES buňky. Kultivace lidských ES buněk probíhá v kompletním médiu KO-DMEM (Invitrogen Gibco) pro ES buňky obsahující 500 U/ml penicilinu, 5 mg/ml streptomycinu, 200 mM Glutamaxu (Invitrogen Gibco), NEEA („non-essential amino acids, PAN), β -merkaptotanol (Invitrogen Gibco), KO-serum replacement (Invitrogen Gibco). Dále byl do média přidán faktor bFGF o konečné koncentraci 10 ng/ml („Fibroblast Growth Factor“, Invitrogen, USA) a faktor hLIF o konečné koncentraci 12 ng/ml („Leukaemia Inhibitory Factor“, Chemicon International, USA), které zabraňují diferenciaci hESCs. Je známo, že LIF faktor se používá k udržení pluripotence myších embryonálních kmenových buněk (mESCs), ale kultivační protokol z laboratoře Prof. D. Meltona (Harvard University, USA) doporučuje použití LIF faktoru i u hESCs. V případě kultivace hESCs je třeba buňkám vyměňovat médium každý den a k jejich pasážování se používá buď 0.05% trypsin a nebo vypichování kolonií kmenových buněk. Pro indukci diferenciacie, byla k buňkám přidána 2 μ M kyselina retinová („*all-trans* retinoic acid“, RA, Sigma Aldrich) po dobu 4 dní. Při každé výměně kultivačního media byla RA znovu přidána a 4. den se buňky fixovaly na krycí sklíčka pro DNA, RNA hybridizaci nebo byly lyzovány pro western bloty a izolaci RNA. Kultivace všech

buněk probíhala vždy při standardních podmínkách, tj. při teplotě 37°C a v atmosféře s 5% obsahem CO₂.

Dále studujeme myší embryonální fibroblasty (MEFs) získané z myši s vyblokovanou transkripční aktivitou genu, který kóduje lamin A/C (LMNA^{-/-}) a další buňky s deficiencí na histonovou methyl transferázu Suv39h1 (Suv39h1^{-/-}). Tyto buňky jsou kultivovány v D-MEM médiu. Wild type MEFs a Suv39h1^{-/-} fibroblasty byly získány z laboratoře Prof. Thomase Jenuweina, Research Institute of Molecular Pathology, Vienna Biocenter, Austria (Max-Planck Institute of Immunobiology, Freiburg, Germany). Buňky se kultivují v D-MEM (#D1152, Sigma-Aldrich, CZ) s 10 % fetálního telecího séra (PAN, Germany), 100 i.u./ml penicilinu a 0.1 mg/ml streptomycinu. D-MEM (pH 7.2) obsahuje 1 μl β-merkaptoetanolu (Gibco, #31350-010), 5 ml NEEA (100x) (Gibco, # 11140-035), 5 ml pyruvátu sodného (Gibco, # 11360-039) a 1.5g NaHCO₃. Buňky se kultivují při standardních podmínkách 37°C, ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂.

2. Imuno-fluorescenční značení interfázních jader

Pro 3D analýzy byly buňky fixovány po dobu 10 minut pomocí 4% paraformaldehydu, pak následovala permeabilizace buněk 8 minut roztokem 0.1% Tritonu X100 v PBS a 12 minut v roztoku 0.1% saponinu (Sigma-Aldrich, Germany) při pokojové teplotě (PT). Poté byly preparáty opláchnuty 2x po 15 minutách v PBS a inkubovány v 1% BSA přibližně 1 hodinu, rovněž při PT. Poté byl preparát propláchnut v PBS a byly nanесeny příslušné primární protilátky naředěné většinou v poměru 1:200 v 1% BSA. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 4°C. Příklady některých použitých protilátek jsou následující: anti-HP1α (klon 15.19s2; Upstate, USA), anti-HP1β (#07-333 Upstate, USA) anti-HP1γ (klon 42s2, Upstate, USA), anti-SC-35 (#ab11826 Abcam, Velká Británie), anti-CENP-A (#ab13939, Abcam, Velká Británie), anti-PML (#ab6263, Abcam, Velká Británie), anti-TIF1β (C-16) (sc-19168, Santa Cruz, USA), anti-Oct-3/4 (C-10) (sc-5279, Santa Cruz, USA) a další. Po inkubaci s primární protilátkou byly preparáty promyty 2x po 5 minutách v PBS a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s vhodným fluorochromem (ředění bylo většinou 1:200 v 1% BSA). Použili jsme následující sekundární protilátky: anti-rabbit IgG-FITC (#F9887, Sigma, Německo), donkey anti-goat IgG-FITC (#sc-2024, Santa Cruz, USA), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (#A11005, Molecular Probes, Invitrogen, KRD Ltd., Česká Republika). Nabarvené preparáty byly nakonec promyty 3x po 5 minutách v PBS a celková DNA byly obarvena TO-

PRO-3 (R)-3 jodidem (0.04 µg/ml, Invitrogen, USA). Všechny preparáty byly pozorovány, snímány a hodnoceny pomocí laserového konfokálního mikroskopu.

3. Značení F-aktinových vláken pomocí phalloidinu

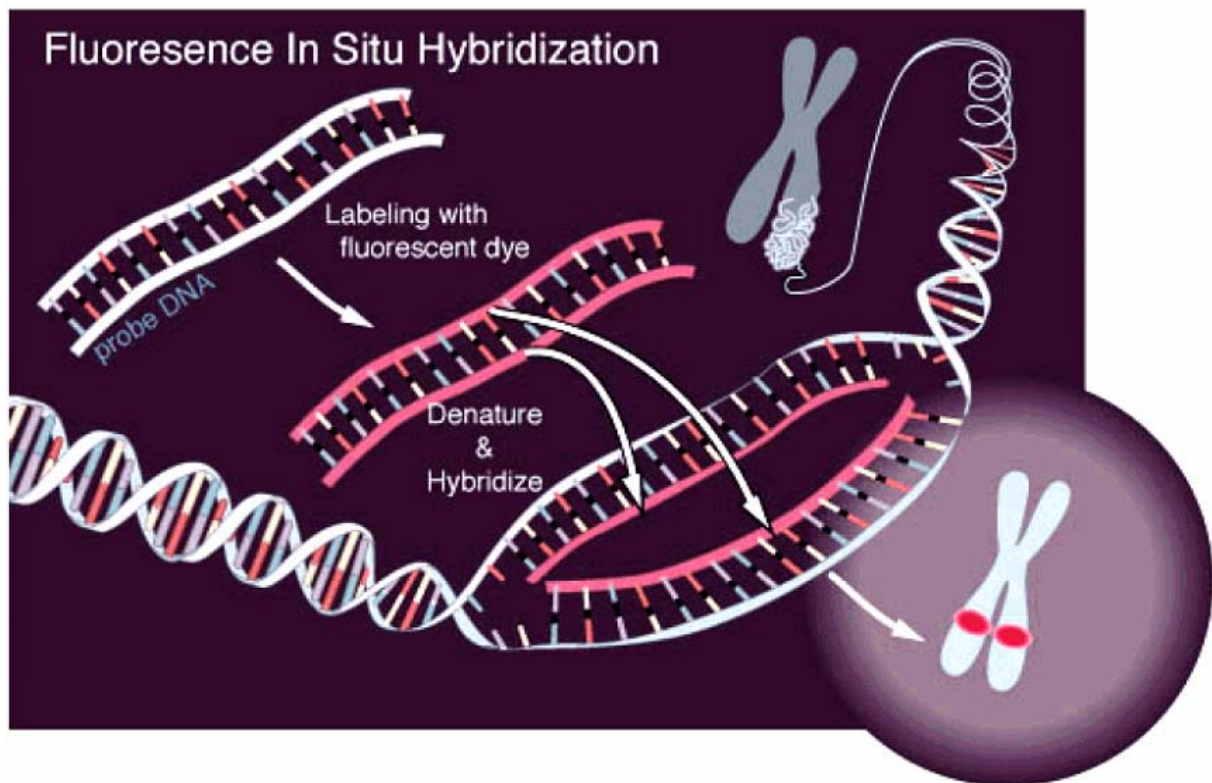
Adherentní buňky, kultivované na krycích mikroskopických sklech, se fixují 4% paraformaldehydem, 10 min, pak se opláchnou PBS a dále se provádí permeabilizace buněk 0.1% Tritonem X-100 po dobu 8 min. Následuje omytí preparátu v PBS po dobu 5 min a na podložní mikroskopické sklíčko se napipetuje 10 µl Phalloidinu (1g/ml, Sigma, Germany) konjugovaného s FITC (fluorescenční značka). Krycí skla s buňkami se ponoří do vytvořené kapky a probíhá inkubace 40-45 min při pokojové teplotě a tmě. Pak se buňky opláchnou 2x 5 min v PBS a provede se barvení buněčných jader pomocí TO-PRO-3 iodidu (0.04 µg/ml), inkubace 8 min při PT, pak následuje opláchnutí v 2x SSC a přidá se „mounting“ medium Vectashield. Vizualizace F-aktinových vláken se provede pomocí konfokálního mikroskopu.

4. DNA izolace z BAC/PAC klonů a nick translace - příprava DNA sondy pro FISH techniku

DNA z BAC/PAC klonů byla izolována pomocí QIAGEN Large Construct kitu. Purifikované DNA fragmenty byly značeny pomocí DIG- nebo BIOTIN-Nick Translačního Mixu (Roche, Německo). Podle protokolu, byl v nově syntetizované DNA každý 20.-25. nukleotid modifikován pomocí DIGOXIGENIN-11-dUTP nebo BIOTIN-16-dUTP. Velikost fragmentů značené DNA byla v rozmezí 200-500 nukleotidů. Pro nick translaci jsme použili 1µg DNA, která byla rozpuštěná v destilované vodě o konečném objemu 16µl. K tomuto objemu byly přidány 4µl DIG- nebo BIOTIN-Nick translačního mixu. Vzorky byly inkubovány při 15°C, po dobu 90 min. Reakce byla zastavena přidáním 1µl 0.5M EDTA a zahřátím na 65°C, po dobu 10 min. V dalším kroku byla aplikována lidská Cot-1 DNA (Roche, Německo), pomocí níž je eliminována hybridizace sond k repetitivním elementům. V reakcích jsme použili 120 ng DIG- nebo BIOTIN-značené DNA, 6µg Cot-1 DNA a “salmon sperm” DNA, která byla přidána pro získání celkového množství 20µg DNA. Pak byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2 objemy zchlazeného 96% ethanolu (-20°C). Inkubace probíhala při -70°C, po dobu 30 min. Pak byly vzorky centrifugovány při 12 000 rpm, po dobu 15 min a pelet byl pak opláchnut 400 µl 70% ethanolu (-20°C). Poté byl pelet lyofylizován a rozpuštěn ve 20 µl hybridizačního pufru (Hybrizol VII od firmy Oncor, USA).

5. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Buňky byly fixovány stejným způsobem jako při imuno-fluorescenčním barvení a pak následovala jejich permeabilizace po dobu 15 minut v 0.1 M HCl s 0.2% Tritonem X-100 v PBS (pH 7.2), poté 10 minut v 0.1 M Tris a 15 minut v 0.2% saponinu (Sigma-Aldrich, Německo). Dále byly fixované buňky opláchnuty v PBS 3x 2 minuty a ekvilibrace proběhla po dobu 20 minut ve 20% glycerolu. Pak byla sklíčka s buňkami 3x ponořena do tekutého dusíku a dehydratována po 2 minutách v etanolové řadě roztoků o koncentracích 70%, 80% a 96% při PT. Cílová DNA byla denaturována po dobu 15 minut v 50% formamidu při teplotě 80°C. Pak následovala dehydratace po 2 minutách v etanolové řadě roztoků o koncentracích 70%, 80% a 96% (-20°C). Připravené denaturované DNA sondy byly nanášeny na preparáty a inkubovány přes noc při 37°C ve vlhké komůrce. Celochromozomové sondy byly zakoupeny od firmy Cambio (Velká Británie). Sondy pro jednotlivé genové lokusy byly většinou připraveny v naší laboratoři z BAC a PAC klonů podle Harničarová et al. Exp. Cell Res. (2006). Denaturace sond probíhala po dobu 10 minut při 75°C a „annealing“ byl 15-30 minut při 37°C. Komerční translokační sondy pro PML/RAR α (LPH 004) geny nebo BCR/ABL lokusy byly dodány firmou Cytocell Technologies (Velká Británie) nebo Oncor (USA). Komerční sondy byly denaturovány podle přiloženého protokolu. V další fázi experimentů byly preparáty promývány po dobu 15 minut v 50% roztoku formamidu a 8 minut v roztoku 0.1% Tweenu ve 2 x SSC obojí při 43°C ve vodní třepací lázni. Pak následovalo opláchnutí preparátů v 0.2% Igepalu, který byl rozpuštěný ve 4 x SSC. Inkubace probíhala 4 minuty při PT. Tímto krokem končí postup promývání sondy, která je přímo fluorescenčně značená. Na nepřímo značenou sondu, například digoxigeninem nebo biotinem, se pak aplikuje příslušná protilátka konjugovaná s fluorochromem, jako je například FITC-Avidin (Roche, Německo) nebo Rhodamin-anti-digoxigenin (Roche, Německo). Dalším krokem je inkubace po dobu 15 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Nadbytečná nenavázaná protilátka se pak vymyla 3x po 4 minutách v roztoku 4 x SSC při 37°C ve vodní lázni. Dále se preparát opláchnul ve 4 x SSC po dobu 4 minut při pokojové teplotě. Buněčná jádra se obarvila buď DAPI (0.2 μ g/ml) v roztoku Vectashieldu (Vector Laboratories, USA) nebo TO-PRO-3 jodidem (0,04 μ g/ml, Molecular Probes, Invitrogen, USA). Analýza se opět prováděla pomocí laserové konfokální mikroskopie.



Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je metoda, která se využívá ke stanovení vybraných sekvencí DNA nebo RNA pomocí specifických sond. Princip je uveden na obrázku.

6. RNA-FISH

Jaderná lokalizace c-myc genových transkriptů byla studována v práci Harničarová et al. (2006) a Bártová et al. (2008) pomocí metody RNA-FISH (Levsky et al., 2002; Wilson et al., 2002) V těchto experimentech jsme použili biotinem značenou 50-mer oligo-próbu, jejíž sekvence byly popsány v práci Levsky et al. (2002). Oligo-próby byly cílené na úsek exonu II a exonu III c-myc genu a jejich sekvence jsou uvedeny na webových stránkách: <http://singerlab.aecom.yu.edu>, a rovněž publikovány v práci Harničarová et al. (2006). Sekvence oligo-prób jsou následující: 1) 5'-TCG T*AG TCG AGG T*CA TAG TTC CT*G TTG GTG AAG CT*A ACG TT*G AGG GGC AT-3' and 2) 5'-CCA CAT* ACA GTC CTG GAT* GAT GAT GTT TT*T GAT GAA GGT* CTC GTC GT*C CG-3' and 3) 5'-TGA CCT* TTT GCC AGG AGC CT*G CCT CTT TT*C CAC AGA AAC AAC AT*C GAT* TT-3' and 4) CTG GT*G CAT TTT CGG T*TG TTG CTG AT*C TGT CTC AGG ACT* CTG ACA CT*G TC-3' and 5) GGC CTT* TTC ATT* GTT TT*C CAA CTC CGG

GAT* CTG GT*C ACG CAG GGC AAA AA-3' (hvězdička značí inkorporovaný biotin). Všechny roztoky pro RNA-FISH byly připraveny ve 2x destilované vodě s rozpuštěným diethylpyrokarbonátem (DEPC) (Harničarová *et al.* 2006).

Buňky, které rostly na krycích sklech byly opláchnuty 1x PBS-MgCl₂ (PBS-M) a dále byly fixovány 10 min při PT ve 4% formaldehydu, který byl smíchán s 10% kyseliny octové, což zvyšovalo pravděpodobnost detekce jaderné RNA. Permeabilizace byla provedena v 0.5% Tritonu X100 po dobu 5 min, na ledu. Pak byla buněčná jádra permeabilizována v 0.1% saponinu, po dobu 10 min. Dále byly preparáty opláchnuty 3x 5 min v PBS-M a 5 min v 2 x SSC při PT. Nakonec byly buňky permeabilizovány v 70% etanolu, přes noc, při 4⁰C. Druhý den byly buňky rehydratovány 10 min při PT v PBS-M a dále denaturovány 10 min v 50% formamidu. Následně proběhla hybridizace po dobu 4 hodin, při 37⁰C, ve 20 µl hybridizační směsi, která obsahovala: 10% dextran sulfate, 1 µg/µl tRNA v 2 x SSC, 1 pmol/µl každého biotin-konjugovaného oligonukleotidu. Po hybridizaci byly buňky opláchnuty 3x 5 min v 4 x SSC s 0.1% Tweenem 20, při PT a 20 min v 4 x SSC s 0.1% Tweenem 20 a 3% BSA, při PT. Následně byl aplikován FITC-konjugovaný avidin (Oncor, USA) po dobu 20 min, při PT. Nakonec byly buňky propláchnuty 3x 5 min v 4 x SSC s 0.1% Tweenem. K vizualizaci interfázních jader byl použit TO-PRO-3 jodid (0.04 µg/ml) rozpuštěný v 2 x SSC. K ověření RNA-FISH výsledků jsme použili ovlivnění buněk RNázou A (100 µg/ml), která byla přidána ke kontrolním buňkám 1 hodinu před hybridizací. Pak byly buňky opláchnuty 3x 15 min při 42⁰C v 50% formamidu, který byl rozpuštěn ve 2 x SSC (pH 7.0). Dále byly preparáty opláchnuty v 0.1 x SSC (pH 7.0), 3x 15 min, při 60⁰C. V tomto případě jsme nepozorovali žádné RNA-FISH signály. Stejně jako po působení 100 µg/ml α-amanitinu, který je inhibítorem RNA polymerázy II.

7. Analýza a zpracování obrazu

Obrazy fluorescenčně-naznačených buněčných jader byly získávány pomocí konfokálního systému, který se skládá z epi-fluorescenčního mikroskopu Leica DMRXA (Leica, Německo), argon/kryptonového laseru (Innova 70, Coherent) s akusticko-opticky laditelným filtrem (AOTF, Brimrose) pro volbu vlnové délky a konfokální jednotky (QLC 100; VisiTech International, Velká Británie). Skenovací systém je v naší laboratoři řízen softwarem FISH 2.0 (Kozubek *et al.*, 1999), který je instalovaný na připojeném počítači. Obrazy jsou digitalizovány pomocí plně programovatelné digitální kamery CoolSnap CCD (Photometrix, Tucson, AZ). Zvětšení čoček objektivu je 100x, numerická apertura NA=1.3 a rozlišení je 15 pixelů na mikrometr. Adherentní buňky byly v našich experimentech většinou

snímány ve 40 optických řezech a v případě imuno-barvených buněk byla optimalizována intenzita fluorescence u kontrolních vzorků, která pak byla použita k posouzení intenzity fluorescence u buněk experimentálních, například ovlivněných HDAC inhibitory nebo indukovaných k diferenciaci. Suspenzní buňky byly často snímány v 70 a více optických řezech, kdy jednotlivá vzdálenost mezi řezy byla 0.1-0.3 μm . Analýza obrazu byla provedena pomocí FISH 2.0 a Andor iQ softwarů a jaderně topografické parametry byly statisticky vyhodnocovány programem SigmaPlot 8.0 (Jandel Scientific, California). U jader obarvených imuno-fluorescenčně byly distribuce vybraných proteinů studovány pomocí Andor iQ softwaru.

V případě hodnocení radiálních distribucí jsme studovali vzdálenosti mezi jednotlivými homologními a heterologními genetickými elementy a dále vzdálenost lokusů od těžiště buněčného jádra (Kozubek et al., 2002, Obr. 29). Vzdálenosti kandidátních lokusů byly normovány na lokální jaderný poloměr a byly počítány průměrné hodnoty. Jednotlivé údaje byly exportovány do programu Sigma plot (8.0) a distribuce genetických elementů v rámci interfázních jader byla zaznamenána do grafů. Na závěr byla provedena statistická analýza pomocí vybraných biostatistických analýz, tak jak je uvedeno v práci Harničarová et al. (2006) nebo Krejčí et al. (2008).

8. Analýzy pomocí western blotů

Buňky byly lyzovány pomocí SDS-lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 % SDS; 10 % glycerol) a poté sonikovány. Koncentrace proteinů byla určena pomocí DC Protein Assay kitu (Bio-Rad, Bio-Consult, Česká, Republika) a k lyzátům byla přidána směs bromfenolové modři (0.01%) a 1% β -merkaptoetanolu (poměr 1:1). Vzorek se povařil 4-5 minut ve vodě. A vzorky jaderných proteinů o stejném množství (10 μg) a vhodné markery byly podrobeny SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu. Po přenesení proteinů na PVDF membránu (Immobilon-P, Sigma-Aldrich, Německo) byly proteiny detekovány příslušnými primárními a sekundárními protilátkami a vizualizovány pomocí systému ECL-Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Česká Republika) podle přiloženého návodu. V laboratoři používáme různé protilátky, například: anti-HP1 α (klon 15.19s2; #05-689, Upstate, USA), anti-HP1 β (#07-333, Upstate, USA) and anti-HP1 γ (klon 42s2, #05-690, Upstate, USA), anti-SC-35 (#ab11826, Abcam, Velká Británie), anti-CENP-A (#ab13939, Abcam, Velká Británie), anti-PML (#ab6263, Abcam, Velká Británie), anti-TIF1 β (C-16) (sc-

19168, Santa Cruz, USA), anti-Oct-3/4 (C-10) (sc-5279, Santa Cruz, USA) a další. Následně jsou použity sekundární protilátky: anti-rabbit IgG (#A4914, Sigma, Česká Republika), anti-goat IgG (#A4174, Sigma, Česká Republika), anti-mouse IgG (#A9044, Sigma, Česká Republika) a další.

9. Izolace RNA a RT-PCR

Expres vybraných genů byla studována pomocí semikvantitativní RT-PCR nebo pomocí Real-Time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett). RNA byla izolována pomocí trizolu (Invitrogen) nebo podle Bártová et al. (2002). Přečištění RNA bylo provedeno pomocí kolonek „RNeasy mini spin columns” (QIAGEN). Případná kontaminující DNA byla odstraněna pomocí DNázy (QIAGEN). cDNA byla syntetizována z 1 μ g celkové RNA za pomoci iScript cDNA kitu (Bio-Rad). Sekvence primerů pro různé geny jsou uvedeny v příložených publikacích. RT-PCR amplifikační mix (20 μ l) obsahoval 25 ng templátové cDNA, 2x SYBR Green I Master Mix (10 μ l, Roche) a 200 nM každého primeru. Amplifikační reakce probíhala za použití termálního cykleru Rotor-Gene 6000 (Corbett). Většinou jsme používali následující kroky: 10 min denaturace DNA při 95°C a dále 40 cyklů při 95°C po 15 sec; annealing při 53°C po dobu 15 sec a elongace při 72°C, po dobu 20 sec. Analýza byla provedena pomocí detekčního softwaru, který rovněž ovládá Rotor-Gene 6000 (Corbett). Za použití standardizovaných křivek byla stanovena exprese studovaného genu relativně k expresi vybraného „house-keeping“ genu, například HPRT1, GAPDH nebo β -actinu. Vizualizace RT-PCR produktů byla rovněž provedena pomocí 2% agarózového gelu.

10. Konvenční chromatinová immunoprecipitace (ChIP)

Histony byly fixovány k DNA pomocí paraformaldehydu, po dobu 10 min, při 37°C, tak, že paraformaldehyd o koncentraci 1% byl přidán přímo do kultivačního media. Buňky byly centrifugovány, umístěny na led a opláchnuty studeným PBS pufrem, který obsahoval inhibitory proteáz (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin a 1 μ g/ml pepstatin A). Další postup byl proveden přesně podle návodu, který byl uvedený v „ChIP essay“ kitu firmy Upstate (USA, #17-295). Buněčný lyzát byl sonikován tak, aby se získaly fragmenty DNA o velikosti 200-1000 pb, což bylo ověřeno na agarózovém gelu. Pro immunoprecipitaci jsme většinou používali následující protilátky: anti-acetyl H3K9, anti-dimethyl H3K9 a anti-trimethyl H3K9 (Upstate, USA). Po promytí histon-DNA-immunokomplexů, následovalo zahřátí vzorků na 65°C, což uvolnilo vazbu histonů a DNA.

DNA byla ze suspenze izolována pomocí QIAamp DNA Mini kitu (QIAGEN #51304) a vzorek bez protilátky byl použit jako negativní kontrola. Pro normování ChIP-PCR výsledků byl použit lyzát vstupní DNA, která neprošla imunoprecipitací, tak zvaný „input“.

12. „ChIP-on-chip“ analýza

Epigenetické modifikace histonů byly studovány pomocí „RefSeq Promoters array“ (NimbleGen, Systems, Inc., USA), který obsahuje dobře charakterizované RefSeq geny. Používali jsme následující array: „2006-07-18_HG18_RefSeq_promoter, 2200 bp upstream a 500 bp downstream“. V těchto experimentech byla ChIP DNA a DNA z tak zvaného „inputu“ izolována pomocí QIAamp DNA Mini kitu (QIAGEN #51304) a koncentrace vzorků byla kvantifikována pomocí UV absorpce (260 nm). Optimální DNA koncentrace byla dosažena na zařízení Speed-Vac a ChIP-DNA byla amplifikována pomocí LM-PCR („Ligation Mediated PCR“). V tomto případě jsme použili „GenomePlex Complete Whole Genome Amplification“ (WGA) kit (Sigma, Missouri, USA, #WGA2). V prvním kroku byly přidány 2 μ l 1x „Library Preparation Buffer“ a potom 1 μ l „Library Stabilization Solution“. Pak byly vzorky krátce centrifugovány a umístěny na termální cykler zahřátý na teplotu 95°C, inkubace probíhala po dobu 2 min, pak byly vzorky umístěny na led. Na závěr byl přidán 1 μ l „Library Preparation Enzyme“ a vzorky byly inkubovány při následujících teplotách a časech: 16°C, 24°C, 37°C (20 min každý) a pak 75°C po dobu 5 min. Na závěr byly vzorky uchovány při 4°C pro další zpracování. Dlouhodobě byly vzorky skladovány při -20°C, pak proběhla amplifikace v doporučeném pufru a za následujících podmínek: denaturace při 95°C, po dobu 3 min (14 cyklů), pak 94°C po dobu 15 sec a „annealing/extenze“ probíhaly při teplotě 65°C, po dobu 5 min. Pak byly vzorky přečištěny pomocí PCR purifikačního kitu (QIAGEN #28104) a ChIP-DNA byla rozpuštěna v deionizované vodě. DNA koncentrace byla kvantifikována pomocí UV absorpce. Poměr OD260/280 byl nejméně 1.7 a poměr OD260/230 měl hodnotu nejméně 1.6. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí „RefSeq Promoters arrays“ (NimbleGen, Systems, Inc., USA). Statistická významnost výsledků byla stanovena pomocí tak zvaného „FDR score“ („False Discovery Rate score“), které je založeno na náhodnosti veličin. Výsledky jsou uvedeny v publikaci Krejčí et al. (2008).