

SureChIP I M-kit

with agarose beads

Trial version, 5rxn

www.krd.cz

Obsah kitu a jeho skladování

SureChIP kit obsahuje reagentie na provedení 5 x 3 imunoprecipitačních reakcí (se specifickou a negativní a pozitivní kontrolní protilátkou).

Kit je rozdělen do dvou částí, jedna je distribuovaná při RT a druhá na suchém ledu.

Reagent 17 a Reagent 18 při prvním rozmrazení rozaliquotujte nebo v celku následně krátkodobě (max. 1 měsíc) skladujte při +4 °C.

Reagent 10 (Proteinase K buffer), Reagent 2 (Crosslinking stop solution) a kolonky na purifikaci DNA skladujte při RT.

Reagentie, které mají být skladovány při -20 °C, umístěte v mrazáku bez funkce autoodmrazování.

Všechny reagentie před použitím pečlivě promíchejte. Precipitáty v pufrch můžete pro rychlejší rozpuštění zahřát na 45 °C.

Při řádném skladování je garantována funkčnost všech složek kitu do 1 roku od data dodání.

Obsah části dodávané při RT

Množství	Reagentie	Skladování
20 ml	Reagent 1: Formaldehyde (11%) buffer	+4 °C
13 ml	Reagent 2: Crosslinking stop solution	RT
50 ml	Reagent 3: Lysis buffer I	+4 °C
50 ml	Reagent 4: Lysis buffer II	+4 °C
13 ml	Reagent 5: Lysis buffer III	+4 °C
13 ml	Reagent 7: MNase buffer	+4 °C
1,3 ml	Reagent 9: MNase stop solution	+4 °C
5,5 ml	Reagent 10: Proteinase K buffer	RT
40 ml	Reagent 13: IP buffer	+4 °C
170 µl	Reagent 14: Protein A beads	+4 °C
170 µl	Reagent 15: Protein G beads	+4 °C
31 µl	Reagent 16: BSA	+4 °C
40 ml	Reagent 19: Wash buffer I	+4 °C
20 ml	Reagent 20: Wash buffer II	+4 °C
24 ml	TE buffer	+4 °C
39 µl	Glycogen	+4 °C
500 µl	NaAc	+4 °C
26 ml	DF buffer	+4 °C
23 ml	Wash buffer	+4 °C
31 ks	Kolonky na purifikaci DNA	RT

Obsah části dodávané na suchém ledu

Množství	Reagentie	Skladování
230 µl	Reagent 6: PIC	-20 °C
16,5 µl	Reagent 8: MNase (20 U/µl)	-20 °C
57 µl	Reagent 11: RNase I	-20 °C
65 µl	Reagent 12: Proteinase K	-20 °C
60 µl	Reagent 17: Negative Ab (rabbit IgG)	-20 °C
60 µl	Reagent 18: Positive Ab (anti H3)	-20 °C

Schéma uspořádání reagensií v balení dodávaném při RT

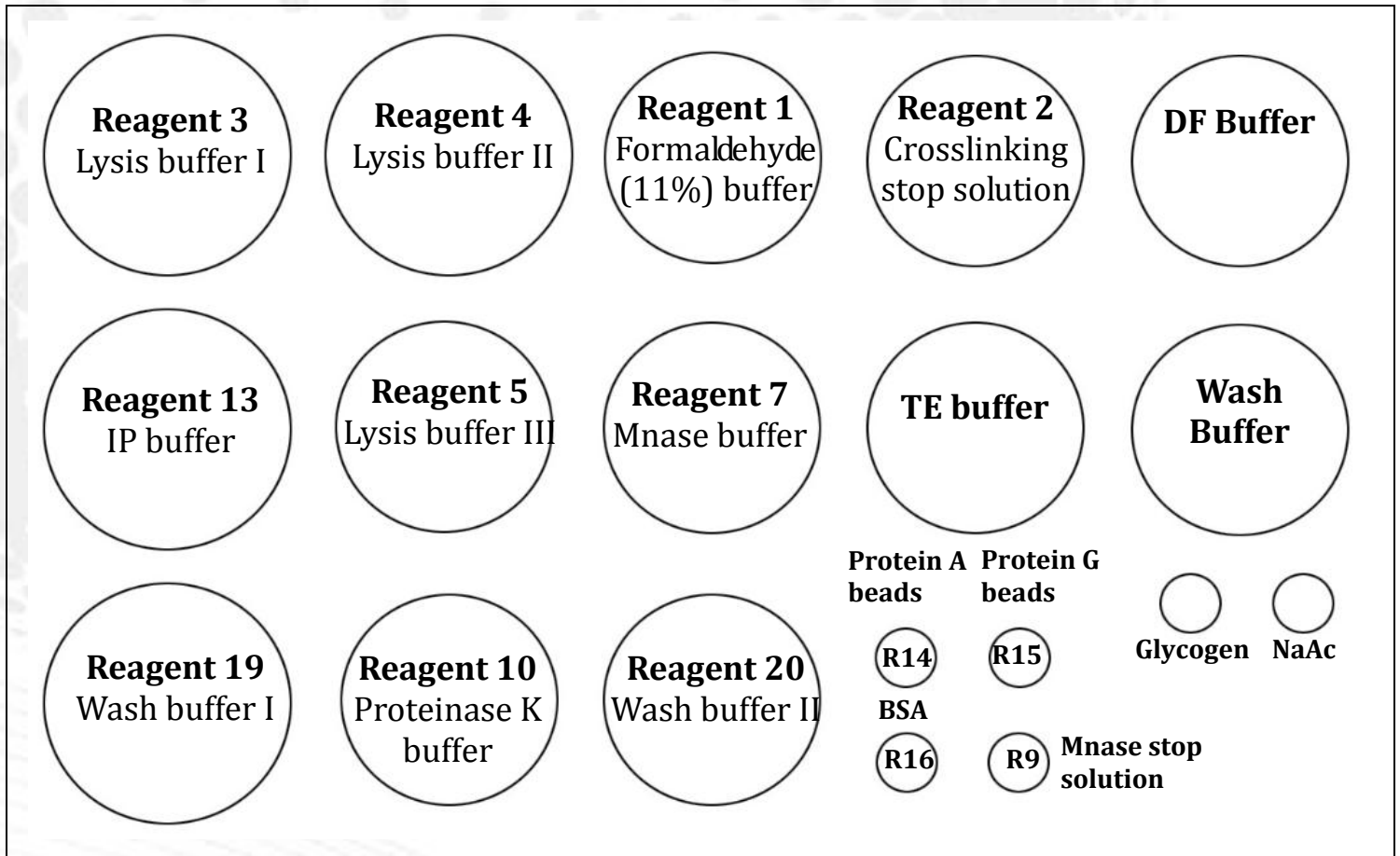
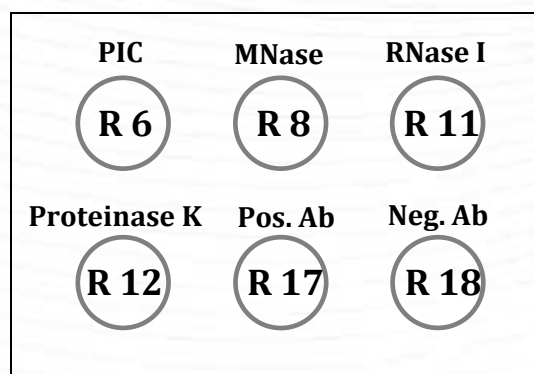


Schéma uspořádání reagensií v balení dodávaném na suchém ledu



Reagencie, které nejsou součástí kitu

37% Formaldehyd (např. Amresco, kat. č. M134)

1X PBS (např. Amresco, kat. č. E504)

Nuclease-free voda (např. Amresco, kat. č. E476)

qPCR premix (doporučujeme SYBR Premix Ex Taq II, Takara, kat. č. RR081A)

specifická protilátka (ověřená pro použití v CHIP)

specifické primery (doporučujeme výrobce IDT)

Potřebné přístroje a pomocná zařízení

Elektroforetická vana se zdrojem

Chlazená centrifuga s rotorem na falkony 15ml a 50 ml

Chlazená mikrocetrifuga (max. otáčky alespoň 15 000 x g)

Inkubátor

Rotátor

Sonikátor

kit byl optimalizován pro použití s:

Digital Sonifier 450 (Branson); Converter 101-135-022; Disruptor Horn

101-147-037; Microtips 101-148-062

a/nebo

Ultrasonic Homogenizer Model 300VT (Biologics Inc.); Tapped Tip 0-120-

0010; Tapped Micro-Tip 0-120-0007)

Spektrofotometr

Termoblok

Termocyklér

Vortex

Protokol na chromatinovou imunoprecipitaci za použití mikrokokální MNázy

testovací verze kitu pro 5rx v5.5.

1. Fixace formaldehydem

1.1 Buněčnou kulturu sklidíte při 50 až 60 % konfluenci, stanovte přesnou koncentraci buněk pomocí počítací komůrky. Z kultury připravte vzorek 30 ml média s koncentrací buněk cca 3×10^5 b/ml, celkové vstupní množství buněk do experimentu tedy bude cca 10^7 (optimum pro SureChIP). Minimální zpracovatelné celkové množství buněk je 5×10^5 .

Před přidáním fixačního roztoku vytemperujte médium s buňkami na pokojovou teplotu.

1.2 Kroslinkování: buňky (chromatin) zafixujte přidáním fixačního roztoku přímo do média s buňkami. Fixačním roztokem je roztok R1 po přidání formaldehydu.

Příprava fixačního roztoku: Pro správnou fixaci je zásadní přidávat formaldehyd k R1 těsně před použitím. Po smíchání vznikne fixační roztok s 11 % formaldehydem. Odeberte dostatečné množství R1 a smíchejte s 37 % formaldehydem v poměru 2,3632 + 1, například 3ml roztoku připravíte smícháním 2108 μ L R1 + 892 μ L 37 % formaldehydu.

Fixační roztok přidejte k médiu v poměru 1+10, například 3 ml fixačního roztoku a 30 ml média s buňkami.

Barva média (pH indikátoru) se po přidání změní na oranžovou, což odpovídá pH ~7.

Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě, během inkubace zkumavku každou minutu několikrát obraťte, aby se obsah průběžně promíchal.

1.3 Fixaci zastavíte přidáním R2 (Crosslinking stop solution) v poměru 1 : 19. Tedy například 1736 μ L R2 + 33 ml média z bodu 1.2. Inkubujte 5 minut v ledové lázni.

Ve všech následujících krocích udržujte vzorky na ledu či v ledové lázni!

1.4 Centrifugujte 10 minut při 1000 g a 4 °C, odstraňte supernatant. Peletu resuspendujte v ledově chladném PBS (~ 7,5 ml*) pomocí pipety a inkubujte 15 minut na ledu. Centrifugujte 5 minut při 2000 g.

**Při nižším vstupním množství buněk úměrně tomu snižte objem PBS; např. 1,5 ml na 5×10^5 buněk.*

2. Příprava chromatinu

2.1 Odeberte potřebné množství lyzačních roztoků (R3, R4, R5), vychladte je v ledové lázni. Po vychlazení přidejte R6 (PIC) v poměru 1:1000 (1 μ l na 1 ml) a vraťte zpět do ledové lázně!

2.2 K sedimentu (bodu 1.4) přidejte 7 ml* R3 (lysis buffer I) a opatrně resuspendujte tak, aby vzorek neobsahoval shluky buněk (při prvních provedeních

doporučujeme provést optimalizaci s mikroskopickou kontrolou). Uvolněná jádra sedimentujte 10 minut při 2000 g a 4 °C.

**Při nižším vstupním množství buněk úměrně tomu snižte objem R3; např. 1 ml na 5 x 10⁵ buněk.*

2.3 Jádra resuspendujte v 7 ml* R4 (lysis buffer II). Opatrně promíchejte a inkubujte v ledové lázni 5 minut. Centrifugujte 10 minut při 2000 g a 4 °C. Supernatant opatrně dekantujte a zbylý supernatant opatrně odsajte pipetou.

**Při nižším vstupním množství buněk úměrně tomu snižte objem R4; např. 1 ml na 5 x 10⁵ buněk.*

3a. Štěpení chromatinu MNázou

Pokud upřednostňujete náhodné štěpení pomocí fyzikálních metod přejděte k bodu 3b Štěpení chromatinu sonikací. Pro počet buněk pod 10⁷ doporučujeme použít protokol s MNázou.

3.1 Sediment resuspendujte v 1 ml* roztoku R7 (MNase buffer). Přidejte MNázu (R8, 1 μl Mnázy o konc. 20U/μl na 10⁷ buněk). Inkubujte 20 min při 37 °C za občasného promíchání

Množství MNázy vs. Počet buněk může být u různých buněk různé a tento krok je potřeba optimalizovat. Viz příloha Optimalizace štěpení MNázou.

** Při nižším vstupním množství buněk úměrně tomu snižte objem R7; např. 100 μl na 5 x 10⁵ buněk.*

3.2 Reakci zastavte přidáním R9 (MNase stop solution) v poměru 1 : 10 k objemu R7 (např. 100 μl R9 na 1 ml R7) a zchlaďte na ledu alespoň 5 minut. Vzorek stočte 1 min při maximální rychlosti (cca. 15000g) a 4 °C a odstraňte supernatant. Peletu jader resuspendujte v 1ml předem připraveného pufru R5 (lysis buffer III)*.

***Při nižším vstupním množství buněk úměrně tomu snižte objem R5; např. 200 μl na 5 x 10⁵ buněk.*

3.3 Rozbijte jádra krátkou sonikací* za neustálého chlazení v ledové lázni.

Protokol pro sonikátor Sonifier 450 (Branson); Converter 101-135-022; Disruptor Horn 101-147-037; Microtips 101-148-062.

Puls: 2s

Pauza: 10s

Celková čistá doba sonikace: 1min

Amplituda: 1 (10%)

Protokol pro sonikátor Ultrasonic Homogenizer Model 300VT (Biologics Inc.); Tapped Tip 0-120-0010; Taperd Micro-Tip 0-120-0007

Power 20%

Pulser 20%

Celkový čas sonikace: 8 minut



**Jako alternativa k sonikaci lze také použít ruční homogenizátor, postup viz příloha Lyze jader ručním homogenizátorem.*

Pro malé objemy použijte mikrozkrumavku s kulatým dnem (viz obrázek).

Zároveň je důležité kontrolovat vzorek během sonikace aby nedošlo k pění vzorku. Pro toto je obzvláště důležité aby sonikační próba byla ponořena až cca 1 mm nad dno zkumavky a nikde se nedotýkala stěn.

3.4 Vzorek stočte 10 min při 10000g a 4 °C a odeberte supernatant do nové mikrozkušavky. Obsahuje izolovaný chromatin.

3.5 Změřte koncentraci chromatinu pomocí spektrofotometru, nejlépe NanoDropu. Optimální očekávaná koncentrace pro 10^7 buněk (vstupní množství) je přibližně 200 ng/ μ l. Ze supernatantu oddělte 20 μ l a použijte pro elektroforetickou kontrolu účinnosti fragmentace (viz krok 4). Zbytek supernatantu je **vstupním vzorkem do imunoprecipitačního kroku**. Lze ho skladovat při -20 °C až 6měsíců, neměl by však projít více než dvěma cykly rozmražení a zamražení. Vstupní objem supernatantu do jedné imunoprecipitační reakce závisí na výše změřené **koncentraci DNA před zamražením**. Doporučené množství chromatinu odebíraného do jedné imunoprecipitační reakce je 3,5 μ g*, které by mělo být obsaženo v maximálním objemu 50 μ l supernatantu.

**3,5 μ g je optimální množství, ale v případě nízkého množství vstupních buněk lze použít i menší množství (musí být shodné ve všech IP). Poté bude pravděpodobně potřeba optimalizovat následnou PCR.*

3b. Štěpení chromatinu sonikací

3.6 Sediment resuspendujte ve 2 ml roztoku R5 (Lysis buffer III). Lyzát přeneste do 15-ml polypropylenové zkumavky a udržujte v ledové lázni. V tomto bodu je vzorek možno zamrazit až 6 měsíců v -70 °C pro pozdější použití.

3.7 Sonikaci doporučujeme provádět v chladové místnosti. Připravte ledovou lázeň v kádince patřičného objemu tak, aby se vytvořila dostatečná chladicí kapacita po celou dobu sonikace. V průběhu sonikace kontrolujte, aby neroztál všechen led, případně průběžně doplňujte. Sondu sonikátoru před sonikací omyjte čistou vodou a následně etanolem.

3.8 15-ml zkumavku se vzorkem připevněte na stojan. Zkušavku zanořte do lázně tak, aby hladina chladicí směsi byla ve stejné nebo mírně větší výšce než hladina vzorku. Zanořte sondu do vzorku a její polohu nastavte tak, aby byla špička vzdálena asi 0,5 cm ode dna zkumavky. Po spuštění sonikace zkontrolujte, zda nedochází k pění vzorku, případně posuňte sondu do jiné polohy. Pění má za následek nedostatečnou účinnost sonikace.

Varování: Sonda se nesmí nikde dostat do kontaktu se stěnou zkumavky – hrozí poškození zkumavky a snížení účinnosti sonikace.

Protokol pro sonikátor Sonifier 450 (Branson); Converter 101-135-022; Disruptor Horn 101-147-037; Microtips 101-148-062.

Puls: 2s

Pauza: 13s

Celková čistá doba sonikace: 16 min 40s

Amplituda: 4,5 (45%)

Protokol pro sonikátor Ultrasonic Homogenizer Model 300VT (Biologics Inc.); Tapped Tip 0-120-0010; Tapped Micro-Tip 0-120-0007

Power 50%

Pulser 15%

Celkový čas sonikace: 110 min

Poznámka: Konkrétní hodnoty nastavení se mohou u jednotlivých typů sonikátorů lišit a je třeba je optimalizovat. Jednotlivé parametry lze měnit a současně sledovat změny účinnosti sonikace elektroforetickou analýzou distribuce délky fragmentů produkovaných při sonikaci. Teplota vzorku při sonikaci by neměla překročit 12 °C.

**Jako alternativa k sonikaci lze také použít ruční homogenizátor, postup viz příloha Lyze jader ručním homogenizátorem.*

3.9 Po ukončení sonikace vzorek stočte 15 min při 15 000g a 4 °C a odeberte supernatant do nové mikrozkušavky. Obsahuje izolovaný chromatin.

3.10 Změřte koncentraci chromatinu pomocí spektrofotometru, nejlépe NanoDropu. Optimální očekávaná koncentrace pro 10⁷ buněk (vstupní množství) je přibližně 200 ng/μl. Ze supernatantu oddělte 20 μl a použijte pro elektroforetickou kontrolu účinnosti fragmentace (viz krok 4). Zbytek supernatantu je **vstupním vzorkem do imunoprecipitačního kroku**. Lze ho skladovat při -20 °C až 6měsíců, neměl by však projít více než dvěma cykly rozmražení a zamražení. Vstupní objem supernatantu do jedné imunoprecipitační reakce závisí na výše změřené **koncentraci DNA před zamražením**. Doporučené množství chromatinu odebíraného do jedné imunoprecipitační reakce je 3,5 μg*, které by mělo být obsaženo v maximálním objemu 50 μl supernatantu.

**3,5 μg je optimální množství, ale v případě nízkého množství vstupních buněk lze použít i menší množství (musí být shodné ve všech IP). Poté bude pravděpodobně potřeba optimalizovat následnou PCR.*

4. Ověření účinnosti štěpení

4.1 Ke 20 μl alikvótu odebraného supernatantu přidejte 180 μl roztoku R10 (PK buffer) a 1,5 μl R11 (RNase I). Inkubujte 30 minut při 37 °C. Poté přidejte 4 μl R12 (Proteinase K) a inkubujte 2 hodiny při 65 °C.

4.2 Následuje jedna z variant purifikace:

4a pročištění DNA na kolonci nebo 4b vysrážením etanolem.

4a Pročištění na kolonci

4a.1 Ke 200 μl vzorku přidejte 1 ml DF Pufru (DF buffer) a zvortexujte. Umístěte kolonku do 2 ml sběrné mikrozkušavky a na kolonku přepipetujte 600 μl vzorku s DF pufrem (DF buffer). Centrifugujte 30 s při 14-16 000g při RT. Odstraňte proteklou tekutinu a tento krok opakujte se zbylým objemem vzorku.

4a.2 Kolonku umístěte zpět do původní sběrné zkumavky a napipetujte na ni 600 μl Wash pufru (Wash buffer). Nechte stát 1 min a poté centrifugujte 30 s při 14-16 000g při RT. Odstraňte proteklou tekutinu, vraťte kolonku zpět do

sběrné mikrozkušavky a centrifugujte další 3 min při 14-16 000g při RT pro úplné vysušení kolonky.

4a.3 Vysušenou kolonku přendejte do nové 1,5 ml mikrozkušavky a napipetujte na ni 20 μ l TE pufru (TE buffer). Nechte stát 2 min. Centrifugujte 2 min při 14-16 000g při RT. Eluát obsahuje přečištěnou DNA.

4a.4 20 μ l naneste na 1,5 % agarózový gel a separujte při napětí cca 80 V.

Doporučená velikost fragmentů je mezi 150 až 600 bp. Optimálně by měly být přítomny i fragmenty větších velikostí, které odpovídají přibližně přítomnosti více nukleosomů – 300, 450, 600 bp (viz pozice 4 na obrázku gelu v příloze Optimalizace štěpení MNázou).

4b Vysrážení etanolem

4b.1 Přidejte v tomto pořadí 1 μ l glykogenu (Glycogen), 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 7) (NaAc) a 2,5 objemu 100 % etanolu. Inkubujte minimálně 4 hodiny při -20 °C nebo 1 hod při -80 °C (pro kvalitnější kvantitativní vysrážení doporučujeme inkubovat přes noc). Roztok by se měl během inkubace mírně zakalit. Centrifugujte 40 minut při maximální rychlosti (cca. 15000g) a 4 °C. Opatrně odstraňte supernatant a peletu omyjte 500 μ l 70 % etanolu a centrifugujte 5 minut, 15000g při 4 °C. Etanol odsajte a peletu DNA sušte několik minut při laboratorní teplotě.

4b.2 Peletu DNA rozpustěte do 20 μ l TE pufru (37 °C, 30 minut) (TE buffer) s občasným jemným vortexováním či lépe ve třepačce. Vzorek odebraný před sonikací se může rozpouštět pomalu, protože obsahuje velké množství genomové DNA. Teplotu rozpouštění lze zvýšit až na 65°C a dobu rozpouštění lze prodloužit až na 120 minut.

4b.3 20 μ l naneste na 1,5 % agarózový gel a separujte při napětí cca 80 V.

Doporučená velikost fragmentů je mezi 150 až 600 bp. Optimálně by měly být přítomny i fragmenty větších velikostí, které odpovídají přibližně přítomnosti více nukleosomů – 300, 450, 600 bp (viz pozice 4 na obrázku gelu v příloze Optimalizace štěpení MNázou).

5. Imunoprecipitace

5.1 Pro přípravu kalibrační křivky je dále nutno ze vzorku chromatinu, který vstupuje do IP reakce, připravit kalibrační standard (Input). Ze supernatantu získaného v bodě 3.5 odeberte objem odpovídající 1,75 μ g chromatinu (tj. 50% input DNA vzaté na jednu IP reakci). Input uchovejte při -20°C. V přípravě tohoto kalibračního standardu další postup navazuje bodem 6.6.

5.2 Připravte si 10 ml* 0,5X R13 smícháním 5 ml R13 (IP buffer) a 5 ml deionizované vody. Poté skladujte na ledu.

**Odpovídá množství na jednu reakci = IP pozitivní kontrolní, negativní kontrolní a testovací protilátky (3 x IP)*

5.3 Promytí kuliček*: Připravte si tři mikrozkušavky, do každé přeneste 90 μ l 0,5X R13 (IP buffer) a přidejte 5 μ l Protein A-beads (R14) a 5 μ l Protein G-beads (R15).** Centrifugujte 5 minut při 500 g a 4 °C, odstraňte téměř veškerý supernatant a peletu resuspendujte v 100 μ l 0,5X R13. Do každé

zkumavky přidejte 1,6 µl R16 (BSA) a inkubujte 2 hodiny při 4°C a konstantním promícháváním, nejlépe obrácením zkumavky s použitím rotátoru.

**Odpovídá množství na jednu reakci = IP pozitivní kontrolní, negativní kontrolní a testovací protilátky (3 x IP)*

*** Před odběrem je kuličky nutno intenzivně promíchat a pro snadnější pipetování ustrihněte špičku od pipety.*

5.4 Předčištění chromatinu*: Připravte si do mikrozkušavky 270 µl 0,5X R13 a přidejte 15 µl Protein A-beads (R14) a 15 µl Protein G-beads (R15).** Lehce zvortexujte a centrifugujte 5 minut při 500g a 4 °C.

Odstraňte supernatant a přidejte vzorek chromatinu (aliquót supernatantu z bodu 3.5) obsahující 3,5+3,5+3,5 µg DNA***, max do objemu 150 µl**** a přidejte 150 µl pufru R13 (IP buffer). Inkubujte 2-4 hodiny při 4 °C a konstantním promícháváním, nejlépe obrácením zkumavky s použitím rotátoru.

Po ukončení inkubace centrifugujte vzorek 10 minut při 14000 g a 4 °C a supernatant obsahující pročištěný chromatin odeberte do nové zkumavky. Při časové prodlevě supernatant nechávejte na ledu.

**Odpovídá množství na jednu reakci = IP pozitivní kontrolní, negativní kontrolní a testovací protilátky (3 x IP)*

*** Před odběrem je kuličky nutno intenzivně promíchat a pro snadnější pipetování ustrihněte špičku od pipety.*

**** V případě, že množství chromatinu nedosahuje 3,5 µg, tak použijte pouze 50 µl chromatinu na jednu reakci*

***** Při objemu pod 150 µl doplňte vodou*

5.5 Vazba protilátky na kuličky*: Do každé zkumavky z bodu 5.3 přidejte 1 µg cílové nebo 10 µl kontrolních protilátek (R17: positive Ab (anti H3), R18: neg Ab (rabbit IgG)) a inkubujte 2 hodiny při 4 °C a konstantním promícháváním, nejlépe obrácením zkumavky na rotátoru.

**Odpovídá množství na jednu reakci = IP pozitivní kontrolní, negativní kontrolní a testovací protilátky (3 x IP)*

5.6 Vlastní imunoprecipitace: ke každé zkumavce z bodu 5.5 (100 µl kuliček s navázanou protilátkou) přidejte 100 µl předčištěného chromatinu z bodu 5.4 a doplňte do 1 ml pufrům 0,5X R13 s přidáním 1 µl R6 (PIC). Inkubujte při 4°C přes noc a konstantním promícháváním, nejlépe obrácením zkumavky na rotátoru.

6. Promytí IP reakce

6.1 Zkušavky centrifugujte 6 minut při 4600g a 4 °C, supernatant odstraňte*.

**Pokud není peleta viditelná, nechte na dně zkumavky cca. 20 µl supernatantu, ať se zabrání odsátí již tak malého množství kuliček.*

6.2 Sediment resuspendujte v 900 µl 0,5X R13 a centrifugujte 6 minut při 4600g a 4 °C, supernatant odstraňte*. Tento krok proveďte celkem 2x.

**Pokud není peleta viditelná, nechte na dně zkumavky cca. 20 µl supernatantu, ať se zabrání odsátí již tak malého množství kuliček.*

6.3 Sediment resuspendujte v 1 ml R19 (Wash buffer I) s přidáním 1 μ l R6 (PIC) a centrifugujte 6 minut při 4600g a 4 °C, supernatant odstraňte.* Tento krok proveďte celkem 2x.

**Pokud není peleta viditelná, nechte na dně zkumavky cca. 20 μ l supernatantu, ať se zabrání odsátí již tak malého množství kuliček.*

6.4 Sediment resuspendujte v 1 ml R20 (Wash buffer II) s přidáním 1 μ l R6 (PIC) a centrifugujte 6 minut při 4600 g a 4 °C, supernatant odstraňte.*

**Pokud není peleta viditelná, nechte na dně zkumavky cca. 20 μ l supernatantu, ať se zabrání odsátí již tak malého množství kuliček.*

6.5 Sediment resuspendujte v 1 ml pufru TE (TE buffer) s přidáním 1 μ l R6 (PIC), centrifugujte 6 minut při 4600 g při 4 °C a opatrně odstraňte supernatant.*

**Pokud není peleta viditelná, nechte na dně zkumavky cca. 20 μ l supernatantu, ať se zabrání odsátí již tak malého množství kuliček.*

6.6 Sediment každého ze tří vzorků (cílová a 2 kontrolní protilátky) resuspendujte ve 100 μ l R10 (PK buffer). Pracujte při RT. Zároveň v tomto kroku do dalšího postupu zařaďte i připravený input (viz bod 5.1). Input doplňte do 100 μ l pufru R10 (PK buffer).

6.7 Ke všem čtyřem vzorkům (cílová protilátka, 2 kontrolní protilátky, input) přidejte 1,5 μ l R11 (RNase I) a inkubujte 30 minut při 37 °C. Poté přidejte 0,5 μ l R12 (Proteinase K) a inkubujte 2 hodiny při 65 °C.* V průběhu reakce doporučujeme vzorek několikrát promíchat.

**V tomto kroku zároveň dochází k reverzi kroslinkování, zkumavku pevně uzavřete, protože hrozí nebezpečí vypařování!*

7. Purifikace pro PCR

7.1 Zkumavky centrifugujte 5 minut při 4000 g a pokojové teplotě a supernatanty přečistěte buď na kolonce, nebo vysrážením etanolem.

7a Pročištění na kolonce

7a.2 Ke 100 μ l vzorku přidejte 500 μ l DF pufru (DF buffer) a zvortexujte. Umístěte kolonku do 2 ml sběrné zkumavky a na kolonku přepipetujte 600 μ l vzorku s DF pufrům. Centrifugujte 30 s při 14-16 000g při RT. Odstraňte proteklou tekutinu.

7a.3 Kolonku umístěte zpět do původní sběrné zkumavky a napipetujte na ni 600 μ l Wash pufru (Wash buffer). Nechte stát 1 min a poté centrifugujte 30 s při 14-16 000g a RT. Odstraňte proteklou tekutinu, vraťte kolonku zpět do sběrné zkumavky a centrifugujte další 3 min při 14-16 000g při RT pro úplné vysušení kolonky.

7a.4 Vysušenou kolonku přendejte do nové 1,5 ml mikrozukumavky a napipetujte na ni 100 μ l* TE pufru. Nechte stát 2 min.

**Při nižším vstupním množství chromatinu do 1 IP reakce můžete snížit objem elučního roztoku až na 40 μ l.*

7a.5 Centrifugujte 2 min při 14-16 000g při RT. Eluát obsahuje přečištěnou DNA. Takto připravené vzorky jsou připravené pro PCR, použijte přibližně 1 μ l jako templát.* Vzorky lze dlouhodobě uchovávat při -20 °C.

**Evtl. zvyšte objem templátu a optimalizujte PCR při nižším vstupním množství chromatinu do 1 IP reakce.*

7b Vysrážení etanolem

7b.2 Supernatanty (z bodu 7.1) precipitujte (nejlépe přes noc, -20 °C), s přidáním 1,5 μ l glykogenu + 1/10 objemu NaAc + 2,5 objemu etanolu.

7b.3 Precipitované vzorky centrifugujte 40 minut při maximální rychlosti (cca. 15000g), odsajte etanol, osušte peletu na vzduchu a opět rozpust'te ve 100 μ l* pufru TE za mírného třepání 20 minut při 37 °C. Takto připravené vzorky jsou připravené pro PCR, použijte přibližně 1 μ l** jako templát. Vzorky lze dlouhodobě uchovávat při -20 °C.

**Při nízkém vstupním množství buněk můžete snížit objem elečního roztoku až na 40 μ l.*

***Evtl. zvyšte objem templátu a optimalizujte PCR při nízkém vstupním množství buněk.*

8. Real-Time PCR

8.1 Nařed'te 50% input do standardních roztoků o koncentracích DNA 50%, 25%, 12.5%,eventuelně 6.25%. Roztoky slouží k vytvoření standardní křivky při PCR amplifikaci DNA s využitím jednotlivých specifických primerů.

8.2 PCR primery musí mít podobné T_m , délku i velikost produktu. Preferenční velikost produktu je 100-150 bp.

8.3 Každý z primerů rozpust'te na celkovou koncentraci 20 μ M.

8.4 Specificitu nově navržených primerů ověřte zkušebním během na genomové DNA, každý pár primerů by měl poskytovat jediný produkt.

8.5 Příklad přípravy jedné reakce pro qPCR:

templát	1 μ l
forward primer	0.2 μ l (20 μ M zásobní roztok F primeru)
reverse primer	0.2 μ l (20 μ M zásobní roztok R primeru)
H ₂ O	3.6 μ l
PCR mix	5 μ l
<hr/> Total	<hr/> 10 μ l*

Amplifikační program:

1. 95 °C/10'
2. 95 °C/15"
3. 60 °C/20"
4. 72 °C/40"

Krok 2 až 4 opakovat 40x

5. Jako poslední bod programu zařadit analýzu křivky tání PCR produktu, teplotní rozmezí zvolte mezi 60 až 98 °C.

**Při přípravě master mixu pro větší počet reakcí vždy počítejte s rezervou, protože při nasávání během pipetování dochází ke ztrátám. Doporučujeme vždy namíchat minimálně 105 % čistého objemu reakcí.*

Přílohy

Optimalizace štěpení Mnázou

Optimální podmínky pro rozštěpení chromatinu na fragmenty dlouhé 150 až 600 bp závisí na typu buněk, na jejich množství, a také na koncentraci Mnázi. Reakci je proto nutné nejprve optimalizovat.

Připravte si buněčná jádra s kroslinkovaným chromatinem z 10⁷ buněk podle výše uvedeného protokolu (postupujte až do bodu 2.3).

Jádra poté resuspendujte v 5 ml R16 a vzniklou suspenzi rozdělte po 1 ml do zkumavek.

Přidejte Mnázu (o koncentraci 20 U/μl) postupně v množství 0 μl, 0,5 μl, 1 μl, 2 μl a 4 μl. Promíchejte několikerým obrácením zkumavky a inkubujte za občasného promíchání 20 min při 37 °C.

Reakci zastavte přidáním 100 μl 0,5M EDTA a zchlad'te na ledu po dobu 5 minut. Vzorky stočte 1 min při maximální rychlosti (cca. 15000g) a 4 °C a odstraňte supernatant. Peletu jader resuspendujte v 200 ul pufru R5 (lysis buffer III) s přidáním 1 μl R6 (PIC).

Rozbijte jádra krátkou sonikací za neustálého chlazení.

Protokol pro sonikátor Sonifier 450 (Branson); Converter 101-135-022; Disruptor Horn 101-147-037; Microtips 101-148-062.

Puls: 2s

Pauza: 10s

Celková čistá doba sonikace: 1min

Amplituda: 1 (10%)

Protokol pro sonikátor Ultrasonic Homogenizer Model 300VT (Biologics Inc.); Tapped Tip 0-120-0010; Tapped Micro-Tip 0-120-0007

Power 20%

Pulser 20%

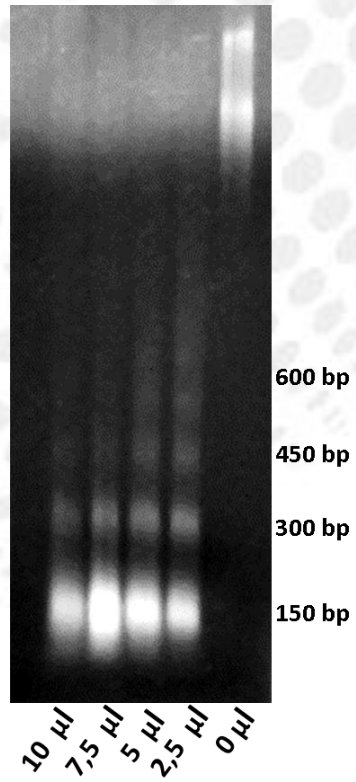
Celkový čas sonikace: 8 minut

Vzorek stočte 10 min při 10000g a 4 °C a odeberte supernatant do nové mikrozkuavky.

Ze supernatantu odeberte 20 μl a použijte pro elektroforetickou kontrolu účinnosti fragmentace. Postupujte podle výše uvedeného protokolu (Krok 4).

Z výsledku agarózové gelové elektroforézy rozhodněte, která koncentrace MNázy je pro štěpení chromatinu optimální. Doporučená velikost fragmentů je mezi 150 až 600 bp. Optimálně by měly být přítomny i fragmenty větších velikostí, které odpovídají přibližně přítomnosti více nukleosomů – 300, 450, 600 bp.

Pokud DNA nebyla naštěpena na fragmenty požadované délky, opakujte optimalizační protokol s vhodně upravenou koncentrací Mnázy.



Lyze jader ručním homogenizátorem

Pokud nemáte k dispozici sonikátor, lze jádra lyzovat také pomocí ručního homogenizátoru (AgileGrinder, ACTGene, kat.č. AG-1500), i když s menší účinností.

Připravte si buněčná jádra s kroslinkovaným chromatinem podle výše uvedeného protokolu (postupujte až do 3.2). Po stočení jader peletu resuspendujte v 50 ul pufru R13 a inkubujte 10 min na ledu.

Pro lyzi jader použijte větší a tvrdší tmavěmodrý nástavec pro AgileGrinder. Ponořte ho do suspenze jader a za stálého chlazení 20 s homogenizujte. Nástavec držte stále pevně na dně, případně s ním občas ve zkumavce mírně zatočte.

Poté homogenizátor vytáhněte ze zkumavky a nechte suspenzi 20 s zchladit na ledě.

Jádra rozbijte sérií 6-ti 20s pulsů vždy s 20 s pauzou. Neustále chlaďte na ledu!

Vzorek stočte 10 min při 10000g a 4 °C a odeberte supernatant do nové mikrozkušavky.

Při tomto postupu nelze po izolaci chromatinu změřit koncentraci DNA, protože pufr R13 obsahuje látky absorbující světlo o vlnové délce 270-280 nm. Podle počtu použitých buněk musíme tedy vypočítat, jaké množství chromatinu použijeme do jedné IP reakce.

Do jedné IP dejte asi 5 ul chromatinu izolovaného z 10^7 buněk. Pokud použijete menší či větší počet buněk, nepřímě úměrně zvyšte či snižte množství chromatinu do 1 IP reakce.



Troubleshooting Guide

Problém	Možná příčina	Řešení
Koncentrace fragmentovaného chromatinu je příliš nízká	Bylo použito příliš málo buněk, nebo po štěpení chromatinu nedošlo k úplné lyzi jader	Před fixací chromatinu stanovte přesný počet buněk. Před a po sonikaci proveďte mikroskopickou kontrolu lyze jader.
Naštěpení chromatinu není úplné, fragmenty jsou příliš dlouhé - delší než 900 bp	Bylo použito příliš mnoho buněk nebo naopak příliš malá koncentrace MNázy.	Před fixací chromatinu stanovte přesný počet buněk. Pro optimalizaci štěpení MNázou použijte protokol v příloze.
Chromatin je naštípan na příliš krátké fragmenty (pouze na jednotlivé nukleosomy o cca 150 bp)	Bylo použito málo buněk nebo příliš mnoho MNázy	Před fixací chromatinu stanovte přesný počet buněk. Pro optimalizaci štěpení MNázou použijte protokol v příloze.
Nevznikl žádný nebo jen male množství PCR produktu	Příliš nízké vstupní množství chromatinu do imunoprecipitační reakce	Před IP změřte koncentraci fragmentovaného chromatinu a do 1 IP dejte 3,5 ug.
	Příliš nízké vstupní množství DNA do PCR reakce	Do PCR reakce dejte větší množství DNA nebo zvyšte počet cyklů
	Chromatin byl naštěpen na příliš malé fragmenty	Navrhněte primery tak, aby vzniklý amplikon nepřesahoval délku 150 bp. Pro optimalizaci štěpení MNázou použijte protokol v příloze.
	Eluovaná DNA obsahuje zbylý etanol	Pokud purifikujete DNA na kolonce, ujistěte se před přidáním TE, že je po omytí Wash puforem dokonale vysušená. Pokud srážíte DNA etanolem, nechte po stočení vzorku etanol úplně vypařit v otevřené mikrozkuhavce.
	Špatně navržené primery	Ujistěte se, že jsou primery specifické k cílové sekvenci.
	Protilátka neváže cílový protein	Ujistěte se, že používáte protilátku ověřenou pro použití v CHIP.

Nevznikl PCR produkt v reakci s pozitivní protilátkou	Do IP reakce bylo použito nedostatečné množství chromatinu nebo protilátky, nebo byla doba inkubace IP příliš krátká.	Do 1 IP reakce použijte 3,5 ug chromatinu a min. 1 ug protilátky. IP reakci inkubujte přes noc.
	Nedošlo k úplné separaci DNA od protein evnt. od kuliček.	Proteináza K je nejúčinnější při 65 °C. V průběhu štěpení vzorek třepejte, nebo alespoň párkrát promíchejte.
Vzniklo stejné množství produktu v PCR reakci s pozitivní i negativní protilátkou	Nedostatečné promytí kuliček	Proveďte pečlivě každý promývací krok, aby bylo dosaženo úplného odmytí nespecifických DNA-protein komplexů.
	Do IP bylo použito příliš velké vstupní množství chromatinu nebo příliš protilátky.	Upravte množství chromatinu a protilátky vstupující do IP reakce.
	Vstupní množství DNA do PCR reakce je příliš velké, nebo proběhlo příliš mnoho PCR cyklů	Upravte počet PCR cyklů, nebo do reakce použijte menší množství DNA.
	Velká nespecifická vazba chromatinu na kuličky.	Kuličky předblokuje pomocí BSA, případně mírně zvýšte koncentraci BSA.
Nevznikl PCR produkt v IP reakci se specifickou protilátkou	Příliš nízké vstupní množství DNA do PCR reakce	Do PCR reakce dejte větší množství DNA nebo zvýšte počet cyklů
	Protilátka neváže cílový protein	Ujistěte se, že používáte protilátku ověřenou pro použití v CHIP.
	Do IP reakce bylo použito nedostatečné množství protilátky.	Typicky se dává 1 – 10 ug protilátky na 1 IP reakci, ale přesné množství závisí na konkrétní protilátce. Zkuste zvýšit množství protilátky v IP reakci.

