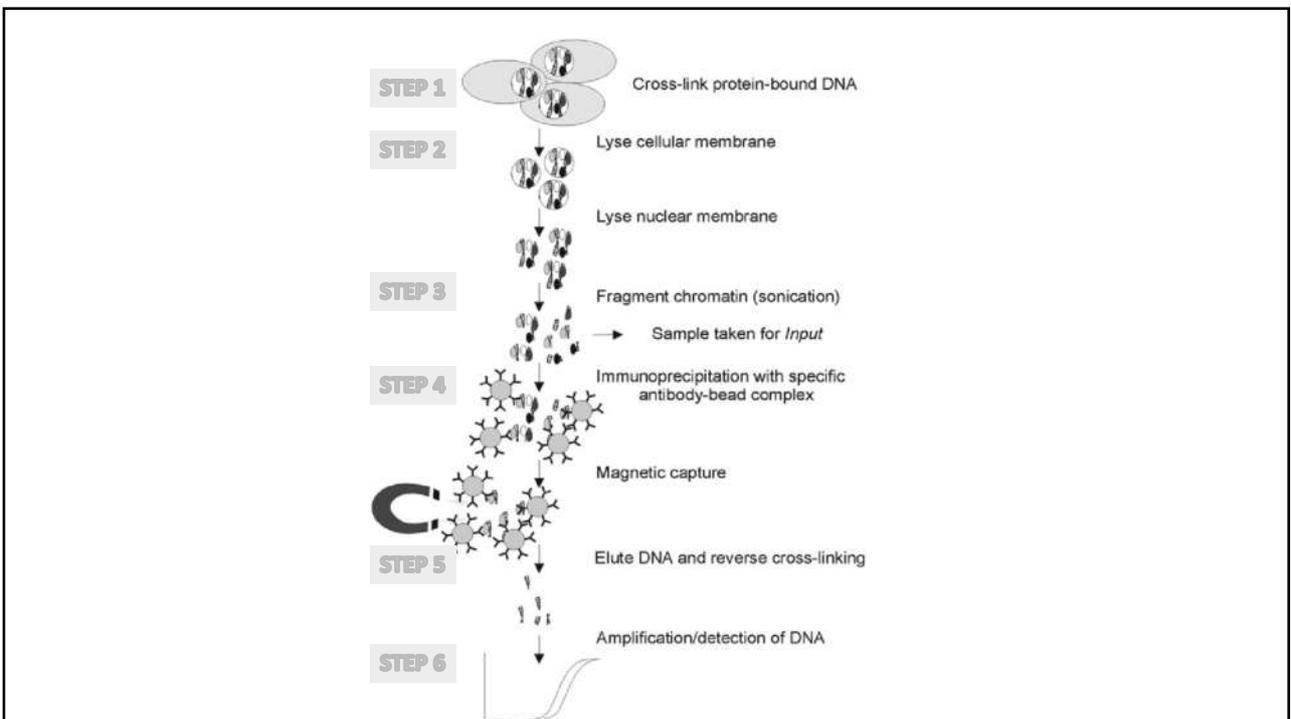


1



2



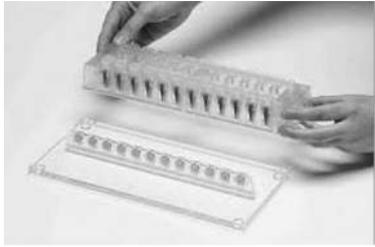
BEADS DI SEFAROSIO
MAGNETICHE
CONIUGATE CON
PROTEINA A IN
GRADO DI LEGARE LA
PORZIONE Fc
DELL'ANTICORPO



ANTICORPO
SPECIFICO PER LA
MODIFICAZIONE
ISTONICA DI NOSTRO
INTERESSE



AGITATORE ROTANTE



RACK MAGNETICO

3

STEP 1

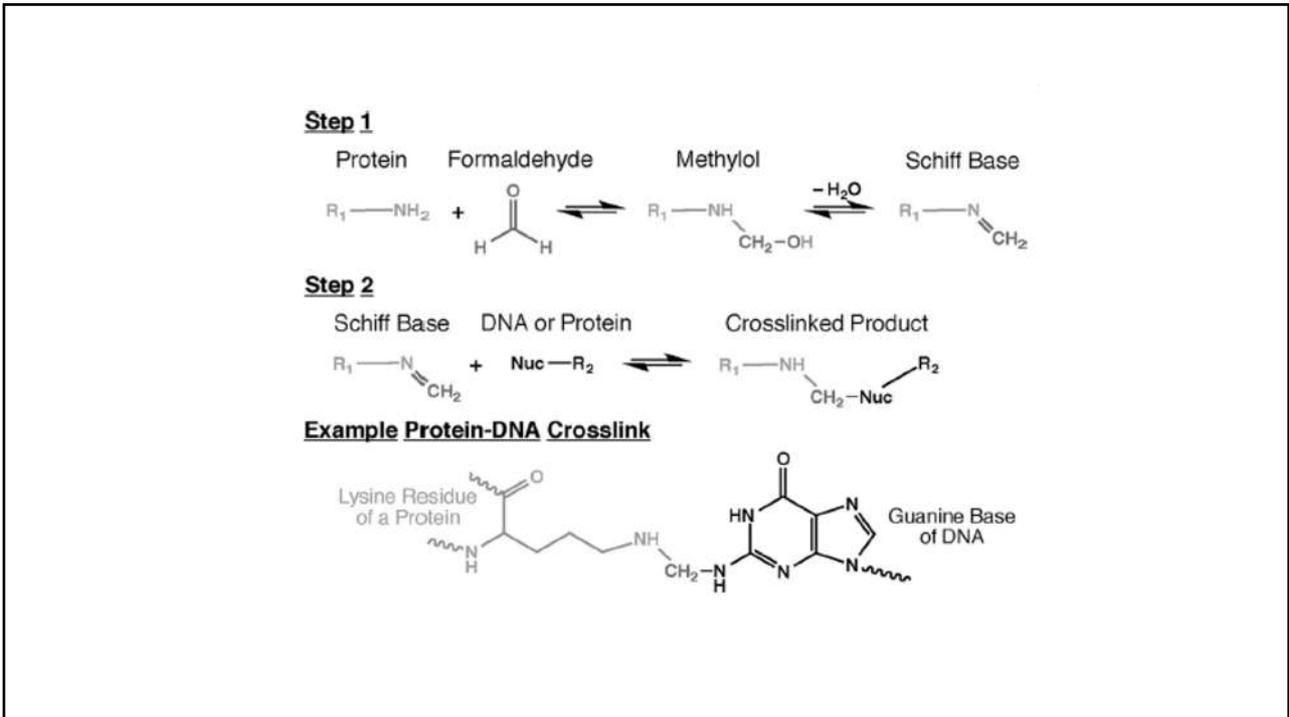
CROSSLINKING DNA-ISTONI



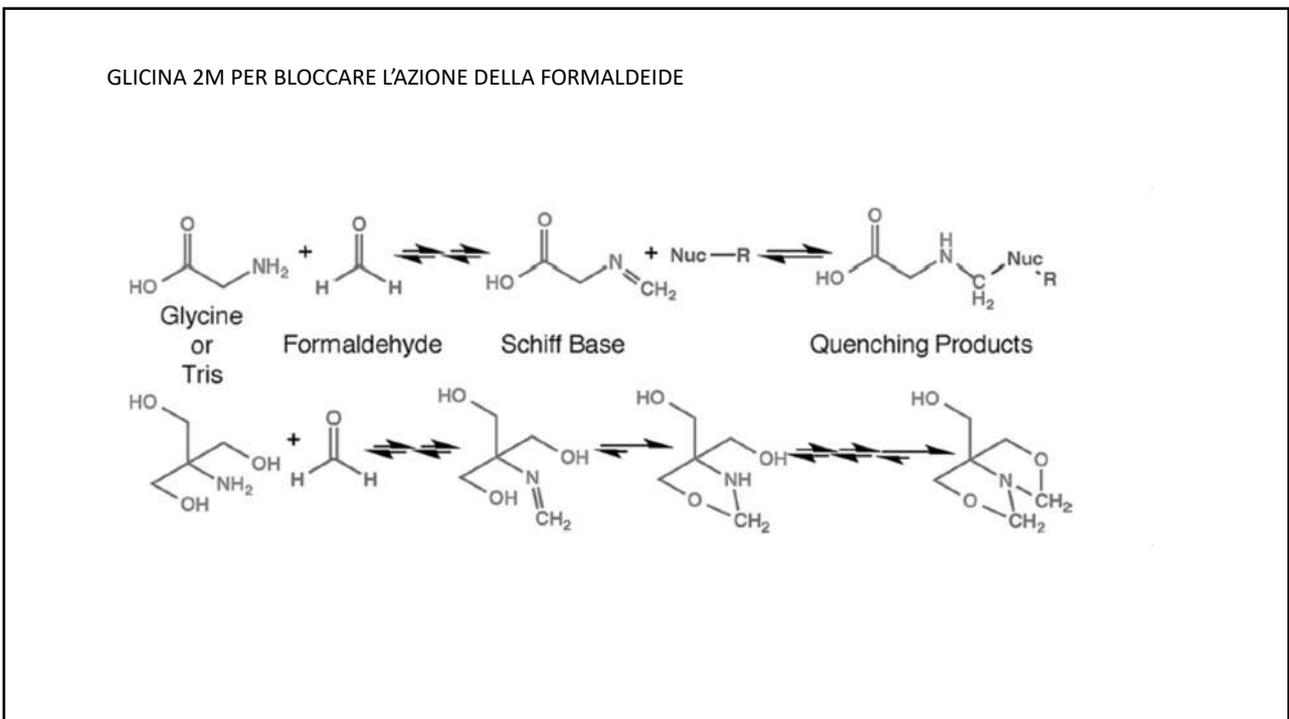
LA FORMALDEIDE PROMUOVE LA FORMAZIONE DI LEGAMI COVALENTI TRA DNA E PROTEINE.

LA FORMALDEIDE È COME UNA POLAROID, FA UNA PERFETTA Istantanea DELLA SITUAZIONE DI INTERAZIONE TRA DNA E PROTEINE E PERMETTE DI EVITARE CHE IN SEGUITO ALLA LISI DELLE CELLULE, LE PROTEINE SI STACCHINO DAL DNA E L'INTERAZIONE CHE VOLEVAMO STUDIARE VENGA PERSA.

4



5



6

STEP 2

Lisi cellulare

Nuclear extraction buffer

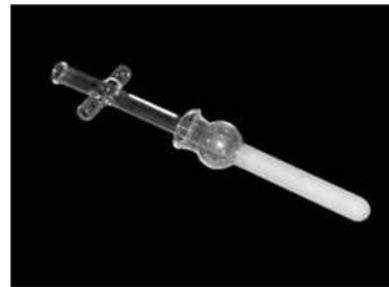
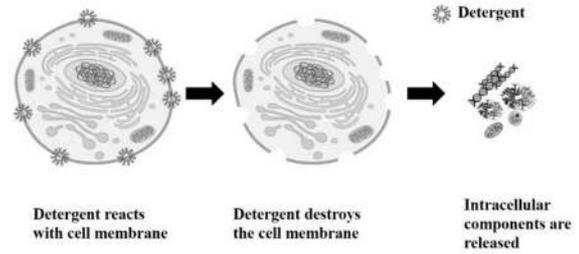
	Final concentration	Stock	500 mL Volume
Tris-HCl	10 mM	1 M	7
NaCl	100 mM	2 M	7
MgCl ₂	2 mM	0,5 M	7
Sucrose	0,3 M	3 M	7
Igepal CA-630	0,25%		1,25 mL

Add protease inhibitors just before use.

Lysis buffer

	Final concentration	Stock	500 mL Volume
Tris- HCl (pH 8.0)	50 mM	1 M	25 mL
EDTA	10 mM	0,5 M	10 mL
SDS	1%	10%	50 mL

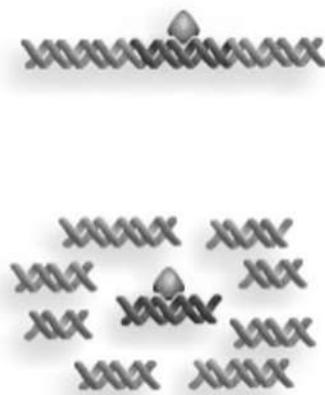
Add protease and phosphatase inhibitors just before use



7

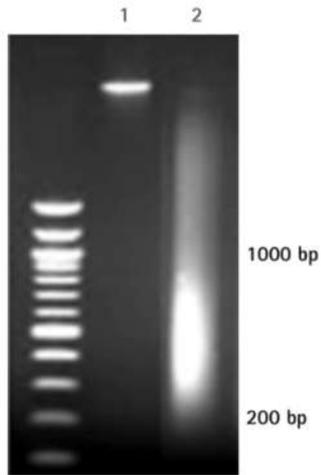
STEP 3

Frammentazione della cromatina



8

VERIFICARE LA DIMENSIONE DEI FRAMMENTI DI CROMATINA OTTENUTI IN SEGUITO AL PROCESSO DI SONICAZIONE, PREPARANDO UN GEL DI AGAROSIO ALL'1,5% E FACENDO CORRERE 10 μ l DI CROMATINA



9

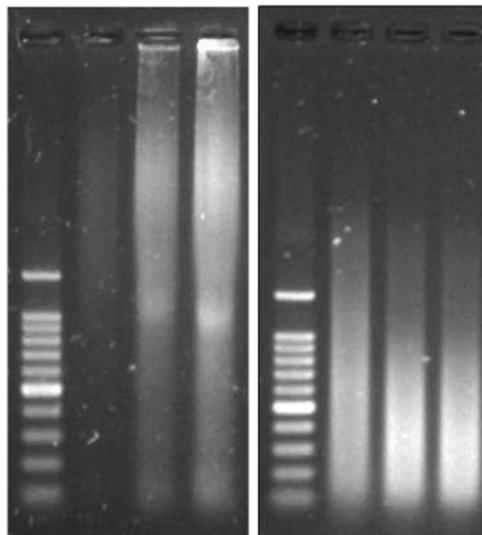
NB
REVERSE CROSSLINK!!

NaCl 2M

+

PROTEINASI K

No de-crosslinking De-crosslinking



10

STEP 4 immunoprecipitazione

The diagram illustrates the immunoprecipitation step. On the left, a schematic shows Sepharose beads with Protein A attached to an antibody, which is bound to an antigen. In the center, a photograph shows a 6 Tube Magnetic Separation Rack with several tubes containing liquid. On the right, a diagram illustrates the separation of DNA-protein complexes from unbound DNA.

11

Chromatin Immunoprecipitation

Quantification of CHIP DNA

ChIP-qPCR
ChIP-chip
ChIP-seq

CHIP binding profiles

Focused (transcription factors)
Broad (e.g. H3K36me3)
Mixture (e.g. DCC)

Gene

12

Come calcolare quanti ul di cromatina dobbiamo prelevare ??

dai ng /ul dell' INPUT

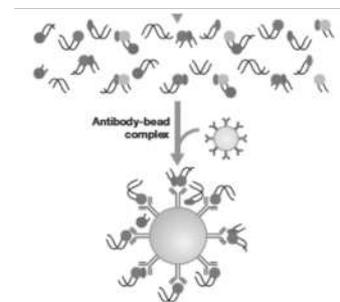
NB

Per preparare INPUT abbiamo utilizzato aliquota di 20 ul di cromatina da cui abbiamo ottenuto dopo reverse crosslink 40 ul DNA

SE lettura spettrofotometro di 1 ul di DNA = 150 ng/ μ L

risospeso in 40 ul di H₂O = 6000 ng

$6000 / 20 = 300$ ng/ul



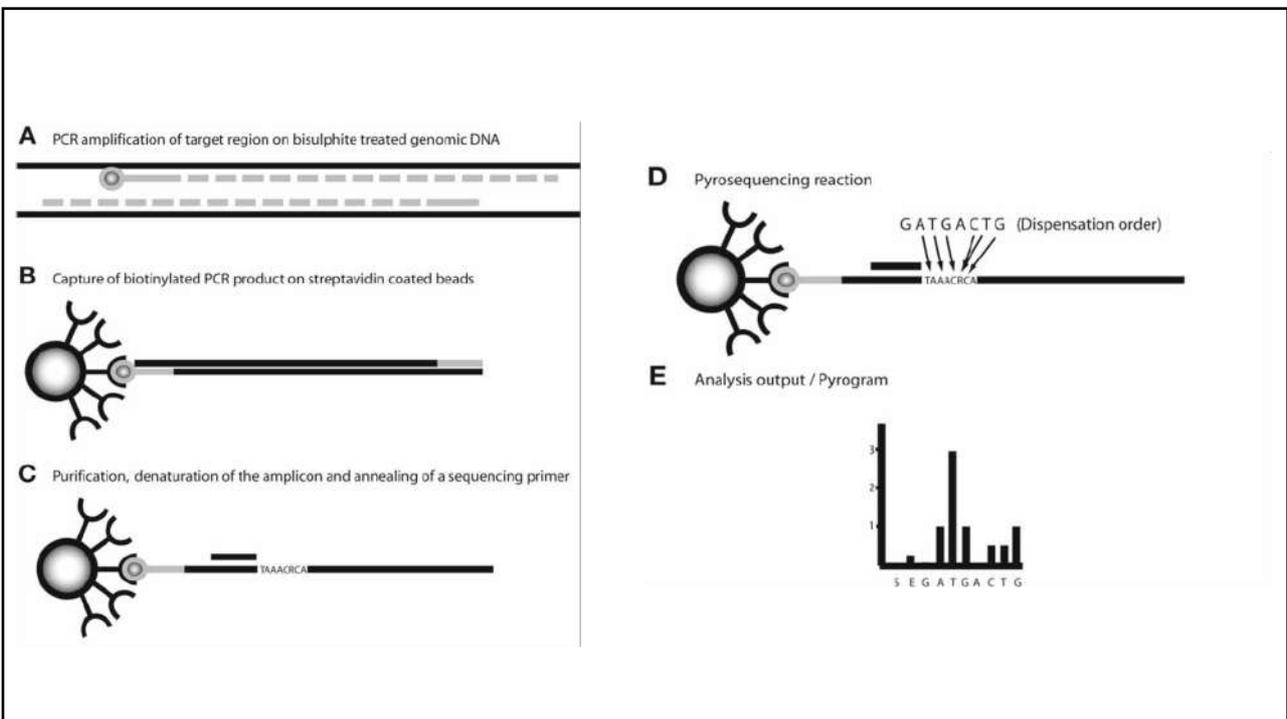
13

<https://www.jove.com/science-education/5551/chromatin-immunoprecipitation>

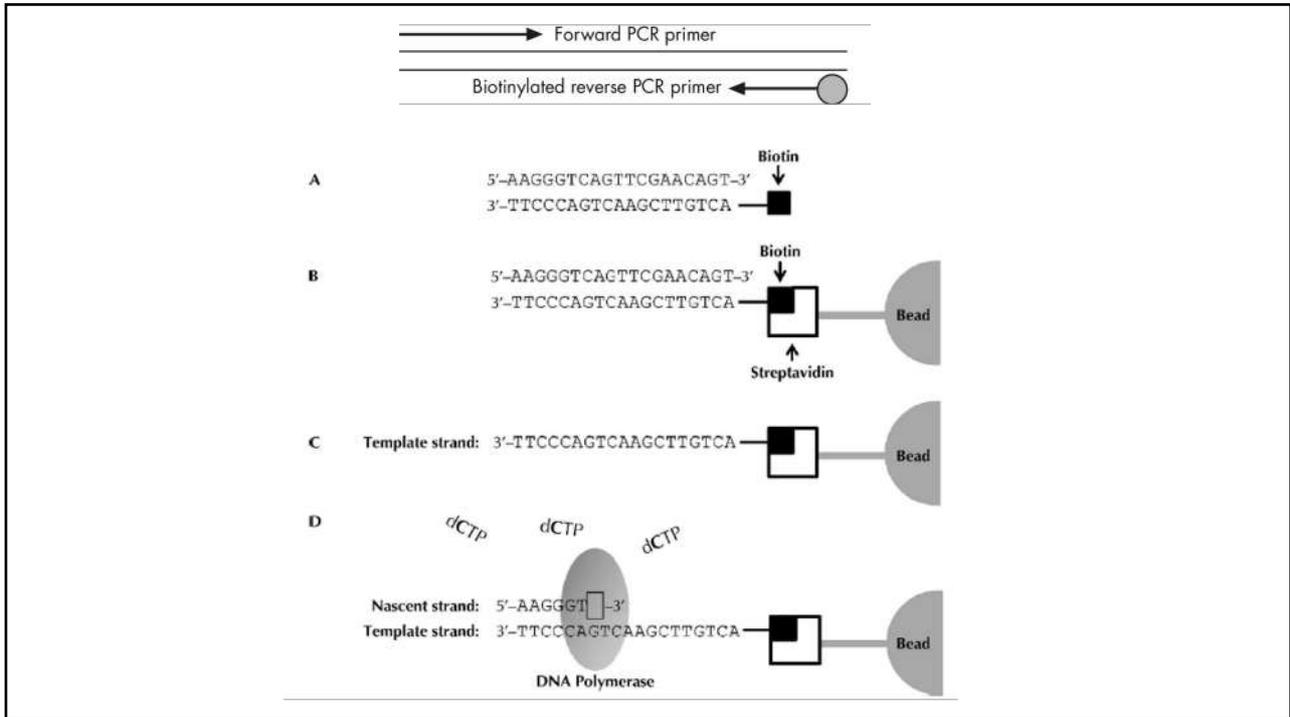
14

PYROSEQUENCING

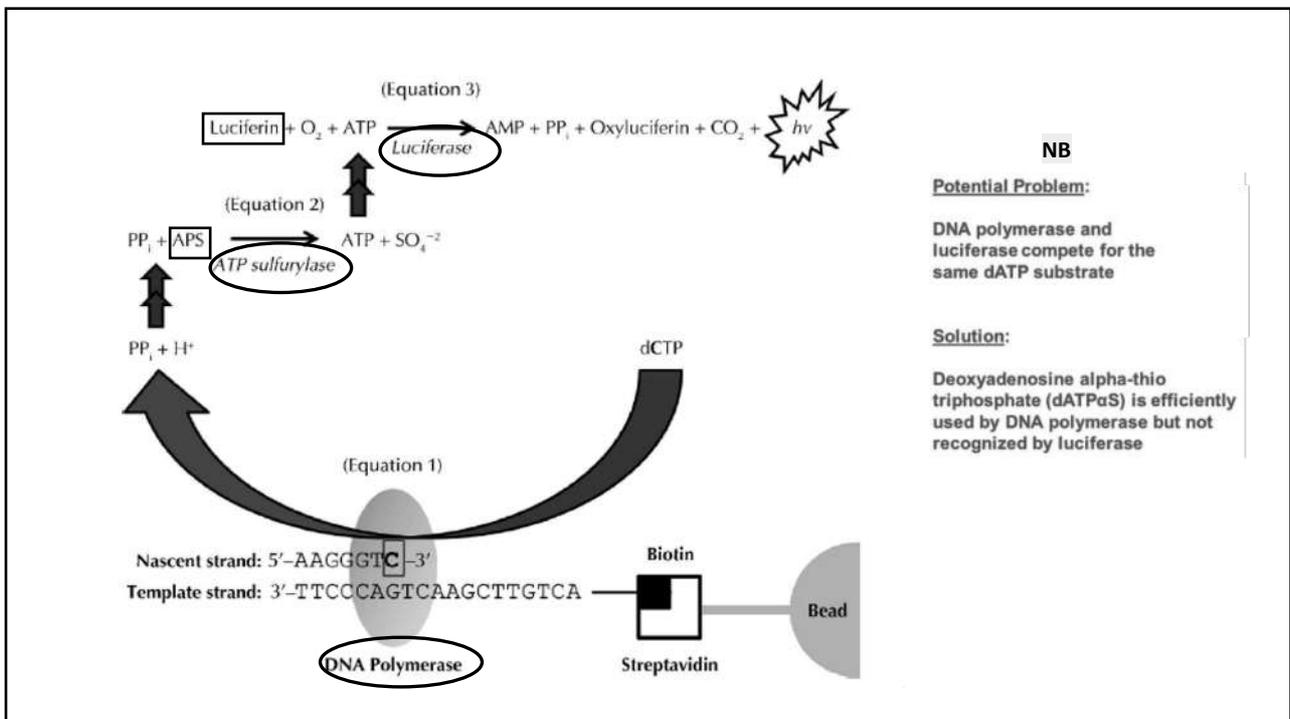
15



16



17



18

$APS + PPi \xrightarrow{\text{Sulfurylase}} ATP$
 $ATP + \text{luciferin} \xrightarrow{\text{Luciferase}} \text{oxyluciferin} + \text{Light}$

Light
 Time

Nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the Pyrogram trace

WWW.QIAGEN.COM

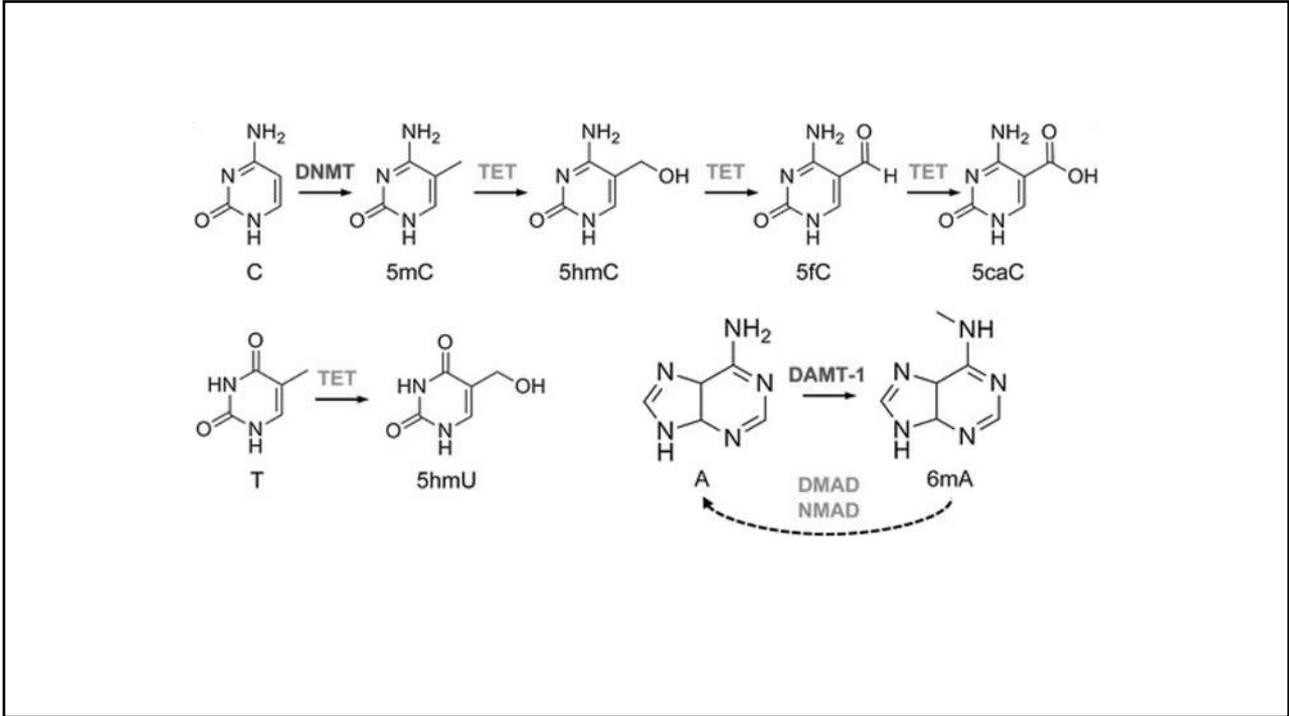
L' ATP SULFORILASI CONVERTE IL PPi in ATP IN PRESENZA DI APS
 L'ATP GUIDA LA CONVERSIONE LUCIFERASI-MEDIATA DELLA LUCIFERINA IN OXILUCIFERINA CHE GENERA LUCE VISIBILE IN QUANTITÀ PROPORZIONALE ALL'AMMONTARE DI ATP.
 LA LUCE GENERATA NELLA REAZIONE CATALIZZATA DALLA LUCIFERASI VIENA RILEVATA DA UNA CAMERA CCD E VISUALIZZATA COME UN PICCO NEL PIROGRAMMA
 L'ALTEZZA DI CIASCUN PICCO È PROPORZIONALE AL NUMERO DI NUCLEOTIDI INCORPORATI

19

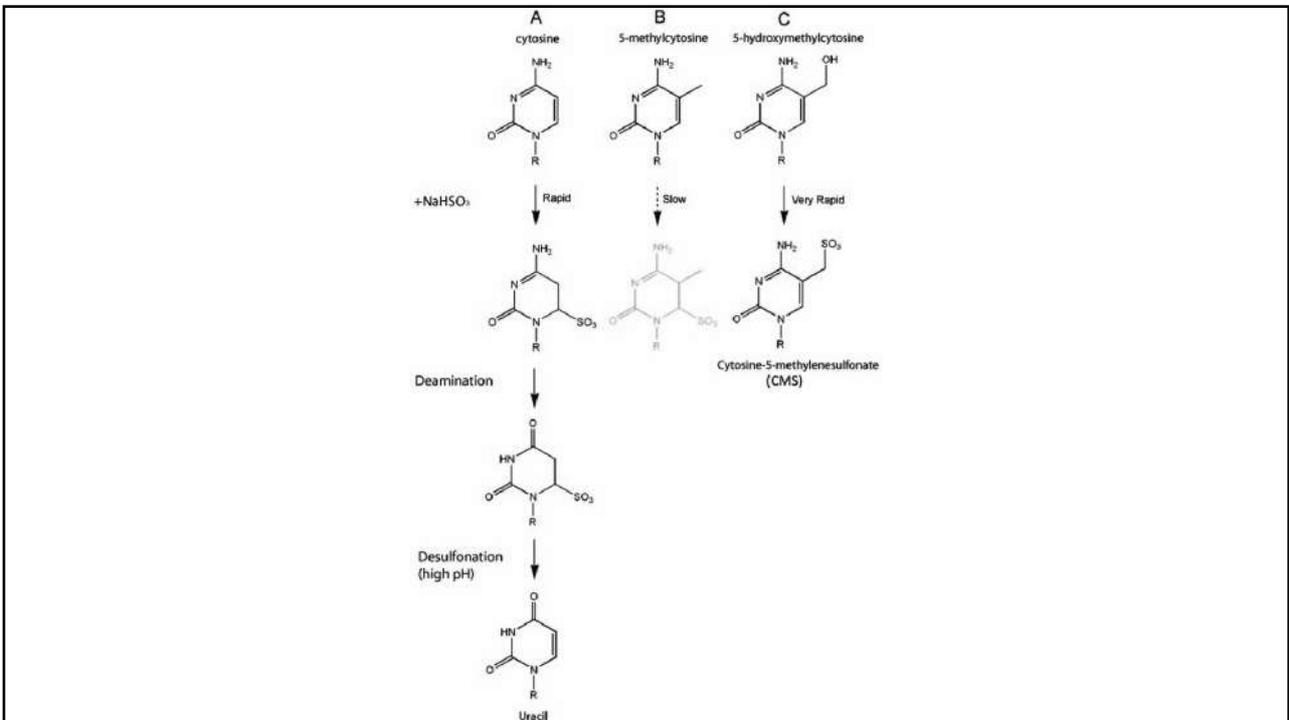
$dNTP \xrightarrow{\text{Apyrase}} dNDP + dNMP + \text{phosphate}$
 $ATP \xrightarrow{\text{Apyrase}} ADP + AMP + \text{phosphate}$

WWW.QIAGEN.COM

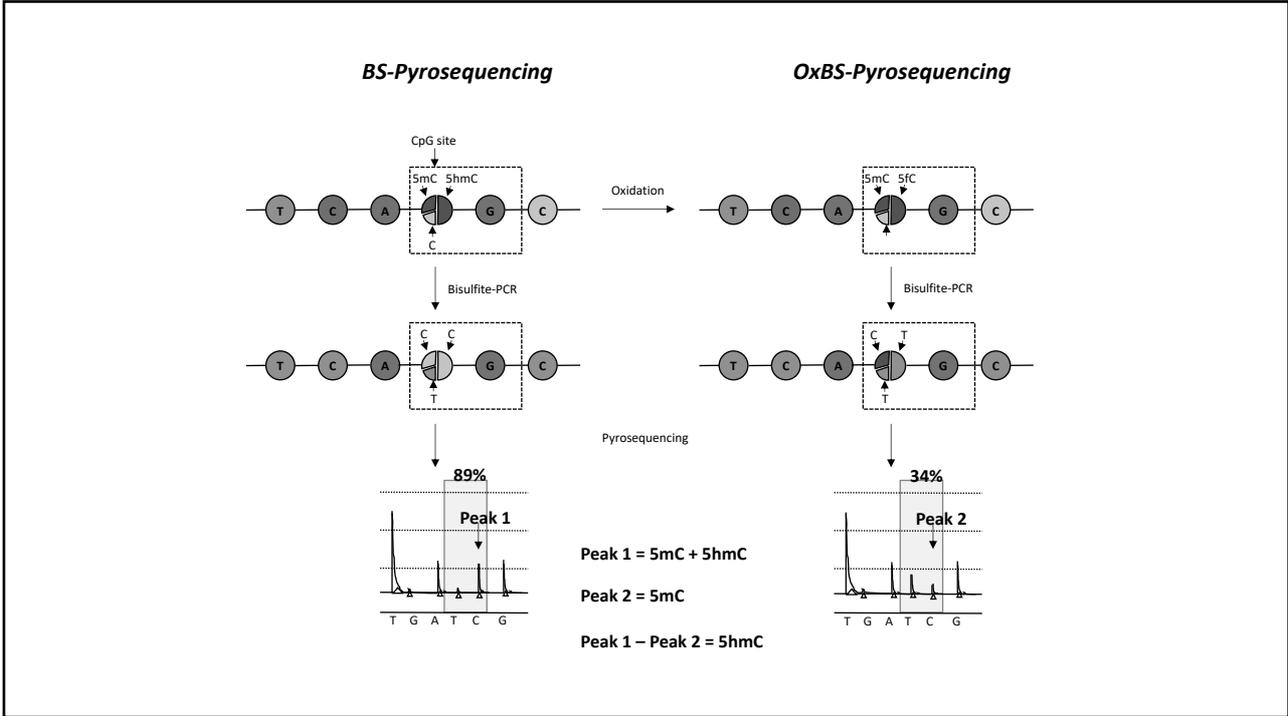
20



23



24



25

<https://www.youtube.com/watch?v=LbEz9GBKW-s>

26

<https://www.jove.com/video/50405/pyrosequencing-for-microbial-identification-and-characterization>

27

PyroMark PCR

Serve sia a creare lo stampo a singolo filamento biotilinato necessario per il sequenziamento, ma anche a convertire gli uracili frutto della reazione di bisolfitazione in timine

COSA CI SERVE?

- PyroMark Master Mix : contiene sali che promuovono l'annealing specifico primer-stampo e allo stesso tempo evitano appaiamenti non corretti, HotStartTaq DNA Polimerasi, dNTPs
- CoralLoad: contiene una soluzione di caricamento gel e un colorante utili per lo step successivo di elettroforesi
- Primer Forward + Primer Reverse: a seconda del gene di interesse e del saggio può essere biotilinato l'uno o l'altro
- H2O Nuclease Free



28

PICCOLA NOTA SUI PRIMERS

SIA I PRIMERS PER L'AMPLIFICAZIONE PCR CHE PER IL SEQUENZIAMENTO POSSONO:

- ESSERE FORNITI DALLA QIAGEN, SI TRATTA DI ASSAY STANDARDIZZATI PER IL GENE DI INTERESSE



- SE LA QIAGEN NON PRODUCE L'ASSAY DI NOSTRO INTERESSE, I PRIMERS VERRANNO DISEGNATI SULLA SEQUENZA DI NOSTRO INTERESSE MEDIANTE SPECIFICO SOFTWARE



29

Come procedere per la PCR?

- In una Eppendorf da 0,2 ml aggiungere:
 - 2,5 µl di DNA bisolfittato nella prima fase
 - 12,5 µl di PyroMark PCR Master Mix
 - 2,5 µl di Mix Primer Forward + Reverse
 - 2,5 µl di H₂O Nuclease Free



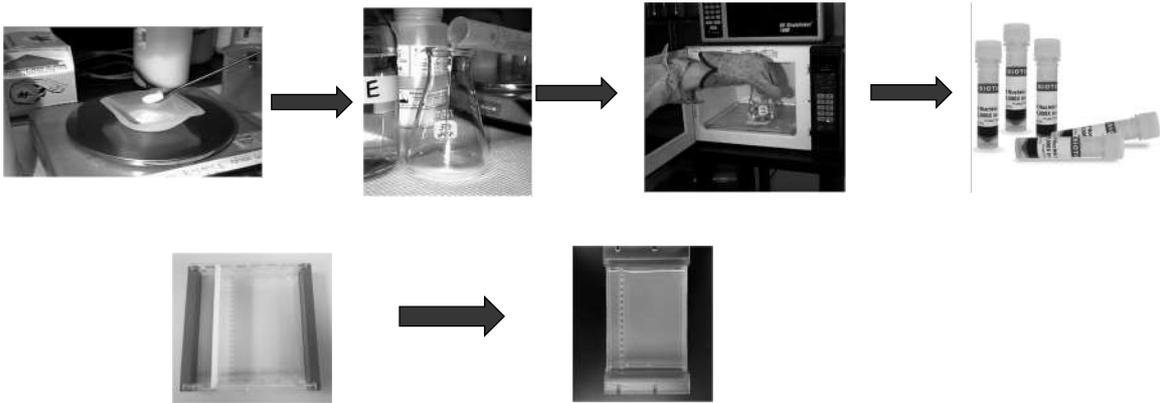
95°C per 15 min
 94°C per 30 s
 56°C per 30 s
 72°C per 30 s
 72°C per 10 min

} 45 cicli

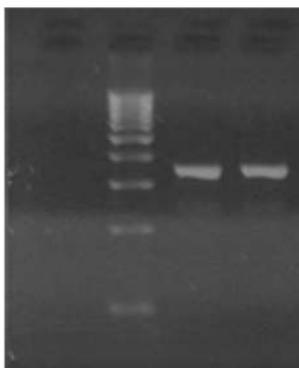
30

Verificare la specificità del prodotto di amplificazione mediante corsa elettroforetica

Preparare un gel di agarosio all' 1,8%, disciogliendo 1,8 g di Agarosio in 100 mL di Tampone TAE 1X mediante l'uso di un forno a microonde ed aggiungere GelRed per rendere visibili i campioni



31



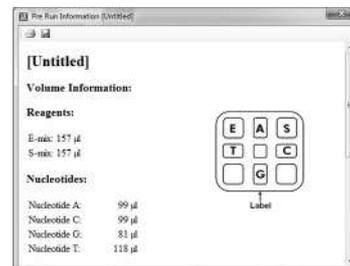
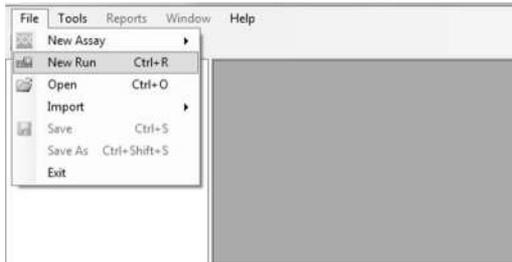
MEDIANTE L'USO DI UN MARCATORE DI DIMENSIONE
VERIFICARE LA SPECIFICITÀ DEL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE

VERIFICARE ANCHE LA PRESENZA DI UNA SOLA BANDA BEN
NETTA, SENZA SMEARS CHE INDICHEREBBERO
FRAMMENTAZIONE DEL NOSTRO DNA.

32

PYROSEQUENCING: SOFTWARE, STRUMENTAZIONE E BUFFERS

- SOFTWARE -



33

PYROSEQUENCING: STRUMENTAZIONE E BUFFERS



BLOCCO RISCALDATO CHE ARRIVA A 80°C + PORTA PIASTRA

REAGENTI:
 BINDING BUFFER
 BEADS DI SEFAROSIO RIVESTITE DA STREPTAVIDINA
 ANNEALING BUFFER
 PRIMER DI SEQUENZIAMENTO 10 X

ETANOLO AL 70%
 DENATURATION SOLUTION
 WASH BUFFER
 H2O NUCLEASE FREE

ENZIMI
 SUBSTRATI
 dNTPs

CARTUCCIA
 CARICAMENTO ENZIMI
 SUBSTRATI E dNTPs



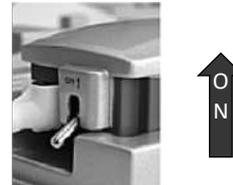
34

PRIMA DI INIZIARE.....

VERIFICARE CHE LA STAZIONE DI LAVORO PER IL VUOTO SIA STATA ASSEMBLATA IN MODO CORRETTO E SICURO.

ACCENDERE LA POMPA PER IL VUOTO.

APPLICARE IL VUOTO ALLO STRUMENTO APRENDO L'INTERRUTTORE DI VUOTO.



LAVARE LE SONDE DEL FILTRO ABBASSANDOLE NELL'ACQUA ALTAMENTE DEPURATA. SCIACQUARE LE SONDE CON 70 ML DI ACQUA ALTAMENTE DEPURATA.



VERIFICARE CHE L'ACQUA SIA TRASFERITA NEL CONTENITORE DEL MATERIALE DI SCARTO. IN CASO CONTRARIO, VERIFICARE CHE LA TUBAZIONE SIA COLLEGATA CORRETTAMENTE E NON SIA ROTTA.

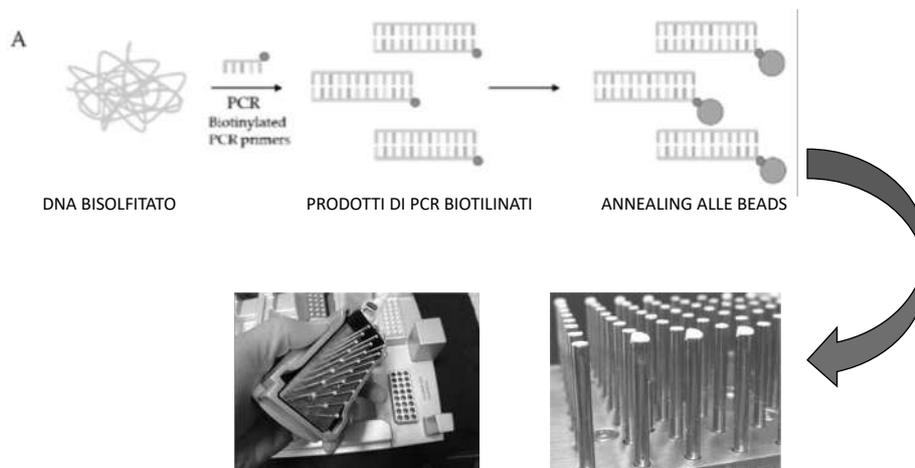
35

PREPARAZIONE CAMPIONE

A PARTIRE DAL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE PCR, È NECESSARIO ISOLARE IL FILAMENTO BIOTILINATO IN MODO DA PERMETTERNE IL LEGAME CON IL PRIMER DI SEQUENZIAMENTO.

È NECESSARIO DUNQUE INNANZITUTTO:

PROMUOVERE IL LEGAME DELL'AMPLIFICATO ALLE BEADS DI SEFAROSIO GRAZIE ALL'AFFINITÀ BIOTINA-STREPTAVIDINA



36

IN UN EPPENDORF DA 0,2 ML AGGIUNGERE, CAMBIANDO IL PUNTALE AD OGNI AGGIUNTA:

- 10 μ l DI PRODOTTO DI PCR
- 40 μ l DI BINDING BUFFER
- 1 μ l DI SEPHAROSE BEADS
- 19 μ l DI H₂O NUCLEASE FREE



DISPORRE L'EPPENDORF IN UN TERMOMIXER, E LASCIARE IN AGITAZIONE A 1400 RPM PER 10 MINUTI A TEMPERATURA AMBIENTE. QUESTO STEP SERVE A FAVORIRE IL LEGAME DNA-BEADS E AD EVITARE CHE QUESTE ULTIME AVENDO UNA DENSITA MAGGIORE SI DEPOSITINO SUL FONDO DELLA PROVETTA



37

NEL FRATTEMPO PREPARIAMO LA MIX PER IL PRIMER DI SEQUENZIAMENTO:

- 2,5 μ l DI PRIMER DI SEQUENZIAMENTO
- 22,5 μ l DI ANNEALING BUFFER

DISPONIAMO I 25 μ l DELLA MIX DI ANNEALING IN CIASCUN POZZETTO DI UNA PYROMARK Q24 PLATE



38

PREPARIAMO LA WORK STATION

Filling the workstation troughs.

WWW.QIAGEN.COM

39

SIAMO PRONTI PER INIZIARE

~ 15 Secs,
tutta la mix deve essere aspirata.
Le beads legate al primer biotilinato fanno si che il prodotto di PCR rimanga adeso alla superficie del filtro del riccio

~ 25 Secs agitando leggermente il Riccio in modo da rilasciare le beads con il DNA nei pozzetti contenenti il sequencing primer

Lavaggio per allontanare il filamento non biotilinato

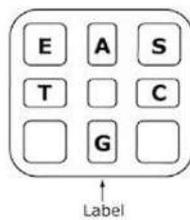
Denaturare il DNA in modo che rimanga il singolo filamento biotilinato adeso alle beads

Lavaggio in etanolo al 70% per allontanare Sali residui e DNA eventualmente non biotilinato

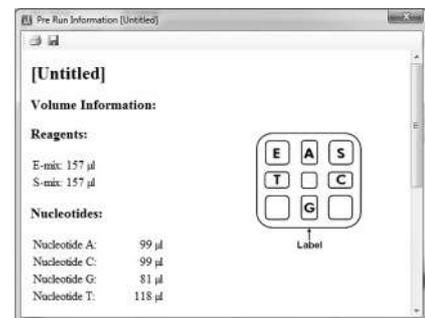
WWW.QIAGEN.COM

40

- Incubare la plate a 80 °C per 2 minuti, ciò serve ad eliminare ogni struttura secondaria dello stampo a singolo filamento che potrebbe interferire con l'annealing del primer di sequenziamento o l'aggiunta enzimatica dei nucleotidi
- Terminati i 2 minuti di incubazione, lasciare raffreddare la plate per circa 10 minuti a temperatura ambiente. Ciò favorirà l'annealing del primer di sequenziamento allo stampo a singolo filament tramite un lento abbassamento della temperatura.
- Nel frattempo carichiamo la cartuccia con i dNTPs, enzimi e substrati seguendo le PreRun informations che ci sono state fornite dal software



Top view of the cartridge



WWW.QIAGEN.COM

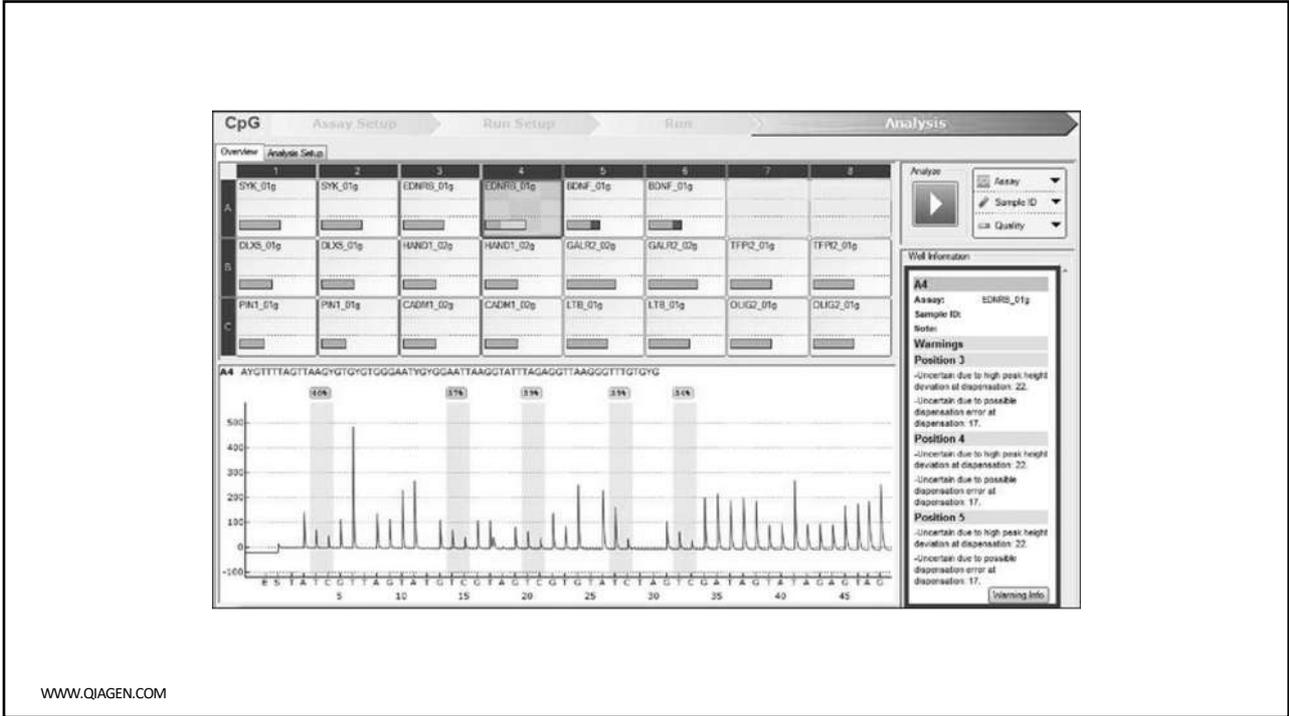
41

Caricare plate e cartuccia all'interno dello strumento ed avviare la run



WWW.QIAGEN.COM

42



WWW.QIAGEN.COM