

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ В ПРОТОКОЛАХ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ХРОМАТИНА (МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ) В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Игнатьева Е.В., Смирнов Д.Д., Костарева А.А., Дмитриева Р.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Игнатьева Елена Владимировна
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: lefutur@mail.ru

Статья поступила в редакцию 07.06.2018
и принята к печати 13.06.2018

Резюме

Эпигенетические механизмы контролируют наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии генов, не затрагивая структурные изменения в их нуклеотидной последовательности. К числу известных эпигенетических механизмов относятся ковалентные модификации хроматина, такие как метилирование ДНК; метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и гликозилирование гистонов. Эти процессы связаны с адаптацией структурной и функциональной организации хроматина к локальным физиологическим и метаболическим нуждам клетки в ответ на постоянно изменяющиеся условия внешней среды. Нарушение механизмов эпигенетической регуляции напрямую или косвенно связано с множеством заболеваний, а факт потенциальной обратимости эпигенетических модификаций делает перспективным поиск методов коррекции патологий, связанных с эпигенетическим перепрограммированием.

Экспериментальные подходы к изучению эпигенетических механизмов могут показаться сложными начинающему исследователю, так как являются трудоемкими, требуют опыта выполнения сложных экспериментальных задач. В нашей работе мы описали и проанализировали протоколы подготовки образцов для изучения метилирования ДНК и модификаций гистонов. Представленные протоколы являются результатом интеграции и адаптации методических подходов, описанных в различных изданиях. Все экспериментальные процедуры мы тестировали на клеточных моделях жировой дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. Протоколы будут полезны как исследователям, изучающим механизмы эпигенетической регуляции конкретных генов, так и для проведения исследований, включающих полногеномное картирование определённых эпигенетических модификаций, а также могут быть адаптированы для иммунопреципитации любых регуляторных комплексов ДНК-белок.

Ключевые слова: эпигенетические модификации, иммунопреципитация метилированной ДНК, иммунопреципитация хроматина.

Для цитирования: Игнатьева Е.В., Смирнов Д.Д., Костарева А.А., Дмитриева Р.И. Особенности пробоподготовки в протоколах исследования роли эпигенетических модификаций хроматина (метилирования ДНК и модификаций гистонов) в регуляции экспрессии генов. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): .

SAMPLE PREPARATION FOR DOWNSTREAM ANALYSIS OF EPIGENETIC MODIFICATIONS (DNA METHYLATION AND HISTONE MODIFICATIONS) IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

Ignatieva E.V., Smirnov D.D., Kostareva A.A., Dmitrieva R.I.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena V. Ignatieva
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: lefut@mail.ru

Received 07 June 2018; accepted 13 June 2018.

Abstract

Epigenetic changes are defined as inherited/non-inherited modifications that control alterations in gene expression without any structural changes in their nucleotide sequence. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation and glycosylation of histones. These processes are associated with the adaptation of the structural and functional organization of chromatin to the local physiological and metabolic changes in response to environmental conditions. It is known by now that the number of diseases is associated with disruptions in the mechanisms of epigenetic regulation; however, epigenetic changes are dynamic and their potential reversibility makes them the promising targets for pharmaceutical interventions to correct alterations associated with epigenetic reprogramming.

Experimental approaches to the investigation of epigenetic mechanisms may seem complicated, since they all are time-consuming and require experience in performing complex experimental tasks. In our work, we present the protocols for the preparation of samples for the study of DNA methylation and histone modifications that are the result of integration and adaptation of the methodological approaches described in various scientific publications. All experimental procedures we tested on the cellular models of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. These protocols will be useful for those who plan to study the mechanisms of epigenetic regulation of specific genes, or for full-genome mapping of certain epigenetic modifications; these protocols can also be adapted for immunoprecipitation of any regulatory DNA-protein complexes.

Key words: epigenetic modifications, methylated DNA immunoprecipitation, chromatin immunoprecipitation

For citation: Ignatieva E.V., Smirnov D.D., Kostareva A.A., Dmitrieva R.I. Sample preparation for downstream analysis of epigenetic modifications (DNA methylation and histone modifications) in the regulation of gene expression. Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018; 5 (2):pages. (In Russ.)

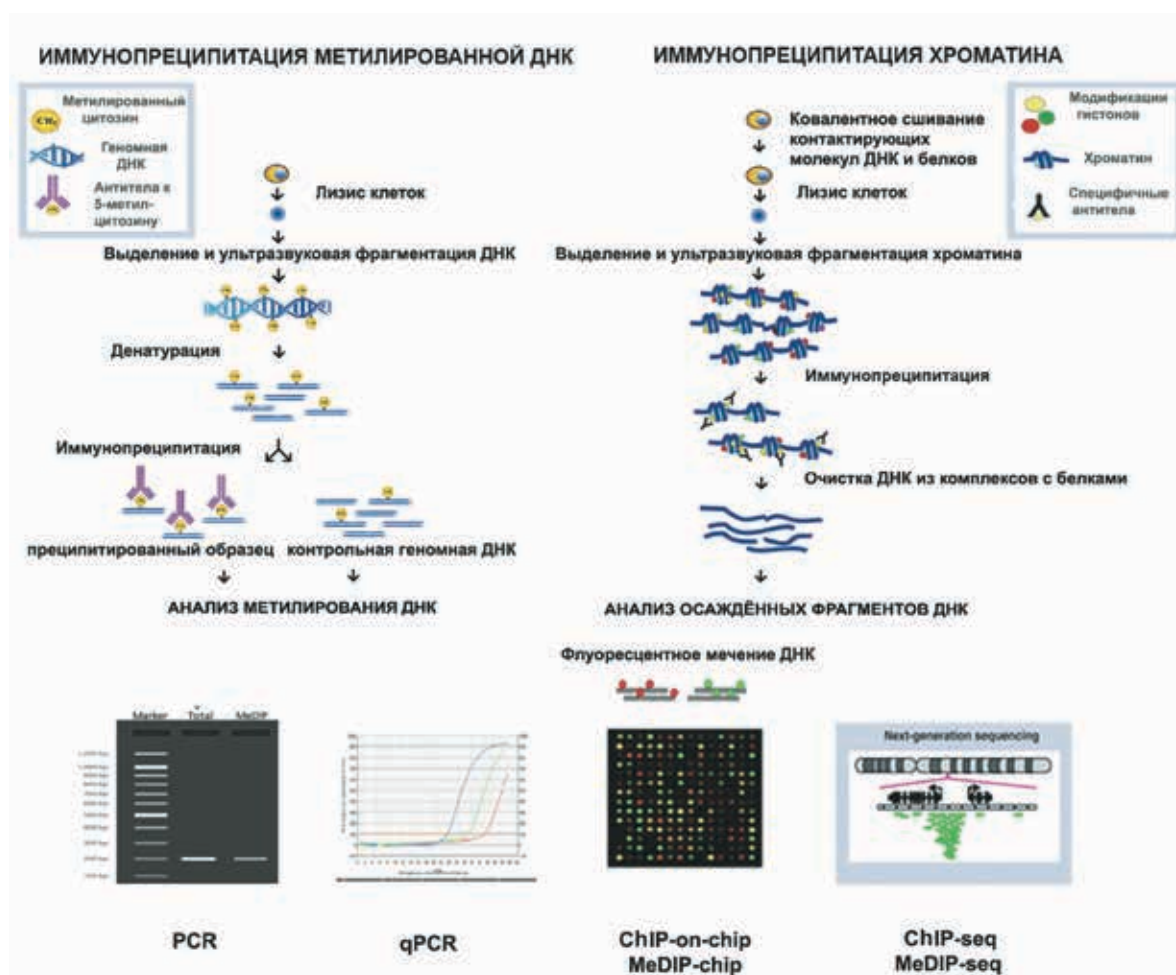
Список сокращений:

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Эпигенетические механизмы контролируют изменение активности генов, не затрагивая последовательность ДНК, но оказывая влияние на взаимодействие между ДНК-последовательностью и переменными регуляторными структурами генома. Эпигенетические механизмы включают в себя

такие ковалентные модификации хроматина как метилирование ДНК, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и гликозилирование гистонов; добавление и удаление этих модификаций катализируется ферментами, активность которых опосредована специфическими субстратами, кофакторами и аллостерическими регуляторами, наличие которых определяется конкретными физиологическими условиями и/или

Рисунок 1. Принципы экспериментальных подходов к изучению эпигенетических модификаций



Методы иммунопреципитации метилированной ДНК (MeDIP – methylated DNA immunoprecipitation) и иммунопреципитации хроматина (ChIP – chromatin immunoprecipitation) используют преципитацию эпигенетически модифицированных фрагментов ДНК/хроматина специфическими антителами. Применяя антитела к 5-метилцитозину, получают фракции ДНК, обогащённые метилированными последовательностями. С использованием антител, специфичных к различным модификациям гистонов, выделяют фрагменты ДНК, связанные с модифицированными гистонами. Полученные путём иммунопреципитации последовательности ДНК затем возможно анализировать, применяя гибридизацию на микрочипах (ChIP-on-chip/MeDIP-chip), прямую ПЦР-амплификацию локусов интереса (PCR, qPCR) или секвенированием (ChIP-seq /MeDIP-seq).

метаболическим статусом клетки [1-3]. Эпигенетическое перепрограммирование, вызванное взаимодействием клетки с внешними условиями, может приводить к развитию наследуемых функциональных изменений в органах и тканях, а также к формированию клонов клеток с новыми, в том числе патологическими свойствами, без изменений в последовательности ДНК.

Эпигенетические модификации могут передаваться потомству и поддерживаться в последующих поколениях даже тогда, когда устранены внешние стимулы, вызывающие конкретный эпигенетический механизм перепрограммирования. В то же время, потенциальная обратимость эпиге-

нетических модификаций создает хорошие предпосылки для поиска эффективных подходов к терапии заболеваний, связанных с эпигенетическим перепрограммированием. Именно поэтому выявление возможной роли эпигенетических механизмов в возникновении, развитии, наследовании и лечении широкого спектра заболеваний становится популярным, а часто и необходимым этапом современных медико-биологических исследований.

Экспериментальные подходы к изучению эпигенетических модификаций можно разделить на две группы: (а) исследования направленные на определение того, как конкретные эпигенетические процессы регулируют активность генов интереса и

(б) исследования, дизайн которых включает в себя полногеномное картирование эпигенетических модификаций в тех или иных экспериментальных или физиологических условиях.

Общим этапом для многих экспериментальных подходов, направленных как на исследование эпигенетических модификаций, которые участвуют в регуляции конкретного гена интереса, так и на полногеномное картирование конкретной эпигенетической модификации, является обогащение исследуемого образца модифицированными фрагментами хроматина/ДНК. Для достижения этой цели обычно используют метод иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК с применением антител к метилированному цитозину анти-5mC или иммуноосаждение модифицированных участков хроматина с применением антител, специфичных к различным модификациям гистонов. Общая схема эксперимен-

тальных подходов к изучению эпигенетических модификаций представлена на рисунке 1.

В данной работе мы представляем детальный анализ основных этапов подготовки образцов для исследования эпигенетических модификаций с использованием иммуноосаждения как метода обогащения исследуемого образца ДНК или хроматина эпигенетически модифицированной фракцией. Протоколы тестировались с использованием клеточных моделей жировой и мышечной дифференцировки взрослых стволовых клеток, хорошо охарактеризованных в наших предшествующих проектах [4,5].

Экспериментальные процедуры

Сравнительный анализ протоколов иммунопреципитации метилированных фрагментов ДНК и иммунопреципитации хроматина.

Получение образцов метилированных фрагментов ДНК (MeDIP) для дальнейшего анализа	Получение образцов фрагментов ДНК, ассоциированных с модифицированными гистонами (ChIP) для дальнейшего анализа
1. Выделение ДНК из клеточной культуры Клетки отмывают от культуральной среды теплым фосфатным буфером и обрабатывают трипсином. Полученную суспензию клеток промывают фосфатным буфером с 2% бычьей фетальной сыворотки для нейтрализации трипсина, центрифугируют при $300 \times g$ 7 минут, супернатант удаляют и отмывают клетки от следов сыворотки теплым фосфатным буфером два раза. Считают клетки. Способ выделения геномной ДНК на анализ метилирования не влияет. Однако чрезвычайно важна тщательная очистка ДНК от ассоциированных с ней белков, таких как гистоны, и РНК. В нашей работе ДНК из культур клеток выделяли с помощью коммерческого набора FlexiGene (Qiagen, UK), с ферментативной обработкой образцов протеиназой K при 65°C-68°C в течение двух часов или ночи¹. Оценку количества и качества выделенной ДНК производили с помощью ДНК-электрофореза в агарозном геле, спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific; Wilmington, DE). Для дальнейшего использования в работу брали только те образцы ДНК, спектральные характеристики которой были: $A_{260}/A_{280} = 1,8\text{-}2,0$ (свидетельство отсутствия в образце контаминирующих белков); $A_{260}/A_{230} > 1,8$ (отсутствие следов ЭДТА, углеводов, фенола).	1. Получение клеточного препарата, фиксирование хроматина, (ДНК-протеин связывание) Добавляют 500 мкл фосфатного буфера, если клеток меньше, чем 2×10^6 и 1 мл, если клеток от 2×10^6 до 10×10^6. Переносят полученную суспензию клеток в 1,5 мл пробирку². К 500 мкл полученной суспензии добавляют 14 мкл формальдегида (36,5% сток, SIGMA) или PFA из расчета получения конечной концентрации PFA 1%. Инкубируют 10 минут при комнатной температуре, после чего инактивируют PFA глицином (28 мкл 2,5 М раствора глицина). Инкубируют 5 минут при комнатной температуре. Затем центрифугируют клетки при $470 \times g$ в течение 10 минут при 4°C, супернатант удаляют, ресуспендируют клетки в 500 мкл холодного фосфатного буфера², центрифугируют при $470 \times g$ в течение 10 минут при 4°C. Повторяют процедуру отмывания два раза. После этого клетки можно быстро заморозить и хранить при -70°C в течение месяца.

2. Ультразвуковая фрагментация ДНК

Для иммунопреципитации требуется 5 мкг геномной ДНК, растворенной в 250 мкл фосфатно-солевого буфера, поэтому к нужному объему ДНК в воде добавляется 25 мкл 10×PBS, и объем пробы доводится до 250 мкл. Затем ДНК подвергается обработке ультразвуком для разбиения на низкомолекулярные фрагменты случайной длины.

Фрагментацию ДНК и хроматина производят ультразвуком с использованием оборудования Bioruptor (Diagenode) при режиме 30 сек ON/OFF на высокой энергии 3-4 раза по 10 минут.

Необходимо помнить, что эффективность фрагментации зависит от типа клеток, условий фиксирования хроматина, объема образца. В связи с этим может возникнуть необходимость в оптимизации протокола фрагментации для достижения размера фрагментов 200-500 bp.

Эффективность фрагментации анализируют в 1.5% агарозном геле с соответствующим маркером.³

2. Лизирование клеток, фрагментация хроматина

К полученному осадку добавляют 180 мкл лизирующего буфера (табл.5) на 2×10^6 клеток. В случае большего образца объем буфера увеличивают, но не более чем до 250 мкл. Встряхивают и оставляют для завершения лизирования на льду в течение 5 минут. Аккуратно пипетируют при необходимости.

Фрагментированный образец центрифугируют при $10000 \times g$ в течение 10 минут при 4°C. Переносят супернатант в новую пробирку. Избегают верхнего слоя (жировые капли в случае препаратов жировой ткани) и осадка. На этом этапе хроматин можно заморозить.

Из полученного препарата отбирают 10 мкл хроматина для анализа качества фрагментации. Подготовка образца хроматина к анализу производится следующим образом: к 10 мкл хроматина добавляют 1 мкл RNAase (используют сток 500 ng/ml, конечная концентрация 50 ng/ml). Инкубируют 20 минут при 37°C. Затем добавляют 190 мкл буфера для элюции (табл.6), если объем образца был больше, чем 10 мкл, следует добавить буфер до получения общего объема 200 мкл. Добавляют 5 мкл протеиназы K (из стока 2 мг/мл) и инкубируют при 68°C 500 rpm на термомиксере два часа или в течение ночи. Из полученного образца выделяют ДНК, как описано в пункте 7⁴. Растворяют в 10 мкл MQ H₂O и анализируют в 1.5% агарозном геле с соответствующим маркером.

3. Иммунизация специфических анти-5MeC антител на магнитных частицах

50 мкл магнитных бусинок Dynabeads® Pan Mouse IgG (Life Technologies, США) переносят в отдельную пробирку, и пробирку помещают на магнитный штатив во льду или в холодной комнате при 4°C. Супернатант убирают. Снимают пробирку со штатива; аккуратно встряхивая, ресуспендируют бусинки в 750 мкл Block Solution 1 (табл.1) и в течение 5 минут при 4°C вращают пробирку на ротаторе. Затем на магнитном штативе при 4°C или на льду удаляют супернатант, повторяют процедуру промывки Block Solution 1, затем убирают надосадочную жидкость на магнитном штативе и центрифугируют магнитные частицы при 4°C и 1500×g в течение 3 минут. Осаждённые бусинки аккуратно ресуспендируют в 230 мкл Block Solution 2 (табл.2) и добавляют к суспензии 5 мкг моноклональных антител к 5-метилцитозину (Eurogentec, BI-MESY-0100). Полученную суспензию инкубируют на протяжении 6 часов или в течение ночи на ротационном перемешивателе при 4°C. На следующий день пробирки с подготовленными бусинками откручивают быстро на миницентрифуге, чтобы собрать все бусинки на дне, и помещают их в магнитном штативе на лед. Убирают супернатант и проводят два цикла промывки от несвязавшихся антител, включающие в себя ресуспендирование в 750 мкл Block Solution 2 и удаление надосадочной жидкости на магнитном стенде. Конъюгированные с антителами магнитные частицы ресуспендируют в 50 мкл Block Solution 2.

4. Денатурация ДНК

Фрагментированную ДНК денатурируют в течение 10 минут при 95°C и затем охлаждают в течение 10 минут во льду⁷. Денатурированную ДНК делят на две фракции. Одна фракция (50 мкл ДНК, растворённой в PBS и подвергнутой ультразвуковому дроблению) затем используется как полногеномный референс (INPUT), другая (200 мкл того же раствора) – для иммунопреципитации.

3. Иммунизация на магнитных частицах антител, специфических к модифицированным гистонам.⁵

Для иммуноосаждения используют магнитные бусинки Dynabeads «Protein A» или «Protein G» в зависимости от того, антитела какого вида используются. Перед использованием бусинки следует хорошо встряхнуть на вортексе до получения гомогенной суспензии. Рассчитывают количество бусинок, необходимых для проведения эксперимента (100 мкл на образец), помещают их в пробирку 1,5 мл и отмывают в 2,5 объеме RIPA буфера (табл.7). Помещают пробирку на магнит на 1 минуту и удаляют буфер. Повторяют отмывку еще раз, после чего ресуспендируют бусинки в 10× объеме RIPA буфера. В подготовленные и подписанные пробирки на 0,2 мл добавляют 100 мкл подготовленных бусинок и 2,5 мкг антител. Инкубируют на ротационном перемешивателе при 40 rpm 2 часа или в течение ночи при 4°C.

4. Подготовка хроматина к иммуноосаждению

Количество хроматина в образце определяют на спектрофотометре Nanodrop по поглощению на A260. Рабочая концентрация для иммуноосаждения соответствует поглощению 2 U/ml, соответственно до такой концентрации следует разбавить образец RIPA буфером без SDS⁶. 100 мкл хроматина отбирают в отдельную пробирку для дальнейшего использования в качестве референсного образца (INPUT), остальную часть образца используют для иммунопреципитации.

5. Иммунопреципитация метилированных фрагментов ДНК

К 50 мкл подготовленных бусинок добавляют 200 мкл денатурированной ДНК и 250 мкл 2×IP (табл.3) буфера. Преципитацию проводят в течение ночи, на ротаторе, при +4°C. После этого помещают пробирки в магнитный штатив на льду и удаляют супернатант. Далее магнитные частицы промывают от неспецифически связанных фрагментов ДНК буфером IP Wash (табл.4). Для этого снимают пробирки со штатива, бусинки ресуспендируют, аккуратно встряхивая, в 1 мл буфера и вращают на ротаторе в течение 3 минут при +4°C. Снова удаляют супернатант на магнитном штативе и повторяют процедуру ещё дважды.

5. Иммунопреципитация фрагментов хроматина ассоциированных с модифицированными гистонами

Пробирки с подготовленными бусинками откручивают быстро на миницентрифуге, чтобы собрать все бусинки на дне и помещают их в магнитном штативе на лед. Удаляют супернатант. Добавляют 100 мкл подготовленного хроматина и инкубируют в течение 2 часов на ротационном перемешивателе при 40 rpm при 4°C. Сбрасывают на миницентрифуге весь материал на дно пробирки, помещают пробирки в магнитном штативе на лед и удаляют супернатант. Добавляют 100 мкл RIPA буфера и инкубируют 4 минуты на rotator при 40 rpm при 4°C. Удаляют супернатант и повторяют отмывку еще два раза. Затем отмывают бусинки в 100 мкл TE буфер (pH 8), крутят rotator при 40 rpm при 4°C, переносят бусинки в новые пробирки и удаляют TE буфер.

6. Отмывка и элюирование метилированной фракции ДНК с магнитных частиц

Добавляют в каждую пробирку с бусинками по 150 мкл Elution Buffer (табл.6), содержащего 1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K. Инкубируют образцы с протеиназой 2 часа или в течение ночи при 68°C на 1300 rpm. Сбрасывают материал на миницентрифуге и собирают супернатант в 1,5 мл пробирку. К бусинкам добавляют ещё 150 мкл Elution Buffer (1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K) и вымывают остатки образца в течение 5 минут при 68°C на 1300 rpm. Собирают супернатант в ту же пробирку. В результате получается 300 мкл экстракта. Затем добавляют по 200 мкл Elution Buffer, чтобы получить образцы объемом 500 мкл для очистки ДНК (увеличение объема увеличивает выход ДНК).

К 50 мкл контрольного образца ДНК INPUT добавляют 450 мкл Elution Buffer (табл.6), и затем оба образца – INPUT и иммунопреципитированный – процессируются одинаково.

6. Отмывка и элюирование фракции ДНК, ассоциированной с модифицированными гистонами

К 100 мкл исходного образца хроматина INPUT добавляют 200 мкл Elution Buffer содержащего 1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K. Инкубируют с протеиназой 2 часа или в течение ночи при 68°C на 1300 rpm. Затем добавляют 200 мкл Elution Buffer, чтобы получить 500 мкл.

7. Экстракция ДНК

1. К 500 мкл образца добавить 500 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1)
2. Перемешать, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, и центрифугировать на 15000 ×g 5 минут
3. Аккуратно перенести верхнюю фазу в новую пробирку
4. Добавить 450 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1)
5. Перемешать, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, и центрифугировать на 15000 ×g 5 минут
6. Аккуратно собрать верхнюю фазу и перенести в новую пробирку
7. Добавить 40 мкл (0,1 объема) 3M Na-acetate, 10 мкл акриламида или гликогена для визуализации осадка и 1 мл холодного 96% спирта и оставить при -80°C на 2 часа или в течение ночи для осаждения ДНК⁹
8. Центрифугировать при 20000 ×g 15 минут при 4°C
9. Удалить супернатант и высушить ДНК в открытой пробирке
10. Растворить в 10 мкл MQ H₂O

8. Контроль эффективности иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК осуществлялся с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) для стабильно метилированного гена контроля области импринтинга H19 ICR, а ген домашнего хозяйства UBE2B использовался в качестве контроля для неметилированных фрагментов [6]. Последовательность праймеров для ПЦР-реакций представлена ниже.

UBE2B-F ACCCGTTCTAAACGCGTCA
 UBE2B-R CACTAGTTTAGGCTCGGCGG
 H19ICR-F GAGCCGCACCAGATCTTCAG
 H19ICR-R TTGGTGGAACACACTGTGATCA

Условия ПЦР-реакции на этапе контроля качества необходимо подбирать для каждой серии образцов индивидуально: количество ДНК-матрицы и число циклов подбирают таким образом, чтобы в INPUT образце на электрофореze была видна четкая линия продукта амплификации UBE2B, а в образце IP была видна четкая линия продукта амплификации стабильно метилированного гена контроля области импринтинга H19ICR. Эффективность иммуноосаждения определяется по соотношению интенсивности полос H19ICR / UBE2B в INPUT/IP образцах. Типичные результаты контроля качества полученных образцов показаны на рисунке 2 (Б, В).
 Итоговое количество выделенной ДНК – 500-700нг.

8. Контроль качества полученного образца

Для подтверждения качества выполнения эксперимента можно использовать профиль эпигенетических модификаций промоторной области гена, про который известно, как он ведет себя в данных экспериментальных условиях. Роль различных модификаций хроматина в регуляции транскрипции подробно описана в обзоре [7]. В наших условиях таким примером может быть ген GAPDH, промотор которого всегда «помечен» маркером H3K4me3 и не содержит меток H3K9me3 и H3K27me3. Контроль качества осуществляют с использованием ПЦР в реальном времени⁸. Во всех экспериментальных условиях промоторная область гена GAPDH была «помечена» маркером H3K4me3 и содержала минимальное количество меток H3K9me3 и H3K27me3 (рис. 3А, В). Результаты ПЦР в реальном времени следует анализировать согласно рекомендациям журнала Clinical Chemistry [8], дизайн праймеров к промоторным областям можно выполнять с использованием базы данных http://epd.vital-it.ch/human/human_database.php
 В этой же базе данных есть информация об уже известных эпигенетических модификациях хроматина для разных типов клеток.

Комментарии к экспериментальным процедурам

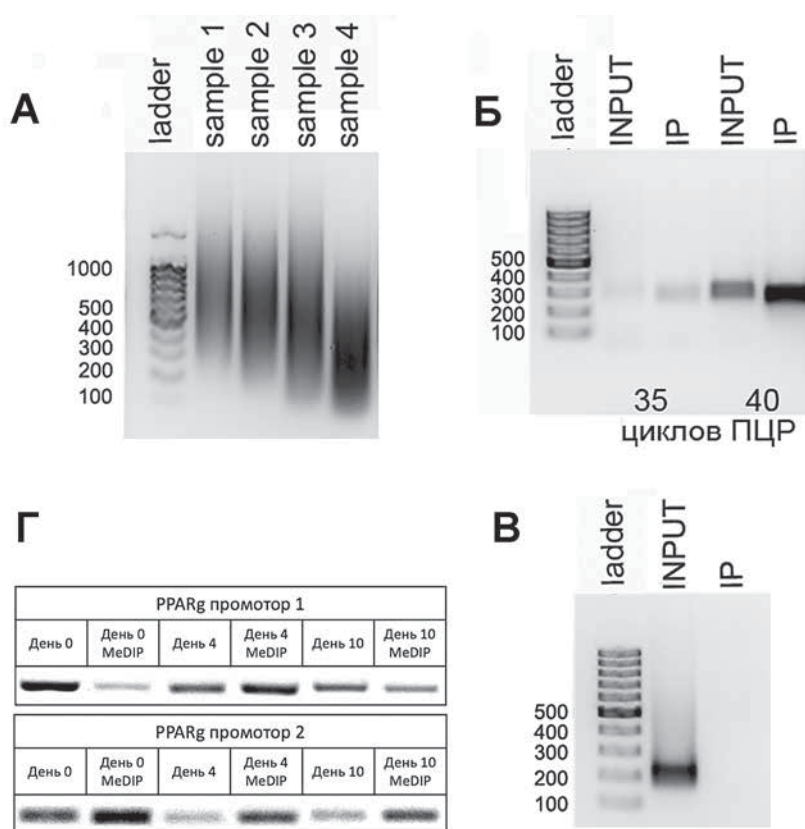
1. Следует обратить особое внимание на этап инкубирования образца с протеиназой К. В данном протоколе он является ключевым, так как очень важно освободить метилированные участки ДНК от белков/гистонов, для того чтобы антитела могли свободно взаимодействовать с эпитопом.

2. Если планируется исследование ацетилирования хроматина, к суспензии добавляют 20 mM бутирата натрия (Na-butyrate), который является ингибитором деацетилаз хроматина.

3. Все процедуры производятся на льду; в присутствии коктейля ингибиторов протеиназ, PMSF и в случае необходимости бутирата натрия. Длина фрагментов ДНК и хроматина имеет важное значение для успешной реализации эксперимента:

они должны быть достаточно короткими, чтобы обеспечить специфичность анализа, но и достаточно длинными для осуществления ПЦР реакции как на этапах контроля качества образца, так и на этапах анализа результатов, если дизайн эксперимента предусматривает такой анализ. Таким оптимальным диапазоном длины фрагментов является 150-500 пар оснований с пиком на 250-300. В случае, если предложенные условия протокола ультразвуковой фрагментации не позволяют добиться нужной длины фрагментов, условия следует откорректировать. Если фрагменты получились слишком длинными, допускается провести дополнительный цикл фрагментации и, убедившись, что полученный образец соответствует заданным критериям, использовать его в эксперименте. Следует также учитывать, что установка ультразвукового

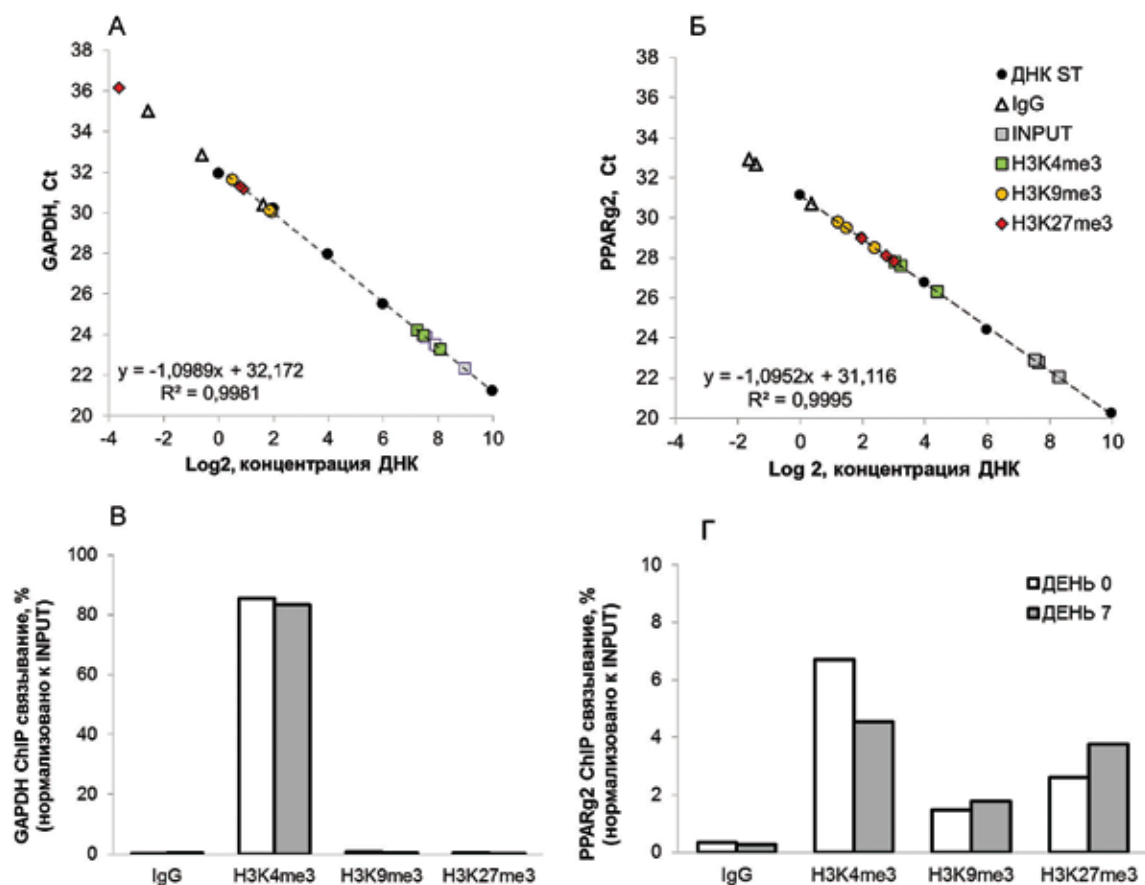
Рисунок 2. Анализ образцов, полученных в результате иммунопреципитации метилированных фрагментов ДНК



(А) Анализ влияния режима ультразвуковой фрагментации геномной ДНК на размер полученных фрагментов. Sample 1: H/1 цикл; Sample 2: H/2 цикла; Sample 3: H/3 цикла; sample 4: H/4 цикла. (Б-В) Контроль эффективности иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК. Гель-электрофорез для визуализации ПЦР с праймерами к стабильно метилированному гену контроля области импринтинга H19 ICR (Б) и с контрольными праймерами к неметилированной области – промотору гена домашнего хозяйства UBE2B (В). (Г) Пример анализа динамики метилирования промоторных областей гена PPAR γ (промотор 1 и промотор 2) в ходе жировой дифференцировки стромальных клеток подкожной жировой клетчатки.

INPUT – контрольная (геномная) ДНК; IP – иммуноосаждённая (антителами к 5-метилцитозину) ДНК.

Рисунок 3. Пример анализа эпигенетических модификаций хроматина с использованием ПЦР в реальном времени



(А,Б) Анализ эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью гена GAPDH.

(В,Г) Анализ эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью гена PPARg2.

На панелях А-Б показано, что во всех экспериментальных условиях промоторная область гена GAPDH «помечена» H3K4me3 модификацией (количество сопоставимо со значениями, полученными для исходного образца INPUT), и содержит минимальное количество меток H3K9me3 и H3K27me3, сопоставимое со значениями, полученными для отрицательного контроля (IgG). Для сравнения мы показываем профиль распределения эпигенетических меток в промоторной области гена PPARg2 (В-Г): распределение эпигенетических меток может свидетельствовать как о неоднородности исследуемой клеточной популяции, так и о динамике эпигенетических модификаций хроматина в промоторной области гена PPARg2 в ходе жировой дифференцировки стромальных клеток подкожной жировой клетчатки.

дробления Bioruptor имеет разные типы штативов для пробирок и объем материала в образце имеет значение для поддержания стабильной эффективности дробления: в пробирки на 2 мл следует помещать не больше 250 мкл материала, а в пробирки на 0.5 мл – не больше 100 мкл. Также не рекомендуется перегружать образец материалом, и в случае высокой концентрации ДНК или хроматина следует разделить образец на несколько частей. Эффективность фрагментации будет стабильна только в образцах с сопоставимой концентрацией. На рисунке 2 (А) показаны примеры ультразвуковой фрагментации разной эффективности.

4. Все объемы реагентов уменьшить в соответствии с тем, что объем исходного образца 200 мкл, а не 500.

5. На начальных этапах отработки условий иммунопреципитации рекомендуется использовать образец неспецифичных антител (IgG) в качестве отрицательного контроля.

6. Разбавляют образец не только для того, чтобы привести в соответствие количество хроматина с количеством антител и «бусинок», которые используют для иммуноосаждения, но и для того, чтобы снизить концентрацию SDS в рабочем растворе, так как SDS может препятствовать связыва-

нию антител с антигеном. Поэтому образец должен быть разбавлен не менее чем 1:5 в RIPA буфере с ингибиторами протеиназ и деацетилаз независимо от исходной концентрации хроматина.

7. Денатурация с последующей иммунопреципитацией позволяет добиться селективного обогащения отдельно по каждой из комплементарных нитей ДНК, что важно при анализе эпигенетических меток.

8. Анализ выполняется с использованием стандартной кривой, полученной при последовательном разведении количественного стандарта ДНК с последующей нормализацией на значения, полученные для контрольных образцов INPUT. Стандартные образцы ДНК могут быть получены из любой ткани, любым доступным в лаборатории методом. Для построения стандартной кривой были использованы 6 последовательных разведений 1:4 с использованием начальной концентрации ДНК 1000 нг/мкл. В каждой серии экспериментов следует использовать одни и те же стандартные образцы ДНК. Обогащение иммуноосажденной фракции соответствующей эпигенетической модификацией промоторной области определяется нормализацией на значения, полученные для контрольных образцов INPUT. Пример

результатов анализа динамики эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью генов GAPDH и PPAR γ 2 в ходе жировой дифференцировки показан на рисунке 3.

9. Линейный полиакриламид является дешевым и удобным носителем для осаждения и визуализации небольших количеств ДНК и может использоваться наряду с коммерческим гликогеном. Приготовление раствора линейного полиакриламида выполняется как описано ранее [9]. Приготовить раствор 5% акриламида (без добавления бис-акриламида) в буферном растворе состава: 40mM Tris-HCl, 20mM Na acetate, 1mM EDTA, pH 7.8. Добавить 1/100 объема 10% ammonium persulfate и 1/1000 от объема TEMED и оставить полимеризоваться при комнатной температуре в течение 30 минут. После того как раствор стал вязким, высадить из него полимеризованный акриламид добавлением 2.5 объема этилового спирта, центрифугировать, удалить надосадочную жидкость и растворить осадок в 20-кратном количестве воды (по отношению к первоначальному объему) в течение ночи, на шейкере, при комнатной температуре. Полученный 0.25% раствор разлить по пробиркам и хранить в течение нескольких лет при -20 °C.

Приложение: состав буферных растворов

Таблица 1.

Block Solution 1	x10 мл
PBS	10 мл
0.5% BSA (масса/объем)	50 мг

Таблица 2.

Block Solution 2	x10 мл
PBS	10 мл
0.5% BSA (масса/объем)	5 мг

Таблица 3.

2×IP buffer	Stock	x 4 мл
0.05% Triton X-100	1% Triton X-100 in PBS	200 мкл
100 нг/мкл Yeast tRNA	50 мкг/мкл	8 мкл
PBS		3,8 мл

Таблица 4.

IP Wash buffer	Stock	x 5 мл
PBS		4,875 мл
0.025% Triton X-100	1% Triton X-100 in PBS	125 мкл

Таблица 5.

Lysis buffer	Stock	х 50 мл		
1% SDS	10%	5 мл		
10 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	1 мл		
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	2.5 мл		
dH ₂ O		41.5 мл		
Protease inhibitor cocktail	100×		10 мкл	Добавить к 1 мл Lysis buffer непосредственно перед использованием
1 mM PMSF	100 mM		10 мкл	
20 mM Na-butyrate	1 M		20 мкл	

Таблица 6.

Elution buffer	Stock	х 50 мл	4°C
50 mM NaCl	5M	500 мкл	
20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	1 M	1 мл	
5 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	500 мкл	
dH ₂ O		42 мкл	
1% SDS	10%	5 мл	добавить непосредственно перед использованием

Таблица 7.

RIPA buffer	Stock	х 100 мл	1 мл	4°C
0.1% SDS	10%	1 мл		
0.1% sodium deoxycholate		0.1 г		
1% Triton X-100	100%	1 мл		
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.5M	200 мкл		
0.5 mM EGTA (pH 8.0)	0.5M	100 мкл		
140 mM NaCl	5M	2.8 мл		
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	1 мл		
dH ₂ O		93.9 мл		
Protease inhibitor cocktail	100×		10 мкл	добавить к 1 мл RIPA buffer непосредственно перед использованием
1 mM PMSF	100 mM		10 мкл	
20 mM Na-butyrate	1 M		20 мкл	

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности/Acknowledgments

Авторы благодарны коллективу лаборатории профессора Philippe Collas Университета Осло за помощь в освоении методов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант 16-15-10178.

Список литературы / References

1. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517(7534):321-326.
2. Reid MA, Dai Z, Locasale JW. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat Cell Biol*. 2017;19(11):1298-1306.
3. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009; 325(5942):834-840.
4. Malashicheva A, Bogdanova M, Zabirnyk A, et al. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol Genet Metab*. 2015; 115(2-3):118-27.

5. Smolina N, Kostareva A, Bruton J, et al. Primary Murine Myotubes as a Model for Investigating Muscular Dystrophy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:594751.
6. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39(4):457-466.
7. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007;128(4):707-719.
8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622.
9. Gaillard C, Strauss F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(2):378.

Информация об авторах:

Игнатьева Елена Владимировна, научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Смирнов Дмитрий Дмитриевич, студент, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;

Костарева Анна Александровна, к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Дмитриева Рената Игоревна, к.б.н., ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Author information:

Elena V. Ignatieva, researcher, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry D. Smirnov, student, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University;

Anna A. Kostareva, PhD, director of the Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Renata I. Dmitrieva, PhD, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre.