

1. Izolace buněčných jader z rostlinných tkání

Izolace a filtrace probíhá v komorové lednici

1. 10g rostlinné tkáně se důkladně rozetře v třecí misce v tekutém dusíku na prášek. Prášek se přesype do kádinky a zalije postupně 60 ml pufru **A**
2. Obsah se přefiltruje přes mlynářské hedvábí do čisté kádinky nebo přímo do centrifugační kyvety.

Centrifugace probíhá v laboratoři, kyvety se ovšem celou dobu temperují na ledu, nutné mít předem vychlazenou centrifugu na 4°C

3. Kyvety se proti sobě vyváží (na předvážkách) a dají se odstředovat do předem vychlazené centrifugy na 4°C na 12min na 5000RPM
4. Supernatant se slije a sediment se opět rozsuspenduje v dalších 15ml roztoku **A**/kyvetu a opět se nechá odstředovat na 5000RPM/12min/4°C
5. Postup z bodu 4. se opakuje dokud se sediment nezbaví tmavězelených částic (chloroplasty a jejich shluky), které se v supernatantu rozpoznají jako nerozpustné malé okem viditelné částice
6. Sediment se rozsuspenduje v 15ml v pufru **B**/kyvetu a centrifuguje na 7000RPM/10min/10°C
7. Pomocí dávkovací pipety (1 ml) s modrou seříznutou špičkou se odeberou jádra, která plavou na povrchu supernatantu do další čisté centrifugační kyvety. Je nutné dbát na to, aby se neodebraly případné zbytky chloroplastů, které se nepodařilo v předcházejících krocích úplně odstranit. V žádném případě neodebírat sediment ze dna zkumavky (obsahuje zejména škrobová zrna).
8. Odebraná jádra se nechají opět centrifugovat v pufru **B** na 7000RPM/10min/10°C. V tomto kroku se opatrně odebírá roztok pod jádry, až zůstanou na dně samotná jádra.
9. Jádra se mohou buď zamrazit na -70°C v minimálním množství pufru **C**, nebo se použijí přímo k další analýze.

Pufir A se připravuje z pufru 5xA a přidáním merkaptoetanolu a PMSF.

Pufir A

10mM NaCl
10mM MES pH 6.0
5mM EDTA
250mM sacharóza
0,6% Triton X-100
150 µM spermidin
100µM PMSF
20mM merkaptoetanol

5xA: 50mM NaCl 50mM MES (při naředění na 10mM má pH 6.0) 25mM EDTA 1250mM sacharóza 3% Triton 750µM spermidin

Pufir B se připravuje z pufru A přidáním navážky Percollu.

Pufir B

2,4 g pufru 5xA
18g Percoll
Těsně před použitím se přidá: 14,2 µl merkaptoetanolu
40µl 0,1M PMSF

Pufir C

10mM Tris-Cl pH 7,7
100mM síran amonný

10mM MgCl₂
5mM merkaptoetanol

8. Extrakce chromatinových proteinů

1. Pokud se pracuje přímo s nově naizolovanými jádry, jádra se promyjí 2x v **promývacím pufru** a odstředí 2000g/15min/4°C. (Pozor, aby při odlívání roztoku nedošlo i k vylití jader).
Pokud se pracuje s jádry které byly skladovány na -70°C, nutné nejdřív odstranit pufr C tím, že se po rozmrazení odstředí 2000g/15min/4°C a až pak promývat.
2. Usazená jádra na dně centrif. kyvety se rozsuspendují v 0,14M NaCl+ 10mM Tris-Cl pH 7,5.
3. Přidá se HCl na výslednou 0,25 M koncentraci a směs se nechá míchat v komorové lednici při 4-5°C na kolotoči 2 hod.
4. Vzorek se odstředí opět na 2000g/15min/4°C a odebere se supernatant.
5. K supernatantu se přidá studená kys. trichlóroctová (TCA) na 25% w/v. Vzorek se nechá inkubovat 30min na ledu za občasného promíchání.
6. Vzorek se odstředí 5000g/30min/4°C a odstraní se supernatant
7. Precipitát se promyje 1x v ledovém acetonu s 1M HCl; poměr = 98:1, odstředí se 2000g/15min/4°C a supernatant se odstraní.
8. Precipitát se promyje ještě 2x ledovým acetonem a pokaždé se odstředí 2000g/15min/4°C
9. Vzorky se nechají vysušit volně na vzduchu

Promývací pufr: 75mM NaCl 10mM EDTA 50mM Tris-Cl pH 8

9. Analýza chromatinových proteinů pomocí SDS-PAGE

K nalévání gelu se použije aparatura od BioRad Mini Protean, skla s 0,75mm spacerem.

12,5% running gel (15ml): 6,3 ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1)
3,8ml 4x running buffer (1,5M Tris-Cl pH 8,8)
0,15ml 10% SDS
6ml H₂O
40μl Amonium Persulfát 30% (APS)
5μl TEMED

Vrchní okraj running gelu se zalije kapkou destilované vody a nechá se zatuhnout. Po ztuhnutí, se voda odsaje filtračním papírem a nalije se stacking vrstva, s 10-komůrkovým hřebínkem.

Stacking gel: 0,88ml 30% zás. roztoku akrylamidu (37:1)
1,66ml 4x stacking buffer (0,5M Tris-Cl pH 6,8)
66μl 10% SDS
4,06ml H₂O
20μl APS 30%
3,3μl TEMED

Na elektroforézu se používá glycinový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3), který získáme ředěním 10x ze zásobního roztoku.

Před nanesením se vzorky denaturují při 95°C / 5 min po přidání denaturační směsi s barvivem, která je připravena buď 2x nebo 4x koncentrovanější. Do první jamky se zpravidla nanáší proteinový marker (nedenaturuje se ani se nepřidává barvička, už je nabarvený od výrobce). V naší laboratoři se používá od firmy Fermentas; do jamky se nanáší 7μl.

2x denaturační barvička (pH 6,8): 0,125M Tris-Cl
4% SDS
20% v/v glycerol
0,2M DTT
0,02% Bromophenol blue

Na zaputování vzorku do stacking gelu se nastaví 50V, (proud při jednom skle 45mA, při dvou sklech 60 mA). Po zaputování do running gelu se zvýší napětí na 100-150V. Gel necháme běžet do doby, než se bromfenolová barvička přiblíží cca 2-5mm od dolního okraje. Po vypnutí a rozdělení aparatury se skla rozloží a gel se opatrně přemístí do misky, kde se nejdříve opláchne vodou a potom se barví Coomassie briliantovou modří (**barvicí roztok**), cca 1-2hod, na třepačce, při nízkých otáčkách.

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