

## Taglio del DNA ad ultrasuoni

- Durante la cernita del DNA e dell'RNA, le molecole di DNA vengono spezzate in pezzi più piccoli. La frammentazione del DNA / RNA è uno dei passi necessari per la preparazione del campione richiesto per creare librerie per il sequenziamento di prossima generazione (NGS).
- La cesoia del DNA ad ultrasuoni utilizza le forze della cavitazione acustica per rompere il DNA o l'RNA in frammenti di 100 - 5 kb bp.
- La cesoia ad ultrasuoni consente una precisa frammentazione del DNA e l'adattamento alla lunghezza del DNA desiderata.

### Taglio del DNA ad ultrasuoni

Hielscher Ultrasonics offre varie soluzioni basate su ultrasuoni per il taglio del DNA, dell'RNA e della cromatina. Scegli tra un ultrasuoni sonda (ad es. UP100H) per la sonicazione diretta usando una microtip, oppure usa il VialTweeter o il cuphorn ultrasonico per la preparazione indiretta del DNA di vari campioni simultaneamente. Hielscher offre il dispositivo ideale in base alle tue esigenze: sia che tu abbia 1 o fino a 10 campioni, volumi da microlitro a litri: i processori ultrasonici Hielscher sono disponibili per soddisfare i tuoi requisiti per preparare frammenti di DNA, RNA e cromatina alla giusta lunghezza. Riproducibilità, facilità d'uso e controllo preciso consentono una libreria affidabile per il sequenziamento di prossima generazione.

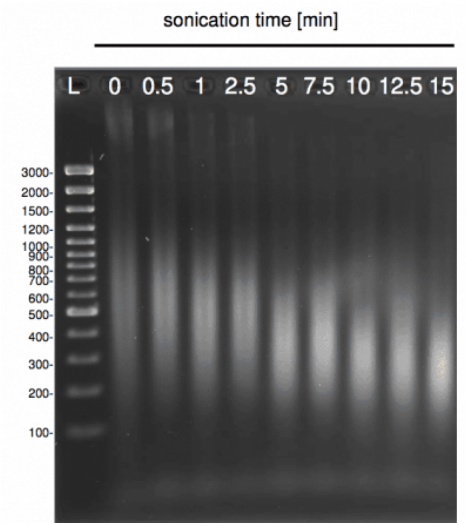
In contrasto con la frammentazione enzimatica del DNA, la cesoia ad ultrasuoni applica forze di taglio meccaniche pure senza aggiungere alcun prodotto chimico. Tramite l'impostazione precisa dei parametri di processo, la cesoia ad ultrasuoni produce frammenti di DNA ad alto peso molecolare (plasmidi e DNA genomico).

Gli acidi nucleici purificati possono essere amplificati prima o dopo una fase di frammentazione.

I parametri di sonicazione (potenza, ciclo di impulsi / burst, tempo e temperatura) possono essere controllati in sicurezza tramite le impostazioni del software.

#### vantaggi:

- controllo preciso
- cicli di sonicazione e tempo adattati con precisione alle dimensioni desiderate del DNA
- frammenti di DNA ad alto peso molecolare
- controllo della temperatura
- veloce
- risultati riproducibili
- autoclavabile
- varie soluzioni: [sonda di tipo](#) , [vialtweeter](#) e [cupolino](#)



Analisi elettroforetiche del DNA genomico di *E. coli* EDL933 sottoposte a ultrasonografia da 0 a 15 minuti. L indica la scala del DNA. (Basselet et al., 2008)



## Protocolli per il taglio del DNA ad ultrasuoni

### Per il test di immunoprecipitazione della cromatina

In breve, le cellule sono state piastrate in piatti da 60 mm di diametro (400.000 per piatto) e trasfettate con RhoA siRNA (come descritto); dopo 72 ore, sono stati incubati con formaldeide (concentrazione finale, 1%) per 10 minuti a 37 ° C per retrocedere le proteine al DNA. La reazione di cross-linking è stata estinta dall'aggiunta di un decimo di volume di 1,25 mol / L di glicina, dando una concentrazione finale di 125 mmol / L. Le cellule sono state lavate due volte con PBS ghiacciato, risospese in tampone di dosaggio radioimmunoprecipitazione [150 mmol / L NaCl, 1% NP40, 0,5% desossicolato, 0,1% SDS, 5 mmol / L EDTA, 50 mmol / L Tris-HCl (pH 8,0)] contenente 1 mmol / L di fenilmetilsolfonilfluoruro, 1 Ag / mL di aprotinina e 1 Ag / mL di pepstatina A, e tenuto in ghiaccio per 30 minuti. Quindi, i lisati cellulari sono stati sonicati su ghiaccio con un [Hielscher UP200S](#) ultrasonic sonicator (3 x 40 s, ampiezza 40%, ciclo 1; Hielscher Ultrasonics GmbH) fino a quando le cromatine reticolate sono state tranciate per produrre frammenti di DNA tra 200 e 1.000 bp. Un decimo di lisato intero è stato utilizzato per quantificare la quantità di DNA presente in diversi campioni e considerata come "DNA di input totale". I supernatanti sono stati incubati con il DNA dello sperma di salmone / agarosio proteico-50% di sospensione per ridurre il background non specifico. L'immunoprecipitazione è stata quindi effettuata durante la notte a 4 ° C con 5 Ag di anti-NF- $\kappa$ B p65 (Upstate) o senza anticorpi (controllo negativo). Questi surnatanti sono stati integrati con NaCl 5 mol / L e riscaldati per una notte a 65 ° C per ripristinare i legami incrociati del DNA proteico. Gli immunocomplessi sono stati ulteriormente trattati con la proteinasi K priva di DNasi e RNasi e il DNA è stato purificato mediante estrazione di fenolo / cloroformio e precipitazione di etanolo. La PCR è stata eseguita con primer specifici corrispondenti a una sequenza all'interno della regione del promotore del gene umano iNOS (primer P1: 5'-GAGGGCTTCCCA- GAACCAAG-3; primer p2: GCTGGGCTACTGACCCAG- CAGTTCCAG-3'). (Doublrier et al., 2008)

### Studi sull'espressione EGFP

Per gli studi di espressione, il ceppo ricombinante *L. tarentolae* p10 :: F9Befp1.4dBsat # 12 (Jena Bioscience, Germania) con il gene EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), cromosomico ssu integrato, è stato coltivato nei vari media come descritto in precedenza e inoltre integrato con 100 mg l<sup>-1</sup> Nourseothricin (Jena Bioscience, Germania). Durante la coltivazione, sono stati prelevati 1 ml di campioni, centrifugati (2000 × g, 20 ° C, 10 minuti) e lavati con soluzione di NaCl allo 0,9%. Il pellet è stato risospeso in tampone (20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) e disintegrato per sonificazione con il processore ultrasonico [UP400S](#) (applicazione di energia ~ 400 Ws). I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione (6000 × g, 4 ° C, 5 min) e analizzati mediante sodio dodecil solfato - elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) in condizioni riducenti secondo il metodo di Laemmli (1970) con gel 12,5% di poliacrilamide. L'espressione di EGFP è stata esaminata in coltura agitata. (Fritsche et al., 2007)

## Immunoprecipitazione della cromatina



Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina è stato eseguito utilizzando il ChIP-IT™ Express (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) in base alle istruzioni del produttore con alcune modifiche. In breve, i podociti umani differenziati sono stati reticolati con l'1% di formaldeide per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate con PBS ghiacciato e la reazione di fissazione è stata interrotta aggiungendo 0,125 M di glicina per 5 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate di nuovo con PBS ghiacciato e raschiate dal piatto. Le cellule sono state compresse per centrifugazione e risospese nel tampone di lisi. Dopo la centrifugazione, i nuclei pellettati sono stati risospesi

nel tampone di cesoiatura, incubati su ghiaccio per 30 minuti e la cromatina è stata tranciata mediante sonicazione, ad es. [UP100H](#) (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germania) al 25% di potenza 5 impulsi di 20 secondi ciascuno su ghiaccio in frammenti di circa 200-600 bp. La cromatina tranciata è stata quindi centrifugata e il surnatante è stato raccolto. Per immunoprecipitazioni, 60 µl di cromatina sono stati incubati con 1 µg di anticorpi Sp1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), NF-κB p65 (Abcam, Cambridge, UK) o NF-κB p50 (Abcam) o con coniglio IgG (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), come controllo negativo, durante la notte a 4 ° C con rotazione delicata. Gli immunocomplessi legati a biglie magnetiche sono stati raccolti utilizzando un supporto magnetico, lavati estensivamente, e i crosslink di proteine / DNA sono stati invertiti e il DNA eluito per l'analisi PCR in tempo reale. (Ristola et al., 2009)

## Preparazione del DNA EHEC per l'analisi di chip array

Disposizione dei lisati cellulari e dei DNA estratti  
I pellet batterici sospesi in PBS alla concentrazione finale desiderata sono stati trattati con il [distruttore ultrasonico UP100H](#) (Hielscher GmbH, Germania) dotato di una microtip MS1 (1 mm di diametro). La frequenza operativa era di 30 kHz e la potenza di uscita effettiva era di 100 W. Durante l'operazione, i campioni sono stati raffreddati in un bagno di acqua e ghiaccio, miscelati e centrifugati. I campioni sono stati utilizzati per studi di citometria a flusso, mentre per la successiva manipolazione, i campioni sono stati sottoposti a un trattamento termico (95 ° C, 5 min). I lisati di cellule grezze sono stati trattati con una miscela di fenolo: cloroformio: alcool isoamilico (25: 24: 1). Un volume uguale di questa miscela è stato aggiunto al campione di lisato, la soluzione è stata agitata con vortex per 15 secondi e centrifugata a 15.000 xg per 2 minuti a temperatura ambiente (RT) intorno a 22 °



© www.hielscher.com

*[VialTweeter](#) per la preparazione di campioni ultrasonici*

C. La fase acquosa superiore contenente il DNA genomico è stata accuratamente separata e raccolta in una nuova provetta Eppendorf sterile.

Successivamente, i campioni furono sonicati per frammentare il DNA. La fase di sonicazione è stata realizzata nelle stesse condizioni sopra descritte. Per valutare gli effetti di frammentazione sul DNA genomico, i campioni sono stati analizzati usando l'elettroforesi su gel di agarosio.

(...) I campioni sonicati precedentemente per 2,5 minuti sono stati sottoposti a una fase di estrazione dopo il trattamento termico e la centrifugazione. Il DNA rilasciato è stato estratto due volte con un fenolo: cloroformio: miscela di alcol isoamilico e successivamente sottoposto a seconda sonicazione per 0-15 min. L'elettroforesi su gel di agarosio è stata utilizzata per determinare la distribuzione delle dimensioni del DNA sottoposto a frammentazione ultrasonica post-estrazione (Fig. In alto a destra). Il DNA altamente frammentato era evidente dalla presenza di uno striscio di DNA piuttosto che da bande di peso molecolare elevato che sono stati eliminati da campioni sonicati per 2,5 minuti o più. La sonicazione più lunga ha ridotto gradualmente le lunghezze dei frammenti a circa 150 - 600 bp, e la sonicazione per 15 min ha ulteriormente degradato questi frammenti, come si può vedere soprattutto nella parte superiore dello striscio. Così, la dimensione media del frammento di DNA diminuiva gradualmente con il tempo di ultrasuoni e il trattamento di 5 minuti consentiva di ottenere le dimensioni dei frammenti di DNA più adatti per i test di chip array. Infine, è stata stabilita la procedura di preparazione dell'analita del DNA comprendente i primi 2 minuti di trattamento ultrasonico, estrazione del DNA (2 x) e successiva 5 minuti di sonicazione. (Basselet et al., 2008)

## Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)



Le cellule HEK293 sono state coltivate come descritto sopra e fissate con 2 mM di disuccinimidil-glutarato per 45 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte con PBS. La cromatina è stata reticolata per 10 minuti a temperatura ambiente usando 1% (v / v) di formaldeide e lavata due volte con PBS ghiacciato. La reazione di reticolazione è stata interrotta mediante incubazione con glicina ad una concentrazione finale di 0,125 M per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione con tripsina, le cellule sono state raschiate dal piatto di coltura cellulare e lavate due volte con PBS. Il pellet cellulare è stato risospeso in tampone di lisi (5 mM Pipes, pH 8,0, 85

mM KCl e 0,5% (v / v) Nonidet P-40), incubato su ghiaccio per 10 minuti e omogeneizzato con un omogeneizzatore Dounce. Successivamente, i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione (3500 xg, 5 min, 4 ° C) e risospesi in tampone nucleico (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 10 mM EDTA e 1% (p / v) di SDS). I nuclei sono stati interrotti dalla sonicazione con tre impulsi da 20 s in [aSonicatore UP50H](#) (Hielscher Ultraschall Technologie) in un'impostazione di ciclo 0,5 e ampiezza del 30%, producendo frammenti di DNA genomico con una dimensione massima di 200 - 1000 bp. Per ChIP, 50 g di DNA sono stati diluiti 4 volte in tampone di immunoprecipitazione (16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1% (v / v) Triton X-100 e 0,01% (w / v) SDS). (Weiske et al., 2006)



## Analisi di modifica degli istoni mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

In breve,  $6 \times 10^6$  cellule sono state lavate due volte con PBS e reticolate sulla piastra di coltura per 15 minuti a temperatura ambiente in presenza di 0,5% di formaldeide. La reazione di reticolazione è stata interrotta aggiungendo 0,125 M di glicina. Tutti i passaggi successivi sono stati eseguiti a 48 ° C. Tutti i buffer erano pre-raffreddati e contenevano inibitori della proteasi (Complete Mini, Roche). Le cellule furono lavate due volte con PBS e poi raschiate. I granuli raccolti sono stati sciolti in 1 ml di tampone di lisi (1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) e sono stati sonicati in un bagno di etanolo freddo per 10 cicli al 100% di ampiezza usando un [sonicatore UP50H](#) (Hielscher, Teltow, Germania). La frammentazione della cromatina è stata visualizzata in gel di agarosio all'1%. I frammenti ottenuti erano nell'intervallo 200-500pb. La cromatina solubile è stata ottenuta centrifugando i campioni sonicati a 14.000 g per 10 minuti a 48 ° C. La frazione solubile è stata diluita 1/10 in tampone di diluizione (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl) quindi aliquotato e conservato a 80 ° C fino al momento dell'uso. (Rodriguez et al., 2008)

Dispositivo	Potenza [W]	genere	Volume [mL]
<a href="#">VialTweeter</a>	200	indipendente, autonomo	0.5 -1.5
<a href="#">UP50H</a>	50	palmare o stand-up	0.01 -250
<a href="#">UP100H</a>	100	palmare o stand-up	0.01 -500
<a href="#">UP200Ht</a>	200	palmare o stand-up	0.1 -1000
<a href="#">UP200St</a>	200	colonna da disporre liberamente	0.1 -1000
<a href="#">UP400St</a>	400	colonna da disporre liberamente	5.0 -2000
<a href="#">CupHorn</a>	200	CupHorn, sonoreactor	10 -200
<a href="#">GDmini2</a>	200	cella di flusso esente da contaminazione	

### Letteratura / Riferimenti

- Basselet P., Wegrzyn G., Enfors S.-O., Gabig-Ciminska M. (2008): Elaborazione del campione per analisi basata su array di chip di DNA di Escherichia coli enteroemorragico (EHEC). Fabbriche di cellule microbiche 7:29. Del 2008.
- Indubbiamente S., Riganti Ch., Voena C., Costamagna C., Aldieri E., Pescarmona G., Ghigo D., Bosia A. (008): RhoA Silencing ripristina la resistenza alla doxorubicina nelle cellule tumorali umane del colon. Molecular Cancer Research 6 (10), 2008.
- Fredlund E., Gidlund A., Olsen M., Börjesson T., Spliid NHH, Simonsson M. (2008): Valutazione del metodo di estrazione del DNA di Fusarium da micelio e frumento per la quantificazione PCR in tempo reale a valle e correlazione ai livelli di micotossine . Journal of Microbiological Methods 2008.
- Fritsche C., Sitz M., Weiland N., Breitling R., Pohl H.-D. (2007): Caratterizzazione del comportamento di crescita di Leishmania tarentolae - un nuovo sistema di espressione per proteine ricombinanti. Journal of Basic Microbiology 47, 2007. 384-393.

- Ristola M., Arpiainen S., Saleem MA, Mathieson PW, gallese GI, Lehtonen S., Holthöfer H. (2009): Regolazione del gene Neph3 nei podociti - ruoli chiave dei fattori di trascrizione NF-κB e Sp1. BMC Molecular Biology 10:83, 2009.
- Rodriguez J., Vives L., Jorda M., Morales C., Munoz M., Vendrell E., Peinado MA (2008): Rilevamento genome-wide di ripetizioni di DNA non metilato in cellule normali e tumorali. Vol. Nucleic Acids Research 36, n. 3, 2008. 770-784.
- Weiske J. Huber O. (2006): Il suggerimento della proteina della triade istidina1 scatena l'apoptosi indipendente dalla sua attività enzimatica. Il Journal of Biological chemistry. Vol. 281, No. 37, 2006. 27356-27366.

## Fatti da sapere

### Ultrasonic Cavitation

