



## Le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique isole la chromatine de haute qualité pour un excellent enrichissement de la cible.

Auteur : Dr Amy Beynon

Contact : Porvair Sciences Ltd. - Tél : +44-1372-824290 - int.sales@porvair-sciences.com - www.porvair-sciences.com

Pour trouver votre distributeur le plus proche en France : www.porvair-sciences.com/distributors.php#france

### Introduction

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est un outil efficace pour élucider les interactions protéine/ADN, permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de la régulation génique. Une étape cruciale dans le processus ChIP est la préparation de fragments de chromatine de haute qualité entre 100-500bp. Ceux-ci sont générés soit par cisaillement mécanique soit par digestion par une enzyme de restriction. Alternative simple et rentable au cisaillement mécanique, la digestion enzymatique ne nécessite aucun équipement coûteux. Le **tableau 1** met en évidence les avantages de chaque méthode.

Pour démontrer l'utilité du kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique dans la préparation de la chromatine ChIP-grade de haute qualité, la ChIP a été utilisée pour enrichir l'histone H3 en haute abondance et le récepteur d'œstrogène en faible abondance (ERα) sur les loci GAPDH et GREB1 respectivement. La chromatine d'excellente qualité, cisailée en fragments de taille optimale, a été obtenue en utilisant le kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique et un excellent enrichissement du gène ciblé a été observée avec un signal / bruit élevé.

### Méthode

#### Préparation de la chromatine

La chromatine a été préparée à partir de deux lignées cellulaires de cancer de l'endomètre humain, Ishikawa réactive à l'œstrogène, et Hec50 négatives à l'ERα. 1 million de Hec50 et 500 000 cellules Ishikawa ont été traitées pour l'isolement de la chromatine en utilisant le kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique selon le protocole standard. Un échantillon de la chromatine préparée a été inversement réticulé et la protéinase K digérée pour permettre l'évaluation de la qualité de la chromatine par électrophorèse sur gel d'agarose (**voir Figure 1**).

#### Immunoprécipitation utilisant des colonnes spin de Chromatrap®

#### Anticorps et gènes ciblés

La marque commune épigénétique, l'histone H3 de la base, et le facteur de transcription (TF) ERα ont été choisis comme cibles des anticorps pour l'étude. H3 est omniprésent dans les chromosomes et sert donc comme cible d'anticorps abondante pour la ChIP. Le locus GAPDH fournit une abondante cible génique et est activement exprimé dans tous les types de cellules (Barber et al., 2005). Les hormones stéroïdes œstrogènes (E2 ou 17β-œstradiol) réglementent divers processus par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, y compris le facteur de transcription nucléaire œstrogène du récepteur alpha (ERα) (Prossnitz et al., 2008). L'activation par les récepteurs œstrogènes de la transcription se produit par l'interaction d'un domaine de liaison à l'ADN conservé avec des séquences palindromiques ADN appelées éléments de réponse d'œstrogène (EREs) (Mader et al., 1993). La région promotrice de GREB1 contient trois tels EREs et le recrutement de ERα dans cette région a été démontré (Deschênes et al., 2007).

#### Immunoprécipitation

Des stocks de chromatine ont été normalisés par la préparation des stocks de travail de 50 ng/μl dans l'eau distillée stérile. Des boues ont été préparées par la suite avec 1μg de chromatine totale et 2 μg d'anticorps pertinent. La ChIP a été réalisée à l'aide d'un kit Pro-A spin colonne Chromatrap® selon le protocole standard. Les entrées ont été préparées en parallèle contenant 1 μg de chromatine de chaque lignée cellulaire dans un volume total de 20 μL, ces échantillons ont été utilisés pour les analyses et non pas soumis à l'enrichissement de la ChIP. Chaque combinaison chromatine/anticorps a été réalisée en trois exemplaires pour démontrer la reproductibilité de l'enrichissement à l'aide de la chromatine, préparée à l'aide du kit.

#### qPCR

Un avantage significatif du kit spin colonne Chromatrap® est l'adéquation du système tampon pour passer directement au traitement en aval sans la nécessité du nettoyage de l'ADN. La qPCR a été utilisée pour analyser la précipitation des loci géniques GREB1 et GAPDH utilisant des anticorps dirigés contre l'ERα et le H3 respectivement. En outre, la précipitation de ces loci non spécifiques IgG a été déterminée.

### Résultats et Discussion

Pour illustrer l'utilisation du kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique comme alternative à la sonication pour la préparation de la chromatine ChIP-grade de haute qualité, la chromatine de deux lignées de cellules de l'endomètre a été extraite et immunoprécipitée à l'aide de spin colonnes de Pro-A Chromatrap®. L'immunoprécipitation de la chromatine de 1μg (équivalente à environ 160 000 cellules) a entraîné une augmentation de 12-fois de l'enrichissement spécifique de H3 au promoteur GAPDH, comparé avec les IgG non spécifiques ; illustrant le haut rapport signal/bruit résultant de l'extraction de la chromatine en utilisant le kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique. Le signal réel élevé a été obtenu pour H3, précipité à ce locus avec 5,63 % et 4,87 % pour GAPDH de chromatine Ishikawa et Hec50 respectivement. Une excellente reproductibilité est clairement démontrée indiquant la faible variabilité entre les échantillons, indépendamment du nombre de cellules au début (**voir Figure 2**).

Inclus ici en tant que cible de facteur de transcription en faible abondance, en l'absence de l'œstradiol en tant que ligand d'activation, le recrutement de ERα par rapport au promoteur de GREB1 a été précipité sélectivement. L'occupation différentielle ERα de GREB1 a été observée dans la chromatine de cellules Ishikawa et de Hec50. Les cellules positives Ishikawa récepteurs d'hormone (Albitar et coll., 2007) ont démontré un signal ERα 4 x plus élevé (2 % réel signal) à ce promoteur de gènes par rapport aux Hec50 (0,5 %). Ce signal accru dans les cellules Ishikawa indique l'amplification sélective et sensible des cibles IP en faible abondance de chromatine obtenue par voie enzymatique en utilisant le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique. Les cellules Hec50 proviennent de cancers de l'endomètre peu différenciés et il a été

	Avantages	Inconvénients
<b>Sonication</b>	Fragmentation aléatoire. Adapté aux types de cellules difficiles à lyser.	Dommages potentiels des épitopes antigéniques par émulsionification et surchauffe. Nécessite un matériel coûteux. Ne peut être utilisé pour la préparation de la chromatine Native (non réticulée).
<b>Enzymatique</b>	Traitement plus doux, moins dommageable aux épitopes d'intérêt. Ne nécessite aucun équipement coûteux. Appropriés pour la préparation de la chromatine native.	Les enzymes de restriction peuvent présenter un biais de séquence au cours de la fragmentation. Ne convient pas pour certains types d'échantillon difficiles à lyser.

Tableau 1 : Comparaison de méthodes de cisaillement pour la préparation de la chromatine

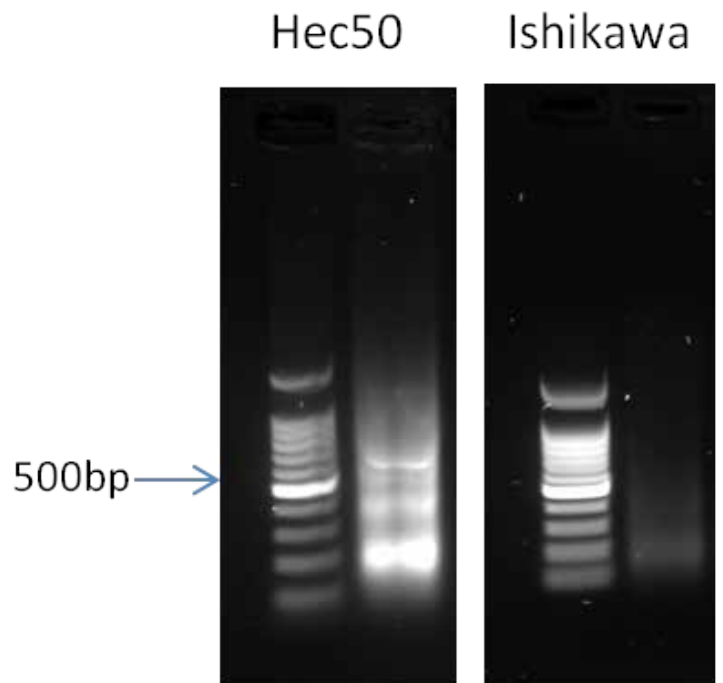


Figure 1 : Un gel d'agarose de chromatine de 400ng/μl Hec50 et 100ng/μl Ishikawa préparé en utilisant le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique. Le modèle typique en forme d'échelle montre des fragments de 200bp, 400bp et 600bp – idéal pour la ChIP à l'aide de colonnes Chromatrap® ChIP ou plaques à haute cadence.

démontré qu'elles expriment très peu ou pas de récepteurs des hormones stéroïdes (Kumar et al., 1998).

### Conclusion

Le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique fournit une excellente méthode pour la préparation de haute qualité de chromatine fragmentée idéalement pour l'analyse de la ChIP. Cette courte note technique montre un excellent enrichissement sensible et sélectif, indépendant du nombre de cellules de démarrage. Avec son protocole simple et rapide, le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique est une alternative intéressante et rentable à la sonication.

### Références

Albitar, L., Pickett, G., Morgan, M., Davies, S., Leslie, K. (2007). Models representing type I and type II human endometrial cancers: Ishikawa H and Hec50co cells. *Gynecol. Oncol.* 106: 52-64.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A.,

Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics* 21, 389-95.

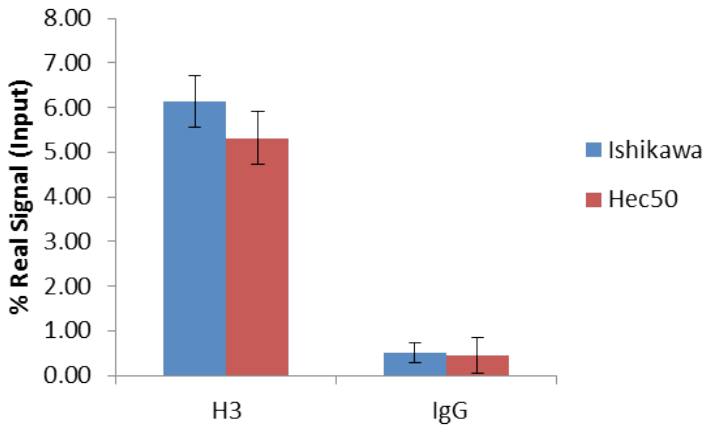
Deschênes, J., Bourdeau, V., White, J. H., Mader, S. (2007). Regulation of GREB1 transcription by estrogen receptor alpha through a multipartite enhancer spread over 20 kb of upstream flanking sequences. *J. Biol. Chem.* 282 (24): 17335-17339.

Kumar, N. S., Richer, J., Owen, G., Litman, E., Horwitz, K. B., Leslie, K. K. (1998). Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res.* 58:1860-5.

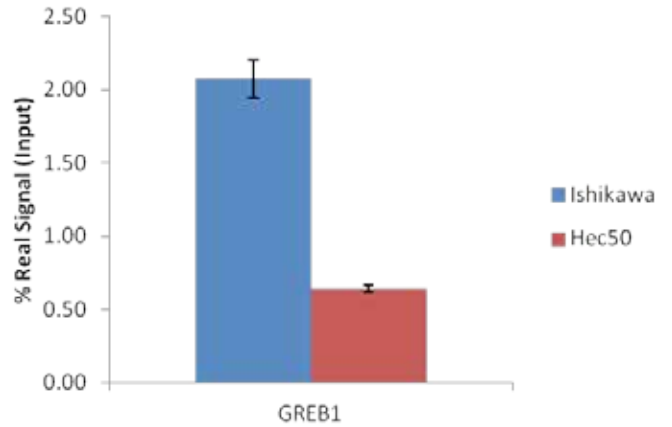
Mader, S., Chambon, P., White, J. H. (1993). Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 21(5): 1125-1132.

Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Oprea, T.I., Sklar, L.A., Hathaway, H.J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. rev. Physiol.* 70:165-90.





**Figure 2 : Enrichissement du signal H3 au promoteur GAPDH.**  
À l'aide de la chromatine, préparée en utilisant le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique, un fort signal amplifié a été obtenu dans le gène promoteur GAPDH suite à l'IP de l'histone H3 base. Le faible bruit de fond non spécifique IgG montre l'excellent rapport signal/bruit de la chromatine Ishikawa et Hec50.



**Figure 3 : L'enrichissement du GREB1 promoteur de chromatine Ishikawa et Hec50.** Amplification de signal de faible abondance, ciblant le taux d'occupation de l'ERα dans le promoteur GREB1, facilement atteinte en chromatine (Ishikawa et Hec50) isolée en utilisant le Kit Chromatrap® de cisaillement enzymatique.

## Nouveau bain à circulation réfrigéré Thermo Scientific VersaCool : l'innovation technologique sans écran permet d'augmenter la productivité tout en optimisant l'ergonomie

Équipé de la technologie innovante sans écran, le nouveau bain à circulation réfrigéré Thermo Scientific VersaCool permet aux chercheurs travaillant sur des échantillons thermosensibles de pouvoir utiliser une zone de bain plus grande que sur la plupart des modèles concurrents et ainsi, d'accueillir plus d'échantillons, d'accéder plus facilement à l'instrument, et d'économiser de l'espace dans le laboratoire.

Le bain à circulation réfrigéré Thermo Scientific VersaCool peut être utilisé comme bain réfrigéré ou comme circulateur pouvant contrôler la température des équipements externes. Compact, il peut être facilement placé et utilisé sous la paillasse, sous des hottes d'aspiration et sous des installations industrielles voire même mobiles.

La tête de contrôle et les serpentins de chauffage/refroidissement du VersaCool sont montés à l'intérieur—cette conception exclusive—sans tête - libère de l'espace à l'intérieur de l'unité, permettant aux utilisateurs d'intégrer plus d'échantillons dans un format identique et de nettoyer plus facilement l'instrument. Une pompe et des ventilateurs à vitesse variable permettent de réduire la consommation d'énergie par rapport aux anciens modèles.

« Dans les laboratoires, il s'agit avant tout d'optimiser les résultats et l'intégrité des échantillons tout en minimisant l'espace et l'énergie consommés » explique Howard

Kopech, vice-président et directeur général du département de contrôle de la température chez Thermo Fisher Scientific. « Notre nouveau bain à circulation réfrigéré Thermo Scientific VersaCool, est une amélioration majeure qui récompense plus de 150 années d'innovation dans les technologies du contrôle de la température. L'innovation de la conception sans tête de contrôle permet d'augmenter les capacités de l'instrument et d'améliorer l'ergonomie pour les utilisateurs. Sa grande variété de capacités de surveillance et de communication à distance, sa puissance de pompage et ses fonctions de sécurité redondantes en font un instrument idéal pour les recherches universitaires et en sciences de la vie, les développements biopharmaceutiques et pharmaceutiques et les applications en industrie »

Les fonctions avancées de communication et de contrôle du VersaCool sont conçues pour garantir un entretien efficace des échantillons et des applications, grâce à la surveillance de la température des fluides dans le bain ou circulant du VersaCool vers une autre application telle qu'un bioréacteur dans les laboratoires de biotechnologie et de biopharmacie ou un condenseur pour les applications chimiques et pétrochimiques. L'utilisateur peut surveiller/recevoir des notifications via son smartphone ou sa tablette lorsque ceux-ci sont connectés par Bluetooth. Il peut aussi se connecter à un laboratoire connecté à Thermo Scientific Smart-View déjà existant pour surveiller et tracer la température sans fil.



Le couvercle à charnières du VersaCool lui confère des fonctions ergonomiques permettant à l'utilisateur de changer aisément de main pour accéder au bain. Autre fonction ergonomique : la présence du panneau de contrôle sur l'avant de l'instrument. Les utilisateurs n'ont plus à passer au-dessus de la zone du bain pour accéder au système de contrôle, minimisant ainsi le risque de vapeurs interférant avec l'écran tactile.

détecte automatiquement la fréquence et la tension appropriées pour permettre un fonctionnement dans le monde entier ; les commandes et le stockage sont simplifiés pour les entreprises internationales cherchant à offrir des équipements avec leurs produits. - Interface sur écran tactile intuitive : Grand affichage intuitif en couleurs pour un fonctionnement aisé et sécurisé.

### Fonctions supplémentaires :

- Rack et couvercle sans outil, sans goutte : flexibilité d'application maximale, nettoyage plus facile et sécurité améliorée.
- Tension internationale : L'instrument

Pour en savoir plus, consultez le site [www.thermoscientific.com/versacool](http://www.thermoscientific.com/versacool)  
Contact France : Olivier Bourdin - Sales Account Manager - Spécialiste Temperature Control  
Tél / Fax : +33 4 67 82 48 60  
[olivier.bourdin@thermofisher.com](mailto:olivier.bourdin@thermofisher.com)

**Noroit**  
Le souffle protecteur

PSM, flux laminaires, conçus et fabriqués en France

## PSM Solis : une protection certifiée, le confort en plus !

**CONCEPTION BREVETÉE**

Dispositif "Twist and Clean"

Basculez, nettoyez, tout simplement ! Nettoyez facile de l'intérieur de la vitre

- Position de travail confortable et naturelle
- Fonctionnement très silencieux
- Clavier convivial, pour une utilisation intuitive

Noroit - 44380 Bouaye  
02.40.50.12.77 - [www.noroitlabo.com](http://www.noroitlabo.com) - [contact@noroitlabo.com](mailto:contact@noroitlabo.com)