

A Polyclonal HaloTag® Antibody for Western Blotting and Immunocytochemistry

ウェスタンブロットングおよび免疫細胞染色のためのポリクローナルHaloTag® 抗体

By Randall D. Learish, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では精製したHaloTag® タンパク質に対して作製されたポリクローナル抗体についてご紹介いたします。抗体のエピトープへの結合に対してリガンドの結合は顕著な影響を与えないため、HaloTag® リガンドとの共標識を行うことができます。Anti-HaloTag® pAbは、発色または化学発光検出のための標識抗ウサギ2次抗体によるウェスタンブロットングや免疫細胞染色に使用することができます。

イントロダクション

HaloTag® Interchangeable Labeling Technologyは、多機能で柔軟性のある融合タンパク質レポーターシステムです (1-4)。培養細胞のイメージングではHaloTag® 融合タンパク質は蛍光標識により視覚化することができます、免疫細胞染色 (ICC) における抗体標識法などによる他の標識物と分離することができます。多くの場合ICCでは免疫標識試薬を使用する前に細胞を固定し、透過処理を施す必要があります。HaloTag® リガンドはin vivo (生細胞) でも有用ですが、幅広い細胞イ

メージングアプリケーションにも利用することができます。結合形態が共有結合であるため、HaloTag® リガンドはタンパク質が変性してもHaloTag® レポーターから外れることが無いため、この融合タンパク質はSDS-PAGEおよび蛍光イメージングで分析することができます。この“Cell to Gell”アプリケーションは、成分の複雑なライセートや反応混合液内におけるHaloTag® 融合体の迅速な検出法を提供します。このウェスタンブロットングの代替法は、タンパク質のニトロセルロース膜への転写や免疫標識ステップを排除します。

HaloTag® テクノロジーは抗体ベースのアプリケーションを凌ぐ利点がありますが、従来のウェスタンブロットングやICCによるis situ 標識でHaloTag® 融合タンパク質の検出を行うための付加的なツールとしてHaloTag® レポータータンパク質に対するポリクローナル抗体 (pAb) を作製しました。pAbはHaloTag® 融合タンパク質を検出する1つの方法として、あるいはin vivoにおけるHaloTag® リガンドによる特異的な標識の確認に使用できます。

ウェスタンブロットングによるAnti-HaloTag® pAbの免疫反応性

HaloTag® タンパク質の精製物をウサギにインジェクションした後、血清をプールし、プロテインGカラムに添加しました。精製したサンプルは、HaloTag® p65融合タンパク質を安定に発現するヒト細胞株 (HEK293-p65-HT2) を用いたウェスタンブロットングおよびICCで活性試験を行いました。

HEK293-p65-HT2細胞はHaloTag® TMR Ligandで標識し、溶解後にSDS-PAGEで分析しました (図1)。その結果、約98kDaと予想されるp65-HT2融合タンパク質は、特異的に標識されており、標準的なセッティングの蛍光イメージングで検出されることが示されました (図1, パネルA)。低分子で強度の弱いバンド (約47kDa) も標識され、融合タンパク質の分解産物であると考えられました。同じサンプルをAnti-HaloTag® pAbでブローブし、ウェスタンブロットングを行った結果、98kDaの融合タンパク質に対する免疫反応性が認められました (図1, パネルB)。さらに、HEK293-p65-HT2細胞ではX線フィルムに長時間暴露すると47kDaタンパク質に対する弱い免疫反応性を示しました (データ未掲載)。コントロール細胞では標識タンパク質が認められないことから、リガンドによる標識とpAbによる標識両方の特異性が高いことが示されました。各アプリケーションにおいて、安定にトランスフェクションされた細胞株にのみ標識タンパク質が観察され、関連性の無いタンパク質に対する顕著な交差反応性は認められませんでした。

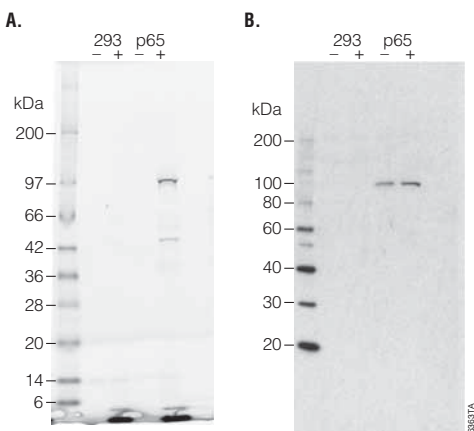


図1. ウェスタンブロットングにおけるAnti-HaloTag® pAbの免疫反応性

HEK293-p65-HT2細胞 (p65) または非トランスフェクションコントロール細胞 (HEK293) は5μM HaloTag® TMR Ligandで15分間標識あるいは擬標識し、PBSで穏やかに洗浄した後、SDSゲルサンプルバッファーで溶解した。その後、タンパク質の一部 (10μl) をSDS-PAGEに展開した。パネルA. ゲルは543nmレーザーおよび580/30バンドパス発光フィルターを用いたTyphoon® fluoroimager (GE HealthCare) でスキャンした。レーン1, DyLight™ molecular weight markers (Pierce)。隣接したレーンは、コントロール細胞の未標識 (293-)および標識 (293+) ライセートおよびHEK293-p65-HT2細胞の未標識 (p65-)および標識 (p65+) ライセート。余剰の未結合HaloTag® TMR Ligandが標識+レーンの下部に観察された。パネルB. タンパク質は30ボルト、4時間 ニトロセルロースメンブレン (BioRad) に転写した。メンブレンは、2% non-fat dry milk (BioRad)を含むTBSTで1時間ブロッキングし、1μg/ml Anti-HaloTag® pAb (ブロッキング溶液で1000倍希釈) で1時間インキュベーションした。メンブレンをブロッキング溶液で2回洗浄し、HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (Part# V795A, ブロッキング溶液で1000倍希釈) で45分間インキュベーションした。さらに、メンブレンはTBSTで2回、TBSで1回洗浄した。全ての抗体反応および洗浄操作は室温で実施した。メンブレンはECL™ Plus Detection System (GE-Amersham)を用いた化学発光検出を行った。BioMax® XAR Film (Kodak) を20秒間メンブレンに露光した。レーン1, MagicMark™ molecular weight marker (Invitrogen)。実験サンプルはパネルAのものと同様。

In situにおけるHaloTag® pAbの免疫反応性

p65タンパク質はNFκBシグナル経路に含まれる細胞質タンパク質です。我々はこれまで、安定にトランスフェクションした細胞においてHaloTag®-p65融合タンパク質が適切な細胞内局在性と生理的活性を有していることを示しました (5)。

HaloTag® TMR Ligandによる標識後、HEK293-p65-HT2細胞をAnti-HaloTag® pAbを用いたICCに供しました。その結果は、安定にトランスフェクションした細胞の細胞質でリガンドと抗体の結合活性が共存していることを示していました (図2)。HEK293におけるリガンド、pAbあるいは両方によるコントロール標識反応ではごくわずかな非特異的標識が認められました (データ未掲載)。さらに、図2では、内部ネガティブコントロールがTMRリガンドやpAbで標識されない低い%の細胞として含まれていました (矢印参照)。これらの細胞はHaloTag®-p65タンパク質未発現あるいは検出レベル以下の発現を示す細胞です。

結 論

今回の結果は、HaloTag® タンパク質へのp65タンパク質付加は、Anti-HaloTag® pAbのエピトープへの結合を顕著に阻害しないことを示唆していました。さらに、HaloTag® TMR Ligand (in vivo) およびそれに続くAnti-HaloTag® pAb (in situ) による融合タンパク質の連続標識も可能です。ICC (他のタンパク質に対する抗体を使用) を併用したHaloTag® リガンドのマルチプレックス標識により、HaloTag® 融合タンパク質と他のタンパク質をin situで検出するための2色標識を行うことができます。

Anti-HaloTag® pAbを用いることができるようになり、HaloTag® ツールボックスに重要な試薬が新たに加わったことになります。これにより、従来法であるウェスタンブロッティングの実施や発色あるいは化学発光検出用の様々な酵素結合抗ウサギ2次抗体を利用できるようになります。同様に本抗体は、免疫細胞染色のための様々な標識抗ウサギ2次抗体を組み合わせることで使用することができます。

参考文献

1. Los, G.V. and Wood, K. (2006) *Methods Mol. Biol.* **356**, 195–208.
2. Los, G.V. *et al.* (2006) *Cell Notes* **14**, 10–14.
3. Svendsen, S. *et al.* (2007) *Promega Notes* **95**, 16–9.
4. Svendsen, S. *et al.* (2007) *Promega Notes* **95**, 20–2.
5. Karassina, N. *et al.* (2006) Abstract #06A1872
American Society of Cell Biology, Presented 12/11/2006, San Diego, CA.

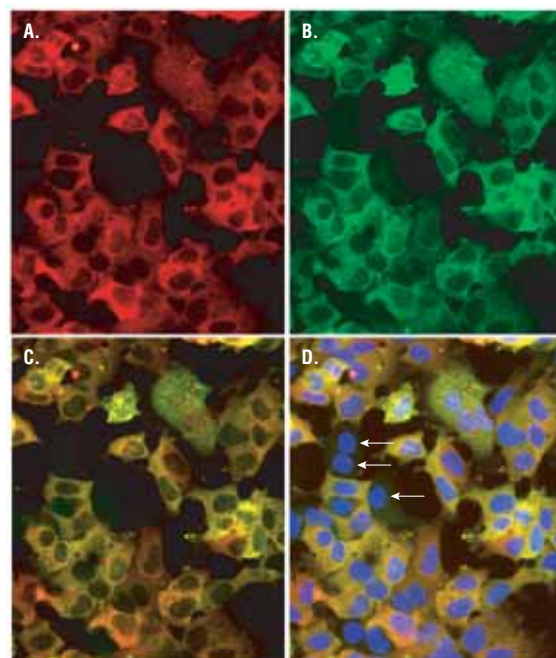


図2. HaloTag® TMR LigandおよびAnti-HaloTag® pAbによるHaloTag®-p65融合タンパク質の共標識

HEK293-p65-HT2細胞はコラーゲンをコートした8ウェルチャンバーカバーガラススライド (Nunc) に播種し、3日間コンフルエントに近い状態まで培養し、5μM HaloTag® TMR Ligandで15分間標識した。細胞は温かいIPBSで穏やかに洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで10分間固定し、0.2% Triton® で透過処理を施した後、2% ロバ血清でブロッキングし、2μg/ml Anti-HaloTag® pAb (500倍希釈) でインキュベーションした。細胞はブロッキング溶液で洗浄し、2mg/ml AlexaFluor® 488- conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen) でインキュベーションした。最後に細胞はDAPI (Vector Laboratories) で対比染色した。イメージは、20×油浸対物レンズおよびローダミン、AlexaFluor® 488に適したフィルターセットを用いた落射型蛍光顕微鏡で撮像した。パネルA. HEK293-p65-HT2細胞のHaloTag® TMR Ligandによる細胞質の標識 (赤)。パネルB. Anti-HaloTag® pAbによる細胞質の標識 (緑)。パネルC. リガンドと抗体の結合活性の共存。パネルD. DAPI (青) による核の対比染色と赤および緑蛍光の重ね合せ像。矢印は、HaloTag®-p65を全くあるいはほとんど発現していない希少な細胞を示す。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Anti-HaloTag® pAb	200 μg	G9281	52,000