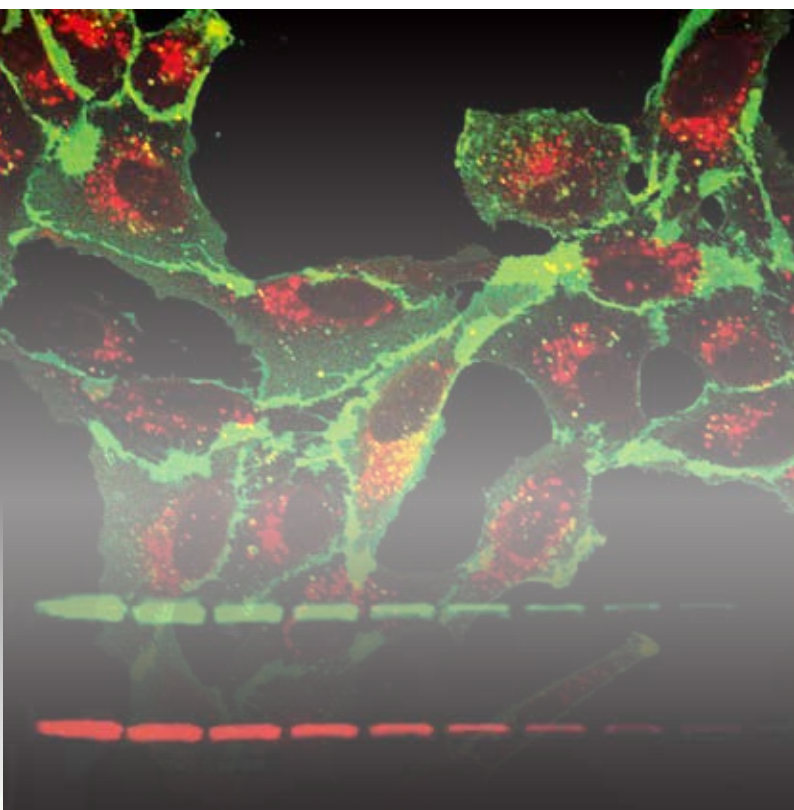


HaloTag[®] ガイド

包括的なタンパク質解析のツール



Contents :

- イントロダクション
 - HaloTag[®] ベクター
 - HaloTag[®] ORF クローン
- 細胞内イメージング
 - 蛍光リガンド・抗体
- パルスチェイス
- タンパク質間相互作用
 - HaloLink[™] Resin/Beads
 - HaloTag[®] Pull-Down System
 - HaloLink[™] Array
- タンパク質-DNA相互作用
 - HaloCHIP[™] System
- タンパク質 発現・精製
 - HaloTag[®] Protein Purification system
- その他のアプリケーション紹介



Promega

The Ultimate Protein Analysis Tool

包括的タンパク質解析ツール

HaloTag® Technology ~ NF- κ B の解析例より~

HaloTag® システムを利用することでタンパク質解析が行える例として、NF- κ B の解析例を紹介いたします。HaloTag® ベクターに p65 遺伝子をクローニングし、細胞内で発現させることにより、NF- κ B (p65) タンパク質の細胞内での動態を観察したり、p65 タンパク質と複合体を形成するタンパク質や I κ B プロモーターへの結合を検出することができます。タンパク質相互作用の解析では、I κ B と p65-HaloTag® の結合が 30 分後に最低レベルになったのに対して、核内の I κ B プロモーターへの p65-HaloTag® の結合が 30 分後に最大になり、イメージングにおける p65-HaloTag® の動態と一致しました。このように HaloTag® ベクターに標的遺伝子をクローニングすれば、タンパク質を多面的に解析することができます。さらに HaloTag® は大腸菌や植物など哺乳動物細胞以外でも発現することができ、タンパク質精製にも利用できます。



タンパク質：タンパク質相互作用

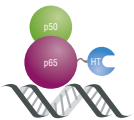
p65-HaloTag® の I κ B タンパク質への結合



0 30 60 90min

Anti-I κ B 抗体を用いた免疫ブロッティング

[詳細については 14 ページ参照]



タンパク質：DNA 相互作用

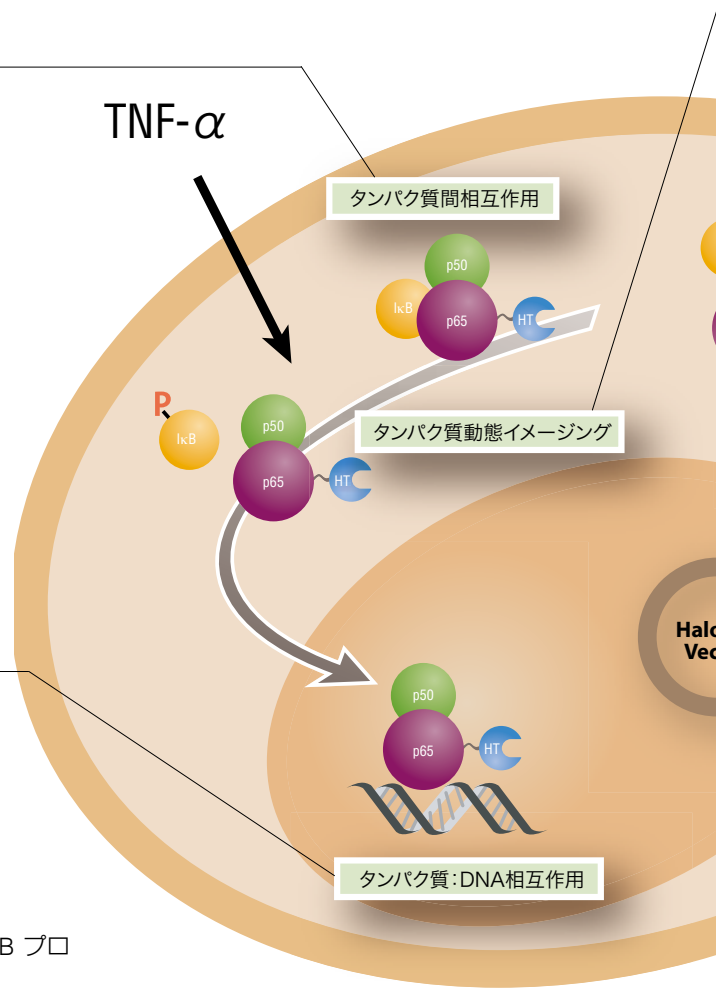
p65-HaloTag® の I κ B プロモーターへの結合



0 15 30 45 60min

HaloCHIP™ System により回収した DNA を用いた I κ B プロモーターの PCR 増幅

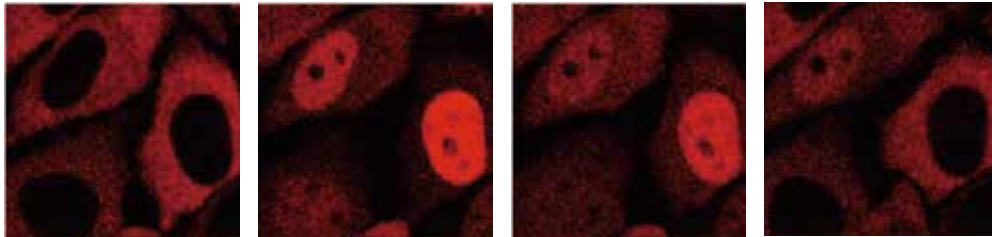
[詳細については 17 ページ参照]



参考文献：Georgyi V. Los, et al. (2008) ACS Chemical Biology 3, 373-382.
細胞内イメージング (AVI file) : www.promega.co.jp/halotag/image1.avi

タンパク質動態イメージング

TNF- α 添加にともなう p65-HaloTag® タンパク質の細胞質から核への移動



0 min

30 min

60 min

120 min

HaloTag® TMR Ligand による標識

[詳細については 8 ページ参照]

タンパク質精製

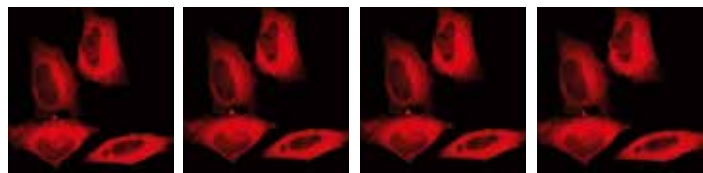
[詳細については 18 ページ参照]

I κ B-HaloTag® を用いたタンパク質分解イメージング

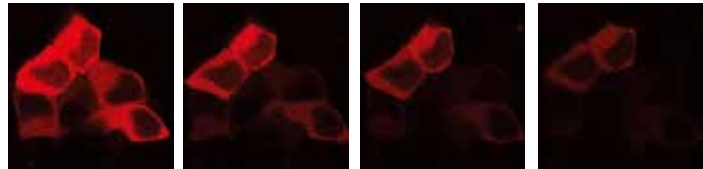
TNF- α 添加にともなう I κ B-HaloTag® タンパク質の S26 プロテアソームによる分解 (Lactacystin : プロテアソーム阻害剤)

0 min 30 min 60 min 120 min

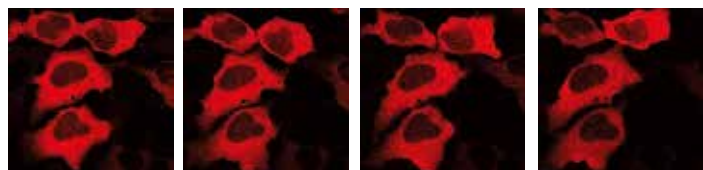
Control



TNF- α



Lactacystin
+ TNF- α



HaloTag® ORF Clone

[詳細については 6 ページ参照]

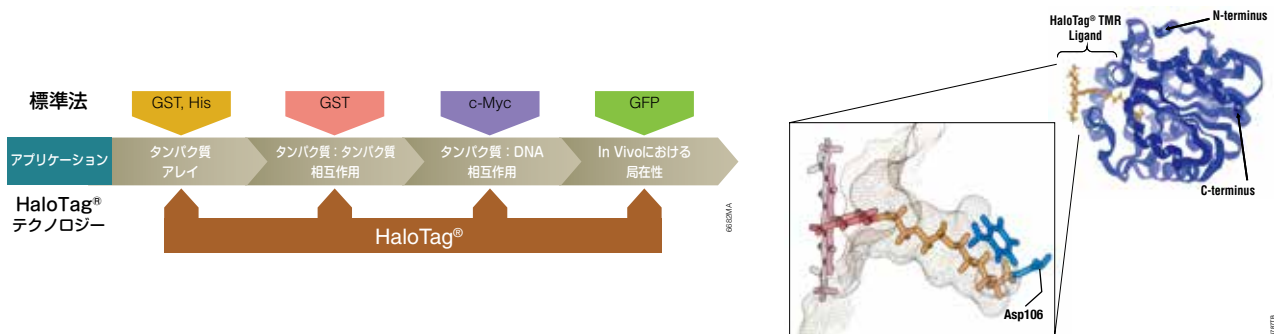
HaloTag® TMR Ligand による標識

[詳細については 13 ページ参照]

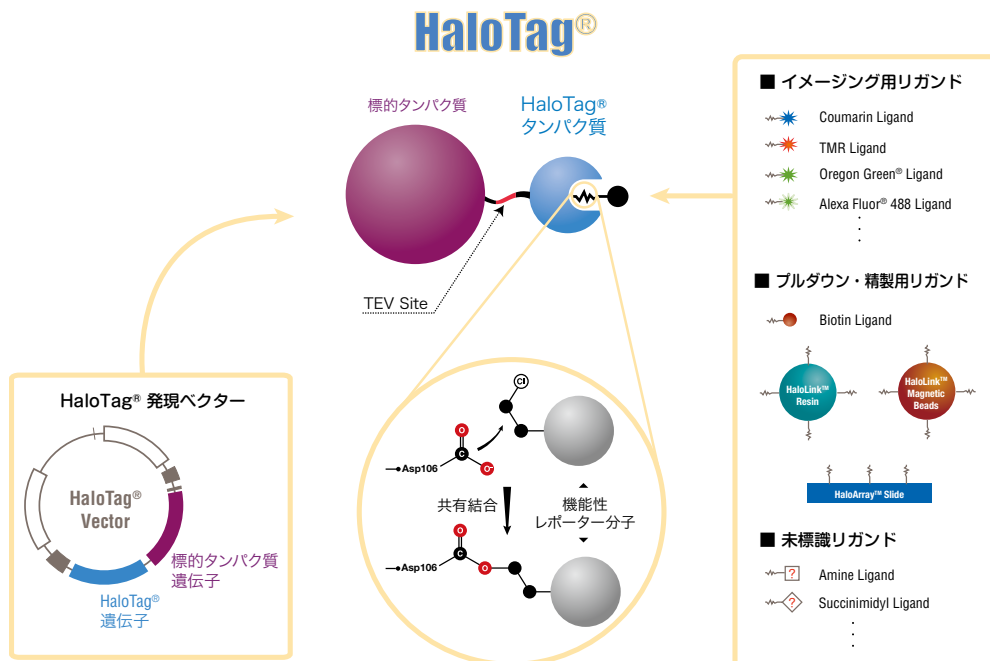
新規な万能タグ (in vitro 解析から細胞内イメージングまで)

標的タンパク質に共有結合で機能性分子を付加します

タンパク質を解析するために多くのタグが利用されています。例えば、組み換えタンパク質の精製や検出を行うために付加するタグとして、タンパク質精製用の His タグ、GST タグなど特定の分子種に特異的な親和性を有するものが使われています。また、抗体により認識されるエピトープ、あるいは蛍光タンパク質など、様々なタグがタンパク質解析の目的に応じて用いられてきました。しかし、これまではタンパク質解析の用途ごとにタグを換えなければならず、ベクター側のコンストラクトを作り直す必要があるため煩雑で、非効率的でした。HaloTag® のストラテジーは、低分子リガンドが特異的に結合（不可逆的な共有結合）する受け皿タンパク質をタグとして利用するため、コンストラクトを変えずに様々な機能を持つリガンドを付帯させることで、広範なタンパク質解析を行うことができます。



HaloTag® タンパク質のポケット構造とリガンドの結合



様々な発現系に適応するベクター & ヒト遺伝子リソース！

哺乳動物発現、大腸菌発現、無細胞発現、N末端/C末端融合など多用途に合わせて設計された各種ベクターに加え、約20,000種のヒトORFを導入済みのベクターも販売(5-6ページ参照)。

リガンドが共有結合します！

HaloTag® タンパク質とリガンドが迅速に共有結合を形成するので反応後リガンドは解離しません。そのため、相互作用を解析する際は低濃度のタンパク質でも検出でき、強力な洗浄を実施できるため高いS/B比を実現できます。

用途に合わせてリガンドが選べます！

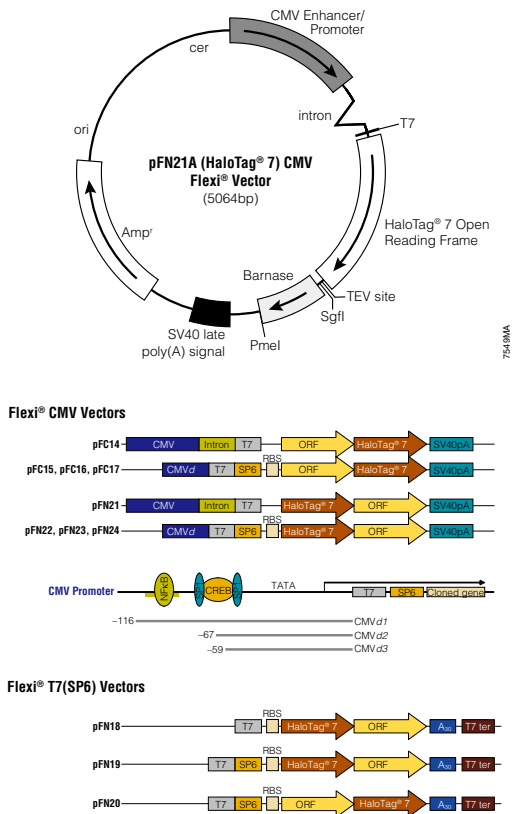
蛍光種や細胞透過性、スパーサーの長さ、担体などの異なる様々な機能性リガンドを取り揃えており、HaloTag® コンストラクトを1度構築すれば、広範なタンパク質解析に利用することができます(9, 14ページ参照)。

HaloTag® Vectors

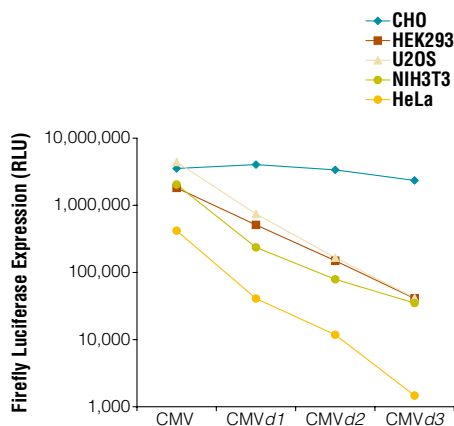
HaloTag® ベクター

幅広いベクターラインナップは緻密な発現実験の設計を可能にします

HaloTag® を発現する Flexi® HaloTag® ベクターは最新型の HaloTag® 遺伝子が含まれており、発現効率やリガンドとの結合効率、タンパク質の安定性、可溶性に優れ、タグの切断機能（TEV プロテアーゼ切断サイト）も付加されています。また、HaloTag® タンパク質を目的タンパク質の N 末端または C 末端に融合できるように 2 つのタイプのベクターを揃えています。



pFN21A のベクターマップと哺乳動物発現用および大腸菌発現・無細胞発現用ベクターの発現エレメント領域



CMV プロモーターの段階的削除による発現レベルへの影響

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を各ベクターに組み込み、その発現量を比較した。CHO 細胞以外では CMV プロモーター領域を段階的に削除することで発現量が抑制されることが示された。発現レベルは CMV > CMV d1 > CMV d2 > CMV d3。

HaloTag® 7 Vector の機能別選択リスト

ベクター名	カタログ番号	マーカー	発現系			融合タグ*	
			E.coli	哺乳動物細胞	無細胞発現	N 末端	C 末端
大腸菌発現							
pFN18A	G2751	Amp	T7	-	T7 (注1)	○	-
pFN18K	G2681	Kan	-	-	-	-	-
無細胞発現							
pFN19A	G1891	Amp	T7	-	T7, SP6	○	-
pFN19K	G1841	Kan	-	-	-	-	-
pFC20A	G1681	Amp	T7	-	T7, SP6	-	○
pFC20K	G1691	Kan	-	-	-	-	-
哺乳動物発現							
pFC14A	G9651	Amp	-	CMV (最強)	T7 (注2)	-	○
pFC14K	G9661	Kan	-	-	-	-	-
pFC15A	G1611	Amp	T7	CMV d1 (強)	T7, SP6	-	○
pFC15K	G1602	Kan	-	-	-	-	-
pFC16A	G1591	Amp	T7	CMV d2 (中)	T7, SP6	-	○
pFC16K	G1571	Kan	-	-	-	-	-
pFC17A	G1551	Amp	T7	CMV d3 (弱)	T7, SP6	-	○
pFC17K	G1321	Kan	-	-	-	-	-
pFN21A	G2821	Amp	-	CMV (最強)	T7 (注2)	○	-
pFN21K	G2831	Kan	-	-	-	-	-
pFN22A	G2841	Amp	T7	CMV d1 (強)	T7, SP6	○	-
pFN22K	G2851	Kan	-	-	-	-	-
pFN23A	G2861	Amp	T7	CMV d2 (中)	T7, SP6	○	-
pFN23K	G2871	Kan	-	-	-	-	-
pFN24A	G2881	Amp	T7	CMV d3 (弱)	T7, SP6	○	-
pFN24K	G2981	Kan	-	-	-	-	-

*TEV プロテアーゼ認識サイトを含むためタグの切除が可能

※ Flexi® ベクターは Barnase (致死遺伝子を含むため大腸菌でそのまま増幅することはできません。)

注 1) 真核生物系の無細胞発現には不適

注 2) E.coli S30 抽出液による無細胞発現には不適

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内			
クローニングベクター			
各 Flexi® HaloTag® 7 Vector	各 20µg	上表参照	51,000
ベクターセット			
HaloTag® 7 Flexi® Vectors - CMV Deletion Series	9 × 2µg	G3780	40,000
Sampke Pack			
HaloTag® Cloning Starter System	1 システム	G6050	61,000

CMV Deletion Series Sampke Pack (カタログ番号 G3780) には、pFC14K, pFC15K, pFC16K, pFC17K, pFN21A, pFN21K, pFN22K, pFN23K, pFN24K の各ベクターが 2µg ずつ含まれます。

また、G6050 には上記の G3780 および クローニング用の試薬 Flexi® System, Entry/Transfer (C8640), Carboxy Flexi® Enzyme Blend (Sgf I and EcolCR I) (R1901) が含まれます。

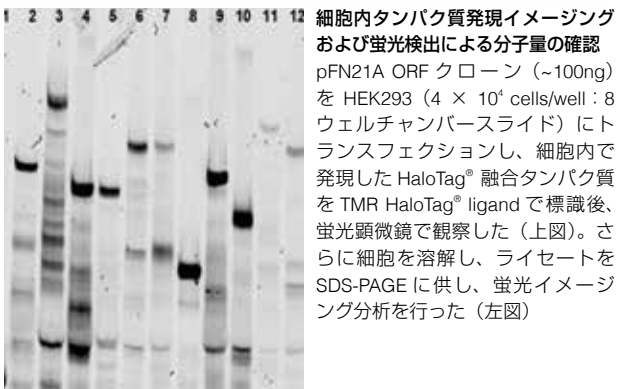
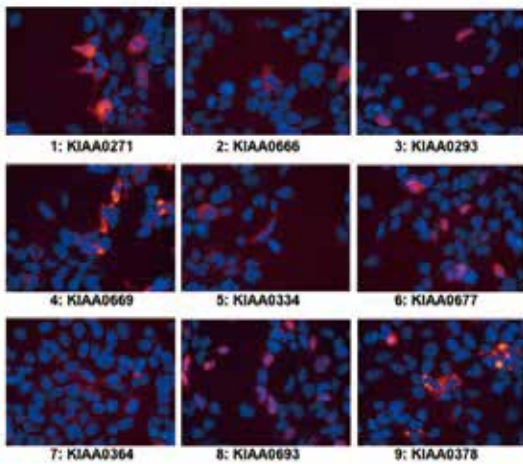
ライセンスについて: HaloTag® Technology で使用するリガンドをプロメガ以外で作製・入手する場合、または研究用途以外 (営利目的等) でご使用される場合、ライセンス契約の必要があります。

"Expression-Ready" ORF Clone

すぐに使用できる遺伝子リソース

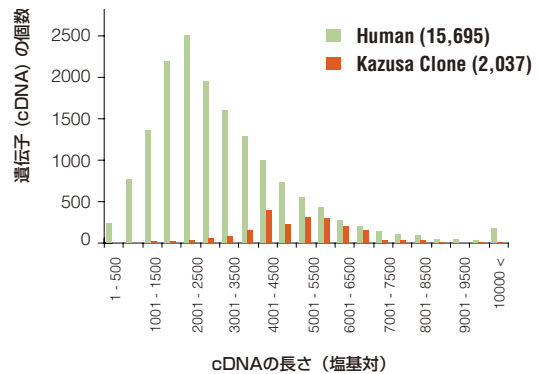
発現試験済みの HaloTag® + ヒト ORF クローン

長鎖に特化したかずさ cDNA コレクション (> 4,000 クローン) と幅広いラインナップの OC ORF (ORFeome Collaboration Clone) コレクション (約 20,000 クローン) の2つのリソースを HaloTag® Flexi® Vector (pFN21A) に導入した "Flexi® HaloTag® Type" クローンを提供しています (前ページのベクターマップ参照)。全てのクローンは、HEK293 細胞でのタンパク質発現も確認済みなので、そのまま発現実験を開始することができます。また、他の Flexi® Vector への ORF の移換えも容易です (次ページ参照)。



細胞内タンパク質発現イメージングおよび蛍光検出による分子量の確認
pFN21A ORF クローン (~100ng) を HEK293 (4×10^4 cells/well : 8 ウェルチャンバースライド) にトランスフェクションし、細胞内で発現した HaloTag® 融合タンパク質を TMR HaloTag® ligand で標識後、蛍光顕微鏡で観察した (上図)。さらに細胞を溶解し、ライセートを SDS-PAGE に供し、蛍光イメージング分析を行った (左図)

- ・細胞内発現イメージングによる発現確認
- ・細胞ライセートより産物のサイズ確認
- ・もちろん全長シーケンスも確認済み
- ・購入時の面倒な書類記入は不要
- ・オンラインでご注文いただけます。
- ・大学、公的研究機関はもちろん、企業における面倒なライセンス契約も不要です。



UniGene Build #172: GenBank (24 Jun 2004), dbEST (24 Jun 2004)

全長塩基配列決定 cDNA における長鎖に特化したかずさ cDNA コレクションの分布



HaloTag® ORF クローンデータベース
(www.kazusa.or.jp/kop/dsearch/)

参考文献:

T. Nagase *et al.* (2008) *DNA Res.* **15** 137-149. (PMID: 18316326)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内 Flexi® HaloTag® Type (pFN21A + ORF)			
	1 クローン	FHCxxxx	50,000

※ご注文後、かずさ ORF および OC Clone から Flexi® HaloTag® へのサブクローニングが既に完了しているクローンについては2週間以内に納品いたします。未完了クローンの納期についてはお問い合わせください (office@kazusa.or.jp)。また、その他のベクタータイプ Flexi® Cloning Type, Original Type については下記のサイトを参照下さい。

HaloTag® ORF Clone の詳細、オンライン注文については www.promega.co.jp/flexiclone/ をご覧下さい。

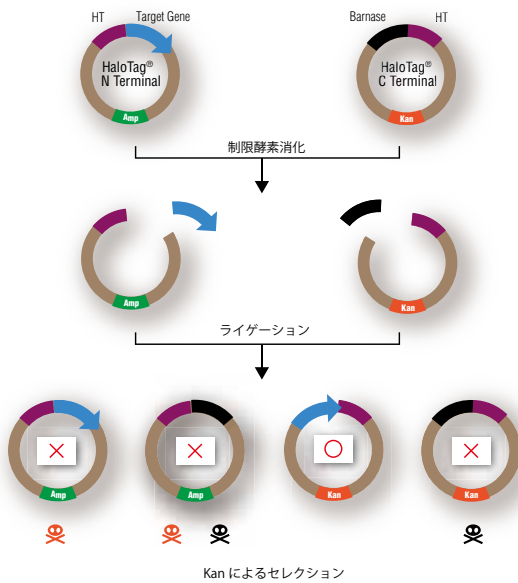
Flexi® Cloning & Vectors

HaloTag® ベクターから他の機能性ベクターへの簡便なクローニング さらに広がるタンパク質解析アプリケーション

HaloTag® ベクターは Flexi® Vector System に対応したベクターです。Flexi® ベクターは、低頻度出現の制限酵素（レアカッター）Sgf I、Pme I および EcoICRI を利用することでシンプルなダイレクショナルクローニングを可能にし、広範な機能性ベクターにより様々なタンパク質機能解析に利用することができます。致死遺伝子バーナーゼ（Barnase）および抗生物質耐性遺伝子（Amp-Kan）によるポジティブセレクションにより効率的なクローニングが行えます。非常にシンプルなクローニング法なので迅速で、正確性が高く ORF を移換えた後の配列確認の必要もありません。

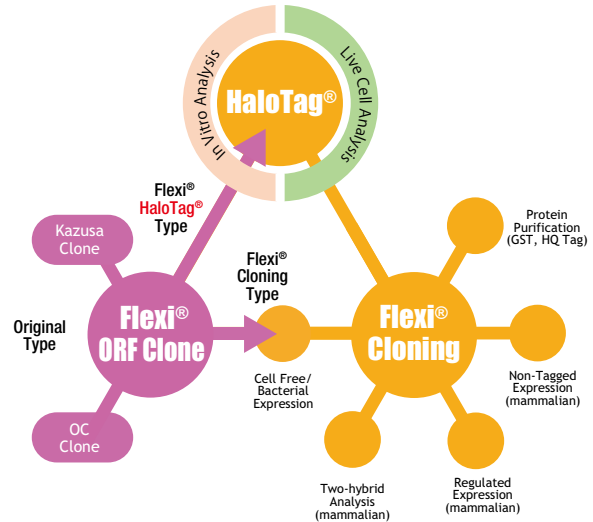
その他の Flexi® 機能性ベクターにより可能なアプリケーション

- ・ タグの無い標的タンパク質の強制発現
- ・ HQ (His) タグあるいは GST タグを付加した標的タンパク質の発現
- ・ 哺乳動物でのツーハイブリット解析
- ・ 哺乳動物での誘導発現
- ・ 無細胞発現（植物系）
- ・ 無細胞発現（昆虫系）



Flexi® ベクターシステムによる簡便な移換え例（N 末融合→C 末融合）

この図では、N 末端側に HaloTag® が融合しているベクター（たとえば、Flexi HaloTag® クローン）から HaloTag® を C 末端側に融合するタイプへ変更する場合の移換え例を示しています。移換える先の Flexi® ベクターには、Barnase 遺伝子（大腸菌に対して毒性を持つ）が組み込まれており、この配列を含むプラスミドは大腸菌内では増幅されません。Target Gene, Barnase を制限酵素で切り出した後、ベクター、断片を精製せずに、両者を混合してライゲーションします。4 種類の組み合わせのプラスミドができますが、アンピシリン（Amp）、カナマイシン（Kan）の選択マーカー、Barnase の有無により、目的のプラスミドだけを選択して取得できます。



Flexi® Type クローンからの容易な ORF の移換え

Flexi® HaloTag® Type および Flexi® Cloning Type のクローンは他の機能を有する Flexi® 発現ベクター（www.promega.co.jp/flexiclone/vectors.html）への ORF の移換えを容易に行うことができます

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内			
クローニングシステム			
Flexi® System, Entry/Transfer	5/20 回分	C8640	32,000
Flexi® System, Transfer	100 回分	C8820	104,000
Carboxy Flexi System, Transfer	50 回分	C9320	59,000
クローニング酵素ブレンド			
10X Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	25µl	R1851	13,000
	100µl	R1852	43,000
Carboxy Flexi® Enzyme Blend (SgfI & EcoICRI)	50µl	R1901	14,000

内容:

C8640

- Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)
- T4 DNA Ligase (HC)
- 5X Flexi® Digest Buffer
- 2X Flexi® Ligase Buffer
- Nuclease-Free Water
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

C8820

- Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)
- T4 DNA Ligase (HC)
- 5X Flexi® Digest Buffer
- 2X Flexi® Ligase Buffer
- Nuclease-Free Water

C9320

- Carboxy Flexi® Enzyme Blend (SgfI & EcoICRI)
- Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)
- T4 DNA Ligase (HC)
- 5X Flexi® Digest Buffer
- 2X Flexi® Ligase Buffer
- Nuclease-Free Water

Flexi® Cloning およびその他の機能性ベクターの詳細については www.promega.co.jp/flexiclone/ を参照ください。

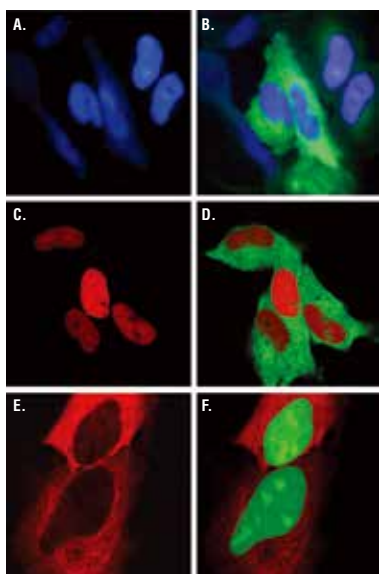
タンパク質の細胞内イメージング

タンパク質の局在、動態、プロテインプールの分染

HaloTag® タンパク質の蛍光リガンドによる標識の特長の1つは、同じコンストラクトより発現したタンパク質を任意の蛍光色素で染めることができる点です（GFPなどの蛍光タンパク質では、異なる蛍光色で検出する場合には、コンストラクト自体を変える必要があります）。そのため、時間差で異なる色素により標識することで、パルス-チェイス様の実験を行うことができます。細胞表面に提示されたタンパク質のみを染色できる細胞膜非透過性リガンドや任意の色素をご自身で合成して頂くために未標識のリガンドも用意しています。

■ 生細胞における蛍光タンパク質とのマルチプレックス解析

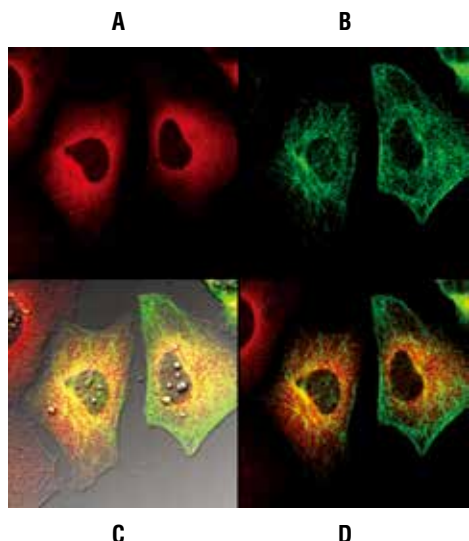
HaloTag® テクノロジーは複数の蛍光染色を簡便にします。蛍光タンパク質とは異なり、HaloTag® コンストラクトを構築すれば、第2あるいは第3の蛍光染色として自由に蛍光色を選択することができ、柔軟な多重染色が行えます。



生細胞の核または細胞質を標的としたHaloTag® およびhMGFPレポーター HaloTag®-(NLS)₃ および hMGFP-α-tubulin (パネル A-D) または HaloTag®-α-tubulin および hMGFP-(NLS)₃ (パネル E, F) の各セットを HeLa 細胞にトランジェントにトランスフェクションした。24 時間後、HaloTag®-(NLS)₃ を発現する細胞は 25μM Coumarin Ligand (パネル A, B) または 5μM HaloTag® TMR Ligand (パネル C, D) で、HaloTag®-α-tubulin を発現する細胞は 5μM HaloTag® TMR Ligand (パネル E, F) でそれぞれ 15 分間インキュベーションした (37°C /5% CO₂)。細胞は洗浄後、30 分間インキュベーションした。パネル A および B では、細胞をフィルターセット (Coumarin Ligand には #31000 DAPI、hMGFP には #41001 FITC Chroma Technology Corp)、Orca CCD カメラ (浜松ホトニクス社) および environmental controls を装備したオリンパス IX81 落射蛍光顕微鏡でイメージングした。パネル C-F では、2 レーザーシーケンシャルスキャンニングおよび TMR と FITC の蛍光に適したフィルターで撮影した。

■ HaloTag® リガンドは固定後も蛍光特性を失わないので、免疫細胞染色 (ICC) とのマルチプレックス解析が可能

HaloTag® とリガンドは安定な共有結合を形成するため固定細胞でもイメージング解析が行えます。タンパク質自体が蛍光を有する GFP とは異なり、安定な蛍光分子を使用するので、変性条件下でも退色はおこりません。

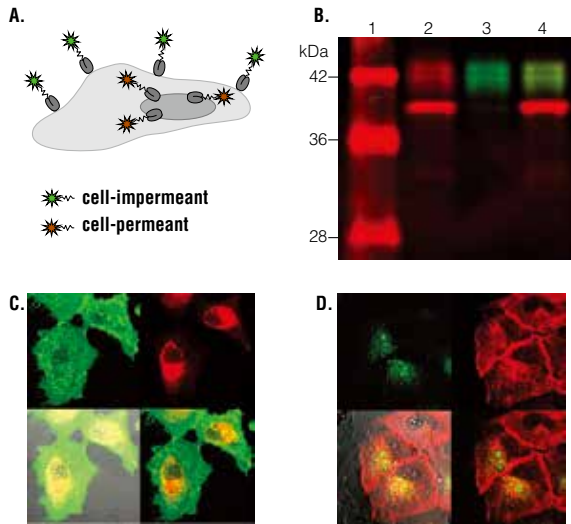


p65-HaloTag® タンパク質を発現し、HaloTag® TMR Ligand で標識した細胞の固定後のイメージング

HeLa 細胞に p65-HaloTag® 融合タンパク質をコードするプラスミドをトランジェントにトランスフェクションし、発現した p65-HaloTag® 融合タンパク質を 5μM HaloTag® TMR Ligand で 37°C、15 分間標識した。細胞は 3.7% パラホルムアルデヒドで固定した後、1μg/ml mouse Anti-βIII Tubulin Antibody (カタログ番号 G7121) および Alexa Fluor®-488-conjugated goat-antimouse IgG (Molecular Probes) を用いて染色した。イメージはオリンパス FV500 共焦点顕微鏡 (TMR または Alexa Fluor® に適したフィルターセットまたは透過光を用いたシーケンシャルモード) により撮影。パネル A. TMR 蛍光。パネル B. Alexa Fluor®-488 蛍光。パネル C. Alexa Fluor®-488 および TMR 蛍光および透過光のオーバーレイ。パネル D. Alexa Fluor®-488 および TMR 蛍光のオーバーレイ。

パルスチェイス実験&時間的/空間的なタンパク質プールの分離および SDS-PAGE でのタンパク質修飾解析

HaloTag® テクノロジーは、1つのベクターコンストラクトを作製するだけで異なる波長の蛍光を HaloTag® レポータータンパク質に付帯させることができます。そのため、発現した時間の異なるタンパク質プールを異なる蛍光色で染色でき、異なる細胞透過性を持つ蛍光 HaloTag® リガンドを使用することにより異なる領域(細胞膜/細胞内)の標的タンパク質を染め分けることもできます。また、ゲル分析によるタンパク質の翻訳後修飾の解析にも利用することができます(下図、パネル B: 細胞表面の HaloTag®-インテグリン融合タンパク質はグリコシル化により修飾されるため高分子側にシフトされて観察されます[グルカナーゼ処理により確認済み])。



HaloTag® テクノロジーを用いた空間的または時間的なタンパク質の分離

パネル A. $\beta 1$ Integrin-HaloTag® タンパク質のパルス/チェイス標識法の概略図(パルスでは細胞表面の HaloTag® タンパク質を標識するために細胞非透過性の HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand を使用し、チェイスでは細胞内の HaloTag® タンパク質を標識するために細胞透過性の HaloTag® TMR Ligand を使用)。**パネル B.** $\beta 1$ Integrin-HaloTag® タンパク質を安定に発現する HEK293 細胞を HaloTag® TMR Ligand のみで標識(レーン 2)、HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand のみで標識(レーン 3)または、膜タンパク質標識のための HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand によるパルスと細胞内タンパク質標識のための HaloTag® TMR Ligand によるチェイス(レーン 4)。生細胞イメージングの後、細胞を溶解して分子量マーカー(レーン 1)とともに SDS-PAGE に供し分析した。**パネル C.** $\beta 1$ Integrin-HaloTag® タンパク質を一過性に発現する HeLa 細胞を HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand でパルス(1 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 15 分)、HaloTag® TMR Ligand でチェイスし(5 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 15 分)、洗浄した後 Olympus FV500 共焦点顕微鏡(適切なフィルターセットを用いたシーケンシャルモード)を用いてイメージングを行った。**パネル D.** 細胞標識 12 時間後のイメージング結果では、異なる標識を行ったタンパク質において細胞質から細胞膜へ移動したタンパク質や細胞膜から細胞内移行したタンパク質が観察された。

製品名 サイズ カタログ番号 価格(¥)

製品案内

蛍光リガンド(標準プロトコル用)

HaloTag® TMR Ligand	15 μ l	G8252	48,000
	30 μ l	G8251	80,000
HaloTag® Oregon Green® Ligand	15 μ l	G2802	48,000
	30 μ l	G2801	80,000
HaloTag® diAcFAM Ligand	15 μ l	G8273	48,000
	30 μ l	G8272	80,000
HaloTag® Coumarin Ligand	15 μ l	G8582	48,000
	30 μ l	G8581	80,000
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand (細胞膜非透過性)	15 μ l	G1002	48,000
	30 μ l	G1001	80,000
HaloTag® Alexa Fluor® 660 Ligand (細胞膜非透過性)	15 μ l	G8472	48,000
	30 μ l	G8471	80,000

蛍光リガンド("No-wash"プロトコル用 [11 ページ参照])

HaloTag® TMRDirect™ Ligand	30 μ l	G2991	48,000
HaloTag® R110Direct™ Ligand	30 μ l	G3221	48,000

ビオチンリガンド

HaloTag® Biotin Ligand	15 μ l	G8282	48,000
	30 μ l	G8281	80,000
HaloTag® PEG-Biotin Ligand (細胞膜非透過性)	15 μ l	G8592	48,000
	30 μ l	G8591	80,000

未標識リガンド

HaloTag® Amine (04) Ligand	5mg	P6741	101,000
HaloTag® Succinimidyl Ester (04) Ligand	5mg	P6751	101,000
HaloTag® Thiol (04) Ligand	5mg	P6761	101,000
HaloTag® Iodoacetamide (04) Ligand	5mg	P6771	101,000
HaloTag® Succinimidyl Ester (02) Ligand	5mg	P1691	101,000
HaloTag® Amine (02) Ligand	5mg	P6711	101,000
HaloTag® Iodoacetamide (02) Ligand	5mg	P1681	101,000

※ G2991, G3221 は高純度リガンドです。

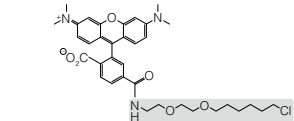
※ 蛍光リガンドは通常 1000 倍に希釈して使用します(原液 30 μ l は 300 ウェル分に相当: 1x リガンド希釈液 100 μ l/ウェル 使用時 [8 ウェルチャンパーなど])。

※ 未修飾リガンドは研究目的に応じて、新たな蛍光リガンドを作成する場合などに利用できます。また固相にカップリングさせている例などもあります。反応法は、各製品シートをご覧ください。O2 と O4 の違いは、反応基と HaloTag® 結合基の間のエーテル結合数の違いです。

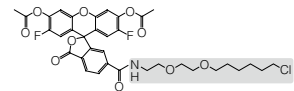
機能的レポーター部 反応性リンカー部

細胞膜透過性リガンド

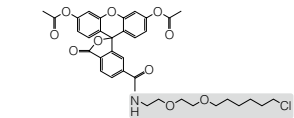
HaloTag® TMR Ligand
555_{Ex}/585_{Em}
C₃₃H₂₆ClN₂O₅
MW = 636



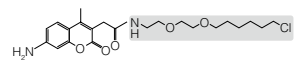
HaloTag® Oregon Green® Ligand
496_{Ex}/516_{Em} (after hydrolysis)
C₃₅H₃₀ClF₂N₂O₁₀
MW = 702



HaloTag® diAcFAM Ligand
494_{Ex}/526_{Em} (after hydrolysis)
C₃₃H₃₀ClN₂O₁₀
MW = 666

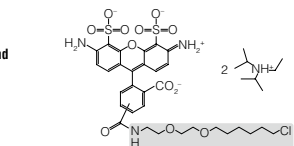


HaloTag® Coumarin Ligand
353_{Ex}/434_{Em}
C₂₂H₁₂ClN₂O₅
MW = 439



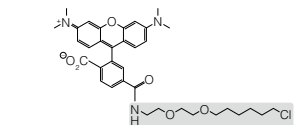
細胞膜非透過性リガンド(細胞表面の標識)

HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand
494_{Ex}/517_{Em}
C₄₁H₂₇ClN₂O₁₂S₂
MW = 999

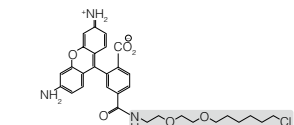


細胞膜透過性リガンド, Non-Wash用

HaloTag® TMRDirect™ Ligand
555_{Ex}/585_{Em}
C₃₃H₂₆ClN₂O₅
MW = 636



HaloTag® R110Direct™ Ligand
502_{Ex}/527_{Em}
C₃₁H₃₀ClN₂O₅
MW = 580

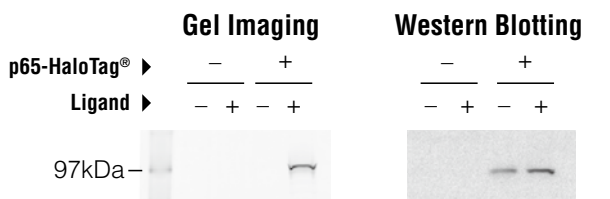
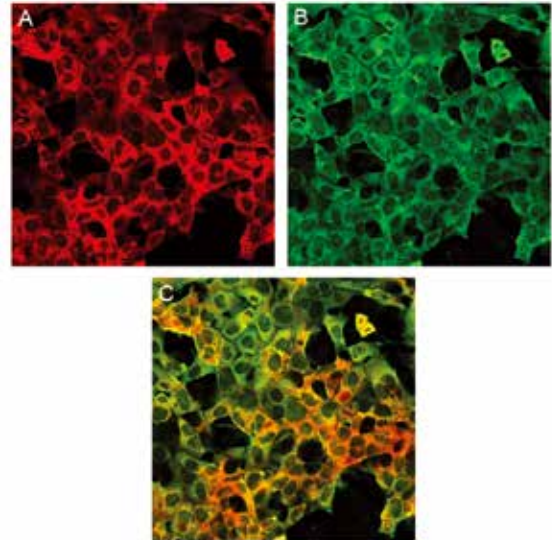


蛍光リガンドの特性と構造

細胞免疫染色

抗体による HaloTag® の局在性確認

細胞免疫染色やウェスタン分析に使用できる HaloTag® に対する抗体, Anti-HaloTag® pAb (カタログ番号 G9281) もございます。本抗体は HaloTag® タンパク質に対する精製ウサギポリクローナル抗体で、プロテイン G アフィニティレジンを精製されています。この抗体は、HaloTag® リガンドとの共標識に利用でき、それぞれの標識に対して互いに干渉しません。HaloTag® タンパク質に捕捉・固定用リガンドが結合している際のイメージングや、パルスチェイス実験にも使用されています。



ウェスタンブロットングにおける Anti-HaloTag® pAb の免疫反応性
p65-HaloTag® をトランスフェクションした HEK293 細胞および非トランスフェクションコントロール HEK293 細胞を 5µM HaloTag® TMR Ligand で標識 (または未標識) した後、ライセートを SDS-PAGE に供した。ゲルの蛍光イメージング像 (左図)。メンブレンに転写後、Anti-HaloTag® pAb (1000 倍希釈)、HRP 標識 2 次抗体を用いてウェスタン分析を行った (化学発光検出) (右図)。

HaloTag® リガンドと Anti-HaloTag® pAb による HaloTag® 融合タンパク質の標識

p65-HaloTag® コンストラクトを安定にトランスフェクションした HEK293 細胞を HaloTag® TMR Ligand で標識後に固定した。さらに Anti-HaloTag® pAb および Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit-IgG で標識した。**パネル A.** HaloTag® TMR Ligand 標識。**パネル B.** Anti-HaloTag® pAb 標識。**パネル C.** 重ね合わせ像

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内			
Anti-HaloTag® pAb	200µg	G9281	55,000
Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody	200µg	G9211	60,000

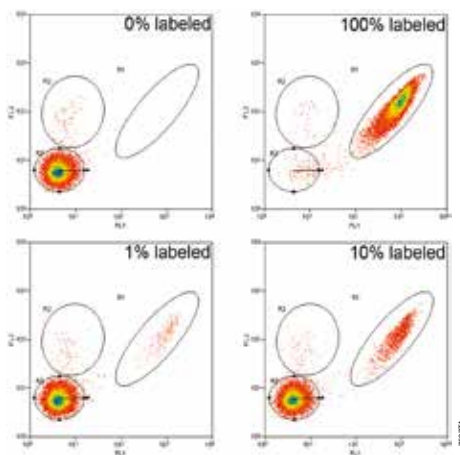
FACS® 分析

セルソーティング

HaloTag® リガンドで標識した細胞は FACS® 分析を行うことができます。浮遊細胞あるいは付着細胞で実施でき、ソートした細胞は顕微鏡によるイメージングや SDS-PAGE、さらに異なる蛍光色での標識 (細胞内で新規に発現した HaloTag® タンパク質) などを行えます。標識操作はステップを簡略化した "Non-Wash Protocol" あるいは標準プロトコルでも実施できます (次ページ参照)。

HaloTag® を発現し、標識された細胞の FACS® 解析

核移行シグナルを融合させた HaloTag® タンパク質を安定に発現する U2OS 細胞を HaloTag® R110Direct Ligand で標識 (Non-Wash Protocol) し、未標識細胞と混和した後、既知数の標識細胞 (1%, 10% または 100%) をソートした。R1 は R110 標識細胞、R2 は死細胞 (プロピジウムイオダイド)、R3 は非標識細胞。各グラフは約 20,000 個の細胞に相当。



FL1=R110, FL2=PI

Imaging

ゲル内分析

抗体を使用せずに標的タンパク質だけを検出

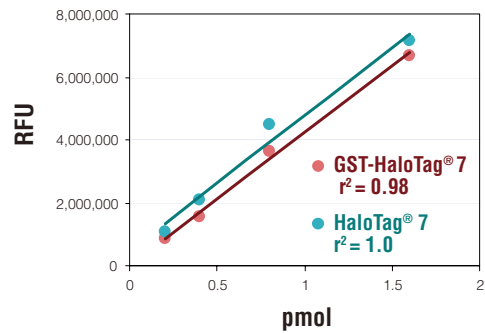
生細胞内で発現した HaloTag® タンパク質を蛍光リガンドで標識後、調製したライセートをそのまま SDS-PAGE に供し、融合タンパク質を蛍光検出することができます。HaloTag® タンパク質とリガンドの結合は強固（共有結合）であるため、SDS 共存下、95°C、5 分間の処理を行っても解離することが無く、定量的に解析することができます。

■ タンパク質の定量的な検出



HaloTag® タンパク質のゲル分析

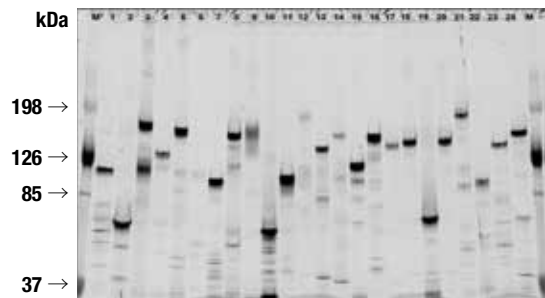
GST-HaloTag® タンパク質は FAM ligand で、HaloTag® タンパク質は TMR ligand で標識した。



標識タンパク質の直線的な標準曲線

■ 発現タンパク質の迅速な確認

生細胞を蛍光標識した後のライセートを SDS-PAGE に供し、発現タンパク質の分子量を迅速に確認することができます。この方法は、かすさ DNA 研究所で Flexi® HaloTag® ORF Clone 作製時に行われるタンパク質発現の確認作業で実際に使用されています（詳細については 6 ページ参照）。



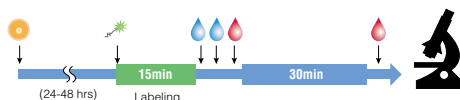
細胞内で発現した HaloTag® タンパク質の蛍光検出による分子量確認

ハイコンテント分析

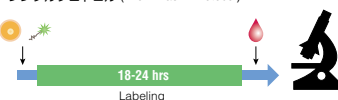
洗浄ステップを伴わない簡便なシンプルプロトコル

新しく開発された HaloTag® TMRDirect および R110Direct Ligand を用いたシンプル - プロトコル "Non-Wash Protocol" は、リガンドを低濃度に抑え、長時間インキュベーションすることで標的 HaloTag® タンパク質を標識する方法で、洗浄操作を省くことができるため、ハイコンテントスクリーニングの自動化などに最適です。低濃度の HaloTag® リガンドを長時間にわたり暴露しますが、毒性も無く、多くのアプリケーションに適合します。

標準プロトコル (Rapid Labeling Protocol)

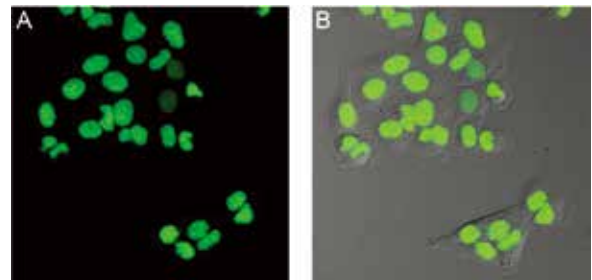


シンプルプロトコル ("Non-Wash" Protocol)



● Cells ✨ Ligands 💧 Wash 🩸 Media replacement

標準プロトコルとシンプルプロトコルの操作比較



"No-wash" 生細胞標識プロトコルでも示された高いシグナル/ノイズ比と特異性

核移行シグナルを融合させた HaloTag® を安定に発現する U2OS 細胞を HaloTag® R110Direct Ligand で洗浄ステップを省略した方法で標識した。パネル A: 蛍光イメージ。パネル B: 蛍光イメージと DIC イメージの重ね合わせ。

植物での応用

HaloTag® は植物でも発現し、本来の機能を有しています。

植物細胞でも HaloTag® タンパク質は発現することが確認され、細胞壁を透過することも報告されています。植物細胞に対する毒性もなく、またご利用目的に応じた蛍光色素を使ってイメージングすることや、植物細胞で発現したタンパク質を HaloLink™ 等を用いて、共沈させることも可能です。また小麦胚芽由来の in vitro 転写、翻訳系の TNT® Coupled Wheat Germ Extract System を利用して、HaloTag® 融合タンパク質を大量に合成することも可能です。植物を使った例として、以下の論文が報告されています。

参考文献（植物）

Lang C. *et al.* (2006) HaloTag®: A new versatile reporter gene system in plant cells. *Journal of Experimental Botany*. **57** (12):2985-2992. (PMID: 16873446)

この論文は、植物細胞において初めて HaloTag® Interchangeable Protein Labeling Technology を使った報告である。pHT2 Vector をテンプレートとして、HaloTag® タンパク質の cDNA を PCR で増幅し、pGEM®-T Easy Vector へ導入した。さらに導入した遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルスウィルス (CaMV) -35S プロモータにより目的タンパク質を発現させるベクターに導入した。構築したベクターは、tobacco protoplast やタバコの葉細胞に導入した。その後細胞内での局在を、HaloTag® TMR や diAcFAM Ligand を用いて検出している。

Ogawa M. *et al.* (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294. (PMID: 18202283)

著者らは、CLV1 のキナーゼ領域を HaloTag® タンパク質と置換した CLV1-HaloTag® 融合タンパク質をタバコ BY-2 細胞に発現させ、その細胞膜画分を調製し、トリチウムラベルした CLV3 との結合を調べた。CLV1-HaloTag® 融合タンパク質を発現させた細胞では、野生型の細胞と比較して有意に CLV3 との結合が見られた。さらに Photoaffinity labeling の手法を用いて、HaloTag®-CLV1 融合タンパク質に [¹²⁵I]ASA-CLV3 が結合する事を確認し、CLV3 が CLV1 の細胞外領域に結合することを明らかにした。

その他の生物種での応用

HaloTag® は粘菌やゼブラフィッシュなど幅広い生物種にも応用できます。

HaloTag® を利用した研究は、哺乳動物細胞、植物だけでなく、粘菌、ゼブラフィッシュでも報告されています。特に全反射顕微鏡を用いた分子イメージングでは、従来の蛍光タンパク質比での優位性が報告されています。また大腸菌での発現例もあり、多くの生物種で HaloTag® を使った研究が進んでいます。

参考文献：

キイロタマホコリカビ

Miyana Y. *et al.* (2009) Single-Molecule Imaging Techniques to Visualize Chemotactic Signaling Events on the Membrane of Living Dictyostelium Cells. *Methods in Molecular Biology* **571**, 417-435. (PMID: 19763983)

全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いた、キイロタマホコリカビ (細胞性粘菌) での 1 分子ライブセルイメージングの論文である。cAMP receptor 1 (cAR1)-HaloTag® プラスミドをエレクトロポレーションでキイロタマホコリカビ細胞に導入している。HaloTag®+ TMR Ligand と、GFP のような蛍光タンパク質を比較した場合、HaloTag® + TMR Ligand の方が蛍光のプリンキングが少ない、退色までの時間が長い、また TMR Ligand の濃度が調節可能といった特長を持つことから、少なくとも 1 分子イメージングにおいては HaloTag® + TMR Ligand の方が優れていると結論している。

Arai Y. *et al.* (2010) Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107** (27): 12399-12404. (PMID: 20562345)

細胞の自発運動では細胞の前後極性が形成されるが、外部シグナルがない場合には細胞が自己組織化反応により自発的に極性を形成する。この細胞極性の時空間パターンを、PTEN-HaloTag® を TMR Ligand で可視化することにより観察している。

ゼブラフィッシュ

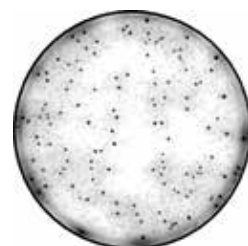
Li W. M. *et al.* (2008) Multiple roles of the furrow deepening Ca²⁺ transient during cytokinesis in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **316** (2): 228-248. (PMID: 18313658)

細胞質分裂の際には VAMP-2 小胞が分裂溝に集積し、分裂を促進する役割を持つ。VAMP-2-HaloTag® をコードする mRNA をゼブラフィッシュの胚にマイクロインジェクションし、TMR Ligand で染色することにより、VAMP-2 の分裂溝への集積を観察している。

実験例：

大腸菌

50nM HaloTag® TMR および 0.25% rhamnose を含む LB Agar プレートに HaloTag-hRL (改変ウミシイタケルシフェラーゼ) または、hRL のみを含む大腸菌 KRX 株を播種 (1:100) した。LB プレートを蛍光観察 (Ex532nm/Em580nm) することにより、HaloTag-hRL を発現するコロニーを検出した。大腸菌内で目的タンパク質が発現していることを電気泳動前に確認できた。

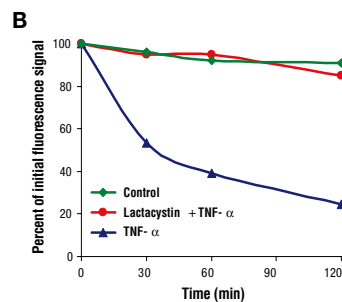
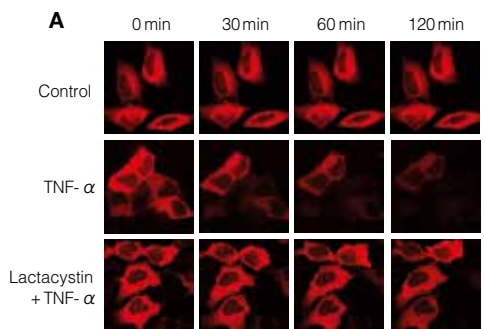


Imaging

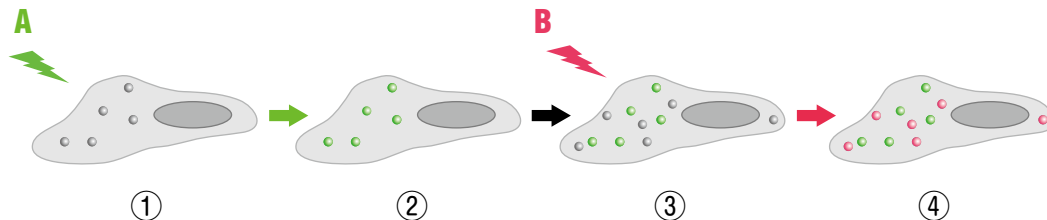
タンパク質の分解

タンパク質の分解過程を可視化、定量化することができます。

タンパク質の寿命や分解に関する研究は近年注目されています。これまでは、タンパク質の寿命を解析するには、 ^{35}S Met を使ってタンパク質をラベルしたりタンパク質合成阻害剤を添加したりする必要がありました。しかし、HaloTag® を使えば、細胞内で発現させたタンパク質を瞬間的に蛍光ラベルし、その後は蛍光を測定するだけで、そのタンパク質の寿命が解析できます（下図参照）。また、蛍光ラベルした HaloTag® タンパク質は蛍光顕微鏡で観察できるので、分解過程を可視化することができます。もちろん分解過程だけでなく、瞬間的にラベルすることが出来るので、タンパク質の局在の変化の観察にも適しています（9 ページ参照）。HaloTag® Biotin Ligand [カタログ番号 G8281] で標識し、その量の変化を解析している報告もあり、実験方法は多彩です。

TNF- α 依存的な I κ B-HaloTag® 融合タンパク質の分解

パネル A) I κ B-HaloTag® 融合タンパク質を HEK293 細胞に一過的に発現させ、TMR リガンド (5 μ M) で標識した。TNF- α (10ng/ml) で刺激後、10 分間隔で 3 時間まで観察を行った（図では 0、30、60、120 分後の画像を示した）。TNF- α の刺激の 30 分前より 10 μ M の Lactacystin で処理することにより、分解が抑制された。パネル B) 細胞の平均的な蛍光強度をオリンパス FV500 ソフトウェアにより求め、時間 0 での蛍光強度を 100 として示している。



パルス・チェイス多重染色の概念図

刺激 A（もしくは刺激なし）によって発現した HaloTag® タンパク質①を緑色蛍光リガンドで染色をすると、その時点で発現していた HaloTag® タンパク質は緑色で検出できます②。その後、一定時間経過した後、同じ細胞に刺激 B を加えて③、赤色蛍光リガンドで染色すると、刺激 A で発現した HaloTag® タンパク質にはすでに緑色リガンドが結合しているため、刺激 B で新たに発現したものが赤色に染め分けられます④。

1 種類の蛍光リガンドとビオチンリガンドを組み合わせて単色でのパルス・チェイス染色を行うことでタンパク質の寿命を解析することも可能です。また細胞膜非透過性リガンドと細胞膜透過性リガンドを使って細胞膜内・外を分けて染色することで細胞膜から細胞質へのタンパク質局在変化をパルスラベリング法と組み合わせて解析することも可能です。

参考文献（タンパク質分解）

Wang L, et al. (2008) The Chaperone Activity of Heat Shock Protein 90 Is Critical for Maintaining the Stability of Leucine-Rich Repeat Kinase 2. *J. Neurosci.* **28** (13) : 3384-3391. (PMID: 18367605)

著者らは、LRRK2 と Hsp90 が in vivo でも結合し、安定性に大きな影響を与えていることを HaloTag® に融合した野生型と変異型の LRRK2 の細胞内分解をパルスチェイス法により比較することで示した。細胞内で発現した HaloTag® タンパク質を 15 分間、Biotin リガンドで標識後、Streptavidin-coated beads で沈降させ、沈降したタンパク質を HaloTag® に対する抗体を使って定量している。

Tatematsu K. et al. (2008) Identification of ubiquitin ligase activity of RBCK1 and its inhibition by splice variant RBCK2 and protein kinase C β . *J. Biol. Chem.* **283**, 11575-11585. (PMID: 18303026)

RBCK1 とユビキチン化タンパク質との相互作用を、HaloTag® ユビキチンと FLAG-RBCK1 を HEK293 細胞に共発現させて検討している。パルスチェイスの実験では、HEK293 細胞に HaloTag®-RBCK1 タンパク質と RBCK2 タンパク質と共発現させ、HaloTag®-TMR リガンドを使うことで、RBCK2 を過剰発現させた場合、RBCK1 の半減期が延びることを示している。

Protein / Protein interaction

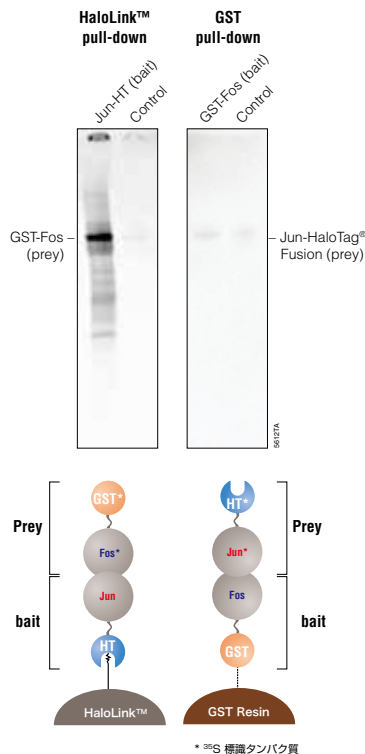
プルダウンアッセイ

効率的なタンパク質：タンパク質相互作用解析

標準的なプルダウンアッセイでは、担体に結合するベイト (bait) タンパク質濃度を高くするために大腸菌発現系が汎用され、アフィニティータグである GST との組み合わせが多く見られます。しかし、タンパク質間の相互作用には修飾やフォールディングなどが必要な場合があり、大腸菌の発現系では相互作用を見逃してしまう場合があります。この点で哺乳動物の細胞や無細胞発現系を用いた相互作用は有用ですが、大腸菌より発現量が比較的小さいため検出が困難な場合があります。これを解消するのが HaloTag® の持つ高い親和性（共有結合：右上図参照）と迅速な結合速度です。発現量が少なくても、強力な洗浄が可能であるためバックグラウンドを極めて低く抑えられ、検出感度が上がります。標準的なプルダウンアッセイでは、非特異的なタンパク質の結合による擬陽性が問題となりますが、HaloTag® と HaloLink™（担体）は強力な結合力を有し、HaloLink™ への非特異的結合が最低限に抑えられているため擬陽性を著しく低減させることができます。これらの特性により無細胞発現タンパク質を bait/prey の両方に用いたり、哺乳動物細胞内での相互作用を検出することも可能になります。プルダウンアッセイで検出された特異的結合パートナーは、SDS-PAGE や質量分析により解析・同定することができます。

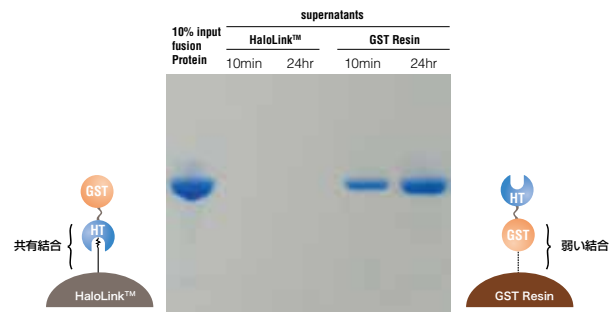
HaloTag® vs GST (bait/prey = 無細胞発現タンパク質)

同等の条件下で比較した HaloTag® および GST とそれぞれの親和性レジンとの結合能力（右図）および実際のプルダウンアッセイにおける検出感度（下図）とも HaloTag® が優れていました。



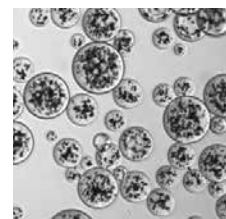
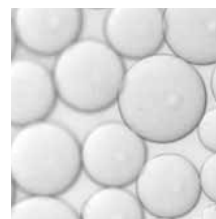
HaloTag® および HaloLink™ Resin を用いたプルダウン法と GST を用いたプルダウン法の比較

GST-c-Fos および c-Jun-HaloTag® 融合タンパク質を無細胞発現系で合成し、互いに bait (未標識) あるいは prey (³⁵S-メチオニン標識) として用いた。合成完了後、未標識タンパク質および標識タンパク質パートナーからなる 2 組の反応液を混合し、タンパク質を結合させた。HaloLink™ Resin (左パネル) または GST-結合レジン (右パネル) を用いて、タンパク質複合体をプルダウンした。左レーン：HaloLink™ または GST レジンをを用いた GST-c-Fos または c-Jun-HaloTag® タンパク質のプルダウン。右レーン：HaloLink™ または GST レジンのみ。



HaloTag® 融合タンパク質の強固な結合

等量 (25μl [沈殿状態]) の HaloLink™ Resin および GST 結合レジンと、それぞれ HaloTag®-GST 融合タンパク質 160μg と混合し、インキュベーションした。レジンを洗浄し、PBS に再懸濁した。4℃ で表示時間インキュベーション後、SDS-PAGE により上清を分析した。最左のレーンでは、添加した HaloTag®-GST 融合タンパク質の 10% 量を泳動した。HaloLink™ では 24 時間後に回収した上清でも HaloTag®-GST 融合タンパク質は検出されない。一方、GST Resin では、すでに 10 分後の上清で HaloTag®-GST 融合タンパク質が検出された。



HaloLink™ Resin:

HaloTag® リガンドでコートしたセファロースレジン。
粒子サイズ：45 ~ 165μm
結合容量：> 7mg/ml (沈殿レジン)

HaloLink™ Magnetic Beads:

HaloTag® リガンドでコートした磁性体粒子。
粒子サイズ：10 ~ 125μm
結合容量：> 10mg/ml (沈殿ビーズ)

製品名

サイズ カタログ番号 価格 (¥)

製品案内

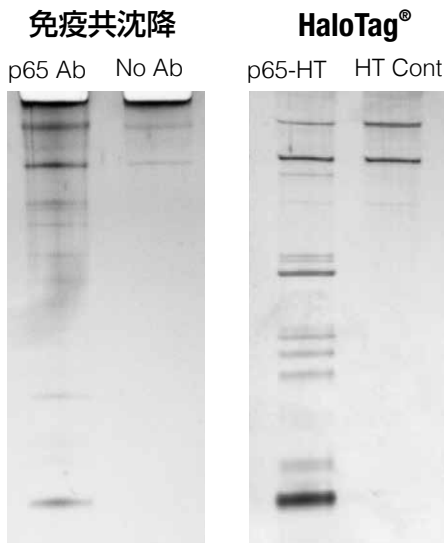
捕捉・精製用レジン担体および磁性体ビーズ

HaloLink™ Resin	1.25ml (5ml)*	G1912	32,000
	2.5ml (10ml)*	G1913	63,000
	10ml (40ml)*	G1914	77,000
	25ml (100ml)*	G1915	160,000
Magne™ HaloTag® Beads	200μl (1ml)*	G7281	17,000
	1ml (5x1ml)*	G7282	68,000

* () 内はレジンあるいはビーズを懸濁した場合の総ボリューム

哺乳細胞内 (in vivo) で形成されたタンパク質相互作用の検出 (bait/prey = 哺乳動物細胞発現タンパク質)

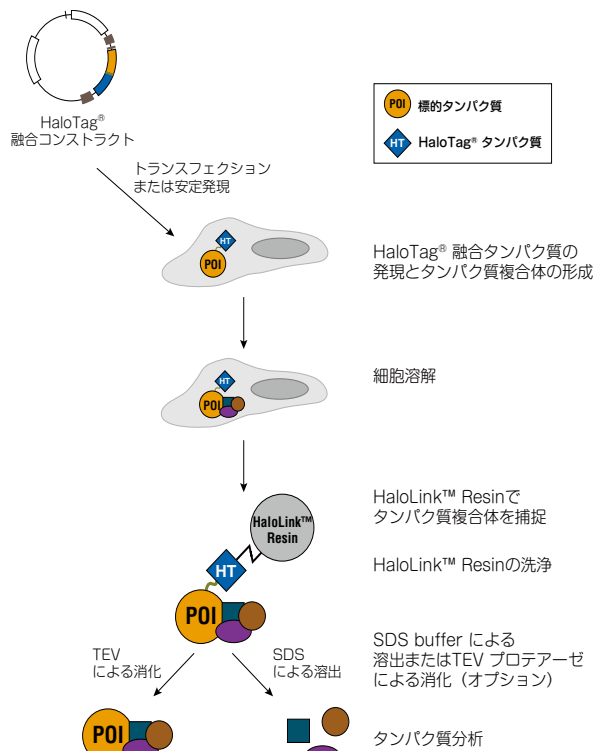
in vivo におけるタンパク質相互作用の分析は、より生体内に近い状態で厳密な相互作用を再現できるため非常に重要です。HaloTag® Mammalian Pull-Down and Labeling System は、HaloTag® 融合タンパク質を哺乳動物細胞内で発現させ、細胞内に含まれる相互作用パートナーやタンパク質複合体をプルダウンするためのシステムです。HaloTag® とレジンとが共有結合するため、一過性あるいは弱い相互作用を形成するパートナーやより高次の細胞内タンパク質複合体を捕捉あるいは精製することができます。本システムには HaloTag® TMRDirect™ Ligand も含まれており、同じ遺伝子コンストラクトを用いて複合体形成との相関的な細胞内局在やリアルタイムイメージングも観察でき、タンパク質機能全体像の理解に役立ちます。付属する HaloTag® Control Vector には CMV プロモーター、T7 や SP6 RNA ポリメラーゼプロモーターが含まれており、哺乳動物細胞、大腸菌あるいは無細胞発現系で HaloTag® タンパク質を発現させることができます。このベクターは全ての HaloTag® 実験システムでコントロールとして使用することができます。



予想されるパートナー	免疫共沈降	HaloTag®
p105	○	○
p100	○	○
Rel A	○	○
Rel B	○	○
C-Rel	○	○
IκBα	○	○
IκBβ	○	○
IκBε	○	○

HaloTag® Mammalian Pull-Down Assay と免疫共沈降法によるプルダウンの比較

上図：HeLa 細胞で p65 の相互作用パートナーのプルダウンを行った後に電気泳動 - 銀染色により検出し、HaloTag® Mammalian Pull-Down Assay と免疫共沈降法を比較した。HaloTag® Mammalian Pull-Down Assay では免疫共沈降法の約 4 ~ 5 倍の感度が得られた。上表：2 つの方法により確認された p65 パートナー。予想される相互作用パートナーは質量分析により確認した。



bait タンパク質として HaloTag® 融合タンパク質を用いた HaloTag® Mammalian Pull-Down Assay の概要

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内			
システム			
HaloTag® Mammalian Pull-Down and Labeling System	24 回分	G6500	94,000
HaloTag® Mammalian Pull-Down System	24 回分	G6504	60,000
HaloTag® Complete Pull-Down System	1 セット	G6509	160,000
関連製品			
HaloTag® Control Vector	20µg	G6591	42,000
Protease Inhibitor Cocktail, 50X	1ml	G6521	15,000
Mammalian Lysis Buffer	40ml	G9381	10,000
HaloLink™ Resin	10ml	G1914	77,000

内 容：G6500、G6504

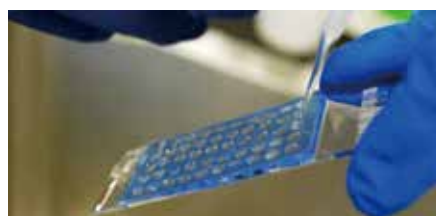
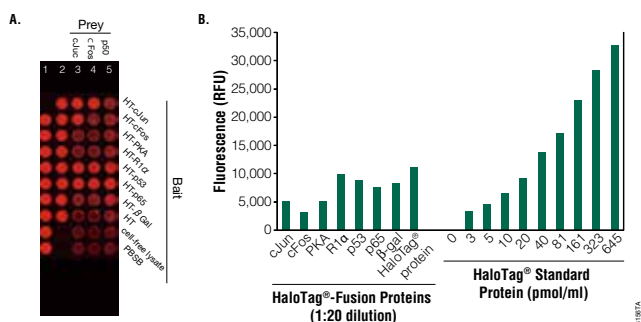
- HaloLink™ Resin (5ml)
- Protease Inhibitor Cocktail, 50X (1ml)
- Mammalian Lysis Buffer (10ml)
- 10X TBS Buffer (25ml)
- SDS Elution Buffer (1.3ml)
- HaloTag® TMRDirect™ Ligand (30µl) (G6500のみ)

Protein Array

タンパク質アレイ

配向性に優れたタンパク質提示が可能

HaloLink™ Array System は HaloTag® リガンドを利用したタンパク質アレイシステムです。無細胞系で発現させた標的 HaloTag® タンパク質を固定化するセルフプリント方式で、自由にタンパク質アレイを作製することができます。無細胞発現は短時間（2 時間以内）でタンパク質を調製でき、スライド上の HaloTag® リガンドへ迅速に共有結合するので標的タンパク質を精製する必要がありません（固定化 / 洗浄のみ）。



50 ウェルのタンパク質アレイスライド

に固定した融合タンパク質およびタンパク質の検出例パネル HaloLink™ Array に固定した HaloTag® Standard Protein（1 列目）および各 HaloTag®-bait 融合タンパク質（2 列目）は Anti-HaloTag® pAb および Alexa Fluor® 633 標識 2 次抗体、TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System で合成したピオチン化 Prey タンパク質（cJun: 3 列目、cFos: 4 列目、p53: 5 列目）と固定化した bait タンパク質との相互作用は Alexa Fluor® 647 labeled streptavidin を利用して蛍光イメージングを行った。パネル HaloTag® Standard Protein (1 列目) および各 HaloTag®-bait 融合タンパク質 (2 列目) の蛍光強度をプロットした。平均蛍光強度は直径 2.0mm の領域から算出した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内			
HaloLink™ Array Six Slide System	6×50 回分	G6190	149,000
HaloTag® Standard Protein	30µg	G4491	11,000
Protein G HaloTag® Fusion Protein	5mg	G7291	60,000

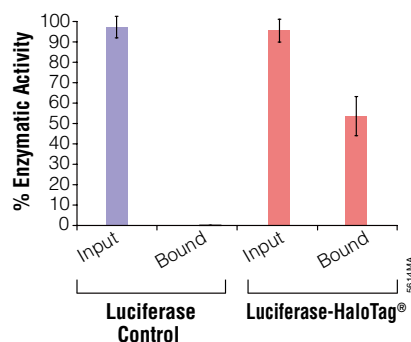
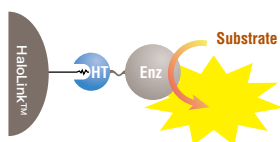
・G6190にはHaloLink™ Array GasketsおよびAnti-HaloTag® pAbも含まれます。

Enzyme Assay

酵素活性の検出

低濃度タンパク質でも効率よく回収できるので感度良く検出できます

HaloTag® テクノロジーは、酵素の固定および活性に関する研究にも利用できます。融合タンパク質を HaloLink™ (Resin または Magnetic Beads) 上に共有結合させることで、様々なバッファー条件でタンパク質が外れることなく長時間にわたり酵素活性を測定することができます。他のアフィニティー担体でも表面に酵素を付着させることはできますが、インキュベーション後に融合タンパク質は担体より解離してしまいます。HaloTag® 融合タンパク質は HaloLink™ 上に共有結合しているため、解離することは皆無です。また、HaloLink™ 上のリガンドに対して一定方向に結合するため、ビーズ上での配向性に優れており、最大の活性を保持することができます。



HaloLink™ Resin 上に固定化したタンパク質の酵素活性検出

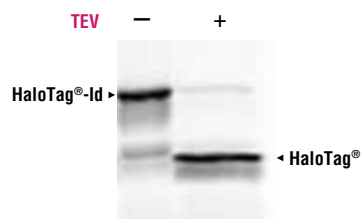
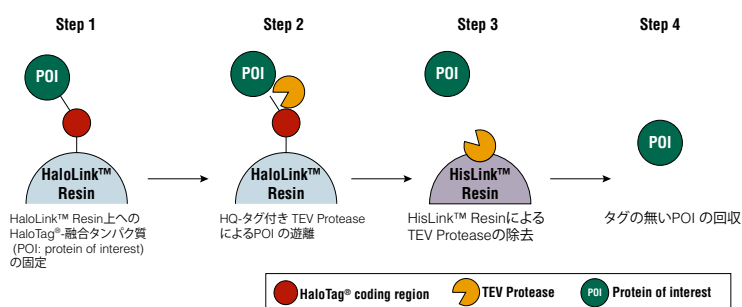
HaloTag® 融合ルシフェラーゼを in vitro で合成し、反応液 20µl を HaloLink™ Resin 50µl に添加した。結合の特異性を評価するため、タグを付加していないルシフェラーゼを発現させ、陰性対照としてレジンを添加した。添加した材料 (in vitro 転写 / 翻訳反応液) の酵素活性を 100% とした場合、レジン表面の酵素活性として 60% 回収することに成功した。

Purification

標的タンパク質の精製とタグの切断 / 除去

高効率のタンパク質精製ストラテジー

HaloTag® Protein Purification System は、大腸菌などで発現させた組換えタンパク質の発現量および可溶性を増加させる新規なタグである HaloTag® の融合タンパク質の精製用にデザインされています。HaloTag® テクノロジーでは、目的のタンパク質を効率的、特異的に捕らえ、共有結合により捕捉することができます。TEV プロテアーゼを用いることで HaloLink™ Resin より標的タンパク質を切り離すことができ、TEV プロテアーゼの N 末端には HQ タグが付加されているので HisLink™ Resin を用いて容易にプロテアーゼを除去することもできます。HaloTag® タンパク質をコードし、大腸菌での発現に適したベクターは、pFN18A HaloTag® T7 Flexi® Vector (カタログ番号 G2751) および pFN18K HaloTag® T7 Flexi® Vector (カタログ番号 G2681) です (キットには付属しません)。

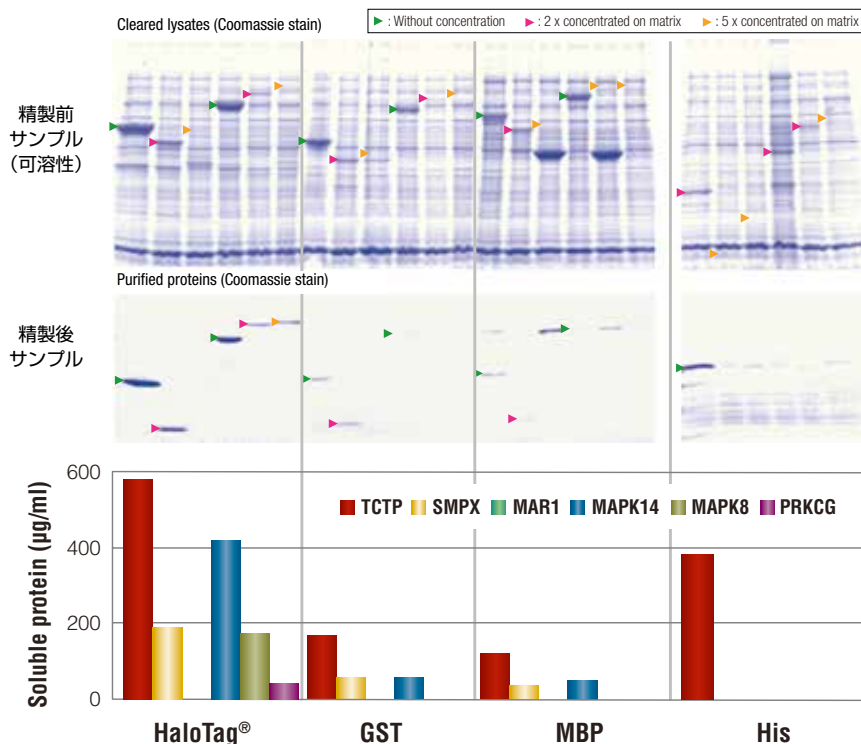


HaloTag® Purification System の簡便な操作ステップ

全ての HaloTag® ベクターにはリンカー配列として TEV プロテアーゼ認識サイト [ENLYFQ ↓ G] をコードする配列が含まれるため、タグを含まない標的タンパク質のみの精製が容易に行えます。His タグと同様の金属結合タグである HQ タグ (HQHQHQ) が付加された TEV プロテアーゼは、HisLink™ レジンにより除くことができます。

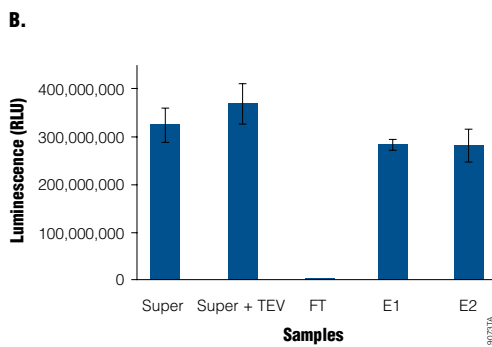
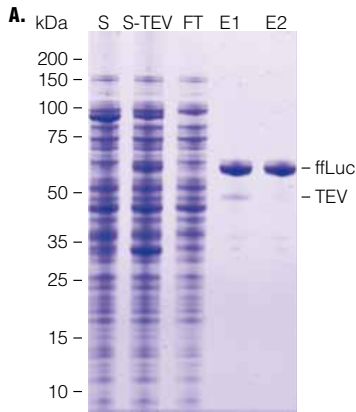
優れた切断効率

新しい HaloTag® タンパク質は、プロテアーゼの切断効率を向上させるためのリンカーが付加されています。



汎用されるアフィニティータグと HaloTag® による融合タンパク質の回収比較

精製の困難なタンパク質 6 種類について、各アフィニティータグを用いて精製を行った後、CBB 染色し、可溶性タンパク質の回収量を比較した。

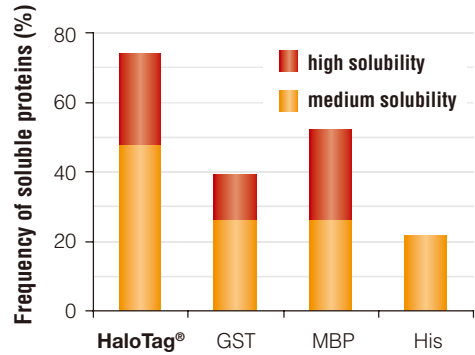


ホタルルシフェラーゼの定量的な回収

HaloTag®-ffLuc を発現する大腸菌 LB 培養液 50ml よりライセート上澄み 5ml を調製し (S)、HaloLink™ Resin 1ml を添加した。ルシフェラーゼの活性は TEV を添加しても失活しないこと (S-TEV)、また効率よくレジンに捕捉できたことが示された (FT)。室温で 1 時間かけて標的タンパク質を捕捉後 HaloLink™ Resin をカラムに添加し、HT バッファー 20ml で洗浄した。cleavage solution 1ml をカラムに添加し、室温で 1 時間 TEV プロテアーゼで消化した。標的タンパク質を HT バッファーで溶出し、溶出液 2ml を回収した (E1)。最後に TEV プロテアーゼを除去するために HisLink™ Resin 50μl を加え室温で 20 分間インキュベーションした (E2)。Lanes S; S-TEV および FT は菌体培養液 10μl に相当し、E1 および E2 は 25μl に相当。活性測定では全てのサンプル (S, S-TEV, FT, E1 および E2) を 1x Glo Lysis Buffer で 100 倍に希釈し、50μl を等量の Luciferase Assay Reagent (カタログ番号 E1501) と混和した。室温で 5 分間 静置し発光を測定した。E1 および E2 のデータは S および S-TEV サンプルからの濃縮係数 2.5 で補正した。

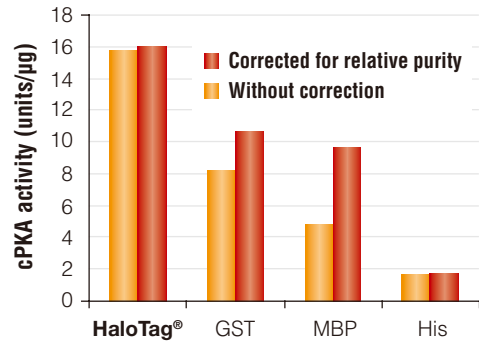
各種 機能性タグの比較

特長	HaloTag®	GST	MBP	His	GFP
サイズ	33kDa	26kDa	40kDa	0.85kDa	27kDa
可溶性	高	高	高	中	—
リガンド親和性	高: リガンド特異的な共有結合	中: アフィニティー (グルタチオン)	中: アフィニティー (アミノ酸)	低: メタルアフィニティー (IMAC)	—
検出	Coomassie, ウェスタン, 蛍光リガンド	Coomassie, ウェスタン, 発色アッセイ	Coomassie, ウェスタン	Coomassie, ウェスタン, ゲル内染色	Coomassie, ウェスタン, 蛍光
その他の用途	タンパク質相互作用, 細胞イメージング	タンパク質相互作用	タンパク質相互作用	タンパク質相互作用	細胞イメージング



発現融合タンパク質の可溶性比較

難溶性タンパク質を含む 100 種類のタンパク質の中で可溶性タンパク質として回収された割合を示す。high solubility: >100μg/ml, medium solubility: <100μg/ml



発現融合タンパク質の活性比較 (cPKA 活性)

PKA の活性触媒領域 (cPKA) を各タグに融合させたものを、大腸菌を用いて発現させた。各タグを用いてプルダウンにより精製したタンパク質の活性を測定した (オレンジ)。それぞれ精製度が異なるため (HaloTag®: 99%, GST: 77%, MBP: 50%, His: 98%)、活性を精製度で補正した (赤)。HaloTag® 融合タンパク質は最も精製度が高く、なおかつ高い酵素活性があった。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
製品案内 システム			
HaloTag® Protein Purification System Sample Pack	50ml culture 2.5 回分	G6270	85,000
HaloTag® Protein Purification System	50ml culture 25 回分	G6280	320,000
関連製品			
Single Step (KRX) Competent Cells, >10 ⁸ cfu/ug	20 × 50μl	L3002	37,000
ProTEV Plus	1,000unit	V6101	22,000
	8,000unit	V6102	157,000

内容: G6270

- HaloLink™ Resin (10ml [25% slurry])
- HisLink™ Protein Purification Resin (10ml [50% slurry])
- TEV Protease for use with HisLink™ Resin (200μl)

Related Products

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
無細胞発現関連製品			
in vitro 転写 / 翻訳 (ウサギ網状赤血球ライセート)			
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	5 回分	L1171	19,000
	40 回分	L1170	72,000
TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System	5 回分	L2081	21,000
	40 回分	L2080	83,000
in vitro 転写 / 翻訳 (小麦胚芽エクストラクト)			
TNT® SP6 High-Yield Protein Expression System	10 回分	L3261	23,000
	40 回分	L3260	80,000
in vitro 転写 / 翻訳 (昆虫細胞 Sf21 エクストラクト)			
TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	10 回分	L1101	24,000
	40 回分	L1102	87,000
in vitro 転写 / 翻訳 (E.coli S30 ライセート)			
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	8 回分	L1115	27,000
	24 回分	L1110	69,000
蛍光標識システム			
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	40 回分	L5001	53,000
イメージング関連製品			
GFP ベクター			
Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP Vector	20µg	E6421	92,000
神経細胞マーカー抗体			
Anti-βIII Tubulin mAb	100µg	G7121	55,000

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
タンパク質精製関連製品			
HisTag 精製レジン			
HisLink™ Protein Purification Resin	5ml	V8823	6,000
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles	9ml	Z5481	21,000
	25ml	Z5482	58,000
プロテアーゼ			
ProTEV Plus	1,000unit	V6101	22,000
	8,000unit	V6102	157,000
タンパク質分析関連製品			
プロテアーゼ			
Sequencing Grade Modified Trypsin	100µg	V5111	14,000
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	100µg	V5280	18,000
Chymotrypsin, Sequencing Grade	25µg	V1061	11,000
Endoproteinase Lys-C, Sequencing Grade	5µg	V1071	31,000
Asp-N, Sequencing Grade	2µg	V1621	21,000
化学発光検出			
ECL Western Blotting Substrate	250ml	W1001	19,000
	500ml	W1015	31,000

ライセンスについて : Monster Green® (GFP) を研究用途以外 (営利目的等) でご使用される場合、ライセンス契約の必要があります。詳細については弊社までご連絡ください (www.promega.co.jp/license/)

On-Line Support

技術サポート

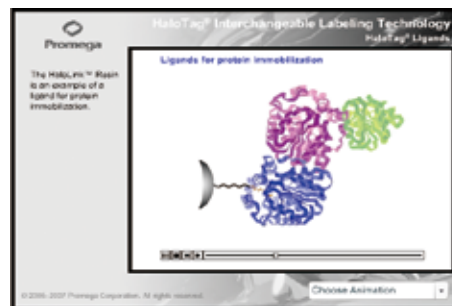
Q&A, ベクター選択ガイド, Citation, etc...

弊社ホームページより HaloTag® の原理、Q&A、Citation など、最新の情報をご覧いただけます。

- ・ Q&A
- ・ ベクター選択ガイド
- ・ アニメーション
- ・ Citation (文献)
- ・ 製品情報
- ・ Flexi® HaloTag® ORF クローン注文サイト

詳細については以下のサイトをご覧ください。

www.promega.co.jp/halotag/



HaloTag® の解説アニメーション

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本 社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2010年9月現在のものであり予告なしに変更することができます。

販売店：