

HaloTag®を用いたタンパク質発現

—発現コロニーの迅速な検出法—

HaloTag®は、これまでのタンパク質性の Tag に比較して、融合タンパク質として発現させた場合に、可溶性が高く、また抗体などを使わずに蛍光リガンドを使って簡便に検出することができるという特徴があります。またプルダウンの実験、タンパク質の精製など幅広い用途でご利用いただけます。

大腸菌を用いた、Tag 融合タンパク質を発現させる場合、多くの場合、目的タンパク質をコードするプラスミドを導入後、最も高発現のコロニーを選択し、それから大量培養などを行い、精製ステップやプルダウンの実験の材料を調製します。その際、LB プレート上のコロニーをピックアップし、小スケールで培養し、さらに電気泳動(SDS-PAGE)、Coomassie(CBB)染色し発現量を確認します(通常法)。しかし、HaloTag®融合タンパク質の発現は蛍光リガンドを使って確認できるので、小スケールで培養せずに LB プレートの上で高発現コロニーを選択できます。

[実験までのステップ]

(通常法)

形質転換→コロニーの確認→小スケール培養→ライセートの調製→SDS-PAGE→CBB→大スケール培養→実験

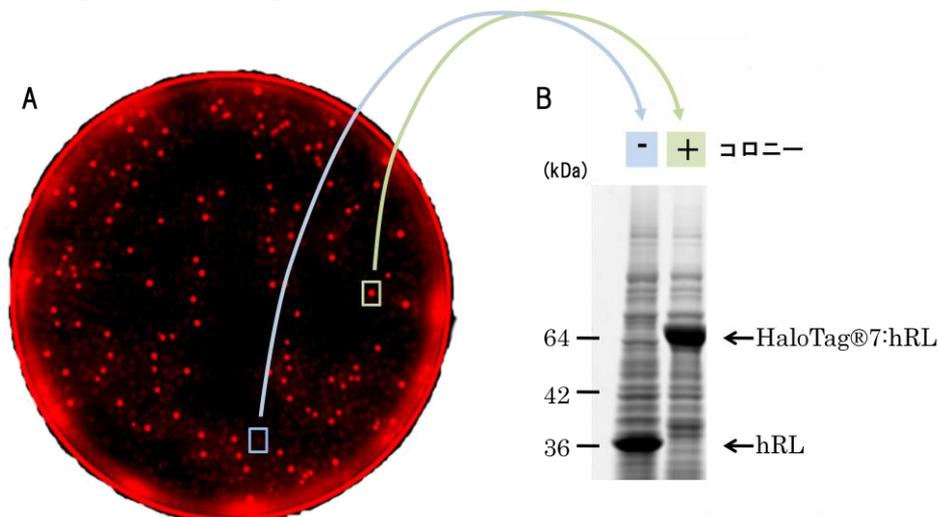
(HaloTag を使用する場合)

形質転換→コロニーの確認/イメージスキャナーでの発現確認→大スケール培養→実験

コロニーを直接選択できるため、小スケール培養(一晚)+抽出液の調製(0.5 時間)+電気泳動(2 時間)+染色のステップ(1 時間)を省略することができます。さらにコストは下記のプロトコル例では、必要な蛍光リガンドの量は一枚のプレートあたり 0.1 μ l(¥250)と計算されますので、蛍光イメージリーダー(Typhoon(GE ヘルスケア), FLA3000(富士フィルム)等)を利用できるのであれば非常に有用な方法です。

[プロトコル例]

50nM HaloTag® TMR ligand および 0.25% rhamnose を含む LB Agar プレートに HaloTag®:hRL(改変型ウミシイタケルシエフェラーゼ遺伝子)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, Typhoon9400)することにより、HaloTag®融合タンパク質が発現しているコロニーが検出される(下図 A)。本当にタンパク質が発現しているか、コロニー(+; 蛍光あり、-; 蛍光なし)からライセートを調製し、電気泳動、Coomassie 染色を行い、発現タンパク質を確認した(下図 B)。



何か不明な点等ございましたら、お問い合わせください。

問い合わせ先:

プロメガテクニカルサービス部

Tel: 03-3669-7980/ Fax: 03-3669-7982

E-mail: prometec@jp.promega.com