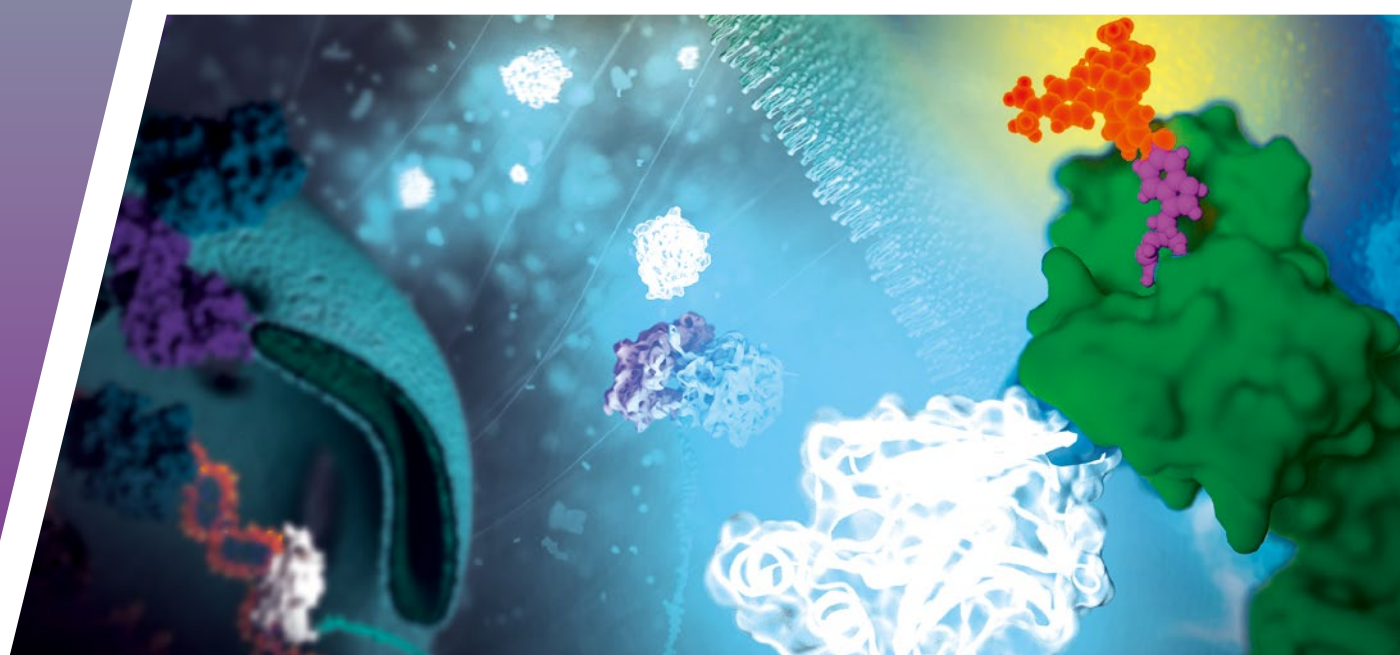


タンパク質レポーター テクノロジーガイド

生きた細胞で見るタンパク質ダイナミクス

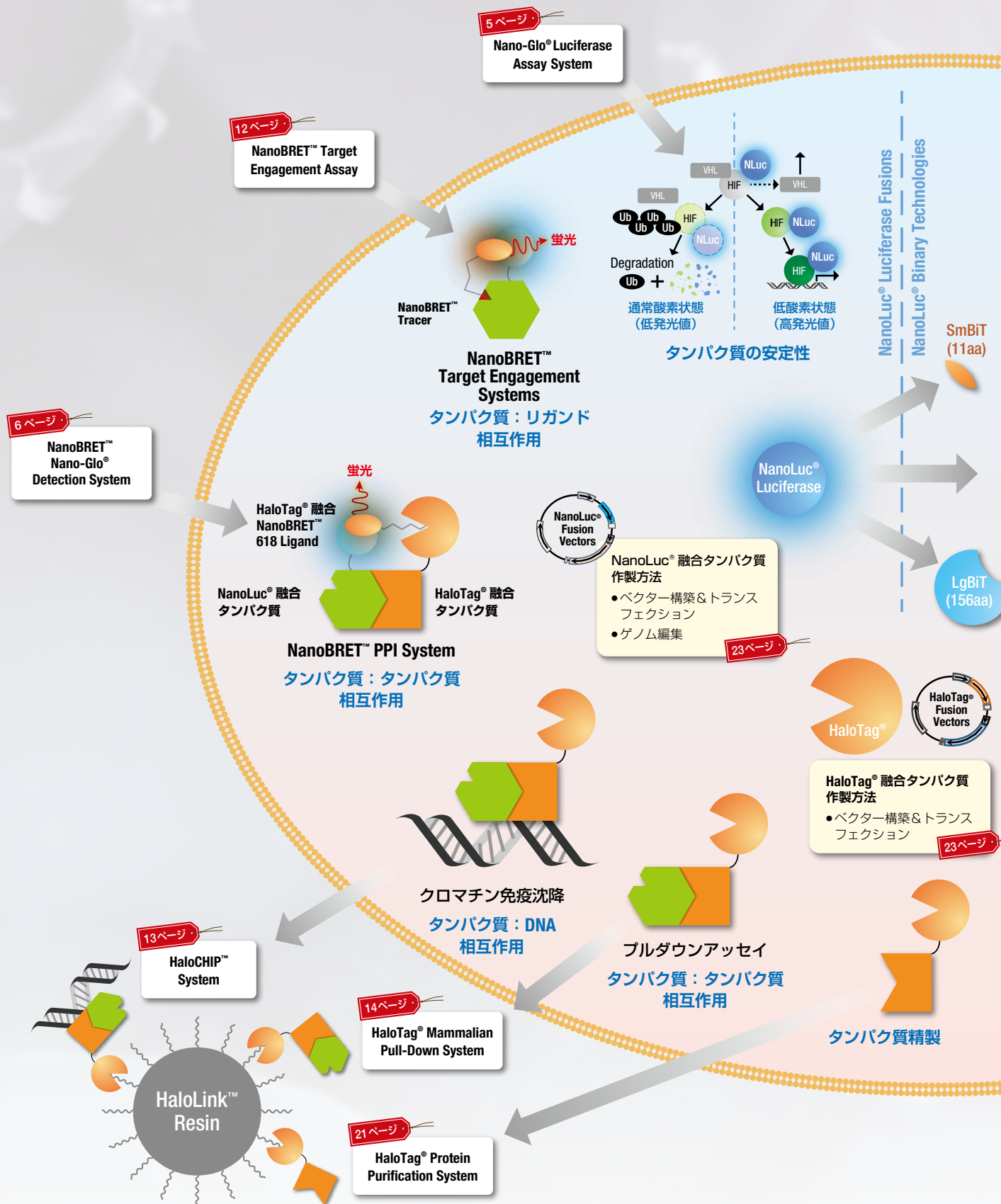


Contents

イントロダクション	2	HaloTag® アプリケーション	13
NanoLuc® アプリケーション	5	・分子間相互作用	13
・タンパク質の安定性	5	・イメージング	16
・タンパク質間相互作用	6	・タンパク質精製	21
・タンパク質発現検出 (HiBiT)	10	タグ融合タンパク質の発現 (How To)	23
・タンパク質-リガンド相互作用	12		

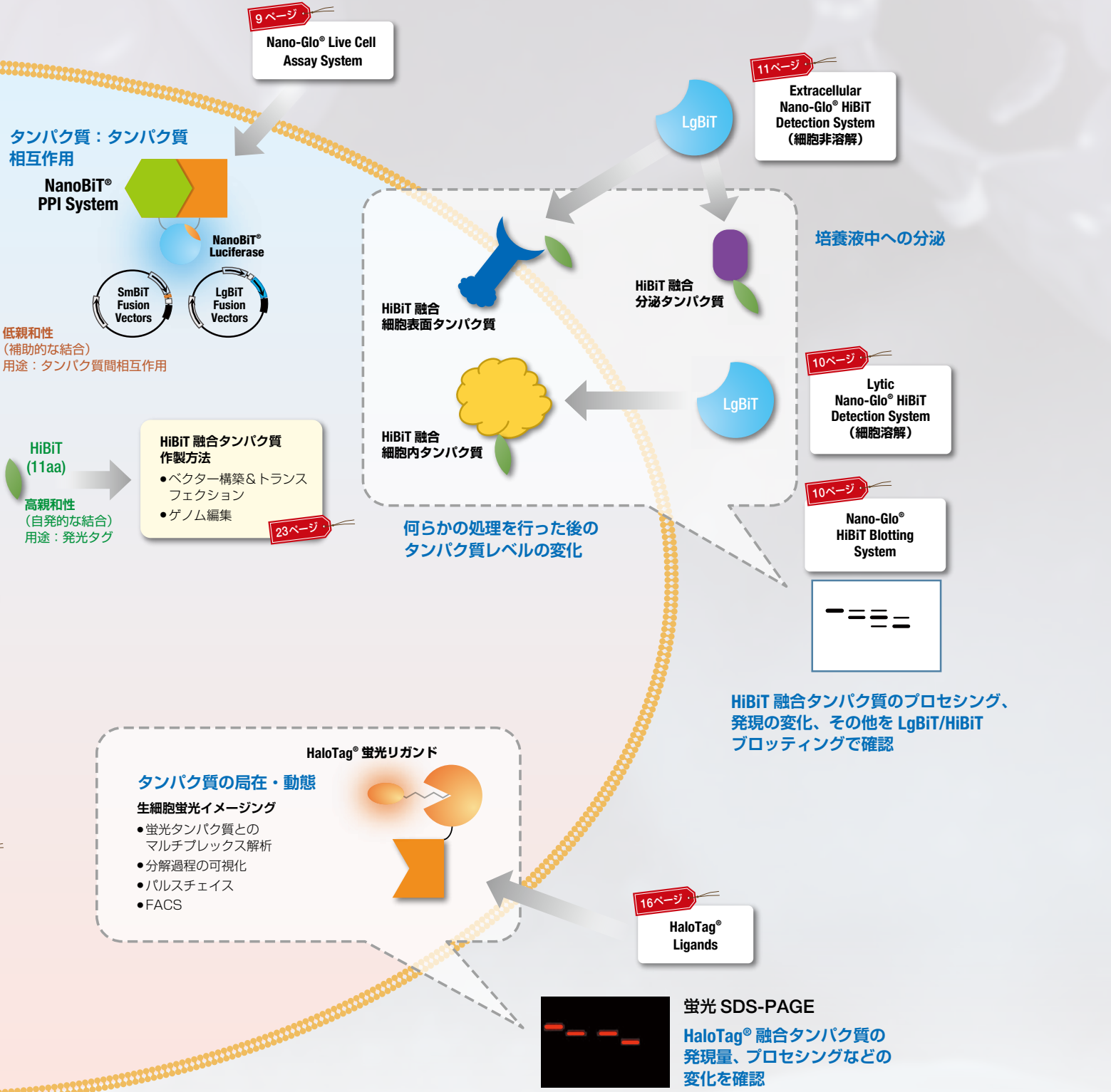
タンパク質のふるまいを、生きた細胞でありのままに

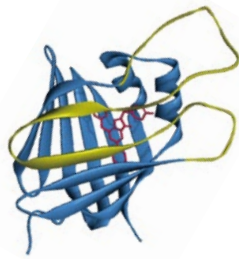
近年は分析手法の著しい進歩により生体分子を網羅的に解析する手法（オミックス解析）がより身近なものになり、生命現象を理解するための新たなアプローチとなっています。一方でこれらの網羅的なデータから生物学的に意味のある解釈を導くには関連するタンパク質の機能を知る必要がありますが、まだその多くが解明されていないのが現状です。そのギャップを埋めるための新たなタンパク質機能解析法も数多く開発され、高度化された質量分析あるいは表面プラズモン共鳴法（SPR）などにより多くの知見が得られてきました。しかし、その多くは細胞から取り出したタンパク質を解析する手法であり、より生体に近い生きた細胞内で真のタンパク質機能をとらえたいという



捉えるために

ニーズも高まっています。NanoLuc[®] および HaloTag[®] テクノロジーは生きた細胞内のタンパク質をより“ありのまま”に検出することを目的に開発されたタグテクノロジーで、GFP や His タグといった従来のタグに比べ検出感度が高く（生体内レベルの分子数でも検出可能）、より分子量の小さなタグ（HiBiT は 11 アミノ酸で標的タンパク質への影響は最小限）を利用することで本来のタンパク質機能を解析することができます。このガイドでは NanoLuc[®] および HaloTag[®] テクノロジーを基盤とした高感度タンパク質検出、ライブセルイメージングから CRISPR によるゲノムへの導入など多様なアプリケーションをご紹介します。





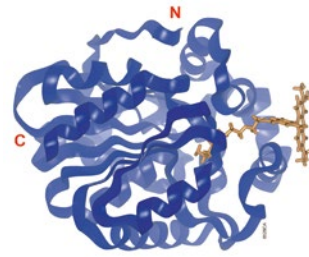
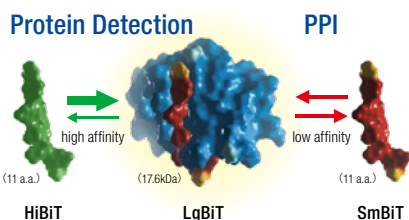
由来

深海エビ（トゲオキヒオドシエビ [*Oplophorus gracilirostris*]）由来のルシフェラーゼであり、触媒活性のある 19kDa のサブユニットを改変して作製。

ホタルやウミシイタケ由来のルシフェラーゼより約 100 倍以上明るく、さらに本来の基質である Coelenterazine をもとに作製した Furimazine という新しい基質を用いることで発光強度と安定性を高めました。この強力な発光により BRET の性能は飛躍的に高まり、これを応用したバイオセンサーの作製も行われています。

2 分子相補システム (HiBiT システム、NanoBiT® アッセイシステム)

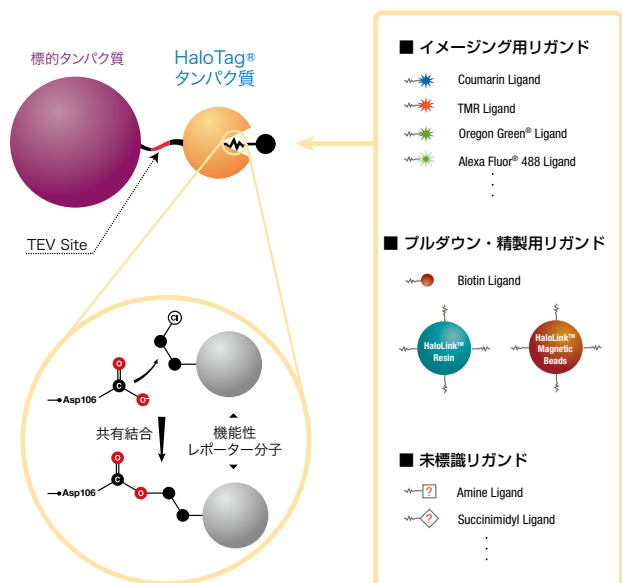
NanoLuc® ルシフェラーゼをわずか 11 アミノ酸のペプチド断片 (HiBiT または SmBiT) とそれに結合する相補的な約 18kDa の断片 (LgBiT) に分け、それらが可逆的に結合して活性をもつ NanoLuc® を再構成することを利用した目的タンパク質の動態解析を行うシステムです。LgBiT と最も親和性の高いペプチド断片を HiBiT、親和性の低いペプチド断片を SmBiT と呼びます。これらはタンパク質タグとして目的タンパク質と融合することで、目的タンパク質の検出あるいはタンパク質間相互作用検出 (NanoBiT®) が可能です。



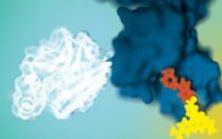
由来

真性細菌 *Rhodococcus rhodochrous* 由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素 (DhaA) に改変を加えて作製。

活性中心付近でクロロアルキル鎖をもつ低分子リガンドと迅速・特異的に共有結合し、反応後リガンドは解離しません。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、コンストラクトを変えずに精製や生細胞イメージングなど幅広いタンパク質解析が実施できます。



	NanoLuc® Luciferase	NanoBiT® PPI System	HiBiT	HaloTag®
概要	- 深海エビ由来ルシフェラーゼ 19kDa - ホタルルシフェラーゼの約 100 倍の明るさ	- 大小のサブユニットに分かれた NanoLuc® 17.6kDa + 11 アミノ酸 - ホタルルシフェラーゼの約 30 倍程度の明るさ - LgBiT との親和性の違いで用途が異なる	- 発現量の変動モニタリングなど、融合タンパク質の定量を重視する実験 - ウイルス感染、細胞融合	- 微生物由来ハロアルカン脱ハロゲン酵素 33kDa - 各種リガンドと共有結合
特長	強力な BRET のシステムがバイオセンサーなどに応用可能	高い定量性 生細胞でのタンパク質間相互作用がルミノメーターだけで測定可能	分子量が小さいためゲノム編集に最適。内在遺伝子の発現レベル解析に理想的。	包括的解析ツール コンストラクトを変えずに様々な実験ができる。融合タンパク質は可溶性が向上する。蛍光リガンドが頑健で褪色しづらい。
使用例 (文献事例を含む)	- BRET を利用したバイオセンサーの作製 - タンパク質とリガンドの相互作用検出 - 発光イメージング	タンパク質間相互作用のリアルタイムモニタリング		- 一分子蛍光イメージング - In vivo プルダウンアッセイによるタンパク質複合体解析 - 結晶構造解析のための膜タンパク質精製



タンパク質の安定性：細胞溶解を伴う発光測定

NanoLuc® Stability Sensor

NanoLuc®

■細胞内の HIF1A、NRF2 タンパク質のターンオーバーを測定

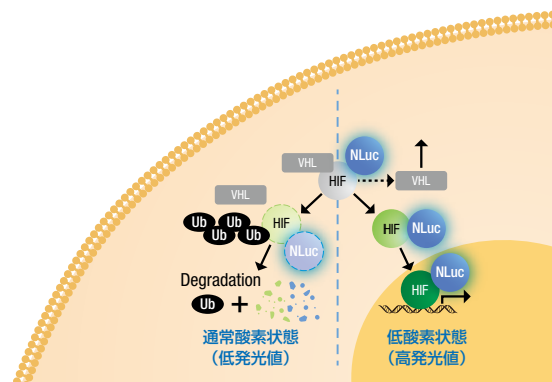
タンパク質のターンオーバーのスピードは、発がんやストレス応答に関わる多くのシグナルタンパク質を制御しています。下流の転写イベントが活性化した結果として細胞の状態が変化し、これにตอบสนองしてタンパク質の安定化とそれに続く蓄積が起こります。NanoLuc® Stability Sensor は ready-to-use のベクターシステムであり、NanoLuc® ルシフェラーゼレポーターの特長を活かし、キーとなる2つのシグナルタンパク質 HIF1A と NRF2 の安定性の検討を可能にしました。

HIF1A Vector System、NRF2 Vector System

HIF1A は低酸素、NRF2 は酸化ストレスに対する細胞の応答を仲介するシグナルタンパク質です。HIF1A Vector System では細胞内 HIF1A タンパク質レベルを、NRF2 Vector System では細胞内 NRF2 タンパク質レベルを簡便に定量し、その動態を検討することが可能です。

HIF1A タンパク質または NRF2 タンパク質は NanoLuc® を C 末端に融合し、CMV プロモーター下で発現します。どちらのシステムにも細胞内での融合タンパク質の発現量を調節するための Transfection Carrier DNA が付属します。

※ NRF2 Vector System にのみ、細胞内 NRF2 レベルを適切に制御するための pKEAP1 発現ベクターも含まれます。



細胞内における HIF1A レベルの検出システム

製品名	サイズ	カタログ番号
ベクター		
pNLF1-HIF1A [CMV/neo] Vector	20 µg	N1381
pNLF1-NRF2 [CMV/neo] Vector	20 µg	N1391

NanoLuc® 融合タンパク質発現クローンについては以下を参照ください

www.promega.co.jp/flexinanoclone/

製品名	サイズ	カタログ番号
検出試薬		
	10 ml	N1110
	100 ml	N1120
Nano-Glo® Luciferase Assay System	10 × 10 ml	N1130
	10 × 100 ml	N1150

発現量の測定：SDS-PAGE

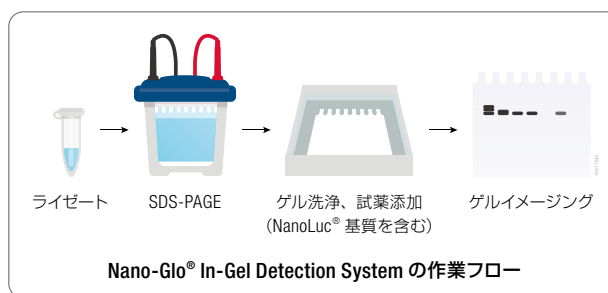
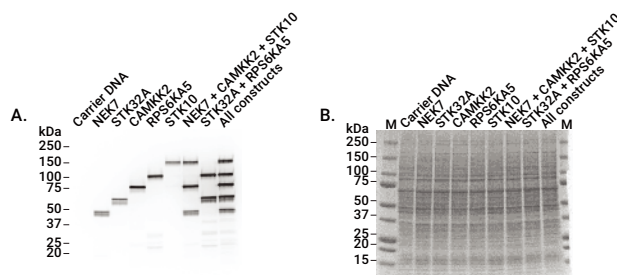
Nano-Glo® In-Gel Detection

NanoLuc®

■ブロッティング不要、ゲルからダイレクトに検出

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した NanoLuc® 融合タンパク質をイムノブロッティングを行わずに検出します。Nano-Glo® In-Gel Detection Reagent とインキュベーションした後に直接ゲルをイメージングします。ネイティブ PAGE の場合、ゲルを検出試薬とともにインキュベーションし、15 分以内にイメージを取得できます。変性 SDS-PAGE の場合、検出前に SDS を除去して NanoLuc® ルシフェラーゼをリフォールディングさせるために 25% イソプロパノールで 2 回洗浄し、次に水で 2 回洗浄します。

NanoLuc® ルシフェラーゼの感度ならば、Nano-Glo® In-Gel Detection System で可視化するために過剰発現させる必要はありません。



Nano-Glo® In-Gel Detection System の作業フロー

一過性発現のためトランスフェクションを行った HEK293 細胞の SDS-PAGE

5 種類の NanoLuc® 融合タンパク質 (NEK7, STK32A, CAMKK2, RPS6KA5, STK10) を HEK293 細胞で一過的に発現させた。CMV をプロモーターとする発現コンストラクトはキャリア DNA で希釈し、細胞にトランスフェクションする際に発現レベルを低下させた。一晩発現させた後、10 µl の細胞ライゼートでゲル電気泳動を行った。パネル A. NanoLuc® 融合タンパク質を Nano-Glo® In-Gel Detection System で可視化した。試薬添加後直ちに 30 秒露光し撮影を行った。パネル B. 同じゲルで Coomassie® 染色を行った像。

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® In-Gel Detection System	100 ml	N3020

タンパク質 - タンパク質相互作用の定量：BRET (生物発光共鳴エネルギー移動)

生細胞
アッセイ

NanoBRET™

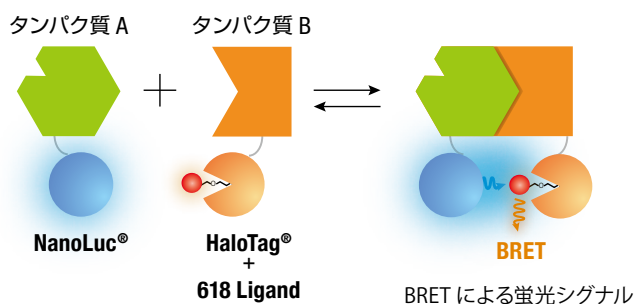
NanoLuc®

HaloTag®

■ 生細胞リアルタイム PPI モニタリング

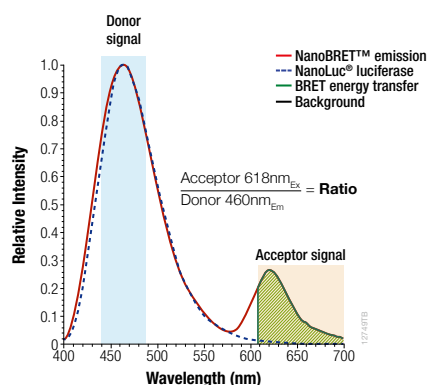
生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence resonance energy transfer) は、生細胞におけるタンパク質間の直接的な相互作用を検出する手法として幅広く用いられています。類似の原理である FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を用いた手法に比べ、励起光を当てて必要がないので、バックグラウンドがきわめて低く、励起光による細胞へのダメージを最小限に抑えることができます。

発光源に高レベル発光酵素 NanoLuc® を用いた NanoBRET™ system は従来のウミシイタケルシフェラーゼを用いた BRET に比べ、より高い発光値と安定性、強固性を持ち、また HaloTag® NanoBRET™ 618 fluorescent Ligand で標識された HaloTag® タンパク質をエネルギー転移アクセプターとして利用することで従来の BRET に比べ優れたシグナル / バックグラウンド比が得られます。生細胞でのリアルタイム解析、及びハイスループットスクリーニングに最適です。



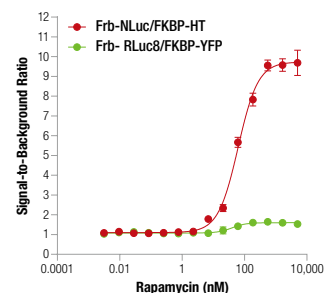
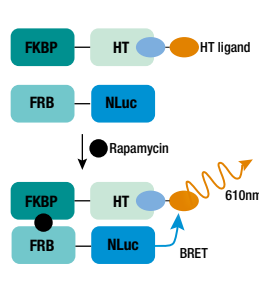
NanoBRET™ システムの原理

ベクターを導入した細胞内で発現した **タンパク質 A : NanoLuc®** (青色) 融合タンパク質と **HaloTag®** (オレンジ色) に低分子蛍光 618 リガンドが結合した **タンパク質 B : HaloTag®** 融合タンパク質が近接すると BRET が起こる。低分子蛍光 618 リガンドはタンパク質発現後に細胞へ添加する細胞透過性の蛍光試薬。



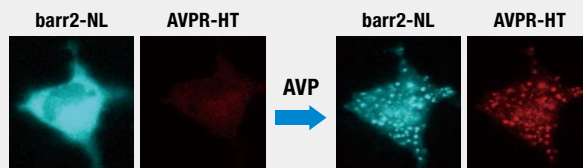
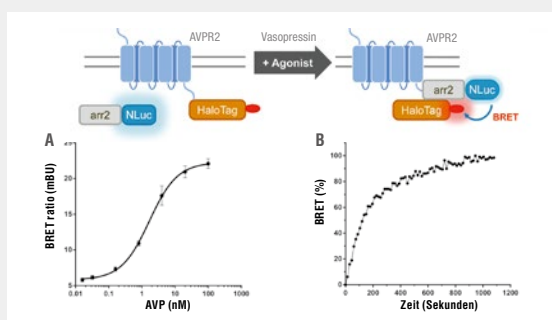
BRET に最適なスペクトルの分離とシグナル強度

新しい発光酵素 (NanoLuc®: ピーク波長 460 nm) と蛍光リガンド (618 Ligand: ピーク波長 618 nm) により、シグナルの増強とスペクトルの分離が大幅に改善され、従来の FRET/BRET では得られなかったシグナル / ノイズ比を実現



従来の BRET アッセイと NanoBRET™ のパフォーマンス比較

HaloTag® 618 Ligand が結合した FKBP-HaloTag® と FRB-NanoLuc® 存在下でラパマイシンを加えると 2 つの融合タンパク質が相互作用を起こし、BRET を生じる (左図)。FKBP-YFP と FRB-RLuc8 による BRET システムとのデータ比較



NanoBRET™ による細胞イメージング

アルギニンバソプレシン受容体 2 (AVPR2) と β -アレスチンとの相互作用の BRET 解析。(撮影は Olympus LV200を使用)

■ NanoBRET™ を始めるには

まず標的タンパク質に NanoLuc® と HaloTag® を付加しますが、最も BRET Ratio の高いコンストラクトを得るために 8 種類のコンストラクトを用意することを推奨します。弊社では NanoBRET™ コンストラクトの受託製造も承っており、確実なアッセイの実施をサポートしています。

NanoBRET™ コンストラクション受託サービスの詳細については、以下のサイト、または弊社までお問合せください。

 www.promega.co.jp/nanoppiconst/

受託サービスを利用する場合の NanoBRET™ 初期検討フロー

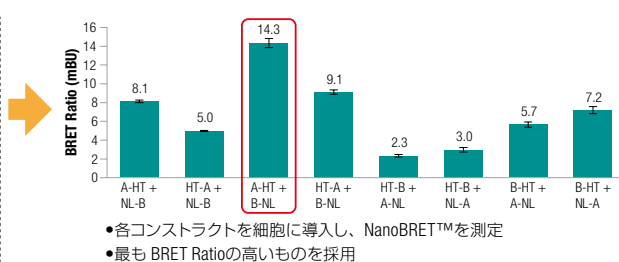
- ① 遺伝子ペア選択
- ② ウェブ申込み
- ③ コンストラクトセット作製
- ④ 納品
- ⑤ ベクターを細胞に導入
- ⑥ NanoBRET™ 測定

受託製造
いたします

製品名	サイズ	納期
NanoBRET™ 検出用クローンセット	8 種類	約 1 カ月

※本サービスはサブクローニングのみであり、発現チェック等は行っておりません。
予めご了承下さい。

受託サービスで作製可能



製品名	サイズ	カタログ番号
クローニングセット		
ご希望のタンパク質遺伝子を、複数の制限酵素サイトより選択してクローニングする標準的な MCS システムと簡便な移し換えが可能な Flexi クローニングが可能な Flexi システムからお選びいただけます。		
NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 セット	N1811
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 セット	N1821
コントロール		
NanoLuc®-HaloTag® 融合タンパク質の発現ベクター Positive Control と p53-HaloTag® と NanoLuc®-MDM2 の各融合タンパク質を発現するベクターセット (PPI Control Pair)		
NanoBRET™ Positive Control	2 × 20 µg	N1581
NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)	2 × 20 µg	N1641
検出試薬		
ドナー側の NanoLuc 検出用の発光基質とアクセプター側の HaloTag® 検出用の蛍光リガンドとのセット		
	200 回分	N1661
NanoBRET™	1000 回分	N1662
Nano-Glo® Detection System	10000 回分	N1663



■ 推奨測定機器

GloMax® Discover

NanoBRET™ の測定に完全対応のマルチモードリーダー（発光、蛍光、吸光 [UV/可視光]、BRET、FRET）です。フィルターによる 2 色発光測定、カインेटクス測定にも対応します。

製品名	サイズ	カタログ番号
測定機器		
GloMax® Discover System (本体)	1 台	GM3000

タンパク質 - タンパク質相互作用の定量 : NanoLuc® 2 分子相補システム

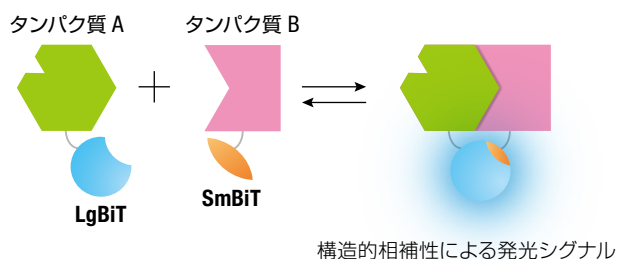
生細胞
アッセイ

NanoBiT®

NanoBiT®

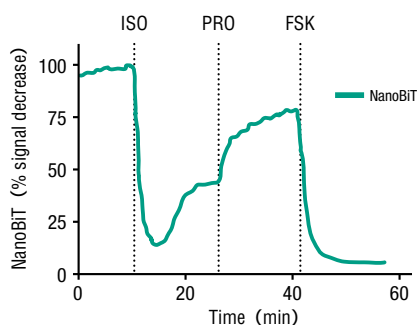
■ ルミノメーターでできる生細胞リアルタイム PPI モニタリング

NanoLuc® Binary Technology (NanoBiT®) は生細胞内でタンパク質間の相互作用を構造的な相補性を利用して検出します。NanoLuc® ルシフェラーゼをベースに作成された Large BiT (LgBiT) および Small BiT (SmBiT) の各サブユニットは構造的な安定性を高め、親和性が低くなるように最適化されています。目的タンパク質と LgBiT または SmBiT との融合体を哺乳動物細胞内で発現させ、目的のタンパク質が相互作用すると構造的相補性が促進され明るい発光酵素が形成されます。細胞透過性の基質を添加すると生細胞でタンパク質の動態をリアルタイムで観察することができます。



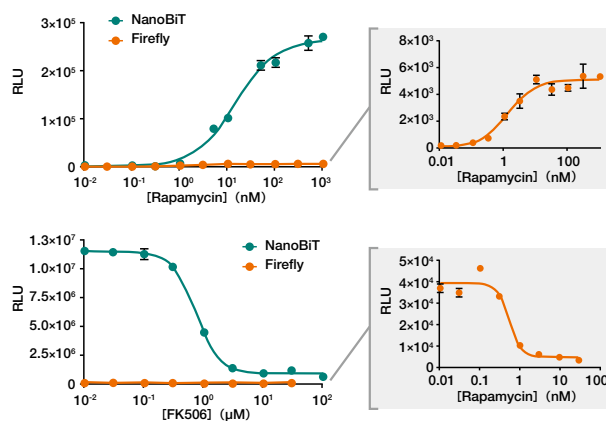
NanoBiT® システムの原理

ベクターを導入した細胞内で発現したタンパク質 A: LgBiT (青色の大きな断片) 融合タンパク質とタンパク質 B: SmBiT (オレンジ色の小さな断片) 融合タンパク質が結合すると発光酵素が再構成される。



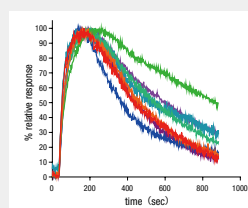
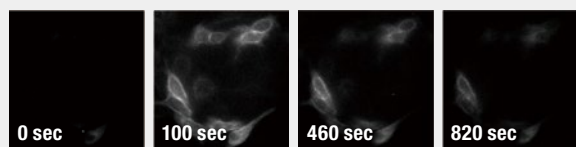
タンパク質間相互作用のダイナミクスをモニタリングできる NanoBiT® の可逆性

SmBiT-CA:LgBiT-R2A (PKA 触媒サブユニットあるいは調節サブユニットと NanoBiT® 断片の融合タンパク質) を発現する HEK293 細胞にイソプロ テレノール (ISO)、プロブラノール (PRO) または フォルスコリン (FSK) で順次刺激してタンパク質間相互作用を検出した



NanoBiT® とスプリットホタルルシフェラーゼの応答性の比較

NanoBiT® タグまたはスプリットホタルルシフェラーゼタグを融合した FKBP および FRB を発現する HEK293 細胞にラパマイシン (上) または FK506 (下) を添加した



シングルセルレベルでの ADRBR-114 / β - アレスチン 相互作用の生物発光イメージング
HeLa 細胞に PPI 検出用の発現ベクターをトランジェントにトランスフェクションし、イソプロテレノールで処理した。グラフの線は細胞 1 個ごとに色分けした。(撮影は Olympus LV200 を使用)

製品名	サイズ	カタログ番号
クローニングセット		
ご希望のタンパク質遺伝子を、複数の制限酵素サイトより選択してクローニングする標準的な MCS システム、簡便な移し換えが可能な Flexi クローニング対応の Flexi システムからお選びいただけます。		
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 セット	N2014
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 セット	N2015
コントロール		
FKBP, FRB の各融合タンパク質を発現するベクターセット		
NanoBiT® PPI Control Pair (FKBP, FRB)	2 × 20 μg	N2016
検出試薬		
NanoBiT® 検出用の発光基質試薬		
	100 回分	N2011
Nano-Glo® Live Cell Assay System	1,000 回分	N2012
	10,000 回分	N2013

■ NanoBiT® を始めるには

標的タンパク質に LgBiT と SmBiT を付加しますが、NanoBRET™ と同様に、アッセイに最適なコンストラクトを得るために 8 種類のコンストラクトを用意することを推奨します (7 ページ参照)。

弊社では NanoBiT® コンストラクトの受託製造も承っており、確実なアッセイの実施をサポートしています。

NanoBiT® コンストラクション受託サービスの詳細については以下のサイト、または弊社までお問合せください。

www.promega.co.jp/nanoppiconst/

製品名	サイズ	納期
NanoBiT® 検討用クローンセット	8 種類	約 1 カ月

※サービスはサブクローニングのみであり、発現チェック等は行っておりません。予めご了承下さい。

■ NanoBiT® 推奨測定機器



GloMax® Navigator (ルミノメーター)

超高感度、ワイドダイナミックレンジな発光測定専用機器です。微弱な生物発光から強い発光までを検出でき、NanoBiT® をはじめとした様々な生物発光アッセイのシグナルを確実に捉えます。

製品名	サイズ	カタログ番号
測定機器		
GloMax® Navigator System (本体)	1 台	GM2000

NanoBiT® と NanoBRET™ の特性比較

特性	NanoBRET™	NanoBiT®
方式	生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET)	発光酵素断片の相補性
検出対象	近接度	直接的な相互作用
タグの大きさ	小さい 20 kDa (NanoLuc®) と 30 kDa (HaloTag®)	非常に小さい 11 アミノ酸 (SmBiT) と 18 kDa (LgBiT)
データ	2 波長の比率 (低 %CV)	RLU (相対発光強度)
試薬添加回数	2	1
アッセイ	BRET 対応ルミノメーター (適合フィルター要)	ルミノメーター (フィルター不要)
検出機器	発光イメージングシステム (Olympus LV200 など) : 相互作用前後を観察可能	発光イメージングシステム (Olympus LV200 など) : 複合体のみ観察可能
可逆性 (キネティックアッセイ可)	○	○
製品形態	キット (100 種類以上)、クローニングベクター、検出試薬 ベクター構築サービスもご提供します。	クローニングベクター、検出試薬
ライセンス費用 (企業を含む)		試薬の購入のみ
その他	HaloTag® 側を使ったブルダウン	

局在解析：生細胞生物発光イメージングと長時間発光基質

生細胞
アッセイ

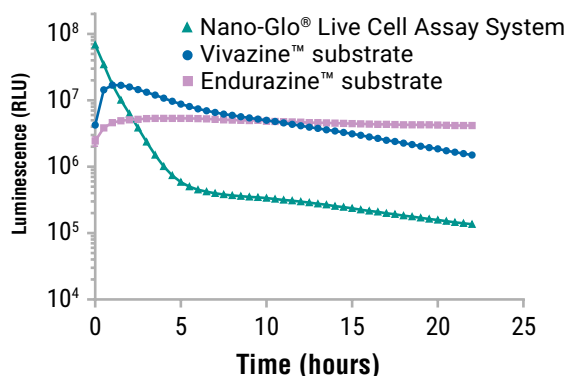
Nano-Glo® Live Cell Assay, Endurazine™, Vivazine™

NanoLuc®

NanoBiT®

■ 生細胞リアルタイムモニタリング用 NanoLuc® 基質

Nano-Glo Live Cell Assay System は生細胞のまま発光を測定する 1 液添加方式の非細胞溶解性の試薬です。NanoLuc® および NanoBiT® の検出の他、NanoBRET™ や NanoLuc® 融合タンパク質の生細胞イメージングにも使用できます。Nano-Glo® Live Cell Substrate は付属の Dilution Buffer で希釈して Nano-Glo® Live Cell Reagent を調製し、培地中に直接添加することで、細胞生存性を損なわずに最長 2 時間まで連続した発光モニタリングが行えます。Endurazine™、Vivazine™ は数時間から数日にわたる長時間発光モニタリングが可能であり、内在レベルのタンパク質測定も可能な感度を有します。



Nano-Glo® Live Cell Assay System、Endurazine™、Vivazine™ の発光
カインेटクス比較

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 回分	N2011
	1,000 回分	N2012
	10,000 回分	N2013
Nano-Glo® Vivazine™ Substrate	0.1 ml	N2580
	1 ml	N2581
	10 ml	N2582
Nano-Glo® Endurazine™ Substrate	0.1 ml	N2570
	1 ml	N2571
	10 ml	N2572
Nano-Glo® Extended Live Cell Substrate Trial Pack (Endurazine™ および Vivazine™ 各 0.1 ml)	0.2 ml	N2590

発現量の測定：細胞溶解を伴う発光測定

Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection

HiBiT

■ 添加・混和・測定だけで細胞内の標的タンパク質を定量

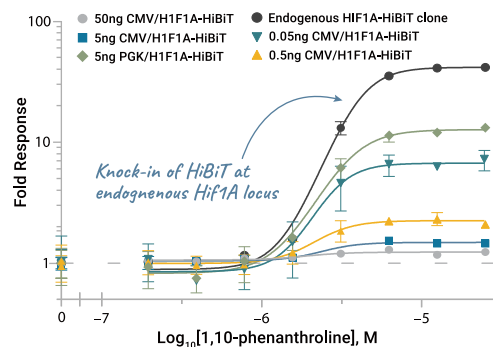
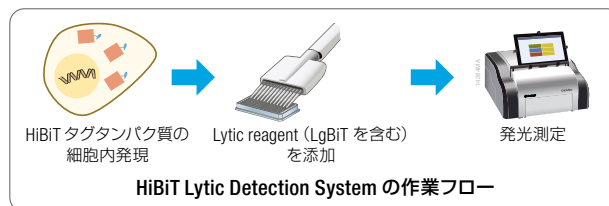
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System を用いれば、細胞ライセート中の HiBiT タグタンパク質を簡便な“添加 - 混和 - 測定”アッセイで直接定量することができます。細胞を溶解すると同時に発光に必要な LgBiT タンパク質および Frimazine 基質を供給する Nano-Glo® HiBiT Detection Reagent を HiBiT タグ タンパク質を発現する細胞に加えます。

LgBiT タンパク質と HiBiT タグとの高親和性の相互作用により NanoBiT® 発光酵素が再構成されます。これにより標準的な抗体を用いた検出法よりも少ない操作ステップでより定量的な測定結果が得られます。

用途

- 制御されたタンパク質発現
- 標的タンパク質の分解
- ウイルスの感染
- 遺伝子発現によるタンパク質レベルと RNA-seq 実験の確認
- プルダウンあるいは一過性トランスフェクション後のタンパク質定量

シグナル半減期：1 ~ 2.5 時間（サンプルと十分混和させた場合）



様々な発現レベルの HiBiT 融合 HIF1A の定量

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いれば HiBiT タグタンパク質を内在的に調節された条件下で発現させることができるため、過剰発現によるアーティファクトを低減し、内在性の結合パートナーや調節機構で適切な化学量論を維持することができる。

発現量の測定：メンブレンにブロットしたタンパク質を発光検出

Nano-Glo® HiBiT Blotting

HiBiT

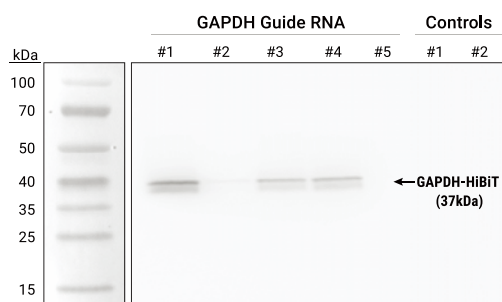
■ pg レベル以下のタンパク質を 5 分で検出

ゲルで分離してメンブレンに転写した HiBiT タグタンパク質を pg レベル以下の感度で可視化できます。LgBiT タンパク質およびフリマジン基質を含むブロットング試薬をメンブレンに直接添加すれば、HiBiT 融合タンパク質から発光シグナルが生じます。

標準的なウエスタンブロットングプロトコルでは数時間かかりますが、このシンプルな検出法なら最速 5 分でタンパク質を検出できます。HiBiT が存在する場所のみが発光するため、バックグラウンドもほとんどありません。

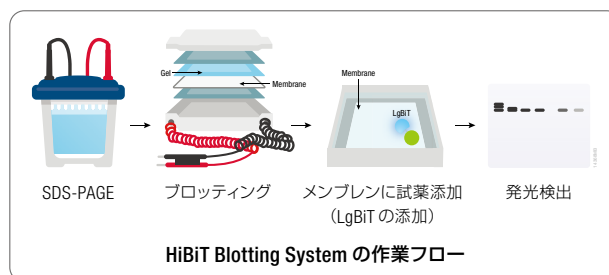
用途

- HiBiT タグタンパク質の分子量を確認
- スプライスバリエーションの発現を同定
- 一過性のトランスフェクションまたは CRISPR/Cas9 によるノックインの迅速なスクリーニング



内在 GAPDH への HiBiT タグging の確認

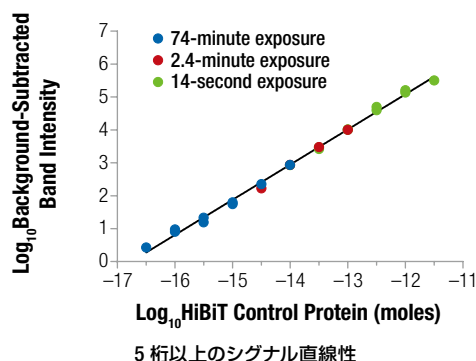
発現レベルに関わらずにタンパク質存在量の変化を測定でき、タグタンパク質を広いダイナミックレンジで正確に定量できる。内在レベルの低いタンパク質量でも定量できる（検出限界 10⁻¹⁰ moles 以下）。



シグナル半減期：60 分

検出感度：100fg ~ 100ng 以上

（露光時間はレンジによって最適化が必要）



発現量の測定、局在解析：細胞外タンパク質の発光検出

生細胞
アッセイ

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection

HiBiT

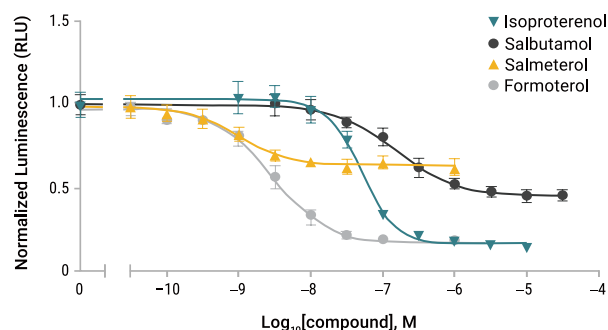
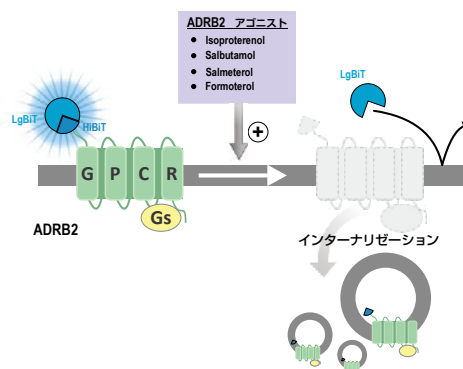
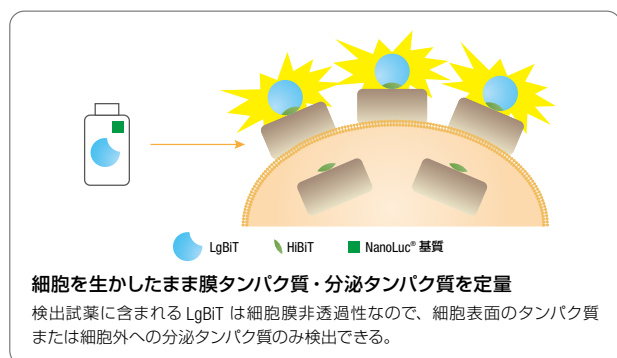
■細胞表面で発現する HiBiT 融合タンパク質、または分泌型 HiBiT 融合タンパク質の定量

Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection Reagent を加え混和して発光を測定するだけで、細胞外に発現した HiBiT 融合タンパク質を直接的に測定できます。構成品の Nano-Glo® HiBiT Detection Reagent には酵素基質と細胞膜非透過性の LgBiT ペプチドが含まれます。細胞表面上あるいは培地中に分泌された発現 HiBiT タグタンパク質だけが細胞外の LgBiT と相補し NanoBiT® 発光酵素として再構成されます。

定量性の高い Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System は標準的な抗体ベースの検出法に比べて操作ステップ数が飛躍的に少なくなるため時間を節約でき、精度も改善されます。

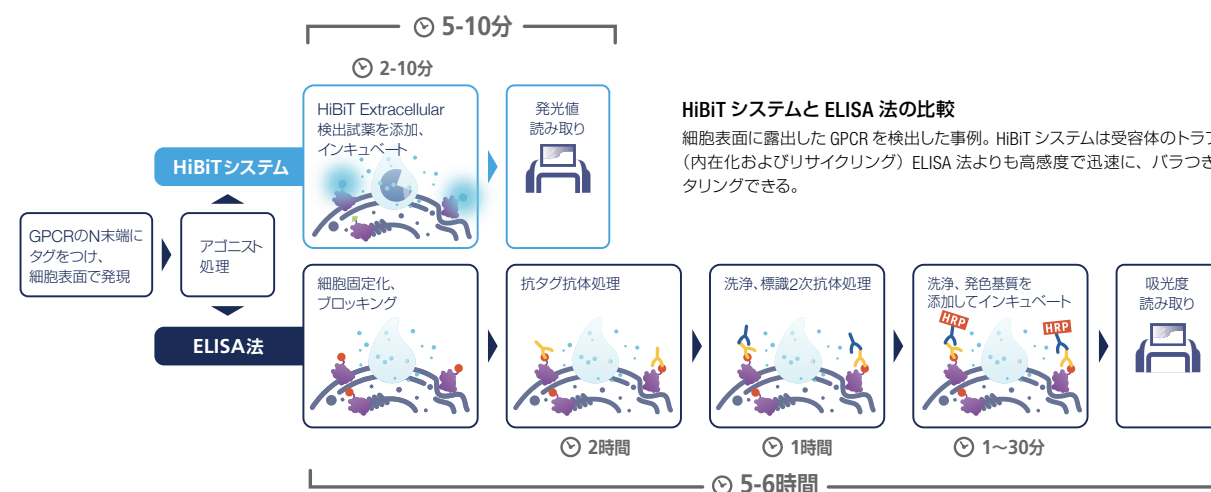
用途

- 受容体のインターナリゼーション ● 受容体のリサイクリング
- タンパク質またはサイトカインの分泌
- 表面タンパク質のトラフィック



アゴニスト	EC ₅₀	細胞表面受容体の残存率
Isoproterenol	50.9 nM	16%
Salbutamol	161 nM	45%
Salmeterol	1.04 nM	63%
Formoterol	2.92 nM	16%

β 2- adrenergic receptor (ADRB2) のエンドサイトーシス模式図 (上図) とインターナリゼーション誘導における各アゴニストの力価と効果 (下図、表)
4 種類の完全または部分的アゴニストに暴露した際の β 2-adrenergic receptor (ADRB2) のインターナリゼーション測定を行った。アッセイは数分で完了し、バラつきも低減できる。



HiBiT システムと ELISA 法の比較

細胞表面に露出した GPCR を検出した事例。HiBiT システムは受容体のトラフィック (内在化およびリサイクリング) ELISA 法よりも高感度で迅速に、バラつきも少ないモニタリングできる。

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 ml*	N3030
	100 ml	N3040
	10 × 100 ml	N3050
Nano-Glo® HiBiT Blotting System	100 ml**	N2410

製品名	サイズ	カタログ番号
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	10 ml*	N2420
	100 ml	N2421
	10 × 100 ml	N2422
HiBiT Control protein	100 µl	N3010

*10ml は 96 ウェルプレートで 100 ウェル分に相当 **100ml は 10 プロット分に相当

発現量の測定：生細胞でリアルタイムに測定したい場合に

生細胞
アッセイ

HiBiT Intracellular Detection

HiBiT

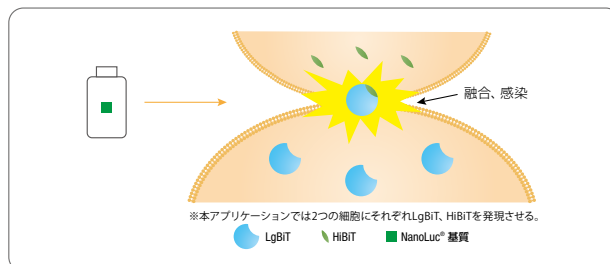
■細胞融合、ウイルス感染リアルタイム検出などに応用可能

細胞内に発現している HiBiT 融合タンパク質の検出を細胞を生かしたまま行いたい場合、HiBiT のパートナーである LgBiT を過剰に共発現させることで検出可能となります。検出には Nano-Glo® Live Cell Assay Reagent (9 ページ) を添加するだけです。

細胞融合やウイルス感染モニタリングの場合、2 種類の細胞あるいは細胞とウイルスなどの組み合わせで、それぞれの細胞に LgBiT、HiBiT を発現させます。それらは融合すると自発的に会合し、Nano-Glo® Live Cell Assay Reagent を添加すれば発光定量が可能です。

用途

- ウイルス感染あるいは複製
(極小 HiBiT はウイルスゲノムへの挿入に好適)
- 細胞融合
- アクセプター細胞への Exosome デリバリー
- 生細胞での細胞内タンパク質の定量



製品名	サイズ	カタログ番号
LgBiT/HiBiT コントロールベクター		
CMV LgBiT Vector		
CMV HaloTag®-LgBiT Vector		お問い合わせください
CMV HaloTag®-HiBiT Vector		
LgBiT の安定発現 HEK293 株		
HEK293 LgBiT Stable Cell Line		お問い合わせください

タンパク質 - リガンド相互作用：BRET (生物発光共鳴エネルギー移動)

生細胞
アッセイ

NanoBRET™ Target Engagement Assay

NanoLuc®

■生細胞内でテスト化合物の親和性およびレジデンスタイムを直接測定

NanoBRET™ Target Engagement (TE) Assay はインタクトな細胞内で標的タンパク質への化合物の結合をリアルタイムに測定します。このシステムは 4 つの要素、すなわち NanoLuc® 融合標的タンパク質、標的タンパク質特異的に結合する細胞膜透過性の蛍光トレーサー、NanoLuc® ルシフェラーゼの基質、細胞膜非透過性の NanoLuc® ルシフェラーゼ阻害剤からなります。

このアッセイは生細胞で分子の近接度を測定するためにデザインされた NanoBRET™ System (6 ページ) がベースになっており、化合物の結合親和性化合物-標的タンパク質のレジデンスタイムを直接測定できます。細胞に添加した化合物が細胞内の NanoLuc® 融合標的タンパク質と特異的に結合すれば BRET の発光値は下がります。この結合を正確に評価するために、ハンドリング時に障害された細胞などから生じた細胞外 NanoLuc® のシグナルを NanoLuc® 阻害剤を用いて減じます。細胞内で発現している NanoLuc® ルシフェラーゼに影響することはありません。

NanoBRET™ Target Engagement Intracellular HDAC Assay

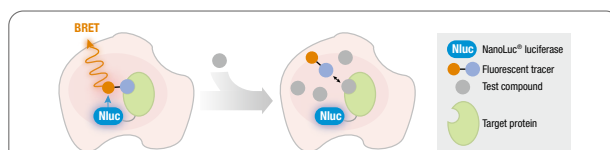
HDAC とテスト化合物の親和性およびレジデンスタイムの直接的な測定が可能です。完全長のタンパク質を用いたアッセイです。

NanoBRET™ Target Engagement Intracellular BET BRD Assay

BET BRD とテスト化合物の親和性およびレジデンスタイムの直接的な測定が可能です。完全長のタンパク質を用いたアッセイです。

NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay

生細胞で標的キナーゼへの化合物の結合が検出できます。120 種類以上のキナーゼ融合ベクターから選択可能です。キナーゼの種類によって 2 種類のトレーサー (K-4、K-5) のうちどちらかを 사용합니다。



テスト化合物の結合親和性と透過性の解析

NanoBRET™ TE Assay は、細胞内で NanoLuc® 融合タンパク質に可逆的に結合する NanoBRET™ トレーサーによる競合的な置換によりテスト化合物の見かけ上の結合親和性と透過性を分析する。テスト化合物が結合すると標的タンパク質とトレーサーから生じる NanoBRET™ シグナルが失われる。

製品名	サイズ	カタログ番号
HDAC 用 セット		
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Assay (検出試薬と NanoLuc® 融合 HDAC6 発現ベクター)	100 回分	N2080
	1,000 回分	N2081
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Complete Kit (検出試薬と NanoLuc® 融合 HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC10 と HDAC6 CD2 発現ベクター)	1,000 回分	N2170
HDAC 用 検出試薬		
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Detection Reagents	10,000 回分	N2090
BET BRD 用 セット		
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Assay (検出試薬と NanoLuc® 融合 BRD4 発現ベクター)	100 回分	N2130
	1,000 回分	N2131
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Complete Kit (検出試薬と NanoLuc® 融合 HDAC1, BRD2, BRD3, BRD4, BRD4 & BRD2 BD1, BRD2 BD2, BRD4 BD1, BRD4 BD2 発現ベクター)	1,000 回分	N2180
BET BRD 用 検出試薬		
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Detection Reagents	10,000 回分	N2140
キナーゼ用 検出試薬 (ベクターは含みません)		
	100 回分	N2520
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-4	1,000 回分	N2521
	10,000 回分	N2540
	100 回分	N2500
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-5	1,000 回分	N2501
	10,000 回分	N2530

※ NanoLuc® 融合キナーゼ発現ベクター一覧については www.promega.co.jp/kinasevect/ をご覧ください。

タンパク質-DNA 相互作用：クロマチン免疫沈降様解析

HaloCHIP™ Assay HaloTag®

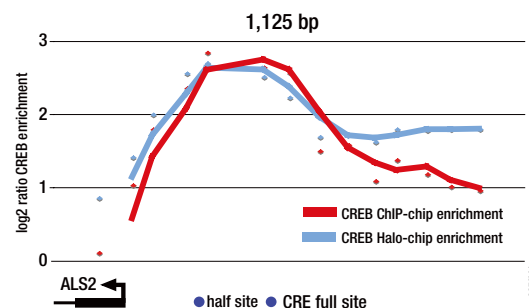
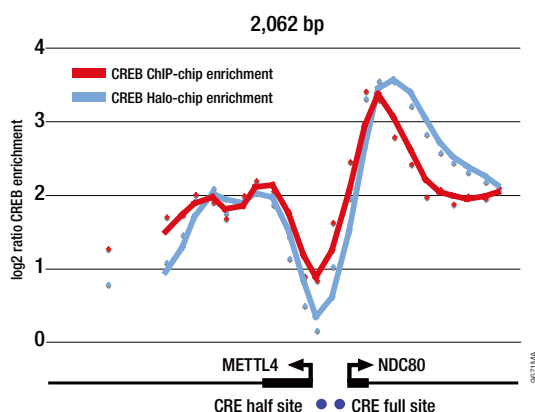
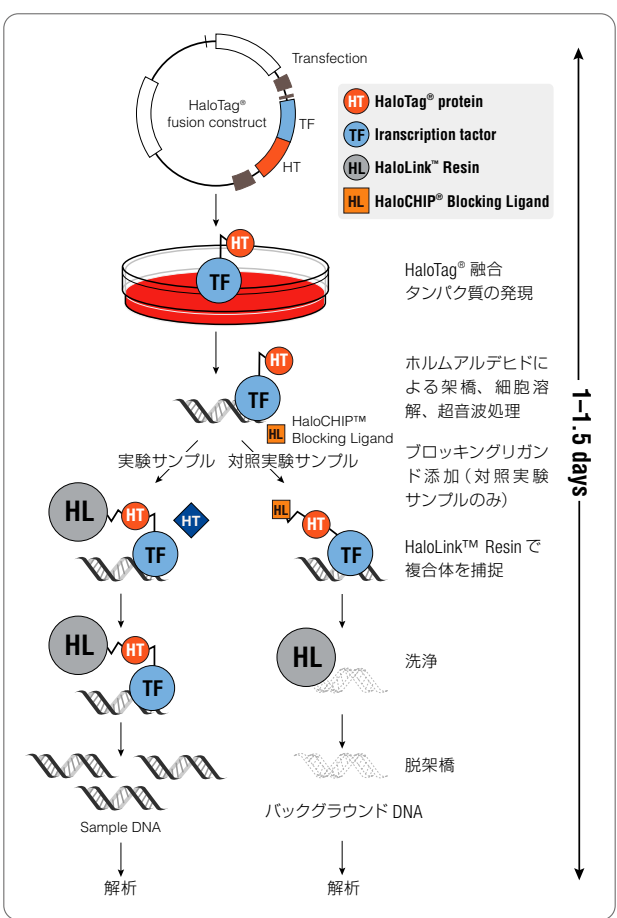
■抗体不要の ChIP 様解析

HaloCHIP™ System は、細胞内のタンパク質 /DNA 複合体を共有結合により捕捉する新しい方法を採用した、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) に替わるシステムです。抗体を使用しないため、従来法よりも効率的で安定したデータが得られます。

細胞内で HaloTag® 融合体として発現し、DNA に結合した目的のタンパク質は、ホルムアルデヒドにより DNA と架橋され、融合タンパク質の HaloTag® 部位と高い特異性で共有結合する HaloLink™ Resin 上に捕捉されます。レジンとタンパク質 / DNA 複合体との間に共有結合が形成されるため、強力な洗浄により非特異的に結合したタンパク質や DNA を従来の ChIP 法よりも効率的に除去することができます。その後、架橋を外して HaloLink™ Resin から精製 DNA 断片を回収します。

HaloCHIP™ と従来法 (ChIP) の比較

HaloCHIP™	従来法 (ChIP)
● ベクターを使用 (融合タンパク質の発現) ● タグを付加した組換えタンパク質 ● 所要時間: 1 ~ 1.5 日 ● 共有結合でタンパク質: DNA 複合体を捕捉 ● 少ないステップ数、エラーが低減 ● 低いバックグラウンド、高い S/B 比	● 抗体を使用 ● 内在タンパク質 ● 所要時間: 4 ~ 5 日 ● 抗体 / プロテイン A/G でタンパク質: DNA 複合体を捕捉 ● 多くのステップ数、データのバラつき ● 高いバックグラウンド、低い S/B 比



HaloCHIP™ は従来法 (ChIP) で検出されるタンパク質 : DNA 相互作用をよく再現する (参考文献より)

HaloCHIP™、従来法で CREB:DNA プロモーター結合サイトの決定を行い、Nimblegen promoter tiling array により再現性を検討した。

参考文献

Hartzell, D. D.; Trinklein, N. D. *et al.* (2009) A functional analysis of the CREB signaling pathway using HaloCHIP-chip and high throughput reporter assays, *BMC Genomics*. 10: 497

本論文では、HaloCHIP™ Systemを用いた実験操作の基本的な手順、特長を紹介している。HaloCHIP™ Systemと従来のChIP法と比べており、同様のプロモーター領域が検出されことを示している。さらにこれらのデータに基づき、プロモーターのオリゴDNAマイクロアレイを組み合わせたハイブリッドなプロモーター解析を行っている。

製品名	サイズ	カタログ番号
HaloCHIP™ System	20 回分	G9410

* 内 容:

- HaloCHIP™ Blocking Ligand (30μl)
- HaloLink™ Resin (2ml)
- High Salt Wash Buffer (25ml)
- Mammalian Lysis Buffer (40ml)
- Nuclease-Free Water (150ml)
- Reversal Buffer (8ml)

タンパク質 - タンパク質相互作用：プルダウンアッセイ

HaloTag® Pull-Down Assay

HaloTag®

■発現量の少ないタンパク質も効率的に捕捉

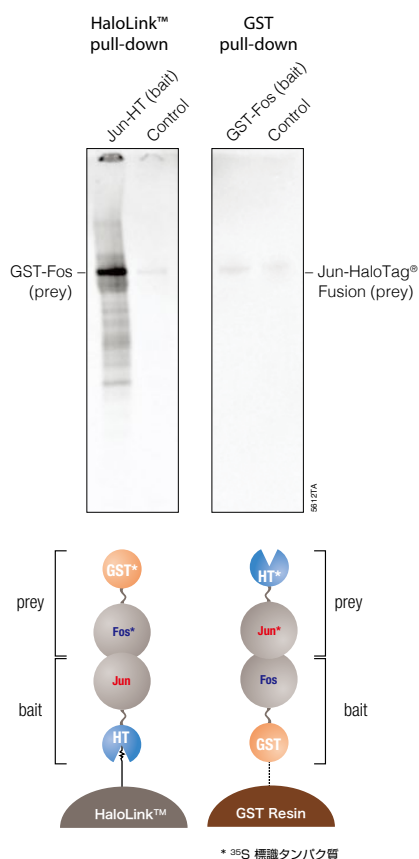
標準的なプルダウンアッセイでは、担体に結合するベイト(bait) タンパク質濃度を高くするために大腸菌発現系が汎用され、アフィニティー タグである GST との組み合わせが多く見られます。しかし、タンパク質間の相互作用には修飾やフォールディングなどが必要な場合があり、大腸菌の発現系では相互作用を見逃してしまう場合があります。この点で哺乳動物の細胞や無細胞発現系を用いた相互作用は有用ですが、大腸菌より発現量が比較的小さいため検出が困難な場合があります。

これを解消するのが HaloTag® の持つ高い親和性（共有結合：右中図参照）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

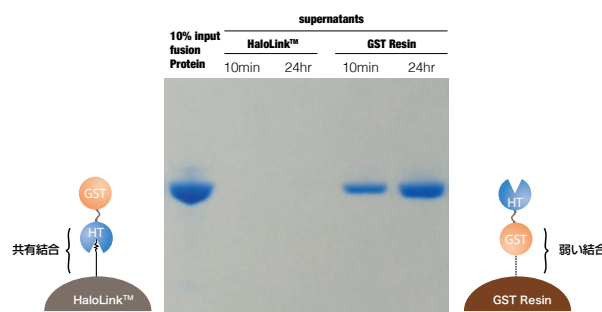
(bait/prey = 無細胞発現タンパク質)

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 [S]-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、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。

プロテアーゼインヒビターカクテル

市販のプロテアーゼ阻害剤にしばしば含まれる AEBSF は、HaloTag® タンパク質と HaloLink™ との結合を阻害することが確認されています（蛍光リガンドに対しては影響が少ないです）。プロメガの Protease Inhibitor Cocktail は AEBSF を含まず、異なる標的プロテアーゼを特異的に阻害する 6 種類のプロテアーゼ阻害剤の混合液のため、幅広いプロテアーゼを効率的に阻害します。このため HaloTag® テクノロジーにはもちろんのこと、様々なタンパク質融合タグ (His、GST、Flag® など) を用いた実験にも有効です。

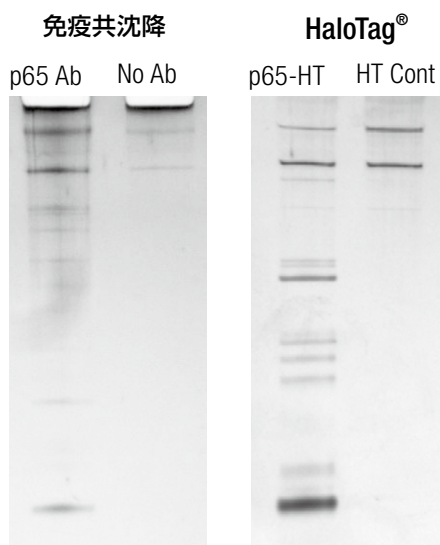
Model	Serine	Cysteine	Aspartate	Metallo-	Amino-peptidases
Promega	✓	✓	✓	✓	✓
Roche-cOmplete™	✓	✓		✓	
BD-BaculoGold™	✓	✓	✓	✓	
PMSF	✓	✓			
Aprotinin	✓				
EDTA				✓	

各種プロテアーゼ阻害剤が対応するプロテアーゼファミリー

公開されているデータを基にした主要プロテアーゼファミリーに対する阻害。
© Omplete is a trademark of Hoffmann-La Roche. BaculoGold is a trademark of Becton, Dickinson and Company.

■ 哺乳細胞内 (*in vivo*) で形成されたタンパク質間相互作用の検出 (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間相互作用の分析は、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。

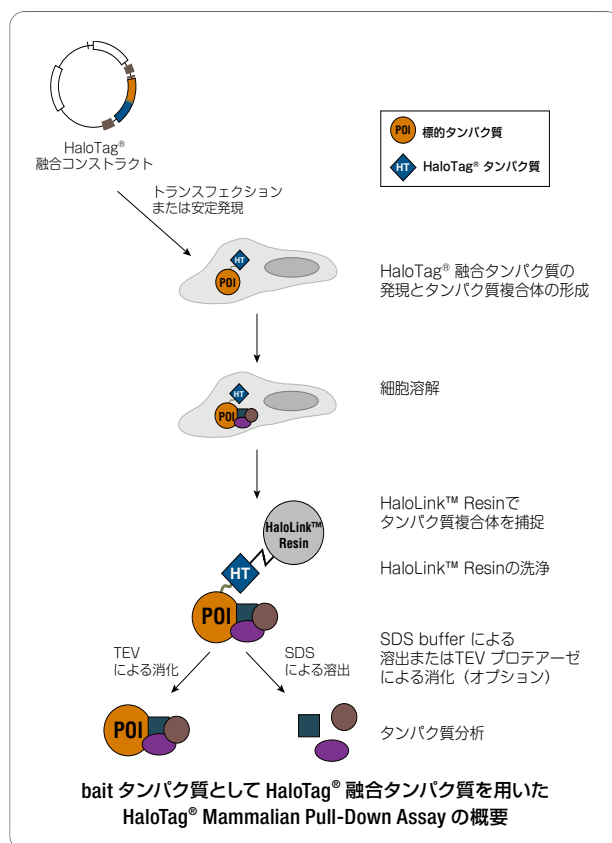


予想されるパートナー	免疫共沈降	HaloTag®
p105	○	○
p100		○
Rel A	○	○
Rel B		○
C-Rel		○
IκBα	○	○
IκBβ	○	○
IκBe	○	○

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。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 倍の感度を得られた。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。

「HaloTag® を用いたタンパク質精製・プルダウンのコツ」
(22 ページ) もご覧ください。



製品名	サイズ	カタログ番号
HaloTag® Mammalian Pull-Down and Labeling System	24 回分	G6500
HaloTag® Mammalian Pull-Down System	24 回分	G6504
HaloTag® Complete Pull-Down System	1 セット	G6509

関連製品		
HaloTag® Control Vector	20 µg	G6591
Protease Inhibitor Cocktail, 50X	1 ml	G6521
Mammalian Lysis Buffer	40 ml	G9381
HaloLink™ Resin	10 ml	G1914

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)

レジン担体の単品販売もございます (22 ページ)。

局在解析：生細胞蛍光標識

生細胞
アッセイ

HaloTag® リガンド

HaloTag®

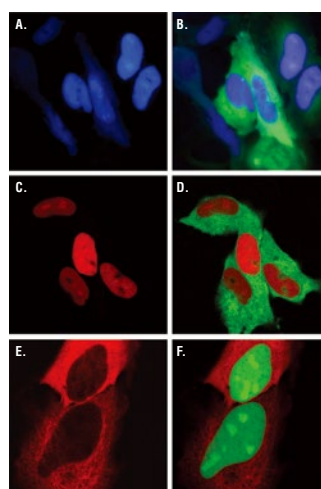
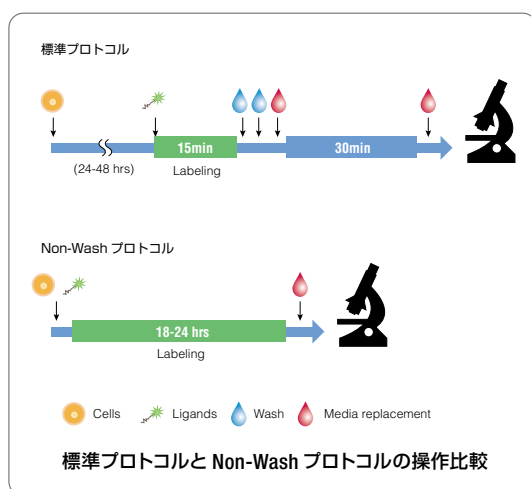
■タンパク質の局在、動態、プロテインプールの分染

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あります。

標識プロトコルには短時間で標識し洗浄ステップを要する標準プロトコル、培地に添加したまま培養し洗浄なしで観察できる Non-Wash プロトコルがあり、それぞれに適した蛍光リガンドを用意しています。

■標準プロトコルの例：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

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。

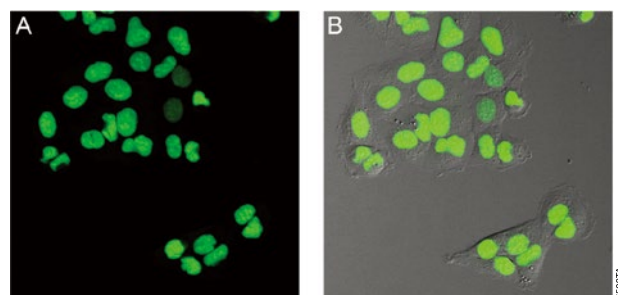


生細胞の核または細胞質を標的とした HaloTag® および hMGFP レポーター

HaloTag®- (NLS) 3 および hMGFP-a-tubulin (パネル A-D) または HaloTag®-a-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®-a-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。

■Non-Wash プロトコルの例：ハイコンテンツ分析

HaloTag® TMRDirect™ および R110Direct™ Ligand を用いたシンプル - プロトコル "Non-Wash プロトコル" 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、ハイコンテンツ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。

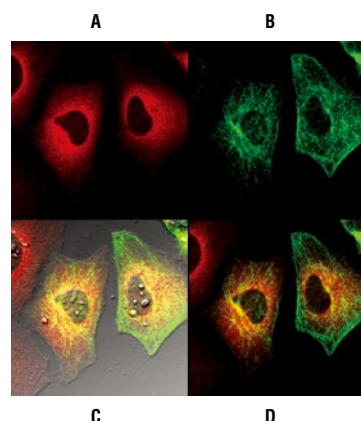


"No-wash" 生細胞標識プロトコルでも示された高いシグナル/ノイズ比と特異性

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。

■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し、固定後も蛍光特性を失わないので、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、変性条件下でも褪色は起こりません。



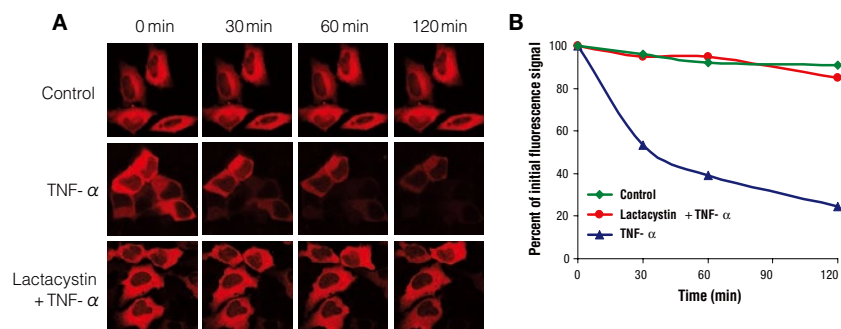
p65-HaloTag® タンパク質を発現し、HaloTag® TMR Ligand で標識した細胞の固定後のイメージング

HeLa 細胞で一過的に発現した p64-HaloTag® 融合タンパク質を、標準プロトコルに従い TMR Ligand で標識した。3.7% パラホルムアルデヒドで固定後、1μg/ml mouse Anti-β III 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。撮影にはオリンパス FV500 共焦点顕微鏡で行った。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。

■タンパク質の分解過程を可視化、定量化

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。これまでタンパク質の寿命を解析するには、 $[^{35}\text{S}]$ 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（18 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 依存性 IκB-HaloTag® 融合タンパク質の分解

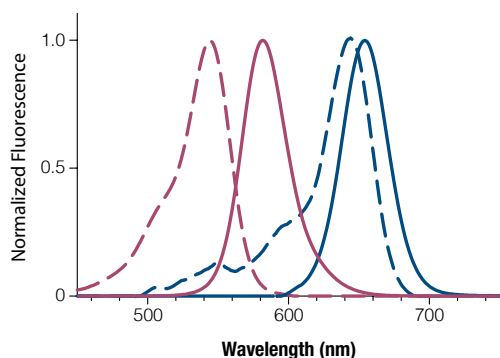
パネル A) IκB-HaloTag® 融合タンパク質を HEK293 細胞に一過的に発現させ、TMR リガンド (5 μM) で標識した。TNF-α (10 ng/ml) で刺激後、10 分間隔で 3 時間まで観察を行った（図では 0、30、60、120 分後の画像を示した）。TNF-α の刺激の 30 分前より 10 μM の Lactacystin で処理することにより、分解が抑制された。**パネル B)** 細胞の平均的な蛍光強度をオリンパス FV500 ソフトウェアにより求め、時間 0 での蛍光強度を 100 として示している。

■高輝度 Janelia Fluor® リガンドにより広がるアプリケーション（超解像顕微鏡イメージング、一分子イメージング、FACS）

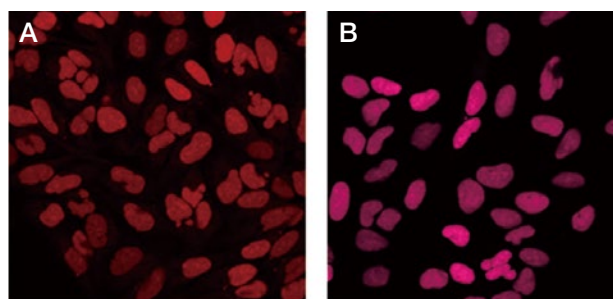
新しい Janelia Fluor® リガンドは HaloTag® 蛍光標識リガンドの中で最も明るいいため、より低レベルに発現するタンパク質でも検出することが可能です。Janelia Fluor® 蛍光色素は優れた量子収量と光安定性を備えているため、HaloTag® 融合タンパク質の高解像度の 1 分子イメージングなどにも使用することができます（以下の文献参照）。No-Wash プロトコルを利用できるため標識操作も簡便です。

Janelia Fluor® 549 や 646 蛍光リガンドは以下の文献で 超解像顕微鏡や 1 分子トラッキングなどに利用されています。

Grimm, J.B. *et al.* (2015) A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* 12, 244–50.



HaloTag® Ligand	Excitation maximum (dotted lines)	Emission maximum (solid lines)
Janelia Fluor® 549	549nm	571nm
Janelia Fluor® 646	646nm	664nm



U2OS 細胞で発現する HaloTag® タンパク質のライブセルイメージング

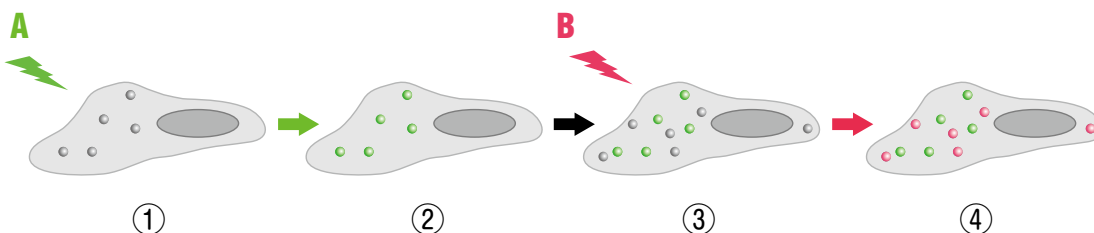
核局在配列を含む HaloTag® 発現 U2OS 細胞をガラスボトムチャンバースライドに付着させ、200 nM の Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand (**パネル A**) または Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand (**パネル B**) で 15 分間標識した。細胞は、Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand では 561 nm、Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand では 637 nm のレーザーで励起してイメージングを行った。

Janelia Fluor® HaloTag® Ligand の励起波長と蛍光波長

Janelia Fluor is a registered trademark of Howard Hughes Medical Institute.

■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

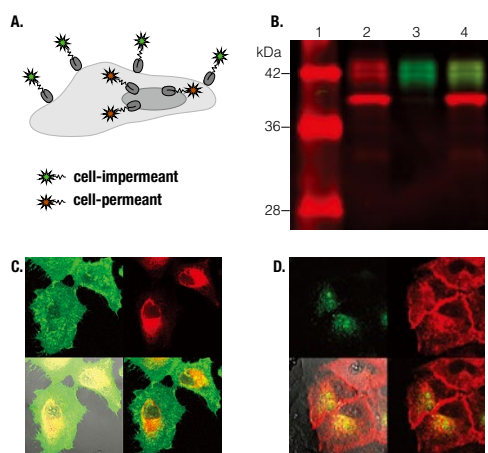
HaloTag® テクノロジーは、1 つのベクターコンストラクトを作製するだけで異なる波長の蛍光を HaloTag® レポータータンパク質に付帯させることができます。そのため、発現した時間の異なるタンパク質プールを異なる蛍光色で染色できます。



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だけ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ることで単色でのパルス・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ることも可能です。

また、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。さらに、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

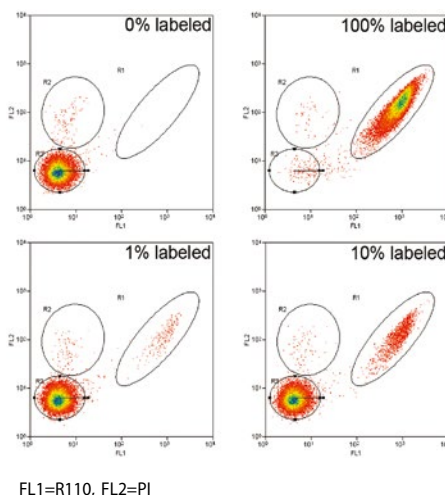
パネル A, $\beta 1$ Integrin-HaloTag® タンパク質のパルス / チェイス標識法の概略図 (パルスでは細胞表面の HaloTag® タンパク質を標識するために細胞非透過性の HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand を使用し、チェイスでは細胞内の HaloTag® タンパク質を標識するために細胞透過性の HaloTag® TMR Ligand を使用)。**パネル B**, $\beta 1$ Integrin-HaloTag® タンパク質を安定に発現する HEK293 細胞を HaloTag® TMR Ligand のみで標識 (レーン 2)、HaloTag® 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°C, 15 分)、HaloTag® TMR Ligand でチェイス (5 μ M, 37°C, 15 分)、洗浄した後に 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。

■FACS® 分析

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) など行えます。標識操作はステップを簡略化した "Non-Wash プロトコル" あるいは標準プロトコルでも実施できます (16 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 プロトコル) 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 (プロビジウムイオダイド)、R3 は非標識細胞。各グラフは約 20,000 個の細胞に相当。



HaloTag® リガンドの価格表および励起 / 蛍光波長

製品名	励起波長 (Ex)	蛍光波長 (Em)	サイズ	カタログ番号
超解像顕微鏡対応蛍光リガンド				
Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand NEW	549	571	5 µg 3 x 5 µg	GA1110 GA1111
Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand NEW	646	664	5 µg 3 x 5 µg	GA1120 GA1121
蛍光リガンド (標準プロトコル用)				
HaloTag® Coumarin Ligand	362	460	15 µl 30 µl	G8582 G8581
HaloTag® Oregon Green® Ligand	492	520	15 µl 30 µl	G2802 G2801
HaloTag® diAcFAM Ligand	492	521	15 µl 30 µl	G8273 G8272
HaloTag® TMR Ligand	552	578	15 µl 30 µl	G8252 G8251
HaloTag® STELLA Fluor™ 650 Ligand	646	660	30 nmol 60 nmol	GCKA308-01 GCKA308-02
HaloTag® STELLA Fluor™ 700 Ligand	691	712	お問い合わせください	
HaloTag® STELLA Fluor™ 720 Ligand	721	740	お問い合わせください	
HaloTag® ICG Ligand	790	830	お問い合わせください	
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand (細胞膜非透過性)	499	518	2 × 20 µg 30 µl	G1002 G1001
HaloTag® Alexa Fluor® 660 Ligand (細胞膜非透過性)	654	690	15 µl 30 µl	G8472 G8471
蛍光リガンド (No-wash プロトコル用)				
HaloTag® R110Direct™ Ligand	498	528	30 µl	G3221
HaloTag® TMRDirect™ Ligand	552	578	30 µl	G2991
機能性蛍光リガンド				
HaloTag® AcidFluor Orange (pH センサー)	520	565	30 nmol 60 nmol	GCKGC310-01 GCKGC310-02
HaloTag® HPF (ROS センサー)	490	515	お問い合わせください	
HaloTag® APF (ROS センサー)	490	515	お問い合わせください	
HaloTag® CaSiR (Ca センサー)	650	664	お問い合わせください	
ビオチンリガンド				
HaloTag® Biotin Ligand			15 µl 30 µl	G8282 G8281
HaloTag® PEG-Biotin Ligand (細胞膜非透過性)			15 µl 30 µl	G8592 G8591
未標識リガンド				
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。				
HaloTag® Amine (O4) Ligand			5 mg	P6741
HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand			5 mg	P6751
HaloTag® Iodoacetamide (O4) Ligand			5 mg	P6771
HaloTag® Succinimidyl Ester (O2) Ligand			5 mg	P1691
HaloTag® Amine (O2) Ligand			5 mg	P6711

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。

推奨されるイメージング用の標準的なフィルターセット

リガンド	推奨するフィルターセット
HaloTag® Alexa Fluor® 660, Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand	Cy® 5 filter set (~640nmEx/700nmEm)
HaloTag® TMR, Janelia Fluor® 549 HaloTag®, TMRDirect™ Ligand	TRITC filter set (555nmEx/580nmEm)
HaloTag® Alexa Fluor® 488, Oregon Green®, R110Direct™ Ligands	FITC filter set (488nmEx/520nmEm)
HaloTag® Coumarin Ligand	DAPI/AMCA filter set (345nmEx/445nmEm)

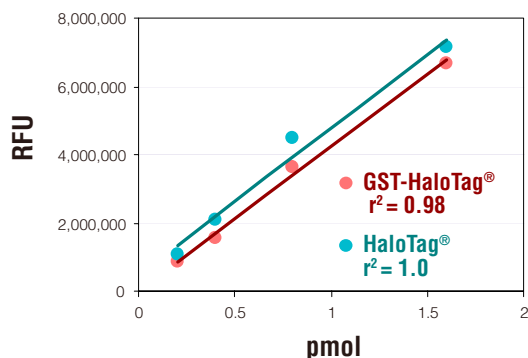
蛍光リガンドによる迅速 SDS-PAGE

HaloTag® Ligand (*in vitro* use)

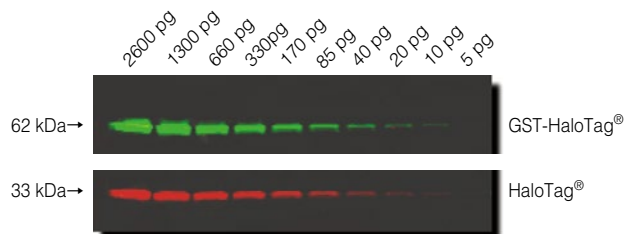
HaloTag®

■ 蛍光標識 SDS-PAGE 解析

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、調製したライゼートをそのまま SDS-PAGE に供し、迅速に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℃、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。



標準タンパク質の直線的な標準曲線



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。

製品名	サイズ	カタログ番号
HaloTag® 融合 GST		
HaloTag® Standard Protein	30 µg	G4491

HaloTag® Ligand の価格については前ページ をご覧ください。

免疫染色、ウェスタンブロッティング

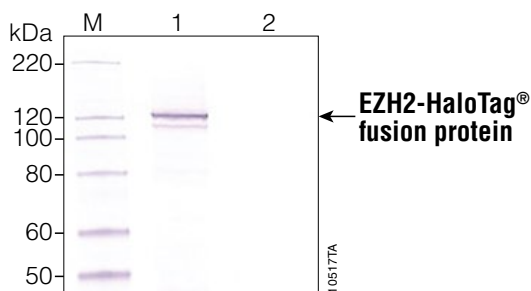
HaloTag® 抗体

HaloTag®

■ 従来法でも発現確認が可能

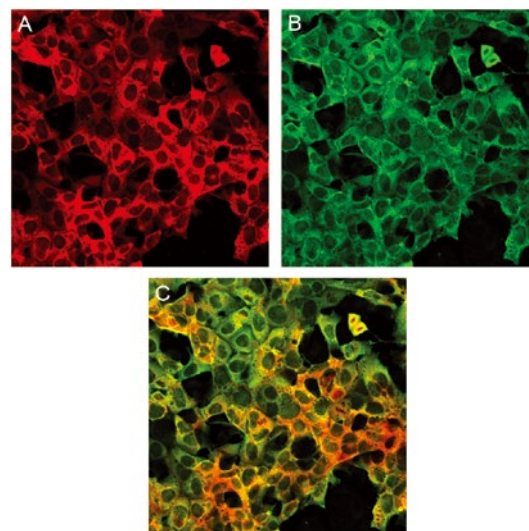
HaloTag® に対するモノクローナル抗体の Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody (マウスモノクローナル抗体) はウェスタン分析に使用でき、HaloTag® 以外のタンパク質に対する交差反応性はほとんどありません。

ポリクローナル抗体の Anti-HaloTag® pAb (精製ウサギポリクローナル抗体) は細胞免疫染色などその他の実験に使用できます。HaloTag® タンパク質は哺乳動物、植物、大腸菌には内在しません。大腸菌および哺乳動物細胞抽出液で低い交差性反応が認められます。



ウェスタンブロッティングにおける HaloTag® Monoclonal Antibody の免疫反応性

EZH2-HaloTag® (~120kDa) を発現した HEK293T ライゼートでウェスタン分析を行った。HaloTag® Monoclonal Antibody (1000 倍希釈)、AP 標識 2 次抗体を用いてウェスタン分析を行った。



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
ポリクローナル抗体		
Anti-HaloTag® pAb	200 µg	G9281
モノクローナル抗体		
Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody	200 µg	G9211

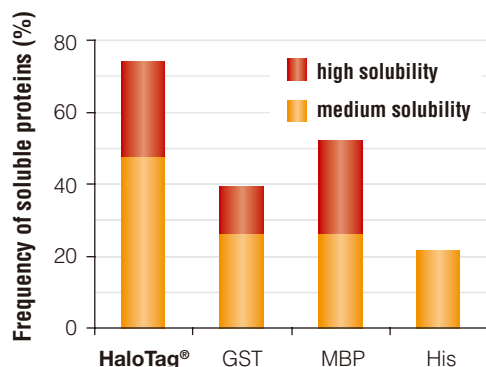
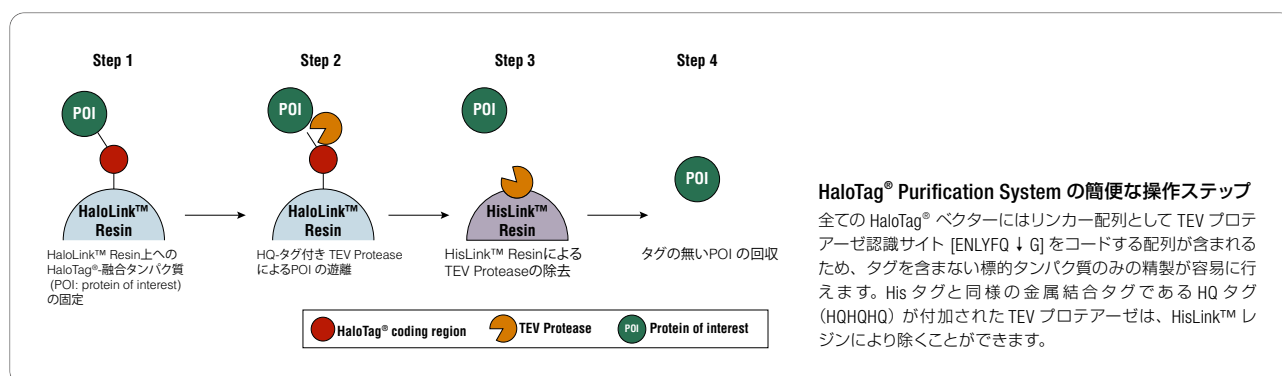
タンパク質精製：タグフリーのタンパク質を取得

HaloTag® Protein Purification

HaloTag®

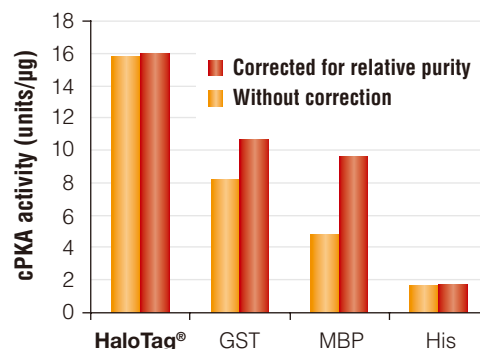
■大腸菌からの HaloTag® 融合タンパク質精製

HaloTag® Protein Purification System は大腸菌で発現させた HaloTag® 融合タンパク質の精製用にデザインされています。HaloTag® は組換えタンパク質の発現量および可溶性を増加させ、目的のタンパク質を効率的、特異的、かつ共有結合により強力に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)。



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。各タグを用いてブルダウニング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。

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	タンパク質間相互作用, 細胞イメージング	タンパク質間相互作用	タンパク質間相互作用	タンパク質間相互作用	細胞イメージング

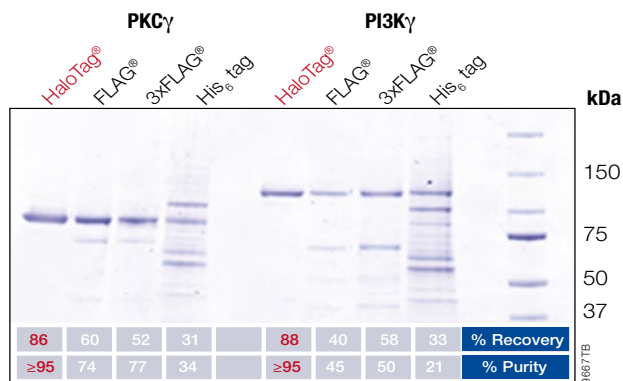
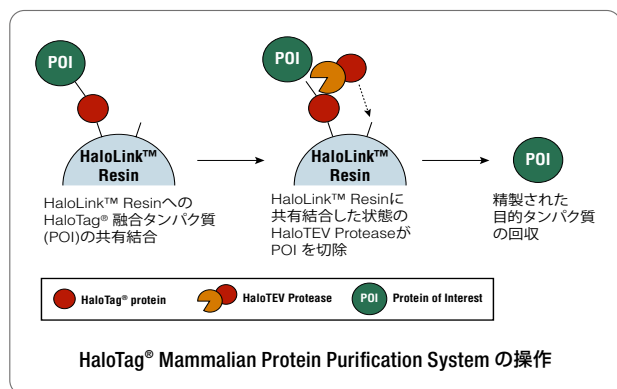
製品名	サイズ	カタログ番号
大腸菌からの精製システム		
HaloTag® Protein Purification System Sample Pack	50 ml culture 2.5 回分	G6270
HaloTag® Protein Purification System	50 ml culture 25 回分	G6280
関連製品		
Single Step (KRX) Competent Cells, >10 ⁹ cfu/µg	20 × 50 µl	L3002
ProTEV Plus	1,000 u	V6101
	8,000 u	V6102

内 容: G6270

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

■動物培養細胞からの HaloTag® 融合タンパク質精製

HaloTag® Mammalian Protein Purification System は、動物培養細胞で発現させた HaloTag® 融合タンパク質の精製用にデザインされています。HaloTag® 融合タンパク質は HaloLink™ Resin と効率的、特異的に共有結合を形成し、哺乳動物培養細胞での発現レベルが低い場合でも非常に高い純度、収率で精製することができます。HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification System (カタログ番号 G6795, G6799) には HaloTag® 染色用の HaloTag® TMRDirect™ Ligand が付属し、簡単に HaloTag® 融合タンパク質を蛍光検出できるため、発現・精製条件の最適化を迅速に行うことができます。システムに付属する HaloLink™ Resin の結合容量は HaloTag® 融合タンパク質 >7mg/ml (FLAG® の約 10 倍) で、回収率も通常 >75% です。非特異的な結合も非常に少なく (<0.1%) 高純度のタンパク質を精製することができます。付属の HaloTEV Protease は HaloTag® 融合タンパク質から HaloTag® を切断するとともに HaloLink™ Resin と結合するため、回収した目的タンパク質溶液からの除去は必要ありません。



HaloTag® および他のタンパク質タグの精製効率の比較

2つのタンパク質 (PKCγ、PI3Kγ) の精製において HaloTag® の回収率および純度は FLAG® タグおよび His タグよりも優れていた。また、HaloTag® で精製したキナーゼは活性も有していた。

Ohana, R.F. *et al.* (2011) HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. *Protein Expr. Purif. Apr*; 76 (2) : 154-64.

製品名	サイズ	カタログ番号
哺乳動物細胞からの精製システム		
HaloTag® Mammalian Protein Purification System	1 システム	G6790
HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification System	1 システム	G6795
HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification System Sample Pack	1 システム	G6799
プロテアーゼ (タグの切除)		
HaloTEV Protease	200 μl	G6601
	800 μl	G6602

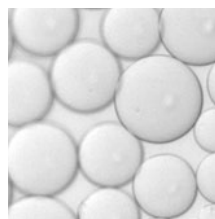
製品名	サイズ	カタログ番号
捕捉・精製用レジン担体および磁性体ビーズ		
HaloLink™ Resin	1.25ml (5ml) *	G1912
	2.5ml (10ml) *	G1913
	10ml (40ml) *	G1914
	25ml (100ml) *	G1915
Magne™ HaloTag® Beads	200μl (1ml) *	G7281
	1ml (5x1ml) *	G7282

* () 内はレジンあるいはビーズを懸濁した場合の総ボリュウム

HaloTag® を用いたタンパク質精製・ブルダウンのコツ

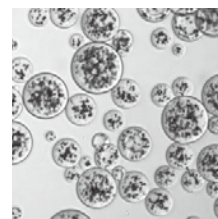
- HaloTag® はもともと酵素であり、SDS を含む溶解バッファーを用いるとリガンド結合能を失います。細胞溶解時はマニュアル記載の溶解バッファーを使用し、リガンドと結合させるまでは変性条件におかないでください。
- HaloTag® とリガンドは共有結合します。一旦 HaloTag® 融合タンパク質を担体に結合させると、SDS-PAGE 用のサンプルバッファーでボイルしても外れません。担体から目的タンパク質を回収する際は、TEV プロテアーゼ処理を行い HaloTag® を切り離す必要があります。

レジン担体と磁性体ビーズの特徴



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)



安心国内受託サービス (かずさ DNA 研究所)

ヒト ORF クローン販売・発現ベクター構築・安定発現株作製受託サービス

■ NanoLuc®・HaloTag® 実験をすぐに始めたい方に、10,000 種以上のタグ融合済みヒト 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 (The ORFeome Collaboration) ORF コレクションの 2 つのリソースをベースとした独自のクローンリソースを、NanoLuc® Flexi® ベクター (pFN31K または pFC32K)、HaloTag® Flexi® ベクター (pFN21A、25 ページ参照) に導入したクローンを提供しています。10,000 種以上のヒト ORF から選択可能であり、ORF は他の Flexi® Vector へ容易に移し換えることができます。

- 購入時の面倒な書類記入は不要
- オンラインで見積り兼注文用紙を自動発行
- 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
- かずさ DNA 研究所で製造、繊細な要望や相談も日本語で安心

クローン検索

www.kazusa.or.jp/kop/dsearch/

製品名	サイズ	カタログ番号
Flexi® HaloTag® Clone	1 クローン	FHCxxxxx
Flexi® NanoLuc® Clone	1 クローン	FNCxxxxxN または C

クローンに伴う有料オプションサービス

ク
ロ
ン

大量調製

クローン各種の標準容量は 100ng ですが、10µg、50µg、100µg に増量することができます。それ以上の増量についてもご相談いただけます。

改変サービス

タグの付け換え、遺伝子変異導入、他の Flexi® ベクターへの ORF 移し替え、発現ベクターの構築及びその発現確認 (動物細胞、大腸菌、*In Vitro*) など

実験受託サービス

HaloTag® を利用した各種実験 (タンパク質精製、プルダウン、発現解析)、ツールの提供など

遺伝子の完全長化、修復

公共データベースの最新情報をもとに、既存の Flexi® ORF Clone に含まれる遺伝子を完全長化し、アップデートされた ORF クローンとしてご提供いたします。

■ NaoLuc®・HaloTag® 融合標的遺伝子の安定発現株作製：ヒト染色体由来人工染色体 (HAC) を導入した TrueSTABLE™ Cell

ヒト人工染色体 (HAC) に任意の ORF、タグ、プロモーターを挿入し、目的の細胞株に導入することで安定発現株を作製します。

HAC は宿主の染色体とは独立して存在するためゲノムが傷つかず、本来の染色体が持つ機能が保持されます。また、HAC に導入される標的遺伝子はコピー数も 1 コピーで安定的に長期間保たれます。

下記のような実験に特に有益です。

- 自然な状態に近い量のリコンビナントタンパク質の機能・PPI を調べたい (過剰発現によるアーティファクトを極力排除したい)
- 比較対象同士 (野生型 vs 変異型 etc.) の条件をなるべく揃えたい (同じ挿入部位・コピー数同士の比較が可能)
- 長期間にわたる現象に関わるタンパク質機能を解析したい

安定発現株作製における選択肢 (例)

遺伝子・細胞の種類 Flexi® ORF Clone & HEK293 cell

タグの種類 HaloTag®, NanoLuc®, HiBiT

タグの位置 N 末端、C 末端

プロモーターの種類 CMV、EF-1

評価系

- ライゼートを用いたタグタンパク質の検出
- SDS-PAGE によるサイズ解析
- 細胞内局在 (HaloTag® 使用の場合、または一部の膜タンパク質と分泌型タンパク質)

受託サービスの詳細、お見積り

www.promega.co.jp/truestablecell/

Flexi® Vector、またはマルチクローニングサイトつきベクター

融合タンパク質発現ベクター

■ ベクター単品 (容量はすべて 20 µg)

NanoBRET™ については 7 ページ、NanoBIT® については 8 ページの各 Starter System (ベクターセット) をご覧ください。

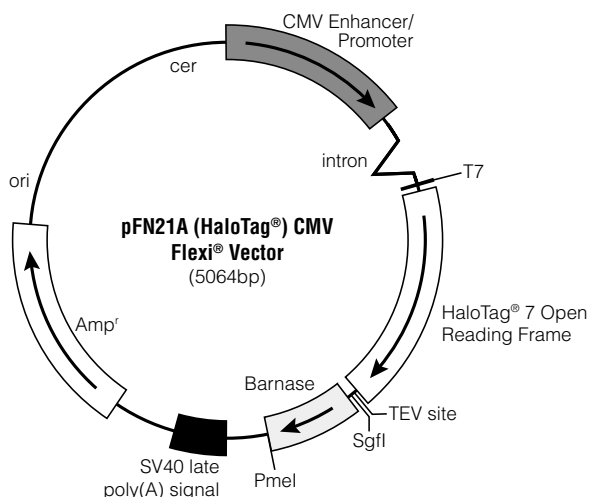
製品名	マルチ クローニング サイト	発現用 プロモーター	融合遺伝子 (+ 融合パートナー)	蛋白質分解 / 分泌配列	動物細胞選択 マーカー (大腸菌選択マーカー)	カタログ 番号
NanoLuc® 融合タンパク質発現ベクター						
哺乳動物発現	pFN31A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc (N 末端)	Hygro (Amp)	N1311
	pFN31K Nluc CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc (N 末端)	Neo (Kan)	N1321
	pFC32A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	Flexi®	CMV	Nluc (C 末端)	Hygro (Amp)	N1331
	pFC32K Nluc CMV-neo Flexi Vector	Flexi®	CMV	Nluc (C 末端)	Neo (Kan)	N1341
	pNLF1-N[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc (N 末端)	Hygro	N1351
	pNLF1-C[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc (C 末端)	Hygro	N1361
	pNLF1-secN[CMV/Hygro]Vector	Yes	CMV	Nluc (N 末端)	Hygro	N1371
HiBiT 融合タンパク質発現ベクター						
哺乳動物細胞	pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2391
	pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2401
	pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2411
	pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	Yes	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2361
	pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	Yes	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2371
	pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	Yes	CMV	HiBiT	Neo (Kan)	N2381
HaloTag® 融合タンパク質発現ベクター*						
哺乳動物発現	pFC14A HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	(Amp)	G9651
	pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	(Kan)	G9661
	pFC15A HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d1 (強)	HaloTag® (C 末端)	(Amp)	G1611
	pFC15K HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d1 (強)	HaloTag® (C 末端)	(Kan)	G1601
	pFC16A HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d2 (中)	HaloTag® (C 末端)	(Amp)	G1591
	pFC16K HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d2 (中)	HaloTag® (C 末端)	(Kan)	G1571
	pFC17A HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d3 (弱)	HaloTag® (C 末端)	(Amp)	G1551
	pFC17K HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d3 (弱)	HaloTag® (C 末端)	(Kan)	G1321
	pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	(Amp)	G2821
	pFN21K HaloTag® CMV Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	(Kan)	G2831
	pFN22A HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d1 (強)	HaloTag® (N 末端)	(Amp)	G2841
	pFN22K HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d1 (強)	HaloTag® (N 末端)	(Kan)	G2851
	pFN23A HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d2 (中)	HaloTag® (N 末端)	(Amp)	G2861
	pFN23K HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d2 (中)	HaloTag® (N 末端)	(Kan)	G2871
	pFN24A HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d3 (弱)	HaloTag® (N 末端)	(Amp)	G2881
	pFN24K HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	Flexi®	CMV d3 (弱)	HaloTag® (N 末端)	(Kan)	G2981
	pFC27A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	Neo (Amp)	G8421
	pFC27K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (C 末端)	Neo (Kan)	G8431
	pFN28A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	Neo (Amp)	G8441
	pFN28K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	Flexi®	CMV (最強)	HaloTag® (N 末端)	Neo (Kan)	G8451
大腸菌発現	pHTC HaloTag® CMV-neo Vector	Yes	CMV	HaloTag® (C 末端)	Neo (Amp)	G7711
	pHTN HaloTag® CMV-neo Vector	Yes	CMV	HaloTag® (N 末端)	Neo (Amp)	G7721
	pFN18K HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag® (N 末端)	Kan	G2681
	pFN18A HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag® (N 末端)	Amp	G2751
	pFN29K His ₆ HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag®, 6xHis (N 末端)	Kan	G8331
	pFN29A His ₆ HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag®, 6xHis (N 末端)	Amp	G8261
	pFC30K His ₆ HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag®, 6xHis (C 末端)	Kan	G8381
	pFC30A His ₆ HaloTag® T7 Flexi® Vector	Flexi®	T7	HaloTag®, 6xHis (C 末端)	Amp	G8321
	pH6HTN His ₆ HaloTag® T7 Vector	Yes	T7	HaloTag®, 6xHis (N 末端)	Amp	G7971
	pH6HTC His ₆ HaloTag® T7 Vector	Yes	T7	HaloTag®, 6xHis (C 末端)	Amp	G8031
無細胞発現	pFN19K HaloTag® T7 SP6 Flexi® Vector	Flexi®	T7, SP6	HaloTag® (N 末端)	Kan	G1841
	pFN19A HaloTag® T7 SP6 Flexi® Vector	Flexi®	T7, SP6	HaloTag® (N 末端)	Amp	G1891
	pFC20K HaloTag® T7 SP6 Flexi® Vector	Flexi®	T7, SP6	HaloTag® (C 末端)	Kan	G1691
	pFC20A HaloTag® T7 SP6 Flexi® Vector	Flexi®	T7, SP6	HaloTag® (C 末端)	Amp	G1681

※ HaloTag® 融合ベクターはリンカー部分に TEV プロテアーゼ認識サイトを含むため、タグの切除が可能です。

●Flexi® システムについては 25 ページをご覧ください。

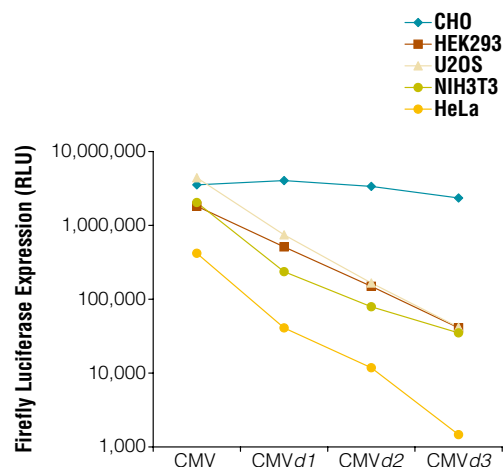
■ HaloTag® ベクターセット

CMV Deletion Series Sample 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 2 µg 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 EcoCR I : R1901) が含まれます。



7549MA

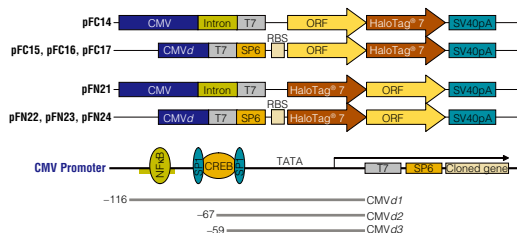
製品名	サイズ	カタログ番号
HaloTag® Flexi® Vectors - CMV Deletion Series Sample Pack	9 × 2 µg	G3780
HaloTag® Cloning Starter System	1 システム	G6050



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

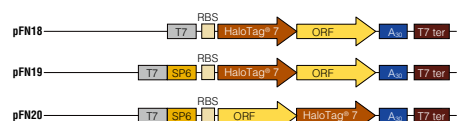
ホタルルシフェラーゼ遺伝子を各ベクターに組み込み、その発現量を比較した。CHO 細胞以外では CMV プロモーター領域を段階的に削除することで発現量が抑制されることが示された。発現レベルは CMV > CMV d1 > CMV d2 > CMV d3。

Flexi® CMV Vectors



HaloTag® 融合タンパク質発現ベクターの発現エレメント領域

Flexi® T7(SP6) Vectors



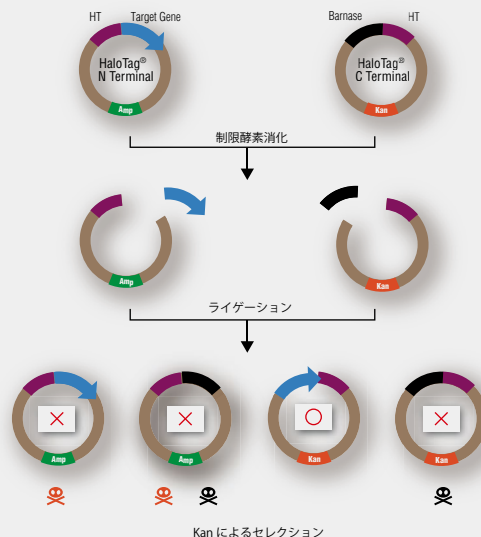
7549MA

Flexi® システム：方向性、読み枠を維持したサブクローニング

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 EcoCR I 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クションにより効率的なクローニングが行えます。シンプルな工程で迅速にクローニングでき、正確性が高く ORF を移し換えた後の配列確認の必要もありません。

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

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タイプの移し換え例を示しています。移し換える先の 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。



内在遺伝子への HiBiT 配列付加

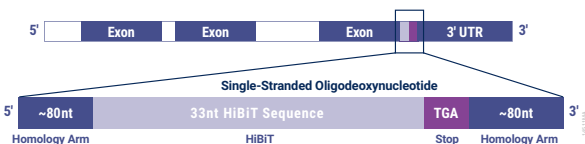
ゲノム編集による HiBiT ノックイン

■ 簡便な検出法でノックイン細胞のクローニングも効率的

HiBiT 配列は 33 塩基にコードされる極小のペプチドタグ (11 アミノ酸) であり、従来法のように HiBiT ベクターへ目的遺伝子をクローニングするだけでなく、ゲノム編集による内在遺伝子への付加にも最適です。CRISPR / Cas9 ゲノム編集技術を用いて内在ローカスに HiBiT 配列を導入することにより、強力なプロモーターで一過的に過剰発現させる場合に比べ多くの場合応答性が向上し、ありのままのタンパク質発現解析が可能になります。

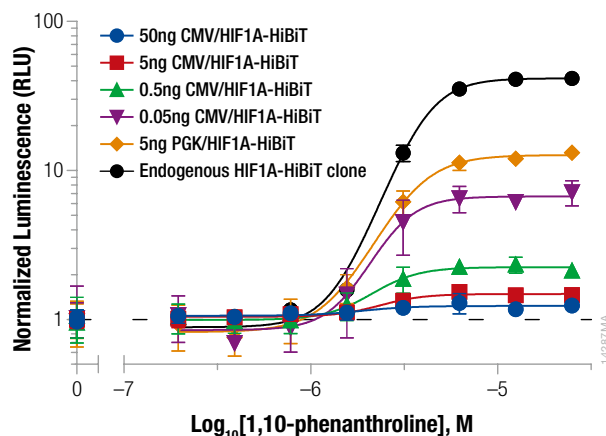
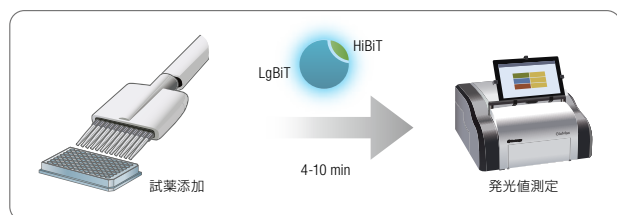
手順

- ① **ライセンス確認登録** www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/
HiBiT 配列 (33 bases) の利用には Web 上での簡単な利用者登録 (ライセンス内容の承認) が必要です。費用は一切かかりません。ご登録後に塩基配列ならびにアミノ酸配列を記したメールをお送りします。
- ② **ゲノム上のターゲット配列確認**
- ③ **crRNA のデザインおよびガイド RNA (crRNA + tracrRNA) のデザイン及び発注**
例) Alt-R CRISPR-Cas9 System (IDT 株式会社)
- ④ **HiBiT Donor DNA template のデザインおよび発注**



- ⑤ RNP、ドナー DNA の細胞への導入
- ⑥ ゲノム編集効果の確認

培養に試薬 (Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System) を添加すると発光反応が始まり、ルミノメーターで容易に検出できます。煩雑な確認作業 (制限酵素処理や電気泳動など) は不要です。



各発現コンストラクトによる応答性の違い

HeLa 細胞に CMV または PGK プロモーターを含む HIF1A-HiBiT 発現コンストラクトを一過的にトランスフェクションまたは CRISPR/Cas9 により内在ローカスに HiBiT を導入し、1.10-フェナントロリンによる応答性を調べた。

より詳細な情報

CRISPR / Cas9 ゲノム編集による
HiBiT ノックインプロトコル

Q www.promega.co.jp/hibitcrispr/

HiBiT のクローニング

人工合成した HiBiT 配列のクローニング

HiBIT 配列は短いため人工遺伝子合成が低コストで実施でき、手持ちの標的遺伝子発現クローンに組み込む断片が容易に得られます。配列の人工合成を行う前に、Web 上で行う簡単な利用登録が必要です（上記ゲノム編集による HiBIT ノックインの手順 1 をご参照ください）。

oligo のデザイン例

制限酵素配列 **HiBiT 配列** **制限酵素配列**

Forward : NNNNN**XXXXXXXXN**NNNNNXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNNNNNN**XXXXXXN**NNNNN
Reverse : NNNNN**XXXXXN**NNNNNXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNNNNNN**XXXXXXN**NNNNN

※ i linker は考慮していません。

より詳細な情報

HiBiT 実験クイックスタートガイド



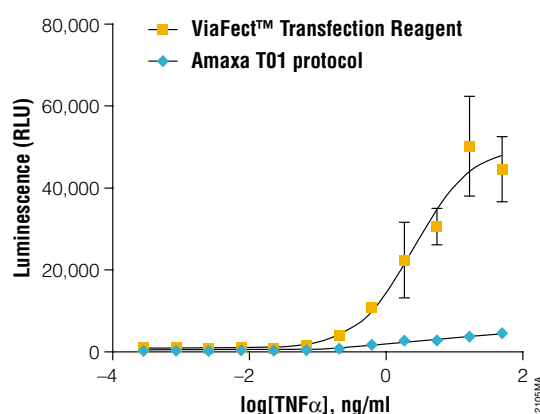
🔍 www.promega.co.jp/pdf/hibitquick_guide.pdf

トランスフェクション試薬

ViaFect™ Transfection Reagent

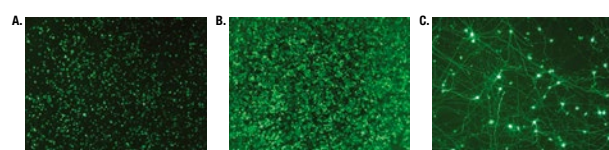
■ 血清・抗生物質存在下でも導入可能、動物由来成分不含

ViaFect™ Transfection Reagent は細胞の生存性を損なうことなく幅広い細胞タイプのトランスフェクションを高効率で行うことができます。細胞を健全な状態に保ち、代謝活性も損ないません。汎用される付着細胞や細胞内シグナリング研究で重要な浮遊細胞だけでなく、幹細胞から分化した細胞を用いる場合でも生物システムに近いアッセイをデザインすることができます。使用前に血清や培地を除く必要のない簡便なプロトコルであり、試薬/DNA 複合体を導入した後も洗浄や培地交換は不要です。最小限の最適化で非常に優れたパフォーマンスを提供し、ご自身が研究する生物システムのモデルとなる最適な細胞で、適切なアッセイをデザインすることができます。



エレクトロポレーションと ViaFect™ を用いたレポーターアッセイの比較：TF-1

細胞（造血細胞モデル）に pGL4.32 [luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] Vector (NF- κ B 応答配列を含むルシフェラーゼレポーター) を ViaFect™ Transfection Reagent または Amaxa Nucleofector® II (エレクトロポレーション) を用いてトランジェントにトランスフェクションした。TNF α で 6 時間 刺激した後に応答を Bio-Glo™ Luciferase Reagent を用いて測定した。



ViaFect™ によるヒト iPS 細胞への効率的なトランスフェクション

Cellular Dynamics 社の iCell® ヒト組織細胞を 96 ウェルプレートに播種したものを用いて実験を行った。A. iCell® 肝細胞に ViaFect™ を用いて試薬:DNA 比 6:1 で GFP レポータープラスミドをトランスフェクションし、トランスフェクション 1 日後に GFP の発現をイメージングした。B. iCell® 心筋細胞に ViaFect™ を用いて試薬:DNA 比 2:1 で GFP レポータープラスミドをトランスフェクションし、トランスフェクション 1 日後に GFP の発現をイメージングした。C. iCell® ドーパミン作動性神経細胞に ViaFect™ を用いて試薬:DNA 比 4:1 で GFP レポータープラスミドをトランスフェクションし、トランスフェクション 3 日後に GFP の発現をイメージングした。データは Cellular Dynamics International のご厚意により掲載。

製品名	サイズ	カタログ番号
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75ml	E4981
	2 × 0.75ml	E4982

※ 0.75ml は 24 ウェルプレートで約 500 ウェル分のトランスフェクションに十分な量です。

初代培養細胞での実績

初代培養細胞	動物種	文献
臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVCE)	ヒト	Yokota, Y. <i>et al.</i> (2015) Endothelial Ca ²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity <i>in vivo</i> . <i>eLife</i> 4, e08817.
ケラチノサイト	ヒト	Nakamura, T. <i>et al.</i> (2014) Epiprotein orchestrates epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. <i>J. Cell Sci.</i> 127, 5261–72.
腎近位 尿管上皮細胞	ヒト	Bethge, T. <i>et al.</i> (2015) Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. <i>J. Virol.</i> 89, 3396–411.
線維芽細胞	ヒト	Takahashi, M. <i>et al.</i> (2015) Normalization of overexpressed α -synuclein causing Parkinson's disease by a moderate gene silencing with RNA interference. <i>Mol. Ther. Nucleic Acids</i> 12, e241.
栄養膜細胞	ヒト	Straka, E. <i>et al.</i> (2016) Mercury toxicokinetics of the healthy human term placenta involve amino acid transporters and ABC transporters. <i>Toxicology</i> 340, 34–42.
皮質ニューロン	マウス	Egusa, S.F. <i>et al.</i> (2016) Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. <i>Neurosci. Res.</i> 105, 49–64.
胎児線維芽細胞	マウス	Peng, Y. <i>et al.</i> (2016) AGE-RAGE signal generates a specific NF- κ B RelA "barcode" that directs collagen I expression. <i>Sci. Rep.</i> 6, 18822.
骨髄由来マクロファージ	マウス	Naujoks, J. <i>et al.</i> (2016) IFNs modify the proteome of <i>Legionella</i> -containing vacuoles and restrict infection via IRG1-derived itaconic acid. <i>PLoS Pathogens</i> 12, e1005408.
肺マクロファージ	マウス	
生殖系幹細胞	マウス	Huang, Y. <i>et al.</i> (2015) Specific tandem 3' UTR patterns and gene expression profiles in mouse Thy1 ⁺ germline stem cells. <i>PLoS One</i> 10, e0145417.
内皮線維芽細胞	マウス	
大動脈平滑筋細胞	ラット	Horita, H. <i>et al.</i> (2016) Nuclear PTEN functions as an essential regulator of SRF-dependent transcription to control smooth muscle differentiation. <i>Nat. Comm.</i> 7, 10830.

参考文献

内容	使用製品	掲載ページ	文献著者・タイトル
タンパク質の安定性	NanoLuc® Stability Sensors for Cell Signaling	5	Hall, M.P., <i>et al.</i> (2012) Engineered luciferase reporter from a Deep Sea Shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. <i>ACS Chem. Biol.</i> 7, 1848-57. Narvaez, A.J., <i>et al.</i> (2017) Modulating protein-protein interaction of the mitotic Polo-like kinases to target mutant KRAS. <i>Cell Chem. Biol.</i> 24, 1017-28.
タンパク質 - タンパク質相互作用	NanoBRET™	6	Machleidt, T., <i>et al.</i> (2015) NanoBRET—A novel BRET platform for the analysis of protein-protein interaction. <i>ACS Chem. Biol.</i> 10, 1797-804. Miyakawa, K., <i>et al.</i> (2017) The tumour suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. <i>Nature Comm.</i> 8, 14259.
タンパク質 - タンパク質相互作用	NanoBiT®	8	Dixon, A.S., <i>et al.</i> (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. <i>ACS Chem. Biol.</i> 11, 400-8.
BRET ベースバイオセンサー	Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate	9	Yoshida, T., Kakizuka, A. and Imamura, H. (2016) BTeam, a novel BRET-based biosensor for the accurate quantification of ATP concentration within living cells. <i>Sci. Reports</i> 6, 39618. Yang, J. <i>et al.</i> (2016) Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca++ sensing. <i>Nature Comm.</i> 7, 13268.
ウイルス粒子の侵入と放出の定量	Nano-Glo® HiBiT Blotting System	10	Sasaki M., <i>et al.</i> (2018) Development of a rapid and quantitative method for the analysis of viral entry and release using a NanoLuc luciferase complementation assay. <i>Virus Res.</i> 243, 69-74.
RNA ウィルスゲノムへの HiBiT 挿入	Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10	Tamura, T., <i>et al.</i> (2018) Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses Possessing a Small Reporter Tag. <i>J Virol.</i> 92, e01582-17.
ゲノム編集による HiBiT のノックイン	Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	11	Oh-Hashi, K., <i>et al.</i> (2017) Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in Neuro2a cells. <i>Biochem Biophys Rep.</i> 12, 40-45.
タンパク質 - リガンド相互作用 (細胞内)	NanoBRET™ Target Engagement Assay	12	Robers, M.B., <i>et al.</i> (2015) Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. <i>Nature Comm.</i> 6, 10091.
タンパク質 - リガンド相互作用 (細胞表面)	NanoBRET™ Target Engagement Assay	12	Stoddart, L.A., <i>et al.</i> (2015) Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. <i>Nature Meth.</i> 12, 661-3. Robers, M. B., <i>et al.</i> (2015) A luminescent assay for real-time measurements of receptor endocytosis in living cells. <i>Anal. Biochem.</i> 489, 1-8.
生細胞でのキナーゼプロファイリング	NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay	12	Vasta, J.D., <i>et al.</i> (2018) Quantitative, wide-spectrum kinase profiling in live cells for assessing the effect of cellular ATP on target engagement. <i>Cell Chem. Biol.</i> 25, 206-214.
タンパク質 - DNA 相互作用	HaloCHIP™ System	13	Hartzell, D. D., <i>et al.</i> (2009) A functional analysis of the CREB signaling pathway using HaloCHIP-chip and high throughput reporter assays, <i>BMC Genomics</i> , 10, 497
タンパク質 - タンパク質相互作用	HaloTag® Pull-Down System, NanoBRET™	14	Moriya, C., <i>et al.</i> (2018) PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90 α and glucose-regulated protein 78. <i>Cancer Sci.</i> 109, 373-383.
1 分子ライブセルイメージング	HaloTag® TMR Ligand	19	Miyana, Y., <i>et al.</i> (2009) Single-Molecule Imaging Techniques to Visualize Chemotactic Signaling Events on the Membrane of Living Dictyostelium Cells. <i>Methods in Molecular Biology</i> 571, 417-435.
膜タンパク質の精製	HaloTag® Mammalian Protein Purification System	21	Toyosima, C., <i>et al.</i> (2013) Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg2+-bound E1 state. <i>Nature</i> 495, 260-4.
タンパク質に結合する RNA の網羅的解析	HaloTag® Mammalian Protein Purification System	21	Yokoshi, M., <i>et al.</i> (2014) Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression. <i>Molecular Cell</i> 55, 186-198.
高発現株の選抜、精製、活性測定	HaloTag® Mammalian Protein Purification System	21	Ohana, R. F., <i>et al.</i> (2011) HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. <i>Protein Expr Purif.</i> 76, 154-64.
ゲノムワイド転写因子結合部位のマッピング (DAP-Seq)	Magne™ HaloTag® Beads	22	Bartlett, A., <i>et al.</i> (2017) Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq. <i>Nat Protoc.</i> 12, 1659-1672.
かずさ cDNA コレクション	Flexi® HaloTag® Clone	23	Nagase, T., <i>et al.</i> (2008) Exploration of human ORFeome: high-throughput preparation of ORF clones and efficient characterization of their protein products. <i>DNA Res.</i> 15, 137-149.

日本語 Web site : www.promega.co.jp

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

プロメガ株式会社

本社 〒103-0001
東京都中央区日本橋小伝馬町1-5 PMO日本橋江戸通ビル 7F
Tel. 03-3669-7981

大阪事務所 〒541-0051
大阪市中央区備後町4-1-3 御堂筋三井ビルディング
Tel. 06-6202-4581

※製品の仕様、価格については 2023 年 12 月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店