

※旧プロトコール HaloTag2 での実績より

1: 細胞染色（一次抗体、二次抗体を使わずに発現タンパク質を検出できる）

1. 細胞を $7.5-50 \times 10^3$ cells/cm² 位の密度で 8-well chamber などに蒔く。
2. 85%コンフルエントくらいになるまで培養する(24-48 時間)。
3. HaloTag[®] 融合タンパク質を発現するベクターをトランスフェクションする。
4. トランスフェクション後、24-72 時間培養する。
5. HaloTag[®] TMR, diAcFAM, Oregon Green[®], Coumarin ligand を培養液で 200 倍に希釈する(1 μ l of ligand + 199 μ l 培地; ストック溶液)。
6. 希釈したリガンド(5x ストック溶液)を培養している細胞に加える(80 μ l 培地 + 20 μ l ストック溶液)。
7. 37°Cで 15 分間(5% CO₂) インキュベーションする。
8. リガンドを含んだ培地をのぞき、培養した培地等量以上の暖めた PBS で細胞を 3 回洗浄する。
9. 培地を加えてさらに 30 分間培養(37°C, 5% CO₂)して、細胞内のリガンドをのぞく。
10. (オプション) 培地をのぞいて、暖めた PBS で洗浄し、細胞を観察する。
11. 培地をのぞき、暖めた PBS で洗浄後、培地と等量の暖めた 4% paraformaldehyde/0.2M sucrose/PBS (pH7.5)を加える。
12. 37°C で 10 分間、反応する。
13. 固定液を除き、等量の PBS + 0.1% Triton X-100 を加え、37°Cで 10 分間処理する。
14. さらに PBS で洗浄する。
15. 顕微鏡で観察し、蛍光画像を取得する。

2: Cell-To-Gel Analysis(発現したタンパク質を抗体を使わずに SDS-PAGE で解析)

1. 24-well プレートに細胞密度が $1.2-1.4 \times 10^5$ cells/well になるように蒔く。
2. 培地を加え培養液が 1000 μ l/well になるようにして、37°C, 5% CO₂ で培養する。
3. HaloTag[®] 融合タンパク質を発現するベクターをトランスフェクションする。
4. 24-72 時間培養する。
5. 培地にリガンド溶液を加え 5 μ M の HaloTag[®] TMR Ligand Solution を用意する。
6. 培地を除き、200 μ l の 5 μ M HaloTag[®] TMR ligand を含む培養液を加える。
7. 37°Cで 15 分間(5% CO₂) インキュベーションする。
8. リガンドを含む培養液を除く。
9. 細胞を暖めた PBS で 2 回洗浄する(1ml x 2)。
10. PBSを除き、200 μ l の 1x SDS sample buffer を各 well に加えて、ライセートを回収する。回収したライセートは、1.5ml チューブに移し、95°Cで 5 分間処理する(リガンドは解離しない)。
11. 10 μ l のサンプルを泳動する(SDS-PAGE)。
12. ゲルは乾燥せずに、蛍光スキャナーを使って解析する(555 Ex / 585 Em)。

(その他の情報)

- 96-well plate で観察まで行う場合、プラスチックの製品だと蛍光リガンドが非特異的にプラスチックに結合し、観察する場合のバックグラウンドの上昇が観察される。Greiner Bio-One 社の SensoPlatesTM (#655892)などのガラスボトムのプレートを推奨する。
- リガンドの濃度は、5 μ M を推奨しているが、HaloTag7 では、リガンドとの結合定数も高く、実際には 1 μ M での染色実績もある(論文参照)。
- diAcFAM, Oregon Green Ligand 血清を含む培地に希釈した場合、血清に含まれるエステラーゼにより切断されるので、希釈後速やかに使用する。
- HaloTag7 も HaloTag 抗体によって認識する。HaloTag 抗体は、WesternBlot や Immunohistochemistry(IHC), FACS には使用できる。免疫沈降は未確認。

