

## 2 x 10<sup>8</sup> 個の細胞からの HaloTag® タンパク質精製

### <細胞溶解>

1. 細胞ペレットを 5ml の HaloTag® Purification Buffer に懸濁する。
2. 100µl の 50X Protease Inhibitor Cocktail を加える。
3. 氷上で超音波処理する。  
\*その他の細胞溶解法は英文マニュアル#TM348 をご覧ください。
4. ライゼートを遠心 (10,000xg、15 分間、4℃) し、上清を回収する。

### <レジンの平衡化>

5. 600µl の HaloLink™ Resin を遠心チューブに移す。
6. 遠心 (1,500xg、5 分間) し、上清を捨てる。
7. レジンを 5 回洗浄する。
  - a. 5ml の HaloTag® Purification Buffer を加え、5 分間混合する。
  - b. 1500xg、5 分間遠心し、上清を捨てる。

### <結合>

8. ライゼートを平衡化したレジンに加える。
9. 室温 (22-25℃) で 90 分間混合する。
10. 遠心 (1,500xg、5 分間) し、上清をサンプルとして別チューブに移し保存しておく。

### <洗浄>

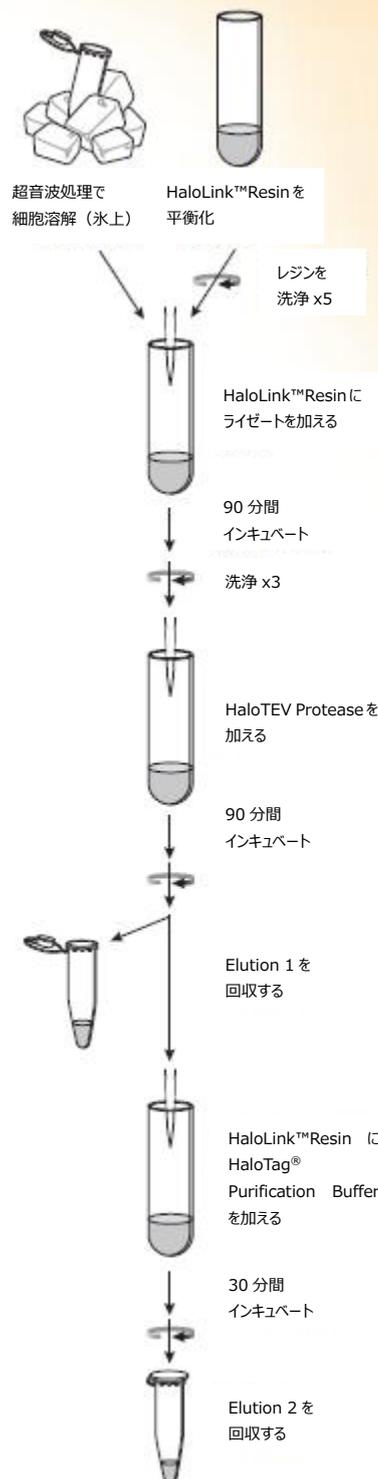
11. レジンを 3 回洗浄する。
  - a. 5ml の HaloTag® Purification Buffer を加え、室温で 10 分間混合する。
  - b. 1500xg、5 分間遠心し、上清を捨てる。

### <HaloTag®の切断>

12. 9µl の HaloTEV Protease と 291µl の HaloTag® Purification Buffer を混合する。
13. レジンに加え、室温 (22-25℃) で 90 分間混合する。

### <溶出>

14. 遠心 (1,500xg、5 分間) し、上清をサンプルとして別チューブに移す (Elution 1)。
15. レジンに 300µl の HaloTag® Purification Buffer を加え、室温 (22-25℃) で 30 分間混合する。
16. レジンをスピニングカラムに移し、遠心 (10,000xg、15 秒間) し、上清を別チューブに移す (Elution 2)。
17. Elution 1 と Elution 2 を遠心 (10,000xg、1 分間) し、新しいチューブに移す。



## HaloTag<sup>®</sup> 融合タンパク質の検出

### 蛍光ラベリング

HaloTag<sup>®</sup> 融合タンパク質を HaloTag<sup>®</sup> TMRDirect™ Ligand で蛍光ラベリングすることで、迅速・簡単にタンパク質発現量や精製効率をチェックできます。

1. HaloTag<sup>®</sup> TMRDirect™ Ligand stock solution (100 $\mu$ M) を DMSO で 2 倍に希釈し、50 $\mu$ M の working solution を作製する。遮光して -20 $^{\circ}$ C で保存する。  
\* PBS で希釈することもできますが、保存ができなくなります。
2. 10 $\mu$ l の HaloTag<sup>®</sup> 融合タンパク質を含むライゼートに、19  $\mu$ l の HaloTag<sup>®</sup> Purification Buffer と 1  $\mu$ l の 50 $\mu$ M HaloTag<sup>®</sup> TMRDirect™ Ligand を加える。  
\* ライゼートの代わりに等量の非結合分画を使用することもできます。
3. 遮光し、室温で 15 分間インキュベートする。
4. 10  $\mu$ l の 4x SDS gel loading buffer を加え、70 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱する。
5. 10  $\mu$ l を SDS ポリアクリルアミドゲルに供す。
6. 電気泳動後、蛍光イメージャー (Typhoon<sup>®</sup> など) でスキャン (励起波長 532nm、蛍光波長 580nm) し、バンドの蛍光強度を定量する。

