

2 x 10⁸ 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 (10,000×g、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 (1,500×g、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. 1500×g、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** 混合する。
10. 遠心 (1,500×g、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＞

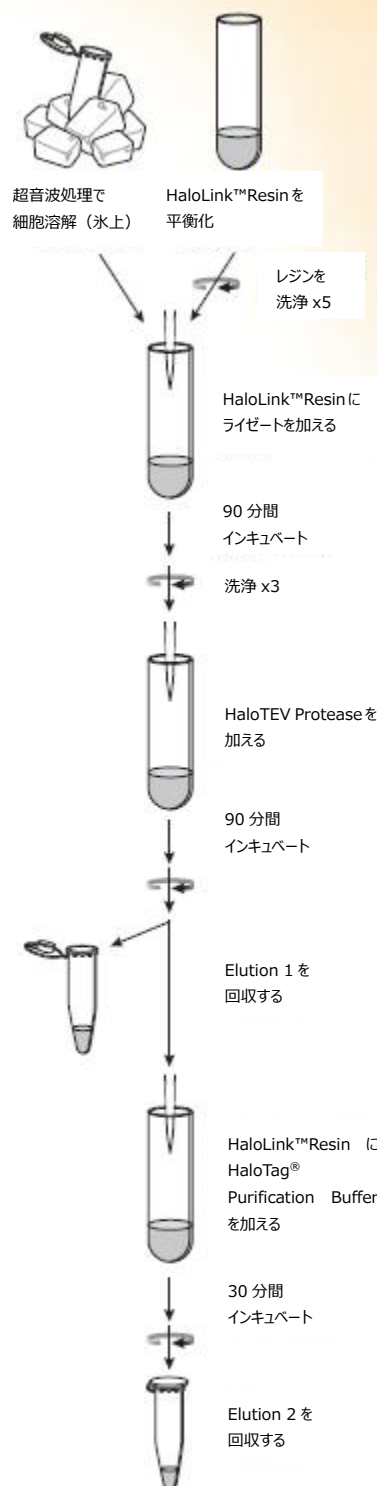
11. レジンを 3 回洗浄する。
 - a. **5ml** の **HaloTag® Purification Buffer** を加え、室温で 10 分間混合する。
 - b. 1500×g、5 分間遠心し、上清を捨てる。

＜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** 混合する。

＜溶出＞

14. 遠心 (1,500×g、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** 混合する。
16. レジンをスピナラムに移し、遠心 (10,000×g、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 (10,000×g、1 分間) し、新しいチューブに移す。



HaloTag® 融合タンパク質の検出

蛍光ラベリング

HaloTag® 融合タンパク質を HaloTag® 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® TMRDirect™ Ligand stock solution (100μM) を DMSO で 2 倍に希釈し、50μM の working solution を作製する。遮光して -20℃ 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. 10μl の HaloTag® 融合タンパク質を含むライゼートに、19 μl の HaloTag® Purification Buffer と 1 μl の 50μM HaloTag® 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 μl の 4x SDS gel loading buffer を加え、70℃ で 3 分間加熱する。
5. 10 μl 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® 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。

