

中文说明书

HaloTag[®] Technology: Focus on Imaging

适用产品目录号:

G2991、G3221、G1001、G1002、G2801、G2802、G8251、
G8252、G8272、G8273、G8581、G8582、G8471、G8472、
G9281、G9211、GA1110、GA1111、GA1120、GA1121、
HT1010, HT1020, HT1030, HT1040, HT1050, HT1060, HT1070,
HT1100, HT1110, P1691、P6751、P6741 和 P6711。



HaloTag[®] Technology: Focus on Imaging

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. HaloTag [®] 技术和细胞成像介绍	2
2. 产品组分和储存条件	4
2. A. 荧光配基	4
2. B. 可定制的反应性配基	9
3. 制备 HaloTag [®] 融合蛋白	10
3. A. 从经过表达验证的 HaloTag [®] ORF 克隆开始	10
3. B. 自行创建 HaloTag [®] 融合蛋白	10
4. 哺乳动物活细胞标记、细胞固定、ICC、SDS-PAGE、流式细胞术与成像	11
4. A. 快速标记 (15–60 分钟)	11
4. B. 免洗 (No-Wash) 标记 (过夜)	14
4. C. 使用 Janelia Fluor [®] HaloTag [®] 配基进行快速、免洗标记 (15 分钟至过夜)	15
4. D. 使用 1nmol Janelia Fluor [®] 及 Janelia Fluor [®] JFX 系列 HaloTag [®] 配基进行快速标记	17
4. E. 脉冲追踪 (Pulse-Chase) 标记	19
4. F. 标记后固定细胞	22
4. G. 使用免疫细胞化学 (ICC) 技术和 HaloTag [®] 进行叠加检测	23
4. H. 通过 SDS-PAGE 分析定量 HaloTag [®] 融合蛋白	26
4. I. 流式细胞术分析	28
5. 使用 HaloTag [®] 单克隆抗体进行蛋白检测 (Western Blotting)	30
6. 如何从 Building Blocks 生成 HaloTag [®] 配基	32
6. A. 报告基团标记的通用方案 (结合至 2-[(6- 氯己氧基) - 乙氧基]- 乙胺)	32
6. B. 使用 HaloTag [®] 胺配基进行蛋白标记	32
6. C. 使用 HaloTag [®] 琥珀酰亚胺酯配基进行抗体标记	33
6. D. 生成 Alexa Fluor [®] 488 HaloTag [®] 配基的具体示例方案	33
7. 标记哺乳动物细胞裂解物中的蛋白或在无细胞系统中表达的蛋白	34
8. 标记大肠杆菌裂解物以分析蛋白表达水平	35
8. A. 在大肠杆菌中表达 HaloTag [®] 融合蛋白	35
8. B. 标记大肠杆菌裂解物以分析蛋白表达水平	36
8. C. 标记大肠杆菌裂解物用于成像分析	37
9. 一般信息、建议和疑难解答	39
9. A. 一般信息	39
9. B. 缓冲液和溶液组成	41
9. C. 疑难解答	42
9. D. 引用文献和其他参考文献	43
10. 相关产品	45
11. 内容变更总结	46

1. HaloTag® 技术和细胞成像介绍

了解蛋白质的功能作用及其在细胞内的相互作用越来越重要。通常需要多个重组蛋白融合体才可完成这项研究，而且由于在不同应用之间的转换效率较低，因此有时进展缓慢且繁琐。因此，需要有一种可在表达和定位、蛋白纯化、蛋白相互作用研究、筛选和进一步功能分析等应用之间自由切换的重组蛋白标签。

HaloTag® 平台^(a-h) 可满足对功能性蛋白分析灵活性的要求。此模块化技术基于融合标签和合成配基之间共价键的形成，旨在全面表征细胞和生化环境中的蛋白质功能。我们提供可用于荧光细胞成像和蛋白捕获 / 纯化的多种 HaloTag® 配基^(a-g) 和试剂盒，此外还提供可定制的反应性 Ligand Building blocks^(e,f,g)。

HaloTag® 报告基因蛋白是一种经基因工程改造、无催化活性的水解酶衍生物，可与 HaloTag® 配基形成共价键（图 1）。在生理条件下，此共价键会迅速形成，并具有高度特异性且基本不可逆，所形成的复合物即使在严格的（stringent）条件下稳定性也很好（1-3）。HaloTag® 蛋白是 33kDa 的单体蛋白，在哺乳动物、植物或大肠杆菌细胞中均没有内源表达。因此，不存在任何非特异性活性，仅存在高标记特异性。此技术已成功应用于多种系统，具体包括：哺乳动物细胞（4）、细菌（5）、酵母（6）、植物（7）和动物模型（8）。

使用 HaloTag® 荧光配基进行细胞成像的优势

通过对标记实验进行时间和空间控制从而提高精确度：HaloTag® 技术的模块化性质以及与配基的快速结合动力学，可实现对蛋白运输和周转的直接成像。由于可用配基的荧光光谱不同且有细胞渗透性和非渗透性配基可供选择，因此用户可对标记实验进行空间和时间控制。例如，研究人员仅需使用不具有细胞渗透性的配基即可对膜结合蛋白的表面池进行标记，并监测其生物学、内化或其他进程。或者，可先使用特定“颜色”的配基对蛋白进行标记，然后过一段时间再使用含不同颜色染料的配基对蛋白进行标记。这种脉冲追踪（pulse-chase）标记可实现直接观测蛋白质随时间的运输和 / 或周转。

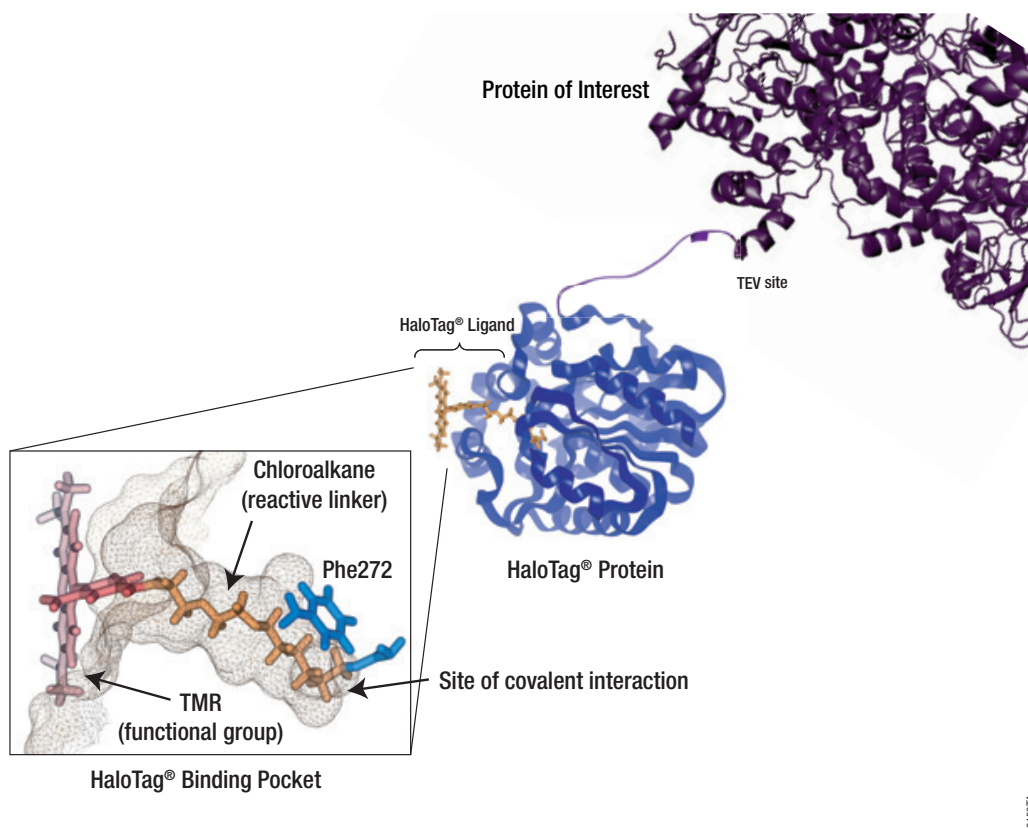


图 1. HaloTag® 融合蛋白，显示了与 TEV 位点成比例的连接臂以及与 HaloTag® 配基共价相互作用的结合口袋。

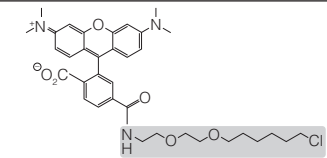
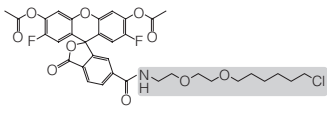
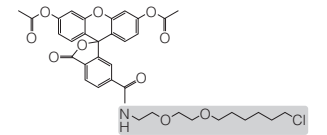
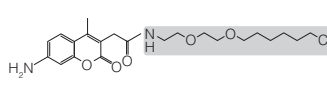
标记活细胞，然后再对活细胞或固定细胞进行成像和 / 或直接进行凝胶定量分析：所有 HaloTag® 荧光配基均可用于活细胞标记和成像分析。根据您的工作流程的需求，可以用一个洗涤步骤（1 小时内）快速完成标记或采用免洗操作方案进行过夜标记。由于 HaloTag® 融合蛋白和配基之间共价键的稳定性以及染料本身的稳定性均很好，因此对用标准免疫细胞化学方案操作过的固定细胞也可进行成像。由于稳定性好，还可使用 SDS-PAGE 和荧光扫描仪直接分析标记的细胞。

仅需设计一种基因构建体，即可用于多种应用场景：无需设计和克隆新的表达构建体便可获得新功能。除用于细胞成像外，相同的融合蛋白还可以经纯化成为单个纯蛋白，或者与其结合伴侣一起 pull down 下来以研究新的蛋白相互作用。HaloTag® Purification and Pull-Down 系统使用 HaloLink™ 树脂替代 HaloTag® 荧光配基，能够高效捕获和回收 HaloTag® 融合蛋白或复合物。

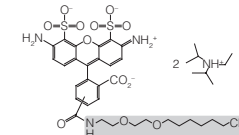
2. 产品组分和储存条件

2.A. 荧光配基

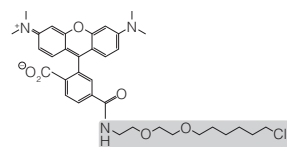
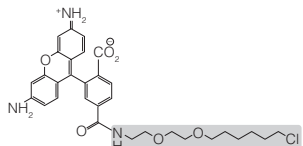
细胞渗透性“快速”配基（用于细胞内标记）

产品	规格	目录号	结构
HaloTag® TMR Ligand	15µl	G8252	
	30µl	G8251	
HaloTag® Oregon Green® Ligand	15µl	G2802	
	30µl	G2801	
HaloTag® diAcFAM Ligand	15µl	G8273	
	30µl	G8272	
HaloTag® Coumarin Ligand	15µl	G8582	
	30µl	G8581	

非细胞渗透性“快速”配基（用于细胞表面标记）

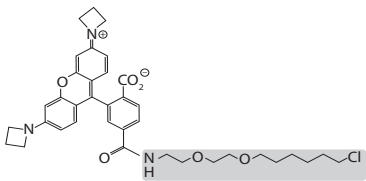
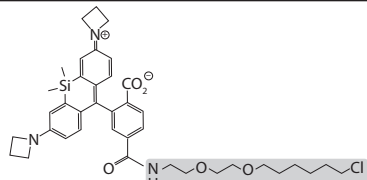
产品	规格	目录号	结构
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	15µl	G1002	
	30µl	G1001	
HaloTag® Alexa Fluor® 660 Ligand ^(d)	15µl	G8472	结构图无法获得
	30µl	G8471	

细胞渗透性“免洗”配基（用于细胞内标记）

产品	规格	目录号	结构
HaloTag® TMRDirect™ Ligand	30μl	G2991	
HaloTag® R110Direct™ Ligand	30μl	G3221	

储存条件：所有 HaloTag® 配基均应在 -30℃到 -10℃、避光条件下储存。避免反复冻融和频繁温度变化，因为此类变化会显著影响产品的稳定性。我们建议在以正确方式储存之前，先将配基进行分装。有关失效日期的信息，请参见产品标签。

细胞渗透性“快速、免洗”配基（用于细胞内标记；溶于 DMSO 的固体配基）

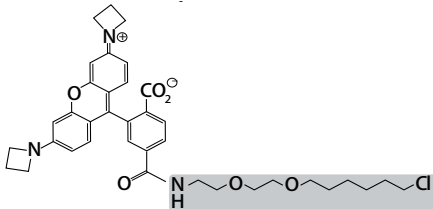
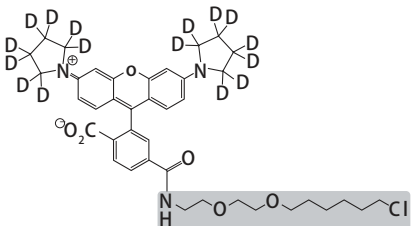
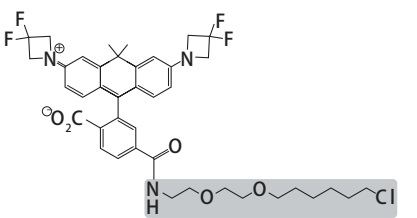
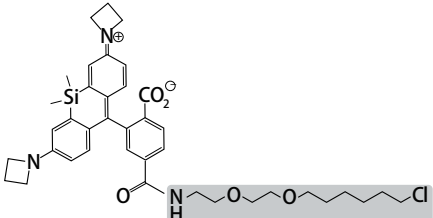
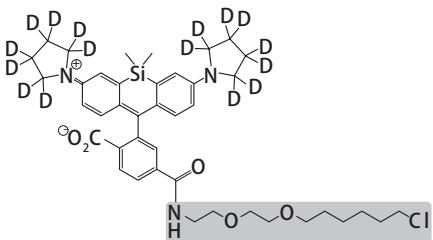
产品	规格	目录号	结构
Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand ^(a-c)	5μg	GA1110	
	3x5μg	GA1111	
Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand ^(a-c)	5μg	GA1120	
	3x5μg	GA1121	

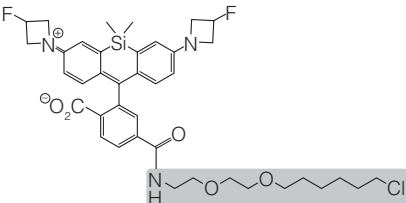
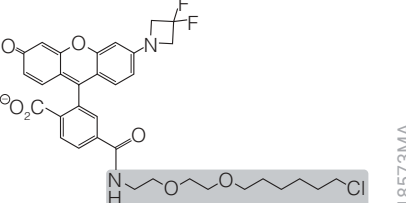
储存条件：将 Janelia Fluor® HaloTag® 配基在 -30℃至 -10℃、避光条件下储存。

注意：Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配基和 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基仅供单次使用。不可储存重悬的 Janelia Fluor® HaloTag® Ligands。

2.A. 荧光配基（续）

细胞渗透性“快速、免洗”配基（用于细胞内标记；1nmol 规格的配基；在水性缓冲液中溶解）

产品	规格	目录号	结构
Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand ^(a-c)	5 × 1 vial	HT1020	
Janelia Fluor® JFX554 HaloTag® Ligand	5 × 1 vial	HT1030	
Janelia Fluor® 585 HaloTag® Ligand	5 × 1 vial	HT1040	
Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand ^(a-c)	5 × 1 vial	HT1060	
Janelia Fluor® JFX650 HaloTag® Ligand	5 × 1 vial	HT1070	

产品	规格	目录号	结构
Janelia Fluor® 635 HaloTag® Ligand	5 × 1 vial	HT1050	
Janelia Fluor® 503 HaloTag® Ligand	5 × 1 vial	HT1010	

产品	规格	目录号
Janelia Fluor® HaloTag® Red Sample Pack	3 vials	HT1100

包括：

- 1 vial Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand
- 1 vial Janelia Fluor® JFX554 HaloTag® Ligand
- 1 vial Janelia Fluor® 585 HaloTag® Ligand

产品	规格	目录号
Janelia Fluor® HaloTag® Far Red Sample Pack	3 vials	HT1110

包括：

- 1 vial Janelia Fluor® 635 HaloTag® Ligand
- 1 vial Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand
- 1 vial Janelia Fluor® JFX650 HaloTag® Ligand

储存条件：将 Janelia Fluor® 和 Janelia Fluor® JFX HaloTag® Ligands 在 -30℃到 -10℃、避光条件下储存。

注意：所有的 Janelia Fluor® 和 Janelia Fluor® JFX HaloTag® Ligands 仅供单次使用。不可储存重悬的 Janelia Fluor® 和 Janelia Fluor® JFX HaloTag® Ligands。

2.A. 荧光配基（续）

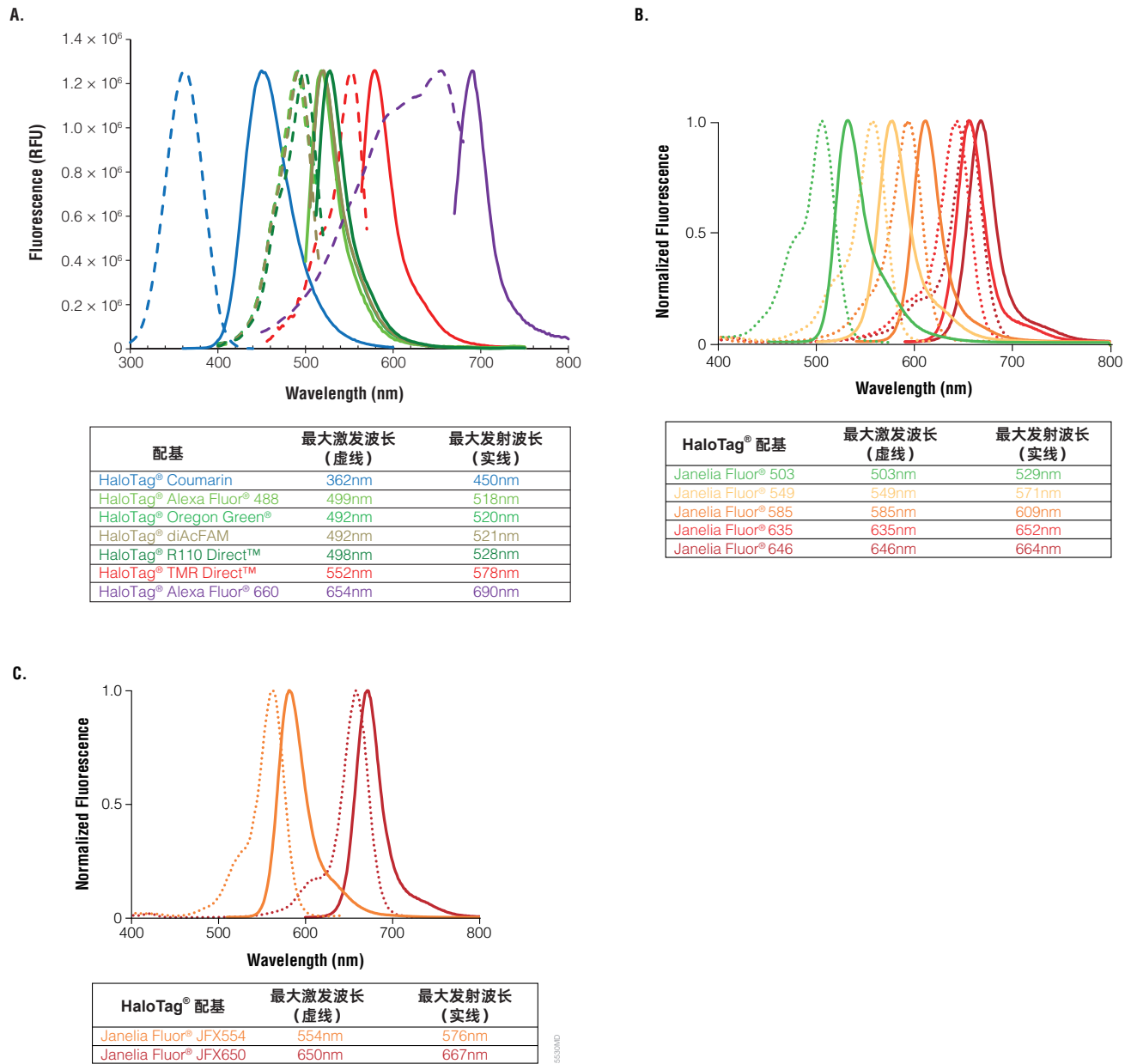
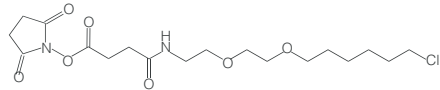
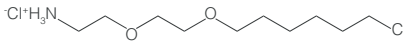
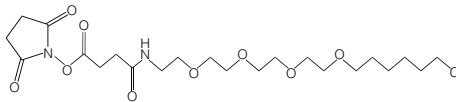
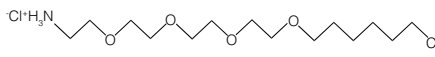


图 2. HaloTag® 配基的激发和发射光谱及表格。 **A.** 表中所列的 HaloTag® diAcFAM 和 Oregon Green® 配基的波长是在二乙酰基水解后所产生的波长。Alexa Fluor® 488 和 Oregon Green® 配基的光谱相同，并且相互重叠。当 pH ≤ 4.0 时，HaloTag® Alexa Fluor® 660 配基的荧光发射信号会降低，而且在此低 pH 值下其吸光度峰也会发生变化。**B.** 生成 Janelia Fluor® HaloTag® 配基的激发和发射光谱，并归一化为峰荧光信号。**C.** 生成 Janelia Fluor® JFX HaloTag® Ligands 的激发和发射光谱，并归一化为峰荧光信号。

2.B. 可定制的反应性配基

HaloTag® Ligand Building Blocks

产品	规格	目录号	结构
HaloTag® Succinimidyl Ester (O2) Ligand	5mg	P1691	
HaloTag® Amine (O2) Ligand	5mg	P6711	
HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand	5mg	P6751	
HaloTag® Amine (O4) Ligand	5mg	P6741	

储存条件：将目录号为 P1691 和 P6751 的产品储存于 -70°C 或以下的情性环境中。将目录号为 P6711 和 P6741 的产品存放于 -30°C 到 -10°C，并置于密封容器中避光储存。

HaloTag® 抗体

产品	规格	浓度	目录号
Anti-HaloTag® pAb	200µg	1mg/ml	G9281
Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody (for Westerns)	200µg	1mg/ml	G9211

注意：第 10 节“相关产品”中提供了 HaloTag® Purification and Pull-Down 系统及试剂（包括生物素配基）的完整列表。

3. 制备 HaloTag® 融合蛋白

3.A. 从经过表达验证的 HaloTag® ORF 克隆开始

Promega 公司与 Kazusa DNA 研究所合作，为客户提供经表达验证的 HaloTag® ORF 克隆。将一个基因的蛋白质编码区克隆到载体中并对其进行验证需大量时间，而且在验证克隆之前经常有很高的失败率。为避免客户浪费时间，Promega 公司与 Kazusa 合作生产了预构建好并且经过实验室验证的 ORF 克隆。这些克隆与 HaloTag® 蛋白分析和 TnT® T7 无细胞表达技术兼容，并且还针对这些技术进行了优化。此外，使用 Flexi® 克隆系统可轻松将这些经验证的 ORF 克隆转移至其他载体中。

如需查找预先克隆至 HaloTag® 载体中并经过验证的蛋白，请访问网站：www.promega.com/FindMyGene

3.B. 自行创建 HaloTag® 融合蛋白

常规克隆至多克隆位点区

pHTN HaloTag® CMV-neo 载体（目录号 G7721，用于 N 端 HaloTag® 融合）和 pHTC HaloTag® CMV-neo 载体（目录号 G7711，用于 C 端 HaloTag® 融合）为非 Flexi HaloTag® 载体，两者具有相同的多克隆位点区，适用于在哺乳动物细胞中表达以 CMV 启动子驱动、具有 N 端或 C 端标签的 HaloTag® 融合蛋白。此外，这些载体含新霉素（G418）选择盒，从而可以通过抗生素选择建立表达融合蛋白的稳定细胞系。由于存在多克隆位点区，因此用户可将 HaloTag® 蛋白和接头（linker）序列转移至任何所选载体中。

Flexi® 克隆方法

Flexi® 载体系统是一种用于定向克隆蛋白编码序列的方法。此方法基于稀有限制性内切酶 SgfI 和 PmeI，可以快速、高保真的方式转移蛋白编码区，而无需重新测序。所有 Flexi® 载体均携带致死性 barnase（解淀粉芽孢杆菌核糖核酸酶）基因，该基因可被目的 DNA 片段取代，为成功连接插入片段提供了阳性筛选。我们建议先克隆至 N 端载体（例如 pFN28A HaloTag® CMV-neo Flexi® 载体，目录号 G8441），如有需要，后续再转移至 C 端载体（例如 pFC27K HaloTag® CMV-neo Flexi® 载体，目录号 G8431）。

4. 哺乳动物活细胞标记、细胞固定、ICC、SDS-PAGE、流式细胞术与成像

4.A. 快速标记（15–60 分钟）

此方案适用于使用 HaloTag® TMR、diAcFAM、OregonGreen®、Coumarin（香豆素）、AlexaFluor® 488 或 AlexaFluor® 660 配基对活细胞进行标记。

代表性数据如图 3 和图 4 所示。

用户需提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

- 装有表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞的腔室盖玻片（chambered cover glass）
- 适用于您所用细胞的完全培养基（37°C）
- 无酚红培养基，37°C（可选）
- 1X PBS（pH7.5，用于洗涤，可选）
- 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场（wide-field）荧光显微镜（请参见第 9.A 节和图 2）
- 37°C，CO₂ 细胞培养箱

1. 在即将加入细胞前，先使用预温培养基制备 HaloTag® 配基稀释液（1：200）。本溶液为 5X 工作储备液。
2. 使用 5X HaloTag® 配基工作储备液替换 1/5 体积的现有培养基，并轻轻混匀，以标记细胞。

此步骤可制得建议的最终标记浓度的配基（5μM TMR；3.5μM Alexa Fluor® 660；1μM diAcFAM、Oregon Green® 或 Alexa Fluor® 488 以及 10μM 香豆素）。

3. 在 37°C，CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟。
4. 对于细胞渗透性配基，请使用等体积（或更多）的新鲜预温培养基（或 1X PBS [pH 7.5]）轻轻替换含配基的培养基。重复此步骤两次，最后使用预温的完全培养基洗涤，总共进行三次彻底的洗涤，然后继续进行步骤 5。

对于非细胞渗透性配基（含 AlexaFluor® 的配基），使用等体积（或更多）的新鲜预温培养基替换含配基的培养基两次，然后继续进行步骤 7。由于这些配基无细胞渗透性，因此无需洗涤未结合的配基。

5. 将完全培养基中的细胞置于 37°C，CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 分钟，以洗涤未结合的配基。
6. 使用等体积的新鲜预温培养基替换前一步骤中的完全培养基。使用无酚红培养基可改善成像结果。
7. 转移至显微镜处，并捕获图像。

4.A. 快速标记（15–60 分钟；续）

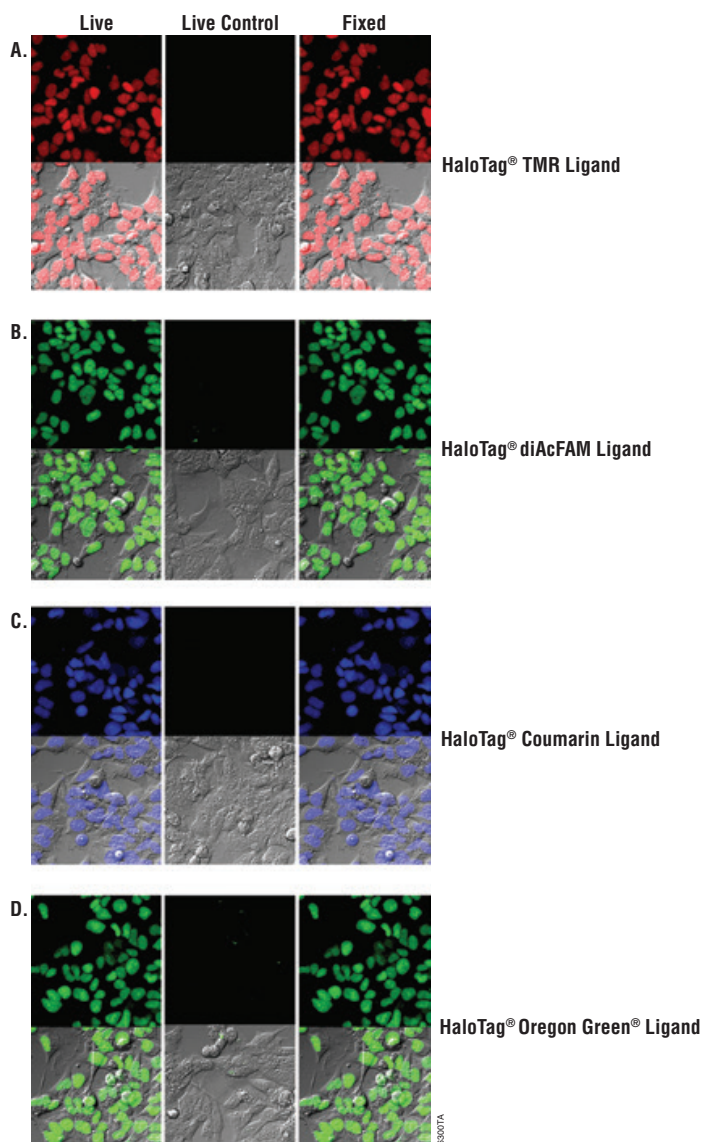


图 3. 先用 HaloTag® 配基标记活细胞，然后再固定。如第 4.A 节中所述，使用 HaloTag® TMR (A)、HaloTag® diAcFAM (B)、HaloTag® Coumarin (C) 或 HaloTag® Oregon Green® 配基 (D) 标记用 HaloTag® 基因（与三个拷贝的核定位序列融合）稳定转染的 HEK293 细胞和未经转染的 HEK293 对照。各图所示的稳定转染细胞的标记部位均仅限于细胞核。未转染细胞（图中所示的活细胞对照）未显示标记。对于 HaloTag® TMR、diAcFAM 和 Oregon Green® 配基标记的细胞，使用了 Olympus FV500 共聚焦显微镜（配有适宜滤光片组）收集图像。对于 HaloTag® 香豆素配基，使用了 DAPI 滤光镜和 CCD 相机（Hamamatsu Orca）与落射荧光照明技术收集图像。各图的第一行仅为荧光信号，底部一行是有荧光信号叠加的微分干涉差（DIC）。

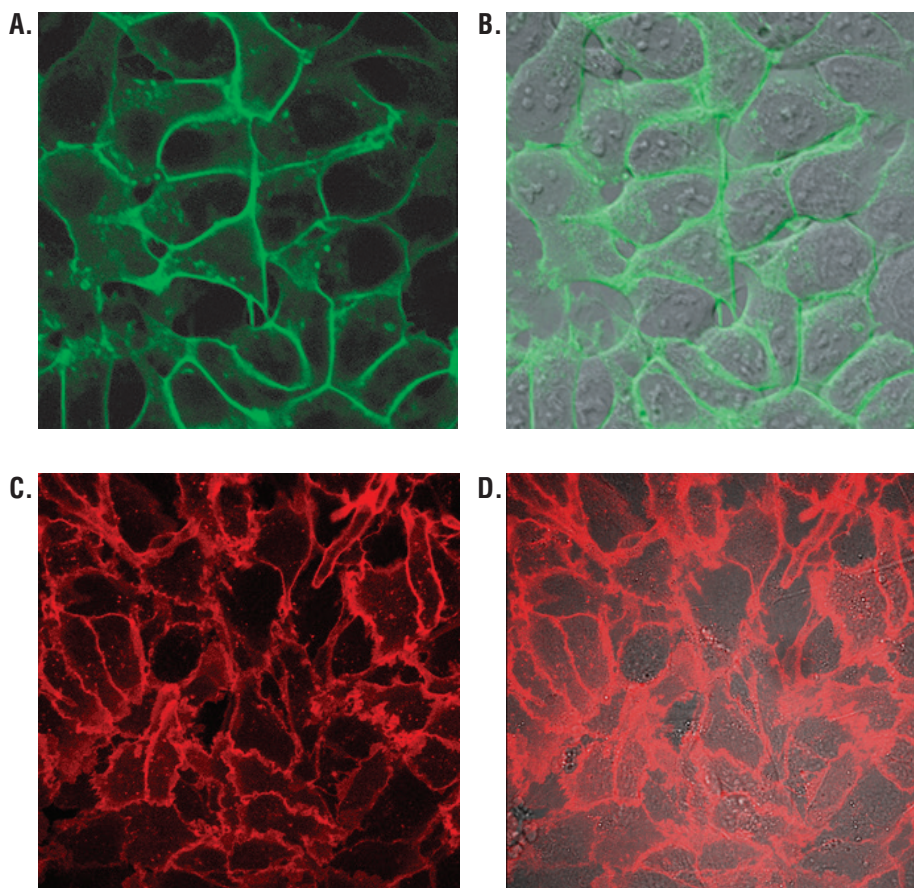


图 4. 对细胞表面 HaloTag[®] 融合蛋白进行活细胞标记。 **A 和 B** 显示了稳定表达 HaloTag[®]-ECS (Extra Cellular Surface; 由信号序列和 β 1-integrin 的单个跨膜区组成) 融合蛋白的 HEK293 细胞的图像, 此图像是通过用 HaloTag[®] Alexa Fluor[®] 488 配基标记细胞然后再进行成像而得。 **C 和 D** 显示了表达 HaloTag[®]-EDG1 (GPCR 受体) 融合蛋白的 U2OS 细胞的图像, 此图像是通过用 Alexa Fluor[®] 660 配基标记细胞然后再进行成像而得。所有的标记步骤均按照第 4.A 节所述进行。共聚焦图像显示荧光 (**A 和 C**) 仅存在于细胞表面, 这在 DIC/ 荧光叠加图 (**B 和 D**) 中也清晰可见。图像是在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适当的滤光片组生成的。

4.B. 免洗 (No-Wash) 标记 (过夜)

此方案适用于用具有细胞渗透性的 HaloTag® TMRDirect™ 或 R110Direct™ 配基进行活细胞标记。此方案可用于标记贴壁或非贴壁细胞。标记时，贴壁细胞可为铺板状态或悬浮状态。代表性数据如图 5 所示。

注意：我们不建议将 HaloTag® TMR 配基（目录号 G8251、G8252）用于此方案。

需用户提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

- 表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞（悬浮细胞或铺板细胞）
 - 腔室盖玻片（chambered cover glass）或其他细胞培养设备
 - 适用于您所用细胞的完全培养基（37°C）
 - 无酚红培养基（可选），37°C
 - 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场（wide-field）荧光显微镜（请参见第 9.A 节和图 2）
 - 37°C，CO₂ 细胞培养箱
1. 在即将加入细胞前，先使用预温培养基制备 HaloTag® TMRDirect™ 或 R110Direct™ 配基稀释液（1: 200）。本溶液为 5X 工作储备液。
 2. 贴壁细胞：使用 5X HaloTag® 配基工作储备液替换 1/5 体积的现有培养基并轻轻混匀。
细胞悬液：将 5X 配基工作储备液加入细胞悬液中，使之最终浓度为 1X。
步骤 2 制得溶液为 100nM（建议的最终标记浓度）的 HaloTag® TMRDirect™ 或 R110Direct™ 配基。
 3. 将细胞铺板（如有必要），并在 37°C，CO₂ 细胞培养箱中孵育过夜。
 4. 使用等体积（或更多）的新鲜预温培养基轻轻替换含配基的培养基，或固定细胞（用于终点检测；请参见第 4.E 节）。
 5. 转移至成像设备处，并捕获图像。

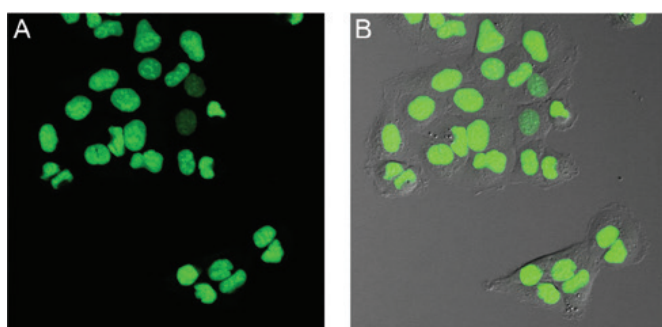


图 5. 免洗活细胞标记可产生很高的信噪比和特异性。如第 4.B 节所述，用 HaloTag® R110Direct™ 配基对稳定表达 HaloTag® 蛋白（其与三个拷贝的核定位序列融合）的 U2OS 细胞进行标记。HaloTag® 标记显示出很高的信噪比和特异性：标记仅限于所有细胞的细胞核。**A** 显示了用 R110Direct™ 配基标记的细胞的荧光图像；**B** 为荧光图像和 DIC 图像的叠加。图像在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适当的滤光片组生成。

4.C. 用 Janelia Fluor® HaloTag® 配基进行快速、免洗标记（15 分钟至过夜）

此方案适用于用 Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配基（目录号：GA1110, GA1111）或 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基（目录号：GA1120, GA1121）进行活细胞标记。这些配基已被证明可用于超高分辨率显微镜和单分子追踪技术（10）。代表性数据如图 6 所示。

需用户提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

- 装有表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞的腔室盖玻片
 - 适用于您所用细胞的完全培养基（37°C）
 - 无酚红培养基，37°C（可选）
 - DMSO
 - 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场（wide-field）荧光显微镜（请参见第 9.A 节和图 2）
 - 37°C, CO₂ 细胞培养箱
1. 将 Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配基重悬于 37.8μl DMSO 中，将 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基重悬于 35.5μl DMSO 中。此步骤可制得 200μM 储备液（建议仅供单次使用）。不建议使用 DMSO 进行储存，这是因为此步骤会影响这些配基的稳定性。
 2. 在即将加入细胞前，先使用预温培养基制备 HaloTag® 配基稀释液（1: 200，最终浓度为 1μM）。本溶液为 5X 工作储备液。
 3. 使用 5X HaloTag® 配基工作储备液替换 1/5 体积的现有培养基并轻轻混匀，以标记细胞。经此步骤可得到建议的最终标记浓度（200nM）。
 4. 在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟或更长时间。
 5. 使用等体积的新鲜预温培养基替换含配基的培养液。可选：使用等体积的新鲜预温无酚红培养基替换含配基的培养液。使用无酚红培养基可改善成像结果。
 6. 转移至显微镜处，并捕获图像。

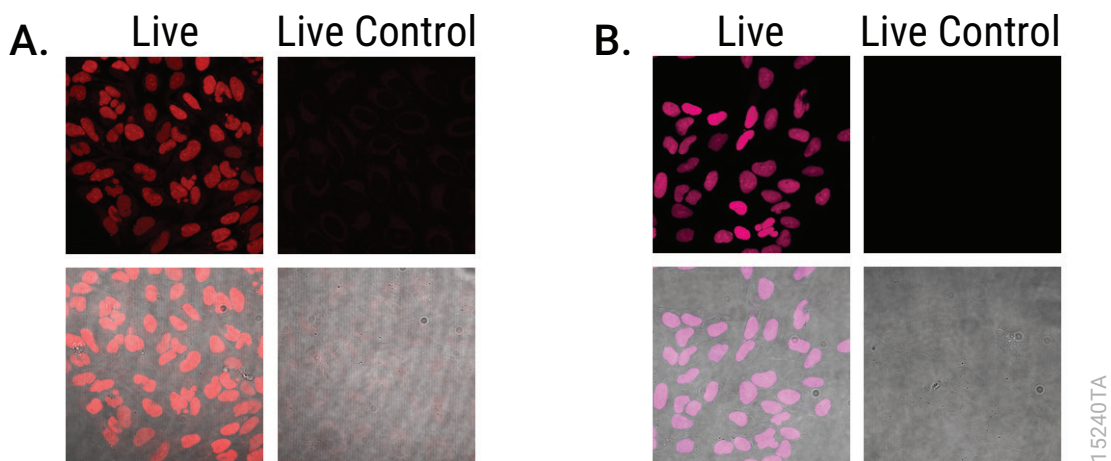


图 6. 对表达核内 HaloTag[®] 蛋白的 U2OS 细胞进行活细胞标记。将亲本 U2OS 细胞和表达 HaloTag[®]（含有核定位序列）的 U2OS 细胞贴壁至玻璃底腔室载玻片上，并用 200nM Janelia Fluor[®] 549 HaloTag[®] 配基或 Janelia Fluor[®] 646 HaloTag[®] 配基标记 15 分钟。然后在以下条件下进行成像：对于 Janelia Fluor[®] 549 HaloTag[®] 配基，用 561nm 波长的激光激发（A），而对于 Janelia Fluor[®] 646 HaloTag[®] 配基，用 637nm 波长的激光激发（B）。在表达 HaloTag[®] 的细胞中，标记部位仅限于细胞核。亲代细胞（图中的活细胞对照）未显示出标记。各图的第一行仅为荧光信号。底行显示的则是在同一相应激光激发波长处收集的透射图像，且荧光图像与之叠加。使用了带 NIS Elements 软件和 40X plan fluor 油浸物镜的 Nikon Eclipse Ti 共聚焦显微镜进行图像采集。

4.D. 使用 1nmol Janelia Fluor® 及 Janelia Fluor® JFX 系列 HaloTag® 配基进行快速标记

本实验方案旨在指导用户使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor® 和 Janelia Fluor® JFX 系列 HaloTag® 配基（目录号：HT1010, HT1020, HT1030, HT1040, HT1050, HT1060, HT1070, HT1100, HT1110）对活细胞进行标记。代表性数据展示在图 7 中。

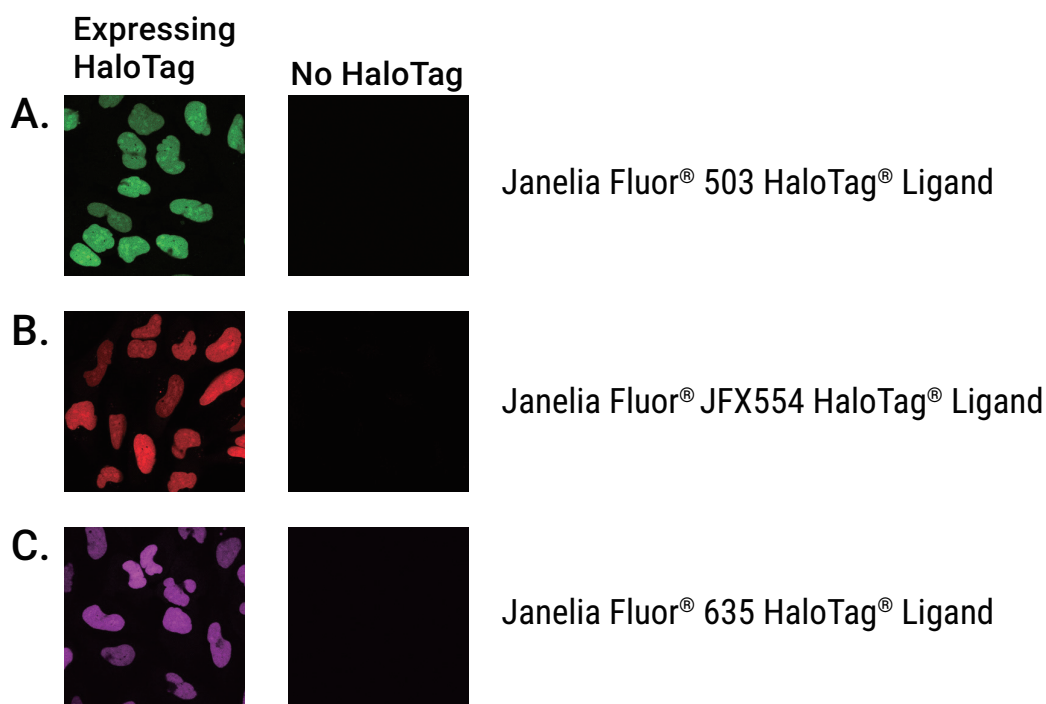
需用户提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

- 装有表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞的腔室盖玻玻片
 - 适用于您所用细胞的完全培养基（37°C）
 - 无酚红培养基，37°C（可选）
 - 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场（wide-field）荧光显微镜（请参见第 9.A 节和图 2）
 - 37°C，CO₂ 细胞培养箱
1. 将一管 1nmol 的 Janelia Fluor® 或 Janelia Fluor® JFX HaloTag® 配基放置至室温下平衡。
 2. 加入 1ml 细胞培养基或选定的水溶性缓冲液。
 3. 将 Janelia Fluor® 或 Janelia Fluor® JFX HaloTag® 配基在培养基中孵育 2 至 3 分钟，期间需间歇性摇动或振荡以溶解配体。请勿使用移液器吸打或涡旋振荡（vortex）来重悬配基。这将得到一个 5X（1μM）工作液浓度的储备溶液。
 4. 将 5X（1μM）的工作液储备溶液按终浓度为 200nM 的比例添加到细胞中，作为推荐的起始剂量。可能需要进一步优化浓度。对于表达 HaloTag® 融合蛋白水平较低的细胞，可能需要更低的浓度以增强信噪比。
 5. 在 37°C、CO₂ 细胞培养箱中，用 Janelia Fluor® 或 Janelia Fluor® JFX HaloTag® 配基孵育细胞 30 分钟（除了 Janelia Fluor® 503 HaloTag® 配基，该配基需要 1 小时的孵育时间）。如果使用较低浓度的配基，可能需要更长的孵育时间。
 6. 吸去含荧光配基的培养基并更换为新鲜的细胞培养基。或者，替换为不含酚红的培养基以减少背景信号。

注：对于非贴壁细胞以及高效表达 HaloTag® 蛋白的细胞，可以保留含配基的培养基，但相比更换为新鲜培养基，其背景信号会更高。当不更换细胞培养基时，我们建议对 HaloTag® 表达水平较低的细胞使用 1nmol 的 Janelia Fluor® 585 和 635 HaloTag® 配基。

4.D. 使用 1nmol Janelia Fluor® 及 Janelia Fluor® JFX 系列 HaloTag® 配基进行快速标记（续）



18589TA

图 7. 利用 1nmol Janelia Fluor® HaloTag® 配基对表达核内 HaloTag® 蛋白的 U2OS 细胞进行活细胞标记。亲本 U2OS 细胞和稳定表达与三拷贝核定位序列融合的 HaloTag® 蛋白的 U2OS 细胞贴壁至玻璃底腔室载玻片上，并在 37°C、CO₂ 细胞培养箱中，用 Janelia Fluor® 503、Janelia Fluor® JFX554 或 Janelia Fluor® 635 HaloTag® 配基孵育 30 分钟进行标记。随后将细胞培养基更换为不含酚红的培养基。

在以下条件下进行成像：针对 Janelia Fluor® 503 HaloTag® 配基，使用 488nm 波长的激光激发（**图 A**）；针对 Janelia Fluor® JFX554 HaloTag® 配基，使用 561nm 波长的激光激发（**图 B**）；针对 Janelia Fluor® 635 HaloTag® 配基，使用 637nm 波长的激光激发（**图 C**）。在表达 HaloTag® 蛋白的细胞中，标记部位仅限于细胞核；而未表达 HaloTag® 蛋白的亲代细胞则未显出任何标记。所有图像均采用配备有 40 倍油镜的 Nikon AX/AXR 共聚焦显微镜收集。

4.E. 脉冲追踪 (Pulse-Chase) 标记

此方案旨在为表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞进行脉冲追踪标记提供指导，以便直接观察蛋白周转或蛋白运输。此方案适用于使用任何 HaloTag® 配基对活细胞进行标记。代表性数据如图 7 所示。

需用户提供的材料

(有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节)

- 装有表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞的腔室盖玻片
- 适用于您所用细胞的完全培养基 (37°C)
- 无酚红培养基, 37°C (可选)
- 1X PBS (pH7.5, 用于洗涤, 可选)
- 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场 (wide-field) 荧光显微镜 (请参见第 9.A 节和图 2)
- 37°C, CO₂ 细胞培养箱

1. 在即将加入细胞前，先使用预温培养基制备脉冲标记配基的 5X 工作储备液。
2. 使用 5X HaloTag® 配基工作储备液替换 1/5 体积的现有培养基并混匀，以标记细胞。此步骤可制得建议的最终标记浓度的配基: 5μM TMR, 3.5μM Alexa Fluor® 660; 1μM diAcFAM、Oregon Green® 或 Alexa Fluor® 488; 10μM 香豆素; 100nM TMRDirect™ 或 R110Direct™; 200nM Janelia Fluor® 549、Janelia Fluor® 646、Janelia Fluor® JFX554、Janelia Fluor® 585、Janelia Fluor® JFX650、Janelia Fluor® 635 或 Janelia Fluor® 503 HaloTag® 配基。

注意：如果融合蛋白是膜结合型的，而且 HaloTag® 蛋白位于膜表面，则应使用不具有细胞渗透性的配基 (Alexa Fluor®488 或 Alexa Fluor® 660 配基) 先对表面 (细胞膜) 蛋白池进行标记。

3. 若使用快速标记配基 (TMR、Oregon Green®、diAcFAM、Coumarin 以及 Alexa Fluor® 配基)，请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟。

若使用免洗标记配基 (TMRDirect™ 和 R110Direct™ 配基)，请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育过夜。

若使用快速、免洗标记配基 (Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配基和 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基)，请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟。

若使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor® 549、Janelia Fluor® JFX554、Janelia Fluor® 585、Janelia Fluor® 646、Janelia Fluor® JFX650 或者 Janelia Fluor® 635 HaloTag® 配基进行快速标记，请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 分钟。

若要使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor® 503 HaloTag® 配基进行快速标记，则需要 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 60 分钟。

4. 如果脉冲标记后需立即进行追踪标记，则应立即进行步骤 5。

如果不需要立即进行追踪标记，则仅需使用等体积新鲜预温培养基替换含配基的培养基，或者在追踪标记前等待特定时间和 / 或在进行步骤 5 所述内容前根据特定需求进行所需生物学实验。

5. 在即将加入细胞前，先使用预温培养基制备追踪标记用的 1X HaloTag® 配基工作液，并用等体积的 1X 追踪标记配基轻轻替换当前所用的细胞培养基。

4.E. 脉冲追踪 (Pulse-Chase) 标记 (续)

6. 若使用快速标记配基 (TMR、Oregon Green[®]、diAcFAM、Coumarin 以及 AlexaFluor[®] 配基), 请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟。

若使用免洗标记配基 (TMRDirect[™] 和 R110Direct[™] 配基), 请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育过夜。

若使用快速、免洗标记配基 (Janelia Fluor[®] 549 HaloTag[®] 配基和 Janelia Fluor[®] 646 HaloTag[®] 配基), 请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 15 分钟。

若使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor[®] 549、Janelia Fluor[®] JFX554、Janelia Fluor[®] 585、Janelia Fluor[®] 646、Janelia Fluor[®] JFX650 或者 Janelia Fluor[®] 635 HaloTag[®] 配基进行快速标记, 请在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 分钟。

若要使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor[®] 503 HaloTag[®] 配基进行快速标记, 则需要在 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 60 分钟。

7. 若使用具有细胞渗透性的快速标记配基 (TMR、Oregon Green[®]、diAcFAM 和 Coumarin 配基), 则应使用等体积 (或更多) 新鲜预温培养基 (或 1X PBS [pH 7.5]) 轻轻替换含配基的培养基。重复此步骤两次, 最后使用预温完全培养基洗涤, 共彻底洗涤三次, 然后进行步骤 8。

对于非细胞渗透性配基 (Alexa Fluor[®] 488 或 660 配基), 使用等体积 (或更多) 新鲜预温培养基替换含配基的培养基两次, 然后再进行步骤 10。

对于免洗标记配基 (TMRDirect[™] and R110Direct[™]), 使用等体积 (或更多) 的新鲜预温培养基轻轻替换含配基的培养基, 然后继续进行步骤 10。

对于快速、免洗标记配基 (Janelia Fluor[®] 549 和 Janelia Fluor[®] 646 HaloTag[®] 配基), 使用等体积 (或更多) 的新鲜预温培养基轻轻替换含配基的培养基, 再进行步骤 10。

若使用 1nmol 规格的 Janelia Fluor[®] 549、Janelia Fluor[®] JFX554、Janelia Fluor[®] 585、Janelia Fluor[®] 646、Janelia Fluor[®] JFX650、Janelia Fluor[®] 635 或者 Janelia Fluor[®] 503 HaloTag[®] 配基进行快速标记, 使用等体积 (或更多) 的新鲜预温培养基轻轻替换含配基的培养基, 再进行步骤 10。

8. 将完全培养基中的细胞置于 37°C, CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 分钟, 以洗涤未结合的配基。
9. 使用等体积新鲜预温培养基替换此培养基 (使用不含酚红的培养基可能会改善成像结果)。
10. 转移至显微镜处, 并捕获图像。

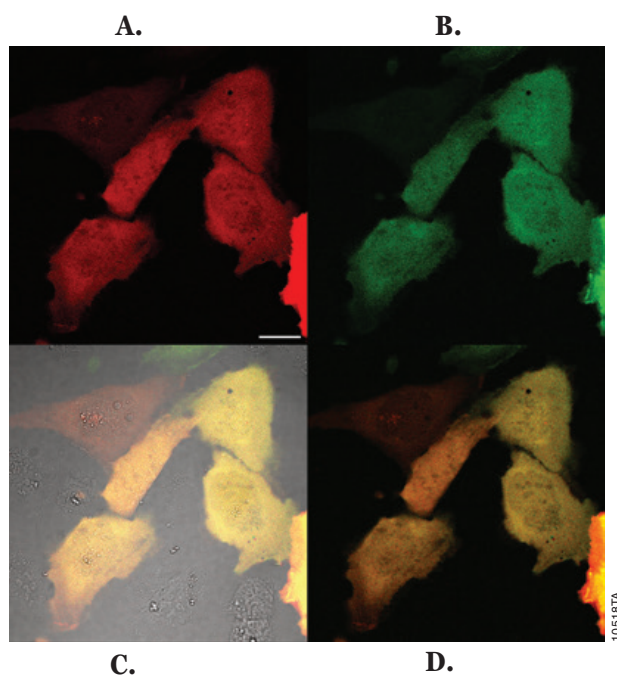


图 8. 采用免洗标记法对表达细胞内 HaloTag[®] 蛋白的细胞进行脉冲追踪标记可直接观察蛋白周转。先使用 HaloTag[®] TMRDirect™ 配基标记瞬时表达 HaloTag[®] 蛋白的 U2OS 细胞 20 小时，然后使用 HaloTag[®] R110Direct™ 配基标记 20 小时，最后通过共聚焦显微镜进行成像。HaloTag[®] 蛋白足够小，在细胞质和细胞核中均可被观察到。可以看到 TMRDirect™ 荧光标记了在细胞标记前以及表达最开始 20 小时内所形成的蛋白池（**A**），而细胞表达的最后 20 小时内所形成的蛋白池被 R110Direct™ 荧光标记（**B**）。**C** 为两个荧光通道和 DIC 的叠加图。**D** 为两个荧光通道的叠加图。比例尺为 20μm。

4.F. 标记后固定细胞

此方案旨在为如何固定表达 HaloTag[®] 融合蛋白的细胞提供指南。由于活细胞标记过程中配基和 HaloTag[®] 蛋白之间形成的是共价键，并且染料的稳定性很好，因此在后续实验中您可使用标准条件固定、透化和洗涤细胞，而不会造成特异荧光信号的明显损失。我们建议使用多聚甲醛（PFA）作为固定剂，因为它可使细胞内和膜上的蛋白质交联，并具有减少细胞从生长表面流失的额外好处。

可使用去污剂（例如 Triton[®] X-100）对固定的细胞进行透化处理，然后将其用于下游免疫细胞化学应用。此处所述条件足以透化质膜。如需对其他结构进行透化处理，可能需要使用其他去污剂。代表性数据如图 3、9 和 10 所示。

需用户提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

所有溶液均应置于室温（另有说明除外）。

- 4% 多聚甲醛 / 0.2M 蔗糖 / 1X PBS (pH 7.5) ，加热至 37°C
 - 1X PBS 缓冲液 (pH 7.5)
 - 1X PBS + 0.1% Triton[®] X-100
 - 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场 (wide-field) 荧光显微镜（请参见第 9.A 节和图 2）
1. 如果需要，可根据第 4.A 节（快速标记）或 4.B 节（免洗标记）中的步骤 1-3，第 4.C 节（快速、免洗标记）中的步骤 1-4，第 4.D 节（使用 1nmol Janelia Fluor[®] 和 Janelia Fluor[®] JFX HaloTag[®] Ligands 进行快速标记）中的步骤 1-5 或第 4.E 节（脉冲追踪标记）中的步骤 1-6，使用 HaloTag[®] 配基对细胞进行标记。
 2. 用等体积预温的 4% 多聚甲醛 / 0.2M 蔗糖 / 1X PBS (pH 7.5) 替换含配基的培养基，并在室温孵育 10 分钟。
 3. 用等体积的 1X PBS + 0.1% Triton[®] X-100 替换固定剂，并在室温孵育 10 分钟。
 4. 使用等体积的 1X PBS 替换含去污剂的溶液，然后转移至显微镜处并捕获图像，于 4°C 储存，或执行第 4.G 节所述的免疫细胞化学操作步骤。

4.G. 使用免疫细胞化学 (ICC) 技术和 HaloTag® 进行叠加检测

本方案旨在为在固定细胞中将 HaloTag® 技术与使用目的抗体进行的 ICC 叠加起来提供指南。此方案中所用的特定抗体是针对 HaloTag® 蛋白的纯化的兔多克隆抗体 (9)。此抗体是使用蛋白 G 亲和树脂纯化的, 并已在免疫细胞化学和 Western blot 应用实验中显示其能够以高灵敏度和高特异性检测 HaloTag® 融合蛋白。此外, 该抗体对 HaloTag® 融合蛋白的标记是不依赖于 HaloTag® 配基的。由于这些标记不会互相干扰, 因此可以用荧光配基和 Anti-HaloTag® pAb (与带有不同光谱荧光标签的抗兔二抗结合) 对 HaloTag® 融合蛋白进行共同标记。代表性数据如图 9 和 10 所示。

需用户提供的材料

(有关溶液组成信息, 请参见第 9.B. 节)

所有溶液均应置于室温。

- 根据第 4.F 节中所述步骤固定细胞
 - 所选的与荧光团偶联的抗兔二抗 (Ab)
 - PBS + 2% 血清 (来自与二抗相同的宿主) + 0.01% Triton® X-100
 - PBS + 1% 血清 (来自与二抗相同的宿主)
 - PBS + 0.1% 叠氮化钠 (可选, 用于存储)
 - 配有适宜滤光片组和 / 或激光器的共聚焦显微镜或宽场 (wide-field) 荧光显微镜 (请参见第 9.A 节和图 2)
1. 用等体积的 PBS + 2% 血清 (来自与二抗相同的宿主) + 0.01% Triton® X-100 替换 1X PBS, 并在室温下进行 1 小时的封闭。
 2. 使用 PBS + 1% 血清 (来自与二抗相同的宿主) 并按 1:500 的稀释比例将 Anti-HaloTag® pAb 稀释至最终标记浓度 2µg/ml。
 3. 使用抗体溶液替换封闭溶液, 并置于室温下孵育 1 小时。
 4. 在室温条件下, 使用 PBS + 1% 血清 (来自与二抗相同的宿主) 洗涤细胞两次, 每次 10 分钟。
 5. 根据生产商的建议, 使用 PBS + 1% 血清 (来自与二抗相同的宿主) 稀释二抗。
 6. 用二抗溶液替换洗涤液并置于室温下孵育 30 小时。
 7. 在室温条件下, 使用 PBS + 1% 血清 (来自与二抗相同的宿主) 洗涤细胞两次, 每次 10 分钟。
 8. 用 1X PBS 替换洗涤液。
 9. 转移至显微镜处, 并捕获图像。将细胞储存于 1X PBS 或 PBS + 0.1% 叠氮化钠中 (4°C)。

4.G. 使用免疫细胞化学 (ICC) 技术和 HaloTag® 进行叠加检测 (续)

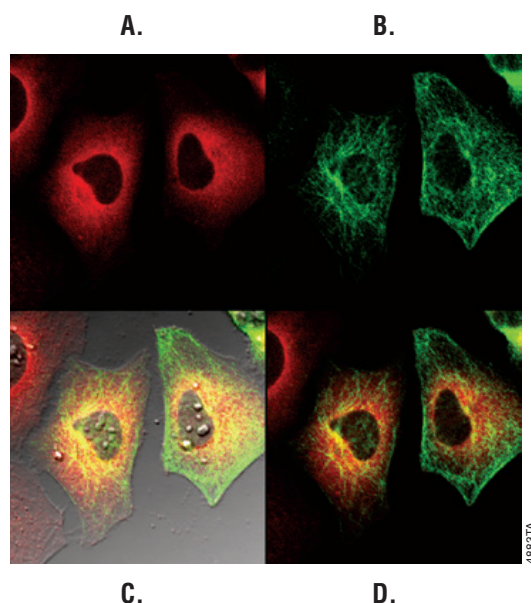
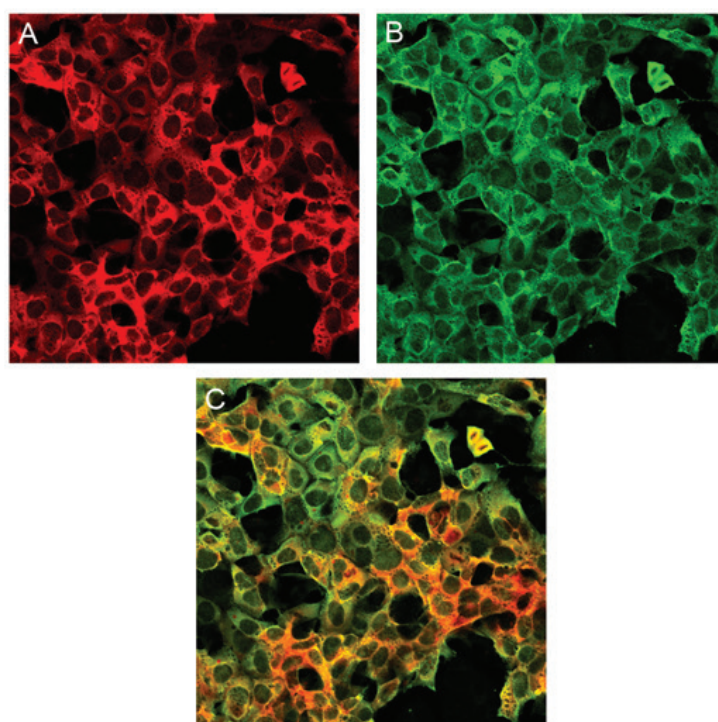


图 9. 使用 TMR 配基和目标抗体进行多重 HaloTag® 标记。如第 4.A 节所述，使用 HaloTag® TMR 配基标记用 p65-HaloTag® 融合蛋白 (3) 表达载体 (p65 为细胞质信号蛋白) 瞬时转染的 HeLa 细胞。然后如第 4.F 节所述对细胞进行固定，并按照第 4.G 节所述，先使用小鼠抗 β III 微管蛋白 mAb 进行标记，然后再使用 Alexa Fluor® 488 偶联的山羊抗小鼠 IgG (Molecular Probes) 进行染色。在细胞质中可观察到 TMR 荧光信号 (**A**)，而 Alexa Fluor® 488 荧光信号显示的是细胞微管 (**B**)。**C** 为两个荧光通道与 DIC 图像的叠加图，而 **D** 仅为两个荧光通道的叠加图。图像在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适宜的滤光片组以连续模式生成。



75287A

图 10. 分别使用 HaloTag[®] 配基和 Anti-HaloTag[®] pAb 对单个 HaloTag[®] 融合蛋白进行标记。如第 4.A 节所述，使用 HaloTag[®] TMR 配基标记用 p65-HaloTag[®] 表达载体稳定转染的 HEK293 细胞（细胞静息时，p65 主要存在于细胞质中），然后按第 4.F 节所述进行固定，并如第 4.G 节所述使用 Anti-HaloTag[®] pAb 进行免疫细胞化学检测。所用二抗为 Alexa Fluor[®] 488 偶联的抗兔 IgG（Jackson ImmunoResearch）。与特异性 HaloTag[®] TMR 配基标记相关的红色荧光（**A**）并不能阻止与特异性 Anti-HaloTag[®] pAb 标记相关的绿色荧光（**B**），证明了两种标记是可区分的。合并荧光图像（**C**）可确认 HaloTag[®] 融合蛋白如预期被特异性标记（主要在细胞质）。图像是在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适宜的滤光片组以连续模式收集的。

4.H. 通过 SDS-PAGE 分析定量 HaloTag® 融合蛋白

下述方案旨在为基于 SDS-PAGE 的 HaloTag® 应用场景提供指导。由于 HaloTag® 蛋白和 HaloTag® 配基之间的共价键可以耐受变性，并且配基中的荧光染料很稳定，因此您可在 SDS-PAGE 完成后使用荧光扫描仪直接对标记的融合蛋白进行定量（即，细胞至凝胶分析）。

后续还可将此类凝胶用于 Western blot 分析（使用最终浓度为 1µg/ ml 的 Anti-HaloTag® mAb；稀释度为 1: 1000；有关操作步骤的具体信息，请参见第 5 节）。

注意：虽然所有 HaloTag® 配基均具有此类功能，但我们建议将 HaloTag® TMR、TMRDirect™ 或 R110Direct™ 配基用于细胞内表达的融合蛋白的直接 SDS-PAGE 荧光扫描。对于将 HaloTag® 运输至细胞表面的细胞外表达蛋白，建议从两种含 AlexaFluor® 的配基中选择一种。代表性数据如图 11 所示。

需用户提供的材料

（有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节）

- 表达 HaloTag® 融合蛋白的细胞
 - 1X PBS (pH 7.5)
 - 1X SDS 样品缓冲液
 - 加热块或水浴 (95°C)
 - SDS-PAGE 所需设备和电泳缓冲液
 - 荧光扫描仪
1. 请使用下述方案中的一种来标记细胞：第 4.A 节或第 4.B 节中的步骤 1-3（快速或免洗标记）；第 4.C 节（快速、免洗标记）中的步骤 1-4，第 4.D 节（使用 1nmol Janelia Fluor® 和 Janelia Fluor® JFX HaloTag® Ligands 进行快速标记）中的步骤 1-5 或第 4.E 节（脉冲追踪标记）中的步骤 1-6。

注意：对于按照快速标记方案标记的细胞内表达的融合蛋白，无需进行时长 30 分钟的洗涤步骤，这是因为所有未结合配基均很小，并且其在凝胶上的迁移速度比标记的融合蛋白快得多（与样品染料前沿一起）。

2. 用 1X PBS (pH 7.5) 替换含配基的培养基，以避免凝胶上出现由完全培养基所造成的一条明显条带。
3. 用 1X SDS 样品缓冲液（约 100–150µl/cm² 细胞生长面积）替换孔中的 1X PBS，从而裂解细胞。
4. 收集细胞裂解物，并在 95°C 孵育 5 分钟。
5. 在凝胶的每个孔中上样约 10µl（5–10µg 总蛋白）进行 SDS-PAGE 实验，或将样品储存于 –20°C 以供后续使用。
6. 使用荧光扫描仪分析凝胶。

注意：染料前沿可能含有会增加检测复杂程度的荧光物质（未结合的配基和 / 或样品缓冲液中的示踪染料）。如需消除这些非特异性荧光源的干扰，只需在进行扫描前先运行凝胶直至染料前沿迁移出凝胶，或将染料前沿从凝胶底部切下即可。

7. 扫描后，若需立即使用（即凝胶未固定、处于湿润状态且未置于缓冲液或去离子水中），则可将蛋白转移至硝酸纤维素膜上以进行 Western blot 分析。

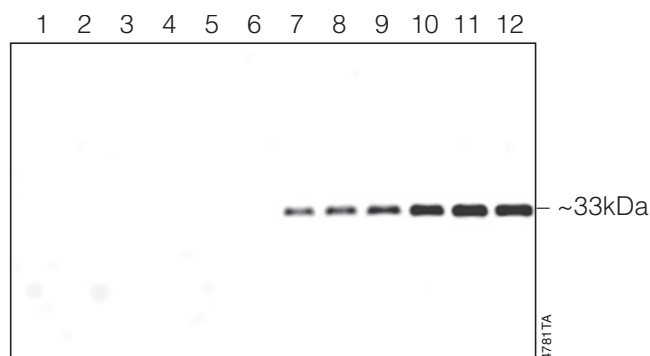


图 11. SDS-PAGE 分析结果显示活细胞中 HaloTag[®] 蛋白标记快速、高效且特异性好。对未转染的 CHO-K1 对照细胞（泳道 1-6）或用仅含 HaloTag[®] 的载体进行瞬时转染的细胞（泳道 7-12），在 37°C 条件下用 5 μ M HaloTag[®] TMR 配基标记不同的时间（0.5、1、2、5、15 或 30 分钟），并按第 4 节所述进行处理。SDS-PAGE 后，使用 HitachiFMBIO[®] 荧光成像系统对凝胶进行了分析。

4.1. 流式细胞术分析

代表性数据如图 12 所示。

用户提供材料

(有关溶液组成信息, 请参见第 9.B. 节)

- 含表达 HaloTag[®] 融合蛋白的细胞和不表达 HaloTag[®] 融合蛋白的阴性对照细胞的大孔板
 - 适用于您所用细胞的完全培养基 (37°C)
 - 贴壁细胞: 1X PBS (pH 7.5) 和含 3mM EDTA 的 1X PBS (非酶溶液) 或胰蛋白酶溶液 (请参见下述步骤 2)
 - 适用于所用配基的流式细胞仪 (配有适宜滤光片组和激光器) (第 9.A 节和图 2)
 - 37°C, CO₂ 细胞培养箱
1. 使用所选配基标记表达 HaloTag[®] 蛋白的细胞 (第 4.A 节, 快速标记; 第 4.B 节, 免洗标记; 第 4.C 节, 快速、免洗标记; 或第 4.D 节, 使用 1nmol Janelia Fluor[®] 和 Janelia Fluor[®] JFX HaloTag[®] Ligands 进行快速标记)。

建议采用的对照:

- a. 使用所选配基标记不表达 HaloTag[®] 蛋白的细胞, 以评估本底信号。
 - b. 准备未标记但表达 HaloTag[®] 蛋白的细胞, 以评估来自内源性细胞荧光的本底信号或表达引起的形态变化。
2. 对于在细胞表面有 HaloTag[®] 融合蛋白表达的贴壁细胞: 使用等体积的 1X PBS 冲洗细胞两次, 然后置于 1X PBS (含 3mM EDTA) 中孵育, 或在 37°C 条件下使用其他非酶溶液孵育 5-15 分钟 (具体取决于所用细胞系), 从而使细胞与板轻轻分离。

对于具有在细胞内表达的 HaloTag[®] 融合蛋白的贴壁细胞: 使用含胰蛋白酶的溶液并以适合细胞系的方式使细胞悬浮。
 3. 收集、离心沉淀、计数并使用 37°C 培养基重悬细胞, 使其浓度为 0.5 至 1×10⁶ 细胞 / ml。
 4. 通过流式细胞术对细胞进行分析。

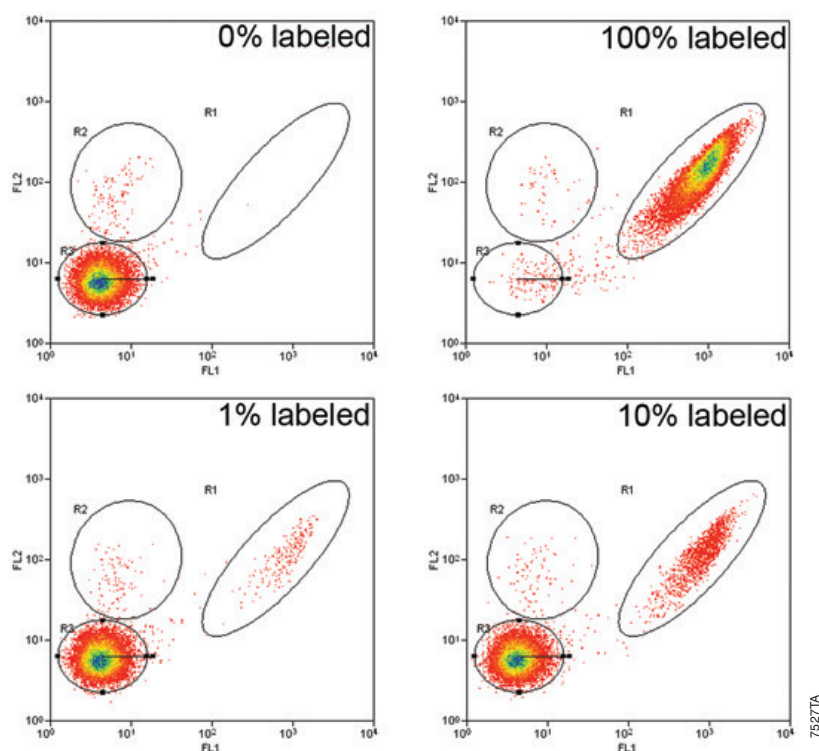


图 12. 对标记的 HaloTag[®] 蛋白表达细胞成功进行流式细胞仪分析。如第 4.B 节所述，使用 HaloTag[®] R110Direct™ 配基对稳定表达 HaloTag[®] 蛋白（与三个拷贝的核定位序列融合）的 U2OS 细胞进行标记，并对已知数量的细胞（标记 1%、10% 或 100%）与未标记细胞设门。使用了 MoFlo[®] 仪器对 HaloTag[®] 蛋白表达细胞进行流式细胞术分析。每张图代表约 20,000 个细胞。R1 代表 R110 标记的细胞，R2 代表死细胞（用碘化丙啶标记），R3 代表未标记的细胞。分析时，未对碘化丙啶和 R110Direct™ 两个荧光通道的重叠部分进行信号补偿。结果表明标记的细胞与未标记的细胞成功设门。

5. 使用 HaloTag® 单克隆抗体进行蛋白检测 (Western Blotting)

下述方案旨在为蛋白印迹 (Western Blotting) 分析中使用 Anti-HaloTag® 单克隆抗体 (目录号 G9211) 提供通用指南。对于所有其他免疫学检测方法, 建议使用 Anti-HaloTag® pAb (目录号 G9281)。代表性数据如图 13 所示。

用户提供材料

- 表达 HaloTag® 融合蛋白的哺乳动物细胞
 - 适宜的哺乳动物裂解缓冲液 (例如, Mammalian Lysis Buffer, 目录号 G9381)
 - SDS-PAGE 凝胶和凝胶运行设备
 - 硝酸纤维素膜或 PVDF 膜和蛋白印迹分析设备
 - TBST (含 0.1% Tween® 的 1X TBS)
 - 含 5% BSA 的 TBST
 - 用于蛋白印迹分析的经适当偶联的抗小鼠 IgG 二抗及其相应检测底物 (例如, 抗小鼠 IgG (H + L) AP 偶联物, 目录号 S3721, 和 Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, 目录号 S3841)
 - 轻微振荡用旋转平台
1. 使用所选择的适宜裂解缓冲液裂解表达 HaloTag® 融合蛋白的哺乳动物细胞。
建议采用的对照: 不表达 HaloTag® 的细胞 (未转染)。
 2. 在 SDS-PAGE 上运行裂解物, 并根据生产商提供的方案将其转移至硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上。
 3. 将得到的硝酸纤维素膜或 PVDF 膜置于含 5% BSA 的 TBST 中, 室温封闭 1 小时或 4°C 封闭过夜, 同时轻微振荡。
 4. 用在 TBST 中以 1: 1,000 比例稀释的 Anti-HaloTag® mAb 溶液替换封闭缓冲液, 并在室温下轻微振荡 1 小时。
 5. 用 TBST 替换一抗溶液。室温下洗涤 3 次, 每次 15 分钟 (洗涤时应轻微振荡)。
 6. 将洗涤液替换为用 TBST 缓冲液稀释成推荐浓度的抗小鼠 IgG 偶联二抗 (例如, 对于抗小鼠 IgG-AP 偶联物, 按照 1:7500 的比例稀释), 并在室温下温和振荡条件下孵育 30 分钟。
 7. 使用 TBST 替换二抗溶液。室温下洗涤 3 次, 每次 15 分钟 (洗涤时应轻微振荡)。
 8. 使用适宜的底物 (例如, AP 底物) 检测 HaloTag® 蛋白条带。



图 13. 使用 Anti-HaloTag[®] 单克隆抗体 (mAb) 对 EZH2-HaloTag[®] (HT) 融合蛋白 (~120kDa) 进行印迹检测。印迹结果显示，对来自 HEK293T 细胞裂解物的 HaloTag[®] 融合蛋白的印迹检测具有特异性并且很可靠。如第 5 节所述，使用了基于 AP 的二抗和底物进行蛋白印迹分析。泳道 2 为未转染的对照。

6. 如何从 Building Blocks 生成 HaloTag® 配基

下述方案旨在为使用 HaloTag® Ligand Building Blocks 生成 HaloTag® 配基提供一个指南。生成含荧光团的配基的具体示例如图 14 所示。

6.A. 报告基团标记的通用方案（与 2-[（6-氯己氧基）-乙氧基]-乙胺偶联）

需用户提供的材料

- 琥珀酰亚胺酯报告基团
 - 碱（三乙胺、二异丙基乙胺等）
 - DMF（二甲基甲酰胺）
 - HPLC 或硅胶色谱分析用仪器和试剂
1. 向溶于 DMF 中的 1 当量的琥珀酰亚胺酯报告基团中加入 1.5 至 3 当量（02）或（04）胺，然后加入碱（三乙胺、二异丙基乙胺等）。
 2. 于室温下搅拌反应 8–16 小时。
 3. 根据构建体的亲脂性，通过制备型 HPLC 或硅胶色谱法进行纯化。

6.B. 使用 HaloTag® 胺配基进行蛋白标记

需用户提供的材料

- 用于偶联的目的蛋白
 - 水，0.1M MES（pH 4.7–6.0）或 0.1M 磷酸钠（pH 7.3）
 - DMSO 或 DMF
 - EDC（1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐）
 - Sephadex® G-25（用于偶联蛋白的凝胶过滤分离）
1. 将需修饰的蛋白以 10mg/ml 的浓度溶于水、0.1M MES（pH 4.7–6.0）或 0.1M 磷酸钠（pH 7.3）中。
 2. 使用 DMSO 或 DMF 制备 5mg/ml HaloTag® Amine（02 或 04）配基储备液。
 3. 取一份 HaloTag® 配基储备液（摩尔数至少为蛋白的 10 倍），并将其在缓冲液（与步骤 1 中所用的相同）中稀释。
 4. 将此 HaloTag® 配基储备水溶液添加至蛋白溶液中；最终蛋白浓度应为 5 mg/ml 或更高。
 5. 将过量于蛋白 10 倍摩尔的 EDC（1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐）以 0.1 至 0.5M 水溶液形式加入蛋白质中，置于室温下反应 2 小时。
 6. 使用 Sephadex® G-25（溶于所选缓冲液）通过凝胶过滤分离纯化连接的蛋白。

6.C. 使用 HaloTag® 琥珀酰亚胺酯配基进行抗体标记

需用户提供的材料

- 用于偶联的目的抗体
- 0.1M 磷酸钠、0.15M 氯化钠 (pH 7.2) [pH 7.0 至 7.6 均可使用]
- DMSO 或 DMF
- Sephadex® G-25 (用于偶联抗体的凝胶过滤分离) 或针对 0.1M 磷酸钠、0.15M 氯化钠、10mM EDTA (pH 7.2) 的透析方法

1. 将抗体以 1–5 mg/ml 的浓度溶于 0.1M 磷酸钠、0.15M 氯化钠 (pH 7.2) 中。
2. 使用 DMSO 或 DMF 制备 5mg/ml HaloTag® Succinimidyl Ester (02 or 04) Ligand (配基) 储备液。
3. 向每毫升 1mg/ml 抗体溶液加入 10–40µl HaloTag® 配基储备液, 并于室温反应 30 分钟。

注意: 12 倍摩尔过量效果很好, 可确保每个抗体至少标记一次。大多数一般抗体标记方案都采用 20 倍过量, 但配基相对于抗体浓度越高, 标记的胺也就越多。此外, 过量标记可能会也可能不会阻碍抗体 - 表位之间的相互作用。

4. 使用 Sephadex® G-25 通过凝胶过滤或通过 0.1M 磷酸钠、0.15M 氯化钠、10mM EDTA (pH 7.2) 进行透析, 纯化偶联的抗体。

6.D. 生成 Alexa Fluor® 488 HaloTag® 配基的具体示例方案

1. 首先从 Life Technologies 获得 5mg Alexa Fluor® 488 NHS 酯 (7.8×10^{-6} mol)。
2. 将一个小磁力搅拌棒加入至购买的小瓶中, 然后将染料溶解在 0.5ml DMF (储存于分子筛上以去除多余水分) 中。
3. 在持续搅拌下, 加入 3 倍过量的氨基配基 (2.3×10^{-5} mol), 然后再加入一滴二异丙基乙胺 (过量)。

注意: 将胺配基溶于 DMF 或二氯甲烷中作为储备液保存。该溶液在 -78°C 条件下储存的稳定性良好。若使用的是染料 SE, 则可使用 1.5 至 3 当量的配基。

4. 搅拌 12 小时, 并采用分析型 HPLC (C12 或 C18) (水相为 0.1% TFA, 有机相为乙腈) 进行监测。
5. 一旦确定反应完成后, 使用 1ml 水稀释反应混合物, 并注入制备型 HPLC 色谱柱 (Varian Microsorb 60-8 C18; 250 × 21.4 mm)。使用与步骤 4 中分析型 HPLC 中相同的流动相对化合物进行纯化。

7. 标记哺乳动物细胞裂解物中的蛋白或在无细胞系统中表达的蛋白

用 HaloTag® TMRDirect™ 配基对 HaloTag® 融合蛋白进行荧光标记为监测蛋白表达和纯化效率提供了一种快速简便的方法。在以下示例中使用了 HaloTag® TMRDirect™ 配基 (555_{Ex} / 585_{Em})，原因是它随 HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification 系统 (目录号 G6795) 一起提供。如有需要，可轻松地用 HaloTag® R110Direct™ 配基 (502_{Ex} / 527_{Em}) 替代此配基。

如需获取有关表达后 HaloTag® 标记的更多信息，请参阅 HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification Systems 的说明书 TM348，网址为：www.promega.com/protocols

需用户提供的材料

(有关溶液组成信息，请参见第 9.B. 节)

- 含 HaloTag® 融合蛋白的裂解物
 - DMSO 或 1X PBS (pH 7.5)，可选
 - 4X SDS 样品缓冲液
 - 加热块或水浴 (70°C)
 - SDS-PAGE 所需设备和电泳缓冲液
 - 荧光扫描仪
1. 在 DMSO 中将 HaloTag® TMRDirect™ 配基储备液 (100μM) 稀释两倍，制成 50μM 工作液 (可于 -20°C，避光储存)；或者使用 1X PBS 制备储备液，但是不可储存。
 2. 将 10μl 含 HaloTag® 融合蛋白的裂解物或等量的未结合部分 (fraction) 与 19μl HaloTag® 蛋白纯化缓冲液以及 1μl 50μM HaloTag® TMRDirect™ 配基混合。
 3. 在室温、避光条件下孵育 15 分钟。
 4. 加入 10μl 4X SDS 样品缓冲液 (第 9.B 节)，并于 70°C 下加热 3 分钟。
 5. 将 10μl 样品加至 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上。
 6. 在荧光扫描仪上扫描凝胶并对条带强度进行定量。

注意：染料前沿可能含荧光物质，因此可能增加检测的复杂程度。在进行扫描前，可能需要先运行凝胶实验直至染料前沿迁移出凝胶，或将染料前沿从凝胶底部切下。

8. 标记大肠杆菌裂解物以分析蛋白表达水平

以下方案旨在为大肠杆菌裂解物和完整细菌的标记提供指南。

8.A. 在大肠杆菌中表达 HaloTag® 融合蛋白

需用户提供的材料

(有关溶液组成信息, 请参见第 9.B. 节)

- 表达 HaloTag® 融合蛋白的转化的大肠杆菌 KRX 菌落 (Single Step (KRX) Competent Cells [目录号 L3002])
- 含适宜抗生素的 LB
- 葡萄糖
- L- 鼠李糖一水合物 (目录号 L5701 或 L5702)
- 细菌生长培养箱 (25°C 和 37°C)

注意: 这些表达条件是大肠杆菌 KRX 细胞所特有的。

1. 将一个菌落接种至 2ml LB (含适宜抗生素) 中, 并在 37°C 条件下过夜培养。

注意: 对于毒性蛋白, 向培养基中加入 0.4% 葡萄糖。

2. 将过夜培养物按 1: 100 的比例稀释到 2ml 自动诱导培养基中。

8.B. 标记大肠杆菌裂解物以分析蛋白表达水平

诱导方式	诱导时的 O.D. 粗略值	培养温度	培养时间
晚期：0.15% 葡萄糖 + 0.2% 鼠李糖	$A_{600} = 1-1.2$	25°C	24 小时
早期：0.05% 葡萄糖 + 0.05% 鼠李糖	$A_{600} = 0.6-0.8$	25°C	16-18 小时

需用户提供的材料

- 50mM HEPES (pH 7.5)
 - 10X Fast Break™ Cell Lysis Reagent (目录号 V8571、V8572 或 V8573)
 - 溶菌酶
 - RQ1 RNase-Free DNase (目录号 M6101)
 - 4X SDS 样品缓冲液
 - -70°C低温冰箱
 - 可在 14000 × g, 4°C条件下离心的离心机
 - 加热块或水浴 (70°C)
 - SDS-PAGE 所需设备和电泳缓冲液
 - 荧光扫描仪
1. 将 1.5ml 培养物离心，随后重悬于 0.5ml 50mM HEPES (pH 7.5) 中。在 -70°C下冷冻 20 分钟。
 2. 在室温下融化细胞，然后加入 0.5ml 裂解缓冲液 (1X FastBreak™ Cell Lysis Reagent+ 2mg/ml 溶菌酶 + 0.02 单位 RQ1 RNase-Free DNase) 裂解 30 分钟 (期间不断摇动)。
 3. 保留 0.5ml 粗裂解物用于分析，并将 1ml 粗裂解物在 4°C, 14,000×g 条件下离心 30 分钟制备可溶性裂解物。
 4. 使用 HaloTag® 荧光配基对粗裂解物和可溶性裂解物进行标记。将配基稀释成 50μM 工作液 (如下所示)。室温孵育 20 分钟。

组分	体积
裂解物 (Lysate)	20μl
配基 (Ligand) (50μM)	1μl
1X 50mM HEPES (pH 7.5)	9μl
总体积	30μl

5. 加入 10μl 4X SDS 载样缓冲液，于 70°C下孵育 2 分钟。
6. 取 10–20μl 样品用 SDS-PAGE 分析。
7. 首先通过荧光扫描仪进行检测，然后使用 Coomassie® blue (考马斯蓝) 进行染色。

注意：染料前沿缘可能含荧光物质，因此可能增加检测的复杂程度。进行扫描前，可能需要运行凝胶直至染料前沿迁移出凝胶，或将染料前沿从凝胶底部切下。

8.C. 标记大肠杆菌用于成像分析

代表性数据如图 13 所示。

需用户提供的材料

- 表达 HaloTag[®] 融合蛋白的大肠杆菌培养物（第 8.A 节）
 - 细菌生长培养箱（25°C）
 - 可在 2,000 × g 条件下离心的离心机
 - 1X PBS
 - 腔室盖玻片
 - 0.1% 明胶
 - 配有适宜滤光片组和激光器的共聚焦显微镜（第 9.A 节和图 2）
1. 在 LB 中按 1:10 的比例稀释过夜培养物，添加 HaloTag[®] TMRDirect™ 配基或 HaloTag[®] TMR 配基至最终浓度为 1μM（对 TMRDirect™ 进行 1: 100 稀释，或对 TMR 进行 1: 5,000 稀释），然后在 25°C 条件下标记 1 小时（不需混匀），从而对细菌进行标记。
 2. 在室温下，通过在玻璃腔室中预涂 0.1% 明胶（200μl/腔室，8 孔盖玻片）1 小时，制备腔室盖玻片。
 3. 为了洗涤未结合的配基，请按照下述步骤 a–e，使用 1X PBS 洗涤 3 次。
 - a. 于 2,000×g 条件下沉淀细胞 5 分钟。
 - b. 重悬于 1ml 1X PBS 中。
 - c. 室温孵育 30 分钟（不需混匀）。
 - d. 于 2,000×g 条件下沉淀细胞 5 分钟。
 - e. 弃去 1X PBS。
 4. 若需进行成像，第三次洗涤后将细胞重悬于 200μl 1X PBS 中，然后继续进行步骤 5。

若需进行 SDS-PAGE 分析，可按照第 8.B 节中所述步骤收集细胞、裂解并在凝胶上分析标记效率。
 5. 若需铺板标记的大肠杆菌，首先应从腔室盖玻片中吸出明胶，然后立即加入细胞。将它们以未稀释、1: 2.5、1: 5 和 1: 10 的稀释度进行铺板。在成像前，应先等待 2 至 3 小时，以使细胞贴壁。
 6. 转移至共聚焦显微镜处，并捕获图像。

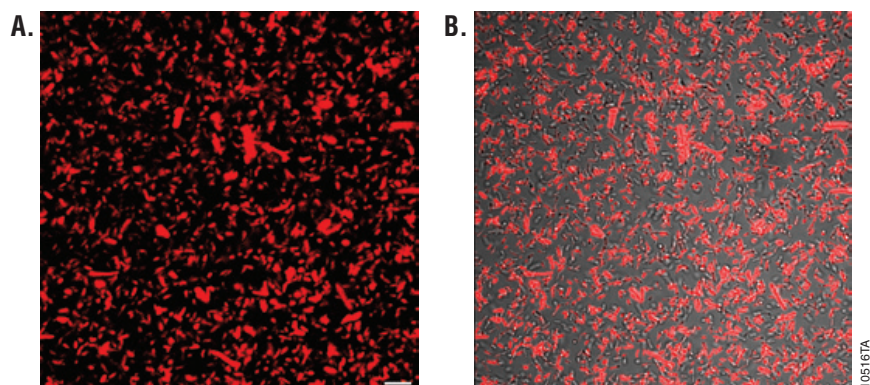


图 14. 对大肠杆菌中表达的 HaloTag[®] 进行清晰标记。如第 8.C 节所述，将表达 HaloTag[®] 融合蛋白的大肠杆菌用 HaloTag[®] TMR 配基标记，然后使用共聚焦显微镜进行成像。这些图像显示出明亮的 TMR 标记信号和很低的本底信号。A 显示的是荧光通道成像图，B 显示的是荧光 /DIC 叠加图。图像在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适宜的滤光片组生成。比例尺为 20 μ m。

9. 一般信息、建议和疑难解答

9.A. 一般信息

推荐的成像用标准滤光片组

配基	推荐的滤光片组
HaloTag® Alexa Fluor® 660, Janelia Fluor® 646, Janelia Fluor® JFX650 和 Janelia Fluor® 635 HaloTag® Ligands	Cy®5 滤光片组 (~640nm 激发波长 / 700nm 发射波长)
HaloTag® TMR 和 TMRDirect™ Ligands, Janelia Fluor® 549, Janelia Fluor® JFX554 和 Janelia Fluor® 585 HaloTag® Ligands	TRITC 滤光片组 (555nm 激发波长 / 580nm 发射波长)
HaloTag® Alexa Fluor® 488, Oregon Green® 和 R110Direct™ Ligands 和 Janelia Fluor® 503 HaloTag® Ligand	FITC 滤光片组 (488nm 激发波长 / 520nm 发射波长)
HaloTag® Coumarin Ligand	DAPI/AMCA 滤光片组 (345nm 激发波长 / 445nm 发射波长)

无可检测到的毒性

在推荐的标记条件下，HaloTag® 配基在所有测试过的细胞系（包括但不限于 U2OS、CHO、HEK293、HeLa、SW48 和人神经祖细胞）均未显示出可检测到的毒性或形态学副作用。此外，在将 200nM Janelia Fluor® 549 和 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基与 U2OS 和 HEK293 细胞过夜孵育后，通过 CellTiter-Glo® Assay 检测了这两种配基的毒性，结果未观察到细胞活性出现降低的情况。在将所有其他配基与 U2OS 和 CHO 细胞孵育 24 小时后，CellTiter-Glo® Assay 检测结果显示未检测到毒性（Direct 配基测试浓度为 10X 推荐浓度）。

信噪比

采用此处提出的标记建议应可得到良好的信噪比。

但是，特异信号与下述因素相关：

1. HaloTag® 融合蛋白的表达水平
2. 细胞类型和细胞健康，因为未结合配基的洗涤是一个相对剧烈的细胞过程
3. 荧光团的量子产率和稳定性

因此，可对建议的配基起始浓度和洗涤时间进行优化。如果您在细胞中观察到大量残留的非特异性荧光，我们建议降低配基浓度和 / 或延长洗涤时间。细胞系传代次数过多（造成信号通路发生变化）也可导致此问题。或者，还可通过用多聚甲醛固定细胞并用 0.1–1.0% Triton® X-100 进行透化处理（第 4.F 节）来进一步减轻残留的非特异性荧光。

diAcFAM 配基的局限性

diAcFAM 所具有的光不稳定性使其在定量荧光细胞成像中的使用具有一定局限性，但是在一些光不稳定性具有优势的标记应用（例如光漂白后荧光恢复 [fluorescence recovery after photobleaching, FRAP]）中，其光不稳定性却是有利的。

与 diAcFAM 相比，HaloTag® Oregon Green® 和 R110Direct™ 配基均显示出明显更高的光稳定性。对于需要对荧光进行定量或使用绿色配基的高激发能的基于细胞的成像应用场景而言，两者均是实用的工具。

在含血清培养基中使用 HaloTag® 配基

所有 HaloTag® 配基均可直接在血清培养基中进行稀释。但是，稀释后必须立即将 HaloTag® diAcFAM 和 Oregon Green® 配基加入到细胞中，因为二乙酰基可被血清酯酶水解，而这种脱乙酰作用会将 HaloTag® diAcFAM 和 Oregon Green® 配基转化为不具有细胞渗透性的荧光配基衍生物。一旦进入细胞，这些配基就会被修饰，并且与所有其他可透过细胞的配基一样，过量的未结合配基会通过主动细胞机制以时间和温度依赖性的方式从细胞中清除。

尽管具有细胞渗透性的配基可进入测试过的所有类型细胞中并可进入所有主要的亚细胞区室，但是排出速率却存在一定差异。一般来说，HaloTag® diAcFAM 和 Oregon Green® 配基的排出速率显著慢于其他配基，而且不同类型细胞间的排出速率可能也有显著差异。存在未结合的修饰配基排出延迟现象的细胞可能主动机制有限或健康状况不佳。因此，虽然使用血清会导致向细胞培养物中添加配基的时间要求更严格，但是血清的存在会使细胞的应激反应最小化，并可维持其主动清除未结合配基的能力，进而降低本底信号。

简化操作方案

不具有细胞渗透性的 Alexa Fluor® 488 和 Alexa Fluor® 660 配基均不需要 30 分钟的洗涤步骤，因为未结合的配基不会进入细胞。在各种细胞渗透性配基中，HaloTag® TMR 和 Coumarin 配基很容易从细胞中洗掉。因此，您可能可以简化第 4.A 节第 4–6 步中的方案，而不会影响信噪比。

9.B. 缓冲液和溶液组成

4% 多聚甲醛 /0.2M 蔗糖 /1X PBS (pH 7.5)

每次使用前均应临用新制。

LB 培养液 (1X)

1%	M 型酪蛋白胨
0.5%	氯化钠
0.5%	酵母提取物

1X PBS 缓冲液 (pH 7.5)

137mM	氯化钠
2.68mM	氯化钾
1.47mM	KH ₂ PO ₄
8.1mM	Na ₂ HPO ₄

4X SDS 样品缓冲液

0.24M	Tris
2%	SDS
50.4%	甘油
0.4M	DTT
3mM	溴酚蓝

使用盐酸滴定至 pH 为 6.8。

1X SDS 样品缓冲液

使用过滤水并按 1: 4 比例对 4X SDS 样品缓冲液进行稀释。

Tris 缓冲液 (TBS)

20mM	Tris-HCl (pH 7.5)
150mM	氯化钠

9.C. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。联系信息见：www.promega.com。电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
融合蛋白未表达或表达水平很低	转染效率不佳。优化转染条件并使用高质量的无内毒素的 DNA。
	考虑使用 HaloTag® 蛋白和目的蛋白顺序相反的构建体。N 或 C 端融合蛋白性能可能会有差异。
	检查表达载体的阅读框，可通过测序或进行快速无细胞翻译（例如 TnT® T7 快速偶联转录翻译系统，目录号 L1170），然后进行标记、SDS-PAGE 和对凝胶进行荧光扫描。
标记细胞的荧光信号弱或无荧光信号	调控元件作用较弱或不合适；考虑更换启动子和 / 或其他调控元件。
	如果在 PBS 中裂解细胞，则应避免蛋白水解；裂解过程中，添加蛋白酶抑制剂，并于 4°C 下进行裂解。
	在进行标记前，应将细胞培养更长时间，从而确保有足够的蛋白表达和细胞密度。
	优化细胞健康。在整个标记和成像过程中，始终将细胞置于完全培养基中以及适宜的 CO ₂ 浓度和 37°C 条件下。
	优化细胞标记方案。增加标记时间。
	HaloTag® 配基应储存于 -20°C（干燥、避光）条件下。将 HaloTag® 配基分装成小份，避免反复冻融。
	使用新鲜稀释的 HaloTag® 配基并立即加入至标记细胞中；避免产生脱乙酰作用。请参见第 9.A 节。
活细胞中存在高本底荧光信号	确保您所用滤光片组适用于成像。请参见第 9.A 节和图 2。
	调整荧光检测仪器的设置（例如，共聚焦显微镜的激光功率、PMT 增益和光圈）。
	增加洗涤时间并使用完全培养基（例如血清培养基）进行洗涤。
	在无酚红的完全培养基中进行细胞成像。
固定细胞中存在高本底荧光信号	标记时应严格遵循温度建议。
	调整仪器设置（例如，降低激光功率、降低 PMT 增益或共聚焦显微镜的光圈）。
	增加洗涤时间，和 / 或洗涤时使用更高浓度的 Triton® X-100 或使用其他去污剂。
细胞从表面脱落	降低染色浓度
	使用其他培养皿或玻璃器具，因为一些 HaloTag® 配基可与带电表面发生结合。
	处理细胞时要轻柔，以确保细胞仍贴附于表面，和 / 或减少培养基的更换次数（即，通过在免洗方案中使用 Direct™ 配基和免洗方案而不是快速标记方案中的配基来减少实验步骤）。
细胞死亡或毒性	使用完全培养基进行所有的标记、洗涤和成像步骤，且尽可能将细胞置于 37°C，CO ₂ 培养箱中。
	增加接种密度或培养时间，以使细胞增殖和更紧密地贴附。
	使用多聚赖氨酸、纤连蛋白或胶原蛋白等附着基质。
细胞死亡或毒性	修改转染方案或尝试使用毒性更小的转染试剂。确保 DNA 中不含内毒素。

9.D. 引用文献和其他参考文献

引用文献

1. Los, G. *et al.* (2005) HaloTag[®] interchangeable labeling technology for cell imaging and protein capture. *Cell Notes* **11**, 2–6.
2. Los, G. and Wood, K. (2007) The HaloTag:Methods. *Methods. Mol. Biol.* **356**, 195–208.
3. Los, G. *et al.* (2008) HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 383–82.
4. Huybrechts, S. J. *et al.* (2009) Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic* **10**, 1722–33.
5. Lee, H.L. *et al.* (2010) Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photo-activatable organic fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15099–101.
6. Reek-Peterson, S.L. and Vale, R.D. (2009) Regulation of the processivity and intracellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* dynein by dynactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5669–74.
7. Lang, C. *et al.* (2006) HaloTag[™] : A new versatile reporter gene system in plant cells. *J. Exp. Bot.* **57**, 2985–92.
8. Kosaka, N. *et al.* (2009) In vivo stable tumor-specific painting in various colors using dehalogenase-based protein-tag fluorescent ligands. *Bioconjugate Chem.* **20**, 1367–74.
9. Learish, R.D. (2007) A polyclonal HaloTag[®] antibody for Western blotting and immunocytochemistryPromega *Notes* **95**, 23–4.
10. Grimm, J.B. *et al.* (2015) A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* **12**, 244–50.

其他参考文献

如需获取关于 HaloTag® 技术和成像的更多信息，请访问：

www.promega.com/resources/technologies/halotag

He, Y. *et al.* (2011) Identification of a lysosomal pathway that modulates glucocorticoid signaling and the inflammatory response. *Sci. Signal.* **4**, ra44.

Strauch, R.C. *et al.* (2011) Reporter protein-targeted probes for magnetic resonance imaging. *J Amer Chem Soc.* **133**, 16346–9.

Hong, H. *et al.* (2011) HaloTag: a novel reporter gene for positron emission tomography. *Am. J. Transl. Res.* **3**, 392–403.

Takemoto, K. *et al.* (2011) Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag® fusion proteins labeled with eosin in living cells. *ACS Chem. Biol.* **6**, 401–6.

Camarda, G. *et al.* (2010) Regulated oligomerization and molecular interactions of the early gametocyte protein Pfg27 in *Plasmodium falciparum* sexual differentiation. *Int. J. Parasitology* **40**, 663–73.

Benink, H.A. *et al.* (2009) Direct pH measurement by using subcellular targeting of 5(and 6-) carboxysemaphthorhodafluorin mammalian cells. *BioTechniques* **47**, 769–74.

Schröder, J. *et al.* (2009) In vivo labeling method using a genetic construct for nanoscale resolution microscopy. *Biophys J.* **96**, L1–3.

Yamaguchi, K. *et al.* (2009) Pulse-chase experiment for the analysis of protein stability in cultured mammalian cells by covalent fluorescent labeling of fusion proteins. *Methods Mol. Biol.* **577**, 121–31.

Ogawa, M. *et al.* (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.

Reck-Peterson, S.L. *et al.* (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335–48.

Eisenstein, M. (2006) Helping cells to tell a colorful tale. *Nat. Meth.* **3**, 647–55.

Zhang, Y. *et al.* (2006) HaloTag® protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 4936–40.

Shinohara, H. and Matsubayahshi, Y. (2007) Functional immobilization of plant receptor-like kinase onto microbeads towards receptor array construction and receptor-based ligand fishing. *Plant J.* **52**, 175–84.

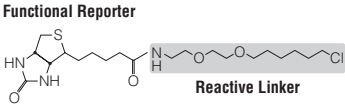
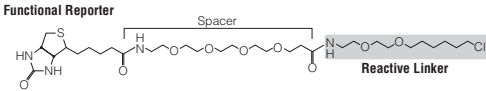
Hata, T. and Nakayama, M. (2007) Rapid single-tube method for small-scale affinity purification of polyclonal antibodies using HaloTag® Technology. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **70**, 679–82.

Grimm, J.B. *et al.* (2017) A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and in vivo imaging. *Nat. Methods* **14**, 987–94.

Grimm, J.B. *et al.* (2021) General method to improve fluorophores using deuterated auxochromes. *JACS Au.* **1**, 690–6.

10. 相关产品

生物素配基

产品	规格	目录号	结构
HaloTag [®] Biotin Ligand	30µl	G8281	
HaloTag [®] PEG-Biotin Ligand	30µl	G8591	

HaloTag[®] Purification and Pull-Down 系统

产品	规格	目录号
HaloTag [®] Mammalian Pull-Down and Labeling System	24 reactions	G6500
HaloTag [®] Complete Pull-Down System	1 each	G6509
HaloTag [®] Mammalian Pull-Down System	24 reactions	G6504
HaloTag [®] Mammalian Protein Detection and Purification System	1 each	G6795
HaloTag [®] Mammalian Protein Purification System	1 each	G6790
HaloTag [®] Protein Purification System	1 each	G6280
HaloTag [®] Protein Purification System Sample Pack	1 each	G6270
HaloCHIP [™] System	20 reactions	G9410

HaloTag[®] Purification and Pull-Down 试剂

产品	规格	目录号
HaloLink [™] Resin	1.25ml	G1912
	2.5ml	G1913
	10ml	G1914
	25ml	G1915
HaloLink [™] Magnetic Beads	40 reactions	G9311

克隆载体

产品	规格	目录号
pHTN HaloTag® CMV-neo Vector	20µg	G7721
pHTC HaloTag® CMV-neo Vector	20µg	G7711

Flexi® 克隆载体

产品	规格	目录号
pFN28A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8441
pFC27K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8431

我们还出售其他 Flexi® 载体以方便您使用。您可在 www.promega.com 上搜索关键词 “halotag flexi vectors”，查阅所有 HaloTag® Flexi® 载体。如需获取适用于 HaloTag® 技术的所有试剂和工具的相关信息，请访问：www.promega.com/resources/technologies/halotag/

11. 内容变更总结

本文件所依据的英文版说明书（修订版 11/23）对以下内容进行了更改：

1. 去除停产产品：目录号为 P1681。
2. 新增了 1nmol 规格的 Janelia Fluor® 及 Janelia Fluor® JFX 系列 HaloTag® 配基。
3. 插入了新的第 4.D 节，并对后续的小节和图例重新进行了编号。
4. 更新了第 4.F、4.H 和 4.I 节的步骤 1。
5. 对第 2.B 节、9.A 节、9.C 节、9.D 节以及 10 节的内容进行了更新。

^(a)BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE STATEMENT. If the researcher is not willing to

accept the conditions of this limited use statement, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide the researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only; no transfer or commercial use of this product is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product or its derivatives, whether or not such product or derivatives are resold for use in research.

With respect to any uses outside this label license, including any commercial, diagnostic, therapeutic or prophylactic uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING

FOR MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE WITH REGARDS TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed

under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(b)U.S. Pat. Nos. 7,867,726, 8,168,405 and 8,257,939 and other patents and patents pending.

^(c)Licensed under U.S. Pat. Nos. 9,933,417, 10,018,624 and 10,161,932 from Howard Hughes Medical Institute.

^(d)The fluorescent dye (the "Dye") of this product (the "Product") is provided under an agreement between Molecular Probes, Inc., and Promega Corporation, and the manufacture, use, sale or import of this Product is subject to: (i) one or more of US Patents and pending US applications and corresponding international equivalents owned by Molecular Probes, Inc. (a wholly owned subsidiary of Invitrogen Corporation); and (ii) one or more of US Patents and pending US applications and corresponding international equivalents owned by Promega Corporation. The purchase of this Product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the Product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The use of this Product for providing medical or diagnostic results or services, including without limitation testing, analysis, or screening, or for providing clinical information or clinical analysis in return for compensation on a per-test basis, is expressly excluded. The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this Product, (b) its components or (c) materials made using this Product or its components to a third party or otherwise use this Product or its components or materials made using this Product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include but is not limited to: (1) use of the Product or its components in manufacturing; (2) use of the Product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the Product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the Product or its components, whether or not such Product or its components are resold for use in research. For information on purchasing a license to the Dye for purposes other than as set forth above, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402-9132. Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504. For information on purchasing a license to this Product for purposes other than as set forth above, contact Promega Corporation.

^(e)BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to

accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only and may modify or link Promega HaloTag[®] ligand building blocks to Promega or customer-supplied moieties. No transfer or commercial use of this product is allowed. Commercial use means any and all uses of this product or derivatives by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product or its derivatives, whether or not such product or derivatives are resold for use in research. With respect to any uses outside this label license, including any commercial, diagnostic, therapeutic or prophylactic uses, please contact Promega for supply and licensing information.

PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANTABILITY OR

FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE WITH REGARDS TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of

Wisconsin, USA.

^(f)Patent Pending.

^(g)Certain applications of this product may require licenses from others.

^(b)BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE STATEMENT. If the researcher is not willing to

accept the conditions of this limited use statement, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide the researcher with a full refund. Researchers may use this product for research use only, no commercial use is allowed. Researchers shall have no right to modify or otherwise create variations of the nucleotide sequence of the HaloTag[®] gene. Researchers may however clone heterologous DNA sequences at either or both ends of said HaloTag[®] gene so as to create fused gene sequences provided that the coding sequence of the resulting HaloTag[®] gene has no more than four (4) deoxynucleotides missing at the affected terminus when compared to the intact HaloTag[®] gene sequence. In addition, researchers must do one of the following in conjunction with use of the product: (1) use Promega HaloTag[®] ligands, which can be modified or linked to Promega or customer-supplied moieties, or (2) contact Promega to obtain a license if Promega HaloTag[®] ligands are not to be used. Researchers may transfer derivatives to others for research use provided that at the time of transfer a copy of this label license is given to the recipients and recipients agree to be bound by the terms of this label license. With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic or prophylactic uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE WITH REGARDS TO THE PRODUCT.

The terms of this agreement shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

© 2004–2022 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Flexi and HaloTag are registered trademarks of Promega Corporation. HaloCHIP, R110Direct and TMRDirect are trademarks of Promega Corporation.

Alexa Fluor and Oregon Green are registered trademarks of Molecular Probes, Inc. Coomassie is a registered trademark of Imperial Chemical

Industries, Ltd. Cy and Sephadex are registered trademarks of GE Healthcare Biosciences. FMBIO is a registered trademark of Hitachi Software Engineering Company, Ltd. Janelia Fluor is a registered trademark of Howard Hughes Medical Institute. MoFlo is a registered trademark of Dako Denmark A/S.

Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals & Plastics Technology Corporation. Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.