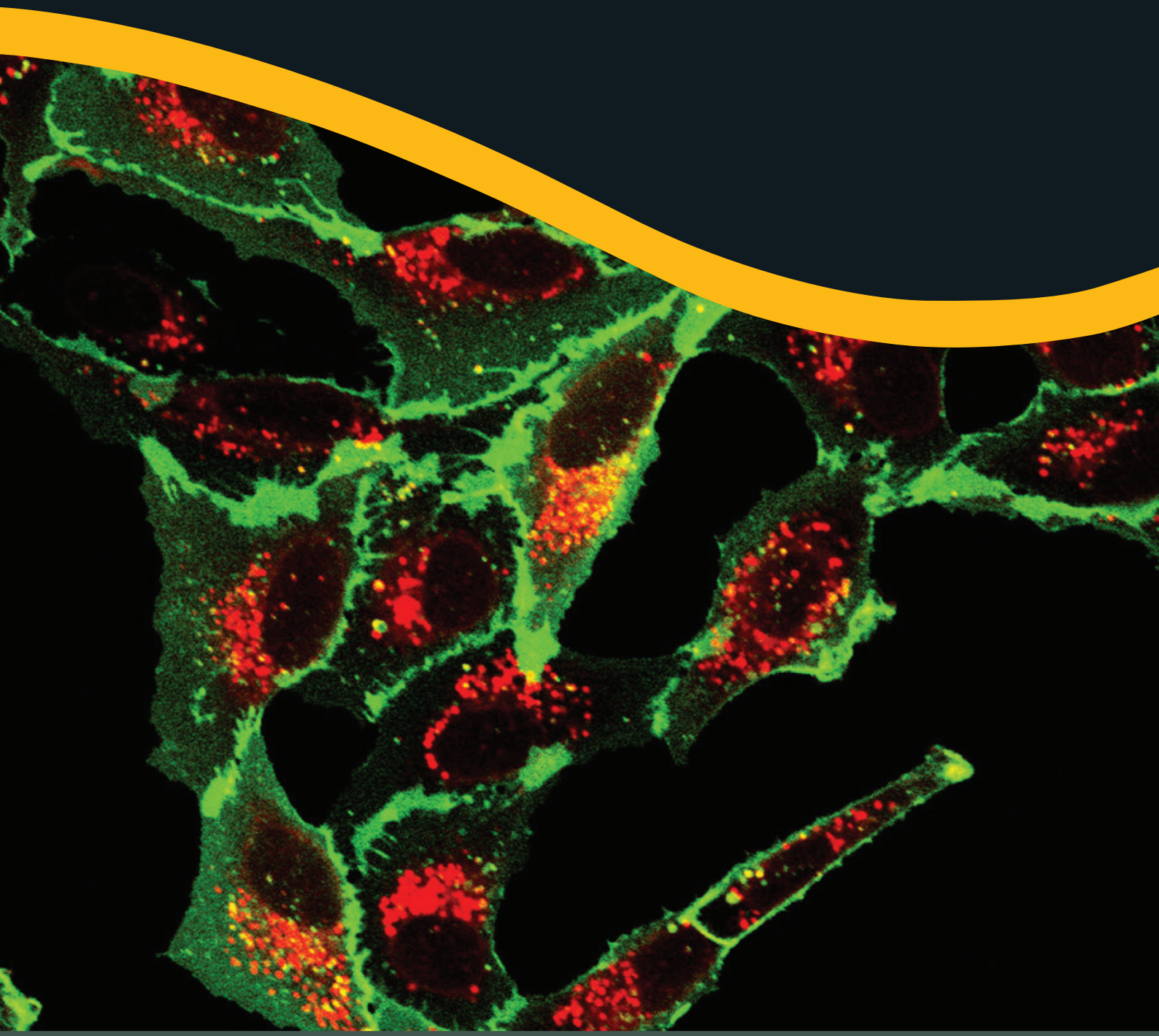


蛋白标记与分析应用

HaloTag[®] Technology for Protein Labeling and Analysis

技术概述 • 细胞成像应用 • 蛋白纯化 • 蛋白互作分析 • 蛋白降解 • 数据示例



Content 目录

1. HaloTag® 蛋白标签技术基本介绍.....3

技术原理	3
不同蛋白标签的比较	4
技术优势及应用	4
HaloTag® 表达载体	5
HaloTag® 荧光配基	9
Janelia Fluor® HaloTag® 配基的应用 HOT	11

2. 细胞成像17

蛋白定位和运输	19
蛋白转位和脉冲追踪研究	20
流式细胞分选	21

3. 蛋白纯化 22

大肠杆菌中的蛋白纯化	24
哺乳动物细胞中的蛋白纯化	25

4. 蛋白互作分析26

蛋白：蛋白相互作用	29
-----------------	----

5. HaloPROTAC 技术.....32



Protein Purification
from *E.coli*

Start with a

HALOTAG FUSION PROTEIN

Your Protein



Super Resolution
Microscopy

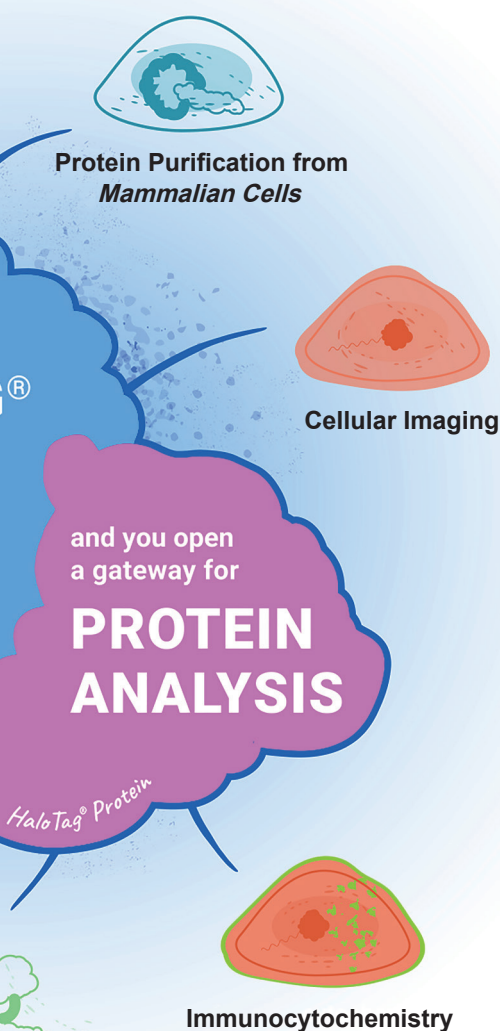


Protein:DNA
Interaction



Protein:Protein
Interaction

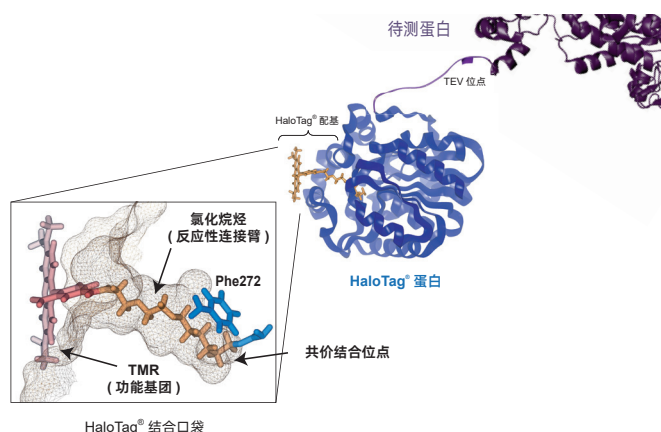
HaloTag® Technology



技术原理

HaloTag® 标签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（氯化烷烃配基）形成共价键（下图）。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条件下稳定性也很好。

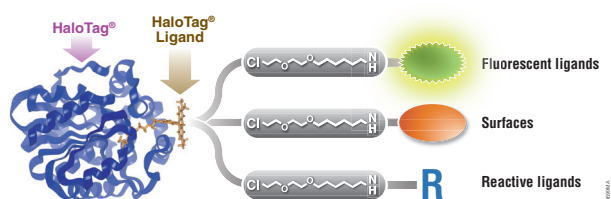
HaloTag® 蛋白是 ~33kDa 的单体蛋白，在哺乳动物、植物或大肠杆菌细胞中均没有内源表达。因此，不存在任何非特异性活性，仅存在高标记特异性。此技术已成功应用于多种系统。具体包括：哺乳动物细胞、细菌、酵母、植物和动物模型。



- HaloTag® 载体包括多克隆位点载体和专利的 Flexi® 克隆技术的载体。
- 配基包括细胞渗透性和非渗透性荧光配基、生物素配基及反应性配基，反应性配基可用于建立自定义的 HaloTag® 连接结构。

HaloTag® 配基 = 氯化烷烃 + 功能基团

- **荧光配基**：用于细胞成像，蛋白相互作用检测 (BRET)。具有不同颜色的荧光基团。
- **非荧光配基**：用于蛋白检测，如生物素 Biotin, PEG-Biotin。
- **表面配基**：用于蛋白纯化，蛋白相互作用研究 (Pull-down)，如磁珠，树脂。
- **反应性配基**：用于连接功能基团，如正电子成像术 (PET) 配基，磁共振试剂。



不同类型蛋白标签的比较

蛋白标签	优点	缺点
His-tag	- 标签尺寸小，6-10 个氨基酸； - 广泛适用于温和或变性的条件，尤其适用于大肠杆菌中的重组蛋白纯化。	- 特异性低，纯化蛋白的纯度较低； - 哺乳动物细胞中宿主蛋白的干扰。
Arg-tag	标签尺寸小，5-6 个氨基酸。	非特异性或切割效率低。
FLAG-tag	- 短肽序列； - 便于进行蛋白质检测和免疫亲和层析纯化。	- 亲和填料成本高； - 低亲和力； - 需要准备抗体和 FLAG 多肽； - 非特异性或切割效率低。
GST-tag	增强可溶性表达。	- 融合表达时需要更多的代谢能量，增加了细胞代谢的负担； - 纯化回收率低，效果不如其他可溶性标签。
MBP-tag	增强可溶性表达的更佳选择。	- 增加细胞代谢的负担； - 随着标签去除，蛋白稳定性和可溶性丧失。
HaloTag	- 最小化背景：与其他哺乳细胞蛋白没有同源性，背景更低； - 不可逆的共价结合：与 HaloTag® 配基的共价结合，严格的洗涤条件也不会对目的蛋白产生影响； - 兼容不同表达系统：反应的进行不需要其他因子参与或转录后修饰，无论真核还是原核表达系统均可使用； - 多重应用：一个融合标签可以满足多方面应用需求。	

参考文献：

- [1] 陈爱春, 彭伟, 汪生鹏. 亲和标签在重组蛋白表达与纯化中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 93-103.
- [2] 崔超, 呼延霆, 尹大川. 重组标签蛋白在蛋白质纯化中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(32): 6372-6378+6359.

技术简要流程



技术应用



HaloTag® 表达载体

Flexi® 载体技术

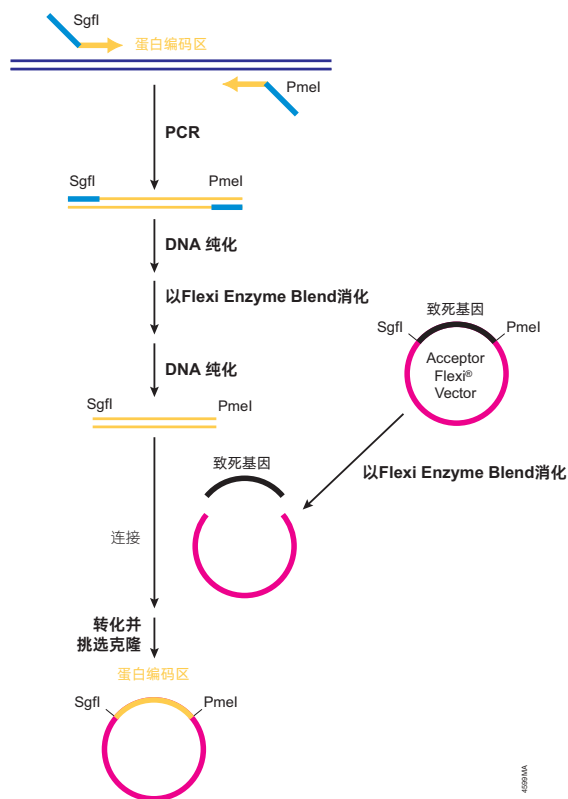
Flexi® 载体系统 (Flexi® Vector System) 是一种简单而强大的蛋白编码序列的定向克隆方法。方法建立在两种位点稀有的限制性酶 SgfI 和 PmeI 基础上, 可以将蛋白编码区在不同的 Flexi® 载体之间转换, 不需要重新测序, 该方法快速、有效、保真度高。Flexi® 载体带有致死性 barnase 基因, 该基因可被插入的目的 DNA 片段所替代, 是连接反应成功的阳性筛选标志。与其它的位点特异性重组载体系统不同, Flexi® 载体系统不需要在目的蛋白的氨基或羧基端加上多个氨基酸。此外, 该系统不需要入门载体, 对于大多数实验而言, 都可以找到符合实验设计的载体。

特点

- **通用:** 您可以随意进行众多实验应用 (例如: 细菌或哺乳动物蛋白的细胞内表达, 无细胞表达), 然后还可以根据需要转向其它实验。
- **省时:** 高效的转移能够直接利用重组克隆, 减少浪费在筛选克隆上的时间。
- **提高生产力:** 对于大规模筛选的需求, 可调整至高通量模式。
- **易于获得:** 不需要许可证书费用, 没有复杂的转移限制。

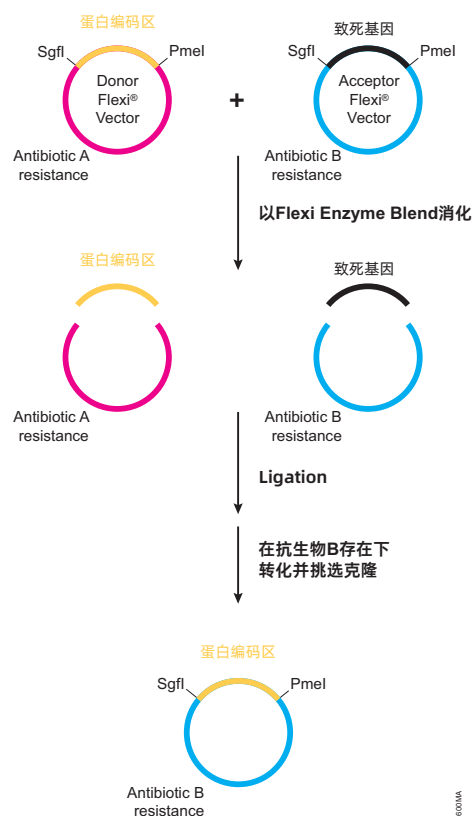
Flexi® 载体的蛋白编码区克隆流程

(通过 PCR 扩增获得蛋白编码区)



将蛋白编码区从 N 端转移或 Flexi® 载体间进行转移

(从带有蛋白编码区的载体中转移)



HaloTag® 融合蛋白表达载体 (哺乳动物细胞)

HaloTag® 融合蛋白表达载体是用于在哺乳动物细胞中 C 端或 N 端表达带有 HaloTag® 标签的融合蛋白。表达的蛋白可以通过 HaloTag® 荧光配基进行蛋白定位, 蛋白运输的细胞成像。并且 HaloTag® 融合蛋白能够通过蛋白伴侣复合物被纯化或 pull-down 检测。

Promega 提供两类 HaloTag® 融合蛋白载体来满足您实验的需求:

- **pHT 系列载体:** 传统多克隆位点载体。
- **pF 系列载体:** Flexi® 克隆载体 - 简单而强大的蛋白编码序列的定向克隆方法, 方法建立在两种位点稀有的限制性酶 SgfI 和 PmeI 基础上, 可以将蛋白编码区在不同的 Flexi® 载体之间转换, 不需要重新测序, 该方法快速、有效、保真度高。



启动子强弱说明: CMV> CMVd1>CMVd2>CMVd3

	载体分类	载体名称	规格	目录号
哺乳动物细胞 C 端 表达载体	pHT 载体系列 (多克隆位点载体)	pHTC HaloTag® CMV-neo Vector	20µg	G7711
		pFC27A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8421
		pFC27K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8431
	pF 载体系列 (Flexi® 克隆载体)	pFC14A HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G9651
		pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G9661
		pFC17A HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	20µg	G1551
		pFC17K HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	20µg	G1321
哺乳动物细胞 N 端 表达载体	pHT 载体系列 (多克隆位点载体)	pHTN HaloTag® CMV-neo Vector	20µg	G7721
		pFN28A HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8441
		pFN28K HaloTag® CMV-neo Flexi® Vector	20µg	G8451
	pF 载体系列 (Flexi® 克隆载体)	pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G2821
		pFN22A HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	20µg	G2841
		pFN22K HaloTag® CMVd1 Flexi® Vector	20µg	G2851
		pFN23A HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	20µg	G2861
		pFN23K HaloTag® CMVd2 Flexi® Vector	20µg	G2871
		pFN24A HaloTag® CMVd3 Flexi® Vector	20µg	G2881

大肠杆菌和无细胞蛋白表达载体

HaloTag® 大肠杆菌和无细胞蛋白表达载体这些载体用于在大肠杆菌和无细胞表达系统中通过 T7 RNA 聚合酶启动子进行 HaloTag® 融合蛋白的诱导表达。表达水平高度依赖于蛋白质的特性，但是一般 N- 末端 HaloTag® 融合蛋白（如 pFN18A/ K, Cat.# G2751, G2681）可以提高表达水平、增强复性，并提高所表达蛋白的溶解度。有两种类型的 HaloTag® 载体：应用传统克隆方法的多克隆位点（MCS）载体和 Flexi® 系统载体。

载体分类	表达	载体名称	规格	目录号	
多克隆位点 表达载体	N 端表达载体	大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中 表达 His6-HaloTag® 双标签蛋白	pH6HTN His6HaloTag® T7 Vector	20µg	G7971
	C 端表达载体	大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中 表达 His6-HaloTag® 双标签蛋白	pH6HTC His6HaloTag® T7 Vector	20µg	G8031
Flexi® 克隆 载体	N 端表达载体	大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中具有 N- 末端 His6-HaloTag® 双标签蛋白 的表达。(氨苄青霉素筛选)	pFN29A His6HaloTag® T7 Flexi® Vector	20µg	G8261
	N 端表达载体	大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中具有 N- 末端 His6-HaloTag® 双标签蛋白 的表达。(卡那霉素筛选)	pFN29K His6HaloTag® T7 Flexi® Vector	20µg	G8331
	C 端表达载体	用于大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中 具有 C- 末端 His6-HaloTag® 双标签 蛋白的表达。(氨苄青霉素筛选)	pFC30A His6HaloTag® T7 Flexi® Vector	20µg	G8321
	C 端表达载体	用于大肠杆菌和 T7 无细胞表达系统中 具有 C- 末端 His6-HaloTag® 双标签 蛋白的表达。(卡那霉素筛选)	pFC30K His6HaloTag® T7 Flexi® Vector	20µg	G8381

Kazusa 克隆：让您的实验一步到位

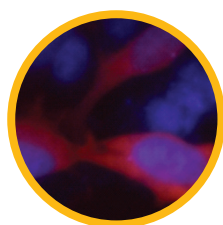
Kazusa Genome Technology (KGT) 是一家日本的学术研究机构，致力于基因组规模研究和个体基因功能研究。Kazusa ORFeome 项目的发起是为了创建一个人类和小鼠的 ORFs 库，从而为更大的科研群体提供可用的，高度验证的 ORFeome。KGT 是 Global ORFeome Collaboration 的成员之一，也是 HUGE (Human Unidentified Gene-Encoded) 大蛋白方面的专家 (>4kb)。Promega 与 KGT 建立了合作伙伴关系，可为 Promega 客户提供 Kazusa's 的实验验证的 ORFs 克隆，加速您的研究进程。

基因库	基因库数量
全部人类 HaloTag ORF 克隆	9,020
转录因子	930
激酶	800
表观遗传学相关	600
泛素相关	750
RNA 结合	480
细胞因子	330
生长因子	280
蛋白酶	270
磷酸酶	90
G 蛋白偶联受体 (GPCRs)	640
转运蛋白	430

经实验验证的克隆

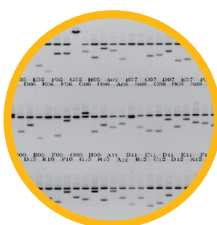
荧光显微镜成像验证

用 HaloTag® TMR 配基对 HaloTag® 融合蛋白原位标记和成像



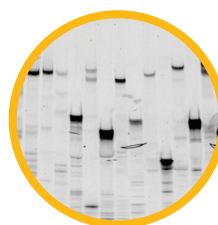
插入片段大小验证

通过琼脂糖凝胶电泳验证



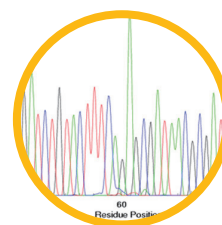
表达验证

以 SDS-PAGE 分析表达在 HEK293 细胞裂解物中的 HaloTag® 融合蛋白



测序验证

以单程测序的方法进行 5' 和 3' 端的测序



特点	HaloTag® 载体库 目录号以 FHC 开头	Flexi® 载体库 目录号以 FXC 开头
克隆库的规模	>9000	>6300
融合标签	HaloTag® 蛋白标签用于蛋白纯化，成像和 pull-down 等应用	无标签
克隆验证	测序验证	✓ 100% clones
	插入验证	✓ 99.9% clones
	表达验证	✓ 99.2% clones
	成像验证	✓ 78% clones
产品提供模式	DNA	DNA

Kazusa 明白广泛验证的价值，为 HaloTag® ORF 克隆的客户提供相应的验证。

了解及搜索载体信息，请浏览下面链接或直接联系 Promega 公司(扫描右侧二维码关注公众号)

www.promega.com/products/pm/halotag-technology/kazusa-collection/

直接搜索克隆请点击下面链接：

www.promega.com/FindMyGene/search.aspx



HaloTag® 荧光配基

HaloTag® 技术为在活细胞中和体外进行快速、定点标记 HaloTag® 融合蛋白提供了新的选择。该技术基于 HaloTag® 蛋白和合成配基之间形成的共价键，这些配基具有多种功能，包括荧光标记、亲和标记和附着在固相载体上；而共价键在生理条件下可迅速形成，且具有高度特异性和本质上的不可逆，形成的复合物即使在变性条件下也是稳定的。因此，使用 HaloTag® 只需要一个可以表达的单一融合结构，用任何一种荧光分子标记，即可在活细胞或固定细胞中进行成像。

HaloTag® 配基分类

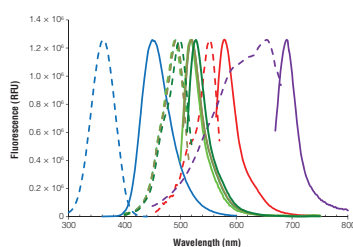
HaloTag® 配基是非细胞毒性配基，可与活细胞或固定细胞中带有 HaloTag® 标签的融合蛋白共价结合从而形成不可逆标记。Promega 提供不同类型的荧光配基，见下表。各种不同颜色的 HaloTag® 配基可轻松改变 POI 的颜色并与类似 GFP 和其他细胞荧光基团整合使用。分类如下：

按标记模式分：

- 快速配基：最快可在 15 分钟完成标记。
- 免洗配基：在细胞铺板或细胞转染时即可加入，标记目标蛋白 (POI)，而无需洗去未结合的配基。也可使用包含洗涤步骤在内的标准标记操作程序（见右图）。

按渗透性分：

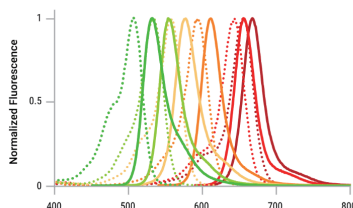
- 渗透性配基：可透过细胞膜标记细胞内蛋白。
- 非渗透性配基可用于跟踪细胞膜蛋白。



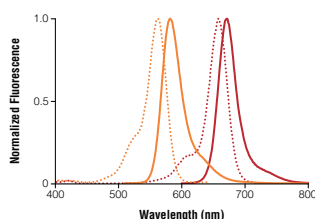
配基	最大激发波长 (虚线)	最大发射波长 (实线)
HaloTag® Coumarin	362nm	450nm
HaloTag® Alexa Fluor® 488	499nm	518nm
HaloTag® Oregon Green®	492nm	520nm
HaloTag® diAcFAM	492nm	521nm
HaloTag® R110 Direct™	498nm	528nm
HaloTag® TMR Direct™	552nm	578nm
HaloTag® Alexa Fluor® 660	654nm	690nm

Janelia Fluor® HaloTag® Ligands

推荐



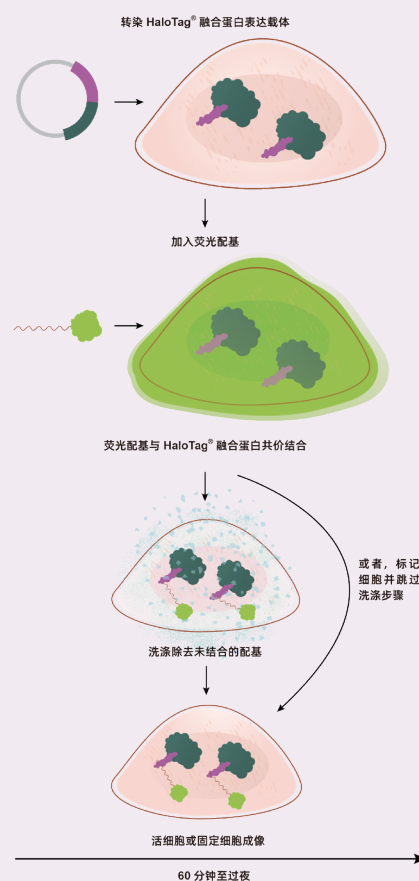
配基	最大激发波长 (虚线)	最大发射波长 (实线)
Janelia Fluor® 503	503nm	529nm
Janelia Fluor® 525	525nm	549nm
Janelia Fluor® 549	549nm	571nm
Janelia Fluor® 585	585nm	609nm
Janelia Fluor® 635	635nm	652nm
Janelia Fluor® 646	646nm	664nm



配基	最大激发波长 (虚线)	最大发射波长 (实线)
Janelia Fluor® JFX554	554nm	576nm
Janelia Fluor® JFX650	650nm	667nm

细胞标记成像简要流程图

HaloTag® 标记可适用于洗涤流程（1 小时内完成），也可适用于无洗涤流程（需过夜完成），这取决于您的实验需求。



Janelia Fluor® HaloTag® Ligand 能够表征内源性细胞环境中的 HaloTag® 融合蛋白。与 HaloTag® 配基关联在一起的染料使其亮度增强，并能够用于检测和单分子成像研究。Janelia Fluor® 系列的荧光染料 (JFX) 是由罗丹明染料改造得来，提高了荧光量子产量，抑制光化学诱导的光谱偏移，并减缓了不可修复的光漂白。

用于细胞成像的 HaloTag® 荧光配基

分类	用途	配基	最大激发 波长 (虚线)	最大发射 波长 (实线)	规格	目录号
细胞渗透性 “快速、免洗” 配基	用于 细胞内 标记 适用于快速且无洗涤步骤操作流程，如：活细胞标记	Janelia Fluor® 549 HaloTag® Ligand	549nm	571nm	5 pack	HT1020
		Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand	646nm	664nm	5 pack	HT1060
		Janelia Fluor® JFX 554 HaloTag® Ligand	554nm	576nm	5 pack	HT1030
		Janelia Fluor® 503 HaloTag® Ligand	503nm	529nm	5 pack	HT1010
		Janelia Fluor® 635 HaloTag® Ligand	635nm	652nm	5 pack	HT1050
		Janelia Fluor® JFX 650 HaloTag® Ligand	650nm	667nm	5 pack	HT1070
		Janelia Fluor® 585 HaloTag® Ligand	585nm	609nm	5 pack	HT1040
		Janelia Fluor® 525 HaloTag® Ligand	525nm	549nm	Please Enquire	
非细胞渗透性配基	用于 细胞表面 标记	Janelia Fluor® 549i HaloTag® Ligand	549nm	571nm	5 pack	Please Enquire
		Janelia Fluor® 635i HaloTag® Ligand	635nm	652nm	5 pack	Please Enquire
细胞渗透性 “快速”配基	用于 细胞内 标记 应用方向如：活细胞或固定细胞成像	HaloTag® TMR Ligand	555nm	585nm	30µl 15µl	G8251 G8252
		HaloTag® Oregon Green® Ligand	492nm	520nm	30µl 15µl	G2801 G2802
		HaloTag® DiAcFAM Ligand	492nm	521nm	30µl 15µl	G8272 G8273
		HaloTag® Coumarin Ligand	362nm	450nm	30µl 15µl	G8581 G8582
细胞渗透性 “免洗”配基	用于 细胞内 标记 应用方向如：脉冲追踪标记观察蛋白周转	HaloTag® R110 Direct™ Ligand	498nm	528nm	30µl	G3221
		HaloTag® TMR Direct™ Ligand	552nm	578nm	30µl	G2991
非细胞渗透性 “快速”配基	用于 细胞表面 标记 应用方向如：活细胞标记	HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	499nm	518nm	30µl 15µl	G1001 G1002
		HaloTag® Alexa Fluor® 660 Ligand	654nm	690nm	30µl 15µl	G8471 G8472
		Lyophilized Alexa Fluor® 488 HaloTag® Ligand (无 DMSO 的冻干粉形式)	499nm	518nm	Please Enquire	
		Lyophilized Alexa Fluor® 660 HaloTag® Ligand (无 DMSO 的冻干粉形式)	654nm	690nm	Please Enquire	

Janelia Fluor® 配基的应用

FACS

超分辨显微成像技术

STED 显微成像技术

活细胞显微成像技术

超分辨显微成像技术

超分辨显微成像技术是一种可利用荧光探针针对细胞内低至蛋白等分子水平问题进行研究的技术。使用这种技术时，用户可实现细胞内荧光探针标记的分子，其位置的可视化，并观察它们之间发生的相互作用。这种技术可实现对活细胞内部以及亚细胞结构和细胞器相关蛋白的可视化，因此其可使用户对荧光探针标记特异性蛋白的生物学作用实现更为深入、全面的了解。HaloTag® 技术提供了一种用明亮荧光染料共价标记靶蛋白的方法，从而更好了解相关蛋白在活细胞中的功能。

如何进行超分辨显微成像？

超分辨显微成像技术所需的工具包括明亮的 Janelia Fluor HaloTag Ligands，例如：Janelia Fluor® 549 和 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基、细胞内表达的 HaloTag 融合蛋白及一台高性能光学显微镜。Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配体和 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基能够在内源性细胞环境中对 HaloTag® 融合蛋白进行标记。一旦与 HaloTag® 融合蛋白发生共价结合后，这些亮度增强的配体染料使得用户可通过以下方式检测和研究活细胞中的单分子：1.) 荧光激活细胞分选术（FACS）；2) 标准共聚焦成像技术；以及，3) 用荧光成像仪进行凝胶检测。

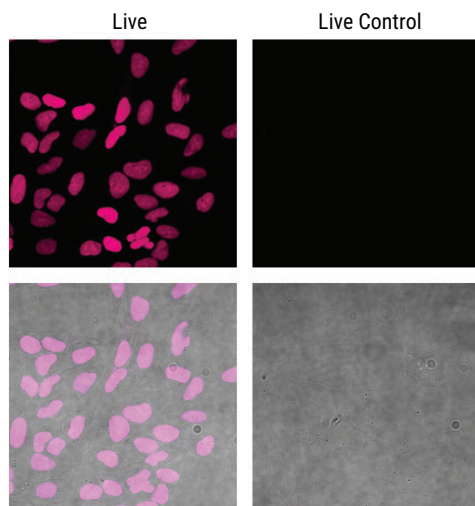
使用 Janelia Fluor® HaloTag® 配基可实现

单分子标记

快速细胞标记

高信噪比和特异性

应用举例



- 将亲本 U2OS 细胞和表达 HaloTag®（含有核定位序列）的 U2OS 细胞粘附至玻璃底腔室载玻片上，并使用 200nM Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基标记 15 分钟。Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配基在 637nm 的激光激发下，对细胞进行了成像。
- 在表达 HaloTag® 的细胞中，标记部位仅为细胞核。
- 亲本细胞（图所示活细胞对照 Live Control）显示未标记。
- 该组图像的最上面一行仅为荧光信号。底行列出的是在同一相应激光激发波长处收集的透射图像，且荧光图像重叠。
- 使用了配备 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。

应用文献：

1. Min Guo, *et al.* Single-shot super-resolution total internal reflection fluorescence microscopy. **Nature Methods**, 2018.
2. Roman S. Erdmann, *et al.* Labeling Strategies Matter for Super-Resolution Microscopy: A Comparison between HaloTags and SNAP-tags. **Cell Chem Biol.**, 2019.
3. Rieke Minner-Meinen, *et al.* Split-HaloTag imaging assay for sophisticated microscopy of protein-protein interactions in planta. **Plant Communications**, 2021.

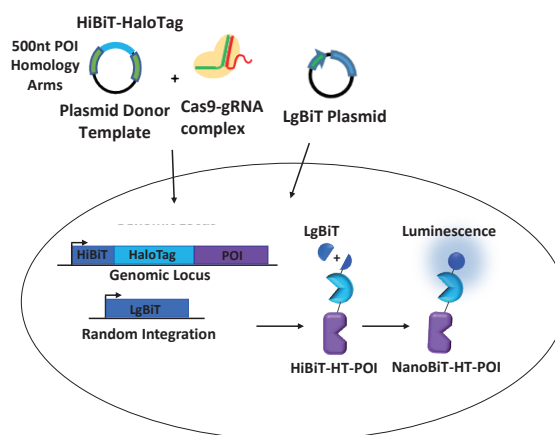


扫码查看 Janelia Fluor®
HaloTag® Ligands 详细介绍

Janelia Fluor® 配基在内源性表达蛋白中的应用

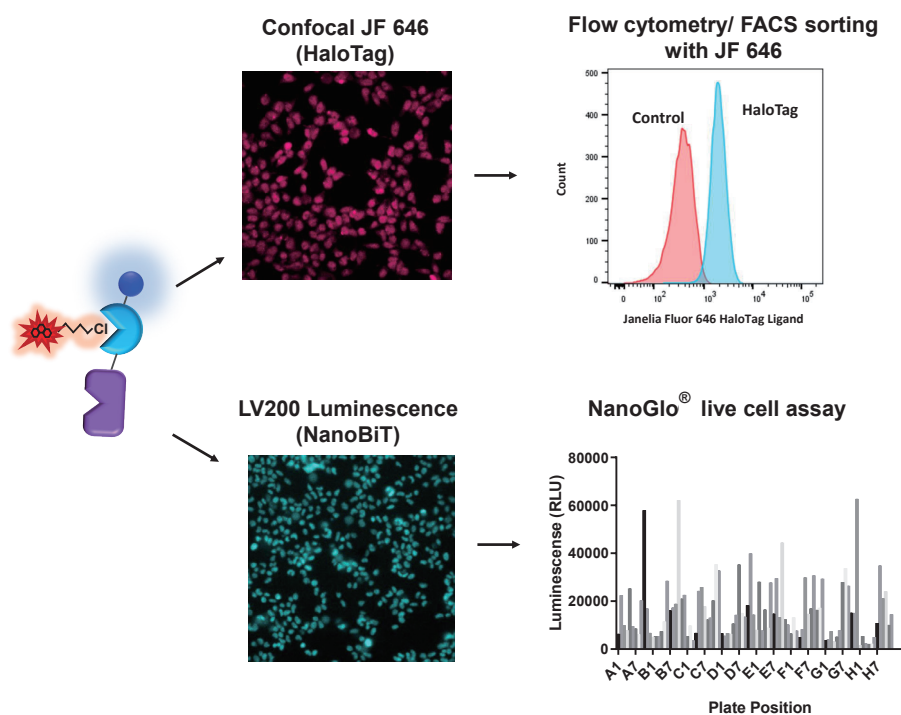
用 CRISPR 技术导入 HaloTag 和 HiBiT 的流程

- 利用供体载体（包含针对目标蛋白 (POI) 的 500 个核苷酸同源臂）将 HaloTag® (HT) 和 HiBiT 插入基因组位点
- Cas9/gRNA complex 指导对基因组位点的切割
- 可利用 LgBiT 质粒创建 LgBiT 稳定细胞株
- LgBiT 与 HiBiT 互补，生成具有明亮发光信号的功能性的酶 (NanoBiT®)



筛选及验证内源性标记的目标蛋白

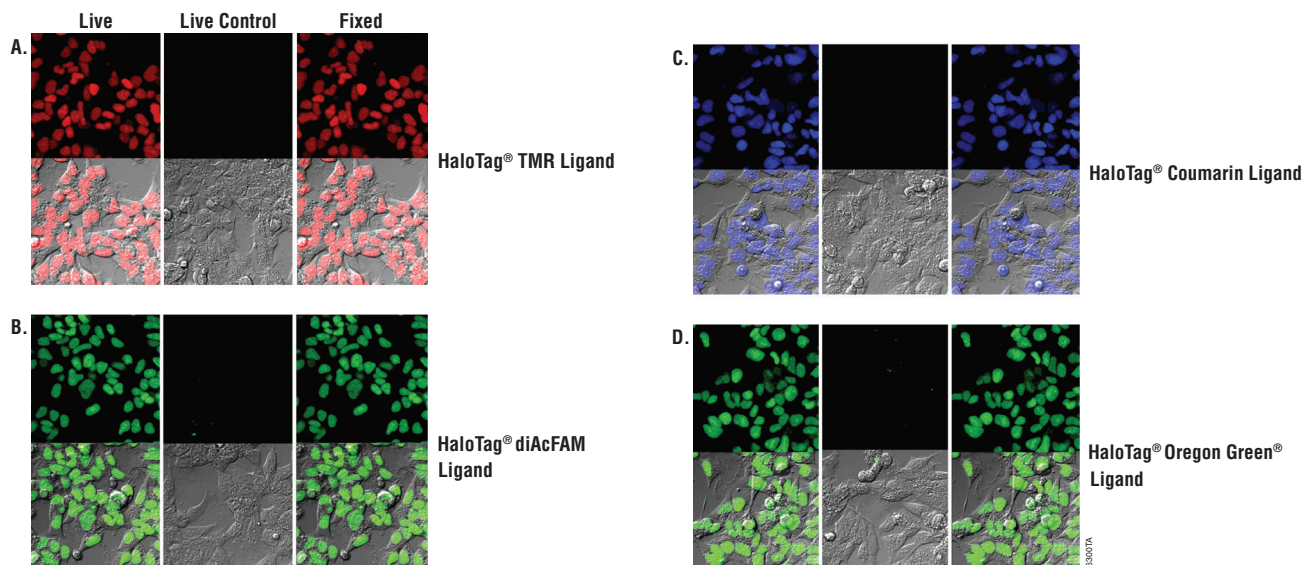
HiBiT-HaloTag-BRD4 HEK293 LgBiT stable cells



- Janelia Fluor® HaloTag® ligands (JF 646) 可用于活细胞成像和流式细胞仪分选以挑选出那些通过 CRISPR 导入 HaloTag® 的细胞
- 将 HaloTag 和 HiBiT/LgBiT 结合可进行细胞成像以及活细胞检测，以便在流式细胞仪分选后鉴定阳性克隆

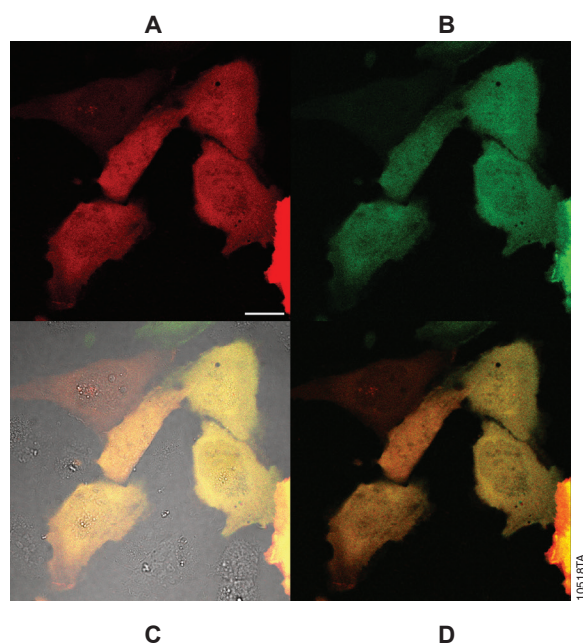
HaloTag® 配基应用示例

细胞渗透性“快速”配基（用于细胞内标记）



使用 HaloTag® 荧光配基进行活细胞或固定细胞成像。HaloTag® 基因与 3 拷贝核定位序列融合后，稳定转染 HEK293 细胞，未转染的 HEK293 细胞作为对照；其中用 **HaloTag®TMR** 标记如图 A 所示，**HaloTag® diAcFAM** 标记如图 B 所示，**HaloTag® Coumarin** 标记如图 C 所示或 **HaloTag®Oregon Green®** 标记如图 D 所示。

细胞渗透性“免洗”配基（用于细胞内标记）

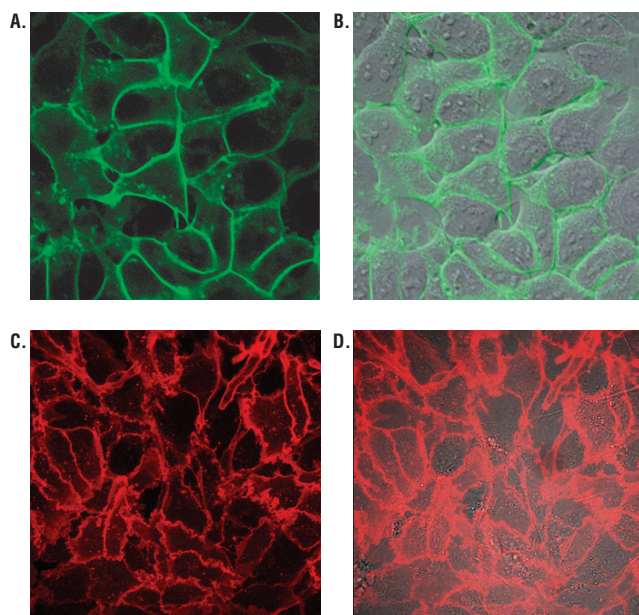


采用免洗标记法对表达细胞内 HaloTag® 蛋白的细胞进行脉冲追踪标记可直接观察蛋白周转。

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™ 荧光标记了在细胞在第一个 20 小时之前和之间表达形成的蛋白池 (**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。

HaloTag® 配基应用示例

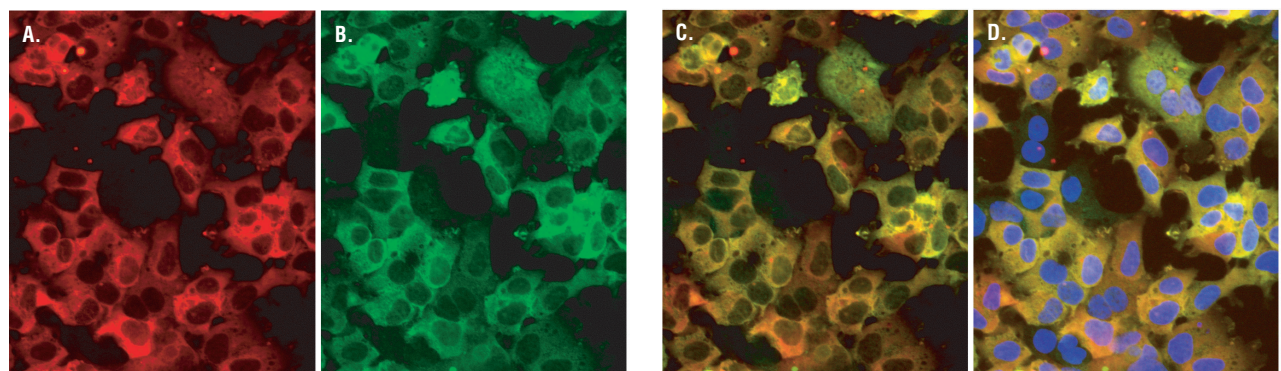
非细胞渗透性“快速”配基（用于细胞表面标记）



细胞表面 HaloTag® 融合蛋白的活细胞标记。

图 A 和 B 显示的是：稳定表达 HaloTag®-ECS(细胞外表面；由信号序列和 b1- 整合蛋白的单个跨膜结构域组成) 融合蛋白的 HEK293 细胞，使用 **HaloTag®Alexa Fluor®488 配基** 标记并成像。图 C 和 D 显示的是：表达 HaloTag®-EDG1 (GPCR 受体) 融合蛋白的 U2OS 细胞，使用 **Alexa Fluor®660 配基** 标记并成像。共聚焦图像显示，荧光 (图 A 和 C) 仅限于细胞表面，在 DIC/ 荧光叠加的图 (图 B 和 D) 也可以清楚地看到。图像是在 Olympus FV500 共聚焦显微镜上使用适当的滤光片组合生成的。

使用免疫细胞化学 (ICC) 技术和 HaloTag® 进行叠加检测



HaloTag®-p65 融合蛋白与 HaloTag®TMR 配基和 Anti-HaloTag®pAb 共标记。用 5 μ M **HaloTag® TMR 配基** 标记细胞 15 分钟，轻柔洗涤后用 2 μ g/ml 带有 **AlexaFluor® 488** 的抗兔 IgG (Invitrogen) 孵育。最后，用 DAPI (Vector Laboratories) 对细胞进行复染。图像用 Olympus IX81 落射荧光显微镜收集，设置对 TMR 和 AlexaFluor®488 适合的滤镜。图 A. 使用 HaloTag® TMR 配基对 HEK293-p65-HT2 细胞进行胞质 (红色) 标记。图 B. 使用 Anti-HaloTag® pAb 进行胞质 (绿色) 标记。图 C. 配基和抗体结合活性的共定位。图 D. 红色和绿色荧光的叠加与 DAPI 对细胞核的复染 (蓝色)。

可定制的活性配基及抗体

HaloTag® Ligand Building Blocks

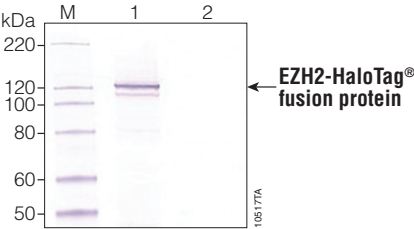
HaloTag® Ligands (HaloTag® 配基) 可携带多种类型的功能基团，如荧光探针、亲和标签、固相结合物等。在正常生理条件下，形成共价键的过程快速、高度特异且不可逆。HaloTag® Ligand Building Block 使研究者可以将与 HaloTag® 蛋白发生反应的氯化烷烃基团应用于具有兼容化学基团的任何化合物或任何表面，从而创造出无限可能的应用。

配基	用途	规格	目录号
含有一个有活性的琥珀酰亚胺酯 (SE) 基团，该基团通过 1 个乙二醇重复 (O2) 连接一个烷基氯	HaloTag® Succinimidyl Ester (O2) Ligand 可以成功地与任何含有氨基的报告基团、蛋白或核酸衍生物结合，形成稳定的酰胺键。	5mg	P1691
含有一个有活性的琥珀酰亚胺酯 (SE) 基团，该基团通过 3 个乙二醇重复 (O4) 连接一个烷基氯	HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand 可以成功地与任何含有氨基的报告基团、蛋白或核酸衍生物结合，形成稳定的酰胺键。	5mg	P6751
含有一个有活性的酰胺基团，该基团通过 1 个乙二醇重复 (O2) 连接一个烷基氯	HaloTag® Amine (O2) Ligand 可以成功地与任何含有活化的羧酸、磺酰卤化物或异氰酸盐的报告基团、蛋白或核酸衍生物结合。	5mg	P6711
含有一个有活性的酰胺基团，该基团通过 3 个乙二醇重复 (O4) 连接一个烷基氯	HaloTag® Amine (O4) Ligand 可以成功地与任何含有活化的羧酸、磺酰卤化物或异氰酸盐的报告基团、蛋白或核酸衍生物结合。	5mg	P6741

HaloTag® Antibodies

Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody 是鼠源抗 HaloTag® 蛋白的单克隆抗体，可用于 Western blotting 检测 HaloTag® 融合蛋白。HaloTag® 平台解决了对功能性蛋白分析的灵活性要求，可应用于细胞成像、蛋白纯化和蛋白 pull-down。

产品	用途	浓度	规格	目录号
Anti-HaloTag® pAb(a)	用于所有其他的免疫学检查方法	1mg/ml	200µg	G9281
Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody ^(a) (for Westerns)	用于 Western blotting 实验	1mg/ml	200µg	G9211

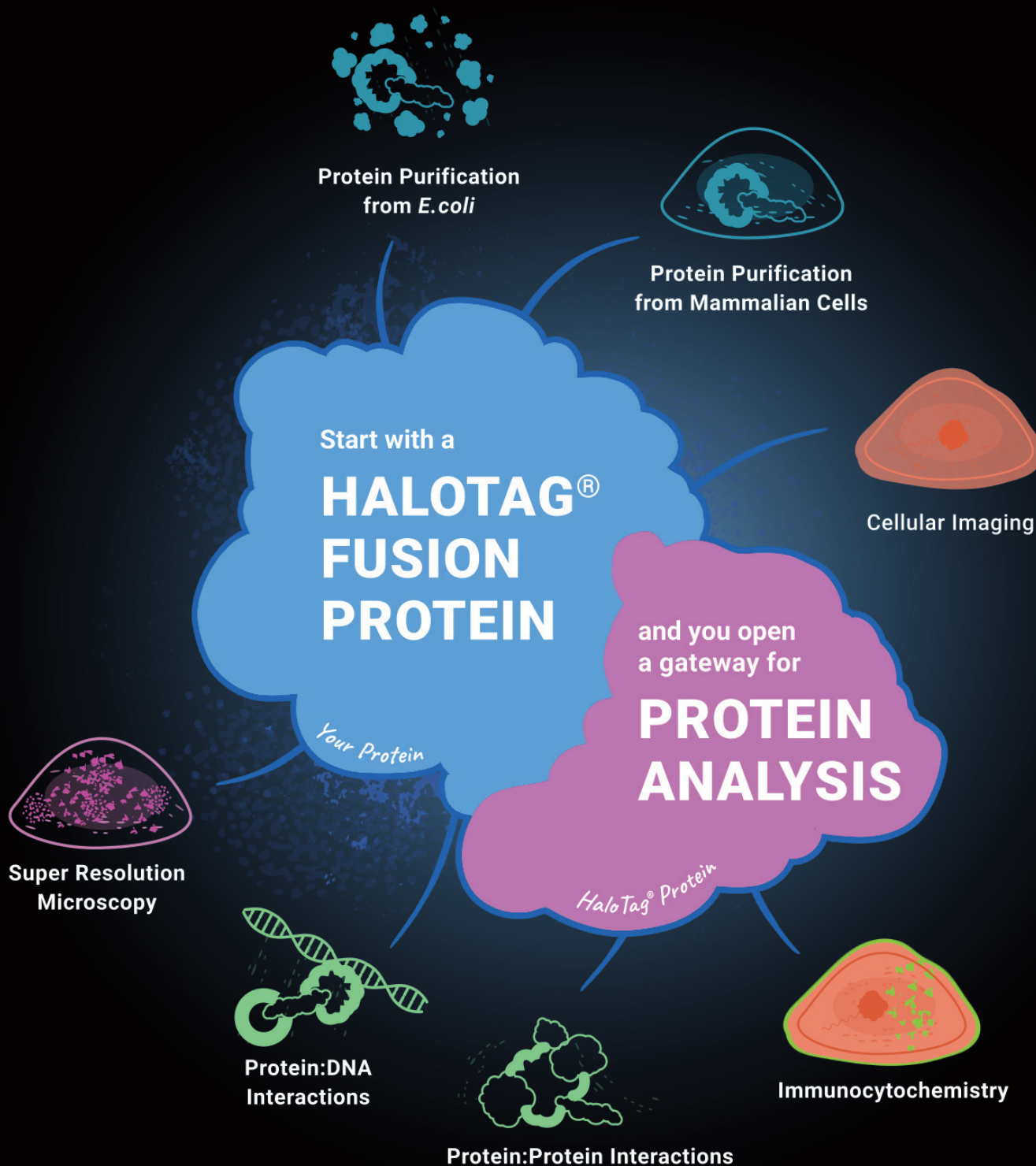


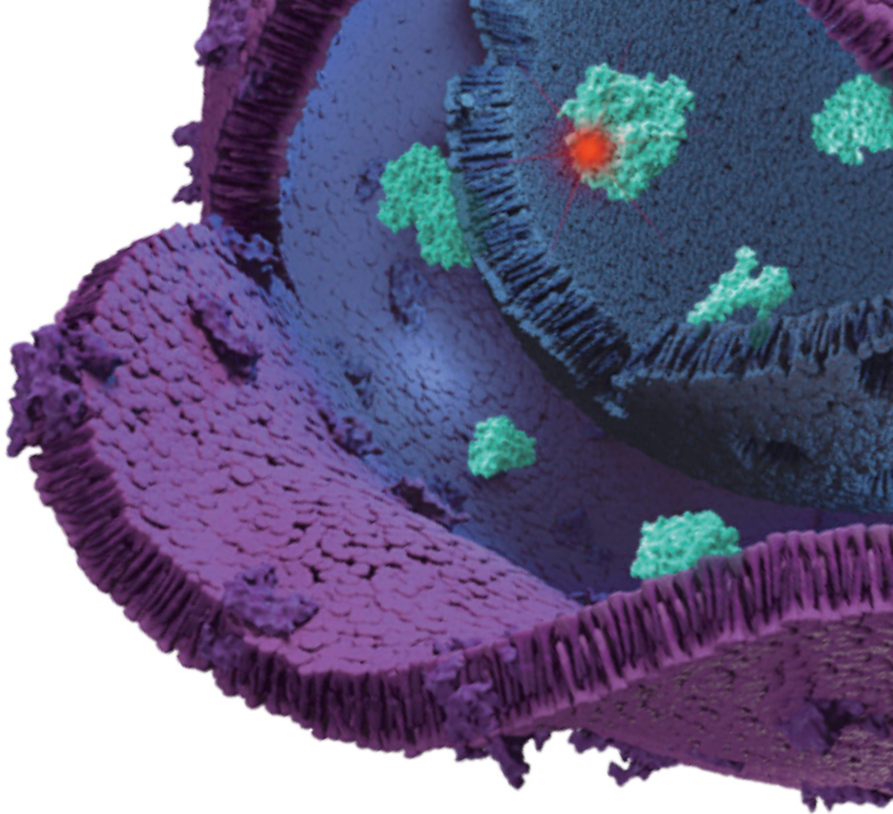
左图：使用 Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody(mAb) 进行 Western blot，检测 EZH2-HaloTag® (HT) 融合蛋白。结果显示，从 HEK293T 细胞裂解物中能够特异的检测到 HaloTag® 融合蛋白（通道 1）。通道 2 是未转染的对照组。

更多操作方法及实验流程请登录 www.promega.com 或 wechat.promega.com.cn 搜索 TM260 查看最新版说明书。

HaloTag® Technology

一个蛋白标签，多种应用





细胞成像

Cellular Imaging

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® 配基和试剂盒，此外还提供可定制的反应性 Ligand Building blocks。

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
- 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
- 仅需设计一种基因构建体，即可用于多种应用场景

使用 HaloTag® 荧光配基进行细胞成像的应用

- 活细胞和固定细胞成像
- 蛋白定位及运输
- 转位
- 细胞分选
- 超分辨率显微成像
-

固定细胞成像

HaloTag® technology: cell imaging and protein analysis

G. LOS, PH.D., R. LEARISH, PH.D., NATASHA KARASSINA, M.S., CHAD ZIMPRICH, B.S., *et.al.*

www.Promega.com 查看原文

实验背景

HaloTag® 配基在细胞固定后仍保持其荧光特性，可以在进行细胞免疫化学检测 (ICC) 后进行叠加检测。Tubulin- 微管蛋白是组成微管的蛋白，分为结构相似的 α 和 β - 微管蛋白 2 种，微管的功能是维持细胞形态，辅助细胞内运输，与其他蛋白共同装配成纺锤体、基粒、中心粒、鞭毛、纤毛神经管等结构，对于保持细胞形状、运动、胞内物质运输起到了不可或缺的作用。

我们以 TMR 配基或 diAcFAM 配基标记表达 HaloTag® - α -tubulin 的 HeLa 细胞，以抗 β III-tubulin 的一抗和 Alexa Fluor® 488- 或 Cy®3- 结合的二抗处理细胞进行 ICC 的检测。所有细胞质中都表达有 β III-tubulin。HaloTag® - α -tubulin 报告基因蛋白存在于被转染了该基因的细胞中。以 HaloTag® Technology 和 ICC 双色荧光成像观察被标记的细胞质中的不同蛋白。

实验材料

转染有 HaloTag® - α -tubulin 融合蛋白的 HeLa 细胞；HaloTag® diAcFAM 配基 (绿色荧光)；HaloTag® TMR 配基 (红色荧光)；0.1% Triton®-X 100；Anti- β III Tubulin mAb (Cat.# G7121)；带有 Alexa Fluor® 488 (绿色荧光) 的二抗；带有 Cy®3 (红色荧光) 的二抗。

检测流程

- 转染有 HaloTag® - α -tubulin 融合蛋白的 HeLa 细胞以绿色 HaloTag® diAcFAM (图 A-C) 或红色 TMR 配基标记 (图 D-F)。
- 洗涤并以 3.7% 多聚甲醛固定细胞。
- 细胞以 0.1% Triton®-X 100 透性化处理。
- 以 Anti- β III Tubulin mAb (1:5,000 稀释, Cat.# G7121) 免疫标记细胞。
- 以 1:500 稀释的带有 Cy®3 的二抗 (图 A-C) 或带有 Alexa Fluor® 488 的二抗 (图 D-F) 孵育细胞。

实验结果

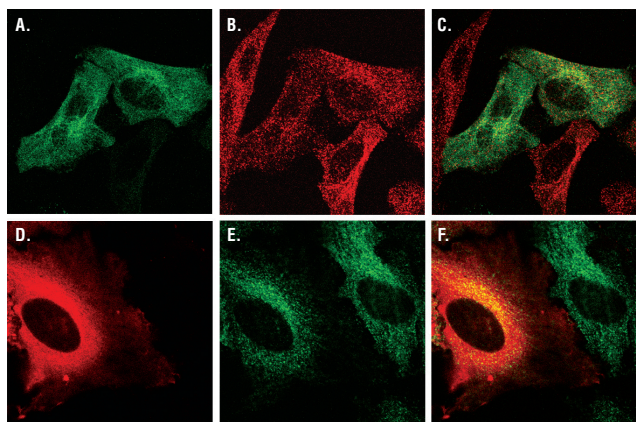


图 A：转染有 HaloTag® - α -tubulin 融合蛋白的细胞结合 HaloTag® diAcFAM 配基荧光成像。

图 B： β III tubulin 蛋白 + Anti- β III Tubulin mAb + 带有 Cy®3 的二抗的免疫化学荧光成像。

图 C：图 A 和图 B 的叠加荧光成像。

图 D：HaloTag® - α -tubulin 融合蛋白结合 HaloTag® TMR 配基荧光成像。

图 E： β III tubulin 蛋白 + Anti- β III Tubulin mAb + 带有 Alexa Fluor® 488 二抗的免疫化学荧光成像。

图 F：图 D 和图 E 的叠加荧光成像。

蛋白定位和运输

Spatial separation and bidirectional trafficking of proteins using a multi-functional reporter

Soshana Svendsen, Chad Zimprich, Mark G McDougall, Dieter H Klaubert and Georgyi V Los

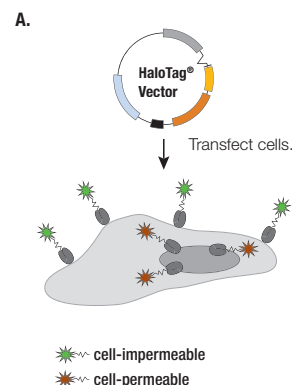
doi: [10.1186/1471-2121-9-17](https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-17) 查看原文

HaloTag® 的配基分为细胞渗透性和非渗透性配基，可分别标记细胞内和细胞表面的蛋白，可用于追踪膜蛋白的空间和时间的动态变化，处理和运输。

实验背景

整合素 Integrin 是细胞表面受体的主要家族，由 α 和 β 两个亚基形成的异二聚体。迄今发现 18 种 α 亚基和 9 种 β 亚基。它们按不同的组合构成 20 余种整合素。含 $\beta 1$ 亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的粘附，会在细胞表面和胞浆之间进行蛋白运输。

我们将 HaloTag 与 $\beta 1$ 整合素细胞外的结构域融合表达，并稳定转染至 HEK293 细胞，用非细胞渗透性配基 HaloTag®Alexa Fluor®488 配基标记细胞表面的 $\beta 1$ Int-HaloTag® 融合蛋白，然后再以渗透性 TMR 配基标记细胞内的 $\beta 1$ Int-HaloTag® 融合蛋白（图 A）。



实验材料

稳定表达 $\beta 1$ Int-HaloTag® 蛋白的 HEK293 细胞

HaloTag®Alexa Fluor®488 配基

HaloTag®TMR 配基

检测流程

- 稳定表达 $\beta 1$ Int-HaloTag® 蛋白的 HEK293 细胞先以非细胞渗透性配基 HaloTag® Alexa Fluor®488 配基标记，再以 HaloTag® TMR 配基标记。
- 标记后立即进行激光共聚焦成像显示 $\beta 1$ Int-HaloTag® 在细胞膜表面和细胞内的定位（图 B）。
- 细胞标记 12 小时后重新成像显示受体的内吞和细胞膜的运输（图 C）。
- SDS 凝胶的荧光扫描成像：细胞标记后 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 12 小时收集细胞，裂解并跑 SDS PAGE 凝胶。（图 D）。

实验结果

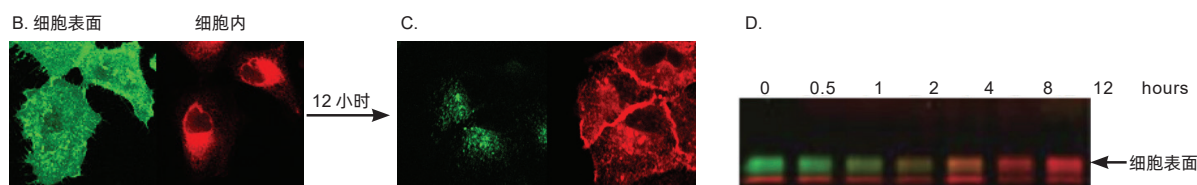


图 B: 稳定表达 $\beta 1$ Int-HaloTag® 融合蛋白的 HEK293 细胞按顺序以 HaloTag® 488 和 TMR 配基标记后立即成像的结果显示空间上分开的蛋白池。

图 C: 在标记后 12 小时重新成像，显示出两个蛋白池的瞬时转位。

图 D: 荧光扫描 SDS 凝胶成像显示 $\beta 1$ Int-HaloTag® 蛋白，上面的条带为细胞表面的 $\beta 1$ Int-HaloTag® 蛋白，从荧光颜色变化可见， $\beta 1$ Int 蛋白的双向运输。

应用文献:

- Sei Kuriyama, *et al.* PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer, **Cell Death Discovery**, 2018.
- Elizabeth J Akin, *et al.* Paclitaxel increases axonal localization and vesicular trafficking of Nav1.7, **Brain**, 2021.

蛋白周转和脉冲追踪研究

Pulse-Chase Experiment for the Analysis of Protein Stability in Cultured Mammalian Cells by Covalent Fluorescent Labeling of Fusion Proteins

Kei Yamaguchi, Shinichi Inoue, Osamu Ohara, Takahiro Nagase

Note: doi: [10.1007/978-1-60761-232-2_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-232-2_10) 查看原文

实验背景

脉冲追踪实验一般是指用同位素或其他标记物瞬间标记细胞或生物个体的特定代谢物，然后在不同的时间取样，通过自显影或其他显色方法追踪分析某一代谢过程的技术。

HaloTag[®] 技术可以通过各种不同的配基来标记不同时间、空间的蛋白池，从而通过不同颜色的荧光基团的细胞成像区分它们（基于成像的脉冲追踪实验）。为了展示这种应用，我们设计下面的实验。

P65 是哺乳动物细胞转录因子 NF- κ B 的家族成员，NF- κ B 家族由 p50, p52, REL, p65（也被称为 REL-A）和 REL-B 组成。这些蛋白质二聚化后形成有功能的 NF- κ B。

我们用 HaloTag[®] TMR 配基 (pulse) 标记 p65-HaloTag[®] -FLAG 融合蛋白，未结合的配基洗去，然后成像检测蛋白池。细胞在标准生长环境中培养 18 小时后以 HaloTag[®] diAcFAM 配基标记细胞，再成像检测蛋白池。TMR 和 FAM 荧光信号的强度代表“旧的”和“新的”蛋白池规模在细胞中的变化，反应了被瞬时转染了融合蛋白基因的细胞的蛋白合成和降解变化。如果在未结合的 TMR 配基被从细胞中洗去后立即加入 diAcFAM 配基将不会检测到 FAM 荧光标记（数据没有显示）。说明 18 小时后被 FAM 标记上的蛋白是新合成的蛋白。这些数据证明不同的蛋白池的差异性标记（如脉冲追踪实验）能够被用来分析活细胞中的蛋白合成，降解，亚细胞分布和刺激依赖性的蛋白转位。

实验材料

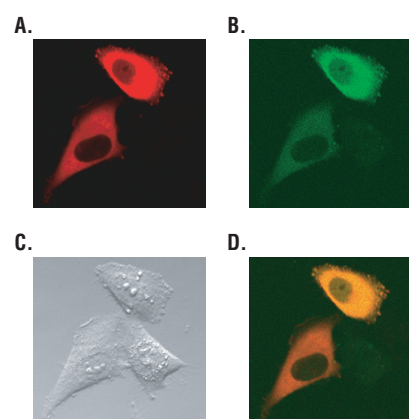
转染有 p65-HaloTag[®] -FLAG 融合蛋白基因的 HeLa 细胞

HaloTag[®] TMR 配基

HaloTag[®] diAcFAM 配基

检测流程

- 将 p65-HaloTag[®] -FLAG 融合蛋白基因载体瞬时转染入 HeLa 细胞。
- 转染后 24h 以 5 μ M HaloTag[®] TMR 配基 37°C 孵育标记细胞 15min, 37°C。
- 洗涤细胞，去除未结合的配基，成像检测（图 A）。
- 标准条件下培养细胞 18h。
- 以 1 μ M HaloTag[®] diAcFAM 配基 37°C 孵育标记细胞 30 min。
- 以 Olympus FV500 共聚焦显微镜的按序模式，使用 TMR 和 FAM 滤片或透射光进行成像（图 B）。



实验结果

图 A: HaloTag[®] TMR 荧光成像。

图 B: 18h 以后 HaloTag[®] diAcFAM 标记荧光成像，说明被标记的是新产生的蛋白。

图 C: 透射光成像。

图 D: TMR 和 FAM 荧光成像叠加。

应用文献:

1. Ronald A. Merrill, et al. A robust and economical pulse-chase protocol to measure the turnover of HaloTag fusion proteins. J Biol Chem. 2019.
2. Ali Harb, et al. Auxiliary Subunits Regulate the Dendritic Turnover of AMPA Receptors in Mouse Hippocampal Neurons. Front Mol Neurosci. 2021.
3. James D P Rhodes, et al. Cohesin Can Remain Associated with Chromosomes during DNA Replication. Cell Reports, 2017.

流式细胞分选

HaloTag® Technology: Focus on Imaging Technical Manual

更多操作方法及实验流程请在 [wechat.Promega.com.cn](https://wechat.promega.com.cn) 中搜索 CTM260 中文版说明书

实验背景

HaloTag® 荧光标记技术可用于流式细胞术的细胞分选，为了展示这一应用设计了下面的实验。

核定位序列 (NLS) 是蛋白质的一个结构域，通常为一段短的氨基酸序列，它能与入核载体蛋白相互作用，使蛋白能被运进细胞核。

稳定转染表达与 3 拷贝核定位序列 (NLS) 融合表达的 HaloTag® 融合蛋白的 U2OS 细胞，以 HaloTag® R110Direct™ 配基标记。

实验材料

U2OS

HaloTag® R110Direct™ Ligand

碘化丙啶 (PI)

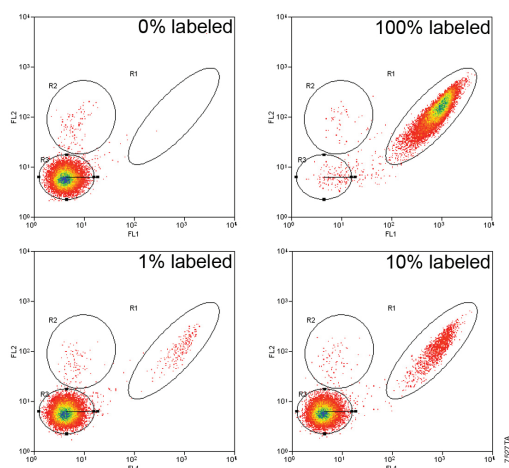
PBS 缓冲液

胰酶溶液

检测流程

- 稳定转染表达与 3 拷贝核定位序列 (NLS) 融合表达的 HaloTag® 融合蛋白的 U2OS 细胞，以 HaloTag® R110Direct™ 配基标记。
- PBS 洗涤细胞。
- 胰酶溶液消化收集细胞，计数并将细胞浓度调整为 $0.5-1 \times 10^6$ 细胞 /ml。
- 已知的细胞数 (1%, 10% 或 100% 标记) 是从无标记细胞中分选得到。使用 MoFlo® 流式细胞仪进行 FACS® 分选。每个图显示大约 20000 个细胞。

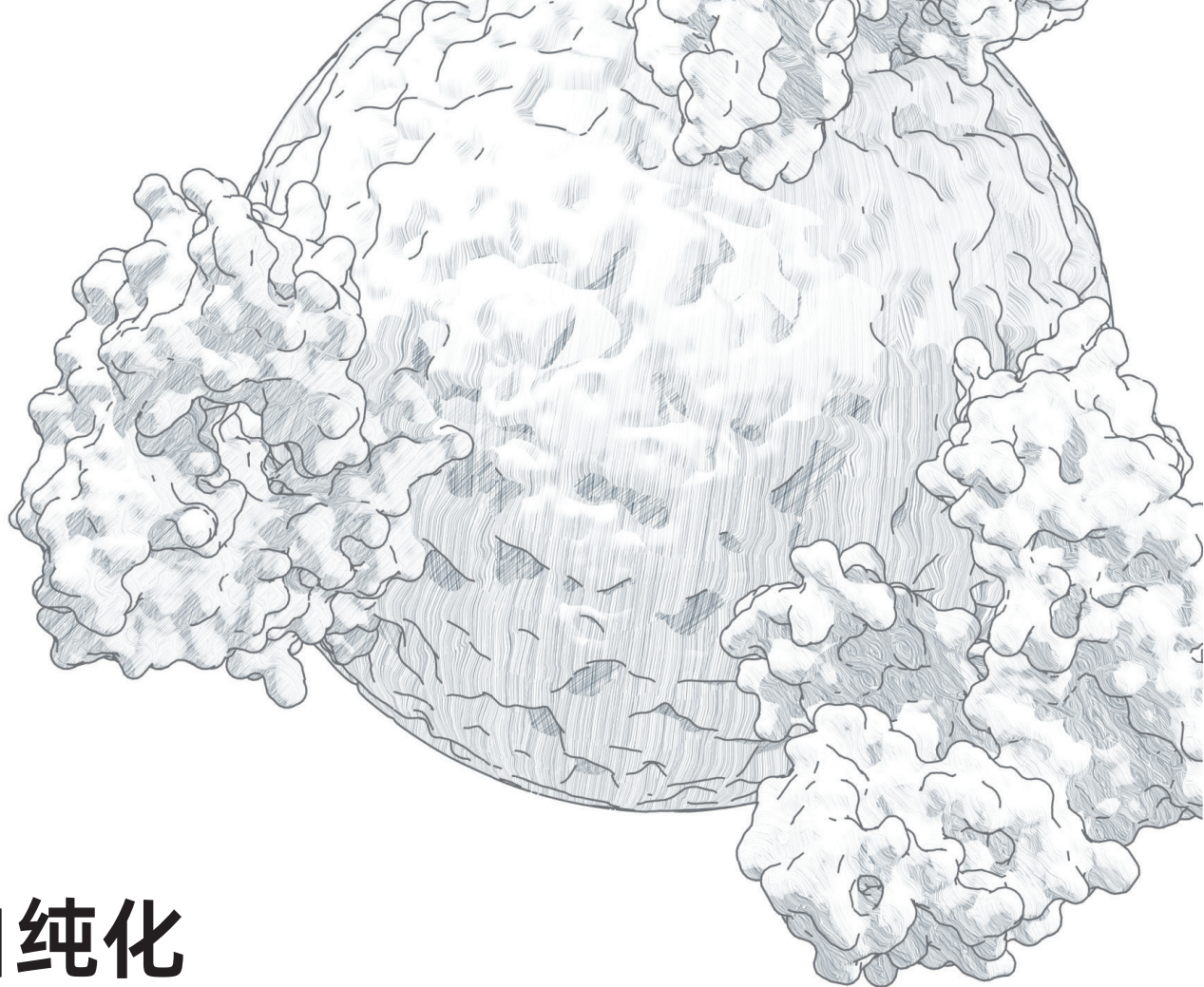
实验结果



- R1 代表以 R110 标记的细胞。
- R2 代表碘化丙啶 PI 标记的死细胞。
- R3 代表未标记的细胞。
- 结果显示，标记细胞成功的从无标记的细胞中筛选出来。

应用文献：

1. Yoshinori Takahashi, *et al.* VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *J Cell Biol.*, 2019.



蛋白纯化

Protein Purification

蛋白质纯化是蛋白质功能研究的基础，涉及从细胞裂解物等复杂的混合物中表达，富集和纯化目的蛋白的一系列过程。而达到这一目的的最快和最有效的方法就是亲和纯化。在纯化重组蛋白时，使用亲和标签如 HaloTag®、GST- 或 His-tag 比较方便。通过在蛋白质融合标签和蛋白质序列之间引入一个切割位点，在纯化过程后，标签便可以酶解去除。

常用的蛋白纯化亲和标签性质比较

Tag	Size (kDa)	Affinity Strength	Solubility Enhancement
HaloTag*	~33	++++	+++
His	~1	++	—
Strep	~1	+++	—
FLAG HA	~1	+++	—
GST	~26	+	++
MBP	~42	+	+++
SUMO	~12	+	+++

*HaloTag® 蛋白标签可以采用 TEV 酶进行切割，不会影响目的蛋白功能。

表达和纯化蛋白对了解蛋白功能而言非常重要。为利用 HaloTag® 技术分离蛋白，研发了可与合成的 HaloTag® 配体共价结合的 ~33kDa 经过修饰的细菌脱卤酶单体蛋白标签。以下是基于 HaloTag® 技术提供的两种纯化方法。

HaloLink™ Resin

HaloTag® 技术提供了高产量、溶解度更高，快速纯化无标签蛋白的平台，并使蛋白的检测和定量更简便。HaloLink™ Resin（HaloLink™ 树脂）能够共价结合 HaloTag® 融合蛋白，将其定向结合到固相表面的方法。树脂由 HaloTag® 配基的 Sepharose® 微球组成，可以特异而迅速地结合 HaloTag® 融合蛋白，结合容量高，结合速率快，与生物素 - 链霉亲和素的结合速率相当。基于共价结合，HaloTag® 融合蛋白不能从树脂上洗脱下来，使得非特异结合的蛋白得以被充分洗涤去除，而没有洗脱掉 HaloTag® 融合蛋白的风险。

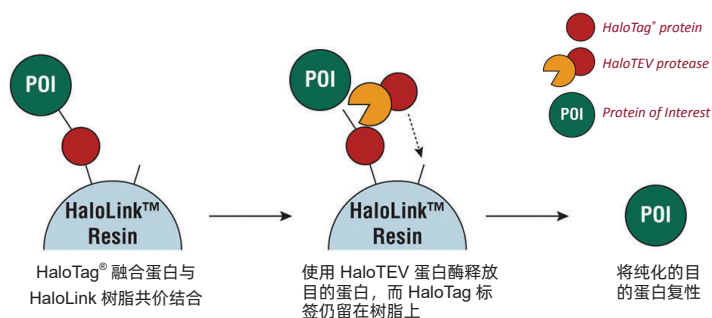
特点

- **纯化效率高：** HaloLink™ 树脂可以共价结合超过 7mg/ml 的 HaloTag® 融合蛋白，回收率很高，普遍高于 75%。
- **纯度更高：** 共价捕获使得在严格的洗脱过程中，不会丢失结合的蛋白，非特异结合率极低（<0.1%），蛋白纯度更高。
- **易于扩展：** 规格可向上或向下扩展，对得到 mg 级以上的蛋白量非常重要。

产品	规格	目录号
HaloLink™ Resin	1.25ml	G1912
	2.5ml	G1913
	10ml	G1914
	25ml	G1915

用途

- 体内和体外蛋白：蛋白相互作用的检测与分析；
- 被固定的 HaloTag® 融合蛋白的酶活力检测；
- 与蛋白水解反应相偶联的一步法融合蛋白纯化。



产品分类	产品	规格	目录号
大肠杆菌蛋白纯化系统	HaloTag® Protein Purification System	1 each	G6280
	HaloTag® Mammalian Protein Detection and Purification System	1 each	G6795
哺乳动物蛋白纯化系统	HaloTag® Mammalian Protein Purification System	1 each	G6790

Magne™ HaloTag® Beads

Magne™ HaloTag® Beads 提供了一个共价捕获 HaloTag® 融合蛋白的简便方法，它应用磁性颗粒进行蛋白 pull-down 和纯化。这些磁珠对 HaloTag® 融合蛋白的结合能力高 ($\geq 20\text{mg/mL}$)，而对非特异蛋白的结合能力低。磁性处理的特点简化了蛋白纯化过程，免除了多个离心步骤，并促进在机器人平台上的自动化应用。

特点

- **最大限度回收 HaloTag® 融合蛋白：**每毫升静置的磁珠结合纯化的 HaloTag® 融合蛋白能力大于 20mg。
- **卓越的磁性处理技术方便高通量应用：**大孔纤维素包裹的磁性颗粒。

应用

- 从 96 孔板中自动或手动纯化大肠杆菌中带有 HaloTag® 标签的蛋白
- 从大肠杆菌（50ml 培养）中纯化带有 HaloTag® 标签的蛋白
- 从哺乳动物细胞中纯化带有 HaloTag® 标签的蛋白
- 从无细胞表达系统中捕获蛋白
- 从哺乳动物细胞中捕获 HaloTag® 标签

产品	规格	目录号
Magne® HaloTag® Beads, 20% Slurry	1ml	G7281
	5ml (5X1ml)	G7282

大肠杆菌中的蛋白纯化

制备靶蛋白的常用方法是用质粒转化大肠杆菌细胞并诱导蛋白表达。这种重组蛋白通常带有一个标签，这有助于将其从大肠杆菌中发现的其他蛋白中提纯出来。HaloTag® 介导的蛋白纯化技术以共价结合为基础，其甚至能有效捕获丰度较低的融合蛋白。通过这种共价结合方法，可进行多次洗涤操作，从而最终达到除去污染物的目的。事实上，经证实 HaloTag® 技术可提高大肠杆菌中可溶性蛋白的表达水平。

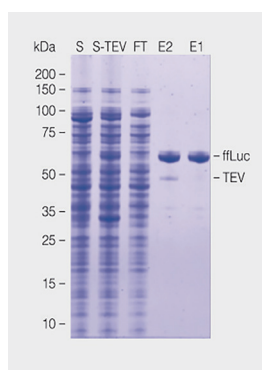
HaloTag® 技术的优势

- **更高的溶解度和活性：**与 His-tag, GST 和 MBP 亲和标签相比具有更高的溶解度和活性。
- **更高的纯度：**共价捕获允许多次严格洗涤，同时不会损失结合蛋白，非特异性结合非常低 (<0.1%)，可获得高纯度的蛋白。
- **蛋白回收率高：**快速的共价捕获；回收率 >75%。
- **蛋白产量高：**每毫升 HaloLink™ 树脂可共价结合超过 7mg 的 HaloTag® 融合蛋白。
- **最终的目的蛋白不带标签：**由于蛋白水解释放，再加上蛋白酶的去除。

数据展示

凝胶成像系统中，按照说明书（编号：TM312）中所述的批量 / 柱组合法，使用 1ml 沉淀的 HaloLink™ Resin 从 50ml 培养物中纯化萤火虫荧光素酶（fLuc）。

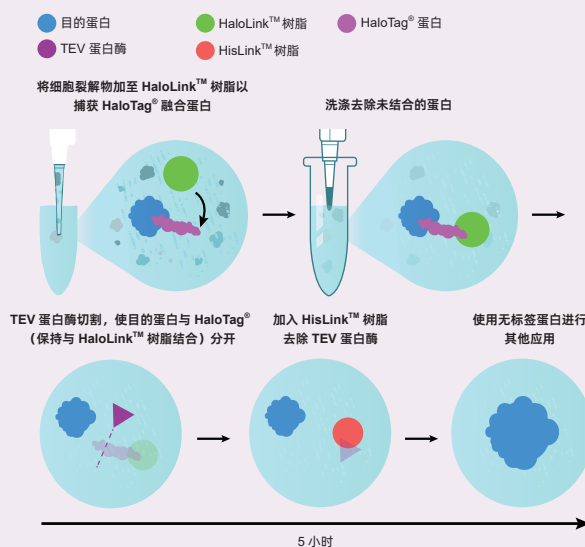
SDS-PAGE 分析结果显示，纯化蛋白的纯度高 (>90%)，通过比较 E2 和 S-TEV 中 Coomassie® 染色的 fLuc 谱带强度，确定其回收率也很高。活性蛋白的回收率大于起始材料的 75% (E2 对比 S-TEV)，这表明其可有效捕获融合蛋白以及通过 TEV 蛋白酶切割实现蛋白释放。



基本操作流程图

靶蛋白 (POI) 与 HaloTag® 蛋白融合，然后与 HaloLink™ Resin 发生共价结合。这种共价交联方法可在严格洗涤条件下使 POI 附着在树脂上。洗涤后，通过 TEV 蛋白酶切割进行 POI 洗脱处理。

使用 HaloTag® Protein Purification 进行纯化，可获得高产量和高纯度的靶蛋白，而且不会残留 HaloTag® 蛋白标签。



应用文献：

1. Ohana, R.F. *et al.* (2009) HaloTag7: a genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. **Protein Expr Purif.** 68(1), 110–20.
2. Neunuebel M.R. *et al.* (2012) Legionella pneumophila LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. **J Bacteriol.** 194(6), 1389–400.
3. Verger, A. *et al.* (2013) The Mediator complex subunit MED25 is targeted by the N-terminal transactivation domain of the PEA3 group members. **Nucl. Acids Res.** 41(9), 4847–59.

哺乳动物细胞中的蛋白纯化

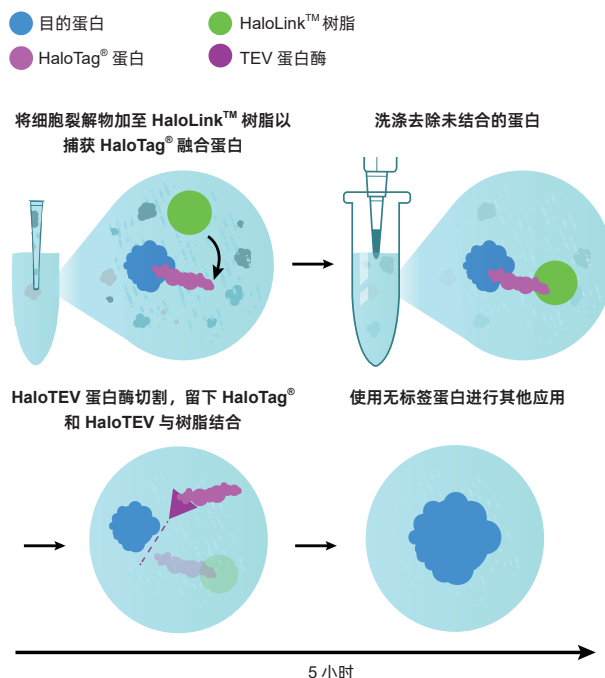
对于难以在细菌细胞中进行表达的蛋白，或者如果蛋白翻译后处理对下游应用而言较为重要，可在哺乳动物细胞中表达并从哺乳动物细胞中分离出标记蛋白。**HaloTag® Mammalian Protein Purification System** 可从哺乳动物细胞培养裂解物中纯化 HaloTag® 融合蛋白。

特点及优势

- 以最小的代价获得高纯度蛋白
- 与 FLAG® 和 His 标记方法相比，回收率更高
- 可从 µg 级扩大到 mg 级
- 便捷的荧光蛋白定量方法

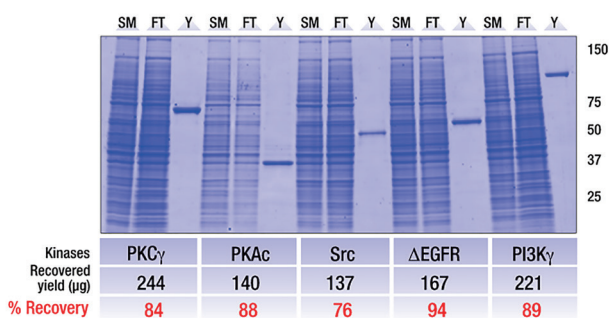
简要操作流程

如右图所示，HaloTag® 融合蛋白可与 HaloLink™ Resin 形成高度特异性的共价键，甚至能够在培养的哺乳动物细胞中实现对表达水平较低的重组蛋白的良好纯化。与其他常见纯化方法（如 FLAG® 标签或 His 标签蛋白纯化）相比，HaloTag®-配体结合的特异性和强度可显著提高功能蛋白的产量和纯度。



数据展示

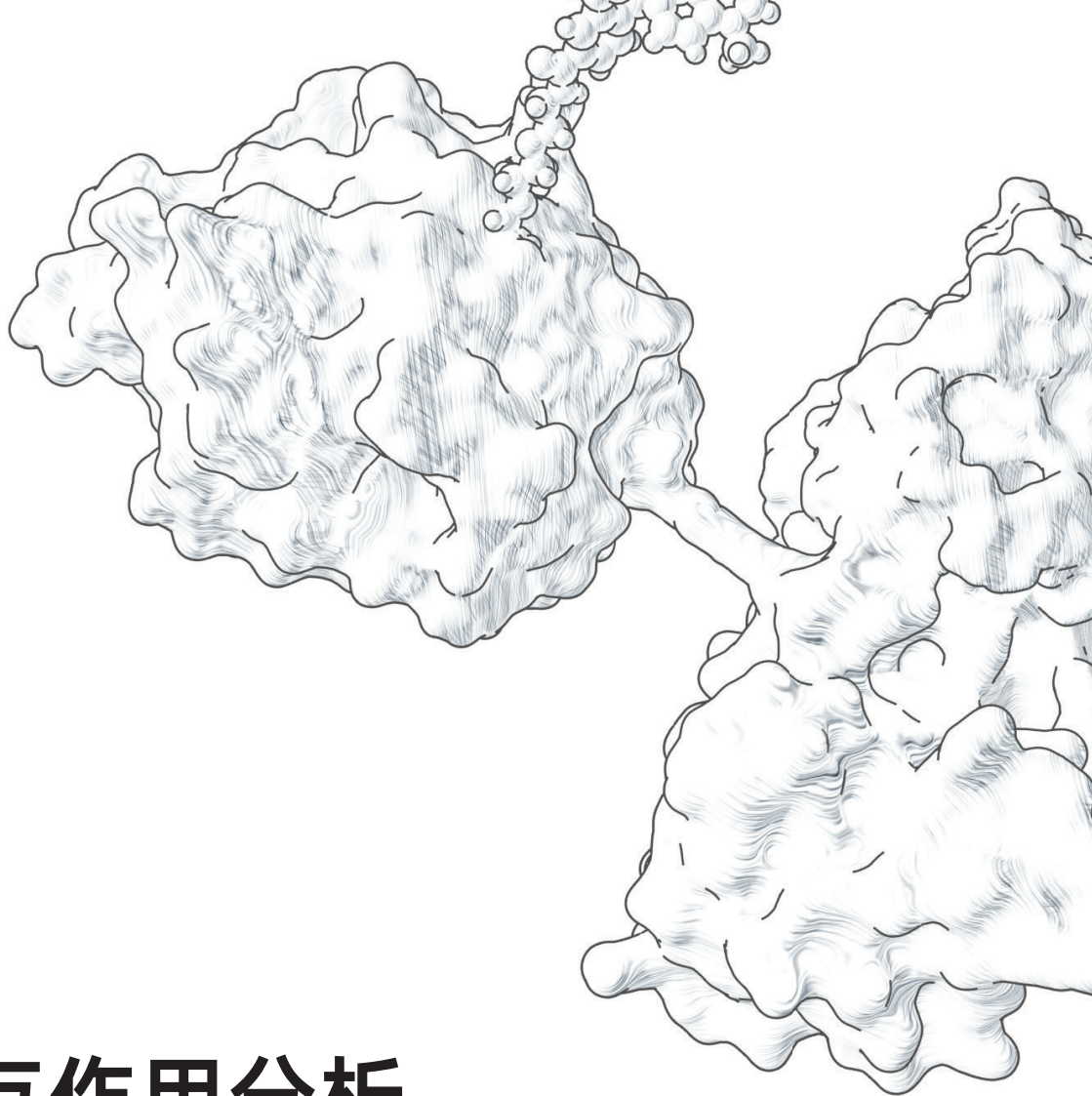
以最小的代价获得哺乳动物细胞中的高纯度蛋白。Ohana 等人使用 HaloTag® Mammalian Protein Purification System 分离出了高纯度、无标签的靶蛋白。与使用 3xFLAG 或 His6tag 系统等亲和标签获得的蛋白产量相比，使用 HaloTag® 系统时，蛋白回收率更高，产量也更高。此外，在纯化低丰度蛋白时，HaloTag® 的表现也优于 3xFLAG 和 His6tag 系统。



根据凝胶成像系统所示，在 HEK293T 细胞（120ml 培养物）中瞬时转染、表达，并用 HaloTag® Mammalian Protein Purification System 纯化了五种 HaloTag® 融合的人类激酶。

应用文献：

1. Nicholas A. Courtney, *et al.* (2018) Excitatory and Inhibitory Neurons Utilize Different Ca²⁺ Sensors and Sources to Regulate Spontaneous Release[J]. **Neuron**, 98(5).
2. Sun, X. *et al.* (2013) Hsp90 inhibitor 17-DMAG decreases expression of conserved herpesvirus protein kinases and reduces virus production in Epstein-Barr virus-infected cells. **J. Virol.** 87(18).
3. Ryu MJ, (2012) Oncogenic Kras expression in postmitotic neurons leads to S100A8-S100A9 protein overexpression and gliosis. **J. Biol. Chem.** 287(27), 22948–58.



蛋白相互作用分析

Protein Interaction Analysis

了解哪些细胞分子发生相互作用有助于确定蛋白通路和参与基因表达的识别位点。HaloTag® Technology 试剂盒可捕获直接和间接的蛋白质间相互作用，以及确定 DNA 结合位点和测定活细胞中的蛋白结合情况。

技术应用：

- 活细胞蛋白：蛋白相互作用检测： NanoBRET® 技术
- 细胞裂解物蛋白：蛋白相互作用： HaloTag® Mammalian Pull-Down System

HaloTag® Mammalian Pull-Down System

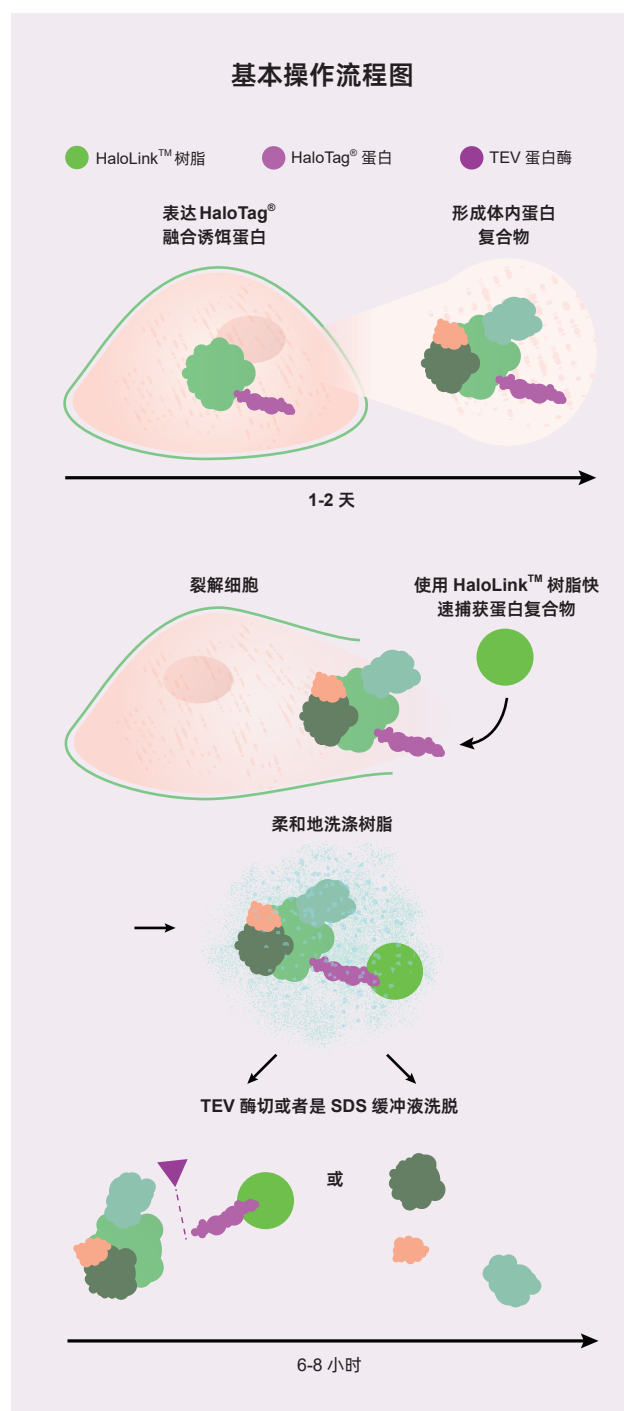
蛋白质间相互作用在细胞复制、转录、翻译和信号转导等过程中发挥着关键作用。**HaloTag® Mammalian Pull-Down System** 用于捕获和纯化细胞内二元和高阶蛋白复合物，包括瞬时的或弱相互作用的伴侣蛋白。HaloTag® 融合诱饵蛋白的共价结合代表其可捕捉所形成的细胞蛋白复合物，并识别更多生理相关的伴侣蛋白，而不受非特异性结合的干扰。

原理

HaloTag® pull-down 系统的基本实验流程见左图。HaloTag® 融合蛋白可在哺乳细胞中稳定或瞬时表达，并可用作诱饵去捕捉相互作用的蛋白或蛋白复合物。细胞裂解后，与相互作用的蛋白伴侣结合的 HaloTag® 融合蛋白以 HaloLink™ 树脂捕捉。被捕捉的蛋白复合物被轻柔洗涤并使用 SDS 洗脱缓冲液洗脱（也可使用其他变性剂如 8M 尿素），或者以 TEV 蛋白酶将蛋白复合物从树脂上剪切下来。复性的蛋白复合物可以用于各种不同的分析，如 Western blotting 和质谱分析。

特点

- 改进的捕捉能力，树脂能够快速共价结合 HaloTag® 蛋白，提高了蛋白伴侣的捕捉能力，包括瞬时结合，背景超低。
- 使用同一个载体即可实现从 pull-down 到成像研究的转变。
- 与多种下游分析方法兼容，如质谱分析。
- 能够荧光标记 HaloTag® 融合蛋白，优化蛋白表达水平，确定细胞蛋白定位。



数据展示

使用 HaloTag® 融合蛋白作为诱饵，能够分离亚复合物家族的大部分核心组份，Nup160, Nup133, Nup107, Nup96, Nup85, Nup43 和 Nup37。而且还能分离其他相互作用的蛋白，如核迁移蛋白 (nuclear migration protein, NUDC) 和 TPR 核蛋白质。

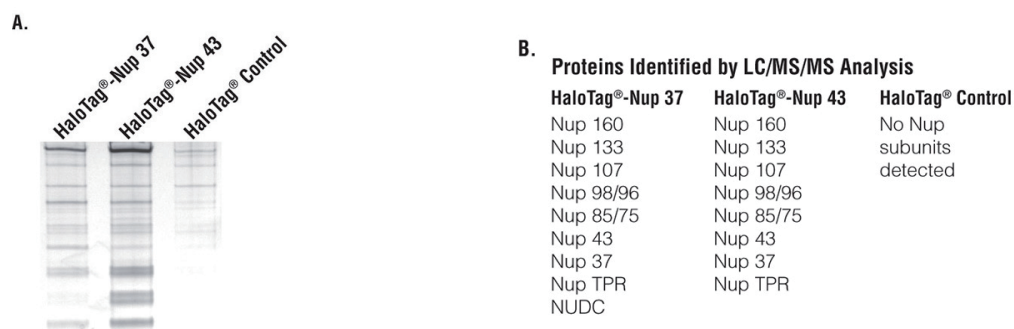


图 A. 20% SDS 洗脱样本以 SDS-PAGE 分离并银染。

图 B. 剩下的洗脱样本以 LC/MS/MS 分析鉴定，可见有多种蛋白分别与 Nup37 和 Nup43 相互作用。而作为对照的 HaloTag® Control 组则未见任何相互作用的蛋白。

产品列表

产品	规格	目录号	产品说明
HaloTag® Mammalian Pull-Down System	24 reactions	G6504	包含进行 HaloTag® pull-down 实验所必需的缓冲液和树脂。
HaloTag® Mammalian Pull-Down and Labeling System	24 reactions	G6500	包含 G6504 的全部组分，并补加了 HaloTag® TMRDirect™ Ligand，从而允许进行相关的细胞定位和实时成像研究。
HaloTag® Complete Pull-Down System	1 each	G6509	包含 G6504 的全部组分、HaloTag® TMRDirect™ Ligand、一个 starter cloning system、Wizard® SV Gel 和 PCR Clean-Up System 以及 FuGENE® HD 转染试剂。
HaloTag® Control Vector	20µg	G6591	HaloTag® 对照载体可在哺乳动物细胞、大肠杆菌或体外表达系统中表达 HaloTag® 蛋白。用作任何 HaloTag® 实验系统的对照，也可用于哺乳动物细胞中 HaloTag® 的稳定和瞬时表达。

应用文献：

- Chiharu Moriya, *et al.* PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90α and glucose-regulated protein 78. **Cancer Science**, 2017.

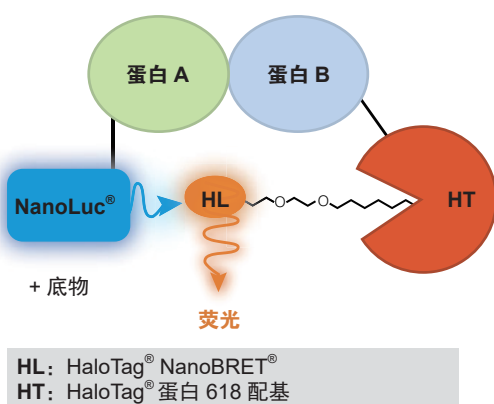
NanoBRET® 技术

研究蛋白质间相互作用的动态变化颇具挑战性。使用 NanoBRET® PPI Assay 可在细胞条件下对诱导和抑制的蛋白间相互作用进行实时研究。基于生物发光共振能量转移 (BRET) 技术，即生物发光供体蛋白接近荧光标记的受体蛋白，NanoBRET® Assay 将明亮的 NanoLuc® 萤光素酶用作能量供体，并将荧光基团标记的 HaloTag® 蛋白用作能量受体。这种灵敏的 PPI 检测意味着可对表达水平较低的全长蛋白进行研究。

NanoBRET® 技术原理

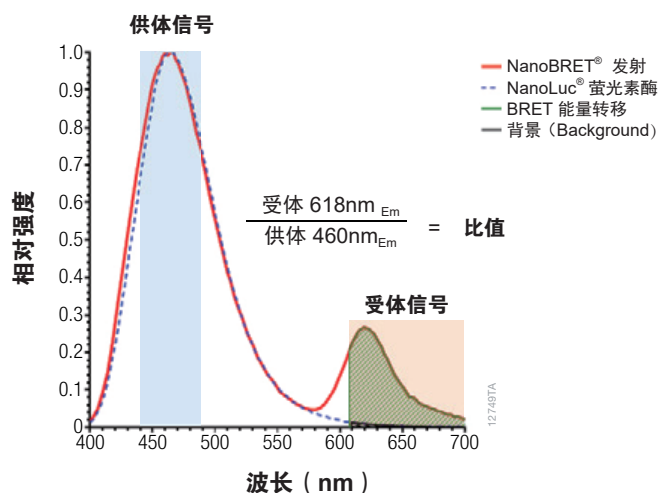
当两个蛋白分子相互作用，一个蛋白融合表达的供体萤光素酶蛋白 (传统使用 Renilla 海肾萤光素酶) 酶学反应产生的发光信号光谱与另一个蛋白标记的受体荧光基团的激发光谱相重叠，诱发受体分子发出荧光。

A.



B.

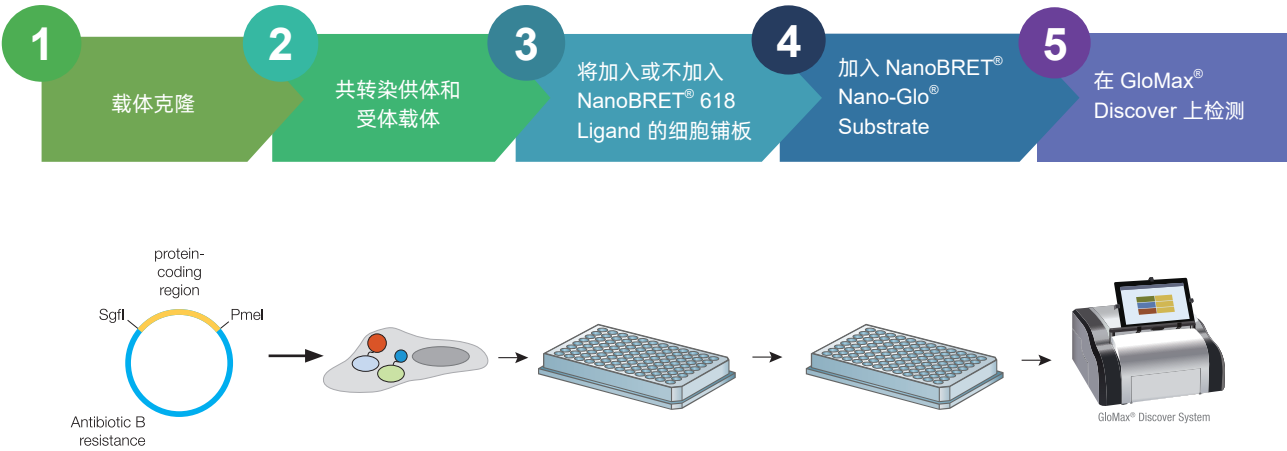
Nano-BRET 分析计算



NanoBRET® 技术优势

- **信噪比高：**由于供体和受体发射光谱间距离较大，具有卓越的信噪比和宽的动态范围。
- **明亮的供体信号：**作为供体的专利型 NanoLuc® 萤光素酶蛋白光信号更强，能够使用弱启动子进行生理表达水平、较低细胞数量、难转染细胞的检测。
- **简单的背景计算：**在没有 NanoBRET® 荧光配体的情况下，可以进行简单的背景计算。这一特性在其他使用固有的荧光蛋白的 BRET 系统中是不可能实现的。
- **个性化检测的设计选择：**NanoBRET® Starter Systems 有 MCS 或 Flexi® 两种选择，根据您的选择即可简单构建 NanoLuc® 和 HaloTag® 融合蛋白。Flexi® 载体可以轻松的完成将 ORFs 从一个载体切换到另一个载体。
- **即用型 ORF 克隆：**从 > 9000 个人的 HaloTag® ORF 克隆中灵活选择，基于 Flexi® Starter System 设计您的实验方案。
- **预构建的 NanoBRET® Assays：**提供一系列预构建的，经过优化的 NanoBRET® Assays，用来检测如表观遗传学，转录和信号传导等关键靶标区域的蛋白：蛋白相互作用。

技术流程 - 完整解决方案



HaloTag® 和 NanoLuc® 融合载体构建组合方案

Test Pair	N-Terminal HaloTag® Fusion Protein	C-Terminal HaloTag® Fusion Protein	N-Terminal NanoLuc® Fusion Protein	C-Terminal NanoLuc® Fusion Protein
1	Protein X		Protein Y	
2	Protein X			Protein Y
3		Protein X	Protein Y	
4		Protein X		Protein Y
5	Protein Y		Protein X	
6	Protein Y			Protein X
7		Protein Y	Protein X	
8		Protein Y		Protein X

预构建载体解决方案

NanoBRET® 预构建载体是已融合构建已知相互作用的蛋白基因的载体对，无需您自行再构建载体，可直接用于进行转染构建细胞模型，配合检测试剂即可进行药物作用机理及其他相关的机制研究。省时省力，结果更有保证。

已知相互作用的蛋白基因载体对包括：

Bromodomain Assays
Other Epigenetic Assays
Membrane Protein Assays
RNA Binding Protein Assays
Transcriptional Protein Assays
Signaling Proteins&Kinase Assays

NanoBRET® 检测试剂：

NanoBRET® Nano-Glo® Detection System

请扫描右侧二维码下载 NanoBRET® 技术手册，
获取详细的产品列表信息。或登录：

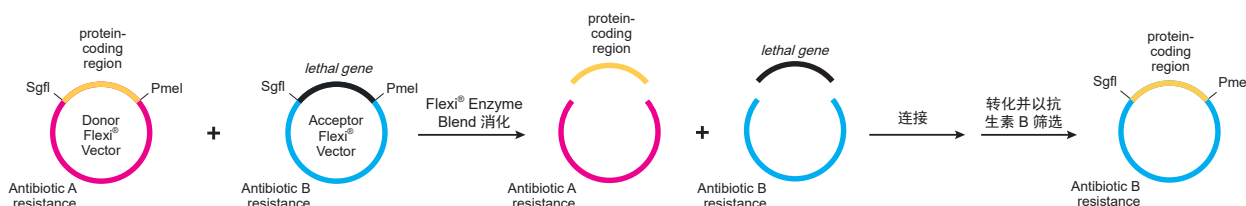
https://wechat.promega.com.cn/content/details37_6675.html



自行构建载体解决方案

1. Flexi 技术解决方案 - NanoBRET® PPI Flexi® Starter System

通过 Flexi® 载体克隆系统生成 Nluc 或 HaloTag® 的 N-端融合蛋白-Flexi® 载体克隆系统生成一种定向克隆技术，基于两个稀有酶切位点的限制性内切酶，SgfI 和 PmeI，这种技术能够快速，高效，高保真地地不同 Flexi® 载体间转移蛋白编码区，而无需重新测序。NanoBRET® PPI Flexi® Starter System 提供了以 Flexi® 载体系统为基础进行蛋白相互检测的解决方案，包括载体，检测试剂及阳性对照，配合 Flexi® System, Entry/Transfer 或 Carboxy Flexi® System, Transfer 即可完成实验。



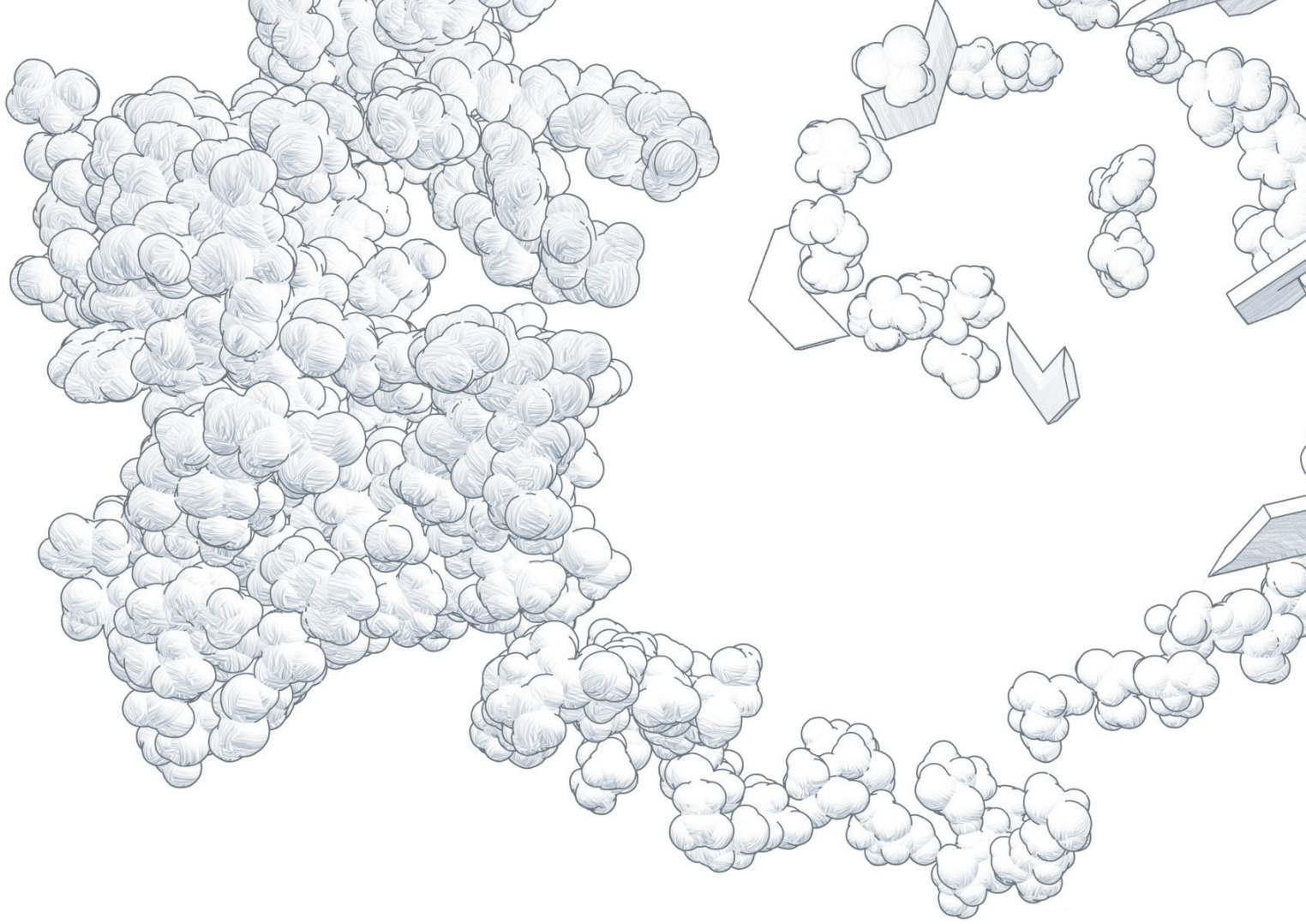
2. 多克隆位点解决方案 - NanoBRET® PPI MCS Starter System

带有多克隆位点的 NanoLuc® 融合蛋白克隆载体和 HaloTag® 融合蛋白载体，检测试剂和阳性对照的试剂盒。

产品列表

产品	目录号	说明
NanoBRET® PPI Flexi® Starter System	N1821	Flexi 技术解决方案（产品所包含组分均可单独购买）
Flexi® System, Entry/Transfer	C8640	配套 Flexi® 载体完成克隆所需的所有组份
Carboxy Flexi® System, Transfer	C9320	C 端融合表达载体间相互转移所需的组份
NanoBRET® PPI MCS Starter System	N1811	多克隆位点解决方案（产品所包含组分均可单独购买）

产品详情请扫描上方二维码查看 NanoBRET® 技术手册。



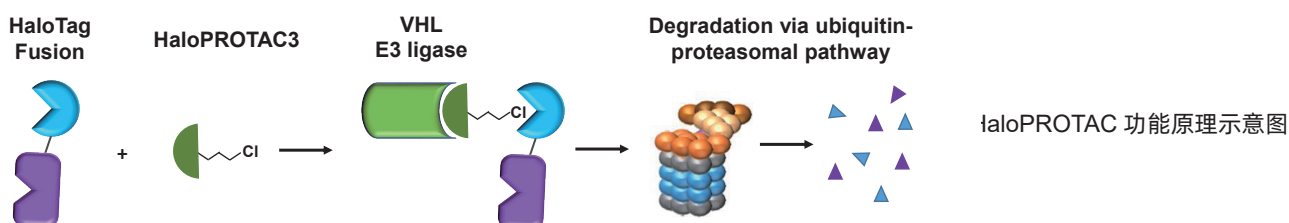
蛋白表型分析

HaloPROTAC3

HaloPROTAC3 是一种 HaloTag[®] 蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera) 小分子，可特异性降解活细胞中的 HaloTag[®] 融合蛋白。HaloPROTAC3 通过将 HaloTag[®] 融合蛋白募集至 VHL E3 连接酶复合物，从而导致泛素化并通过泛素 - 蛋白酶体途径降解 HaloTag[®] 融合蛋白。可通过 CRISPR / Cas9 基因编辑技术将 HaloTag[®] 标签整合到任何靶蛋白的 N 或 C 端而得到内源性 HaloTag[®] 融合蛋白。此外，Promega 将具有 11 个氨基酸的 HiBiT 附加到 HaloTag[®] 融合蛋白上，从而可以使用发光法代替抗体法来对活细胞中的蛋白降解进行高度定量的动力学监测。

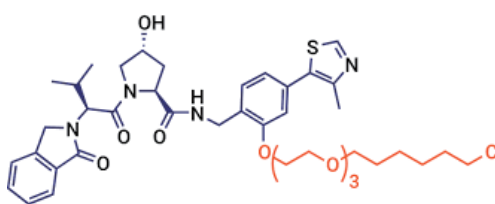
HaloPROTAC3 技术

与基因敲除或蛋白突变相比，细胞内蛋白质的短暂降解通常会引|起一种完全不同的表型。HaloPROTAC-3 是 HaloTag® 标签和 PROTAC 的融合，是了解和表征蛋白质降解表型的一种快速高效的方法。HaloPROTAC-3 将内源性 VHL E3 连接酶组分引入 HaloTag® 融合蛋白，通过蛋白酶体途径实现泛素化降解。 HaloPROTAC 包含一个诱导降解的胺基，通过可变长度的连接物与氯烷烃基结合。



技术应用

- ☐ 内源性蛋白的表型分析
- ☐ 可帮助表征对 PROTAC 开发很重要的靶标
- ☐ 研究活体内 in vivo (例如: 小鼠) 降解
- ☐ 在无需开发 PROTAC 的情况下研究蛋白降解
- ☐ 研究细胞生长或生存中所必需的蛋白降解
- ☐ 控制蛋白降解过程中的蛋白水平和时间范围
- ☐ 可与 HiBiT 发光检测技术配套使用
- ◆ 无需抗体即可检测蛋白降解
- ◆ 在活细胞中进行降解动力学实验



HaloPROTAC3

HaloPROTAC-3 结构图

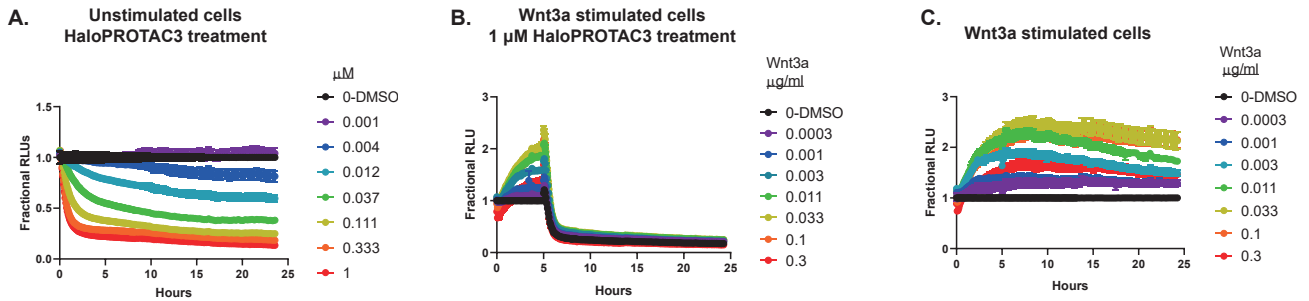
优势特性

- ☐ 控制蛋白丢失 (程度和时间范围)
- ☐ 可用于研究那些如果在基因组水平上被敲除会致命的必需蛋白质的丢失
- ☐ 蛋白回收的可能性 / 可逆性
- ☐ 模拟 PROTAC 表型
- ☐ 在没有可结合配基的情况下可研究蛋白降解

产品列表

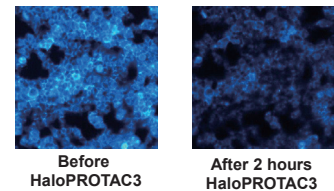
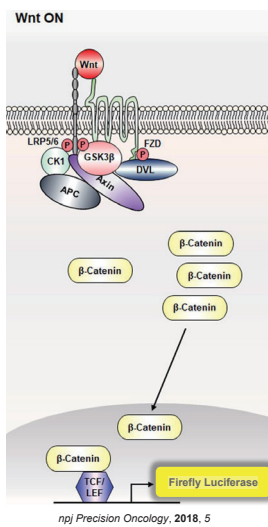
产品	规格	目录号	产品说明
HaloPROTAC3, 2.5mM	20ul	GA3110	了解和表征蛋白质降解表型
ent-HaloPROTAC3, 2.5mM	20ul	GA4110	用于确定 HaloTag® 融合蛋白降解是通过 VHL 结合和 PROTAC 机制介导

应用举例

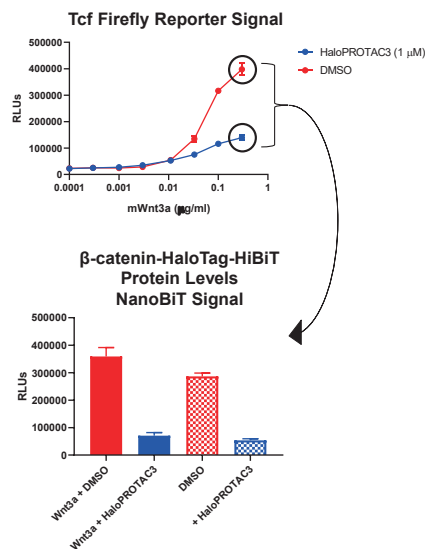
1. Wnt3a 刺激前后 β -catenin 的降解动力学 β -catenin-HaloTag-HiBiT HEK293 LgBiTstable cells

- 在 Wnt3a 刺激前后，用 HaloPROTAC3 处理细胞后 HaloTag-HiBiT 内源性标记的 β -catenin 发生有效降解
- 在用 HaloPROTAC3 处理后，使用 LV200 成像系统观察 β -catenin-HT-HiBiT 的丢失
- Wnt3a 刺激后，活细胞中的 β -catenin-HT-HiBiT 水平升高

D. NanoBiT imaging Unstimulated cells

2. 在有 β -catenin 降解存在时监测 Wnt3a 信号转导 β -catenin and Wnt3a signaling pathway

Tcf Reporter Assay

 β -catenin-HaloTag-HiBiT HEK293 LgBiT stable cells + Tcf Reporter

- 使用双报告基因系统与 Tcf 萤火虫报告基因检测到，用 HaloTag-HiBiT 内源性标记的 β -catenin 对 Wnt3a 刺激产生预期响应
- 在 Wnt3a 存在时观察到 β -catenin 的降解，及对刺激的响应减弱
- HaloPROTAC3 是一种用于研究降解表型和功能的优良化合物

应用文献：

- George M Burslem, Craig M Crews. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell*, 2020.
- Soumik BasuRay, Yang Wang, Eriks Smagris, et al. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *PNAS*, 2019.



扫码下载 PROTAC 技术解决方案

HaloTag[®] Technology

www.promega.com/resources/technologies/halotag-technology/



关注 Promega 生命科学公众号，您可获得



产品信息



价格查询



中文说明书



讲座视频



技术资料



实验工具



市场活动



经销商信息

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2024.08