

## Мечение клеток, экспрессирующих гибридные белки HaloTag®, с помощью лигандов HTag

### Прежде чем начать

Приведённые ниже протоколы предназначены для окрашивания и анализа клеток, экспрессирующих гибридные белки HaloTag®. Перед мечением высейте клетки с требуемой плотностью, используя стандартную культуральную среду, оптимальную для данной линии. Для трансфекции следуйте инструкциям производителя трансфекционного реагента.

*Примечание: клетки, культивированные до очень высокой плотности (т.е. до конфлюэнтного монослоя), могут давать повышенный фон при мечении.*

### Обращение и хранение

- Лиганды HTag поставляются в лиофилизированном виде по 150 нмоль в пробирке. Реагенты могут храниться при -20°C до двух лет после получения.
- Непосредственно перед окрашиванием приготовьте стоковый раствор лиганда. Для этого добавьте 150 мкл [ДМФА](#) или [ДМСО](#) к содержимому пробирки 150 нмоль и перемешайте на вортексе.
- После растворения стоковые растворы следует хранить при -20°C, защищая от света и влаги.

### Протокол

#### А. Быстрое мечение живых клеток

1. Непосредственно перед использованием разбавьте стоковый раствор HTag в соотношении 1:200 в тёплой культуральной среде. Полученное разведение соответствует 5× рабочему раствору.
2. Для мечения клеток замените 1/5 объёма культуральной среды на 5× рабочий раствор HTag. Аккуратно перемешайте.
3. Инкубируйте клетки с HTag в течение 15 минут при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе для клеточных культур.
4. Дважды замените среду, содержащую лиганд, равным объёмом тёплой свежей среды. Поскольку лиганды AF HTag не проникают в клетки, отмывка для удаления несвязанного лиганда не требуется.
5. Перенесите образцы под микроскоп и выполните съёмку.

#### Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160  
Westminster, Maryland 21157  
USA  
Phone: +1 888 973 6353  
Fax: +1 888 973 6354  
Email: [order@lumiprobe.com](mailto:order@lumiprobe.com)

#### Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

#### Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto:ru@lumiprobe.com)

#### Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre  
23 Harbour Road, Wan Chai  
Hong Kong  
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)  
Phone: +86-147-14316277 (from China)  
Email: [hk@lumiprobe.com](mailto:hk@lumiprobe.com)

#### Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.  
3223562, Haifa  
Israel  
Phone: +972-(0)4-374-0377  
Email: [il@lumiprobe.com](mailto:il@lumiprobe.com)

#### Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center  
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community  
Lianhua Street, Futian District  
Shenzhen, China  
Phone: +86-1471431-6277  
Email: [cn@lumiprobe.com](mailto:cn@lumiprobe.com)

## Б. Pulse-chase мечение клеток

Данный протокол позволяет исследовать оборот или транспорт гибридных белков HaloTag®, методом pulse-chase мечения.

1. Непосредственно перед использованием приготовьте 5× раствор лиганда для pulse-мечения разбавлением стокового раствора НTag в соотношении 1:200 в тёплой культуральной среде.
2. Для мечения клеток замените 1/5 объёма культуральной среды на 5× раствор НTag. Аккуратно перемешайте.
3. Инкубируйте клетки с лигандом для pulse-мечения в течение 15 минут при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.
4. Если этап chase следует сразу после pulse-мечения, переходите непосредственно к шагу 5. В противном случае замените среду, содержащую лиганд, равным объёмом тёплой свежей культуральной среды и либо выдержите необходимое время перед этапом chase, либо выполните запланированные биологические процедуры перед переходом к шагу 6.
5. Непосредственно перед использованием приготовьте разведение лиганда для chase-мечения в соотношении 1:1000 (1× рабочий раствор) в теплой культуральной среде. Аккуратно замените среду равным объёмом 1× раствора для chase-мечения.
6. Инкубируйте клетки с лигандом для chase-мечения в течение 15 минут при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.
7. Дважды замените среду, содержащую лиганд, равным объёмом тёплой свежей среды.
8. Поместите образцы под микроскоп и выполните съемку.

## В. Фиксация клеток после мечения

Ковалентная связь между лигандом и белком HaloTag® позволяет проводить последующую фиксацию, пермеабиллизацию и отмывки клеток в стандартных условиях без значительной потери специфического флуоресцентного сигнала.

1. Пометьте клетки с использованием лиганда AF НTag, следуя шагам 1–3 раздела А (Быстрое мечение) или шагам 1–6 раздела Б (Pulse-chase мечение).
2. Замените среду равным объёмом 4% параформальдегида в 1× PBS (рН 7,5) и инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре.
3. Замените фиксатор равным объёмом 0,1% Triton X-100 в 1× PBS и инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре.
4. Замените раствор детергента равным объёмом 1× PBS, затем либо перенесите образцы под микроскоп и выполните съемку, либо храните при 4°C, либо перейдите к разделу Г для проведения иммуноцитохимии.

## Г. Иммуноцитохимия

Фиксированные клетки после мечения лигандом НTag можно дополнительно окрасить иммуноцитохимически любым интересующим антителом. Описанные процедуры можно использовать в качестве отправных. Протокол для конкретного антитела может отличаться, поэтому необходимо придерживаться инструкций его производителя.

1. Замените 1× PBS равным объёмом блокирующего раствора (2% нормальной сыворотки от хозяина того же вида, что и для вторичного антитела, и 0,1% Triton X-100 в 1× PBS) и инкубируйте клетки в течение 1 часа при комнатной температуре.
2. Приготовьте раствор первичного антитела в 1% нормальной сыворотке в 1× PBS в концентрации, рекомендованной производителем.
3. Замените блокирующий раствор раствором первичного антитела. Инкубируйте клетки в течение 1 часа при комнатной температуре.
4. Промойте клетки дважды 1% нормальной сывороткой в 1× PBS по 10 минут на каждую отмывку при комнатной температуре.
5. Разведите вторичное антитело в 1% нормальной сыворотке в 1× PBS, следуя рекомендациям производителя.
6. Инкубируйте клетки в растворе вторичного антитела в течение 30 минут при комнатной температуре.
7. Промойте клетки дважды 1% нормальной сывороткой в 1× PBS по 10 минут на каждую отмывку при комнатной температуре.
8. Замените раствор для отмывки на 1× PBS.
9. Поместите образцы под микроскоп и выполните съемку.

## **Д. Анализ методом SDS-PAGE**

Ковалентная связь между белком HaloTag® и лигандом выдерживает денатурацию, что позволяет количественно определять меченый гибридный белок методом SDS-PAGE с использованием флуоресцентного сканера.

1. Приготовьте 4× SDS буфер (0,24 M Tris, 2% SDS, 50,4% глицерин, 0,4 M DTT, 3 mM бромфеноловый синий). Доведите его pH до 6,8 с помощью HCl. Для приготовления 1× буфера разведите 4× буфер в соотношении 1:4 фильтрованной водой.
2. Пометьте клетки, следуя шагам 1–3 раздела А (Быстрое мечение) или шагам 1–6 раздела Б (Pulse-chase мечение).
3. Замените среду, содержащую лиганд, на 1× PBS (pH 7,5), чтобы избежать появления яркой полосы от полной культуральной среды.
4. Лизуйте клетки, заменив 1× PBS на примерно 100–150 мкл 1× SDS буфера на см<sup>2</sup> площади клеток.
5. Соберите клеточный лизат и инкубируйте его в течение 5 минут при 95°C.
6. Проведите SDS-PAGE, загружая примерно 10 мкл (5–10 мкг общего белка) каждого образца в лунку геля, либо храните образцы при -20°C для последующего использования.
7. Проанализируйте гель с помощью флуоресцентного сканера.

*Примечание: фронт красителя может содержать флуоресцентный материал (несвязанный лиганд и/или красители из буфера образца), что может затруднять детекцию. Чтобы устранить эти источники неспецифической флуоресценции, просто дайте фронту красителя выйти за пределы геля или отрежьте его от нижней части геля перед сканированием.*

## **Е. Анализ методом проточной цитометрии**

1. Пометьте клетки, экспрессирующие гибридный белок HaloTag®, с использованием лиганда НTag, следуя шагам 1–3 раздела А или шагам 1–6 раздела Б.
2. Подготовьте контроли:
  - (а) Пометьте клетки, не экспрессирующие белок HaloTag®, лигандом НTag для оценки фона от лиганда.
  - (б) Подготовьте немеченые клетки, экспрессирующие белок HaloTag®, для оценки фона, обусловленного эндогенной флуоресценцией клеток или морфологическими изменениями вследствие экспрессии.
3. Если адгезионные клетки с HaloTag® экспрессируют гибридный белок на поверхности клетки, промойте их дважды равным объёмом 1× PBS, затем инкубируйте в 1× PBS с 3 mM EDTA или другим неферментативным раствором при 37°C в течение 5–15 минут для мягкого отделения клеток. Если адгезионные клетки экспрессируют гибридный белок HaloTag® внутриклеточно, суспендируйте их с использованием подходящего раствора, содержащего трипсин.
4. Соберите и ресуспендируйте клетки в культуральной среде при 37°C до концентрации 0,5–1 × 10<sup>6</sup> клеток/мл.
5. Произведите анализ методом проточной цитометрии.

## **Устранение проблем**

Хотя приведённые выше рекомендации должны обеспечивать хорошее соотношение сигнал/шум, конкретное мечение зависит от уровня экспрессии гибридного белка HaloTag®, типа клеток, их состояния, качества фиксации, отмытки несвязанного лиганда и т.д. Ниже приведены возможные проблемы мечения и способы их устранения:

### **Слабый или отсутствующий флуоресцентный сигнал в меченых клетках**

- Для предотвращения протеолиза при лизисе клеток в PBS добавляйте ингибиторы протеаз или проводите лизис при 4°C.
- Увеличьте время культивирования клеток перед мечением, чтобы обеспечить достаточный уровень экспрессии белка и плотность клеток.
- Обеспечьте оптимальные условия для клеток. Производите мечение и визуализацию только в полной (т.е. содержащей сыворотку) культуральной среде при 37°C в соответствующих условиях CO<sub>2</sub>.
- Оптимизируйте протоколы мечения, увеличивая время инкубации.
- Храните лиганды НTag в сухом виде при -20°C, защищая от света. Стоковые растворы лиганда храните в виде одноразовых аликвот, чтобы избежать повторных циклов замораживания-оттаивания.
- Используйте свежеприготовленный раствор лиганда НTag и добавляйте его к клеткам немедленно после приготовления.
- Убедитесь, что используется правильный набор фильтров для визуализации.
- Отрегулируйте настройки прибора для регистрации флуоресценции (например, мощность лазера, усиление PMT и апертуру конфокального микроскопа).

## Высокий фоновый флуоресцентный сигнал в живых клетках

- Снизьте концентрацию лиганда HTag.
- Увеличьте длительность отмывок и проводите их в полной среде.
- Проводите визуализацию клеток в полной среде без фенолового красного.
- Строго соблюдайте рекомендуемые температуры мечения.
- Отрегулируйте настройки прибора (например, уменьшите мощность лазера, усиление PMT или апертуру).

## Высокий фоновый флуоресцентный сигнал в фиксированных клетках

- Увеличьте время отмывок и/или проводите отмывки при более высокой концентрации Triton X-100 или с использованием альтернативного детергента.
- Снизьте концентрацию красителя.

## Клетки отрываются от поверхности

- Обращайтесь с клетками аккуратно, чтобы сохранить их прикрепление к поверхности. Попробуйте сократить количество замен среды.
- Проводите все этапы мечения, отмывки и визуализации в полной культуральной среде, по возможности удерживая клетки при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.
- Увеличьте плотность посева или продлите время культивирования, чтобы клетки лучше пролиферировали и прикреплялись.
- Используйте адгезивные покрытия, такие поли-L-лизин, фибронектин или коллаген.

## Гибель клеток или цитотоксичность

- Оптимизируйте протокол трансфекции или используйте менее токсичный трансфекционный реагент.
- Убедитесь, что ДНК не содержит эндотоксинов.

---

HaloTag® является зарегистрированной торговой маркой Promega Corporation.

### Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160  
Westminster, Maryland 21157  
USA  
Phone: +1 888 973 6353  
Fax: +1 888 973 6354  
Email: [order@lumiprobe.com](mailto:order@lumiprobe.com)

### Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23  
30625 Hannover  
Germany  
Phone: +49 511 16596811  
Fax: +49 511 16596815  
Email: [de@lumiprobe.com](mailto:de@lumiprobe.com)

### Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4  
121351 Moscow  
Russian Federation  
Phone: +7 800 775 3271  
Email: [ru@lumiprobe.com](mailto:ru@lumiprobe.com)

### Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre  
23 Harbour Road, Wan Chai  
Hong Kong  
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)  
Phone: +86-147-14316277 (from China)  
Email: [hk@lumiprobe.com](mailto:hk@lumiprobe.com)

### Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.  
3223562, Haifa  
Israel  
Phone: +972-(0)4-374-0377  
Email: [il@lumiprobe.com](mailto:il@lumiprobe.com)

### Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center  
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community  
Lianhua Street, Futian District  
Shenzhen, China  
Phone: +86-1471431-6277  
Email: [cn@lumiprobe.com](mailto:cn@lumiprobe.com)