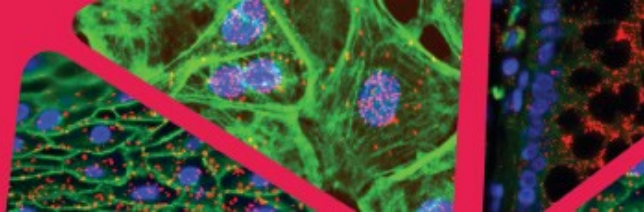
AMPLIFIED DETECTION



創新蛋白交互作用偵測 - Duolink® *in situ* PLA 技術

交互作用之時間，地點，定量，一次到位

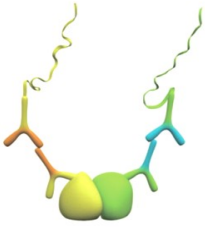
將蛋白質信號放大1000倍，微弱交互作用也能看得見

- 在原生細胞/組織上，直觀偵測蛋白質及其相互作用
- 可固定組織切片或細胞於玻片上操作，類似 IF/IHC 實驗流程，
  也可應用於懸浮之細胞以 Flow Cytometry 偵測，快速簡便
- 可定量，應用領域廣
- 可同時間偵測多達 4組之蛋白交互作用 (4 種不同螢光)

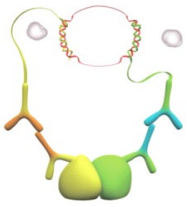
Duolink *in situ* PLA (Proximity Ligation Assay) 技術原理

利用抗體專一性偵測蛋白特性，於二級抗體上設計特定核酸序列探針，當偵測之兩個分子足夠靠近(<40nm)時，標定之核酸探針得以彼此接合並進行核酸環狀放大(訊號放大1000倍)，最後再以能辨認放大之核酸環之螢光探針偵測。

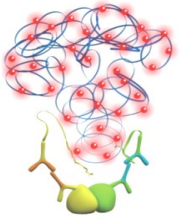
兩個來自不同物種之一級抗體分別專一性結合至兩欲偵測之蛋白



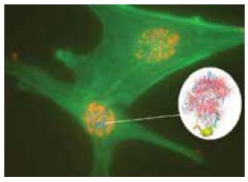
加入兩支分別能辨認一抗物種且各自帶有不同核酸序列之 PLA probe (plus 及 minus)



加入可將 plus 及 minus Probe 相接起的環狀 DNA並接合。



加入 聚合酶將 DNA 環狀放大。最後加入帶有互補於放大DNA 序列的螢光探針



每一對交互作用的蛋白在顯微鏡視野下即可觀察到一個顯著的螢光亮點。

蛋白質交互作用技術比一比

項目	DUOLINK®	IP / WESTERN	FRET
交互作用力	勝 不論穩定、過渡或是微弱的交互作用，皆適用	主要適用於高穩定性的交互作用	適用於穩定性的交互作用
作用位置	勝 可提供	無法提供	勝 可提供
定量	勝 可定量	半定量	勝 可定量
內源性蛋白	勝 可分析	無法，通常需要大量表現蛋白質	無法，蛋白質必需是重組螢光蛋白質
靈敏性	勝 極佳，可分析單一細胞的單一蛋白質	差	中等

Duolink *in situ* PLA 應用實例:

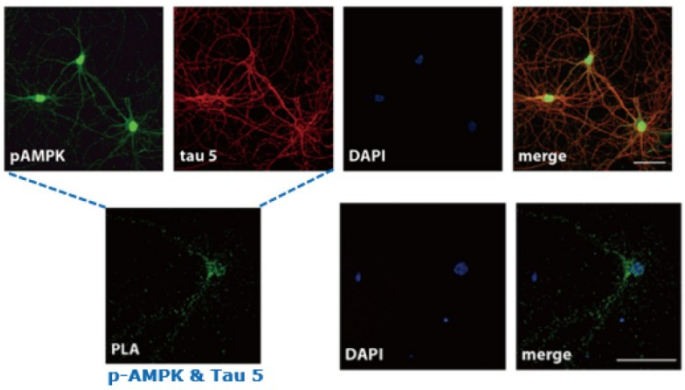
應用1.神經退化相關疾病研究

PLA 優勢

- 只要**一顆細胞**，可同時偵測二種蛋白交互作用之直接證據 (total & phospho)
- 輔助 IF 或 IHC之**雙重驗證**
- 可同時看交互作用蛋白之 Co-localization

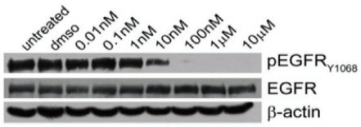
IF
驗證

PLA
驗證

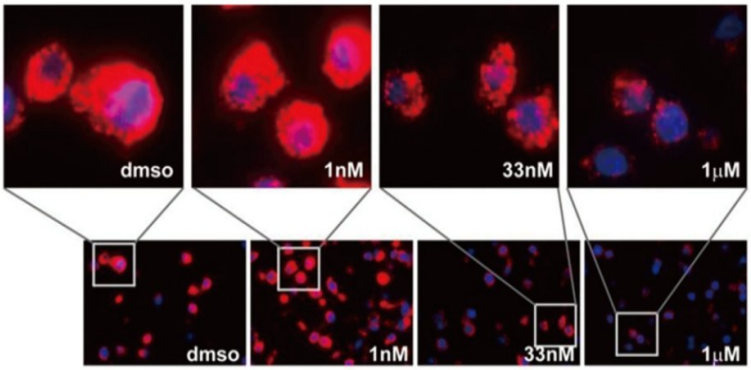


AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo Scientific Reports | 6:26758 | DOI: 10.1038/srep26758

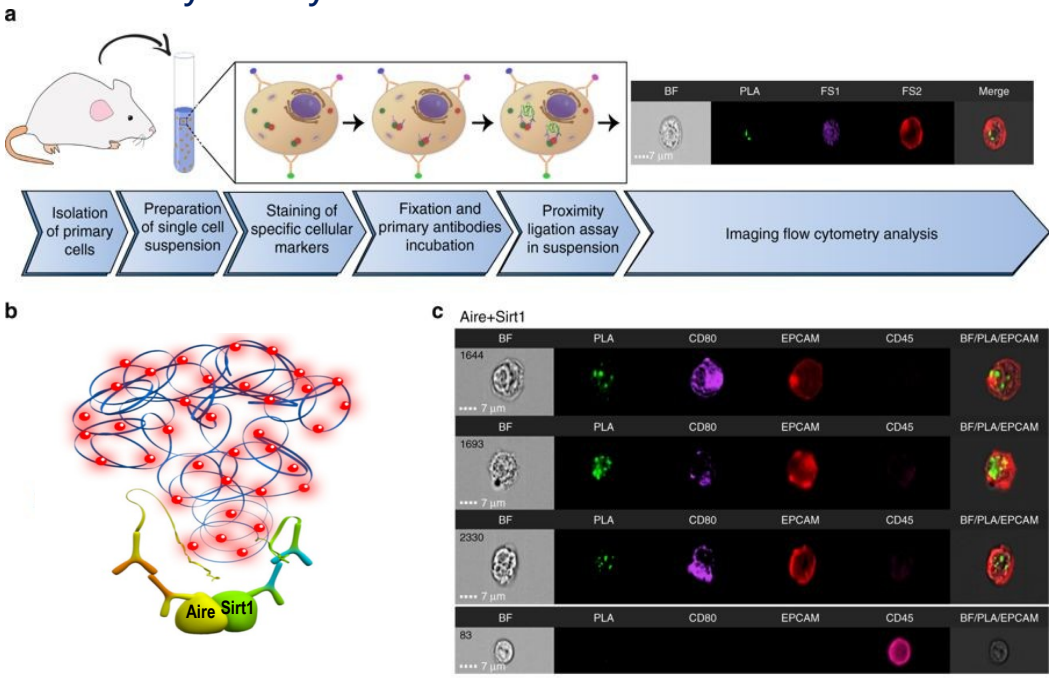
應用2.訊息傳遞研究: 讓磷酸化蛋白偵測更精準



在 WB 看不見的磷酸化現象，
可在 Duolink PLA系統清楚呈現



應用3. 以 Flow Cytometry 偵測 Aire 和 Sirt1 在單顆細胞中交互作用狀況



a. 實驗流程 b. 圖解說明使用 PLA 分析Aire 和 Sirt1相互作用原理。 C. PLA 以 Flow cytometry 分析所得到之影像呈現出在mTEChi 及CD45 +細胞群體中 Aire 和 Sirt1 蛋白彼此交互作用，從左到右分別為：明視野 (BF)，PLA信號 (綠色)，CD80染色(PB) ，EpCAM （ APC ） ，CD45（ APC / Cy7 ）和BF / PLA / EpCAM疊圖結果。 Avin, A., *et al.,* NATURE COMMUNICATIONS | 8: 1524

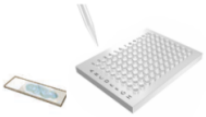
操作流程

製備

STEP 1. 細胞固定

STEP 2. 加入一級抗體

A. 類似 IF/IHC 偵測應用



將細胞或組織固定在顯微鏡玻片或是microplate 上

B. Flow Cytometry 偵測應用

細胞固定, permeabilize & block 並懸浮

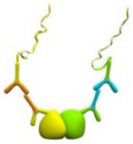
細胞分管或是分於 96-well plate

兩個不同物種來源的一級抗體各自可分別辨認不同蛋白質

PLA 偵測流程

STEP 3. 加入PLA probes

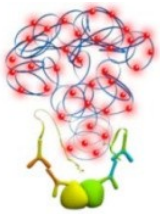
選擇分別可辨認兩個一級抗體來源物種的二及抗體且其末端分別接上不同 oligonucleotides 序列的 PLUS & MINUS PLA Probes



STEP 4. 加入 Ligation Solution, Amplification solution

當一對 PLA probes 彼此夠接近時，PLUS & MINUS 末端DNA片段與接著加入的兩個 circle-forming DNA oligonucleotides 進行 ligation，並能讓加入的polymerase 作用進行 rolling circle amplification。

STEP 5 .加入 Detection reagent



放大了好幾百倍的 DNA 最後能利用 Detection reagent (螢光或染劑標定之互補 DNA probe) 來偵測

分析

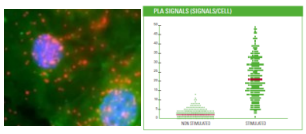
STEP 6. 封片

A. 類似 IF/IHC 偵測應用

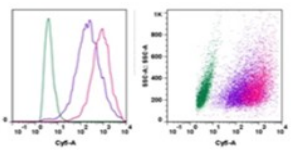
STEP 7. 觀察與擷取影像

相容之儀器廠牌: Zeiss, Nikon, Olympus, Leica

STEP 8. 定量 & 資料分析



B. Flow Cytometry 偵測應用



Duolink *in situ* PLA Starter Kit

For 類似 IF/IHC 偵測應用，新手方便包 ~

每組 Starter kit 內含試劑	包裝
1. **PLUS** probe	30RXN
2. **MINUS** probe	30RXN
3. Detection Reagents	30RXN
4. Wash Buffers, Fluorescence	4L
5. Mounting Medium with DAPI	5ML

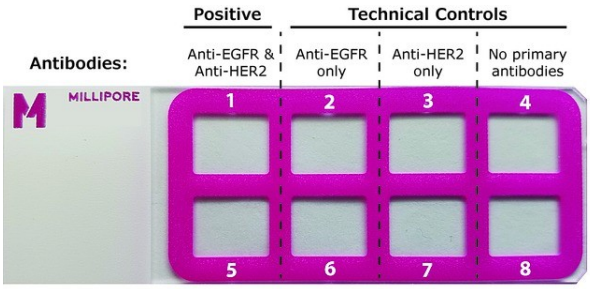
偵測螢光顏色	Plus /Minus probes	品號
Red (594 nm /624 nm)	Rabbit /Mouse	DUO92101
	Mouse/Goat	DUO92103
	Goat/Rabbit	DUO92105
Orange (554 nm / 576 nm)	Rabbit/Mouse	DUO92102
	Mouse/Goat	DUO92104
	Goat/Rabbit	DUO92106

Duolink ® PLA Control Kit – PPI (#DUO92202)

每組 Kit 包含:

A. 兩片 8-well chamber slide with EGF-treated pre-fixed SKOV3 cells

B. Mouse anti-EGFR & rabbit anti-HER2 antibodies



Duolink®PLA Control Kit – PPI slide layout and sample placement.
All wells contain EGF-stimulated, pre-fixed SK-OV3 cells. After permeabilization and blocking, wells 1 and 5 were incubated with both rabbit anti-EGFR and mouse anti-HER2 primary antibodies, wells 2 and 6 were incubated with anti-EGFR antibody alone, wells 3 and 7 were incubated with anti-HER2 antibody alone, and wells 4 and 8 were incubated with antibody diluent only.

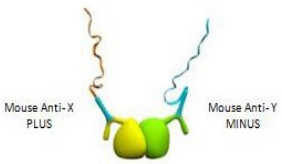
產品訊息

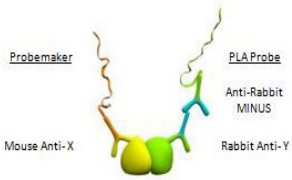
(1) 選擇 Probe: plus + minus 各一

Duolink *in situ* PLA Probes (30rxn/100rxn)	
Anti-Mouse PLUS	DUO92001
Anti-Rabbit MINUS	DUO92005
Anti-Goat MINUS	DUO92006
Anti-Rabbit PLUS	DUO92002
Anti-MOUSE MINUS	DUO92004
Anti-Human PLUS	DOU92020
Anti-Human MINUS	DUO92021

無適用物種之Probe可選時，可自行做 probe

Duolink® *In Situ* Probemaker	
Probemaker PLUS	DUO92009
Probemaker MINUS	DUO92010





(2) 依想用之螢光選擇 Detection kit

a. for 類似 IHC / IF 偵測法

Duolink *in situ* Detection Reagents		
Red	DUO92008	100 RXN
Orange	DUO92007	100 RXN
Green	DUO92014	100 RXN
Brightfield	DUO92012	100 RXN

b. for flow cytomety 偵測法

Duolink Flow PLA Detection Kit (40 Tests)	
Red (Ex. 594nm, Em. 624nm)	DUO94001
Green (Ex. 495nm, Em. 527nm)	DUO94002
Orange (Ex. 554nm, Em. 579nm)	DUO94003
FarRed (Ex. 644nm, Em. 669nm)	DUO94004

更多技術及產品訊息:

Duolink® PLA Resource Center

PLA 確效之一級抗體

PLA 各種應用的 Paper

Power of PLA Flow Kit

多組蛋白交互作用，同時偵測

Duolink ® PLA Multicolor Kits

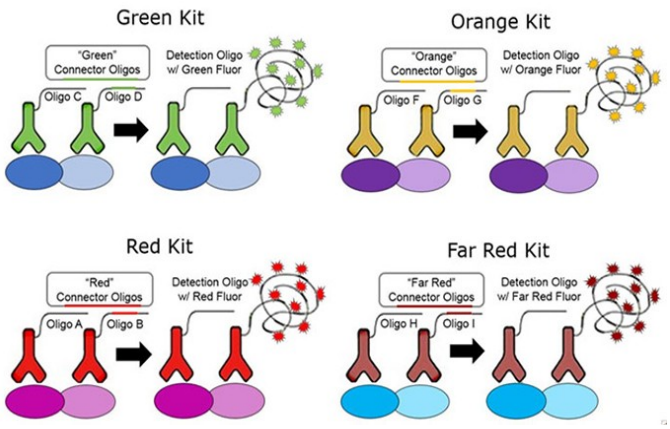
相互作用的蛋白質通常在細胞間和細胞內訊息傳導傳遞鏈中扮演重要角色，並影響多種細胞功能和行為。然而，準確鑑定固定組織和細胞中的蛋白質 - 蛋白質相互作用可能具相當挑戰性，尤其是對於低豐度或微弱交互作的蛋白。有鑒於越來越多的螢光團和新型檢測技術，多種研究領域已經註意到由於細胞內蛋白質相互作用的鑑定而取得的巨大進步。因此，偵測出這些交互作用能增進我們對蛋白質功能的理解，並可對正常和及病組織的許多訊息傳導途徑提供關鍵見解。而 Duolink®PLA 多色技術能在固定組織或細胞中，同時檢測並定量多組不同的蛋白交互作用。

➢ 產品特色

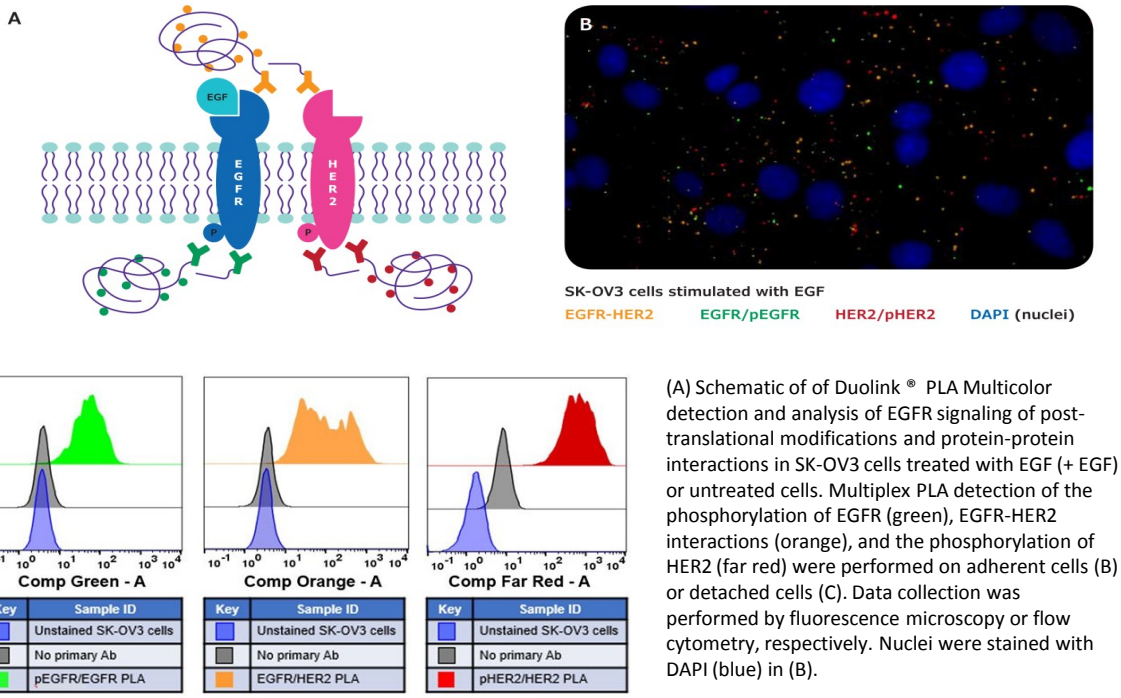
● 提供四種不同顏色螢光之 Probe maker kit，各色螢光具有獨特專一核酸序列探針，單一樣品上可同時偵測最多四對交互作用蛋白，彼此不會相互干擾

● 每一色螢光之Probe maker kit 含有可被此顏色螢光探針專一性辨認之一對特定序列 oligonucleotides, 用來標定於欲偵測之一組交互作用蛋白的一級抗體上

● 實驗需搭配含有Multicolor reagent pack 使用，內含 rolling circle amplification 試劑以及混有四色探針之偵測試劑



➢ 應用實例



(A) Schematic of of Duolink ® PLA Multicolor detection and analysis of EGFR signaling of post-translational modifications and protein-protein interactions in SK-OV3 cells treated with EGF (+ EGF) or untreated cells. Multiplex PLA detection of the phosphorylation of EGFR (green), EGFR-HER2 interactions (orange), and the phosphorylation of HER2 (far red) were performed on adherent cells (B) or detached cells (C). Data collection was performed by fluorescence microscopy or flow cytometry, respectively. Nuclei were stained with DAPI (blue) in (B).

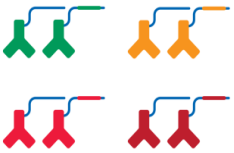
➢ 操作流程

Duolink® PLA Multicolor Fluorophore Specifications

Preparation

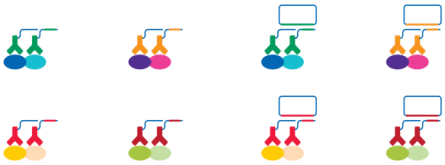
Step 1. Prepare microscope slides or microplate

Step 2. Fix cells or tissue, wash, permeabilize, and block



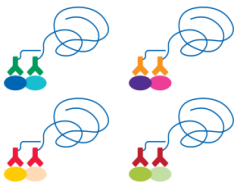
Step 3. Generate PLA probes using Multicolor Probemaker kits

Duolink® PLA

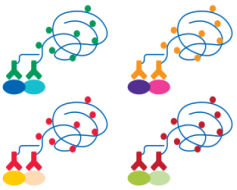


Step 4. Add Multicolor PLA probes

Step 5. Wash and add the ligation solution



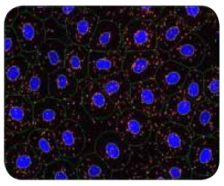
Step 6. Wash and add the amplification solution



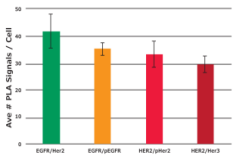
Step 7. Wash and add the detection solution

Analysis

Step 8. Capture images of each protein event separately



Step 9. Obtain objective quantification of each protein event separately



Step 10. Combine data analysis

➢ Duolink ® PLA Multicolor Probemaker Kit (標 20ug x 2 抗體)

Product #	Fluor Color	Ex. (nm)	Em. (nm)	Filter
DUO96010	Red	593	622	Texas Red
DUO96020	Green	490	520	FITC
DUO96030	Orange	542	562	Cy™3
DUO96040	Far Red	646	664	Cy™ 5

➢ 搭配之偵測試劑

Product #	Product Name	PKG
DUO96000	Duolink ® PLA Multicolor Reagent Pack (內含四色螢光, 最多可同時辨認偵測 for四色螢光之 probe)	30 RXN 100 RXN
DUO82049	Duolink ® In Situ Wash Buffer, Fluorescence	4L 20L
DUO82040	Duolink ® In Situ Mounting Medium with DAPI	5ML

PLA® Validated Antibody Targets

Target					
14-3-3 Sigma	Chk2	GbetaL	Menin	Rad17	SMN1
53BP1	c-Jun	GNL1	MLH1	Rad17, Phospho (S645)	SMRT
53BP1, Phospho (S25)	CKI alpha	GRLF1/p190RhoGAP	MLL1	Rad18	Sp1
AATF/Che-1	CKII alpha	GTF2B/TFIIB	MOF/MYST1	Rad21	SRC1
AKT1	CKII beta	GTF3C1/TFIIIC220	MOV10	Rad50	SRC2
AKT2	Claspin	H2AX	Mre11	Rad9	SRC3
ARID4B	c-myc	H2AX	MSH2	RanBP3	STAT3
ASH2	Coilin	HBO	MSH6	RbBP4	STUB1/CHIP
ATAD5/FRAG1	CoREST	HCF1	MLH1	RbBP7	TAF5
ATF2	CPSF160	HDAC1	MLL1	RCC1	TCP1
ATM	CREB	HdmX/MDM4	MOF/MYST1	RCD8	TDP1
ATMIN	c-Rel	HdmX/MDM4, Phospho (S403)	MOV10	RelA	TIF1 Alpha/TRIM24
ATR	CRM1	HIF1-alpha	Mre11	RelA, Phospho (S468)	Timeless
ATRIP	CRSP1/TRAP220	HMG20B/BRAF35	MSH2	RelB	TIPIN
ATRX	CSN1	HP1-beta	MSH6	RENT1	TLK1
BAF53A	CTBP1	HSP60	mTOR	RFC1	TLK2
BAP1	CTF18	IKK-alpha	NBS1	RENT1	TNIK
BARD1	CtIP	IKK-beta	NCoR	RFC1	TopBP1
BCAR3	Cul1	IQGAP1	NEK9	RFC2	TRF2
BCR	Cul4a	JARID1A/RBP2	NF-kappaB1	RFC3	TRRAP
BIRC6/Apollon	Cyclin T1	KAP-1	NF-kappaB2	RFC4	TRX2
BLAP75	DAXX	KAP-1, Phospho (S824)	NFRKB	RFC5	TSG101
BLM	DBC1/p30 DBC	Ki-67	NIF1	Rictor	TTI1
BMI1	DBF4	KPNA3	NONO	RIF1	USP28
BRCA1	DC8	Ku70	NOP56	RNA Polymerase II	USP7
BRCA1, Phospho (S1524)	Dcp2	Ku80	Notch1	RNA Polymerase II, Phospho (S2)	VCP
BRD2	DDB1	Lasu1/Ureb1	NPM1	ROCK2	Vimentin
BRD4	DDX56	LATS2	ORC1	RPA32	WAPL
BRF1	DMAP1	MAD1	ORC2	RPA32, Phospho (S33)	WDR5
BRG1/SMARCA4	DNA-PKcs	MAD2	p16INK4a	RPA32, Phospho (S4/S8)	XRN1
cAbl	DNMT1	MCM2	p300	RPA70	YL1
Caf1p150	E2F1	MCM2, Phospho (S108)	p400	RPL26	YY1
CBP	E2F4	MCM2, Phospho (S27)	p53	RPS6, Phospho (S235/S236)	ZNF8
CBX3	EGFR	MCM2, Phospho (S40/S41)	p73	RuvBL2	—
CBX5	EPC1	MCM2, Phospho (S41)	PARP1	SA1	—
CCDC131	ERK1	MCM2, Phospho (S53)	PCNA	SCC-112	—
CDC25a	ERK2	MCM3	PHF8	SDS3	—
CDC25c	ESCO2	MCM4	PIM1	SETDB1	—
CDC6	Estrogen Receptor Alpha	MCM3	PKM2	Sin1	—
CDC7	Estrogen Receptor Alpha, Phospho (S305)	MCM4	PLK1	Sin3A	—
CDK1	EWS	MCM5	PML	Sirt1	—
CDK2	FANCD2	MCM6	PMS2	SMC1	—
CDK7	FANCE	MCM7	PolA1	SMC1, Phospho (S957)	—
CDK9	FOXO1a	MCPH1	PPP1CA	SMC1, Phospho (S966)	—
CHD4/Mi2 beta	FOXO3a	MDC1	PPP1CC	SMC2	—
Chk1	FUS	MEK1	PPP5C	SMC3	—
Chk1	G3BP1	MEK1, Phospho (T286)	PRKCBP1	SMC4	—
Chk1, Phospho (S317)	GAPDH	MEKK1	PSF/SFPQ	SMG1	—

RJX
82787
1114