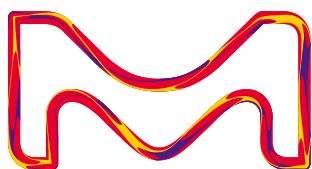
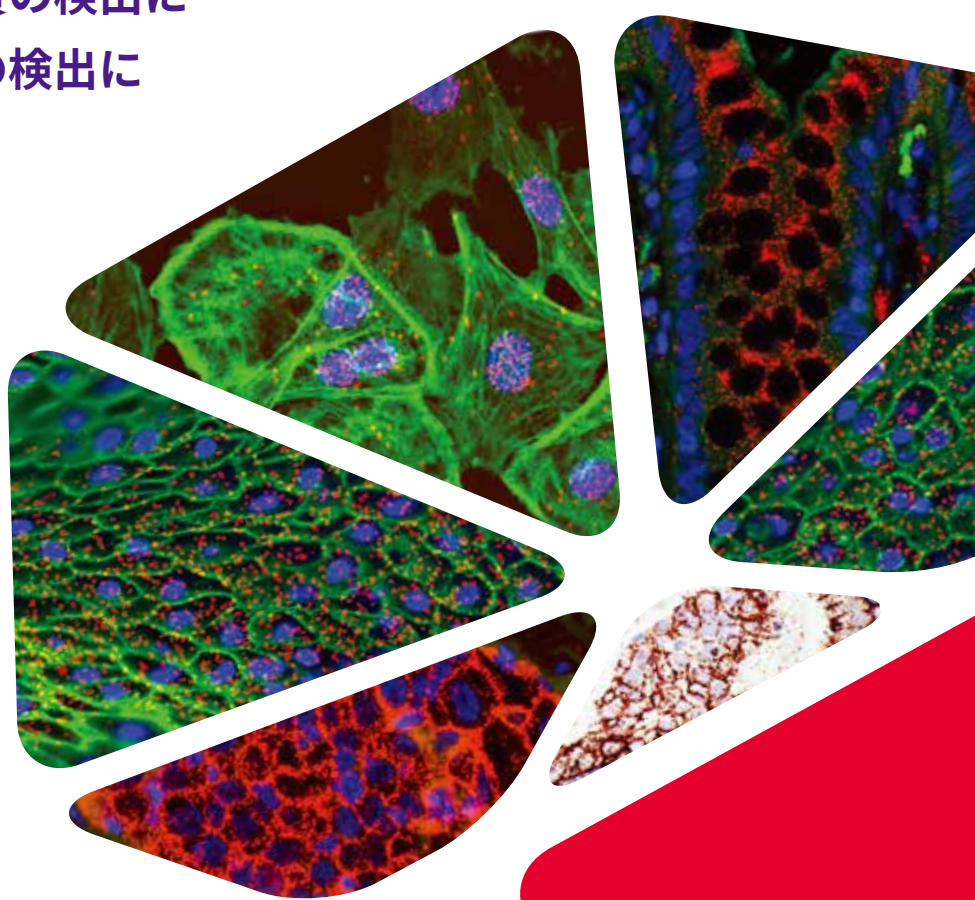


免疫染色の高感度検出に

Duolink™ PLA

(Proximity Ligation Assay)

- 低濃度内在性タンパク質の検出に
- タンパク質間相互作用の検出に
- 翻訳後修飾の検出に



The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

すべての細胞の中には、まだ発見されていないタンパク質の革新的な機能や役割が存在します。ヒト疾患の原因の正しい理解を得る、あるいは不規則なタンパク質-タンパク質相互作用を明確なシグナルで発見する機会を得るには、強力な研究ツールと効率的なアプローチが必要です。

Duolink PLA (Proximity Ligation Assay: 近接ライゲーションアッセイ)を使用すれば、簡単なプロトコルでシグナルを1,000倍に増幅し、タンパク質とその相互作用を視覚的に検出することが可能になります。

次世代免疫検出技術

高感度

低バックグラウンド

- ・プローブを増幅することで強いシグナル検出を実現
- ・検出は蛍光色素、HRPによる染色を選択可能
- ・ターゲットに対し、2種類の抗体を作用させることで特異性が高く、低いバックグラウンドの検出が可能

Duolink PLA の原理

Duolink PLA のベースとなっている近接ライゲーションアッセイ (PLA) は、固定された細胞の内在性タンパク質を検出するために、二次抗体の特異性と相補的なオリゴヌクレオチドプローブのローリングサークル増幅 (RCA) を組み合わせています。一対のオリゴヌクレオチド標識抗体 (PLA プローブ) は、プローブが近接 (40 nm 以内) しているときにのみ増幅シグナルを生成します。

1

Anti-Mouse PLUS
Mouse Anti-X
Anti-Rabbit MINUS
Rabbit Anti-X

2

3

1. 一次抗体反応後、PLA プローブ (PLUS および MINUS) が共有結合した二次抗体を添加し結合させます。
2. PLA プローブ環状化のための DNA オリゴヌクレオチドおよびライゲーション酵素を添加し、DNA サークルを形成、DNA ポリメラーゼによってサークルを増幅させます。
3. 蛍光標識された相補的オリゴヌクレオチドプローブが増幅された DNA に結合し、シグナルが検出されます。

※ イラストは2つの標的タンパク質に対する抗体を作用させた際のイメージです。1つの標的タンパク質に対し2種類の抗体を用いた場合も同様の原理で検出されます。

簡易プロトコール

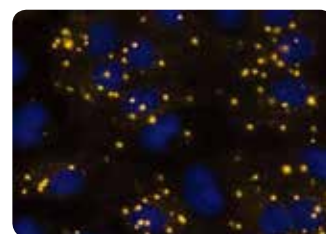
Duolink PLA を使用すると、従来の免疫蛍光染色法や免疫組織染色法と同様の簡単な免疫検出プロトコールを用いて、**低濃度内在性タンパク質、タンパク質-タンパク質相互作用、翻訳後修飾**をより高感度に検出、定量、可視化できます。

下記、8つの基本ステップの、簡単で分かりやすいプロトコールです。

- 1 サンプル調製 (細胞または組織スライド、固定および透過処理)
- 2 ブロッキング
- 3 一次抗体インキュベーション

基本の抗体反応
+ わずか3ステップ

- 4 PLA プローブ添加
- 5 ライゲーション (PLA プローブへの環状化のための DNA オリゴヌクレオチドとライゲーション酵素の添加)
- 6 DNA増幅および蛍光標識された相補的オリゴヌクレオチドプローブによる増幅されたDNAの標識
- 7 洗浄とカバーガラス取り付けによるスライド調製
- 8 蛍光顕微鏡を用いたイメージングと解析



リン酸化 EGFR の検出 (黄)

Duolink の原理やプロトコール動画などがこちらのページにてご覧いただけます
www.sigma-aldrich.com/duolink-jp



Duolink PLA を使ってみたい…!
でもうまく使いこなせるかご心配な方へ

Duolink PLA Control Kit – PPI

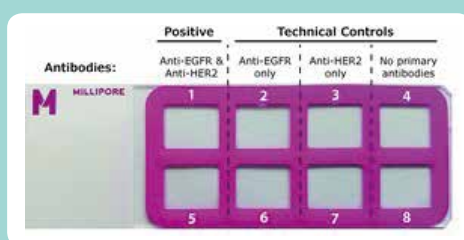
(PPI: タンパク質-タンパク質相互作用)

本製品には、固定済み SK-OV3 ヒト卵巣がん細胞の8ウェルガラススライド2枚が入っています (右図)。この固定済み SK-OV3 細胞株は EGF で刺激したもので、EGFR-HER2 相互作用を誘導済みです。ウサギ抗 HER2 抗体とマウス抗 EGFR 抗体も同梱されておりますので、EGFR-HER2 相互作用を本製品を用いてご確認いただけます。

※ 検出には PLA プローブ (PLUS および MINUS) と検出試薬が別途必要です

製品名	カタログ番号
Duolink PLA Control Kit - PPI	DUO92202-1KT

関連製品	反応性	免疫動物	抗体タイプ	アプリケーション	カタログ番号
Anti-Epidermal Growth Factor Receptor antibody, clone F4	H	M	Mono	ELISA, IH (F, P), IH (F), IH (P), WB	E3138-100UL E3138-.2ML
Anti-ERBB2 Antibody	H	Rb	Poly	IF, IH	HPA001383-100UL



Duolink PLA を用いた免疫染色のアプリケーション

1. 低濃度内在性タンパク質の検出と定量

検出限界以下の低発現量タンパク質やバイオマーカーは、従来法による検出では、見落とされる可能性があります。Duolink PLA では、わずか 1 分子のタンパク質でも検出対象とすることが可能です。標的的特異的抗体をお持ちであれば、強制発現や遺伝子操作を実施せずに内在性タンパク質を検出可能です。

2. タンパク質間相互作用の検出と定量

タンパク質は、他のタンパク質、DNA、膜画分、細胞内構造などと相互作用して細胞機能を制御します。Duolink PLA を使用すれば、これらの細胞内相互作用を、明確で視覚的なシグナルとして確認可能です。標的タンパク質が 40 nm 以内にある場合にのみシグナルが生成され、相互作用が検出されます。

3. 翻訳後修飾の検出と定量

従来法によるメチル化やリン酸化などのタンパク質修飾の確実な検出は困難でした。Duolink PLA を使用すれば、翻訳後修飾を高感度かつ高い特異性で検出可能です。タンパク質検出用と翻訳後修飾検出用の 2 種類の抗体をご使用ください。修飾がタンパク質上にある場合のみ、2 つの抗体上のプローブが DNA サークルを形成し、シグナルが生成されます。

参考文献

- Phizicky E. M. & Fields S. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. Microbiol Rev. ,59, 94-123.(1995) PMID: 7708014
- Stadler, Charlotte, et al. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. Nat Methods . ,10(4);:315-323.(2013) PMID: 23435261

Duolink PLA は論文掲載実績
3,700 報 以上 !!!

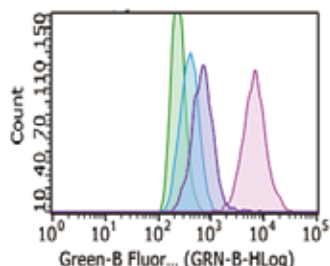
従来法との比較

	Duolink PLA	IP/Western	FRET/BRET
検出可能な相互作用	安定、一過性もしくは弱い相互作用	高親和性の相互作用	安定な相互作用
細胞内タンパク質の局在検出	○	○	○
標的タンパク質の定量	○ ソフトウェア使用	× 半定量的	○ ソフトウェア使用
内在性タンパク質の検出	○	× 強制発現が必要	× 遺伝子操作が必要
検出感度	◎ 非常に高く、1 分子の検出が可能	× 低く、低精度	× 中程度
対象サンプル	固定済み細胞および組織 (凍結切片、パラフィン包埋切片、ホルマリン固定切片)	細胞抽出液 組織抽出液	生細胞

新製品のご紹介

Duolink flowPLA Detection Kit

これまでフローサイトメトリーはタンパク質 - タンパク質相互作用および低レベルのタンパク質イベントを検出するには限界がありました。本製品は既存の Duolink PLA を改良し、より高感度にするにより、細胞集団における低濃度の標的タンパク質およびそのイベントの検出が可能になりました。



例：HeLa 細胞における Rictor-mTOR 複合体の検出

左) Rictor-mTOR 複合体の細胞内局在 (赤)
右) フローサイトメーターによる Rictor-mTOR 複合体検出数

一次抗体なし
抗 Rictor 抗体のみ
抗 mTOR 抗体のみ
Rictor-mTOR PLA

参考文献

- Söderberg O, et al. (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. Nat Methods **3**, 995-1000 PMID: 17072308
- Leuchowius K, et al. (2009) Flow Cytometric In Situ Proximity Ligation Analyses of Protein Interactions and Post-translational Modification of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. Cytometry, Part A, **75**, 833-839. PMID: 19650109
- Avin A, et al. (2017) Quantitative analysis of protein-protein interactions and post-translational modifications in rare immune populations. Nature Communications, **8**:1524. PMID:29142256
- Andersen SS, et al. (2013) Proximity ligation assay combined with flow cytometry is a powerful tool for the detection of cytokine receptor dimerization. Cytokine, **64**(1), 54-57. PMID: 23726671

製品名	Excitation (nm)	* Excitation Laser Line (nm)	Emission (nm)	Filter	容量	製品番号
Duolink flowPLA Detection Kit - Red	594	532, 561	624	Texas Red	40 tests (1 test: 1 × 10 ⁵ cells/ 100 μL)	DUO94001
Duolink flowPLA Detection Kit - Green	495	488	527	FITC		DUO94002
Duolink flowPLA Detection Kit - Orange	554	532, 561	576	Cyanine 3		DUO94003
Duolink flowPLA Detection Kit - Far Red	644	638, 640, 642	669	Cyanine 5		DUO94004

* 蛍光色素を励起する一般的なレーザー。必ずしも特定の機器で利用可能なレーザーを反映しているとは限りません。ご了承ください。

今からすぐに実験を始められるスターターセットをご用意しています

PLA プローブと検出試薬の組み合わせ

スターターセット構成

例：PLA プローブ PLUS で“マウス由来”を選んだ場合

PLA プローブ PLUS



カタログ番号：DUO92001

+

PLA プローブ MINUS



カタログ番号：DUO92005

or



カタログ番号：DUO92006

+

検出試薬

ご実験に合わせて
お選びください

+

洗浄バッファー

&
封入剤

スターターセットはこちらのウェブサイトからお選びいただけます！ <https://goo.gl/GRVezD>

ご注文情報

製品名	容量	カタログ番号
PLA プローブ PLUS		
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse PLUS	30 回分	DUO92001-30RXN
	100 回分	DUO92001-100RXN
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS	30 回分	DUO92002-30RXN
	100 回分	DUO92002-100RXN
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Goat PLUS	30 回分	DUO92003-30RXN
	100 回分	DUO92003-100RXN
NEW Duolink In Situ PLA Probe Anti-Human PLUS	30 回分	DUO92020-30RXN
	100 回分	DUO92020-100RXN
PLA プローブ MINUS		
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS	30 回分	DUO92004-30RXN
	100 回分	DUO92004-100RXN
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit MINUS	30 回分	DUO92005-30RXN
	100 回分	DUO92005-100RXN
Duolink In Situ PLA Probe Anti-Goat MINUS	30 回分	DUO92006-30RXN
	100 回分	DUO92006-100RXN
NEW Duolink In Situ PLA Probe Anti-Human MINUS	30 回分	DUO92021-30RXN
	100 回分	DUO92021-100RXN
検出試薬		
Duolink In Situ Detection Reagents Orange	30 回分	DUO92007-30RXN
	100 回分	DUO92007-100RXN
Duolink In Situ Detection Reagents Red	30 回分	DUO92008-30RXN
	100 回分	DUO92008-100RXN
Duolink In Situ Detection Reagents Brightfield	30 回分	DUO92012-30RXN
	100 回分	DUO92012-100RXN
Duolink In Situ Detection Reagents FarRed	30 回分	DUO92013-30RXN
	100 回分	DUO92013-100RXN
Duolink In Situ Detection Reagents Green	30 回分	DUO92014-30RXN
	100 回分	DUO92014-100RXN

製品名	容量	カタログ番号
PLA プローブ自家調製キット		
Duolink In Situ Probemaker PLUS	20 µg	DUO92009-1KT
Duolink In Situ Probemaker MINUS	20 µg	DUO92010-1KT
封入剤		
蛍光染色用 Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI	5 mL	DUO82040-5ML
明視野用 DPX new non-aqueous mounting medium for microscopy	500 mL	1.00579.0500
※ DUO80102 の販売中止に伴い、本製品をご紹介します。		
洗浄バッファー		
Duolink In Situ Wash Buffer, Brightfield	4 L	DUO82047-4L
	20 L	DUO82047-20L
Duolink In Situ Wash Buffers, Fluorescence	4 L	DUO82049-4L
	20 L	DUO82049-20L
その他推奨アクセサリ		
Duolink In Situ Microplate Nuclear Stain, Anti-Fade	1 mL	DUO82064-1KT
Duolink In Situ Microplate Heat Transfer Block	1 個	DUO82065-1EA

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】

<メルク製品>

TEL：03-4531-1140

FAX：03-5434-4859

Email：jpts@merckgroup.com

<シグマ製品>

TEL：03-6756-8245

FAX：03-6756-8302

Email：jpts@merckgroup.com



LINE公式アカウント
はじめました



サイエンス系
お役立ちメディア

M-hub



m-hub.jp



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Sigma-Aldrich Co. LLC の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2018 年 12 月時点の情報です。©2018 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigma-aldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245 Fax: 03-6756-8302

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@sial.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。