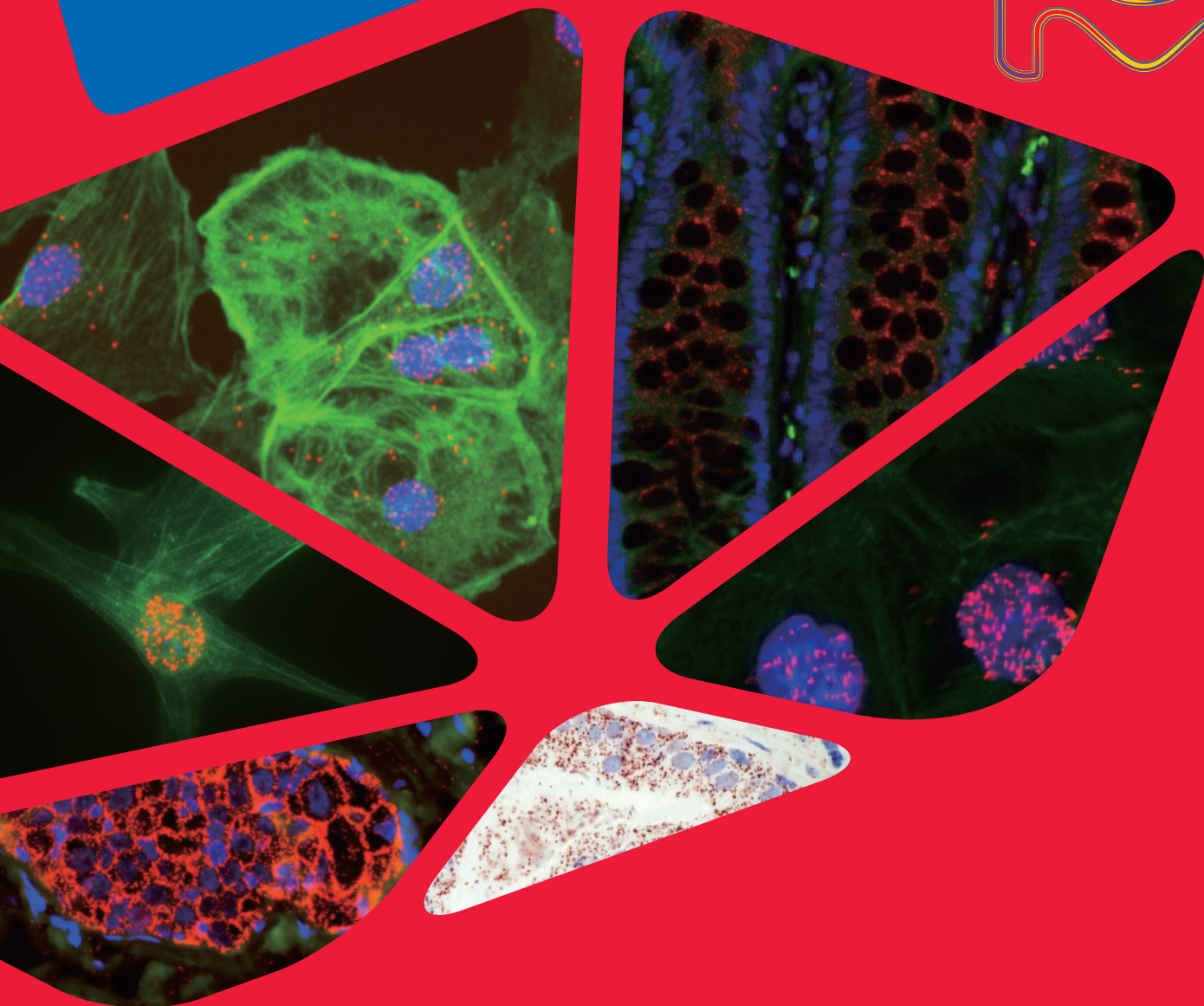


Sigma-Aldrich

Lab Materials & Supplies



看得见的蛋白互作

— **DUOLINK[®] PLA[®]**技术
蛋白检测新标准

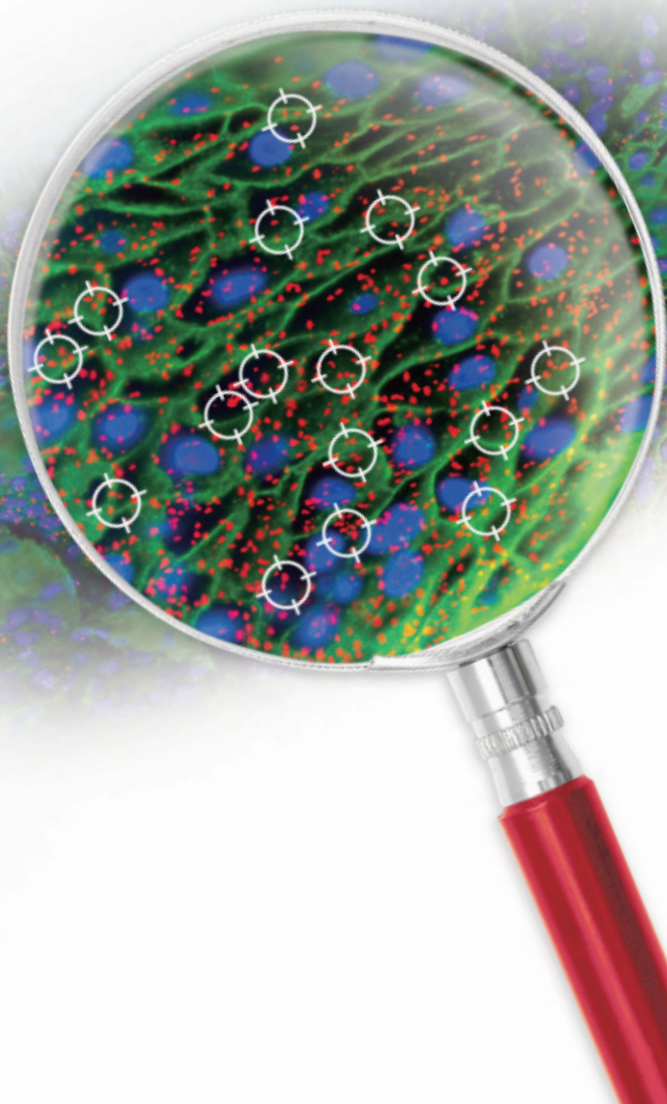
MERCK

每个细胞中，都有一个重大突破等待被发现。

发现蛋白功能异常的生物标志，进而找到人类疾病的根源，需要强大的研究工具和系统但简化的方法。要想成功，你必须快、精确和富有洞察力，但不管你多么熟练，都很难检测你看不到的东西。

现在，技术革命已经爆发，Duolink®技术加速了蛋白研究新发现。该技术可将蛋白信号放大1000倍，实现单分子级别检测灵敏度。即使是微量样本、微弱互作、极罕见低丰度表达，也能在细胞生理水平下，获得基于图像的可视化蛋白检测结果，真实反映内源表达水平蛋白的互作、定位和定量。

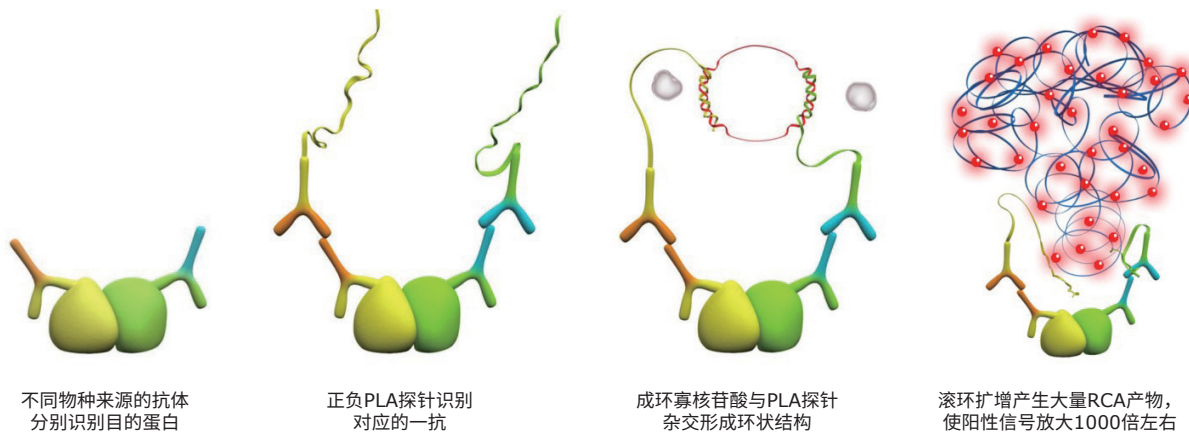
看得见的蛋白互作 —— DUOLINK® PLA®技术



- 🔍 蛋白互作双微检测
- 🔍 病理组织原位显示
- 🔍 不仅可视而且定量

Duolink[®] 实验原理

Duolink[®] 实验基于邻位连接技术(Proximity Ligation Assay, PLA)，只有在2个一抗均与目标蛋白结合且一对PLA探针的空间距离足够接近时(<40nm)，邻位连接反应才能发生。PLA技术的特点使Duolink[®] PLA[®]可精确靶定蛋白的相互作用，滚环扩增则确保最微弱的信号也能被看到，具有极高灵敏度的蛋白检测技术。



Duolink[®] PLA[®]技术特点：

蛋白互作双微检测：

信号扩增放大1000倍使其具有单分子级别灵敏度，即使微量样本、微弱蛋白互作亦能轻松可视化

病理组织原位显示：

细胞生理水平的检测，不需要修饰或改造细胞/组织，病理组织切片也可原位显示蛋白互作

不仅可视而且定量：

Imagetool软件可轻松统计PLA信号，亦可结合流式细胞术进行精确定量；简化的实验流程适合高通量筛选，用于药物筛选时优势更加突出。

结果可靠即用发表：

抗体特异性与滚环扩增高灵敏度的完美结合，获得的原位可视化检测结果，真实、可靠、有说服力，可即时用于文章发表



Duolink® 实验流程

—— 当天可完成，简单犹如1、2、3

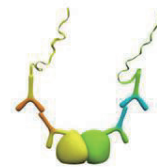
实验准备



步骤 1. 将细胞或组织固定于玻片或多孔板

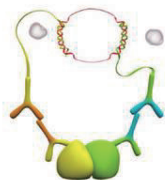


步骤 2. 漂洗样品并加入两种一抗多孔板

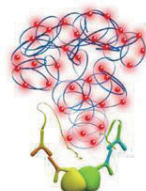


步骤 3. 漂洗样品并加入正链和负链标记的PLA探针

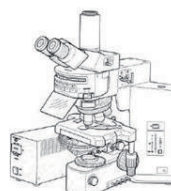
结果检测



步骤 4. 漂洗样品并加入连接酶及缓冲液

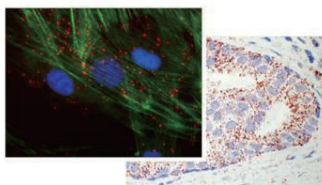


步骤 5. 漂洗样品并加入扩增缓冲液

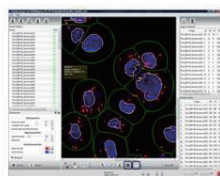


步骤 6. 使用显微镜记录结果

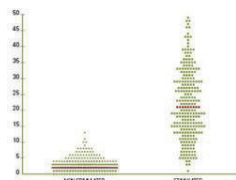
结果分析



步骤 8. 使用荧光或明场显微镜对蛋白相互作用进行成像

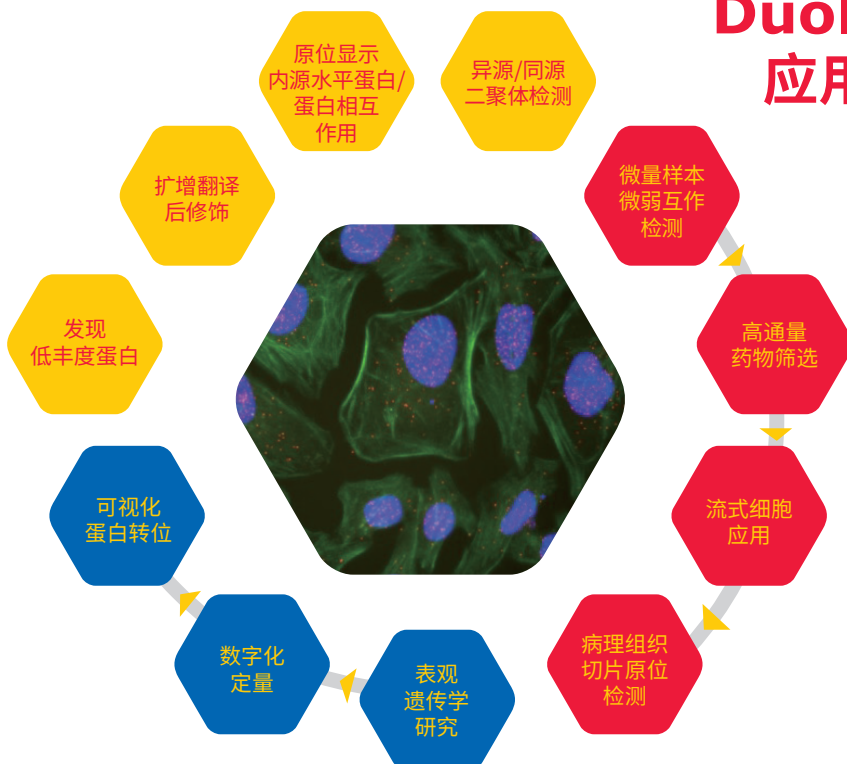


步骤 8. 使用Doulink®成像工具对结果进行定量



步骤 9. 数据统计与分析

Duolink® PLA® 技术 应用广泛，堪称蛋白 检测多面手



微量细胞中的微弱蛋白互作检测

Massinen S, Tammimies K P I. Functional interaction of DYX1C1 with estrogen receptors suggests involvement of hormonal pathways in dyslexia.[J]. Human Molecular Genetics, 2009, 18(15):2802.

背景

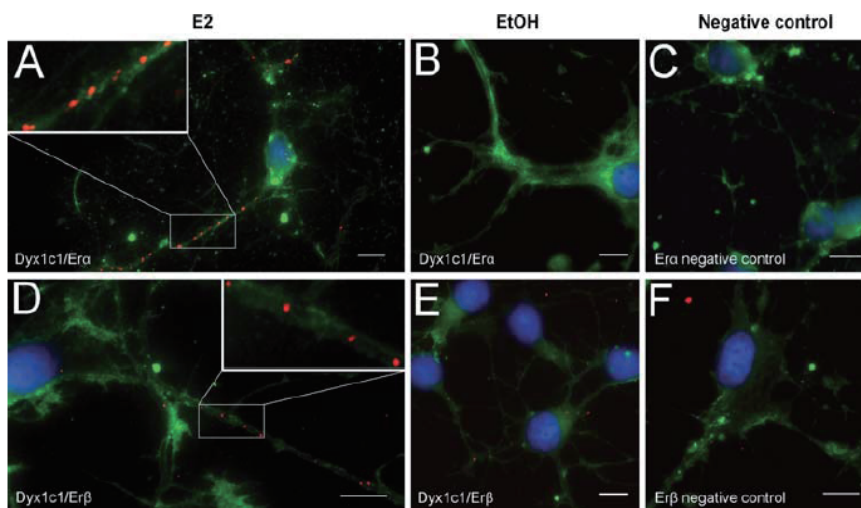
DYX1C1是阅读障碍(失读症)的易感基因,与神经元迁移有关,但并不清楚他们之间的功能与相关性。DYX1C1与U-box蛋白CHIP具有相关性, U-box蛋白CHIP也参与雌激素受体(ERa)和(ERb)的降解, ERs在脑发育及认知功能中具有重要作用, 猜测DYX1C1效应可能部分通过ERs进行调控和介导。

结果

PLA技术显示在加入雌二醇培养 48h 的大鼠胚胎海马神经元中, 能在内源性水平检测到ERs与DYX1C1在神经突触中的相互作用复合物。作者使用传统Co-IP方法并没有在胚胎神经元中检测到相互作用的复合物。

结论

对DYX1C1的功能有新的理解, 发现神经元迁移、阅读障碍与雌性激素信号通路的联系, 从而影响脑发育, 调节认知功能。



原代大鼠胚胎海马神经元使用雌二醇培养48h, PLA检测雌激素受体ERs/DYX1C1在神经突触中的相互作用 (A, D为雌二醇 (E2) 刺激组, B,E 为未刺激组, C, F为无抗体阴性对照), 每一个红点代表 ERs/DYX1C1相互作用的复合物, 蓝色代表 Hoechst 染细胞核, 绿色代表Actin蛋白。

蛋白瞬时相互作用检测

Mellberg S, Dimberg A, Bahram F, et al. Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis[J]. FASEB Journal, 2009, 23(5):1490-1502.

背景

为了确定血管3D形态的形成，鉴定VEGF(血管内皮生长因子)诱导的内皮细胞管生成状态。前期的研究发现VE-PTP (血管内皮蛋白酪氨酸激酶)基因，VE-PTP的表达沉默伴随VEGFR2酪氨酸磷酸化增加和下游信号通路激活。

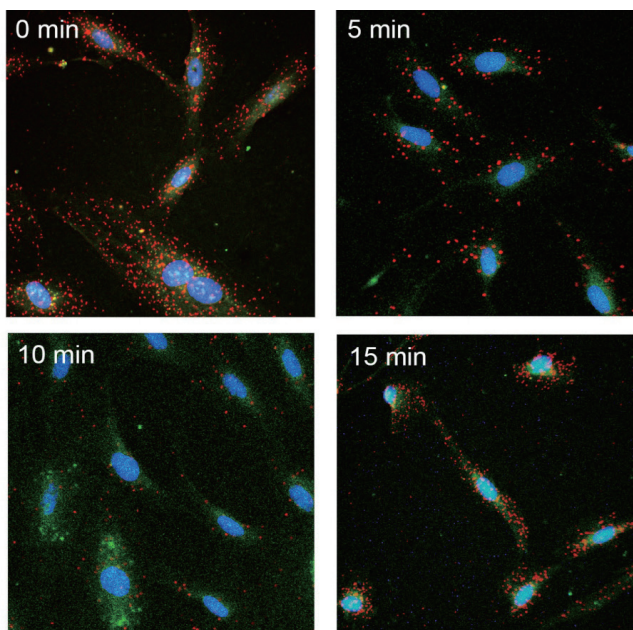
结果

PLA技术确定VEGFR2是VEPTP的底物，显示在休眠细胞中VEGFR2和VE-PTP具有密切的关系，VEGF能够以瞬时作用方式调控VE-PTP和VEGFR2复合物的形成，当VEGF激活VEGFR2时，这种相关性快速消失，随着受体活性降低，VEGFR2和VE-PTP的相关性能够恢复。此外，作者使用了传统Co-IP方法检测VE-PTP和VEGFR2是否存在相互作用，但是没有检测到这种复合物的形成。

结论

发现VE-PTP能够通过调节VEGFR2活性从而调节血管生成过程中VEGF的反应，是血管形成过程中重要的功能基因。

VEGF刺激前后不同时间，PLA原位检测内皮细胞中VE-PTP与VEGFR2复合物的相互作用(红点)



内源性蛋白相互作用检测

Choi B K, Fan X, Deng H, et al. ERBB3 (HER3) is a key sensor in the regulation of ERBB-mediated signaling in both low and high ERBB2 (HER2) expressing cancer cells[J]. Cancer Medicine, 2012, 1(1):28-38.

背景

EGFR与ERBB2 (HER2)异常表达和激活已成功作为肿瘤治疗的靶标,最近在基础医学以及临床的研究显示ERBB3 (HER3)通过与其他ERBB蛋白形成二聚体能够作为信号通路下游关键的激活子,在针对EGFR和HER2临床靶向性肿瘤治疗中产生的抗性具有关键作用,HER3能够作为肿瘤抗体药物靶向治疗中的潜在靶标。配体的结合对于HER3与其他ERBB蛋白的二聚化是必需的,导致HER3的C端酪氨酸磷酸化,以及下游 AKT 和 MAPK 信号通路的激活。

结果

PLA技术研究显示在高表达和低表达HER2肿瘤细胞中,anti-HER2单克隆抗体(HER2Mab)能够封闭HER2/HER3二聚化,诱导HER3/EGFR二聚化。在无HER3配体激活情况下,HER2Mab在低表达HER2的肿瘤细胞中能促进细胞增殖和迁移。进一步研究显示HER2Mab诱导的HER3信号是通过EGFR/HER3二聚化以及下游AKT信号通路的激活。

结论

通过PLA可视化原位检测HER3/HER2, HER3/EGFR, HER2/EGFR的受体二聚化,显示HER2Mab能够干扰ERBB蛋白二聚体的平衡,深入理解HER2抗体治疗在诱导肿瘤细胞增殖和迁移的信号机制,表明HER3能够作为抗体靶向治疗的位点。

图1:

HER2Mab诱导MCF7细胞中配体非依赖性EGFR/HER3二聚化。PLA检测HER3/EGFR或HER3/HER2二聚体。血清饥饿处理, MCF7细胞分别经PBS (C), NRG1 (N),HER2Mab(H)或HER2Mab/NRG1(NH)联合处理。荧光显微镜观察,每个红点分别代表一个二聚体复合物,蓝色代表细胞核。

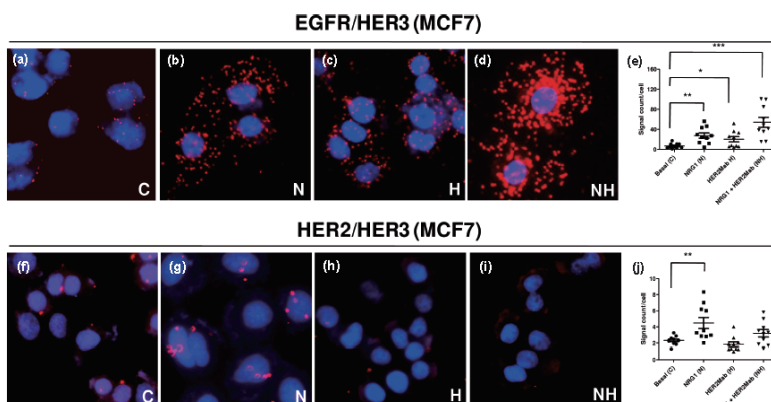
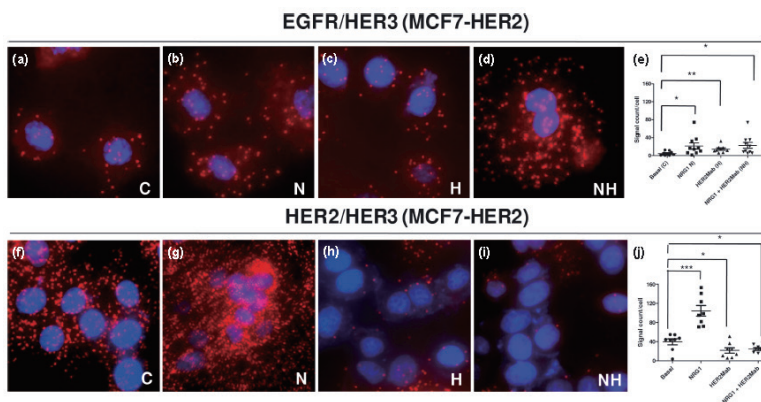


图2:

HER2Mab有效封闭MCF7-HER2细胞中HER2/HER3二聚化。PLA检测HER3/EGFR或HER3/HER2二聚体。血清饥饿处理, MCF7-HER2细胞分别经PBS (C), NRG1(N),HER2Mab (H)或 HER2Mab/NRG1(NH)联合处理。荧光显微镜观察,红点代表二聚体复合物,蓝色代表细胞核。



原位检测病理组织中 蛋白相互作用

Boussemart L, Malkamahieu H, Girault I, et al. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies.[J]. Nature, 2014, 513(7516):105.

背景

在BRAF(V600)的突变型肿瘤中，药物抗性产生的主要机理包括MAPK信号转导途径中靶向BRAF和/或MEK激酶，PI(3)K-AKT-mTOR通路或是调节Caspase依赖的凋亡级联反应，这三种通路最终调节eIF4F复合物的形成（调节特定mRNAs的翻译）。BRAF(V600)-突变的黑色素瘤、结肠癌和甲状腺癌中，eIF4F复合物(eIF4E,eIF4G和eIF4A)的形成与抗BRAF、抗MEK、抗BRAF和抗MEK联合用药过程中产生的药物抗性具有相关性。

结果

研究显示针对eIF4F复合物形成与3个机理中的一个相关：MAPK信号的再活化，抑制eIF4E结合蛋白4EBP1持续的ERK-非依赖性磷酸化，或增加pro-凋亡BMF依赖性eIF4G降解，开发了PLA原位方法检测临床病人样本中eIF4E-eIF4G的相互作用，显示与anti-BRAF治疗前的肿瘤相比，eIF4F复合物的形成比率在免疫应答的肿瘤中降低，在抗药性转移的肿瘤中复合物形成比率升高；更重要的是，通过干扰eIF4E-eIF4G相互作用或靶向eIF4A，能够抑制eIF4F复合物的形成，从而协同抑制BRAF(V600)，消除肿瘤细胞。

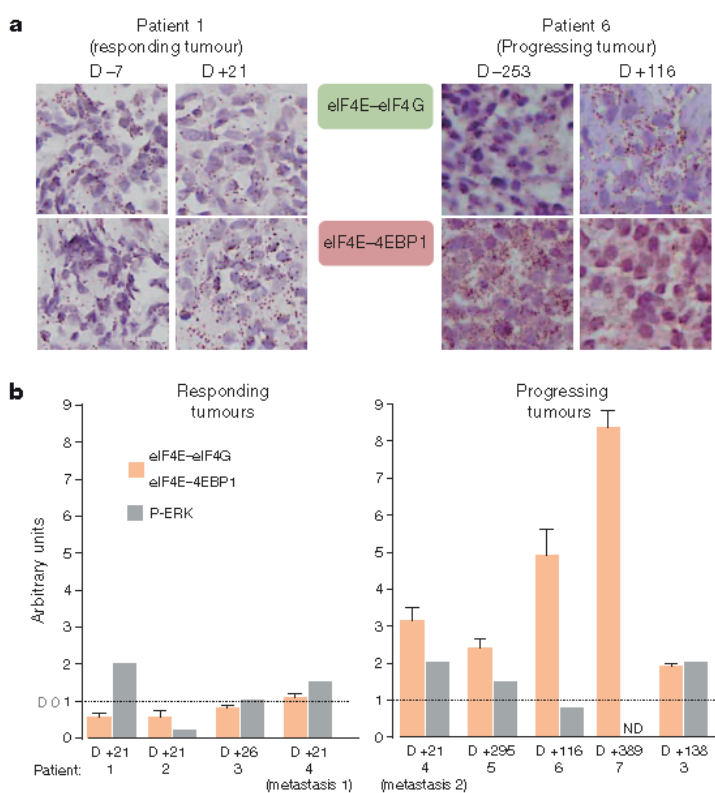
结论

eIF4F不仅能够作为先天 (innate) 和获得性 (acquired) 抗性的指示器，也能作为抗肿瘤治疗的靶标；靶向 BRAF (和/或 MEK) 和 eIF4F 的联合治疗能够克服大多数在BRAF(V600)-突变型肿瘤中不断增加的药物抗性。

图1:

病人组织样本中eIF4F复合物的形成。

a, PLA检测不同时间病人组织样本中eIF4E-eIF4G和eIF4E-4EBP1的相互作用。每个棕色的点状信号代表一个相互作用复合体。b, PLA定量显示复合物形成比率。



单细胞蛋白互动与翻译后修饰

Leuchowius, et al., Cytometry A. 75, 833–839 (2009). Flow Cytometric In Situ Proximity Ligation Analyses of Protein Interactions and Post-translational Modification of the Epidermal Growth Factor Receptor Family

背景

配体的刺激能够改变EGFR家族成员之间的相互作用，调节对细胞的反应。EGFR家族成员之间的相互作用能够为肿瘤的预后提供重要的信息，作为预后标志物。此外，针对临床样本开发新的高灵敏度和精确性的方法对于研究非修饰细胞的相互作用非常重要。

结果

原位PLA技术结合流式细胞仪能够在多种培养细胞中对EGFR与HER2的同源(homo-)和异源二聚体(heteromeric)相互作用定量检测，IF(免疫荧光)与流式结合无法进行二聚体定量的检测。此外，细胞在EGF刺激后，二聚化模式和磷酸化状态的变化，EGFR和HER2在不同的细胞系具有很大不同，但是二聚化数量并没有受到显著的影响。PLA对EGFR的激活能进行可视化研究，但是IF无法观察到EGFR的激活。PLA能成功的用于受体二聚化研究，在EGF受体家族成员的激活研究中具有高的选择性和灵敏度。

意义

PLA能成功的用于受体二聚化的可视化研究，与FCM的结合能在单细胞水平为蛋白相互作用和翻译后修饰提供更为强大的方法，能够为恶性肿瘤的治疗提供预后靶标。

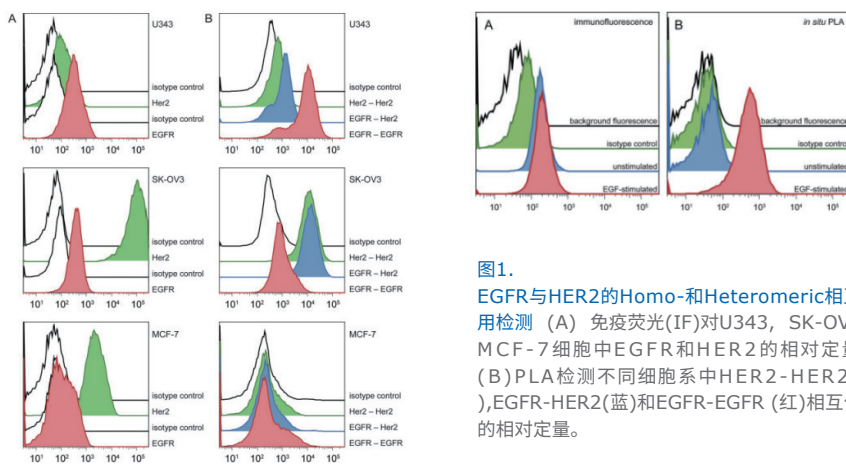


图1. EGFR与HER2的Homo-和Heteromeric相互作用检测 (A) 免疫荧光(IF)对U343, SK-OV3和MCF-7细胞中EGFR和HER2的相对定量。(B) PLA检测不同细胞系中HER2-HER2(绿), EGFR-HER2(蓝)和EGFR-EGFR(红)相互作用的相对定量。

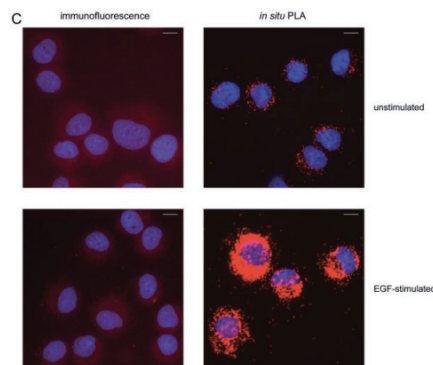


图2. EGF刺激后受体二聚化与EGFR磷酸化检测。比较磷酸化EGF受体IF检测(A)和PLA检测(B)。(C) 磷酸化修饰与受体二聚化具有直接相关性，IF和PLA检测磷酸化EGF受体。蓝色代表复染的细胞核。

高通量蛋白互作检测

——药物筛选和靶标验证

Leuchowius KJ; Jarvius M; etc. High content screening for inhibitors of protein interactions and post-translational modifications in primary cells by proximity ligation[J]. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2010, 9(1):178.

背景

在药物研发过程中很大的一个障碍是很多临床前筛选的药物由于在临床使用中达不到预期效果或由于严重的副作用导致药物无法获得批准，占据了很高的研发费用。虽然高通量的化合物筛选能显著提高药物的筛选能力，但并没有获得很高的成功率。因此，急需一种方法能够鉴定生物学相关复合物，在药物研发早期能更精确的预测体内效应。

结果

文章基于药物在信号通路中的效应开发了高通量的PLA筛选技术，通过前期鉴定的激酶抑制剂文库进行高通量筛选，包括6个临床使用的酪氨酸激酶抑制剂，PLA技术筛选在激活的原代人成纤维细胞中能够抑制PDGF受体信号通路的复合物，在80个复合物文库中发现13个能够作为潜在候选（hits），这些复合物的剂量效应检测显示具有很高的Z' factor(0.71)和信噪比(11.7)，具有很高的抑制特定信号通路的能力，此外与磷酸化PDGF受体的免疫荧光(IF)检测进行比较，显示PLA对受体磷酸化抑制效果的检测具有更高的检测效率。

结论

PLA药物高通量的细胞内原位检测，对抑制剂诱导的PDGF信号通路中蛋白相互作用进行准确定量，结果更真实，筛选效率更高，在药物开发中具有很高应用价值。

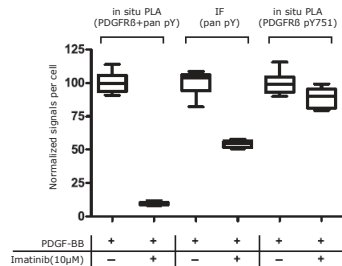


图1: 原位PLA与IF基础上PDGFR磷酸化检测的比较。原位PLA检测结果显示:Z' factor是0.71, 信噪比是11.6; IF基础上的检测Z' factors的 -3.1 和0.25 (达不到筛选目的)。Excellent(Z' factor >0.5); Poor (0 < Z' < 0.5); Unusable (Z' < 0)

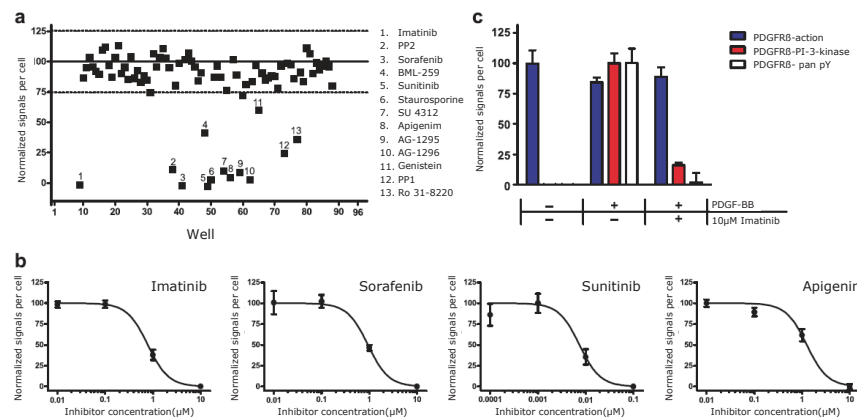


图2: 原位PLA基础上对激酶抑制剂文库的筛选和靶标验证。a, PLA对激酶抑制剂文库筛选化合物能够抑制人成纤维细胞中PDGFR磷酸化。b, 候选hits验证。c, 在刺激与非刺激细胞中，抑制剂imatinib在PDGFR与PI3K相互作用中的效应。

独特应用:

组织样本的 单细胞组蛋白修饰检测

Gomez D, Shankman L S, Nguyen A T, et al. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections[J]. Nature Methods, 2013, 10(2):171.

背景

ChIP为表观遗传学中最为重要的技术之一，能够让人们很好的理解组蛋白修饰在基因调控中的作用，但是无法在单细胞水平上进行研究。

结果

将PLA技术与原位杂交（ISH）技术联合起来开发出新的ISH-PLA技术，能够在石蜡切片的组织样本中对特定类型单细胞的特定基因位点的组蛋白修饰进行可视化研究，发现在人和小鼠的组织中MYH11位点的H3K4me2被限制在平滑肌细胞(SMC)中，这种修饰甚至在SMC的表型已发生变化的动脉粥样硬化损伤中始终存在。

意义

ISH-PLA能够准确，特异性的检测人和小鼠组织中单个细胞的特定基因位点的组蛋白修饰。该研究第一次在复杂的多种类型细胞存在完整组织样本中，细胞内源性水平鉴定了特定细胞和基因位点组蛋白修饰，显示在体内SMC细胞中MYH11基因H3K4me2的独特和重要的表观特征，表明PLA技术可以很方便适用于单细胞水平组蛋白修饰和多个基因位点的检测，在疾病研究或药物开发中对于复杂多细胞组织中的表观遗传学机理具有更广泛应用。

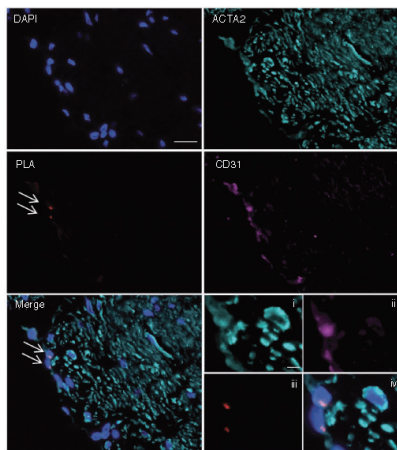


图1:
检测人颈动脉 MYH11启动子上H3K27me3修饰。箭头表示在CD31+ECs上MYH11H3K27me3的PLA信号(d, i-iv)更高的分辨率显示 ACTA2 (i), CD31 (ii), PLA (iii)和merge with DAPI (iv)。

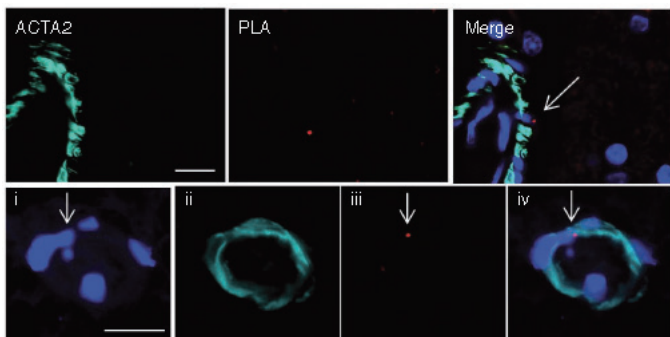


图2:
人脑组织通过ACTA2染色的MYH11 H3K4me2 PLA分析。箭头表示 MYH11 H3K4me2的PLA+ SMC信号。(e, i-iv)人脑组织小动脉分别在DAPI (i), ACTA2(ii), PLA(iii) and merge (iv)的展示。

Duolink® 高分文章举例

1. Fredriksson S, Dixon W, Ji H, Koong AC, Mindrinos M, et al. (2007) Multiplexed protein detection by proximity ligation for cancer biomarker validation. *Nat Methods* 4: 327-329.
2. Schallmeiner E, Oksanen E, Ericsson O, Spangberg L, Eriksson S, et al. (2007) Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays. *Nat Methods* 4: 135-137.
3. Gustafsdottir SM, Schlingemann J, Rada-Iglesias A, Schallmeiner E, Kamali-Moghaddam M, et al. (2007) In vitro analysis of DNA-protein interactions by proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3067-3072.
4. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, et al. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326: 289-293.
5. Yaffe E, Tanay A (2011) Probabilistic modeling of Hi-C contact maps eliminates systematic biases to characterize global chromosomal architecture. *Nat Genet* 43: 1059-1065.
6. Tavoosidana G, Ronquist G, Darmanis S, Yan J, Carlsson L, et al. (2011) Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8809-8814.
7. Moran SD, Woys AM, Buchanan LE, Bixby E, Decatur SM, et al. (2012) Two-dimensional IR spectroscopy and segmental ¹³C labeling reveals the domain structure of human gammaD-crystallin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3329-3334.
8. Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT, Owens GK (2013) Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods* 10: 171-177.
9. Nong RY, Wu D, Yan J, Hammond M, Gu GJ, et al. (2013) Solid-phase proximity ligation assays for individual or parallel protein analyses with readout via real-time PCR or sequencing. *Nat Protoc* 8: 1234-1248.
10. Selvaraj S, J RD, Bansal V, Ren B (2013) Whole-genome haplotype reconstruction using proximity-ligation and shotgun sequencing. *Nat Biotechnol* 31: 1111-1118.
11. Weibrecht I, Lundin E, Kiflemariam S, Mignardi M, Grundberg I, et al. (2013) In situ detection of individual mRNA molecules and protein complexes or post-translational modifications using padlock probes combined with the in situ proximity ligation assay. *Nat Protoc* 8: 355-372.
12. Moore KM, Thomas GJ, Duffy SW, Warwick J, Gabe R, et al. (2014) Therapeutic targeting of integrin alphavbeta6 in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 106.
13. Gao X, Hannoush RN (2014) Single-cell in situ imaging of palmitoylation in fatty-acylated proteins. *Nat Protoc* 9: 2607-2623.
14. de Vree PJ, de Wit E, Yilmaz M, van de Heijning M, Klous P, et al. (2014) Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nat Biotechnol* 32: 1019-1025.

Duolink® 高分文章举例

15. tom Dieck S, Kochen L, Hanus C, Heumuller M, Bartnik I, et al. (2015) Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. *Nat Methods* 12: 411-414.

16. Stott JB, Povstyan OV, Carr G, Barrese V, Greenwood IA (2015) G-protein betagamma subunits are positive regulators of Kv7.4 and native vascular Kv7 channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 6497-6502.

17. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, et al. (2015) An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov* 5: 1049-1057.

18. Bunse L, Schumacher T, Sahm F, Pusch S, Oezen I, et al. (2015) Proximity ligation assay evaluates IDH1R132H presentation in gliomas. *J Clin Invest* 125: 593-606.

19. Ramani V, Qiu R, Shendure J (2015) High-throughput determination of RNA structure by proximity ligation. *Nat Biotechnol* 33: 980-984.

20. Perez-Gomez E, Andradas C, Blasco-Benito S, Caffarel MM, Garcia-Taboada E, et al. (2015) Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 107: djv077.

21. Nagano T, Lubling Y, Yaffe E, Wingett SW, Dean W, et al. (2015) Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell. *Nat Protoc* 10: 1986-2003.

22. Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EW, Chen SY, et al. (2016) Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. *Nat Methods* 13: 269-275.

23. Wakle-Prabakaran M, Lorca RA, Ma X, Stamnes SJ, Amazu C, et al. (2016) BKCa channel regulates calcium oscillations induced by alpha-2-macroglobulin in human myometrial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E2335-2344.

24. Wu X, Schneider N, Platen A, Mitra I, Blazek M, et al. (2016) In situ characterization of the mTORC1 during adipogenesis of human adult stem cells on chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E4143-4150.

25. Reddy RJ, Gajadhar AS, Swenson EJ, Rothenberg DA, Curran TG, et al. (2016) Early signaling dynamics of the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 3114-3119.

26. Brown JA, Kinzig CG, DeGregorio SJ, Steitz JA (2016) Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 14013-14018.

27. Al Ghoulah I, Meijles DN, Mutchler S, Zhang Q, Sahoo S, et al. (2016) Binding of EBP50 to Nox organizing subunit p47phox is pivotal to cellular reactive species generation and altered vascular phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E5308-5317.

28. Drennan S, D'Avola A, Gao Y, Weigel C, Chrysostomou E, et al. (2017) IL-10 production by CLL cells is enhanced in the anergic IGHV mutated subset and associates with reduced DNA methylation of the IL10 locus. *Leukemia*.

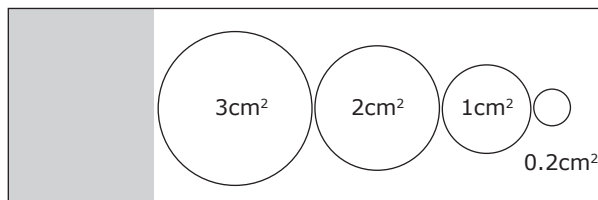
买家宝典

—— 成功之路从这里开始

每个细胞中，都有一个重大突破等待被发现。
成功，从拥有Duolink® PLA®试剂开始！
发现蛋白检测研究的无限可能
—— 全面的Duolink® PLA®产品线

Duolink® Starter 试剂盒 (30*次规格)	Duolink® PLA® 单组份试剂 (30或100次规格)	附属产品	Probemaker 自制PLA®探针试剂盒
完整的试剂盒，包括Duolink®实验的必需试剂（各组分均可单独订购）：	选择单组份试剂，灵活组合：	帮助获得更好实验结果的工具：	允许客户自制PLA®探针，满足更多实验需求：
<ul style="list-style-type: none"> • 一对正负PLA®探针 • 检测试剂 • 洗涤缓冲液 • 封片剂 	<ul style="list-style-type: none"> • 荧光标记的检测试剂：橘色、红色、远红外、绿色 • 酶标记的检测试剂 • 正负PLA®探针 	<ul style="list-style-type: none"> • 检测洗涤缓冲液 • 封片剂和抗淬灭剂 • 绝热块 • Imagetool分析软件 • PLA®一抗/抗体对 	<ul style="list-style-type: none"> • 正链探针制备 • 负链探针制备

*规格计算标准为每次反应体积40μl，实际可根据反应面积大小进行调整，但建议不得少于15μl
(0.2cm²=15μl, 1cm²=40μl, 2cm²=80μl, 3cm²=120μl)



订购信息

产品名称	产品描述	货号	规格
Starter kits – 完整试剂盒, 优化的组合			
Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit	含一对PLA® probe、红色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别小鼠和兔来源的一抗	DUO92101-1KT	30次
Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit	含一对PLA® probe、橘色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别小鼠和兔来源的一抗	DUO92102-1KT	30次
Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Goat	含一对PLA® probe、红色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别小鼠和山羊来源的一抗	DUO92103-1KT	30次
Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Goat	含一对PLA® probe、橘色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别小鼠和山羊来源的一抗	DUO92104-1KT	30次
Duolink® In Situ Red Starter Kit Goat/Rabbit	含一对PLA® probe、红色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别山羊和兔来源的一抗	DUO92105-1KT	30次
Duolink® In Situ Orange Starter Kit Goat/Rabbit	含一对PLA® probe、橘色荧光检测试剂、洗涤缓冲液和封片剂, 其中PLA® probe可识别山羊和兔来源的一抗	DUO92106-1KT	30次
Detection Reagents – 检测试剂单组份, 灵活选择, 打造个性化试剂盒			
Duolink® In Situ Detection Reagents Green	绿色荧光检测试剂, 荧光基团 $\lambda_{ex}=495$ nm, $\lambda_{em}=527$ nm, 可使用滤镜同Cy2或FITC	DUO92014-30RXN DUO92014-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ Detection Reagents Orange	桔色荧光检测试剂, 荧光基团 $\lambda_{ex}=554$ nm, $\lambda_{em}=579$ nm, 可使用滤镜同Cy3	DUO92007-30RXN DUO92007-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ Detection Reagents Red	红色荧光检测试剂, 荧光基团 $\lambda_{ex}=594$ nm, $\lambda_{em}=624$ nm, 可使用滤镜同Texas Red	DUO92008-30RXN DUO92008-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ Detection Reagents Far Red	远红外色荧光检测试剂, 荧光基团 $\lambda_{ex}=644$ nm, $\lambda_{em}=669$ nm, 可使用滤镜同Cy5	DUO92013-30RXN DUO92013-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ Detection Reagents Brightfield	明场检测试剂, HRP标记, 含核染试剂、NovaRED底物	DUO92012-30RXN DUO92012-100RXN	30次 100次
PLA® Probes – PLA®探针单组份, 灵活选择, 打造个性化试剂盒			
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Mouse PLUS	PLA® 正链探针, 可特异识别小鼠来源的一抗	DUO92001-30RXN DUO92001-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Rabbit PLUS	PLA® 正链探针, 可特异识别兔来源的一抗	DUO92002-30RXN DUO92002-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Goat PLUS	PLA® 正链探针, 可特异识别山羊来源的一抗	DUO92003-30RXN DUO92003-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Mouse MINUS	PLA® 负链探针, 可特异识别小鼠来源的一抗	DUO92004-30RXN DUO92004-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Rabbit MINUS	PLA® 负链探针, 可特异识别兔来源的一抗	DUO92005-30RXN DUO92005-100RXN	30次 100次
Duolink® In Situ PLA® probe anti-Goat MINUS	PLA® 负链探针, 可特异识别山羊来源的一抗	DUO92006-30RXN DUO92006-100RXN	30次 100次
Accessories – 附属产品, 确保更佳性能			
Duolink® In Situ Mounting Medium with DAPI	封片剂, 含DAPI, 荧光检测使用	DUO82040-5ML	
Duolink® In Situ Wash Buffer for Brightfield	洗涤缓冲液, 明场检测使用	DUO82047-4L DUO82047-20L	
Duolink® In Situ Wash Buffers for Fluorescence	洗涤缓冲液, 荧光检测使用	DUO82049-4L DUO82049-20L	
Duolink® In Situ Microplate Nuclear Stain and Anti-Fade	DAPI核染试剂和Anti-Fade防淬灭试剂	DUO82064-1KT DUO82065-1EA	
Duolink® In Situ Microplate Heat Transfer Block	绝热块, 多孔板检测时保持所有孔温度均衡	DUO90806-1EA	
Duolink® ImageTool	数据分析软件, 可进行单细胞信号分布等精确定量分析		
Probemaker – 自制PLA探针, 满足更多实验需求			
Duolink® In Situ Probemaker PLUS	包含正链探针、偶联试剂	DUO92009-1KT	
Duolink® In Situ Probemaker MINUS	包含负链探针、偶联试剂	DUO92010-1KT	

买家宝典

——成功的基本条件

“巧妇难为无米之炊”，如果手中无样品，一切都是空谈，而合格的细胞样品则离不开高品质的细胞培养系统。Merck提供超过20,000种工具助您获得一致的细胞培养环境，以确保实验结果的有效性和可靠性。我们全面的高品质产品组合包括血清、培养基、添加剂和冻存试剂，以及过滤装置、一般实验室耗材和特殊培养基。通过与ECACC等知名组织的合作，我们始终致力于为您的细胞培养准备、生长和分析环节提供高质量、一致的产品。

细胞冻存培养基和试剂

成功冻存和复苏细胞是细胞培养研究的重要方面，细胞低温储藏时防止冰晶形成是维持细胞活力的关键。Merck提供全面的经过无菌过滤和应用验证的低温保护剂，如DMSO、即用型细胞冻存培养基等，最大化维持细胞在冻融过程中的活力。

货号	品名
D2650	二甲基亚砜, 适合杂交瘤细胞
D2438	二甲基亚砜, 适合杂交瘤细胞
C6164	细胞冻存培养基-DMSO
C6039	细胞冻存培养基-甘油
C2639	无血清细胞冻存培养基
C9249	无DMSO细胞低温储藏培养基,成分限定,无动物源成分,可保护干细胞的分化能力

无菌过滤



Millex® 针头式滤器

特别适合处理小体积样品 (0.1-200mL)，例如抗生素或添加剂的过滤。Millex®以其综合优秀品质和稳定的质量长久以来作为行业金标被研究者广泛采用和信赖，成为无菌过滤环节的首选产品。4、13、25、33和50mm适合处理不同体积的样品。膜材质优秀，PES和PVDF膜过滤速度快而蛋白吸附损耗小。各种进口/出口接头设计，方便上下游配套。

货号	品名
SLGP033RB	Millex-GP 33mm PES 0.22µm Sterile 250/pk
SLHV033RB	Millex 33mm Durapore PVDF 0.45µm Sterile 250/pk



货号	品名
C3124	细胞低温储藏培养基CS2配方
C2999	细胞低温储藏培养基CS5配方
C2874	细胞低温储藏培养基CS10配方
C6295	DMSO无血清细胞冻存培养基
C9481	羧甲基纤维素钠, USP级别

经干细胞培养验证!



Stericup®和 Steritop®过滤装置

是最值得信赖的细胞培养基、缓冲液及试剂的无菌过滤工具，有150-1000mL规格，0.1µm(严格去除支原体)/0.22µm(除菌)/0.45µm(除颗粒)。PES膜比同类产品快50%以上，含血清培养基500mL用时90秒，过滤粘度大的样品时优势更明显。

货号	品名
SCGPT05RE	Steritop® 500mL PES 0.22µm 12/pk
SCGPT10RE	Steritop® 1000mL PES 0.22µm 12/pk
SCGPU05RE	Stericup® 500mL PES 0.22µm 12/pk
SCGPU11RE	Stericup® 1000mL PES 0.22µm 12/pk
SCVPU11RE	Stericup® 1000mL PES 0.10µm 12/pk

免疫细胞化学



Millicell® EZ细胞培养玻片

采用 EZSlide 培养小室与玻片一体化设计装置,细胞培养、固定、染色和观察全都在这个装置中完成,使这类操作被大大简化,变得十分方便。观察时您只需轻轻一掰,去除四个固定耳片的同时即可移除培养小室的边框,既不会造成玻片碎裂,细胞也绝不会受到损伤。

产品描述	目录号
Millicell® EZSLIDE (4-well, glass, 16/pk)	PEZGS0416
Millicell® EZSLIDE (4-well, glass, 96/pk)	PEZGS0496
Millicell® EZSLIDE (8-well, glass, 16/pk)	PEZGS0816
Millicell® EZSLIDE (8-well, glass, 96/pk)	PEZGS0896

细胞计数



Scepter™ 2.0手持式细胞计数器

- 库尔特原理对每个细胞精确计数, CV 低至 5%
- 14 秒快速完成自动计数
- 便携式设计,易于在超净台内操作
- 实时定量评估细胞健康状态
- 对复合样本(如外周血单个核细胞 PBMC)中亚细胞群分别计数
- 适合 3-36 μ m 细胞 / 颗粒精确计数

货号	品名
PHCC20040	Scepter™ 2.0 Cell Counter with 40 μ m Scepter™ sensors (50/pk)
PHCC20060	Scepter™ 2.0 Cell Counter with 60 μ m Scepter™ sensors (50/pk)

买家宝典

—— 相关产品推荐

传统IP/coIP

哺乳动物细胞表达载体

来自Oxford Genetics的表达载体提供多样性的选择,包括GFP, FLAG等标签,用于细胞内表达和蛋白相互作用研究。

标签纯化

通过标签亲和纯化是获得纯净重组蛋白和蛋白互作复合物的有效方法。FLAG标签因其诸多优点而成为coIP和pulldown的最佳选择。默克也提供众多其它标签纯化的选择。新型亲和磁珠更有利于降低背景和多样品操作。



货号	品名
A2220 (5mL 等多种包装)	ANTI-FLAG® M2 AFFINITY GEL
M8823-1/5ML	Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads
F2426	EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel
F4799	3X FLAG® Peptide
G4510-SPEC	Glutathione-Agarose
A7470-1ML	Anti-c-Myc Agarose Affinity Gel
A2095-5X1ML	Monoclonal Anti-HA Agarose
5893801001	cComplete™ His-Tag Purification Resin
11641778001	STREPTAVIDIN MAGNETIC PARTICLES, 10 ML
A7345-1ML	Anti-V5 Agarose Affinity Gel

细胞裂解

汇集Roche和Sigma最好用的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物,确保蛋白完整性和磷酸化状态,使数据稳定,可信。配合细胞裂解液使用,非常方便。



货号	品名
4693132001	cComplete Protease Inhibitor, EDTA-free (铝箔装, 50ml/片)
5056489001	cComplete Protease Inhibitor, EDTA-free (50ml/片)
4906837001	PhosSTOP, 20 TABLETS (铝箔装, 10ml/片)
P8340-5ML	Protease Inhibitor (液体浓缩型)
R0278-50/500ML	RIPA BUFFER

Protein A/G, 磁珠磁力架

IP/coIP中用于抗体纯化的Protein A和Protein G也有琼脂糖珠和磁珠形式。方便的可拆卸磁力架也成为IP/coIP中的常用工具。



货号	品名
16-266	PROTEIN G AGAROSE FAST FLOW 10mL
11243233001	Protein G Agarose
16-156	PROTEIN A AGAROSE FAST FLOW 10mL
11134515001	Protein A Agarose
LSKMAGS08	PureProteome Magnetic Stand, 8 well

买家宝典

——成功的必要条件

Duolink®实验要得到高质量的结果，抗体的选择十分重要。默克旗下的Sigma品牌结合自身的经验，为广大科研用户精选出一些PLA®验证抗体及抗体对，帮助实验者获得更好的结果。

畅销PLA®验证抗体及抗体对

品名	物种来源	基因/靶点	应用	货号
Rabbit anti-53BP1 Antibody	Rabbit	Rabbit	PLA,WB	PLA0077-100UL
Goat anti-53BP1 Antibody	Goat	Goat	IP,PLA	PLA0303-100UL
Rabbit anti-Phospho 53BP1 (S25) Antibody	Rabbit	Rabbit	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0126-100UL
Goat anti-ATM Antibody	Goat	Goat	IP,PLA,WB	PLA0045-100UL
Rabbit anti-ATM Antibody	Rabbit	ATM	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0086-100UL
Rabbit anti-BAP1 Antibody	Rabbit	BAP1	IP,PLA,WB	PLA0248-100UL
Rabbit anti-BRCA1 Antibody	Rabbit	BRCA1	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0185-100UL
Rabbit anti-Chk1 Antibody	Rabbit	Chk1	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0085-100UL
Rabbit anti-Chk2 Antibody	Rabbit	Chk2	IP,PLA	PLA0122-100UL
Rabbit anti-E2F1 Antibody	Rabbit	E2F1	IP,PLA,WB	PLA0139-100UL
Rabbit anti-HIF1-alpha Antibody	Rabbit	HIF1-alpha	IP,PLA,WB	PLA0081-100UL
Rabbit anti-mTOR Antibody	Rabbit	mTOR	IP,PLA,IF	PLA0114-100UL
Rabbit anti-c-myc Antibody	Rabbit	c-myc	IP,PLA,WB,ELISA	PLA0001-100UG
Rabbit anti-p300 Antibody	Rabbit	p300	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0096-100UL
Rabbit anti-p53 Antibody	Rabbit	p53	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0072-100UL
Rabbit anti-PCNA Antibody	Rabbit	PCNA	IP,PLA,WB,IF,IHC,FASC	PLA0079-100UL
Rabbit anti-RNA Polymerase II Antibody	Rabbit	RNA polymerase II	IP,PLA,WB	PLA0127-100UL
Goat anti-RNA Polymerase II Antibody	Goat	RNA polymerase II	IP,PLA,WB	PLA0292-100UL
Rabbit anti-PSF/SFPQ Antibody	Rabbit	PSF/SFPQ	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0181-100UL
Rabbit anti-PTEN Antibody	Rabbit	PTEN	IP,PLA,WB,IF,IHC	PLA0133-100UL
Rabbit anti-Vimentin Antibody	Rabbit	Vimentin	PLA,WB,IF,IHC	PLA0199-100UL
p53 and SP1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	P53/SP1	Direct PLA	PLAK0184-1KT
53BP1 and p53 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	P53/53BP1	Direct PLA	PLAK0311-1KT
EGFR and p53 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	P53/EGFR	Direct PLA	PLAK0314-1KT
BRCA1 and p53 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	P53/BRCA1	Direct PLA	PLAK0318-1KT
p53 and STUB1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	P53/STUB1	Direct PLA	PLAK0812-1KT
p300 and SRC2 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	SRC2/P300	Direct PLA	PLAK0444-1KT
p300 and SP1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	SP1/P300	Direct PLA	PLAK0185-1KT
53BP1 and CHK1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	53BP1/CHK1	Direct PLA	PLAK0396-1KT
53BP1 and E2F1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	53BP1/E2F1	Direct PLA	PLAK0627-1KT
BRCA1 and E2F1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	E2F1/BRCA1	Direct PLA	PLAK0628-1KT
c-Abl and STUB1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	C-ABL/STUB1	Direct PLA	PLAK0814-1KT
c-Abl and c-Abl PLA® Antibody Kit	Rabbit/Rabbit	C-ABL/C-ABL	Direct PLA	PLAK0836-1KT
RAD17 and p53 PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	P53/RAD17	Indirect PLA	PLAK0304-1KT
53BP1 and p53 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	P53/53BP1	Indirect PLA	PLAK0335-1KT
MEN1 and c-MYC PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	c-MYC/MEN1	Indirect PLA	PLAK0001-1KT
HIF1-alpha and c-MYC PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	c-MYC/HIF1-α	Indirect PLA	PLAK0012-1KT
SP1 and c-MYC PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	c-MYC/SP1	Indirect PLA	PLAK0014-1KT
MCM7 and CDC25A PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	CDC25A/MCM7	Indirect PLA	PLAK0111-1KT
RAD17 and CDC25A PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	CDC25A/RAD17	Indirect PLA	PLAK0112-1KT
RENT1 and ROCK2 PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	RENT1/ROCK2	Indirect PLA	PLAK0078-1KT
HdmX and KPNA3 PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	HDMX/KPNA3	Indirect PLA	PLAK0824-1KT
MCM2 and HIF1-alpha PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	HIF1-α/MCM2	Indirect PLA	PLAK0380-1KT
MCM7 and HIF1-alpha PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	MCM7/HIF1-α	Indirect PLA	PLAK0382-1KT
GAPDH and HIF1-alpha PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	HIF1-α/GAPDH	Indirect PLA	PLAK0383-1KT
HIF1-alpha and ERK1 PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	HIF1-α/ERK1	Indirect PLA	PLAK0926-1KT
HIF1-alpha and ERK2 PLA® Antibody Kit	Goat/Rabbit	HIF1-α/ERK2	Indirect PLA	PLAK0929-1KT
HIF1-alpha and SRC2 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Goat	SRC2/HIF1-α	Indirect PLA	PLAK0446-1KT
Rictor and SIN1 PLA® Antibody Kit	Rabbit/Mouse	RICTOR/SIN1	Indirect PLA	PLAK0686-1KT
Rictor and mTOR PLA® Antibody Kit	Rabbit/Mouse	RICTOR/Mtor	Indirect PLA	PLAK0519-1KT

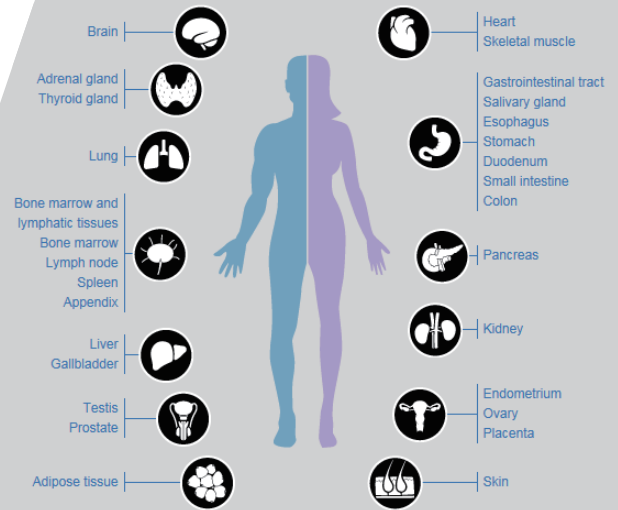
更多PLA®抗体及抗体对，请查询 sigma.com/duolinkpla

HPA金标抗体

人类蛋白质组学研究指定抗体， 700多张实验验证图片确保 更好的结果

除了已经验证过的PLA®抗体适用于Duolink®实验外，HPA金标抗体也是Duolink®实验很好的选择。提到HPA金标抗体，我们还要从人类蛋白质组学计划说起。该项目始于2003年，由瑞典和欧盟投资，旨在利用基于抗体的蛋白质组学技术，来探索人体蛋白在组织和细胞中的分布。由于该项目急需大量的抗体，而市面上抗体的质量让HPA科学家十分担忧。HPA项目共检测了来自29家公司的9000余种抗体，结果发现一半的抗体无法在WB或IHC实验中正常工作。

因此，HPA投入大量精力自主研发和生产抗体，以确保抗体批次稳定性和实验的可重复性。每支抗体提供700张IHC、IF和WB图片，目前HPA公共数据库已收录了1300万张组织和细胞的IHC/IF/WB的实验图片。这些被HPA自主研发、生产，并用于HPA项目中的抗体被称为“HPA金标抗体”。



HPA金标抗体 能为你的实验带来什么？

- 高特异性的实验结果：金标抗体均通过严格抗原序列比对筛选，保证反应的高特异性。
- 丰富的实验验证图片：每一支金标抗体都提供700张IHC、WB和IF的实验验证图片。
- 严谨的参考文献和生物信息学预测：每一支金标抗体除了实验验证，发表文献和生物信息学预测也是抗体的重要参数。
- 更方便的查询实验数据：每一支金标抗体实验验证结果都可以在the Human Protein Atlas (proteintatlas.org) 网站上免费公开查询，包括免疫IHC，WB和IF的图片数据。
- 实验数据真实可靠：HPA金标抗体由HPA项目自主研发、生产和使用的抗体，验证数据更有公信力。



HPA抗体快速查询及订购通道：

- ✓ 现场订购：联系默克公司当地销售代表
- ✓ 网络订购：访问网站 sigma.com/prestige
- ✓ 电话订购：800-819-3336（固话），400-620-3333（手机）
- ✓ Email订购：orderCN@sial.com



上海

上海市浦东新区张江高科
晨晖路88号二号楼2楼
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 201203

北京

北京市朝阳区曙光西里甲5号
凤凰置地广场A座写字楼18层
电话: (010)59898600
传真: (010)57623560
邮编: 100028

广州

广州市黄埔大道西638号
富力科讯大厦803A室
电话: (020) 37883048
传真: (020) 37883072
邮编: 510627

成都

成都市锦江区东大街芷泉街
东方广场C座11楼7号
电话: (028)85288550
传真: (028)85288553
邮编: 610061

本资料中所有内容（包括但不限于产品图片、公司logo等）为德国默克集团所有，未经允许，任何人或实体不得擅自使用或转载。

更多详情，敬请登陆：www.sigama.com/duolink 客服/订购热线：800-819-3336（固话）400-620-3333（手机） 客服/订购 Email: orderCN@sial.com

Sigma办公室地址：上海市淮海中路1010号嘉华中心41层