

PolyamineRED® <Intracellular Polyamine Detection Reagent>

商品コード FDV-0020

※本商品は研究用です。研究用以外には使用できません。

商品背景

プトレシン (putrescine; Put), スペルミジン (spermidine; Spd), スペルミン (spermine; Spm) などとそのアセチル化誘導体を含むポリアミン類 (図 1) は 2 個以上のアミノ基を持つ直鎖アルキル構造を有しています。ポリアミンは、細胞内にサブ-mM~mM の高濃度であらゆるの生物に存在すると考えられています。ポリアミンはポリカチオン性を持ち、非常に多くの生物学的機能を有しています。例えば、ポリアミンは核内の DNA および RNA と相互作用し、遺伝子発現を制御します。また、ポリアミンは負に帯電したタンパク質と相互作用し、その機能を制御します。ポリアミンの主な供給源はアミノ酸の一種であるオルニチンで、哺乳類の場合、オルニチンはオルニチン脱炭酸酵素 (Ornithine decarboxylase; ODC) によりプトレシンに変換され、その後スペルミジン、スペルミンが合成されます。ODC はがん細胞で高発現しているため、ポリアミンもがんマーカーの一つと考えられています。ポリアミンの検出法はこれまでいくつか開発されていますが、その多くはポリアミン標準化合物を用いた HPLC によるスループットの低い分析方法が一般的となっています。ポリアミンの細胞内における生物学的機能を明らかにするために、簡便かつハイスループットな細胞ベースのアッセイ法が望まれていました。

PolyamineRED®は、前処理や細胞溶解を必要としない、世界初の細胞内ポリアミン検出用試薬です。PolyamineRED®は、TAMRA (テトラメチルローダミン) を結合させたグリシンプロパギルエステル誘導体で、直鎖の一級アルキルアミンに特異的に反応し、二級アミンやアミノ酸やモノアミンには反応しません。PolyamineRED®は細胞膜透過性を持ち、細胞内のポリアミンと特異的に反応し、ポリアミンを赤色蛍光色素 TAMRA で標識します (図 2)。

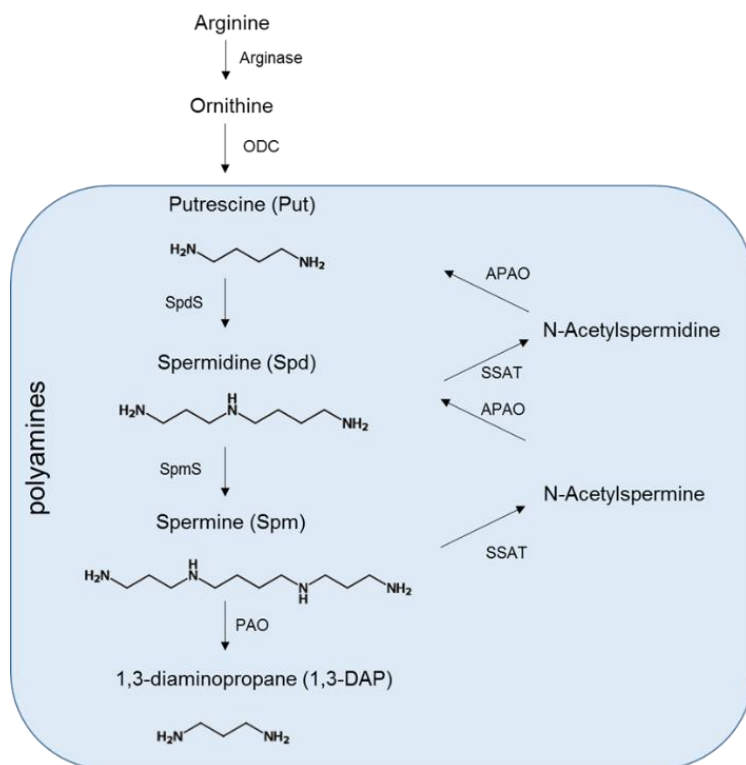


図 1 主要なポリアミン類と代謝経路

商品情報

商品コード: FDV-0020

包装サイズ: 0.5 mg

分子量: 611 g/mol

溶解性: DMSO に可溶

蛍光色素: TAMRA (赤色蛍光色素) を標識します。

蛍光特性: 励起 560 nm / 蛍光 585 nm

*一般的な TAMRA の検出条件や

フィルターセットが利用できます。

溶解方法と保存方法

溶解方法: 1 mM/100% DMSO を推奨

保存温度 (溶解前): -20°C で保管

(溶解後): DMSO 溶液として調製後は小分注し遮光条件下 -20 °C で保管

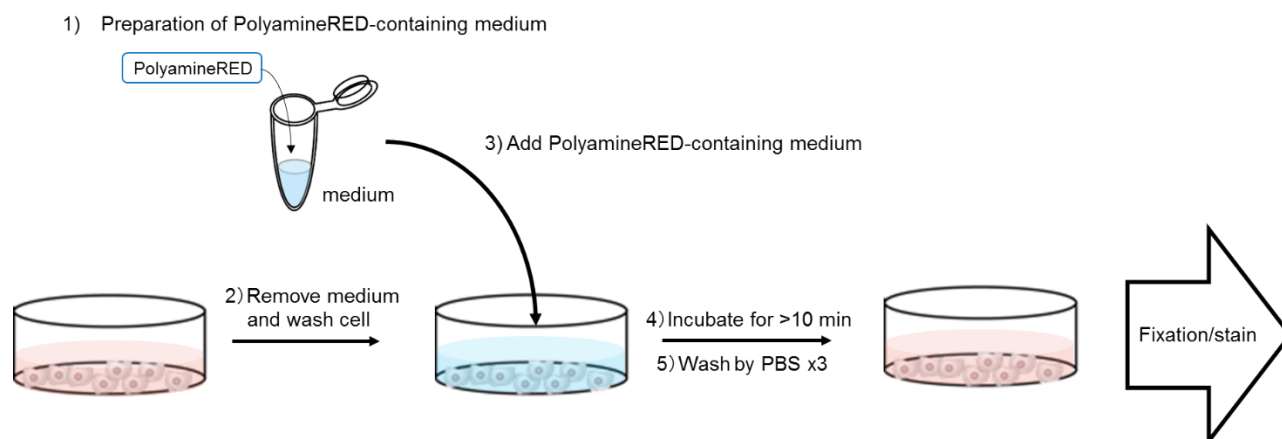
凍結融解の繰り返しは避け、小分注品の使い切りを推奨

使用方法

細胞内ポリアミン検出方法の一例

*このプロトコールは細胞ベースでの検出法の一例です。

1. 無血清培地に PolyamineRED® を終濃度 10~30μM で添加する。
2. 培養培地を除去して、PBS で 2 回細胞を洗浄し、PolyamineRED® 含有培地を細胞に添加する。
3. 10 分以上細胞を培養する。
4. 細胞を PBS で 3 回洗浄する。
5. パラホルムアルデヒドで細胞を固定する。(オプション)
注意: メタノール固定は使用できません。ホルムアルデヒドによる細胞固定を実施して下さい。
6. DAPI 染色や対象因子の抗体による免疫染色など追加の染色も可能です。



参考データ

グリシンプロパギルエステルのポリアミン特異性

ベンジルオキシカルボニルグリシンプロパギルエステルをモデル分子として、各種生体アミンと反応させた。モノアミンの一種であるエピネフリンやアミノ酸の一種であるリシンの反応物はほとんど検出されなかった。一方で、ポリアミンとは高効率で反応し、その反応性はポリアミンの長さに依存し、スperlミン（アミノ基数 4）、スperlミジン（アミノ基数 3）からはポリアミンが 2 つ結合した付加体も検出された。

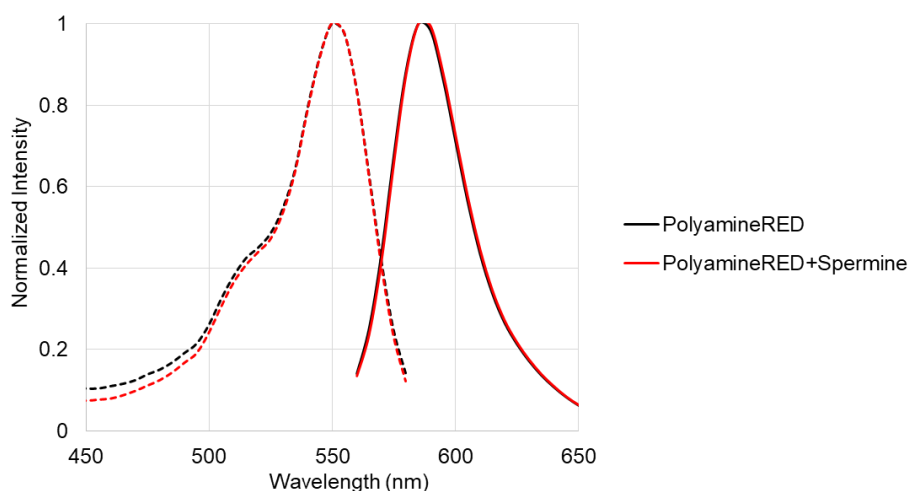
表 グリシンプロパギルエステルの生体アミンに対する選択性

アミン名	反応物			加水分解生成物	非反応物
	合計	付加数 1	付加数 2		
スperlミン	82%	59%	23%	17%	1%
スperlミジン	78%	67%	11%	21%	1%
プトレシン	66%	66%	<1%	22%	7%
エピネフリン	<1%	<1%	<1%	7%	92%
リシン	2%	2%	<1%	6%	85%

注：本データは参考文献 1 より引用したものです。

PolyamineRED®の吸収・蛍光スペクトル

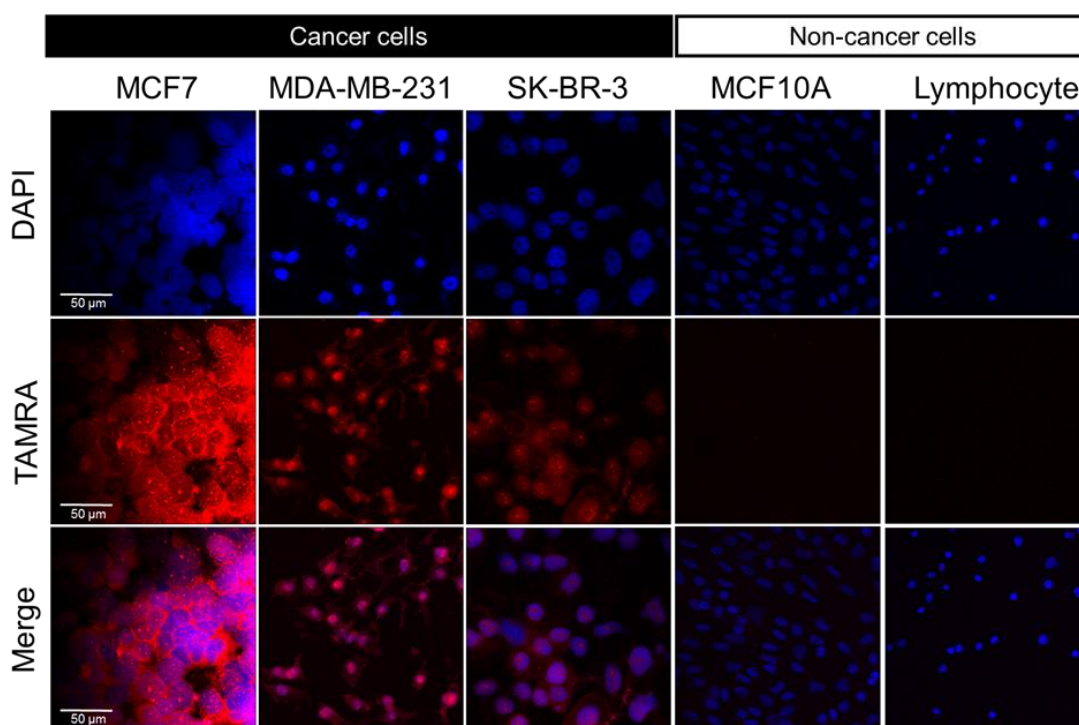
PBS 中における PolyamineRED®単体（黒）およびスperlミンを前処理した PolyamineRED®（赤）吸収スペクトルを点線、蛍光スペクトルを実線で示す。PolyamineRED®はポリアミンの反応前後でほとんどスペクトルに変化がないことが分かる。



アプリケーションデータ

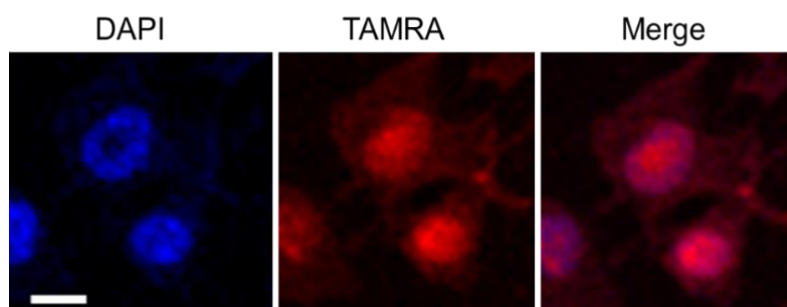
蛍光顕微鏡観察によるがん細胞および非がん細胞のポリアミン検出

3 種のがん細胞株（MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3）と 2 種の非がん細胞（MCF10A, ヒトリンパ球）を 30 μ M PolyamineRED[®] で 10 分間処理した。インキュベーション後, 細胞を PBS で 3 回洗浄し, その後 DAPI 染色とホルマリン固定を行った。画像は, TAMRA については Ex/Em=560 nm/585 nm で、DAPI については Ex/Em=358 nm/461 nm で取得した。TAMRA の蛍光は、がん細胞株で検出された。一方、本観察条件下においては非がん細胞株では、ほとんど蛍光が検出されなかった。



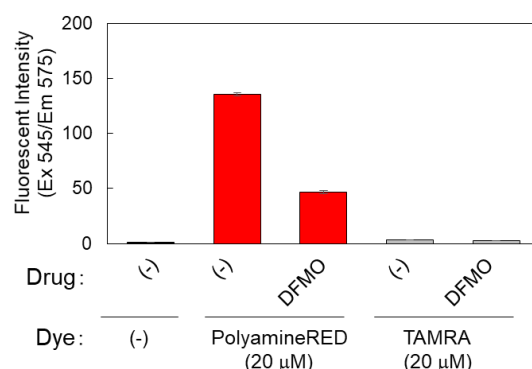
MDA-MB-231 がん細胞でのポリアミンの細胞内局在の評価

MDA-MB-231 細胞を 30 μ M PolyamineRED[®] で 10 分間処理した。インキュベーション後, 細胞を PBS で 3 回洗浄し, その後 DAPI 染色とホルマリン固定を行った。画像は, TAMRA については Ex/Em=560 nm/585 nm で、DAPI については Ex/Em=358 nm/461 nm で取得した。TAMRA の主要な蛍光シグナルは核から検出された。このことは、MDA-MB-231 のポリアミンは主に核に局在していることを示している。



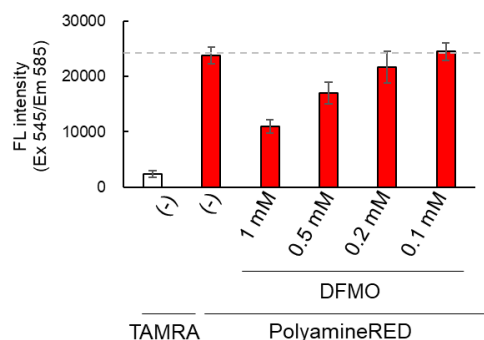
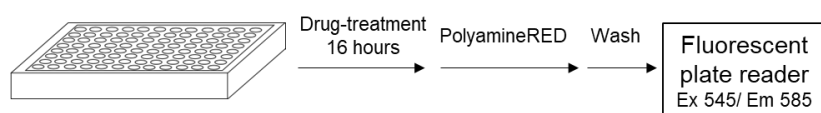
PolyamineRED®処理細胞の細胞ライセートにおける検出

786-O 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、1 日培養したのち、コンフルエント条件下で無血清 DMEM 培地中にオルニチン合成酵素阻害物質 DFMO (1 mM) を添加し 16 時間処理した。そこに終濃度 20 μ M PolyamineRED®または TAMRA (ネガティブコントロール) を追添加し、4 時間反応させた。細胞を PBS で 3 回洗浄後、1% SDS を含む PBS を添加し、細胞ライセートを調製した。各細胞ライセートを蛍光分光光度計で蛍光強度 (Ex 540 \pm 10 / Em 585 \pm 20) を測定した。PolyamineRED®を処理した細胞ライセートの蛍光強度はネガティブコントロールとして実施した TAMRA 処理細胞ライセートに比べて顕著に優位であり、蛍光プレートリーダーでも十分な特異的シグナルが検出できた。また、DFMO により大きくシグナルが減衰したため、ポリアミンの生合成が抑えられたことがわかる。



蛍光プレートリーダーによるハイスループット検出系

786-O 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、1 日培養したのち、コンフルエント条件下でオルニチン合成酵素阻害物質 DFMO をフェノールレッド不含 DMEM 培地中に添加し 16 時間処理した。そこに終濃度 10 μ M PolyamineRED®または TAMRA (ネガティブコントロール) を追添加し、4 時間反応させた。細胞を PBS で 3 回洗浄後、新しい PBS を添加し、蛍光プレートリーダー (透過型測定) で蛍光強度 (Ex 545 \pm 5 / Em 585 \pm 10) を測定した。PolyamineRED を処理した細胞の蛍光強度は、ネガティブコントロールとして実施した TAMRA に比べて顕著に優位であり、蛍光プレートリーダーでも十分な特異的シグナルが検出できた。このシグナルは DFMO 処理で濃度依存的に阻害されることがわかった。



参考文献

1. K. Vong, K. et. al., *Chem. Commun.*, **52**, 8403 (2017). Cancer cell targeting driven by selective polyamine reactivity with glycine propargyl esters.

免責事項

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2018年6月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル（以下、商品資料）を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。

PolyamineRED™ <Intracellular Polyamine Detection Reagent>

Catalog NO. FDV-0020

Research use only, not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

日本語版はこちらから
ダウンロードできます。
①弊社ウェブサイトより
Webページ番号検索にて
【70873】で検索



Product Background

The polyamine species (Figure 1), including putrescine, spermidine and spermine etc. and its acetyl derivatives, are one of the essential class of metabolites which have linear alkyl structure with two or more amines. Polyamines are found in all living organisms with high concentration, from sub-millimolar to millimolar, in the cells. Polyamines have polycationic properties and shows an enormous number of biological functions. For example, polyamines interact with DNA/RNA in the nuclear and regulate gene expression. Polyamines also interact with negatively charged proteins and control its function. The major source of polyamines is an amino acid ornithine. In the case of mammalian, ornithine is converted to putrescine by ornithine decarboxylase (ODC), followed by synthesizing spermidine and spermine. Because ODC is highly expressed in cancer cells, polyamines are considered as one of the cancer marker. Several detection methods of polyamines are developed to date but most of the methods are commonly low-throughput systems using HPLC with polyamine standard compounds. To clear biological functions of polyamines in the cells, the cell-based assay with easy- and high-throughput-procedures is desired.

PolyamineRED™ is the world's first reagent for detecting intracellular polyamines without any pre-treatment and cell lysis. PolyamineRED™ is a TAMRA (tetramethylrhodamine)-conjugated derivative of glycine propargyl ester which specifically reacts with linear primary alkylamine but not react with secondary amines, bulky amines including amino acids nor monoamines. PolyamineRED™ has cell-penetrating properties, specifically reacts with polyamines inside the cells and labelled polyamines with red fluorescent dye TAMRA. (Figure 2).

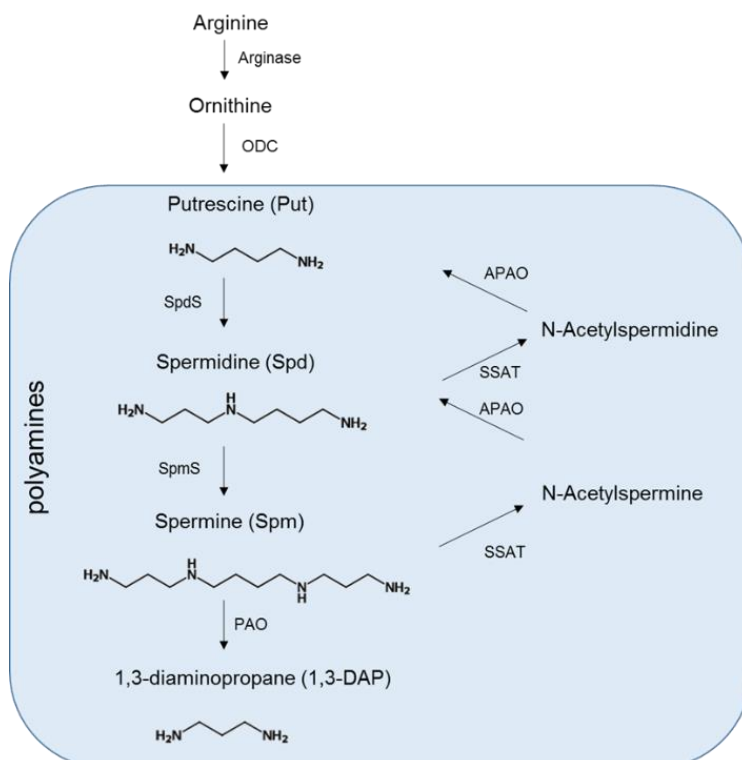


Figure 1. Major polyamine species

Description

Catalog Number: FDV-0020

Size : 0.5 mg

Molecular weight : 611 g/mol

Solubility : Soluble in DMSO

Fluorophore : TAMRA

(red fluorescent dye)

Ex/Em: 560 nm/585 nm

*TAMRA filter sets are available.

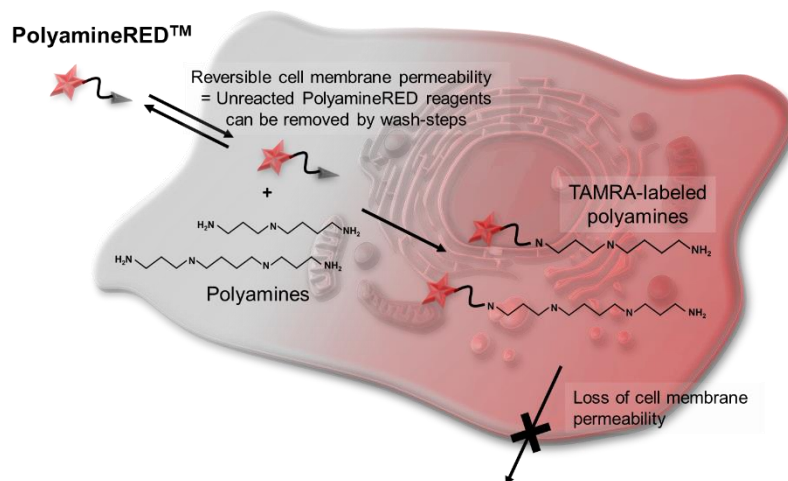


Figure 2. Principle of PolyamineRED

Reconstitution and Storage

Reconstitution : stock solution in 100% DMSO.

Storage (solution) :

Store powder at -20°C.

After reconstitution in DMSO, aliquot and store at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

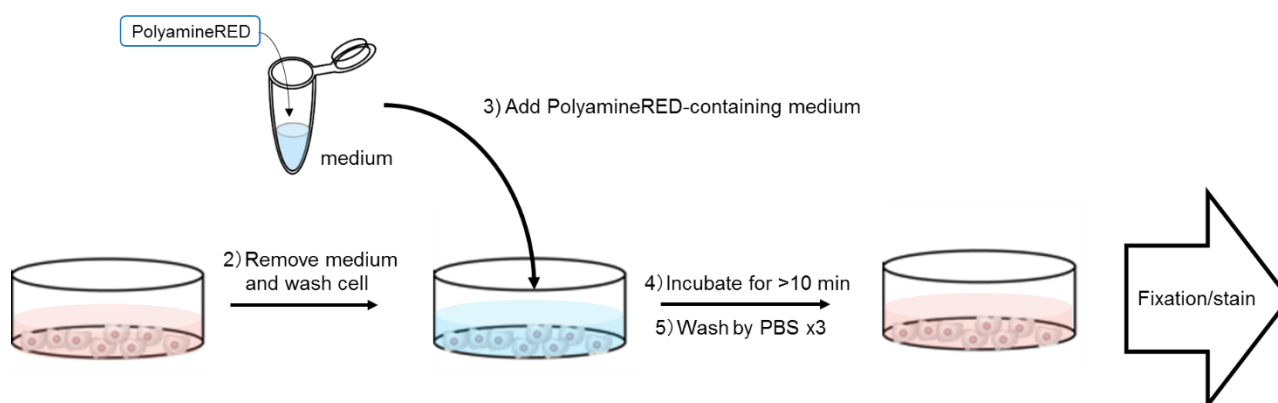
Protect from light.

How to use

General procedure of detection of intracellular polyamines

1. Prepare 10-30 μM PolyamineRED™ in fresh medium
 2. Remove culture medium, wash cells by PBS twice and add PolyamineRED™ -containing medium to cells
 3. Culture cells for at least 10 min
 4. Wash cells with PBS 3 times
 5. Fixed cells with paraformaldehyde (Option)
- Note: MeOH-fixation is not available. Please fix cells by formaldehyde.
6. Additional staining such as DAPI staining or immunocytochemistry with antibodies of interest are available.

1) Preparation of PolyamineRED-containing medium



Reference data

Selectivity of glycine propargyl ester to polyamines

Benzyloxycarbonyl glycine propargyl ester as a model molecule was selectively reacted with polyamines. Reactant of epinephrine, an example of monoamine, and lysine, an example of amino acid, were rarely detected. Reactivity for polyamines depends on the length of polyamine and double linkage products were observed from spermine (4 amino groups) and spermidine (3 amino groups).

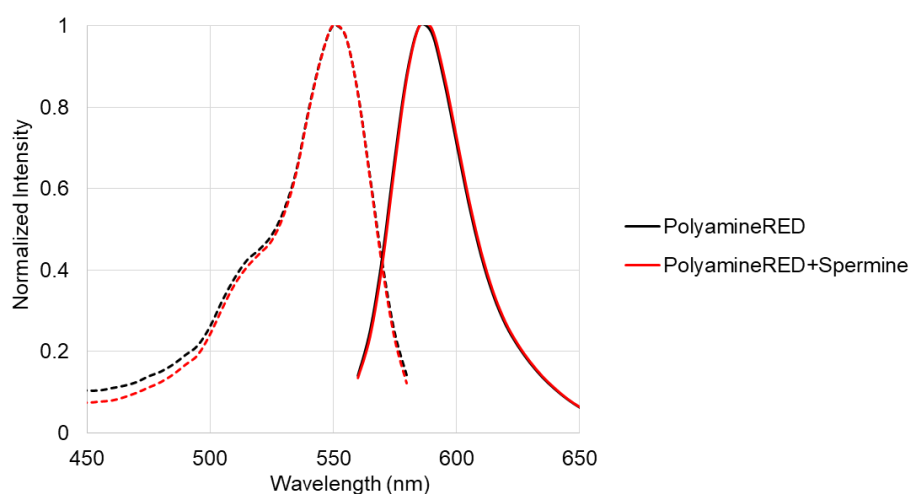
Table Selectivity of glycine propargyl ester to biological amines

amine	Reaction products			Hydrolysis product	Non reacted product
	Total	Single linkage	Double Linkage		
Spermine	82%	59%	23%	17%	1%
Spermidine	78%	67%	11%	21%	1%
Putrescine	66%	66%	<1%	22%	7%
Epinephrine	<1%	<1%	<1%	7%	92%
Lysine	2%	2%	<1%	6%	85%

*This data was cited from Ref.1

Absorption and Fluorescent spectrum of PolyamineRED™

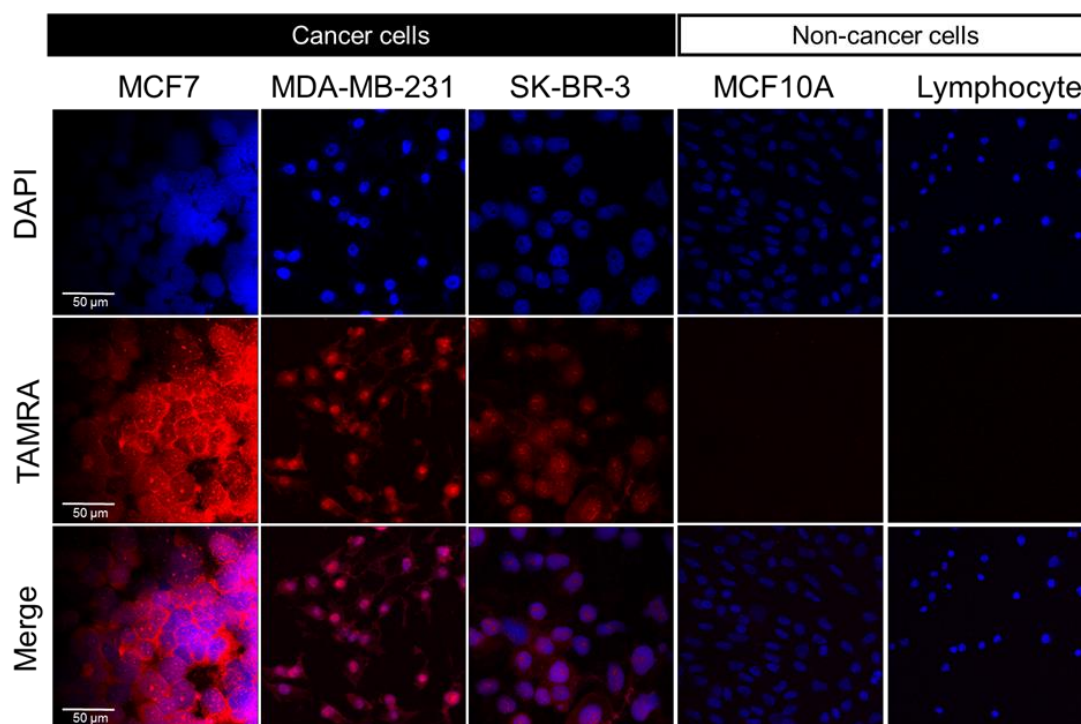
Absorption (dash line) and emission (solid line) of PolyamineRED™ (Black) and PolyamineRED™ with spermine (Red) in PBS.



Application data

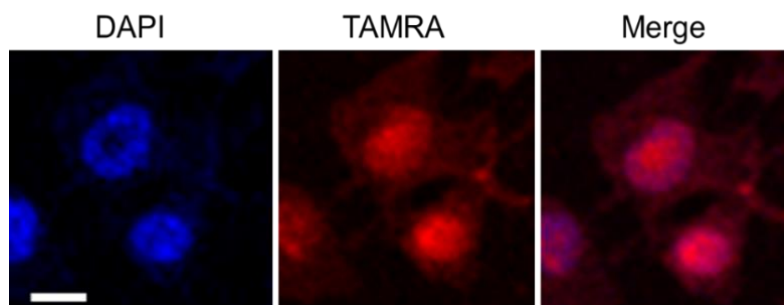
Polyamine imaging in both cancer and non-cancer cells by PolyamineRED™

Three cancer cell lines (MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3) and two non-cancer cells (MCF10A and human lymphocyte) were treated with 30 μ M of PolyamineRED™ for 10 min. After incubation, cells were washed three times by PBS, followed by DAPI staining and formalin fixation. Images were obtained at Ex/Em=560 nm/585 nm for TAMRA and at Ex/Em=358 nm/461 nm for DAPI. TAMRA fluorescence was detected in cancer cell lines. On the other hand, incubation with non-cancer cell lines showed little fluorescence.



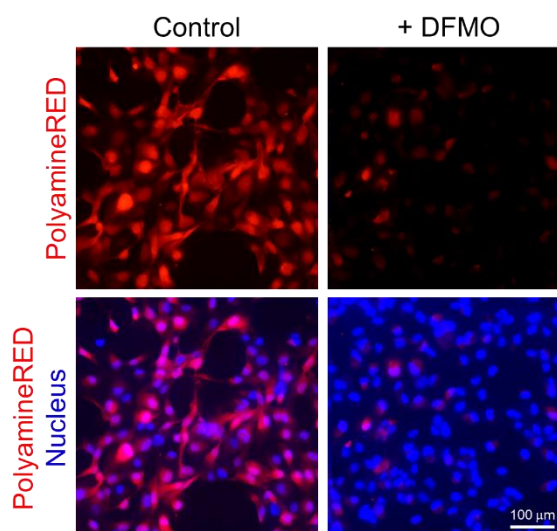
Evaluation of intracellular distribution of polyamines in MDA-MB-231 cancer cell lines

MDA-MB-231 cells were treated with 30 μ M of PolyamineRED™ for 10 min. After incubation, cells were washed three times by PBS, followed by DAPI-staining and formalin fixation. Images were obtained at Ex/Em=560 nm/585 nm for TAMRA and at Ex/Em=358 nm/461 nm for DAPI. Major TAMRA fluorescent signal was detected from nuclear. This indicates polyamines in MDA-MB-231 are mainly localized in nuclear.



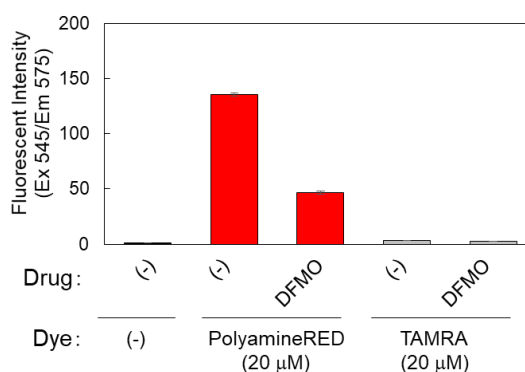
Evaluation of effect of ODC inhibitor on polyamine biosynthesis in renal cancer cell lines

A renal cancer cell line 786-O cells were seeded in 3.5 cm glass bottom dishes and cultured in 10% FBS/DMEM for 1 day. Then, cells were treated with 1 mM DFMO (an ODC inhibitor) or 1% DMSO (negative control) in serum-free DMEM for 20 hours. After wash cells with HBS twice, the cells were stained with 10 μ M PolyamineREDTM and 1 μ M Hoechst 33342 in HBS for 1 hour. The cells were washed with HBS 3 times and observed by epi-fluorescent microscopy under live cell condition (Ex.510-560 nm/Em. 590- nm). DFMO-treated cells showed weaker signal of PolyamineREDTM than control cells. This result indicates that DFMO inhibits polyamine biosynthesis.



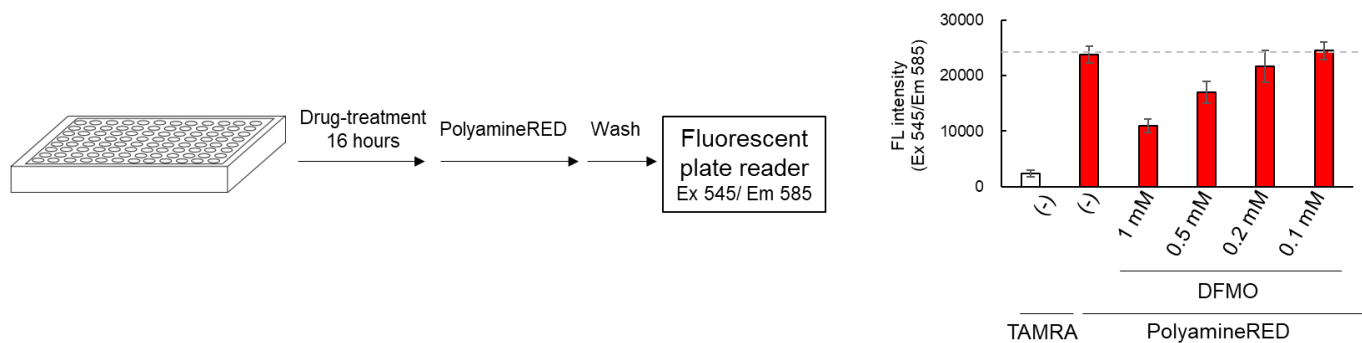
Detection of PolyamineREDTM signal from cell lysate

786-O cells were seeded in 24 well and culture for 1 day. Confluent cells were treated with DFMO, a ornithine synthase inhibitor; 1 mM, for 16 hours in phenol red-free DMEM (PRf-DMEM) without FBS and further treated with final 20 μ M of PolyamineREDTM or TAMRA as a negative control for 4 hours. Cells were washed by PBS 3 times and added with 1% SDS-containing PBS. Fluorescent intensity (Ex 540 \pm 10 nm/ Em 585 \pm 20 nm) by the fluorescent spectrophotometer. Fluorescent signals from PolyamineREDTM -treated cells were significantly higher than that of TAMRA negative control experiment. DFMO-treatment reduced fluorescent intensity.



High-throughput cell-based detection by fluorescent plate reader

786-O cells were seeded in 96 well and culture for 1 day. Confluent cells were treated with indicated drugs for 16 hours in phenol-red free DMEM (PRf-DMEM) without FBS and further treated with final 10 μ M of PolyamineRED™ or TAMRA as a negative control for 4 hours. Cells were washed by PBS 3 times and added with fresh PBS. Fluorescent intensity (Ex 545 \pm 5 / Em 585 \pm 10) by the fluorescent plate reader with a transparent mode. Fluorescent signals were normalized by background signal of wells of non-dye treated cells. Fluorescent signals from PolyamineRED™-treated cells were significantly higher than the TAMRA negative control experiment.



Reference

1. K. Vong, K. Tsubokura, Y. Nakao, T. Tanei, S. Noguchi, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Tanaka, *Chem. Commun.*, **52**, 8403 (2017). Cancer cell targeting driven by selective polyamine reactivity with glycine propargyl esters.

Related product

AcroleinRED™ <Cell-based Acrolein Detection Reagent>

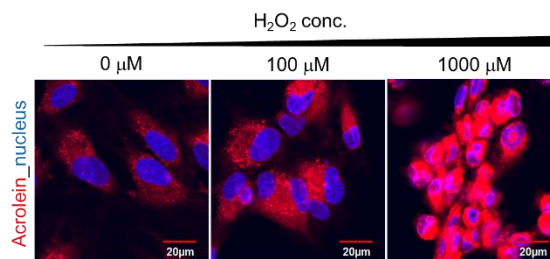
Acrolein is one of the most toxic oxidative stress marker and AcroleinRED™ is the world first cell-based acrolein detection reagent. As polyamines are one of the major source of acrolein, AcroleinRED™ and PolyamineRED™ are good set for oxidative stress research.

Catalog No. FDV-0022

Size 0.5 mg

Features

- Recommended Ex/Em: 560 nm/585 nm
- Easy and quick protocol
- Enable to semi-quantify intracellular acrolein



LipiRADICAL™ Green <Lipid Radical Detection Reagent>

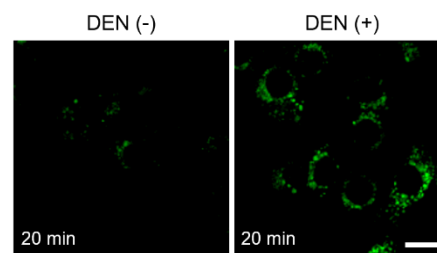
LipiRADICAL™ Green is a specific fluorescent dye for lipid-derived radicals which are the most upstream factor of lipid peroxidation (LPO). LipiRADICAL™ Green can be applied into both *in vitro* assay and cell-based assay to monitor lipid radical productions.

Catalog No. FDV-0042

Size 0.1 mg

Features

- Recommended Ex/Em: ~480 nm / 520 nm
- Enable to detect very unstable lipid-derived radicals
- Compatible with *in vitro* assay and in cell-based assay
- An innovative reagent for comprehensive identification of lipid-derived radicals by lipidomics



CellFluor™ GST <Cell-based GST Activity Assay Reagent >

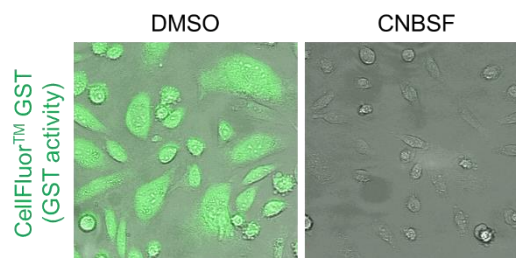
CellFluor™ GST is a novel fluorescent probe for monitoring wide GST members' activity both *in celluo* or *in vitro*. CellFluor™ GST releases green fluorophore rhodamine 110 upon GST activities. This probe has cell-permeability and can detect intracellular GST activity.

Catalog No. FDV-0031

Size 0.1 μmol

Features

- Easy and quick protocol
- Broad specificity for various GST family members
- Ex/Em: 496 nm/520 nm
(Compatible with commercial FITC filters)



Disclaimer/免責事項

This product has been commercialized by Funakoshi Co., Ltd. based on the results of academic research, and the advertisement text, figures and manuals (hereinafter “Product information”) have been prepared based on published research reports on June, 2018. The academic interpretation at the time of creation of the Product Information may change in accordance with future developments in the relevant research field and expansion of various scientific findings, and the latest version and certainty of the Product Information are not guaranteed. The specifications of this product and the Product Information are subject to change without notice. Please contact us for the latest information.

本商品は学術研究成果を基にフナコシ株式会社が商品化したもので、2018 年 6 月時点における公開研究報告を基に広告文章およびマニュアル(以下、商品資料)を作成しています。今後の当該研究分野の発展および各種学術知見の拡大にともない、商品資料作成時の学術的解釈が変更になる可能性があり、最新性・確実性を保証するものではありません。また、本商品の仕様および商品資料を予告なく変更する場合がございます。最新の情報に関しましては、弊社までご確認いただきますようお願い申し上げます。



E-mail Newsletter
Sign Up

Japanese



English



 **funakoshi**
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE

URL: <http://funakoshi.co.jp>
9-7 Hongo 2-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033