

ERseeing® <Endoplasmic Reticulum Green>

商品コード FDV-0038

※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

小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) は、細胞内で最も大きなオルガネラであり、特徴的かつダイナミックなチューブ状またはシート状構造を有します。ER は、タンパク質の生合成、正確なフォールディング、品質チェックに重要な役割を果たし、ゴルジ体、エキソサイトーシス、細胞膜、細胞外タンパク質など分泌タンパク質の輸送源となっています。また、ER の機能はタンパク質の合成だけでなく、糖質代謝、カルシウム貯蔵、脂質代謝、脂肪滴の合成にも関与します。そのため、生細胞における ER 構造の可視化は、ER の機能や ER 局在タンパク質の生理的意義を理解する上で非常に重要です。

従来より最も汎用されている ER 染色試薬は、Glibenclamide に蛍光色素を付与したものをベースにしています。Glibenclamide は、ATP 感受性 K^+ チャンネルであるスルホニル尿素受容体の強力かつ特異的な阻害剤です。このスルホニル尿素受容体は ER に選択的に局在することから、Glibenclamide をベースにした ER 染色試薬は ER 構造を可視化できます。一方、Glibenclamide は薬理活性を示すため、ER における K^+ チャンネル機能に悪影響を及ぼします。さらに Glibenclamide は可逆的な阻害剤であるため、洗浄工程や培地交換によって容易に除去されてしまいます。そのため、Glibenclamide ベースの ER 染色試薬によるイメージングでは、薬理作用の影響を受けた細胞を観察することになり、また、長期間のイメージング実験には適しません。

これに対し、ERseeing® は細胞機能への薬理作用が小さく、洗浄工程や培地交換後も観察が可能な ER 染色試薬です。ERseeing® は、ER 膜に強い親和性を示す Rhodol 系緑色蛍光色素とチオエステル構造のタンパク質標識基の 2 種類のユニットを有します。ERseeing® は培地に添加されると迅速に ER 膜選択的に蓄積されます。ERseeing® が集積すると ERseeing® の標識基が ER タンパク質中の求核性アミノ酸と反応し、共有結合して ER 局在タンパク質に Rhodol-tag が標識されるため、ERseeing® は洗浄や培地交換後も ER 構造を可視化することができます。本試薬は、薬理作用が少なく、生細胞の ER 構造を可視化できる強力なツールです。

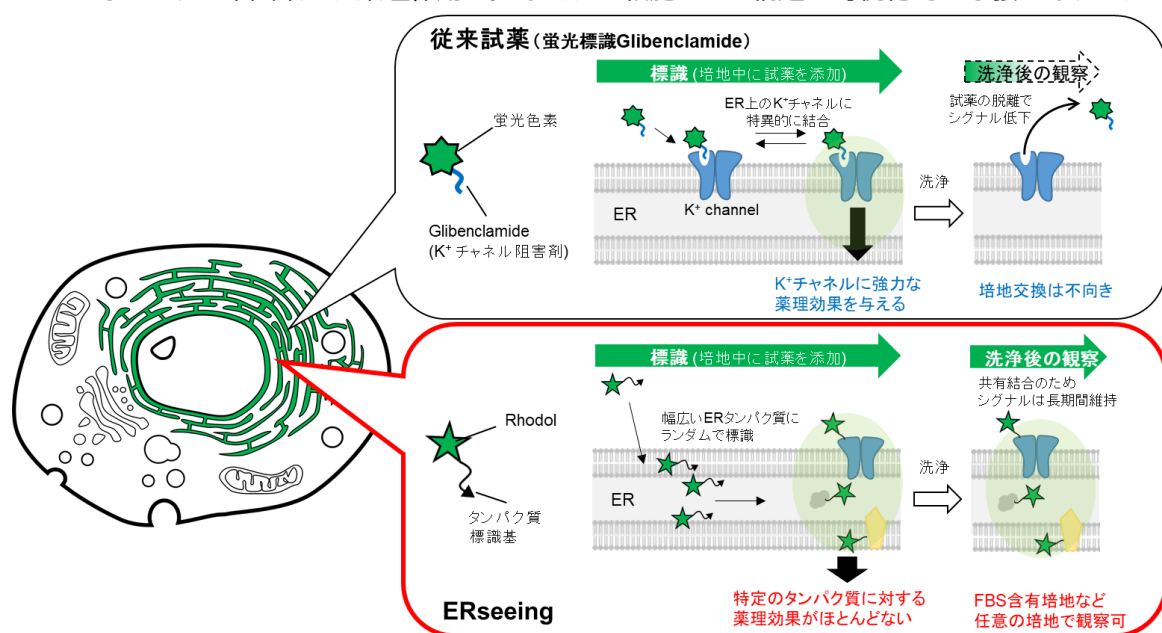


図 1 ERseeing® と Glibenclamide ベースの従来色素の概要

商品情報

商品コード: FDV-0038

包装サイズ: 10 nmol

組成式: $C_{37}H_{28}F_2N_2O_4S$

分子量: 634.6 g/mol

溶解性: DMSO に可溶

蛍光特性: Ex/Em: 509 nm/524 nm

*一般的な緑色蛍光色素 FITC の観察条件が適用可能です。

アプリケーション

-生細胞（培養細胞）における ER のイメージング

注意：生細胞で染色した後、細胞を固定処理しても観察可能です。ただし、本試薬は固定後の細胞の染色には適していないため、染色工程は生細胞で実施してください。

溶解方法と保存方法

溶解方法: 0.1 mM-1 mM/100% DMSO を推奨

保存温度（溶解前）: -20℃ 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℃で保管

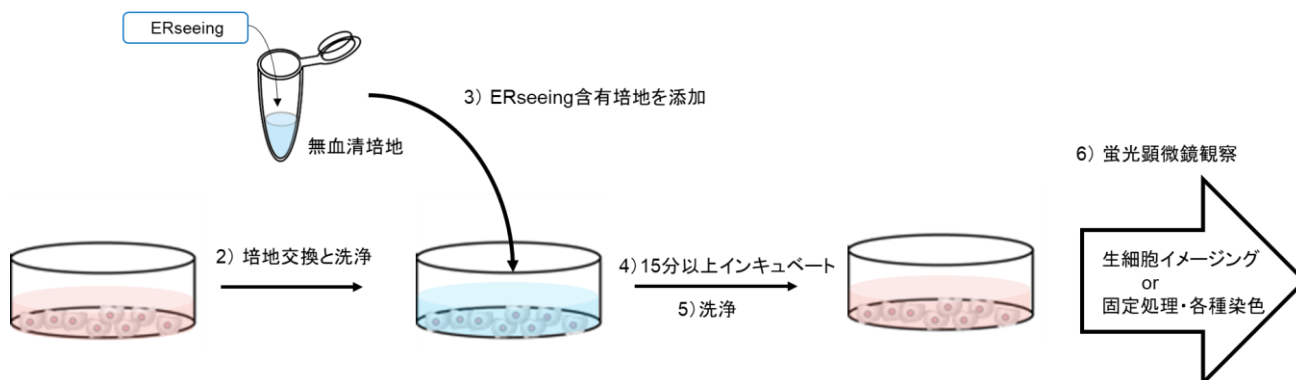
凍結融解の繰り返しは避け、小分注品の使い切りを推奨

使用方法

ER イメージングのプロトコール例

1. ERseeing[®]濃度 0.1-1 μ M になるように無血清培地を用いて ERseeing[®]溶液を調製
注：ERseeing[®]濃度 0.1 μ M から染色することを強く推奨します。1 μ M のような高濃度での染色は非特異的な染色を示すことがあります。ERseeing[®]の濃度は実験目的に応じて最適化してください。
2. 培養細胞の培地を取り除き PBS で複数回細胞を洗浄
3. ERseeing[®]溶液を細胞に添加
4. 細胞を 37℃で 15 分以上インキュベート
注：染色効率はインキュベーション時間に依存します。洗浄工程なしで細胞を観察する場合、15 分の染色を推奨します。洗浄工程後に染色細胞を観察する場合、1 時間の染色を推奨します。
5. 細胞を PBS、または任意の培地で洗浄する（任意）
6. 生細胞条件下もしくは固定（4% PFA もしくはメタノール）後、細胞を観察します。

1) ERseeingを含む培地を調製



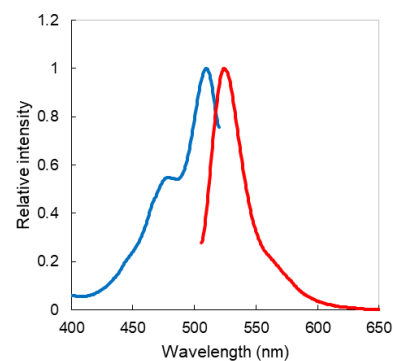
参考データ

ERseeing®の励起・蛍光スペクトル

励起スペクトル（青）と蛍光スペクトル（赤）。

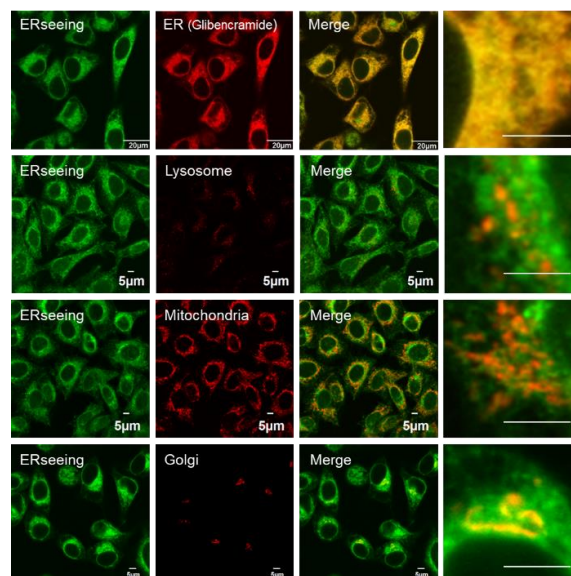
$Ex_{max}/Em_{max} = 509/524 \text{ nm}$

一般的な緑色蛍光色素 FITC 観察条件が適用可能です。



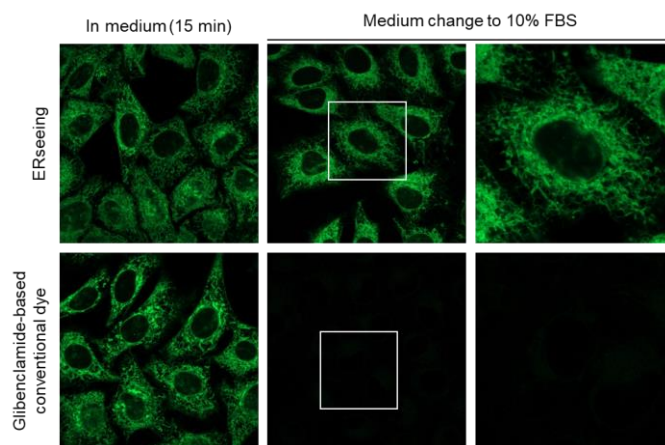
ER 特異性の検証

Hela 細胞を ERseeing® (100 nM) と各オルガネラマーカー色素（Glibenclamide 型 ER 染色試薬、リソソーム染色試薬、ミトコンドリア染色試薬、ゴルジ体染色試薬）で染色した。ERseeing®のシグナルは従来の ER 染色試薬（Glibenclamide 型）のシグナルと高い共局在が観察された（ピアソン相関係数 >0.9）。一方、リソソームマーカー、ミトコンドリアマーカーとの共局在は観察されなかった。ゴルジ体マーカーとは一部で共局在が観察され、本試薬により標識されたタンパク質が小胞体から Golgi 輸送で移動し分泌経路に移行していると考えられる。なお、ER-Golgi 輸送阻害剤を添加するとゴルジ体との共局在が減少することが分かっている（詳細は参考文献 1 をご参照下さい）。



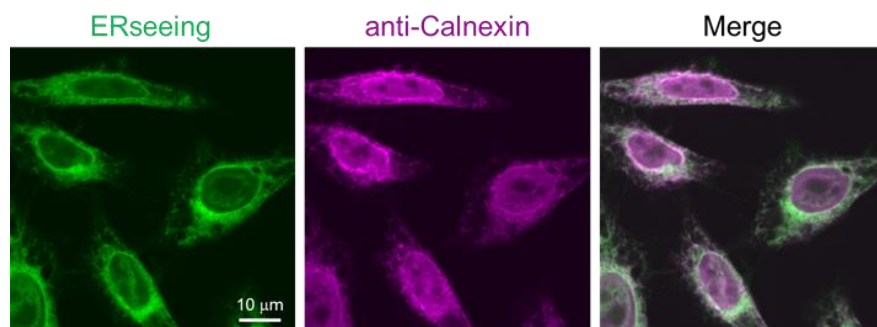
細胞洗浄時における従来色素との比較

Hela 細胞を ERseeing®または従来の ER 染色試薬（Glibenclamide 型）で 15 分間染色し、洗浄工程なしで観察した（図左）。その後、PBS で細胞を洗浄し、10% FBS 含有培地に交換し再度観察した。従来の ER 染色試薬（Glibenclamide 型）では洗浄後に著しく蛍光シグナルの消失が見られたが、ERseeing®では洗浄後も十分なシグナルが観察された。ERseeing®は培地交換後の長期イメージングに適していることが分かる。



免疫染色との併用

HeLa 細胞を生細胞において ERseeing® (100 nM) で染色後に, 4% PFA で細胞を固定し, ER 特異的マーカータンパク質である calnexin に特異的な抗体および対応する 2 次抗体を用いて免疫染色を行った。ERseeing® は不可逆的に標識されるため、固定後に免疫染色と併用することができ、ERseeing® は calnexin の局在とよく一致していることがわかる。



参考文献

1. Fujisawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17060-17070 (2018) Chemical Profiling of the Endoplasmic Reticulum Proteome Using Designer Labeling Reagents.

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、2020 年 4 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、弊社までご確認くださいませようようお願い申し上げます。

ERseeing™ <Endoplasmic Reticulum Green>

Catalog NO. FDV-0038

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

Endoplasmic reticulum (ER) is the largest organelle in the cell and has unique and dynamic tubular or sheet structures. ER plays essential roles in biosynthesis, precise folding and quality control of proteins and is a traffic origin of secreted pathway proteins including the Golgi apparatus, exocytosis, plasma membrane, and extracellular proteins. The major functions of ER are not only protein synthesis, but also carbohydrate metabolism, calcium storage, lipid metabolism, and lipid droplet synthesis. Visualization of ER structure in live cells is very important for the understanding of ER function and physiological significance of ER-resident proteins.

The most conventional ER-staining dye is based on glibenclamide-fluorophore conjugate. Glibenclamide is known as a potent and specific inhibitor of the sulphonylurea receptors of ATP-sensitive K⁺ channels which are selectively localized on ER, glibenclamide-based ER dyes can visualize ER structures. However, its pharmacological activity negatively affects K⁺ channel functions in ER. In addition to the harmful influence of glibenclamide-based dyes for the cells, glibenclamide is a reversible inhibitor and can be washed out by wash step and medium change. Consequently, glibenclamide-based ER dyes can visualize only pharmacologically affected cells and not suitable for long-term imaging experiments.

Our **ERseeing™** exhibit little effect on the ER functions pharmacologically and can visualize ER after washout or medium change. ERseeing™ has two units, a rhodol-type green fluorescent dye, and a thioester-type protein labeling group with rhodol-derivative having a high affinity to ER membrane. Right after addition of ERseeing™ to culture media, it can be accumulated into ER membranes. Protein labeling occurs with ERseeing™ non-specifically conjugates the rhodol fluorescent dyes onto ER-proteins by nucleophilic attack forming a covalent bond between ERseeing™ and ER-proteins resulting in a stable ER-rhodol label. ERseeing™ enables visualization of the ER structure even after washout or medium changes. This reagent is a powerful tool to monitor ER structures in live cells with little pharmacological effects.

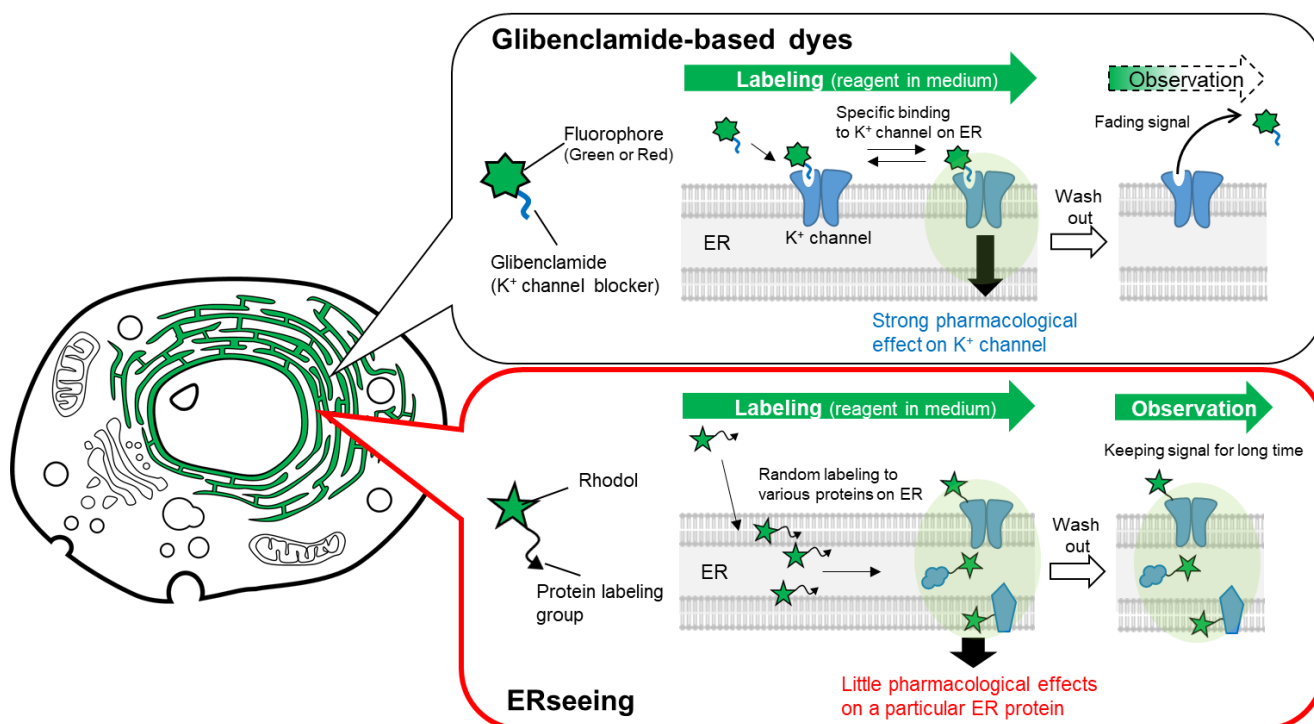


Figure 1. Overview of ERseeing™ and conventional glibenclamide-based dyes

Description

Catalog Number: FDV-0038

Size: 10 nmol

Formulation: C₃₇H₂₈F₂N₂O₄S

Molecular weight: 634.6g/mol

Solubility: Soluble in DMSO

Ex/Em: 509 nm/524 nm

*FITC filter sets are available.

Application

- Live cell ER imaging of cultured cells

NOTE: After staining live cells, cell fixation is compatible. However, this reagent does not stain ER specifically in fixed cells, staining step should be under live cell condition.

Reconstitution and Storage

Reconstitution: stock solution recommended concentration 0.1 mM to 1 mM in 100% DMSO.

Storage :

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 ER imaging

1. Prepare 0.1-1 μM ERseeing™ in serum-free medium.

NOTE: Highly recommend starting with 0.1 μM ERseeing™, higher concentrations such as 1 μM reagent may show non-specific staining. Empirically optimize and determine the concentration of ERseeing™ for your experiments.

2. Remove culture medium and wash cells PBS several times

3. Add ERseeing™-containing medium to cells.

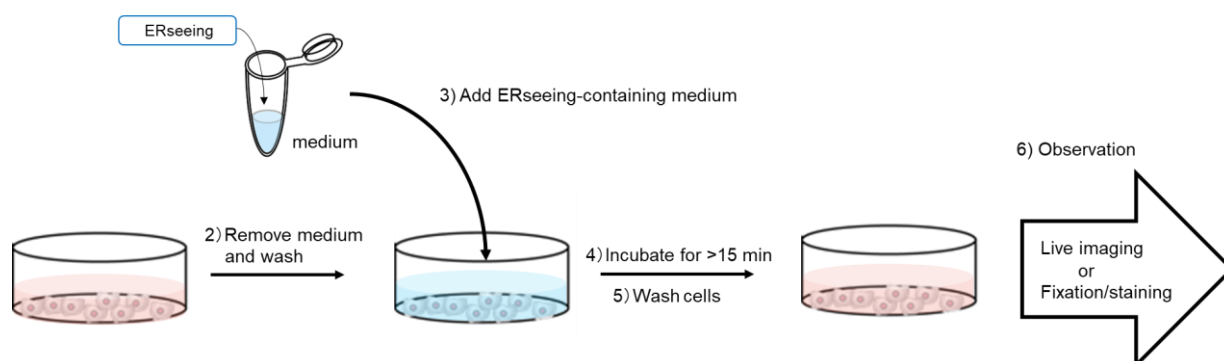
4. Incubate cells at 37°C for over 15 min.

NOTE: Staining efficiency depends on incubation time. If you need to observe cells without washout step, 15 min staining is recommended. If you would like to observe stained cells after washout, 1-hour staining recommended.

5. Wash cells with PBS or medium (Optional).

6. Observe cells under live condition or after fixation by 4% PFA or methanol.

1) Preparation of ERseeing-containing medium

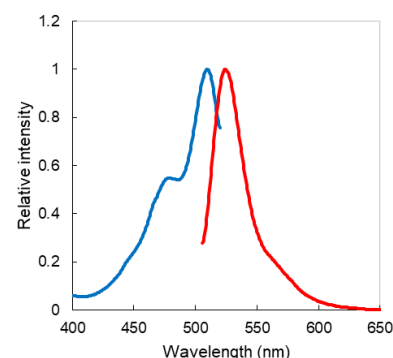


Reference data

Absorption and fluorescent spectrum of ERseeing™

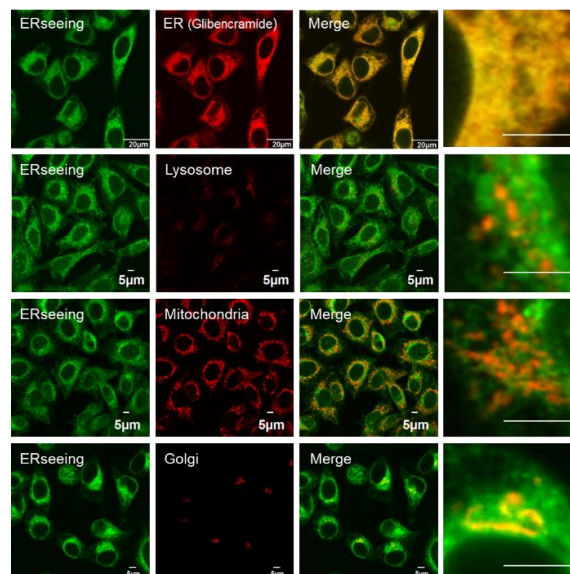
Excitation (blue) and fluorescent (red) spectrum. $Ex_{max}/Em_{max} = 509/524$ nm.

Commercial FITC filter sets are compatible.



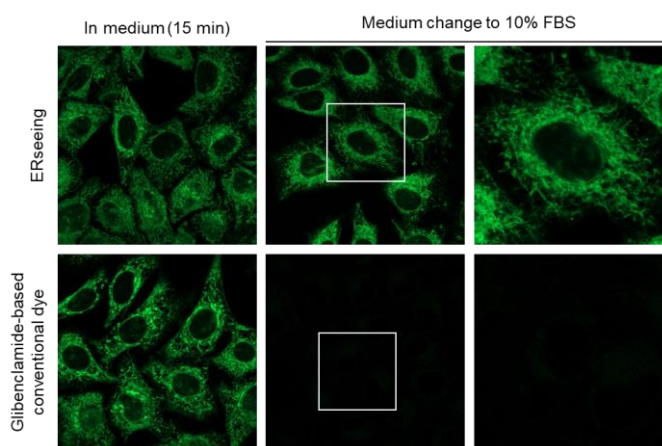
ER specificity

HeLa cells were stained with ERseeing™ (100 nM) and organelle markers, Glibenclamide-type ER staining, lysosomal staining, mitochondrial staining, and Golgi apparatus staining. ERseeing™ was highly overlapped with conventional Glibenclamide-type ER staining (Pearson coefficient >0.9) but not correlated with lysosome marker or mitochondria marker. Only a small portion of staining by ERseeing™ was overlapped with Golgi apparatus staining. It was considered that this is attributed to the vesicle transport of ERseeing™ or ERseeing™ labeling proteins from ER to Golgi apparatus. The ER-to-Golgi trafficking inhibitor decreased overlap between ERseeing™ - staining and the Golgi apparatus-staining (Detail information is described in Ref. 1).



Comparison between ERseeing™ and conventional dye

HeLa cells were treated with ERseeing™ or Glibenclamide-based dye for 15 min and observed without washout (Left). Both reagents show ER staining. After that, cells were washed by PBS, added fresh media containing 10% FBS and observed again. While the glibenclamide-based dye showed a very weak signal from the cells, ERseeing™ maintains a good signal from ER. ERseeing™ is suitable for long-term imaging after medium changes.



Reference

1. Fujisawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17060-17070 (2018) Chemical Profiling of the Endoplasmic Reticulum Proteome Using Designer Labeling Reagents.

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 April, 2020. 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、2020 年 4 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



Related products

NucleoSeeing™ <Live Nucleus Green>

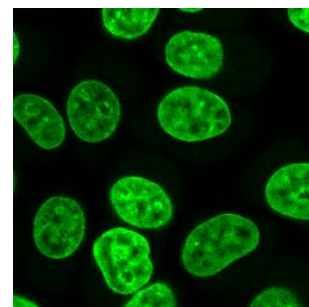
NucleoSeeing™ is DNA-responsive green dye for monitoring cell nucleus in live cells. As it shows low cytotoxicity and phototoxicity, it is very suitable for long-term live imaging of cell nucleus.

Catalog No. FDV-0029

Size 0.1 mg

Features

- Easy and quick procedure
- Compatible with 10% FBS
- Validated for both adherent cells and floating cells
- Little influence on cellular functions
- Ex/Em: 488 nm/520 nm (commercial FITC filters are available)



CytoSeeing™ <Reversible Cytoplasm Blue>

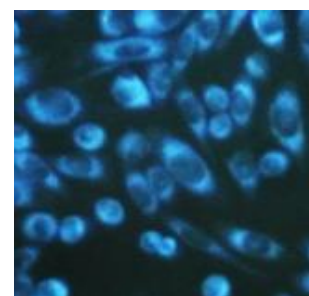
CytoSeeing™ is a reversible blue cytoplasm-staining dye for monitoring cell morphology. It allows to observe cell structure and to reuse the cells after removing dyes.

Catalog No. FDV-0017

Size 1 mg

Features

- Easy and quick staining less than 10 min
- Washable, reversible staining
- Validated for both adherent cells and floating cells
- Little influence on cellular functions
- Ex/Em: 345 nm/456 nm



LipiDye™ II <Live Imaging>

LipiDye™ II is a highly sensitive lipid droplet staining dye with extremely photostable property. This dye is the second generation of our previous reagent, LipiDye™. This dye allows us to detect small lipid droplets (<1 μm) in non-adipocytes and to apply into long-term live cell imaging for dynamic lipid droplet movements.

Catalog No. FDV-0027

Size 0.1 mg

Features

- Recommended Ex/Em: 400-500 nm / 490-550 nm
- Enable to detect <1 μm lipid droplets
- Suitable for long-term live cell imaging
- Extremely photostable compared with conventional dyes
- Compatible with both live and fixed cells

