

## Technical Note (Version 1.1)

### マウス（ラット）血清（血漿）Immunoglobulin kappa light chain ウェスタンブロットプロトコール

Immunoglobulin  $\kappa$  light chain (Ig- $\kappa$  light chain)は B 細胞における発現や免疫グロブリンを形成する分子の一つとして幅広く知られる分子量約 25000 のタンパク質です。近年、Ig- $\kappa$  light chain が免疫反応に深く関与する<sup>1,2</sup>ことや精神・神経疾患バイオマーカーになる可能性<sup>3</sup>が示唆され注目を集めています。本 Technical Note ではマウス（ラット）の血清（血漿）中に含まれる Ig- $\kappa$  light chain のウェスタンブロットによる定性的定量法について解説します（このプロトコールは Oh-Nishi 2016 を参考に作成されています）。

#### ①マウス（ラット）の血清（血漿）中に含まれる Ig- $\kappa$ light chain の抽出

サンプルバッファー組成

Tris-HCl 100mM (pH.8.8)

SDS 2%

Sucrose 20%

BPB 0.06%

尿素 7 M

チオ尿素 2M

DTT 100mM

（尿素、チオ尿素、DTT を必ず入れて下さい）

注意：水溶液中の尿素、チオ尿素、DTT は短い期間で不活化してしまうため、中～長期保存は避けて下さい。（毎回新しく Extracting buffer を調製することをお勧めします）

Ig- $\kappa$  light chain は血清（血漿）大量に含まれているため、PBS (pH7.4)などの緩衝液で 10～100倍希釈し、サンプルバッファーと1：1で混和。

（（重要）Vortex 15分若しくは 100℃ 5分でインキュベーションし、完全に混和して下さい）

注意：溶血している血清（血漿）サンプルは正しく Ig-K が測定出来ない可能性がありますので避けて下さい。

採血の際はキャピジエクト® (<https://www.terumo.co.jp/medical/equipment/me78.html>) 等の使用をお勧めします。

#### ②SDS-PAGEによる分離（一般的な方法で問題ありません）

泳動バッファー組成（一例）

Tris 25mM

Glycine 192mM

SDS 3.5mM

10-20% gradient SDS-PAGE ゲル (ATTO e-PAGEL) (12.5% SDS PAGE ゲルでも OK) に血清 (血漿) とサンプルバッファーの混和物を 1-10ul アプライし、任意の条件で電気泳動する (ATTO ミニスラブサイズポリアクリルアミドゲル電気泳動装置の場合、20 mA 60~80min)。

③ PVDF 膜 (ニトロセルロース膜でも構いません) への転写 (一般的な方法で問題ありません)

転写バッファー組成 (一例)

Tris 48mM

Glycine 39mM

MeOH 200ml/L

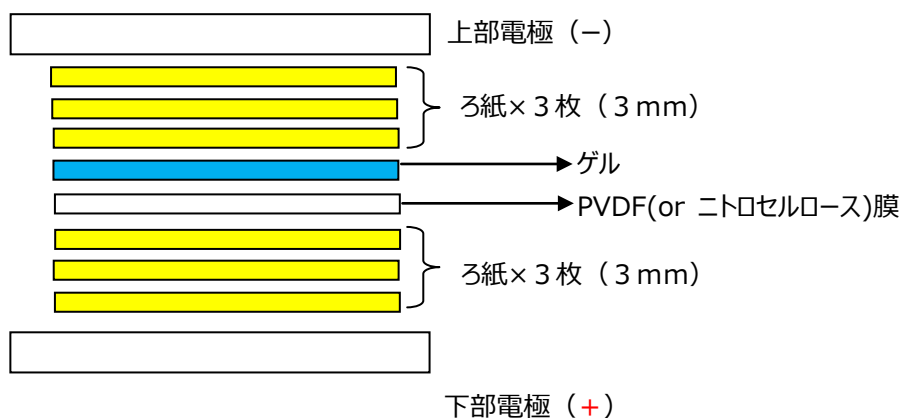
(ATTO 社 EzFastBlot でも代用可)

PVDF 膜使用場合は **10~60 秒間 MeOH を浸透させる**。その後、転写バッファーを 30 分以上浸透させる。

ニトロセルロース膜の場合は直接転写バッファーを 30 分以上浸透させる。

電気泳動が終了したゲルを転写バッファーにのりが入った容器に入れゲル表面を軽く洗い流す。

ろ紙を転写バッファーに浸漬し下記図を参考にしろ紙、PVDF (ニトロセルロース) 膜を順番に重ねる。



(注意: 気泡が入らない様に密着させて下さい。密着が不完全だとプロットング効率にムラが生じることがあります)

任意の条件で通電。

(ゲルサイズ 85 mm x 90 mm であれば、75~120 mA 60~90 min 程度で転写可能)

です)

#### ④ブロッキング (一般的な方法で構いません)

転写の終わった膜を任意のブロッキングバッファーでブロッキングを行う。(ブロッキングバッファーは任意の市販の溶液で構いませんが、ATTO 社 EzBlock Chemi が簡便です。バンドが複数出る場合は 5%スキムミルク in TBS-T 等の使用をお勧めします)

#### ⑤ 1 次抗体

RESVO Anti-IgK 若しくは IGKR-P1 Ig G ([http://www.anatech.co.jp/resvo\\_anti-igk.html](http://www.anatech.co.jp/resvo_anti-igk.html))を 1:500~2000 でブロッキングバッファーで希釈し、転写された PVDF(ニトロセルロース) 膜を室温の場合 1 時間 (4℃の場合 2-4 時間) 振盪しながらインキュベーション。

#### ⑥ 2 次抗体

洗浄液 (ATTO EzTBS が便利です) 5 分振盪を 3 回行いで膜洗浄する。次に HRP が付加された任意の 2 次抗体 (ラビット抗体に結合するものであれば構いません) をブロッキングバッファーで任意の希釈倍率で希釈し、洗浄した膜を 60 分間室温で振盪しながらインキュベーション。

#### ⑦化学発光

洗浄液で 5 分振盪を 3 回行いで膜洗浄する。その後 HRP 用発光試薬 (イムノスターゼータ or ECL Plus を推奨)によってシグナルを検出。

#### ⑧Ig-K シグナルの定性的定量

ウェスタンブロットの場合 Housekeeping protein などのシグナルを用いて、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)などで検出したシグナル強度を補正し定性的定量を行います。血清 (血漿) Ig-K の場合、そのシグナル補正に Albumin を用いることを推奨します。

以上のプロトコルによって血清 (血漿) に含まれる Ig-K をウェスタンブロットによって検出することが可能です。ウェスタンブロットは同じプロトコルでもちょっとした手技の違いで大きく結果が異なることがあります。そのため最適な結果を得るには複数回の試行が必要な場合がありますのでご了承下さい。

#### 参考文献

1. Redegeld FA, Nijkamp FP. *Trends Immunol.* Apr 2003;24(4):181-185.
2. van der Heijden M, Kraneveld A, Redegeld F. *Eur J Pharmacol.* Mar 8 2006;533(1-3):319-326.
3. Oh-Nishi A, Koga K, Maeda T, Suhara T. *Neurosci Res.* Jul 15 2016.