



SHIMA Laboratories CO., LTD.

研究用

品番 R0I004

シトルリン化タンパク質検出抗体（ウエスタンブロット用）

Citrullinated protein detection antibody

別名 [抗化学修飾シトルリン（AMC）ポリクローナル抗体]

別名 [Anti-modified citrulline (AMC) IgG]

ウサギ IgG 分画

Rabbit AMC IgG

容量：0.075 mL

免疫抗原：化学修飾シトルリン化（脱イミノ化）ヒストン（ヒストン H1 を除いた）

免疫動物：ウサギ

由来：血清

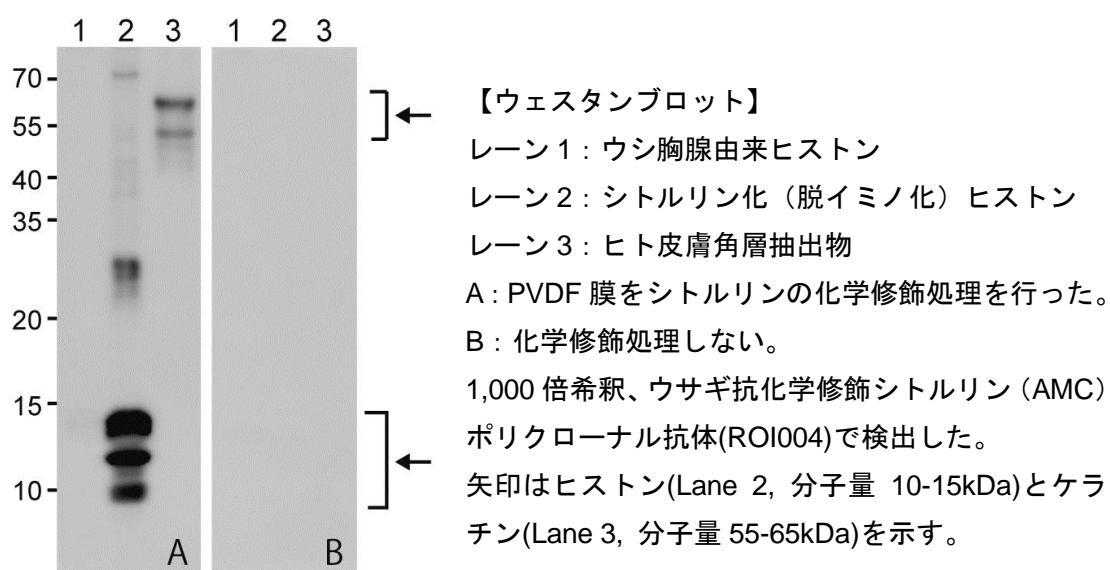
性状：0.05% NaN<sub>3</sub> 含有 10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl

安定性、保存：2~8℃保存、2 年

用途：ウエスタンブロット検出（500~1,000 倍希釈）、免疫組織染色については調べていない。

※ 本抗体を用いてシトルリン化タンパク質をウエスタンブロットで検出するためには、電気泳動したタンパク質を PVDF 膜に転写後、PVDF 膜を化学修飾（シトルリンの化学修飾）処理を行う必要があります。詳細は、実験プロトコルを参照して下さい。

種交差性：ヒト、マウス、ラットシトルリン化タンパク質と反応する。他の種については調べていない。



※ シトルリンの化学修飾処理を行わない(B)とシトルリン化タンパク質は検出されない。

参考文献：

1. Senshu, T. et al., Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal. Biochem.* 203, 94-100 (1992)
2. Senshu, T. et al., Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J. Invest. Dermatol.* 105, 163-169 (1995)
3. Ishigami, A. et al., Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 80, 120-128 (2005)
4. 石神昭人: アルツハイマー病とシトルリン化蛋白質. 医学のあゆみ 255, 889-893 (2015)

---

製造元

株式会社シマ研究所

〒174-0063

東京都板橋区前野町1-29-10

3号館2階

販売元（問合せ先）

コスモ・バイオ株式会社

〒135-001

東京都江東区東陽2-2-20 東陽駅前ビル8F

TEL : 03-5632-9610 FAX : 03-5632-9619

Mail : [service@cosmobio.co.jp](mailto:service@cosmobio.co.jp)

## 化学修飾シトルリン化タンパク質ウェスタンブロット実験プロトコール

### ■ 必要な試薬類（本製品には含まれていません）

- 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ （硫酸）
- 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ （リン酸）
- 酢酸
- Diacetyl Monoxime [2,3-Butanedione monoxime] (Nacalai Tesque 10923-52, SIGMA-ALDRICH B0753)
- Antipyrine (Wako Pure Chemical 018-11112, SIGMA-ALDRICH, A5882)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [Iron(III) Chloride Hexahydrate] (Wako Pure Chemical 091-00872, SIGMA-ALDRICH 236489)

### ■ 保存溶液の作製方法

#### 1. Reagent I (100 mL) 室温で保存

MilliQ 水 55 mL

MilliQ 水をスターラーで攪拌しながら、以下の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  及び  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を少量ずつ、ゆっくりと加える。高熱が発生するため、冷やしながらかき混ぜる。

$\text{H}_2\text{SO}_4$  20 mL

$\text{H}_3\text{PO}_4$  25 mL

溶液の温度が室温になってから、以下の  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を加えて溶かす。

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  41.6 mg

#### 2. Reagent II (100 mL) 4℃で保存

Diacetyl Monoxime 2 g (終濃度 2%)

Antipyrine 1 g (終濃度 1%)

MilliQ 水 80 mL

スターラーで攪拌して溶かす。

酢酸 (17.4 M) 0.575 mL (終濃度 1 M)

MilliQ 水で全量を 100 mL にする。

### ■ 実験プロトコール

#### 電気泳動と転写

1. 電気泳動用サンプルを調製する。
2. サンプルを電気泳動する。
3. PVDF 膜に転写する。（PVDF 膜は各社から販売されている）

### 【オプション】PVDF 膜へのタンパク質の固定

次の手順（シトルリン化の化学修飾）で目的のタンパク質が PVDF 膜からはがれやすい場合のみ行う。必要ない場合は、次のシトルリン化の化学修飾に進む。

1. 転写した PVDF 膜を MilliQ 水で洗う。
2. 0.1% ovalbumin in phosphate-buffered saline で 15 分間振とうする。
3. PVDF 膜を MilliQ 水で手早く洗う。
4. 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline で 15 分間振とうする。
5. PVDF 膜を MilliQ 水で数回、洗う。

### シトルリンの化学修飾

6. 【用事調製】シトルリン化学修飾液（Regent I : Regent II = 2 : 1 の割合で混合した液）を用意する。
7. 転写した面をシトルリン化学修飾液に浸し、37℃で 2 時間以上又は一晩、インキュベートする。
8. PVDF 膜を MilliQ 水で数回、洗う。

※ ネガティブコントロールとして反応の特異性を調べるときは、この手順（シトルリンの化学修飾）を行わない。

### 抗体反応、検出

1. ブロッキング  
ブロッキング液、5%スキムミルク/TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween-20)で 1 時間振盪する。
2. 一次抗体の反応  
シトルリン化タンパク質検出抗体 [ウサギ抗化学修飾シトルリン (AMC) ポリクローナル抗体] を 5%スキムミルク/TBST に 500~1,000 倍希釈し、室温で 3 時間反応させる (4℃で一晩反応させてもよい)。
3. TBST で 5 分間×3 回振盪する。
4. 二次抗体の反応 (二次抗体は各社から販売されている)  
ヤギ抗ウサギ HRP 標識 IgG を二次抗体に使用方法  
二次抗体を 5%スキムミルク/TBST で希釈し、室温で 1 時間反応させる。
5. TBST で 5 分間×3 回振盪する。
6. 検出 (各社から検出試薬が販売されている)。  
ケミルミネッセンス (化学発光) を使用する。



SHIMA Laboratories CO., LTD.

ROI004

**Citrullinated protein detection antibody (for Western blot analysis)**

**Another name: Anti-modified citrulline (AMC) IgG**

Rabbit Polyclonal Antibody (Purified IgG Fraction)

Rabbit AMC IgG

Volume : 0.075 mL

Antigen : Calf thymus histones (Histone H1 depleted) deiminated *in vivo* with recombinant human PAD2 proteins. The resulting deiminated histones were then modified by ureid group specific color reaction.

Host : Rabbit

Supplied As : IgG fraction purified from rabbit serum.

Prepared in 10 mM Tris (pH 7.4), 0.14 M NaCl and 0.05% NaN<sub>3</sub>.

Storage and Stability : 2-8 °C, 2 years.

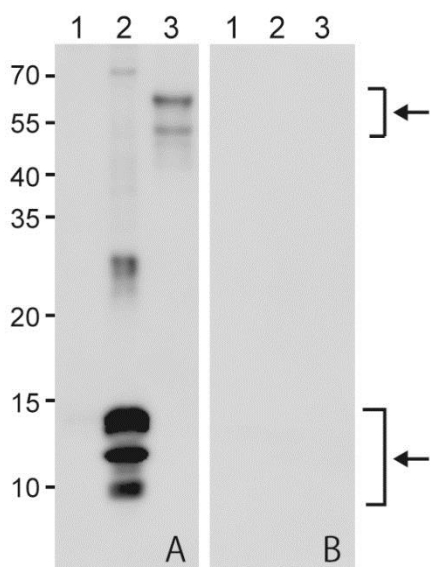
Tested applications : • Western Blot (1:500-1:1,000 dilution)

To detect deiminated proteins by Western blot using this antibody, it is essential to perform chemical modification (chemical modification of citrulline residues) of PVDF membrane after transfer the electrophoresed proteins. The details refer to experiment protocol.

• We have no data about immunohistochemistry.

Cross Reactivity: Cross reacts with Human, Mouse and Rat deiminated proteins.

Not yet tested in other species.



**[Western blot analysis]**

Lane 1 : Histones (from calf thymus)

Lane 2 : Deiminated histones

Lane 3 : Human skin cornified cell lysate

A : Chemical modification of PVDF membrane

B : Control

Anti-modified citrulline (AMC) IgG (ROI004) at 1:1,000 dilution used.

Arrows indicate modified deiminated histones (Lane 2, 10-15kDa) and deiminated keratins (Lane 3, 55-65kDa).

Signals were not detected in the control membrane (B) without chemical modification of PVDF membrane.

**References :**

1. Senshu, T. et al., Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal. Biochem.* 203 94-100 (1992)
2. Senshu, T. et al., Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J. Invest. Dermatol.* 105 163-169 (1995)
3. Ishigami, A. et al., Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 80 120-128 (2005)

***For Research Use Only***

---

## **Chemically modification of deiminated proteins - Western blot protocol**

### ■ Reagents (necessary but not included)

- 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- Acetic acid
- Diacetyl Monoxime [2,3-Butanedione monoxime] (Nacalai Tesque 10923-52, SIGMA-ALDRICH B0753)
- Antipyrine (Wako Pure Chemical 018-11112, SIGMA-ALDRICH, A5882)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [Iron(III) Chloride Hexahydrate] (Wako Pure Chemical 091-00872, SIGMA-ALDRICH 236489)

### ■ Stock solutions

#### 1. Reagent I (100 mL) store at room temperature

Water 55 mL

Please add following  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  slowly in small quantities while stirring water in a stirrer because temperature of the solution rises.

$\text{H}_2\text{SO}_4$  20 mL

$\text{H}_3\text{PO}_4$  25 mL

Please add following  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and dissolve it after temperature of the solution reached room temperature.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  41.6 mg

#### 2. Reagent II (100 mL) store at 4 °C

Diacetyl Monoxime 2 g (final conc.2%)

Antipyrine 1 g (final conc.1%)

Water 80 mL

Please stir it in a stirrer and dissolve it.

Acetic acid (17.4 M) 5.75 mL (final conc.1 M)

Adjust to 100 mL with water

### ■ Experimental protocol

## **Electrophoresis and transfer**

1. Prepare the electrophoresis samples.
2. Perform SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transfer the proteins to PVDF membrane.

**Optional:** If the expected deiminated proteins are not stably retained on the PVDF membrane, please perform the following procedure to improve protein retention. If it does not need, please proceed to the next step (Chemical modification of deiminated proteins).

1. Wash the transferred PVDF membrane in water.
2. Immerse the PVDF membrane in 0.1% ovalbumin in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min with agitation.
3. Wash the PVDF membrane in water.
4. Immerse the PVDF membrane in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min with agitation.
5. Wash the PVDF membrane several times in water.

#### **Chemical modification of deiminated proteins (citrulline residues)**

6. Prepare chemically modification solution (Regent I : Regent II = 2 : 1).
7. Immerse the PVDF membrane and incubate at 37°C more than 2 hour (or overnight) without agitation.
8. Wash the PVDF membrane several times in water.

~~✕if you check the specificity of reaction, please skip this procedure.~~

#### **Immunoreactions and detection**

1. Blocking  
Block the membrane in 5% Skim milk/TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 hour at room temperature with constant agitation.
2. Reaction of primary antibody  
Incubate the membrane with citrullinated protein detection antibody [rabbit anti-modified citrulline (AMC) antibody] diluted 1:500-1,000 in 10 ml 5% Skim milk/TBST for 3 hour at room temperature (or overnight at 4 °C).
3. Wash the membrane three times in TBST for 5 minutes each time.
4. Reaction of secondary antibody (you can use a commercial antibody)  
Method of using a Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate for secondary antibody  
Incubate the membrane with secondary antibody diluted in 5% Skim milk/TBST for 1 hour at room temperature.
5. Wash the membrane three times in TBST for 5 minutes each time.
6. Detection  
Use the detection method of your choice. We recommend enhanced chemiluminescence reagent.