

## Western Blots

Monoklonaler Anti-c-myc von Boehringer (#1667149) .....	2
Polyklonaler Anti-c-myc Tag 409-420(cat#06-549/Lot#14966) .....	2
Anti-X-Press (#46-0528/Lot#800969).....	2
Monoklonaler Anti-P-Tag (H902-ascites) .....	3
Polyklonaler Anti-Flag von Santa Cruz (D-8/ cat#sc807/Lot#B057).....	3
M1 Monoklonaler Anti-FLAG M1 von Kodak (cat#13001) .....	4
Polyklonaler Anti-IKB- $\alpha$ (C-21/cat#sc-371/Lot#A058).....	5
Polyklonaler Anti-Traf-1 (H-186/cat#sc-7186/Lot#Do18).....	5
Polyklonaler Anti-Traf-2 (H-249/cat#sc-7187/Lot#Do88).....	5
Anti-HA-HRP-konjugiert (Böehringer cat#1667475) .....	6
Anti-myc-HRP conjugated (Invitrogen, #46-0709) .....	6
Anti-TAK1 (Santa Cruz, rabbit polyclonal, #sc-7162, Lot: J227).....	6
Anti-FLAG (M2): Monoclonal mouse ab, Sigma F3165, Lot: 68H9255 .....	7
Polyklonaler Anti-GFP (Clontech.cat#8363-1) .....	7
Anti-Phospho-p38 .....	8

### **Monoklonaler Anti-c-myc von Boehringer (#1667149)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen
2. Waschen: 2x 2 min PBS def./0,1% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: monocl. anti-c-myc 1:200 in PBS def./0,1% Tween 20  
2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-mouse-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 931,  
Batch 133232 ) in PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit PBS def./0,1% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im  
Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
8. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Polyklonaler Anti-c-myc Tag 409-420(cat#06-549/Lot#14966)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen
2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: polykl. anti-c-myc 1:1000 in 1x PBS def./0,1% Tween  
20, 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 934,  
Batch 103 ) in 1x PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im  
Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
8. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Anti-X-Press (#46-0528/Lot#800969)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen

2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: anti-X-Press 1:5000 in 0,1% BSA /1x PBS def./0,1% Tween 20, 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-mouse-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 931, Batch 133232 ) in 1x PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren, Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Monoklonaler Anti-P-Tag (H902-ascites)**

1. Blocken mit 2% Magermilch / 1x PBS def.-0,05% Tween 20: 30 min schütteln lassen
2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,05% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: monoc. anti-P-Tag 1:2000 in 0,2% Trockenmilch/1x PBS def./0,05% Tween 20  
über Nacht bei 4°C inkubieren (1:1000 verdünnen, wenn man 1 Std. bei RT inkubiert)
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,05% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-mouse-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 931, Batch 133232 ) in 1x PBS def./0,05% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,05% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
8. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Polyklonaler Anti-Flag von Santa Cruz (D-8/ cat#sc807/Lot#B057)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen

2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: polykl. anti-Flag 1:1000 in 1x PBS def./0,1% Tween 20  
1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 934, Batch 103 ) in 1x PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
8. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **M1 Monoklonaler Anti-FLAG M1 von Kodak (cat#13001)**

1. Blocken mit 5% Magermilch/50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> ) 1 Stunde schütteln lassen
2. Waschen: 3x kurz 50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> )
3. Inkubation mit 1. Antikörper: monocl. M1 anti-Flag 1:500 in 50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> )  
Inkubation 1 Stunde bei R.T.
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> )
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-mouse-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 931, Batch 133232 ) in 50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> ) 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 50 mM Tris(50 ml 1 M Tris bei 11)+ 200 mM NaCl(40 ml 5 M NaCl)+ 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml 2 M CaCl<sub>2</sub> )

7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren, Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Polyklonaler Anti-IKB- $\alpha$ (C-21/cat#sc-371/Lot#A058)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen
2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
3. Inkubation mit 1. Antikörper: polykl. anti-IKB- $\alpha$  1:500 in 1x PBS def./0,1% Tween 20, 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 934, Batch 103 ) in 1x PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
8. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Polyklonaler Anti-Traf-1 (H-186/cat#sc-7186/Lot#Do18)**

### **Polyklonaler Anti-Traf-2 (H-249/cat#sc-7187/Lot#Do88)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def.-0,05% Tween 20: 30 min schütteln lassen
2. Inkubation mit 1. Antikörper: polykl.cl. anti-Traf 1/2 1:500 in 5% Magermilch/1x PBS def./0,05% Tween 20, 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
3. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,05% Tween 20
4. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 934, Batch 103 ) in 1x PBS def./0,05% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
5. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,05% Tween 20
6. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren

### **Anti-HA-HRP-konjugiert (Böehringer cat#1667475)**

1. Blocken mit 1% BSA / 50 mM Tris/ 200 mM NaCl/ 0,1% Tween 20: 1 Stunde schütteln
2. Inkubation mit 1. Antikörper: anti-HA-HRP 1:1000 in 1% BSA / 50 mM Tris/ 200 mM NaCl/ 0,1% Tween 20, 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkub.
3. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 50 mM Tris/ 200 mM NaCl/ 0,1% Tween 20
4. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
5. Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

### **Anti-myc-HRP conjugated (Invitrogen, #46-0709)**

1. Block: 5% dry milk in TBS
2. Wash 2x 5 min with TBS/0.05% Tween-20 (TBS/T)
3. Antibody: anti-myc-HRP (1:2000 in blocking buffer): 2 h at r.t. or over night at 4°C
4. Wash 2x 5 min with TBS/T
5. Wash once for 5 min with TBS
6. Detection with Pierce SuperSignal or equivalent

### **Anti-TAK1 (Santa Cruz, rabbit polyclonal, #sc-7162, Lot: J227)**

1. Block: 30 min with 5% dry milk in TBS (or PBS)
2. Wash briefly with TBS
3. 1<sup>st</sup> antibody: anti-TAK1 (1:500 or 1:1000 in TBS): 1 h at r.t. or over night at 4°C
4. Wash 3 x 5 min with TBS/0.05% Tween-20
5. 2<sup>nd</sup> antibody: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 in TBS/T (Amersham NA 934): 1 h at r.t.
6. Wash 3 x 5 min with TBS/0.05% Tween-20
7. Detection with Pierce SuperSignal or equivalent

### **Anti-FLAG (M2): Monoclonal mouse ab, Sigma F3165, Lot: 68H9255**

1. Block with 5% dry milk in TBS (1 h at 37°C)
2. Wash 2x 2 min with TBS
3. 1<sup>st</sup> antibody: anti-flag M2 (1:1000 in TBS or in blocking buffer): 30 min – 1 h at r.t.
4. Wash 3x 2 min with TBS
5. 2<sup>nd</sup> antibody: anti-mouse-Ig-HRP (1:5000 in TBS or blocking b., Amersham NA931)  
30 min – 1 h at r.t.
6. Wash 3x 15 min with TBS
7. Detection with Pierce SuperSignal ...

### **Polyklonaler Anti-GFP (Clontech.cat#8363-1)**

1. Blocken mit 5% Magermilch / 1x PBS def./0,1% Tween 20: 30 min schütteln lassen
  2. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
  3. Inkubation mit 1. Antikörper: polykl. anti-GFP 1:1000 in 1x PBS def./0,1% Tween-20 , 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubieren
  4. Waschen: 2x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
  5. Inkubation mit 2. Antikörper: anti-rabbit-Ig-HRP 1:5000 (Amersham NA 934, Batch 103 ) in 1x PBS def./0,1% Tween 20: 1 Stunde bei R.T.
  6. Waschen: 3x kurz, 1x 15 min und 2x 5 min mit 1x PBS def./0,1% Tween 20
  7. Detektion mit dem Pierce SuperSignal Reagenz: 125 µl/cm<sup>2</sup> Blot , 2 Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt: 5 min inkubieren
- Exponieren auf Film, bzw. Detektion am LumiImager

## **Anti-Phospho-p38**

1. Block: 3% milk in PBS/0.1% Tween 20 (PBS/T): 30 min
2. 1<sup>st</sup> antibody (New England Biolab, Diana Mechtcheriakova) 1:1000 in Block: 1 h at r.t.
3. Wash: 3x 5 min in PBS/T
4. 2<sup>nd</sup> antibody: anti-rabbit Ig-HRP 1: 2500 (Amersham): 1 h at r.t.
5. Wash: 3x 5 min in PBS/T
6. Detection with Pierce SuperSignal or equivalent