

# Anti-ACTIVE<sup>®</sup> MAPK, p38 and JNK Polyclonal Antibodies and Anti-ACTIVE<sup>®</sup> Qualified Secondary Antibody Conjugates

日本語プロトコール No. TB262J

2000年8月作製

カタログ番号 V1211, V8031, V7931, V7932, V7951, V7971

## 目次

I.	はじめに .....	1
II.	キットの構成 .....	2
III.	考慮が必要な事項 .....	3
IV.	Anti-ACTIVE <sup>®</sup> pAb を用いたウエスタンブロッティング解析	
A.	Anti-ACTIVE <sup>®</sup> pAbによる抗体反応 .....	5
B.	検出方法 .....	6
V.	Anti-ACTIVE <sup>®</sup> pAbs を用いた免疫細胞染色法 .....	8
VI.	バッファーおよび溶液の組成 .....	9
VII.	関連製品の紹介 .....	9
VIII.	参考文献 .....	11

## I. はじめに

プロメガはMitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)スーパーファミリーの3メンバーに対するポリクローナル抗体(pAb)を開発しました。これらの酵素 MAPK, p38, JNKは真核細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしています。これらのキナーゼはシグナル伝達反応のカスケードにおける連結役を担っています。Anti-ACTIVE<sup>®</sup> pAbsは2重リン酸化された活性化型のMAPK, p38, JNKと特異的に反応するため、これらの酵素の活性化を正確に検出するツールとなります。

Anti-ACTIVE<sup>®</sup> MAPK pAb, Rabbit (カタログ番号 V8031)はアフィニティー精製されたポリクローナル抗体で、2重にリン酸化された活性化型 MAPK (またはp44/ERK1およびp42/ERK2)を特異的に認識します。Anti-ACTIVE<sup>®</sup> MAPK pAbは活性化型ERKの触媒中心に相当する2重リン酸化ペプチド配列を免疫原として作成されています。このペプチドはp42/ERK2のThr<sup>183</sup>とTyr<sup>185</sup>に相当するアミノ酸残基がリン酸化されています。Anti-ACTIVE<sup>®</sup> MAPK pAbのウエスタンブロッティング分析に用いる場合の推奨希釈倍率は5,000倍です。

Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK pAb, Rabbit (カタログ番号 V7931, V7932)はアフィニティー精製されたポリクローナル抗体で2重リン酸化された活性化型 JNK (c-Jun N-terminal protein kinase)[SAPK (Stress-Activated Protein Kinase)としても知られる]を認識します。Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK pAbは活性化型 JNKの触媒中心に相当する2重リン酸化ペプチド配列を免疫原として作成されています。このペプチドはJNK2のThr<sup>183</sup>とTyr<sup>185</sup>に相当するアミノ酸残基がリン酸化されています。Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK pAbのウエスタンブロッティング分析に用いる場合の推奨希釈倍率は5,000倍です。

Anti-ACTIVE® p38 pAb, Rabbit (カタログ番号 V1211), はアフィニティー精製されたポリクローナル抗体で2重リン酸化された活性化型p38を認識します。Anti-ACTIVE® p38 pAbは活性化型p38Kの触媒中心に相当する2重リン酸化ペプチド配列を免疫原として作成されています。このペプチドはp38のThr<sup>180</sup>とTyr<sup>182</sup>に相当するアミノ酸残基がリン酸化されています。Anti-ACTIVE® p38 pAbのウエスタンブロッティング分析に用いる場合の推奨希釈倍率は2,000倍です。

Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP, Anti-ACTIVE® Qualified (カタログ番号 V7951) および Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP, Anti-ACTIVE® Qualified (カタログ番号 V7971) はアフィニティー精製されたホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)またはアルカリフォスファターゼ(AP)で標識されたAnti-ACTIVE® pAbs用の2次抗体です。化学発光または発色検出によるウエスタンブロッティング分析用として検定されています。この標識抗体とヤギ、マウス、ヒツジのIgGやウシ血清アルブミン(BSA)および哺乳動物細胞抽出液のタンパク質との交差反応性は最低レベルで、Anti-ACTIVE® MAPK pAbの場合、5,000倍希釈、Anti-ACTIVE® JNK pAbとAnti-ACTIVE® p38 pAbの場合、10,000倍希釈でこの2次抗体を用いると低いバックグラウンドと高い特異的シグナルを示します。

## II. キットの構成

製品名	サイズ	カタログ番号
Anti ACTIVE® MAPK pAb, Rabbit (pTEpY)	40µl	V8031
Anti-ACTIVE® JNK pAb, Rabbit (pTPpY)	40µl	V7931
	120µl	V7932
Anti-ACTIVE® p38 pAb, Rabbit (pTGpY)	100µl	V1211
Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP, Anti-ACTIVE® Qualified	60µl	V7951
Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP, Anti-ACTIVE® Qualified	60µl	V7971

推奨する倍率で希釈した場合、カタログ番号 V7932, V7951 および V7971 は600ml分、カタログ番号 V1211, V8031 および V7931 は200ml分のブロッティング溶液を調製できます。

### 内容:

1 チューブ	Anti-ACTIVE® pAb またはAnti-ACTIVE® Qualified antibody conjugate
1 部	Protocol

### 保存条件:

Anti-ACTIVE® MAPK pAb (カタログ番号 V8031), Anti-ACTIVE® p38 pAb (カタログ番号 V1211) および Donkey Anti-Rabbit IgG antibody conjugates (カタログ番号 V7951 および V7971) は-20°Cで保存(少なくとも6ヶ月間 安定)

Anti-ACTIVE® JNK pAb (カタログ番号 V7931, V7932) は-70°Cで保存(少なくとも6ヶ月間 安定)  
凍結/融解の繰返しを避けるため、保存する前に小分けすることを推奨します。

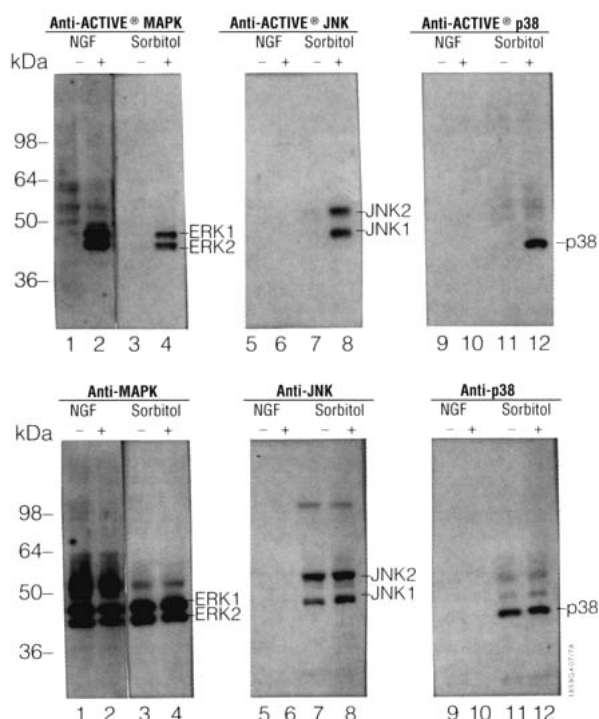
### III. 考慮が必要な事項

Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) は、多くの細胞内イベントが調節される哺乳動物細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしています(1,2)。ERKs, JNKs および p38 キナーゼを含むMAPキナーゼスーパーファミリーは3つのシグナル伝達カスケードを織り成しています。これらのキナーゼ群は、有糸分裂誘起物質、成長因子や様々な形のストレスに応答し、転写因子をリン酸化して活性化します。ERK, JNK および p38 は、MEK として知られる MAP キナーゼ・キナーゼにより活性化され、pTXpY 配列上のスレオニンとチロシン残基がリン酸化されます。このように ERK、JNK および p38 が最大に活性化されるにはスレオニンおよびチロシン両方のリン酸化が必要です。

ERK( Extracellular signal-Regulated protein Kinase) ファミリーとして5つのアイソフォームERK1 ~ ERK5 が報告されています。JNK (c-Jun N-terminal Kinase) は SAPK とも呼ばれており、転写因子 c-Jun (AP1) をリン酸化します。JNK の主要なアイソフォームは p46/JNK1, p54/JNK2, p49/JNK3 (3) で、最大 10 種類のスプライシング産物の存在が考えられています (4)。p38 の場合、そのタンパク質はもともと CSBP (Cytokine-Suppressive anti-inflammatory drug Binding Protein) と呼ばれていました。また、酵母の p38 ホモログである HOG (High Osmolarity Glycerol response) の特徴が示されました。p38 は ATF (Activating Transcription Factor) をリン酸化します。p38 のアイソフォームは p38, p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$  と呼ばれ、SDS-PAGE においてわずかな移動度の違いを示します (5)。

JNK/SAPK および p38/HOG 経路は紫外線 (UV)、サイトカイン、浸透圧ショックを与える試薬 (ソルビトールなど)、タンパク質合成阻害剤 (アミノマイシンなど) また、程度は落ちますが成長因子によっても活性化されます。この調節物質の幅広さは、この酵素が様々なストレス応答を変換する働きのある酵素であることを物語っています。これらのシグナルは細胞膜結合レセプターから様々な低分子量 GTP 結合タンパク質 (JNK, p38 の場合 Cdc42, Rac など (6)) を経由して、MEK キナーゼ (MEKKs) レベルに達し、さらに MEK へと伝達されます。次に JNK、p38 は、それぞれに対応するキナーゼ MEK4/7 および MEK3/6 により活性化されますが、MEK の活性化は刺激と細胞のタイプ両方に依存します (7)。例えば、B 細胞における極度の一過性カルシウムイオン濃度上昇は MEK4/7 および JNK を活性化することが示されています (低レベルに維持された  $Ca^{2+}$  濃度では起こらない) (8)。JNK および p38 のホモログは系統発生的レベルで広く異なる生物種において見つかっています。Drosophila (ショウジョウバエ) においては *basket (bsk)* 遺伝子が、順調な胚発生 (9) や免疫応答 (10) に必須の JNK ホモログをコードしています。酵母の場合、p38/HOG ホモログの経路が浸透圧ショックにより活性化し、Pbs2p と呼ばれる MEK により制御されます (11)。

Anti-ACTIVE<sup>®</sup> 抗体は ERK2 の pTEpY (12)、p38 の pTGpY、JNK2 の pTPpY の各モチーフを包含する合成ペプチドを免疫原として作成されました。3種類全ての抗体は2段階のアフィニティー精製工程を経ています。まず、非リン酸化型のペプチドを用いた特異性の低い抗体のトラップ/除去を行い、次に活性化型酵素由来の2重リン酸化型ペプチドを用いた陽性イムノアフィニティー選別を行います。この結果、最終的な調製抗体は各キナーゼの pTXpY 配列 (活性化型) に特異的なものとなります。図1にAnti-ACTIVE<sup>®</sup> MAPK, JNK および p38 pAbs を用いたウエスタンブロットング分析結果を示します。



**図 1. Anti-ACTIVE® MAPK, JNK および p38 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングによる PC12 細胞抽出液の活性化 MAPK, JNK および p38 の検出**

PC12 細胞は 25mM HEPES, 0.5mM EGTA, 10% ウマ血清, 5% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 60-80% のコンフルエントとなるように培養した。無処理の細胞と図に示したように 50ng/ml nerve growth factor (NGF) で 5 分間または 0.5M ソルビトールで 5 分間の処理の細胞を用いた。細胞を回収、ホモジナイズし、高速遠心を行った (7)。この上清を -70 °C の保存した。分注したそれぞれの抽出液を SDS-PAGE (変性条件下の 10% ゲル) で解析し、ニトロセルロースメンブランに転写した。図中に示した Anti-ACTIVE® pAb (上段) とそれぞれのキナーゼのサブファミリーの活性化型および不活性化型の両方を認識する抗体 (下段) でメンブランを処理した。JNK において、両方のフォームを検出する抗体は、ラット由来の全 JNK 酵素に対して産生されている。一方、p38 と ERK1 および ERK2 の抗体は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列の一部から得られた合成ペプチドに対して産生されている。2 次抗体は Promega の Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP, Anti-ACTIVE® Qualified conjugate (カタログ番号 V7971) を用いた。化学発光の検出は Tropix Western-Star™ Kit と Kodak® BioMax® film を用い、これら製品のマニュアルにしたがって行った。

レーン 1, 5, 9: 2µg の無処理の PC12 細胞抽出液; レーン 2, 6, 10: 2µg の NGF 刺激した PC12 細胞抽出液; レーン 3, 7, 11: 20µg の無処理の PC12 細胞抽出液; レーン 4, 8, 12: 20µg のソルビトール処理した PC12 細胞抽出液。

## IV. Anti-ACTIVE® pAbs を用いたウエスタンブロッティング分析

図2はAnti-ACTIVE® pAbsを用いたウエスタンブロッティング分析の方法概要です。この方法はこれまでの様々な実験系で強いシグナルと非常に低いバックグラウンドを示す結果を得ています。しかし、個々の実験系で最良の結果を出すためには、いくつかのポイントで最適化を要する場合があります。

Anti-ACTIVE® MAPK, JNK および p38 pAbsの陽性および陰性コントロールとしてPC12細胞抽出液がプロメガからご利用いただけます。

### 本製品以外に実験前に準備するもの

(溶液の組成についてはセクション VI を参照のこと)

- HRP 発色検出の場合 : TMB reagent (KPL カタログ番号 50-77-00)
- AP発色検出の場合: Western Blue® Stabilized (Promega カタログ番号 S3841)
- HRP 化学発光検出の場合 : ECL™ detection (Amersham Pharmacia カタログ番号 RPN 2109)
- AP 化学発光検出の場合 : Western- Star™ substrate (Tropix カタログ番号 WL10RS)
- 2次抗体 [Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP, Anti-ACTIVE® Qualified, (Promega カタログ番号 V7951)、または Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP, Anti-ACTIVE® Qualified, (Promega カタログ番号 V7971)]

### A. Anti-ACTIVE® pAbs による抗体反応

1. SDS-PAGE分析を行った後、ニトロセルロースまたはPVDFメンブレンに転写する。
2. **ニトロセルロースメンブレン** : TBS buffer/1% BSA で1時間、37°C または O/N、4°C でブロッキングする。  
**PVDF メンブレン** : PVDF buffer で1時間、37°C または O/N、4°C でブロッキングする。
3. メンブレンを抗体とともにインキュベートするために1次抗体を調製する。推奨希釈倍率は次の通りです。  
Anti-ACTIVE® MAPK pAb (カタログ番号 V8031) の場合 5000 倍  
Anti-ACTIVE® JNK pAb (カタログ番号 V7931, V7932) の場合 5000 倍  
Anti-ACTIVE® p38 pAb (カタログ番号 V1211) の場合 2000 倍  
**ニトロセルロースメンブレン** : TBST/0.1% BSA で希釈した Anti-ACTIVE® pAb を振盪しながら室温で2時間インキュベートする。  
**PVDF メンブレン** : PVDF buffer で希釈した Anti-ACTIVE® pAb を振盪しながら室温で2時間インキュベートする。
4. **ニトロセルロースメンブレン** : TBST buffer 75ml を用いて15分づつ3回洗浄する(各洗浄ごとに液体をデカントし、新しいバッファーを加える)。  
**PVDF メンブレン** : PVDF buffer 75ml を用いて15分づつ3回洗浄する(各洗浄ごとに液体をデカントし、新しいバッファーを加える)。

**備考:** 実験系によって抗体の希釈倍率を最適化する必要があるかもしれません。

5. メンブレンを抗体とともにインキュベートするために2次抗体を調製する。  
Anti-ACTIVE® Qualified Donkey Anti-Rabbit antibody conjugateの推奨希釈倍率は5,000 ~ 10,000倍です。  
**ニトロセルロースメンブレン**: TBST/0.1% BSA で希釈した Donkey Anti-Rabbit Antibody conjugateを振盪しながら室温で1時間インキュベートする。  
**PVDF メンブレン**: PVDF buffer で希釈した Donkey Anti-Rabbit conjugateを振盪しながら室温で2時間インキュベートする。
6. **ニトロセルロースメンブレン**: TBST buffer 75ml を用いて15分づつ3回洗浄し、TBS buffer 1分づつ2回すすぐ(各洗浄/すすぎごとに液体をデカントし廃棄)。  
**PVDF メンブレン**: PVDF buffer 75ml を用いて15分づつ3回洗浄し、TBS buffer 1分づつ2回すすぐ(各洗浄/すすぎごとに液体をデカントし廃棄)。

備考: 実験系によって2次抗体の希釈倍率を最適化する必要があるかもしれません。

## B. 検出方法

ニトロセルロースメンブレンおよびPVDFメンブレンについてそれぞれ2種類の検出方法がお選びいただけます。発色検出法または化学発光検出法のいずれかを選んで以下のプロトコルに従ってください。

**発色検出法**: ニトロセルロースまたはPVDFメンブレンとも、適度なシグナルが得られるまでインキュベートする。

**化学発光検出法 (HRP)**: ニトロセルロースまたはPVDFメンブレンとも、1分間 ECL™ Detection Reagent に浸漬し、フィルムに感光する。

**化学発光検出法 (AP)**: ニトロセルロースまたはPVDFメンブレンとも、5分間 Tropix Western- Star™ Substrate に浸し、余分な試薬を除去した後フィルムに感光する。

**A. ニトロセルロース**

SDS-PAGE 後、ニトロセルロースメンブレンに転写



TBS/1%BSA で1時間(37 )または O/N(4 )でニトロセルロースメンブレンをブロッキング



TBST/0.1%BSA で希釈した Anti-ACTIVE® pAb を添加し、振盪しながら室温で2時間インキュベート



TBST 75ml で3回(15分づつ)メンブレンを洗浄(洗浄液は毎回デカントして廃棄)



TBST/0.1%BSA で希釈(1:5,000 ~ 1:10,000)した Anti-ACTIVE® qualified Donkey Anti-Rabbit Antibody conjugate を添加し、振盪しながら室温で1時間インキュベート



TBST 75ml で3回(15分づつ)メンブレンを洗浄し、TBS で2回(1分づつ)すすぐ(洗浄液は毎回デカントして廃棄)



**発色検出**

適度なシグナルが得られるまで検出試薬とインキュベート  
**HRP**: KPL TMB Reagent  
**AP**: Promega の Western Blue® Substrate

**化学発光検出**

**HRP**: メンブレンを ECL™ Detection Reagent 中で1分間浸し、フィルムに感光  
**AP**: メンブレンを Tropix Western-Star™ Substrate で5分間浸し、余分な試薬を除いて、フィルムに感光

**B. PVDF**

SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンに転写



TBS/1%BSA で1時間(37 )または O/N(4 )で PVDF メンブレンをブロッキング



PVDF Buffer で希釈した Anti-ACTIVE® pAb を添加し、振盪しながら室温で2時間インキュベート



PVDF Buffer 75ml で3回(15分づつ)メンブレンを洗浄(洗浄液は毎回デカントして廃棄)



PVDF Buffer で希釈(1:5,000 ~ 1:10,000)した Anti-ACTIVE® qualified Donkey Anti-Rabbit Antibody conjugate を添加し、振盪しながら室温で1時間インキュベート



PVDF Buffer 75ml で3回(15分づつ)メンブレンを洗浄し、TBS で2回(1分づつ)すすぐ(洗浄液は毎回デカントして廃棄)



**発色検出**

適度なシグナルが得られるまで検出試薬とインキュベート  
**HRP**: KPL TMB Reagent  
**AP**: Promega の Western Blue® Substrate

**化学発光検出**

**HRP**: メンブレンを ECL™ Detection Reagent 中で1分間浸し、フィルムに感光  
**AP**: メンブレンを Tropix Western-Star™ Substrate で5分間浸し、余分な試薬を除いて、フィルムに感光

**図 2. Anti-ACTIVE® pAbs を用いたウエスタンブロッティングの簡易プロトコル (ニトロセルロース / PVDF メンブレン)**

ニトロセルロースを用いたプロトコル (パネル A) と PVDF (パネル B) メンブレン。Anti-ACTIVE® pAbs の推奨希釈倍率 (Anti-ACTIVE® MAPK pAb:5,000倍、Anti-ACTIVE® p38 pAb:2,000倍、Anti-ACTIVE® JNK pAb:5,000倍、Anti-ACTIVE® Qualified Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary anti-bodies HRP または AP:10,000倍)。KPL = Kirkegaard and Perry Laboratories

**備考:** 実験系によって1次抗体、2次抗体の希釈倍率を最適化する必要があるかもしれません。また、プロメガの2次抗体以外のものを使ってみるのも1つの方法です。

## V. Anti-ACTIVE® pAbs を用いた免疫細胞染色法

### 本製品以外に実験前に準備するもの

(溶液の組成についてはセクション VI を参照のこと)

- Lab Tek® 4-チャンバースライド (Fisher カタログ番号 12-565-21)
- rat tail コラーゲン (Collaborative BioScience Products)
- RPMI 1640 (25mM HEPES, 300mg/L L-glutamine, 10% ウマ血清, 5% ウシ胎児血清 および 0.5mM EGTA を含む)
- NGF (Promega カタログ番号 G5141) またはソルビトール
- PBS
- 10% パラホルムアルデヒド
- メタノール (-20°C)
- ブロッキングバッファー (1% BSA, 5% ロバ血清を含むPBS)
- Donkey Anti-Rabbit Cy™3 conjugate (Jackson ImmunoResearch カタログ番号 741-165-152)

以下の手順はMAP キナーゼを活性化させるためにNGFを、JNKおよびp38を活性化させるためにソルビトールをそれぞれ加えたPC12細胞における調製/免疫染色法です。図3には各Anti-ACTIVE® pAbsで免疫細胞染色したPC12細胞の染色像を示しています。

1. Lab Tek® 4-チャンバースライドを滅菌PBSに溶解したrat tail コラーゲン (6µg/cm<sup>2</sup>) で1時間コートする
2. PC12細胞をRPMI 1640培地 (25mM HEPES, 300mg/L L-グルタミン, 10% ウマ血清, 5% ウシ胎児血清 および 0.5mM EGTA を含む) の入ったチャンバー内で培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。細胞密度が80%になるまで、培地を毎日交換する
3. 2つのチャンバー内の細胞を以下の要領で活性化し、残りの2チャンバーの細胞は未処理のコントロールとして使用する

#### ERK 活性化のための NGF 処理

免疫細胞染色を行う前日、血清を含む新鮮な培地を加え、当日にNGF (200ng/ml) を含むRPMIを加えて37 °Cで5分間インキュベート

#### JNK および p38 活性化のためのソルビトール処理

免疫細胞染色を行う前日、血清を**含まない**新鮮な培地を加え、当日にソルビトールを終濃度1Mになるように加えて37 °Cで30分間インキュベート

4. 冷たいPBSで1回洗淨する
5. 10% パラホルムアルデヒドで細胞を固定 (30分間、室温) する
6. PBSで各5分間、3回洗淨する
7. 細胞を冷たい (-20°C) メタノールで10分間透過処理を行う
8. PBSで各5分間、3回洗淨する
9. ブロッキングバッファー (1% BSA, 5% ロバ血清を含むPBS) で3時間、室温でインキュベートする



10. PBS で1回、5分 洗浄する。
11. Dilution buffer (1% BSA, 1% ロバ血清を含む PBS) で希釈した Anti- AC-TIVE® pAbと4 でO/Nインキュベート(推奨希釈倍率: MAPKは500倍、JNKは1,000倍、p38は500倍)する。
12. PBS で各15分間、5回洗浄する。
13. Dilution buffer (1% BSA, 1% ロバ血清を含む PBS) で1,000倍に希釈した Donkey Anti-Rabbit Cy™3 Conjugateとともに90分間、室温でインキュベートする。
14. PBS で各15分間、5回洗浄する。
15. グリッドを外し、DAPIを含む Vectashield® でスライドをマウントする。

**備考:** 実験系によって1次抗体、2次抗体の希釈倍率を最適化する必要があるかもしれません。

## VI. バッファーおよび溶液の組成

### 10% パラホルムアルデヒド

5g パラホルムアルデヒド  
50ml PBS

フュームフード(ドラフト)内で75 に暖めて溶解するまで攪拌し、室温まで冷ました後、水で50mlにメスアップ(温めている間に水分が蒸発するため)

### TBS buffer

20mM Tris-HCl (pH 7.5)  
150mM NaCl

### PVDF buffer

0.2% I-Block™ (Tropix, Inc.) および  
0.1% Tween® 20を含むTBS buffer

### TBST buffer

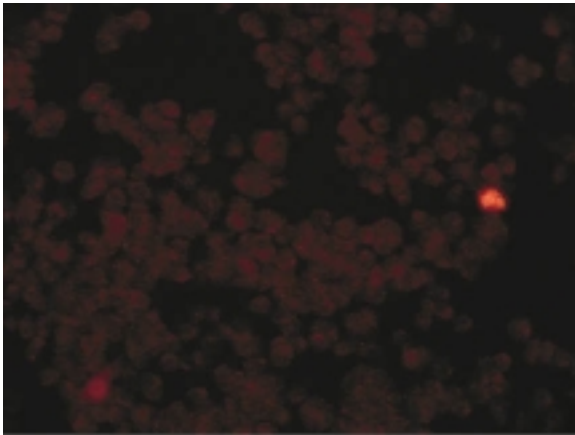
0.05% Tween® 20を含むTBS buffer

## VII. 関連製品の紹介

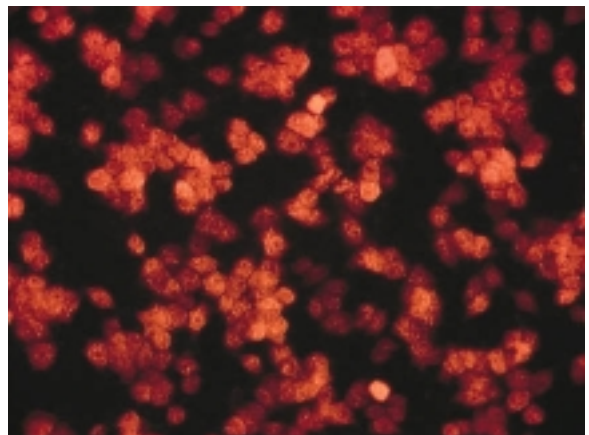
製品名	サイズ	カタログ番号
Anti-ERK 1/2 pAb, Rabbit	40µl	V1141
Anti-pT <sup>183</sup> MAPK pAb, Rabbit	50µl	V8081
PC12 Cell Extracts, Western Control - Sorbitol/Untreated	10blots	V8100
PC12 Cell Extracts, Western Control - NGF/Untreated	10blots	V8110
MEK Inhibitor U0126	5mg	V1121
PD 98059 (inhibitor for MEK1)	5mg	V1191
SB 203580 (inhibitor for p38)	1mg	V1161

**A. Anti-ACTIVE® MAPK pAb**

未処理

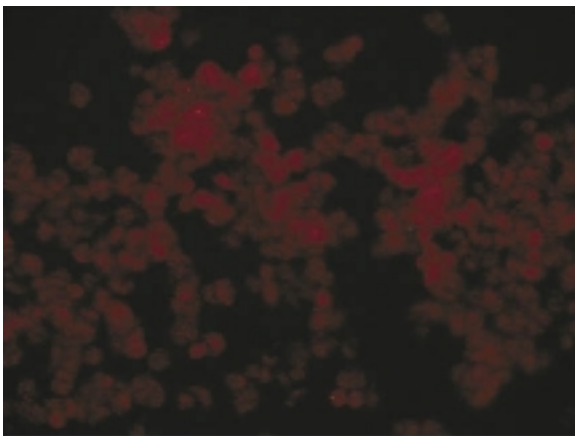


NGF 処理

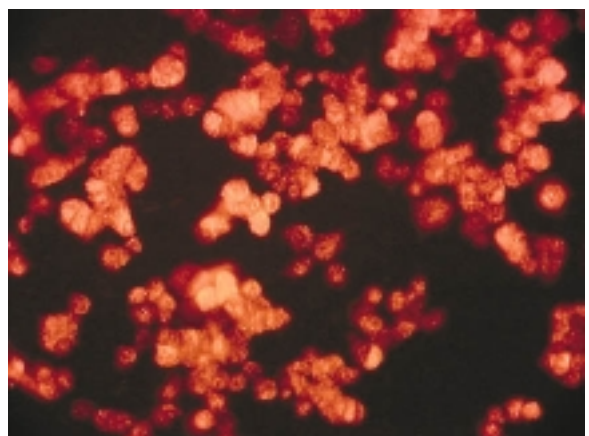


**B Anti-ACTIVE® JNK pAb**

未処理

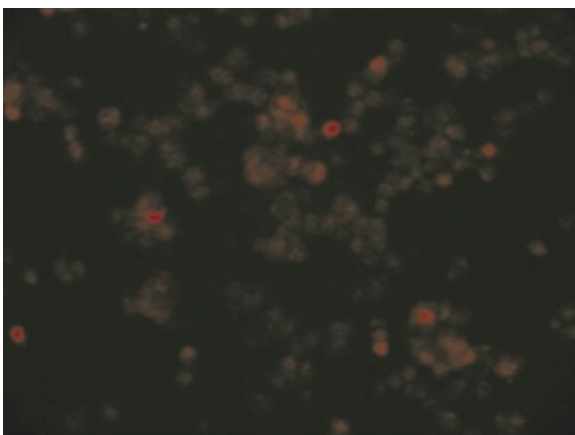


ソルビトール処理

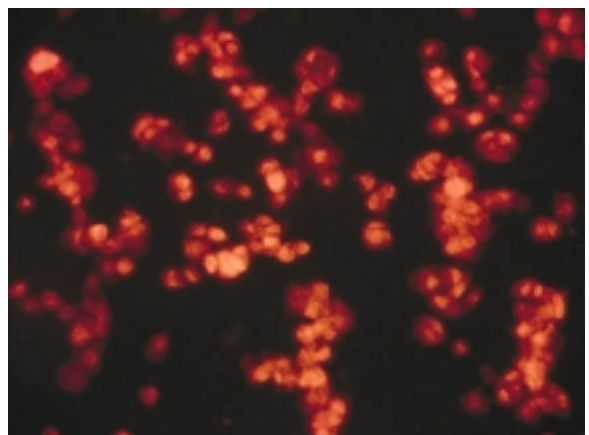


**C Anti-ACTIVE® p38 pAb**

未処理



ソルビトール処理



**図 3. 免疫細胞染色による PC12 細胞における活性化型 MAPK, JNK, p38 の検出 (ICC)**

PC12 細胞は RPMI 培地 (25mM HEPES, 300mg/L L- グルタミン, 10% ウマ血清, 5% ウシ胎児血清および 0.5mM EGTA を含む) で 80% コンフルエンスになるまで培養した。細胞は 200ng/ml NGF または 1M ソルビトールで処理 (または未処理) した。免疫細胞染色の方法については製品に添付のプロトコルに従った。各 Anti-ACTIVE® pAb の希釈倍率は、MAPK : 500 倍 (A)、JNK : 1,000 倍 (B)、p38 : 500 倍 (C)。

## VI. 参考文献

1. Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726.
2. Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* **20**, 117.
3. Kyriakis, J.M. *et al.* (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156.
4. Gupta, S. *et al.* (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**, 2760.
5. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. and Han, J. (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **228**, 334.
6. Lamarche, N. *et al.* (1996) Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65 PA K and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519.
7. Meier, R. *et al.* (1996) Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**, 796.
8. Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. and Healy, J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855.
9. Riesgo-Escovar, J.R., Jenni, M., Fritz, A. and Hafen, E. (1996) The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev.* **10**, 2759.
10. Sluss, H.K. *et al.* (1996) A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila. *Genes Dev.* **10**, 2745.
11. Posas, F. and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702.
12. Payne, D.M. *et al.* (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**, 885.
13. Derijard, B. *et al.* (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025.

© 1998–2000 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Anti-ACTIVE and Western Blue are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

BioMax and Kodak are registered trademarks of Eastman Kodak. Cy and ECL are trademarks of Amersham Pharmacia Biotech, Ltd. Lab-Tek is a registered

trademark of Nalge-Nunc International. Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc. I-Block and Western- Starare trademarks of Tropix,

Inc. Vectashield is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc.