**Estrazione Metanolo/Cloroformio**

(metodica per rimuovere sali e detergenti)

Questa procedura viene applicata alle frazioni di un gradiente di saccarosio ( step gradient 5%-30%-40% saccarosio in 25mM MES pH 6.5 + NaCl 0,15 M ) per precipitare le proteine contenute nelle diverse frazioni. La percentuale di saccarosio parte da 5% della prima frazione, e aumenta gradualmente fino a 30% dell’ultima frazione che noi analizziamo.

Il volume di ciascuna frazione è di 375µl

* ad campione si aggiungono 4 volumi di metanolo
* mescolare bene (vortex)
* aggiungere 1 volume di cloroformio . Vortex
* aggiungere 3 volumi di H2O. Vortex
* centrifugare per 1 minuto a 14,000 g
* rimuovere la fase acquosa superiore ( le proteine si trovano nell’interfase )
* aggiungere 4 volumi di metanolo. Vortex
* centrifugare 2 minuti a 14,000g
* rimuovere tutto il metanolo possibile (LIPIDI) senza perturbare il pellet
* seccare il pellet (lasciare asciugare all’aria)
* risospendere in 2x sample buffer per PAGE
* incubare almeno 1 ora a 65°C per favorire la risospensione delle proteine.