

## **METHANOL-CHLOROFORM-FÄLLUNG VON PROTEINEN**

**NACH WESSEL UND FLÜGGE** (*Anal. Biochem.* 1984, 138 (1): 141 – 143)

### **1. ALLGEMEINES**

Bei dieser Fällungsmethode bilden sich Proteinpräzipitate zwischen der oberen, wässrigen Schicht, und der unteren, organischen Schicht. In der wässrigen Phase befinden sich Nukleinsäuren, Salze, Detergenzien, reduzierende Agenzien etc. Die organische Phase (Chloroform/Methanol) enthält Lipide. Somit können mit dieser Methode Proteine angereichert und von störenden Verunreinigungen, wie z. B. Lipide und Nukleinsäuren getrennt werden.

### **2. BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE**

- Chloroform (SERVA Kat.-Nr. 45627)
- Methanol (SERVA Kat.-Nr. 45631)
- Destilliertes Wasser (dest. H<sub>2</sub>O)
- Geeignete Probengefäße, z. B. 1,5- oder 2,0 ml-Reaktionsgefäße
- Vortex-Mischer
- Mikrozentrifuge, z. B. SERVA BlueSpin Mini

### **3. DURCHFÜHRUNG**

**Bitte beachten Sie:** Das nachfolgende Protokoll ist für 1,5 ml- Reaktionsgefäße angepasst. Falls notwendig, können Sie die angegebenen Mengen entsprechend vergrößern.

- Legen Sie **150 µl Proteinprobe (Proteingehalt 50 – 300 µg)** in einem 1,5 ml-Tube vor. Falls notwendig, kann die Probe entsprechend verdünnt werden. Verwenden Sie hierzu den Puffer, den Sie für die Probenherstellung eingesetzt haben.
- Geben Sie anschließend **600 µl Methanol** sowie **150 µl Chloroform** zu und mischen gründlich mit einem Vortex-Mischer.
- Danach geben Sie **450 µl dest. H<sub>2</sub>O** zu und mischen nochmals gründlich.
- **5 min** Zentrifugation bei **mind. 12.300 xg**
- Trennen Sie die obere, wässrige Phase vorsichtig ab, ohne die weißen Proteinpräzipitate an der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase zu zerstören.
- Danach geben Sie **450 µl Methanol** zu und mischen nochmals gründlich.
- Sedimentieren Sie das Protein: **5 min** Zentrifugation bei **mind. 12.300 xg**
- Trennen Sie nun den Überstand vorsichtig vom Proteinpellet ab. Beachten Sie hierbei, dass sich das Pellet nicht löst. Markieren Sie hierzu die Pellet-Position an der Außenseite des Reaktionsgefäßes.
- Um restlichen Überstand vollständig zu entfernen, zentrifugieren Sie erneut (**5 min** bei **mind. 12.300 xg**) und entfernen die Flüssigkeit vorsichtig.
- Das Protein-Pellet wird anschließend ca. 10 min luftgetrocknet. Alternativ kann auch eine Speed-Vac verwendet werden.

**WICHTIG:** Das Pellet sollte nicht zu trocken werden, da ansonsten vollständiges Lösen sehr schwierig ist. Außerdem können Reste von Methanol und Chloroform bei nachfolgender DIGE-Markierung stören.

## **METHANOL-CHLOROFORM PRECIPITATION OF PROTEINS** **ACCORDING TO WESSEL AND FLÜGGE** (*Anal. Biochem.* 1984, 138 (1): 141 – 143)

### **1. GENERAL INFORMATION**

The protein precipitates form at the interphase between the top aqueous layer and the organic (chloroform/methanol) bottom layer. The aqueous layer contains nucleic acids, salts, detergents, reducing agents etc. The organic layer contains lipids. This protocol is suitable for both, protein enrichment and removal of interfering molecules, e.g. lipids and nucleic acids.

### **2. REQUIRED REAGENTS AND DEVICES**

- Chloroform (SERVA cat. no. 45627)
- Methanol (SERVA cat. no. 45631)
- Distilled water (dist. H<sub>2</sub>O)
- Suitable sample tubes, e.g. 1.5- or 2.0 ml-tubes
- Vortex
- Microcentrifuge, e.g. SERVA BlueSpin Mini

### **3. PROTOCOL**

**Please note:** This protocol is for 1.5 ml-tubes. If necessary, scale up is possible.

- Pipette **150 µl of the protein sample (protein content 50 – 300 µg)** in a 1.5 ml-tube. To make up the volume of 150 µl, you may add the required amount of sample buffer used to prepare the protein sample.
- Add **600 µl methanol** and **150 µl chloroform** and mix thoroughly by vortexing.
- Add **450 µl dist. H<sub>2</sub>O** and mix well by vortexing.
- Centrifugation: **5 min at min. 12,300 xg**
- Remove the upper aqueous phase carefully, without disturbing the white protein precipitate formed between the two phases.
- Add **450 µl methanol** and mix well by vortexing.
- Pellet the protein by centrifugation: **5 min at min. 12,300 xg**
- Remove the supernatant completely. Be careful not to lose the pellet. For easier visibility, mark the position on the outside of the tube.
- Centrifuge again (**5 min at min. 12,300 xg**) to collect residual chloroform/methanol at the bottom of the tube. Remove the supernatant carefully.
- Air-dry the protein pellet. Alternatively use a speedvac for approx. 10 min.

**IMPORTANT:** The pellet should not be completely dry because dissolving will be easier afterwards. Traces of chloroform and methanol may interfere with DIGE labeling.