



## Arbeitsunterlagen zum Beispiel

# SDS-PAGE - ELEKTROPHORESE

Stand: Oktober 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einige wichtige Sicherheitsregeln .....</b>	<b>3</b>
<b>Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	4
SDS-PAGE: was bedeutet das? .....	4
Probenvorbereitung für die SDS-PAGE .....	5
Störungsfaktoren in der SDS-PAGE .....	5
Detektion der Proteine .....	6
Bestimmung der Größe eines Proteins .....	6
Was passiert nach der Elektrophorese? .....	7
<b>Material und Durchführung .....</b>	<b>8</b>
Lösungen für die Elektrophorese .....	8
Polyacrylamidgel .....	8
Mischen & Giessen des Gels .....	8
Probenpuffer zur Vorbereitung der Proben .....	9
Probenvorbereitung .....	9
Die Elektrophoreseapparatur (Biorad Mini PROTEAN 3) .....	10
Laufpuffer: .....	11
Fixierlösung: .....	11
Färbelösung: .....	11
Entfärbelösung: .....	11
Probenauftrag und Elektrophorese .....	11
Starten der Elektrophorese .....	12
Ende der Elektrophorese .....	12
Fixieren, Färben und Entfärben .....	12
Bestimmen der Molmassen anhand eines Proteinstandards .....	13
<b>Anhang .....</b>	<b>14</b>
Proteinfällung für Elektrophorese .....	14

## **Einige wichtige Sicherheitsregeln**

### **Acrylamid ist giftig !!**

(Besonders heikel: Staub beim Einwiegen von Acrylamid,  
Acrylamidlösungen werden vom Laboranten hergestellt!)

Sehr heikel: Das Mischen der Gellösungen.

Regel 1: Beim Pipettieren und Giessen des Gels Handschuhe tragen.

Regel 2: peinlich darauf achten, den Arbeitsplatz sauber zu halten. Überlegen, wo man benutzte Pipetten und Spitzen werfen kann (eigenes WASTE - Gefäß bereitstellen, z.B. großes Becherglas).

Die überschüssige Gellösung in der Saugflasche polymerisieren lassen, erst dann werfen, denn das polymerisierte Gel ist weniger heikel. Da es aber immer noch Reste an Acrylamid enthält darf es daher auch nicht mit bloßen Händen angefasst werden.

### **Wir arbeiten mit Hochspannung !!**

Der Arbeitsplatz muss trocken sein. Bedacht und Sorgfalt bei der Bedienung des Spannungsgebers walten lassen. Bei eingeschalteter Spannung nicht an der Elektrophoreseapparatur herumfummeln.

### **Die Apparatur ist teuer**

Die Platinelektroden und die Glasplatten können leicht beschädigt werden, wenn sie nicht mit dem nötigen Fingerspitzengefühl behandelt werden. Damit Sie und Ihre Kollegen arbeiten können, ist es wichtig, größte Vorsicht walten zu lassen.

## Grundlagen

Bei einer elektrophoretischen Trennung sprechen wir im Allgemeinen von einer Separation geladener Probemoleküle in einer bestimmten Gelmatrix mittels eines elektrischen Feldes. Abhängig von der jeweils aufzutrennenden Probe werden die spezifischen Parameter wie Art des Gels, der Probenvorbereitung und der (in der Regel visuellen) Detektion der Probe gewählt. In weiterer Folge wird dieses Skriptum einerseits eine kurze Übersicht über die unterschiedlichen Möglichkeiten der Elektrophorese von Proteinen geben, aber auch als Arbeitsanleitung für die Übungen dienen.

Im Rahmen des Beispiels "SDS-PAGE" werden Sie neben Standardproteinen auch eigene, von Ihnen in den vorausgegangenen Übungsteilen produzierte und charakterisierte Proteinextrakte auftrennen.

### Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Im Gegensatz zur SDS-PAGE, wo aufgrund des SDS die Eigenladung der Proteine praktisch keine Rolle für die Separation spielt, wird bei der IEF die Eigenladung gezielt ausgenutzt, um Proteine voneinander zu separieren. Das IEF-Gel ist ein sehr schwach polymerisiertes Gel in dem ein pH-Gradient eingebettet ist. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine in diesem Gel bis zu jenem pH-Bereich, an dem die Nettoladung der Proteine 0 ist (isoelektrischer Punkt). Nachdem das Protein nun nach außen keine Ladung mehr aufweist, ist eine weitere Wanderung im Gel unterbunden und somit das jeweilige Protein in einem bestimmten pH-Bereich fokussiert. Nach der IEF kann das Gel entweder gefärbt werden oder aber das IEF-Gel stellt den "Anfang" für eine SDS-PAGE dar. Wenn die IEF der SDS-PAGE vorausgegangen ist, sprechen wir von einer zweidimensionalen Elektrophorese (2D-PAGE).

### SDS-PAGE: was bedeutet das?

SDS-PAGE steht für "**S**odium **D**odecyl **S**ulfate – **P**oly**A**crylamid **G**el **E**lectrophoresis". In der Regel wird die SDS-PAGE in Gelen auf Polyacrylamidbasis durchgeführt. Je nachdem, in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen können Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid verwendet werden. In der Regel erreicht man eine gute Auftrennung über einen weiten Größenbereich bei der Verwendung von 12-14%igen Gelen. Es sind aber auch so genannte Gradientengele erhältlich, die unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid (z.B. 4-15%) über den gesamten Trennungsbereich aufweisen und so ein sehr breites Größenspektrum von Proteinen

abdecken können. Im Rahmen des Beispiels "SDS-PAGE" verwenden wir keine gekauften oder Gradientengele, sondern selbst gemixte und gegossene Gele.

In der Regel bestehen SDS-PAGE Gele aus zwei Gelen: einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Sammelgel ist ein schwächer konzentriertes Gel und dient, wie der Name schon sagt, zum "Sammeln" der gesamten aufgetragenen Probe um allen Probemolekülen den selben "Startpunkt" für die Trennung zu ermöglichen. Das ist wichtig, damit Proteine mit gleichem Migrationsverhalten nach der Trennung im Trenngel als einzelne klare Bande erscheinen. Die Rolle des Trenngeles erklärt sich von selbst.

### **Probenvorbereitung für die SDS-PAGE**

Die Probenvorbereitung ist ein essentieller Schritt für den Erfolg der SDS-PAGE. Da im Gegensatz zur IEF (siehe oben) die Eigenladung der Proteine keinen Einfluss auf die Trennung haben soll, ist die vollständige "Ummantelung" der Proteine mit SDS essentiell, um so allen Proteinen eine negative Ladung zu verleihen.

Das Wanderungsverhalten eines Proteins im Gel wird wesentlich von seiner Größe bestimmt. Proteine mit sehr ähnlicher Anzahl an Aminosäuren können aufgrund ihrer spezifischen Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur durchaus unterschiedliche Größen als aktives Protein aufweisen. Dies ist jedoch bei der SDS-PAGE wenig förderlich, wenn man unbekannte Proben miteinander vergleichen und die ungefähre Größe von Proteinen mittels dieser Methode bestimmen möchte. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten ist es wesentlich, dass die Proteine vor der Trennung alle in eine möglichst gleiche Form gebracht werden. D.h. jegliche Parameter neben der Eigenladung wie z.B. Faltung und Struktur sollen so wenig wie möglich das Wanderungsverhalten der Proteine im Gel beeinflussen. Das erreichen wir einerseits durch Denaturierung mittels SDS und Hitze. Jedoch werden dadurch kovalente Sekundärstrukturen wie Cysteinbrücken nicht zerstört und die jeweiligen Proteine weisen somit immer noch eine Art von Faltung auf. Um auch Proteine mit Cysteinbrücken in lineare Polypeptidketten umzuwandeln ist es wesentlich ein so genanntes Reduktionsmittel bei der Probenvorbereitung zu verwenden (z.B.: Dithiothreitol oder Mercaptoethanol).

Durch das Zusammenspiel von SDS, Hitze und dem Reduktionsmittel werden nun alle Proteine in der Probe vollständig denaturiert, linearisiert und mit einer Hülle aus negativ geladenen SDS-Molekülen versehen.

### **Störungsfaktoren in der SDS-PAGE**

Ein wesentlicher Störfaktor in der SDS-PAGE ist zuviel Salz in der Probe. Dieses verhindert die Anlagerung von SDS an die Proteine. Deshalb sollte die Probe eine geringe bis gar keine Salzkonzentration aufweisen.

Außerdem spielt die Menge an aufgetragenem Protein eine wesentliche Rolle für die Auswertung. Wenn zuviel Protein aufgetragen wird, wird die Trennung schlechter und außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit, dass weniger prominente Proteine durch die sehr stark vorkommenden überdeckt werden. Wird zu wenig Protein aufgetragen, macht das die Auswertung mangels sichtbarer Banden quasi unmöglich. Deshalb ist die Bestimmung der Proteinkonzentration vor der SDS-APGE erforderlich (erfolgt im Beispiel "Proteinbestimmung"), um sich in weiterer Folge die benötigte Menge an Probe für die SDS-PAGE zu errechnen. Als Faustregel sollten (bei SDS-PAGE mit Commassiefärbung) etwa zwischen 0.5 – 20 µg Protein pro Lane aufgetragen werden, um gute Ergebnisse zu erzielen. Werden aber andere Färbemethoden gewählt, muss die eingesetzte Proteinmenge der Empfindlichkeit der jeweiligen Färbemethode angepasst werden.

### **Detektion der Proteine**

Für den Erfolg der Elektrophorese ist die Visualisierung der Proteine ebenso wichtig wie die Probenvorbereitung und Elektrophorese selbst. Dafür werden die Proteine in der Regel nach erfolgter Trennung gefärbt. Dies erfolgt im Rahmen des Elektrophoresebeispiels mit dem Farbstoff Coomassieblau, der sich unspezifisch an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert. Andere weit verbreitete Färbemethoden sind z.B. die Silberfärbung oder die Färbung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, um nur einige zu nennen. Jede dieser Färbungen hat einen bestimmten Empfindlichkeitsbereich, auf den bei der Bestimmung der Proteinmenge Rücksicht genommen werden muss. Die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen gehört zu den empfindlichsten Methoden, die aber aufgrund der relativ hohen Anschaffungskosten nur in bestimmten Fällen angewandt wird. Im Laboralltag gehören die Färbung mit Coomassie und Silber zu den am häufigsten verwendeten.

Neben den Färbemethoden können Proteine auch noch mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden, wenn sie zuvor radioaktiv markiert wurden. Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgt in der Regel nachdem die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert wurden (Western-blot) und nach bestimmten Protokollen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

### **Bestimmung der Größe eines Proteins**

Die Bestimmung der Größe der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgt mit Hilfe eines Standards, der Proteine bekannter Größe enthält. Darüber hinaus dient dieser Standard auch der "Überprüfung", da wir somit kontrollieren können, ob alle Schritte richtig gemacht wurden und die Proteine im Gel richtig aufgetrennt und sichtbar gemacht worden sind.

## Was passiert nach der Elektrophorese?

Während bei den biochemischen Übungen die SDS-PAGE den Abschluss der Arbeiten mit Ihren Proteinextrakten bedeutet, ist die Elektrophorese für sich oft nur ein kleiner Teil einer größeren Analyse. Des Öfteren ist die Elektrophorese (1D-PAGE oder 2D-PAGE) nur der entscheidende Trennschritt für ein komplexes Gemisch von Proteinen, die aus einer biologischen Matrix isoliert wurden. Ein entscheidender Vorteil der Elektrophorese ist eben diese relative einfache und gut reproduzierbare Trennung komplexer Proteingemische – entscheidend für das wiederfinden der interessanten Banden bzw. Spots.

Nichts desto trotz sagt das Migrationsverhalten eines Proteins noch nichts über dessen Identität aus. Die eindeutige Identifizierung der Proteine, die einen auf dem Gel sichtbaren Spot bilden, ist mittlerweile eine Standardapplikation in vielen Labors und unter dem Schlagwort "Proteomics" bekannt.

Proteomics ist definiert als die wissenschaftlichen Methoden und Anforderungen, die notwendig sind um die Gesamtheit an Proteinen zu analysieren, die in einem bestimmten Organismus bzw. in einem bestimmten Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden sind. Obwohl es auch andere Ansätze gibt, eine elektrophoretische Trennung für die proteomischen Analysen zu umgehen, ist in den meisten Fällen die elektrophoretische Trennung ein wichtiger Methodenteil in dieser Bioanalytik.

Für die Identifizierung der Proteine werden die Banden ausgeschnitten, entfärbt und mit einer spezifischen Protease (z.B: Trypsin) in kleinere Peptide zerlegt. Diese Peptide werden in weiterer Folge aus dem Gel extrahiert und können dann mittels massenspektrometrischen Analysen untersucht werden. Eine Reihe von unterschiedlichen massenspektrometrischen Experimenten führt letzt endlich zu einer Identifizierung der in der jeweiligen Bande enthaltenen Proteine. Es ist keine Seltenheit, dass eine Bande mehrere Proteine enthalten kann. Sobald einmal die Identität eines Proteins geklärt ist lassen sich auch bestimmte Fragen besser beantworten: z.B: wie die Proteinzusammensetzung eines bestimmten Organs vor und nach der Zugabe eines z.B. Therapeutikums beschaffen ist.

Darüber hinaus kann die massenspektrometrische Analyse auch noch zusätzliche wichtige Informationen über die so genannten post translationellen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Glycosylierung,...) geben.

Neben den bereits beschriebenen proteomischen Analysen, die man nach der elektrophoretischen Trennung machen kann, können die Proteine eines Gels auch auf eine Membran übertragen werden (blotten, Western Blot). Das ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen oder von bestimmten Eigenschaften derselben, je nachdem welcher Antikörper dafür eingesetzt wird.

## Material und Durchführung

### Lösungen für die Elektrophorese

#### Polyacrylamidgel

<b>AA</b>	30 % (w/v) Acrylamid	diese beiden Lösungen
<b>BIS</b>	1 % (w/v) Bis (N,N'-Methylen-Bisacrylamid)	sind bereits fertig.
<b>TGP</b>	Trenngelpuffer: 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8	
<b>SGP</b>	Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8	
<b>SDS</b>	10 % (w/v) SDS (Na-Laurylsulfat)	
<b>APS</b>	10 % (w/v) Ammonium-Persulfat	immer frisch bereiten (100 µL/Gel)

Darüber hinaus brauchen Sie auch noch **TEMED** (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, eine Flüssigkeit) und destilliertes Wasser.

#### Mischen & Giessen des Gels

Die Angaben gelten für ein 14 % Trenngel (14 % T, 1 % C) und ein 5.7 % Sammelgel. Für Trenngel mit anderen Acrylamid-Gehalten sind sowohl die Menge an Acrylamid als auch an Bis entsprechend zu verändern.

Die Lösungen werden (zunächst bis auf TEMED und APS) in die kleinen Saugflaschen pipettiert.

	Trenngel	Sammelgel	
<b>AA</b>	3.73 mL	0.76 mL	Die Polymerisationszeit der Gele beträgt jeweils ungefähr 30 min. Nach dem Giessen des Trenngels wird dieses mit 20% Ethanol übergossen, um einen geraden Abschluss des Geles zu erreichen. Beim Mischen und beim Giessen der Gele sollten Sie Handschuhe tragen und vorsichtig arbeiten.
<b>Bis</b>	1.15 mL	0.52 mL	
<b>TGP</b>	2.0 mL	---	
<b>SGP</b>	---	1.00 mL	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.04 mL	1.71 mL	
<b>SDS</b>	80 µL	40 µL	
<b>TEMED</b>	5.3 µL	2.7 µL	Nach Zugabe sofort Gel gießen. → Polymerisation!
<b>APS</b>	53 µL	27 µL	

### Probenpuffer zur Vorbereitung der Proben

Der Probenpuffer wird üblicherweise zweifachkonzentriert hergestellt und enthält ein Reduktionsmittel für Disulfidbrücken.

Das Rezept:

- 10 mg SDS
- 1.5 mg DTE (Dithioerithrit)
- 0.25 mL SGP (siehe oben)
- 0.115 mL Glyzerin (87 %)
- 0.5 mL H<sub>2</sub>O
- 1-2 Tropfen Bromphenolblau (ca. 1% in 1:1 Gemisch von Wasser und 96 % Ethanol)

Der Probenpuffer soll ordentlich blau sein.

### Probenvorbereitung

Die Proteinproben werden entweder direkt in Eppendorfhütchen pipettiert. Das Maximalvolumen einer Probe darf höchstens 10 µL betragen. In den meisten Fällen werden Sie aber ihre Proben mit Wasser verdünnen müssen, um nicht zuviel Protein aufzutragen. Am Besten sind etwa 4 - 10 µg Protein pro Bande. Da Sie jedoch nicht wissen, wie viele Banden Ihre Proben aufweisen werden, ist es ratsam, sie in mehreren Konzentrationen aufzutragen. Das Auftragen von drei unterschiedlichen Mengen an Protein (1 µg, 4 µg und 16 µg Protein) hat sich bisher immer bewährt. Viel mehr Protein sollte es aber nicht mehr sein, da zu große Konzentrationen zu unschönen Verzerrungen führen und so teilweise eine Auswertung dann nicht mehr möglich ist.

Mit dem Molmassen-Standard verfahren Sie ebenso. Den Molmassen-standard sowie die die unbekannte Probe erhalten Sie von Ihrem Tutor. Von dieser Unbekannten Probe müssen Sie in weiterer Folge die Größe der Proteinbande(n) bestimmen.

Wenn Sie nun das Volumen der Probe auf 10 µL im Eppi gebracht haben, geben Sie 10 µL des 2x-konzentrierten Probenpuffers dazu und "derivatisieren" die Probe 6 min bei 95°C im Heizblock. Nach dem Abkühlen werden die Eppis in der Biofuge kurz zentrifugiert, um die ganze Probe am Boden des Gefäßes zu vereinigen.

## Die Elektrophoreseapparatur (Biorad Mini PROTEAN 3)



Figure 1: Die Teile der Elektrophoreseapparatur

- ❶ Spannungsgeber (Biorad Power Pac 300)
- ❷ Gel-Gießrahmen
- ❸ Elektrodenrahmen
- ❹ Deckel mit Spannungsanschlüssen
- ❺ Käbme (→ fürs Probestaschen gießen)
- ❻ Keil zum Öffnen der Glasplatten nach erfolgter Elektrophorese
- ❼ Fixierrahmen
- ❽ Puffer - Tank
- ❾ Gel-Gießstand
- ❿ Glasplatten (siehe auch Figure 2).  
10a: Glasplatte mit Spacer, 10b: kurze Glasplatte, 10c: Dummy-Platte (wird gebraucht, wenn nur ein Gel verwendet wird)

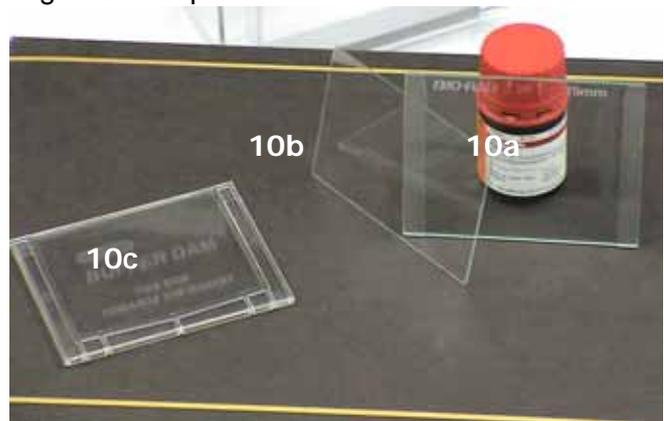


Figure 2: Glas- und Dummyplatten

Das Zusammensetzen der Apparatur sowie das Giessen der Gele erfolgt zusammen mit ihrem Übungsbetreuer.



es durch Positionierung des Standards oder durch die verschiedenen Konzentrationen der Proben) bewährt.

### Starten der Elektrophorese

Nun setzen Sie den Deckel auf und stecken die Plugs in die gleichfarbigen Buchsen am Spannungsgeber. Nach Einschalten des Geräts müssen Sie noch die Bedingungen für die Elektrophorese einstellen (200 V, Spannung konstant halten). Dann können Sie die Elektrophorese starten.

Dabei kommt es in der inneren Laufkammer zu einer starken Luftblasenbildung und der Puffer fängt an zu schäumen. Weiters wird sich bei den Taschen eine blaue Lauffront bilden. Wenn all dies passiert ist, haben Sie alles richtig gemacht.

### Ende der Elektrophorese

Nun lassen Sie die Elektrophorese so lange laufen, bis die blaue Lauffront etwa 5 mm vor dem unteren Ende der Glasplatte ist (~40-50 min). Dann unterbrechen Sie am Spannungsgeber den Stromfluss, schalten diesen ab und stecken ihn vom Stromnetz ab.

Zusammen mit Ihrem Betreuer entnehmen Sie die Gele der Apparatur und schneiden Sie aus den Glasplatten, bevor Sie das Gel vorsichtig in die Fixierlösung legen. Achten Sie darauf, dass das Gel nicht reißt.

### Fixieren, Färben und Entfärben

Das Gel wird in der Fixierlösung etwa 15 min gut bedeckt am Schüttler inkubiert, danach wird die Fixierlösung in eine eigene Flasche abdekandiert. Die Fixierlösung kann bis zu 10 mal verwendet werden, aus diesem Grund bitte notieren, wie oft die Lösung schon verwendet wurde.

Das Gel wird nun mit der Färbelösung bedeckt und gefärbt bis die Banden vom Standard schön sichtbar sind. Das dauert in der Regel etwa 30-180 min, abhängig von der Färbelösung. Nach dem Färben wird die Färbelösung in eine eigene Flasche wieder abdekandiert und notiert, wie oft sie schon verwendet wurde. Die Färbelösung kann bis zu 3 mal wieder verwendet werden.

Danach wird das Gel mit der Entfärbelösung überschichtet um vor allem den Hintergrund zu entfärben und die Banden klarer erscheinen zu lassen. Wechseln Sie nach 5 min das erste mal die Entfärbelösung, anschließend nach 15 min und danach nochmals nach 15 min. Anschließend wird das Gel kurz mit Wasser abgespült und zusammen mit dem Laboranten für das Protokoll eingescannt.

### **Bestimmen der Molmassen anhand eines Proteinstandards**

Sie bekommen den Standard von Proteinen bekannter Masse vom Betreuer. Der wird Ihnen auch sagen, wie Sie mit dem Standard zu verfahren haben. In weiterer Folge behandeln Sie den Standard wie Ihren Proben: 10  $\mu$ L 2x Probenpuffer dazu, 6 min bei 95°C derivatisieren, zentrifugieren und auftragen.

Der Standard enthält mehrere Proteine, die aktuelle Zusammensetzung des Standards entnehmen Sie bitte dem Schaukasten beim Biochemie-Übungslabor.

Die Molmassen der unbekannt Probe werden graphisch mittels eines Plots ermittelt. Die Wanderungsstrecke (mm im Trenngel) wird gegen den dekadischen Logarithmus der Molmasse (überlegen Sie sich eine sinnvolle y-Skala) aufgetragen. Der Zusammenhang ist nicht immer eine klare und genaue Gerade!

Bestimmen Sie die Größe der Banden ihrer unbekannt Probe. Bei Unklarheiten welche Banden Sie nehmen sollen, wenden Sie sich an Ihren Betreuer.

## **Anhang**

### **Proteinfällung für Elektrophorese**

Eine Proteinfällung wird dann gemacht, wenn ihre Proben zu verdünnt sind oder zu viel Salz enthält. Im Rahmen des Beispiels wird aber darauf aus Zeitgründen verzichtet. Um Ihnen jedoch eine Idee von der Durchführung zu geben, finden Sie hier das Protokoll.

Faustregel: Wenn ihre Probe nach entsprechender Verdünnung (siehe Kap. Probenvorbereitung) in einem Puffer von weniger als 50 mM ist bzw. die Konzentration an Neutralsalz kleiner 100 mM ist, wird es ohne Fällung gehen.

Jenes Volumen an Probe, das die gewünschte Menge an Protein enthält geben Sie in ein Eppendorfhütchen und fügen die mindestens ca. fünffache Menge an (idealerweise schon vorgekühlten) Methanol (oder Aceton) zu. Das Eppi stellt man eine, besser zwei Stunden in den Gefrierschrank und zentrifugiert dann in einer entsprechenden Zentrifuge etwa 4 min bei knapp 10.000 rpm. Der Überstand wird dann abdekantiert und bevor Sie das Eppendorf wieder umdrehen tupfen Sie mit einem Tuch den Rand trocken. Das Pellet muss trocknen, was etwas schneller geht, wenn Sie dafür die Proben im Heizblock auf 40-50°C erwärmen. Anschließend nehmen Sie das Pellet in dem 2x-Probenpuffer auf und verfahren mit der Sample wie oben beschrieben.