

En el Servicio de Interacciones Moleculares realizamos dos tipos de experimentos de Ultracentrifugación Analítica:

- Por un lado realizamos experimentos de "**velocidad de sedimentación**", que proporcionan información sobre el número de especies presentes en la muestra, tamaño, forma y su coeficiente de sedimentación. Si la polidispersidad, referida al número de especies, es baja es fácil determinar si se trata de monómeros, dímeros, etc., siendo el tamaño calculado más exacto cuanto menos especies haya presentes en la muestra y cuanto más pura sea ésta.
- Por otro lado realizamos experimentos de "**equilibrio de sedimentación**". En estos se obtiene el peso molecular de la molécula o complejo en estudio. Para ello la muestra debe contener, como mucho, dos especies (monómero y dímero, por ejemplo) e ir muy pura. Hay que tener en cuenta que lo que se obtiene es la masa promedio de todo lo que haya en la muestra, de manera que si en la muestra sólo hay un tipo de complejo entonces la masa es coincidirá con la de ese complejo, pero si hay otras especies presentes, entonces será el promedio de todas ellas.
En ambos experimentos el número máximo de muestras por experimento es de siete.

Normalmente, antes de realizar un equilibrio de sedimentación, se estudia la presencia de especies por velocidad de sedimentación a diferentes concentraciones de proteína. Si en la velocidad se observa un único complejo, entonces procedemos a obtener su masa por equilibrio en esas mismas condiciones. Cada experimento permite analizar 7 muestras a la vez y el análisis de los datos lo realizamos en el Servicio.

En cuanto a los requisitos que deben cumplir las muestras, se debe tener en cuenta lo siguiente:

- las concentraciones pueden ir desde 0.1 mg/mL hasta 1-2 mg/mL y el volumen requerido para cada muestra es de 400 microlitros, en el caso de la velocidad de sedimentación, y de 100 microlitros, en caso de los equilibrios de sedimentación. Además, por cada condición a ensayar, es necesario poner en paralelo 420 microlitros del tampón en el que vaya cada concentración o muestra. Más que la concentración, el factor limitante es **la absorbancia de la muestra, la cual debe estar entre 0.2 y 1.3 u.a.**, (con un paso óptico de 1 cm) para poder analizarla posteriormente.
- el tampón no debe llevar beta-mercaptoetanol o DTT, pues presenta absorbancia entre 230 y 260 nm. Si es imprescindible para la estabilidad de la muestra recomendamos reducir su concentración hasta 0.2 mM y si es posible, sustituirlo por TCEP, que es más estable.
- Igualmente, si es absolutamente necesario que el tampón lleve glicerol, recomendamos como máximo un 5%.