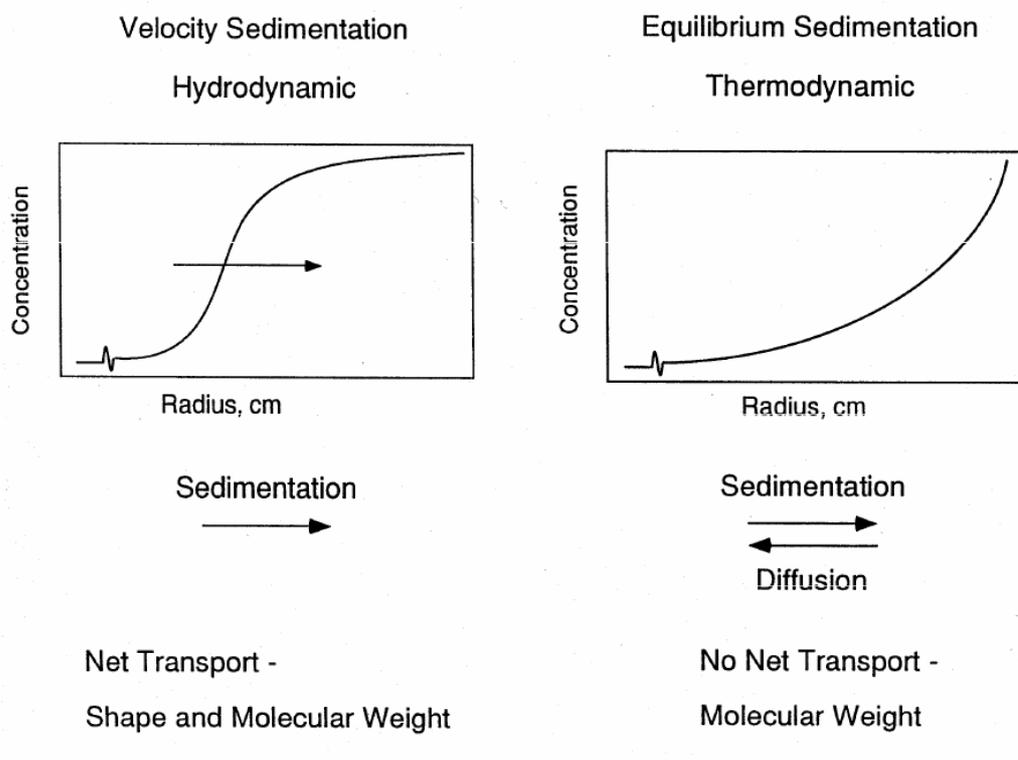


MÉTODOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA EN EL CIB: Consideraciones generales y aspectos prácticos.

Analytical Ultracentrifugation



Velocidad de Sedimentación

Fundamentos. En un experimento de **velocidad de sedimentación** las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. Es un método hidrodinámico de transporte que permite fraccionar las macromoléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación (una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular).

Aplicaciones. La primera información que estos experimentos nos darán es el grado de homogeneidad o heterogeneidad de las especies macromoleculares que sedimentan. Este fraccionamiento también puede ser muy útil para detectar y cuantificar la estequiometría y la afinidad de complejos macromoleculares. De esta información podemos también estimar la forma aproximada de macromoléculas en disolución.

Análisis preliminar. Cálculo de coeficientes de sedimentación: programas SEDFIT y SVEDBERG (accesibles en los enlaces relacionados indicados en la página web del Servicio).

Aspectos prácticos.

- La absorbancia de la muestra frente a su correspondiente tampón ha de ser menor de 1,3 (unidades de absorción a la longitud de onda de trabajo). Es necesario poner en cada celda de la ultracentrífuga el tampón de muestra (que se usa como referencia).
- Se recomienda hacer el experimento a varias concentraciones (al menos tres).
- Volumen de muestra: 300-400 μL .
- Tiempo aproximado del experimento: 2 h.

Equilibrio de Sedimentación

Fundamento. En la modalidad de **equilibrio de sedimentación** las muestras se someten a campos centrífugos moderados hasta que se igualan las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión (condición de equilibrio). En estas condiciones, las especies macromoleculares se distribuyen formando un gradiente de concentración que se caracteriza porque a) no varía con el tiempo, b) es independiente de las propiedades hidrodinámicas (forma) de las macromoléculas y c) depende únicamente de la masa molecular de la especie que sedimenta. Este último punto es muy importante, ya que implica que esta técnica permite estudiar procesos de asociación en los que no es posible separar físicamente las diferentes especies moleculares presentes (por ejemplo, interacciones débiles). Si conocemos la dependencia con la composición de la masa molecular, es posible modelar dicha dependencia en el contexto de diferentes esquemas de asociación.

Aplicaciones. Esta técnica permite la determinación de la masa molecular de las especies macromoleculares que sedimentan, así como la detección y el análisis cuantitativo (en términos de estequiometría, afinidad y reversibilidad) de las asociaciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares en disolución.

Análisis preliminar. Cálculo de masas moleculares promedio: programas EQASSOC y XLAEQ, paquete de programas de análisis que se suministran con el equipo, y SEDPHAT (accesibles en el sitio RASMB, ver enlaces relacionados).

Aspectos prácticos.

- La absorbancia de cada muestra en la celda, medida frente a su correspondiente tampón, ha de estar en el intervalo de 0.1-0.6 unidades de absorción a la longitud de onda elegida (preferiblemente en un máximo de absorción, en el intervalo entre 220 y 600 nm). Es necesario poner en cada celda de medida de la ultracentrífuga el tampón de muestra (que se usa como referencia).
- La medida de la absorbancia se suele realizar en un espectrofotómetro con una cubeta de paso óptico de 1 cm. Para correlacionar esta medida con la señal que se detectará en las celdas de la ultracentrífuga debe tenerse en cuenta el paso óptico de dichas celdas. A) Las piezas centrales que se emplean más habitualmente tienen un paso óptico de 1.2 cm. En este caso, una absorbancia de 1.0 en el espectrofotómetro daría 1.2 en la ultracentrífuga. B) Si las muestras

dan una absorbancia superior a 0.6 pueden emplearse celdas de paso óptico de 0.3 cm (donde una absorción de 1.0 UA, medida espectrofotométricamente, daría una señal en la ultracentrífuga de 0.3).

- Se recomienda hacer el experimento a varias concentraciones de muestra (al menos tres) y a varias velocidades angulares (al menos dos).
- Volumen de muestra: normalmente 80 μL , aunque puede ser de 60-120 μL (a mayor volumen mayor precisión en el análisis, pero a costa de que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de sedimentación aumenta considerablemente).
- Tiempo aproximado del experimento: 15-24 h (80 μL). Muestras lábiles: se pueden reducir estos tiempos usando procedimientos experimentales específicos.

Muestras

- **Al ser una técnica no destructiva, las muestras se pueden recuperar después de cada análisis.**
- **¿Cuál es el grado posible de toxicidad/contaminación de las muestras?**
- Las muestras han de ser lo más puras que sea posible y estar bien equilibradas en el tampón de trabajo. Diagnóstico previo de pureza: **¿Aparece la proteína como una o como varias bandas en electroforesis en presencia de SDS?**
- Diagnóstico de homogeneidad (de tamaño) de la muestra: **¿Eluye la proteína en cromatografía de filtración en gel como uno o como varios picos?**
- **¿Cuál es el espectro UV-VIS (200-350 nm) de la muestra?**
- **¿Cuál es la composición de aminoácidos de la proteína?** Esta información es necesaria para calcular el volumen específico parcial de la proteína/ADN.
- Centrifugar las muestras en una centrífuga de mesa a 13.000 rpm durante unos 5-10 minutos. Medir la absorbancia de la muestra antes y después de la centrifugación. **¿Disminuye la absorbancia después de centrifugar?** Una disminución apreciable de la absorbancia indicaría que la muestra está agregando en esas condiciones y habría que buscar otras condiciones (temperatura, composición del tampón, etc.) para hacer el experimento.
- Los análisis se suelen realizar a temperaturas de +4 a +37°C. **¿Cuál es la temperatura a la que se debe realizar el experimento?**
- **¿Son las muestras estables / lábiles (condiciones de temperatura, pH, etc.)?**

Tampones

- Es necesario poner en cada celda de medida, además de la muestra, una alícuota del tampón en el que va disuelta la muestra, que se usa como referencia. Cuando sea posible, este tampón provendrá del último paso de diálisis de nuestra

muestra. **¿Posee el tampón de referencia la misma composición que el correspondiente en el que está disuelta la muestra?**

- Existen sustancias en los tampones habitualmente empleados que absorben en el UV (nucleótidos, algunos agentes reductores, como mercaptoetanol y DTE, detergentes, etc.) y pueden interferir en las medidas de centrifugación, por lo que, si es posible, se recomienda no emplearlos. Este problema no existe en experimentos de velocidad de sedimentación por interferencia con el modelo XLI. **¿Qué componentes lleva el tampón que contiene la muestra?**
- Otras sustancias (como por ejemplo el glicerol, la urea y el cloruro de guanidinio) pueden interaccionar con las proteínas alterando su volumen específico parcial. Aunque es posible trabajar en presencia de estas sustancias, esto dificulta el análisis experimental, por lo que se recomienda eliminarlas, si es posible, previamente. Por otro lado, el cloruro de guanidinio y sustancias similares pueden dañar las celdas de medida. **¿Lleva el tampón de muestra alguna de estas sustancias?**
- Dado que las ventanas de medida de las celdas de la centrífuga son de cuarzo (o zafiro) y las piezas centrales de las mismas son de ciertos tipos de plásticos (Epon-charcoal, aluminio-Epon) los tampones **NO** podrán contener sustancias que afecten a los mencionados materiales (ácidos y bases fuertes, algunos disolventes y detergentes, etc.). **¿Cuál es la composición completa del tampón de muestra?**