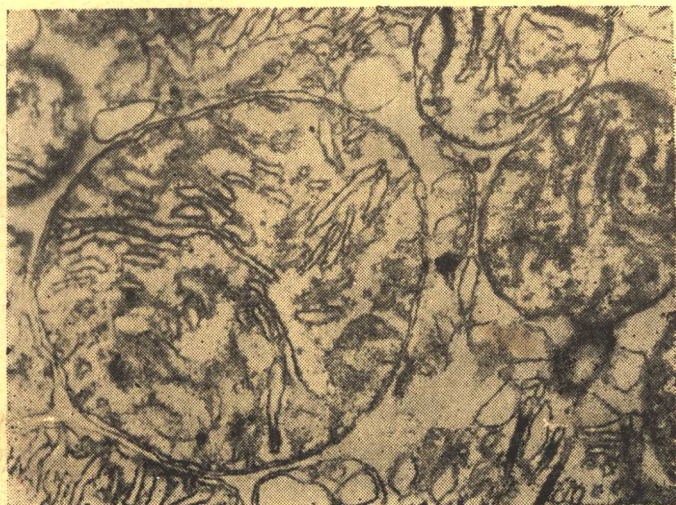




# 线粒体的分离与

# 活性测定

中国科学院生物物理研究所

线粒体研究小组编

# 线粒体的分离与活性测定

中国科学院生物物理研究所

线粒体研究小组 编

一九八〇年四月

# 前 言

线粒体是细胞内的一个重要细胞器，是细胞进行呼吸作用的场所，细胞的各项活动所需要的能量，主要是通过线粒体的呼吸作用来提供的，因而，它赋有细胞“动力站”之称。有关线粒体的结构和功能的研究在国际上一直是一个非常活跃的领域。在国内有关这方面的研究亦日趋迅速发展。下面结合我们在实际工作中的一些经验，就线粒体的分离及线粒体活性测定的方法做些介绍。

\* \* \*

下列人员参加本书的编写：杨福愉、黄有国、林治焕、陈受宜、郭倍奇、赵云鹃、李才元、史宝生、邢菁如、陈文雯、张淑秀、车延武、王淑娅和梁洪光等。

# 内 容 提 要

## 前言

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| <b>一、线粒体的分离</b> .....                         | (1)  |
| 1. 动物细胞线粒体的分离.....                            | (1)  |
| ① 鼠肝线粒体的分离.....                               | (1)  |
| ② 大鼠心肌线粒体的分离.....                             | (3)  |
| ③ 大鼠腿部骨骼肌线粒体的分离.....                          | (5)  |
| ④ 猪(牛)心线粒体的分离.....                            | (5)  |
| 2. 植物细胞——玉米线粒体的分离.....                        | (9)  |
| 3. 酵母线粒体的分离.....                              | (11) |
| <b>二、线粒体的形态鉴定</b> .....                       | (16) |
| 1. 相差显微镜观察.....                               | (16) |
| 2. 电子显微镜观察.....                               | (17) |
| <b>三、线粒体的活性测定</b> .....                       | (18) |
| 1. 测定线粒体活性的主要指标和方法.....                       | (19) |
| ① 呼吸控制率(RCR)和氧化磷酸化效率<br>(P/O或ADP/O比值).....    | (19) |
| ② $^{32}\text{P}_i$ —ATP交换活性.....             | (21) |
| 2. 测定线粒体活性的几个实例.....                          | (22) |
| ① 用氧电极法测定呼吸控制率(RCR)和<br>氧化磷酸化效率(ADP/O比值)..... | (22) |
| (1) 鼠肝线粒体的测定.....                             | (22) |
| (2) 其它细胞线粒体的测定.....                           | (25) |

- ② 用瓦氏检压法测定线粒体的氧化磷酸化效率 (P/O比值) ..... (28)
  - (1) 鼠肝线粒体的测定 ..... (28)
  - (2) 其它细胞线粒体的测定 ..... (31)
- ③ 猪心线粒体 $^{32}\text{P}_i$ —ATP交换活性的测定 ..... (33)

#### 四、附录

- 1. 蜗牛酶的制备 ..... (37)
- 2. 简法制备己糖激酶 ..... (39)
- 3. 放射性磷 ( $^{32}\text{P}_i$ ) 的处理方法 ..... (42)

## 一、线粒体的分离

线粒体制备的一般过程如图 1 所示。操作过程中的基本要求是：（1）整个过程要保持在低温下（ $0 \sim 5^{\circ}\text{C}$ ）进行；（2）要特别注意分离介质的 pH 值；（3）要选择研杵松紧适度的匀浆器；（4）要尽可能缩短分离过程所需的时间，否则都会影响分离线粒体的质量。

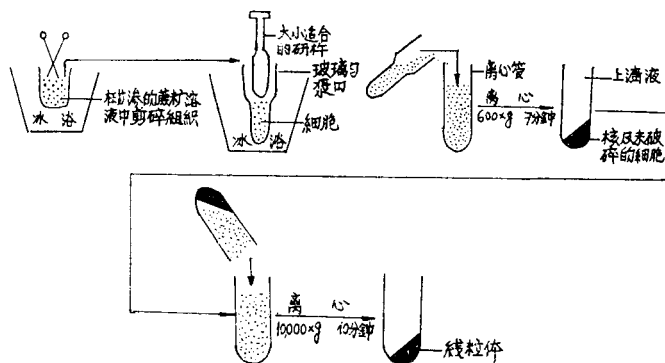


图 1 线粒体分离的一般流程

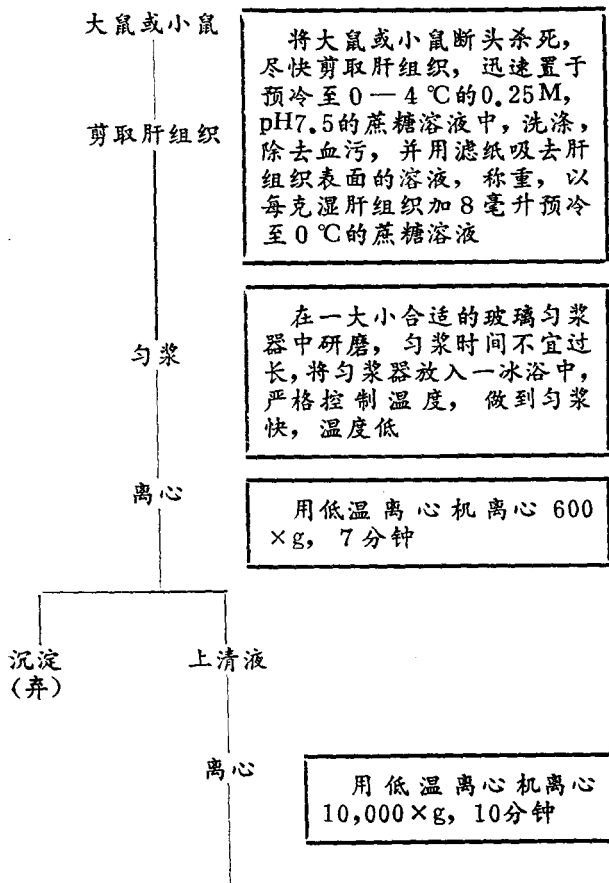
### 1、动物细胞线粒体的分离

下面介绍从几种不同动物组织细胞分离线粒体的方法。

①鼠肝线粒体的分离（《实验生物学报》9（3），261，1964）

将大或小鼠断头杀死后，尽可能快地取出肝组织并迅速浸入预冷的蔗糖介质中，洗涤，称重，以每克湿肝组织加 8

毫升预冷的蔗糖溶液，匀浆。匀浆液采用分级离心法用低温离心机进行分离。在两次离心后，将所得的线粒体悬浮于 0.25M, pH7.5 的蔗糖溶液中。分离的详细步骤如图 2 所示。



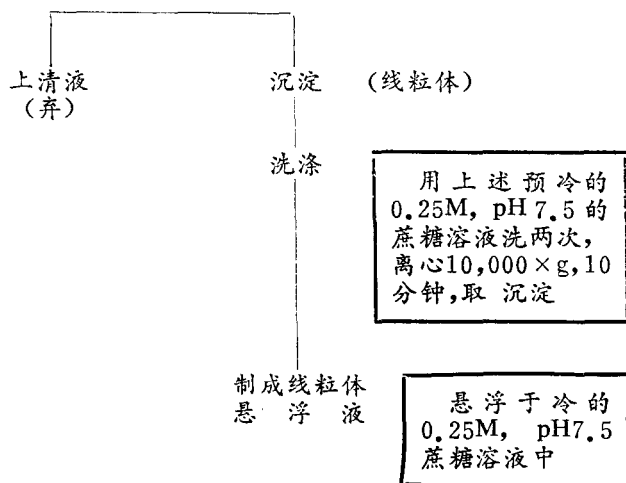


图 2 鼠肝细胞线粒体的分离程序

为了保证分离的线粒体的质量, 应注意下列几点: (1) 尽可能把肝组织剪成细块乃至似肉糜, 这有利于缩短匀浆时间; (2) 切实控制匀浆液的温度, 匀浆器必须置于  $0^{\circ}\text{C}$  左右的冰浴中。整个分离过程必须保持在  $0-4^{\circ}\text{C}$  下进行; (3) 特别要注意蔗糖的 pH 值, 因为蔗糖无缓冲能力, pH 值易发生变化, 故匀浆介质最好新鲜配制, 并在使用前调至所需的 pH 值; (4) 整个分离过程一般最好在 1 个半小时内完成, 不宜过长。

## ②大鼠心肌线粒体的分离

与肝脏组织相比, 心肌组织较难捣碎, 因此, 在制备心肌线粒体时, 一方面要用较剧烈的条件, 以便尽可能使绝大多数心肌细胞破碎以获得较多的线粒体; 另一方面又要避免

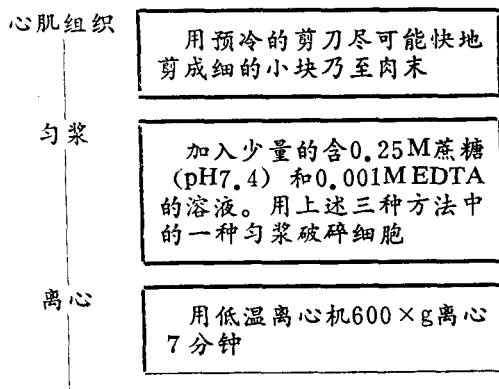
因条件过于剧烈而使分离的线粒体受到损伤。因此，要分离活性较高的线粒体，掌握好这个“火候”是很关键的。捣碎心肌组织一般有下列三种方法：

A、将心肌组织剪成小块，加入少量分离介质（0.25M蔗糖，0.001M EDTA）和一定量的石英砂（化学纯，经酸处理并用水反复洗净），在研钵中研磨匀浆，然后进行离心分离。

B、将心肌组织剪成小块，加入一定量的分离介质，用马达带动玻璃匀浆器匀浆。匀浆器的转杆最好是Teflon（聚四氟乙烯）制成的。

C、用组织捣碎机（Waring blendor）将心肌组织捣碎，捣碎时速度不宜太高（约12,000转/分），捣碎时间不宜太长（约30~60秒）。

整个操作过程应控制在0—4℃进行。应注意事项基本上与肝细胞线粒体的分离相同。分离的详细程序如图3所示。



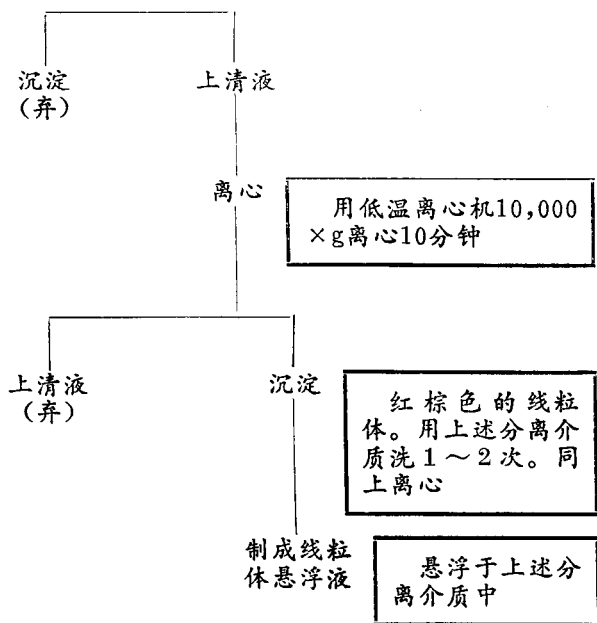


图3 大鼠心肌线粒体的分离程序

### ③大鼠腿部骨骼肌线粒体的分离

制备的方法与心肌线粒体基本相同。但由于骨骼肌的线粒体的含量较少，因此，制备的起始材料取量要多些。分离介质组份为0.176M KCl, 0.005M  $\text{MgSO}_4$ , 0.001M ATP和0.001M EDTA, pH7.4。

④猪(牛)心线粒体的大量分离 (《生物化学与生物物理学报》2,1980)

整个分离过程大体可分为猪心肌的剥离、心肌肉末制备、心肌肉末的匀浆以及线粒体的离心分离等主要步骤。

### A、心肌的剥离

从屠宰场取得 3 ~ 6 公斤的新鲜猪(牛)心, 立即置于冰块中。在 4 °C 的冷库中, 尽快的去除脂肪和结缔组织, 用清水快速冲洗肌肉组织, 除去血污。在这一步中, 应尽可能地把脂肪和结缔组织去除干净, 这对快速捣碎心肌和得到较好的心肌肉末是必要的。

### B、心肌肉糜的制备

称取1,000克的洗净的心肌组织, 在预冷的绞肉机(隔板孔径 4 ~ 5 mm, 预先置于冰箱中过夜) 中快速绞碎, 制成肉末。用预冷的洗涤液(通常将配洗涤液的蒸馏水在 4 °C 左右的冷库中预冷备用) 洗肉末一次, 搅动肉末并注意将洗涤液的 pH 用 5 N KOH 调节维持在 7.0 左右, 然后用四层纱布挤压(用自制手摇压榨机), 除去水分。将所得肉末再用细隔板孔径(约 2 mm) 的电动绞肉机再绞一次, 制成更细的肉糜。用上述洗涤液再洗肉糜, 充分搅匀, 再次调试 pH 在 7.0 左右, 同样挤压除去水分, 如此重复三次。在这一步中, 必须注意洗涤肉末时要充分搅匀, 严格控制 pH 值。用压榨机挤压时不宜过猛但又要挤干水分。操作在 4 °C 的冷库中进行。

### C、心肌肉糜的匀浆

将经过洗涤的肉糜分成若干份, 悬浮于预冷的捣碎液中, 用高速组织捣碎机(8,000—10,000转/分) 连续捣碎 1 分半钟, 得到的捣碎液呈红棕色。为了要得到活性较高的线粒体, 掌握适当的匀浆条件甚为重要。严格控制捣碎液的温度对线粒体的质量影响很大。捣碎液必须预冷至 0 °C 或稍低于 0 °C, 可将捣碎液和肉糜事先置于含盐的冰浴中冷却, 当溶液表面有一些可见的冰片出现时, 即可放入捣碎机中捣

碎，其目的是为了保持在捣碎后溶液的温度不至于升高（大约可保持在 $2 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 之间）。同时要注意捣碎液的体积不宜过大，以有利于细胞的破碎，在捣碎后可再补充些捣碎液以达到肉糜与捣碎液<sup>3</sup>所需的比例（肉末：捣碎液 = 1 : 3.5）。要严格控制捣碎时间。整个步骤在 $4^{\circ}\text{C}$ 左右的冷库中进行。

#### D、线粒体的分级离心分离

将得到的红棕色匀浆液，用低温离心机在 $900-1,000 \times g$ 离心10分钟，所得上清液在 $10,000 \times g-11,000 \times g$ 离心10分钟。所得沉淀（线粒体）用上述的捣碎液洗一次，同样离心。将沉淀悬于 $0.25\text{M}$  pH7.4的蔗糖溶液（或上述捣碎液）中制成线粒体悬液。线粒体可保存于干冰或液氮中，至少在两周左右其活力无明显变化（ $^{32}\text{P}_i$ —ATP 交换活力可高达 $1.0-1.5$ 微克分子磷/毫克蛋白/15分钟）。从1,000克猪心肌中，大约可得1,500毫克（有时甚至可达2,000毫克）的线粒体蛋白。由猪（牛）心肌分离线粒体的整个流程如图4所示。

猪（牛）心

由屠宰场取得新鲜猪（牛）心约3公斤，迅速置于冰块中，保持低温

剥离心肌

在 $4^{\circ}\text{C}$ 的冷库中，尽快去除脂肪，结缔组织，将心肌置于洗净的冰块中。用自来水快速冲洗肌肉，除去血污。并称重

第一次肉  
末的制备

称取1.000克心肌,在绞肉机中快速绞碎。用预冷的洗涤液(0.125M KCl, 0.001M EDTA, pH7.0, 肉末:洗涤液为1:5)洗一次,充分搅匀,用KOH调pH至7.0左右。后用四层纱布过筛并压干除去水份

第二次肉  
糜的制备

将上面得到的肉末制剂,用隔板孔径为2 mm 的绞肉机进一步绞碎,并用上述洗涤液(肉末与洗涤液的比例同上)洗涤,搅匀,调pH至7.0左右,压干除去水分,此过程重复三次

匀浆

将上面得到的肉糜分成5份,每份约200克肉糜,放入预先冷却的捣碎液中。待冷却至有冰片出现时,方可捣碎。捣碎液含0.25M 蔗糖, 0.002M EDTA, 0.005M Tris·HCl, pH 7.4。每份肉糜加300毫升捣碎液。在8,000—10,000转/分连续捣碎1分半钟。然后加捣碎液至700毫升

离心

将所得的捣碎液用低温离心机900—1,000×g离心10分钟

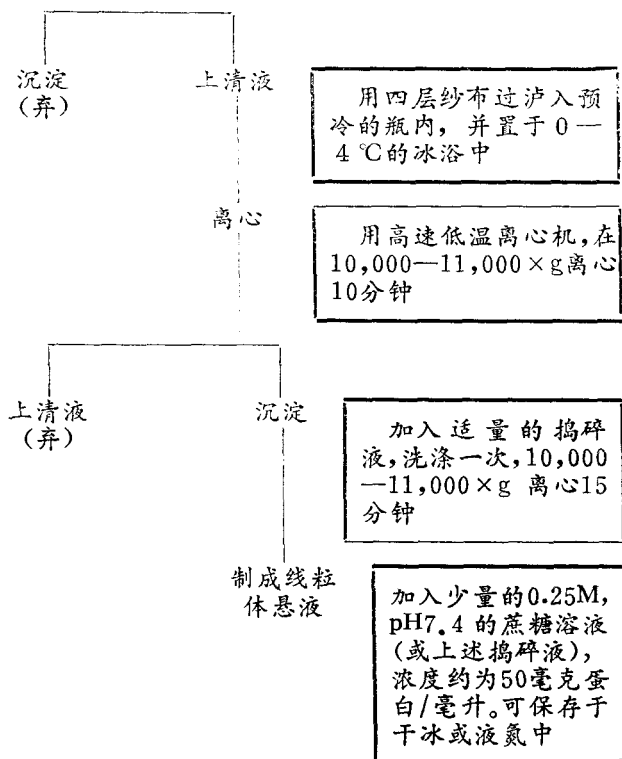


图 4 大量制备猪(牛)心线粒体的程序

## 2. 植物细胞——玉米线粒体的分离

### (1) 玉米种子的萌发

首先将干净的玉米种子用  $0.1\%$  氯化汞浸泡 10 分钟以灭菌，经清水冲洗半小时，再于水中浸泡 15 小时左右，然后均匀地将种子平铺在搪瓷盘内的纱布上，在  $28^{\circ}\text{C}$  的恒温箱中发芽。为了使萌发幼苗的长度尽可能一致，不同种子催芽时间

可以根据具体情况加以掌握，一般在恒温箱中发芽约 2 ~ 3 天，幼苗生长达 1 ~ 2 公分即可。在整个发芽过程中控制湿度。

## (2) 线粒体的分离

将黄化幼苗剪下，称重，并在冰箱中放置 1 小时。然后倒入双层的尼龙袋中，以 1 : 3 的比例加入含 0.25M 蔗糖，0.067M pH7.2 的磷酸缓冲液，0.005M EDTA，0.75 毫克/毫升牛血清清蛋白的匀浆介质，在瓷研钵中磨碎。过筛除去残渣。然后将过筛液用低温离心机离心分离，第一次  $600 \times g$  离心 10 分钟，弃沉淀，取上清液。第二次， $11,000 \times g$  离心 10 分钟，弃上清液，取沉淀。所得的线粒体用上述匀浆介质洗一次，最后悬浮于 0.3M pH7.2 甘露醇中备用。整个过程应严格控制在 0 — 4 °C 进行。详细的制备过程如图 5 所示。所述方法基本适合于从谷子、高粱等的幼苗分离线粒体。

干净种子

用 0.1% 氯化汞浸泡 10 分钟，清水冲洗半小时，再于水中浸泡 15 小时左右

发芽

于 28°C 恒温箱中保温 2 ~ 3 天，待发芽幼苗达 1 ~ 2 公分。

黄化幼苗

剪下 1 ~ 2 厘米长的黄化幼苗，称取 12 克左右，放入尼龙小袋中，在 0 — 4°C 暗处放置 1 小时。将幼苗连同尼龙袋放在瓷研钵中快速研磨（幼苗与匀浆液的比例为 1 : 3）

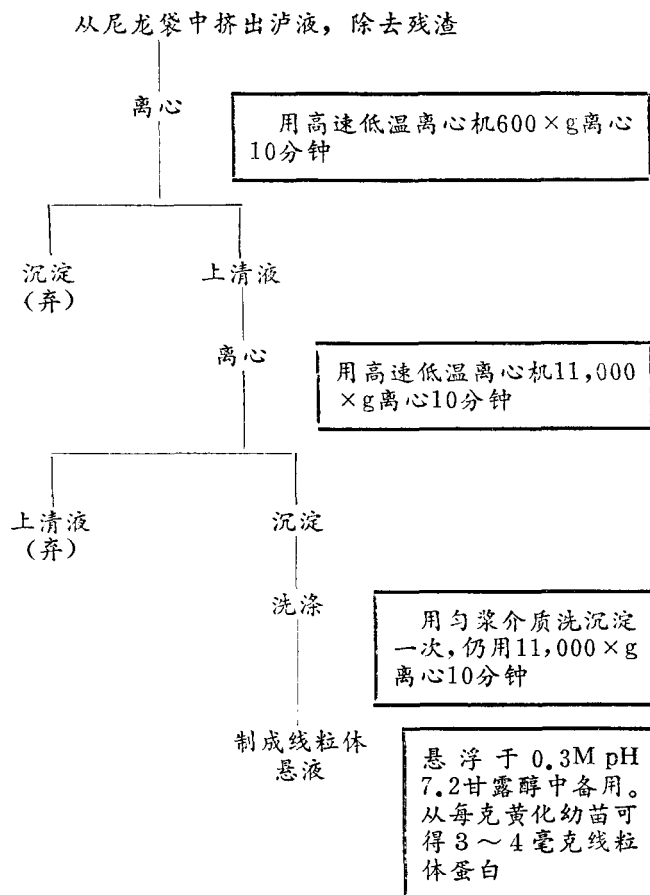


图5 玉米线粒体的分离程序

### 3. 酵母线粒体的分离

#### (1) 酵母细胞的培养

面包酵母 *Saccharomyces Cerevisiae* 在下列介质中培养。

## 酵母细胞培养基成份

| 成份                           | 在 1 升培养基中的含量 (克)  |
|------------------------------|-------------------|
| $\text{CaCl}_2$              | 0.33              |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$     | 9.00              |
| $\text{MgSO}_4$              | 0.50              |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 6.00              |
| 蛋白胨                          | 5.00              |
| 酵母浸出膏                        | 10.00             |
| 葡萄糖                          | 8.00 (含水葡萄糖则为8.8) |

将面包酵母菌株接种于上述培养基中，在28℃振荡培养。何时适宜于收集酵母细胞，视其研究目的而异。当研究葡萄糖去阻遏条件下线粒体的生物发生时，待葡萄糖耗尽时（大约培养9小时）进行收集。一般都在酵母细胞生长最旺盛的对数生长期时进行收集。将所收集的酵母细胞，用蒸馏水洗涤三次，除去浮在沉淀上面的黑色层杂质。

### (2) 线粒体的离心分离

因为酵母细胞外面有一层坚厚的细胞壁，因此，首先必须将细胞壁除去后才能进行线粒体的分离。可以用不同的方法除去细胞壁。我们摸索了用蜗牛酶消化细胞壁的方法。这包括先用巯基乙酸钠预处理酵母细胞，再用自制的蜗牛酶进行处理形成原生质体（或球形体），最后从原生质体分离线粒体。

#### A、原生质体的形成

按每克湿酵母细胞加4毫升的含1M巯基乙酸钠,0.1M