

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

## **СПЕЦПРАКТИКУМ ПО БИОЭНЕРГЕТИКЕ**

Учебно-методическое пособие для вузов

Составители:  
А.П. Гуреев, М.Ю. Сыромятников,  
В.Н. Попов

Воронеж  
Издательский дом ВГУ  
2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ТЕМА 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ.....	6
ТЕМА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ПЕЧЕНИ МЫШИ. ИЗМЕРЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА .....	10
ТЕМА 3. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ СКОРОСТИ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ. ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ.....	18
ТЕМА 4. ИЗМЕРЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ КАЛЬЦИЯ МИТОХОНДРИЯМИ.....	22
ТЕМА 5. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ МОЗГА МЫШИ .....	26
ТЕМА 6. ИЗМЕРЕНИЕ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА .....	31

## ТЕМА 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ

**Цель занятия:** Введение в митохондриологию, ознакомление с методикой приготовления сред для выделения митохондрий. Сравнение сред для выделения митохондрий из различных тканей.

**Основные теоретические положения:** Среды для выделения и инкубации митохондрий по плотности и своему ионному составу должны максимально соответствовать естественному окружению митохондрий, то есть цитозолю. Главными компонентами сред для выделения и инкубации митохондрий являются сахара, буферные растворы и хелаторы.

Среди сахаров, являющихся основными осмотически активными компонентами сред, обычно используется сахароза и маннитол. Сахароза, или столовый сахар - это димер глюкозы и фруктозы. Молекулярная масса сахарозы 342,3 г/моль, плотность 1,588. Сахароза имеет очень высокую растворимость – 200 г/100 мл воды, поэтому с ее помощью легко варьировать плотности буферов для различных целей. Маннитол, или D-Маннит является одним из сахаров с гидроксильными ( $\text{OH}^-$ ) группами, поэтому имеет некоторые химические свойства спиртов. Молекулярная масса маннитола 82,17 г/моль, плотность 1,489. Маннитол осмотически более активен, чем сахароза, но его использование обусловлено наличием  $\text{OH}^-$ -групп, что защищает митохондрии от повреждений радикалами кислорода, особенно гидроксил-радикалами.

Среди буферов самым распространенным в биологических исследованиях является Трис- $\text{HCl}$  ( $\text{Tris-HCl}$ ). При температуре 25°C он имеет величину  $\text{pK}_a = 8,06$ . Это предполагает, что эффективный предел буферной емкости находится между  $\text{pH}$  7,1 и 9,0. Однако многие авторы отмечали неко-

торую токсичность Трис-НСI для митохондрий. Поэтому при работе с митохондриями наибольшей популярностью пользуется ХЕПЕС (HEPES) (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан-сульфоновая кислота). ХЕПЕС является органическим буфером цвиттер-ионом, то есть в одной молекуле содержатся кислотные и щелочные группы. ХЕПЕС оптимально подходит для сред выделения и инкубации, поскольку он имеет максимальную буферную емкость при рН 3,0 и при нормальном физиологическом значении рН цитоплазмы клеток 7,5.

Хелаторы являются обязательными компонентами сред для выделения и инкубации митохондрий. Основное свойство хелаторов заключается в связывании ионов металлов, что имеет большое значение для митохондрий, способных аккумулировать значительное количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Большое количество  $\text{Ca}^{2+}$  выделяется при гомогенизации тканей. Это оказывает негативное влияние на целостность внутренней мембраны митохондрий и, как следствие, на качество интактных препаратов митохондрий.

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) представляет собой хелатор с высокой специфичностью для двухвалентных катионов, таких как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ . Но его использование имеет также негативные последствия для митохондрий, так как удаление ионов  $\text{Mg}^{2+}$  ведет к конформационным изменениям, в результате чего протонная проводимость внутренней мембраны увеличивается, и мембранный потенциал падает. Более того, ЭДТА меняет кинетику взаимодействия митохондриальных ферментов с АТФ и АДФ, так как в нормальных условиях АТФ практически полностью находится в комплексе с  $\text{Mg}^{2+}$ . Именно по этой причине в качестве хелаторов в средах для работы с митохондриями используется не ЭДТА, а ЭГТА.

ЭГТА (этиленгликольтетрауксусная кислота) имеет намного большую, в сравнении с ЭДТА, специфичность по отношению к ионам кальция. Специфичность ЭГТА к ионам  $Mg^{2+}$  в 10000 раз ниже, чем к  $Ca^{2+}$ .

БСА (бычий сывороточный альбумин) не является строго обязательным компонентом сред для работы с митохондриями, но он улучшает качество препаратов, поскольку устраняет разобщающее действие жирных кислот. Рекомендуется использовать БСА только в среде выделения и не добавлять БСА в среду для промывки митохондрий. В живых клетках сывороточные альбумины имеют две главные функции – транспортную и создание так называемого онкотического давления.

Классически для выделения митохондрий используется 2 типа сред: среда для выделения (с БСА), в которой производится гомогенизация и первое центрифугирование, и среда для промывки (без БСА), в которой производятся все дальнейшие работы. Измерение биоэнергетических характеристик (кроме поглощения  $Ca^{2+}$ ) проводят в среде измерения, но также допускается измерение и в среде для выделения (с БСА).

## **Работа 1. Приготовление сред для выделения и работы с митохондриями**

*Материалы и оборудование.* Электронные весы; рН-метр; маннитол, сахароза, EGTA, HEPES, БСА, KCl, NaCl,  $KH_2PO_4$ ,  $MgCl_2$ , KOH.

*Ход работы:*

**Замечание 1.** Для выделения митохондрий печени лучше всего использовать чистую сахарозную среду. Это связано с тем, что при гомогенизации печени в гомогенате содержится очень много эритроцитов. Маннитол

вызывает набухание эритроцитов, в результате чего избавиться от них без дополнительных процедур достаточно сложно.

1. Рассчитать массу компонентов на объем 300 мл:

Табл. 1. Компоненты сред для выделения митохондрий из печени

Компонент	Концентрация
Сахароза	250 мМ
HEPES	10 мМ
EGTA	1 мМ
BCA (только для среды выделения)	2 мг/мл

Табл. 2. Компоненты сред для выделения митохондрий из мозга

Компонент	Концентрация
Маннитол	225 мМ
Сахароза	75 мМ
HEPES	5 мМ
EGTA	1 мМ
BCA (только для среды выделения)	2 мг/мл

Табл. 3. Компоненты сред для измерения биоэнергетических параметров митохондрий (предпочтительно на 100 мл)

Компонент	Концентрация
KCl	125 мМ
HEPES	20 мМ
NaCl	14 мМ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 мМ

MgCl <sub>2</sub>	1 мМ
EGTA	0,2 мМ
БСА (только для среды выделения)	1 мг/мл

2. Взвесить необходимое количество компонентов для приготовления среды для выделения и среды для промывки. Растворить в 300 мл дистиллированной воды.

3. Довести значения pH сред до нормального физиологического значения pH цитозоля 7,2 – 7,4, используя сухой КОН.

4. Хранить среды при +4°C в течение нескольких недель.

***Замечание 2.** Все среды рекомендуется хранить в стеклянной таре. Ни в коем случае не допускается ее длительное хранение в пластиковой посуде, так как происходит обогащение среды перекисью водорода.*

## ТЕМА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ПЕЧЕНИ МЫШИ.

### ИЗМЕРЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

**Цель занятия:** освоение и закрепление метода выделения интактных митохондрий из печени мыши. Ознакомление с методом измерения мембранного потенциала.

**Основные теоретические положения:** Митохондрии печени имеют уникальные свойства, которых нет у митохондрий других органов. Например, сильная зависимость функций от метаболического состояния органа, что позволяет оценивать влияние тех или иных препаратов на митохондриальные функции. Митохондрии печени обладают высокой устойчивостью к