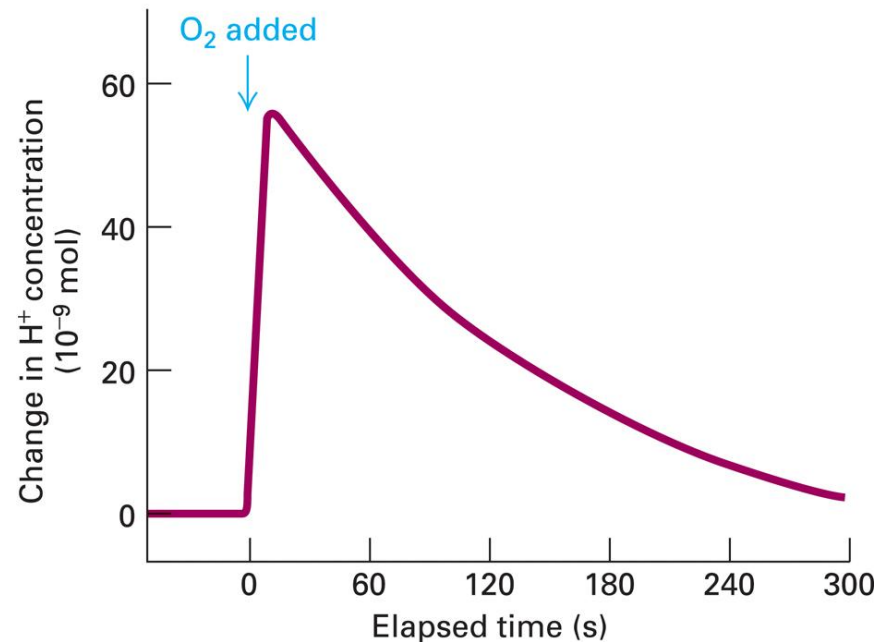
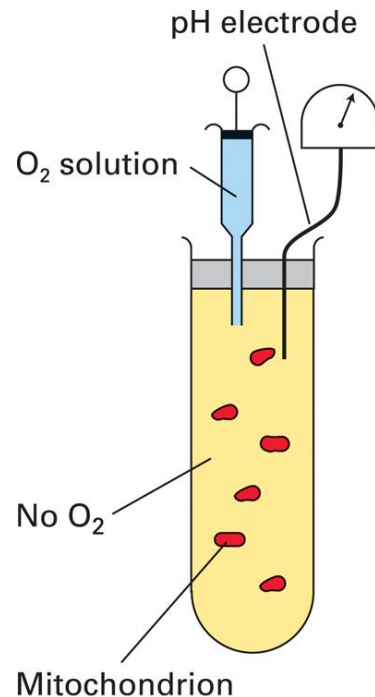


# 实验十二、线粒体的分级分离及电子传递的检测

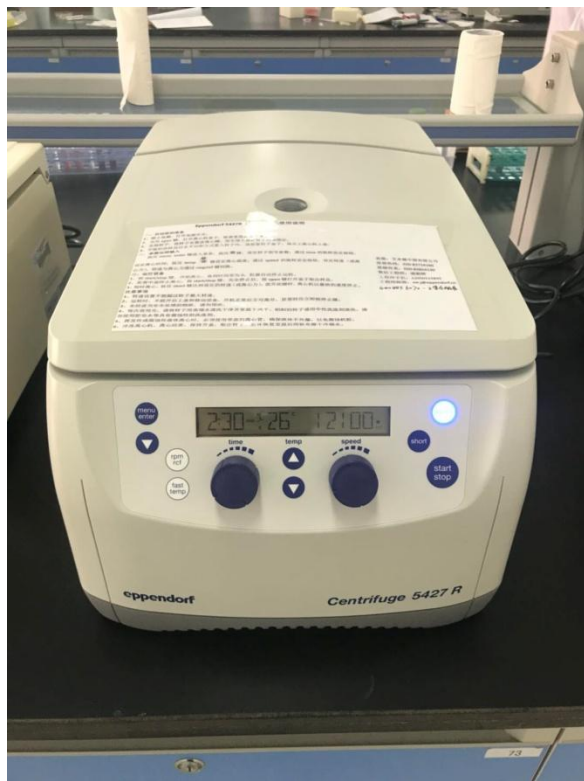
### (三) 线粒体电子传递的检测

在线粒体结构完好的条件下，如果将 $\text{NAD}^+$ 加入到线粒体的悬浮液中，在没有氧气存在的条件下，电子传递不会发生， $\text{NAD}^+$ 也不被氧化，而当加入 $\text{NAD}^+$ 的同时注入氧气，伴随着电子传递， $\text{NAD}^+$ 接受电子被氧化，同时会将 $\text{H}^+$ 外排至线粒体悬浮液中，通过检测悬浮液的酸化，即pH降低，即可证实电子传递的发生。



### 三、实验材料及用品：

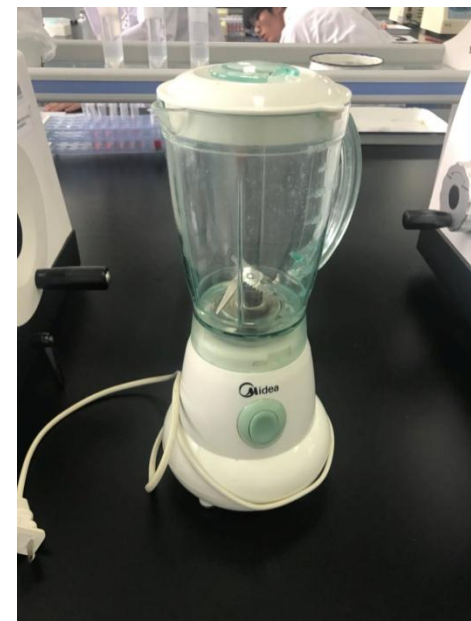
器具：高速离心机、解剖刀剪、小烧杯、冰浴、组织捣碎机，培养皿，离心管，制氧机，pH试纸



2700/12800rpm  
离心机



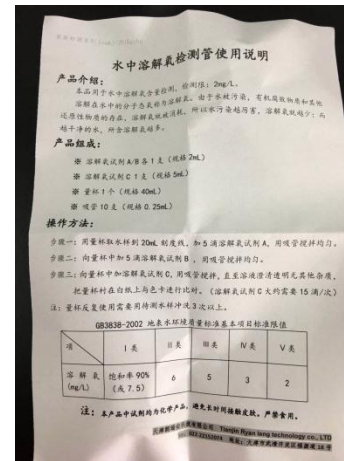
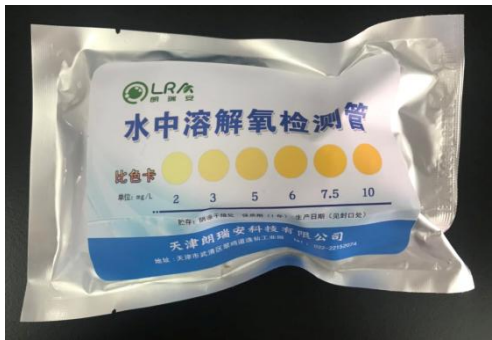
制氧机



组织捣碎机

# 试剂：生理盐水、

1. 0.25mol/L蔗糖-0.003mol/L氯化钙溶液、
2. 0.34mol/L蔗糖+0.01mol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.4)
3. 0.25mol/L蔗糖+0.01mol/L Tris-HCl缓冲液  
(pH7.4)+10mM NAD<sup>+</sup>
4. 水中溶解氧检测试剂



5. 固定液【甲醇-冰乙酸(9:1)】、姬姆萨染液(Giemsa)
6. 1%詹纳斯绿B染液(Janus Green染液)。

材料：动物肝脏(蛙肝)。

## 四、实验方法与步骤：

### 1. 动物肝细胞匀浆制备：

(1) 取出肝脏（2只牛蛙），先用清水冲洗干净后，放在置于冰块上的培养皿中用剪刀剪成小块，去除结缔组织，用生理盐水反复洗涤，尽量除去血污，用滤纸吸去表面的液体。

(2) 加入40mL预冷的0.25mol/L蔗糖-0.003mol/L氯化钙溶液

(3) 将悬浮的肝组织液倒入组织捣碎机中进行捣碎，直至没有可见的组织块为止。

(4) 在烧杯上铺上三层纱布，过滤去除大组织块。

## **注意事项：**

尽可能先充分剪碎肝组织，缩短匀浆时间，  
整个分离过程不宜过长，以保持组分生理活性。

## 2. 细胞核与线粒体的分离（两人一组）：

(1) 先将20mL 0.34mol/L蔗糖缓冲液分别注入到两支50ml离心管，然后沿管壁小心地各加入20mL前面制备的肝组织匀浆液，使其覆盖于上层。 2700 rpm 4 ° 下离心10min，沉淀为粗提的细胞核。（该步骤使用五楼实验室的离心机）

(2) 离心结束后，将上述两支离心管中的上清缓缓取出转入另一个50ml离心管中，沉淀用1mL预冷的0.25mol/L蔗糖缓冲溶液洗1次 (2700rpm离心10min)，离心管中的沉淀为细胞核与部分细胞碎片。

## 差速离心分离线粒体

(3) 将上一步得到的上清液12800rpm离心10min（该步骤使用五楼实验室的离心机），沉淀即为粗提的线粒体。

（如果沉淀足够多，也可以用1mL预冷的0.25mol/L蔗糖缓冲溶液洗1次(2700rpm离心10min)，获得线粒体）



## 五. 实验结果和作业：

### 1. 线粒体电子传递的检测：

(1)悬浮液注氧：在等待离心的同时，在0.25mol/L蔗糖缓冲溶液中注氧1min。

(2)离心结束后，用上述注氧悬浮液225ul悬浮线粒体，同时加入25ul 100mM NADH (终浓度为10mM)，混匀后迅速用枪头吸取少量悬浮液用pH试纸检测pH的变化并记录拍照。以未充氧的悬浮液以及者充氧但未加入NADH的悬浮液为对照。

## 2. 细胞核与线粒体的观察、鉴定：

(1) **细胞核**：取细胞核沉淀一滴**涂片**，空气干燥，加入甲醇-冰乙酸**固定15min**，充分**吹干**，滴**姬姆萨染液**(原液10~20倍稀释)**染色10min**。自来水**冲洗**，**吹干**，镜检。

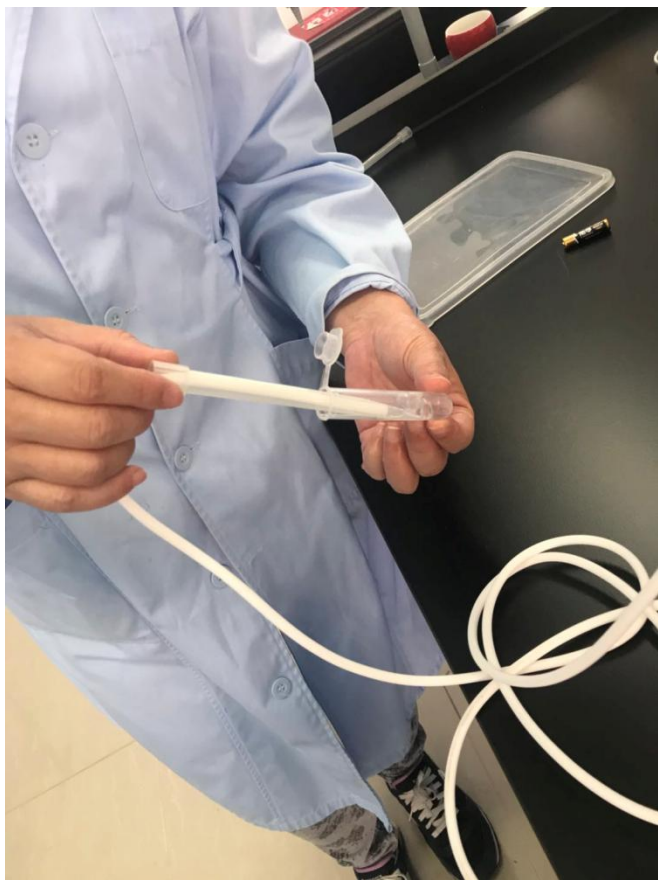
结果：细胞核紫红色，上面附着少量胞质及浅蓝色碎片。

(2) **线粒体**：取线粒体沉淀**涂片**，注意勿太浓密，**不待干**即滴加1/5000稀释的**詹纳斯绿B染液****染色20min**，**盖上盖玻片**，镜检。

结果：线粒体蓝绿色，呈小棒状或哑铃状。

## 3.作业

- 1) 分别绘图描绘你所观察到的典型细胞核和线粒体的形态。
- 2) 分析电子传递过程中悬浮液pH值的变化



向0.25mol/L蔗糖缓冲溶液中充氧



充氧且加NADH的悬浮液

未充氧且未加NADH的悬浮液

增加一个充氧且未加NADH的悬浮液作为对照