

ЮХАН КАЛАМ, МЕЙДА МАЙЕР, ТОЙВО ОРАВ

О ВЫДЕЛЕНИИ МИТОХОНДРИЙ У *VICIA FABAE* L.

В последние годы получены убедительные доказательства способности митохондрий к воспроизведению своей основной структуры с помощью собственного аппарата репродукции, действующего как под контролем хромосомных факторов, так и вполне автономно. Доказательства о присутствии ДНК в митохондриях, хотя в концентрациях в два раза меньше, чем в ядрах тех же клеток, получены разными методами, вплоть до препаративного выделения (Mitchell и др., 1953; Schatz и др., 1964; Luck, Reich, 1964; Sager, Ramanis, 1965; Rabinowitz и др., 1965; Казаков, 1965 и др.). В митохондриях имеются также своеобразные рибосомы и система синтеза белка (Елаев, 1964; Roodyn, Wilkie, 1968). Все это привлекло внимание генетиков, так как митохондрии, по-видимому, являются основными клеточными органеллами, определяющими эффекты цитоплазматической наследственности. В исследованиях по радиобиологии и радиационной генетике, проводимых нами, возникла необходимость изучения некоторых процессов на субклеточном уровне, в частности, изучение реакции митохондрий конских бобов на действие некоторых модификаторов эффекта гамма-облучения. Первым шагом в достижении этой цели является выделение активной фракции митохондрий.

Мы поставили перед собой задачу выработать оптимальную модификацию методики выделения митохондрий из проростков *Vicia faba* L.

Хотя уже в 1948 г. Д. Х. Хогебум и сотрудники (Hoгеboom и др., 1948) сообщили, что при использовании 0,88 М сахарозы в качестве среды для диспергирования клеток печени методом дифференциального центрифугирования удается легко отделить друг от друга ядра, митохондрии и микросомы. Не существует единой методики получения чистых фракций митохондрий. Митохондрии выделяют способом, в основе которого лежит методика К. Клиленда (Cleland, 1952) или модификация И. Мосоловой и Н. Сисакяна (1961). Но в общем методика выделения митохондриальной фракции, например, предварительное и заключительное центрифугирование, в различных исследованиях варьирует в достаточно больших пределах (табл. 1), что существенно затрудняет предварительный выбор оптимального режима центрифугирования для выделения митохондриальной фракции из изучаемого объекта.

Семена одинакового размера одной и той же линии конских бобов сорта 'Йыгева' проращивались в темноте на влажной фильтровальной бумаге при температуре 20°C до двухнедельного возраста. Навеску (5 г) из этиолированных проростков растирали в фарфоровой ступке в среде выделения (0,5 М сахарозы, 0,02 М трис-буфера, 0,005 М ЭДТА,

Таблица 1

Величины центробежных сил, применяемые при выделении митохондриальной фракции (по данным литературы)

Объект	I		II		Ссылка
	центрифугирование				
	центроб. сила, g	время, мин	центроб. сила, g	время, мин	
Листья табака	120	10	19 000	20	DuBuy и др., 1950
Проростки клешевины	500	5	18 000	30	Beevers, Walker, 1956
Листья табака	1000	7	10 000	30	Pierpoint, 1959
Проростки гороха	3800	5	7800	15	Мосолова, Сисакян, 1961
Проростки кукурузы	1500	10	18 000	20	Саламатова, 1965
Проростки гороха	2300	10	7800	10	Калачева, Сисакян, 1964
Корешки кукурузы	5000	5	20 000	20	Таирбеков, 1964
Проростки гороха	2300	10	5000	20—30	Целищев и др., 1965
Проростки кукурузы	580	10	17 500	15	Андреева, Куркова, 1965
Гипокотили мasha	1000	15	10 000	15	Ikuta, Bonner, 1967
Листья гороха	600	15	11 000	15	Рёслер, Косицын, 1967
Проростки пшеницы	фильтрование через 2-слойный нейлон (50 отверстий на см)		40 000	2	Sarkissian, Srivastava, 1968
Проростки гороха	1000	10	10 000	10	Зенченко, Станко, 1969
Листья томата	1300—1600	10	7000	20	Косицын, Игошина, 1970
Корешки пшеницы	3000	10	15 000	10	Зайшева, Титова, 1970

Таблица 2

Результаты электронно-микроскопического анализа митохондриальной фракции при разных режимах центрифугирования

Вариант	I		II		III		Оценка митохондриальной фракции	
	центрифугирование						чистота	цельность
	g	мин	g	мин	g	мин		
1	1500	15	4500	25			—	+
2	2100	10	5500	15			—	+
3	3800	10	5500	15			—	+
4	3800	10	7800	15			—	+
5	1500	15	4500	25	4500	25	—	—
6	2100	10	5500	15	5500	15	+	+
7	3800	10	5500	15	5500	15	+	+
8	3800	10	7800	15	7800	15	—	—

Примечание. Загрязненные другими органеллами и частицами варианты, а также варианты с несколькими морфологически нецельными митохондриями отмечены —, а положительные результаты — +.

pH 8,5). Количество среды и растительного материала брали в отношении 2:1. Гомогенат фильтровали через один слой фланели с последующим отжиманием. Первое центрифугирование гомогената для удаления ядер и обломков клеток проводили при 1500, 2100 или 3800 g в течение

10 или 15 мин. Полученный супернатант центрифугировали для осаждения митохондрий при 5500 и 7800 *g* по 15 мин и при 4500 *g* по 25 мин. Осадок промывали (0,5 *M* сахарозы, 0,02 *M* трис-буфера, 0,005 *M* ЭДТА, рН 7,5) и повторно центрифугировали при тех же условиях. Все операции по подготовке материала и выделению митохондрий проводили при температуре $2 \pm 1^\circ$.

Для оценки чистоты митохондриальной фракции при разных режимах центрифугирования проводили электронно-микроскопический анализ, любезно выполненный по нашей просьбе А.-П. Сильвере.

Условия выделения митохондрий и результаты электронно-микроскопического анализа приведены в табл. 2.

Приведенные данные показывают, что при выделении митохондрий из проростков *Vicia faba* L. наиболее чистыми и цельными являются фракции вариантов 6 и 7.

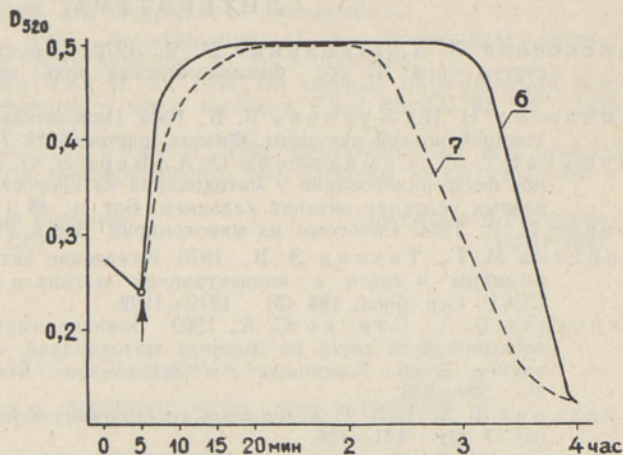
При подборе оптимальных составов сред выделения, промывания

и ресуспендирования мы основывались на данных литературы (Бушуева и др., 1963; Калачева, Сисакян, 1964; Андреева, Куркова, 1965; Целищев, Мухин, 1965; Саламатова, 1965; Рёслер, Косицын, 1967; Зенченко, Станко, 1969; Косицын, Игошина, 1970; Алексева, Школьник, 1970), а также определяли активность митохондриальных фракций, используя оптические параметры (Chappell, Greville, 1963; Ленинджер, 1966). Осадок митохондрий ресуспендировали в среде инкубации (0,1 *M* сахарозы, 0,01 *M* трис-буфера, рН 7,5), и при помощи спектрофотометра СФ-10 при 520 нм регистрировались оптические плотности. В качестве показателя активности митохондриального препарата использовались интенсивность сжатия митохондрий под действием Na-соли АТФ (повышение оптической плотности при 520 нм через 2 мин после добавления Na-соли АТФ) и время полного набухания всех митохондрий в препарате.

В наших опытах оптимальными оказались следующие среды: 1) среда выделения — 0,5 *M* сахарозы, 0,02 *M* трис-буфера, 0,005 *M* ЭДТА, рН 8,5; 2) среда промывания — 0,5 *M* сахарозы, 0,02 *M* трис-буфера, 0,005 *M* ЭДТА, рН 7,5; 3) среда ресуспендирования — 0,1 *M* сахарозы, 0,01 *M* трис-буфера, рН 7,5.

Применяя выявленные оптимальные среды, мы сравнивали варианты 6 и 7, чтобы выяснить наилучший режим центрифугирования. Результаты приведены на рисунке.

Бросается в глаза, что для выделения митохондриальной фракции оптимальным является вариант 6, т. е. I центрифугирование при 2100 *g* в течение 10 мин, II центрифугирование при 5500 *g* в течение 15 мин и промывание с последующим центрифугированием при 5500 *g* в течение 15 мин.



Активность митохондрий в оптимальных средах.
6, 7 — варианты опытов (см. табл. 2).

На основании полученных результатов можно считать оптимальной для выделения митохондрий из проростков конских бобов следующую методику: среда выделения — 0,5 М сахарозы, 0,02 М трис-буфера, 0,005 М ЭДТА, pH 8,5; центрифугирование при 2100 и 5500 г; среда промывания — 0,5 М сахарозы, 0,02 М трис-буфера, 0,005 М ЭДТА, pH 7,5; среда ресуспендирования — 0,1 М сахарозы, 0,01 М трис-буфера, pH 7,5

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Х. А., Школьник М. Я., 1970. Структура митохондрий при недостатке бора. В сб.: Физиологическая роль микроэлементов у растений. Л.: 81—97.
- Андреева И. Н., Куркова Е. Б., 1965. Окислительное фосфорилирование митохондрий корней кукурузы. Физиол. растений **12** (4) : 584—589.
- Бушуева Т. М., Семихатова О. А., Берс Э. П., 1963. Дыхание и окислительное фосфорилирование у митохондрий из проростков гороха, выращенных при разных условиях питания кальцием. Бот. ж. **48** (11) : 1667—1670.
- Елаев Н. Р., 1964. Рибосомы из митохондрий. Вестн. ЛГУ. Сер. биол. **3** : 167—171.
- Зайцева М. Г., Титова З. В., 1970. Изменение активности митохондрий корней пшеницы в связи с концентрацией магния в среде инкубации. Докл. АН СССР. Сер. биол. **194** (5) : 1219—1222.
- Зенченко В. А., Станко С. А., 1969. Влияние импульсного концентрированного электрического света на дыхание митохондрий, сопряженное с фосфорилированием. В сб.: Хлоропласты и митохондрии. Вопросы мембранной биологии. М.: 329—338.
- Казакова Т. Б., 1965. О возможных генетических функциях митохондрий. Цитология **7** (2) : 141—155.
- Калачева В. Я., Сисакян Н. М., 1964. Об эффективности окислительного фосфорилирования растительными митохондриями. Докл. АН СССР **154** (5) : 1198—1201.
- Косицын А. В., Игошина Т. И., 1970. Связь цинка с белками в хлоропластах и митохондриях томатов. В сб.: Физиологическая роль микроэлементов у растений. Л.: 147—153.
- Ленинджер А., 1966. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции. М.
- Мосолова И. М., Сисакян Н. М., 1961. Об условиях выделения митохондрий из растительной клетки. Биохимия **26** (3) : 549—555.
- Рёслер М. И., Косицын А. В., 1967. Очистка митохондрий из листовой ткани гороха зонным центрифугированием. Физиол. растений **14** (1) : 176—178.
- Саламатова Т. С., 1965. Изучение влияния одно- и двухвалентных катионов и ауксинов на набухание и сократительные свойства митохондрий мезокотилей кукурузы. В сб.: Регуляторы роста растений и нуклеиновый обмен. М.: 200—209.
- Таирбеков М. Г., 1964. Влияние фосфорного питания на окислительное фосфорилирование и ультраструктуру митохондрий корешков кукурузы. Докл. АН СССР **158** (5) : 1206—1208.
- Целищев С. П., Мухин В. П., 1965. Подбор оптимального буфера в среде выращивания при выделении митохондрий из проростков гороха. Докл. ТСХА, **115** (1) : 153—157.
- Целищев С. П., Мухин В. П., Семенова Э. Г., 1965. Влияние условий центрифугирования гомогената на функциональную активность выделенных митохондрий. Докл. ТСХА **115** (1) : 147—151.
- Chappell J. B., Greville G. D., 1963. Influence of the composition of suspending medium on the properties of mitochondria. Methods of separation of subcellular structural components. Cambridge.
- Cleland K. W., 1952. Permeability of isolated rat heart sarcosomes. Nature **170** (4325) : 497—499.
- Du Buy H. G., Woods M. W., Lackey M. D., 1950. Enzymatic activities of isolated normal and mutant mitochondria and plastids of higher plants. Science **111** (2891) : 572—574.
- Beevers H., Walker D. A., 1956. The oxidative activity of particulate fractions from germinating castor beans. Biochem. J. **62** (1) : 114—120.
- Hogboom G. H., Schneider W. C., Palade G. H., 1948. Isolation of intact mitochondria from rat liver, some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem. **172** (3) : 619—628.
- Ikuma H., Bonner W. D. Jr., 1967. Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. Plant Physiol. **42** (1) : 67—75.

- Luck D. J., Reich E., 1964. DNA in mitochondria of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. **52** (4) : 931—938.
- Mitchell M. B., Mitchell H. K., Tissieres A., 1953. Mendelian and non-mendelian factors affecting the cytochrome system in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. **39** (7) : 606—613.
- Pierpoint W. S., 1959. Mitochondrial preparations from the leaves of tobacco. (*Nicotiana tabacum*). Biochem. J. **71** (3) : 518—528.
- Rabinowitz M., Sinclair J., De Salle L., Haselkorn R., Swift H. H., 1965. Isolation of deoxyribonucleic acid from mitochondria of chick embryo heart and liver. Proc. Natl. Acad. Sci. **53** (5) : 1126—1133.
- Roodyn D., Wilkie D., 1968. The biogenesis of mitochondria.
- Sager R., Ramanis Z., 1965. Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. **53** (5) : 1053—1061.
- Sarkissian I. V., Srivastava H. K., 1968. On methods of isolation of active, tightly coupled mitochondria of wheat seedlings. Plant Physiol. **43** (9) : 1406—1410.
- Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H., 1964. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. **15** (2) : 127—132.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
10/III 1971

JUHAN KALAM, MEIDA MAYER, TOIVO ORAV

VICIA FABA L. MITOKONDRITE ERALDAMISEST

Resümees

Antakse kirjandusel põhinev ülevaade mitokondrite eraldamise erinevatest meetoditest ja esitatakse meetodika, mis on kohandatud mitokondrite eraldamiseks põldoa etioloogilise runud idanditest. Selle meetodika kohaselt eraldatakse mitokondrid diferentseeritud tsentrifuugimisega, kusjuures tiirude arv on 2100 ja 5500 g ja keskkondadena kasutatakse mitokondrite eraldamise keskkonda (0,5 M sahharoos + 0,02 M tris + 0,005 M EDTA, pH 8,5), pesemiskeskkonda (0,5 M sahharoos + 0,02 M tris + 0,005 M EDTA, pH 7,5) ja inkubatsioonikeskkonda (0,1 M sahharoos + 0,01 M tris, pH 7,5).

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabus
10. III 1971

JUHAN KALAM, MEIDA MAYER, TOIVO ORAV

ON THE ISOLATION OF *VICIA FABA* L. MITOCHONDRIA

Summary

The data available in literature concerning the methods of isolation of mitochondrial fractions are discussed. The modified method for isolation of mitochondrial fractions from horse bean etiolated seedlings is described. Mitochondrial fractions are prepared by centrifugation at 2100 and 5500 g, using following media: extraction medium (0.5 M sucrose + 0.02 M Tris + 0.005 M EDTA, pH 8.5), washing medium (0.5 M sucrose + 0.02 M Tris + 0.005 M EDTA, pH 7.5) and incubation medium (0.1 M sucrose + 0.01 M Tris, pH 7.5).

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
March 10, 1971