

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS: ACTIVIDAD MALATO DESHIDROGENASA

FUNDAMENTO TEORICO:

La mayoría de los procesos bioquímicos que producen energía química se realizan en orgánulos intracelulares llamados mitocondrias. Estos orgánulos contienen el equipamiento bioquímico necesario para la oxidación de los ácidos grasos, ácidos di- y tri-carboxílicos y aminoácidos, así como para el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.

Debido a la importancia biológica de estas partículas intracelulares, se han desarrollado diversos métodos para su aislamiento. La mayoría de estos métodos se basan en el tamaño, relativamente grande, de las mitocondrias y utilizan para su purificación la centrifugación diferencial de tejidos homogeneizados. La fracción mitocondrial que obtendremos contiene mitocondrias, como componente mayoritario, y además otros componentes celulares como lisosomas, peroxisomas y fragmentos del núcleo. La pureza de la preparación depende de la fuente del extracto y del método de purificación utilizado.

La fracción mitocondrial se puede caracterizar comprobando la existencia de enzimas marcadores. Entre los característicos de la mitocondria mediremos la actividad de la malato deshidrogenasa por medio de un ensayo espectrofotométrico.

MATERIALES Y MÉTODOS:

- Medio de homogenización: 0.3M Manitol (M=182.2), 20mM MOPS (M=209.3), 1mM EDTA (M=372.2), pH 7.5 (guardar a 4°C) 2 litros
- Medio de ensayo 1: 0.3M Manitol, 20mM MOPS, pH 7.4 500 ml
- Medio de ensayo 2: 20 mM MOPS pH 7.4 500 ml

- Medio de ensayo 3: 0.3 Manitol, 20 mM MOPS, 0.1 % Tritón X-100, pH7.4, 500 ml
- 20 mM oxalacetato, pH 6.5 (guardar a 4°C)
- 3 mM NADH en tampón MOPS
- Batidora
- Gasas

Preparación de la fracción mitocondrial:

MANTENER LA MUESTRA a 4°C: Para obtener una fracción de mitocondrias viables todas las disoluciones, material de vidrio, tubos de centrifuga, etc., deben mantenerse en hielo, y los equipos necesarios deben pre-enfriarse antes de utilizar.

Pelar 2 patatas medianas y cortarlas en trozos muy pequeños o rodajas finas. Pesar 200 g e introducirlos en la batidora con 150 ml de medio de homogenización (suficiente para cubrir las patatas). Homogenizar la mezcla durante **3 segundos**. Mezclar el contenido inclinando la batidora y homogenizar otros **3 segundos** a velocidad máxima. Si se homogeniza durante más tiempo, muchas de las mitocondrias se romperán disminuyendo la calidad de la preparación.

Filtrar el homogenado a través de 6-8 capas de gasa. Transferir el filtrado a tubos de centrifuga, equilibrarlos y centrifugar a 1.200 x g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada (4 °C). Recoger el sobrenadante y desechar el precipitado que contiene almidón, núcleos y fragmentos de la pared celular. Centrifugar el sobrenadante (4 °C) durante 20 minutos a 10.000 x g. Decantar cuidadosamente el sobrenadante. El precipitado resuspendido en 0.5 ml de medio de homogenización con una pipeta Pasteur, es la fracción mitocondrial.

Precaución: las mitocondrias se rompen en contacto con agua destilada. Es importante no contaminarlas con agua al utilizar pipetas, casos, etc.

Las mitocondrias se guardan en suspensiones concentradas, ya que en estas condiciones son más estables. Sin embargo, para ensayar la actividad malato deshidrogenasa, se diluirá la muestra 10 veces para conseguir una concentración adecuada para pipetear.

Ensayo de la malato deshidrogenasa:

El enzima cataliza la reacción reversible



El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia el malato y NAD^+ , por lo que la actividad enzimática se ensaya midiendo la oxidación del NADH, a 340 nm, por el oxalacetato.

Diluir 0.1 ml de la fracción mitocondrial con 0.4 ml del medio de ensayo correspondiente (1, 2 ó 3). Después añadir los siguientes reactivos a las cubetas muestra y referencia:

Muestra	Reactivo	Referencia
3 ml	Medio de ensayo (1, 2 ó 3)	3 ml
0.1 ml	NADH	-----
0.05 ml	oxalacetato	0.05 ml

- Añadir 0.05 ml de la fracción mitocondrial diluída a la cubeta referencia.
Tapar la cubeta con parafilm y mezclar bien la preparación.
- Ajustar la absorbancia a 340 nm del espectrofotómetro a cero.

- Añadir 0.05 ml de la fracción mitocondrial diluida a la cubeta muestra, mezclar como antes e inmediatamente comenzar a registrar la variación de la absorbancia a 340 nm.
- Determinar la actividad de la malato deshidrogenasa sabiendo que la absorbancia del NADH es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm. Expresar la actividad en moles de NADH oxidado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml mitocondria}^{-1}$.

Nota: el valor de dilución es orientativo, ya que varía entre preparaciones. Se debe ajustar para conseguir una “reacción” lineal durante 5 minutos.