

## 希爾反應的測定

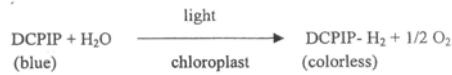
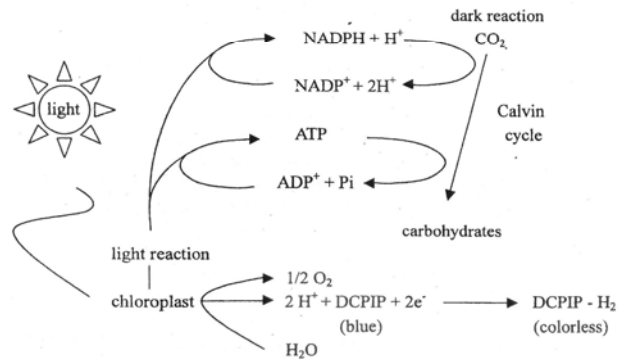
### 實驗目的：

了解單離葉綠體可進行水光解作用

### 實驗原理：

光合作用的進行可分為兩個階段，依光之必需與否分為光反應期 (light reaction stage) 與暗反應期 (dark reaction stage)。光反應發生於葉綠體內的葉綠餅 (grana) 上，包括水光解作用 (photolysis of water) 及光加磷作用 (photophosphorylation)，期間可生成高能產物 NADPH 及 ATP，用於暗反應中二氧化碳之還原合成碳水化合物。

1937 年希爾 (Hill) 首次揭示單離葉綠體在試管中可進行反應，經照光後可將水分解，生成還原態的氫受體而放出氧氣，若給予適當的氫接受者 (hydrogen acceptor)，如 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)，則會放出氧氣，其反應式如下：



這個反應，後人稱之為希爾反應 (Hill reaction)，在本實驗中可明確地證明光合作用放出的氧氣是來自水的分解。因此將於光照情況下，水的分解放出氧氣謂之水的分解。本實驗以 2,6-DCPIP 為氫的接受者，控制光照環境，測定 DCPIP 由深藍色退色的時間，以探討其對光反應速率的影響。

### 材料與藥品：

新鮮菠菜葉	GM buffer : 0.40M sucrose
試管	0.035M NaCl
鋁箔紙	0.05M Tris pH 7.8
果汁機	phosphate buffer 0.1M, pH6.5
離心機與離心管	DCPIP 0.2 mM
光電比色計	DCMU ( $10^{-2} M$ )
光照度計	ascorbic acid 粉末

### 實驗方法：

1. 秤取新鮮的菠菜葉片，去除葉脈及葉柄，加入適量冰冷的 GM buffer 於果汁機內打碎。
2. 以四層紗布過濾，並分裝入離心管。(步驟 1、2 由值日生協助完成，並隨時必須將抽取物保持於冰冷的溫度下)
3. 秤重平衡後，置於離心機以轉速 250 xg 離心 5 分鐘。
4. 拋棄沈澱物，取上層液再以 2000 xg 離心十分鐘，使葉綠體沈澱。
5. 以 10 ml GM buffer 將離心管內的沈澱物懸浮起來，置於 4°C 中待用。
6. 預測實驗：依表一配置各種反應溶液，選擇適當的葉綠體懸浮液體積，使其反應能於十分鐘時結束，即反應液顏色退為綠色，此適當之葉綠體懸浮液體積為 X ml。

7. 依下表配置各種反應體積，測定光強度對希爾反應的影響：

表一：(各試劑體積以 ml 為單位)

試管號碼	1	2	3	4
處理情形	對照組	黑暗處理	光照 30 公分	光照 90 公分
phosphate buffer	0.8	0.8	2	2
0.2 mM DCPIP	0	0.6	1.5	1.5
H <sub>2</sub> O	0.74	0.14	0.35	0.35
chloroplast suspension	0.06	0.06	0.15	0.15

- 利用光照度計測量不同光照距離下之光強度為何。
- 除黑暗組外，第 2、5、10 分鐘，於波長 620 nm 下測量其吸收度。
- 黑暗組以鋁箔紙包住以遮光，並於 0 分鐘及 10 分鐘時，取出試管測定吸光度。

8. 依下表配置各種反應溶液，測定 DCMU 及葉綠體活性對希爾反應的影響：

表二：DCMU 及葉綠體活性對光反應的影響

試管號碼	1	2	3	4
光照情形	對照組	光照 30 公分	光照 30 公分	光照 30 公分
phosphate buffer	0.8	0.8	0.8	0.8
0.2 mM DCPIP	0	0.6	0.6	0.6
DCMU	0	0	0.05	0
H <sub>2</sub> O	0.74	0.14	0.09	0.14
Boiled chloroplast suspension	0	0	0	0.06
chloroplast suspension	0.06	0.06	0.06	0

- 第四管所加之 chloroplast suspension 先於 90°C 水浴加熱 10 分鐘，以破壞原有葉綠體之功能。
- 各試管於第 10 分鐘，在波長 620 nm 下測量其吸收度。
- 之後，每管各加入少許 ascorbic acid 粉末，觀察顏色變化情形。

問題：

- 試討論光強度及 DCMU 對光反應的影響。
- 試討論 DCMU 的作用機制。
- 在生物活體內，氫接受者是何物？