

希爾反應的測定

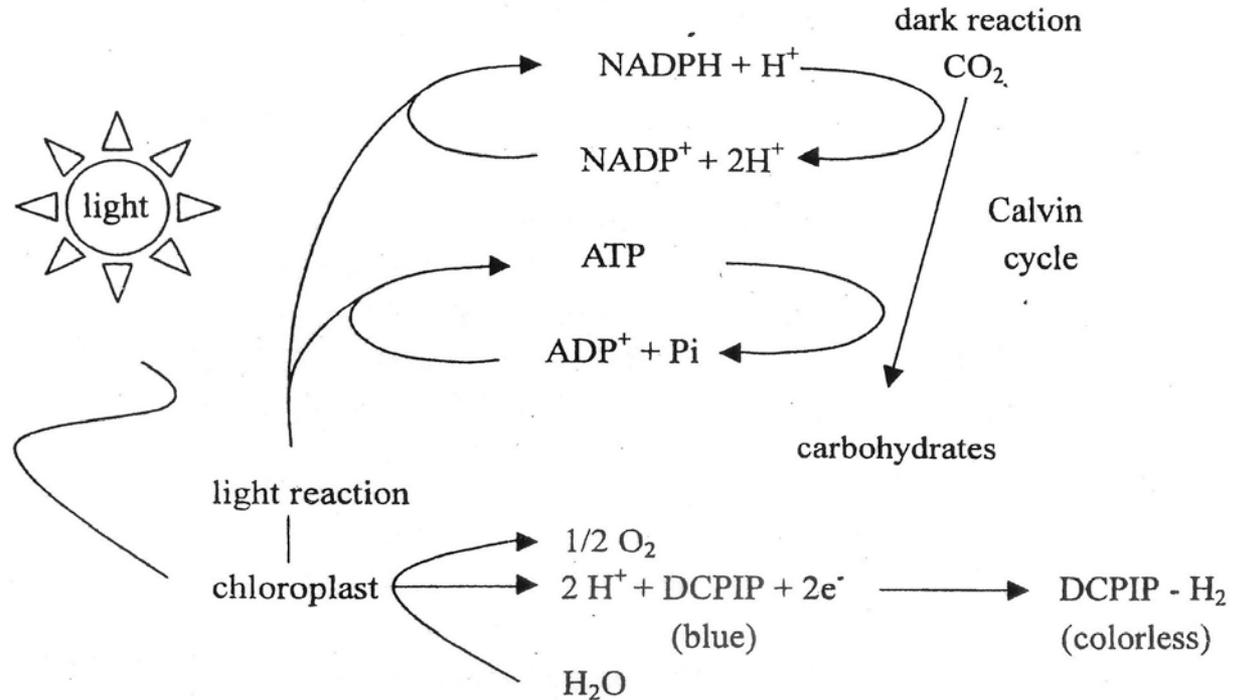
實驗目的:

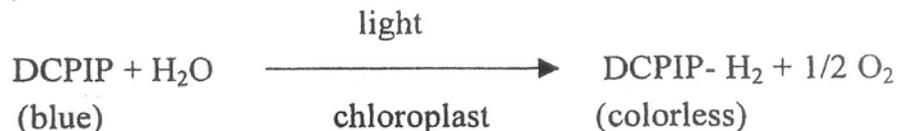
了解單離葉綠體可進行水光解作用

實驗原理:

光合作用的進行可分為兩個階段，依光之必需與否分可為光反應期 (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 ₂ 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。

光照強度：

_____公分：

_____ $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$

_____公分：

_____ $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$

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 ₂ 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？

氧氣釋放測量(Oxygen evolution measurement)

原理：

葉片的氧氣釋放情形使用LD1/2 Oxygen Electrode Chamber (Hansatech)測量。利用氧氣分子改變電極導電度的特性(電極法)，在穩定狀態下產生之電流強度正比於氧氣濃度。瞭解葉片在不同光照強度下，以所釋放氧氣含量的變化速率，推算葉片光合作用的效率。

方法：

儀器組裝

將約 50 μl 的飽和KCl溶液滴在感應器陰極上，並使用Spacer paper和PTFE membrane覆蓋。墊片部份，將不鏽鋼片、海綿、中間有孔洞的鐵網、不織布片和中央無孔洞的鐵網依序放入承載器上部。在不織布片上滴 200 μl 的1M NaHCO_3 ，使承載器中維持約1%二氧化碳濃度。將承載器連接水循環恆溫系統，穩定控制容器中溫度(依培養環境而定)。可利用針筒注入或移除 1ml空氣，檢查承載器是否有漏氣情形發生。

調整光源器的光照強度

將光源器(100w燈泡，光照強度約 4500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)放入適當的濾片(穿透度分別為80%、50%、25%、10%)，調整為適當的光照強度(依培養環境而定)，並紀錄。

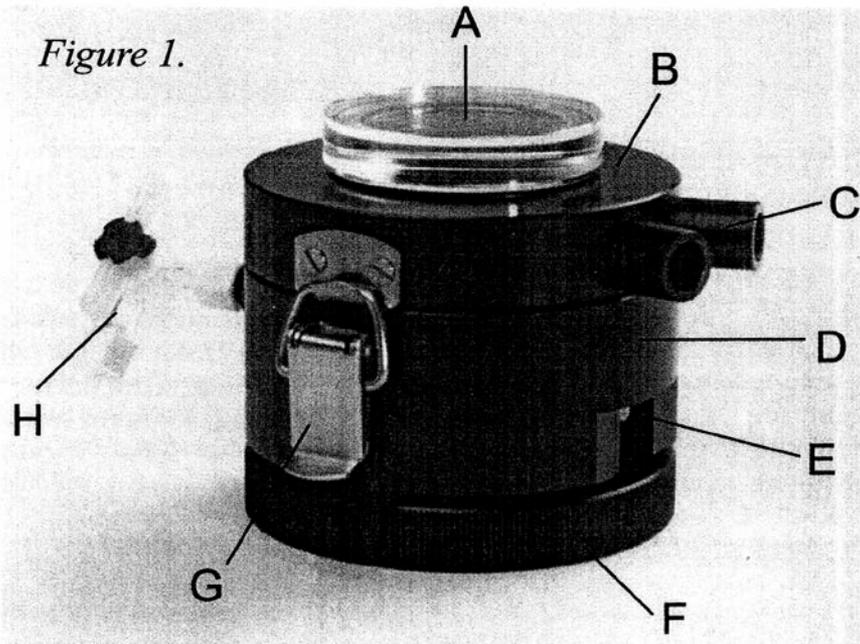
Hansatech LD1 oxygen electrode chamber

– O₂ evolution

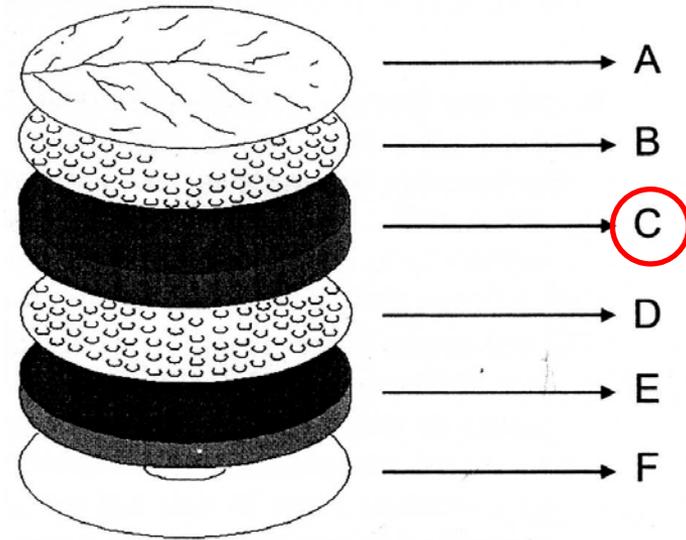


Hansatech LD1 oxygen electrode chamber

– O₂ evolution



- A: Cast Acrylic Top Window.
- B: Water Jacket.
- C: Water Jacket Connectors.
- D: Leaf Chamber.
- E: S1 Electrode Disc.
- F: Base ring.
- G: Securing Clasps.
- H: Gas Port.



In the LD1/2 electrode chamber the leaf (A) is supported by a sandwich of materials. Beneath the leaf is a stainless steel grid an unperforated centre (B), layer of capillary matting (C), stainless steel grid with open centre (D), sponge spacer (E) and a stainless steel washer (F) which locates nearest the electrode disc.

The purpose of the sandwich of materials is to support the leaf sample above the cathode whilst still permitting adequate diffusion of evolved oxygen through the floor of the reaction chamber to the cathode of the electrode disc.

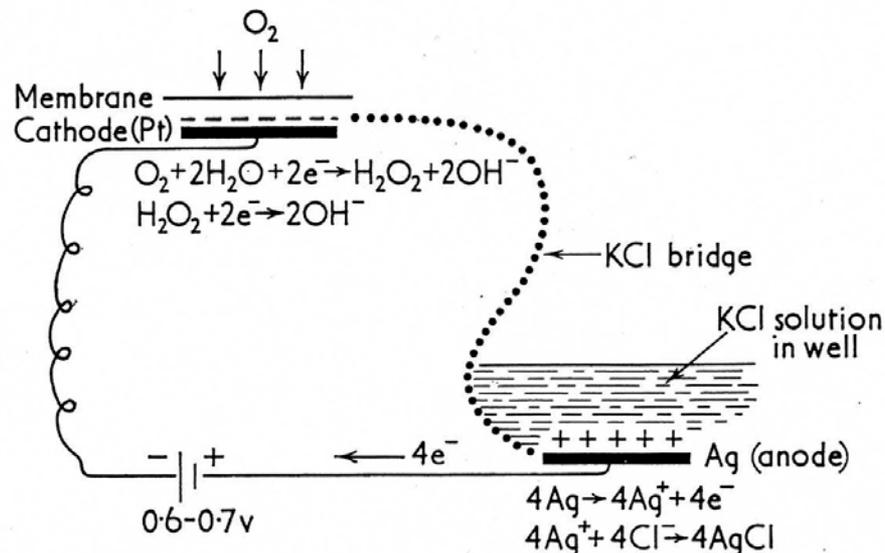
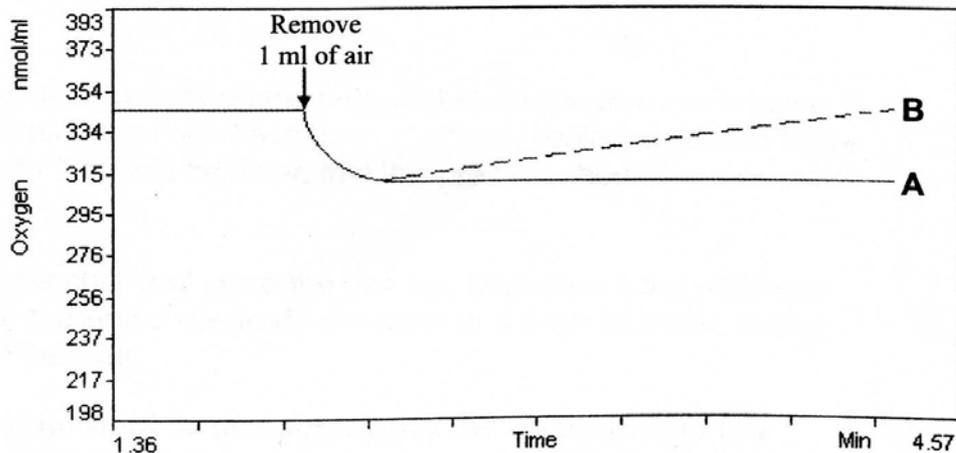


Fig. 1. Diagrammatic representation of electrode reactions. When the potentiating voltage is applied across the two electrodes the platinum becomes negative and the silver becomes positive. Oxygen diffusing through the membrane is reduced at the platinum surface and a current flows through the circuit (which is completed by the KCl bridge). The silver is oxidized and silver chloride is deposited. The current is stoichiometrically related to the oxygen reduced (see text).

Removing 1 ml of air from the chamber will induce a rapid negative response in electrode signal. Once the signal re-stabilises, no further drift should occur (A). A gradual upward drift may indicate a leak in the chamber allowing ambient air entry.



製作氧氣濃度校正

確定承載器密封後，先針對目前大氣氧氣含量將讀值調整為零，並將 1 ml 大氣利用針筒送入承載器中，所測得讀值差作為當前氧氣濃度的校正。

測量樣品

利用鑽孔器切下適當大小的葉片(最大為 10 cm²)放在墊片最上層，確認密封後，放上光源器，紀錄一至三分鐘內，每十秒的數據變化。

公式

$$\text{Oxygen evolution rate} = \frac{8.584 \times \Delta \text{樣品讀值}}{\Delta \text{standard 讀值} \times \text{時間} \times \text{葉片面積}}$$

(單位：μmol m⁻² s⁻¹)

(* 8.584 μmol 為 1 ml 空氣在 25°C，1atm 下，氧氣的含量)

Leaf types