

植物生物学实验-植物生理部分

# 实验三 光合作用的希尔反应

# 【实验原理】

- 离体叶绿体加到具有适当氢受体（A）溶液中，光照后放出氧气。



实验中用的氧化剂A是2,6-二氯靛酚（2,6-D），是一种蓝色染料，接受电子和H<sup>+</sup>后被还原成无色。在光下，叶绿体将2,6-D还原，从蓝色到无色。通过测定其光密度的变化，可以得出叶绿体的还原能力。



氧化型二氯醌  
(蓝色)

还原型二氯醌  
(无色)

DCMU (二氯苯基二甲基脲, dichlorophenyl dimethylures,商品名为敌草隆, diuron)等除草剂是作用于光合作用光系统II中质体醌 $Q_B$ 结合部位。它们竞争性地替换与D1蛋白结合着的质体醌 $Q_B$ , 导致电子传递受阻, 抑制Hill反应的发生。

非环式光合磷酸化与假环式光合磷酸化均可被DCMU所抑制, 而环式光合磷酸化则不被DCMU抑制。

# 【实验材料】

- 菠菜叶片

# 【实验器材与试剂】

- **实验器材：** (1)研钵; (2)移液管; (3)离心机; (4)722型分光光度计; (5)500瓦灯泡
- **实验试剂：** (1) 提取液(0.02M Tris-HCl 缓冲液, 含有0.4M 蔗糖, 0.03M KCl, pH7.5); (2) DCMu(用0.02M Tris-HCl缓冲液配制成5 $\mu$ M DCMU溶液); (3) 2,6-D,即2,6-二氯靛酚(用0.02M Tris-HCl缓冲液配制成0.003% 2,6-D溶液); (4)80%丙酮; (5)0.4M蔗糖等

# 【实验步骤】

## ■ 叶绿体的提取

- ① 将**4g**新鲜叶片去叶脉后剪碎，放于预冷的研钵，加入**4mL**预冷的提取液，研磨成匀浆，再加**4mL**预冷的提取液混匀，将所有的匀浆液用4层纱布过滤，弃去杂质。
- ② 收集过滤液于离心管中，**4℃** **1000rpm**离心 **3min**，收集上清液于一新的离心管，弃去沉淀。
- ③ **4℃** **3000rpm**离心**5min**，弃去上清液，将沉淀悬浮于冷的**4mL**提取液，即为叶绿体提取液。

## ■ 叶绿素含量的测定

取**0.1ml**叶绿体悬浮液于**7ml**离心管，用**4.9ml 80%**丙酮稀释到**5ml**，混匀后，在**652nm**下测定吸光度，来计算叶绿素含量。

$$C(\text{mg/mL}) = \text{OD}_{652} \times 1/34.5 \times \text{稀释倍数}$$

用预先冷冻的提取液稀释叶绿体悬浮液，总体积**8mL**，使叶绿体悬浮液浓度约相当于叶绿素浓度为**0.04mg/mL**。

## ■ Hill反应

取9支试管，包好黑纸并编号1-9，按下表所列试剂分别加入9支试管中。

试管号	提取液/mL	叶绿体/mL	DCMu/mL	2.6-D/mL
1	4.0	--	--	1.0
2	4.5	0.5	--	--
3	4.0	1.0	--	--
4和5	3.5	0.5	--	1.0
6和7	3.0	1.0	--	1.0
8和9	--	1.0	3.0	1.0

提取缓冲液做参比，600nm读取1号管光密度，分别取0.5mL和1mL叶绿体悬浮液放入2号和3号试管中，立即于600nm读取光密度，再按表中要求加入叶绿体悬浮液于其它试管中，然后把黑纸剥掉，将4号、6号和8号管放在距光源20cm处，把5号、7号和9号管放在距光源60cm处（注意：试管放在盛有水的烧杯中），10分钟后，立即用黑纸把试管包好放冰浴中，然后于600nm分别读取光密度。

# 【注意事项】

- 叶绿体提取：

在冰浴低温条件下操作，  
上清液和沉淀的保留与否。

- 希尔反应：

每管反应的总体积相同，且做好标记；

在反应时，所加溶液为提取液稀释的叶绿体悬浮液，与测定叶绿体含量时用丙酮稀释不同；

光照条件下取放试管时，千万注意不能将水溅到灯泡上  
(冷水溅到热的灯泡上会引起灯泡爆炸)。

# 【思考与作业】

- 解释叶绿体浓度和光照强度对希尔反应有何影响？
- DCMU抑制希尔反应活性的机理何在？
- 为得到理想的实验结果，在实验中应注意的主要问题何在？