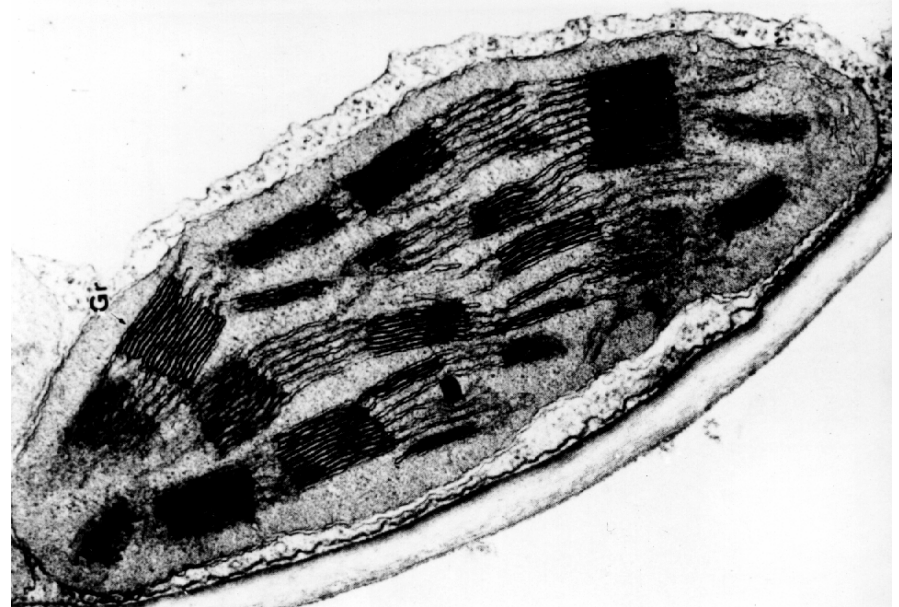
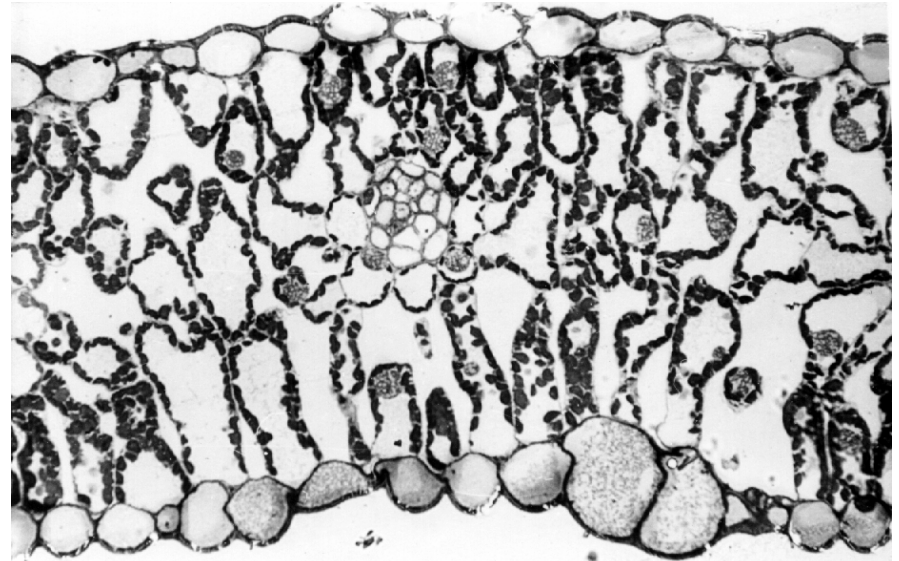


一、叶绿体(类囊体)的Hi11反应活力测定

- ❖ 叶绿体是植物进行光合作用的细胞器，依据分离所得叶绿体的结构完整程度，大致将它分成两类：
- ❖ 被膜破碎的叶绿体（类囊体）具有光合电子传递、光合放氧和光合磷酸化的功能
- ❖ 被膜完整的叶绿体 具有同化二氧化碳的完全的光合作用功能。
- ❖ 下面介绍类囊体的制备及其Hi11反应活力测定。

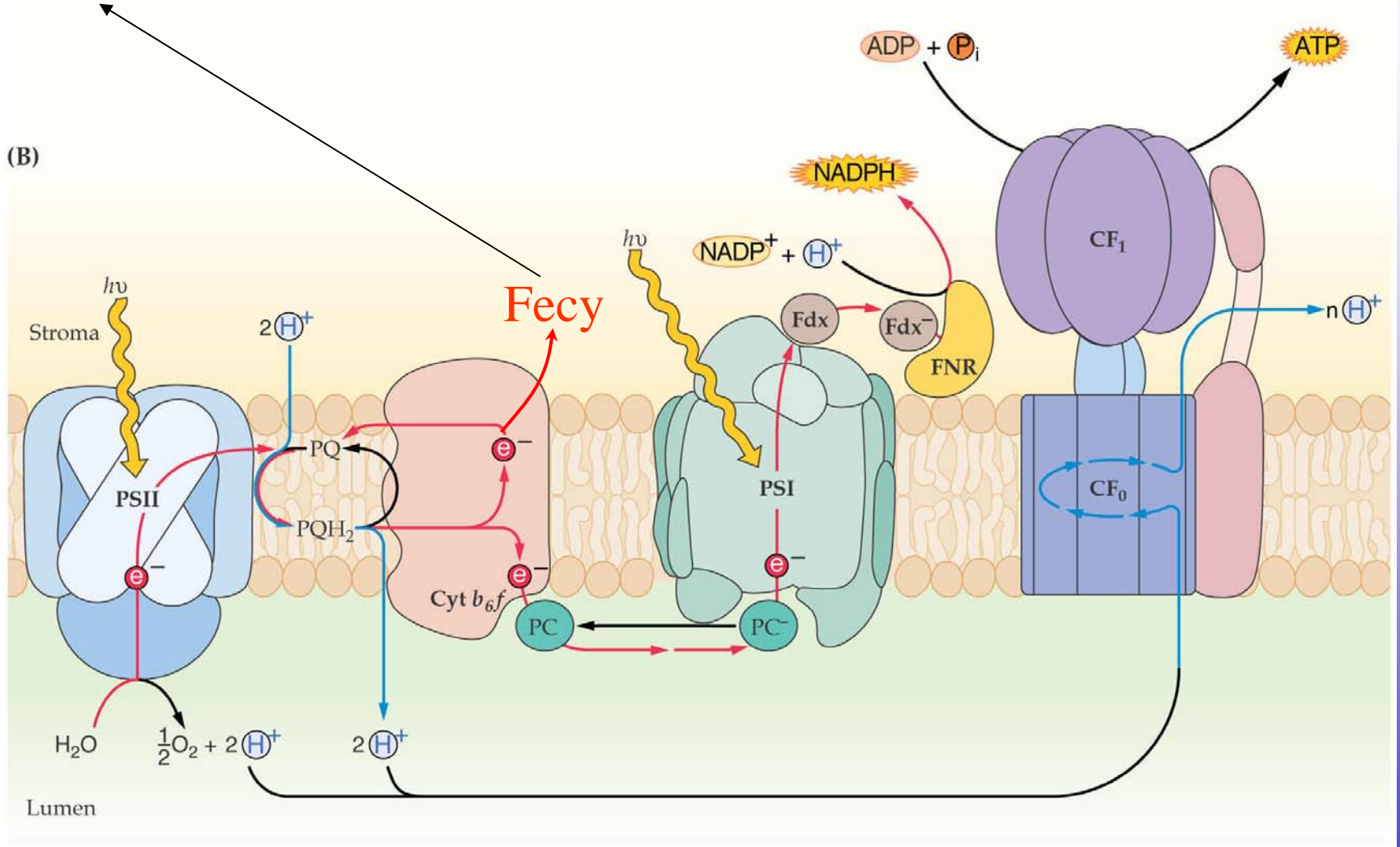


- (一) 实验原理

- 用STN (Sucrose, Tricine或Tris, NaCl) 提取并经分级离心的叶绿体碎片, 具有完整的类囊体, 将其放入一定的反应介质中给予照光, 能通过反应中心的电子传递进行希尔反应、放氧和光合磷酸化。当用Fecy(Fe^{3+})作为电子受体时, 它接受电子还原为 Fe^{2+} , 而 Fe^{2+} 可与邻菲罗啉(OP)反应生成红色的络合物, 510nm下的OD与 Fe^{2+} 的浓度成正比, 由此可测定希尔反应活力。



(B)



- (四) 实验步骤

- 1. 配制STN研磨液

- 取Tricine (或Tris, 0.2mol/L, pH值7.4) 10ml、Sucrose (1 mol/L) 40ml、NaCl (0.1 mol/L) 10ml, 定容到100ml。

- 2. 希尔反应活动测定

- (1) 将STN、研具、烧杯、离心管、纱布放入冰箱冰冻(约15分钟)。
- (2) 样品洗净后放入冰箱(4°C~8°C) 15-20min。

- (3) 配制反应液。使其最终浓度为：
Tricine（或Tris,pH值8.0）50mmol/L、
MgCl₂ 2mmol/L、Fecy 1mmol/L、
Na₂HPO₄ 2mmol/L、ADP 1mmol/L。配好
反应液后分装入指管，每只2ml。
- (4) 水浴调温。把玻璃缸的水温调至合
适范围（菠菜、小麦、蚕豆20℃，水稻
25℃），其内放入指管。

- (5) 叶绿体（类囊体）的提取。

- 叶片去中脉剪碎

- ↓ 加STN（约5-10ml/g）

- 迅速研磨成颗粒状

- ↓ 四层纱布过滤，

- 离心

- ↓ 4000r/min离心1 min~2 min，

- 沉淀悬浮（1~2mlSTN）

- ↓ 离心1000r/min1 min，

- 上层液于另一只试管，用STN稀释到约含叶绿素200 μ g/ml，放入冰浴用于测定Hill反应活力和叶绿素含量。

- (6) 照光反应。
- 调准缸内水温，每管加叶绿体提取物 0.2ml，开灯照光 1min，闭灯后立即加 20% TCA 0.2ml 以中止反应。以照光前加 0.2ml 20% TCA 的对应试管作对照。

- **(7) Fe^{2+} 的测定。**
- 将上述试管以4000r/min离心2min，取二支试管，放入试管（用遮光试管架）中，分别取离心后的上清液0.7ml，加 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 溶液（0.2mol/L）2ml、水1ml、 FeCl_3 （0.01mol/L）0.1ml、OP（0.05 mol/L）0.2 ml，摇匀，置约25℃下显色15min，在510nm下分别测定照光和对照的OD值，以用水代替上清液的为对照。

- (8) 叶绿素含量测定。
- 取上述叶绿体提取物0.2ml加4.8ml 80%丙酮，摇匀，以4 000r/min离心1min~2min，在652下测OD值。
- 按下列方程计算叶绿素含量：

$$\text{Chl}(\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD}_{652} \times 1000}{34.5} \times 25$$

- (五) 结果计算:

$$\begin{aligned}
 \text{希尔反应活力} &= \frac{\text{OD(光照—对照)}}{\text{OD } \mu \text{ mol}^{-1} \text{Fecy}} \times \frac{2.4}{0.7} \times \frac{5000}{\text{Chl}(\mu \text{ g/ml})} \times 60 \\
 (\text{Fe}^{2+} \text{形成 } \mu \text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}) &
 \end{aligned}$$