

表 1 二茂铁及其衍生物修饰的铂支撑 BLM 的 E_{pa} 与 I_{pa}

化 合 物	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μA)		
		A	B	C
Fc	510	0.340	0.430	0.525
$Fc \begin{array}{c} O \\ \\ CCH_3 \end{array}$	520	0.215	0.320	0.470
$Fc-CH=N-C_6H_4-N=CH-Fc$	450	0.320	0.410	0.505
$Fc-CH=N-C_6H_4-C_6H_4-N=CH-Fc$	550	0.205	0.370	0.485

表 2 不同扫描速度下二茂铁及其衍生物修饰的铂支撑 BLM 的 I_{pa}

ν (mV/s) \ I_{pa} (μA)	Fc	$Fc \begin{array}{c} O \\ \\ CCH_3 \end{array}$	$Fc-CH=N-C_6H_4-N=CH-Fc$	$Fc-CH=N-(C_6H_4)_2-N=CH-Fc$
60	0.435	0.420	0.430	0.425
80	0.470	0.450	0.460	0.455
100	0.525	0.470	0.505	0.485
200	0.590	0.520	0.585	0.560

mV/s) 下电极的 I_{pa} 值。若将 I_{pa} 对 $\nu^{1/2}$ 作图, 均可得到直线, 表明在所用的扫描速度范围内, 电极反应将受溶液中 AH_2 向 BLM 的斯特恩层的扩散所控制。

致谢: 本文还得到南京大学现代分析中心的部分资助。

参 考 文 献

1 田心禄. 化学通报, 1989;(7): 1

- Janas T *et al.* *Bioelectrochem Bioenerg*, 1988; 19: 405
- Tien H Ti *et al.* *Bioelectrochem Bioenerg*, 1989; 22: 211
- You X Z *et al.* *Elect Chem Acta*, 1989; 34: 249
- Ochiai E. *Bioinorganic chemistry an introduction*. Boston: Allyn and Bacon Inc, 1977: 440—441
- Dautartas M *et al.* *J Electroanal Chem*, 1980; 109: 301
- 邹明珠等. 高等学校化学学报, 1985; 6(2): 123
- 吕紫玲等. 化学学报, 1986; 44: 32
- Leidbeiser H *et al.* *Science*, 1988; 24: 1379
- Tien H Ti *et al.* 生物化学与生物物理进展, 1990; 17(5): 359

光合放氧的电极电位测定法的研究

倪 红 兵

(北京有色金属研究总院, 北京 100088)

金 沙

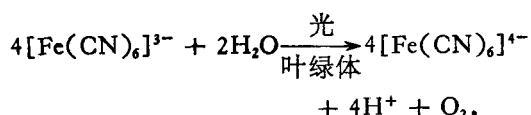
(复旦大学生物系, 上海 200433)

提 要

介绍了用电极电位法测定植物的光合放氧速率, 由此可以测定其放氧活性, 此法具有应用面广、设备简便、灵敏度、反应快及可以连续记录的特点, 是一种研究光合作用的新方法。

关键词 光合放氧, 电极电位, 放氧活性

在光合作用放氧的研究中,通常采用希尔反应(Hill reaction)来测定植物的光合放氧速率,其反应方程式为:



用分光光度法测定反应中 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的变化量以及用薄膜氧电极法或检压法测定氧的生成量,以此来定量表示放氧的速率。其中氧电极法^[1]是最为常用的方法,它有许多优点,但也存在着电极制作、系统封闭性、温度系数较大及测定重复性等问题。分光光度法的误差较大。检压法的测定手续繁琐。我们采用电极电位法测定希尔反应中 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 和 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的变化量,从而计算出叶绿体的放氧活性。Spikes^[2]曾尝试过这一方法,证明方法是可行的,但至今尚未得到应用。本文介绍了用电极电位法测定塌棵菜和菠菜叶绿体的放氧活性的结果,认为此方法具有应用面广、设备简便、灵敏度高、反应快及可以连续记录的特点,能为研究光合作用增加一种新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

塌棵菜 (*Brassia narinosa*), 菠菜 (*Spina-
cia oleracea*)。

1.2 样品制备方法

叶绿素制备按《植物生理学实验手册》^[3]中有关方法进行,叶绿素浓度按 Arnon 方法^[4]进行测定。制备好的叶绿素样品应放在避光处。

1.3 希尔反应测定方法

用 PZ8 型直流数字电压表测定电位变化,用台式记录仪同步记录。以 1000W 白炽灯为光源,测定光强为 50000 lx 以上。研究电极铂片电极 (1 cm × 1 cm), 参比电极为 217 型饱和甘汞电极,体系用超级恒温槽保温。为了与氧电极法比较,反应条件相同,体系中含 Tris 50 mmol/L (pH 7.6)、NaCl 10 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L 及 K₃Fe(CN)₆ 1 mmol/L, 溶液体积为 20 ml。当体系电位稳定后,开白炽灯并将避光容器中的叶绿体悬浮液样品加入体系的电解池中进行测定。

2 实验结果

2.1 体系的电极电位测定

反应体系中电极反应为: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + \text{e} \rightarrow [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, 根据 Nernst 公式,体系的

表 1 放氧活性与叶绿素浓度及光照时间关系测定表

样品	样品量 光照 时间(min)	0.05ml			0.10ml			0.20ml			0.40ml			0.80ml		
		$\phi_{\text{S.C.E.}}(\text{V})$	C/C'	活性	$\phi_{\text{S.C.E.}}(\text{V})$	C/C'	活性	$\phi_{\text{S.C.E.}}(\text{V})$	C/C'	活性	$\phi_{\text{S.C.E.}}(\text{V})$	C/C'	活性	$\phi_{\text{S.C.E.}}(\text{V})$	C/C'	活性
菠菜	0	0.2930	3.6	/	0.2930	23.6	/	0.2930	23.6	/	0.2930	23.6	/	0.2930	23.6	/
	1	0.2856	17.7	455	0.2821	15.4	361	0.2755	11.9	327	0.2691	9.3	250	0.2570	5.8	236
	2	0.2822	15.5	253	0.2779	13.1	177	0.2677	8.8	247	0.2596	6.4	169	0.2455	3.7	148
	3	0.2796	14.0	215	0.2748	11.6	150	0.2615	6.9	217	0.2530	4.95	146	0.2393	2.9	97
	4	0.2777	13.0	169	0.2725	10.6	121	0.2577	5.95	154	0.2480	4.08	128	0.2330	2.27	110
	5	0.2763	12.3	133	0.2715	10.0	83	0.2559	5.55	78	0.2450	3.62	87	0.2295	1.98	66
塌棵菜	0	0.2980	28.7	/	0.2980	28.7	/	0.2980	28.7	/	0.2980	28.7	/	0.2980	28.7	/
	1	0.2885	19.8	173	0.2800	14.2	193	0.2640	7.6	248	0.2588	6.2	158	0.2426	3.3	149
	2	0.2819	15.3	159	0.2707	9.9	156	0.2522	4.8	168	0.2426	3.3	141	0.2284	1.9	84
	3	0.2773	12.8	133	0.2640	7.6	147	0.2434	3.4	165	0.2333	2.3	106	0.2144	1.1	98
	4	0.2739	11.1	122	0.2600	6.45	108	0.2381	2.75	118	0.2265	1.8	81	0.2115	0.95	27
	5	0.2713	10.0	99	0.2571	5.87	68	0.2344	2.45	70	0.2199	1.6	41	0.2110	0.90	10

注: 菠菜叶绿素浓度为 0.17 mg/ml, 塌棵菜叶绿素浓度为 0.50 mg/ml

电极电位为 $\varphi_{\text{S.C.E.}} = \varphi_{\text{S.C.E.}}^0 + \frac{RT}{F} \lg \frac{C}{C'}$, 其中 $\varphi_{\text{S.C.E.}}^0$ 为标准电极电位, C 及 C' 分别表示 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 及 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的浓度. 用分析纯的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 及 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 及 1.3 中所述的缓冲介质配制标准溶液, 测定其电位再根据 Nernst 公式计算得到 $\varphi_{\text{S.C.E.}}^0 = 0.212\text{V}$. 饱和甘汞电极电位温度校正公式为:

$$\varphi = 0.2444 + 0.0007(T - 298.2),$$

实际测定时应加以校正.

2.2 放氧活性与叶绿素浓度及光照时间的关系测定

测定加不同量叶绿体及光照时间 5min 时活性变化如表 1 所示, 体系温度为 $(20.5 \pm 0.1)^\circ\text{C}$.

表 1 中放氧活性的单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ (每毫克叶绿素每小时放氧微摩尔数). 根据体系在光合放氧中的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 和 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 量计算放氧活性, 具体计算方法为: 先根据反应前后 C/C' 的差值算出 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的生成量, 再根据每还原四个 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 释放一分子氧换算得到 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ 计量单位.

$$\text{放氧速率} = \frac{1}{4} a \left\{ \frac{1}{[C/C']_2 + 1} - \frac{1}{[C/C']_1 + 1} \right\} \cdot \frac{1}{\text{mg} \cdot \text{chl}} \cdot 60\text{min},$$

其中 a 为介质中 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的量 (mol), $[C/C']_1$ 和 $[C/C']_2$ 分别为反应某一段时间前后的 C/C' 值.

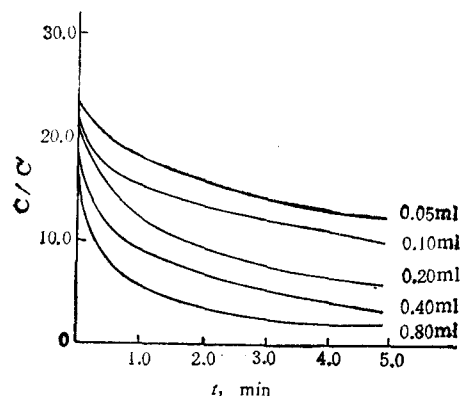


图 1 不同量菠菜叶绿体的 C/C' 随光照时间变化图

由表 1 可知, 在光照初期放氧活性很高, 随时间增长则放氧速率下降, 5min 后减少为开始的 1/3 左右, 这一现象可能是由于叶绿体在 20.5°C 下较慢地失活的缘故. 添加更多量的叶绿体后, 放氧速率并不随叶绿体量的增多而按比例的增加, 反而有下降的趋势, 这是由于叶绿体虽多但不能充分发挥作用, 从而计算所得的单位叶绿素浓度下的放氧速率下降. 整个反应的 C/C' 变化趋势如图 1 及图 2 所示, 由图 1 及图 2 也可以看出放氧反应和放氧活性随时间的变化趋势.

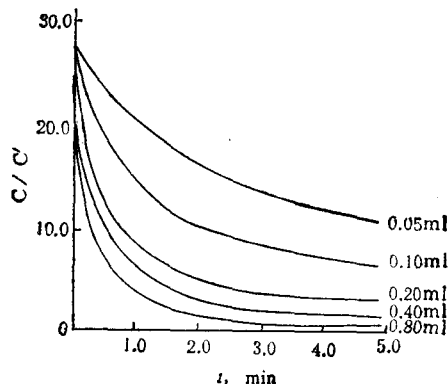


图 2 不同量塌棵菜叶绿体的 C/C' 随光照时间变化图

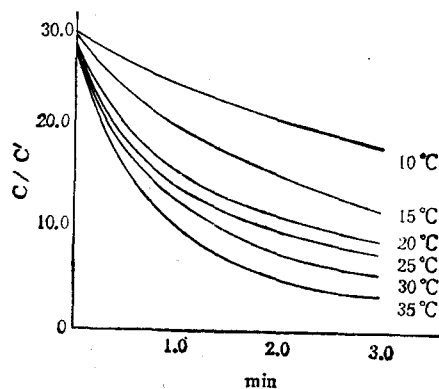


图 3 塌棵菜叶绿体在温度不同时 C/C' 随光照时间变化图

2.3 放氧活性与温度的关系测定

将塌棵菜叶绿体悬浮液(浓度 0.50 mg/ml) 0.1 ml 加入反应体系中光照反应, 测定不同反应温度时放氧活性随时间的变化关系, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知, 随温度升高, C/C' 的变化趋势与在同温度时增加叶绿体量的情况相

同。 C/C' 随温度增高而变化增大,主要是由放氧速率增高的缘故。到后期随着时间增长 C/C' 变化减小,随温度增高此现象更为明显,这是由于温度增高,失活速率加快,表现为活性下降变快。

3 讨 论

测定光合放氧的电极电位法的整个反应体系和测定步骤与氧电极法基本相同,但不存在系统封闭性和温度系数较大等问题,整个反应系统敞开。电极电位法的灵敏度很高,在 20ml 反应体系中加入含 $10\mu\text{g}$ 叶绿素的叶绿体即可得到较好的测定结果,比氧电极法灵敏十几倍。由电极电位法测得的放氧活性比氧电极法测得的结果略高,这是由于氧电极法中氧电极套上薄膜后与电极电位法相比,存在着对光合放氧的响应及测定对象形式的不同而产生的系统偏差,可进行校正而不影响测定结果。

用电极电位法测定光合放氧,当叶绿体样品加入体系时即可进行,反应开始阶段时放氧活性为 $300-400\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 甚至更高,2—3 min 后下降至 $100-200\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,而在氧电极法中,由于温度系数较大,当加入叶绿体样品量不是很少时,需恒温 1—2min,以消除加样时温度的微小变化而造成的氧电极响应的不稳定。为减少或避免样品加入后初始反应的测定误差,氧电极法中应用较大的电解池、较

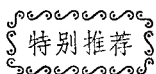
多的溶液或添加极少量的叶绿体样品以消除加样时的温度影响。氧电极法对加入样品的后期的反应活性测定结果与电极电位法相似。

实验发现在完全黑暗的条件下,加入叶绿体样品后电极电位随时间几乎没有变化,开白炽灯后电极电位才有变化,这说明在完全黑暗的条件下光合放氧几乎没有进行。实验中还发现普通日光灯也能使光合放氧进行,所以如用电极电位法测定光合放氧时应考虑各种光源对测定结果的影响,扣除体系外光源对测试结果引起的误差。

电极电位法所需仪器设备简单,体系建立方便。实验中采用的 PZ 8 型数字电压表精确度和灵敏度很高,测量误差仅为 0.1%,也可用袖珍型数字电压表或数字型 pH 酸度计,误差为 1%,均在测定生物样品的活性所允许的误差范围内。铂片电极很稳定,制作简便且不存在老化现象,还可以普遍地用作测定金属离子及其络合物离子的氧化还原反应的电极电位,甘汞电极是有商品供应的,所以电极电位法可以广泛地应用于叶绿体的光合放氧的研究。

参 考 文 献

- 1 李德维,叶济宇. 植物生理学通讯,1980;1:35
- 2 Spikes J D et al. Arch Biochem Biophys, 1950; 28:48
- 3 薛应龙主编. 植物生理学实验手册. 上海: 科学技术出版社,1985:104—106
- 4 Arnon D I. Plant Physiol, 1949; 24:1



特别推荐

辣椒红 色 素

该产品系从食用辣椒中提炼出的一种天然植物色素,是食品、医药和化妆品的着色剂。其色泽鲜艳,并有很高的营养价值和医疗保健功能。同时,在提炼中还能得到辣味素、辣椒油、辣椒渣粉末。

接产条件: 规模可大可小,方法可洋可土。土法生产: 厂房 100m^2 , 其它用房: 150m^2 , 设备投资 2.5 万元,工人 6 人。年处理鲜辣椒 600 吨,成本 24 万元,价值 58.8 万元,年利约 30 万元。

若拟建小型、中型生产线,请参阅可行性分析论证,50 元/份。函授: 9000 元,提供技术资料,并常年免费提供咨询服务;面授: 2.6 万元,提供技术资料,现场实际操作,包出产品。协助建厂,费用面议。

本刊读者凭刊样可优惠 10%。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 李群(电话: 5762127, 5762194)]