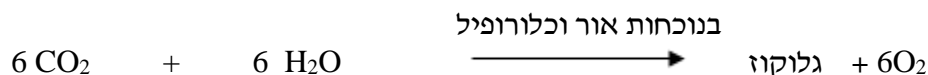




## ריאקציית היל: חקר פוטוסינתזה במערכת של כלורופלסטים מבודדים

### רקע לריאקציית היל ותיאור מערכת הניסוי:

בתהליך הפוטוסינתזה:



תהליך הפוטוסינתזה הוא **תהליך חימצון - חיזור** שבמהלכו מים מתחמצנים לחמצן ו  $\text{CO}_2$  מתחזר לפחמימה (חומר אורגני). **בשלב הראשון** בתהליך הפוטוסינתזה **אנרגיית האור** נקלטת בפיגמנטים אשר בכלורופלסט **הופכת לאנרגיה כימית** הנאגרת במולקולות ATP וב – NADPH. כתוצאה מתהליך זה, נוצר חמצן מולקולרי. השלב הראשון הוא תלוי אור (יתרחש רק בזמן שהצמח מואר) ומתרחש על ממברנות התילקואיד בכלורופלסט. פריצת דרך בהבנת תהליך הפוטוסינתזה נעשתה בשנת 1937 ע"י החוקר האנגלי רוברט היל. במשך תקופה ארוכה לפני תגליתו של היל, לא ניתן היה לקבל פעילות פוטוסינתטית **בכלורופלסטים מבודדים**. היל גילה כי כאשר מספקים לכלורופלסטים מבודדים חומר מחמצן שימשם כקולט אלקטרוניים – מתקבל שחרור של חמצן מולקולרי בזמן הארה.

ריאקציה זו נקראה ע"ש החוקר **ריאקציית היל**. המשותף לריאקציית היל המתרחשת בכלורופלסטים מבודדים ולתהליך הפוטוסינתזה המתחולל **בעלה**, הוא שבשניהם ישנה המרה של אנרגיית אור לאנרגיה כימית תוך הוצאת אלקטרוניים מהמים והעברתם לחומר מחמצן. ההבדל הוא בחומר המחמצן - בפוטוסינתזה בצמח  $\text{NADP}^+$  הוא החומר המחמצן. בריאקציית היל, המתרחשת במעבדה, בכלורופלסטים מבודדים, החומר המחמצן הוא חומר המוסף באופן מלאכותי למערכת התגובה.

DCPIP ( 2,6 dichlorophenolindolpheno ) הוא חומר מחמצן בו נשתמש במעבדה זו כקולט אלקטרוניים, ובעזרתו נדגים את ריאקציית היל. בצורתו המחומצנת, צבעו של **DCPIP** הוא **כחול** ואילו בצורתו המחוזרת הוא **חסר צבע**. במעבדה נעקוב אחר העלמות הצבע הכחול של DCPIP בתמיסה בה מצויים כלורופלסטים מבודדים ומוארים. העלמות הצבע היא סימן עבורנו לכך שריאקציית היל יצאה לפועל. את העלמות הצבע של DCPIP נבדוק בעזרת הספקטרופוטומטר שמוודד את מידת הבליעה של התמיסה אותה נרצה לבדוק. הספקטרופוטומטר מעביר קרן אור דרך מבחנה מלאה בנוזל ומוודד את מידת בליעת האור על ידי הנוזל שבמבחנה. ככל שהנוזל שבמבחנה כהה יותר כך הבליעה תהייה גבוהה יותר. יחידת הבליעה הינה צפיפות אופטית ונמדדת ביחידות (O.D.) Optical Density.



## הניסויים:

### הערות כלליות:

1. בניסוי נשתמש באמבט מים שקוף ובתוכו מעמד למבחנות. אמבט המים מונע שינויי טמפרטורה חדים אשר עלולים לפגום בניסוי. שינויי טמפרטורה עלולים להיווצר בשל חום הנפלט מהמנורה.
2. את עוצמת ההארה של הנורה נבדוק בעזרת מד אור. המנורה חייבת להישאר במרחק קבוע מאמבט המים לכל אורך הניסוי. הזזת המנורה באמצע הניסוי תשנה את עוצמת האור שתגיע למבחנות השונות ותשבש את תוצאות הניסוי. במקרה של הזזת המנורה עליך לקבוע את מיקומה הנכון בעזרת המדריך.
3. יש להעמיד את המבחנה באמבט הניסוי תמיד באותו מקום כדי שכל מבחנות הניסוי, תקבלנה עוצמת הארה זהה.

### המעבדה מחולקת לארבעה חלקים:

- א. ניסויים לקביעת הגורמים המגבילים את ריאקציית היל.
- ב. השפעת ריכוז הכלורופלסטים על קצב הריאקציה.
- ג. השפעת המעכב (DCMU) על קצב הריאקציה.
- ד. השפעת אורך הגל על קצב ריאקציית היל.

### חלק א: ניסויים לקביעת הגורמים המגבילים את ריאקציית היל

מטרת ניסויים אלו לקבוע מהם הגורמים המגבילים את ריאקציית היל.  
הניסויים אותם נעמיד:

1. ריאקציה עם כלורופלסטים באור.
2. בדיקת הבליעה של DCPIP מחוזר.
3. ריאקציה עם כלורופלסטים בחושך.
4. ריאקציה עם כלורופלסטים שחוממו.
5. ריאקציה עם כלורופלסטים באור ללא DCPIP.

### הכנת מערכת הניסוי:

- קבע במדויק את המרחק בין המנורה ובין אמבט המים, כך שעוצמת האור שתגיע לאמבט תהיה שווה ל 30,000 לוקס. העזר במדריך למדידת עוצמת ההארה על ידי מד אור. לאחר שקבעת את המרחק המדויק, השאר את המנורה והאמבט במקומם לכל אורך הניסוי.
- הדלק את הספקטרופוטומטר, כוון לאורך גל 550 ננומטר



חלק א': מהלך הניסוי

- סמן חמש מבחנות, בחלקן העליון, במספרים 1 – 5.
- הוסף למבחנות את התמיסות הבאות על פי הטבלה:

מס' מבחנה	בופר STN (מ"ל)	DCPIP (מ"ל)	O.D. בזמן 0	O.D. בזמן 4 דקות
1	4	1		
2	4	1		
3	4	1		
4	4	1		
5	5	--		

- אפש את הספקטרופוטומטר עם מבחנה מספר 5.
- החזר את מבחנה מספר 5 למעמד המבחנות.

מבחנה מס' 1 – ריאקציה עם כלורופלסטים באור

1. הוסף 0.1 מ"ל של תרחיף כלורופלסטים וערבב.
2. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
3. כוון את השעון ל – 4 דקות.
4. הכנס את המבחנה לאמבט.
5. הדלק את המנורה והפעל את השעון.
6. מקץ 4 דקות, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
7. מדוד את הבליעה בפעם השנייה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.

שים לב! האם חל שינוי בתוצאה? במידה ולא חל כל שינוי בתוצאה יש לדווח למדריך.

מבחנה מס' 2 – בדיקת שינוי הבליעה של DCPIP ע"י חומר מחזר

1. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
2. הוסף מספר גבישים של סודיום די תיוניט (חומר מחזר).
3. ערבב והמתן דקה.
4. מדוד את הבליעה של המבחנה שוב. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.

מה היא מטרת הניסוי?

תאר והסבר את התוצאה שהתקבלה:



**מבחנה מס' 3 – ריאקציה בחושך**

1. הוסף 0.1 מ"ל של תרחיף כלורופלסטים וערבב.
  2. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
  3. כוון את השעון ל – 4 דקות.
  4. עטוף את המבחנה בנייר אלומיניום והכנס את המבחנה לאמבט.
  5. הדלק את המנורה והפעל את השעון.
  6. מקץ 4 דקות, כבה את המנורה, הסר את נייר האלומיניום, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
  7. מדוד את הבליעה בפעם השנייה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
- תאר את התוצאה שהתקבלה והסבר: \_\_\_\_\_

**מבחנה מס' 4 – ריאקציה עם כלורופלסטים מחוממים**

1. הוסף 0.1 מ"ל של תרחיף כלורופלסטים אשר חוממו עד לטמפרטורה של  $70^{\circ}\text{C}$  וערבב (שים לב! עליך לבקש מהמדריך כלורופלסטים מחוממים).
  2. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
  3. כוון את השעון ל – 4 דקות.
  4. הכנס את המבחנה לאמבט.
  5. הדלק את המנורה והפעל את השעון.
  6. מקץ 4 דקות, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
  7. מדוד את הבליעה בפעם השנייה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
- תאר את התוצאה שהתקבלה והסבר: \_\_\_\_\_

**מבחנה מס' 5 – ריאקציה עם כלורופלסטים באור ללא נוכחות DCPIP (חומר מחמצן)**

1. הוסף 0.1 מ"ל של תרחיף כלורופלסטים.
2. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
3. כוון את השעון ל – 4 דקות.
4. הכנס את המבחנה לאמבט.
5. כוון את שעון העצר ל 4 דקות, הדלק את המנורה והפעל את השעון.



6. מקץ 4 דקות, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
  7. מדוד את הבליעה בפעם השניה.
  8. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
- תאר את התוצאה שהתקבלה והסבר: \_\_\_\_\_
- 

### **ב. השפעת ריכוז הכלורופלסטים על קצב הריאקציה.**

שימו לב שבניסוי זה תמדדו את קצב הראקציה, ועליכם למדוד OD כל דקה, במשך 4 דקות. בניסוי זה נשתמש בשני ריכוזים שונים של כלורופלסטים. על מנת להשוות בין שני הניסויים עלינו להפחית את מידת הבליעה של הכלורופלסטים. לכן, רק בניסוי זה נאפס את הספקטרופוטומטר עם בופר STN המכיל כלורופלסטים.

#### **ניסוי ראשון: 0.1 מ"ל כלורופלסטים.**

1. סמן מבחנה נקייה במספר 1.
2. הוסף 3.9 מ"ל בופר STN.
3. הוסף 0.1 מ"ל תרחיף כלורופלסטים וערבב.
4. אפס את הספקטרופוטומטר על ידי מבחנה מספר 1.
5. הוסף 1 מ"ל DCPIP.
6. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
7. כוון את שעון העצר לדקה, הדלק את המנורה והפעל את השעון.
8. מקץ דקה, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
9. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
10. עליך לחזור ארבע פעמים על שלבים 7-8 ורשום את התוצאות בטבלה המתאימה במחשב.

#### **ניסוי שני: 0.2 מ"ל כלורופלסטים.**

1. סמן מבחנה אחת במספר 2.
2. הוסף 3.8 מ"ל בופר STN.
3. הוסף 0.2 מ"ל תרחיף כלורופלסטים וערבב.
4. אפס את הספקטרופוטומטר על ידי מבחנה מספר 2.
5. הוסף 1 מ"ל DCPIP.
6. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
7. כוון את שעון העצר לדקה, הדלק את המנורה והפעל את השעון.
8. מקץ דקה, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.



9. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.

10. עליך לחזור ארבע פעמים על שלבים 7-8 ולרשום את התוצאות בטבלה המתאימה במחשב.

**טבלה לאיסוף נתונים:**

קריאת O.D. בדקה					הטיפול במבחנה				מספר מבחנה
4	3	2	1	0	כלורופל- סטים (מ"ל)	אור/חושך	בופר STN (מ"ל)	DCPIP (מ"ל)	
					0.1	אור	1	3.9	1
					0.2	אור	1	3.8	2

### ג. השפעת המעכב DCMU על קצב ריאקצית היל.

• לפני התחלת העבודה עם DCMU לבש כפפות!

מהלך הניסוי:

- סמן שתי מבחנות במספרים 1-2.
- אפס את הספקטרופוטומטר על ידי מבחנה המכילה רק בופר STN
- הוסף למבחנות את התמיסות על פי הרשום בטבלה:

DCMU (מ"ל)	DCPIP (מ"ל)	בופר STN (מ"ל)	מס' מבחנה
0.1	1	3.8	1
0.5	1	3.4	2

#### מבחנה מס' 1

1. הוסף 0.1 מ"ל תרחיף כלורופלסטים וערבב.
2. מדוד את הבליעה ורשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
3. כוון את שעון העצר לדקה, הדלק את המנורה והפעל את השעון.
4. מקץ דקה, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
5. מדוד את הבליעה.
6. חזור על שלבים 3-4 ארבע פעמים בסה"כ. את התוצאות רשום בטבלה המתאימה במחשב.

#### מבחנה מס' 2

חזור על שלבים 1-6 כפי שתוארו עבור מבחנה 1.

\* - הביקורת בניסוי זה הינה מבחנה המכילה בדיוק את אותם החומרים המצויים במבחנות 1 ו-2 למעט המעכב DCMU. מבחנה שכזו הכנת כבר בניסוי ב' (0.1 מ"ל כלורופלסטים). על כן הוצבו בשורה "ביקורת" שבטבלת התוצאות הנתונים מהניסוי הקודם.



**טבלה לאיסוף נתונים:**

קריאת O.D. בדקה					הטיפול במבחנה				מספר מבחנה	
4	3	2	1	0	DCMU (מ"ל)	אור/חושך	כלורופלסטים (מ"ל)	DCPIP (מ"ל)		בופר STN (מ"ל)
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	אור	0.1	1	4	ביקורת
					0.1	אור	0.1	1	3.8	1
					0.5	אור	0.2	1	3.4	2

**ד. השפעת אורך הגל על קצב ריאקציה היל.**

על שולחןך מצויים הכלים הבאים:

→ שתי נורות צבעוניות: אדומה וירוקה.

→ שני ניירות צלופן צבעוניים: אדום וירוק.

מהלך הניסוי:

□ סמן שתי מבחנות נקיות במספרים 1-2.

□ הוסף למבחנות תמיסות על פי הרשום בטבלה:

DCPIP (מ"ל)	בופר STN (מ"ל)	מס' מבחנה
1	4	1
1	4	2

אור ירוק

1. החלף את הנורה הלבנה בירוקה. השתמש בכפפות עבות משום שהנורה חמה מאוד.
2. הוסף למבחנה מס' 1 0.1 מ"ל תרחיף כלורופלסטים וערבב.
3. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.
4. כוון את שעון העצר לדקה והכנס את המבחנה לאמבט.
5. כסה את האמבט בשקית ירוקה כך ששלוש שכבות של הנייר מצויות מול הנורה.
6. הצמד את הנורה הירוקה לאמבט, הדלק אותה והפעל את השעון.
7. מקץ דקה, כבה את המנורה, נגב את המבחנה, ערבב היטב בוורטקס.
8. מדוד את הבליעה.
9. חזור על שלבים 6-8 ארבע פעמים בסה"כ. את התוצאות רשום בטבלה המתאימה במחשב.

אור אדום

1. החלף את הנורה הירוקה באדומה. השתמש בכפפות עבות משום שהנורה חמה מאוד.
2. הוסף למבחנה מס' 2 0.1 מ"ל תרחיף כלורופלסטים וערבב.
3. מדוד את הבליעה. רשום את התוצאה בטבלה המתאימה במחשב.



4. כוון את שעון העצר לדקה והכנס את המבחנה לאמבט.
5. כסה את האמבט בשקית אדומה כך **ששכבה אחת** של הנייר מצויה מול הנורה.
6. הצמד את הנורה האדומה לאמבט, הדלק אותה והפעל את השעון.
7. מקץ דקה, כבה את המנורה, נגב את המבחנה וערבב היטב בוורטקס.
8. מדוד את הבליעה.
9. חזור על שלבים 6-7 ארבע פעמים בסה"כ. את התוצאות רשום בטבלה המתאימה במחשב.

**טבלה לאיסוף נתונים:**

קריאת O.D. בדקה					הטיפול במבחנה			מספר מבחנה
4	3	2	1	0	אור	כלורופלסטים (מ"ל)	בופר STN (מ"ל)	
					ירוק	0.1	1	4
					אדום	0.1	1	4