

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

040725

爬上另一座 Hill-光反應實驗的再探討

學校名稱： 國立虎尾高級中學

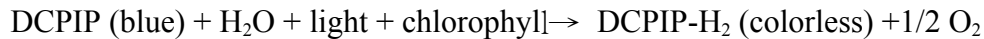
作者：	指導老師：
高二 林健安	廖學瑞
高一 黃婷資	
高一 楊博涵	
高一 蔡岱凌	

關 鍵 詞：Hill 反應、葉綠體、DCPIP

爬向另一座 Hill -光反應的再探討

摘要

1939 年，University of Cambridge 的 Robert Hill 發現葉綠體在光照下，可還原許多分子，例如 ferricyanide(FeCy) 和 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP)等，我們稱為 Hill reactions。



我們希望找出 Hill 反應更好的實驗條件，以及探討與光反應相關的影響因素。

壹、研究動機

課本中的實驗活動，應當要在兩堂課短短 2 小時內，看見明顯的效果，使學生對實驗的內容、目的、結果...留下深刻的印象；老師在上光合作用時提到高中的 Hill 實驗常會看到結果不明顯，高中生物參考書的參考答案也和我們實驗結果不太像；此外我們在網路上查到相同的實驗，但是過程卻與課本大相逕庭，令我們感到困惑：究竟原文版和課本有何差異？於是我們決定針對幾個實驗條件作修改，看能不能在課堂的有限時間內做出明顯的結果。

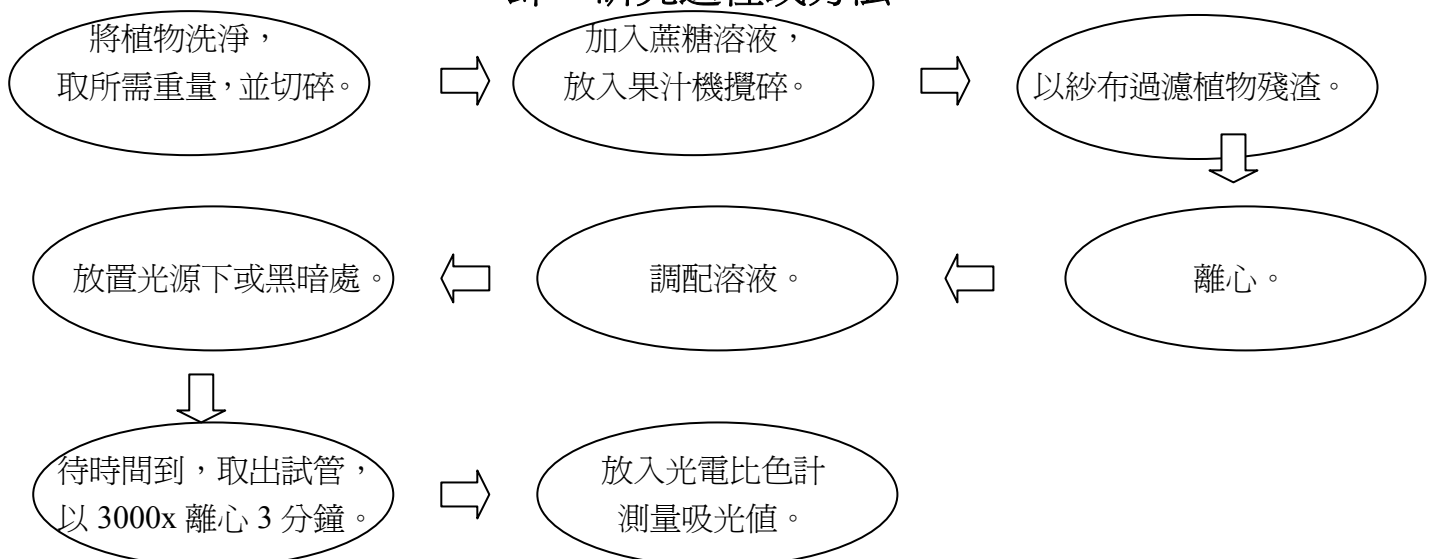
貳、研究目的

- 一、找出 Hill 反應最佳的實驗條件。
- 二、探討各種植物光反應的差異。
- 三、求證同性質光反應試劑的可用性。

參、研究設備及器材

地瓜葉、變葉木、酢醬草、菠菜、玉米、蕨類(瓦氏麟毛蕨)、兩耳草... 每根試管 7 克
蔗糖溶液 (0.5M)、DCPIP 0.05%、試管 16 管、燒杯 7 個、玻棒 3 根、低速離心機 2 台
光電比色計 1 台、酸鹼測定計 1 台、紗布適量、菜刀 1 把、砧板 1 塊、果汁機(Philips) 1 台
數位相機(OLYMPUS) 1 台、光學顯微鏡(OLYMPUS) 1 台、微量天秤 1 台、螢光燈桌上檯燈(Philips) 27W

肆、研究過程或方法



一、果汁機轉速的不同

(一)課本:果汁機低速打 20 秒。

(二)原文版:果汁機以最高速先打 15 秒→停 10 秒→最高速再打 10 秒。

二、紗布層數的不同

- (一)課本:以兩層紗布過濾植物殘渣。
- (二)原文版:以四層紗布過濾植物殘渣。

三、離心步驟的不同

- (一)課本:以 3000x 離心 5 分鐘→取沉澱物使用。
- (二)原文版:先以 200x 離心 3 分鐘→取上清液→以 1000x 離心 7 分鐘→取沉澱物沉澱物加入適量的蔗糖溶液攪拌均勻→以 1000x 離心 7 分鐘→取沉澱物使用。

四、指示劑的不同

- (一)課本: 0.01%~0.1% DCPIP。
- (二)原文版:0.05% DCPIP。
- (三)生物參考書:甲基藍亦可為替代 DCPIP 之指示劑。

伍、研究結果

實驗一 找出最佳的實驗條件

- (一)DCPIP 濃度:課本的 DCPIP 濃度在 0.1%~0.01%，這個範圍太大，如 0.1%與 0.01%泡出來的顏色差異很大，我們想確定最佳的濃度。
→結果:0.05% DCPIP 最佳(照光 4 小時後目測下顏色有改變，0.1%太深，0.01%太淡)。
- (二)光源:燈光一般用實驗桌前的日光燈管或 40W 燈泡檯燈，光源不固定，距離也不固定，我們試著找出最適當的條件。
→結果:27W 省電螢光燈桌上檯燈比 40W 燈泡檯燈佳。
- (三)葉子重量:葉子用量是多少才能在 2 節實驗課內看到結果?
→結果:葉子用量 7g/試管反應結果明顯。
- (四)糖水量:糖水的量至少要讓果汁機打的動，但加太多用掉更多離心管處理汁液(耗時)。

實驗二 不同植物光合作用的效率(實驗二流程只用課本方法)

課本中此實驗皆以菠菜為材料，我們認為菠菜也許不是唯一選擇，且校園內這麼多植物，也許有更好的植物作為光反應的實驗材料，於是我們選取變葉木、地瓜葉、酢醬草等常見植物來實驗。

→結果:在照光 1 小時、3 小時、5 小時後變葉木、地瓜葉有顏色變化，酢醬草也有變淡，但是沒有照光的對照組也很淡。我們懷疑有些反應結果肉眼無法看出差異，所以決定用光電比色計作定量實驗【DCPIP 最佳吸光值在 600~590 nm(我們選 596 nm)】。

※實驗不一定要用菠菜，不過尚未比較效果差異。



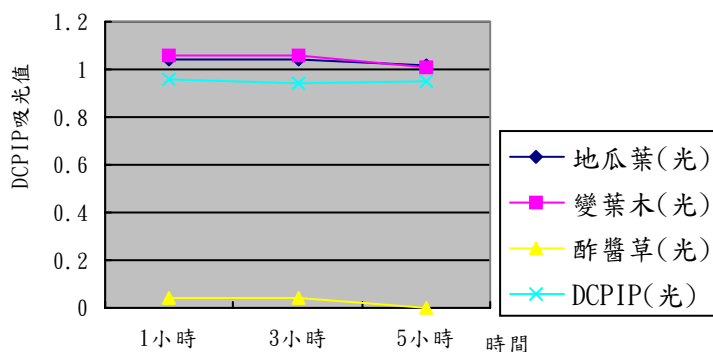
照片 1: 變葉木(刻意選不完全綠色的葉子)。

照片 2: 酢醬草暗/光、地瓜葉暗/光、變葉木暗/光

表一、不同植物的光合作用效率(光)

植物 \ 時間	1 小時	3 小時	5 小時
地瓜葉	1.040	1.040	1.020
變葉木	1.055	1.060	1.005
酢醬草	0.043	0.041	0.001
DCPIP(對照組)	0.955	0.945	0.950

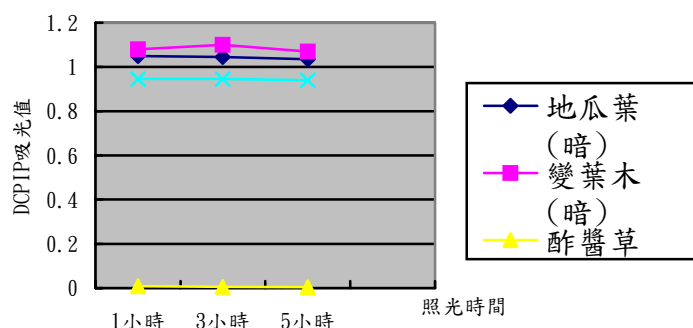
圖一、各種植物的光合作用效率(光)



表二、不同植物的光合作用效率(暗)

植物 \ 時間	1 小時	3 小時	5 小時
地瓜葉	1.050	1.045	1.035
變葉木	1.080	1.100	1.070
酢醬草	0.0093	0.0063	0.0041
DCPIP(對照組)	0.945	0.945	0.940

圖二、各種植物的光合作用效率(暗)



實驗三 縮短時間後，不同植物的光合作用效率

如果實驗條件以及實驗材料已經能穩地呈現結果，我們希望在照光 1 小時內 DCPIP 有明顯顏色變化，以符合實驗課堂內能看到結果的原則。

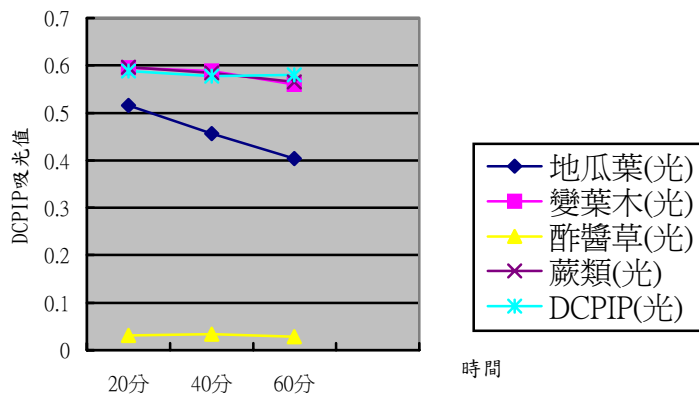
→結果：在照光 20 分鐘、40 分鐘、60 分鐘後變葉木、地瓜葉、酢醬草、蕨類所呈現的結果並不理想，雖然有時候變葉木、地瓜葉可觀察到 DCPIP 顏色變淡，但覆現性不高；而蕨類照光 1 小時內幾乎吸光值不變；酢醬草仍然很快變淡，但是沒有照光的對照組也很淡。

(以下數據是選有變化的結果呈現)

表三、不同植物的光合作用速率(光)2

植物 \ 時間	20 分鐘	40 分鐘	60 分鐘
地瓜葉	0.516	0.456	0.404
變葉木	0.598	0.588	0.560
酢醬草	0.031	0.033	0.028
蕨類	0.569	0.584	0.566
DCPIP(對照組)	0.588	0.578	0.58

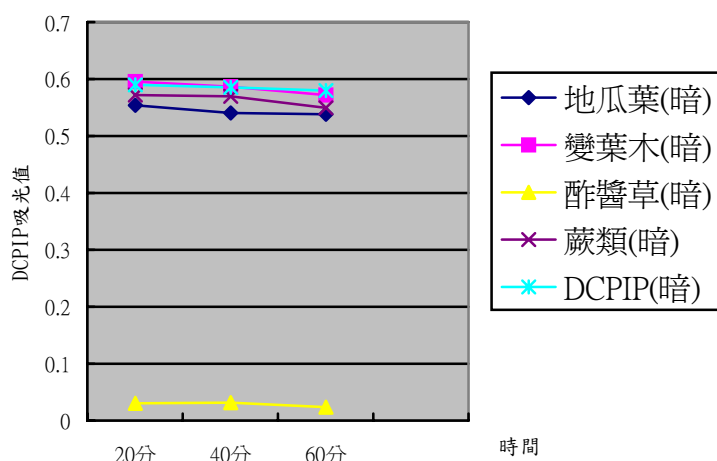
圖三、各種植物的光合作用效率(光)2



表四、不同植物的光合作用效率(暗)2

植物 \ 時間	20 分鐘	40 分鐘	60 分鐘
地瓜葉	0.554	0.540	0.538
變葉木	0.595	0.586	0.572
酢醬草	0.030	0.032	0.024
蕨類	0.572	0.570	0.550
DCPIP(對照組)	0.59	0.585	0.58

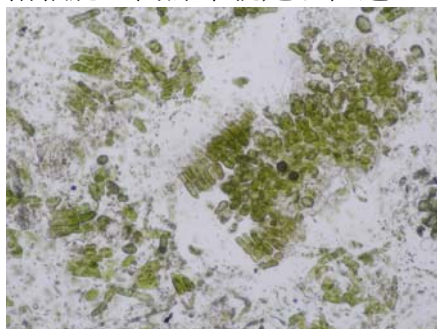
圖四、各種植物的光合作用效率(暗)2



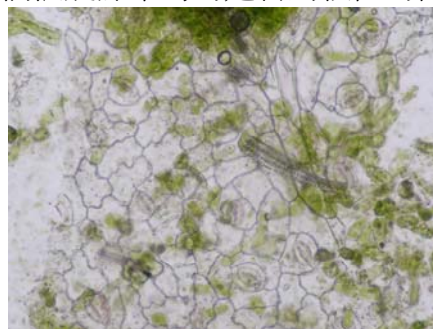
實驗四 果汁機不同轉速和時間，對光合作用效率的影響

有一篇中文網頁是國內一所大學生物系學生實驗報告，內容有相同的 Hill 反應實驗及結果與討論，該報告實驗結果很完美，1 小時內即有相當明顯的反應結果，我們從討論中注意到葉綠體完整度的問題，果汁機也許可以嘗試以不同轉速及時間攪碎葉子，也許會得到不同的葉綠體溶液。

→結果：以顯微鏡觀察葉綠體溶液的狀況，在低速 20 秒、1 分鐘、2 分鐘及高速 20 秒、1 分鐘、2 分鐘後，地瓜葉並沒有太大的差異，顯微鏡觀察都含完整葉綠體，我們沒有定量完整/破碎比率，而低速下顯微鏡觀察到較多的完整葉肉細胞，甚至有完整表皮細胞及完整保衛細胞，而課本就是以低速 20 秒來處理菠菜，我們懷疑課本寫的是否為較佳的條件？



照片 3：低速 20 秒地瓜葉葉肉組織仍清晰可見

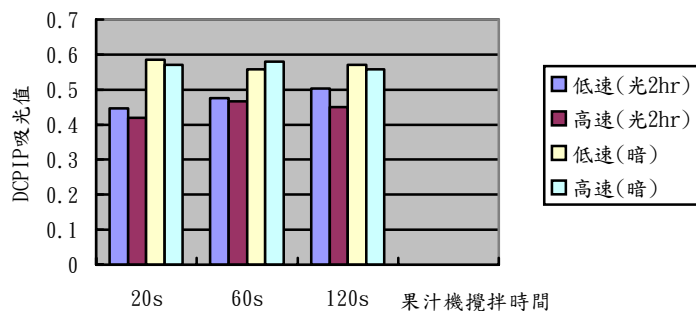


照片 4：低速 20 秒地瓜葉可見完整表皮細胞及保衛細胞

表五、果汁機攪拌時間及速率的結果(地瓜葉)

速度 \ 攪拌時間	20 秒	60 秒	120 秒
低速(照光 2hr)	0.446	0.476	0.504
高速(照光 2hr)	0.420	0.466	0.45
低速(暗)	0.586	0.558	0.570
高速(暗)	0.570	0.580	0.558

圖五、果汁機攪拌時間與結果的關係



實驗五 原文版與課本步驟對光合作用效率的比較

寒假中上網查到一篇英文版 Hill 反應實驗，和我們的教科書有不同的實驗流程，最大的差異是離心步驟：

版本	原文版	課本
步驟	1.以 200x 離心 3 分鐘，取上清液 2.以 1000x 離心 7 分鐘，取沉澱 3.加入適當 0.5M 糖水，resuspend， 離心 7 分鐘，取沉澱	以 3000x 離心 5 分鐘，取沉澱。

→結果

(一)原文版：照光 20 分鐘、40 分鐘、60 分鐘後地瓜葉顏色變化明顯。

(1) 我們認為是由於原文版 Hill 反應流程中有去上清液，留下來的葉綠體在顯微鏡觀察時數目雖然較少但是完整，顯示破碎葉綠體即使留下，也不會在最後的試管中與 DCPIP 作用。

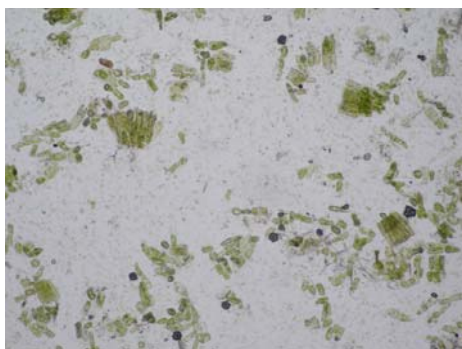
(2) 原文版 Hill 反應流程組在照光後，最後觀察顏色時上清液便會顯示 DCPIP 藍色的變化。

(二)課本：照光 20 分鐘、40 分鐘、60 分鐘後地瓜葉顏色變化不明顯。

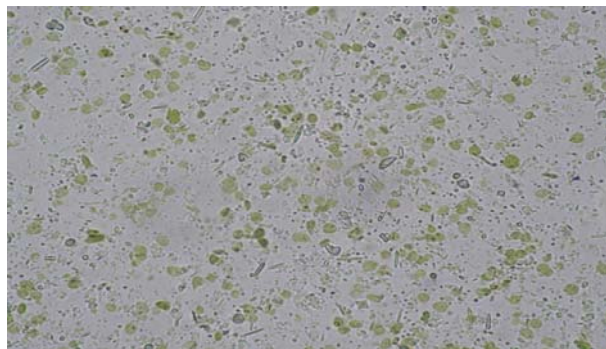
(1)教科書流程只有一道離心步驟，所有完整細胞、比重大的碎塊都和葉綠體一起沉澱下來。

(2)教科書流程組最後一道離心時上清液仍呈綠色，使得藍色 DCPIP 的變化看不清楚，且 596nm 吸光值也沒有太大改變。

※此實驗只要照光後，最後一道離心時若上清液成綠色，通常看不到明顯的實驗結果，反之，上清液呈藍色變化是成功的，故我們認為製備葉綠體溶液時捨棄上清液是必要的。



照片 5：低速下果汁機絞碎較久，地瓜葉仍可見完整細胞。



照片 6：只有一道離心步驟，比重大的碎塊都和完整葉綠體一起沉澱下來。

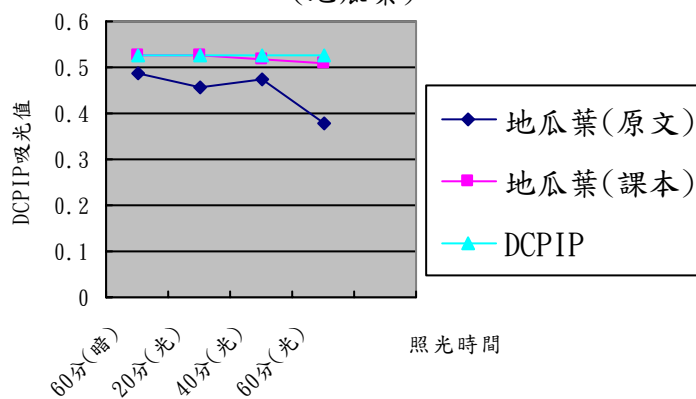


照片 7：地瓜葉英文版 Hill 反應流程中有去上清液，這些綠色上清液我們會丟棄

表六、原文書實驗流程及課本實驗流程結果(地瓜葉)

版本 \ 時間	20 分(光)	40 分(光)	60 分(光)	60 分(暗)
原文書	0.458	0.476	0.380	0.485
課本	0.526	0.516	0.508	0.528
DCPIP(對照組)	0.527	0.527	0.526	0.528

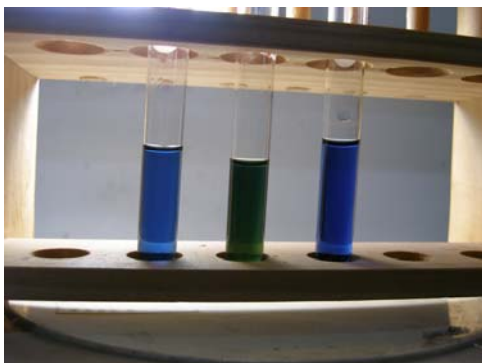
圖六、原文書實驗流程及課本流程結果
(地瓜葉)



照片 7：地瓜葉一、課本光 20 分二、40 分三、60 分 四到六為英文版流程



照片 8：照片 7 放大英文版流程光一、20 分二、40 分 三、60 分



照片 9：地瓜葉暗 60 分英文版流程/課本流程/DCPIP 對照組

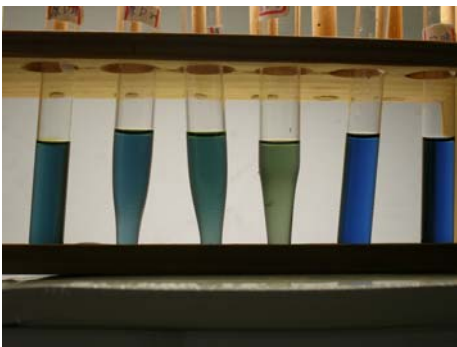
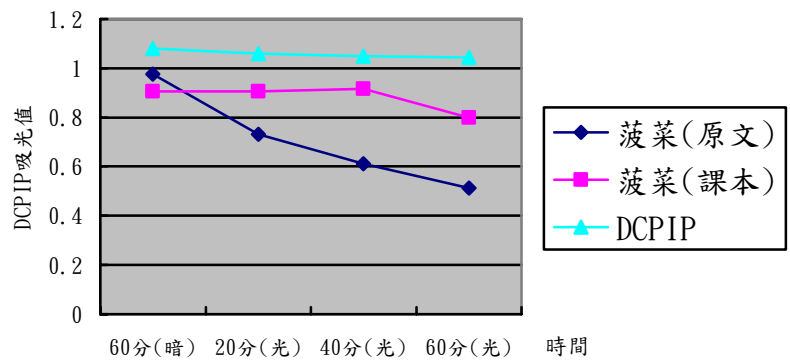


照片 10：菠菜葉的綠色上清液，這些綠色上清液會捨棄

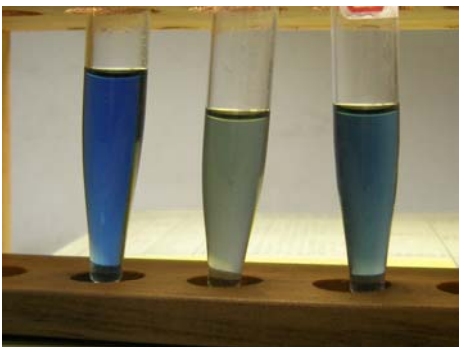
表七、原文版實驗流程及課本實驗流程結果比較(菠菜)

版本 \ 時間	20 分(光)	40 分(光)	60 分(光)	60 分(暗)
原文書	0.732	0.612	0.514	0.975
課本	0.905	0.915	0.800	0.905
DCPIP(對照組)	1.06	1.05	1.045	1.08

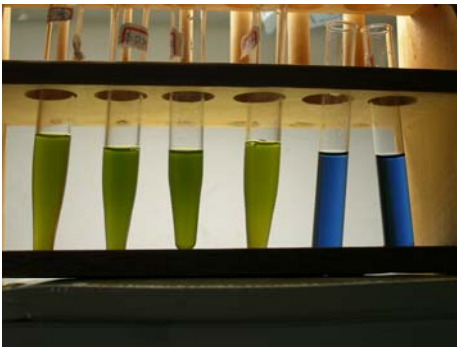
圖七、原文書實驗流程及課本流程結果(菠菜)



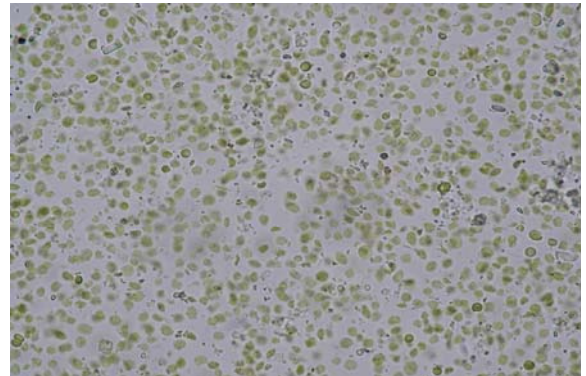
照片 11：菠菜英文版流程一、暗
二、光 20 分 三、光 40 分
四、光 60 分 五、DCPIP 光
六、DCPIP 暗



照片 12：(照片 11 放大) 一、只有 DCPIP 光
二、光 60 分 三、暗



照片 13：菠菜課本流程一、暗/二、光 20 分/三、40
分/四、60 分/五、只有 DCPIP 光/六、只有 DCPIP 暗



照片 14：英文版流程得到的菠菜葉綠體

實驗六 不同植物光合作用的效率(以原文版流程)

我們以原文版流程再度比較不同植物的光合作用效率，得到以下結果。

最佳	菠菜、玉米葉、地瓜葉(陽性植物)
稍差	變葉木、瓦氏麟毛蕨(陰性植物)
不可用	酢醬草、兩耳草(陰性植物；酢醬草因 pH 3.5 使 DCPIP 變淡)

※我們懷疑是否因為陽性植物和陰性植物的差異所造成。



兩耳草

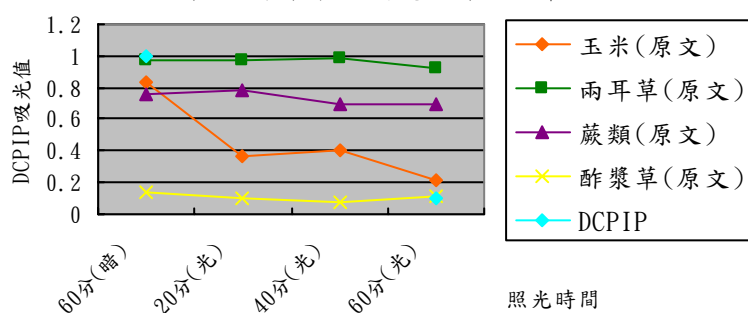


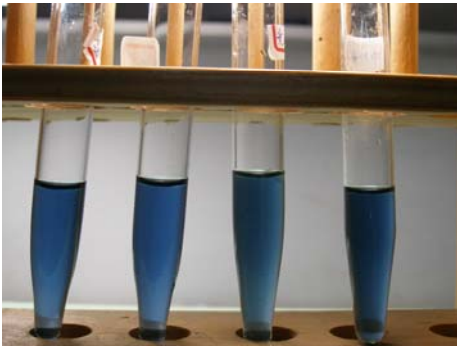
瓦氏麟毛蕨

表八、各種植物的光合作用效率³

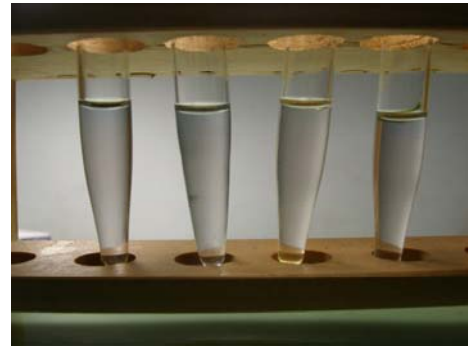
植物 時間	20 分(光)	40 分(光)	60 分(光)	60 分(暗)
玉米	0.363	0.408	0.217	0.835
兩耳草	0.970	0.985	0.920	0.975
蕨類	0.780	0.694	0.690	0.758
酢醬草	0.106	0.081	0.110	0.138
DCPIP			0.100	0.995

圖八、各種植物的光合作用效率³





照片 15：兩耳草一、暗 二、光 60 分
三、光 40 分 四、光 20 分



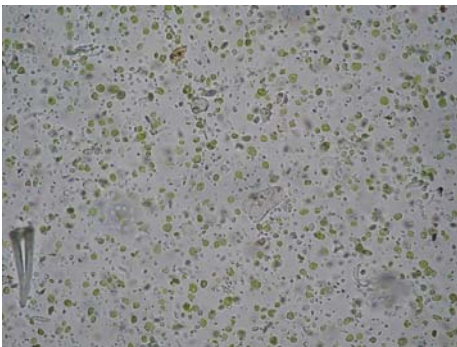
照片 16：酢醬草一、暗 二、光 60 分
三、光 40 分 四、光 20 分



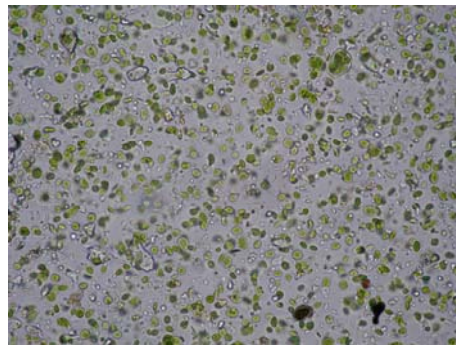
照片 17：蕨類一、暗 二、光 60 分
三、光 40 分 四、光 20 分



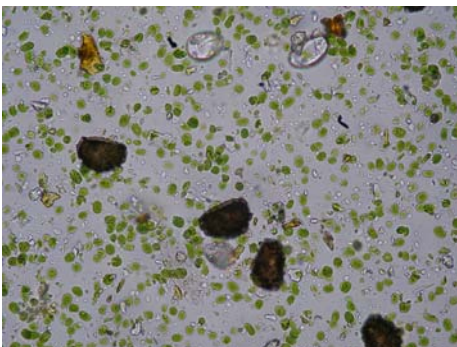
照片 18：玉米葉一、暗二、光 60 分
三、光 40 分 四、光 20 分



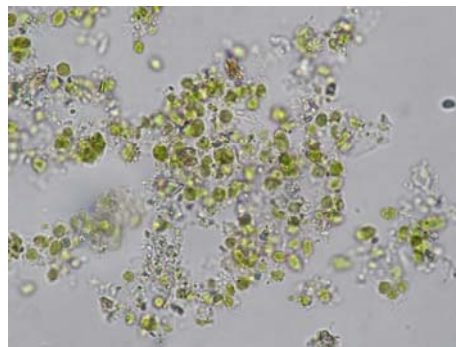
照片 19：玉米葉綠體



照片 20：兩耳草葉綠體



照片 21：蕨類葉綠體(黑色是孢子)

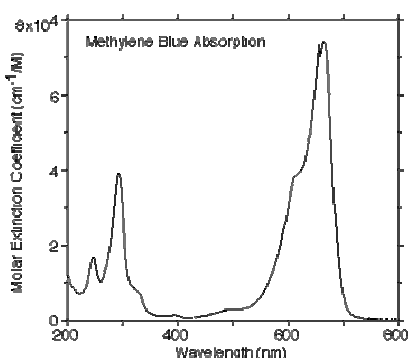
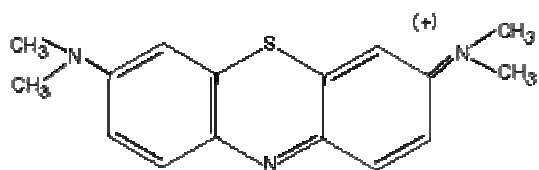


照片 22：酢醬草葉綠體

實驗七 探討甲基藍是否可為 DCPIP 替代品？

高中參考書寫甲基藍可作為 DCPIP 的替代物，我們上網查到甲基藍的參考資料，覺得二者化學性質相似，顏色變化也幾乎一樣是從藍色變淡。

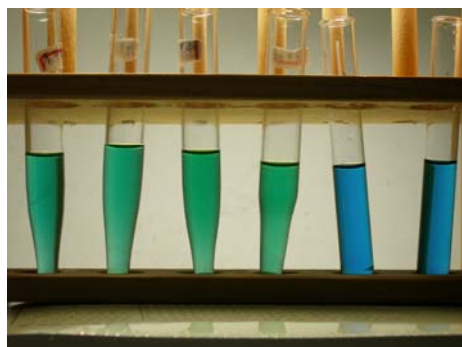
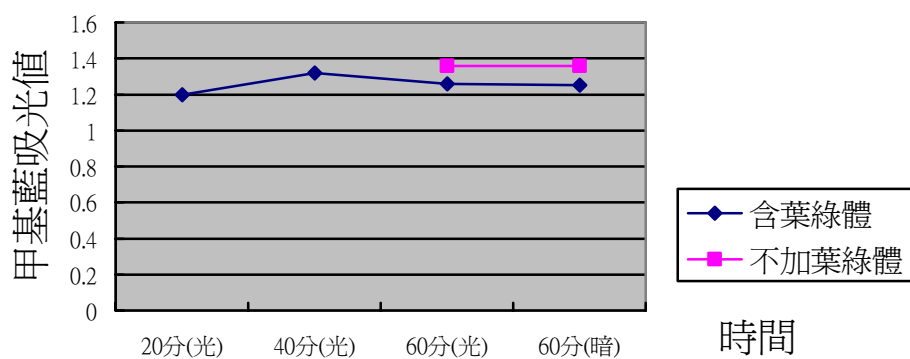
→結果：不行



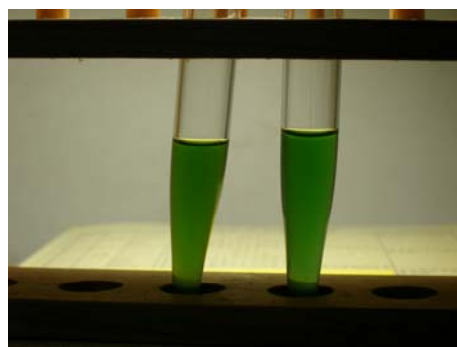
表九、甲基藍光反應的結果（668nm 吸光值）菠菜 英文版 Hill 反應流程

時間 有無葉綠體	20 分(光)	40 分(光)	60 分(光)	60 分(暗)
含葉綠體	1.2	1.32	1.26	1.25
不含葉綠體			1.36	1.36

圖九、甲基藍反應結果



照片 23：菠菜一、暗 二、光 20 分 三、光 40 分 四、光 60 分 五、甲基藍光 六、甲基藍暗



照片 24：地瓜葉(甲基藍)一、光 20 分 二、光 60 分

實驗八 簡化原文版繁複的離心步驟

在分區科展中，指導教授認為原文版的離心步驟過於繁複且費時，希望我們能化繁為簡，以增加實驗效率，故我們以多層紗布代替第一道離心步驟(200x 5 分鐘)，並縮短第二道及第三道離心的時間。

→結果：200x 低速離心的主要目的是除掉大塊的渣滓，增加紗布層數再過濾亦有此作用；1000x 七分鐘的離心步驟是為了得到完整的葉綠體，縮短離心時間影響也不大，實驗數據顯示，修改過後的步驟與原文版的步驟結果差異並不大，但離心總時間卻由 17 分鐘縮減為 10 分鐘，因此可提高實驗效率。

步驟\版本	原文版	修改後
過濾	以四層紗布過濾。	以多層紗布過濾(≥六層)。
第一道離心步驟	以 200x 離心 3 分鐘，取上清液。	省略。
第二道離心步驟	以 1000x 離心 7 分鐘，取沉澱。	以 1000x 離心 5 分鐘，取沉澱。
第三道離心步驟	加入適當 0.5M 糖水，resuspend 以 1000x 離心 7 分鐘，取沉澱。	加入適當 0.5M 糖水，resuspend，以 1000x 離心 5 分鐘，取沉澱。

表十、原文版及修改過後實驗結果

版本\時間	60 分鐘(光)	60 分鐘(暗)
修改後	0.372	0.396
原文書	0.322	0.370
DCPIP	0.402	0.414

陸、討論

一、實驗結果顯示，修改過後的實驗流程具有以下優點：

(一)覆現性高，幾乎每次實驗都能得到明顯的結果。

(二)反應速率快，只需照光 20 分鐘便可觀察出結果；而實驗課的時間有限，若能在短時間內即有明顯變化，可使實驗進行更有效率。

(三)結果明顯用肉眼即可觀測，每個學校未必使用光電比色計測微量變化，若用肉眼即可觀察出顏色變化，將更幫助學生學習。

二、所有課本似乎皆指定菠菜作為實驗的材料，我們發現這是由於菠菜比起其他植物具有某些特質如：葉綠體多、纖維少、容易過濾等，可以使實驗的結果更明顯，但我們覺得可以比照花粉管萌發的實驗選擇不同的植物來進行，由同學從家裡帶來各種不同植物，提供其它的變因，增加實驗討論的空間。

三、實驗中我們使用了許多植物如：菠菜、玉米葉、地瓜葉、變葉木、蕨類、酢醬草、兩耳草，前三者為陽性植物，其餘為陰性植物，我們發現陽性植物所呈現的結果較明顯，可供課前準備時選擇材料的參考。陽性植物（菠菜、玉米葉、地瓜葉）與陰性植物（變葉木、蕨類、酢醬草、兩耳草）葉綠體濃度都很高，在 Hill 反應卻有如此差異有待進一步探討。

四、由光學顯微鏡分析，我們發現照原文版的流程所得到的葉綠體顆粒較大而完整；而依課本所得的葉綠體包含了許多無法行光合作用甚至干擾 DCPIP 還原的雜質，也有大量細胞壁未被打碎的細胞，若能進一步使用電子顯微鏡觀察或許可以解開這些干擾雜質的面貌。

五、依原文版實驗流程所得的葉綠體溶液加 DCPIP，經離心後上清液為藍色；依課本方法所得的葉綠體溶液加 DCPIP，經離心後上清液常是綠色，藍色反而不明顯，可能葉綠體碎塊

或溶於水的葉綠素太多。除了干擾 DCPIP 的還原作用外，也造成藍色不明顯。因此去上清液的兩道離心步驟是必要的，不但能得到完整葉綠體，且讓實驗反應更快。

- 六、原文版的實驗有低速離心去渣，此步驟之後以 2 層或 4 層紗布去渣應該沒有太大差別；由於課本方法沒有以低速離心去渣，可見大塊表皮細胞(氣孔可見)出現在葉綠體溶液。
- 七、酢醬草的酸鹼值很低，因此我們推測酢醬草在黑暗中也產生顏色變化原因是其酸性與 DCPIP 作用的關係，所以我們建議找酸鹼值中性的植物作為實驗材料。(經測量地瓜葉 pH 值 6.86、變葉木 7.3、蕨類 7.05)，原文書上實驗步驟中有加入緩衝液(buffer)，目的是維持酸鹼值在中性的情況下，以避免待測物與 DCPIP 作用，使顏色變化而影響測定吸光值時的結果，酢醬草葉綠體溶液若加入緩衝液也許仍然能進行 Hill 實驗反應，但因時間不足我們暫無法提供實驗數據。
- 八、在此實驗中我們並未顧及到「溫度」這個變因，也許這是一個重要的影響因素，因大學生命科學實驗常使用大塑膠盆裝滿碎冰及冷卻的果汁機、buffer (ice-cold)。
- 九、實驗結果顯示甲基藍在 1 小時內無明顯變化，但沒有作時間更長的實驗，不能完全證明甲基藍真的不會變色，但我們肯定在高中實驗不適用。
- 十、實驗結果顯示，果汁機攪拌之高、低速結果變化不大，但是本實驗條件是在課本方法下照光 2 小時，沒有作原文版的實驗。此外課本方法離心速度太快，3000x 把更多比葉綠體小的顆粒離下來，所得的葉綠體溶液非常黏稠，我們推測這是否也是干擾 DCPIP 的還原原因之一？
- 十一、在這次科展實驗中，我們利用網路查到許多資料，如:DCPIP 與甲基藍最佳吸光值、原文版實驗步驟、植物鑑定、化學結構等等，因此使用書籍資料與網路資料是我們探索本實驗的重要線索。

柒、結論

- 一、經過上述實驗流程所呈現的結果，我們確定若課本上的步驟經過部分修改，可以在實驗課上得到更明顯顏色變化，以供學生觀察紀錄。
- 二、我們所得到的葉綠體溶液，由於葉綠體完整度高，雜質及碎塊含量少，更適合用來做光合作用相關實驗的材料來源，例如:進一步探討陽性植物及陰性植物光反應差異的影響因素，或植物的 pH 值對光合作用的影響，因時間緊迫，無法完成這些實驗得到可參考的結果，但這將是我們更深入探討的方向之一。

捌、參考資料及其他

- 一、楊冠政(民 94)。載於龍騰文化高三生命科學(上)(87~88 頁)
- 二、林金盾(民 94)。載於康熙圖書網路股份有限公司高二生物上冊(90~91 頁)
- 三、蔡珍(民 87)。載於建宏出版社簡明高中生物 1(241 頁)
- 四、國立清華大學生命科學系 LS 3822 生物化學實驗講義
- 五、THE HILL REACTION, from <http://www.lhup.edu/smarvel/biol300/hill.htm>
- 六、DCPIP and pH, from <http://biae.clemson.edu/biolab/DCPIP.html>
- 七、Optical Absorption of Methylene Blue, from <http://omlc.ogi.edu/spectra/mb/index.html>

附錄：Chloroplast isolation. (摘自 <http://www.lhup.edu/smarvel/biol300/hill.htm>)

- a.) Weigh about 8g of spinach leaves that have had midveins and petioles removed. (In order to preserve chloroplast activity these leaves have been kept in the dark and cold since they were purchased.)
- b.) Rinse the leaves in ice water, then cut them into pieces about 1cm square. Place the leaf pieces into a pre-chilled blender with 40 ml ice-cold 0.5M sucrose. Blend for 15 sec at top speed, wait about 10 sec, then blend again for 10 sec. Squeeze the leaf slurry through four layers of cheesecloth

into a pre-chilled beaker. Pour equal amounts of the filtered, green slurry into two centrifuge tubes (30 ml size). Store the filled tubes in a beaker filled with ice until they can be centrifuged.

c.) Centrifuge the slurry at 200x gravity for 3 min. Unwanted whole cells and cell wall debris are spun to the bottom of the tube at this speed. Decant the supernatant into fresh, cold centrifuge tubes and centrifuge at 1,000x gravity for 7 min. This will spin the chloroplasts down to the bottom of the tube.

Discard the supernatant this time, and resuspend the bottom pellet of chloroplasts into 10 ml of cold 0.5M sucrose, by using a glass rod. After the chloroplasts have been resuspended, combine test tubes and spin again at 1,000x gravity for 7 min to obtain a pellet of moderately pure chloroplasts. Discard the supernatant, and resuspend the pellet in 25 ml of cold 0.1M phosphate buffer at pH 6.5. Keep the chloroplast suspension in an ice bath.

評語

040725 爬上另一座 Hill-光反應實驗的再探討

本實驗經由國外文獻取得之實驗方法比原教科書版本有明顯快速效果，但實驗設計本身大是“假設”部份並無創意或新發現。