

Kit réaction de Hill

Réf. HILL

CONSERVATION

Température ambiante

COMPOSITION

- 3,22 g de réactif de Hill (Potassium hexacyanoferrate)		SACHET HILL1
- Poudre pour préparer 250ml de tampon double phosphate - saccharose pH 6.5 :		SACHET HILL2
- Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	17,9 g	
- KH ₂ PO ₄	3,4 g	
- Saccharose	42,75 g	
- Poudre pour préparer 250ml de tampon simple phosphate - saccharose pH 6.5 :		SACHET HILL3
- Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	8,95 g	
- KH ₂ PO ₄	1,7 g	
- Saccharose	21,35 g	

SECURITE

Utiliser des gants pour manipuler le potassium hexacyanoferrate.

RAPPELS

Les chloroplastes, chez les organismes photosynthétiques, sont le siège de la photosynthèse.

L'énergie lumineuse y est transformée en énergie chimique via des voies de biosynthèse bien spécifiques.

Dans les chloroplastes, un accepteur d'électron, le NADP⁺ est impliqué dans ce processus.

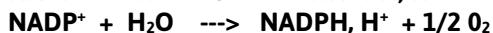
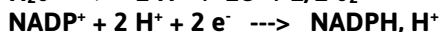
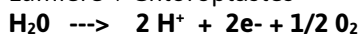
L'expérience de Hill propose d'isoler les chloroplastes pour montrer la nécessité de cet accepteur d'électrons.

Lorsque l'enveloppe des chloroplastes est altérée, le NADP⁺ est fortement dilué.

On étudiera alors leur activité photosynthétique en suivant la production d'oxygène moléculaire à la lumière et à l'obscurité en présence ou non d'un accepteur d'électron exogène : Le potassium hexacyanoferrate : K₃ Fe (CN)₆

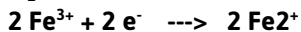
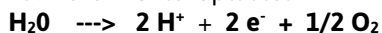
IN VIVO

Lumière + Chloroplastes



IN VITRO

Lumière + Chloroplastes



Les chloroplastes isolés sont conservés dans un tampon Saccharose-Phosphate :

- 71,6 g/L de Na₂HPO₄

- 13,6 g/L de KH₂PO₄

- 171 g /L de Saccharose

PREPARATION

Verser le contenu du sachet HILL1 dans 50 ml d'eau déminéralisée, vous obtenez la solution oxydante.

Verser le contenu du sachet HILL2 dans 250 ml d'eau déminéralisée, vous obtenez le tampon double.

Verser le contenu du sachet HILL3 dans 250 ml d'eau déminéralisée, vous obtenez le tampon simple.

Les tampons et la solution oxydante peuvent être stérilisés par autoclavage pour les conserver par la suite au réfrigérateur.

MANIPULATION

- Mettre 50 g d'épinard frais dans 12 ml de tampon simple
- Broyer 5 minutes au mixeur
- Ajouter 75ml de tampon simple
- Filtrer sur gaze dans un erlenmeyer recouvert d'aluminium
- Centrifuger 5 minutes à 1500g
- Conserver les tubes à l'obscurité dans un bac de glace pilée
- Eliminer le surnageant
- Récupérer le culot de chloroplastes et les mettre dans 5 ml d'eau distillée pour les faire éclater par choc osmotique
- Ajouter 5ml de tampon double afin de rétablir la pression osmotique
- Effectuer des mesures d'oxymétrie par EXAO ou à l'aide d'un oxymètre dans les conditions suivantes :

T0 : suspension de chloroplastes à l'obscurité

T0 + 90 secondes : Lumière

T0 + 180 secondes : Injection de 0,5ml de potassium hexacyanoferrate

T0 + 240 secondes : Obscurité

Résultats attendus :

