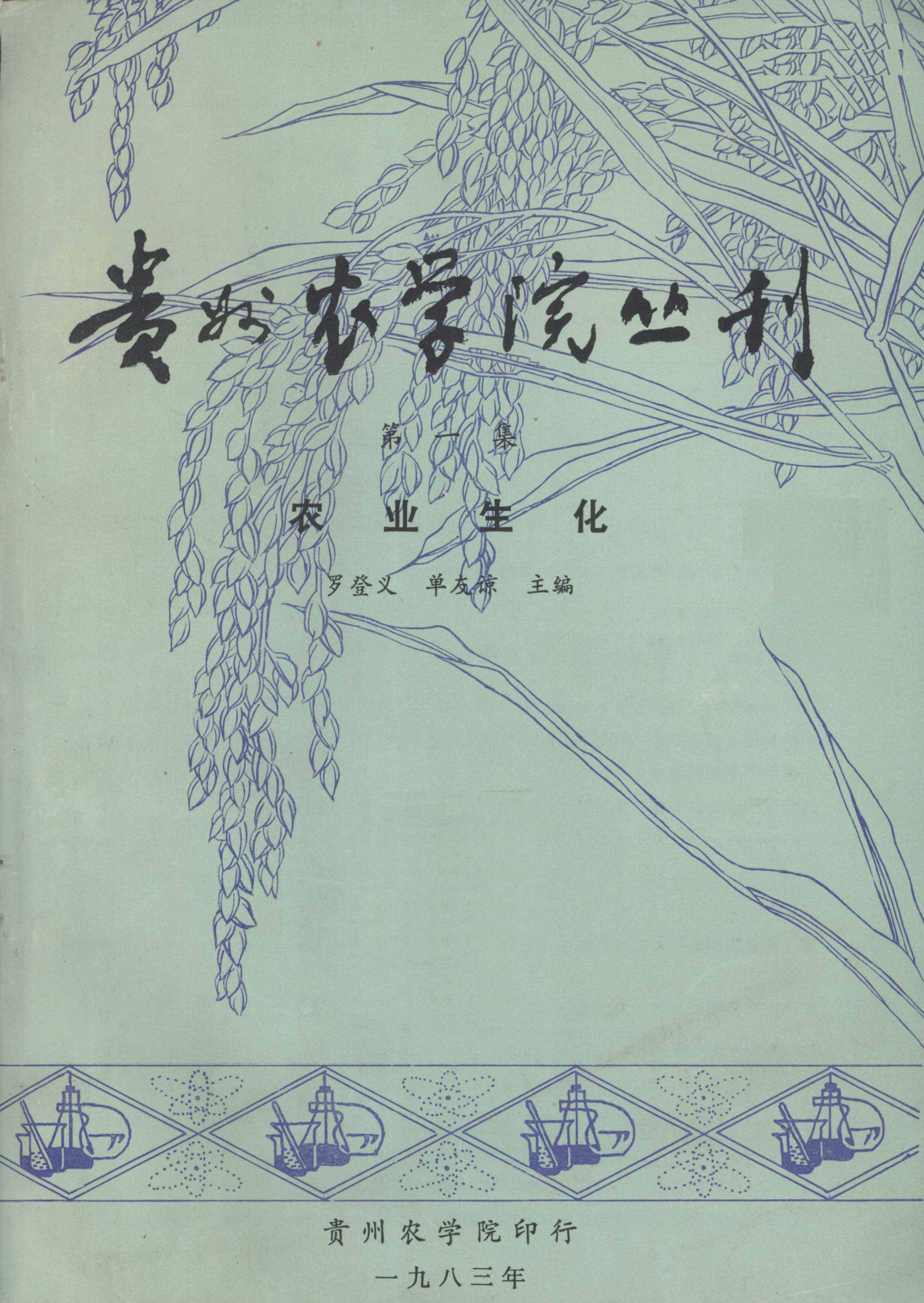


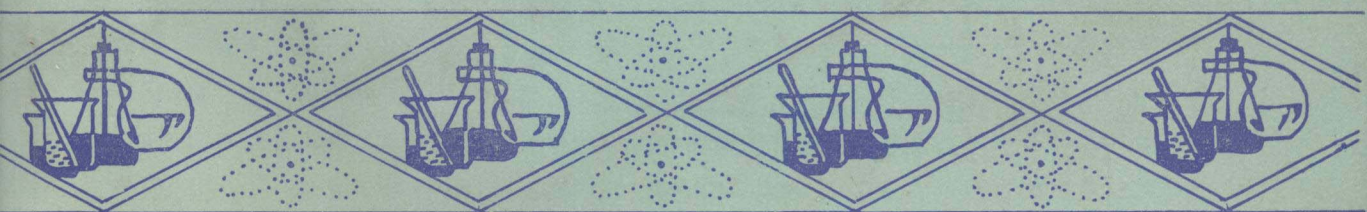


贵州农学院丛刊

第一集

农业生化

罗登义 单友谅 主编



贵州农学院印行

一九八三年

贵州农学院丛刊

弁 言

高等院校的基本任务，就是搞好教学和科研，两者是相辅相成，互相促进。所以与其称为“两个中心”，宁可说是两位一体。一个理想的大学教师，必须做到二者并重。如是才能为“四化”大业服务，才能促进两个文明。（近来有提到面向生产的，实则农学方面的科研，大都是针对着生产问题的。）

“出成果，出人才”，这是党的明智号召，也是我们的神圣职责。近十多年来，贵农有识之士，苦心惨淡努力，对此初见成效。诚然，一得之愚，沧海一粟；雕虫小技，贻笑大方。但为抛砖引玉，启后承先，企望来者，居上胜蓝。科学知识，贵在集腋。斯刊编辑，意义在此。贵农志士，曷兴乎来！

创刊伊始，错误难免，尚望高明，不吝指正，幸甚！

罗登义

一九八三年三月一日

《农业生化》专集附言

1964年春，我院承担国家科委和农业部下达的“果品营养价值研究”的任务，成立了生化营养研究室，由罗登义教授主持其事。后遭十年浩劫，研究工作中断。

“四人帮”粉碎后，研究室恢复工作，我们从国内农业科学的实际出发，主对蛋白质、氨基酸、维生素、淀粉、脂油、农药等方面，研究其简易、快速、低消耗的分析方法，同时也作一些稀缺试药的制备，以便目前在农学界科研中应用。至于研究的材料对象，大半带有地方农业色彩，这也是很自然要注意到的。

编 者

一九八三年三月十五日

贵州农学院丛刊

第一集

农 业 生 化

1983年

目 录

弁言	罗登义
《农业生化》专集附言	编者
用染料结合法同时测定米中蛋白质和赖氨酸的研究	
.....	罗登义 单友谅 熊绿芸 王绍美 (1)
稻米中蛋白质和赖氨酸含量快速测定方法的研究	
.....	何照范 王绍美 单友谅 牛爱珍 (10)
测定谷物种子中色氨酸含量的快速法	熊绿芸 (18)
谷物直链、支链淀粉纯品制备及测定方法的研究	何照范 单友谅 (21)
谷类种子中淀粉的理化学性质	何照范 国兴民 (32)
植物种子中主要不饱和脂肪酸薄层分析方法的研究 (I) 层析条件	
.....	叶在荣 单友谅 朱文适 (41)
贵州水果的营养价值	罗登义 单友谅 叶在荣 何照范 (46)
	罗先进 李久禄 刘荣生
猪的野生饲料调查及其营养成分	罗登义 单友谅 钱定宽 彭国华 封朝璧
	黄自强 李永康 陆曼珠 廖衍伦 陈淑华 (63)
	段绵青 方蔼如 杜国馨 徐文汇
贵州地方水稻品种营养品质的研究	罗登义 单友谅 何照范 熊绿芸 李久禄
	国兴民 牛爱珍 王绍美 叶在荣 杜薇 (76)
贵州黑糯米的营养成分	朱文适 (132)
米之生化研究	罗登义 (140)
新农药杀虫双在稻米中残留量分析方法	单友谅 叶在荣 国兴民 杜薇 (150)
杀虫双和巴丹在中稻上安全使用标准的研究	单友谅 叶在荣 独山县植保站 (163)
用水溶法生产的杀虫单工业品 (水剂) 和水溶法生产的杀虫双工业品 (水剂)	
直接制备沙蚕毒素草酸氢盐纯品方法的研究	单友谅 叶在荣 (167)

用染料结合法同时测定米中蛋白质 和赖氨酸的研究

罗登义 单友谅 熊绿芸 王绍美

(生化营养研究室)

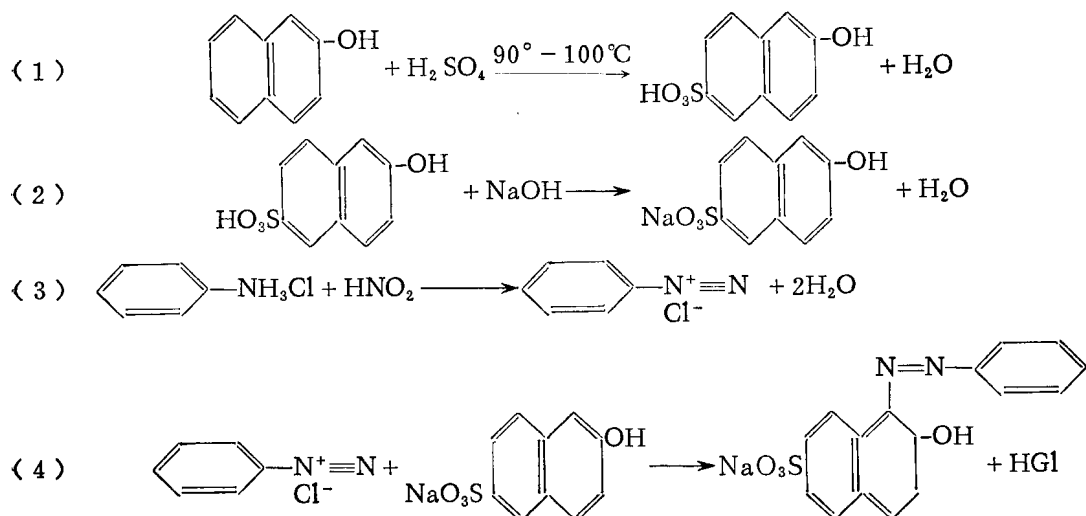
稻米中蛋白质和赖氨酸含量的多少, 决定其营养价值的高低, 因而提高稻米中蛋白质和赖氨酸的含量, 是现代品质育种工作中重要任务之一。为了尽快地筛选出高蛋白质和赖氨酸的亲本材料和杂种后代, 迫切需要使用简易, 快速、低消耗的分析方法。

前几年国外多用快速的染料结合法 (Dye Binding Capacity 法, 简称 DBC 法)⁽¹⁾⁽²⁾, 评价蛋白质的数量和品质。近年来, 从丹麦进口的蛋白质分析仪就是以染料结合法为原理设计的, 并在此基础上提出测定赖氨酸含量的方法 (简称 DBL 法)⁽³⁾。我们利用同一原理, 使用国产 G×D-20 型蛋白质分析仪及 72 型分光光度计, 建立了同时测定蛋白质及赖氨酸含量的联合测定法。

国产蛋白质分析仪原使用金橙 G 作试剂, 据国外报导, 金橙 G 的颜色灵敏度只有酸性橙₁₂的一半⁽⁴⁾, 而赖氨酸的计算原理是染料与赖氨酸等克分子结合; 因此, 建立本方法需要解决合成目前国内市场尚无出售的酸性橙₁₂和建立测定染料准确纯度的方法。

一、酸性橙₁₂ 染料的制备和鉴定

(一)酸性橙₁₂ 染料的制备: 酸性橙₁₂ 是由 β 萘酚 6-磺酸钠与氯化重氮苯偶合而成, 其主要方程如下:



制备步骤:

1. β 萘酚磺酸钠的制备: 将烧杯中 145ml 浓硫酸于沸水浴上加热至 80°C , 在剧烈搅拌下缓慢加入 100 克 β 萘酚, 然后继续控制烧杯内容物的温度在 $90-100^{\circ}\text{C}$ 之间, 不断搅拌 20 分钟, 加入 250ml 蒸馏水, 冷后缓慢加入 $10N$ NaOH 溶液约 522ml, 使溶液 PH 值达 8 左右, 立时有沉淀析出, 趁热抽滤, 用少量蒸馏水洗沉淀, 将沉淀溶解于 1100ml 热蒸馏水中, 用活性炭脱色, 冷却后, 析出细针状结晶, 抽滤, 用少量蒸馏水洗涤两次, 干燥备用。

2. 46 克 β 萘酚磺酸钠溶于大约 2000ml 蒸馏水中, 放入 $5-0^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

3. 重氮盐的制备: 取新蒸苯胺 17 克加入盛有 43ml 浓盐酸的烧杯中, 待冷至室温后置于冰浴中冷至 5°C 以下, 搅拌下缓慢加入亚硝酸钠溶液 (12 克亚硝酸钠溶于 29ml 水中), 反应温度保持在 5°C 以下。当大部分亚硝酸钠加入后, 用淀粉碘化钾试纸检测, 直至试纸刚变蓝色为止。

4. 称 97 克 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 配成饱和溶液备用。

5. 酸性橙₁₂的合成。将盛有 β 萘酚磺酸钠溶液的烧杯置于冰盐浴中冷却至 5°C 以下, 在不断搅拌下用两支滴管同时向 β 萘酚磺酸钠溶液中加入重氮盐和碳酸钠溶液, 直到重氮盐加完为止。最后反应混和物的 PH 应在 8 左右, (若碳酸钠溶液未加完也停止加入), 所得红色染料粗制品滤干后, 用 90% 的热酒精重结晶, 结晶滤干后, 置于索氏脂肪抽提器用乙醚回流萃取有色杂质至乙醚无色为止, 在 50°C 的温度下干燥备用, 产率约 72%。

(二) 酸性橙₁₂ 染料的鉴定

1. 定性鉴定

(1) 吸收光谱图的比较: 同时作丹麦进口染料和自制染料的吸收光谱图 (图 1), 最大吸收峰均在 $482-485\text{m}\mu$ 处, 图形一致。

(2) 薄板层析鉴定: $10 \times 20\text{cm}$ 玻板用硅胶 G 涂板烘干, 分别将进口酸性橙₁₂和自制酸性橙₁₂比较定量测定。

用 90% 乙醇溶解, 点样时各点 $5\mu\text{l}$, 在甲醇: 乙酸 = 9:1 的混合溶剂中展开, 得层析谱如图 2 所示, 丹麦染料与自制染料 R_f 值相同, 均无杂色斑点, 只有一种有色物质存在。说明自制染料与进口染料完全相同。

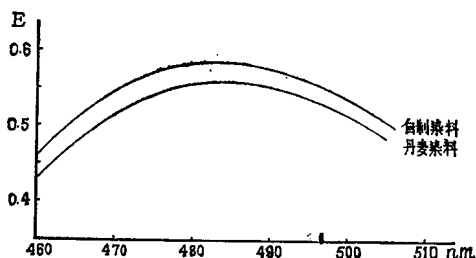


图 1 丹麦染料和自制染料吸收光谱图

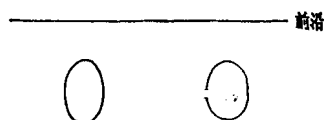
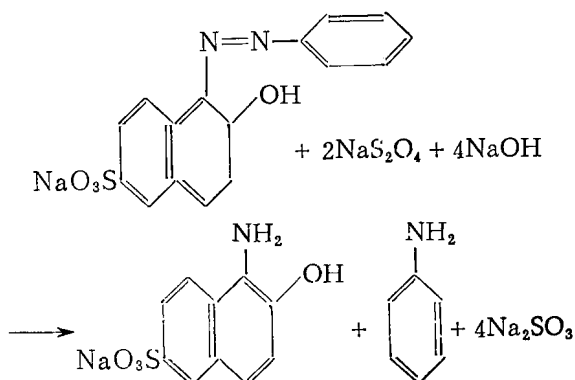


图 2 两种染料的薄板层析图谱

2. 定量测定

(1) 原理: 每分子偶氮磺酸染料含有一个偶氮基 ($-\text{N}=\text{N}-$), 在碱性溶液中, 加入低亚硫酸钠 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (保险粉), 即将氮与氮间双键断开, 并生成两分子胺类化合物, 如下式:



然后，用凯氏法测出含氮量。

(2)方法步骤：准确称取0.04克染料于凯氏瓶中，加2ml蒸馏水，两滴40%的NaOH溶液和0.5克保险粉，加热溶解，染料溶液由红色变成黄色。再加入1.5克10:1的 $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4$ 接触剂，3ml浓硫酸，同时作一空白。开始小火消煮，待泡沫消失后加大火力消煮。至溶液透明后再继续消煮100分钟，即可蒸馏滴定。

因按结构每克分子染料含氮量为 $\frac{28}{350.37}$ 克，故0.04克染料含氮量应为 $28/350.37 \times 0.04 = 0.003197$ 克，根据下式计算染料的百分含量。

$$A = \frac{B}{0.003197} \times 100$$

A：染料百分含量

B：0.04克染料测出的实际含氮量

(3)测定结果：自制染料纯度为96.43%，丹麦染料为81.33%。

(4)测定条件与方法的可靠性

a 用丹麦蛋白质分析仪附带的染料（含量为81.89%）与自制染料同时进行不同消煮时间对比试验，其结果以消煮透明后继续消煮100分钟为最好（表1）

表1. 消煮时间对测定染料百分含量的影响

染料纯度 样品名称	30分	60分	100分	130分
丹麦进口染料	69.80	80.50	81.33	81.23
自制染料	85.00	94.57	96.43	96.34

b 以丹麦进口染料的纯度为标准，测出克分子消光系数为20803.2，根据此克分子消光系数计算自制染料纯度为96.8%。

c 按丹麦进口染料的纯度和用本法测得自制染料的百分含量，准确配成每毫升含10微克的溶液，测得消光值很一致（见表2）。

以上结果说明本法测定结果可靠。

表 2 同一浓度的两种染料在不同波长的光密度值

波 长 (mμ)	470	480	482	486	488	490	500
进 口 染 料	0.500	0.560	0.560	0.551	0.520	0.455	0.30
自 制 染 料	0.500	0.555	0.560	0.551	0.522	0.455	0.30

注：丹麦染料百分含量的计算：按丹麦仪器说明书规定，整瓶染料配成10立升溶液，其浓度为3.89mM，说明若是百分之百纯度，那就只有13.6294克染料，但实际上整瓶染料准确称量为16.6258克，其纯度应为：

$$\frac{13.6294}{16.6258} \times 100\% = 81.98\%$$

二、蛋白质及赖氨酸联合测定实验

(一)方法原理

(1)蛋白质测定原理：利用蛋白质的精氨酸、组氨酸、赖氨酸残基能与偶氮磺酸染料发生静电结合的性质，以及蛋白质含量与染料结合量之间存在正相关的关系。先对数十种样品用凯氏法测得蛋白质百分含量，再测各样品染料结合量，进行数理统计得出回归方程。以后只要测出未知样品的染料结合量，就可算出其蛋白质的百分含量。

(2)赖氨酸的测定原理：赖氨酸的ε-氨基与丙酸酐发生丙酰化反应后，不能再与染料结合，而精氨酸和组氨酸的咪唑基，胍基不能发生丙酰化反应，仍能与染料结合，因此丙酰化与未丙酰化两份样品的剩余染料浓度之差值就是赖氨酸结合的染料量，而染料与赖氨酸是等克分子结合，从而可间接算出样品中赖氨酸的含量。

(二)仪器和试剂

粉碎机、离心机、恒温振荡机。

G×D-201型蛋白质分析仪或72型分光光度计。

pH2.2的缓冲溶液：称取KH₂PO₄3.4克(AR)，草酸20克(AR)，用水溶解后加入85% H₃PO₄1.7ml，冰醋酸60ml，丙酸1ml，稀释成一升。

醋酸钠溶液：100ml蒸馏水溶解8克无水醋酸钠。

酸性橙₁₂溶液：称取纯度相当于100%的酸性橙₁₂1.5克，加缓冲溶液约400ml，在沸水浴中溶解，待冷却后转入1000ml容量瓶中，加缓冲液定容至刻度，即为每ml溶液含酸性橙₁₂1500微克。

丙酸酐

(三)测定方法

1.标准曲线的绘制

(1)蛋白质分析仪标准曲线绘制：准确称取相当于纯度100%的已知纯度的染料0.2500克，用pH2.2的缓冲溶液配成250ml，即为每ml含1000微克染料，再分别吸取8、10、12、14、16、18、20ml于7个20ml容量瓶中，以缓冲液定容，即为每ml含400、500、600、700、

800、900、1000 微克的染料溶液。分别测出透光率（为了提高灵敏度，采用X2.5的表观透光率），以染料浓度为横坐标，透光率为纵坐标，在半对数坐标线上绘制标准曲线。

（2）72型分光光度计标准曲线的绘制：吸取上述每毫升含1000微克的染料溶液1ml 稀释50倍，即为每 ml 含20微克的染料溶液。分别吸取4、5、6、7、8、9、10ml 于试管中，稀释至10ml，即为每ml 含8、10、12、14、16、18、20微克的标准溶液，分别在72型分光光度计上测其光密度值，绘制光密度对浓度的标准曲线。

2. 分析步骤及结果计算

（1）运用蛋白质分析仪的分析步骤及计算：准确称取两份通过60目筛的等量样品（0.2000克）于具塞试管中，分别编为 α 管与 γ 管，各加2ml 醋酸钠溶液，向 α 管加入0.2ml 丙酸酐， γ 管加入0.2ml 缓冲液，塞上管塞，用手猛烈振荡，充分混匀，若室温高于20℃，混匀后静置10分钟即可加入染料，若室温低于20℃，需静置30分钟左右才能酰化完全，（也可放在振荡机上振荡同样的时间），然后分别向每管加1500微克/ml 的染料溶液10ml，摇匀，置于80℃的恒温振荡器上振荡45分钟，将反应混和物以4000转/分的速度离心10分钟，把蛋白质分析仪的流动液槽吸管插入上清液层，读出两管的透光率。

赖氨酸含量的计算：查标准曲线即得到两管的剩余染料浓度（微克/ml），用下式计算赖氨酸含量。

$$\text{赖氨酸}\% = \frac{\frac{A \times 10^{-6} \times B}{350.37} \times 146.2}{W} \times 100$$

A： α 管与 γ 管剩余染料浓度之差（微克/ml）。

10^{-6} ：将每 ml 微克数换算成每 ml 克数。

B：加入试剂的总体积（ml）。

350.37：染料的分子量。

146.2：赖氨酸的分子量。

W：样品重量（克）

蛋白质含量的计算：用30个左右经凯氏法测得蛋白质含量高低不等的样品，按上述方法测出的 γ 管（未酰化管）的透光率与相应的蛋白质含量进行回归统计⁽⁵⁾，算出回归方程，即可算出其蛋白质含量（操作步骤见北京环保仪器厂生产的蛋白质分析仪说明书）。

（2）应用72型分光光度计的分析步骤：将上述离心后的上清液稀释50倍，以波长482m μ ，0.5cm 比色杯比色测定，用 γ 管的光密度值对粗蛋白质进行回归统计，即可求出未知样品的蛋白质百分含量。

α 管与 γ 管剩余染料浓度之差乘以稀释倍数，即可按上述公式计算赖氨酸含量。

（四）结果和讨论：

1. 丙酰化反应的条件

（1）温度对丙酰化反应速度的影响：据我们试验，室温在25℃以上，丙酰化反应速度非常迅速，只要样品与丙酸酐接触，反应很快就能完成（表3）。但室温低于20℃，特别是低于15℃以下，完成丙酰化反应的时间需增到30分以上（表4、5）

表 3 25℃以上室温丙酰化反应完成的速度

丙酸酐与样品混匀 的方式和反应时间	玻棒轻搅	手摇混匀	振 荡 机 上 振 荡				
			10分	20分	30分	50分	
酰化管的透光率	36.6	36.5	36.2	37.0	36.6	36.2	
	37.0	36.3	36.2	36.2	36.5	—	

表 4 不同温度对酰化反应的影响 (酰化时间为10分)

酰 化 温 度 (℃)	10	15	20	20	30
酰化管的透光率	56.6	53.6	49.9	48.0	47.0
赖氨酸含量(%)	0.37	0.39	0.42	0.44	0.45
氨基酸分析仪值	0.44				
染料结合温度	21℃				

表 5 10℃酰化时间对赖氨酸测定值的影响

酰 化 时 间	10分	20分	30分	40分	3 小时
测出的赖氨酸量(%)	0.385	0.405	0.415	0.44	0.455
氨基酸分析仪值	0.44				
染料结合温度	21℃				

(2) 酰化反应的方式: 手摇混匀后静置与振荡机振荡一致 (表 6)

表 6 不同酰化方式对赖氨酸测定值的影响

赖 氨 酸 含 量 (%) 样 品 号	酰 化 方 式	手 摇 混 匀 后 静 置 10 分	混 匀 后 振 荡 机 振 荡 10 分
1		0.32	0.32
2		0.31	0.31
3		0.32	0.31

2. 粒度对染料结合速度的影响: 粒度越细, 结合完全所需时间越短 (表 7), 通过60目筛孔的样品在室温下需振荡 6 小时才结合完全, 而通过200目筛孔的同一样品只需振荡70分钟就结合完全。

3. 温度对染料结合速度的影响及在不同温度下结合完全所需要的振荡时间 (表 5)。

表 7

粒度对染料结合速度的影响

透光率及赖氨酸含量 筛 孔 数 目		振 荡 时 间			70 分			4 小 时			6 小 时		
					x	y	赖氨酸 %	x	y	赖氨酸 %	x	y	赖氨酸 %
60	目				35.1	39.5	0.21	35.9	44.2	0.32	37.6	46.7	0.38
100	目				36.5	44.7	0.36	37.3	46.9	0.40	38.1	48.1	0.40
200	目				38.3	48.2	0.40	37.8	47.7	0.41	38.3	48.3	0.40

以透光率不继续增加作为三种碱性氨基酸与染料结合完全所需要的振荡时间。在25℃下需振荡5~6小时,在60℃下只需1小时,而在80℃下,仅需45分钟。在一定的温度范围内随着温度的升高,结合速度加快。

※ 60℃为表观温度,内容物温度实际为56℃左右。

表 8

温度对染料结合速度的影响及在不同温度下最佳振荡时间

振 荡 时 间		温 度			25℃ (常温)			60℃ [※]			80℃ [※※]		
		透 光 率 及 赖 氨 酸 含 量 ※			透 光 率		赖氨酸	透 光 率		赖氨酸	透 光 率		赖氨酸
					x	y	%	x	y	%	x	y	%
15	分							36.2	45.8		34.5	44.1	
30	”							36.8	46.0		36.0	46.1	
45	”							37.2	46.8		38.5	49.0	0.26
60	”				57.1	48.3		38.3	48.2	0.25	38.9	49.9	
75	”							37.5	48.0		39.8	50.0	
90	”							38.3	49.4		39.8	50.8	
105	”							38.6	48.5		40.1	50.0	
2	小现				41.3	52.6		37.8	47.8		39.3	50.7	
3	”												
4	”				43.1	56.1							
5	”				44.2	57.1	0.26						
6	”				43.5	57.7							

※※ 在80℃的表观温度下振荡45分钟后,立即降温至60℃,内容物温度维持在56℃左右。

4.离心后的上清液染料颜色稳定性试验,结果说明非常稳定,如当天不能测定,放置五天再测定亦可。

5.本方法的准确度和精密度:用上述方法在国产蛋白质分析仪上联合测了76个水稻样品的赖氨酸和蛋白质含量,其中赖氨酸含量大多数在0.23-0.37%之间,个别低于0.23%,少数高达0.40~0.47%,其中四个系经氨基酸分析仪分析过的样品,用本法多次重复测定,其结果与氨基酸分析仪所测结果相近。(见表6)。将 y 管的透光率代入回归方程($y = 0.218x - 1.28$, $n = 26$, 相关系数为0.984, 剩余方差为0.436)计算蛋白质含量。再将此计算结果与凯氏法测定结果进行比较,其中绝对误差在0.5%以下的占68%, 0.5-0.9%占29%, 1%以上的占3%。用本法多次重复测定经氨基酸分析仪测定过的两个小麦、3个玉米样品,结果与氨基酸分析仪测定结果相近(表6)。

6.除运用具有固定流动比色槽的国产蛋白质分析仪测定外,也可用72型分光光度计测定,两种仪器测定结果基本一致(表7),但用国产蛋白质分析仪可克服72型分光光度计在稀释过程中所带进的实验误差及不同的比色杯和不同的几何位置带来的实验误差。

表 9

本法测定结果与氨基酸分析仪测定结果比较

名 称 测 定 项 目 结 果	初 胜 (梗稻)		IR ₄ (籼稻)		1 (水稻)		2 (水稻)		野鸭红 (玉米)		中单2号 (玉米)		华农2号 (玉米)		鉴 26 (冬麦)		京红8号 (小麦)	
	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均	氨分 基析 酸仪	本平 法均
平 均 值	0.23	0.26	0.23	0.25	0.28	0.28	0.32	0.33	0.32	0.32	0.23	0.27	0.23	0.27	0.28	0.31	0.34	0.35
本 法 测 定 结 果 的 标 准 差	±0.0106		±0.0119		±0.0141		±0.0303		±0.0158		±0.0232		±0.0205		±0.0458		±0.0173	

7.上述方法简单快速,可用于大批样品的筛选。但其中有两个实验条件值得商讨:(1)温度对染料结合速度的影响,虽然在较高的温度下(60~80℃)振荡染料结合速度加快,表现在反应后剩余染料浓度的透光率较快恒定,但本方法是基于两份样品酰化与否的染料结合量之差来计算赖氨酸含量,两者的透光率同时上升与下降,其结果基本一致,所以在一般情况下就不必采用高温振荡而在室温(20℃左右)下振荡1-2小时即可。(2)用样量:等量称酰化与不酰化两份样品,在理论上和实践上都使结果偏低,因此最好采用不等量称样。

表10 两种仪器测定结果比较

样 品 编 号	国产蛋白质分析仪		72 型 分 光 光 度 计	
	蛋 白 质 %	赖 氨 酸 %	蛋 白 质 %	赖 酸 氨 %
1	12.33	0.35	12.27	0.33
2	14.16	0.40	13.81	0.37
3	11.71	0.32	11.74	0.34
4	9.09	0.27	9.04	0.27
5	11.84	0.25	11.98	0.27
6	13.35	0.28	12.80	0.24
7	12.43	0.28	12.27	0.28
8	9.76	0.22	9.72	0.21
9	10.49	0.29	10.58	0.27
10	15.40	0.39	14.77	0.37
11	9.52	0.24	9.48	0.23
12	9.14	0.26	9.10	0.24
13	12.92	0.34	13.28	0.36
14	10.38	0.28	10.53	0.26
15	10.16	0.34	10.44	0.33
16	9.78	0.34	10.15	0.33
17	7.36	0.19	7.27	0.17
18	11.19	0.37	11.59	0.35
19	11.27	0.32	11.50	0.31
20	11.84	0.33	11.93	0.30
21	9.90	0.30	10.25	0.29
22	8.38	0.26	7.94	0.22

参 考 文 献

- 〔1〕 J.Bunyan J. Sci Food Agric, 10. August 1959. P. 25—430
 〔2〕 Udy.D.C., Cereal Chem, 1956, 33,190
 〔3〕 K.J.Carpenter and R.F.Hurrell, Proc, Nutr, Soc., 35.25A(1976)
 〔4〕 Udy.D.C.,J.Am. Oil chemists soc., 48,29.(1971)

稻米中蛋白质和赖氨酸含量 快速测定方法的研究

何照范 王绍美 单友谅 牛爱珍

(生化营养研究室)

摘 要

近年来,水稻育种学家为了培育高产水稻品种,十分重视品质的改良。蛋白质及赖氨酸含量是稻米营养品质的两项主要指标。本文作者基于品质育种工作的需要,研究了双缩脲法测定蛋白质的反应条件及标准曲线选择,将反应温度从常温升高至60℃,反应时间从90分钟降到5分钟,并采用酪蛋白制备标准曲线,从而大大提高分析速度。测定结果与凯氏法相比较,十分令人满意。

此外,作者在Kakade等人⁽¹⁾(1969)基础上,研究了三硝基苯磺酸(TNBS)试剂,在偏碱性溶液中直接与稻米样品中蛋白质的赖氨酸 ϵ -NH₂反应生成黄色络合物,其颜色深浅与赖氨酸量成比例关系。建立了稻米样品蛋白质不必经过盐酸水解及乙醚抽提杂质等操作手续,直接测定赖氨酸含量的方法,与用氨基酸自动分析仪测得的结果基本一致。由于简化了操作手续,较适合于基层选种单位和一般实验室。

稻米是我国人民的主食,也是人体蛋白质的主要来源。在谷物中稻米蛋白质含量较低,但就它的品质而言,却比其它谷物显著优越。因此,近十多年来,国内外育种学家们在提高水稻产量的同时,也特别注意品质育种研究工作。其重点是通过育种手段,进一步提高稻米蛋白质含量,兼顾提高赖氨酸含量。与育种途径密切有关的是分析技术,快速而较准确测定蛋白质,赖氨酸的方法,必将进一步推动品质育种进展。凯氏定氮法至今仍为谷物蛋白质的常规分析方法,此法近百年来,虽有很多改进,但操作繁杂费时。为了适应品质育种工作亲本材料快速筛选要求,出现了酚试剂法,双缩脲法,紫外光谱吸收法,染料结合法等方法。至于赖氨酸,目前一般仍采用氨基酸自动分析仪测定,此仪器价格昂贵,不能普及,近年来,生化工作者也摸索出了一些化学方法,如2,4-二硝基氟苯法,三硝基苯磺酸(TNBS)法,二硝基苯磺酸(DNBS)法,2-氯-3,5-二硝基吡啶法,DBL法等。上述测定技术各有其优缺点,特别是赖氨酸测定,还不能满足品质育种中对大批原始材料和突变体进行筛选的要求。为此,我们研究了稻米蛋白质及赖氨酸的快速测定技术,现将研究采用升温显色的改良双缩脲法及简化的三硝基苯磺酸法^(1,2)报道如下。

材 料 及 方 法

一、试剂及仪器

试剂：双缩脲试剂-在 500ml 容量瓶中依次加 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30ml, 2.5% 酒石酸钾钠 100ml, 5N KOH 30ml, 最后用蒸馏水稀释至刻度, 混匀。使用时, 再将上述溶液与透明度良好的异丙醇等体积混合。

AuC 试剂-在 1000ml 容量瓶中, 加 180.16g 尿素, 3.64g 十六烷基三甲基溴化铵, 以及相当于含有 0.6g 醋酸的醋酸溶液, 以蒸馏水稀释至刻度, 若发现混浊应过滤。

三硝基苯磺酸系本室合成, 其余化学试剂均为 AR 纯。

仪器: 72型光电比色计、离心机、分析天秤、恒温振荡器等。

二、双缩脲法测定蛋白质含量

1. 制备酪蛋白标准曲线。称取国产酪蛋白 2g (磨细至 80 目) 于 0.15N KOH 溶液中, 加热溶解, 并定容至 100ml。分别取此溶液 0.2—0.9ml 8 份, 加 10ml 双缩脲试剂, 在 60—65℃ 恒温水浴中振荡 5 分钟, 随后以 4000 转/分离心 10 分钟, 取离心液在 550nm 下, 以 1cm 比色杯进行比色测定。同时取上述酪蛋白液 5ml (双样) 进行凯氏定氮, 乘以换算系数 6.41 即为酪蛋白含量。以测得的光密度值为纵坐标, 相应的酪蛋白含量为横坐标作标准曲线或计算出光密度值与相应酪蛋白含量的回归方程式 $y = a + bx$ 。

2. 稻米中蛋白质含量测定, 称取过 40 目筛的米粉 0.1g (准确至 1mg), 放入干燥的 25ml 消化瓶或大试管中, 内放几粒玻璃珠, 加 10ml 双缩脲试剂, 按 (二、1) 操作测定样品液光密度值 (空白为不加样品的试剂)。查标准曲线或根据回归方程式, 即可计算出样品中蛋白质含量。

三、赖氨酸含量测定

1. 制备赖氨酸标准曲线

取 L-赖氨酸盐酸, 在 105℃ 温度下烘干三小时, 精确称取 46mg, 加 0.25% 氢氧化钠, 待溶解后定容至 100ml, 即为 $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 赖氨酸标准溶液, 吸取上述标准液 0.1—0.7ml, 用 0.25% 氢氧化钠加至 10ml, 加 10ml 4% 碳酸氢钠, 摇匀。再加 1% TNBS 1ml, 混匀, 置于 40℃ 的恒温箱内 35 分钟, 取出, 以蒸馏水定容至 50ml, 于 430nm 波长下用 1cm 比色皿测定其光密度 E , 以 E 为纵坐标, 赖氨酸的 NH_2 基微克分子数为横坐标, 绘制标准曲线。

2. 测定

称取 60mg 左右脱脂样品 (准确至 1mg), 放入 50ml 容量瓶中, 加少量无水乙醇, 使样品湿润, 加 10ml 0.25% NaOH, 在 40℃ 水浴中振荡 30 分钟。或在室温下放置 6—15 小时, 再摇动 30 秒钟后, 加入 10ml 4% 碳酸氢钠 (pH 8.5) 摇匀。加入 1ml 1% TNBS, 摇匀, 另一份样品液不加 TNBS (样品空白液), 置 40℃ 恒温箱中保温 35 分钟, 取出以蒸馏水定容至 50ml (若有泡沫可加几滴乙醇消除), 混匀。以 4000 转/分离心 10 分钟, 离心液在 430nm 下用 1cm 比色皿, 以试剂空白为对照测定光密度 E , 另一样品液用蒸馏水作对照在同样条件下测定光密度 E_0 。查标准曲线, 计算出稻米脱脂样品中赖氨酸含量。

结果计算：由标准曲线查得光密度 E 的 NH_2 基的微克分子数 A ， E_0 的 NH_2 基微克数为 B_0 ， x 为样品液的称样重 (mg)， y 为样品液空白的样重 (mg)。

$$\text{脱脂样品中赖氨酸}\% = \frac{14.62A}{x} - \frac{14.62B_0}{y}$$

结 果 及 讨 论

一、双缩脲反应及其温度，添加 Auc 的影响

在蛋白质水溶液中加入氢氧化钠和硫酸铜生成紫红色络合物，此反应称为双缩脲反应。近年来用 X 射线结晶解析，发现在碱性条件下，双缩脲与铜反应而生成的络合物是顺式型。当 pH 值低时，一个肽键末端氨基与它邻接的肽键和金属离子相配位，当 pH 变高时，肽基就从末端氨基相接近的部分开始顺次解离出质子 (H^+)，且与铜离子相配位。可见双缩脲反应显色是由于 Cu^{++} 和失去质子 (H^+) 的多肽链中的氮原子相结合的缘故。所以蛋白质的种类即使不同，其显色度亦无大的差异。在组氨酸以外的游离氨基酸和二肽化合物中，均不能使其显色。双缩脲，1-亚氨基缩脲、2-亚氨基缩脲、丙二酰氨、氨基乙醇、氨基酸酰胺等少数化合物以外的非蛋白质化合物也不显色。因此可以认为双缩脲反应是蛋白质特有的反应。

1. 标准曲线的选择。双缩脲法测定蛋白质，一个重要的问题是标准曲线的制备，目前在谷物测定中常选用30多种蛋白质含量广泛的样品，加双缩脲试剂测得光密度值，与同一样品凯氏法蛋白质结果进行数理统计，计算出回归方程式。此种方法不仅制作费时，而且标准也不一致，因而造成不同实验室间测定结果差异较大。为此，我们研究了国产酪蛋白制备标准曲线，并与35种大米的回归方程进行比较（表1）。

表 1

标准曲线 名 称	样 品 数	回 归 方 程	$ b_1 - b_2 $	$s_{b_1 - b_2}$	$t \frac{ b_1 - b_2 }{s_{b_1 - b_2}}$	自 由 度 $N_1 + N_2 - 4$	$f \cdot a$ $t_{0.10}$
35 种 大 米	35	$y = 0.1 + 33.12x$	0.185	0.8	0.03	39	1.684
酪 蛋 白	8	$y = 0.62 + 32.93x$					

由表1t检验结果看出， $t < t_{0.10}^{0.10}$ 可见，35种大米回归直线和酪蛋白回归直线的斜率 b_1 与 b_2 差异不显著。因此可以用酪蛋白标准曲线代替35种大米的标准曲线。这样不仅制作方便，而且节省了时间和试剂。且测定结果稳定。

2. 大米在不同温度下显色及其稳定性

Hisateru Mitsuoka 及其合作者 (1974) 研究双缩脲反应⁽³⁾，发现淀粉在碱性溶液中，于 550nm 下，光密度随浓度增加成直线的上升，加入双缩脲试剂则显著的加大了吸光度。开始时随着淀粉浓度的增加，光密度急剧地上升，当继续增加淀粉浓度时，光密度慢慢达到一个稳定的阶段。可见忽视了淀粉影响，将会带来错误结果。然而由于改良的双缩脲试剂⁽⁴⁾中含有异丙醇，降低了淀粉的溶解，有利于蛋白质提取及显色。我们研究还发现，温度对蛋白

质提取,显色及其稳定性有明显的影响(图1、表2)。

表 2

常温与60℃下回归直线比较

显 色 条 件	样 品 数	回 归 方 程	$b_1 - b_2$	$s_{b_1 - b_2}$	$t = \frac{ b_1 - b_2 }{s_{b_1 - b_2}}$	自 由 度 $N_1 + N_2 - 4$	$f \cdot \alpha$ $t_{0.10}$
20—25℃ 振荡 一 小 时	17	$y = 1.26 + 24.86x$	4.86	3.119	1.558	29	1.699
60℃ 水浴中 振荡 5 分钟	16	$y = 2.99 + 20x$					

由图1看出,在双缩脲反应中,温度对蛋白质提取显色有明显影响,温度愈高,愈有利于蛋白质提取,显色。在常温(20—25℃)下需60分钟显色完全,40℃下为15分钟,60℃下仅需5分钟。不同温度下显色后的紫红色溶液在数小时内相当稳定。由表2的t检验结果说明,常温一小时提取与60℃五分钟提取所得的两条回归直线的斜率 b_1 与 b_2 差异不显著,说明两条回归直线中, x 对 y 的影响规律,在实验范围内是等同的。所以可以采用自制的恒温水浴振荡器,在60℃下振荡显色5分钟。采取提高显色温度对提高分析速度将是一个有效手段。

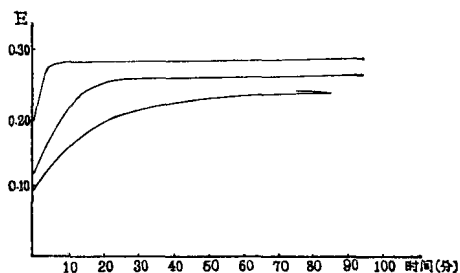


图 1 不同温度下双缩脲显色稳定性曲线

所以可以采用自制的恒温水浴振荡器,在60℃下振荡显色5分钟。采取提高显色温度对提高分析速度将是一个有效手段。

3. 关于样品中添加 Aue 试剂的问题

据 G.S.Noll 的报告,应用此试剂对样品蛋白质的抽提、显色有利。因此我们在所测的稻米样品中先加入 1ml Aue 试剂,充分搅拌后再加入 10ml 双缩脲试剂进行反应与只加入双缩脲试剂的同种样品结果比较(表3)。

表 3

添加 Aue 试剂对显色的影响

处 理	样 品 数	回 归 方 程	$ b_1 - b_2 $	$s_{b_1 - b_2}$	$t = \frac{ b_1 - b_2 }{s_{b_1 - b_2}}$	自 由 度 $N_1 + N_2 - 4$	$f \cdot \alpha$ $t_{0.10}$
不 加 Aue	17	$y = 1.26 + 24.86x$	0.32	3.181	0.1008	30	1.697
加 Aue	17	$y = 2.46 + 24.54x$					

表3 17个大米样品在加入双缩脲试剂之前加 Aue 试剂与不加 Aue 试剂,对二者 t 检验结果说明 $t < t_{0.10}$,故 b_1 与 b_2 差异不显著。因此,Aue 试剂对测定结果没有明显影响。同时不加 Aue 还可节约试剂,简化一步过程,提高分析速度。

二、脱脂样品中蛋白质提取及 TNB-赖氨酸的特性反应

1. 脱脂样品中蛋白质的提取

水稻蛋白质由白蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白组成,它的主要蛋白质是谷蛋白、约占80%左右。选用0.25%氢氧化钠作为蛋白质溶剂、实验了适当加温振荡提取,室温静置提取。用凯氏定氮法分别测定了样品及样品提取液里蛋白质含量,结果如下表(表4.5.6)