

大豆粗蛋白微量快速分析

张·家 藻

莫尚武 邱淑华

(四川大学生物系) (四川大学原子核科学技术研究所)

提高稻、麦、大豆等作物蛋白含量的研究近年受到各国学者的普遍重视〔1、2〕。但在品质育种研究中,如何从杂交后代或诱发突变群体中快速筛选出高蛋白含量的株系是一个亟待解决的问题。凯氏定氮法是分析蛋白质的经典方法,但对大量样品分析筛选有困难。进口设备操作简便,但价格昂贵,不便普及。我们在大豆诱变育种研究中,三年的实践,在 Pinckney〔3〕法的基础上建立了大豆粗蛋白微量快速分析法。此法操作简便,成本低、取样少、准确度和稳定性都较好,适用于大豆高蛋白株系的筛选研究。

材 料 和 方 法

一、仪器药品及试剂配制

1. 仪器:分析天平、粉碎机、电动振荡器、离心机(4000转/分)、分光光度计。

2. 药品:硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),氢氧化钾(KOH)(化学纯),酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)(分析纯),四氯化碳(CCl_4)(化学纯)。

3. 试剂配制:

称取30克氢氧化钾溶于4700毫升蒸馏水中,加入25%的酒石酸钾钠溶液100毫升,然后缓缓加入5%的硫酸铜溶液200毫升。(加入硫酸铜溶液时,要激烈搅动,否则会产生氢氧化铜沉淀,影响测定结果)。此试剂贮存在塑料瓶或内壁涂以石蜡的玻璃瓶中可长期存放。

二、试验方法

1. 测定原理:大豆、小麦、水稻等作物所含蛋白质类型主要为球蛋白、谷蛋白和醇蛋白,均能溶于碱溶液,在碱性环境中铜离子和蛋白质能形成紫红色或青紫色的络合物。在一定浓度范围内,蛋白质的含量与生成络合物颜色的深浅成比例。蛋白质种类不同,显色程度无大差异,非蛋白化合物不显色。用分光光度计在550nm波长,测定光密度的变化,即可计算出蛋白含量。

2. 制定标准曲线:

1) 把数支具塞10毫升的离心管洗净、烘干。在粗天平上配对平衡、编号。

2) 任选一个大豆品种用凯氏法精确测定其蛋白含量。

3) 称取已知蛋白含量的大豆种子 5—10 克, 风干, 粉碎, 使 50% 以上通过 100 目筛。装入干净的样品瓶中, 放入 $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 2 小时, 取出后放入干燥器中冷至室温 (约 30 分钟)。

4) 在分析天平上准确称取已知蛋白含量的大豆粉末: 0.0200、0.0250、0.0300、0.0350、0.0400、0.0450 克于编号离心管中。再设置空白管为对照。

5) 每管中加入 1 毫升四氯化碳, 再加入 10 毫升试剂, 在振荡器上振荡 10 分钟、为了充分振荡, 离心管应水平固定于振荡器上, 并旋紧磨口塞, 防止管中液体溢漏。

6) 振荡完毕后, 以 3000rp/m 离心 5 分钟, 使液体完全透明, 取上清液 5—6 毫升于另一个干净的试管中, 置于 40°C 水浴中保温一小时后, 用分光光度计在 550nm 波长下, 测定光密度。用空白管液体为对照。

7) 以光密度为纵坐标, 样重 \times 蛋白含量为横坐标绘制标准曲线, 并计算相应方程。如图 1。

对于不同的分光光度计, 其灵敏度是不同的。因此在分析工作进程中, 若中途更换仪器或新配制试剂应重新制作标准曲线。

3. 样品的测定:

待测大豆样品, 按制作标准曲线相同的方法制样和测定光密度。把测得的光密度值代入

$$x = 4.18y - 0.18 \quad \text{求出 } x \text{ 值}$$

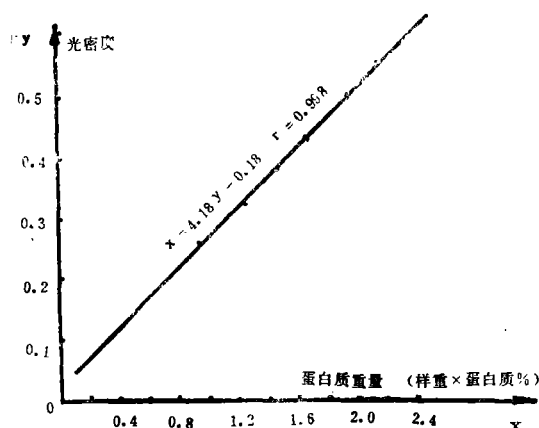


图1 标准曲线图 Fig. 1 Standard curve

未知样品的蛋白含量为

$$P = \frac{x}{w} \%$$

P ——为蛋白含量, w ——为样品的重量。

每个样品应用平行管测定, 取平均值表示蛋白含量 (保留小数后两位)。平行管测定结果若相差在 2% 以上, 应重新再测一次。

二、结果与讨论

1. 准确度、重复性: 用本法与凯氏定氮法对来自辽宁、黑龙江、四川等地的 15 个大豆品种进行分析, 蛋白质含量差异均在 2% 以内 (见表 1)。同时与吉林农科院分析结果也进行了比较, 其差异在 1.5% 以内。另外, 对四个大豆品种中的每一个品种, 先后进行八次分析, 测定结果相近, 变异系数在 0.67%—1.11% 之内 (见表 2)。说明准确度、重复性均好。

表1 蛋白质含量分析比较
Table 1 Analysis and comparison of protein content

编号 Number	品种名称 Variety	微量快速分析法 High-speed analysis method %	凯氏法 % Kjeldahl method %	差异 Difference %	吉林农科院分析 % Analysed by Jilin Academy of Agricultural Sciences %	差异 Difference %
1	沈7912—907 Shen7912—907	44.82	43.19	1.63	44.67	0.15
2	沈7912—28 Shen7912—28	43.49	41.74	1.75	43.46	0.03
3	沈7919—63—3 Shen7919—63—3	42.94	42.29	1.65	42.66	0.28
4	辽76—9037 Liao76—9037	38.82	37.01	1.75	38.10	0.72
5	辽84—9039 Liao84—9039	43.33	41.53	1.80	43.44	—0.11
6	龙辐80—9825 Longfu80—9825	42.91	40.94	1.97	42.83	0.08
7	龙辐80—9837 Longfu80—9837	46.14	45.34	0.80	46.05	0.09
8	川81—02M Chuan81—02M	48.84	49.12	—0.28	49.71	—0.87
9	川82—05E Chuan82—05E	49.52	50.18	—0.66	50.10	—0.68
10	川—83—8408 Chuan—83—8408	49.95	48.21	1.74	50.18	—0.23
11	哈83—1054 Ha83—1054	39.34	38.12	1.22	39.79	—0.45
12	哈83—1134 Ha83—1134	40.25	40.01	0.24	40.18	—0.07
13	哈82—5773 Ha82—5773	46.50	45.25	1.25	46.48	0.02
14	哈82—5775 Ha82—5775	45.86	45.33	0.53	46.53	—0.67
15	哈83—147 Ha83—147	40.96	49.87	1.09	39.47	1.49

表2 重复测定结果
Table 2 Result of repeated determination

蛋白含量 Protein content %	测定次数 Times of determination	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值 \bar{X} Mean \bar{X}	标准差±SE Standard deviation ±SE	变异系数 C.V % Coefficient of variation C.V %
品种名称 Variety												
川82—02M Chuan82—02M		49.07	48.94	49.30	49.32	48.51	48.75	48.59	47.98	48.92	±0.33	0.67
川82—5D Chuan82—5D		47.33	46.61	46.76	47.47	47.71	47.03	48.07	47.77	47.34	±0.51	1.08
川83—84 Chuan83—84		46.62	47.73	46.66	46.84	46.84	47.49	47.13	46.50	46.98	±0.44	0.93
鲁80—7517 Lu80—7517		43.24	44.70	44.35	43.91	43.53	44.05	42.83	44.71	43.91	±0.49	1.11

2. 温度对测定结果的影响：温度对样品溶液光密度的影响很大。温度升高，光密度上升；温度降低，光密度下降；其变异系数均大于5%（见表3）。因此，在不同温度下

测定将会发生较大的误差。经过每次试验表明：用水浴进行恒温控制，取得令人满意的稳定结果。样品溶液放置40℃水浴上，络合物能较长期稳定，放置24小时内光密度变化不大、这样有利于大量样品的分析。

表 3 不同温度对光密度测定的影响

Table 3 Effect of different temperature on the determination of light density

样品名称 Sample	样重 (克) Weight (g)	光 密 度 Light density							变异系数 C.V % Coefficient of variation C.V %
		10℃	20℃	30℃	40℃	50℃	60℃	70℃	
川82—5D	0.0252	0.295	0.315	0.321	0.332	0.349	0.354	0.365	6.7
	0.0274	0.320	0.340	0.348	0.353	0.370	0.383	0.400	5.9
Chuan82—5D	0.0335	0.300	0.405	0.424	0.420	0.436	0.456	0.475	7.0

3. 不同萃取剂对测定结果的影响：加入萃取剂的目的，在于抽提大豆的油脂，如果不除去油脂，将会干扰蛋白质的测定。分别用三种萃取剂：四氯化碳、乙醚、石油醚，并和 不加萃取剂进行了试验，所得蛋白质含量与凯氏法测得的结果进行比较：四氯化碳处理所得结果差异最小；乙醚、石油醚处理所得结果误差均大；不加萃取剂进行处理所得结果平均误差达100%以上（见表4）。这说明必须加萃取剂，而且用乙醚、

表 4 不同萃取剂对测定结果的影响

Table 4 Effect of different extraction agentson determination

萃 取 剂 Extraction agents	品 种 名 称 Variety	样 重 (克) Weight (g)	光 密 度 Light density	蛋白含量 % Protein content %	凯氏法测定 % Kjeidahl method %	平均误差* % Mean error %
四氯化碳 CCl ₄	川82—14D	0.0363	0.450	46.86	46.66	0.43
	Chuan82—14D	0.0361	0.386	46.84		
乙 醚 Ether	川82—14D	0.0353	0.540	57.54	46.66	25.12
	Chuan82—14D	0.0353	0.540	59.18		
石 油 醚 Petroleum ether	川82—14D	0.0359	0.700	76.49	46.66	58.02
	Chuan82—14D	0.0275	0.510	70.97		
不加萃取剂 Check	川82—14D	0.0339	1.050	124.15	46.66	160.10
	Chuan82—14D	0.0342	1.020	119.40		

* 平行管测定的平均值与凯氏法测定结果进行比较。
* Comparison between mean determined by parallel tubes and results determined by kjeldahl method.

石油醚处理均不如四氯化碳效果好。四氯化碳比重大，能使样品全部上浮不粘于管底，同时与样品溶液易于分开，对比色无影响。但四氯化碳有轻微毒性，操作应适当注意。

4. 振荡离心后静置时间对测定结果的影响：振荡离心后分别在不同的时间内测定光密度结果不一致。因为蛋白质溶液在碱性环境中与铜离子生成紫色的络合物，需要一定的时间才能达到反应平衡，使光密度测定稳定。振荡离心后置于40℃水浴中，在60分钟之内光密度变化较大；放置一小时后光密度趋于稳定；24小时之内能一直稳定。因此测定光密度时间最好在振荡离心后1—20小时内。

5. 称量范围：称样准确与否对分析结果影响很大。称量范围应在0.0200—0.0450克之间，此范围所分析的蛋白质含量与凯氏法分析的结果相近。因为这个称量范围有较好的线性关系和较高的准确度（见表5）。

表5 不同称量对测定结果的影响
Table 5 Effect of different weights on the determination

品种名称 Varity	样重 Weight	光密度 Light demsity	蛋白含量 % Protein content %	凯氏法分析 % Kjeldahl method %	误差 Error %
川82—5 D Chuan82—5 D	0.0057	0.090	34.42	48.01	28.31
	0.0118	0.174	46.38	48.01	3.40
	0.0252	0.332	47.93	48.01	0.17
	0.0274	0.352	47.59	48.01	0.87
	0.0335	0.425	47.66	48.01	0.74
	0.0412	0.510	47.37	48.01	1.33
	0.0540	0.620	44.66	48.01	6.98
	0.0662	0.730	43.37	48.01	9.66

三、结 语

本方法适用于大豆籽粒蛋白含量分析。所需仪器、药品便宜，操作简便，不污染环境。一人一天能分析40多个样品，如果称样能自动化，将分析更多的样品。分析一个样品成本费约一角钱。此法取样少（在20—45毫克），适用于对突变单株进行选择。我们用此法，从1984年到1985年先后在大豆辐射后代中，选育出蛋白含量高达49%的三个突变系，分别送往吉林、黑龙江、山东等农科院分析，结果与本法基本一致，误差在2%以内。实践证明，在品质育种中，选用此法快速筛选，再用凯氏法仲裁，能达事半功倍的效果。不过蛋白定量的分析，目前还没有一种方法令人十分满意〔3〕，本法也有许多缺点待改进。

参 考 文 献

- [1] 王金陵, 1983, 《中国油料》(4), 1—5。
[2] (英) 诺顿, 1983, 《植物蛋白》科学出版社, 24—27。
[3] (日) 菅原法、付岛正美著, 张旭译, 1979, 《蛋白质的定量分析法》农业出版社, 12—18。
[4] 华中农学院化学组, 1974, 《湖北农业科技》。

THE RAPID MICROANALYSIS OF SOYBEAN CRUDE PROTEIN

Zhang Jiazao Mo Shangwu Qiu Shuhua

(*Sichuan University*)

Abstract

A rapid microanalysis method of soybean protein based on the Pinckney's method is studied here according to the principle of Biuret method. Comparing with the classical Kjeldahl's method of determination of protein, the method proposed in this paper is more convenient to operate. Its accuracy and repetition are also good. So it is suitable for the selection of high protein soybean from large number of samples in the soybean breeding program as well as in the study of quality of cereal crops.