

大豆子粒蛋白质含量的快速测定*

(改良双缩尿法)

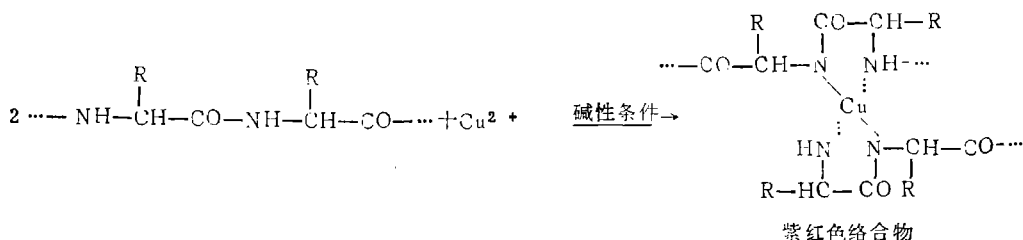
白宝璋 赵景阳 田文勋 魏春华

(吉林农业大学植物生理 生化教研室)

大豆子粒中的蛋白质含量常常是评价大豆品种、子粒的极为重要的指标之一。因此，需要经常分析其含量。在这项工作中，已有许多方法，其中凯氏(M.kjeldahl)定氮法是成功的，被公认为是最准确的方法。但是，该法操做程序较繁杂，需要时间较长，对水质的要求也较高，这就给许多在基层单位的科研工作者带来了困难。为此，我们在已有的双缩尿法^[1、2]的基础上加以改进，即将原法中的用天平称量碳酸铜的固体粉末改为用移液管滴加含铜离子(来源于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)的液体双缩尿试剂。同时，将微量克氏定氮法作为标准，进行比较。结果表明，采用改良双缩尿法测定大豆子粒中蛋白质的含量，不仅简便、快速，而且数据较准确，重现性好，完全适用于大豆子粒蛋白质含量的分析。

一、基本原理

在碱性溶液中，双缩尿($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$)能与二价铜离子(Cu^{2+})反应，生成紫红色的络合物，这就是双缩尿反应。除了双缩尿以外，凡是含有两个以上肽键的化合物，例如，蛋白质，其分子中含有很多肽键，因此具有强烈的双缩尿反应^[3]。这一反应的实质，就是铜离子与肽键中失去质子的氮原子相结合，生成紫红色的络合物。其反应式如下：



该反应所生成的紫色络合物，在一定范围内，其颜色深浅与蛋白质的含量成正比，而与蛋白质的分子量及氨基酸组成无关，并且络合物的颜色很稳定，因此可用比色法测定。

此外，氨基酸、二肽、酰胺等不与双缩尿试剂显色，但由于色素、类脂能够干扰比色，故加入氯仿消除之。

二、试剂配制

(一) 双缩尿试剂：蒸馏水920毫升+10N氢氧化钾溶液10毫升+25%酒石酸钾钠溶液

* 本文承蒙东北师范大学生物系苗以农副教授审阅，谨致谢忱。

20毫升，摇匀；然后在剧烈搅拌下加入4%硫酸铜溶液50毫升，密封保存。如有沉淀析出，则需重新配制。

(二) 0.05N氢氧化钾溶液。

(三) 蛋白质标准液：纯净酪蛋白（或牛血清蛋白）*烘至恒重，准确称取1.000克，加入0.05N氢氧化钾溶液，定容至100毫升（浓度为10毫克/毫升）

(四) 氯仿。

* 酪蛋白（或牛血清蛋白）应事先用克氏定氮法测定其纯度。

三、标准曲线制作

为了求得样品中的蛋白质含量，可用蛋白质标准液配制成不同浓度的系列溶液而制作出一条标准曲线。过程如下：

(一) 取6支干洁试管，按0、1、2、3、4、5编号。

(二) 按照表1依次加入各种试剂，摇匀，在20—25℃下放置30分钟，充分显色。

(三) 用72—1分光光度计进行比色测定。上述溶液分别倒入光径为1厘米的比色杯中，以0管为对照，在波长550纳米（nm）下读取光密度值。

表1 绘制标准曲线所用试剂

管号	0	1	2	3	4	5
蛋白质标准液(毫升)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
双缩脲试剂	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

(四) 以各管的蛋白质浓度（毫克/毫升）为横坐标，以光密度值为纵坐标，画一条曲线，即为标准曲线（图1）。

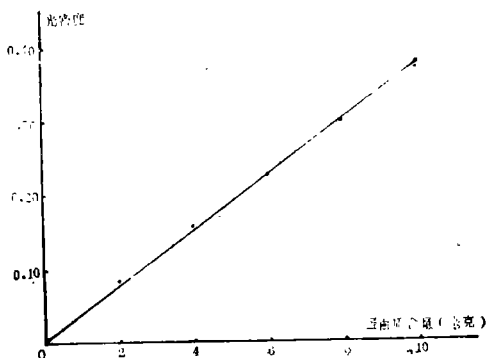


图1 标准曲线

四、样品测定步骤

(一) 样品予处理：将待测的样品用粉碎机磨成细粉，过100目铜筛，再放入80℃烘箱烘干（3—5小时）后，置于干燥器内备用。

(二) 样品显色测定：

1. 准确称取0.200—0.500克样品细粉三份，分别放入干洁150毫升三角瓶内。

2. 依次向各瓶内加入：氯仿1毫升，0.05N氢氧化钾溶液10毫升，双缩脲试剂40毫升，加塞。在振荡器上振荡10分钟，再于20—25℃下放置60分钟。

3. 分别从每个三角瓶内取出适量溶液于离心管内，在3,500转/分下离心10分钟。仍以标准曲线中的0管作为空白，按照制作标准曲线的方法进行比色，记录光密度值。

(三) 结果计算：根据样品的光密度值，在标准曲线上查出相应的蛋白质浓度，代入下式进行计算：

$$\text{样品蛋白质含量}(\%) = \frac{A}{\frac{1000}{W}} \cdot \frac{V_2}{V_1} \times 100\%$$

式中: $\frac{A}{1000}$ —A为从标准曲线上查得的样品蛋白质含量(毫克), 1000为毫克将换算成克的系数;

W—样品重(克); V₁—标准曲线显色液体积(5毫升);

V₂—样品显色液体积(50毫升); 100%—换算成百分含量的系数。

五、测定结果

我们应用此法测定了本校育种研究室提供的7242、7252、7509、7509—1、7613和71313等品种大豆子粒的蛋白质含量。结果列于表2。

表2 采用改良双缩脲法和凯氏定氮法测定大豆子粒蛋白质含量的比较

品 种	7242	7252	7509	7509—1	7613	71313
蛋白质含量 (%)						
项 目						
凯氏定氮法(对照)	39.79	38.48	39.62	43.61	36.58	40.38
改良双缩脲法	39.43	38.67	39.33	43.32	36.57	40.66
误差(%)	0.90	0.49	0.73	0.66	0.27	0.67

从表2可以看出, 采用改良双缩脲法测定大豆子粒蛋白质的含量十分接近于凯氏定氮法, 误差不超过1%。这一结果与Teruo Ishige的报导相一致〔4〕。

改良双缩脲法之所以能够有较高的准确性, 主要是对原来的双缩脲法〔1, 2〕的显色试剂做了相应的改进: (1)由原法的固体碳酸铜粉末改为液体的双缩脲试剂, 使显色反应进行得充分、彻底; (2)由原法的用天平称量改为用移液管滴加, 减少了称量之间造成的误差。此外, 原法制做标准曲线时, 不是采用蛋白质标准液法, 而是用天平逐一称量酪蛋白粉末, 易造成误差, 因而标准曲线的重现性很差。

测定样品时, 如果显色后颜色太深, 可稀释适当倍后再行比色。计算结果时, 再乘以所稀释的倍数。

此外, 改良双缩脲法还适用于小麦、水稻等谷类作物种子蛋白质含量的快速测定。

参 考 文 献

〔1〕 C. E. Craney 1972: Cereal Chem. 49, 496—498.

〔2〕 华东师范大学生物系植物生理教研组1980: 《植物生理学实验指导》, 第161—163页, 人民教育出版社。

〔3〕 沈仁权等: 1980, 《基础生物化学》, 第6页, 上海科学技术出版社。

〔4〕 Teruo Ishige: 1984, JARQ. 17(4), 230—235, (此文由白宝璋译, 田佩占校, 刊于《国外农学—大豆》, 1985年, 第3期, 第25—29页)。