水稻种子氨基酸含量的测定

Determination of Amino Acid Content in Rice Grains

彭波, 李一博*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: liyibo@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 彭波, 李一博. (2018). 水稻种子氨基酸含量的测定. *Bio-101* e1010165. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010165.

How to cite: Peng, B. and Li, Y. B. (2018). Determination of amino acid content in rice grains. *Bio-101* e1010165. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010165. (in Chinese)

实验原理: 氨基酸为两性分子, 在强酸性溶液中, 氨基酸以阳离子形式存在, 可用阳离子交换分离。在强碱性介质中, 氨基酸以阴离子形式存在, 可用阴离子交换分离。经过前处理的样品液标本从自动进样器进入保护柱进行预分离, 然后再进入分离柱分离, 并与泵吸入的茚三酮溶液在混合器混合, 送入反应柱反应后生成深蓝色的液体, 最后送检测器经光电比色计检测标本中各种氨基酸的含量。即利用阳离子交换分离, 茚三酮(Ninhydrin)柱后衍生反应, 从而对蛋白质水解液及各种游离氨基酸的组分含量进行测定。

实验目的: 检测水稻种子中蛋白质水解后的氨基酸含量, 或者游离氨基酸含量。也可以检测水稻叶片中蛋白水解的氨基酸或者游离的氨基酸含量。

关键词: 水稻, 种子, 氨基酸含量, 测定

材料与试剂

1. 塑料离心管
2. 80 目筛
3. 水稻种子
4. 定量滤纸 (11 cm * 11 cm, 杭州新华纸业有限公司)
5. 浓盐酸 (国药试剂, 分析纯)
6. 双蒸水

仪器设备

1. 电热恒温鼓风干燥箱 (黄石市恒丰医疗器械有限公司)
2. 电子天平 (OHAUS, USA)
3. 真空旋转仪 (Eppendorf concentrator 5301, USA)
4. 离心机 (Eppendorf, centrifuge 5417R, USA)
5. 全自动氨基酸测定仪 (L-8800 HITACHI, Japan)
6. 旋风式粉碎机 (Udy corporation, Colorado, USA)
7. 精米机 (JMJ-100 型, 铁岭精泰制米机械股份有限公司)
8. 真空干燥箱 (DZF-6050 型, 上海精宏实验设备有限公司)
9. 稻谷垄谷机
10. 定量移液器
11. 水解管及酒精喷灯
12. 容量瓶
13. 天玻白色 50 ml 容量瓶
14. 玻璃上样瓶 (Agilent, USA)

实验步骤

1. 水稻种子成熟收获后晒干或者烘干, 然后将种子进行脱粒处理。
2. 种子在室温保存 3 个月后利用稻谷垄谷机上脱壳得到糙米。如果测精米的氨基酸含量, 还需要将糙米在精米机上粉碎成精米。
3. 将糙米或者精米在旋风式粉碎机上粉碎成米粉。
2. 米粉过 80 目筛, 以保证取样均匀和水解效果。
3. 用电子天平称 50-100 mg 米粉, 并记录。
4. 用可调定量加液器向已装有样品的水解管中加入 6.8 ml 的 6 mol·L⁻¹ 的盐酸。
5. 利用真空干燥箱抽真空减压后用酒精喷灯灼烧封口。
6. 在 110 度电热恒温鼓风干燥箱中水解 22 小时。
7. 将水解管中液体摇匀, 并用滤纸过滤于 50 ml 容量瓶中, 用双蒸水定容至 50 ml。
8. 摇匀后取 1 ml 于塑料离心管中, 真空干燥箱或者真空旋转仪中浓缩 4-6 小时至近干燥状态。

9. 加入 1 ml 0.02 mol·L⁻¹ 的盐酸于离心管中震荡均匀。
10. 用 14,000 x g 离心 15 分钟，吸上清液 0.8 ml 于玻璃上样瓶中。
11. 同时将标准样和试验样品放入全自动氨基酸测定仪上机测定氨基酸含量。
12. 结果分析：根据标准样品与试验样品的峰面积按比例计算出各种氨基酸的浓度，再根据算出的氨基酸浓度值计算出水稻样品中的氨基酸浓度(图 1)。

图 1. 氨基酸测定结果示意图

注意事项

1. 米粉要过 80 目或者 100 目的筛子，以便取样均匀及水解完全。
2. 控制称取样品的量，不宜过多，一般可根据样品粗蛋白质含量，确定大体称样量。
3. 称量样品时注意用特定的小勺子取样，将样品送入水解管底部。
4. 称量操作时要戴手套。
5. 在加入 6 mol·L⁻¹ 的盐酸前要先加入 0.5 ml 左右的盐酸浸湿。
6. 过滤前要润洗水解管三次以上，待每次滤纸上的水已过滤至容量瓶后再加水过滤，保证水解管及滤纸上不残留氨基酸。