

水稻种子蛋白质含量的测定

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). 水稻种子蛋白质含量的测定. *Bio-101* e1010164. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010164.

实验原理: 红外光(Infrared)分为近红外(780-2500 nm)、中红外(2,500-50,000 nm)和远红外(50,000-106 nm)三部分。红外光的能量与分子振动能量相当可以反映出不同的官能团、化学键等信息。分子中的原子以化学键连接,每一化学键都有其特定的振动频率和振幅。当入射光与化学键振动频率不匹配时,没有能量吸收;当入射光能与化学键振动频率相匹配时,匹配偶极分子特征频率的光被吸收,表现为振幅的增加。近红外光谱研究有机分子中与氢相连化学键的振动吸收,近红外区是分子的合频和倍频吸收谱带,主要用于定量分析和已知物质的判别。近红外谱区谱有不同级别的倍频谱带外还包含许多不同形式组合的合频吸收,谱带复杂,信息丰富,难于用常规的方法解析图谱,需要具有先进化学计量学手段的专用近红外软件(WinISI软件)支持。将样品的近红外扫描光谱数据和准确的湿化学数据结合起来可以建立数学模型来预测未知样品已建立定标成分的值。

实验目的: 可以快速、准确测定水稻种子蛋白质含量,并且对分析的样品没有任何损害,可直接同时进行分析测定多种成分(如蛋白质、淀粉、水份,氨基酸等)。

关键词: 水稻, 种子, 蛋白质含量, 测定

材料与试剂

1. 水稻种子

仪器设备

1. 近红外快速分析仪 Foss XDS Rapid Content Analyzer (Foss NIR Systems, Inc. Laurel, MD)

2. 稻谷垄谷机 (JLGJ4.5, 台州市粮仪厂)
3. 静态圆杯

实验步骤

1. 用 WinISI 软件建立定标方程并完善
 - 1.1 在 WinISI 主菜单中建立新项目。
 - 1.2 使用.nir 格式的文件和 **View & Modify Files** 程序块进行查看及编辑样品编号, 添加及修改实验室标准数据, 对光谱文件进行排序生成其它新文件用于不同目的评估和测试等操作, 并且可以对定标方程进行调整。
 - 1.3 使用.CAL 格式的文件和 **Plot Spectra & Scores, Spectrum** 应用程序观察每一样品的吸收图谱, 并对光谱进行数学处理和去散射处理。进而考察不同“数学处理”技术对光谱的影响。
 - 1.4 使用.CAL 格式的文件和 **Make and Use Scores, Create Score File from Spectra File** 应用程序对光谱文件进行聚类分析, 确定那些样品与文件中其它样品的扫描光谱在光谱统计上有显著区别, 将光谱数据转化为主成分得分数据, 最后评估聚类分析结果。
 - 1.5 使用.CAL 格式的文件和 **Make and Use Scores, Select Sample from Spectra File** 程序, 采用主成分分析 **PCA** 选项, 挑选过程只利用光谱扫描数据进行选择。如果文件中还具有化学数据(即 **CAL** 文件), 可采用 **PL1** 或 **PL2** 进一步优化对某个或某些成分参与定标样品的挑选。从而确定代表性的样品, 去掉过剩样品。
 - 1.6 使用 **Regression** 程序和.CAL 格式的文件, 利用 WinISI 软件中的建立定标方程工具 (天然样品近红外定标最常使用的定标技术为 **Modified Partial Least Square** 改进最小二乘法回归) 建立定标方程文件。
 - 1.7 使用.EQA 格式的文件和 **View & Modify Files, Calibration Equation and Support Files** 应用程序观察和编辑文件/定标方程及其支持文件, 将评估不同的数学处理技术和散射校正方法对定标模型的影响, 选出最佳的定标模型。

- 1.8 使用.CAL 和.EQA 格式的文件及 Monitor Results 使用程序评估定标方程的预测性能,判断是否需要调整,进而获得定标方程调整所需的统计数据。
 - 1.9 利用.EQA 格式的文件和 View and Modify Files 程序观察和编辑文件,使用结果监控程序所计算的统计数据对定标方程进行截距的调整。
 - 1.10 使用 Regression (回归建模), Discriminate Equations (判别方程), Develop Equation (开发定标方程) 程序和 4 个.CAL 格式的文件来开发一个判别方程来鉴别样品的种类。
 - 1.11 使用.CAL 和.EQA 格式的文件及 Regression (回归建模), Global Equations (宽范围定标), Develop Expandable Equation (建立可扩展的定标方程) 应用程序对现有定标方程进行调整、升级。
2. 种子蛋白质含量的测定
 - 2.1 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。
 - 2.2 种子在室温保存 3 个月后利用稻谷出糙机上脱壳得到糙米。
 - 2.3 糙米倒满静态圆杯后放入近红外快速分析仪并固定。
 - 2.4 打开主机两分钟后,双击 ISIScan 软件-选择 Products-选择建立的定标方程文件-点击 Scan,给样品输入一个编号,等待两分钟即得到检测结果。
 - 2.5 检测下一个样品直接点击 Scan,给样品输入一个编号即可。
 - 2.6 最多一次只能检测 600 个样品,这时要将测得的结果数据导出。
 - 2.7 试验数据导出:双击 ISIScan 软件-选择 Products-选择建立的定标方程文件-点击 History-选中试验数据-右击鼠标-选择 Select Samples,然后打开窗口右侧的 Select Sample,点击 File-Export-选择 Export Data,保存为.PDF 或者.XLS 或者别的格式的文件。
 - 2.8 得到的试验结果的单位为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

注意事项

1. 参与定标方程的样品量要尽量大,具有代表性。
2. 参与定标方程的样品间差异要足够大,差异越大越好。
3. 定标时所使用的实验室测定的数据要准确。

4. 要对不同的数学处理和光学处理对结果的影响进行比较，得到最好的数学模型，建立最理想的定标方程。
5. 水稻种子成熟收割后，种子的前期处理要和建立定标方程时测定种子蛋白质含量时的处理方式一致。