

木瓜蛋白酶在谷物色氨酸测定上的应用*

吴显荣 梁鸿秋

(北京农业大学植物生化组)

提 要

目前测定谷物色氨酸的方法操作繁琐,费用昂贵,准确性也差,为了适应在普通实验室条件下进行大批样品的测定,我们采用木瓜蛋白酶水解玉米粉等谷物的蛋白质,然后用对二甲胺基苯甲醛(DAB)显色法进行比色测定,方法简单、快速,可达到上述测定目的。

引 言

色氨酸是人体和动物营养上的必需氨基酸,它与尼克酸代谢有密切的关系,又是植物生长素吲哚乙酸的前体,具有重要的生理功能,测定谷物中色氨酸的含量,是鉴定谷物及蛋白质品质的重要手段^[1]。

蛋白质中的色氨酸,特别是谷物籽粒蛋白质中的色氨酸,定量测定是比较困难的,在普通的酸水解中,色氨酸极易破坏,加入巯基乙酸或磷酸类保护剂进行水解,因样品有大量的碳水化合物,干扰了测定^[2],而用碱水解,又破坏了其他氨基酸,用碱水解法在氨基酸自动分析仪上单项分析色氨酸,成本昂贵,不易推广。

鉴于色氨酸含量测定的重要性和方法上的困难,探求一个快速、准确、简便的测定方法,多年来一直是人们的研究课题。

色氨酸的测定方法很多,其中有些方法需要比较高级的精密仪器,有的操作繁琐,准确性也差^[3,4],为适应在普通条件下和大量样品的测定,我们经过 4 年多的研究,采用木瓜蛋白酶水解玉米粉中的蛋白质,然后用对二甲胺基苯甲醛(DAB)显色法在分光光度计下进行比色。该法方法简单、快速,适于大批样品的分析。

我国广东海南、广西、福建、云南等省有丰

富的番木瓜资源,可以大量提取木瓜蛋白酶,采用木瓜蛋白酶水解法测定谷物的色氨酸,能够大大降低测试的费用。可广泛应用于生物技术、农业品种资源的鉴定及遗传育种工作中。

根据色氨酸的测定结果,再乘以系数 4.0,还可大致求出谷物样品的赖氨酸含量,一举两得,最适合一般实验室采用。

实 验 方 法

一、原理

木瓜蛋白酶又名番瓜酵素(Papain, EC 3.4.22.2),是一种具有广泛底物专一性的半胱氨酸类蛋白酶,有很强的分解蛋白质的能力,反应最适 pH 为 6.0—7.0,目前美国 SIGMA 公司及德国 E. MERCK 等公司都有纯酶试剂出售,我国也有进口分装的试剂出售,可供测试之用。

木瓜蛋白酶水解种子蛋白质,释放出游离的色氨酸,对二甲胺基苯甲醛(简称 p-DAB 或 DAB),在酸性条件下和有硝酸或亚硝酸存在时,能与上述水解液中色氨酸的吲哚基发生反应,生成兰色化合物,此反应不受其他氨基酸干扰,生成颜色的深浅与色氨酸含量在一定范围

* 本课题是农业部资助项目。

内呈正相关(色氨酸含量在 10—100 μg 范围内属线性关系^[5-8]。

二、试剂的配制

1. 木瓜蛋白酶溶液 (4mg/ml): 用 pH7.0, 0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液或磷酸盐缓冲液配制, 木瓜蛋白酶在 65℃ 加热, 使酶充分溶解后过滤再用。

2. 标准色氨酸溶液: 用上述缓冲液配成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准液。

3. DAB 液: 称取 0.85 克对二甲胺基苯甲醛, 溶于 25ml 的 9mol/L 硫酸中。

三、操作步骤

1. 标准曲线的制作

取 6 支 10—15ml 具塞试管, 分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准色氨酸 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml, 用缓冲液补足到 1ml, 即配成每毫升含色氨酸 0, 20, 40, 60, 80, 100 μg 的标准液, 再向各管加入 DAB 液 1ml, 加 9mol/L H_2SO_4 5ml, 摇匀后再加入 0.045% 亚硝酸钠 0.1ml, 摇匀, 半小时后在 590nm 波长下用 1cm 光径比色杯比色, 记下光密度(重复一次)。

以色氨酸含量为横坐标, 光密度为纵坐标绘制标准曲线, 作为定量的依据。

2. 样品的处理与测定

(1) 取样品粉碎, 经脱脂、烘干后备用。

(2) 取以上脱脂样品, 准确称取 100mg 左右(准确至小数点后 4 位), 放入具塞试管中, 加入 4mg/ml 木瓜蛋白酶溶液 5ml (重复二次), 在 65℃ 恒温水浴上水解 16—18 小时 (过夜), 同时做 2 个酶液空白(注意勿使样品粘于管壁, 中间摇动 2 次), 水解后过滤或离心, 吸取上清液待测。

(3) 测定, 取上述清液 1ml, 放具塞试管中, 加入 DAB 液 1ml, 9mol/L H_2SO_4 5ml, 0.045% 亚硝酸钠 0.1ml, 混匀, 半小时后, 在 590nm 下比色, 记下光密度(半小时后显色稳定)。

(4) 计算, 从标准曲线上查得测定样品每毫升所含色氨酸的微克数 (μg), 计算样品中色氨酸含量 (%)。

样品中色氨酸含量 (%)

$$= \frac{(\text{样}(\mu\text{g}) - \text{空}(\mu\text{g})) \times 5}{\text{样重}(\text{mg}) \times 10^1} \times 100$$

结果与讨论

一、谷物色氨酸与赖氨酸的相关性

我们用上述方法先后测定了两批共 54 个玉米品种样品, 测得玉米蛋白中色氨酸含量与同一样品经酸水解后通过日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定赖氨酸的结果比较, 二者相关系数均在 0.6 以上, 并证实玉米蛋白中赖氨酸与色氨酸有 4:1 的相关性, 例如在氨基酸自动分析仪上测知农大 105 玉米品种的蛋白质中赖氨酸含量为 4.20%, 采用本方法测出色氨酸含量为 1.05%, 则 $1.05 \times 4 = 4.20\%$, 与自动分析仪的结果一致, 又农大 107 品种, 用氨基酸分析仪测知赖氨酸含量为 4.72%, 用本法测知其色氨酸含量为 1.07, 则 $1.07 \times 4 = 4.28\%$, 也很接近氨基酸自动分析仪的数据, 由此可见, 在玉米的品质育种及营养分析中, 采用本法测出色氨酸的含量, 就可以大致求出赖氨酸的百分数。

二、脱脂与不脱脂样品对木瓜蛋白酶活性的影响

我们的实验证明, 脂肪对酶的影响很大, 从下表清楚看出, 不脱脂的样品, 测出的色氨酸含量都较低, 且极不规则。这是由于脂肪干扰了酶的作用, 使酶不能完全与蛋白质分子接触, 因此降低了酶的活性。

表 1 脱脂与不脱脂玉米粉的色氨酸含量 (%)

样品号	脱脂粉	未脱脂粉	相差 (%)
16	0.087	0.057	45
17	0.081	0.044	76
21	0.088	0.032	167
23	0.068	0.052	26
24	0.067	0.051	26

本实验主要采用丙酮脱脂, 我们曾反复用了三种不同的溶剂, 即丙酮, 己烷和乙醚脱脂, 从结果看对色氨酸的测定无明显的影响。

采用木瓜蛋白酶水解谷物样品, 要注意其

用于视觉神经电生理研究的实时计算机系统

徐嘉芳

孙炳荣

(中科院上海脑研究所)

(上海分院计算中心)

提 要

本文描述用 IBMPC/XT 微机和适量外围接口组成的视觉神经电生理研究的实时计算机系统。系统由视屏产生多变的刺激图形、获取视网膜神经节细胞和外膝体细胞的感受野范围,测量感受野中心区大小及外周区拮抗作用的强度等参数。系统实时采集数据、分析、处理,在实验室已取得成效。

引 言

视觉神经电生理学研究一直为生理学家所瞩目^[1]。六十年代初,人们利用多种光刺激仪器研究了视觉神经细胞对光刺激方式、移动方向、移动速度和空间频率等方面的敏感性,分析了单个细胞的感受野特性,并用来解释某些视觉心理现象。这些仪器由精密的光学系统、机械构件及复杂的电路控制设备等组成^[2]。但普通实验室很难装备这样的系统。近十年来,一些实验室开始使用了电子计算机产生和控制刺激图形,对视觉神经细胞的电反应进行了实时的时间和空间分析^[3]。这样的系统结构简单容易实现。本文所介绍的由微机、数字化接口及生物电反应记录仪器等组成的视觉神经电生理研究的实验系统,以下通称为系统。

最适温度、pH 和水解时间,由于酶本身是蛋白质,也含有一定的色氨酸,所以测定时一定要设空白对照。

参 考 文 献

- [1] E. Villegas et al.; *CIMMYT Res. Bull.*, 1971, No. 21.
- [2] 金谷晴夫等:《生化学の实验法》,丸善株式会社,1983,287—293.
- [3] 林范天等:《氨基酸杂志》,1983, No. 3, 9—13.

本系统目前可用于描绘视网膜神经节细胞和外膝体细胞的感受野,测量感受野中心区的大小及外周区拮抗作用的强度,并用模式翻转 (Pattern Reversal) 方法研究感受野内空间总和的特性。经过补充修改后可用于分析视皮层的感受野特性。

系统硬件配置

系统硬件主要由微机 IBMPC/XT、数据输入/输出子系统、电生理信号探测仪等组成。微机的主要作用是控制、调节整个系统的运行,引导用户正确使用本系统,提示用户在使用过程中产生错误的原因,以及纠正的方法。

数据输入/输出子系统由输入/输出接口模块 (I/O) 和输入/输出功能模块组成。输入/输出模块是插在 PC/XT 微机板扩展槽中的一

- [4] Hernan D. H. et al.; *CIMMYT Res. Bull.*, 1969, No. 13.
- [5] 张龙翔:《生化实验方法与技术》,人民教育出版社,1982,60—61.
- [6] 蔡武成等:《生物化学实验技术丛书》,科学出版社,1982,70—72.
- [7] 中国农科院综合分析室:《色氨酸分析方法》(译文集),中国农科院,1985.
- [8] 日本化学会编:《实验化学讲座巧》,丸善株式会社,1957,143—146.

[本文于 1987 年 11 月 9 日]