文章编号：1007－4627(2004)01－0056－04

谷物种子中蛋白质含量测定的核反应分析法*

罗小兵，张软玉，陈世国，李泰华，安 竹，曹养书，何福庆，彭秀峰
（四川大学原子核科学技术研究所，四川 成都 610064）

摘 要：分析了在高蛋白质谷物育种中对筛选方法的要求，对谷物中蛋白质测定的方法进行了综述评价，重点介绍了用于谷物蛋白质测定的核反应分析法的原理及特点.

关键词：蛋白质；育种；核反应
中图分类号：TL99；Q946.1 **文献标识码**：A

1 引言

蛋白质是极其复杂的含氮有机化合物，是体现生命现象的物质基础，一切生命活动均与蛋白质密切相关. 由于人(动物)只能从食物中所得到的蛋白质及其分解产物来建造自身的蛋白质，同时人体储备蛋白质的能力极其有限，因此保证蛋白质的日均摄入量对人体健康极其重要. 而小麦、水稻等粮食作物是人们(尤其是发展中国家人民）获取蛋白质的最重要来源，因此提高粮食作物中蛋白质含量、改善其蛋白质质量，对提高人民的整体营养水平具有重要意义.

长期以来，提高粮食作物中蛋白质含量一直是谷物育种的重要工作，而小麦、水稻不同品种间蛋白质含量的差异极大[1]. 在我国，小麦不同品种间蛋白质含量在 6%—18%间变化，常用品种其蛋白质含量大多在 12%—13%；对水稻，品种间的变化范围为 5%—17%，常用品种蛋白质含量大多为 8%. 因此采用选种培育的方法提高其蛋白质含量潜力巨大.

然而，高蛋白质含量的谷物育种是极其困难的工作. 在小麦和水稻等谷物中，蛋白质含量的高低属数量性状，受多基因控制，同时对施肥水平以及环境条件的变化反应敏感，因而大大降低了对这一性状进行选择的可靠性和效率. 同时对禾本科作物，由于蛋白质含量和谷物产量之间大多呈现一种负相关关系，因此要培育出有生产价值的高蛋白品系，需要考查更多杂交组合和人工变异体；如果再考虑对其子代中蛋白质积累规律性的监测，则需要对其蛋白质含量进行分析的样品数量成千上万，而给予该项分析工作的时间是有限的. 特别是冬季作物，很重要的是在从收割到播种不多时间内作出评价. 而且在育种的第一阶段，样品的种子量是极有限的，对个别的种子，育种学家可以分离出来用于分析的种子只有几粒. 因此在高蛋白小麦等谷物育种工作中，首先是要建立快速、准确和能对少量样品中蛋白质含量进行测定的分析手段，尤其重要的是建立对有生产价值的基因型高蛋白质含量子体的有效筛选方法.

2 谷物蛋白质含量测定方法

测定蛋白质含量的方法很多，一般可分为间接方法和直接方法[2]. 间接方法是根据谷物蛋白质中的含氮量是恒定的，通过测定样品的含氮量来推算其蛋白质含量的方法. 常用的有：凯氏法、杜马斯法、强碱直接蒸馏法、纳氏(Nessler)法和试剂比色法等. 直接方法是根据蛋白质的物理及化学性质直接测定蛋白质含量的方法，其中有紫外吸收法、双缩脲法、酚试剂法和染料结合法(DBC)法等.

对小麦等谷物种子中蛋白质含量加以测定的标准方法是凯氏法，其原理是将含氮有机物在还原性催化剂帮助下，与浓硫酸共热，使蛋白质的氮和其它有机态氮消化转变成硫酸氨，然后与强碱作用，蒸馏得到氨，将其收集到含盐酸或硼酸的容器中，

收稿日期：2003－07－25；修改日期：2004－01－04
* 基金项目：国家自然科学基金资助项目(10175043)
作者简介：罗小兵(1965－)，男(汉族)，四川叙永人，副研究员，从事核物理及核技术应用研究.

最后用盐酸滴定，通过计算，便可得到氮的含量. 由于一般种子中所含的氮，绝大部分来自于其中蛋白质，因此由测得的氮含量依照一定的比例关系，便可得到种子中蛋白质的含量，用这种方法测定的为粗蛋白质，即总氮量都换算为蛋白质的量，由于小麦籽粒中含有的非蛋白氮量少，因此对测得结果影响不大.

大量使用的还有比色测定法(DBC 法)，其原理是基于样品中蛋白质与不同试剂反应呈现的颜色或溶液的光密度差异，从而推算出其中蛋白质含量.

红外光谱法，其原理是利用粮食蛋白质吸收红外光谱区中一定频率的电磁辐射，通过测量反射的光通量，便可确定其中蛋白质含量.

这些方法通常需要较长的样品准备时间或处理时间，生产率较低，而且大多是破坏性的，尤其难于判断测得的蛋白质含量的变化是否属于基因型，难于建立高效的筛选手段. 因此在发展对谷物种子中蛋白质含量加以测定的各种化学和物理方法的同时，基于对氮元素成分进行分析，从而确定其蛋白质含量的核分析方法也得到迅速发展[3, 4]，如中子活化法、光子活化法、质子、α 粒子和氘引起的核反应分析法，以及 PIXE，NMR 和 NQR 等分析技术. 采用核分析技术具有以下特点：(1)反应灵敏，准确度高；(2)允许最高的样品分析率；(3)样品准备时间短，有的无需秤重；(4)不会带来化学污染. 在世界粮农组织(FAO)和国际原子能机构(IAEA)组织的对所有这些核分析方法进行评估的报告中[5]，$^{14}N(d, p)^{15}N$ 核反应分析法被视为提高谷物蛋白质含量的最有希望的筛选手段.

3　核反应分析法原理及特点

在谷物种子中主要是 C，H，O 和 N 4 种元素，由于$^{14}N(d, p)^{15}N$ 核反应相对于氘与其它元素的核反应有更高的 Q 值(见表 1)，因此从测得的出射质子能谱中通过能量甄别，很容易选出来自^{14}N 的信息[6]. 由图 1 可以看到，$^{14}N(d, p)^{15}N$ 反应的出射质子能量远大于$^{12}C(d, p)^{13}C$ 反应的质子能量，在很宽的能区范围内不受碳元素的干扰，可以实现在相应范围内(对小麦约 500 μm)对氮元素的深度分析.

表 1　(d, p)核反应 Q 值

元素	^{12}C	^{13}C	^{14}N	^{15}N	^{16}O
Q 值/MeV	2.72	5.59	8.61	0.26	1.92

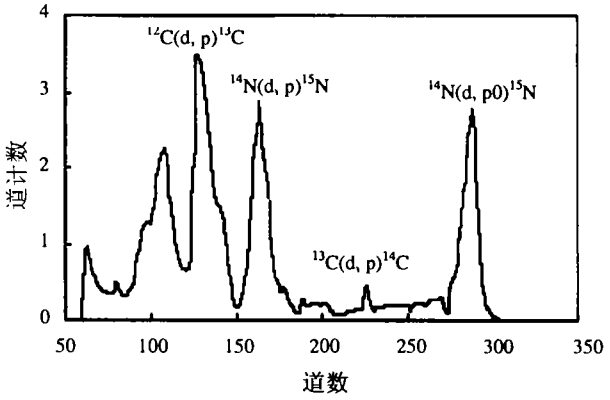

图 1　能量为 13.4 MeV 的氘(d)束照射薄蜜胺膜($C_3H_6N_6$)，用 Au-Si 面垒探测器在反角(155°)测得的出射质子谱，图中道计数为相对单位

因此利用加速器产生的几个 MeV 到十几个 MeV 的氘束(d)照射谷物种子，根据氘与种子中氮元素发生的$^{14}N(d, p)^{15}N$ 反应，通过测量反应产生的出射质子，便可求得种子中氮元素含量；同时在种子内不同深度发生的核反应，其带电粒子穿透该深度的能量损失不同，因而从测得的出射质子能谱，可以计算出^{14}N 的深度分布，从而得到其蛋白质含量的深度分布，而采用其它方法是难于获得这一信息的. 又由于谷物种子中 C 元素的含量可以直接用来标度种子中有机物的量，因此从测得的出射质子能谱中甄别出来自于$^{12}C(d, p)^{13}C$ 反应的质子数，便可以确定种子中氮、碳元素比($^{14}N/^{12}C$)，从而确定出种子中蛋白质含量的相对高低. 采用这一方法可以对单一颗粒种子进行分析，且无须对分析样品秤重，易于实现对大量种子样品中蛋白质含量的快速分析，同时测得的蛋白质在种子内深度分布信息，对早期选种中排除由非遗传因素造成的高蛋白含量的小麦种子具有重要意义[7]. 在前苏联高蛋白小麦育种工作中，其育种学家通过实验研究了氮营养水平及气候环境条件的不同与小麦中氮深度分布的相关性. 他们认为小麦中表层氮含量随外界条件显著变化，而内层氮含量则相对稳定，其变化不大. 因此认为内层蛋白质含量主要由种子的遗传特性决定，即由基因控制. 如果根据特定深度的蛋白

质含量进行筛选，便可以得到基因型高蛋白质含量的小麦品系. 前苏联核物理专家涅麦茨院士和植物生态学家格劳金斯基院士领导的科研组，就基于这一选种思想，有效地选育出高蛋白生产型小麦品种 HaDDHenp ЯHCK aЯ80，其单位面积蛋白质收获量较标准值提高了 12%—18%.

同时蛋白质深度分布信息的获得，对水稻尚具有下述意义：由于大多数的稻子在食用前要碾磨去壳，因此，寻求其内层具有更高蛋白质比例，从而提高其食用价值的想法是合理的，但是否有实际意义，则必须对大量品种蛋白质深度分布加以系统测量，以确定不同品种间其内、外层蛋白质比例是否差异显著，是否有可能由此选育出食用价值更高的优良品种.

在国际上，采用这一方法开展研究工作最多的有瑞典 Uppsala 大学串列加速器实验室和古斯道夫-佛尔纳学院自然生物系[8]，以及前苏联乌克兰基辅核研究所等. 在国内，四川大学原子核科学技术研究所利用其 1.2 m 回旋加速器产生的 13.4 MeV 氘束，开展了用$^{14}N(d, p)^{15}N$ 核反应方法分析小麦种子中蛋白质含量的研究工作，建立了样品分析靶室和探测系统(如图 2 所示)，用 Au-Si 面垒半导体探测器对小麦、水稻种子中蛋白质含量的深度分布进行了分析[6]. 利用$^{14}N(d, p)^{15}N$ 和$^{12}C(d, p)^{13}C$ 反应微分截面的特点：13.4 MeV 氘束引起的$^{14}N(d, p)^{15}N$ 核反应微分截面随角度的增加而增大，而$^{12}C(d, p)^{13}C$ 反应微分截面在 120°有最大值，因此选择在 165°(实验室几何条件允许的最大角度)和 120°放置两路耐辐射的 CsI 晶体探测器，对小麦、水稻多个样品中的氮、碳元素比($^{14}N/^{12}C$)进行了测定，并用凯氏法对氮、碳元素比($^{14}N/^{12}C$)表征的蛋白质含量高低的正确性加以检验[9]. 现在该工作仍在继续进行，重点是研究蛋白质在种子内深度分布信息与氮营养水平、气候环境条件，尤其是与品种的相关性.

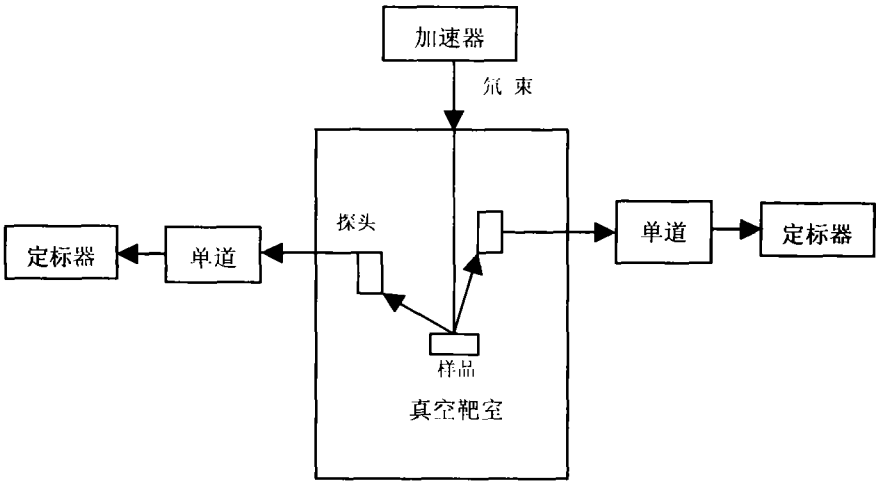

图 2 实验装置

4 结束语

在高蛋白质谷物育种工作中通常包括两个基本的环节：一是利用各种手段创造所需要的遗传变异；另一是在所产生的子体中选择所需要的基因型并通过试验产生优良的品种和品系. 近年来，随着基因工程的迅猛发展，在实验室内可以使同物种间，甚至是不同物种间的基因发生重组，短期内即可获得大量的重组后代，因而这一环节的研究工作有了飞速发展. 而在有生产价值的基因型高蛋白质含量子体的筛选这一环节中，虽然建立了很多测定有机物中蛋白质含量的方法，但由于决定谷物中蛋白质含量因素的多样性和复杂性，使得对基因型的辩别至今仍是一尚未很好解决的、同时也很困难的工作. 而利用核反应分析技术的特点，可以建立一种满足选种需要的筛选手段.

参 考 文 献：

[1] 李德炎. 小麦育种学[M]. 北京：科学出版社，1976.

[2] 刘铭三. 谷物及油料品质分析法[M]. 北京：农业出版社，1987，88－93.

[3] Kaul A K. Mutation Breeding and Crop Protein Improvement [A]. Nuclear Techniques for Seed Protein Improvement (Proc Meeting Neuherberg, 1972)[C]. IAEA, Viena, 1973, 1－106.

[4] International Atomic Energy Agency. Recommendations[A]. Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques (Proc Meeting Ibadan, 1973)[C]. IAEA, Viena , 1975, 18－86.

[5] Niemann E G. Nuclear Techniques for the Determination of Protein Content in Plant Material[J]. Atomic Energy Review, 1980, **18**(1): 125.

[6] Zhang Kun, Cao Jianhua. Determining Nitrogen Depth Distributions in Seeds of Grain by Nuclear Reaction Method[J]. Nuclear Science and Techniques, 1996, **7**(1): 58.

[7] 阿·士·麦列涅夫斯基. 筛选高蛋白生产型谷物的核物理原理和元素分析方法的研究[D]. 乌克兰：基辅核研究所，1989.

[8] Gonczi L, Didriksson R, Sundqvist B. The $^{14}N(d, p)^{15}N$ Reaction for Measurements of Nitrogen Depth Distributions in Single Seeds of Wheat[J]. Nucl Instr and Meth, 1982, **203**(2): 577.

[9] 罗小兵，曹建华，安　竹. 核反应技术在高蛋白小麦选种中的应用[J]. 核技术，2002，**25**(1)：33.

Nuclear Reaction Method for Measurement of Protein Content in Seed of Grain*

LUO Xiao-bing, ZHANG Ruan-yu, CHEN Shi-guo, LI Tai-hua, AN Zhu, CAO Yang-shu, HE Fu-qing, PENG Xiu-feng

(Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, *China)*

Abstract: The requirements of the screening method for high protein content in grain breeding are analysed. Methods for the determination of protein content in grain seed are reviewed. The principle and the advantages of the nuclear reaction method for the measurement of protein content in grain seed are discussed in detail.

Key words: protein; grain breeding; nuclear reaction

* **Foundation item**: National Natural Science Foundation of China (10175043)