

まえがき

生化学は生命体や生命現象を化学的手法で解明する学問領域であると言われるように、今日の生化学の広範な知見は、実験をとおして得られた膨大なデータを基にして構築されてきたものである。生化学の領域を対象とした学術雑誌は世界中に数多くあり、それらに掲載される様々な実験の結果を基にして書き上げられた論文も多大な数にのぼり、日々新たな知見が積み重ねられている。

生命体はタンパク質、糖、脂質、核酸といった様々な有機化学物質から構成されているが、それらは単に組織や器官といった構造を作り上げるための構成要素として機能しているばかりでなく、お互いに関連し合って生体物質の合成・分解、エネルギーの産生・消費などの反応が進行することによって生体内における一定の秩序が保たれている。生化学実験の多くは、いわゆる *in vitro* の実験であり、生体内で起こる諸反応を試験管内で再現するという手法が多く用いられる。そのためには、生物を構成する多種多様な生体高分子を単離することから始まり、それらの構造や性質を調べ、さらに生体内での様々な反応について調べることになる。

本書では、生化学を学ぶ学生がマスターしておかなければならない生化学の基本的な実験を骨格として、さらに応用的な実験として、血液成分や尿成分の分析など臨床分野で使われる実験も取り上げている。血液や尿成分の分析データは、人の健康状態を判断する上でのバロメーターであり、体内での生化学反応が円滑に行われているかどうかを判定する指標となるものである。これらの測定では、従来は分析化学的手法が使われることが多かったが、最近では酵素を用いた生化学反応を利用した手法が広く普及するようになってきている。このような実験項目は、栄養士や管理栄養士養成課程はもとより、医療関係あるいは食品科学関連の学部・学科で学ぶ学生にとっても有用となるであろう。

実験は単に教科書に書かれた操作手順に沿って進めて結果を得るということでは終わるわけではなく、実験の目的と原理を十分に理解した上で、各段階での操作が何を目的として行われるのか、その意味を考えながら進めなくてはならない。さらに、実験で得られたデータからどのようなことが分かるのかを考察することによって考える力を養うことが肝要である。

千里の道も一歩からといわれるように、まずは本書をとおして生化学の実験の一歩を踏み出して、実験の基礎を確実に修得し、その後の卒業研究やさらに高度な研究を進展させるための礎を築いていただきたい。

本書の出版にあたっては、企画立案から編集作業を経て発行に至るまで、三共出版の石山慎二氏ならびに飯野久子氏に多大なご尽力を頂いた。ここに著者一同心からお礼申し上げる。

2008年2月

編著者

目次

1 実験にあたっての予備知識	1
1-1 実験の心得	1
1-2 器具の名称と取り扱い	2
1-2-1 ガラス器具	2
1-2-2 ピペット	5
1-2-3 天秤	5
1-2-4 遠心分離	7
1-2-5 ホモジナイザー	8
1-2-6 ガスバーナー	9
1-3 実験データの処理	9
1-4 実験の記録とレポートの作成	11
コラム 「調製」と「調整」の使い分け	13
2 基礎実験	14
2-1 溶液の濃度ならびに調製法	14
2-1-1 水の精製	14
2-1-2 生化学実験で使われる単位	14
2-1-3 SI接頭語	14
2-1-4 溶液の濃度	15
2-1-5 溶液の希釈法	16
2-1-6 緩衝液(Buffer)	16
2-2 滴定曲線—pHについての基礎知識—	19
2-3 分光光度法	23
2-3-1 分光光度法の原理	23
2-3-2 分光光度計の仕組み	24
2-3-3 セル	24
2-3-4 二種類の色度の吸収曲線	24

3 糖質に関する実験	26		
3-1 糖質の定性反応	26		
3-1-1 Benedict(ベネディクト)反応.....	26		
3-1-2 Bial(ビアル)反応.....	26		
3-1-3 Skatole(スカトール)反応	27		
3-1-4 Seliwanoff(セリワノフ)反応	27		
3-2 ラット肝臓からのグリコーゲンの分離と定量	28		
3-2-1 グリコーゲンの分離	28		
3-2-2 グリコーゲンの定量	29		
3-3 血糖(グルコース)の定量	30		
4 アミノ酸・タンパク質に関する実験	32		
4-1 ニンヒドリン反応によるアミノ酸の定量	32		
4-2 アミノ酸およびタンパク質の紫外線吸収スペクトル	34		
コラム 「M」の読み方	35		
4-3 ゲルろ過クロマトグラフィー	36		
4-3-1 塩とタンパク質の分離	36		
コラム モル, mol (または mole)	37		
4-3-2 アルブミンとDNP-リジンの分離.....	38		
4-3-3 アルブミンのペプシン処理分解物のゲルろ過	39		
4-4 タンパク質溶液の比色定量法	40		
4-4-1 ビウレット法によるタンパク質の定量	40		
コラム %記号	41		
4-4-2 Lowry法によるタンパク質の定量	42		
4-5 透析によるタンパク質溶液からの脱塩	44		
4-6 粘度測定によるタンパク質の構造変化の検出	46		
4-7 硫酸によるタンパク質の塩析	48		
4-8 血清タンパク質のセルロースアセテート膜電気泳動	50		
4-9 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動	52		
コラム 分子量と分子質量	54		
5 酵素に関する実験	55		
5-1 酵素反応の基礎実験	55		
5-1-1 検量線の作製	55		
5-1-2 反応の経時変化	56		
5-1-3 酵素濃度の影響	56		
5-2 酵素反応速度論(Enzyme kinetics)	58		
5-2-1 アルカリホスファターゼ活性測定による K_m と V_{max} の決定.....	59		
5-3 乳酸デヒドロゲナーゼの活性測定	60		
5-4 唾液アミラーゼによるデンプンの加水分解	62		
5-5 トリプシンによるカゼインの加水分解	64		
6 脂質に関する実験	66		
6-1 ラット肝臓からの脂質の抽出と定量	66		
6-1-1 脂質の抽出	66		
6-1-2 中性脂肪の定量	67		
6-2 遊離脂肪酸の定量	69		
6-3 コレステロールの定量	72		
6-4 リパーゼによる脂質の加水分解	74		
7 核酸に関する実験	76		
7-1 ラット肝臓からの核酸の抽出精製および定量	76		
7-2 口腔粘膜からのDNA抽出とアガロースゲル電気泳動.....	80		
コラム pH	83		
8 ビタミンに関する実験	84		
8-1 ビタミンA前駆物質(葉緑素)の分離と定性	84		
8-2 ビタミンB ₁ の比色定量.....	86		
9 免疫に関する実験	88		
9-1 オクタロニー法による抗原抗体反応の検出	88		
9-2 血液型の判定	90		
10 血液・尿に関する実験	92		
10-1 血清アルブミン・グロブリン比の測定.....	92		
10-2 ヘマトクリット値の測定.....	94		
10-3 血中リン脂質の定量.....	95		
10-4 血清酵素(アミノ基転移酵素)の活性測定.....	97		
10-5 血漿遊離アミノ酸比の判定試験.....	99		
10-6 無機リンの定量.....	101		
10-7 血清および尿中のクレアチニンの定量.....	103		

目 次

10-8 尿成分の定性反応	106
コラム 大きな数字でのコンマ (,) の打ち方	105
10-9 血清および尿中の尿素窒素・尿酸の定量	108
10-9-1 尿素窒素の測定	108
10-9-2 尿 酸	109
11 栄養・食品に関する実験	112
11-1 基礎栄養学実験	112
11-2 牛乳中のカルシウムの定量	115
11-3 滴定法による食品中の酸・塩分の測定	117
付 録：電子顕微鏡	119
参考図書	122
索 引	123

2 基礎実験

2-1 溶液の濃度ならびに調製法

2-1-1 水の精製

溶液を作るには溶質を溶媒に溶かすことになるが、溶媒として一般に使われるのは、水である。水道水や地下水には種々の無機塩類のような不純物が含まれているので、そのまま実験に用いることはできない。水を精製するには、蒸留法、イオン交換法、逆浸透法などがあり、これらの方法で精製された水は、蒸留水、脱イオン水、精製水、あるいは純水などと呼ばれる。また、これらの方法を組み合わせて水を精製することも良く行われている。精製した水を空気にさらした状態で放置すると、空気中の二酸化炭素を吸収して弱酸性を示すようになる。二酸化炭素を含まない水にするためには、使用前に煮沸することによって二酸化炭素を追い出す。本書で、単に「水」と記してある場合でも、特に断らないかぎり、いずれかの方法で精製された水を意味する。

2-1-2 生化学実験で使われる単位

SI (国際単位系) 基本単位としては、長さのメートル(m)、質量のキログラム(kg)、時間の秒(s)、物質量のモル(mol)、温度のケルビン(K)、電流のアンペア(A)、光度のカンデラ(cd)の7つがあり、他のすべての単位はこれに基づいて導かれる。

生化学の実験では、体積、質量、長さ、時間、物質量などの単位が使われることが多く、体積はリットル(lまたはL)、質量はグラム(g)が一般に使われる。体積はSI基本単位にはないが、1リットル(L) = 1 dm³ = 10⁻³m³である。

2-1-3 SI 接頭語

上記のSI単位をそのまま使うと、時には数字が大きすぎたり、逆に小さすぎることがある。このような場合、ゼロの連続を避け、桁数の少ない数値として表現するために、適当な接頭語を付けることが行われる。主なSI接頭語を下表に示す

大きな単位			小さな単位		
倍率	接頭語	記号	倍率	接頭語	記号
10 ³	キロ	k	10 ⁻³	ミリ	m
10 ⁶	メガ	M	10 ⁻⁶	マイクロ	μ
10 ⁹	ギガ	G	10 ⁻⁹	ナノ	n
10 ¹²	テラ	T	10 ⁻¹²	ピコ	p

この表から分かるように、SI接頭語は、10³あるいは10⁻³ごとに変わる。例えば、0.0003 L = 0.3 × 10⁻³ L = 0.3 mL、あるいは0.0003 L = 300 × 10⁻⁶ L = 300 μLである。

なお、体積の場合はデシ(d)=10⁻¹、長さの場合にはセンチ(c)=10⁻²という接頭語も使われる。

2-1-4 溶液の濃度

液体状態にある均一な混合物を溶液(solution)という。溶液は、ある液体に他の液体や固体あるいは気体を溶解してつくられる。物質を溶解させるもとなる液体を溶媒(solvent)、溶解している物質を溶質(solute)という。溶媒に固体が溶けずに微粒子として分散している場合は懸濁液(suspension)という。

溶液の濃度を表すには、以下のような表記法がある。

%濃度 (百分率濃度)

- 1) 重量百分率 (weight percentage, w/w%)
溶液 100 g 中の溶質の g 数で表わした濃度をいう。
- 2) 重量容量百分率 (weight-volume percentage, w/v%)
溶液 100 mL 中に含まれる溶質の g 数で表わした濃度をいう。これは、g/dL と同じである。
- 3) 容量百分率 (volume percentage, v/v%)
溶液 100 mL 中の溶質(液体)の mL 数で表わした濃度をいう。
例：2% (w/w) NaCl；2 g の NaCl と 98 g の水を混合する。
2% (w/v) NaCl；2 g の NaCl に水を加えて溶解させて容量を 100 mL とする。
2% (v/v) 酢酸；2 mL の酢酸に水を加えて容量を 100 mL とする。

モル濃度 (mol/L, M)

溶液 1 L 中に含まれる溶質の量をモル*数で表わした濃度をモル濃度といい、mol/L あるいは、一般的には M(molar という)で表記する。

*モル(mol, mole)：¹²C の 12 g 中に含まれる原子の数(アボガドロ数 = 6.02 × 10²³)に等しい個数の化学的単位を含んでいる物質量を 1 モルという。
ある物質の分子量に g をつけた質量を計り取ると 1 モルということになる。
例：1 モルの KCl(分子量 74.56)は 74.56 g
1 モルのアルブミン(分子量 68,000)は 68 kg

あるモル濃度の溶液を調製する場合、例として、0.5 M NaCl 溶液を調製するには、0.5 mol の NaCl(MW：58.44)、すなわち 29.22 g の NaCl を水に溶かして、最終容量を 1 L とする。

注 1 L の水に溶かすのではない。もし、1 L の水に NaCl を溶解させたならば、その溶液の最終容量は 1 L を越えてしまう。

2 つ以上の溶質を含む溶液の場合も、個々の試薬の [分子量 × 濃度(M)]g を秤量し、合

6 脂質に関する実験

6-1 ラット肝臓からの脂質の抽出と定量

脂質は生体成分の中で、水に不溶で有機溶媒に可溶性物質である。脂質は組織中でタンパク質や糖類と van der Waals 力、疎水性相互作用、イオン結合、水素結合などで結合している。このため、組織から脂質を抽出するためには、これらの結合を切断するような処理を行う必要がある。疎水的な結合はクロロホルムやベンゼンあるいはジエチルエーテルのような極性の低い溶媒によってこわすことができる。一方、水素結合やイオン結合を切るためにはエタノールやメタノールのような極性溶媒が使われる。個々の脂質は組織内での存在様式や他成分との結合状態が様々であり、そのため種々の抽出方法が考案されている。本実験では、組織から総脂質画分を得るのに適している Folch 法によって肝臓から脂質を抽出し、さらに得られた脂質を使って中性脂肪の定量を試みる。

6-1-1 脂質の抽出

試料・試薬

試料：ラットまたはブタ肝臓

クロロホルム・メタノール混液 (2:1, v/v)

器具・装置

共栓付遠沈管、試験管、駒込ピペット、パスツールピペット、分液ろ紙(アドバンテック; No. 2S など)、ホモジナイザー(なければ乳鉢と乳棒)、遠心分離機

操作

1. 細切した肝臓約 1 g を量り取り、ホモジナイザーに入れ、10 mL のクロロホルム・メタノールを加えてホモジナイズする(乳鉢を使っても良い)。
2. 遠心分離(3,000 rpm, 5分)後、残渣を 5 mL のクロロホルム・メタノールでさらに 2 回抽出し、これらの抽出液を合わせる(容量を測定すること)。遠心分離機が利用できない場合は、分液ろ紙を使ってろ過しても良い。
3. 抽出液 10 mL を共栓付き遠沈管(50 mL)に取って、40 mL の水を加えて攪拌し、静置するかあるいは遠心分離(3,000 rpm, 5分)によって 2 層に分離させる。
4. 下層を回収し、ドラフト内で 80℃ に加温して溶媒を除去し、乾固させる。
5. 乾固した脂質に 2.0 mL のクロロホルム・メタノール混液を加えて溶かす。

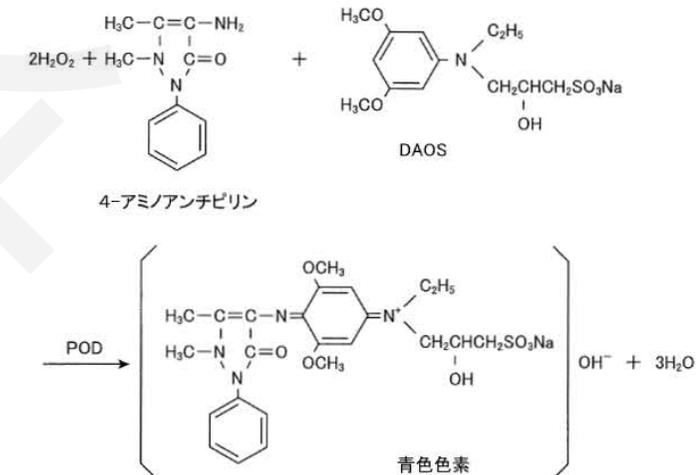
結果

肝臓の単位重量あたりどれだけの脂質が回収されたかを求めよ。

6-1-2 中性脂肪の定量

原理

脂質中の中性脂肪(トリグリセリド)にリポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼを作用させた際に生じる過酸化水素は、ペルオキシダーゼの作用により DAOS (3, 5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2-ヒドロキシル-3-スルホプロピル)-アニリンナトリウム)と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させて青色に色素を生成させる。



試料・試薬

試料：肝臓より抽出した脂質溶液

市販のトリグリセリド測定用キット(トリグリセリド E-テストワコー；和光純薬)

器具・装置

恒温水槽、分光光度計、試験管

操作

1. 試験管を 5 本用意し、各々にトリグリセリド標準液(300 mg/dL)を 0, 5, 10, 15, 20 μL 入れ、さらに溶解液を加えて各試験管の全量を 20 μL とする。これらは検量線作成用試料となる。別の試験管 1 本に 6-1-1 で得た試料を 20 μL 入れる。
2. 各試験管に発色試液を 3.0 mL 加え、よく混和して 37℃ で 5 分間加温する。
3. 各試料の 600 nm での吸光度を測定し、検量線用試料の吸光度から検量線(一次回帰式)を求める。