

第2版

生化学実習

堀内 登 前奥羽大学歯学部教授

加藤節子 明海大学名誉教授

根本孝幸 長崎大学名誉教授

山越康雄 鶴見大学歯学部教授

坂東健二郎 明海大学歯学部教授

[編]



Laboratory Course of Biochemistry

医歯薬出版株式会社

実習についての 一般的注意事項と機器の使用法

【実施】

学習にあたっては、あらかじめ、プリントおよび実習書の注意、参考事項（原理、特異性）などをよく読んで、要領よく行うこと（予習）。実習書に記載のもので机上にない検体については省略する。

【試薬の分取】

試薬には、各自の実験台に置くものと、共同のものがある。共同のものは必要量を各自で分取する。決して余分に分取しないこと。

【取扱注意】

- ・濃硫酸および濃硫酸性試薬は必ず安全ピペッターまたは駒込ピペットでとること。皮膚、衣服、床などに決してつけないこと。
- ・氷酢酸（100%酢酸）、アンモニア、クロロホルムなどもできるだけ口では吸わないこと。安全ピペッターまたは駒込ピペットを使用すること。

【器具の洗浄】

- ・実習終了後、試験管などにマジックインクなどで書いた字は必ず消し、洗剤をつけてブラッシングし、水道水でよく水洗いする。実習内容の項で指示するとき以外は、蒸留水ですすぐ必要はない。
- ・ピペット類は、先端と吸口部はとくによく洗い、中を水道水でよく流し、水をよくきって、あったところに戻しておく。

【器具の破損】

器具を破損したときは、教員に報告する。必要な場合は破損届けを出す。

【実習レポート】

実習用の用紙を使用し、実習した分についてのみ記入し、各実習終了時に教員の検印を受ける。

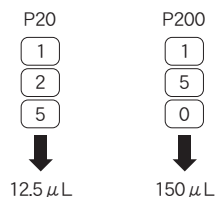
マイクロピペットの使い方

マイクロピペットは μL 単位の量を正確に測ることができるが、操作を誤ると容易に破損する。メーカーにより多少、配置が異なるが、下の図のような構造をしている。



- ①目盛り調節ダイヤル
- ②容量目盛り
- ③チップホルダー
- ④プッシュボタン

②容量目盛りの表示



- (1) ①の目盛り調節ダイヤルを回し、②の容量目盛りを目的の容量に合わせる。たとえば、P20型（上限 20 μL ）の場合、容量目盛りを **1****2****5** に合わせると 12.5 μL 、P200型（上限 200 μL ）の場合、容量目盛りを **1****5****0** に合わせると 150 μL を測りとることができる。
- (2) ③のチップホルダーにピペットチップを装着する。
- (3) ④のプッシュボタンを第一ストップまで押したのち、ピペットチップの先端を液体中に入れ、プッシュボタンを静かに戻すと、容量目盛りに表示された容量を測りとることができる。
- (4) 再び、④のプッシュボタンを第一ストップまで押すと、ピペットチップ中に測りとられた液体が放出される。このとき、ピペットチップの先端に微量の液体が残存するので、プッシュボタンを第二ストップまで押すと、残存した液体も放出される。

第1章

糖の定性反応

INTRODUCTION

糖質は炭水化物ともよばれ、生命活動における主要エネルギー源であるとともに身体の構成成分として機能している。糖質のうち単糖類、少糖（オリゴ糖）類は天然に遊離状態で存在するものは比較的少なく、主として多糖類および配糖体の構成成分として存在する。単糖類、二糖類の多くはアルカリ性で、銅のような金属塩を還元する性質があるので、これを利用して検出する。生体には糖類以外にも多くの還元性物質が存在するので、還元反応による定性試験で反応が陽性になったからといって、必ず還元糖が存在すると判断するのは危険である。

糖類を強酸と加熱するとフルフラールおよびその誘導体を生成する。これらのフルフラール類は酸の存在下でフェノール類と反応して、それぞれ特有な色素を生成するので、これを利用した糖類の定性反応も多い。

I 糖の定性反応

【目的】

5種類の未知の糖試料について4種類の定性実験を行って、結果よりそれぞれの糖の構造および性質を理解する。

【実験器具】

各班1つ：煮沸水浴用容器（熱湯に注意）、三脚、ガスバーナー、ピペット置き

人数分：蒸留水小瓶、マイクロピペット、安全ピペッター、試験管（試薬ごとに5本ずつ）、試験管立て、2 mL メスピペット（各班4本）→1つの定性試薬に対して1本ずつ使用

【糖試料】

各試験管①～⑤に、グルコース、スクロース、フルクトース、ラクトース、リボースが入っており（それぞれ1 g/mL）、どの番号がどの糖であるかはわからない。

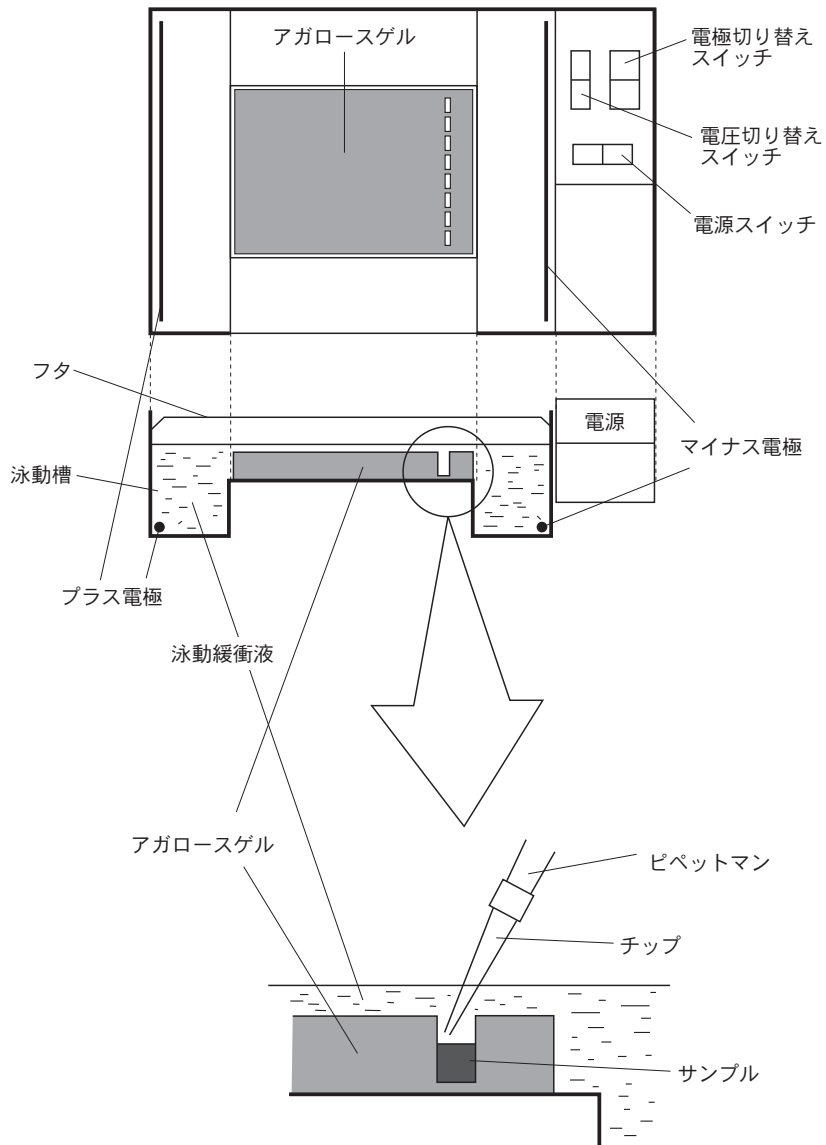


図 4-11 電気泳動装置とアガロースゲルへのサンプルの添加

pUC19 (No. 311-01004) の *Pst*I & *Bam*HI 切断生成断片を組み込んだもの。

- ・ Nucleospin[®] Plasmid Kit (A1, A2, A3, AW, A4, A5 溶液を含む, 日本ジェネティクス(株) No. 740588.50)

A1 溶液 : RNase 溶液

A2 溶液 : 0.2 M NaOH, 10% SDS

A3 溶液 : 2 M 酢酸カリウム

AW 溶液 : 4 M グアニジン

A4 溶液 : 75% エタノール

A5 溶液 : 10 mM トリス, 1 mM EDTA (pH8.0)

- ・ 制限酵素 (*Eco*R I, *Hind* III)

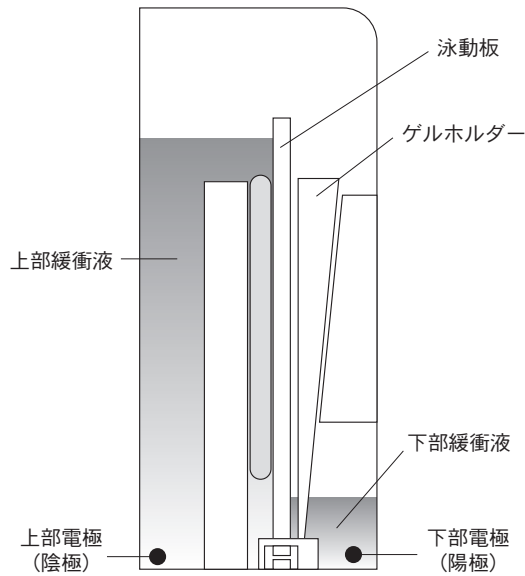


図 8-3 電気泳動槽への泳動ゲル板のセット

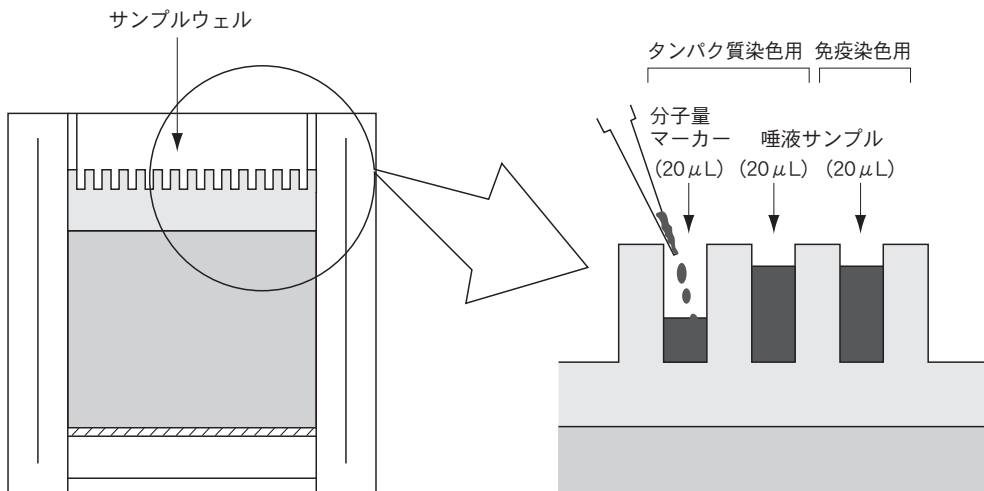


図 8-4 サンプルの充填

2) 免疫化学法によるタンパク質の検出

【原理】

ニトロセルロース膜などの疎水性固相にタンパク質を結合させ、タンパク質に特異的な抗体を用いて検出する方法をイムノプロット法という。検出には抗体を直接標識する場合と、免疫に用いた動物の抗体（1次抗体）を抗原にして作製した標識抗体（2次抗体）で検出する場合がある。標識には酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、ビオチン、 ^{125}I プロテイン A などが用いられる。

またタンパク質を電気泳動で分画してから膜に転写し、抗体でタンパク質を検出する方法をウエスタンプロット法という。電気泳動後、ゲル面に垂直に電圧をかけることでタンパク質をゲルから膜へ強制的に移動させる（これをプロッティングまたは転写という）。