『イラスト　栄養生化学実験（第２版）』を
ご利用の先生方へ

東京教学社

はじめに

１．小冊子について

本文の「このテキストを使う前に」にも述べましたように，本書ではいろいろな工夫をこらしております．イラストで実験操作を記載したこともそうですが，私たちの体で実際に起こっている現象に焦点をあてて実験内容を選択しました．さらに，従来のテキストにありましたような多数の実験例を掲載したり，また試薬の作り方も懇切丁寧に記載しませんでした．しかし，実際に担当する立場からしますと，試薬や器具類の準備には大変な労力を要します．そこで，本書の執筆者が，実験を指導する教員の立場になって，実験のちょっとしたノウハウや，用意すべき試薬の調製，器具類の準備をまとめたのが，この小冊子です．**10組分**の試薬の作り方と用意すべき器具類を書き出しましたのでご利用いただき，お役に立てれば幸いです．

２．老婆心ながら

著者等の数少ない経験ではありますが，実験を実施する前に理論的な詳しい実験内容の講義をするよりも，実験を行ったのちに，各自が自分のデーターを見ながら講義を受けた方が，より教育効果が大であるように思われます．特に，第11章，第12章のように他の班の実験結果を同時に見ないと考察できないような場合，実験室や講義室の黒板に，全ての班のデーターを記載させ，グループディスカッションを行わせると実験の全体像が把握でき，その実験の意義を理解してくれるように思います．ご検討ください．

また，このテキストでは学生が考える余地がないとか，レポートを書かせることもできないとお叱りを受けそうですが，最低限これだけは理解させたいと思われる内容を「考察」に書いてしまいました．そこで，これらの欠点を穴埋めするべく，第14，15章にタンパク質と糖質の定性実験を掲げました．この章の実験を実施していただき，レポートを書く練習にしていただければと思います．また，「悩んでみよう不思議な点」を課題にして，レポートを提出させてもよいかと思います．

著者一同

【第４章　糖質実験　Ⅰ】

１．試薬

１）４％でんぷん溶液：2.4g の可溶性でんぷんを60mL の精製水に加熱しながら懸濁する．

２）４％マルトース溶液：1.6g のマルトースを40mL の精製水に溶解する．

３）0.1N 酢酸緩衝液（pH5.0）：0.3g の酢酸を50mL の精製水に溶解後，濃水酸化ナトリウム溶液で pH5.0に合わせる．

４）唾液：口の中を水でよくすすがせた後，脱脂綿をくわえさせ，脱脂綿中の唾液を絞り集める（１班あたり約１mL 準備する）．

５）グルコアミラーゼ溶液：100mg のグルコアミラーゼ（クモノスカビ由来30μ／mg 粉末，生化学工業社製）を10mL の精製水に溶解する．実験開始まで氷冷しておく．

６）グルコース溶液：10mg のグルコースを1.0mL の10％イソプロパノール溶液に溶解する．

７）エチルアルコール：150mL

８）展開溶媒：酢酸エチルエステル，イソプロパノール，水，ピリジンを104：56：28：８（*v*/*v*）の割合で混合する．

９）発色試薬：アニリン１g とジフェニルアミン１g を，アセトン50mL と80％リン酸溶液7.5mL の混合液に溶解する．

10）0.01N ヨウ素溶液：ヨウ素は水に溶けないが，ヨウ化カリウムの水溶液には溶ける．そこで，ヨウ化カリウム3.0g を精製水10mL に溶かした溶液に0.127g のヨウ素を加え，精製水で100mL にする（褐色びんで保存）．

２．器具・機械

遠心管		50本
試験管		100本
メスピペット	0.5mL	40本
	1 mL	30本
	2 mL	20本
	5 mL	20本
ビーカー	100mL	10個
脱脂綿		
恒温槽		
シリカゲル薄層板		10枚

毛細管（ガラス細工の練習をかねて軟質ガラスで手作りさせてもよい．約５μL）　60本

薄層クロマトグラフ用展開槽　10個

噴霧器	１個
二連球	１個
ヘアードライヤー	10個
乾燥器（100℃）	
ドラフト	

３．注意点

１）発色試薬に含まれているアニリンを皮膚に付けたり，吸入しないこと．そのためこの発色試薬を噴霧するときはドラフト内で行うことが望ましい．

２）薄層クロマトグラフ用展開槽は，インスタントコーヒーの空きびんで代用可能．

３）糖質の分解酵素の作用点は以下に示す通りである．

α-アミラーゼ：手あたり次第にα-1,4結合を加水分解するエンド型酵素

α-グルコシダーゼ：α-1,4グルコシド結合を非還元末端側から加水分解する酵素

グルコアミラーゼ：非還元末端からグルコース単位で，α-1,4とα-1,6の両方の結合を加水分解するエキソ型酵素

【第５章　糖質実験　Ⅱ】

１．試薬

１）10％グルコース溶液：30g のグルコースを300mL の精製水に溶解する．

２）ドライイースト：30g（オリエンタル酵母工業株式会社製）

３）水酸化カルシウム溶液：0.21g の水酸化カルシウムを150mL の精製水に溶解する．

４）ベーキングパウダー：５g（愛国産業株式会社製）

５）0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）：3.58g の $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を100mL の精製水に溶解する（Ⅰ液）．0.68g の KH_2PO_4を50mL の精製水に溶解する（Ⅱ液）．Ⅰ液とⅡ液を適当に混合しながら pH を7.4に合わせる．

６）酵母懸濁液（pH7.4）：ドライイースト3.0g を，５）のリン酸緩衝液30mL に懸濁する．

７）10％トリクロロ酢酸溶液：３g のトリクロロ酢酸を30mL の精製水に溶解する．

８）３mM 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNP）溶液：30mg の DNP を50mL の希塩酸溶液（濃塩酸21.8mL＋精製水75mL）に溶解する．

９）５％水酸化ナトリウム溶液：５g の水酸化ナトリウムを100mL の精製水に溶解する．

２．器具

ビーカー	300mL	10個	
三角フラスコ	100mL	30個	
試験管		40本	
遠心管	15mL	20本	注：肉厚の試験管ならば遠心管として代用可能です．
ビュレット	50mL	10本	注：プラスチック製ですと，安価で破損の心配無用です．
メスピペット	１mL	70本	
	５mL	10本	
ゴム栓付きポリエチレンチューブ		10本	
恒温槽		数台	注：三角フラスコを浸すだけですので，１台で３班くらいは使用可能です．
スタンド		10個	
温度計		数本	

３．注意点

１）ドライイーストの懸濁には少し時間がかかる．懸濁後のイーストは実験に使用するまで氷冷しておく．

２）二酸化炭素を集めるゴム栓付ポリエチレンチューブは，直径５～６mm のチュー

ブを５cm 位の長さに切り，中程をブンゼンバーナーの弱火で温めながら，ガラス細工の要領でゆっくり引き伸ばす．細く伸びた中程で２つに切り，反対側の太い方を穴を開けたゴム栓に通す．

３）二酸化炭素の捕集に際し，１分毎の値を読ませ一定値に達するまで行うこと．初めのうちはゴム栓を締める圧力で気泡が出る．また，途中で恒温槽の温度を変えたりするので，空気の膨張により気泡が出るので，その影響がなくなるまで，すなわち１分毎の値が一定になるまで読み取らせる．なお，三角フラスコを時々振り混ぜないと，気泡がコンスタントに出ないことがあるので注意する．

【第６章　脂質実験】

１．試薬

１）10mM 塩化カルシウムを含む10mM トリス ― 塩酸緩衝液（pH7.4）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（MW：121）の0.24g をビーカーにとり，約180mL の精製水を加えて溶解する．希塩酸（５％程度）を加えながら pH を7.4にあわせる．その後，200mL にメスアップする．これに塩化カルシウム（MW：110）を0.22g 加える．

２）卵黄希釈液：卵黄１mL に，１）の緩衝液２mL を加え，ガーゼでろ過する．

３）酵素液Ⅰ（リパーゼ溶液）：リパーゼ（Rhizopus delemar 由来，Fine grade，生化学工業社製）を，１）の緩衝液に溶解して５mg/mL とする．

４）酵素液Ⅱ（ホスホリパーゼ溶液）：ホスホリパーゼ A_2（Bee Venom 由来，シグマアルドリッチジャパン社製）を，１）の緩衝液に溶解して１mg/mL とする．

５）クロロホルム ― メタノール（１：１，*v*/*v*）混液：クロロホルム30mL にメタノール30mL を加える．密栓して保存．

６）標準脂質：いずれの脂質も使用する量はきわめて微量で，Sigma 社製を使用した．

・ホスファチジルコリン（Phosphatidylcholine，dioleoyl）7.8mg を10mL の５）に溶解して約１mM とする．

・リゾホスファチジルコリン（Lysophosphatidylcholine，oleoyl）10.4mg を10mL の５）に溶解して約２mM とする．

・トリグリセリド（Triolein）8.9mg を10mL の５）に溶解して約１mM とする．

・脂肪酸（Oleic acid）5.6mg を10mL の５）に溶解して約２mM とする．

７）展開溶媒：１個の展開槽に約20mL の溶媒を入れるとして計算

リン脂質用：クロロホルム130mL にメタノール50mL と精製水８mL を加えて混和する．

中性脂質用：石油エーテル140mL にエチルエーテル60mL と酢酸２mL を加えて混和する．

２．器具・機械

１）試験管：30本

２）メスピペット：　0.2mL　40本

　　2.0mL　10本

３）薄層クロマト用プレート（５cm×10cm）：20枚

４）脂質塗布用ガラス製毛細管：熱したガラス管を伸ばして作製する．

５）展開槽：10個

６）ヨウ素蒸気槽：密閉できる容器（デシケータが便利）にヨードの粉末を入れ，ふた

をする．プレートの出し入れは迅速に．

7）恒温槽（37℃に設定）：１台

8）分注器：３個（あれば便利であるが，なくても実験に支障をきたさない）

9）撹拌機：２台（あれば便利であるが，なくても実験に支障をきたさない）

3．注意点

1）卵黄を採取したピペットは，簡単な洗浄ではきれいにならない．学生に採取させると洗浄するピペット数が増えるので，あらかじめ教員が分注しておいたほうがよい．

2）酵素について：安価ではあるが純度の低いリパーゼには，ホスホリパーゼ活性が混在していることがある．その場合，１）の緩衝液のカルシウムの代わりにエチレンジアミン四酢酸・２Na（EDTA・２Na）を10mM 程度加えて酵素に混在するカルシウムをキレートし，ホスホリパーゼ活性を阻害するとよい．調製して残ったリパーゼとホスホリパーゼは，冷凍保存で翌年も使える．

3）標準物質について：ヨウ素蒸気で発色させるため，また脂質過酸化を防ぐため全てオレイン酸結合脂質で純度の高いものを用いる．いずれも，溶媒が蒸発しないように密栓（スクリューコックつき試験管を利用すると便利）し，冷凍保存すれば数年間は使用可能．著者等は，学生が誤って標準脂質を混合させることがないように，各脂質専用の毛細管を用意しそれぞれに旗を付けて使用している．

4）薄層クロマト用プレートは，シリカゲルが塗布（層厚0.25mm）してあるガラス製プレコート（10cm×20cm）の裏面にガラスカッターで線を引き，両サイドを持って２枚に割る．同様に切断し，５cm×10cm のプレートを４枚作製する．手の油がつかないように手袋を使う．

5）展開槽として著者等は，インスタントコーヒーの空きびんを利用している．リン脂質用，中性脂質用のいずれも２組で１個の展開槽を使用する．展開溶媒は使用する10～20分前に，展開槽の底から１cm 程度入れる．展開槽の内面には，展開溶媒の蒸気を槽内に飽和させる目的でプレートの高さ程度まで，ろ紙を巻く．プレートを入れるときは，２組分揃ってからサンプル塗布面を向かい合わせにして入れる．

6）酵素は高価であるし，またクロロホルム ― メタノール混液はあまり吸わせたくないので，大小２種類の分注器を利用すると便利である．分注器がなければ安全ピペッターを使用するのもよい．

7）発色はヨウ素蒸気の代わりに，10％リンモリブデン酸のエチルアルコール溶液をドラフト内で噴霧し，100℃の乾燥器で５～10分加熱してもよい．

【第７章　タンパク質実験】

１．試薬

実験１　タンパク質の変性，実験２　タンパク質の等電点沈殿

１）卵黄液：新鮮鶏卵を，卵黄と卵白に分け，それぞれをよく溶いて均一化する．

２）卵白液：新鮮鶏卵を，卵黄と卵白に分け，それぞれをよく溶いて均一化する．

３）2.4％スキムミルク溶液：24g のスキムミルクを精製水1000mL に溶解する．

４）0.1N HCl：濃塩酸（35％，約11N）９mL に精製水を加えて全量を1000mL とする．

実験３　タンパク質の消化

５）卵白20倍希釈

卵１個から約30mL 程度の卵白がとれる．そこに精製水を加えて卵白を20倍希釈し，充分に撹拌し，その後30分程度放置する．不溶性のオボムシンを遠心分離（5,000rpm，10分程度）により取り除く．

６）トリプシン溶液（0.5mg/mL）：トリプシン（ブタすい臓由来：ナカライテスク社製）50mg を10）のリン酸緩衝液に溶かし，全量を100mL にする．

７）10％トリクロロ酢酸溶液：トリクロロ酢酸10g を精製水に溶かし，全量を100mL にする．

８）ローリー法試薬

①２％ Na_2CO_3溶液：炭酸ナトリウム10g を精製水に溶かし，全量を500mL にする．

②2.7％酒石酸カリウムナトリウム溶液：酒石酸カリウムナトリウム2.7g を精製水に溶かし，全量を100mL にする．

③１％ $CuSO_4$・５H_2O 溶液：硫酸銅１g を精製水に溶かし，全量を100mL にする．

ローリー発色試薬：①500mL に②5.0mL と③5.0mL を加える．使用する直前に混合する．混合後，１日経過したものは廃棄する．

９）フェノール試薬：市販されているフェノール試薬（1.8N）55mL に精製水45mL を加えて混合する．冷暗所で保存する．

10）10mM リン酸緩衝液（pH7.6）

① Na_2HPO_4・$12H_2O$ 0.716g を精製水に溶かし，全量を200mL にする．

② KH_2PO_4 0.136g を精製水に溶かし，全量を100mL にする．

①と②を適当に混合しながら pH を7.6に合わせる．

２．器具

ガラス棒		１本
試験管		130本
沸騰水浴		１台
メスピペット	１mL	80本

2 mL	40本
5 mL	20本
恒温槽	１台
分光光度計	１台

（等電点沈殿は10人１組で実施するとして以下に記載）

ビーカー（200mL）	１個
駒込ピペット	１本
スターラーと撹拌子	１台
pH メーター	１台

３．注意点

１）タンパク質の加熱変化は，温度設定を正確に行わないと卵白と卵黄の凝固に差がでないことがある．65℃の加熱でも半熟のようになるので，試験管を振ったりして，凝固の状態が異なることを確認させる．

２）タンパク質の等電点沈殿実験で，スターラーを使用する場合，ゆっくり回さないと沈殿物が生じてもわかりにくい場合があるので注意する．スターラーがない場合は，ガラス棒でかき混ぜながら，pH を確認して塩酸を加える．

３）タンパク質の消化実験では，加熱卵白と非加熱（生）卵白にトリプシンを作用させるが，生卵白に酵素作用後トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させたのみでは，遠心後の上清の吸光度は高くなってしまう．そこで，トリクロロ酢酸を添加後に加熱してから遠心後の上清を測定したところ，生卵白と加熱卵白間で差が生じた．理由は定かではないが，高次構造を維持している生タンパク質よりも，あらかじめ加熱して変性したタンパク質の方が消化酵素の作用を受けやすいことを理解させたくて導入した実験である．卵白を材料にすることに固執しているわけではないので，本書を使用してくださっている先生方で，妙案があればご教示いただきたい．

【第８章　核酸実験】

１．試薬

１）50mM EDTA を含む１mM トリス塩酸緩衝液（Ⅰ）100mL：１M トリス塩酸緩衝液0.1mL と0.2M EDTA 溶液25mL を採取し精製水74.9mL 加える．

１M トリス塩酸緩衝液の調整：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン12.1g を精製水に溶かして80mL 位とし，これに濃塩酸（約７mL）を加えて pH を7.4に調整した後，精製水を加えて100mL とする．

0.2M EDTA 溶液の調整：エチレンジアミン四酢酸・三ナトリウム4.1g を精製水に溶かし50mL とする．そのままで pH7.4位になる．

２）１mM EDTA を含む10mM トリス塩酸緩衝液（Ⅱ）100mL：１M トリス塩酸緩衝液１mL と0.2M EDTA 溶液0.5mL を採取し精製水98.5mL 加える．

３）10％ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）溶液10mL：ラウリル硫酸ナトリウム１g を精製水に溶かして10mL とする．冬期は溶解度が下がるので37℃に温めて保存．

４）５M 塩化ナトリウム溶液10mL：塩化ナトリウム2.92g を精製水に溶かして10mL とする．

５）クロロホルム100mL

６）エチルアルコール200mL

７）ジフェニルアミン試薬：ジフェニルアミン0.5g を氷酢酸49mL に溶解し，濃硫酸１mL 加える．（用事調整）

８）５M 硫酸５mL：95％硫酸，比重1.84の場合，精製水3.6mL に硫酸1.4mL を加える．

９）30％過酸化水素水１mL：市販品をそのまま使用する．

10）５％モリブデン酸アンモニウム液10mL：モリブデン酸アンモニウム0.5g を水に溶かして10mL とする．

11）アミノナフトールスルフォン酸試薬：15％亜硫酸水素ナトリウム $NaHSO_3$液10mL に，１-アミノ-２-ナフトール-４-スルフォン酸25mg を加え，加温して溶解する．これに，亜硫酸ナトリウム Na_2SO_3 50mg を加えて加温溶解する．褐色びん中に入れ冷暗所に保存する．室温に戻るとまた白沈する．

２．器具

シャーレ	10cm	10個
解剖用はさみ		10個
ポリプロピレン製遠心管	50mL	20本
メスピペット	10mL	20本
	５mL	10本
	２mL	20本

	1 mL	60本
駒込ピペット	2 mL	10本
試験管大		100本
試験管ばさみ		10本
ペーパータオル		10枚
水浴		
恒温槽		
実験用保護めがね		
分光光度計		
遠心機		
ドラフト		

３．注意点

１）DNA の抽出に使用する遠心管は高価であるがポリプロピレン製を使用のこと．ポリスチレン製はクロロホルムで溶け出す．

２）EDTA を緩衝液に加えているのは，肝臓に含まれている DNA 分解酵素を阻害するためである．DNA 分解酵素は Mg イオンによって活性化されるため，EDTA により Mg をキレート結合して取り除く．

３）リン酸の定性実験は，濃硫酸を使用し，直火で加熱する．突沸することがあるため，学生実験としては危険であるので，十分注意していただきたい．

その他の実験例に関する試薬類

この実験に要する試薬はかなり高価であるが，学生に塩基配列を実感させるにはよい．

１）λファージ DNA（Toyobo DNA-001），

２）Pvu Ⅰ 200U（Takara 1075A），

３）Sma Ⅰ 2000U（Takara 1085A），

注：サイズマーカーは上記λファージ DNA を制限酵素 Hind Ⅲで切断した物が市販もされているが，Hind Ⅲを購入して自ら作成してもよい（全て各10,000円位）．

４）５×Loading 液（0.025％ブロモフェノールブルー /50％グリセリン溶液）

５）アガロース LO３ 100g（Takara 16,000円）

６）Mupid Blue（アドバンスバイオ1800円）が便利ではあるが，１％メチルグリーンによる染色方法もある．

７）TAE 緩衝液

電気泳動槽

反応

10×K Buffer（Pvu Ⅰを購入すると添付されている）	1 μL
BSA（Pvu Ⅰを購入すると添付されている）	1 μL
0.1 μg/ μL λファージ DNA	2.5 μL
精製水（オートクレーブ済み）	4.5 μL
Pvu ⅠまたはSma Ⅰ（1 U）	1 μL

（希釈するなら50％グリセリンで直前に）

Pvu ⅠとSma Ⅰの二重切断では精製水の量を3.5 μLとする．

制限酵素の1 Uはλ DNA 1 μgを1時間で切断する活性量とされているので37℃ 1時間で充分であるが少し長めの方が確実である．特にSma ⅠのK緩衝液での活性は本来のTris，BSA緩衝液の20％とされているので一晩反応させてもよい．

アガロースゲルに載せる前に65℃，10分加熱するのはλ DNAの両端12塩基が共通配列の1本鎖になっていて，（cohesive end）常温ではお互いに水素結合により二本鎖になっているため，この部分だけ一本鎖にして画分をはずすためである．5 ×Loading液を1.2 μLと反応液6 μLを混合しゲルに載せる．（制限酵素1種類の方のサンプルは5 ×Loading液を0.8 μLと反応液4 μLが濃過ぎずよい．）約5 cmのゲルで100V45分（BPBが流れ出る直前まで）である．アガロースゲルの染色はMupid blueの場合3分，70％エタノールによる脱色1分2回，精製水による脱色5分2回でバンドは見える．さらに水による脱色を続ける．バンドの移動距離の逆数をプロットすると直線が得られるので長さを求めることができる．Pvu Ⅰの切断部位は11936，26257，35790であり，Sma Ⅰの切断部位は19399，31619，39890である．従って，得られる画分の長さはPvu Ⅰで14321，12712，11936，9533 base pair（bp）であり，Sma Ⅰでは19399，12220，8612，8271 bpである．また，二重切断をすると11936，8612，7463，6858，5362，4171，4100 bpが得られる．

【第９章　酵素実験　Ⅰ】

１．試薬

１）50mM クエン酸緩衝液（pH4.9）：2.3g のクエン酸二水素カリウム（$KH_2C_6H_5O_7$）におよそ80mL の水を加えて溶解し，これに水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を4.9に合わせた後，200mL にメスアップする．

２）基質液Ⅰ（10mMp-ニトロフェニルリン酸）：186mg の p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物（関東化学株式会社）を１）の緩衝液50mL に溶解する．

３）酵素溶液：じゃがいも由来の酸性ホスファターゼ（7.6unit/mg，和光純薬社製）を使用．

４）50mM NaOH 溶液：2.0g の水酸化ナトリウムを水に溶かして1000mL にする．

５）0.5mM p-ニトロフェノール標準液：139.1mg の p-ニトロフェノール（$C_6H_5NO_3$）を20mL の水に溶解する（50mM）．これを水で100倍希釈して標準液とする．

２．器具

試験管		190本
メスピペット	1.0mL	60本
	5.0mL	10本
マイクロピペット	100μL	10本
恒温槽		
分光光度計		

【第10章　酵素実験　Ⅱ】

1．試薬

1）1/15M リン酸緩衝液（pH7.4）：（A）0.907g のリン酸一カリウム（KH_2PO_4）を100mL の精製水に溶解する．（B）1.194g のリン酸二ナトリウム十二水和物（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）を50mL の精製水に溶解する．（A）の溶液の一部に（B）の溶液を加え，pH7.4に調整する．

2）1/15M トリス塩酸緩衝液（pH9.4）：0.808g のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（分子量121.14）を約80mL の精製水に溶解し，塩酸で pH を9.4に調整し，その後100mL にメスアップする．

3）1/15M クエン酸緩衝液（pH4.4）：1.53g のクエン酸二水素カリウム（$KH_2C_6H_5O_7$）におよそ40mL の水を加えて溶解し，これに水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を4.4に合わせた後，100mL にメスアップする．

4）43mM ピルビン酸溶液：47mg のピルビン酸ナトリウム（分子量110.04）を10mL の水に溶解する（遮光して冷蔵保存）．

5）0.86mM ピルビン酸溶液（pH7.4）：4）のピルビン酸溶液0.3mL に1）の緩衝液を加えて15mL にする．

6）0.86mM ピルビン酸溶液（pH9.4）：4）のピルビン酸溶液0.3mL に2）の緩衝液を加えて15mL にする．

7）0.86mM ピルビン酸溶液（pH4.4）：4）のピルビン酸溶液0.3mL に3）の緩衝液を加えて15mL にする．

8）1N HCl 溶液：13.5mL の濃塩酸に水を加えて150mL にする．

9）0.08％ 2,4ジニトロフェニルヒドラジン（DNP）溶液：0.12g の DNP に13.5mL 濃塩酸を加えて溶解し，これに水を加えて150mL とする（遮光して冷蔵保存）．

10）1.0N NaOH 溶液：40g の水酸化ナトリウムに水を加えて1000mL にする．

11）乳酸脱水素酵素：1 mg の乳酸脱水素酵素（ブタ心臓由来350μ／mg タンパク質，Toyobo Enzymes 社）に水を加えて1000mL にする（用事調整）．

12）0.1％ NADH 溶液：0.1g のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型に水を加えて100mL にする（用事調整）．

2．器具

試験管		130本
メスピペット	0.5mL	10本
	1.0mL	30本
	2.0mL	40本
	5.0mL	20本

10.0mL　10本

恒温槽

分光光度計

3．注意点

1）試薬のうち，補酵素（NADH）はオリエンタル酵母社製の β -NADH を，乳酸脱水素酵素（LDH）は生化学工業社製の生化学用を使用した.

2）溶解した LDH は冷蔵保存でも失活するし，NADH の分解も早いので，これら両者は使用直前に調整することが望ましい.

【第11章　尿成分実験】

尿成分実験を実施される先生方へ

テキストでは，植物性・動物性高タンパク質食および低タンパク質食を摂取する３群で実験するようにしていますが，尿酸の実験結果が期待していたような値にならないことが，ままあります．尿酸排泄量は摂取食物の影響に加え，体内でのプリンヌクレオチドの分解も加わるからかと想像します．

以前，執筆者のひとりは，上記３群の他に絶食グループを設けました．実験前日は，お茶や水以外は一切口にしない条件です．もちろんジュースや炭酸飲料も不可にしました．実験当日，採尿後は朝食を摂取してよいのですが，朝・昼・夕食を抜くのはかなり堪えるようです．しかし，その甲斐あってびっくりするほど尿素排泄量が増加します．体タンパク質がエネルギー源として利用されたからと思われます．食事の大切さを教えるには絶好の内容かと思います．また協力する学生がいればですが，決めた時刻に数回採尿し（排泄する尿をすべて回収して液量を測定），クレアチニンが尿量に関係なく一定速度で排泄されることを学ばせてもおもしろいかと思います．

なお，尿素定量時の原尿の希釈度合いですが，被験者の条件によってかなり異なります．ここでは800倍としましたが，適宜変更してください．その場合，計算式の変更もお願いします．

１．試薬（尿素測定は市販されている臨床検査キット（和光純薬工業社製）を用いて20組分の調製）

１）尿素の定量（ウレアーゼ・インドフェノール法）

(a)　尿素標準液（尿素窒素として2.5mg/100mL）

尿素0.214g（尿素窒素量として100mg）を精製水に溶かして100mL にする．作製した標準液は尿素窒素量として100mg/100mL になっているので，精製水で40倍希釈して尿素標準液とする．

(b)　酵素（ウレアーゼ）試液（100mL：１組５mL（１mL×５本）を20組分とする）

①酵素希釈液の調製

EDTA・２Na 0.2 g を約400mL の精製水に溶かし，１N水酸化ナトリウム溶液で pH７に調整後，精製水で500mL にする．

②酵素（ウレアーゼ）試液（１mg/100mL）の調製

ウレアーゼ（ナタ豆由来72.5U/mg，和光純薬工業社製）１mg を酵素希釈液100mL に溶解する．当日調製し，氷水中に保存する．

（購入したウレアーゼは，10～20包程度に小分けして－20℃のフリーザー内で保存し，使用する分だけ解凍するのが好ましい．なお酵素の比活性が低い場合は濃度を高くする）

(c)　フェノール試液（100mL：１組５mL（１mL×５本）を20組分とする）

フェノール１g，ニトロプルシドナトリウム５mg を精製水に溶解し，100mL にする．褐色ビンに保存する（褐色ビンがない場合は，アルミホイルで試薬ビンの回りを覆う）

(d)　次亜塩素酸試液

水酸化ナトリウム0.4g と有効塩素濃度５％の次亜塩素酸ナトリウム0.5mL を精製水に溶解し，100mL にする．ポリ容器に保存する．

２）尿酸の定量（ウリカーゼ法）

①尿酸標準液：尿酸溶液（2.5mg/100mL）（キットに含まれる標準液は10mg/100mL であるが，これを精製水で４倍希釈する）．

②酵素試液：酵素試薬 -A（アスコルビン酸オキシダーゼ390単位含有）を発色試薬（N- エチル -N-（２- ヒドロキシ - ３- スルフォプロピル）- m - トルイジンナトリウム，0.57mM 含有）にて溶解し，これに酵素試薬 -B（ウリカーゼ４単位，ペルオキシダーゼ200単位，４- アミノアンチピリン0.59mM 含有）を加えて酵素試薬とする（冷蔵保存で３週間安定）（総調製量は200mL）

３）クレアチニンの定量（Jaffe 反応法）

①クレアチニン標準液：クレアチニン（10mg/100mL）溶液

②ピクリン酸試液：22mM の2,4,6- トリニトロフェノール含有試液

③水酸化ナトリウム溶液：0.75N 水酸化ナトリウム

２．器具・機械（10組分の必要量）

メスピペット	0.5mL	70本
	2.0mL	30本
	5.0mL	20本
試験管		150本
撹拌器		
恒温槽		
分光光度計		

３．注意点

１）実験に際して

実験内容はタンパク質，核酸代謝物を測定することから，栄養関係を学ぶ学生には好実験例と思われる．しかし，ヒトを対象とした実験なので個体差が大きい．さらに学生の実験技術の未熟さから，結果に大きなバラツキの生じることもある．著者等は，測定結果をすべて実験室の黒板に板書させている．これによって同一尿を数組で

測定する場合もあるので，技術の未熟さによるバラツキはある程度補正できる．さらに，摂取した食事内容を被験者に記述させて提示することにより，考察の材料としている．

2）実験材料

被験尿：実験開始直前に数 mL 採取する．

800倍希釈尿2.0mL と20倍希釈尿2.0mL および10倍希釈尿2.0mL を用意する．いずれも精製水で正確に希釈する．

3）臨床検査キットを用いての尿中成分の測定

尿素，尿酸，クレアチニンの測定にはいろいろな方法がある．著者等は，試薬の調製と実験操作が簡便な臨床検査キットを一部用いている．キットは微量で測定できるように考案されているが，学生レベルの実験ではマイクロピペットの使用数にも限度があるのでメスピペットで実験できるように試薬の調製を一部変更している．

4）経費節約の一方法

尿酸の測定は臨床検査キットを用いた酵素法であり，キットに含まれている試薬類を全部溶解して使用するシステムになっている（殆どは100回測定用で販売している）．したがって，本実験での調製量は10組分ではなく20組分である．市販されているキットは安いものではないので，実験書に記載した容量の半量で実験を組んだり，あるいは，実験書では各実験ごとに標準液とブランクを用意しているが，精製水をブランクとした検量線をあらかじめ作製し，これを用いて学生が試料の濃度を求めるようにするとキットの消費量が少なくより経済的である．

【第12章　動物実験】

（A）　動物の飼育，解剖

1．班の構成

餌の種類（下記の表に示すように６種類）を基本にし，各餌につきラットを４匹とした（摂食量等がラットにより異なるので匹数が多いほど信頼できる結果が得られるが，飼育室などの問題で，本学では24匹までとした）．１班の学生を７ ～ ８名とし，12班に分けた（例：10％カゼイン食班 －１ ：ラット２匹，学生７名）．各班の学生が交代しながら２週間，体重，摂食量の測定，ケージ洗浄などラットの世話をさせる（学生の中にはどうしても動物に触れない者もいるので配慮が必要）．

2．ラット：ウィスター系 ST 雄ラット（５週齢で体重100g 前後．成長期のラットの方が，またメスよりもオスの方が差が出やすい）を日本エスエルシー株式会社より購入（平成15年度で１匹1300円程度）．

3．飼育ケージとエサ箱，給水びん：餌の摂取量を正確に測定しなければならないので，ラットは１ケージに１匹とする．ケージは餌の摂取量を測定することを考えると，金網を引いたケージが好ましい（紙やおがくずをケージの底にひくと，エサ箱からこぼした餌の回収が不可能となる）．

4．飼料の調製

ラットの１日当たりの摂食量を25g（余分を考えて）とし，飼育期間を乗じて必要な飼料の量を算出する．

（例）本書に記載した飼料調製：飼育日数14日間とし，各飼料につき２匹飼育するので，２匹×25（g/ 日）×14日間＝ 700g．ゆえに２週間飼育するには700g の飼料が必要となる．飼料配合は表１の割合で調製する．

表１　飼料配合（％）

飼料成分	10％カゼイン飼料	20％カゼイン飼料	10％小麦グルテン飼料	20％小麦グルテン飼料	１％リジン＋10％小麦グルテン飼料	１％リジン＋20％小麦グルテン飼料
カゼイン	10	20	―	―	―	―
小麦グルテン	―	―	10	20	10	20
リジン	―	―	―	―	1	1
コーン油	5	5	5	5	5	5
ミネラル混合	4	4	4	4	4	4
ビタミン混合	1	1	1	1	1	1
コーンスターチ	80	70	80	70	79	69
合計（％）	100	100	100	100	100	100

※なお混合前の各飼料は，下記メーカーのものを使用した．
小麦グルテン，ミルクカゼイン：日本クレア株式会社
ビタミン，ミネラル（AIN-76），コーンスターチ：日本農産工業株式会社
コーン油（トウモロコシ油）：シグマアルドリッチジャパン社
リジン（L- リジン塩酸塩）：メルク社

本書に示した量（700g）で飼料を作成すると表２の分量になる．

なお本書に記載したボールの大きさは，大：36号（直径38cm），中：24号（直径26cm）である．また使用したスコップはステンレス製の粉末用スコップである．飼料の混合は，スコップのみでは均一になりにくいので，使い捨てのビニール手袋を与え，手で直接混合させた．また調整後の飼料は，飼料名を記載したビニール袋に入れて，冷蔵庫（４℃）で保存した．

表２　配合飼料の重量（g）

飼料成分	10%カゼイン飼料	20%カゼイン飼料	10%小麦グルテン飼料	20%小麦グルテン飼料	１%リジン＋10%小麦グルテン飼料	１%リジン＋20%小麦グルテン飼料
カゼイン	70	140	—	—	—	—
小麦グルテン	—	—	70	140	70	140
リジン	—	—	—	—	7	7
コーン油	35	35	35	35	35	35
ミネラル混合	28	28	28	28	28	28
ビタミン混合	7	7	7	7	7	7
コーンスターチ	560	490	560	490	553	483
合計（g）	700	700	700	700	700	700

※コーン油についてはビーカーではかりとる．

５．体重計：動物測定用はかり（ザートリウス社製 MC１LC6200）を使用したが，精度の高い天秤であるならば他社の製品で構わない．

６．軍手：動物に噛み付かれても怪我をしないように，動物を扱う際に使用させた．

７．解剖用具

①解剖台：30×20×２cm 程度のウレタンマット（ウレタンマットは水洗可能であり，ラットを固定する際，針で固定することも可能であり，とても便利である）．

②はさみ，ピンセットは手術用のものを使用する．

③麻酔用デシケーター：エーテル麻酔用のデシケーター（または密閉できる容器）

④摘出した臓器を洗浄するための生理食塩水（100 ～ 200mL のビーカー）．

⑤解剖時にラットの毛が飛び散らないよう，消毒用70%エタノールを噴霧するための噴霧器．

⑥抗凝固剤として少量のヘパリン（ノボ・ヘパリン注，アベンティスファーマ株式会社製）を添加した採血用注射器（10mL）．

⑦ろ紙：摘出した臓器の洗浄に使用する．

（B）血漿タンパク質測定

１．試薬

a）総タンパク質の定量（ビウレット反応法）

①発色試薬：硫酸銅1.5g，酒石酸カリウムナトリウム６g，水酸化ナトリウム30g，ヨウ化カリウム１g に水を加えて１L とする．

②標準液（4.0g ／ 100mL）：牛血清アルブミン4.0g を水に溶かして100mL とする．

b）アルブミンの測定（ブロモクレゾールグリーン；BCG 法）

①0.6mM BCG 保存液：特級 BCG419mg を0.1N 水酸化ナトリウム溶液10mL に溶解し，水を加えて 1 L とし褐色びんにて保存する．

②0.1M クエン酸緩衝液（pH4.2）：特級クエン酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 21.0g を水約800mL に溶かし，水酸化ナトリウム溶液で pH4.20に調整したのち，水を加えて 1 L とする．

③30％ Brij-35：Brij-35 30g に水約80mL を加え，60℃前後の温浴中で溶解し，冷却後水を加えて100mL とする．

④ BCG 発色試薬：BCG 保存液250mL に0.1M クエン酸緩衝液（pH4.2）750mL を加え，30％ Brij-35を 4 mL を加え，pH4.2 ± 0.05に調整する（ 4 ℃保存）．

⑤標準液（2.0g ／ 100mL）：牛血清アルブミン2.0g を水に溶かして100mL とする．

2．器具

試験管		60本
メスピペット	1 mL	50本
	5 mL	20本
遠心分離機		1 台
分光光度計		1 台

【第13章　細胞分画】

試薬の作り方

（1）0.25M ショ糖を含む10mM トリス塩酸緩衝液（pH7.4）

8.56g のショ糖と0.12g のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを80mL 程度の水に溶解し，塩酸で pH7.4に合せ，最終100mL とする．

（2）0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）：3.58g の $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を100mL の精製水に溶解する（Ⅰ液）．0.68g の KH_2PO_4を50mL の精製水に溶解する（Ⅱ液）．Ⅰ液とⅡ液を適当に混合しながら pH を7.4に合わせる．

（3）0.02％メチレンブルー水溶液

メチレンブルー 0.01g を水50mL に溶解する．

（4）0.1M コハク酸ナトリウムを含む0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）

コハク酸二ナトリウム六水和物（$C_4H_4Na_2O_4 \cdot 6H_2O$）2.7g を（2）のリン酸緩衝液10mL に溶解する．

【第14章　タンパク質とアミノ酸の定性反応】

1．試薬（10組分）

タンパク質とアミノ酸の未知試料溶液

1）0.2％アルブミン水溶液：アルブミン0.2g を精製水に溶かして100mL とする．

2）0.2％ゼラチン水溶液：ゼラチン0.2g を精製水に懸濁し，加温しながら溶かして100mL とする．

3）0.2％トリプトファン水溶液：トリプトファン0.2g を精製水に溶かして100mL とする．

4）0.2％システイン水溶液：システイン0.2g を精製水に溶かして100mL とする．

5）0.2％ロイシン水溶液：ロイシン0.2g を精製水に溶かして100mL とする．

定性反応用試薬

6）飽和硫安水溶液：硫酸アンモニウム（$(NH_4)_2SO_4$）77g を精製水に溶かして100mL とする．

7）ビウレット試薬：硫酸銅（$CuSO_4$）0.15g と酒石酸カリウムナトリウム（$KNaC_4H_4O_6$）0.6g を50mL の精製水に溶かし，これに10％水酸化ナトリウム溶液を30mL を加え，撹拌後精製水を加えて100mL にする．

8）１％ニンヒドリン水溶液：ニンヒドリン0.5g を精製水に溶かして50mL とする．

9）濃硝酸

10）50％水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム50g を精製水に溶かして100mL とする．

11）10％水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム５g を精製水に溶かして50mL とする．

12）10％酢酸鉛水溶液：酢酸鉛（$Pb(CH_3COO)_2$）10g を精製水に溶かして100mL とする．

2．器具・機械

大試験管

ビーカー（300か500mL）

ガスバーナー

3．注意点

試験管を直接バーナーの炎で加熱することは避け，ビーカーにいれた水をバーナーで沸騰させ，その中に試験管を入れるようにする．これにより，危険が防止できるし，加熱による色の変化なども確認できる．

４．実験方法の紹介

５種類の定性反応を全部行わせる方法と，あらかじめ未知試料名を教え，どの定性反応をどのような順序で行っていけばすべての未知検体を同定できるかを考えさせ，必要とする定性反応だけを行わせる方法がある．この際，手順は一つではないので，学生の個性がでておもしろい．

（例）まず，飽和硫安を用いてタンパク質（２本）とアミノ酸（３本）に分ける．全部にキサントプロテイン反応を行い，アミノ酸３本のうち反応するものがトリプトファンであり，タンパク質２本のうち反応するのがトリプトファンを多く含むアルブミンである．さらに，アミノ酸の残りの２本に硫化鉛反応を行い，反応した方がシステインである．

２つのタンパク質の同定に，熱凝固反応を用いてもよい．ゼラチンは熱で凝固しないためアルブミンと区別ができる．

【第15章　糖質の定性反応】

1．試薬

1）0.1％グルコース溶液：グルコース0.1g を精製水100mL に溶解する．

2）0.1％フルクトース溶液：フルクトース0.1g を精製水100mL に溶解する．

3）0.1％マルトース溶液：マルトース0.1g を精製水100mL に溶解する．

4）0.1％スクロース溶液：スクロース0.1g を精製水100mL に溶解する．

5）0.1％でんぷん溶液：可溶性でんぷん0.1g を精製水100mL に懸濁し，加熱して溶解する．

6）５％α-ナフトール溶液：α-ナフトール2.5g をエチルアルコール50mL に溶解する．

7）濃硫酸：100mL

8）フェーリング試薬：$CuSO_4$・５H_2O 11.6g を精製水150mL に溶解する（Ⅰ液）．酒石酸カリウム・ナトリウム57.7g と NaOH 16.7g を精製水150mL に溶解する（Ⅱ液）．使用時にⅠ液とⅡ液を等量混合する．

9）バーフォード試薬：酢酸銅20g と氷酢酸2.7mL に精製水を加え300mL とし加熱溶解後，室温に戻してからろ過する．

10）セリワノフ試薬：濃塩酸34.8mL に精製水65.2mL を加えて４N 塩酸を作り，これにレゾルシン0.05g を加える．

11）0.01N ヨウ素ヨウ化カリウム溶液：ヨウ素は精製水に溶けないが，ヨウ化カリウムの水溶液には溶ける．そこで，ヨウ化カリウム3.0g を精製水10mL に溶かした溶液に0.127g のヨウ素を加え，精製水で100mL にする（褐色ビンで保存）．

2．器具・機械

試験管		250本	
試験管立て		10個	
試験管ばさみ		10個	
温度計		10本	
駒込ピペット	２mL	90本	（共通試薬にそれぞれ付けておくのであれば９本でよい．）
	５mL	20本	（　〃　２本でよい．）
水浴		10個	

【悩んでみよう不思議な点】の回答

第３章　酸とは何か，アルカリとは何か

（１）酸の濃度を２倍にすると，滴定曲線の形はどうなるか？

Ans. 酸にアルカリを加えていく時，X 軸に加えたアルカリの量を，Y 軸に pH をプロットすると，中和点で pH のジャンプが起こる．そこが中和に必要なアルカリの量に相当する．この際，酸の濃度を２倍にすると，pH のジャンプが起こるまでの，アルカリの量が２倍になり，右に平行移動したような形になる．

（２）NaOH を正確な電子天秤でなく，上皿天秤で測ったのはなぜだと思うか？

Ans. NaOH は吸湿性があり，重量を電子天秤で正確に測定したとしても，その中には，未知量の水分が含まれているため，正確な NaOH の重量を測りとることは不可能である．したがって，上皿天秤で測って作った NaOH 溶液を，正確な濃度のシュウ酸溶液で滴定して NaOH の濃度を求める．

第４章　糖質実験Ⅰ

（１）アミラーゼやグルコアミラーゼ，グルコシダーゼはどんな化学反応を助けるか？

Ans. グリコシド結合を加水分解する酵素は，次のように大きく二種類に分類される．

エキソ型……多糖類の端から切断していく酵素

グルコアミラーゼ: 非還元末端からグルコースをはずしていく．α１→α６も分解する．

グルコシダーゼ（マルターゼ）：非還元末端に存在するα-D- グリコシド結合を分解する．

βアミラーゼ：非還元末端からマルトース単位をはずす．

エンド型……多糖類の内部のグリコシド結合を切断する酵素

αアミラーゼ：α１→α４グリコシド結合を加水分解する．

（２）マルトースとグルコアミラーゼの反応液にエチルアルコールを加えたときにできた少量の沈殿は何の沈殿か？

Ans. グルコアミラーゼの変性により，わずかに白く濁って見えることがある．

（３）でんぷんとグリコーゲンの同じ点，違う点は何か？

Ans. 同じ点：α1,4とα1,6グリコシド結合でつながっている．

違う点：グリコーゲンの方が枝分かれが多い．

第５章　糖質実験Ⅱ

（１）発生した気体と水酸化カルシウムとの反応を化学式で書こう．

Ans. $CO_2 + Ca(OH)_2 \rightarrow CaCO_3$（白濁）$+ H_2O$

（2）パンやケーキを作るときに酵母（イースト）やベーキングパウダーを使うのはなぜか？

Ans. パンを作るときに酵母を混ぜて寝かせておくと嫌気的条件下でアルコール発酵が起きる．すなわち，ピルビン酸脱炭酸酵素によりピルビン酸からアセトアルデヒドになる反応で CO_2 が発生する．一方，ベーキングパウダーには炭酸水素ナトリウムとα-酒石酸水素カリウムとが含まれており，水に溶解すると炭酸水素ナトリウムから二酸化炭素が発生し，出てきた NaOH は酒石酸水素カリウムを中和して酒石酸カリウム・ナトリウムと水を生成する．

$NaHCO_3$ ＋酒石酸水素カリウム→ CO_2 ＋酒石酸カリウム・ナトリウム＋ H_2O

（3）酵母に添加したグルコースが，ピルビン酸に留まることなく，またアルコールを生成することなく，すべて二酸化炭素に代謝されたと仮定したとき（実際上は考え難いが），1 g の酵母はどれだけのグルコースを消費することになるか．10分間に発生したガス量は自分の結果より，また気体の 1 mol は常温常圧で22.4L であることを考慮に入れて計算しなさい．

Ans. 1 分間に 3 mL の二酸化炭素を発生したと仮定すると，

3 mL/min＝0.003リットル /min　0.003/22.4＝0.000134mol/min

0.134mmol×10＝1.34mmol/10min　10分間に1.34mmol の二酸化炭素を発生した．

$C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$

ゆえに二酸化炭素 6 mol 生成するのに対してグルコースは 1 mol 消費する．したがってグルコースの消費量は，1.34/ 6 ＝0.223mmol/10min となり，これにグルコースの分子量を乗じて　0.223×180＝40.2mg/10min となる．

答え　10分間におよそ40mg のグルコースを消費する

第 6 章　脂質実験

（1）卵黄に有機溶媒（クロロホルムとメチルアルコール混液）を加えた後，生じた不溶物は何か？

Ans. 卵黄リポタンパク質の成分として含まれていたタンパク質．

（リポタンパク質の脂質は有機溶媒によって抽出され，タンパク質は有機溶媒によって変性し，塊となって沈殿した．）

（2）卵黄は水で希釈できるのに，それから抽出した脂質を水で薄められないのはなぜか？

Ans. 脂質はもともと水に不溶で有機溶媒に可溶という性質がある．一方，卵黄中の脂質はタンパク質と複合体を形成し，リポタンパク質として存在するので可溶性である．上記のように，リポタンパク質からタンパク質を除いてしまうと脂質は水に不溶になってしまう．

（3） 2種類の展開溶媒を使い分けたのはどうしてか？

Ans. 実験結果を見ればわかるように，中性脂質の分離を目的として用いた極性の小さな展開溶媒（石油エーテル ― エーテル ― 酢酸）では，リン脂質は試料を塗布した原点から移動せず，逆に極性の大きなリン脂質を分離する目的で用いた展開溶媒（クロロホルム ― メタノール ― 水）で中性脂質を分離すると，ほとんどの中性脂肪は薄層クロマトの上位に移動し，それぞれの中性脂肪を分離することが出来ない．それゆえに，極性の異なるそれぞれの脂質を分離するためには，それぞれの脂質の極性に見合った極性の展開溶媒を用いなければならない．

第7章　タンパク質実験

（1）牛乳は加熱しても凝固しないが，卵は加熱すると凝固するのはなぜだろう？

Ans. タンパク質が凝固するためにはある程度の濃度が必要である．タンパク質の濃度が低すぎると，熱変性をさせても凝固物を作るために必要な網目構造ができない．牛乳のタンパク質濃度が3％前後であるのに対し，卵のタンパク質濃度は12％程度あり，牛乳よりも卵のタンパク質濃度が高いからである．

（2）スキムミルクに塩酸溶液を加えたところ，pHの低下に伴い沈殿が現れた．pH4.6で最大の沈殿が生じた後，より多くの塩酸を加えたところ沈殿が消失した．沈殿物が再び溶解したのはなぜだろう？

Ans. タンパク質分子は正と負の荷電をもっている．この荷電状態は溶液のpHによって変化するが，正荷電（＋イオン）と負荷電（－イオン）の数が等しくなった状態のpHを等電点と呼び，この時タンパク質の溶解度は最も低くなる．カゼインの等電点はpH4.6であるが，さらに塩酸を加えることにより，タンパク質分子の正荷電が増加し，再びタンパク質の溶解度は上昇する．ゆえに，塩酸を加えることにより沈殿物が溶解したものと考えられる．

第8章　核酸実験

（1）小さな細胞の中に170cmもの DNA がどのようにしまわれているのだろう．

Ans. ヒストンを中心として DNA が糸巻き状にまかれクロマチン構造をとっている．

（2）糸のような DNA に私たち生物のどんな情報が入っているのだろう．

Ans. DNA にはタンパク質のアミノ酸の配列順序と，RNA として細胞内で働く RNA の塩基の配列，その配列情報の RNA への転写を調節する領域もある．また，何も役割をしていない領域も多くあるが，生物の進化の歴史を知ることもできる．たとえば，筋肉にあるミオグロビンのグロビン遺伝子と赤血球にあるヘモグロビンのグロビン遺伝子は約10億年前に分岐し，さらにヘモグロビン1分子中にあるα鎖とβ鎖グロビン遺伝子は5億年前に分かれたことが DNA の分析より明らかになった．αグロビン遺伝子はさらに重複し

て成体で発現する全く同じ２つの遺伝子と，胚期に発現するζグロビン遺伝子や発現できない偽遺伝子がファミリーを形成している．

（３）鶏と人の DNA の何が異なっているのだろう．

Ans．鶏と人とでは塩基配列が異なるためにできてくるタンパク質のアミノ酸配列が異なっている．しかし，生命維持に必要な極めて大事なタンパク質のアミノ酸配列は共通である．形を決める遺伝子は大分明らかになってきているが，複数の遺伝子が関係し，発生の過程で順次発現してくる．どの遺伝子を何時働かせるかを決める調節領域も異なっている．また，含まれている遺伝子の種類も異なっている．

第９章　酵素実験Ⅰ

（１）実験１で酵素活性のグラフが直線にならないのはなぜか．

Ans．反応の進行と共に基質濃度が減少し，反応速度が低下したためと考えられる．もし基質濃度が充分あれば反応速度は維持される．

（２）実験１の結果と p-ニトロフェニルリン酸の検量線から酵素の初速度を求めなさい．

Ans．例えば，酵素反応15分間で得られた吸光度が0.5mMp-ニトロフェノールを0.5mL使用した時の吸光度と同一であったと仮定すると，$0.5\times10^{-3}\times0.5\times10^{3}=0.25\times10^{-6}$mol（0.25μmol）の p-ニトロフェノールが生成したことになる．酵素は0.07mg/mL を0.1mL 使用したので７μg 含まれており，また反応時間は15分間であったので，初速度は$0.25\times10^{-6}\div7\div15=2.38\times10^{-9}$mol/enz μg/ 分となる．

答　2.38×10^{-6}mmol/enz μg/ 分

（３）この酵素反応で生成物は何か．生成物の１つは反応にどのような影響をおよぼすか．このような酵素反応の調節機構を何というか．

Ans．生成物は p-ニトロフェノールとリン酸．生成物のリン酸が酵素の活性部位に結合して競争阻害剤となる．生成物の濃度が高くなると反応が阻害される負のフィードバック調節である．

（４）糖代謝の中で同じような調節機構を持つ酵素の例を挙げなさい．

Ans．グルコースがグルコース-６-リン酸になる反応でヘキソキナーゼは生成物のグルコース-６-リン酸によって負のフィードバック調節を受ける．

第10章　酵素実験Ⅱ

（１）至適温度が37℃であることの意味は何か？

Ans．生体の中で，酵素が最も働きやすい温度であることを意味している．

（２）至適 pH が7.4であることの意味は何か？

Ans．生体の中で，最も働きやすい pH であることを意味している．

（３）この実験の反応生成物である乳酸をこの酵素の基質として用いることもできる．そ

れはなぜか？

Ans. 乳酸脱水素酵素は，ピルビン酸を基質とした際に，至適 pH は7.5である．それに対し，乳酸を基質とした際には，至適 pH が8.3である．したがって，測定条件により，ピルビン酸，乳酸ともに基質となりえる．

（4）乳酸脱水素酵素（LDH）の生体内での役割は何か？

Ans. LDH は動物細胞の解糖系の酵素のひとつである．十分に好気的でないとき，LDH によりピルビン酸が乳酸に変換される際に，NADH は NAD に酸化され，電子の平衡が維持される．また，血清 LDH 活性は，心筋梗塞の発作後上昇することから，経過観察に有用であるとされている．

第11章　尿成分実験

（1）尿量や尿成分を調べることによってわかる身体の異常にはどのようなものがあるか？

Ans. 尿は腎臓で作られるので，腎臓機能障害の有無を知ることができる．例えばネフローゼ症候群や腎不全などによって尿量が少なくなったり，尿にタンパク質が混じったりすることがある．

（2）飢餓時にも尿素排泄量が高くなるといわれている．なぜか？

Ans. 私たちの体内では糖質，脂質，タンパク質からエネルギーを作り出している．

飢餓時のように摂取食物がない場合，体脂肪や体タンパク質からもエネルギーが産生される．特に，血糖を維持するためにアミノ酸からの糖新生が活発に行われる．したがって，飢餓時にもアミノ酸の最終代謝産物である尿素の排泄量は高くなる．

（3）低タンパク質食群でも尿素排泄量が著しく減らないのはなぜか？

Ans. 尿素は摂取食物に含まれるタンパク質のみの代謝産物ではない．当然のことながらタンパク質を摂取しても摂取しなくても体タンパク質の代謝回転が生じているので，その産物である尿素の排泄量が著しく減少するということはない．

（4）ろ紙でグルコース溶液をろ過したら，グルコースはろ液に含まれるのに，血液を腎臓でろ過した排泄尿に，なぜグルコースは含まれないのか？

Ans. 正常な腎臓の糸球体でろ過された直後の原尿には，タンパク質などの高分子化合物は含まれていないものの，たくさんのグルコースやアミノ酸が含まれている．この点ではろ紙によるろ過と同じ．しかし，グルコースやアミノ酸など体が必要とする低分子化合物は腎尿細管で再び吸収され血液に戻されるので（再吸収），結果的に排泄される尿の中には含まれないことになる．

第12章　動物実験

（1）アミノ酸含有量の異なる A 食品と B 食品のタンパク質栄養価はほぼ同じであるとい

う．アミノ酸評点パターンを参考にしつつ，その理由を考えよう．

Ans．テキストに示したA食品とB食品のアミノ酸スコアを計算すると次の表のようになる．

A食品とB食品のアミノ酸スコア

アミノ酸		Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val	His
アミノ酸評点パターン		194	394	325	156	288	169	46	256	113
A食品	アミノ酸含量	250	500	220	290	580	210	87	380	160
	アミノ酸スコア	129	127	68	186	201	124	189	148	142
		100	100	68	100	100	100	100	100	100
B食品	アミノ酸含量	200	268	340	150	395	200	75	240	125
	アミノ酸スコア	103	68	105	96	137	118	163	94	111
		100	68	100	96	100	100	100	94	100

アミノ酸スコアは，（食品中のアミノ酸含量÷評点パターン中のアミノ酸含量）×100で求められ（上段に示す数値），一般的にその数値が100以上の場合は100として表示される（下段の数値）．

A，B両食品のアミノ酸スコアを計算してみると，A食品のリジン含量は評点パターンの68％しかなく，またB食品においてはロイシン，含硫アミノ酸およびバリンの含量は，評点パターンの68％，96％，94％しか含まれていない．

A，B両食品のアミノ酸スコア（上段の数値）を概観すると，A食品の数値がB食品の数値よりも全般的に高いので，A食品の方がB食品よりも栄養価が高いと考えがちである．しかし，たんぱく質の栄養価は構成するアミノ酸のバランスであり，もっともアミノ酸含量の少ない第一制限アミノ酸で比較されるものである（100以上のスコアを100と表示した下段の数値の方が理解しやすい）．そこでA，B両食品の第一制限アミノ酸のスコアを見ると，アミノ酸の種類は異なるものの，両者とも68であることから，A食品とB食品のたんぱく質栄養価はほぼ同じであることになる（なお，ここに示したA，B食品は，アミノ酸スコアと栄養価との関連性を理解させるために使用した架空のものである）．

（2）栄養評価法としての次の項目を，計算式を交えてまとめてみよう．

①見かけの消化吸収率（apparent digestibility; AD）

真の消化吸収率（true digestibility; TD）

②生物価（biological value; BV）

③正味タンパク質利用率（net protein utilization; NPU）

Ans.

①AD＝（摂取窒素量－糞中排泄窒素量）/ 摂取窒素量×100

TD＝{摂取窒素量－（糞中排泄窒素量－無タンパク食時の糞中排泄窒素量）}/摂取窒素量×100

②BV＝（体内保留窒素量 / 吸収窒素量）×100

③NPU＝（体内保留窒素量 / 吸収窒素量）×消化吸収率（％）×100

第13章　細胞分画

（1）ミトコンドリア画分の定性反応で，なぜ流動パラフィンを重層して，酸素を遮断しなければいけないのか？

Ans. 反応液に酸素が入ると，メチレンブルー（MBH）が酸化されるため，メチレンブルーが酸化型（MB）となり，色が青くなり，本来の定性反応を邪魔するから.

第14章　タンパク質・アミノ酸の定性反応

（1）定性反応の原理を調べてみよう.

Ans. 濃厚塩類による沈殿反応，ビウレット反応に関しては他の章を参照.

ニンヒドリン反応：アミノ酸のアミノ基とニンヒドリンとの結合で青紫色の化合物ができる.

キサントプロテイン反応：芳香環をもつアミノ酸のアミノ基が濃硝酸と加熱された結果，ニトロ基に変わり黄色い色になる.

硫化鉛反応：含硫アミノ酸のシスチン，システインは，アルカリ性で分解して硫黄イオンを生成し，この際鉛イオンが存在すると，黒色の硫化鉛が生成する.

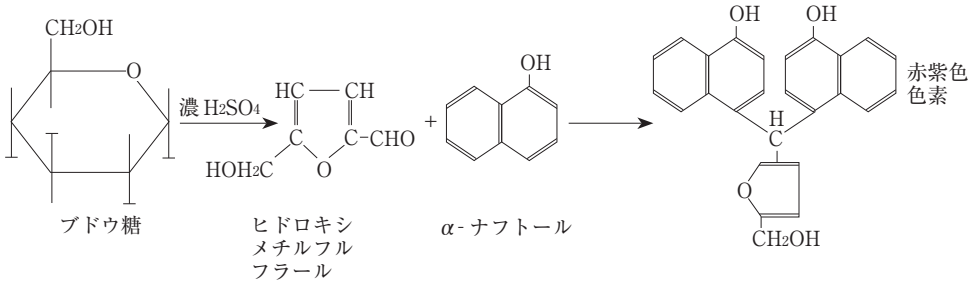
第15章　糖の定性反応

（1）各々の反応がどのようにして起きるか調べてみよう.

Ans.

①モーリッシュ反応

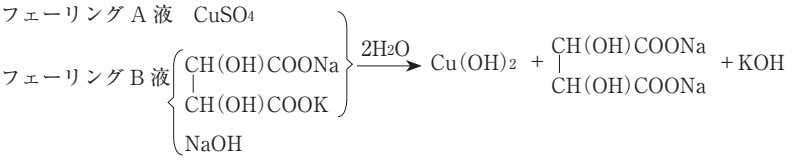
硫酸（H_2SO_4）による脱水反応で糖質からフルフラール誘導体が生じ，これがα-ナフトールと反応して紫色の色素を生じる.

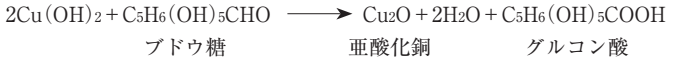


②フェーリング反応

還元糖により2価の銅が還元されて亜酸化銅の沈殿ができる．アルドースは水溶液中で鎖式と環式の間を行き来している．鎖式状態でアルデヒド基が出現するため銅を還元する．フルクトースにあるケトン基には還元性はない．しかし隣の炭素に結合している水酸基との間でケトエノール反応が起き，さらにフルクトースもグルコースに変換される（ロブリー・ドブリュイン転移）ため，還元糖として銅を還元できる.

ロブリー・ドブリュイン転移



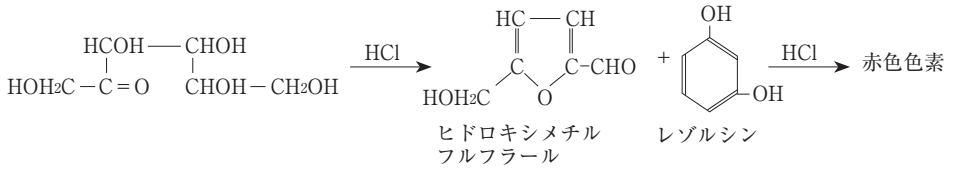


③バーフォード反応

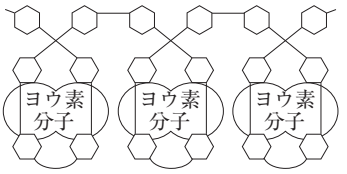
単糖類では銅（Cu^{2+}）が還元されて亜酸化銅の赤沈が生じる．反応時間を長くすると還元性の二糖類でも銅が還元される．

④セリワノフ反応

フルクトースは強酸の存在下でヒドロキシメチルフルフラールとなりレゾルシノールと反応して赤色色素を生成する．



⑤ヨウ素でんぷん反応



（参考文献）

「生化学実験」林　淳三　編　建帛社

「化学大事典」東京化学同人