

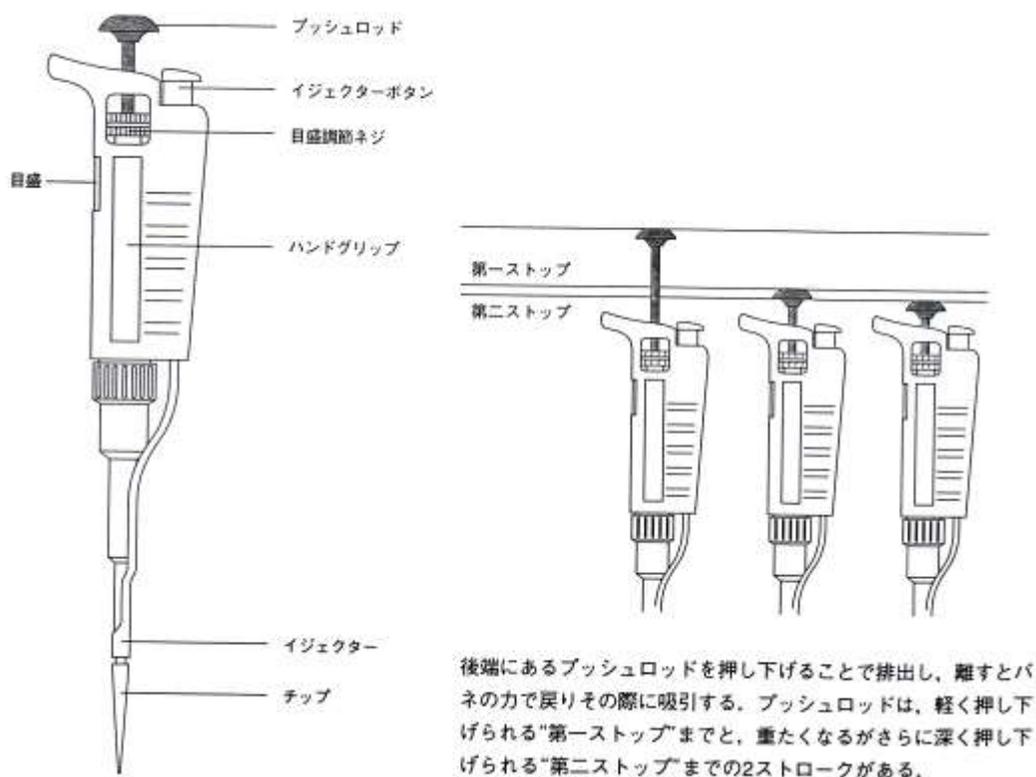
マイクロピペットの取り扱いと生体高分子の定性反応

(担当；佐藤高)

目的

現代生物学の進展において、微量物質の取り扱いは非常に重要である。とりわけ、我々生物を構成する種々の生体高分子（核酸、タンパク質、脂質、糖質）を研究する上では、通常 1mL 以下の微量の体積を取り扱うことが多々ある。ここでは、1mL 以下を正確に分取できるマイクロピペットの取り扱い法について学び、さらに生体高分子のうち、糖質とアミノ酸・タンパク質の検出を行うことを目的とする。

【マイクロピペットの構造】



* 出典 中山 広樹、西方 敬人 (1995) バイオ実験イラストレイテッド①分子生物学実験の基礎 (細胞工学別冊 目で見る実験ノートシリーズ) p. 63 秀潤社

準備

マイクロピペット P-1000(最大 1000 μ L)、P-200 (最大 200 μ L)、P-20 (最大 20 μ L)
チップ (イエロー、ブルー)、1%グルコース液、1%ショ糖液 (スクロース)、
試薬 1 および 2、1%グリシン溶液、1%ニンヒドリン溶液 (注：スポイト使用)、試験管

実験

＜この実験は4人で1班を作り、班ごとに行う。＞

① マイクロピペットの取り扱い

蒸留水をビーカーに適量とる。P-1000 マイクロピペットの先にチップ（ブルー）をつける。ダイヤルを任意の液量にセットする。

※100 μL 測る場合→上から「0, 1, 0」（目盛を10倍した値=P-1000で測り取れる量（ μL ））。壊れるので「1, 0, 0」より大きい方にダイヤルを回さない。

マイクロピペット上部のボタンを一段階目（抵抗がある所）まで押し、静かにチップの先を液面につける。そのまま静かにゆっくりとボタンを離す。液体がチップの中に吸い上げられる。※チップ先端が液面から出ないように目視しながら行う。

任意の容器に注ぐ時には、ボタンを二段階目まで深く押し下げる。ボタンの押し・離し加減により、液体の吸い上げ・注ぎの勢いを調節できる。イジェクタボタンを押し、チップをチップ捨てに捨てる。コンタミネーション（混入）防止のため、チップは扱うサンプルが変わる度交換する。

同様に、P-200、P-20（チップはイエロー）についても、使用の練習をする。

※P-200で100 μL 測る→上から「1, 0, 0」（目盛=測り取れる液量（ μL ））。

壊れるので「2, 0, 0」より大きい方にダイヤルを回さない。

※P-20で10 μL 測る→上から「1, 0, 0」（目盛の1/10=測り取れる液量（ μL ））。

壊れるので「2, 0, 0」より大きい方にダイヤルを回さない。

（注意事項）

・マイクロピペットの落下に注意する。落としたり、ぶついたりして衝撃が加わった場合、点検が必要になるため、必ず申し出ること。

・液体を吸い上げる際に、チップの先が液面から離れると、マイクロピペットの中に液体を吸い込んでしまう。チップの先を液から離さないように、注意しながら操作すること。吸い込んでしまった場合、洗浄のため必ず申し出ること。

・チップをつけたまま、マイクロピペットの先端を上向きにしない。ピペット内に液が逆流するのを防ぐため、先端を水平よりも上に傾けないこと。

・各マイクロピペットの上限以上に、目盛りを回さないこと。

P-1000（最大1000 μL =1, 0, 0）、P-200（最大200 μL =2, 0, 0）、P-20（最大20 μL =2, 0, 0）

これらは故障の原因となりますので、注意してください。
もし注意事項に当てはまった場合は、必ず申し出てください。

② 生体高分子の定性反応

配布した試料 A, B, C が、上記いずれのサンプルに該当するかを、フェーリング反応およびニンヒドリン反応により同定する。試料は下記の溶液のいずれかである。

- ・ グルコース（単糖類）
- ・ ショ糖(スクロース, 二糖類)
- ・ グリシン（アミノ酸）

（原理）

(1) 糖の定性反応（Fehling 反応）

糖の簡便な検出法として、フェーリング反応がある。原理は、硫酸銅に水酸化ナトリウムを加えると、水酸化第二銅を生じる。これを加熱し糖が還元すると、亜酸化銅または水酸化第一銅が析出する。しかし、すべての糖質が反応するわけではない。この反応は、糖のアルデヒド基による還元反応を利用しているので、多糖類は反応しない場合もある。

(2) アミノ酸・タンパク質の定性反応（ニンヒドリン反応）

この反応はアミノ基とカルボキシ基を持つ物質に共通の反応である。アミノ酸はニンヒドリン存在下アルデヒドとなり、ニンヒドリンは還元されて相当するアルコールになる。これと生じた NH_3 と残余のニンヒドリンが縮合して青色の化合物をつくる。

（実験）

- ① 栓付き試験管を、各班当たり 6 本 (A, B, C 各 2 本ずつ) 準備する。試験管にラベルする。
- ② A, B, C の各試料 0.5mL を、マイクロピペットを用いて、該当する試験管にそれぞれ分注する

③ フェーリング反応

- (1) 試験管 A, B, C に、マイクロピペットを用いて、フェーリング試薬 0.5mL をそれぞれ加える。ミキサーで攪拌する。
- (2) 湯浴で 10 分間加熱する。
- (3) 各試験管の色を記録する。

④ ニンヒドリン反応

- (1) 試験管 A, B, C に、スポイトを用いて、ニンヒドリン試薬 50 μL をそれぞれ加える。ミキサーで攪拌する。
- (2) 湯浴で 10 分間加熱する。
- (3) 各試験管の色を記録する。

- ⑤ 上記③, ④の結果から、試料 A, B, C を同定する。

【まとめ】

- ・レポートには、目的、原理、方法、結果、考察、参考文献を記載する(授業中に指示する)。
- ・原理には、マイクロピペットの構造と説明、糖の定性反応原理、アミノ酸・タンパク質の定性反応原理について記載する。
- ・結果には、各試料の反応前と反応後の色の変化について観察し、結果をレポートに書く(いずれも図や写真のみではなく、説明を加える)。
- ・考察は、試料 A, B, C の同定とその根拠について、原理などを引用しながら、実験結果について説明し考察する。
- ・参考文献は、原理や考察等で引用した文献(インターネット不可)を記載する。授業で使用している教科書でもよい。
- ・レポートは各自作成し、次回授業開始前までに提出。他人の写しは、未提出扱い(0点)とする。

この資料およびテキスト(佐藤高担当分)は、下記 HP よりダウンロード
できます。

<https://satokichi2012jp.wixsite.com/biochem/blank>