

魚類の血漿タンパク質の定量実験について

Quantification of plasma protein in fishes

小島綾華 梶村麻紀子
Ayaka KOJIMA Makiko KAJIMURA
(和歌山大学教育学部生物学教室)

2013年10月4日受理

要約

A practical way of sampling fish blood and quantifying protein is proposed for use as teaching material for junior and senior high school biology classes. In addition, the efficacy and areas for improvement are discussed based on a trial lesson in a junior high school using our original worksheet to sample rainbow trout.

はじめに

血液は、物質の運搬や生体防御、体液調節など多くの機能を持ち、生体の恒常性維持に大きな役割を果たす。血液には、多くの種類の血液細胞(血球)が、タンパク質や脂質、無機質等の溶け込んだ液体(血漿)に浮かんでいる。血液凝固を妨げるヘパリンなどの抗凝固剤を加えて遠心すると、上澄み液の血漿と沈殿物の血球に分離できる。多くの高等学校の生物学の教科書や資料集には、血液が分離した状態の図が、血漿や血球のはたらきと共に掲載されている。

血漿成分のほとんどは水で、その次に多いものがタンパク質である。血漿タンパク質のほとんどはアルブミンとグロブリンで、浸透圧の維持、栄養やホルモンの運搬、免疫など生体内で重要な働きをする。また、血漿タンパク質の1つであるフィブリノーゲンについては、高等学校の生物基礎の「血液凝固」で学習する。

高等学校の化学分野では、中和滴定や酸化反応など、ある物質がどれだけ含まれているかを決定する定量実験を学ぶ。一方、生物学分野で行われる実験は、性質を実際に見て確認する定性実験が多く、定量実験は少ない。定量実験では多くの場合、実験結果が数値で示されるため、生徒は数値化したデータを表やグラフに表し、それらをもとに客観的に分析・考察する練習がしやすい。したがって、定性実験とは違う形で、定量実験は科学的な思考力・表現力を育成するために非常に有効であると考えられる。

本稿では、高等学校の生物学分野で取り扱うことのできる定量実験として、魚類の血漿タンパク質の定量方法をまとめた。そして、教育現場で実施しやすいように、材料の入手方法や試薬の価格および実験操作の

詳細な手順を示した。また、生徒へ配布する資料を作成し、それを用いて授業実践を行った。

材料 魚

体長6 cm以上の生体であれば、殺すことなく採血できるが、より大きな魚(15 cm以上)が好ましい。

池や川、海などで採集できる魚(コイ、フナ、カワムツ、アジなど)、ペットショップやホームセンターなどで購入できる魚(キンギョ『姉金』として販売されている)、養魚場で購入できる魚(ニジマス、ヤマメ、アマゴ、アユなど)など多くの魚種が材料となりうる。その他、漁港の市場などでも生きた魚を購入できることがある。

麻酔

バケツ、網、MS222(3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩、Sigma-Aldrich、E10521、5300円)等の麻酔薬

採血および血漿の分離

バット、キッチンペーパー、注射針付きシリンジ(テルモ、SS-02SZ2232、3000円)、ヘパリン(和光純薬、085-00134、4500円)などの抗凝固剤、0.9%生理食塩水、1.5 mLエッペンチューブ、遠心分離機、ピペットおよびピペットチップ

タンパク質の測定

本稿では、TaKaRa Bradford Protein Assay Kit(ブラッドフォード試薬およびタンパク質溶液、タカラ

バイオ、T9310A、7700円)を用いた測定方法を示す。

ブラッドフォード試薬およびタンパク質溶液(2 mg/mL)、吸光度595 nm領域(フィルターがない場合は575~620 nmの間の波長でも可能)が測定できる分光光度計(本稿ではプレートリーダーとマイクロプレートを使用)、蒸留水、1.5 mLエッペンチューブ、ピペットおよびピペットチップ

方法

1. ヘパリンを生理食塩水に溶解する(1000 units/mL)。そのヘパリン溶液を注射器で吸引し、排出する。これにより少量のヘパリンが注射器内に残る。¹⁾
2. タンパク質溶液を用いて5種類の濃度基準溶液(スタンダード)を準備する。まず、エッペンチューブを5本用意し、5本すべてに200 μ Lの蒸留水を入れる。タンパク質溶液(2000 μ g/mL)をピペットで200 μ Lとり、1本目のエッペンチューブに入れて蒸留水とよく混和する。次に、1本目から200 μ Lとり、2本目のエッペンチューブに入れてよく混和する。これを5本目まで繰り返す(図1)。これにより、1000、500、250、125、62.5 μ g/mLのスタンダードが完成する。

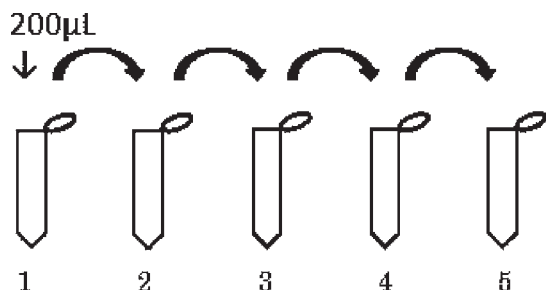


図1 タンパク質のスタンダードの作り方

3. 麻酔液(MS222、0.3 g/L)の入ったバケツに魚を入れ、網ですくい上げて動かない状態になるまで麻酔する。²⁾
4. 魚が滑らないようバットにキッチンペーパーを敷き、その上に麻酔した魚を置く。
5. 魚の背大動脈や尾動脈などの血管は脊椎骨(背骨)の腹側に位置するため、横から背骨の下部へ向かって、注射針の先がかたい骨に軽く当たるように針先を入れる。まず臀鰭付近からはじめ、採血できない時は、頭部へ向かって少しずつ針を入れる位置をかえていく(図2)。³⁾
6. 採血した血液をエッペンチューブに入れ、遠心分離機で遠心する。遠心力1000 rcf以上であれば数分で血液を分離できる。その際、対角線上に同量の水を入れたエッペンチューブを入れて、重心が偏らないようにする。

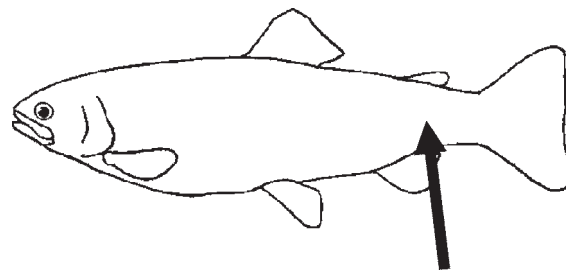


図2 注射針を入れるおおよその位置

7. 上澄み(血漿)だけをピペットで静かにとり、新しいエッペンチューブに入れる。
8. 血漿タンパク質濃度が測定範囲(25~1000 μ g/mL)に入るように、蒸留水で任意の倍率に希釈する。⁴⁾
9. 蒸留水と5種類のスタンダードをマイクロプレートのウェルにそれぞれ4 μ Lずつ入れる。
10. 希釈した血漿4 μ Lをウェルに入れる。
11. 全てのウェルにブラッドフォード試薬を200 μ Lずつ入れる。
12. 波長595 nmにおける吸光度を測定する。
13. 蒸留水およびスタンダードのタンパク質濃度を横軸に、吸光度を縦軸にとってグラフにプロットし、検量線を作成する。
14. 検量線から希釈した血漿タンパク質濃度を求める。その濃度に希釈倍率をかけて実際の血漿のタンパク質濃度を求める。

授業実践の結果

2013年9月和歌山大学教育学部附属中学校3年生の生徒11人を対象に、ニジマスの血漿タンパク質の定量実験および解剖実習を行った(生徒への配布資料1~4)。なお、授業時間が90分間であったため、タンパク質のスタンダード作製と注射器のヘパリン処理は事前に行った。また、生徒全員がピペットを初めて使用することから、使用前にピペットの使い方を指導し、蒸留水を用いて操作方法を練習してもらった。



図3 採血の様子



図4 血漿を取り分ける様子

実験後、生徒に実験についてのアンケートを実施し、11人中10人から回答が得られた。以下にその結果を示す。

(ア)血漿中のタンパク質の定量について

- ・非常に分かりやすかった(3人)
- ・分かりやすかった(6人)
- ・分かりにくかった(1人)
- ・非常に分かりにくかった(0人)
- ・非常に興味深かった(4人)
- ・興味深かった(6人)
- ・興味深くなかった(0人)
- ・全く興味深くなかった(0人)

(イ)血漿中のタンパク質の定量実験の実験操作について

- ・非常に容易であった(0人)
- ・容易であった(5人)
- ・難しかった(5人)
- ・非常に難しかった(0人)

(ウ)ニジマスの解剖について

- ・非常に容易であった(1人)
- ・容易であった(2人)
- ・難しかった(4人)
- ・非常に難しかった(1人)
- ・無回答(2人)
- ・非常に興味深かった(7人)
- ・興味深かった(3人)
- ・興味深くなかった(0人)
- ・全く興味深くなかった(0人)

(エ)分かりにくかった点や改善した方がいいと思うところ

- ・特になし(5人)
- ・時間がもっとあれば良かった(2人)
- ・難しい言葉があって、何か分からないところがあった(3人)

(オ)分かりやすかった点や良かったと思うところ

- ・分からないところなどを、説明してくれたところ。採血のコツを教えてくれたこと。

- ・魚を解剖する事が楽しく感じられたこと。
- ・たくさんの先生が周りにいて教えてくれたのがありがたかったです。ピペットの使い方や練習の時間があつたのは良かったと思います。
- ・なかなかうまく測れなかった時、先生がわかりやすく教えてくれたので安心しました。ニジマスの体のつくりもよくわかりました。
- ・先生たちが詳しく説明してくれたこと。
- ・プリントに手順を書いていてくれていて、プリントで手順を見てから、説明してくれたのが分かりやすかったです。
- ・実験方法の説明で、“何でこうするのか”が分かりやすかった。
- ・道具の使い方を説明してくれたところ。
- ・手伝ってくれたので良かった、実験道具が用意されていてよかった。
- ・タンパク質の求め方の説明が分かりやすくて良かったです。ニジマスの解剖は少ししかできなかったけど、短い時間の間に器官の説明をしてくれて分かりやすかったです。

考察

タンパク質の定量には、ローリー法やケルダール法、電気泳動法など、複数の方法が知られており、それぞれ利点と欠点がある。今回は、色素結合法の1つであるブラッドフォード法を用いて血漿タンパク質の定量を行った。ブラッドフォード法は、通常時は褐色の色素 Coomassie Brilliant Blue G250(クマシーブリリアントブルー)が、タンパク質に結合すると青色に変化する性質を利用したタンパク質の定量法である。この定量法の最大のメリットは、実験操作が簡単であること、試薬を入れて室温で反応させ、10分後に測定できることである。デメリットは、特定のアミノ基に色素が結合するので、タンパク質間で検出のばらつきがあることである。一般には、定量したい種類のタンパク質の物質量や化学的性質を考慮したうえで、複数あるタンパク質の定量方法の中から適切な方法を用いるべきである。しかしながら、中学校や高等学校などの教育現場で行う場合、理論が理解しやすく、手順が複雑でないことが重要だろう。また、反応時間の短さから考えても、ブラッドフォード法が最も適していると考えられる。

本実験の欠点は、機器や薬品が高価なことである。薬品は適切な取扱いにより、複数回の実験に使うことができる。機器では、特に分光光度計が非常に高価で、安価なキュベット式でも10万円程度する。分光光度計がない場合、目視法(標準色列を用いて目視により簡易的に定量する方法)を用いることにより、おおよそのタンパク質濃度を調べることができる。目視法でも、本稿で紹介した吸光光度定量法と同様に、スタンダード

と希釈した血漿にそれぞれブラッドフォード試薬を加えて反応させる。分光光度計を使用する場合より、より多くのスタンダードを用意すると比色しやすい(図5)。



図5 標準色列の例

スタンダード(各100 μL)に、ブラッドフォード溶液(各5 mL)を入れ反応させた。タンパク質濃度は、左から0、100、200、…1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ずつ高くなっている。

今回実践した授業では、注射器やピペットなど生徒が初めて使用する器具が多かったが、怪我をする生徒や、ピペットの中まで誤って水を吸い込む生徒はいなかった。ピペットの練習を含めて、実験や操作の説明が十分にできていたと考えられる。実際、「ピペットの練習する時間が設けられていて良かった」という生徒の意見もあった。

タンパク質量後にニジマスの解剖と内部形態の観察を行ったが、90分間の授業時間のうち定量実験の終了まで70分かかった。そのため、解剖と観察に必要な十分な時間がとれなかった。この点を改善できるよう、以下の授業計画を提案する(図6)。なお、高等学校学習指導要領に基づいて1単位時間を50分とした。

1 時間目(0~50分)

魚から採血する。

採血した血液の一部(数滴)を用い、血球観察用のプレパラートを作製する。

残りの血液を遠心し、血漿と血球に分離する。

(3、4時間目が後日になる場合は、血漿と魚を冷凍保存する)

2 時間目(50~100分)

プレパラートの血球を観察する。

ピペットの使い方を学ぶ。

3 時間目(100~150分)

血漿タンパク質を定量する。

4 時間目(150~200分)

(魚を冷凍保存した場合は、授業の数時間前に冷凍庫から出して室温で解凍する)

外部形態の観察後、解剖して内部形態の観察をする。

図6 授業計画の例

授業では、検量線を引くのに手間取る生徒が何人か見受けられた。スタンダードのタンパク質濃度を示す横軸(x軸)上に、実際に使用した5本のスタンダードの濃度を、わかりやすく示しておくべきであった。この反省を踏まえて、本稿に添付した生徒配布用プリントは、実際に生徒に配った資料のグラフを一部変更し、スタンダードのタンパク質濃度のところにグリッドを引いた。

中学校や高等学校では、学習した内容を実際に目で確かめる実験の割合が高く、実験後の生徒からは「実験がうまく行って良かった」や「実験が失敗して残念だ」という意見が多く出る。しかし、今回の授業の感想の中には、そのような意見はなかった。「初めて使う器具ばかりだったけど、分かりやすく教えてくれて興味深かった」、「初めて魚の心臓を見て、驚いた」、「あまり理科の実験に関心はなかったけど、今回の実験で理科の授業・実験にも関心が持てそう」という意見が大半を占めた。今回の定量実験は、定性実験と比較して、成功したか、失敗したか、という二者択一的な実験結果の評価に結び付きにくい点で、実験の内容や理論・方法論に興味を持ちやすいと考えられる。

注釈

- 1) ヘパリン等の生物由来の薬品はmgではなくunit(単位)表示が一般的である。また、薬品ラベルには10,000 unit/mgなどと、1mg当たりのunit数が表示されている。
- 2) 鰓がゆっくり動いている状態で麻酔液から取り出して採血し、その後速やかに水へ戻すと再び泳ぎだす。したがって、材料の魚を殺すことはない。
- 3) 予備実験では、体長6cmのキンギョから約150 μL 、体長20cmのニジマスから約1000 μL の血液を、失血死させることなく採血できた。
- 4) ニジマスの血漿タンパク質は約25 mg/mlであることから、本実験では100倍に希釈した。

参考文献

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Ganong W.F. 2006. ギャノン生理学、原書22版、562-567。丸善、東京。
- 後藤潔 2009. 生化学実験、24-27。建帛社、東京。
- 鈴木信雄・田畑純・服部淳彦 2009. キンギョ。身近な動物を使った実験1、鈴木範男(編)55-63。三共出版、東京。
- 大地陸男 2007. 生理学テキスト、第5版、233-235。文光堂、東京。
- 西方敬人・真壁和裕 2005. 超実践バイオ実験イラストレイテッド(レッスン1)、17-18。秀潤社、東京。
- 文部科学省・文部省 2011. 高等学校学習指導要領、77-79。東山書房、京都。

魚の血しょう中のタンパク質の定量と解剖

目的： 定量実験および魚の形態的特徴を学ぶ

用意するもの

魚（ニジマス）、バケツ、網、バット、注射器（針とシリンジ）、蒸留水、エッペンチューブ、ピペットとピペットチップ、遠心分離機、プレート、プレートリーダー、タンパク質基準溶液（スタンダード）、ブラッドフォード試薬

手順

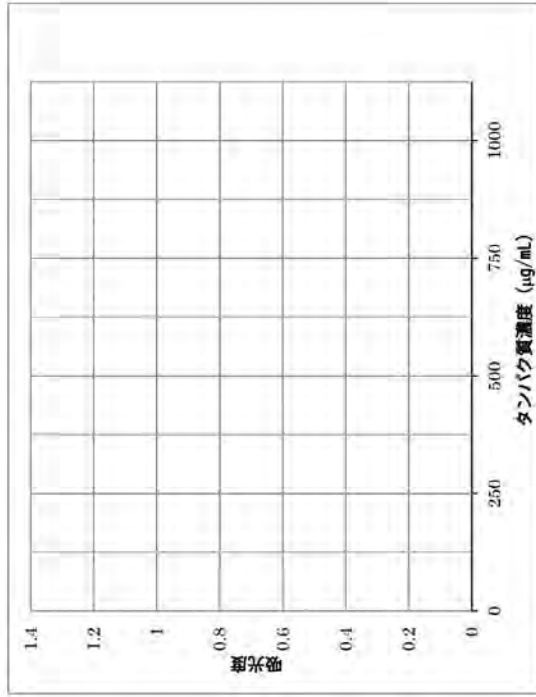
1. 魚を麻酔液の入ったバケツに入れて、網ですくい上げても動かなくなるまで麻酔する。
2. バットに麻酔した魚を置く。キッチンペーパーの上に魚を置くと滑らない。
3. 魚の背大動脈や尾動脈などは背骨の腹側にあるため、横から背骨の下側へ注射針が当たるように針先を入れる。まず、しりびれ付近からはじめ、採血できない時は頭部へ向かって少しずつ針を入れる位置をかえていく。
4. 採血した血をエッペンチューブに入れる。
5. 採血した血をエッペンチューブに入れて遠心する。その際、刻角線上に同量の水を入れたエッペンチューブを入れて、重心が偏らないようにする。
6. 上澄み（血しょう）だけをピペットで静かにとり、新しいエッペンチューブに入れる。
7. 新しいエッペンチューブに、血しょう 10 μ L と蒸留水 990 μ L 入れて、血しょうを 100 倍に希釈する。
8. 蒸留水と 5 種類のスタンダードをプレートのウェルに 4 μ L ずつ入れていく。蒸留水はプレートの A1 と B1 のウェルに、スタンダード 62.5 は A2 と B2 に、スタンダード 1000 の A6 と B6 まで順番に入れていく。その際、スタンダードの濃度の低いものから入れていく。
9. 7 で希釈した血しょう 4 μ L を A7 と B7 のウェルに入れる。
10. A1～A7、B1～B7 のウェルにブラッドフォード試薬を 200 μ L ずつ入れる。
11. プレートリーダーで吸光度を測定する。
12. 蒸留水とスタンダードのタンパク質濃度を縦軸に、吸光度を横軸にとってグラフにプロットし、検量線を作成する。
13. 検量線を用いて希釈した血しょうのタンパク質の濃度を求める。希釈した倍率（100 倍）をかけて、実際の血しょうタンパク質濃度を求める。

資料：生徒配布プリント 1

タンパク質の濃度と吸光度を使って検量線を作成する

吸光度の値を下に書き入れ、その値を使って検量線を作成する。

x	0 μ g/mL (蒸留水)	62.5 μ g/mL	125 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL	1000 μ g/mL
y						



血しょうの吸光度を下に書き入れる。

希釈した血しょうの吸光度

血しょうの吸光度と検量線がぶつかるところを探し、ぶつかったところの x 軸の値を下に書き入れる。

希釈した血しょうのタンパク質濃度
(x 軸の値)


血しょうは 100 倍に希釈されているので、100 をかけて実際の血しょうのタンパク質濃度を求める。

実際の血しょうのタンパク質濃度

μ g/mL

資料：生徒配布プリント 2

➤ **材料と器具**



それぞれの実験組に置かれているもの

- バット…①
- 1.5ml エッペンチューブ…②
- タンパク質基準溶液…③
- 注射器…④
- ビベットとビベットチップ(左から 1000, 200, 20 μ L 用)…⑤
- 蒸留水…⑥
- フラッドフォード試薬…⑦
- プレート…⑧


黒板の前にあるもの

- 魚
- 麻酔液の入ったバケツと網
- 遠心分離機
- プレートリーダー…⑨

資料：生徒配布プリント 3


➤ **ビベットの使い方 ※大切に扱きましょう!!**

1. ビベットの先にビベットチップを差し込む。
2. ビベットのプッシュロッドは2段階押しこむことができる。
3. 1段階目(点線)まで押しこむと、規定量の液体を吸い上げることができる。
4. 液体を出すときは2段階目(直線)まで押しこむと、ビベットチップの中の液体を出し切ることができる。
5. ビベットは丁寧に扱うこと!! プッシュロッドはいきなり離さないこと。



➤ **プレートについて**

右の写真がマイクロプレート(プレート) 横は1-12の12列、縦はA-Hの8列、合計で96個の穴(ウェル)がある。それぞれのウェルにはA1, F5といった番号が付いている。プレートの底面を触らないこと、側面を持つようにする。



➤ **μ (マイクロ) について**

ごく微量の物を表す時に使われる単位の1つ。

G	M	k	m	μ	n
ギガ	メガ	キロ	ミリ	マイクロ	ナノ

1 km (キロメートル) や 1 mm (ミリメートル) と同じように、1 μ m (マイクロメートル) などと表現される。

資料：生徒配布プリント 4