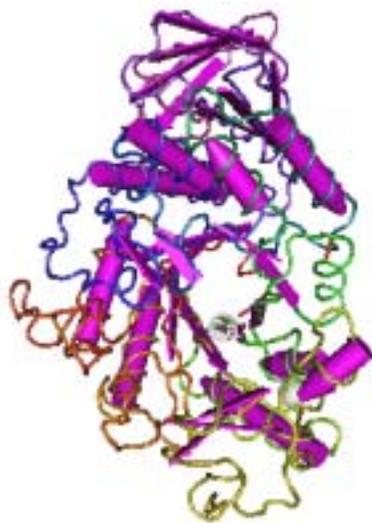


アミラーゼ活性測定キット

入門編



マニュアル

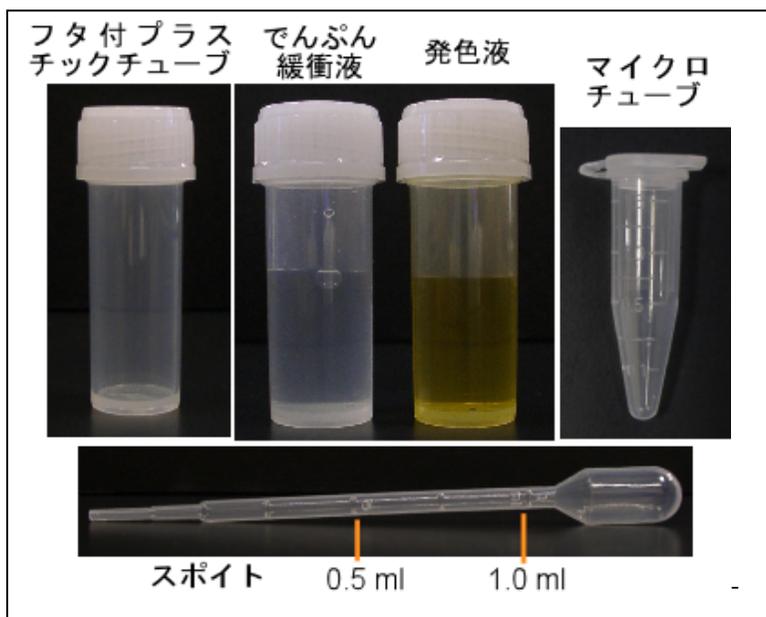
山口大学工学部

無断転載・複製を禁ず

キット内容（4人×10グループ）

マニュアル	1冊	
でんぷん緩衝液 pH6（3 ml）	11本	冷蔵庫（4）保存
発色液（3 ml）	11本	冷蔵庫（4）保存
フタ付プラスチックチューブ	44本	4本×10グループ+予備実験用
袋入りスポイト	11本	だ液用滅菌済み
スポイト	33本	3本×10グループ+予備実験用
マイクロチューブ	11本	だ液採取用

1回の予備実験用を含む



キットに含まれないもの

水（イオン交換水等）
細字サインペン
湯
ピンセット

約 10 ml × グループ分（ビーカー等に用意）
グループ分
なべに湯浴を作る。60 程度。

キットの保存

キットは冷蔵庫で保存してください。実験前にはでんぷん緩衝液は冷蔵庫から取り出し、室温にもどしてください。低温のまま実験を行うと結果に影響します。

アミラーゼ活性測定キットの概要

遺伝子とタンパク質を学ぶことが重要な時代となっています。このキットはタンパク質である酵素について簡単に、しかも深く学ぶことができるキットです。人の唾液のなかにある酵素アミラーゼは、米やパンのでんぷんを分解する能力を持っています。消化酵素と呼ばれるものです。自分の酵素の能力を測定してみると非常に強い活性を示すことがわかります。消化薬などにも含まれるアミラーゼと比較してみるとおもしろいでしょう。また、このキットと遺伝子組換えキットを組み合わせることで遺伝子操作 タンパク質生産 有用酵素活性の利用という遺伝子工学の全貌も理解できます。

このキットではだ液アミラーゼの活性を観察します。さらに、アミラーゼなどの酵素が熱に不安定であることを示す実験を行います。

本キットは高等学校等で教材としての使いやすさを特に配慮しています。

- 1) 安価である。
- 2) 教師の準備がほとんどない。
- 3) 特別な実験機器を必要としない。
- 4) すべての試薬，器具が含まれている。
- 5) 簡単で失敗がない。
- 6) 教師用予備実験用も含まれている。
- 7) 長く保存できる。
- 8) 身近なアミラーゼを利用するので安全で親しみやすい。
- 9) 生物 I と II の教科書との対応が考えられている。
- 10) 工夫が盛り込め、高度な実験への展開も可能である。

シンプルな実験操作で酵素タンパク質の能力を学ぶことができます。実験を通して生物に対する理解が深まり、タンパク質への興味や人類社会におけるバイオテクノロジーの役割を考えるきっかけとなれば幸いです。

だ液アミラーゼ活性の観察

[1グループ分の準備]

キットに含まれるもの

フタ付プラスチックチューブ	4本
マイクロチューブ	1本
個別袋入りスポイト	1本（だ液採取用滅菌済）
スポイト	3本（でんぷん，水，発色液用）
でんぷん緩衝液（pH6）	1本（3 ml）
発色液	1本（3 ml）

用意が必要なもの

水（イオン交換水等）	約 10 ml（ビーカー等に）
細字サインペン	
湯	なべに湯浴を作る。実験時に沸騰させる。
ピンセット	

実験方法

- 1) サインペンでスポイト3本（だ液用ではないもの）に「水」、「でんぷん」、「発色液」と記入する。
- 2) フタ付プラスチックチューブに「1/10 だ液」、「熱処理」、「未処理」、「水」の印をサインペンでつける。
- 3) グループ内の一人のだ液を袋入りスポイト（滅菌済みなので清潔）で採取しマイクロチューブに入れます（写真）。約 0.5 ml を採取する。（マイクロチューブの目盛りでおおまかに測る）
- 4) 採取しただ液をスポイトで 0.5 ml 取り、「1/10 だ液」のフタ付プラスチックチューブに入れる。
- 5) だ液 0.5 ml の入った「1/10 だ液」チューブに水 4.5 ml（イオン交換水がよいが水道水でも構わない）を「水」スポイトで入れ、1/10 に希釈する。
- 6) フタをして混ぜる。

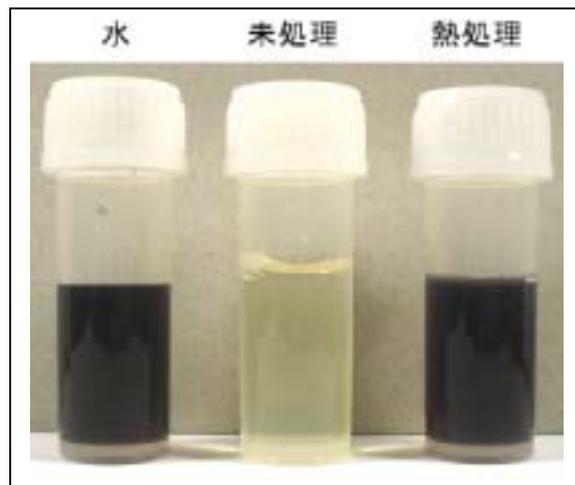


- 7) 1/10 だ液を「熱処理」と「未処理」のフタ付プラスチックチューブ 2 本にそれぞれ 1 ml ずつだ液を採取したスポイトで入れ、フタをする。
- 8) 「熱処理」チューブはフタをして、沸騰水につける。3 分後にピンセットを使って取り出し室温にもどす。やけどをしないように気をつける。
- 9) 「水」チューブに水 1 ml を「水」スポイトで入れる。
- 10) 時計の用意をする。
- 11) でんぷん緩衝液 (pH6) を「でんぷん」スポイトでそれぞれ 1 ml ずつ 3 本のチューブ (熱処理, 未処理, 水) に入れる。入れたら時間を計り、フタをして混合後、5 分間待つ。
- 12) 5 分後に、3 本のチューブに発色液を「発色液」スポイトで 1 ml ずつ入れる。入れたらフタをして軽く混合する。
- 13) 「水」チューブはだ液アミラーゼを入れていないので紫色となる。ヨウ素でんぷん反応によりヨウ素がでんぷんに入り込み紫色を出す。一方、だ液入り「未処理」チューブは透明となるはず。「熱変性」だ液は酵素が変性し、酵素活性がなくなるので紫色となるはず。
- 14) 色の違いを観察する。(吸光度計があれば、波長 660 nm で測定すると定量化もできる。) 各グループの液を比較し、アミラーゼ活性の強弱を考察する。

補足

だ液を段階希釈し、希釈しても紫色が薄くなるアミラーゼが強力な活性を持っていることになる。通常は、100 倍希釈ぐらいでも活性は残る。詳細な比較実験は希釈をするとよい。酵素反応時間も変化させることができる。

この実験により、酵素反応、酵素の熱変性、酵素活性の強弱等を説明できる。



付録

でんぷん緩衝液

- ・ 200 mM Na_2HPO_4 (リン酸水素二ナトリウム Disodium Hydrogenphosphate, MW: 141.96 アルカリ性)
- ・ 100 mM クエン酸 (クエン酸一水和物 Citric Acid Monohydrate, MW: 210.14 酸性)

2つを混ぜることで pH6 の緩衝液とする。

- ・ 1% 可溶性でんぷん (でんぷん・溶性 Starch, Soluble 一級)
- 緩衝液と 1% でんぷん溶液を 4 : 1 に混合。滅菌後, 冷蔵庫保存。

発色液

0.02% I_2 /0.2% KI (よう素 Iodine, よう化カリウム Potassium Iodide)

この溶液はイソジンうがい液などの消毒薬と同じような液。

連絡先

山口大学工学部応用化学工学科
〒755-8611 宇部市常盤台 2-16-1

赤田倫治
星田尚司

TEL : 0836-85-9292
FAX : 0836-85-9201
e-mail : rinji@yamaguchi-u.ac.jp

だ液アミラーゼ活性の観察

遺伝子とタンパク質を学ぶことが重要な時代となっています。この実験では人のだ液のなかにある酵素アミラーゼについて調べます。アミラーゼは米やパンのでんぷんを分解する能力を持っています。消化酵素と呼ばれるものです。

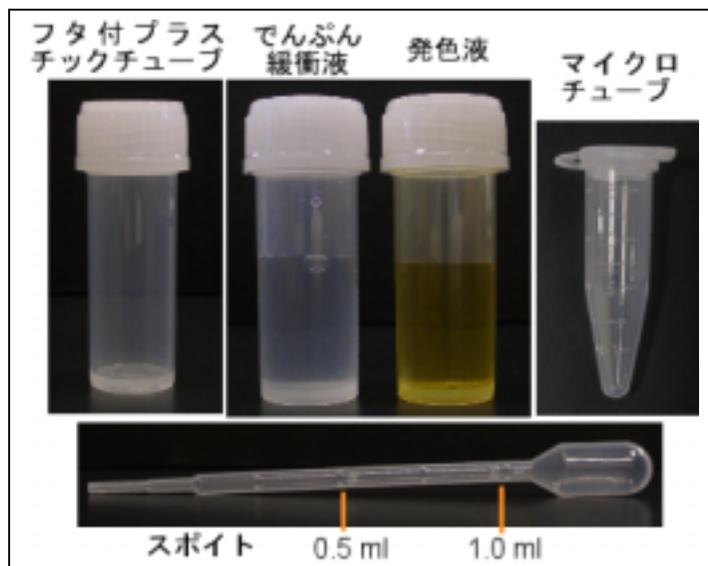
酵素などのたんぱく質はその立体構造が化学反応に重要な役割を持ちます。しかし、立体構造が壊れてしまうことを変性と呼びます。高温ではタンパク質は通常、変性し、もとに戻らない構造になってしまいます。ゆで卵が固まることをイメージしてください。ここでは、酵素が高温で活性を失うことも調べます。

[1グループ分の準備]

フタ付プラスチックチューブ	4本
マイクロチューブ	1本
個別袋入りスポイト	1本（だ液採取用滅菌済）
スポイト	3本（でんぷん、水、発色液用）
でんぷん緩衝液（pH6）	1本（3 ml）
発色液	1本（3 ml）
水（イオン交換水等）	約 10 ml（ビーカー等に）
細字サインペン	

教室に必要なもの
湯
ピンセット

沸騰水（なべ等に準備）



実験

1) サインペンでスポイト3本(だ液用ではないもの)に「水」、「でんぷん」、「発色液」と記入する。

2) フタ付プラスチックチューブに「1/10 だ液」、「熱処理」、「未処理」、「水」のマークをサインペンでつける。

3) ループ内の一人のだ液を袋入りスポイト(滅菌済みなので清潔)で採取しマイクロチューブに入れる(写真)。約 0.5 ml を採取する。(マイクロチューブの目盛りでおおまかに測る)



4) 採取しただ液をスポイトで 0.5 ml 取り、「1/10 だ液」のフタ付プラスチックチューブに入れる。

5) だ液 0.5 ml の入った「1/10 だ液」チューブに水 4.5 ml (イオン交換水がよいが水道水でも構わない)を「水」スポイトで入れ、1/10 に希釈する。

6) フタをして混ぜる。

7) 1/10 だ液を「熱処理」と「未処理」のフタ付プラスチックチューブ 2 本にそれぞれ 1 ml ずつだ液を採取したスポイトで入れ、フタをする。

8) 「熱処理」チューブはフタをして、湯浴につける。3 分間後にピンセットを使って取り出し室温にもどす。やけどをしないように気をつける。

9) 「水」チューブに水 1 ml を「水」スポイトで入れる。

10) 時計の用意をする。

11) でんぷん緩衝液 (pH6) を「でんぷん」スポイトでそれぞれ 1 ml ずつ 3 本のチューブ(熱処理, 未処理, 水)に入れる。入れたら時間を計り, フタをして混合後, 5 分間待つ。

12) 5 分後に, 3 本のチューブに発色液を「発色液」スポイトで 1 ml ずつ入れる。入れたらフタをして軽く混合する。

13) 色の違いを観察する。各グループの液を比較し, アミラーゼ活性の強弱を考察する。