

## 第 3 章

# 植物生化学実験

## 第3章 目次

3.1. 植物の無機成分分析	113	3.1.4. カリウムの定量	122
3.1.1. 全窒素の定量	113	3.1.4.1. 目的	122
3.1.1.1. 目的	113	3.1.4.2. 器具・試薬	123
3.1.1.2. 器具・試薬	113	3.1.4.3. 実験操作	123
3.1.1.3. 実験操作	114	3.1.4.4. 結果の整理	123
3.1.1.4. 結果の整理	116	3.1.5. 廃液処理	124
3.1.2. 硝酸イオンの定量	117	3.1.6. 使用器具一覧	125
3.1.2.1. 目的	117	3.2. 植物細胞の分化全能性とプロトプラスト	126
3.1.2.2. 器具・試薬	118	実験	
3.1.2.3. 実験操作	119	3.2.1. 植物細胞培養	126
3.1.2.4. 結果の整理	120	3.2.2. 脱分化に伴う形質発現の変化の	133
3.1.3. リンの定量	120	観察	
3.1.3.1. 目的	120	3.2.3. プロトプラスト実験	136
3.1.3.2. 器具・試薬	121	3.2.4. 無傷葉緑体の単離と光合成酸素	143
3.1.3.3. 実験操作	121	発生測定	
3.1.3.4. 結果の整理	122		

## 3.1. 植物の無機成分分析

植物は環境中から取り入れたエネルギーと無機物のみを原料として自らの体を作り成長する。植物体の無機成分組成は植物が根から何をどれだけ吸収したかを反映する値であり、それは要求性と吸収選択性における種間差や、作物であれば土壌条件や肥料の与えかたに影響される。したがって植物体の無機成分組成は植物の栄養生理研究や作物の栄養診断において極めて重要な情報である。

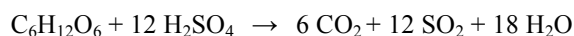
本実験では、無機成分のなかでも作物に多量に必要とされ肥料の三要素といわれる窒素、リン、カリウムの含量測定を行い、生体に含まれる無機成分の分析・定量の基礎を習得する。

### 3.1.1. 全窒素の定量

#### 3.1.1.1. 目的

植物がアンモニウムイオンや硝酸イオンとして吸収した窒素は、同化作用によりアミノ酸、タンパク質、核酸、糖タンパクなど様々な有機化合物に組込まれる。植物による窒素の総吸収量を求めるには、これらの化合物を分解し、含まれる窒素を分析に適した形態に変換しなければならない。

硫酸を用いた生体試料の分解は創始者にちなみケルダール分解と呼ばれる。ケルダール分解では濃硫酸の酸化力、還元力によって有機物を分解し、窒素をアンモニウムイオンとして回収する。硫酸の沸点を上昇させるために分解促進剤として硫酸カリウムと硫酸銅の混合物(9:1)を加え加熱する。硫酸イオンは  $\text{SO}_4 \rightarrow \text{SO}_3 + (\text{O})$  となって酸化力を発揮し、同時に亜硫酸が酸素を奪って還元力を発揮することで有機物を分解する。



ケルダール法では、試料に含まれる硝酸イオンは揮散するため測定できない。このため硝酸イオンを多量に含む試料の場合にはガンニング変法を用いるか、水抽出液の硝酸イオンを別途定量する等の方法をとる。

#### 3.1.1.2. 器具・試薬

4人が1組となり、1台の水蒸気蒸留装置を組み立てて実験を進める。

##### 【器具】

(4人あたり)

丸底フラスコ(1 L 容) 1個、リービッヒ冷却管 1本、クランプ 5個、三脚 1台、スタンド 1台、逆流防止管 1個、ピンチコック 4個、シリコンゴムチューブ(内径 6 mm) 0.5 m、黒アメゴム管(冷却管用) 2 m、ガラス管(内径 6 mm) 1 m、ビュレット(10 mL 容) 1本、ケルダールフラスコ(100 mL 容) 3本、ケルダールフラスコ(200 mL 容) 1本、三角フラスコ(100 mL 容) 6本、乳鉢・乳棒(中) 2組、ホールピペット(10 mL 容) 2本、メスピペット(10 mL) 2本、メスフラスコ(100 mL 容) 3個、ポリ瓶(500 mL 容) 3個、ポリ瓶(100 mL 容) 3個、パラフィルム、封筒 2枚

## 【試薬】

- 分解促進剤

硫酸カリウム 9 と硫酸銅 1 (重量比) を乳鉢でよく混ぜる。

- 混合指示薬

ブロムクレゾールグリーン 0.5 g とメチルレッド 0.1 g をエタノール 100 mL に溶かす。

- 0.02 N 硫酸

1 N 硫酸を 1 L メスフラスコとホールピペットを用いて希釈する。4 人で 0.5 L 調製する。

- 40% (約) 水酸化ナトリウム

予めビーカーにメスシリンダを用いて 0.5 L 脱塩水をとり、マジックインクで水位に印をつける。水を捨てたビーカーに 200 g の水酸化ナトリウムを秤量する (潮解するので秤量は手早く済ますこと)。ドラフト中で、ビーカーを氷水中に漬けて冷却し、ガラス棒で攪拌しながら徐々に水を加え水酸化ナトリウムを溶解させる。発熱と刺激臭に注意すること。溶液は空気中の二酸化炭素を吸収しガラスを徐々に溶かすのでポリ瓶に保存する。4 人で 0.5 L 調製する。

- 4% ホウ酸

体積に対し 4% 重量となるようホウ酸を秤量し、ビーカーにとって水を加え加熱して溶かす。室温まで冷却してからメスシリンダーで定容とする。4 人で 0.5 L 調製する。

### 3. 1. 1. 3. 実験操作

#### ケルダール分解

4 人で植物試料 2 点とブランク 1 点の分析を行なう。植物試料に付着したほこり・汚れを脱塩水で手早く洗い流し、ペーパータオルを用いて水を除く。これを予め重量を測定した封筒に入れ、封筒ごと秤量して新鮮重を測定する。70°C の乾熱器に入れ一晩以上乾燥する。

乾燥試料を封筒ごと秤量した後、試料を乳鉢で粉碎する。試料を取り出した後の封筒も秤量し、乾燥重を算出しておく。

100 mL 容ケルダールフラスコに、粉碎した乾燥試料 200 mg 程度を正確に秤取する。まず薬包紙を天秤皿に載せてほしい 0 点に合わせる。ここに試料を約 200 mg 載せ指示値を読む (A mg)。試料をケルダールフラスコに注意深く移す。薬包紙を精秤する (B mg)。(A-B)mg が実際の秤量値である。ここに分解促進剤 0.5 g を加える。ブランクとして、植物試料なし・分解促進剤のみの試料も用意する。

試料に濃硫酸 10 mL を加え、静かに加熱する。固形物が見えなくなったら強熱し淡黄緑色に至らせる。30 分程度加熱を続けほとんど無色になれば加熱をやめる。ほしい 6 時間かかる。

放冷後、分解瓶を氷水中で冷やししながら徐々に水を加える。冷却した後メスフラスコで 100 mL の定容とする。プラスチック瓶に移して保存する。

#### 水蒸気蒸留

図 1 に従って水蒸気蒸留装置を組み立てる。

三角フラスコ (100 mL 容) に 4% ホウ酸水溶液 10 mL を分注し、混合指示薬を 2 滴加える (ホウ酸キャッチャ

一). 条件を揃えるため、一連の蒸留操作を開始する前に必要な個数を一度に作ってしまうと良い。

### <蒸留操作>

植物試料中にあった窒素はアンモニウムイオンとなって分解試料液に溶けこんでいる。これを蒸留槽(図1のB)において過剰量のアルカリと混合してアンモニアガスとし、水蒸気とともにCへ追い出す。精度と再現性を得るためには、Bで発生したアンモニアがC以外へ逃げることがないように注意して操作する必要がある。同時に、装置の破裂等の事故が起こらぬよう、常に蒸気の出口が確保されていることを確認しつつ操作を行なうこと。

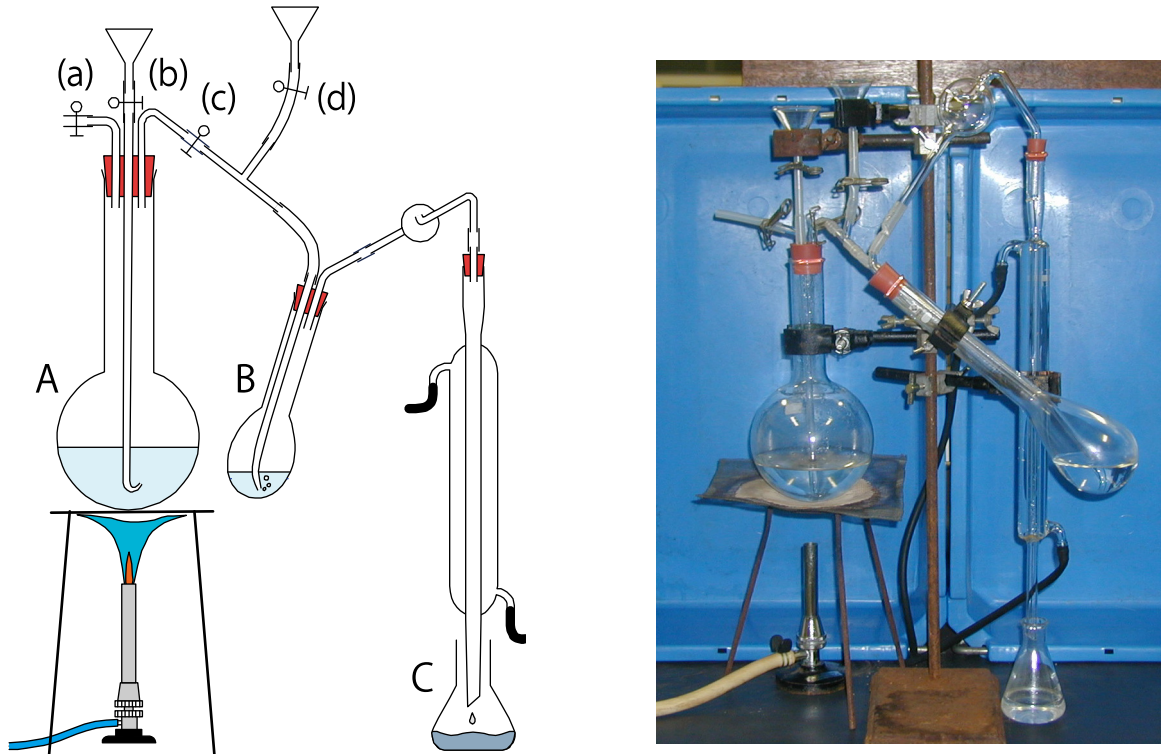


図1 水蒸気蒸留装置の模式図(左)および組立例(右)

準備:

1. (a) (c) (d) 開, (b) 閉の状態、A の水を沸騰させる。
2. ホウ酸キャッチャー(C)をセットする。

試料導入:

3. (d) 開 (c) 閉
4. 分解液 10 mL をホールピペットを用い蒸留槽(B)に導入する。少量の水で洗い込む。
5. 40% 水酸化ナトリウム 10 mL を(d)からメスピペットで加え、少量の水で洗い込む。
6. (d) 閉。

蒸留:

7. (c)開, ただちに (a)閉. B に水蒸気を吹き込む.
8. C に 50 mL 程度の水蒸気が回収されるまで蒸留を続ける.
9. 蒸留が終了したら (a)開, C をはずし受け器を置く.

B の水量が増してきたら, (a)開, (c)閉, (d)開の後に B を外し廃液を捨てる(流しに捨てず貯留する. 廃液処理の項を参照のこと). 蒸留廃液は強アルカリ性, 高温なので注意すること.

A は空焚きにならないよう適宜水を補給する. その際, (a)開・(c)閉, C ははずしておく. これは水を入れることで A の温度が下がって減圧となり, B や C から逆流がおこることを防ぐためである.

### **中和滴定**

水蒸気蒸留で回収されたアンモニアによって C の液性はアルカリ性となる. これを 0.02 N 硫酸で中和滴定し, 必要とした  $H^+$  の量から試料液中に含まれていたアンモニウムイオン量を計算する.

#### **3.1.1.4. 結果の整理**

##### **滴定に際してのヒント**

滴定量の目安は以下のようにして計算できる. 一般的な植物のケルダール窒素含有率は乾物あたり 3~5% である. つまり 1 g の乾物は 30~50 mg のケルダール窒素を含む. 0.2 g を分解して 100 mL にしたとき, 6~10 mg の窒素がその中にあることになる. そのうち 10 mL を蒸留すれば, 窒素 0.6~1.0 mg がアンモニアとして回収されることになる. このアンモニアに由来する  $OH^-$  を酸で中和滴定する.

##### **窒素濃度の算出**

滴定値から, 水蒸気蒸留に供した 10 mL の分解液中にどれだけの窒素が含まれていたかが求められる. これを分解液全体の量に換算し, 用いた植物試料中に含まれるケルダール窒素量(乾物あたり%)を求める.

##### **観測度数が少ない場合の棄却検定法 (Q テスト)**

1. 結果の範囲, すなわち最大値と最小値の差を計算する.
2. 注目している結果とそれに最も近い結果との差を求める.
3. 前段階で求めた差を範囲(最大値と最小値の差)で割る. この値を棄却係数 Q とする.
4. 計算した Q 値が表 1 の値より大きい場合, 注目している結果が, 他の結果に作用していないある因子によって影響されている確率は 90% である.

表 1 90%の信頼限界での Q 値

観測度数	3	4	5	6	7	8	9	10
Q 値	0.94	0.76	0.64	0.56	0.51	0.47	0.44	0.41

例えば 6 回滴定し, 滴定値が 0.75, 0.81, 0.82, 0.84, 0.85, 0.85 だったとする. 0.75 を他の滴定値と一緒にして平均値を出してよいか判定する.

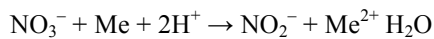
1. 「範囲」は、 $0.85-0.75=0.10$  である。
2. 「最も近い値との差」は、 $0.81-0.75=0.06$  である。
3. 棄却係数  $Q$  は、 $0.06/0.10=0.60$  である。
4. この値は表 1 の値 0.56 より大きいので、危険率 10%で棄却できる。

### 3.1.2. 硝酸イオンの定量

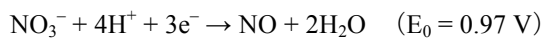
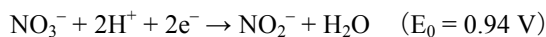
#### 3.1.2.1. 目的

硝酸イオンは作物にとって有効な窒素源であり、吸収された後に体内で還元されアミノ酸、核酸に組み込まれる(還元同化)。また一部の微生物は硝酸を呼吸における最終電子受容体に用い、亜硝酸イオン、一酸化窒素、窒素ガスを放出する(脱窒)。脱窒は、農業では窒素肥料の損失と見なされるが、地球生物圏における窒素循環の観点からは、固定された窒素ガスが大気へ帰還する重要な反応である。近年硝酸イオンの環境蓄積が問題となっているが、これは自然界の脱窒能力を超えた窒素固定を人類が行ってきたためである。今後、環境の富栄養化を防ぎつつ作物生産を増加させるためには、化学肥料施肥量を削減し、人為的に固定された窒素が新たに窒素循環サイクルに流入する割合を抑制していかなければならない。

本実験では植物体や環境水に含まれる硝酸イオンを測定する。植物体に含まれる硝酸イオンは根から吸収されたが生育に用いられなかった(還元同化されなかった)画分であり、余剰の窒素に相当する。硝酸イオンを直接定量する方法としては比色法、イオンクロマトグラフィー法があるが、感度は高くない。高感度検出・定量には本実験のように硝酸イオンを金属により還元して亜硝酸イオンとし、亜硝酸イオンをジアゾ法で定量する方法が用いられる。



硝酸イオンから亜硝酸イオン、硝酸イオンから一酸化窒素への標準酸化還元電位は以下のとおりである。



還元の種類は使用する金属の種類、溶液の pH、金属表面の活性に依存する。本実験の目的を達成するには、 $\text{NO}_3^-$ を $\text{NO}_2^-$ に定量的に変換し、かつ NO までは還元しない条件を選択する必要がある。ここではカドミウムと塩化アンモニウム緩衝液を使用する。塩化アンモニウムは pH を一定に保つとともに溶解してくるカドミウムの錯化剤として機能し、カラムを新鮮な状態に保つ。

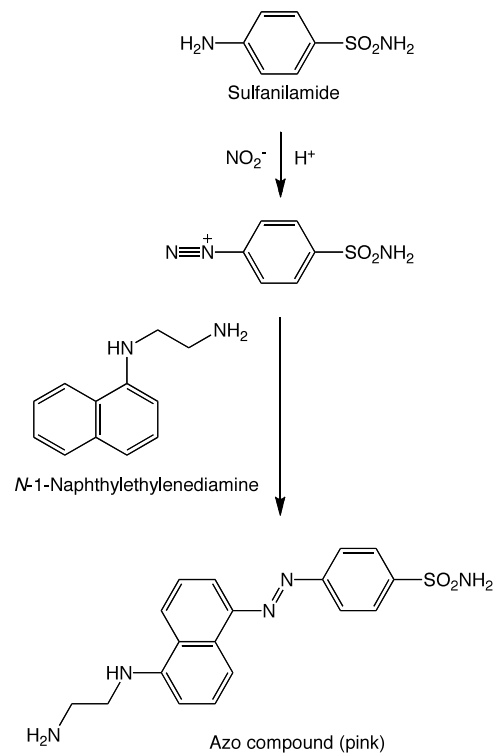
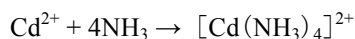
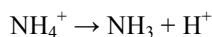


図 2 亜硝酸イオン定量のためのジアゾカップリング反応

生成した亜硝酸イオンはスルファニルアミドと反応してジアゾニウムイオンを生じ、さらにナフチルエチレンジアミンとのカップリングによりピンク色のアゾ色素を与える。この色素を 540 nm で比色する。

### 3.1.2.2. 器具・試薬

#### 【器具】

4人で1本のカドミウムカラムを使用する。

カラム 1本, ピンチコック(スクリュー式) 1本, シリコンチューブ 3~4 cm, グラスウール 少量, クランプ 1個, スタンド 1本, ビーカー(100 mL 容) 2個, ビーカー(200 mL 容) 1個, ポリ瓶(100 mL 容) 2個, ポリ瓶(500 mL 容) 1個, メスフラスコ(100 mL 容) 6個, 比色びん(50 mL 容) 10個, ワッセルマン試験管 2個, ビー玉 2個, ホールピペット(5 mL 容) 1本

#### 【試薬】

- 硝酸態窒素標準液原液(40ppm)

硝酸カリウム( $\text{KNO}_3$ ) 2~3 グラムを 110°C で 4 時間乾燥させる。デシケーター中で放冷した後、0.2889 g を秤量する。ビーカーにいれ、脱塩水で溶かす。溶けたら 1 L のメスフラスコにうつす。ビーカーを脱塩水でゆすぎ、洗液もメスフラスコにうつす。脱塩水で 1 L 定容にする。この溶液は 1 mL 中に 40  $\mu\text{g}$  の硝酸態窒素を含む。実際の  $\text{KNO}_3$  秤量値からファクターを計算し、容器に書いておく。

- 亜硝酸態窒素標準液原液(2ppm)

調製したものを提供する。この溶液は 1 mL 中に 2  $\mu\text{g}$  の亜硝酸態窒素を含む。

以下の試薬は 4 人で一式作成する。

- 塩化アンモニウム緩衝液(pH 8.5)

塩化アンモニウム 35 g を 200 mL 容のビーカーにとり、100 mL の脱塩水を加えて溶かす。pH メータを使い、アンモニア水(28%)で pH 8.5 とする。ドラフト中で作成すること。

- カラムバッファー(50 倍希釈塩化アンモニウム緩衝液 使用当日に調製する)

塩化アンモニウム緩衝液 20 mL を脱塩水で 1 L に希釈する。

- 活性化溶液(使用当日に調製する)

カラムバッファー 100 mL と 40ppm 硝酸態窒素水溶液(標準液原液) 5 mL を混合する。

- $\text{NO}_3\text{-N}$  標準液系列(0, 0.4, 0.8, 1.6ppm)

100 mL 容メスフラスコに、 $\text{NO}_3\text{-N}$  標準液原液(40ppm)を 0, 1, 2, 4 mL はかりとる。塩化アンモニウム緩衝液を 2 mL ずつ加える。脱塩水で 100 mL にメスアップする。

- スルファニルアミド液

濃塩酸 20 mL に脱塩水を加えて 100 mL とする(2.4 N 塩酸。ドラフト中で調製すること)。スルファニルアミド 0.5 g を 2.4 N 塩酸 100 mL に溶かす。冷蔵保存する。



- *N*-(1-ナフチル)-エチレンジアミン液

濃塩酸 1 mL に脱塩水を加えて 100 mL とする (0.12 N 塩酸. ドラフト中で調製すること). これに *N*-(1-ナフチル)-エチレンジアミン二塩酸塩 0.3 g を加えて溶かす. 瓶をアルミ箔で包み遮光し, 冷蔵保存する.

### 3. 1. 2. 3. 実験操作

#### 植物試料中の硝酸イオンの抽出

粉碎試料約 100 mg をワッセルマン試験管に正確にはかりとり, 脱塩水 5 mL を加えタッチミキサーで混合する. ビー玉でふたをし, 沸騰湯浴中で 10 分間加熱する. 室温まで放冷しパラフィルムでふたをしてよく混ぜた後, 遠心する. 遠心上清 0.5 mL 及び塩化アンモニウム緩衝液 2 mL を 100 mL 容のメスフラスコにとり, 脱塩水で定容とする.

#### カドミウムカラム作成

カラムの先にシリコンチューブを付け, チューブにピンチコック (スクリュー式) をつける. カラムの底にガラスウールを詰め, カラムをクランプで支柱につける. ピンチコックを閉じ, 脱塩水をカラムの半分くらいまで入れておく. スパテラで試薬ビン中のカドミウム粒をカラム中の水の中に落としていき, 5~6 cm の長さ (カラムの半分くらいになるまで) 詰める. 空気酸化を防ぐため, カドミウム粒子は常に水につかっているようにする.

#### カラムの活性化

カラムの出口をビーカーで受け, カラム上面の水をカドミウム表面から 1~2 mm の位置まで抜く. 活性化溶液をカラムに流す. 溶液を加えるときは駒込ピペットを使い, カラムの内壁を伝わすようにしながらそっと加える. 最初は 3 mL ほど加え, カドミウムの表面近くまで水位が下がったら再び活性化溶液を加える. この操作を3回繰り返さず (カラム中の溶液が効率よく入れ替わるようにするため). その後はカラムいっぱい活性化溶液をいれ, 水面が下がってくれば継ぎ足しながら, 流していく. 水面がカラムの上端からカドミウムの表面まで 1 分くらいでおりてくる程度の速さで流れるようにピンチコックの緩め方を調節する. 作った活性化溶液全量を流す. 次に, カラムバッファー 100 mL を同様にしてカラムに流す. カラムから出てきた溶液はカドミウムイオンを含んでいるので流しに捨てず所定の廃液溶液に貯留する.

#### カラムによる硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元

カラムの水面をベッド表面の直上まで下げておく.

カラムの出口を比色びんで受ける.  $\text{NO}_3\text{-N}$  標準液 (0ppm) 5 mL をホールピペットでとってカラムに添加する. ゆっくり溶出させ, 水面がカドミウムベッド表面のすぐ上まできたら, カラムバッファーを 3 mL くらい添加してゆっくり溶出させる. 少量を添加して流す操作を何回か行った後は, カラムいっぱいカラムバッファーを入れ溶出させる. 溶出液が比色びんの秤線の下, 約 1 cm の位置まで溜まるまで続ける. ピンチコックを閉め比色びんを外す. カラムバッファーで定容とする.

以上の操作を残りの  $\text{NO}_3\text{-N}$  標準液と植物試料抽出液希釈液についても行なう. 時間があれば環境水の硝酸イオンを測定してみる.

## **ナフチルエチレンジアミン吸光度法による亜硝酸の比色定量**

試料液(カラム溶出液またはNO<sub>2</sub>-N標準液系列\*) 50 mLを入れた比色瓶に、スルファニルアミド液 1 mLを加える。パラフィルムでふたをして転倒混和した後 5 分間放置する。

N-(1-ナフチル)-エチレンジアミン液 1 mLを加える。パラフィルムでふたをし、転倒混和する。20分間放置した後、540 nm の吸光度を測定する。測定は 2 連で行なう。

\* NO<sub>2</sub>-N 標準液系列:比色瓶にNO<sub>2</sub>-N標準液原液(2ppm)を0, 1, 2, 4 mLと塩化アンモニウム緩衝液 1 mLをとり、脱塩水で 50 mL 定容とする。

### **3.1.2.4. 結果の整理**

#### **カラムの還元率の算出**

吸光度測定結果からNO<sub>2</sub>-N標準液の検量線、NO<sub>3</sub>-N標準液の検量線を作成し、2つの検量線の勾配の比からカラムの還元率を求める。操作が適切であれば還元率はほぼ 100%となるはずである。

#### **植物試料中の硝酸イオン含有率**

検量線から抽出液中の硝酸態窒素含有率を求め、植物試料乾物あたりの硝酸態窒素含有率(乾燥重あたり%)を算出せよ。前節の結果と併せ、ケルダール窒素と硝酸態窒素の合計に占める硝酸態窒素の割合を求めよ。

新鮮重あたりの硝酸イオン含有率(mg硝酸イオン/kg新鮮重)を算出せよ。また、乾燥前の新鮮試料中には水、硝酸イオンが一様に分布していたと仮定して、組織中の硝酸イオン濃度(mM)を計算せよ。

### **3.1.3. リンの定量**

#### **3.1.3.1. 目的**

植物は土壌からリン酸の形でリンを吸収する。吸収されたリン酸は種々の有機化合物とリン酸エステル(核酸、リン脂質、糖リン酸等)を形成する。一部は無機リン酸のまま液胞に貯蔵される。植物の全リン含量を測定するには、リン酸エステル化合物を分解し無機リン酸に変換する必要がある。そのための分解(灰化)法には様々な方法があるが、ここではケルダール分解によるものとし、窒素の定量(3.1.1 節)に用いた分解液をリン酸の定量にも用いる。

定量にはモリブデンブルー法を用いる。リン酸は酸性条件下でモリブデン酸イオンと反応して黄色のリンモリブデン酸錯体を作る。



この錯体をアスコルビン酸で還元するとモリブデンの一部が+5 価となり濃青色を呈する。またこの際アンチモン(Sb)が共存するとモリブデンの一部がSbに置換された錯体が形成され、最大発色に至るまでの時間が短縮される。このようにして生成する青色錯体(モリブデンブルー)の 880 nm における吸収を利用してリン酸を定量する。

### 3.1.3.2. 器具・試薬

#### 【器具】

(4人あたり)

ビーカー(100 mL 容) 3個, ビーカー(200 mL 容) 1個, ポリ瓶(100 mL 容) 1個, 試験管( $\phi$ 17.5×130 mm) 24本, マイクロピペット(200  $\mu$ L 容, 1000  $\mu$ L 容) 各1本, メスシリンダ(100 mL 容) 1本, メスフラスコ(1 L 容) 全体で数個.

#### 【試薬】

- リン酸標準液原液(50ppm)(当番が作成)

リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2~3 グラムを 110°C で 4 時間乾燥させた後デシケーター中で放冷する. 0.2197 g を秤量する. ビーカーにいれ, 脱塩水で溶かす. 溶けたら 1 L のメスフラスコにうつす. ビーカーを脱塩水ですすぎ, 洗液もメスフラスコにうつす. 脱塩水で 1 L 定容にする. 実際の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  秤量値からファクターを計算し, 容器に記しておく.

- 5ppm P 標準液

50ppm P 標準液をホールピペットとメスフラスコを用い脱塩水で希釈する.

- 4.5 M 硫酸

濃硫酸 25 mL をビーカーに取り, 別のビーカーに取った脱塩水 50 mL の中に徐々に加える(発熱に注意). 放冷後メスシリンダに移し, 脱塩水を加えて 100 mL とする.

- 酸性モリブデン酸溶液

モリブデン酸アンモニウム(七モリブデン酸六アンモニウム四水和物:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 2.5 g を 100 mL ビーカーに取り, 30 mL の脱塩水を加えて溶解させる. 次に酒石酸アンチモニルカリウム 0.1 g を加え溶解させる. 完全に溶解したら 70 mL の 4.5 M 硫酸を加え混和する. 保存する場合は褐色びんに入れ冷蔵する(数ヶ月安定).

- 酸性アスコルビン酸溶液

アスコルビン酸 1.0 g をビーカーにとり 5 mL の脱塩水に溶かす. 溶解したら, 5 mL の 4.5 M 硫酸を加える. 保存する場合は, 遮光して冷蔵する.

- 1 N NaOH

水蒸気蒸留に用いた 40%水酸化ナトリウム水溶液を脱塩水で 10 倍に希釈する.

### 3.1.3.3. 実験操作

#### 標準液および試料液の作成

- 標準液: 5ppm P 標準液を 0, 0.2, 0.5, 1 mL 試験管に取り脱塩水を加えて 5 mL とする.

- 試料液 A: ケルダール分解試料(植物試料およびブランク, 100 mL にフィルアップしたもの) 0.2 mL と 1 N NaOH 0.7 mL を試験管に取り, 脱塩水を加えて 5 mL とする. NaOH を添加するのは試料の酸濃度を下げ呈色反応の阻害を防ぐためである. 酸濃度が概ね 0.1 N 以下であれば呈色に影響しない. 分解試料を 0.1 mL だけ用いて測定する場合は 1 N NaOH を 0.35 mL とする.

- 試料液 B: 乾燥植物試料約 100 mg をワッセルマン試験管に正確にはかりとり、脱塩水 5 mL を加えふりまぜる。ビー玉でふたをし、沸騰湯浴中で 10 分間加熱。室温まで放冷しパラフィルムでふたをしてよく混ぜた後、遠心する。遠心上清 50  $\mu$ L に脱塩水を加え 5 mL とする。

### 発色操作

標準液、試料液 5 mL に対して酸性モリブデン酸溶液 0.1 mL を加え混合する。次に酸性アスコルビン酸溶液 0.1 mL を加え混合する。5 分以上放置した後、880 nm の吸光度を測定する。測定は 2 連で行なう。

### 3. 1. 3. 4. 結果の整理

標準液と試料液の吸光度から試料液のリン濃度を求める。試料液 A の測定値は全リン、試料液 B の測定値は無機リン酸によるものとして、それぞれ植物試料中の含有率(乾燥重あたり%, Pとして)を求めよ。また、乾燥前の新鮮試料中には水、無機リン酸が一様に分布していたと仮定して、組織中の無機リン酸濃度(mM)を計算せよ。

## 3. 1. 4. カリウムの定量

### 3. 1. 4. 1. 目的

カリウムは植物細胞では大部分イオン( $K^+$ )として存在する。 $K^+$ は細胞質においては最も多量に存在するカチオンであり、pH・浸透圧調節や膜電位形成などに重要な役割を果している。本実験では発光分析法の一種である炎光分析により植物体のカリウム含量を測定する。

試料を高温の炎中や炉で加熱すると成分元素が原子化し原子蒸気が生成する。これに光を照射すると、原子は準位間エネルギー差に相当するエネルギーを持つ波長の光を吸収し、基底状態から励起状態に遷移する。この現象を原子吸光という。また逆に、熱エネルギーを吸収し励起された原子がエネルギー差に相当する光を放射し基底状態へ戻る現象を原子発光(炎光)とよぶ。基底-励起状態の準位間エネルギー差は原子によって異なるため、吸光あるいは発光の波長スペクトルは各原子に固有である。また吸光・発光の強さは原子の濃度に比例しランバート-ベールの法則が成り立つ。従って特定波長における吸光・発光の程度を測定することにより、特定の元素の定量分析を行なうことができる。いずれの方法も検出限界は ppb( $ng\ g^{-1}$ ) オーダーで微量分析に適する。Na, K のようなアルカリ金属の定量には炎光分析法を用いることが多い。

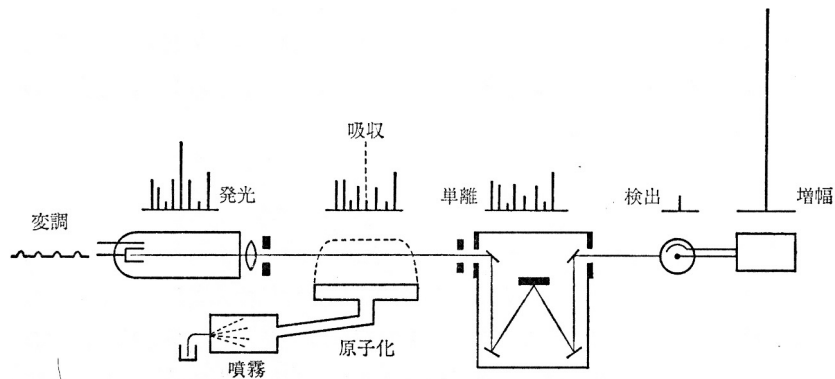


図2 原子吸光分析装置の構成(鈴木正巳『原子吸光分析法』共立出版 1984より引用)

### 3.1.4.2. 器具・試薬

#### 【器具】

(4人あたり)

ワッセルマン試験管 2本, メスフラスコ(100 mL 容)2個, マイクロピペット(200  $\mu$ L 容)

### 3.1.4.3. 実験操作

植物試料の熱水抽出液(遠心上清・硝酸イオン測定 of 項参照)0.2 mL をメスフラスコにとり脱塩水で 100 mL とする. この試料液 10 mL をワッセルマン試験管に分注し提出する(試験管に番号・名前を記入すること). 試料および標準液(2, 4, 6, 8, 10ppm K)を原子吸光光度計のオートサンプラーにセットし, 測定を行なう.

### 3.1.4.4. 結果の整理

標準液の測定値から標準曲線を作成し, 試料液のカリウム濃度を求める(炎光分析の検量線は直線ではなく上に凸の曲線となる). 得られた値から植物試料のカリウム含有率(乾燥重あたり%)を算出せよ. また, 乾燥前の新鮮試料中には水, カリウムが一樣に分布していたと仮定して, 組織中のカリウムイオン濃度(mM)を算出せよ.

表 2 原子吸光分析法による各元素の分析波長と検出限界

元素	波長 (nm)	検出限界 ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	元素	波長 (nm)	検出限界 ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	元素	波長 (nm)	検出限界 ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )
Ag	328.1	0.0005	Hg	253.7	0.5	Rh	343.5	0.03
Al	309.3	0.1	Ho	410.4	0.3	Ru	349.9	0.3
As	193.7	0.2	In	303.9	0.05	Sb	217.5	0.2
Au	242.8	0.02	Ir	264.0	2	Sc	391.2	0.2
B	249.8	6	K	766.5	0.005	Se	196.0	0.5
Ba	553.6	0.05	La	550.1	2	Si	251.6	0.1
Be	234.9	0.002	Li	670.8	0.005	Sm	429.7	5
Bi	223.1	0.05	Lu	331.2	3	Sn	224.6	0.06
Ca	422.7	0.002	Mg	285.2	0.0005	Sr	460.7	0.01
Cd	228.8	0.005	Mn	279.5	0.003	Ta	271.5	6
Co	240.7	0.005	Mo	313.2	0.1	Tb	432.6	2
Cr	357.9	0.005	Na	589.0	0.005	Te	214.3	0.3
Cs	852.1	0.05	Nb	334.4	5	Ti	364.3	0.2
Cu	324.7	0.005	Nd	463.4	2	Tl	276.8	0.8
Dy	421.2	0.4	Ni	232.0	0.005	V	318.4	0.04
Er	400.8	0.1	Os	290.9	1	W	400.9	3
Eu	459.4	0.2	Pb	283.3	0.01	Y	407.7	0.3
Fe	248.3	0.005	Pd	247.6	0.02	Yb	398.8	0.04
Ga	287.4	0.1	Pr	495.1	10	Zn	213.6	0.002
Gd	368.4	4	Pt	265.9	0.1	Zr	360.1	5
Ge	265.2	1	Rb	780.0	0.005			
Hf	307.3	15	Re	346.0	1.5			

検出限界:バックグラウンド(ゼロ吸光)のノイズ変動の標準偏差の 2 倍(信頼度 95%)もしくは 3 倍(信頼度 99%)に等しいシグナルを与える元素濃度

### 3.1.5. 廃液処理

1. ケルダール分解液には分解促進剤として添加した銅イオンが含まれている。分解液 100 mL あたり 0.5 g 分解促進剤を使用するので  $0.5 \times 0.1 \times 63.5 / 249.5 = 0.0128$  g で濃度は 128ppm になるので廃棄せずに貯留する。蒸留後の強アルカリ性廃液に含まれる量は 1 回の蒸留に分解液 10 mL 供試し水酸化ナトリウムなどで 3 倍程度に希釈されるので 40ppm 程度となる。これも貯留する。
2. カドミウムを含む溶液はすべて貯留する。
3. モリブデンブルー法に用いた廃液はモリブデン、アンチモンを含むので貯留する。
4. その他、重金属を含まない廃液は pH 調整の後に廃棄する。重金属廃液として処理する必要のない廃液を重金属廃液に混入させないこと(処理が必要な廃液の体積を徒に増やすことはエネルギーと費用の無駄である)。

### 3.1.6. 使用器具一覧

	個数		
	2人あたり	4人あたり	50人あたり
乾熱器			1
多本架卓上遠心機			4
pHメータ			5
丸底フラスコ 1 L		1	
三角フラスコ 100 mL		6	
サンプル瓶(ポリ製) 100 mL	4		
サンプル瓶(ポリ製) 500 - 1000 mL		4	
カラム		1	
ビー玉	1		
比色瓶 50 mL		10	
メスシリンダー 100 mL	2		
メスシリンダー 500 mL			5
メスシリンダー 1 L			5
メスフラスコ 1 L			5
メスフラスコ 100 mL		8	
ビーカー 1 L			20
ビーカー 100 mL	2		
ビーカー 200 mL		1	
ケルダールフラスコ 100 mL	3		
ケルダールフラスコ 200 mL		1	
ワッセルマン試験管	3		
試験管(φ 17.5x 130 mm)	20		
マイクロピペット(1000 μL 容)	1		
マイクロピペット(200 μL 容)	1		
ホールピペット 10 mL	2		
ホールピペット 5 mL	2		
メスピペット 10 mL	2		
駒込ピペット 3 mL	2		
ビュレット 10 mL	1		
ビュレット台	1		
乳棒・乳鉢(中)	1		
ロート(小)	2		
リービッヒ冷却管		1	
逆流防止管		1	
T字管		1	
ピンチコック		5	
ピンチコック(スクリュー式)		1	
ガスバーナー		4	
アスベスト金網		4	
三脚		4	
スタンド		4	
クランプ		6	
ゴム管		1 m	
ガラス管		1 m	
シリコンチューブ		6 m	
アルミフویل			5
パラフィルム			2
グラスウール			1
軍手	2		
植物体乾燥用封筒	1		

## 3.2. 植物細胞の分化全能性とプロトプラスト実験

外来遺伝子を真核生物に導入する際、単細胞の酵母の他に、多細胞生物である動植物培養細胞、および動植物個体をそのホストとすることが可能である。ここでは、多細胞生物である植物を遺伝子導入実験のホストと想定し、そのための植物材料の無菌的な取り扱いを習得する。また、カルス誘導や組織再分化の実験を通じて、統合的な遺伝子発現制御によるダイナミックな変化、すなわち植物細胞の脱分化の様子、並びに未分化なカルス塊からの植物体の再生を観察する。さらに、植物組織から細胞壁を持たないプロトプラストを単離する技術に習熟する。

### 3.2.1. 植物細胞培養

植物細胞培養法の確立により、優良形質を持った植物体の大量繁殖、ウイルスフリー株の育成、耐病性など新しい特性を持った植物体の試験管内選抜、などが早くから実用化され、最近では遺伝子操作技術により、有用な形質を導入した形質転換植物も市場に出回るようになってきている。このような植物のバイオテクノロジーを可能にしているのは、植物細胞の持つ分化全能性 (totipotency) である。すなわち、タバコ等の植物組織を無菌条件下で、適当な植物ホルモン (オーキシシンとサイトカイニン)、無機塩、糖を含む培地に置床すると、細胞は分裂を開始し、脱分化 (dedifferentiation) した不定形のカルス (callus) と呼ばれる細胞集塊を形成する。またサイトカイニン濃度が高い条件では不定芽 (adventitious shoots) が、一方ホルモンフリーやオーキシシンのみを含む培地上では不定根 (adventitious roots) が分化する。これらから植物個体の再生が可能となる。この様に植物細胞は培養により脱分化状態から再分化 (redifferentiation) する可塑性を持っている。なお、培養条件によっては、培養組織から直接不定芽や不定根形成が起こる場合や、ニンジンのようにカルスをホルモンフリー培地に移植することで、直接不定胚の形成 (somotic embryogenesis) が起こる場合もある。

#### (1) 培地作成

植物細胞は適当な植物ホルモン、無機塩、糖存在下で細胞分裂、分化を行う。ここでは最もよく用いられている Murashige-Skoog 無機塩培地 (3%ショ糖を含む) を基本培地とし、種々のホルモン組成 (A, B, C) における細胞の応答を調べる。(なお、自分で考えてこれ以外の組み合わせの培地を作成してもよい。)

- 0 : ホルモンフリー
- A : オーキシンのみ
- B : オーキシシン+サイトカイニン
- C : サイトカイニンのみ

(オーキシシンにはナフタレン酢酸, サイトカイニンにはベンジルアデニンを使用)

各人が各々の培地を 4 本ずつ (無菌タバコ, 有菌タバコ, カルス, 各自の材料) 作成する。



## 実験準備

作業は4人1班として行う。以下の器具は4人当たりの必要数。

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> 1000 ml プラスチックビーカー (1個) | <input type="checkbox"/> 300 ml マイヤーフラスコ (16個)       |
| <input type="checkbox"/> 100 ml マイヤーフラスコ (4個)    | <input type="checkbox"/> 50 ml サンプル管 (64個)           |
| <input type="checkbox"/> 300 ml ビーカー (4個)        | <input type="checkbox"/> 200 ml ビーカー (4個)            |
| <input type="checkbox"/> シャーレ (5枚)               | <input type="checkbox"/> 駒込ピペット (10 ml と 2 ml) (各4本) |
| <input type="checkbox"/> アルミホイル                  | <input type="checkbox"/> 油性マジック                      |

☆当番は以下の試薬を準備室の机上に準備すること。

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 無機塩 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , $\text{KNO}_3$ , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) |                               |
| <input type="checkbox"/> ショ糖  | <input type="checkbox"/> 寒天末  |
| <input type="checkbox"/> エタノール  | <input type="checkbox"/> オスバン |
| <input type="checkbox"/> ホルモン原液 (1,000 倍液), Fe 原液 (100 倍液), 微量元素原液 (100 倍液),<br>ビタミン類原液 (100 倍液) は教官が調製したものを使用する。   |                               |

☆当番は pH 調整用 0.3N NaOH, 0.3N HCl, 各 500 ml を調製すること。

## 実験操作

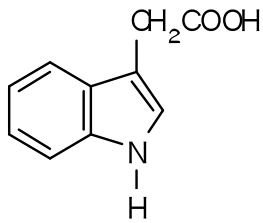
1. 器具の洗浄
2. 基本培地 (ホルモンの入っていないもの) を各班 (4人) で 800 ml 作成する。まず以下の無機塩類を秤量し, 1000 ml プラスチックビーカーに入れ, 約 600 ml の脱イオン水に溶解する。  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  : 1.32 g       $\text{KNO}_3$  : 1.52 g       $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0.35 g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0.30 g       $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0.14 g  
そこに Fe, ビタミンおよび微量元素原液を加える (各 8 ml)。さらにショ糖 (3% w/v) を加えて溶解し, pH を 5.6-5.8 に調整する。その後, 最終的な液量をポリメスシリンダーで 800 ml に合わせる。
3. 作成した基本培地を 300 ml マイヤーフラスコに 4 等分 (各 200 ml) し, ホルモンを以下の最終濃度になるように加える (各 200  $\mu\text{l}$ )。  
0 : ホルモンフリー  
A : NAA 10  $\mu\text{M}$   
B : NAA 10  $\mu\text{M}$  + BA 1  $\mu\text{M}$   
C : BA 10  $\mu\text{M}$   
(NAA はナフタレン酢酸 : BA はベンジルアデニン)
4. 固形培地とするために寒天末を 1% w/v となるように加え, 湯煎にて完全に加温溶解する。良く混ぜること。
5. 駒込ピペットで約 10 ml ずつ 50 ml サンプル管に分注後, 3 重のアルミホイル (以下同じ) で蓋をする。この蓋は後日一度外して付け直すため, 極力しわを少なく折り畳むようにするとよい。また, アルミ蓋は大きすぎず, 小さすぎず, サンプル管の上から 1/3 を覆う程度とする。この時使

用した駒込ピペットは、まだ熱いうちに湯煎の熱湯を吸引排出して内部の寒天が固着しないように洗浄すること。

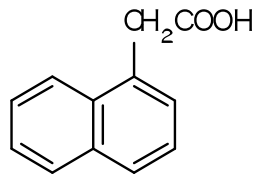
6. 培地の種類を間違えないように、あらかじめ培地名 (0, A, B, C) および班名ないしは個人名 (イニシャルなど) をアルミホイルの蓋に油性マジックで書いておく。
7. オートクレーブ (1.2 気圧, 120°C, 20 分間) する。
8. オートクレーブ後, 取り出し, 静置する。培地が固まる前に一度, 泡立たない程度に軽く振って混ぜておくと均一な培地となる。余りの寒天培地は, 翌日新聞紙にくるんで, 可燃物として廃棄する。
9. 以下に記す器具を各班毎に準備し, 全てオートクレーブで無菌化する。
  - アルミホイルで口を覆ったビーカー (300 ml) 4 個 (有菌植物水洗用容器)
  - マイヤーフラスコ (300 ml) に入ったイオン交換水 (200 ml) 4 本 (滅菌水)
  - アルミホイルでくるんだシャーレ 5 枚 (オートクレーブ後乾熱器に入れておく)
  - 水約 50 ml が入った 100 ml マイヤーフラスコ 4 本 (冷却用)これらの器具はオートクレーブ後も, 全てアルミホイルを付けたまま。これらは全て翌日のクリーンベンチでの無菌操作で使用する。
10. 殺菌用の試薬として, 以下の薬品を各班でそれぞれ 1 つずつ, 300 ml フラスコに 200 ml 作成し, 栓をしておく。
  - 70% (v/v) エタノール (エタノール濃度が低くなると殺菌力が弱まるので注意)
  - 0.2% (w/v) オスバン (原液の濃度に注意)

以上, 殺菌用の試薬, オートクレーブした培地, オートクレーブした器具, 無菌水は, 翌日にクリーンベンチのある部屋へ持参のこと。

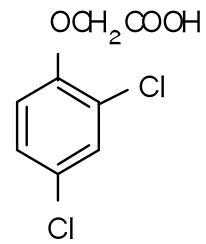
## オーキシシン類



indole-3-acetic acid  
(IAA)

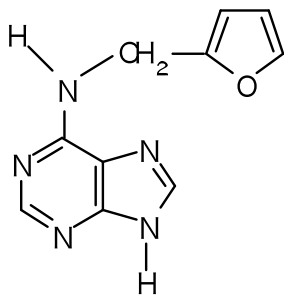


1-naphthaleneacetic acid  
(NAA)

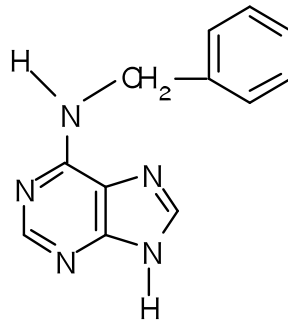


2,4-dichlorophenoxy-  
acetic acid (2,4-D)

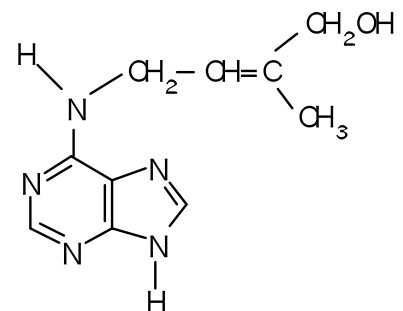
## サイトカイニン類



kinetin

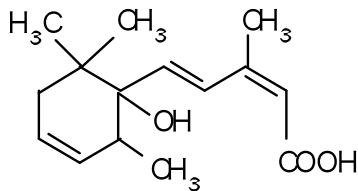


6-benzyladenine (BA)

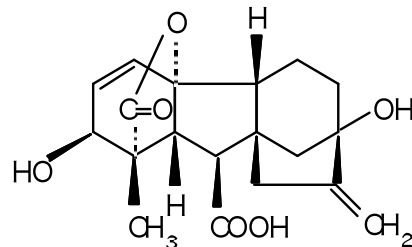


zeatin

## その他のホルモン



abscisic acid



gibberellic acid (GA<sub>3</sub>)

図1 代表的な植物ホルモン

## (2) 植物組織からのカルス誘導

植物細胞（組織）は、特定のホルモンを含む栄養培地上に置かれると、細胞分裂を開始し、カルス化したり不定芽を形成したりする。植物は本来光合成だけで生育できる光独立栄養性を持っているが、切り出された状態ではその能力は損なわれ、培地中の糖に依存した生育をするようになる。このため細胞培養では雑菌の混入を防ぐことが重要になる。一般に自然状態で生育されている植物体はかびや細菌によって汚染されていることが多い。従って、カルス化を行う材料としては、種子を無菌的に発芽させた無菌植物体を用いることが望ましい。しかし、無菌化する方法を知ることも重要であ

る。ここでは無菌的に生育しているタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の小植物体の葉、茎と有菌の材料を用いて実験を行う。

<有菌の材料は各人が用意したものをを用いてもよい>

注意: クリーンベンチ内ではガスバーナーとエタノールを使用する。エタノールは可燃性であるので、火傷に気をつけると同時にエタノールのビンに火をつけないよう十分注意する。万が一エタノールに点火した場合は、空気を遮断する等適切に消火する。

#### 実験準備

##### ●器具, 試薬, 植物材料

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> 前日作成した培地 (サンプル管 64 個)           | <input type="checkbox"/> 200 ml 容ビーカー 2 個          |
| <input type="checkbox"/> 無菌水 (300 ml と 100 ml ビーカー各 4 個) | <input type="checkbox"/> 無菌器具 (ビーカー 4 個, シャーレ 5 枚) |
| <input type="checkbox"/> 油性マジック                          |  |
| <input type="checkbox"/> 次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン)            |  |
| <input type="checkbox"/> 消毒用 70%エタノール                    | <input type="checkbox"/> オスバン 0.2%溶液               |
| <input type="checkbox"/> カルス                             | <input type="checkbox"/> 無菌タバコ (緑葉, および茎を材料とする)    |
| <input type="checkbox"/> 有菌タバコ                           | <input type="checkbox"/> 各自の材料 (有菌)                |

(無菌操作に必要なピンセット, メスなどの器具, およびカルス誘導用有菌タバコ, 無菌タバコ, 植物体再分化用カルスはクリーンベンチの部屋に準備してある.)

#### 実験操作

1. アンチホルミン (次亜塩素酸ナトリウム) 5 倍希釈液 200 ml (有効塩素濃度 1%) を調製する。
2. クリーンベンチを設置してある部屋へ移動する。
3. 無菌操作に先立ち, 手をよく洗い, 70%アルコール (あるいは 0.1%オスバンなど) を含ませた脱脂綿で手の表面を殺菌する。
4. クリーンベンチの準備をする (図 2 参照)。 (注 1)
  - クリーンベンチは作業 15-20 分前に運転を開始しておく。
  - クリーンベンチ内を 70%アルコールを含ませた脱脂綿で拭く。
  - 作業に必要な器具を外部より持ち込む際には, 70%エタノールを含ませた脱脂綿または噴霧器で軽く表面殺菌するか, 金属などであればガスバーナーの火炎で焼き滅菌する。
5. 先に有菌植物体の除菌を行う。4 人分まとめて殺菌操作を行う。
  - 材料が汚い場合は, その表面を水道水で洗い, 除菌しやすいように適当な大きさ (5 cm 程度) に切る。 (注 2)
  - 70%エタノールに資料を約 30 秒浸け, 表面を殺菌する。 (注 3)
  - 試料を 0.1%オスバン液に移し, 時々攪拌しながら 5 分間滅菌する。 (注 4)
  - 殺菌用次亜塩素酸で 15 分間殺菌する。なお, この操作以降は, 必ず, クリーンベンチ内で行うこと。

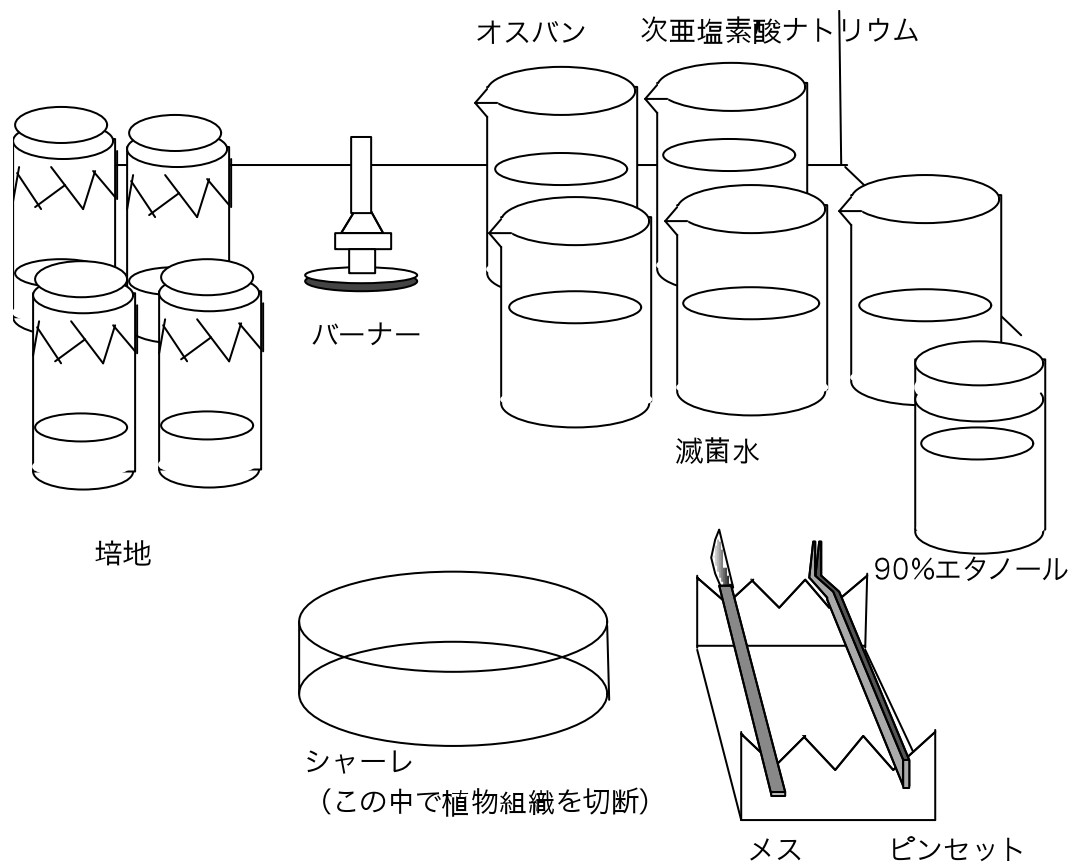


図2 クリーンベンチ内の器具の配置例

- 無菌水を滅菌ビーカーに入れ、殺菌した試料を無菌水に移し、殺菌剤を洗い流す（10分間の洗浄処理を3回繰り返す）。（注5）

（各自が選んだ植物体の殺菌も同様に行う。）

（無菌タバコ、カルスは殺菌不要。）

6. 無菌操作でカルス誘導を行う。1種の植物体につき各ホルモン条件の培地4種に1切片ずつ移植する。4種類の植物を使うので、1人16個のサンプルができる。（図3参照）。

#### <無菌操作>

- 手をよく洗い、70%アルコール（0.1%オスパン、ウエルパス）で手を殺菌する。
- ガスバーナーに火をつける。
- 無菌植物の入った容器、無菌水（100 ml フラスコ）、無菌シャーレ、培地をガスバーナーの火炎もしくは70%アルコールを染み込ませた脱脂綿で表面殺菌した後、クリーンベンチ内に持ち込む。必要に応じ、中に雑菌が入らないように蓋（アルミホイル）を開ける。
- メスとピンセットを90%アルコールにつけ、次いでガスバーナーの火炎で余分のアルコールをとばす。熱くなったメス、ピンセットの先は無菌水で冷やす。
- 無菌の植物体を切り取り、少し無菌水を入れたシャーレに入れる。漂白された部分は死んでいるので、メスで除く。無菌植物体の場合、無菌的に葉と茎を切り出し、滅菌水を入れたシャーレに入れる。

(70%EtOH で拭いたからといって、直接手で植物に触らないこと)

● 適当な大きさ、葉；5 mm 角程度、茎；2-3 mm に切断し、培地毎に1切片を置床する。

7. 切片を植え付けた培地を  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養する。2-4 週間後、植え付けた組織の変化（カルス化、不定芽や不定根の形成）を観察する。（図4参照）

注1 クリーンベンチは  $0.2 \mu\text{m}$  の HEPA フィルターによって空気中の塵、雑菌等を除き、無菌の空気を通気する装置である。従って、クリーンベンチ内には除菌した器具以外は入れないようにし、不要な器具を放置しない。

注2 ニンジンのような堅い組織は強く洗ってもよいが、葉のような薄い組織では、表面を傷つけないよう柔らかく洗う。種子のように材料が小さい場合には、ガーゼなどの目の細かい布やミラクロスに包み、まとめて殺菌する。なお、種子の場合は、全日より流水中で吸水させておく。

注3 長く浸けると内部までエタノールが浸透し、植物細胞も死滅する。

注4 以下、火炎で焼いて滅菌したピンセットを用いる。滅菌法は、まず、殺菌したい先端 10 cm ほどを 90%エタノールに浸け、次いでガスバーナーの火炎でアルコール分を燃やし、蒸発させる程度に加熱する。熱くなった先端部を冷却用滅菌水で冷やす。

注5 殺菌剤が残存していると、細胞生長やカルス化が阻害される。しかし、野外で採取した植物材料には、組織内まで菌が侵入し、上記の方法では完全な殺菌が不可能な場合もある。その場合、処理時間を長くしたり、より浸透性のよい殺菌剤を用いるか、種子より無菌植物を育成したり、培地に抗生物質を加える等の工夫が必要である。グラム陽性菌にはカルベニシリンが、グラム陰性菌にはセファタキシムが有効である。酵母やカビにはナイスタチンが使われるが、一般に抗生物質のみによる完全な除菌は困難である。

### **(3) 脱分化した細胞からの再分化**

脱分化したカルスからの個体再生も培地中のホルモン濃度によって調節されている。既に、カルス化した細胞を、作成した4種の培地に植え付け、細胞の生長、再分化を観察する。

#### 実験材料

□タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)

#### 実験操作

1. 滅菌した容器の中にある細胞（細胞塊、小指の先ほど）を滅菌したピンセットでつまみ、4種の培地（0-C）に置床する（無菌操作）。
2. カルス塊を植え付けた培地を  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養する。2-4 週間後、植え付けた細胞塊の変化（カルスの生長、不定芽や不定根の形成）を観察する。タバコなどでは、ホルモンフリーの培地でも当初は生育が見られるが、徐々に生育は低下する。一方、カルスを B の培地に移植するとカルスの生長が、C の培地に移植すると、不定芽の形成が観察される。これらの反応は植物種により、若干

異なり，また継代培養をくり返すうちに，再分化能は失われていくことが多い。

### 3.2.2. 脱分化に伴う形質発現の変化の観察

分化した状態の植物組織がカルス（脱分化した状態）に変化する際，遺伝子発現の状態が劇的に変化する。また，逆に，カルスから組織，例えば茎，葉，根，花に再分化する際も，システマティックな遺伝子発現の変化を伴う。この組織分化における遺伝子発現の変化を mRNA のレベルで検出するには，ノーザン・ブロットィング法などによる検出を行う。またこの変化を蓄積するタンパク質レベルで検出する場合には，各々の組織より抽出したタンパク質を，電気泳動で分離し，タンパク質染色（例えば CBB ; クマシーブルーによる），活性染色，ならびにウエスタン・ブロットィング法により，タンパク質パターンの変化として観察することができる。

#### (1) 植物細胞のタンパク質定量

本実験では，まず，培養細胞や緑葉など様々な植物組織において発現している総タンパク質を抽出し，その定量値を比較することで，カルスと緑葉，葉と茎などの各組織におけるタンパク質の発現の量的変化を考察する。

タンパク質の定量方法としてはいくつかの方法が報告されている。ここでは近年もっとも多用されている色素（CBB）結合法（Bradford 法）によるタンパク質の定量を行う。

#### 実験準備

##### ●器具，試薬，植物材料

- 作業は 4 人 1 班として行う。
- ビーカー（200 ml or 300 ml）
- 乳鉢，乳棒
- ペーパータオル
- 遠心チューブ（丸底プラスチック 10 ml）
- ろ紙
- ロート
- 洗面器（乳鉢冷却用氷入れ）
- クマシーブリリアントブルー（CBB）G-250
- EtOH
- リン酸
- 海砂
- Tris base
- 塩酸
- 牛血清アルブミン（BSA）標準液
- タバコカルス
- タバコ植物体
- もやし
- 緑化もやし

#### 実験操作

1. CBB G-250（10 mg）を秤量し，95% EtOH（5 ml）に溶解する。この溶液に 85%（v/v）のリン酸 10 ml を加え，さらに脱イオン水で 100 ml とする。使用前にろ紙にてろ過すること。（調製した試薬は冷蔵庫で約 1 ヶ月間安定）

<CBB には Bradford 法に用いる G-250 と電気泳動に使う R-250 がある。混同しないこと！>

(注意) 定量用試薬は強酸 (リン酸) を含んでいるので、取り扱いに注意する。直接口で吸わないこと。また、余った CBB 溶液は、高濃度のリン酸を含むため、流しには捨てられない。一ヶ所 (流し内のポリバケツ) に集め、当番が中和の後、所定のポリタンクに廃棄のこと。

2. 検量線を作成する。ここでは、作業の簡便化のため、一点検量線とする。標準タンパク質溶液 (牛血清アルブミン 0.5 mg/ml) ならびにブランク (イオン交換水) をそれぞれ 0.2 ml, きれいな乾燥したファルコンチューブに取る (2 連で行う)。
3. 希釈した定量用 CBB 溶液 5 ml を加え、攪拌する。
4. 5-60 分の間に OD 595 (595 nm の吸光度) を測定し、標準曲線を得る。なお水を加えたものをブランクとして吸光度計を調節すること。

＜調製した CBB 溶液は、引き続き次ぎの植物細胞や組織のタンパク質定量実験に使う。＞

5. 抽出用緩衝液 : 100 mM Tris-HCl (pH7.0) 100 ml, を作成する。
6. タンパク質抽出用の試料を準備する。
  - 1) タバコカルス 4 g
  - 2) タバコ葉もしくは茎 1 g
  - 3) もやし 1 g
  - 4) 緑化もやし 1 g
7. 試料についている水分はペーパータオルなどでよく除いてから、重さ (100 mg 単位でよい) を記録する。(後で、新鮮重あたりのタンパク質量を計算する際に必要)
8. 試料を冷やした乳鉢に入れ、よく冷やした抽出用緩衝液 4 ml と少量の海砂を加え、よく磨砕する。
9. 磨砕液を抽出用緩衝液で湿らせたミラクロス (10 cm 角) でろ過する。ろ液は、ファルコンチューブで受け、チューブの目盛りで、0.1 ml の単位で抽出液全量の体積を読み取って記録しておく。それぞれの抽出液から定量 (2 から 3 ml 程度) を取り、冷却高速遠心機用丸底チューブ (小 : 10 ml) に入れ、バランスをとる。
10. 遠心機にて 10,000 rpm x 15 分間 (4 °C) の遠心で細胞残さを沈澱させる。
11. 上清中のタンパク質量を測定し、その結果を基に、タンパク質濃度が 0.5 mg/ml となるように希釈した溶液 0.5 ml を調製し、次ページ (2) の電気泳動に用いる。その際、上清の一部を適度に希釈してタンパク質濃度測定に用い、その結果を基に残りの上清を 0.5 mg/ml となるように希釈するとよい。
12. 新鮮重 g 当りのタンパク質量を各試料について算出する。4 種類の試料から得られた定量結果を比較し、そこに違いが生じる理由を考察する。

☆当番は CBB 廃液を必ず中和してから所定のポリタンクに廃棄する (一度バケツに溜めておくこと)。

(質問)

1. 一点検量線法は、簡便であるが精度に欠ける。より正確な定量実験で用いられる検量線作成法を述べよ。



2. CBB G-250 を用いる Bradford のタンパク質定量法が、従来のタンパク質定量法である Lowry 法、Biuret 法、Kjeldahl 法に比べて、優れている点と劣っている点を挙げよ。

## **(2) 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動**

### **(Nondenaturing (or Native) Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Protein)**

ポリアクリルアミドゲルを用いたタンパク質の電気泳動には、等電点電気泳動、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) および Native-PAGE がある。変性剤である SDS を加えた SDS-PAGE はタンパク質に吸着した SDS の電荷を利用して電気泳動するため、その泳動距離はタンパク質の分子量ときわめてよい相関を示し、分子量の決定に利用される。一方、Native-PAGE ではタンパク自身の電荷で泳動するため、分子量のみで泳動距離が決まるわけではない。むしろ Native-PAGE は、SDS で解離してしまうマルチサブユニットのタンパク質を複合体のまま泳動したり、酵素を活性を保ったまま泳動することにより、タンパク質の分離精製や活性染色に利用される。ここでは、前日の実験で、様々な植物組織から抽出してきたタンパク質を材料として Native-PAGE を行い、分化とタンパク質組成との関係について考察する。

#### 実験準備

##### ●試薬等

- アクリルアミドのストック溶液(TAが調製したものを使用する):40gアクリルアミド,1.08gビス-アクリルアミド. 蒸留水にて 100 ml に.
- ゲル緩衝液: 1.5 M トリス-HCl, pH 8.8 (TA が調製したものを使用する).
- 10%過硫酸アンモニウム水溶液 (W/V) (TA が調製したものを使用する).
- N,N,N',N'-テトラメチレンジアミン (TEMED)
- (5X)サンプル緩衝液(TA が調製したものを使用する): 以下を混合.
  - a 1M トリス-HCl pH 6.8, 15.5 ml
  - b 1% ブロモフェノールブルー水溶液, 2.5 ml
  - c 蒸留水, 7 ml
  - d グリセロール, 25 ml
- 電気泳動緩衝液: トリス塩基 3.0 g とグリシン 14.4 g を蒸留水に溶解し 1 L に. pH は, 8.3 に調節.
- ペルオキシダーゼ基質: ジアミノベンジジン塩酸塩, 過酸化水素
- タンパク質染色液: クーマシービリリアントブルー (CBB R250) 0.25 g, メタノール 125 ml, 氷酢酸 25 ml, イオン交換水 100 ml. まず染料をメタノールに溶かしてから, 氷酢酸, 蒸留水を加える.
- 脱色液: メタノール 100 ml, 氷酢酸 100 ml, 蒸留水 800 ml.

## 実験操作

1. ゲルカセットを組み立てる.
2. 分離用ゲルの調製：アクリルアミドストック溶液 1.9 ml, ゲル緩衝液 2.5 ml, 蒸留水 5.6 ml, 10% 過硫酸アンモニウム溶液 50  $\mu$ l.
3. TEMED 20  $\mu$ l を加え, 均一になるようによく攪拌する. TEMED によりゲル化が始まり, 約 20 分で固まるため, これからのステップは手早く行う必要がある.
4. パスツールピペットを用い, ガラス板に這わせるように, ゲル液をカセットの中に移す. サンプル液を加える枠穴 (ウェル) をゲル上面に作るためコームをガラス板の間に挿入し, ゲルが固まるまで待つ.
5. 慎重にコームをはずす. ゲルカセットからスパーサーをはずし, 泳動槽にゲルカセットを装着する. 下部槽を電気泳動緩衝液で満たす. ゲルの底の気泡を取り除く. サンプル添加用のゲルのウェルを完全に満たすように上部槽に電気泳動緩衝液を入れる.
6. 昨日調製したタンパク質抽出液 1 ml に(5X)サンプル緩衝液 0.25 ml を加える.
7. ウェルの底すれすれまで, ピペットマンチップを差し込み, 慎重に 6 で調製したサンプル 20  $\mu$ l を加える.
8. 25 mA の電流を定電流モードで通電する. タンパク質の大半はマイナス電荷をもっているため, 陽極に向かってタンパク質が泳動するように電極を確認する. プロモフェノールブルーのバンドが底にくるまでほぼ 65 分泳動する.
9. 泳動中にペルオキシダーゼ活性染色液を作成. タンパク質抽出用緩衝液 (100 ml トリス HCl pH 7.0, 昨日使用したものの残り) 50 ml に 3,3'-ジアミノベンジジン 180 mg 加える.
10. 慎重にゲルをカセットからはがし, バット中の染色液に入れ, 30%過酸化水素 20  $\mu$ l を加える. 数分でペルオキシダーゼのバンドが現われる.
11. 10 分後, ハイブリバックに挟んで 4 人分ゼロックスコピーする.
12. タンパク質染色する場合は染色液に置いて, 30 分振とうし, その後オーバーナイトで脱色.

### 3.2.3. プロトプラスト実験

植物細胞は動物細胞と異なり, セルロースやヘミセルロースを主成分とする細胞壁に包まれており, また細胞間隙には, ガラクツロン酸等酸性多糖からなるペクチン質が多く存在し, 細胞同士を接着している. 原形質はその膨圧により外向きの圧力をもつが, 堅い細胞壁に阻まれるため結果的に細胞壁に押し付けられ, 細胞の機械的強度が維持される. 細胞を高浸透圧条件に置くと, その膨圧が低下し, 原形質分離が生じる. 一方, 植物細胞の細胞壁を分解酵素などで処理すると, 細胞壁を持たない「裸の」細胞が得られる. これをプロトプラストという. プロトプラストは種々の刺激により DNA 等の高分子を外界から取り込むことができ, また細胞融合を起こすことから, 新規植物の育種の材料として利用されてきた. また, その原形質膜は温和な条件で破壊されることから, 細胞内小器官を単離する材料としても利用価値が高い.



20 mM MES-NaOH, pH 5.6

5 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O

0.6 M ソルビトール

調製法：上記溶液の効率的な作成方法としては、先ず MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O とソルビトールを溶解した 20 mM MES 緩衝液 (pH はあらかじめ NaOH で 5.6 に調製する) を 100 ml 作成する。これに、所定の濃度となるように酵素 2 種を溶解した酵素液 A, B 各 30 ml を作る。なお、酵素を溶解するとき泡立てないようにする。

2. シャーレに酵素液を入れ、用意された緑葉ならびにオウレン培養細胞各 1 g を別のシャーレに測り取る (新鮮重量を 100 mg 単位で測定し、記録しておく)。タバコの場合、1 g は、葉半分程度。緑葉は、かみそりで、約 1 mm 幅に切断し、速やかに酵素液に浸ける。
3. 資料を入れたシャーレに蓋をしてデシケーターに入れ、アスピレーターで 10 分間減圧し、酵素液を組織内部にまで浸透させる。減圧にしたまま長時間放置しないこと。
4. 減圧を破り、デシケーターから出して、常圧、室温にて一晩静置する。(注 1)
5. 翌日用いる試薬の準備を行う。

-スライドグラスを洗って乾かしておくこと。

-プロトプラスト精製、融合用の試薬調製

a) プロトプラスト洗浄液

I : 0.6 M ソルビトール, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (150 ml)

II : 0.6 M ソルビトール (50 ml)

b) ナイロンメッシュ (60 μm) のついたろ過筒 (各班 2 個)

c) ポリエチレングリコール溶液 : 40% (w/v) PEG 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub> 5 ml (15 ml ファルコンチューブに作成)。PEG6000 は溶解し難い場合がある。十分攪拌した後、一晩放置する。また、少量の CaCl<sub>2</sub> を秤量し難い場合は、50 mM CaCl<sub>2</sub> を 50 ml 作成しておき、この溶液を用いて PEG を終濃度 40% (w/v) になるように溶解してもよい。

注 1 ここではオーバーナイトで処理を行ったが、酵素濃度を高めることにより、数時間で単離することも可能。

## **(2) プロトプラストの精製**

### 実験操作

1. プロトプラストの遊離状態を観察する。酵素液を一滴とり、乾いたスライドグラスの上に置き、顕微鏡で観察する。必ずカバーグラスをかけて観察すること。プロトプラスト化が進んでいる場合には次ぎの操作に移る。(図 3 参照)

注) 緑葉とオウレンのプロトプラストは別々に精製する。

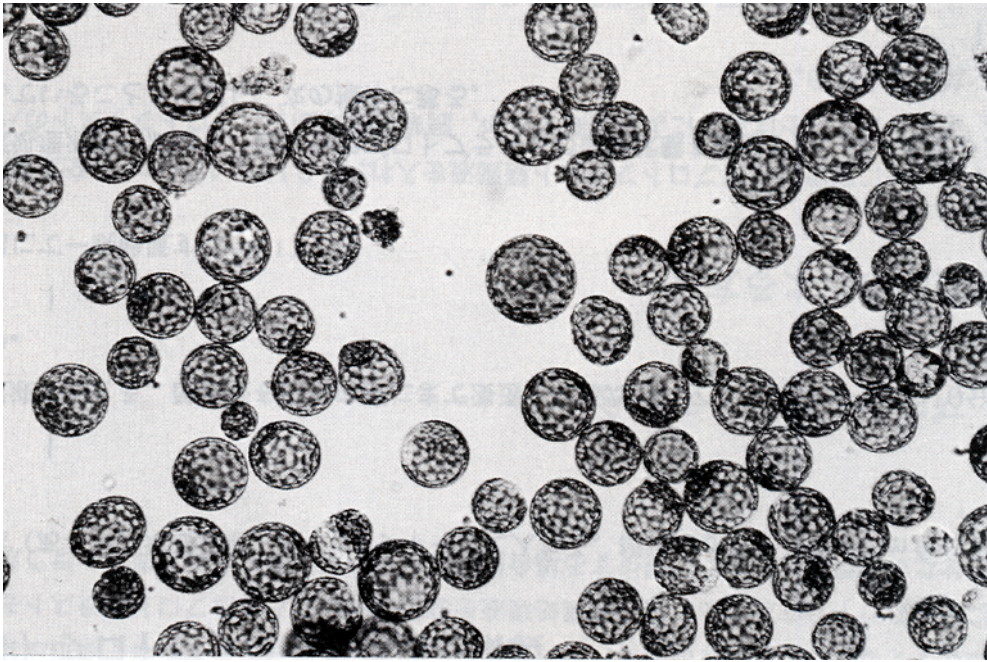
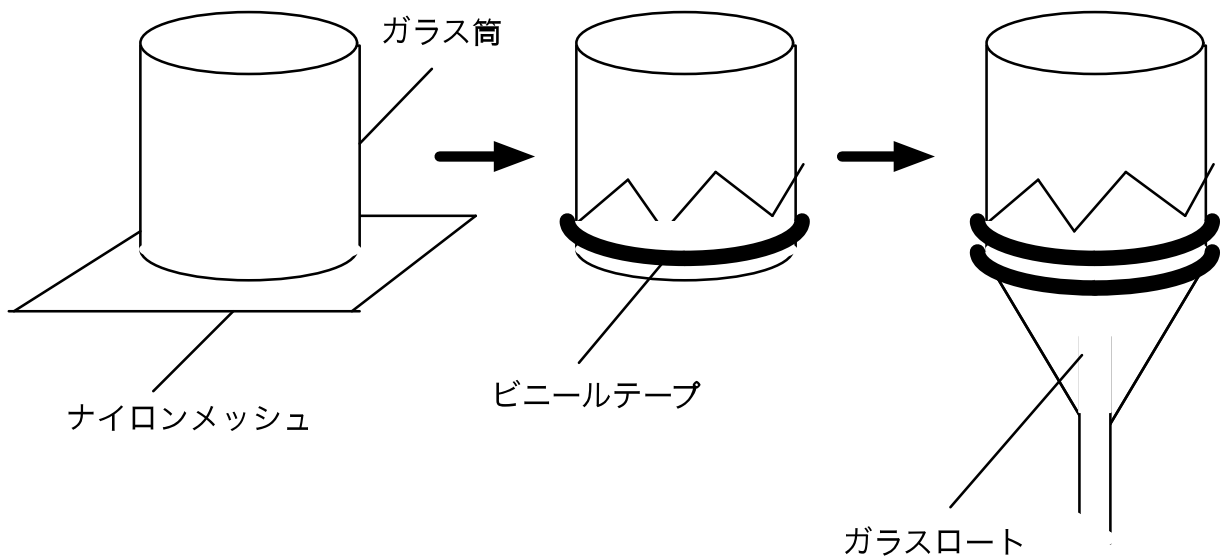


図3 タバコ葉肉細胞のプロトプラスト

2. 未分解の細胞残渣や葉片をナイロンメッシュで除く．なおナイロンメッシュでろ過する前に一度駒込ピペットで穏やかに細胞を分散させておくとプロトプラストの遊離率が高くなる．但し，分散の時あまり強くやり過ぎるとプロトプラストは壊れてしまう．  
(ナイロンメッシュは回収する．決して捨てないこと.)



3. ろ過したプロトプラスト懸濁液を 500 rpm x 5 分間遠心し (ファルコンチューブを使用)，プロトプラストを沈澱させる．使用后ファルコンチューブも回収するので洗浄のこと．
4. 上澄みをすて，プロトプラスト洗浄液 I (以下洗浄液という場合は I) 約 10 ml を加え，穏やかに

混合し、再度遠心する。このプロトプラスト洗浄液で酵素を取り除く作業は2回行う。

5. プロトプラストを 10 ml の洗浄液に懸濁し、その密度 (ml あたりのプロトプラストの数) を血球計算盤 (Haemocytometer) で測定する。血球計算盤での測定は最低 3 回行う (レポートにはその平均を求め、新鮮重あたりのプロトプラスト収量を記載すること)。血球計算盤の見方は下図参照。なお、この時、培養細胞と葉肉のプロトプラストの大きさを、血球計算盤の目盛りを基準として見積もり、レポートする。
6. 測定したプロトプラスト密度をもとに、約 50,000/ml になるように洗浄液にて希釈 (または遠心により濃縮) する。→PEG による融合実験に使用。
7. 密度調節したプロトプラスト懸濁液の一部は、再度遠心し、上澄みを捨てて、洗浄液 II を適量加え、約 200,000/ml となるようにする。→電気融合に使用。

一般的にプロトプラストは衝撃や浸透圧変化に弱いので、取り扱いには十分注意する。この実験では、タバコ緑葉の場合、 $10^7$  個/g fr. wt, オウレン培養細胞では  $10^6$  個/g fr. wt 程度のプロトプラストが単離できる。その他、新鮮な野菜などを材料としてプロトプラストを単離することができるが、材料により収量が大きく異なる。最も収量に影響を及ぼすのは材料とする植物種であるが、酵素の種類、濃度、浸透圧も重要。単子葉植物の場合は、より強力な酵素、例えばセルラーゼオノヅカ RS やペクターラーゼ Y23 などが用いられる。

### **(3) プロトプラストの融合**

#### **(A) PEG 法による細胞融合**

1. タバコ葉肉およびオウレン培養細胞由来の密度約 50,000/ml のプロトプラスト懸濁液を当量ずつ混合する。融合には 5 ml 程度あれば十分。
2. 混合したプロトプラスト懸濁液をプラスチックシャーレに滴下する。約 5 分間静置し、プロトプラストがシャーレ底面まで沈むのを待つ。次ページの図のように PEG 溶液をプロトプラスト懸濁液の周辺 4 箇所滴下していく。
3. 図 C のようにパスツールピペットで PEG 溶液とプロトプラスト懸濁液を混じり合わせる。この時、プロトプラストはシャーレ底面に張り付き、プロトプラスト同士が凝集する様子を観察する。各自の顕微鏡で観察が困難であれば、教官、TA が準備している倒立顕微鏡を使用する。
4. 3~10 分間静置した後、洗浄液 I (high  $\text{Ca}^{2+}$ ) を周辺に加え PEG を希釈する。この過程で、プロトプラストの融合が起こる。PEG と洗浄液をゆっくりと丁寧に除いてから、シャーレ底面に残ったプロトプラストの様子を観察する。
5. PEG による融合の別法：プロトプラスト懸濁液と PEG 溶液を試験管中 1:1 で混和し、数分静置する。その後、洗浄液で希釈、遠心し回収されたプロトプラストを観察する。

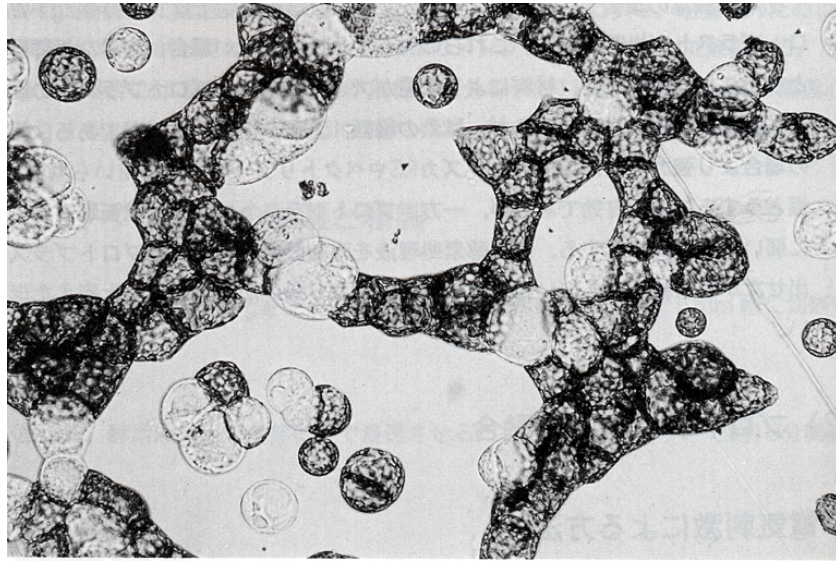
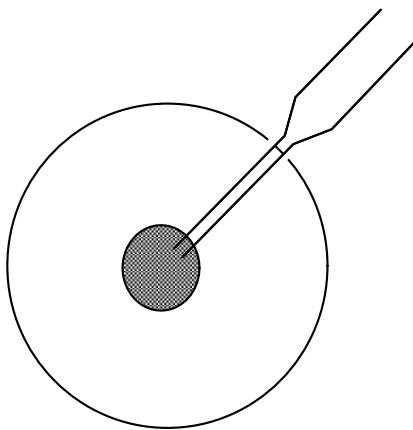
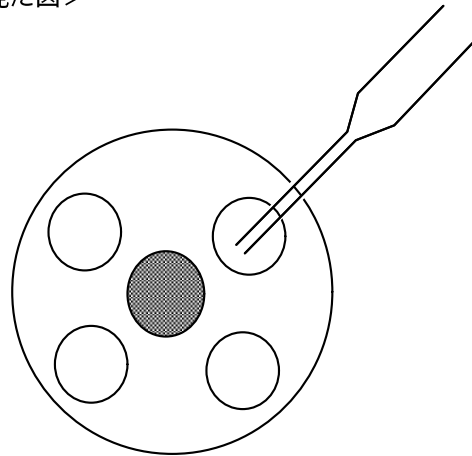


図4 PEGによる融合

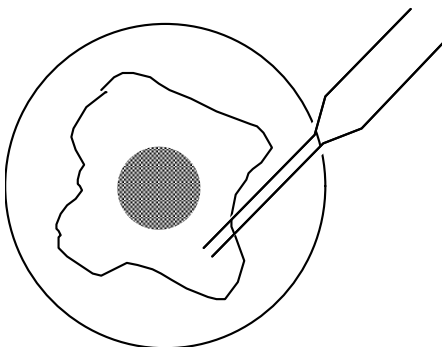
<PEG融合の操作をシャーレの上部から見た図>



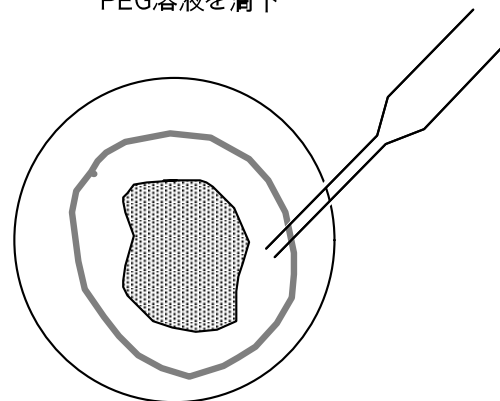
(A) プロトプラストの液滴を中央にそっと置く



(B) その周り4箇所にPEG溶液を滴下



(C) PEGとプロトプラストをそっとまぜる



(D) 周辺に洗浄液Iを加えてPEGを希釈



## (B) 電気刺激による細胞融合

1. 電極チャンバーにプロトプラスト懸濁液 (20,000/ml, 洗浄液 II に懸濁したもの) を入れ, 2.0 MHz, 40 V/cm の交流電場をかける. プロトプラストは重力により沈降するが, dielectrophoresis のために, 電気泳動し, 電極に対して垂直に並んだ, いわゆる「パールチェーン」を形成する.
2. パールチェーンができた段階で, 直流パルス, 1.25 kV/cm, 100  $\mu$ s を与える. プロトプラスト融合が誘起される. まず, 隣り合ったプロトプラストの接点で膜が破れ, 隣り合った細胞同士の膜が融合すると細胞融合が進展する. 数分で, 達磨型になる. 直流パルスから 5-15 分間程度で, 融合が終了する.

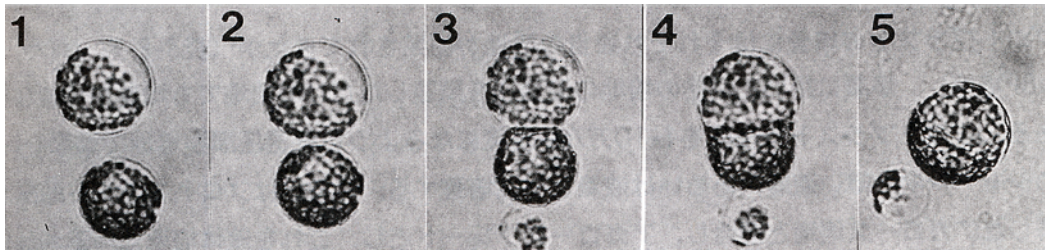
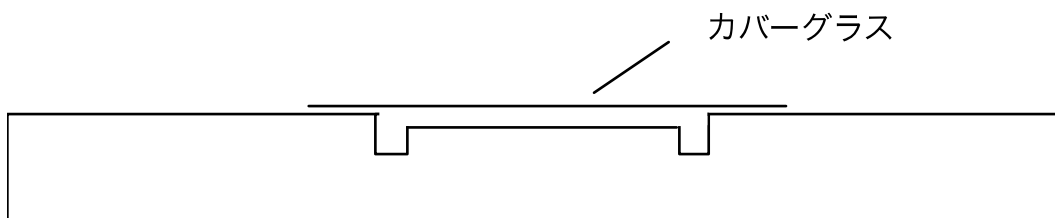
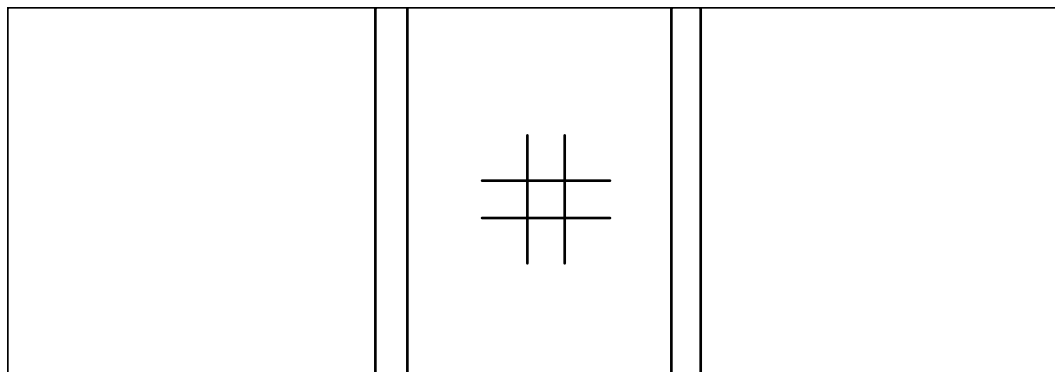


図 5 電気融合のプロセス



血球計算盤の模式図



### 3.2.4. 無傷葉緑体の単離と光合成酸素発生測定

光合成の機構を解明するために、緑葉と同程度の光合成活性をもつ葉緑体を単離し、それを用いた研究が有効である。ここでは、ハウレンソウ緑葉から包膜を持った葉緑体（無傷葉緑体）を単離し、酸素電極を用いて、照明下、酸素発生を測定する。

#### (1) 無傷葉緑体の単離

実験準備/4人1班

##### ●試薬等

- ソルビトール      MgCl<sub>2</sub>      MnCl<sub>2</sub>
- EDTA              KCl            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- MES                HEPES        アスコルビン酸 Na 塩
- 80%アセトン
- 電子受容体溶液 (2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM ジクロロベンゾキノン) は TA が準備したものを使用。

当番は、80%アセトン (v/v) を 100 ml 調製する。

実験操作

##### 1. 葉緑体調製液/反応液の作成：

ソルビトール	0.3 M
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
MnCl <sub>2</sub>	1 mM
EDTA	2 mM
KCl	30 mM

まず、上記の基本組成液を 100 ml 作成する。そのうち 50 ml に MES を 30 mM になるように秤量して加え pH を 6.3 に調節する。これを葉緑体調製液とする。残りの基本組成液 50 ml には HEPES を 50 mM になるように加え、pH を 7.6 に調節する。これを反応液とする。作成した葉緑体調製液と反応液は、洗面器にいた水で冷やしておく。葉緑体調製液には使用の直前に 10 mM アスコルビン酸 Na 塩を添加するため、あらかじめ、アスコルビン酸 Na の粉末を必要量秤量しておく。

2. ハウレンソウの葉を水洗後、よく水を切り、氷冷しておいたもの 10 g を約 3 cm 四方くらいに指で千切る。
3. 葉緑体調製液 50 ml に千切ったハウレンソウ葉をいれ、氷冷したミキサーにて、3 秒間ほど摩砕する。摩砕液を 4 重のガーゼでろ過する。
4. ろ液を 3000 x g で 1 分間遠心し、上清を手早くデカントで捨て、沈澱に 1 ml の反応液を加える。沈澱した葉緑体（非常に破裂しやすい）を慎重に懸濁させる。懸濁が困難な場合には、駒込ピペットの先にゆっくりと出し入れして懸濁させる。

5. クロロフィル濃度を測定する．エッペンドルフチューブに 80%アセトン 1 ml をとり，葉緑体懸濁液を 5-20  $\mu\text{l}$  加え，10,000 rpm で 5 分間遠心する．上清について吸光度計にて 720, 663, 645 nm での吸光度を測定し以下の式にてクロロフィル濃度を計算する．

$$\text{総クロロフィル } (\mu\text{g/ml}) = 20.2 \times (A_{645}-A_{720}) + 8.02 \times (A_{663}-A_{720})$$

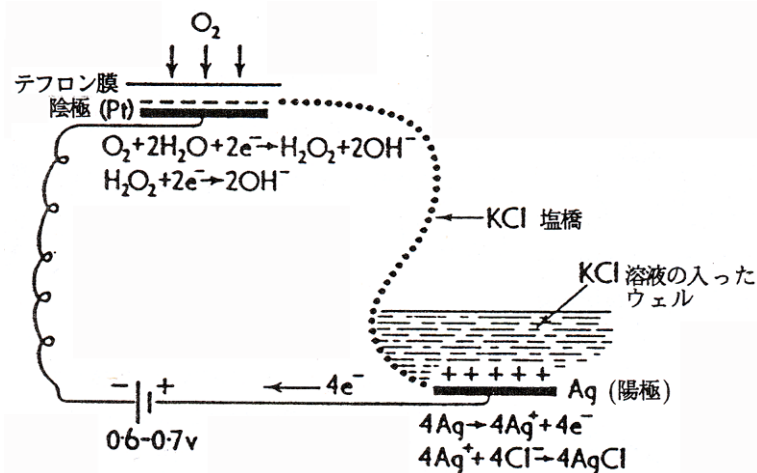
$$\text{クロロフィル a } (\mu\text{g/ml}) = 12.7 \times (A_{663}-A_{720}) - 2.69 \times (A_{645}-A_{720})$$

$$\text{クロロフィル b } (\mu\text{g/ml}) = 22.9 \times (A_{645}-A_{720}) - 4.68 \times (A_{663}-A_{720})$$

## (2) 酸素発生 の 測定

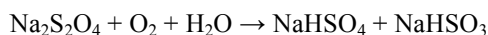
### ●酸素電極の原理：

光合成で生じた酸素を酸素電極で検出する．標準のクラークタイプの酸素電極では，プラチナの陰極と銀の陽極が電解液で電気的につながっている．すなわち，電極ディスクの中央に陰極が，環状のみぞに銀の陽極がある．両者は，ドームを覆った紙のスペーサーに染み込んでいる電解液（通常は飽和 KCl 溶液）の薄い層でつながっている．図のように電圧をかけると，陰極で酸素が還元され初めは  $\text{H}_2\text{O}_2$  になる．その時流れる電流は陰極で消費される酸素量と化学量論的に相関している．



### ●実験手順

1. 酸素電極の準備：電極の乗ったディスクを電極チャンバーからはずし，陽極の表面を磨き粉（歯磨きゲル等）で磨く．陽極のはまった環状のみぞに飽和 KCl を加える．電極ディスクの中央の陰極の上に KCl 溶液を一滴垂らした後，2 cm 四方に切った紙スペーサーをのせ，さらにその上に同サイズに切ったテフロン膜をのせ，O リングでしっかりと固定する．この際，電極上で膜にしわができないように注意する．以上，電極の準備は教員または TA がデモンストレーションする．
2. 酸素電極のカリブレーション：電極のサンプルチャンバーに 1 ml 程度蒸留水をいれ，スターラーをまわして，蒸留水中の酸素濃度を空気中の酸素と平衡状態にし，その時の電気シグナルを記録しておく．ついで，ジチオナイトを耳掻き一杯ほどサンプルチャンバーに加え，蓋をして，チャンバー内を密閉する．以下の反応式にしたがい酸素が溶存酸素が消費される．



酸素の急激な消費に伴い、電気シグナルが低下し、やがて安定した無酸素状態のレベルのシグナルを記録する。25°Cにおける空気と平衡状態にある水溶液の溶存酸素濃度は、0.254 mM であるから、ジチオナイト添加前後のシグナル差は、この濃度の酸素量に対応することになる。葉緑体による酸素発生速度を定量化する際は、この値を基準とする。

3. 酸素発生測定：酸素電極のサンプルチャンバーに 1 ml の反応液を加え、さらに最終濃度が 10  $\mu\text{g}$  クロロフィル/ml となるように葉緑体懸濁液を加える。チャンバーを蓋で密閉して、シグナルが安定するまで待つ。まず、炭酸固定を促進するため、電子受容体として重炭酸ナトリウム 2 mM をピンホールから添加して、飽和光を照射する。健全な葉緑体が単離できていれば、酸素発生が見られる。ついで、光化学系 II からの電子受容体となるジクロロベンゾキノン 0.5 mM を添加し、酸素発生シグナルを記録する。上記のカリブレーションの値を基準として、酸素発生速度を  $\text{O}_2$  の発生速度を  $\mu\text{mol O}_2/(\text{mg}$  クロロフィル  $\cdot$  hr) の単位に換算する。