

購入したタンパク質定量試薬を用いての トリプシンの酵素反応の教材化

加藤 良一

地域教育文化学部 地域教育文化学科

荒川 弘子

教育実践研究科 教職実践専攻

新庄市立萩野中学校

土井 正路

山形大学附属中学校

長根 智洋

愛知教育大学附属高等学校

鈴木 拓史

地域教育文化学部 地域教育文化学科

(平成27年8月28日受理)

要 旨

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシン (和光純薬工業(株) Catalog No: 201-19181) および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) を、39°Cで10分間酵素反応させた。そして、その反応液をバイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬で発色させると、反応後に青色が薄くなることを肉眼でも確認でき、トリプシンによるウシ血清アルブミンの分解を示すことができた。さらに、この反応条件下で、トリプシンの活性に及ぼす温度およびpHの影響も確かめることができた。

I はじめに

生物が生命活動を行うためには、生体内での酵素反応が必要不可欠である。酵素を教材として取り上げる中学校の現場では、ヒトの唾液とデンプン溶液を混ぜ合わせて反応させ、そこにヨウ素液やベネジクト液を加えて、デンプンが糖に変わったことを確かめる実験¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が行われていて、このような唾液アミラーゼによるデンプン分解の実験が全てで、タンパク質分解の実験は行われていない。高等学校では、すりおろしたダイコン⁵⁾⁶⁾、すりおろしたジャガイモ⁷⁾、動物の肝臓の小片⁵⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、または動物のすりつぶした肝臓¹¹⁾で過酸化水素を分解するカタラーゼの実験、酵母液とコハク酸ナトリウム水溶液を混ぜ合わせて反応させメチレンブルーの色の変化で観察するコハク酸脱水素酵素の実験¹²⁾¹³⁾、またはルシフェリンを分解するルシフェラーゼの実験¹⁴⁾が行われているが、タンパク質分解の実験は「生物基礎」・「生物」の教科書では取り上げられていない。

筆者らは、安価で簡便で分かりやすい実験教材となるように、タンパク質の分解反応を取り上げ、はんぺんの切片上にパイナップルまたはメロンを乗せて1日間または2日間反応させる方法と、はんぺんまたは牛肉の切片をパイナップルの搾り汁の中に入れて1日間反応させる方法を提唱した¹⁵⁾。しかし、このタンパク質分解の酵素反応では、その実験に少なくとも1日程度かかり、現場の授業の1校時(45分または50分)以内にタンパク質分解の酵素反応が終了してその実験結果が得られなかった。そこで、短時間にタンパク質分解の酵素反応を行わせ、すぐにその結果が出るような実験教材を考えると、基質であるタンパク質の検出を敏速に行わなければならない。それには、ビュレット法¹⁶⁾ またはフェノール試薬法¹⁷⁾などが従来示されてきたが、これらは皮膚に炎症を起こす試薬などを用い、場合によってはそれを温めたりするので、これらの操作を中学校や高等学校の生徒に行わせるのは安全上問題がある。さらに、これらの試薬調整も煩雑で、検出に30分以上かかるものもある。

バイオ・ラッド ラボラトリーズ社は、色素結合法¹⁸⁾ の中の1つであるBradford法¹⁹⁾ によるタンパク質定量試薬を従来から販売しており、生命科学の研究ではこれが一般的に使われてきた。この試薬は取扱い上ほとんど危険性がなく、さらにこの試薬を一度添加するだけで瞬時にタンパク質が定量できる。そこで、本研究では、中学校「理科」や高等学校「生物基礎」・「生物」の授業で取り上げてもらえるように、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のこのタンパク質定量試薬を用いて、タンパク質分解酵素であるトリプシンの酵素反応を安全に短時間で行える実験教材の開発を目指した。

II 研究方法

1. 試薬

タンパク質分解酵素のトリプシン(ブタ膵臓由来、生化学用、1g、和光純薬工業(株) Catalog No: 201-19181)、基質のウシ血清アルブミン(100g、Sigma Chemical Co. 製品番号:A-8022)、およびタンパク質定量試薬(プロテインアッセイ染色液、450ml、バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株) Catalog No: 500-0006)は購入した。

2. 事前の準備

200mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0)、200mM K-リン酸 Buffer (pH6.0)、および200mM クエン酸 Na Buffer (pH3.0) を作製した。トリプシンを400 μ g/mlの濃度で、ウシ血清アルブミンを4 mg/mlの濃度で、それぞれ蒸留水に溶かした。なお、酵素および基質が変性しないように、トリプシン水溶液およびウシ血清アルブミン水溶液は実験当日に準備した。また、実験当日に、タンパク質定量試薬の原液は、蒸留水で5倍に希釈した。

3. 酵素反応

200mM Bufferを200 μ l、4 mg/mlウシ血清アルブミンを400 μ l、400 μ g/mlトリプシンを400 μ l、100 μ l、または25 μ l、および全量が2 mlになるように蒸留水を適量、これらを試験管（長さ:103mm、直径:14mm）の中に入れ、試験管攪拌機（アズワン(株)、Automatic Labo-Mixer NS-9）を用いて攪拌した。つぎに、この試験管を、0 $^{\circ}$ Cの氷中、39 $^{\circ}$ Cの水温に調整したインキュベーター（大洋科学工業(株)、Mini-80/Personal-10、振とう:76回/分）、または65 $^{\circ}$ Cの水温に調整したウォーターバス（アドバンテック東洋(株)、TBS181SA）に入れて、酵素反応を適時間行った。そして、この試験管の中から反応液を80 μ l取り出して別の試験管に入れ、そこに希釈したタンパク質定量試薬を4 ml加えて、試験管攪拌機を用いて攪拌した。5分間が過ぎたら、595nmの波長に設定した分光光度計（紫外可視分光光度計、島津製作所、UV mini-1240）を用いて、その吸光度を測定した。また、そのときに発色した青色の濃さを肉眼でも確認した。なお、実験終了後に、このタンパク質定量試薬によってガラス器具に付着した青色の色素は、少量の100%エチルアルコールで洗浄して取り除くことができた。

タンパク質分解酵素の活性について、基質タンパク質の水溶液にこのタンパク質定量試薬を添加して発色させた青色の濃さ（または595nmの波長の吸光度）と、基質タンパク質の水溶液にタンパク質分解酵素を加えて反応をさせた後にタンパク質定量試薬をそこに添加して発色させた青色の濃さ（または595nmの波長の吸光度）とを比較し、その両者の差がこの酵素活性を示すことになる。

Ⅲ 結 果

1. 酵素の濃度

①80 μ g/mlトリプシンおよび800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0)、②20 μ g/mlトリプシンおよび800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0)、または③5 μ g/mlトリプシンおよび800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0)を酵素反応液として、39 $^{\circ}$ Cで20分間、ウシ血清アルブミンをトリプシンで分解させた。このとき、5分おきに酵素反応液をそれぞれ取り出し、そこに希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、①の酵素反応液では短時間でその吸光度が低下し、③の酵素反応液では吸光度はなかなか下がらなかつた（図1）。なお、②の酵素反応液で10分間反応させると、発色した青色が薄くなり、ウシ血清アルブミンの分解が肉眼でも明確に確認できた（図2）。

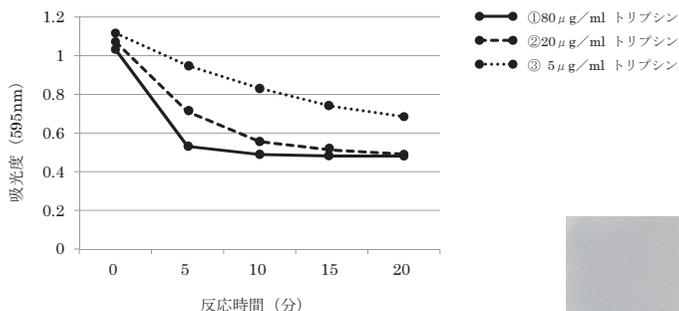


図1 ウシ血清アルブミンの分解におけるトリプシンの濃度

①80 $\mu\text{g/ml}$ トリプシン (和光純薬工業(株) Catalog No: 201-19181) および800 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2ml, ②20 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2ml, または③5 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2mlを, 39℃で20分間, トリプシンの酵素反応をさせた。このとき, 5分おきに酵素反応液を80 μl それぞれ取り出し, そこにバイオ・ラッドドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて, 595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

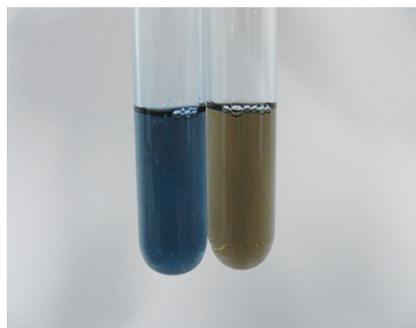


図2 トリプシンによるウシ血清アルブミンの分解

左：酵素反応前、右：10分間の酵素反応後

2. 温度の影響

②20 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) を酵素反応液として, 0℃, 39℃, または65℃で10分間, ウシ血清アルブミンをトリプシンで分解させた。そして, 各酵素反応液に希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果, 0℃および65℃で反応させてもその吸光度は高かったが, 39℃で反応させると吸光度は低かった (図3)。なお, この結果は, 発色した青色の濃さの違いとして肉眼でも容易に確認できた (図4)。

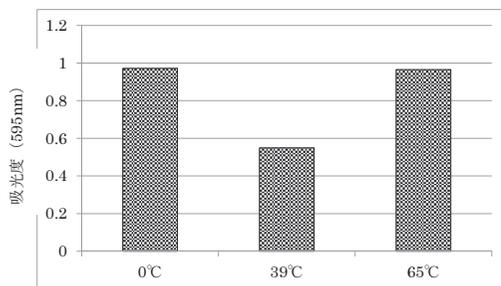


図3 ウシ血清アルブミンの分解におけるトリプシンの活性に及ぼす温度の影響

②20 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2ml を, 0℃, 39℃, または65℃で10分間, トリプシンの酵素反応をさせた。そして, これらの酵素反応液を80 μl それぞれ取り出し, そこにバイオ・ラッドドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて, 595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

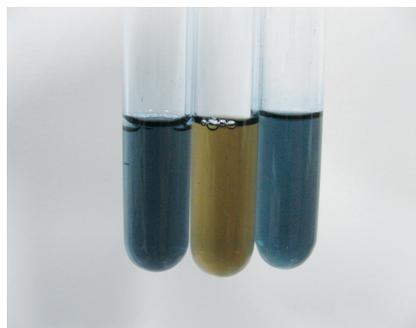


図4 トリプシンの活性に及ぼす温度の影響

左：0℃で酵素反応, 中：39℃で酵素反応, 右：65℃で酵素反応

3. pHの影響

④20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、⑤20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer (pH6.0)、または②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) を酵素反応液として、39°Cで10分間、ウシ血清アルブミンをトリプシンで分解させた。そして、各酵素反応液に希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、pH 3 およびpH 6 で反応させてもその吸光度は高かったが、pH 9 で反応させると吸光度は低かった (図5)。なお、この結果は、青色の違いとして肉眼でも確認できた (図6)。

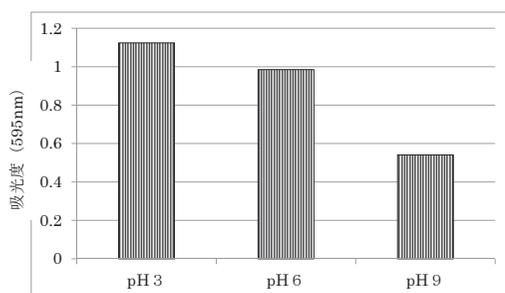


図5 ウシ血清アルブミンの分解におけるトリプシンの活性に及ぼす pH の影響

④20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸 Na Buffer (pH3.0) 2ml、⑤20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer (pH6.0) 2ml、または②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2mlを、39°Cで10分間、トリプシンの酵素反応をさせた。そして、これらの酵素反応液を80 μl それぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

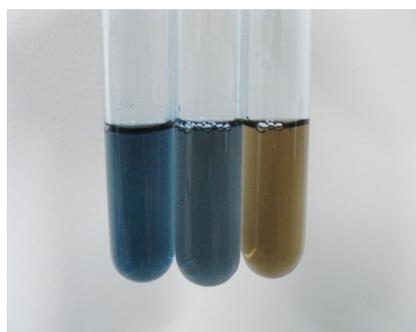


図6 トリプシンの活性に及ぼす pH の影響

左：pH 3のBuffer中で酵素反応、
中：pH 6のBuffer中で酵素反応、
右：pH 9のBuffer中で酵素反応

バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)のタンパク質定量試薬は、基質に用いようとした800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卵白アルブミン (鶏卵由来、生化学用、1g、和光純薬工業(株) Catalog No: 010-17071) を青色に発色させなかった (データは示さない)。また、20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) に含まれる800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カゼイン (乳由来、化学用、500g、和光純薬工業(株) Catalog No: 030-01505) の基質に対して、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンを39°Cで60分間作用させても、このタンパク質定量試薬による595nmの波長の吸光度は全く下がらなかった (データは示さない)。同様に、同buffer (pH9.0) に含まれる1.2mg/mlウシγグロブリン (2mg/ml、Prod# 23212、Thermo Scientific、USA) の基質に対して、120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンを39°Cで60分間作用させても、同波長の吸光度は全く下がらなかった (データは示さない)。なお、これらの原因は不明である。

IV 考察

タンパク質分解の酵素反応の教材として、筆者らが提案した教材¹⁵⁾ 以外には、タンパク質分解酵素であるトリプシンまたはパパインと卵白をセルロースチューブに入れて反応した後の分解物を透析させる実験²⁰⁾、タンパク質分解酵素によるゼラチンの分解を試作の落下式粘度計を用いて測定する実験²¹⁾、固めたゼラチンの上にタンパク質分解酵素を含むキュウイフルーツを乗せて反応させる実験²²⁾、および写真用フィルムのゼラチン層をキュウイフルーツの搾り汁で溶かす実験²³⁾ などが今までに紹介されてきた。しかし、これらのタンパク質分解の教材でも、現場の授業の1校時以内にその実験結果が得られるものはなかった。そこで、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬を用いて、タンパク質分解酵素であるトリプシンの酵素反応を10分前後で行える教材を開発するのが、本研究の目的である。

ウシ血清アルブミン水溶液をバイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)のタンパク質定量試薬で青色に発色させたときに、595nmの波長の吸光度が1.0程度になるように、酵素反応液中のウシ血清アルブミンの濃度を800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。この800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ血清アルブミンに対して、トリプシンの濃度を①80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または③5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としてそれぞれ作用させ、どの酵素濃度が最適なのか調べた。その結果、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度が適している(図1)、さらにこの条件下で39℃で10分間酵素反応させると、肉眼でもウシ血清アルブミンの分解が明確に確認できた(図2)。なお、ここで用いられたトリプシンはブタ由来であるので、この酵素の反応温度をブタの正常体温と同じ39℃とした。

高等学校「生物」の教科書では、カタラーゼ⁷⁾¹⁰⁾ またはルシフェラーゼ¹⁴⁾ の活性に及ぼす温度の影響、およびカタラーゼ⁷⁾⁸⁾¹¹⁾ またはルシフェラーゼ¹⁴⁾ の活性に及ぼすpHの影響が示されている。そこで、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含むBuffer (pH9.0) を、0℃、39℃、または65℃で10分間酵素反応させると、トリプシンの活性は39℃で最も高かった(図3、図4)。また、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む④pH3.0、⑤pH6.0、または②pH9.0のBufferを、39℃で10分間酵素反応させると、トリプシンの活性はpH9で最も高かった(図5、図6)。

以上の結果から、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬を用い、ウシ血清アルブミンを基質として、トリプシンの酵素反応が安全に短時間ででき、加えて、この酵素活性に及ぼす温度およびpHの影響の結果も得やすい、タンパク質分解酵素の新たな教材をここに提唱することができた。実際には、上記のⅢの1を中学校理科2年生の授業で、上記Ⅲの1～3を高等学校「生物」の授業で、それぞれ行うことができると考える。

V まとめ

①80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシン（和光純薬工業(株) Catalog No: 201-19181）および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer（pH9.0）2 ml、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer（pH9.0）2 ml、または③5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer（pH9.0）2 mlを、39℃で20分間、トリプシンの酵素反応をさせた。このとき、5分おきに酵素反応液を80 μl それぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッド ラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4 ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。また、発色した青色の濃さも肉眼で確認した。その結果、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の酵素濃度が適量で、さらにこの条件下で39℃で10分間酵素反応させると、肉眼でもウシ血清アルブミンの分解が明確に確認できた。つぎに、②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer（pH9.0）2 mlを、0℃、39℃、または65℃で10分間酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、トリプシンの活性は39℃で最も高く、このことは発色した青色の濃さの違いとして肉眼でも容易に確認できた。さらに、④20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸 Na Buffer（pH3.0）2 ml、⑤20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer（pH6.0）2 ml、または②20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンおよび800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸 Na Buffer（pH9.0）2 mlを、39℃で10分間酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、トリプシンの活性はpH9で最も高く、このことは青色の濃さの違いとして肉眼でも確認できた。よって、中学校理科2年生の授業または高等学校「生物」の授業において、以上をタンパク質分解酵素の新たな教材として提唱できた。

なお、本研究は、一般財団法人教友会の平成26年度研究助成金を用いて行われた。筆者らは、この一般財団法人教友会にここで深く感謝申し上げる。また、本研究の一部は、山形大学大学院教育実践研究科の大学院生を対象とした授業科目「教職実践プレゼンテーション I（教科教育高度化分野・理科）」の中で、生物教育の教材開発研究として行ったものである。

引用・参考文献

- 1) 岡村定矩、藤嶋昭、ほか49名（2012）「文部科学省検定済教科書 新しい科学2年」東京書籍pp. 85-86.
- 2) 有馬郎人、ほか57名（2012）「文部科学省検定済教科書 理科の世界2年」大日本図書 pp. 101-102.
- 3) 霜田光一、ほか25名（2012）「文部科学省検定済教科書 中学校科学2」学校図書 pp. 130-131.

- 4) 細矢治夫、養老孟司、下野洋、福岡敏行、ほか25名 (2012)「文部科学省検定済教科書 自然の探求 中学校理科 2」教育出版pp. 131-132.
- 5) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物基礎」新興出版社啓林館 pp. 43.
- 6) 吉里勝利、ほか17名 (2014)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物基礎」第一学習社 pp. 102.
- 7) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物」新興出版社啓林館 pp. 29.
- 8) 吉里勝利、ほか16名 (2014)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物」第一学習社 pp. 46.
- 9) 嶋田正和、ほか11名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物基礎」数研出版 pp. 39.
- 10) 浅島誠、ほか20名 (2014)「文部科学省検定済教科書 生物」東京書籍 pp. 35.
- 11) 嶋田正和、ほか21名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物」数研出版 pp. 25.
- 12) 浅島誠、ほか20名 (2014)「文部科学省検定済教科書 生物」東京書籍 pp. 50-51.
- 13) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013)「文部科学省検定済教科書 生物」新興出版社啓林館 pp. 56.
- 14) 庄野邦彦、馬場昭次、ほか12名 (2015)「文部科学省検定済教科書 生物」実教出版 pp. 32-33.
- 15) 加藤良一、大岩悠子、小川馨慧、高橋大輔、原田隆人、吉田貴行、鈴木隆 (2008)「タンパク質分解の教材化」山形大学紀要 (教育科学) 14:283-293.
- 16) 菅原潔、副島正美 (1977)「生物化学実験法 7 蛋白質の定量法 第2版」学会出版センター pp. 74-88.
- 17) 菅原潔、副島正美 (1977)「生物化学実験法 7 蛋白質の定量法 第2版」学会出版センター pp. 95-108.
- 18) 菅原潔、副島正美 (1977)「生物化学実験法 7 蛋白質の定量法 第2版」学会出版センター pp. 147-165.
- 19) 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.
- 20) 大鹿聖公、池田秀雄 (1991)「タンパク質の消化に関する実験」生物教育31 (1) :66-67.
- 21) 高木幸子、所康子、藤原康晴、山下伸典 (2001)「生活環境における酵素の働きを考える家庭科教材の開発—落下式粘度計による食品中のタンパク質分解酵素の活性の測定およびその活性と食生活との関係—」科学教育研究 25 (1) :35-43.
- 22) 石川統、ほか12名 (2006)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物Ⅱ」東京書籍 pp. 14-15.
- 23) 石川統、ほか12名 (2006)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物Ⅱ」東京書籍 pp. 16-17.

Summary

Ryoichi Kato¹⁾, Hiroko Arakawa²⁾³⁾, Masamichi Doi⁴⁾,

Tomohiro Nagane⁵⁾, Takuji Suzuki¹⁾

Teaching materials of enzymatic reaction of trypsin using the protein assay dye reagent purchased

Trypsin reacted by an incubation in 20 mM boric acid Na buffer (pH9.0) containing 20 μ g/ml of trypsin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Catalog No : 201-19181) and 800 μ g/ml of bovine serum albumin at 39 °C for ten minutes. The blue developed by an addition of the protein assay dye reagent of Bio-Rad Laboratories, Inc. into the buffer, it was recognized by the naked eye that the blue became light after the trypsin reaction, and the result was able to show the decomposability of bovine serum albumin with trypsin. The effects of temperature and pH on trypsin activity were recognized under the same enzyme reaction.

- 1) Food and Nutrition, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University
- 2) Professional School of Education, Graduate School of Teacher Training, Yamagata University
- 3) Shinjo Municipal Hagino Junior High School
- 4) Yamagata University Junior High School
- 5) Senior High School Affiliated to Aichi University of Education