

参考図書：[メタボロミクス実践ガイド](#)（羊土社）

このプロトコールは上記の書籍を参考にしています。細かいコツなどは本書をご確認ください。徳島大学図書館で貸し出しています。

必要な実験装置：

- ・冷却遠心機（4°C、16,000×g で回せるもの） 例 KITMAN-18

親水性代謝物の抽出方法（培養上清）

注1：測定の前日か当日に調製する

1. 培養上清 300 μ L 以上をチューブで受け取る。
2. 培養上清 150 μ L を 1.5ml チューブに回収する。
3. アセトニトリル 300 μ L を加えてボルテックス
4. 4°C、15,000×g で 5 分間遠心分離を行う。
5. 上清 200 μ L を新しい 1.5 mL チューブに回収し、200 μ L の 0.2 M HCL を加えて混合
6. 4°C、15,000×g で 5 分間遠心分離を行う。
7. 上清 300 μ L をバイアルに移して測定

→7 まで進めて、乾固済みのサンプルを-80°Cで保管して下さい。その後、下記のフォームから分析依頼を出して藤井センター3階にお持ちください。

アミノ酸受託分析依頼フォーム

<https://forms.office.com/r/auU4D6xY6L>

前処理に関する質問とその回答

質問1：アミノ酸分析に必要なサンプル量を教えて下さい。

回答1：目安として下記の一覧を参考にサンプルを用意して下さい。一度分析をしてその結果を元に量を減らしたり、増やしたりトライ&エラーする必要があります。

表1 サンプル量の目安

サンプル	サンプル量	抽出溶媒	備考
血清	20 μ L	500 μ L	分液時水 280 μ L を追加
臓器（肝臓・秘蔵）	25-50 mg 新鮮重	20 倍量	マルチビーズショッカーなどで破碎する。
培養細胞	10 ⁷ cells	500 μ L	分液時、水を 100 μ L 追加
シロイヌナズナの植物体	25-50 mg	20 倍量	

質問 2：手持ちの遠心機が $14,800 \times g$ が最大ですが問題ないですか？

回答 2： $14,800 \times g$ で問題ありません。

質問 3：内部標準品を使ってサンプル間のバラつきを補正する場合は何を使えば良いですか？また、どの程度添加すれば良いですか？

回答 3：基本的に質量分析の場合は安定同位体のアミノ酸を使うのが良いと思います。サンプル当たり $1 \sim 2 \text{ nmol}$ 程度を目安に加えて下さい。質量分析用に 19 種類の安定同位体アミノ酸混合物を販売しているメーカーがあります。

興味のある方は担当者（西野 k_nishino@tokushima-u.ac.jp）にご連絡ください。

質問 4：内部標準品を加えるタイミングはいつですか？

回答 4：工程 3 の冷メタノールに内部標準品を添加しておき、冷メタノールをサンプルに加えて下さい。