

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：

- ・ 破砕機（組織を破砕できるもの） 例 TissueLyser II
- ・ 冷却遠心機（4℃、16,000×gで回せるもの） 例 KITMAN-18
- ・ 遠心濃縮機 例 SPD1010

破砕機や遠心濃縮機が研究室にない人は別紙「必要な装置の利用可能施設紹介」をご覧ください。学内で利用可能な施設を紹介しています。

親水性代謝物の抽出方法（組織）

1. 組織を破砕装置用のチューブに回収する。
2. チューブに破砕体を入れて、破砕機で破砕する。
注1：破砕機によって使用できるチューブや破砕体が異なるので機器の担当者に聞きながら破砕して下さい。
注2：破砕時は温度が上がるのでこまめに氷中や液体窒素で冷やしながら破砕して下さい。
3. 20倍量の冷メタノールを加えて攪拌する（組織50mgなら1mL）。
4. 破砕体を取り出す。破砕体に組織が付着しないように注意しながら取り出す。
5. 氷上で5分間静置した後に、4℃、16,000×gで5分間遠心分離を行う。
6. 上清500μLを2mLセイフロックチューブに回収する。
7. 新たな2mLセイフロックチューブに回収した上清500μLに対して、クロロホルム（500μL）、水（200μL）を加える（メタノール/クロロホルム/水=500/500/200μL）
8. ボルテックスで攪拌後、4℃、16,000×gで5分間遠心分離を行う。
9. 親水性代謝物分析のために、上相500-600μLを回収し、遠心濃縮機にてサンプル乾固後、分析まで-80℃で保存する。

→9まで進めて、乾固済みのサンプルを-80℃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ください。

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 1~2 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。