

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：

- ・超音波破碎処理機（ウォーターバスタイプ） 例 BIORUPTOR
- ・冷却遠心機（4°C、16,000×gで回せるもの） 例 KITMAN-18
- ・遠心濃縮機 例 SPD1010

超音波破碎機と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（培養細胞）

1. ステンレスバットに氷を敷き詰め、その氷上に培養した細胞の 10 cm ディッシュを並べて準備
2. ディッシュの培養上清を吸引除去した後、10mL の PBS (4°C) あるいは、10mL の 5% (w/v) マンニトール溶液にて細胞を 2 回洗浄する（できる限り洗浄液を除く）。
3. 1 mL の冷メタノール（使用直前まで-30°Cで冷却）を細胞に加えて代謝反応を停止（クエンチ）
4. セルフスクレーパー処理により細胞を素早く剥がした後、細胞を含む冷メタノール液 1 mL を 1.5 mL のセイフロックチューブに回収する。
5. 1 分間のボルテックス (Max) による攪拌操作および 5 分間の超音波処理により代謝物を抽出する。
6. 氷上で 5 分間静置した後に、4°C、16,000×g で 5 分間遠心分離を行う。
7. 上清 600 μL を 2 mL セイフロックチューブに回収する。
8. **（この工程はオプションです）** 残渣の沈殿物を BCA アッセイによる総タンパク質定量を行う。総タンパク質量からサンプルの細胞数のバラつきを補正できます。
9. 新たな 2 mL セイフロックチューブに回収した上清 600 μL に対して、クロロホルム（600 μL）、水（480 μL）を加える（メタノール/クロロホルム/水=600/600/480 μL）
10. ボルテックスで攪拌
11. 4°C、16,000×g で 5 分間遠心分離を行う。
12. 親水性代謝物分析のために、上相 600-800 μL を回収し、遠心濃縮機にてサンプル乾固後、分析まで-80°Cで保存する。下層を吸ってしまう場合は回収量を減らして下さい。再度遠心しても構いません。

→12 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。