

ホルモン解析プラットフォームを用いた共同研究について

(ver.2.2: 2012.7.24)

理化学研究所は、文部科学省最先端研究基盤事業「[植物科学最先端研究拠点ネットワーク](#)」の研究支援の1つとして、質量分析機を用いた (I) 植物ホルモン定量解析・(II) 植物ホルモン高精度質量分析を行います。本研究支援は共同研究として行わせて頂きます。以下の注意点をよくお読みいただいたうえでお問い合わせください。

I. 植物ホルモン定量解析

使用機器

固相抽出装置：

[Hamilton STAR](#) または [Gilson SPE215](#)

液体クロマトグラフィー／質量分析機 (LC-qMS/MS)：

Waters [UPLC-Quattro Premier XE](#)

Waters [UPLC-Xevo TQ-S](#)

利用する上での注意点

解析はサンプルを理研にお送りいただき、理研側で抽出と質量分析を行います。

*受付出来ないサンプル

物理的な理由：ビーズ粉砕装置での粉砕が困難なサンプル（硬いまたは大きいなど）。

指定の容器（それと同等の強度、形状のもの）を使用していないもの。

生物的な理由：毒性・感染性のある病原菌など、安全管理上取り扱いが困難なもの。

識別が不能：サンプル受取り時にサンプルネーム・番号が解読不能なもの。（シールは剥がれてしまいます。）

測定時間上の理由：サンプル数があまりに多く、かつ、測定結果が必要な期限がこちらの解析スケジュールと合わない場合。

共同研究に不向き：論文化できない、大規模スクリーニング、目的が明確でないなど。

利用の流れ

- ① 事前打ち合わせ
- ② 申請書の提出、審査
- ③ 解析の詳細打ち合わせ
- ④ 分析依頼サンプルの送付（送付方法：例>クール宅急便など）
- ⑤ 測定結果（納期は、状況によって異なるためご相談ください。）

植物ホルモン分析定量の流れ（詳細は後述）

- ① サンプル調製およびサンプリング
- ② 破碎・抽出・精製
- ③ 分析・定量：LC-qMS/MS を用いた分析定量
- ④ データ解析
- ⑤ データ納品

注意点

- ①：サンプリングは測定結果に大きく影響を与えますので、注意点を参照の上行ってください。
- ②, ③：複数の依頼者のサンプルを同時に行います。

費用負担

現状では、費用負担をお願いしておりませんが、サンプリングチューブとサンプル破碎用のビーズ(後述)はご購入くださいますようお願いいたします。サンプル送付にかかる費用も各自ご負担ください。

Authorship

解析結果を用いた発表をする場合は、榊原均（e-mail: sakaki@riken.jp）に事前（論文投稿前、学会発表要旨投稿前）に御連絡いただくとともに、小嶋美紀子（Kojima Mikiko）、榊原均（Sakakibara Hitoshi）両名を共著者として下さい。

納期

納期は、機器の故障およびサンプルの混雑状況によって異なります。

植物ホルモン定量分析のためのサンプリング方法などについて

分析方法の詳細は以下の論文に紹介されています。

参考論文

[Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. and Sakakibara, H. \(2009\) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 50: 1201-1214.](#)

➤ 測定可能なサンプル

- ・ 生重量 100 mg 程度までの植物サンプルで、ビーズ粉砕機で粉砕可能な物。
- ・ 指定のサンプリングチューブ*内で、濃縮済みの液体サンプル。
- ・ いずれのサンプルも、最大 100 個/回 程度。

➤ 測定可能な植物ホルモン (2011.2 月現在)

Hormone species	
Cytokinin	tZ, tZR, cZ, cZR, iP, iPR, DZ, DZR, tZ7G, tZ9G, tZOG, tZROG, cZOG, cZROG, DZ9G, iP7G, iP9G, tZRP _s , cZRP _s , iPRP _s , DZRP _s , cZRPOG, tZRPOG
Auxin	IAA, IA-Ala, IA-Leu, IA-Ile, IA-Asp, IA-Phe, IA-Trp
Gibberellin	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₈ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₁₉ , GA ₂₀ , GA ₂₄ , GA ₄₄ , GA ₅₃
Abscisic acid	ABA
Salicylic acid	SA
Jasmonic acid	JA

- ・ 略称の解説は、上記の論文参照

1. サンプリング

- ① サンプルリスト (事前に Excel ファイルのひな形を送付) を作成してください。
- ② 指定のサンプリングチューブ (ジルコニアビーズ入り) の蓋と側面に油性ペンで直接番号を記入してください。番号を書いたシールを貼りつけたものだと、操作中にはがれてしまいます。

2 ml tube : Assist 2ml サンプリングチューブ (セーフシール) Cat.No. 72.695.500
5 mm ジルコニアビーズ : バイオメディカルサイエンス 製品番号 ZZ50-0001

- ・ チューブには、番号以外の情報を書かないでください。

- ・ サンプリングシートに、チューブの番号に対応するサンプルの内容を記録してください。
同じシリーズのサンプルは、連続するよう並べてください。

困った例 1

蓋の表記の解読が大変困難であるもの。

細かな文字でたくさんの情報が書き込まれていて、番号の表記が読みにくいもの。

困った例 2

不透明なチューブを使用しているもの。



- ③ 風袋（サンプリングチューブ+ビーズ）の重量を測定します。

- ・ 精密天秤を用いて、**0.1 mg** まで測定してください。

- ④ サンプルをチューブにいれてください。

- ・ サンプルについての水分は、十分に拭き取ってください。サンプルに水分が付着したまま、重量を測定してしまうと、正確な測定値を得ることができません。
- ・ 大きなサンプル（長さ **2 cm** を超えるもの）、堅いサンプル（茎、果実など）は、**2~3 mm** 角程度の大きさにしてからチューブにいれてください。

ビーズ粉砕機は、チューブを縦方向に振動させてサンプルを粉砕します。チューブいっぱいの長さのサンプルだと、ビーズが振動するだけでサンプルが十分に粉砕されないことがあります。

困った例 3

チューブと同じくらいの長さのままのイネの葉



困った例 4

チューブにまるごと入れられたイネ茎頂



- ⑤ サンプリング後、風袋込みの重量（ビーズ入りサンプリングチューブ+サンプル）をできるだけ素早く秤量。重量をサンプリングシートに記入。自動的にサンプル重量が計算されます。

サンプル入りチューブを即座に液体窒素で凍結。

Beads mixer (Mixer mill)をお持ちであれば粉砕してください。

適当なサンプルボックスにチューブを並べて入れてください。

その後、**-80度**で保存。

- ⑥ 送付の場合は、発泡スチロール箱に十分な量のドライアイスを入れてクール便で送付。サンプリングシートは別途メールにて榊原にお送りください。

必ずドライアイスを含めた発泡スチロールの箱にサンプルを入れてお送り下さい。

クール便の冷凍庫の温度ではサンプルが溶けてしまいます。

ドライアイスの量は、サンプルボックスの上下、側面を囲む事ができるくらいあれば安心です。

困った例 5

サンプルボックスに入っていないもの。（数が少なければ問題ありませんが、10サンプル以上有る場合は、サンプルボックスに並べてください。）

送付先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

理化学研究所 植物科学研究センター 生産機能研究グループ (E714)

榊原 均

2. 結果の見方

結果は、Excel file を E-mail に添付してお送りします。

- ・ 基本的に内部標準の回収率と、サンプル重量を基に、pmol/g fresh weight として算出します。
- ・ 1種類が3連以上のサンプルについては、平均 (Ave.) と、標準偏差 (S.D.) を算出し、S.D.の大きなものに関しては色をつけて表示し、生データを確認してからお返ししています。

以上

小嶋美紀子・榊原均

II. 植物ホルモン高精度質量分析

AB SCIEX Triple TOF 5600 を用いた解析では、より精密な質量分析が可能となります。具体的には、ホルモン等の低分子化合物の精密な分子量決定、夾雑物が多いサンプルからのホルモン類の定性解析等に特に威力を発揮します。なお、本装置は多検体試料の迅速な解析には対応できません。

ご依頼の際には、担当者との事前打ち合わせが必要になります。初めに榊原均 (sakaki@riken.jp) にお問い合わせ頂ければ、理研側で適宜判断させていただきます。サンプルの種類、形状、量（特に微量な場合）など、その都度ご相談させていただきます。

使用機器

[AB SCIEX Triple TOF 5600](#)

分析可能なホルモン類

(内部標準が手に入れば下記以外も対応可能な場合があります。その他、未同定物質の質量分析等に関してもご相談ください。)

ジベレリン：GA₁, GA₄, GA₈, GA₉, GA₁₂, GA₁₅, GA₁₉, GA₂₀, GA₂₄, GA₂₉, GA₃₄, GA₄₄, GA₅₁, GA₅₃ (その他の GA についてはご相談ください)

オーキシシン：IAA (結合型、生合成中間体についてはご相談ください)

アブシジン酸：ABA

ジャスモン酸：JA, JA-Ile (生合成中間体についてはご相談ください)

サリチル酸：SA

サイトカイニン：tZ, iP, DHZ

利用の流れ

- ① 事前打ち合わせ
- ② 申請書の提出、審査
- ③ 解析の詳細な打ち合わせ
- ④ 分析依頼サンプルの送付 (もしくは持ち込み)
- ⑤ 抽出・精製・機器分析・データ解析
- ⑥ 解析結果

費用負担

基本的には費用負担をお願いしておりませんが、状況に応じて精製用カートリッジ等の消耗品をご購入頂く場合があります。サンプル送付にかかる費用も各自ご負担ください。

Authorship

解析結果を用いた発表をする場合は、事前 (論文投稿前、学会発表要旨投稿前) にご連絡頂く共に、解析に携わった担当者 (実際の状況によります) を共著者として頂くことをお願いします。

納期

納期は機器の状態、ご依頼のサンプル数、全体の解析依頼件数などによって異なります。全体の作業の効率化の都合上、必ずしもご依頼を受けた順番通りに解析が進むとは限りません。

瀬尾光範・榊原均