

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.2.7: 2018.4.1)

理化学研究所環境資源科学研究センターでは、質量分析機を用いた植物ホルモン定量解析を行っています。本解析プラットフォームを用いて共同研究をベースとした研究支援を行います。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。

植物ホルモン定量解析

1. 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-Xevo TQ-S](#)
Thermo [UHPLC-Q-Exactive](#)

2. 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。

サンプルの受け取りは、トラブル防止のため毎週木曜日の午前（祝日は除く）に限らせていただいております。

お手数ですが、事前にサンプル到着日をご連絡ください。

***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。

注）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、且つ、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。

3. 利用の流れ

- ① 事前打ち合わせ
- ② 申請書の提出
- ③ 解析の詳細打ち合わせ
- ④ 分析依頼サンプルと「[植物サンプルの授受における確認書](#)」の送付
(毎週、木曜日午前限定。事前に到着予定日をご連絡ください。)
- 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。)

4. 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-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。

植物サンプルの送付に先立ち、「[植物サンプルの授受における確認書](#)」への記入をお願いしております。詳細は個別にお知らせ致します。

5. 費用負担

植物科学最先端研究拠点ネットワークの植物ホルモン定量解析では、これまでサンプルの抽出から定量解析にかかる費用のすべてを理研側で負担してきましたが、昨今の予算状況の変化から、これまでのような形での解析支援が困難な状況になってきました。

そこで、消耗品の費用の一部を依頼者の方に負担していただくことに致しました。

詳細については支援用件ごとに個別に相談させていただきます。

何卒ご協力のほどよろしく申し上げます。

6. 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)、竹林裕美子 (Takebayashi Yumiko)、榊原均 (Sakakibara Hitoshi) を共著者として下さい。

7. 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。特定の日時までの結果送付はお約束できません。

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

分析方法は以下の文献を元にしてしています。

1. 参考文献

Kojima, M. and Sakakibara, H. (2012) Highly sensitive high-throughput profiling of six phytohormones using MS-probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 918: Chapter 11. pp151-164. Springer.

[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.](#)

2. 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、凍結乾燥処理された物。
- ・ 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。

*あらかじめ粉砕されたものをお送りいただくと大変助かります。可能な限りご協力をお願いします。

3. 測定可能な植物ホルモン (2016.11 月現在)

Hormone species	
Cytokinin	tZ, tZR, cZ, cZR, iP, iPR, DZ, DZR, tZ7G, tZ9G, tZOG, tZROG, cZOG, cZROG, DZ9G, iP7G, iP9G, tZRPs, cZRPs, iPRPs, DZRPs, 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 ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₀ , GA ₂₄ , GA ₄₄ , GA ₅₃
Abscisic acid	ABA
Salicylic acid	SA
Jasmonic acid	JA, OPDA, JAIIe
Brassinosteroid	BL, CS
Ethylene	ACC

- ・ 略称の解説は、上記の論文参照

4. 測定する植物ホルモンについて

近年の財政状況、標品の入手困難、作業効率を鑑みて、測定が必要な植物ホルモン分子種を選択していただいております。サンプル送付のご連絡時にご連絡ください。

特定の植物ホルモンのみの定量をご希望の場合は、その分子種をお伝え願います。

いくつかの分子種の定量をご希望の場合は、以下のコースから選択して下さい。

GA1GA4 コース	GA1, GA4	+	Cytokinin, Auxin, ABA, SA, JA, JAIIe
GA1 コース	GA1, GA4, GA8, GA19, GA20, GA44, GA53	+	Cytokinin, Auxin, ABA, SA, JA, JAIIe
GA4 コース	GA1, GA4, GA9, GA12, GA15, GA24	+	Cytokinin, Auxin, ABA, SA, JA, JAIIe
GA All コース	GA1, GA3, GA4, GA7, GA8, GA9, GA12, GA15, GA19, GA20, GA24, GA44, GA53	+	Cytokinin, Auxin, ABA, SA, JA, JAIIe

OPDA, BL, CS, ACC の測定について

- * これらの分子種は、特に注目している場合にのみ測定を行います。別作業になるために解析に非常に時間がかかることをあらかじめご了承ください。
- * OPDA の内部標準物質は、大変高額であるためサンプル数によっては試薬購入のご負担をお願いする可能性があります。

5. サンプルリング

サンプル輸送時におけるトラブルをできるだけ少なくするために、サンプルを凍結乾燥処理していただく事を推奨していますが、そのための機器をお持ちでない場合は、凍結状態のサンプルをお送りいただくことも可能です。

正確な植物ホルモン定量のために、以下の注意事項をよく読んでいただきサンプルリングしてくださいませよう、よろしくお願いたします。

5.1 フリーズドライサンプルの場合

- 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 指定のサンプルリングチューブ (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 : eppendorf Safe-Lock Tubes 2.0mL Order no.:0030 120.094

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

注意

- ・ チューブには、番号以外の情報を書かないでください。
- ・ サンプルリングシートに、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。

注意

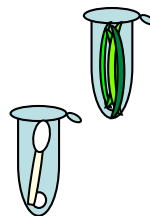
- ・ サンプルについての水分は、十分に拭き取ってください。サンプルに水分が付着したまま重量を測定してしまうと、正確な測定値を得ることができません。
- ・ 大きなサンプル（長さ 2 cm を超えるもの）、堅いサンプル（茎、果実など）は、2~3 mm 角程度の大きさにしてからチューブにいれてください。
- ・ ビーズ粉砕機は、チューブを縦方向に振動させてサンプルを粉砕します。チューブいっぱい長さのサンプルだと、ビーズが振動するだけでサンプルが十分に粉砕されないことがあります。

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し重量をサンプリングシートに記入してください。

即座に、サンプル入りチューブを液体窒素で凍結させてください。

- ⑥ サンプルを凍結乾燥させてください。

お手持ちの装置に合わせて処理してください。

*不明点がありましたらお問い合わせください。

- ⑦ サンプリングチューブはサンプリングボックスに番号順に並べて、「[植物サンプルの授受における確認書](#)」を同封し、宅配便でお送りください。

サンプル受付日は毎週木曜日となっています。

事前に、送付日時を E-mail にてご連絡をおねがいいたします。その際、サンプリングシートもお送りください。

送付先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22 E712

理化学研究所 環境資源科学研究センター 質量分析・顕微鏡解析ユニット
小嶋美紀子

5.2 凍結サンプルの場合

- 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 : eppendorf Safe-Lock Tubes 2.0mL Order no.:0030 120.094

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

注意

- ・ 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入れてください。

注意

- ・ 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入れてください。

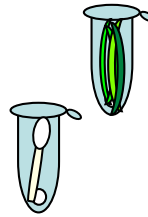
- ・ ビーズ粉砕機は、チューブを縦方向に振動させてサンプルを粉砕します。チューブいっぱい長さのサンプルだと、ビーズが振動するだけでサンプルが十分に粉砕されないことがあります。

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し重量をサンプリングシートに記入してください。

即座に、サンプル入りチューブを液体窒素で凍結させてください。

サンプルボックスにチューブを番号順に入れて、-80 度で保存してください。

- ・ Beads mixer (Mixer mill)をお持ちであれば粉砕していただけると大変助かります。

注意

- ・ キャップの周りにパラフィルムを巻かないでください。凍結状態での作業に支障をきたします。

- ⑥ 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してください。

その際、「[植物サンプルの授受における確認書](#)」を同封してください。

サンプル受付日は毎週木曜日となっています。

事前に、送付日時を E-mail にてご連絡をおねがいたします。その際、サンプリングシートもお送りください。

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。

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。（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。）

必ずサンプルボックスに並べて下さい。ドライアイスの重みでチューブが破損することがあります。

送付先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22 E712

理化学研究所 環境資源科学研究センター 質量分析・顕微鏡解析ユニット

小嶋美紀子

6. 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。

- ・ 繰り返しの実験である旨を事前にご連絡いただければ、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

理化学研究所 環境資源科学研究センター
質量分析・顕微鏡解析ユニット
小嶋美紀子・竹林裕美子・榊原均