

## 資源植物科学研究所「微量生体物質・植物ホルモン解析装置」利用手引き

### はじめに

微量生体物質・植物ホルモン解析支援は、LC/MS (Agilent 6410) を用いて主に植物のストレス応答に関連する植物ホルモン（アブシジン酸、サリチル酸、ジャスモン酸）の定量分析を行うものです。後述する抽出方法で得たサンプルを用いて、数種類（上述のホルモンに加えオーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン）の定量分析が可能です。その他の物質の定量につきましては、相談してください。

利用される場合は、事前に担当者までご連絡いただくとともに、「植物科学最先端研究ネットワーク利用申請書」により利用申請していただきます。利用案内については、以下のサイトもご覧ください。

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/collaboration/collaboration3.html>

### 使用機器

LC/qMS/MS (Agilent 6410)

### 利用の流れ

基本的にサンプルを送付していただき、当研究所で解析します。解析は共同研究が前提となります。

- ① 事前打ち合わせ
- ② 申請書の提出、審査
- ③ 解析詳細打ち合わせ
- ④ 分析依頼サンプルの送付
- ⑤ 解析結果

## 解析の流れ

- (1) 試料からの植物ホルモンの粗抽出と乾固
- (2) 試料の送付 (植物研宛)
- (3) サンプルの前処理
- (4) 固相抽出
- (5) LC-MS 解析 (アジレント社 6410Triple Quad LC/MS を使用)
- (6) 溶出スペクトラムおよび解析結果の送付 (依頼主宛)

## 試料からの植物ホルモンの粗抽出と乾固の方法

- 1) 100-500 mg の植物試料の新鮮重を迅速に秤量する.
- 2) 組織を 1 cm 角程度にハサミ等で細断し, 丸底ポリプロピレンチューブ (Falcon 14 mL Polypropylene Round-Bottom Tube 等) に取り, 直径 1 cm ジルコニアビーズと共に液体窒素で凍結する.
- 3) チューブ内で, 凍結組織とジルコニアビーズをボルテックスミキサーにより強く攪拌することで, 磨砕する.
- 4) 組織粉末に 3 mL の 80%メタノール/1%酢酸を加え混和した後, 4°C で1時間保温する. 3000 g 程度で 10 分間遠心分離後, 上清を 10 mL のディスポーザブルガラス試験管 (旭硝子 Disposable Culture Tube, 13 x 100 mm 等) に回収する. 抽出操作をもう一度繰り返す.
- 5) 溶媒を遠心濃縮機 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社 Speed Vac 等) で (40°C程度で加熱) 蒸発させ, 試料を濃縮乾固する.
- 6) 乾燥した試料を 500  $\mu$ l 程度のメタノールに溶解し, パストゥールピペット等で, 2 mL マイクロ遠心管 (エッペンドルフ社 2 mL Safe-Lock tube 等) に回収する. この操作をもう一度繰り返す.
- 7) 最後に, マイクロ遠心管内の溶媒を遠心濃縮機で蒸発させ, 試料を乾固する.
- 8) 乾燥試料を送付する.

## 溶出スペクトラムの送付とデータの解析について

LC-MS 解析では安定同位体の内部標準を用いて解析します. 定量解析の詳細についてはスペクトラムデータ送付時に各々説明いたします.

### 解析の留意点について

解析する植物種およびサンプル重量により内標添加量および粗抽出方法が変わりますので解析時に植物種およびサンプル重量をご連絡ください。

イネの解析では、感度が低いホルモン種がありますのでご注意ください。

根を含む組織からの解析は、葉状組織に比べ感度が低いホルモン種があります。

冷凍サンプルを研究所に送付いただき、研究所で粗抽出を行う方が高感度で解析出来る場合があります。

### 経費の負担について

利用に関わる消耗品などについては利用者負担でお願いします。一定期間で使用した溶媒およびメンテナンス費用についても利用者負担を原則としますが、明らかに過失と認められる故障については該当する利用者で負担していただきます。

### Authorship

成果を発表する際は、分析に関わった方を共同研究者として共著者に入れてください。また、謝辞には最先端研究開発戦略的強化費補助金による機器（supported by the Japan Advanced Plant Science Network.）と、明記してください。当研究所の共同研究として行う場合は、成果発表はその契約に従って下さい。

### 納期

納期は、機器の状態、サンプルの混雑状況により異なります。

ホルモン解析状況ページを更新しています。

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/ers/hormone.html>

参考にしてください。

### 連絡先

平山隆志 [hira-t@rib.okayama-u.ac.jp](mailto:hira-t@rib.okayama-u.ac.jp)

森 泉 [imori@rib.okayama-u.ac.jp](mailto:imori@rib.okayama-u.ac.jp)