

貳、材料與方法

一、材料

(一)蛋白質來源

分離大豆蛋白(isolated soy protein, ISP)購自台灣振芳股份有限公司

(二)蛋白質分解酵素

1. Flavourzyme®Type A、Alcalase®2.4L(2.4 Anson unit/g)、Neutralse與Esperase購自Novo Industry A/S (Copenhagen, Denmark)
2. α -Chymotrypsin、Pepsin、Trypsin購自Sigma (USA)台灣友和貿易股份有限公司

(三)水解率與凱氏氮測定

1. Leu-Gly、o-phthalaldehyde (OPA)、sodium dodecyl sulphate(SDS)購自Sigma (USA)台灣友和貿易股份有限公司
2. β -mercaptoethanol購自Merck (USA)台灣默克股份有限公司
3. Sodium tetraborate購自和光純藥工業株式會社
4. Boric acid購自Panreac Quimca Sa
5. 消化錠購自台灣今日儀器股份有限公司
6. OPA溶液配製:
solution A:3.184 g sodium tetraborate溶於去離子水中成為
100 mL溶液
solution B:20 g sodium dodecyl sulphate (SDS)定量至100 mL
去離子水

solution C: 20 mg OPA粉末溶於0.5 mL甲醇中

solution D: 50 μ L β -mercaptoethanol

7. OPA溶液組成: 12.5 mL solution A + 1.25 mL solution B + solution C + solution D 定量至25 mL於棕色瓶。

(四) 細胞培養

1. 東海大學畜產與生物科技學系陳珠亮老師提供3T3-L1前驅脂肪細胞
2. 胎牛血清(fetal bovine serum)購自Biological Industries
3. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-0)購自Gibco(USA)
以下藥品均購自Sigma USA, gentamicin sulfate, dexamethasone, isobutyl-methylxanthine, acetic acid, D-(+)-glucose, dimethyl sulphoxide, insulin, ethylenediamine tetra-acetic acid, potassium chloride, potassium phosphate monobasic, sodium bicarbonate, sodium phosphate, HEPES

(五) Oil-red O染色

Oil-red O, Isopropanol購自Sigma (USA)

二、實驗方法

(一) 大豆蛋白水解物製備

表一為6種不同酵素最適作用的溫度與酸鹼值。本實驗配製2.5%(w/v)ISP依不同酵素特性調整反應溫度與pH值如表一，攪拌20 min後加入酵素，酵素受質比例為1:100(w/w of ISP)。加入酵素前進行0 h樣品取樣，加入酵素後開始計時；本實驗取樣時間為0、0.5、1、2、4、6、8 h，樣品以沸水浴10 min使酵素失活，冷卻後取樣進行水解率分析，其餘樣品經8000 \times g離心15 min，取上清液進行冷凍乾燥而得ISP水解物(ISP hydrolysate; ISPH)以作為後續細胞實驗樣品。

(二)水解率測定

酵素對蛋白質的水解程度可經由水解率來評估，本實驗依據Church等人(1983)的方法測定之；其作用原理為蛋白質水解時會游離出 α -胺基，而OPA會與水解物中 α -胺基反應產生螢光，在波長340 nm下可測定其吸光值，吸光值越高表示 α -胺基酸愈多，蛋白質斷鍵也愈多。透過計算斷鍵胜肽數求得水解率。取現配OPA試劑 1 mL加入適當稀釋的樣品避光反應2 min，在波長340 nm下測定吸光值，另外利用不同濃度的Leu-gly製作 α -胺基當量標準曲線，同時可求出樣品的當量濃度，即斷鍵數。水解率計算公式如下：

$$DH=(H_s/H_{total})\times 100\% \quad (1)$$