

表一、蛋白酶特性

Table 1. General characteristics of proteases used in this study

Proteases	Sources	Type of protease	Reaction conditions	Preperential specificity
Flavourzyme type A	Fungi( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Endoprotease +exopeptidase	55°C , pH 7.5	Very broad specificity
Pepsin	Animals(porcine)	endoprotease	37°C , pH 2	Aromatic-COOH , Leu- , Asp-Glu-COOH
Trypsin	Animals(bovine)	endoprotease	50°C , pH 7.5	Lys- , Arg-COOH
Chymotrypsin	Animals(bovine)	endoprotease	37°C , pH 8.0	Phe- , Tyr- , Trp-COOH
Neutralse	<i>Bacillus subtilis</i>	exoprotease	45°C , pH 6.0	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methyl-coumarin
Esperase	<i>Bacillus lentus.</i>	endoprotease	60°C , pH 8.0	Broad specificity , mainly hydrophobic -COOH

DH表示水解率(degree of hydrolysis, DH),  $H_s$ 代表水解物或樣品中胜肽斷鍵數, 至於 $H_{total}$ 為等量蛋白質中胜肽總鍵數, 即ISP克數乘以ISP轉換係數(7.8 meq  $\alpha$ -胺基/g ISP)。

### (三)粗蛋白分析

取ISPH 2 mL與15% TCA溶液混合過濾後去除非蛋白態氮, 加入濃硫酸20mL和消化錠於400°C分解爐上加熱2 h, 待ISPH與濃硫酸完全反應形成硫酸胺後取出靜置冷卻, 加入75 mL蒸餾水。通蒸氣後以4%  $H_3BO_3$ (Boric acid)收集游離氨, 以0.1N HCl滴定計算含氮量。粗蛋白質(crude protein, TN%)計算如下:

$$\text{Crude protein(\%)} = \{[(V_2 - V_1) \times C \times 14] / \text{sample} \times 1000\} \times F \times 100 \quad (2)$$

$V_2$ 為滴定水解物所需HCl毫升數,  $V_1$ 為滴定blank所需HCl毫升數,  $C$ 為鹽酸當量濃度,  $F$ 是氮對蛋白質的轉換係數, 在ISP中為6.25, 而Sample代表ISPH克數 (g)。

### (四)分子量分析

以HPLC分析水解物中胜肽與胺基酸分子量分布情形。使用管柱為Superdex peptide 10/300GL(購自安瑪西亞股份有限公司)。樣品經過適當稀釋後經由標準品定義分子大小範圍。標準品與分子量如下: cytochrome C (12500 Da)、aprotinin (6500 Da)、substance P(1348 Da)、(glycine)<sub>3</sub>(189 Da)。移動相使用0.02M pH 7.2 phosphate buffer, 0.25 M NaCl, 流速為 0.5 mL/min, 偵測波長214 nm。

### (五)Oil-red O染色

依據Green and Kehinde(1975)染色方法, 經部分修飾後測定細胞內中性脂肪含量。細胞在24孔盤中於特定天數下以PBS清洗, 再用10% 福馬林固定保存於4°C冰箱1 h, 之後以去離子水清洗每孔再加入作用溶液 1 mL避光染色15分鐘, 再以去離子水清洗數次, 加入0.5 mL異丙醇退染15 min後於540 nm下測定吸光值, 吸光值越高代表油脂含量越高。Oil Red O粉末以每0.5 g/100 mL異丙醇的濃度作為儲備溶液, 使用前以0.22  $\mu$ m濾過去除雜質。每次染色前取6 mL儲備溶液與4 mL 去離子水混合成為作用溶液。

### (六)細胞培養

本實驗使用3T3-L1前驅脂肪細胞第11代, 以24孔盤培養, 細胞數為每孔 $1 \times 10^4$ 個。細胞培養液為DMEM-10 (10%胎牛血

清)，經48 h培養後進行更換，培養箱溫度為37°C，5% 二氧化碳。前驅脂肪細胞誘導分化試劑為insulin、IBMX、dexamethasone。

### 1. 探討ISPH對前驅脂肪細胞生長之影響

實驗架構如圖二stage A，於24孔盤內培養前驅脂肪細胞，起始細胞濃度約 $1 \times 10^4$ 個/孔，72 h後進行細胞記數。每次記數為三次獨立試驗平均值，記數表示法為 $\text{mean} \pm \text{S. D.}$ 。細胞記數使用tryphan blue對活細胞進行染色並於顯微鏡下呈現光亮點，死亡細胞不會呈現亮點因此可排除在計數結果以外。每次記數前先以HBSS清洗細胞並於孔內添加適量trypsin-EDTA靜置3 min使細胞懸浮，收集細胞於1.5 ml離心管內後以培養液清洗24孔盤，並重複收集細胞以確保沒有殘留。將細胞取樣與tryphan blue混合並記數。

### 2. 探討ISPH對前驅脂肪細胞分化之影響

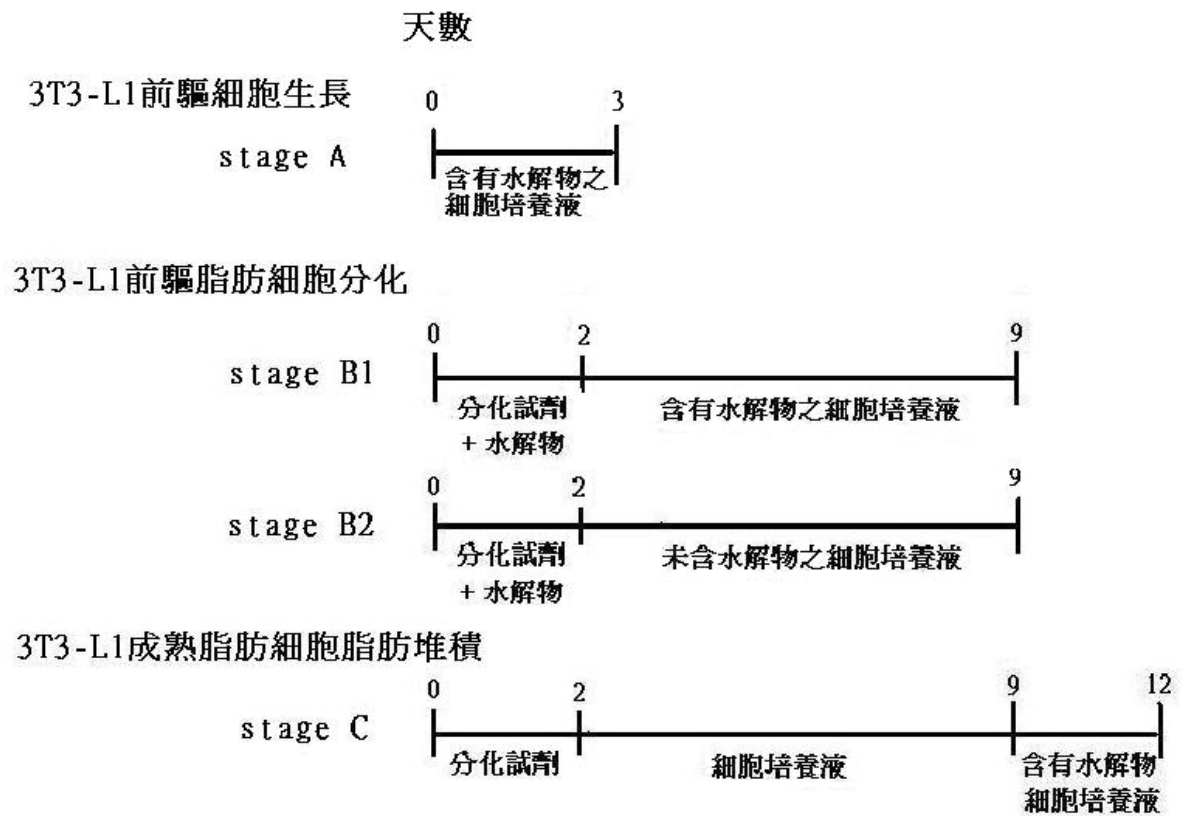
參考Kim等人(2001)與Harmon等人(2001)的分化方式來評估，分別如圖二實驗架構中stage B<sub>1</sub>與B<sub>2</sub>所示，24孔盤每孔加入 $1 \times 10^4$ 個細胞進行培養，實驗前先以四天培養細胞使其均勻增滿後於培養盤中再添加分化試劑，其使用濃度為insulin 10  $\mu\text{g/ml}$ ，dexamethasone 0.35  $\mu\text{g/ml}$ ，IBMX 0.11 mg/ml。Stage B<sub>1</sub>，參考Kim等人(2001)的方法，在48 h後換液持續以含有ISPH與insulin 10  $\mu\text{g/ml}$ 的培養液培養；而stage B<sub>2</sub>則是參考Harmon等人(2001)，48 h內以含有ISPH的分化試劑刺激分化，之後以含有insulin 10  $\mu\text{g/ml}$ 的DMEM-10培養細胞。所有細胞每兩天更換培養液至第九天以PBS清洗細胞，以10%福馬林保存於4°C，待染色後測定油脂含量；ISPH以0.22  $\mu\text{m}$ 濾膜過濾後隨分化試劑添加。

### 3. 探討ISPH對成熟脂肪細胞之影響

如圖二實驗架構中所示stage C，前驅脂肪細胞分化後持續以含有insulin的DMEM-10對細胞進行培養，48 h更換培養液。培養至第九天即更換為含有insulin與ISPH上清液凍乾粉末的培養液，第十二天以PBS清洗細胞，10%福馬林保存於4°C待Oil-red O染色測定油脂含量。

## (七)脂質萃取

參考Fortier等人(2005)，細胞以trypsin處理後將之收集並移去上清液，以20 mL chloroform-methanol(2:1)與4 mL 0.9% NaCl震盪1 h，經過2000 $\times$ g離心10 min，取出有機溶液於37°C下蒸發，脂肪重新以chloroform- methanol (2:1)復



圖二、3T3-L1前驅脂肪細胞之生長、分化與成熟各階段的實驗架構  
 Figure 2. Experimental design for the proliferation、differentiation and maturation of 3T3-L1 preadipocytes.

溶，TG含量以TG試劑組(TR 213，Randox)測定。

#### (八)脂肪分解

TG在細胞內經三種脂解酶作用後形成丙三醇釋放出細胞外，藉由丙三醇釋放量評估脂解作用程度，使用試劑組(GY 105，Randox)測定培養液中丙三醇含量。細胞培養液收集後於70°C水浴10 min，與檢驗試劑混合後在37°C水浴5 min隨即測定在520 nm下吸光。

