

## 第二章 材料

### 2.1 細胞株

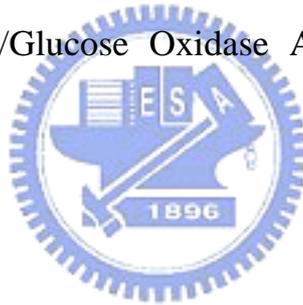
- C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (BCRC 60083)，購自台灣食品工業發展研究所。

Name	C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>
ATCC number	CRL-1772
Species	<i>Mus musculus</i> (mouse)
Tissue	Muscle; myoblast
Morphology	Myoblast
Growth Properties	Adherent
Culture Medium	90% DMEM + 10% FBS
Culture Condition	37°C , 5% CO <sub>2</sub>
Subculture Routine	Maintain cell density between 10 <sup>5</sup> to 10 <sup>6</sup> cells/ml
Freeze Medium	93% culture medium + 7% DMSO

### 2.2 試驗藥品

- Apo-transferrin(from human)，購自 Biological industries 公司。
- Trypsin，購自 Biological industries 公司。
- Penicillin-streptomycin-amphotericin B solution(PSM)，購自 Biological industries 公司。
- Fetal bovine sera(FBS)，購自 Biological industries 公司。
- Bovine sera(CS)，購自 Gibco 公司。
- DMSO，購自 Sigma 公司。
- 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)，購自 Sigma 公司。
- Giemsa，購自 Microscopy 公司。
- Vanadyl sulfate hydrate (VOSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)，購自 Sigma 公司。

- Chromium(III) chloride( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，購自 Sigma 公司。
- Cobalt(II) nitrate hexahydrate( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，購自 Showa 公司。
- Insulin(from Bovine pancreas)，購自 Sigma 公司。
- Dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DME medium) ，購自 Sigma 公司。
- Dulbecco's modified eagle's medium base(DME medium) ，購自 Sigma 公司。
- N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES) ，購自 Sigma 公司。
- Hi-trap<sup>TM</sup> desalting column ，購自 Pharmacia Biotech 公司。
- Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit ，購自 molecular probes 公司。



### 2.3 儀器設備

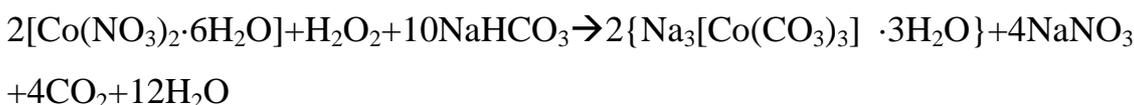
- UV-visible(HP 8453 型)
- 恆溫循環水槽(Firstek Scientific B403 型)
- 真空濃縮機
- Sonicator
- Microplate Reader Model 550(Bio-Red<sup>®</sup>)
- Beckman<sup>®</sup> 桌上型離心機
- ICP-mass

## 第三章 方法

### 3.1 三價鈷溶液備製

參考 He 和 Bauer 等人所發表的方法，並加以修飾<sup>9, 10, 21</sup>

第一步要先合成  $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，化學反應如下：



所以先把  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  solution 和過量的 35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  混和後，緩慢加入泥狀的  $\text{NaHCO}_3$  solution 中，並保持整個實驗在  $0^\circ\text{C}$  下進行 1 小時。顏色會由原本的磚紅色變為橄欖綠色的產物，之後，將其產物過抽氣漏斗，並用冰水沖洗 filtered 三次，然後再用 absolute alcohol 和 dry ether 洗 filtered 三次，最後利用真空幫浦抽乾多餘的水分。

第二步再合成  $\text{Co}^{3+}$  solution，將  $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶在 1M  $\text{NaHCO}_3$  solution 中，並放置室溫下 2 小時，之後再用過抽氣漏斗，取 filtrate，並靜置在室溫下三天，待三天過後，再過濾一次，取 filtrate，並儲存在  $4^\circ\text{C}$  中。

### 3.2 金屬錯合物滴定

參考 Zhong 和 Harris 等人所發表的方法，並加以修飾<sup>20, 40</sup>

500 $\mu\text{l}$  的 apo-transferrin 個別加入 sample cuvette 和 reference cuvette 中，再取適當體積的金屬溶液(金屬離子與運鐵蛋白的莫耳數比為三比一)，加入 sample cuvette 中，同時並取一樣的量的緩衝液加入 reference cuvette 中，並予適當的時間間隔測其吸光值。待其吸光值不再變化時，即可停止實驗。

### 3.3 金屬錯合物上多餘金屬離子之去除

利用 Hi-trap<sup>TM</sup> column 可以把多餘的金屬離子去除，而 Hi-trap<sup>TM</sup> column 主要是利用其內所填充的樹酯孔徑不同來分離不同大小分子。分別用將 25ml 的去離子水和 binding buffer 沖洗 Hi-trap<sup>TM</sup> column，並流速定在每分鐘 5ml，在沖洗 Hi-trap<sup>TM</sup> column 完畢之後，再將樣品體積補至 1.5ml 後，打入 Hi-trap<sup>TM</sup> column 中，之後，再用 25ml 的 binding buffer 打入 Hi-trap<sup>TM</sup> column 中，之後分 1ml 收一管，並分管測定 OD280。

### 3.4 SDS-PAGE

1. solving-gel solution: 15% : for 4 ml

Components	Volume (ml)
ddH <sub>2</sub> O	0.88
30% Acrylamide mixture	2
1.5M Tris (pH 8.8)	1.04
10% SDS	0.04
TEMED	0.0016
10% APS	0.04

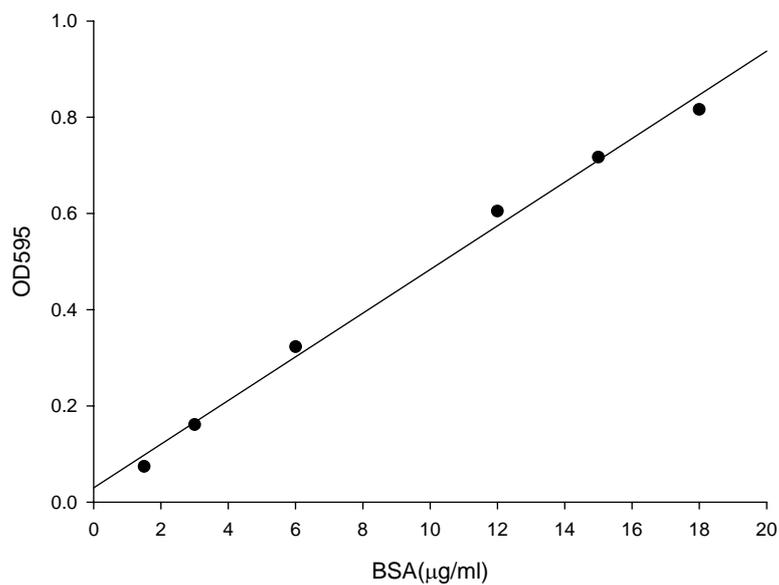
2. acking-gel solution: 5% : for 3 ml

Components	Volume (ml)
ddH <sub>2</sub> O	2.1
30% Acrylamide mix	0.5
1M Tris (pH 6.8)	0.38
10% SDS	0.03
TEMED	0.003
10% APS	0.03

將玻璃及鋁板依造操作手冊組裝起來。注入 3ml 的 resolving-gel solution 於玻璃與鋁板間的溝槽，視 Teflon comb 底部與 resolving-gel solution 上層的空隙再添補 resolving-gel solution。以 1ml 的覆蓋其表面，靜置 30 分鐘以待其凝結完全。倒掉覆蓋的 isopropanol 並側立等待其完全蒸發。注入適當體積的 stacking-gel solution 於凝結完全的 resolving gel 上，立即在 stacking-gel solution 中斜插入 Teflon comb，小心避免產生氣泡。再注入 stacking-gel solution 以完全充滿 comb 的間隙。靜置 30 分鐘，待其凝結後小心移開 comb，然後立即以二次水清洗以去除殘留未凝結的 acrylamide。將凝結完成的 gel 連同玻璃、鋁板架設於電泳槽上，小心倒入 Tris-glycine electrophoresis buffer，並小心去除藏匿於 gel 下方的氣泡。之後，將 sample 與 4x SDS gel-loading buffer 混合後，在 100°C 的沸水中靜置 5 分鐘以確保蛋白質完全 denature。先以 100 volt 進行蛋白質電泳，當 dye 通過 stacking gel 要進入 resolving gel 時，將電壓增加至 200 volt。當 bromophenol blue 到達 resolving gel 的底部時，將電源供應器關上。此時，小心將 gel 自電泳槽取下。切下 stacking gel，並將 resolving gel 浸泡於 Coomassie Blue staining solution，回收 staining solution，並將 gel 以二次水清洗 2 次。再來將 gel 浸泡於 destain solution，並置放於緩慢擺動的 orbital shaker。在 destaining 完成後，將 gel 浸泡於二次水中。將 gel 以玻璃紙密封起來，以長期儲存。

### 3.5 蛋白質濃度的測定

蛋白質濃度的測定是利用 Bio-Rad Protein Assay Kit。這個方法是依據 Bradford dye-binding procedure 而來的。在實驗中所得知的標準曲線公式為：



$$Y = 0.0454x + 0.0294$$

X: 在波長 595nm 時所測得的吸光值

Y: 蛋白質濃度(µg/ml)



### 3.6 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 分化

根據 Tortorella 和 Shiokawa 等的方法, 加以修飾之。<sup>30, 35</sup>

待 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblast 長至全滿之後(此時定義為 Day0), 吸除一半舊的培養液, 再加入一半新的分化液(99%DMEM+10%CS)。之後, 每 48 小時換一次培養液。一直到 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblast 融合成 myotube 之後即可。

### 3.7 Giemsa 染色

待 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 分化完全之後，先去舊的培養液，並用 PBS 沖洗三次。接著，用 methanol 固定細胞 10 分鐘後，再次用 PBS 沖洗。最後將 Giemsa 與去離子水以一比九的比列混合，並加入細胞中染一個小時即可。

### 3.8 萃取細胞內的葡萄糖

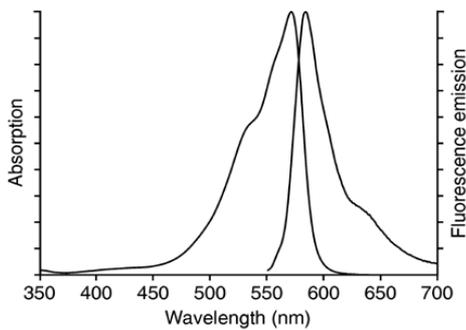
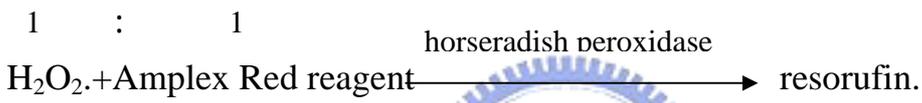
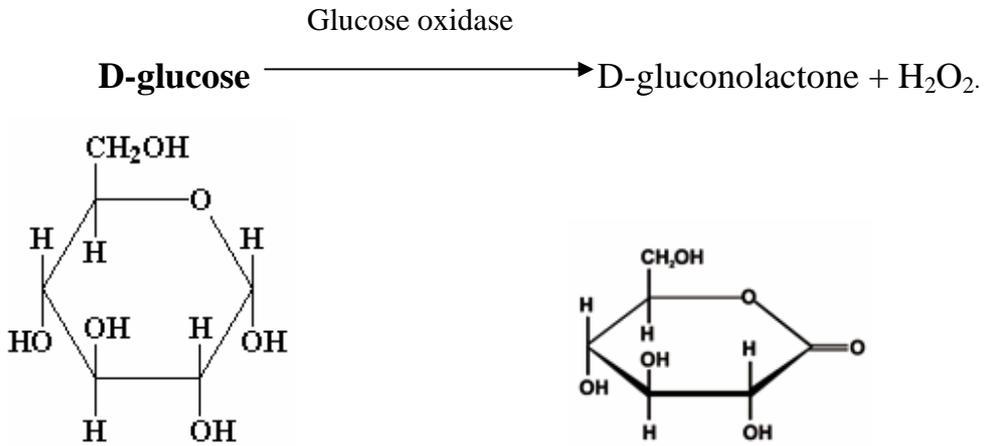
根據 Bogan 和 Moyers 等的方法, 加以修飾之<sup>11,27</sup>。在做實驗的前十六小時，將已分化 C2C12 myotube 中舊的培養液去除，並用 PBS 沖洗細胞一次後，加入 starvation medium(100%)。實驗開始後，加入適當濃度的樣品(刺激樣品溶於 DMEM base 中 DMEM;不含葡萄糖)，並放在 37°C 下 30 分鐘。30 分鐘之後加入 4mM 的 2-Deoxy-D-glucose，然後放在 37°C 下 10 分鐘。之後，為停止反應故將細胞放在冰上 10 分鐘。

接著，去除舊的培養液，用冰的 PBS 沖洗細胞三次。沖完後，用冰的 65% EtOH 將細胞刮下，並利用超音波震盪將細胞打破後，以 13000rpm 於 4°C 下離心 15 分鐘，取上清液至一新的離心管中，而 pellet 再一次用冰的 65% EtOH 將細胞打散，然後以 13000rpm 於 4°C 下離心 15 分鐘，把上清液與之前的混在一起後，利用真空濃縮機將其抽乾。之後存放在 -20°C 下。

### 3.9 葡萄糖吸收量測定

利用 Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit 來測定葡萄糖的量

原理:



Resorufin uv 光譜圖

所以可以藉由測定 resorufin 的量，來反推葡萄糖的量。