中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　農業與食品學科

052209

開發益生菌外膜蛋白 Amuc_1100 的穩定蛋白質純化方法

學校名稱： 臺北市立第一女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 施禹安	周芳妃
高二 林室均	劉宛欣

關鍵詞： 層析、蛋白質純化、AlphaFold

摘要

糖尿病和肥胖已成為現代廣泛且嚴重的問題，而腸道益生菌 *Akkermansia muciniphila* 能幫助改善糖尿病和血脂異常，其外膜蛋白 Amuc_1100 為再現醫療效益之關鍵分子，在開發益生菌產品上具有潛力，但本土 Amuc_1100 尚未被開發，因此本研究分析臺灣不同個體腸道 Amuc_1100 序列差異，以親和性層析和離子交換層析進行蛋白質純化，發現最佳的酸鹼性條件為 pH9 稀釋、pH 7.4 純化。此外結合 AlphaFold 人工智慧繪圖，創新發現蛋白質的結構與電性影響與層析管柱的結合能力。本研究不僅成功針對本土樣品開發最適合的純化方法，導入人工智慧更可在學術藥理上發揮價值，並降低產業成本提高應用。

壹、 前言

一、研究動機

近代人的飲食高油高鹽，肥胖及糖尿病是現代不可輕視的重要健康問題之一，*Akkermansia muciniphila*（簡稱 *A. muciniphila*）為近期國外發現的一種腸道益生菌，被證實能減少脂肪堆積、腸道發炎、第二型糖尿病產生以及抵抗憂鬱症等[1]，且根據目前所知，影響 *A. muciniphila* 功能的蛋白質，主要是其菌體外膜蛋白 Amuc_1100[2]，具備開發為保健食品的潛力，但文獻中關於 *A. muciniphila* 的研究主要針對從外國人腸道分離出的 Amuc_1100 樣品，並沒有針對臺灣人的相關實驗，然而不同地區飲食習慣差異會影響人的腸道環境，國外的益生菌產品不一定能完全符合臺灣人的需求，因此我們想開發出臺灣本土 Amuc_1100 的純化方法，應用於研發適合臺灣人的保健食品。

根據文獻指出，不同個體中分離出來的 *A. muciniphila* 菌株具基因體差異性[3]，在功效上也不完全相同。然而在前人的實驗中，純化蛋白質的方式主要是透過大腸桿菌大量表現蛋白質，並且以層析的方法純化[4]，並未探討對於序列不同的蛋白質，是否存在離子強度及不同 pH 值下的純化差異。因此在本研究首先想要了解不同個體所分離出 *A. muciniphila* 菌株中 Amuc_1100 的序列差異；並針對台灣人糞便所分離出之不同序列的 Amuc_1100，在不同緩衝液濃度及酸鹼性環境下，藉由檢測純化出蛋白質的純度、濃度及穩定度，探討序列不同對 Amuc_1100 純化的影響，進一步開發出最有效的純化方法。另外，我們也想要以 AlphaFold 將蛋白質的三維結構圖和電性分佈呈現在 PymoL 中，分析除了序列外，其他可能影響純化條件的因素，並將分析結果應用於 *A. muciniphila* 益生菌開發，研發有益於減少脂肪、促進健康的保健食品。

二、文獻回顧

(一) 人體微生物菌落與健康的關聯性

根據文獻指出，人體身體質量指數（body mass index, BMI）、腰臀比、空腹葡萄糖水平、血糖狀態、高密度脂蛋白（high-density lipoprotein, HDL）膽固醇水平（36%）等宿主表型與腸道微生物群之間存在顯著的相關性[5]，而環境因素如：飲食和家庭共居等…對腸道微生

物群的組成和功能的影響很大，因此在不同地區的人們在不同環境與飲食習慣下，腸道環境亦會有所差異[6]。

人體的腸道中富含大量的微生物菌落，透過序列分析，可從排泄物樣本中重建微生物的種類及功能，進而發現細菌物種腸道微生物群在人類健康中扮演重要角色，影響代謝性疾病及腸道疾病的發展，尤其在脂質代謝平衡方面發揮作用[7]。其中益生菌為給予適量補充時，對宿主健康有益的菌種，常見並有益於人體健康的腸道菌群包含乳酸桿菌（*Lactobacillus*）及雙歧桿菌（*Bifidobacterium*）[8]。這些天然腸道菌群常被開發成益生菌產品，詳細的腸道益生菌菌種與功用見下表 1.。其中疣微菌門的 *Akkermansia muciniphil*a 因能有效減少脂肪堆積，且在產業上還未引入應用性，故為近年來研究著重的菌種。

表 1. 常見的腸道益生菌與功用

常見益生	嗜酸乳桿菌（*Lactobacillus acidophilus*）	雙歧桿菌（*Bifidobacterium bifidu*）	乾酪乳桿菌（*Lactobacillus casei*）	鼠李糖乳桿菌（*Lactobacillus rhamnosus GG*）	*Akkermansia muciniphila*
功用	調節腸道菌叢環境	改善腹瀉 幫助消化	改善免疫 舒緩過敏	降低脂肪 改善腹瀉	減少脂肪堆積 改善第二型糖尿病
應用	已被廣泛應用在益生菌藥品與相關食品中				應用性尚未被開發

(二) *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*)

A. muciniphila 屬於疣微菌門，是一種革蘭氏陰性、嚴格厭氧和分解黏液的細菌[9]，占腸道環境的 1%到 5%[7]。研究指出，*A. muciniphila* 的豐度與發炎性腸道疾病(inflammatory bowel disease, IBD)、肥胖和糖尿病等疾病的發生呈負相關，因 *A. muciniphila* 可以黏附在腸上皮細胞上，能在體外增強腸細胞單層的完整，並具有能夠促進個體腸道屏障的功效[10]。在飲食誘導的肥胖模型的老鼠實驗中，口服 *A. muciniphila* 可減少老鼠體重增加、控制脂肪堆積、減少小鼠脂肪組織中促炎細胞因子的產生，因此目前研究對於開發 *A. muciniphila* 作為自身免疫性疾病和慢性發炎性疾病的免疫調節益生菌有很高的潛力[10]。

(三) 不同品系的 *A. muciniphila*

運用來自人類和小鼠糞便的 39 個分離株揭示 *A. muciniphila* 的基因組結構 ，可知 *A. muciniphila* 可分為三個系統群 AmI、AmII 和 AmIII [3]，這些系統群的共同特徵，包括氧耐受性、與 TLR2 的作用等。而 AmI、AmII 和 AmIII 間的基因組差異可能使 *A. muciniphila* 菌株對宿主健康的影響效果多元化，其中 AmI 是最常出現的系統群，在高達 93%的測試人群中均有發現。AmII 為第二常見的系統群，主要出現在人類腸道中，AmII 在歐洲人群中的發現率(44%)高於中國人(27%)和美國人(33%) [3, 11]。

(四) Amuc_1100

Amuc_1100 為 *A. muciniphila* 的一種耐高溫的外膜蛋白質，能夠再現菌株的有益效果。Amuc_1100 可和腸道表皮細胞的受體(Toll-like receptor 2, TLR2)結合，產生訊息傳遞，加強腸道屏蔽(gut barrier)，使腸道中的有害物質不會滲漏到血液中，並能促進肌肉細胞利用葡萄糖、減少肝臟釋放血糖、減少脂肪堆積等，在一定程度上重現了 *A. muciniphila* 對宿主之肥胖、胰島素阻抗和腸道屏障改變的作用 [2]。Amuc_1100 對宿主免疫反應的作用及血糖的調節機制見下圖(圖 1.)。

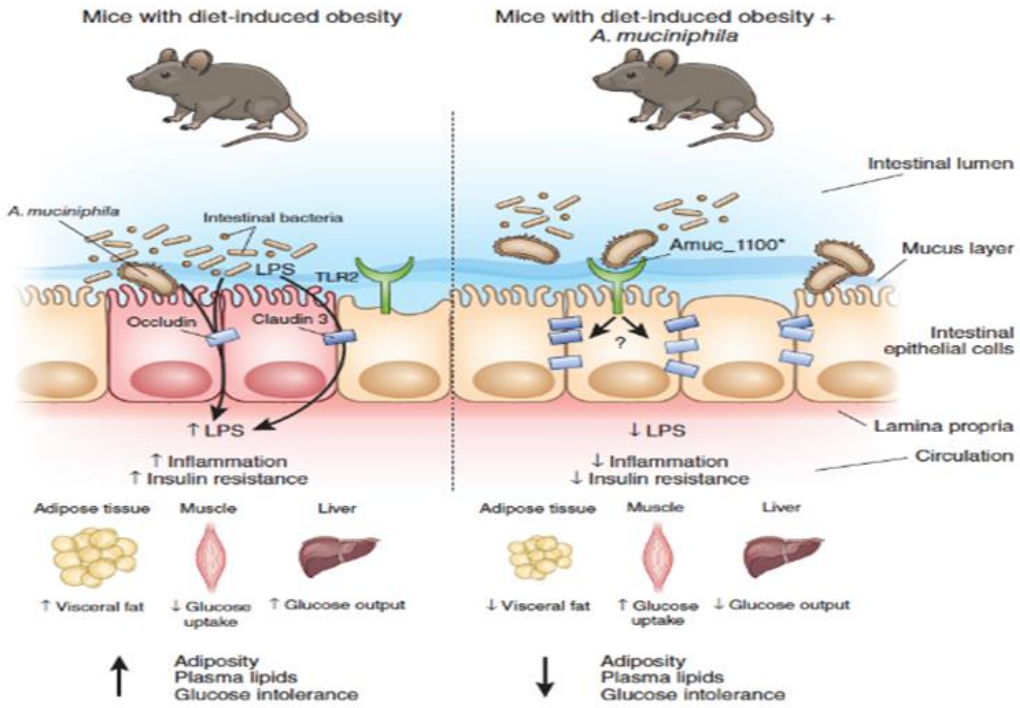


圖 1. Amuc_1100 的作用[2]

(五) 親和層析法[4]

親和層析法(affinity chromatography)是一種常用於蛋白質純化的技術，利用管柱上特定分子與目標蛋白質之間的親和作用，使目標蛋白與特定分子結合，其他雜蛋白質則在以緩衝液沖洗的過程中被移除。在配製緩衝液的過程中，藉由提高能與目標蛋白質競爭的分子濃度，可以達到純化目標蛋白質的目的。

(六) 離子交換層析[4]

離子交換層析法(ion exchange chromatography) 通過調節溶液的 pH 值，以改變蛋白質的帶電情況。在陰離子交換層析中，固定相帶有正電荷，因此具有負電荷的目標蛋白質會與之相互吸附，而不帶電或帶正電的雜蛋白質則在緩衝液沖洗的過程中被移除。藉由提高緩衝液中的鹽類濃度，使鹽類中的陰離子與目標蛋白質競爭，從而達到分離並純化的目的。

三、研究目的

(一) 探討不同個體所分離出之 *A. muciniphila* 菌株之 Amuc_1100 蛋白質序列間的差異

(二) 針對不同 Amuc_1100，找出親和性層析法和離子交換層析中緩衝液合適的濃度

(三) 找出不同酸鹼性環境，對 Amuc_1100 純化效果的影響

(四) 使用 AlphaFold 以 Amuc_1100 的序列解出其結構差異並據以解釋及分類純化條件

貳、 研究設備及器材

一、實驗設備

微量吸管

微量離心管

血清瓶

離心管

量筒

二、器材

純化	Ni-NTA 管柱、Q 管柱、濃縮管、超音波破菌機、離心機
BCA method	96孔盤、吸光光譜儀
SDS-PAGE	鑄膠台、電泳槽、玻片、齒梳

三、藥品

純化	三羥甲基胺基甲烷(Tris)、氯化鈉(NaCl)、菌種樣品、咪唑(imidazole)
BCA method	牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)
SDS-PAGE	十二烷基硫酸納(sodium dodecyl sulfate, SDS)、丙烯醯胺(acrylamide)、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine , TEMED)、過硫酸銨(ammonium persulphate, AP)、考馬斯亮藍(染色劑)

參、研究過程或方法

一、實驗流程

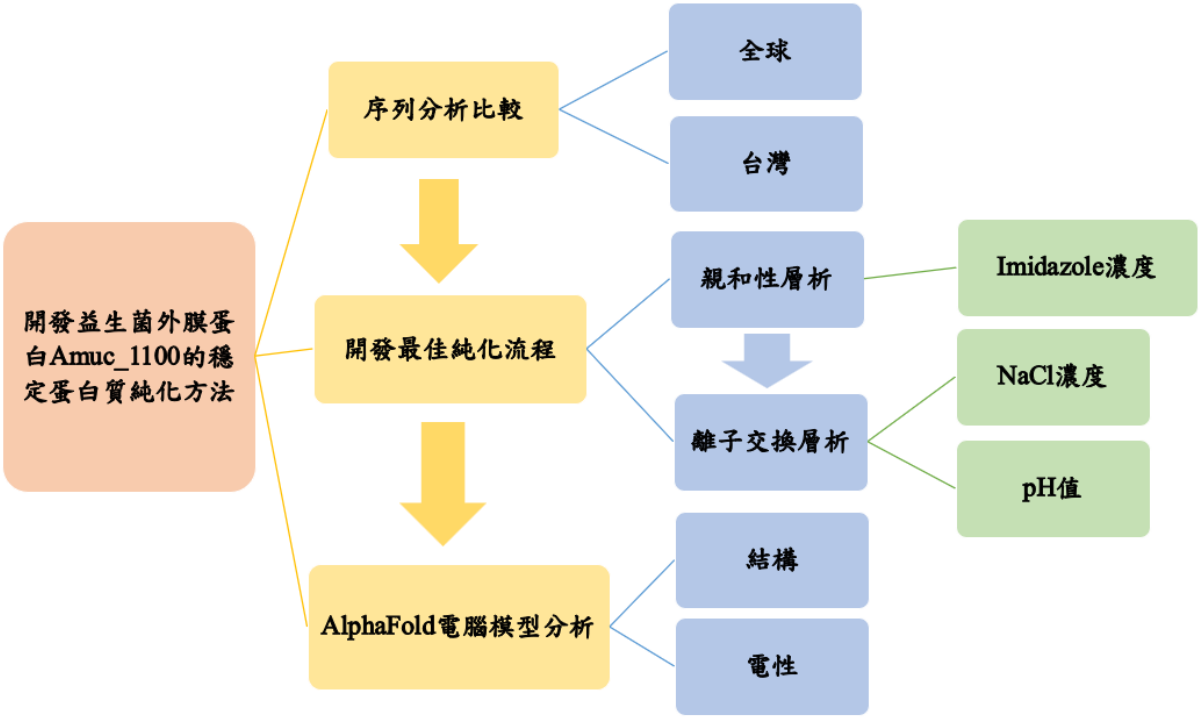


圖 2. 實驗流程圖(作者自行繪製)

二、研究設計

(一) 蛋白質序列比較

1. 不同區域之 Amuc_1100 序列比較：從生物資料庫(National Center for Biotechnology Information, NCBI)和已發表文獻中，取得已發表之 Amuc_1100 序列，並使用 BLAST 網站，並進行差異比較。

2. 臺灣人之 Amuc_1100 序列：本研究和某研究單位合作，由其技轉合作單位提供從健康臺灣人分離出的蛋白質序列

(二) 蛋白質結構分析

1. 臺灣人之 Amuc_1100 結構分析：以 BLAST 分析蛋白質序列，接著將 Amuc_1100 序列輸入 AlphaFold 預測結構，並以 PyMOL 軟體繪製並比較蛋白質三維結構圖像與電性分佈。

(三) 蛋白質表達及破菌

1. 樣品編號：本研究和某研究單位合作，借得蛋白質序列等相關資訊，將不同的人糞便取得之 *A. muciniphila* 菌株的膜蛋白 Amuc_1100 以 isolate (編號)和一組數字表示，後續實驗主要針對國際標準菌株 BAA-835 和來自臺灣人的本土菌株 isolate 02、isolate 04、isolate 05 的 Amuc_1100 進行實驗。

2. 蛋白質表達：

Amuc_1100 利用外膜區與腸道表皮受體作用，再現 *A. muciniphila* 的有益效果，而在純化的過程中，為了能使蛋白與親和性層析 Ni 管柱結合，本研究與某研究單位合作，使用實驗室在 Ecoli-BL21(DE3)大腸桿菌中表達的重組 Amuc_1100，其指去除 Amuc_1100 跨模區後，在外膜區後加上 6 個 His-tag 的樣品，實驗所採用的蛋白為具有 6 個 His-tag 的重組 Amuc_1100。

3. 蛋白質破菌：

(1) 使用實驗室在 *Ecoli*-BL21(DE3)大腸桿菌中表達的蛋白質，以-80 ˚C 保存。

(2) 取出隔水融化，並以 31.25 瓦特，20,000 赫茲進行超音波破菌。

(3) 放入 4 度的離心機以每分 13,000 轉的頻率離心 10 分鐘。

(4) 取上清液準備純化。

(三) 蛋白質純化

1. 測試用蛋白挑選

在實驗上的 Amuc_1100 蛋白選擇 BAA-835 和 isolate 02 作為測試用實驗蛋白，因為 BAA -835 和 isolate 02 有較明顯的序列差異，且 BAA -835 和 isolate 05 之間序列相近，而 isolate 02、isolate 04 之間序列相近，因此選用 BAA-835 和 isolate 02 進行實驗可以分別代表兩種不同序列的蛋白，並涵蓋所有目標蛋白序列，同時以此判斷出改變緩衝液比例對不同序列蛋白質的影響。

2. 親和性層析緩衝液濃度對 Amuc_1100 純化的影響

利用 Ni-NTA 管柱固定相和 Amuc_1100 的 His-tag 作用，使含 His-tag 的 Amuc_1100 留在 Ni-NTA 管柱中，其餘順著緩衝液離開管柱，達到去除雜蛋白並保留目標蛋白的目的，

再配置 imidazole 緩衝液，與保留在 Ni-NTA 管柱中 Amuc_1100 競爭，使 Amuc_1100 離開管柱，進而收集到目標蛋白。

[步驟]

(1) 將上清液注入 Ni-NTA 管柱並收集液體(後標示為 flow through)。

(2) 將體積分別為各 6 mL 之 0 mM、25 mM、50 mM、125 mM、200 mM、350 mM、500 mM 之 imidazole 緩衝液依序加入管柱中，收集液體。

(3) 將收集的樣品加入染色劑，準備進行蛋白質鑑定。

(4) 進行 SDS-PAGE 蛋白質膠體電泳分析，得知含有蛋白之溶液及蛋白質純度。

(5) 分析能沖出目標蛋白的 imidazole 濃度，找出最佳緩衝液濃度區間以純化不同序列的 Amuc_1100。

在測試不同緩衝液比例對純化效果的影響的實驗中，本研究配置 0 到 500 mM 的 imidazole 緩衝液，以找出可以競爭下目標蛋白的最佳緩衝液比例和順序，以低濃度的範圍內用以沖洗雜蛋白以提高純度，中濃度用以沖洗目標蛋白，高濃度確認有無殘留，純化 BAA -835 和 isolate 05、isolate 02 和 isolate 04 這兩組蛋白。

3. 離子交換層析緩衝液濃度對 Amuc_1100 純化的影響

利用離子交換管柱(Q 管柱)固定相和 Amuc_1100 結合，再配置 NaCl 緩衝液，利用緩衝液中的氯離子(Cl^-)與蛋白質競爭，使 Amuc_1100 離開管柱，進而收集到目標蛋白。離子交換層析為在親和性層析之後進行的第二次層析，取親和性層析純化出來的目標蛋白樣品通過 Q 管柱進行第二次純化，提高純化的品質和純度

[步驟]

(1) 將在親和性層析中純化出來的目標蛋白當作初始管，以 6mL 的初始管和 18 mL 50 mM 的 Tris 稀釋 4 倍，使其鹽濃度降低，並將其加入 Q 管柱並收集沖洗下的液體(後標示為 flow through)。

(2) 將體積分別為各 6 mL 之 50 mM、97.5 mM、145 mM、240 mM、335 mM、525 mM、762.5 mM、1,000 mM 之 NaCl 緩衝液依序加入管柱中，收集液體。

(3) 將收集的樣品加入染色劑，準備進行蛋白質鑑定。

(4) 進行 SDS-PAGE 蛋白質膠體電泳分析，得知含有蛋白之溶液及蛋白質純度。

(5) 分析能沖出目標蛋白的 NaCl 濃度，依上述實驗測試最佳 NaCl 緩衝液比例以純化蛋白質。

在測試離子交換層析緩衝液比例對純化效果的影響的實驗中，配置了 50 到 1,000 mM 的 NaCl 緩衝液，找出能競爭下目標蛋白的最佳緩衝液比例和順序。同時，為了確保純化出的蛋白純度及量的多寡，以低濃度的範圍內用以沖洗雜蛋白以提高純度，中濃度用以沖洗目標蛋白，高濃度確認有無殘留，純化 BAA-835 和 isolate 05、isolate 02 和 isolate 04 這兩組蛋白。

4. 離子交換層析酸鹼性對 Amuc_1100 純化的影響

本研究使用的蛋白質之理論 pI 值均為 6.04，根據離子交換層析原理，能夠與陰離子交換管柱(Q 管柱)結合的為帶負電的蛋白質，純化環境的 pH 值應大於 pI 值+1 才適合與 Q 管柱交互作用，同時蛋白質的穩定範圍 pH 值為 pI 值±3，為了能同時符合上述兩個條件，以達到最好的純化效果。在酸鹼性實驗中配置 pH 7.4、pH 8、pH 9 的緩衝液，在不同的酸鹼性環境測試純化效果差異。

5. 蛋白質濃縮

(1) 取出含有目標蛋白的緩衝液，裝入濃縮離心管。

(2) 於濃縮離心管中在每分 3,000 轉的頻率下離心 10 分鐘，並做二重複。

(3) 收取濃縮離心管上層濃縮好的蛋白質。

(4) 以 BCA method 鑑定純化出的目標蛋白之濃度。

(四) 蛋白質鑑定

1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

(1) 完成純化的蛋白質樣品與染劑以 3:1 的比例混和均勻。

(2) 製備 SDS-PAGE 1 片，先依配方配置下膠(running gel)及上膠(stacking gel)。(表 2)

表 2. 上下膠配方

	下膠	上膠
藥品	使用量	
10% SDS	0.15 mL	0.05 mL
acrylamide	3.33 mL	0.5 mL
Running/Stacking buffer	1.25 mL	0.625 mL
ddH_2O	5.125 mL	3.78 mL
TEMED	8.3 μL	8.3 μL
10%AP	42μL	42μL

(3) 吸取樣品注入膠體凹洞，並以 60V 進行電泳 120 分鐘，分離不同分子量的蛋白質。

(4) 將膠片進行染色，再以純水褪染，方便觀察。

2. Bicinchoninic acid assay (BCA method)

為了知道不同樣品中的蛋白質濃度，本研究使用 bicinchoninic acid (BCA) method，先用 BSA（牛血清白蛋白）標準品配置檢量線，作為樣品濃度的參考標準。

[步驟]

(1)以濃度為 2,000 μg/mL 的 BSA 作為母管，將其稀釋為 1,000, 500, 250, 100, 25 μg/mL BSA。

(2) 以 50:1 的比例混和 Reagent A 和 Reagent B，製備 working solution。

(3) 將不同濃度 BSA 25 μL 與 working solution 200 μL 混和，在 37 度環境靜置 30 分鐘使其反應。

(4) 用吸收光譜儀測量混和後溶液的 OD562，繪製蛋白質檢量線。

(5) 將樣品 25 μL 與 BCA working solution 200 μL 混和，在 37 度環境靜置 30 分鐘使其反應。

(6) 用吸收光譜儀測量樣品的 OD562，根據檢量線計算蛋白質濃度。

3. 蛋白質穩定度

(1) 將純化好的樣品進行 BCA 定量，計算各蛋白濃度。

(2) 取不同量的蛋白，使每個樣品均含 50 μg 蛋白。

(3) 將樣品放入 37 度環境並靜置。

(4) 48 小時後收取樣品，進行 SDS-PAGE 觀察蛋白質降解情形。

肆、研究結果

一、蛋白質序列比較

(一) 了解不同區域間 Amuc_1100 蛋白質樣品間序列的差異

1. 國際標準菌株與各國菌株比較

(1)國際標準菌株 ATCC BAA-835

(2) JCM 30893 (GeneBank: BBP48400.1)

(3) Akk0096 (GeneBank: QWO84765.1)

(4) NBRC 114322 (GeneBank: UBU78314.1)

表 3. 不同區域間的 Amuc_1100

不同序列	地區	Theoretical pI	相似度
ATCC BAA-835	國際標準菌株	6.04	100
JCM 30893	日本	6.04	100
Akk0096	美國	6.04	100
NBRC 114322	日本	6.04	100

比較國際標準菌株 BAA-835 和 JCM 30893、Akk 0096、NBRC 114322 的序列，四者的相似度為 100% (表 3)，推測是因為沒有日本及美國這些地區更多的樣品所以序列相似度高。

2. 臺灣本土純化菌株與亞東地區比較

(1) isolate 04

(2) isolate 05

(3) JCM 30893 (GeneBank: BBP48400.1)

表 4. 比較台灣與亞東區域的 Amuc_1100

不同序列	地區	理論 pI 值	序列相似度
isolate 04	臺灣	6.04	91
JCM 30893	日本	6.04	
isolate 05	臺灣	6.04	99
JCM 30893	日本	6.04	

JCM 30893、 NBRC 114322 與 isolate 04 相似度較低，有 91%的相似度，而 JCM 30893、NBRC 114322 與 isolate 05 序列相似度較高，有 99%的相似度 (表 4) 。

3.不同臺灣人分離株的差異

(1) isolate 02

(2) isolate 04

(3) isolate 05

利用 BLAST 網站比較以上蛋白質序列發現，isolate 05 只和 BAA -835 相差一個序列，序列相似度約 99%，推測其性質相似。而 isolate 02 、 isolate 04 序列和 BAA- 835 較不相近，相似度約為 91%，其中 isolate 04 只和 isolate 02 相差一個序列，並以序列進行理論計算，推算出 BAA-835 及 isolate 02、isolate 04、isolate 05 的 pI 值皆約為 6.04。

本研究根據上述結果選用 BAA-835 和 isolate 02 進行實驗，以涵蓋所有目標蛋白序列，同時判斷改變緩衝液比例，觀察對 BAA-835 和 isolate 02 這兩種不同序列的蛋白質而言，純化所需的條件是否有差異。依 BAA-835 和 isolate 02 的實驗結果再次純化 isolate 04、isolate 05，對照幾乎有相同序列的以下兩組:BAA-835、isolate 05 和 isolate 02、isolate 04 的純化結果。

二、純化結果

SDS-PAGE 膠圖的代號如表 5 所示。

表 5. SDS-PAGE 代號說明

管柱	代號	意　義
親和性層析 (Ni 管)	sup	上清液
	p	離心後所得的沉澱物
	ft	上清液通過管柱後收集的 flowthrough
	WI	減少 pH 值改變幅度的緩衝液
	w	以低濃度沖洗雜蛋白
	m	marker
離子交換層析 (Q 管)	w	以低濃度沖洗雜蛋白
	sup	稀釋後的 Ni 管柱目標蛋白
	ft	sup 通過管柱後收集的 flowthrough
	m	marker

(一) 針對不同 Amuc_1100，找出最佳層析法緩衝液的比例

1. 親和性層析

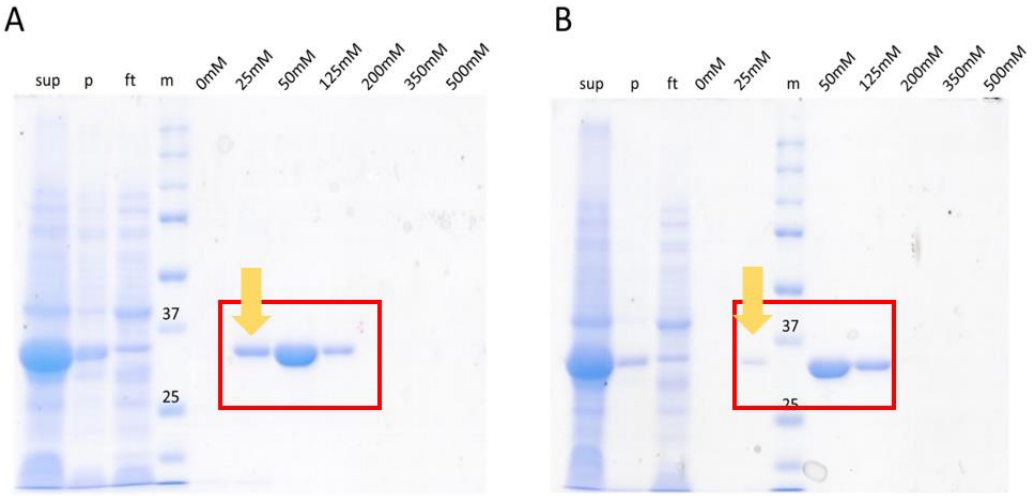


圖. 3 親和性層析 SDS-PAGE。(A) BAA-835 親和性層析 SDS-PAGE。(B) isolate 02 親和性層析 SDS-PAGE。(作者自行拍攝)

由上圖 3 結果可知，SDS-PAGE 依分子量由大到小分離，而圖中紅色方框處為被競爭下的目標蛋白，BAA-835 及 isolate 02 在 25 mM、50 mM、125 mM imidazole 的緩衝液均有目標蛋白被沖洗出，而 125 mM 以上的緩衝液都沒有目標蛋白被沖洗出。

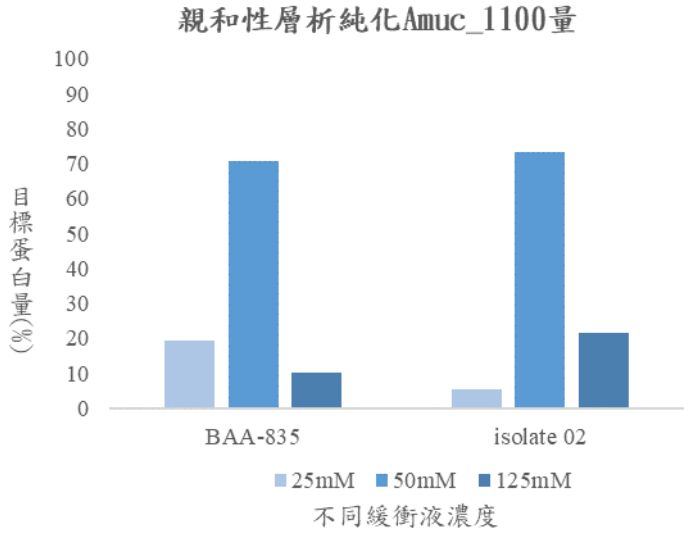


圖 4.：親和性層析純化 Amuc_1100 量的產率(作者自行繪製)

將上圖 SDS-PAGE 跑膠結果量化，得到數據整理成上圖 4，由圖中可以看出 BAA-835 及 isolate 02 結果都大致相同，只有在 25 mM 有較明顯的不同。BAA-835 25 mM 可以看出有沖洗出一部分的目標蛋白，相較之下 isolate 02 在相同 imidazole 濃度下沖洗出的目標蛋白量比起 BAA-835 少許多，且 isolate 02 在 125 mM 才被競爭下來的目標蛋白比例也較 BAA-835 多，由此可知 BAA-835 及 isolate 02 兩者純化所最適合的 imidazole 濃度仍然有差異。

2. 離子交換層析

(1) pH 9

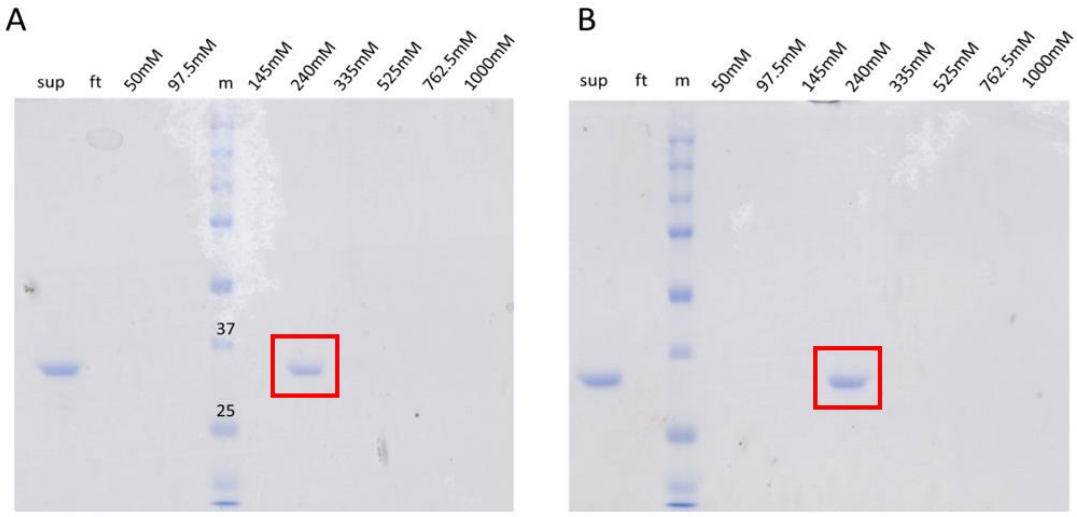


圖 5. 離子交換性層析 SDS-PAGE。(A) BAA-835 離子交換層析 SDS-PAGE pH 9。(B) isolate 02 離子交換層析 SDS-PAGE pH 9。(作者自行拍攝)

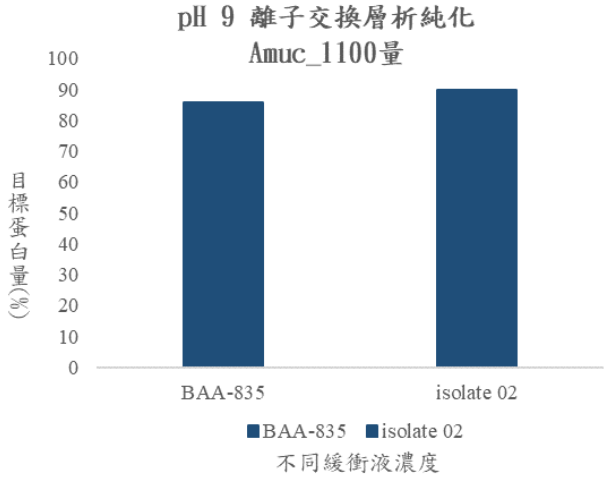


圖 6. pH 9 離子交換層析純化 Amuc_1100 量的產率(作者自行繪製)

已知在 BAA-835 及 isolate 02 的親和性層析 Ni 管中，在 25 mM、50 mM、125 mM imidazole 均有目標蛋白被沖洗出，將這三管有目標蛋白的緩衝液混合後稀釋四倍，在 pH 9 環境下通過 Q 管進行第二次層析。由圖 5 及圖 6 結果可知，在 pH 9 的環境下，BAA-835 及 isolate 02 均在 240 mM NaCl 將所有目標蛋白沖洗出。

Amuc_1100 蛋白作用於人體內，可以達成降低脂肪，避免心血管疾病的功效，因此本研究希望能使在接近人體環境的 pH 值下純化出目標蛋白，在以下實驗中進一步探討酸鹼性對離子交換層析純化的影響，除了原先的 pH 9 之外，更加入 pH 8 及 pH 7.4 兩種不同的酸鹼性條件。

(二) 探討不同酸鹼性緩衝液對 Amuc_1100 純度的影響

1.在不同酸鹼性環境下，序列間差異比較

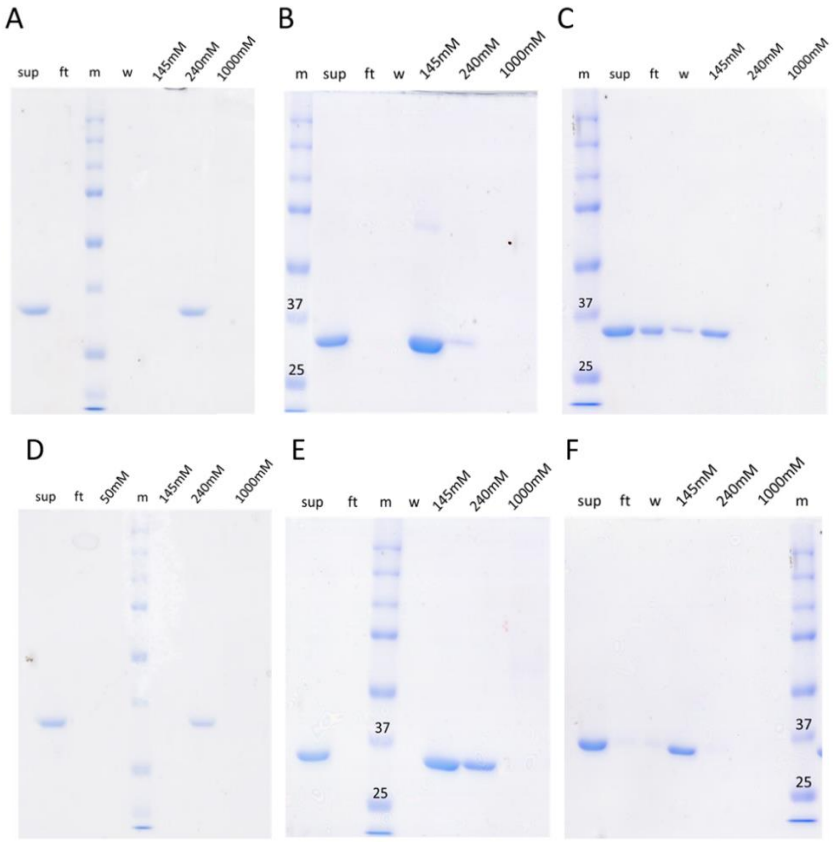


圖 7. 酸鹼性 SDS-PAGE。(A) BAA-835 pH 9 離子交換層析 SDS-PAGE。(B) BAA-835 pH 8 離子交換層析 SDS-PAGE。(C) BAA-835 pH 7.4 離子交換層析 SDS-PAGE。(D) isolate 02 pH 9 離子交換層析 SDS-PAGE。(E) isolate 02 pH 8 離子交換層析 SDS-PAGE。(F) isolate 02 pH 7.4 離子交換層析 SDS-PAGE。(作者自行拍攝)

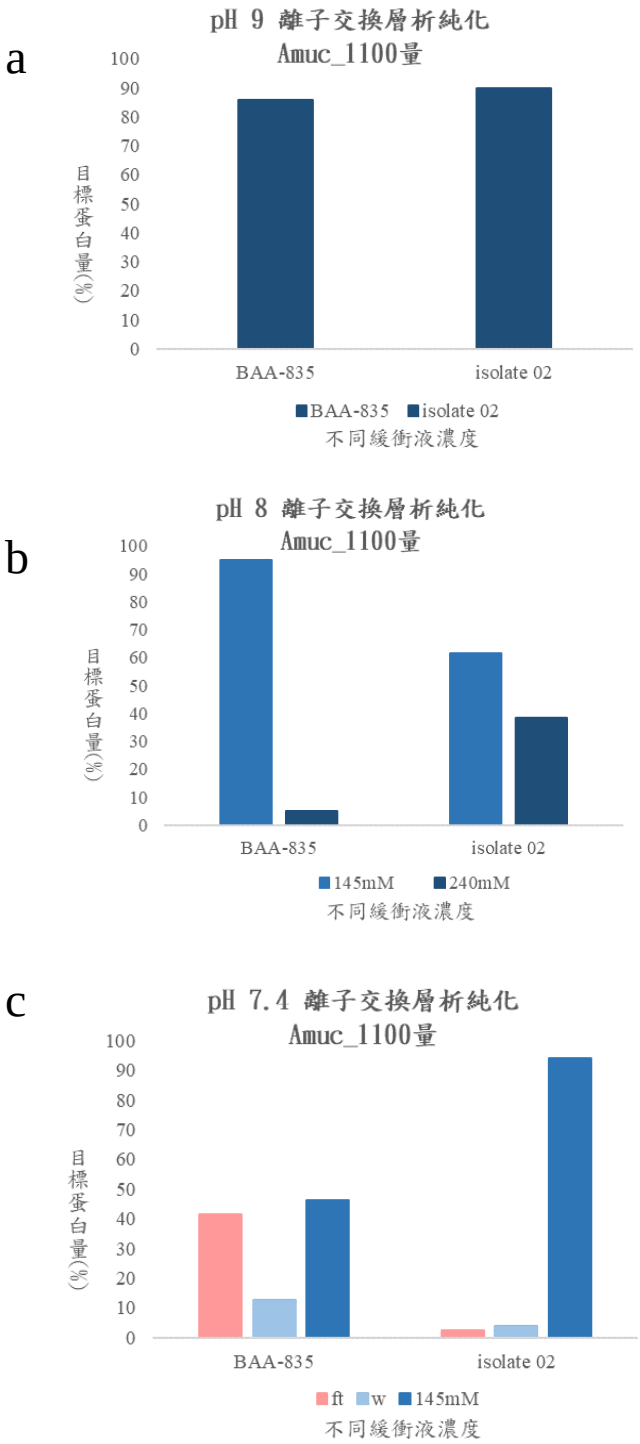


圖 8. 不同酸鹼性環境離子交換層析純化 Amuc_1100 量的產率。(a) pH 9, (b) pH8, (c) pH7.4。(作者自行繪製)

接下來本研究更深度的探討酸鹼性對純化條件的影響，除前述的 pH 9 外，增加了 pH 7.4、pH 8 以瞭解酸鹼性的影響，將圖 7 的 SDS-PAGE 圖量化成圖 8，而由圖 8-(a)結果可知，同一序列蛋白在 pH 9 環境下，都在 240 mM NaCl 將目標蛋白全部沖洗出；圖 8-(b)則

顯示，在 pH 8 環境下，145 mM 和 240 mM NaCl 均有目標蛋白被沖洗出；而在 pH 7.4 環境下(圖 8-(c))，145 mM NaCl 就可以將所有目標蛋白沖洗出。由此可知，離子交換層析環境越酸，Amuc_1100 與管柱的結合能力越差，競爭目標蛋白所需的 NaCl 緩衝液濃度也越低。 而比較不同序列的 Amuc_1100，可以發現，在 pH 7.4 的環境下，BAA-835 在 ft 和 wash 就有沖出目標蛋白，對比 isolate 02 在 145 mM 時才有目標蛋白被沖洗出。由此可知，BAA-835 和 Q 管柱的結合能力較差，在相同濃度下較容易被競爭下來，但其在 flowthrough 即有目標蛋白被競爭出，表示部分目標蛋白還未和管柱結合即被沖出，在後續的應用上，較有可能出現混和雜質的情形，因此為了解決此問題，在接下來的實驗中，加入 isolate 05，對照 BAA-835 及 isolate 02，進一步探討 pH 值和序列差異對純化所需條件的影響。

2.以不同 pH 值稀釋及純化的比較

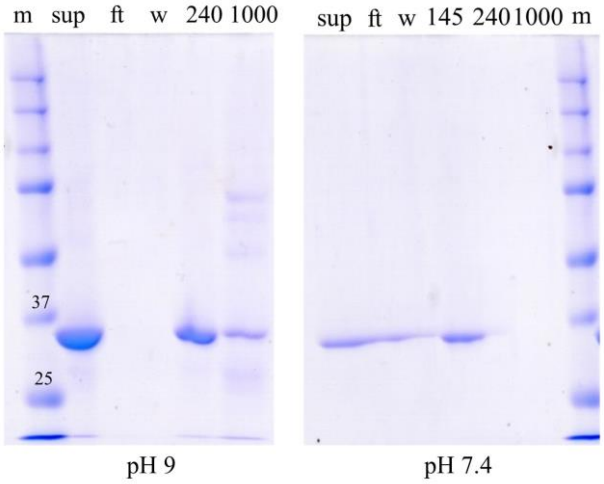


圖 9. isolate 05 在不同酸鹼性下的純化結果。(作者自行拍攝)

為了進一步測試不同 pH 值下的純化效果及序列差異的影響，再以和 BAA-835 序列幾乎相同的 isolate 05 通過 Ni 管柱後，進入陰離子交換層析管柱中，在不同酸鹼性環境下純化(圖 9)。在此實驗中，先測試競爭序列和 BAA-835 相似的 isolate 05 所需之緩衝液濃度，由圖 9 可知，在 pH 9 環境進行純化，大多數蛋白在 240 mM 被競爭下來；在 pH 7.4 環境進行純化，則是在 ft、wash、145 mM 有目標蛋白被沖洗出，在這兩種酸鹼性下，其所需的緩衝液濃度均與 BAA-835 相同，說明序列相似，所需的純化條件也相似，BAA-835 和 isolate 05 同樣都有 ft 即沖出目標蛋白的情形，為了解決此問題，嘗試更改稀釋條件，增加 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化的方法。

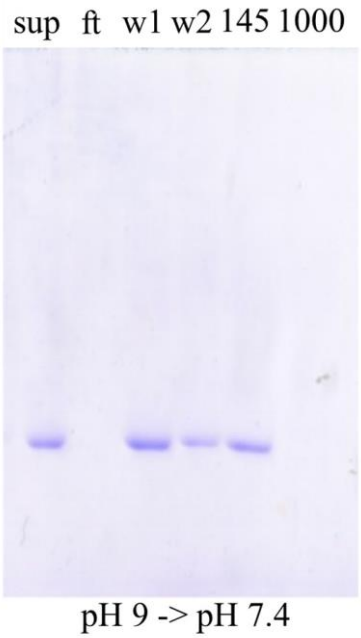


圖 10. isolate 05 以 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化。(作者自行拍攝)

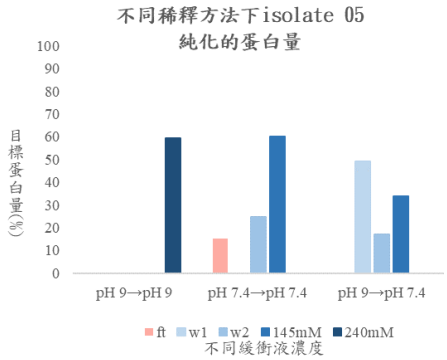


圖 11.不同稀釋條件純化 isolate 05 量的產率。(作者自行繪製)

針對目標蛋白 isolate 05，本研究採用 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化的方法，希望能在 pH 9 環境先將上清液通過管柱，以較高的結合力讓目標蛋白和管柱結合，再改以 pH 7.4 緩衝液和其競爭，以接近人體環境的 pH 值純化 Amuc_1100。而根據上圖 10 的實驗結果，isolate 05 在 wash 才被沖出，表示此方法能解決蛋白在 flowthrough 即被沖出的問題，在確保純度的同時，也保留目標蛋白在 pH 7.4 被純化出來的條件，因此在後續的實驗中，皆以 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化作為酸鹼性條件。不同稀釋條件純化 isolate 05 量的產率如圖 11 所示。

(三) 不同序列的 Amuc_1100 個別調整最適合的純化方法

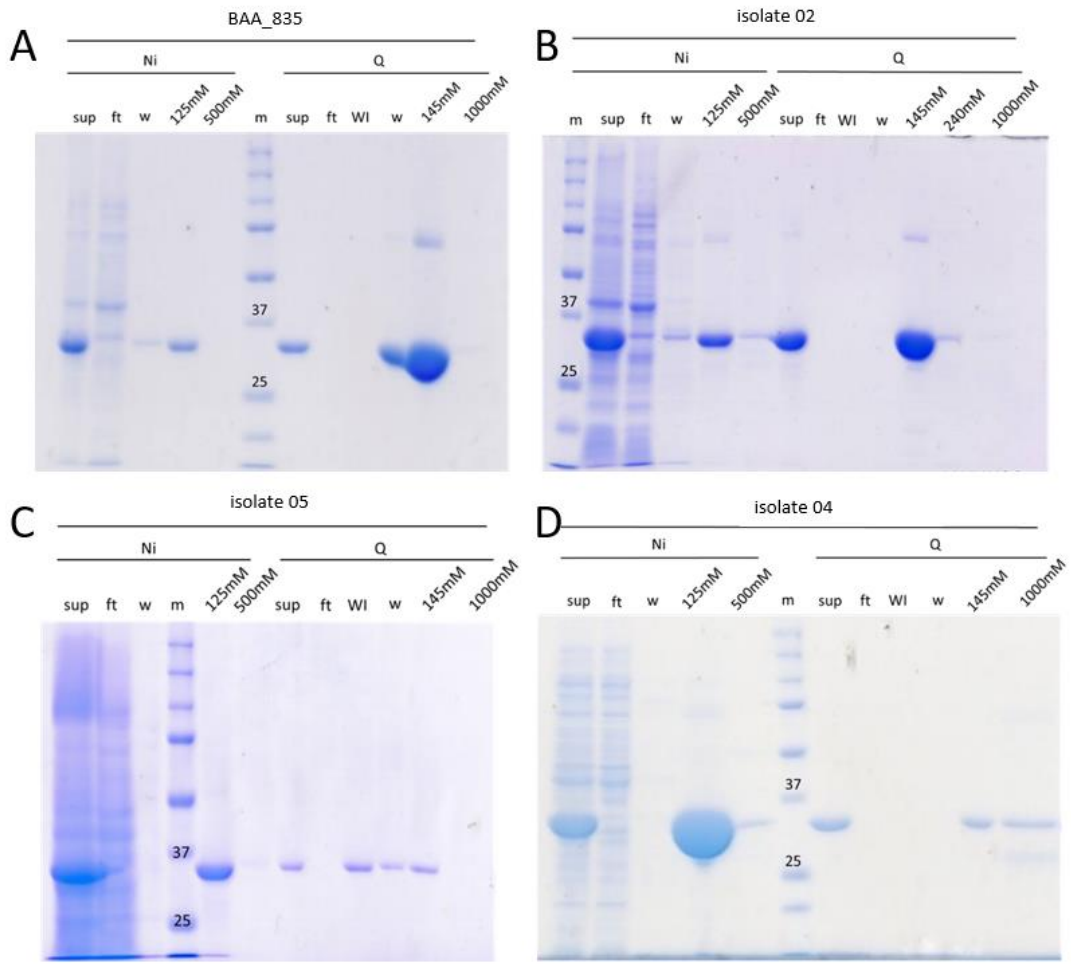


圖 12. 各序列蛋白質 SDS-PAGE。(A) BAA-835 SDS-PAGE。(B) isolate 02 SDS-PAGE。(C) isolate 05 SDS-PAGE。(D) isolate 04 SDS-PAGE。(作者自行拍攝)

根據先前 BAA-835 和 isolate 02 緩衝液濃度的測試結果，本研究成功找出最佳親和性及離子交換層析法緩衝液的比例和順序。已知親和性層析管柱中，BAA-835 和 isolate 02 皆在 125 mM imidazole 緩衝液即可沖洗出所有目標蛋白(圖 12)，而緩衝液濃度為 25 mM imidazole 時，能沖出一部分的 BAA-835 卻僅能沖出極少量的 isolate 02，因此在通過 125 mM imidazole 前，先以更低濃度緩衝液通過管柱確保無雜蛋白殘留，此用以沖洗雜蛋白的緩衝液命名為 wash，wash 的濃度根據 BAA-835 和 isolate 02 緩衝液濃度的測試結果制訂。

而離子交換層析管柱中，可知 BAA-835 和 Q 管柱的結合能力較差，在相同濃度下較容易被競爭下來，BAA-835 在 145 mM NaCl 就能沖洗出大部分的目標蛋白，而 isolate 02

在相同濃度下只有沖出部分的目標蛋白，剩下的在 240 mM 才被沖洗出，因此在 Q 管柱中純化 BAA-835、isolate 05 時以 145 mM NaCl 緩衝液做為主要沖洗目標蛋白的濃度，而純化 isolate 02、isolate 04 時，也依先前實驗結果推測會有部分蛋白需要更高濃度才能沖洗出，因此用 240 mM 和 1,000 mM NaCl 緩衝液檢查。由圖 12 中 BAA-835、isolate 05 在 145 mM 及 1,000 mM 的純化結果可知，在 1,000 mM 沒有目標蛋白被沖洗出，代表所有目標蛋白的確在 145 mM NaCl 被全部競爭出。而 isolate 02、isolate 04 無法在 145 mM NaCl 即純化出所有目標蛋白，需要比 145 mM NaCl 更高濃度的緩衝液以將目標蛋白沖出。

isolate 05 和 BAA-835 純化條件相似，isolate 02 和 isolate 04 純化條件相似，由此可知序列相似蛋白需要相似的條件，本研究也成功依之前的實驗結果為每種蛋白找出最佳層析法緩衝液的比例，設計開發個別適合的純化方法。(表 6)

表 6. 各蛋白適合的純化緩衝液濃度與順序

蛋白	各蛋白適合的純化緩衝液濃度與順序
BAA-835	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管:　wash→145 mM→1,000 mM
LWHK05	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→1,000 mM
LWHK02	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1,000 mM
LWHK04	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1,000 mM

(四) 分析 Amuc_1100 結構與電性

從上述純化方法的開發，可以發現序列相似的蛋白有相似的純化條件，為了了解是否還有其他因素影響 Amuc_1100 蛋白質各自適合的緩衝液濃度，進一步分析 Amuc_1100 的結構與電性，將 BAA-835 與 isolate 02 的序列匯入 AlphaFold 模型預測結構，再以 PyMOL 軟體繪製出三維結構圖，並對齊比對，同時進一步繪製兩者的電性分佈圖，觀察電性分佈差異。

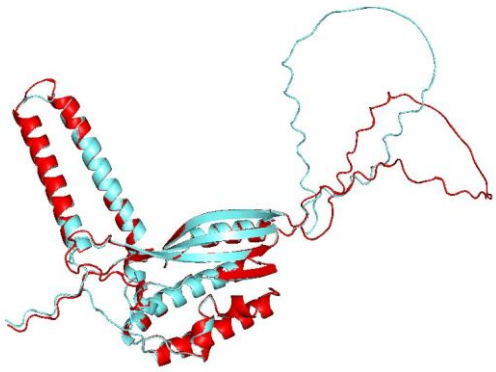


圖 13. BAA-835 與 isolate 02 的三維結構對齊比對圖。（藍色：BAA-835；紅色：isolate 02）。(作者自行繪製)

由圖 13 可以觀察 BAA-835 與 isolate 02 在二級結構的 α 螺旋與 β 摺疊大致重疊，但兩者 Loop 有所差異而無法完全重疊。

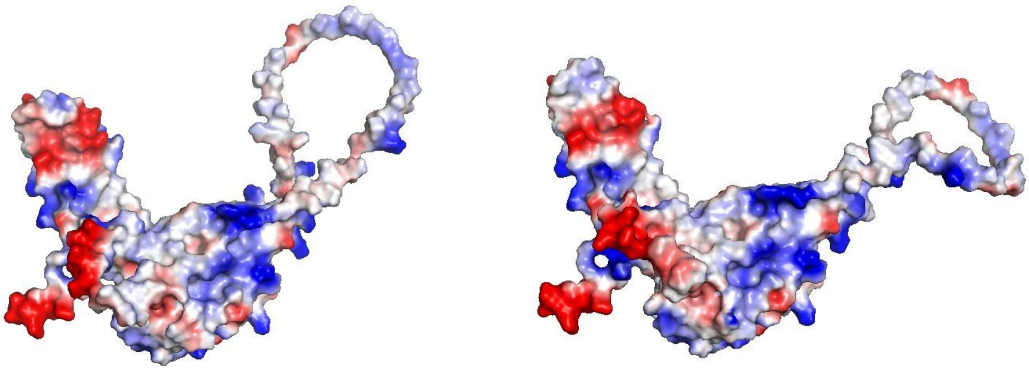


圖 14. BAA-835 與 isolate 02 的電性分佈圖。（左：BAA-835；右：isolate 02）。(作者自行繪製)

在圖 14.電性分佈圖中，藍色代表帶正電，而紅色為帶負電，由上圖可以觀察到 isolate 02 帶較多負電，較容易和帶正電的Q管住結合，可驗證先前純化條件測試中，isolate 02 和陰離子交換管柱結合能力較佳的結果，因此由 BAA-835 與 isolate 02 驗證得出蛋白質本身結構和電性可配對到合適的純化條件，本研究在未來的應用上，可以利用電腦模型結合分析化學製程，完善蛋白質純化方法學，未來可為保健食品與藥物開發產業大幅降低研發成本，得到可量產且穩定的益生菌外膜蛋白，更能進階探究 Amuc_1100 蛋白質結構在醫療藥理上降低血脂的機制。

(四) BCA 鑑定

以 BSA 作為標準品，配置不同濃度並量測其吸光數值，配置檢量線(圖 17)，作為後續實驗的蛋白質樣品濃度的對照。

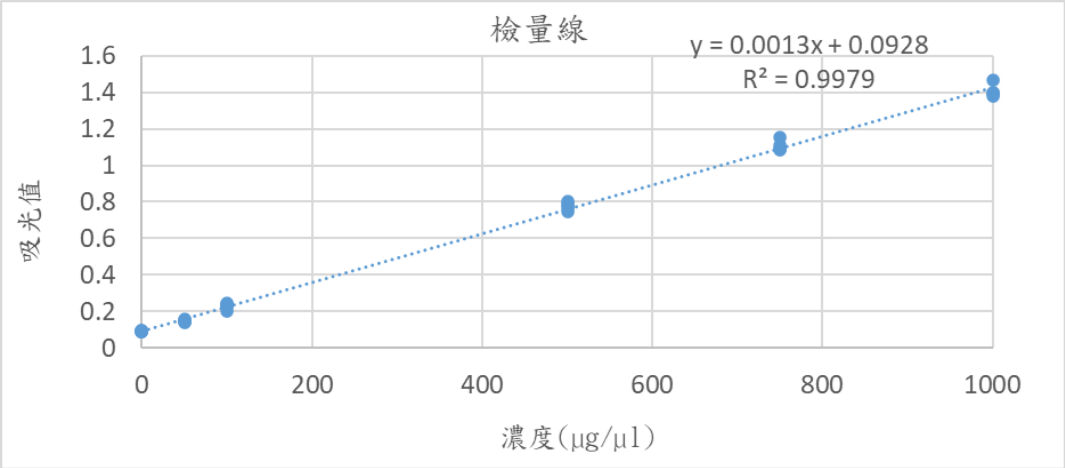


圖 15. BSA 配置檢量線(作者自行繪製)

最後將各條件純化出的目標蛋白進行濃縮，並以 BCA method 定量，計算蛋白質的濃度並換算成蛋白的總量(表 7)。

表 7. 各樣品濃度

蛋白質	pH 環境	條件	蛋白總量(μg)
BAA-835	pH 8	66.7 mM imidazole ; Ni 管柱	2866.664
isolate 02	pH 8	66.7 mM imidazole ; Ni 管柱	2720.844
BAA-835	pH 9	240 mM NaCl ; Q 管柱	2770.394
isolate 02	pH 9	240 mM NaCl ; Q 管柱	3311.920
BAA-835	pH 7.4	145 mM NaCl ; Q 管柱	706.002
isolate 02	pH 7.4	145 mM NaCl ; Q 管柱	4275.783
BAA-835	pH 8	145 mM NaCl ; Q 管柱	1441.097
isolate 02	pH 8	172.5 mM NaCl ; Q 管柱	2030.510
isolate 05	pH 8	125 mM imidazole ; Ni 管柱	1351.792
isolate 05	pH 9-pH 7.4	145 mM NaCl ;Q 管柱	158.928
isolate 05	pH 9	240 mM NaCl ;Q 管柱	4474.610
isolate 05	pH 7.4	240 mM NaCl ;Q 管柱	320.512

(五) 探討不同酸鹼性下，純化出 Amuc_1100 的穩定度的影響

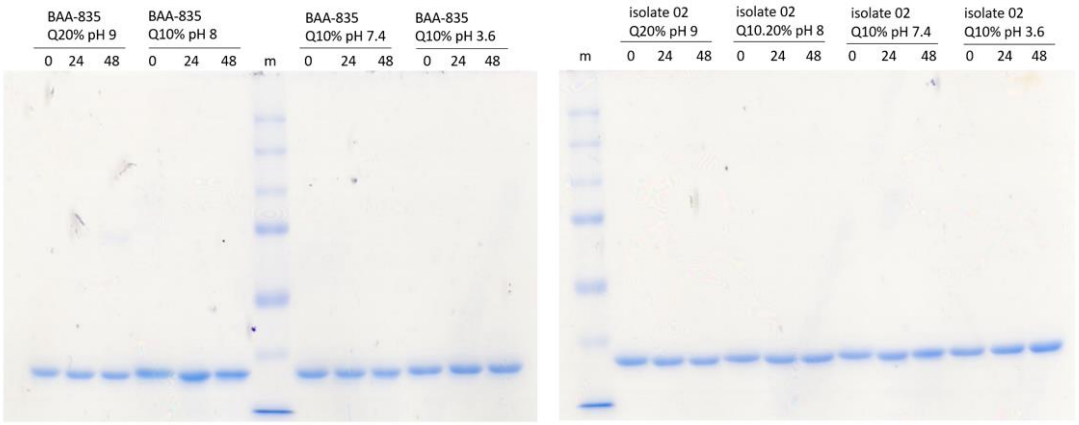


圖 16. 穩定度 SDS-PAGE(作者自行拍攝)

經過以上實驗，本研究已順利純化出 Amuc_1100 樣品，接下來進行穩定度實驗，確認蛋白質是否能在接近人體環境中保持穩定。將 Amuc_1100 放置於 37 度環境中，每隔 24 小時收取蛋白，並且為了模擬胃中環境，使一部分蛋白在 pH 3.6 環境中靜置，觀察蛋白質降解情形。由圖 16 可以發現，所有蛋白在 37 度的環境下經過 48 小時後，分子量都還是介在 25 到 37 kDa，並未出現明顯降解情形，且可以看出序列差異及純化 pH 值條件並不會影響 Amuc_1100 的穩定度，表示 Amuc_1100 蛋白質穩定度高。

伍、討論

一、*A. muciniphila* 外膜蛋白 Amuc_1100 功效

人體微生物菌落與人體健康具有顯著的關聯性，而 Amuc_1100 為 A. muciniphila 的一種耐高溫的外膜蛋白質，能夠再現菌株的有益效果，在一定程度上重現了 A. muciniphila 對宿主之肥胖、胰島素阻抗和腸道屏障改變的作用 [2]，因此 Amuc_1100 具有研發醫療保健食品的潛力。後續實驗針對國際標準菌株 BAA-835 以及臺灣本土 Amuc_1100 ，分別命名為 isolate 02、isolate 04、 isolate 05 完善純化方法學，提高純化後蛋白的純度及品質。

二、Amuc_1100 序列及結構差異

藉由國際基因庫中的 Amuc_1100 資訊，本研究取得公開的國際標準菌株 BAA-835 序列，並將其與 isolate 02、isolate 04、isolate 05 比較相似度，發現樣品序列可以分為兩大類，分別依相似度分成第一類序列 BAA-835、 isolate 05，以及第二類序列 isolate 02、isolate 04。

三、親和性層析條件測試

針對 Amuc_1100 的純化分為親和性層析和離子交換層析，第一步驟為親和性層析，配製 0 到 500 mM imidazole 緩衝液依序通過管柱，探討能競爭下目標蛋白的緩衝液濃度範圍，由 SDS-PAGE 結果可以看出 BAA-835 及 isolate 02 能競爭出目標蛋白的 imidazole 濃度均在 25 mM 以上，在 25 mM、50 mM、125 mM 都有目標蛋白被沖出。其中在 25 mM 緩衝液，isolate 02 被沖出的蛋白量明顯少於 BAA-835，說明 BAA-835 有比較容易被 imidazole 競爭下來的特性，推測主因為關鍵胺基酸序列差異影響和管柱的結合能力。

四、離子交換層析條件測試

而為了提高蛋白質的純度，將經過親和性層析法純化的 Amuc_1100 樣品，稀釋 4 倍之後進行離子交換層析，使用陰離子交換，慢慢提高 NaCl 緩衝液的濃度，以觀察何種濃度緩衝液最適合用來競爭目標蛋白，發現在 pH 9 的環境下，BAA-835 及 isolate 02 均在 240 mM 將所有目標蛋白競爭出。

而因為益生菌保健食品需在人體內發揮作用，本研究希望能在接近人體的 pH 7.4 進行純化，因此進一步進行了酸鹼性測試，增加了 pH 8 及 pH 7.4。結果顯示，環境越酸，蛋白質與管柱的結合能力越差，競爭出目標蛋白所需的緩衝液度也越低，在 pH 8 的環境

下，BAA 835 和 isolate 02 均在 145 mM 和 240 mM 將目標蛋白競爭出；在 pH 7.4 的環境下，在 pH 7.4 的環境下，BAA-835 在 ft、wash 及 145mM 可以收取到目標蛋白，isolate 02 則是在 145 mM 將大部分目標蛋白競爭出。

在 pH 7.4，BAA-835 在 ft 就有收取到目標蛋白，表示其還沒和管柱結合就直接被沖出，在後續的應用上，較有可能出現混和雜蛋白或雜質的情形，因此為了能使樣品在接近人體的酸鹼性環境進行純化，同時希望蛋白質保有一定的與管柱結合能力，本研究採用 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化的方法，在 pH 9 環境先將上清液通過管柱，以較高的結合力讓目標蛋白和管柱結合，再改以 pH 7.4 緩衝液和其競爭，以接近人體環境的 pH 值純化 Amuc_1100。此方法能確保純度，也保留目標蛋白在 pH 7.4 被純化出來的條件，因此在後續的實驗，均以 pH 9 稀釋，pH 7.4 純化為最佳酸鹼性條件。

五、序列差異對離子交換層析純化條件的影響

以 pH 7.4 為例，isolate 05 在 flowthrough、wash、145 mM 緩衝液能競爭出目標蛋白，這樣的結果和 BAA-835 較相近，和 isolate 02 較不相近，表示序列確實是影響純化所需條件的重要因素之一，序列相似的蛋白有相似的純化條件，BAA-835 和 isolate 05 這組蛋白和陰離子交換管柱結合能力較差，需要的緩衝液濃度較低，而 isolate 02 和 04 和管柱結合能力較好，需要較高的 NaCl 濃度將蛋白質競爭出來。推測是因為其結構及實際 pI 值有些微不同，導致其和管柱的結合能力也會出現差異。

六、針對不同序列的 Amuc_1100 進行純化條件個別調整

接下來，根據以上實驗結果，我們分別純化出高純度不具雜蛋白的各序列目標蛋白，針對 BAA-835 和 isolate 05 這組蛋白，選用 145 mM 作為主要競爭目標蛋白的緩衝液濃度，而對於 isolate 02 和 isolate 04 這組蛋白，則是使用較高濃度的 240 mM 作為緩衝液濃度，以確保能純化出所有目標蛋白。

七、結構及電性差異對親和性層析及離子交換層析純化條件的影響

本研究完成利用親和性層析和離子交換層析找出蛋白質純化條件，同時也發現來自國際標準菌株 BAA-835 和本土菌株 isolate 02 純化條件有差異，序列相似的蛋白有相似的純化條件，為了進一步探討造成差異的原因，以 AlphaFold 人工智慧預測蛋白質結構並進

行電性分析，研究發現 isolate 02 和 BAA-835 有所差異，兩者 Loop 無法完全重疊，另外，isolate 02 也帶較多負電，較容易和帶正電的Q管柱結合，可驗證先前純化條件測試中，isolate 02 和陰離子交換管柱結合能力較佳的結果。因此，由兩者的結構與電性分析可以驗證得出蛋白質本身結構和電性可配對到合適的純化條件，本研究以電腦模型預測工作並配對到第一階段的純化製程，提供全新展望，利用 AlphaFold 人工智慧結合分析化學製程，完善蛋白質純化方法學，未來可為保健食品與藥物開發產業大幅降低研發成本，得到可量產且穩定的益生菌外膜蛋白。

八、測試穩定度

因為目標是能開發出益生菌食品，蛋白須能在人體環境保持穩定，以發揮最大功效，將純化好的 Amuc_1100 放置於 37 度環境中，每隔 24 小時收取一次蛋白質樣品，進行 SDS-PAGE 以觀察蛋白質降解情形，測試穩定度，且為了模擬胃中環境，將一部分的蛋白質放在 pH3.6 環境中靜置，可以發現純化好的 Amuc_1100 皆沒有出現降解情形，表示其在人體及胃中環境都能保持穩定。

陸、結論

一、探討不同個體所分離出之 *A. muciniphila* 菌株之 Amuc_1100 蛋白質序列間的差異

依序列相似度分為第一組 isolate 05、BAA-835，和第二組 isolate 02、isolate 04

二、針對不同 Amuc_1100，測試緩衝液濃度及酸鹼性對純化的影響

(一) 在親和性層析法中，BAA-835 及 isolate 02 均在 25 mM 以上都有目標蛋白被沖出。

(二) 在離子交換層析法中，BAA-835 及 isolate 02 能競爭出目標蛋白的 NaCl 濃度均至少要 145 mM 以上。

(三) 離子交換層析管柱環境越酸蛋白與管柱的結合能力越差。

(四) 離子交換層析法中，pH 9 稀釋，pH 7.4 為最佳酸鹼性條件

(四) 序列差異會造成其所需的純化條件不同，且 BAA 835 和 isolate 05 這組序列和管柱的結合能力較 isolate 02 和 04 差。

三、探討不同酸鹼性下，純化出 Amuc_1100 的穩定度的影響

此蛋白質穩定度高，在中性及酸性環境皆能保持穩定。

四、開發各序列 Amuc_1100 最適合的純化條件

經過反覆實驗後，已開發出不同序列 Amuc_1100 最佳的純化方法，最佳條件分述如下：

蛋白	各蛋白適合的純化緩衝液濃度與順序
BAA-835	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→1000 mM
LWHK05	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→1000 mM
LWHK02	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1000 mM
LWHK04	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1000 mM

本研究目前已完善了 Amuc_1100 的純化方法學，找出最適合各序列蛋白質的純化條件，並順利純化出各個蛋白，接下來希望進一步測試純化後的蛋白之反應活性，將純化出的 Amuc_1100 應用於生活中，同時提供全新展望，利用 AlphaFold 人工智慧結合分析化學製程，驗證對應實驗結果、完善蛋白質純化方法學，未來可為保健食品與藥物開發產業大幅降低研發成本，得到可量產且穩定的益生菌外膜蛋白，更能進階探究 Amuc_1100 蛋白質結構在醫療藥理上降低血脂的機制，在產業及學理上都有其應用價值。

柒、參考資料

一、1. Gu, Z., et al., 2021. Akkermansia muciniphila and its outer protein Amuc_1100 regulates tryptophan metabolism in colitis. Food Funct, 12(20): p. 10184-10195.

二、Plovier, H., et al., 2017. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. Nat Med, 23(1): p. 107-113.

三、Guo, X., et al., 2017. Genome sequencing of 39 Akkermansia muciniphila isolates reveals its population structure, genomic and functional diverisity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. Bmc Genomics, 18(1): p. 800.

四、Labrou, N.E., 2021. Protein purification technologies. Methods Molecular Biology,2178: p. 3-10.

五、Bajzer, M. and R.J. Seeley, 2006. Obesity and gut flora. Nature, 444(7122): p. 1009-1010.

六、David, L.A., et al., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature, 505(7484): p. 559-63.

七、Thursby, E. and N. Juge, 2017. Introduction to the human gut microbiota. Biochem J, 474(11): p. 1823-1836.

八、Hills, R.D., Jr., et al., 2019. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. Nutrients, 11(7).

九、Ottman, N., et al., 2017. Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function. PloS One, 12(3): p. e0173004.

十、Rodrigues, V.F., et al., 2022. Akkermansia muciniphila and gut iisoune system: A good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes. Front Immunol, 13: p. 934695.

十一、 Luo, Y., Lan, C., Li, H. et al., 2022. Rational consideration of Akkermansia muciniphila targeting. Intestinal health: advantages and challenges. Biofilms Microbiomes 8.

【評語】052209

1. 本作品探討不同個體所分離出之 A. muciniphila 菌株之 Amuc_1100 蛋白質序列間的差異，並探討不同 Amuc_1100 之親和性層析和離子交換層析中使用的緩衝液合適濃度，並探討不同酸鹼性環境對 Amuc_1100 純化效果的影響，並以 AlphaFold 針對 Amuc_1100 的序列解出其結構差異。本作品僅為一般分子生物實驗室常操作的重組蛋白質純化，原創性稍嫌薄弱。

2. 試驗的方法，若是未標示出處，則認為是作者所自創，但若引用自其他學者之報告，應予標示出處，否則會有抄襲之疑慮。討論部分應與其他學者類似之研究文獻，進行比較探討，而非僅列出試驗結果，並做推論，此為本研究缺點之一。

3. 本項研究並未設立重複，故亦無法了解標準偏差，因而無法進行統計上差異之比較，此為缺點之二。

4. 參考文獻之書寫須再加強，且不能用 et al.一筆帶過，而應將所有參與作者名字完整列出。

5. 本研究雖有部分缺點，但目的明確、架構完整、報告書寫文筆流暢，亦為其優點。

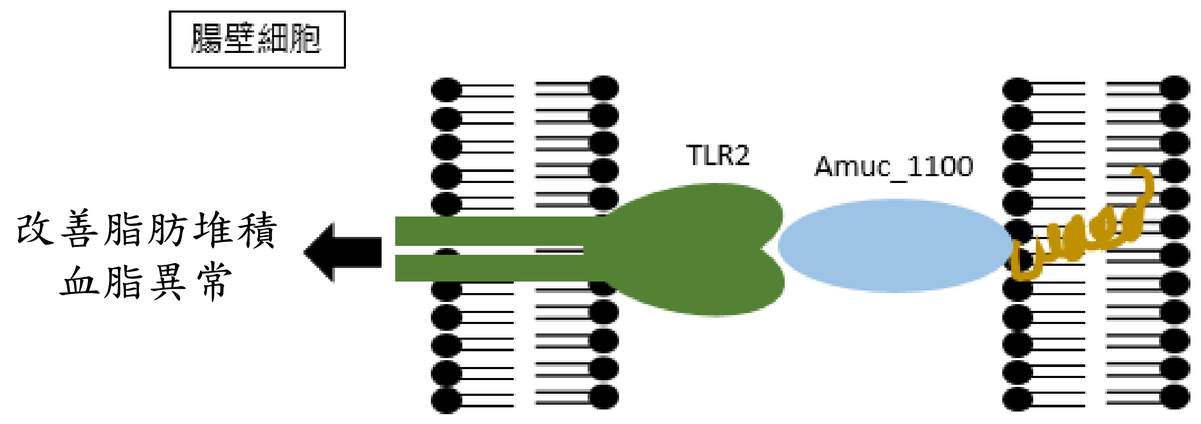
作品簡報

開發益生菌外膜蛋白Amuc_1100的穩定蛋白質純化方法

摘要

糖尿病和肥胖已成為現代廣泛且嚴重的問題，而腸道益生菌Akkermansia muciniphila能幫助改善糖尿病和血脂異常，其外膜蛋白Amuc_1100為再現醫療效益之關鍵分子，在開發益生菌產品上具有潛力，但本土Amuc_1100尚未被開發，因此本研究分析臺灣不同個體腸道Amuc_1100序列差異，以親和性層析和離子交換層析進行蛋白質純化，發現最佳的酸鹼性條件為pH 9稀釋、pH 7.4純化。此外，結合AlphaFold人工智慧繪圖，創新發現蛋白質的結構與電性影響與層析管柱的結合能力。本研究不僅成功針對本土樣品開發最適合的純化方法，導入人工智慧更可在學術藥理上發揮價值，同時降低產業成本、提高應用。

實驗純化的膜蛋白	
BAA-835	國際標準菌株
isolate 01	本土菌株 （從台灣人取得）
isolate 02	
isolate 04	
isolate 05	



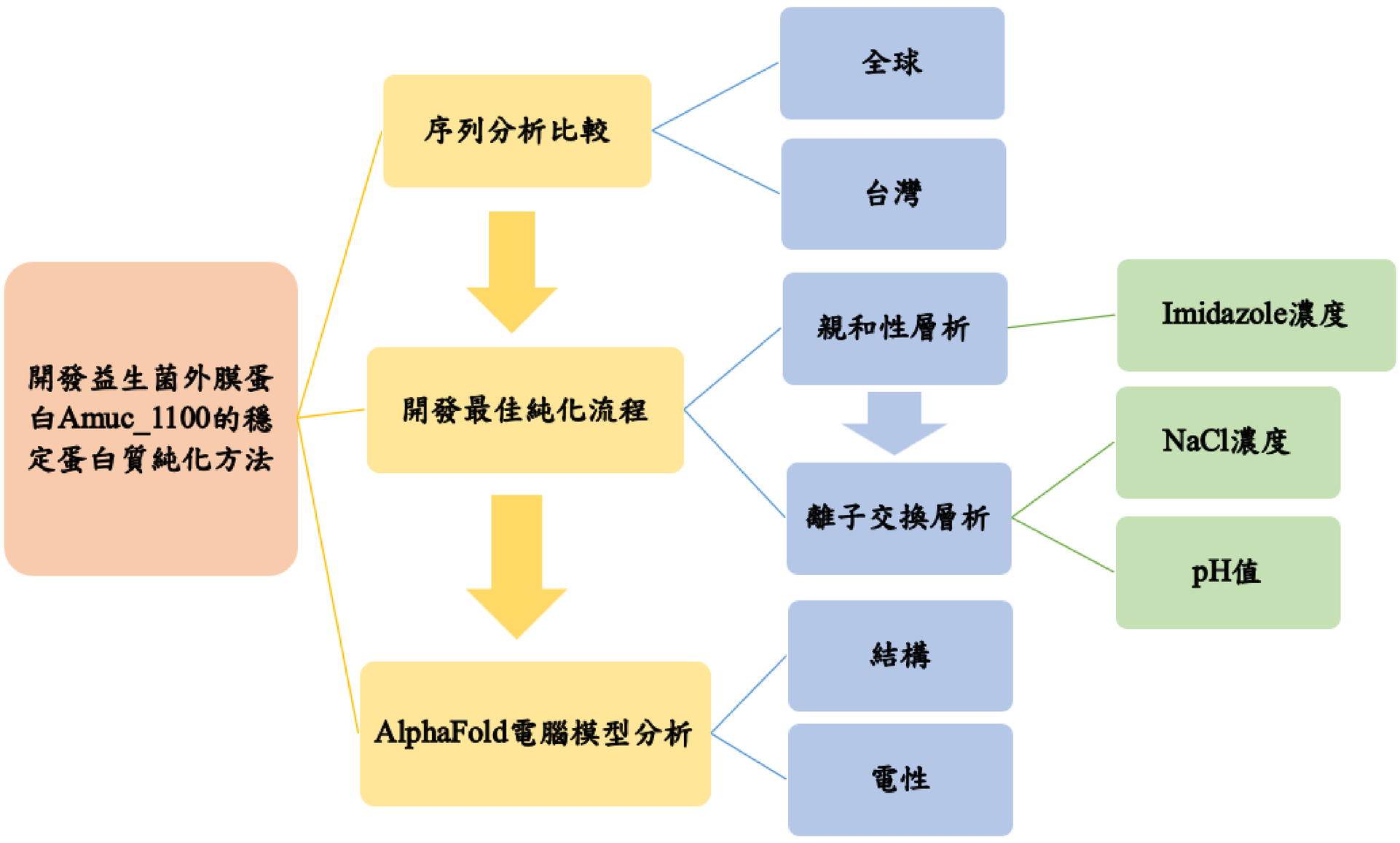
研究動機

*Akkermansia muciniphila*外膜蛋白Amuc_1100可以有效改善糖尿病與脂肪堆積，具有醫療潛力，但文獻中關於Amuc_1100的研究皆針對來自外國人腸道的樣品，並沒有針對台灣人的相關實驗，而不同地區飲食習慣差異會影響腸道環境，因此我們想針對台灣本土Amuc_1100進行實驗，開發純化方法，擴大關於Amuc_1100有益效果的應用，研發適合台灣人的保健食品。

研究目的

(一) 探討不同個體所分離出之*A. muciniphila*菌株之 Amuc_1100蛋白質序列間的差異
(二) 針對不同Amuc_1100，找出親和性層析法和離子交換層析中緩衝液合適的濃度
(三) 找出不同酸鹼性環境，對Amuc_1100純化效果的影響
(四) 使用AlphaFold以Amuc_1100的序列解出其結構差異

研究設計



親和性層析(Ni管柱)

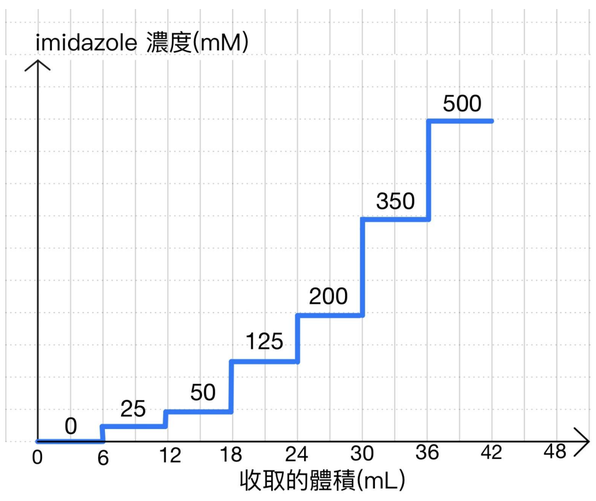


- 實驗使用含有His-tag的Amuc_1100
- Ni管柱固定相和His-tag作用，使其留在Ni-NTA管柱中，再配製imidazole緩衝液將Amuc_1100競爭下來。

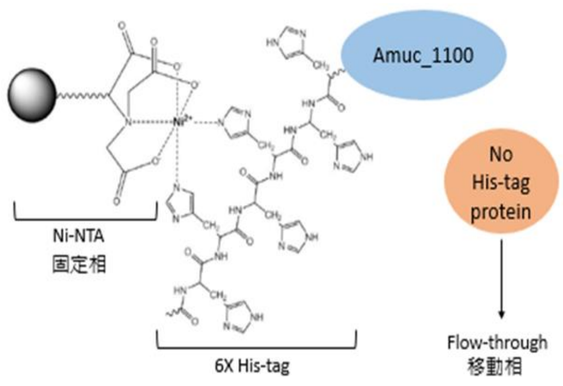
陰離子交換層析(Q管柱)



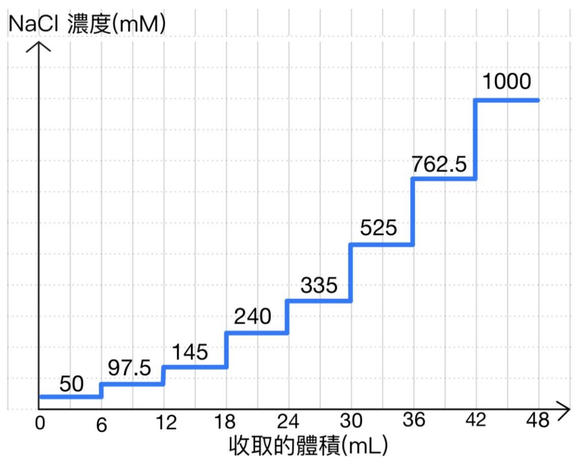
- 調控pH值使Amuc_1100帶負電，和帶正電的Q管柱結合，利用NaCl緩衝液中的氯離子(Cl^-)與蛋白質競爭，使Amuc_1100離開管柱，進而收集到目標蛋白。



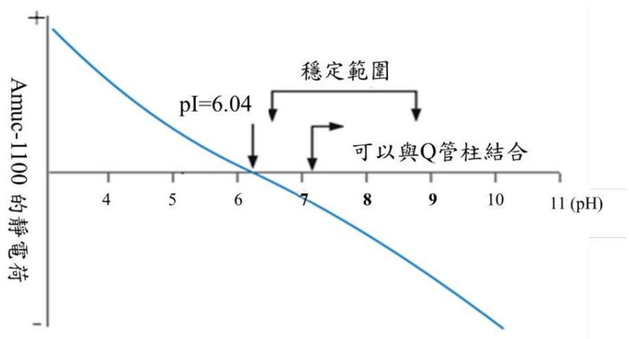
imidazole緩衝液濃度和收取體積



Ni管柱作用原理



NaCl緩衝液濃度和收取體積



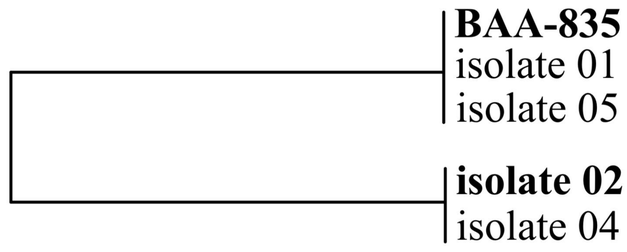
Q管柱作用原理

實驗結果

序列分析

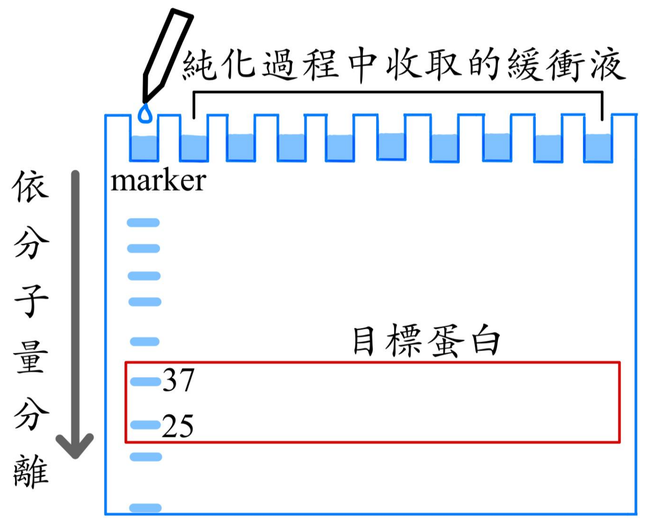
不同臺灣人Amuc_1100蛋白質樣品間序列的差異，經由Blast網站分析，將五種Amuc_1100依序列相似度分為兩類：
1. BAA-835、isolate 01 與 isolate 05
2. isolate 02 與 isolate 04

後續實驗以 isolate 02 和 BAA835 作為此兩類序列的代表

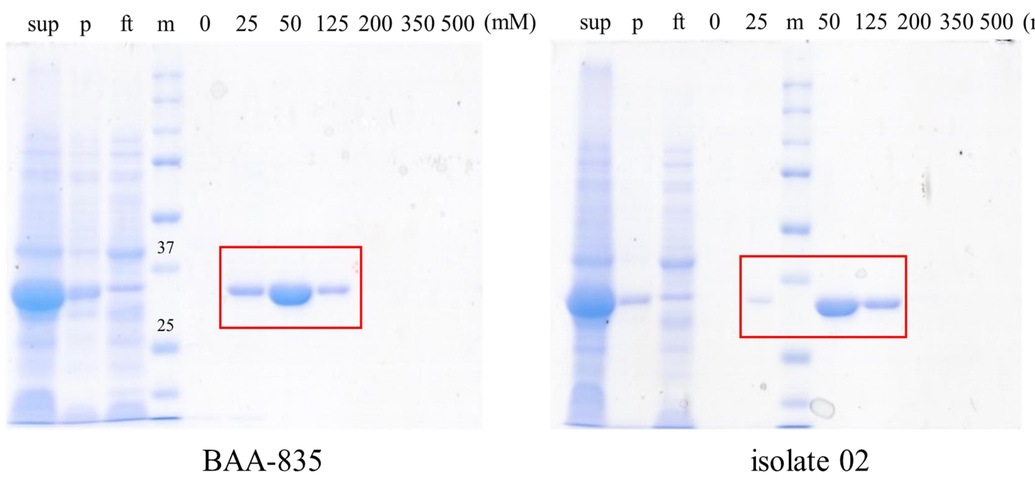


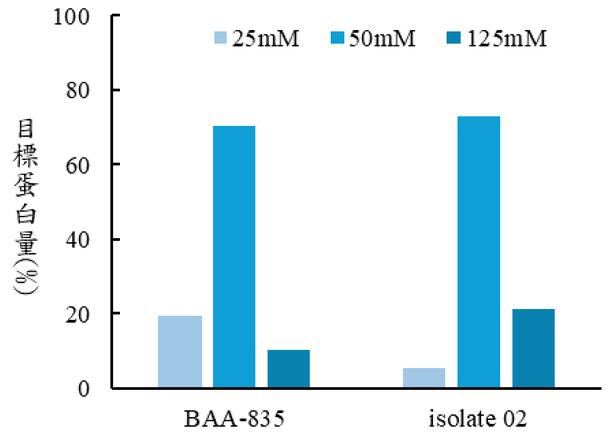
純化結果

將純化完的Amuc_1100蛋白進行SDS-PAGE電泳分析，依蛋白質分子量大小分離，以觀察目標蛋白(25~37 kDa)的沖洗情形，了解純化結果



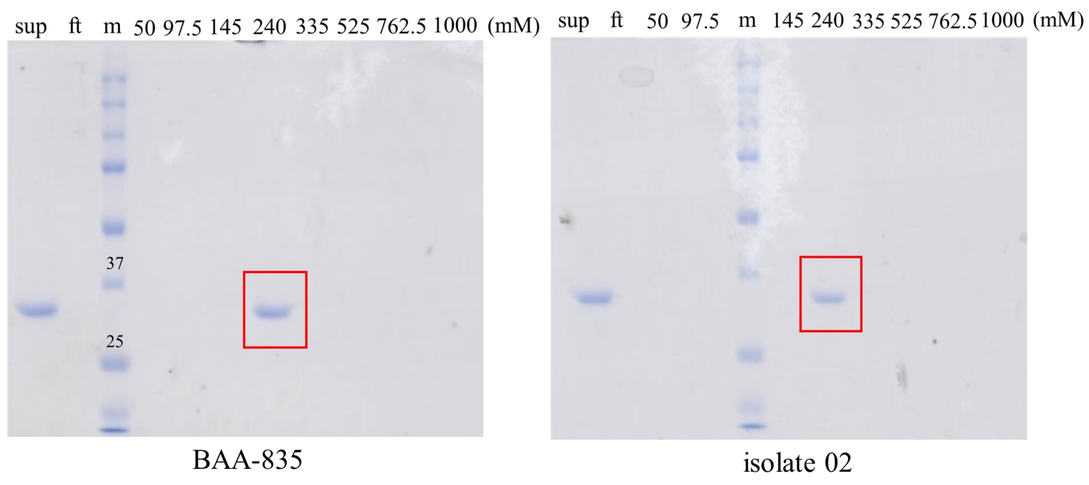
1.親和性層析(Ni管柱)

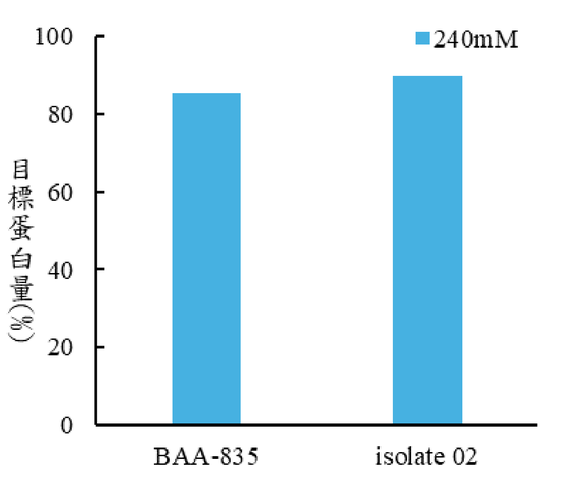




針對BAA-835和isolate 02，125mM imidazole皆能沖洗出所有目標蛋白

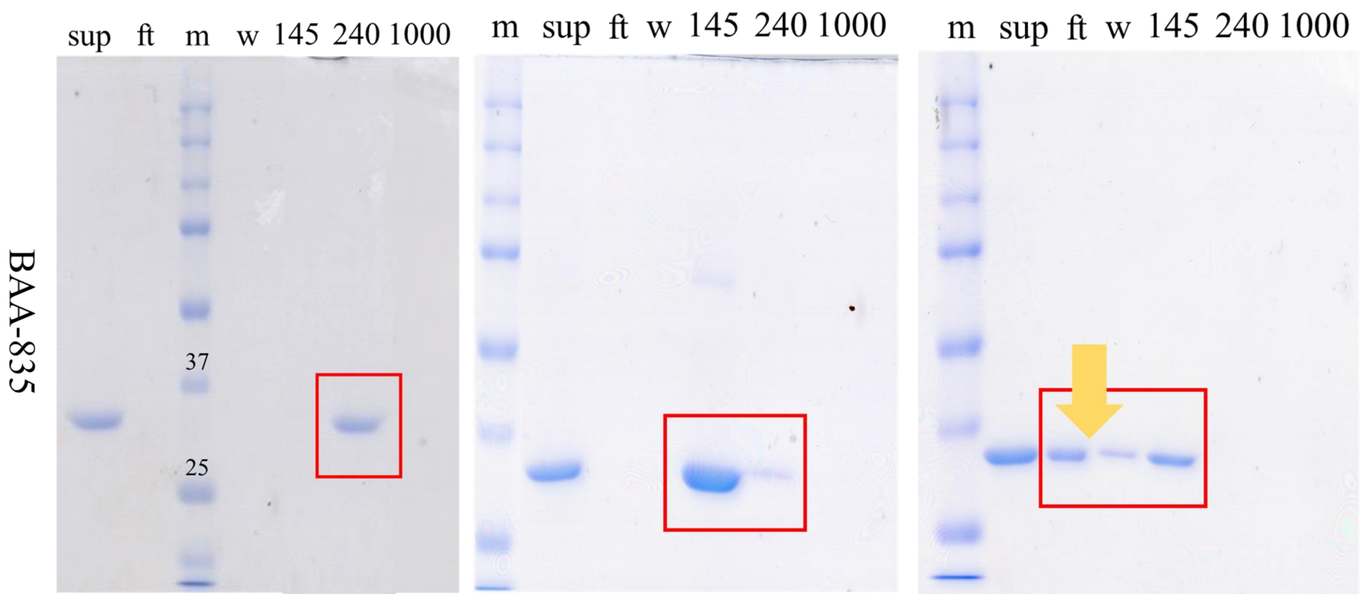
2.離子交換層析(Q管柱)





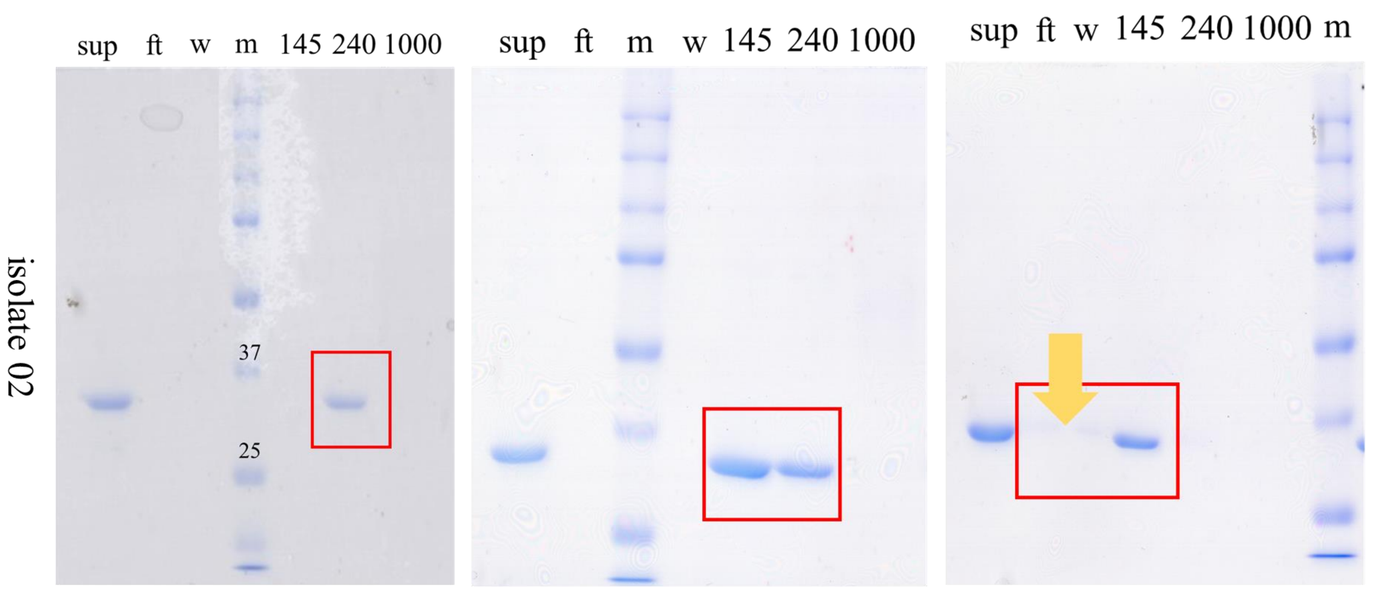
將Ni管柱中純化出來的目標蛋白當作初始管，以50 mM的Tris稀釋4倍，在pH 9的環境下，BAA-835及isolate 02均能以240 mM NaCl將所有目標蛋白沖洗出。

3.酸鹼性環境測試(離子交換層析)



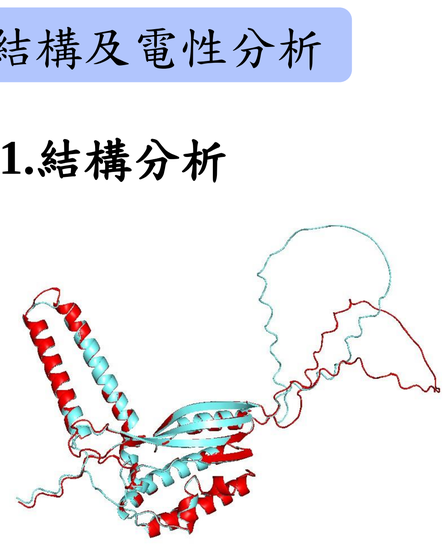
	蛋白	ft	w	145	240
pH 9	BAA-835				✓
	isolate 02				✓
pH 8	BAA-835			✓(大量)	✓
	isolate 02			✓(一半)	✓
pH 7.4	BAA-835	✓	✓	✓	
	isolate 02			✓	

- 純化環境越酸，蛋白質和管柱結合能力越差
- isolate 02較BAA-835和離子交換層析管柱結合能力佳，較不易被競爭下來



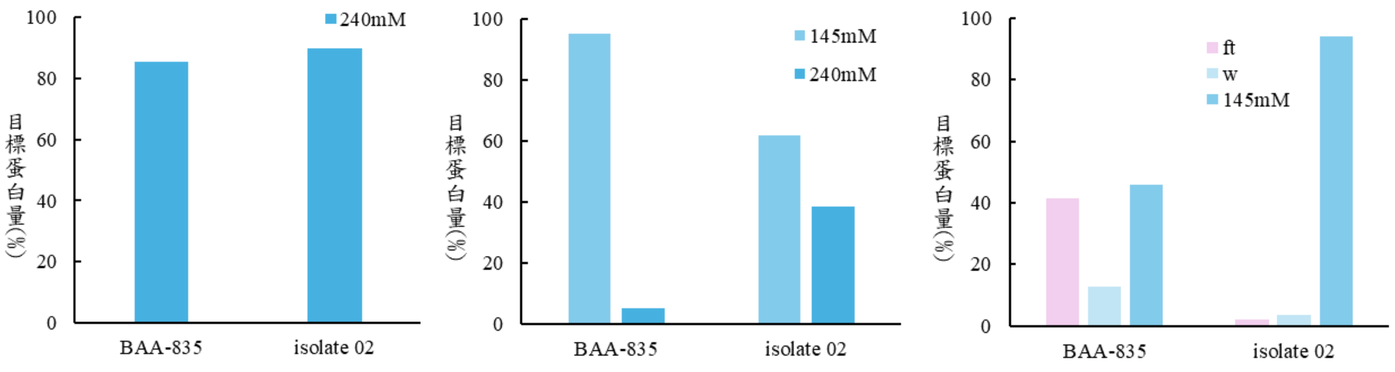
結構及電性分析

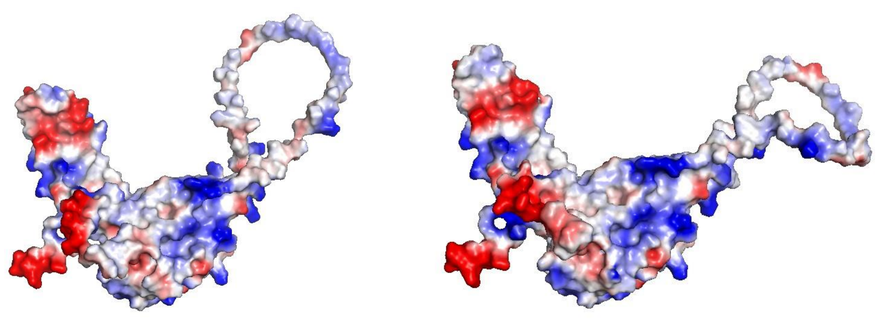
1.結構分析



BAA-835(藍)與isolate 02 (紅) 在二級結構的α螺旋與β摺疊大致重疊，但兩者Loop有所差異

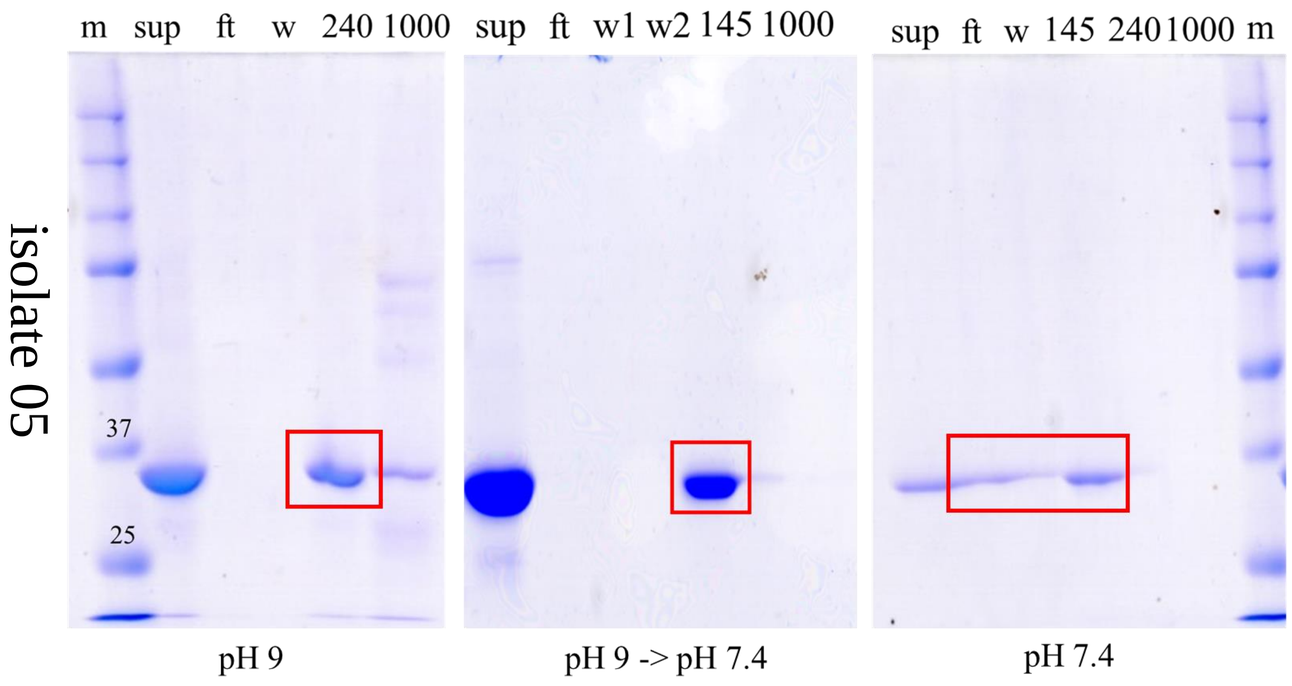
2.電性分析





BAA-835　　isolate 02

4.在不同pH值下稀釋對純化效果的影響



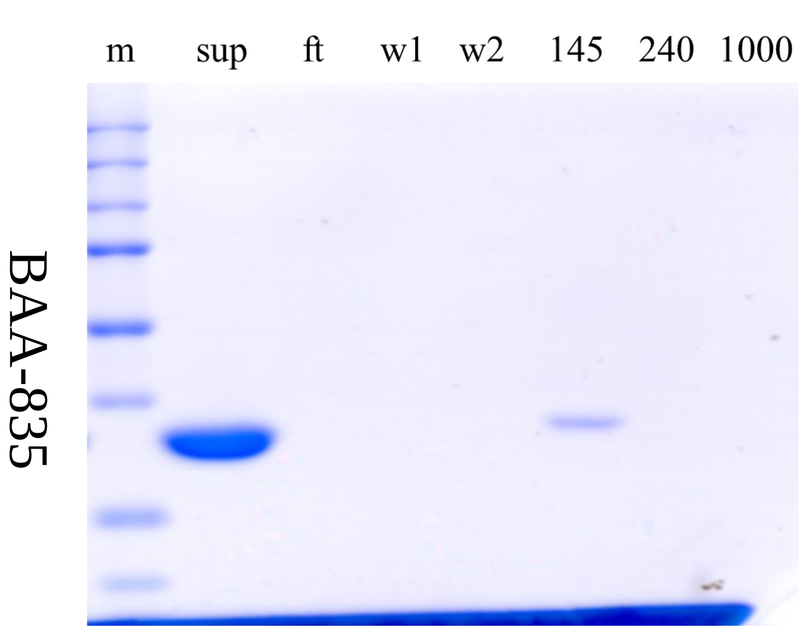
- 改變稀釋的環境: pH 9 稀釋，pH 9 純化
  pH 9 稀釋，pH 7.4 純化

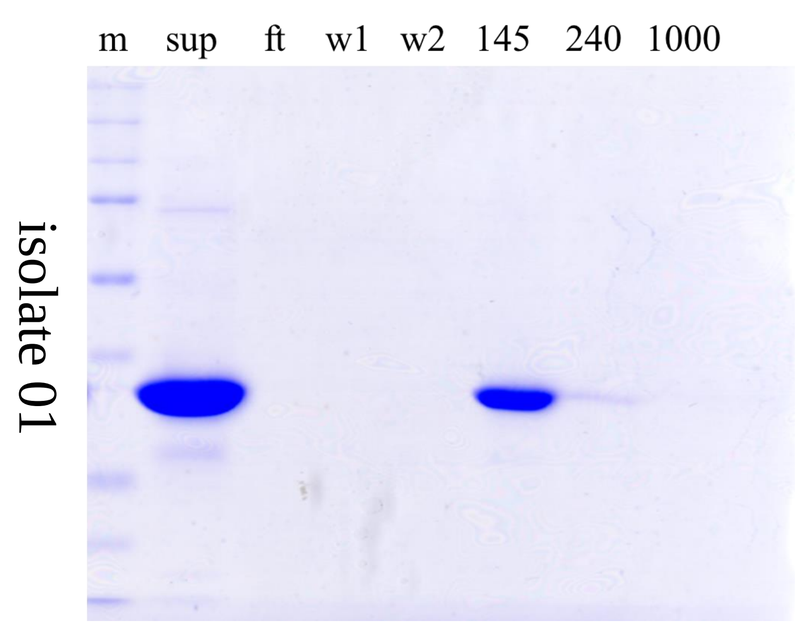
Ni管柱 → **稀釋4倍** → Q管柱

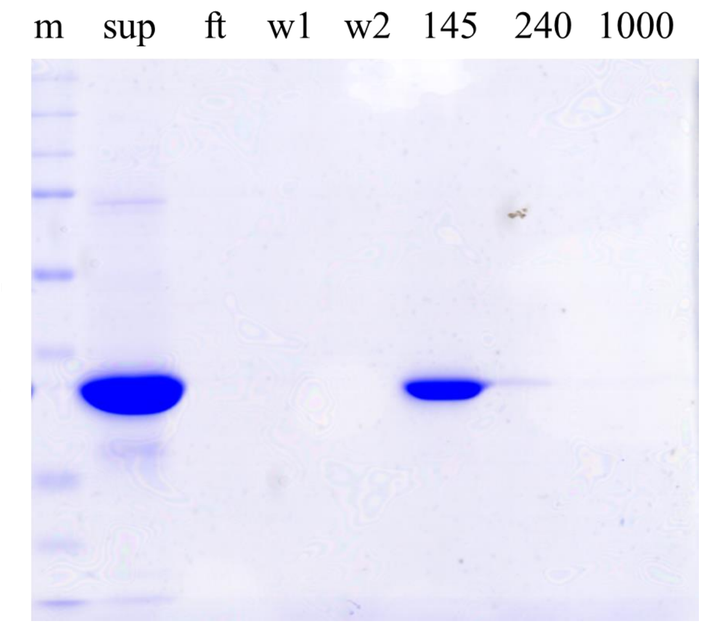
pH 9稀釋且pH 7.4純化的條件可以提高和管柱的結合力，並以接近人體的酸鹼值純化出目標蛋白，解決pH 7.4時蛋白和管柱的結合能力較低的問題，此方法可以作為蛋白質最佳純化的pH值條件

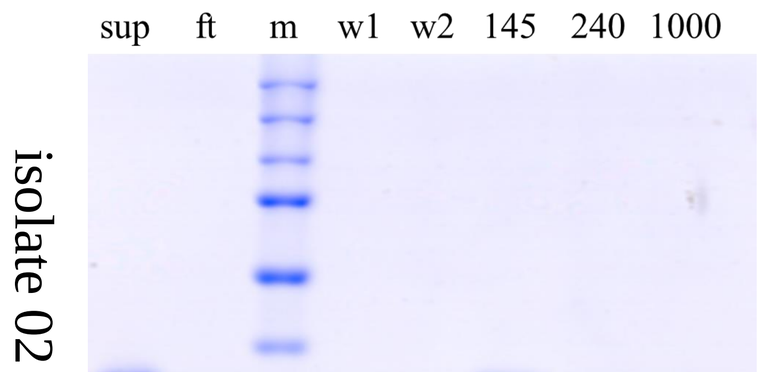
純化環境	ft	w	145	240
pH 9 → pH 9				✓
pH 7.4 → pH 7.4	✓	✓	✓	
pH 9 → pH 7.4			✓	

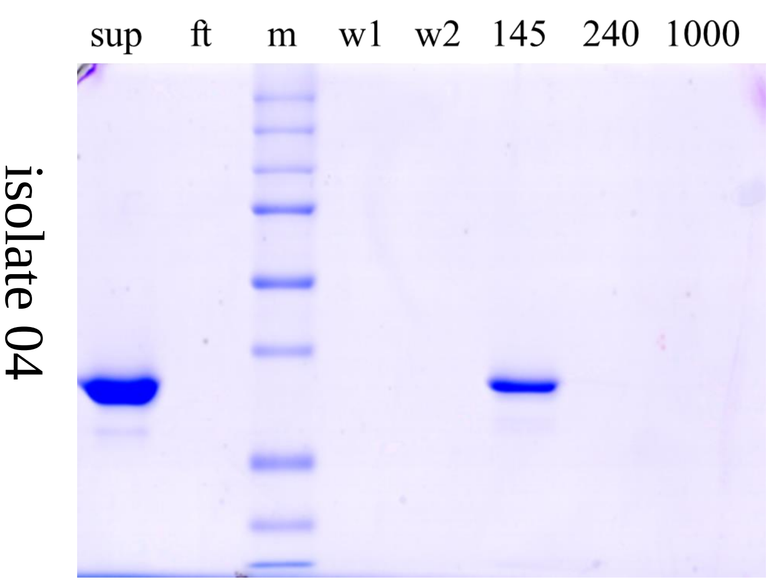
5.針對不同序列分別進行純化





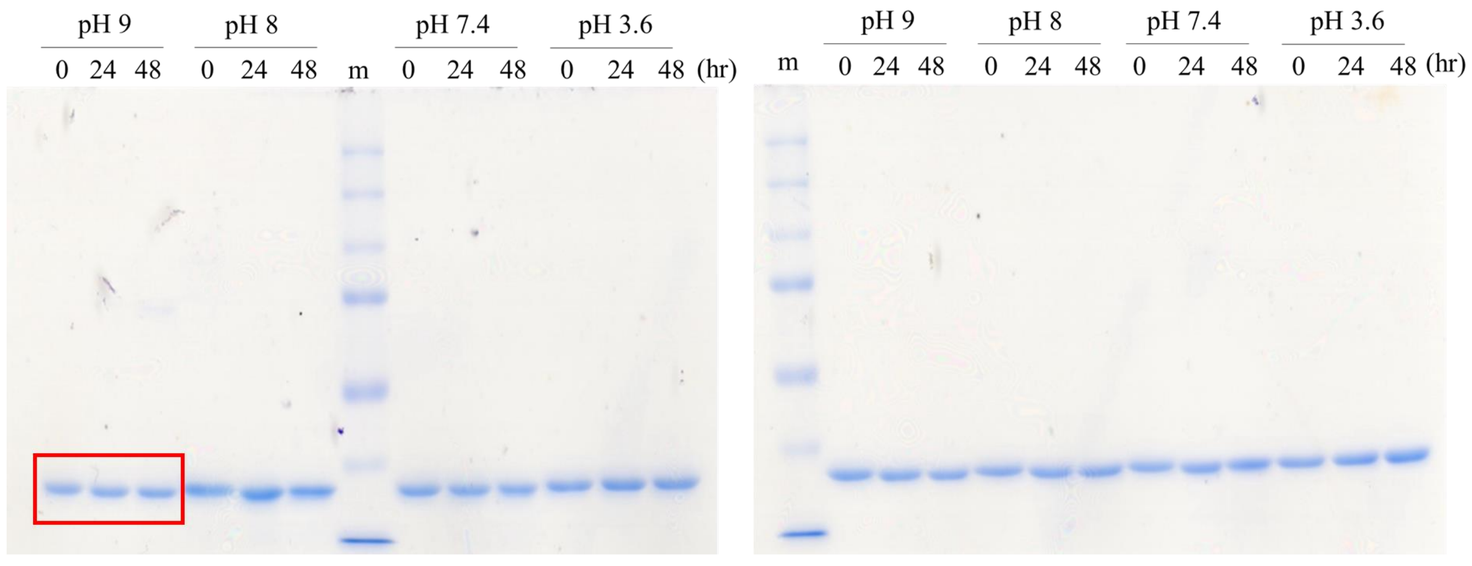






最佳純化條件:
- pH 9稀釋，pH 7.4純化
- Ni管: 125mM imidazole
- Q管: 145mM NaCl

穩定度測試



37度環境下在不同酸鹼性靜置，BAA-835與isolate 02均並未出現明顯降解情形，且可以看出序列差異及純化pH值條件並不會影響Amuc_1100的穩定度，表示純化出的Amuc_1100蛋白質穩定度高。

討論及結論

- 以pH 7.4、pH 8、pH 9的NaCl緩衝液純化，雖然實驗結果發現環境越酸蛋白與管柱的結合能力越差，但考量益生菌保健食品需在人體內發揮作用，因此仍使用最接近人體環境的pH 7.4進行離子交換層析法純化，並以pH 9稀釋，改善pH7.4時和管柱結合能力較低的問題，提高純度。
- Amuc_1100的序列差異會造成其所需的純化條件不同， BAA-835和isolate 05這組蛋白和管柱結合能力較差，推測是因為其結構電性有些不同所造成。
- 純化後的Amuc_1100穩定性高，在接近人體的酸鹼性環境與酸性環境皆沒有出現降解情形。
- 成功找出能適用於isolate 01、isolate 02、isolate 04、isolate 05及BAA-835的最佳純化條件，使不同序列的蛋白皆於相同濃度被競爭下來。

目前我們已完善純化方法學，搭配電腦模型驗證純化結果，並開發 pH 9稀釋、pH 7.4純化的酸鹼性環境，找出一種可以套用在不同Amuc_1100的純化條件，讓不同序列蛋白質皆在145mM的NaCl 緩衝液被競爭下來，降低醫療產業上量化的成本，並且將純化出的蛋白質應用於生活中，開發成有效改善糖尿病與肥胖的益生菌產品。

參考資料

1. Plovier, H., et al., 2017*A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice.* Nat Med,. **23**(1): p. 107-113.
2. Rodrigues, V.F., et al., 2022. Akkermansia muciniphila and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. Front Immunol, 13: p. 934695.