

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號

030018

參展科別

化學

作品名稱

開發腸道菌外膜蛋白質純化方法及以AlphaFold 軟體
對應合適製程

Developing purification methods for outer
membrane proteins of gut bacteria and matching
the optimal purification process by using
AlphaFold.

就讀學校

臺北市立第一女子高級中學

指導教師

周芳妃

徐丞志

作者姓名

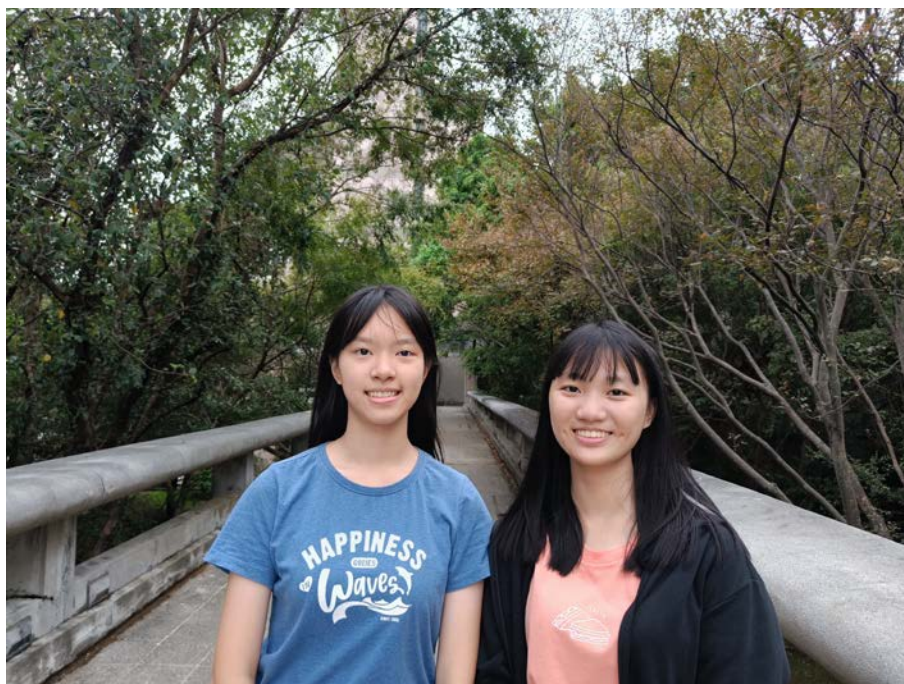
施禹安

林室均

關鍵詞

腸道菌、蛋白質純化、AlphaFold

作者簡介



我們是北一女中資優班的施禹安和林室均，非常感謝能進入台大化學系進行研究。在這段過程中，我們收穫良多，學到科學探究及克服挫折的能力。

我們由衷感謝台大化學系徐丞志教授提供實驗設備及資源，也特別感謝林泓君學長的支持與幫助。此外，謝謝周芳妃老師和劉宛欣老師，一路陪伴我們，提供指導與協助。

我們非常幸運能站上科學的殿堂，並獲得難得的經驗，再次感謝所有幫助過我們的師長與學長姐！

2025 年臺灣國際科學展覽會
研究報告

區別： 北區

科別： 化學科

作品名稱：

開發腸道菌外膜蛋白質純化方法及以 AlphaFold 軟體對應合適製程

Developing purification methods for outer membrane proteins of gut bacteria and matching the optimal purification process by using AlphaFold.

關鍵詞：腸道菌、蛋白質純化、AlphaFold（最多三個）

編號：

摘要

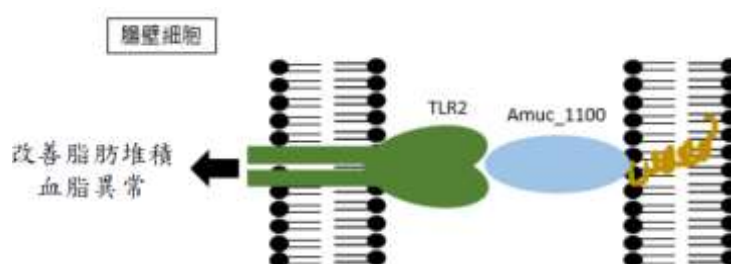
可再現醫療效益之腸道益生菌關鍵分子是重要蛋白質，蛋白質純化極重要但傳統方法費時耗力，導致發展腸道益生菌保健食品的成本很高。本研究取用助於改善糖尿病和血脂異常的腸道益生菌 *Akkermansia muciniphila* 外膜蛋白 Amuc_1100為樣品，先以傳統方法開發純化製程，利用親和性層析和離子交換層析找出純化臺灣本土菌株 **isolate 02**和國際標準菌株 **BAA-835**之條件及其差異，確認純化蛋白質可維持3日穩定。本研究進行 **AlphaFold** 電腦模型預測蛋白質結構並進行蛋白質序列分析，發現蛋白質本身結構和電性不同才導致 **isolate 02**和 **BAA-835**純化製程條件有所差異。本研究提供全新展望，透過人工智慧將蛋白質結構對應到合適製程，大幅減少研發純化條件的時程，完善蛋白質純化方法學，並得到可量產且品質穩定的純化蛋白質。未來將選用其他臺灣本土 Amuc_1100樣品以擴大驗證及建立蛋白質結構與純化製程資料庫。

Abstract

Key molecular components of reproducible medical-benefit intestinal probiotics are essential proteins. Traditional protein purification processes are crucial but time-consuming and labor-intensive, leading to high costs in developing intestinal probiotic health foods. For this study, we selected the outer membrane protein Amuc_1100 of *Akkermansia muciniphila*, a gut probiotic known for its benefits in managing diabetes and dyslipidemia, as our research sample. This study begins with developing the traditional protein purification process for Amuc_1100. Affinity chromatography and ion exchange chromatography were utilized to determine the purification conditions for both a Taiwanese **isolate 02** and the international standard strain **BAA-835**, and their differences were identified. The purified protein was confirmed to maintain stability for up to 3 days. The Computer software **AlphaFold** was employed to predict the protein structure through computer modeling, and protein sequence analysis was performed. It was found that the differences in protein structure and electrical properties led to the variations in purification conditions between **isolate 02** and **BAA-835**. This study provides a novel perspective by matching protein structures with suitable purification conditions. This study offers a novel approach, utilizing artificial intelligence to match protein structures with optimal purification processes. By significantly reducing the time required to develop purification conditions, we have refined protein purification methodologies and obtained high-quality, scalable purified proteins. Future research will involve expanding our validation by using other indigenous Taiwanese Amuc_1100 samples to establish a database of protein structures and purification processes.

壹、研究動機

Akkermansia muciniphila (簡稱 *A. muciniphila*) 為近期被發現一種腸道益生菌，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]，因此具有開發為益生菌食品的潛力。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]，而文獻中關於 *A. muciniphila* 的研究主要針對從外國人腸道分離出 Amuc_1100 樣品，並沒有針對台灣人的相關實驗，因此本研究想開發出台灣本土 Amuc_1100 的純化方法，應用於研發適合台灣人的保健食品。人工智慧導入也加速縮短生產的時間成本。透過人工智慧將蛋白質結構對應到合適製程，大幅減少研發純化條件的時程，免除傳統法的費時費力的高成本困境，完善蛋白質純化方法學，並得到可量產且品質穩定的純化蛋白質。



(作者自行繪製)

貳、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、以 AlphaFold 人工智慧預測分析不同序列 Amuc_1100 結構差異
- 三、針對不同 Amuc_1100，找出親和性層析法和離子交換層析條件，開發純化製程
- 四、以 AlphaFold 人工智慧預測預測更多其他臺灣本土益生菌 Amuc_1100 結構並配對到合適的純化製程

參、研究設備及器材

一、實驗設備：

微量吸管

離心管

微量離心管

量筒

血清瓶

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(BSA)
SDS-PAGE	十二烷基硫酸鈉(SDS)、丙烯醯胺(acrylamide)、四甲基乙二胺(TEMED)、過硫酸銨(AP)、考馬斯亮藍(染色劑)
樣品編號	來源：與研究單位及廠商提供不同人糞便取得菌株 <i>A. muciniphila</i> 及外膜蛋白質序列 Amuc_1100等相關資訊： 國際標準菌株 <i>A. muciniphila</i> ： BAA-835 臺灣本土菌株 <i>A. muciniphila</i> ： isolate 02、isolate 04、isolate 05

肆、研究過程或方法

一、文獻探討

(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（BMI）、腰臀比、空腹葡萄糖水平、血糖狀態、高密度脂蛋白（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，詳細的腸道菌種與益生菌見下表 1。其中疣微菌門的 *Akkermansia muciniphila* 因能有效減少脂肪堆積，故為近年來研究著重的菌種。

表 1. 常見的腸道菌種及有益菌種

常見的腸道菌門	有益菌屬
厚壁菌門(<i>Firmicutes</i>)	乳酸桿菌（ <i>Lactobacillus</i> ）
	梭菌（ <i>Clostridiales</i> ）
擬桿菌門(<i>Bacteroidetes</i>)	
變形菌門(<i>Proteobacteria</i>)	
放線菌門（ <i>Actinomycetota</i> ）	雙歧桿菌（ <i>Bifidobacterium</i> ）
疣微菌門(<i>Verrucobacteria</i>)	<i>Akkermansia muciniphila</i>

(二)腸道菌 *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)腸道菌外蛋白 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(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、胰島素抵抗和腸道屏障改變的作用 [11]。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.)。

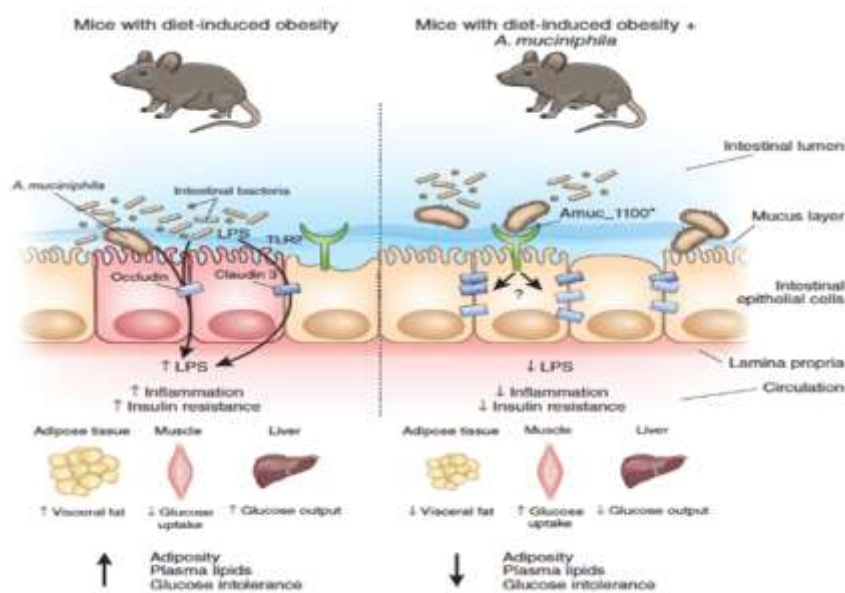


圖 1. Amuc_1100 的作用[2]

(四)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。

利用 Ni-NTA 管柱固定相和本研究的 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。

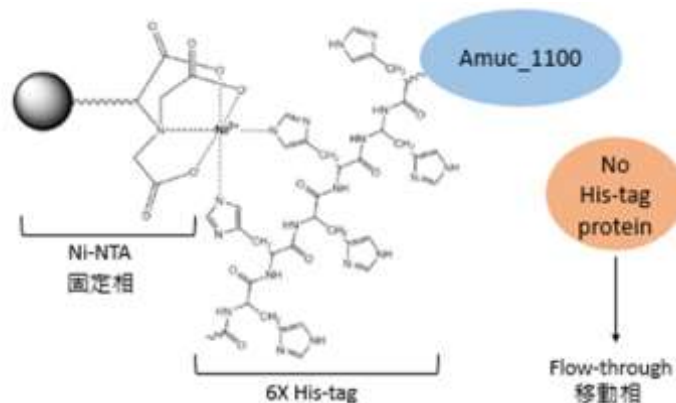


圖 2. Ni-NTA 管柱作用原理(作者自行繪製)

(五)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。

(六)電腦 AlphaFold 軟體模擬蛋白質結構與電性

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，電腦 AlphaFold 軟體可模擬蛋白質結構與電性。人工智慧相關突破成為 2024 諾貝爾獎大贏家，Google 旗下的 DeepMind 公司於 2018 年推出一款蛋白質結構預測程式 AlphaFold 1，透過深度學習，能夠協助科學家分析、判定和預測各種物質的蛋白質

結構，並在 2020 年推出新版本 AlphaFold 2，2023 年 AlphaFold 3 推出。AlphaFold 能在短時間內辨識蛋白質形狀，之前學界識別蛋白質形狀經常需花費數年時間。過去 60 年來，科學家僅辨識約 17 萬種蛋白質結構，但自從 AlphaFold 推出後，六年來資料庫已儲存超過兩億種蛋白質結構，對於科學研究發展有極龐大的幫助。

二、實驗流程

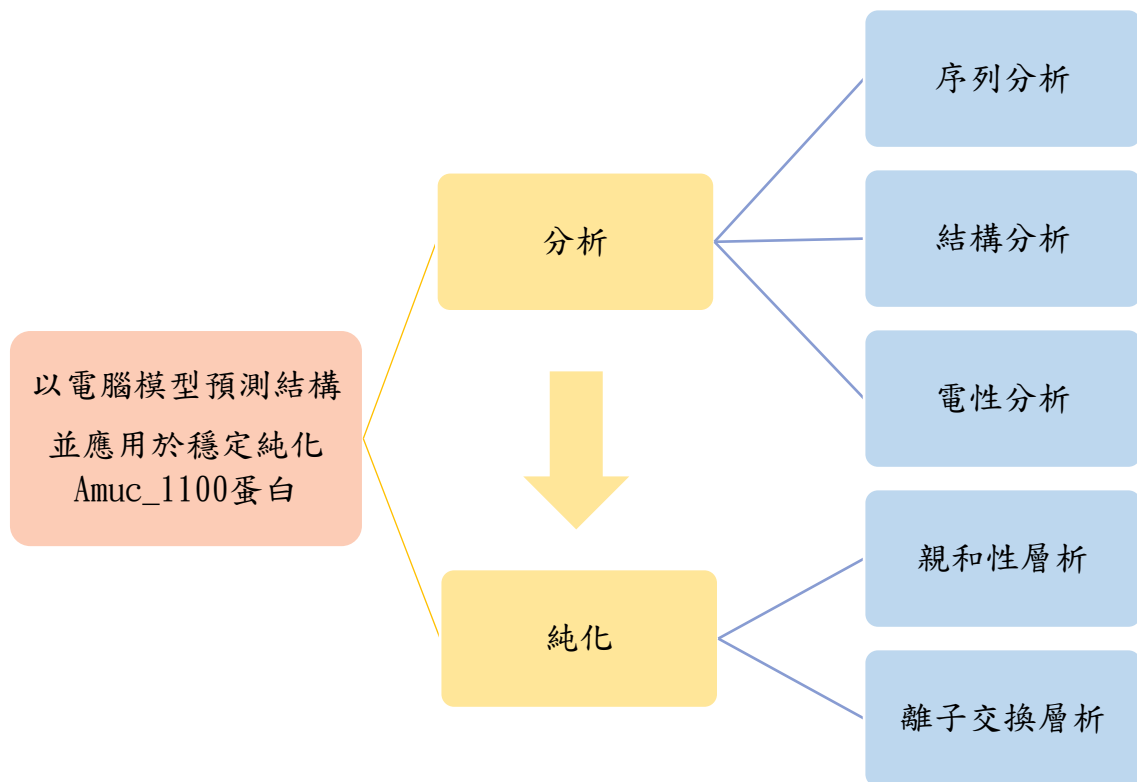


圖 3. 實驗流程圖(作者自行繪製)

三、研究步驟

(一) 電腦模擬

蛋白質序列分析比較

1. 不同區域之 Amuc_1100 序列比較：從生物資料庫(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. 臺人之 Amuc_1100 序列：由廠商提供從健康臺灣人分離出的蛋白質序列

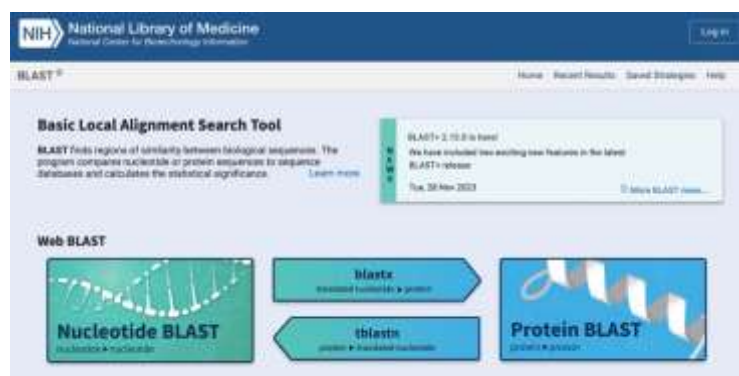


圖 4. Blast 網站(作者自行截圖自 Blast 網站)

蛋白質結構分析與電性分析

1. Amuc_1100 結構分析：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，分析結構差異與帶電情形，對應適合的緩衝液條件及濃度。



圖 5. 並以 PyMOL 軟體繪製蛋白質三維結構(作者自行繪製)

(二) 蛋白質表達及破菌

步驟：

- (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，20000 赫茲進行超音波破菌。
- (3) 放入 4 度的離心機以每分 13000 轉的頻率離心 10 分鐘。
- (4) 取上清液準備純化。

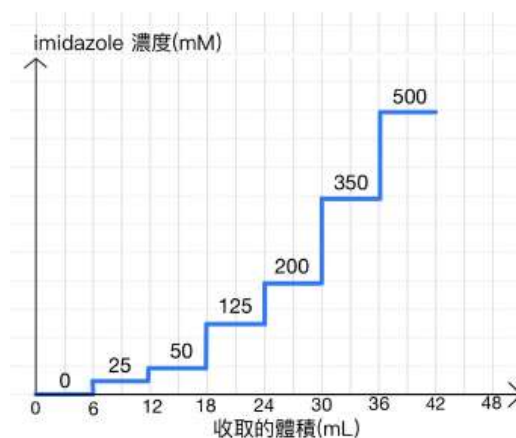
(三) 蛋白質純化

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。後續實驗我們會以 **isolate 04**、**isolate 05** 進行電腦模型預測工作並配對到第一階段的純化製程驗證蛋白質適合的純化條件。

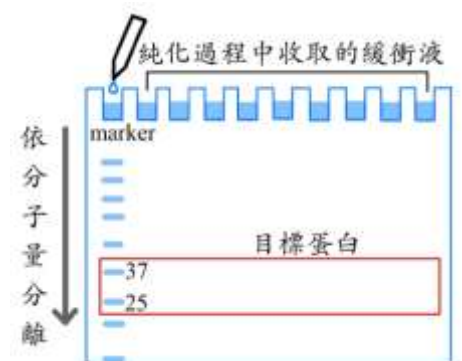
2. 親和性層析緩衝液濃度對 Amuc_1100 純化的影響

- (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。



(作者自行繪製)

- (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。



(作者自行繪製)

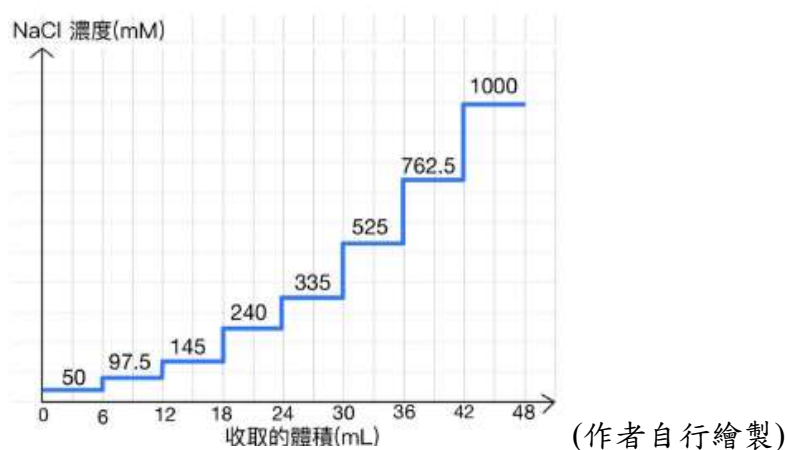
在測試不同緩衝液比例對純化效果的影響的實驗中，我們配置 0 到 500 mM 的 imidazole 緩衝液，以找出可以競爭下目標蛋白的最佳緩衝液比例和順序。根據實驗結果，我們將以低濃度的範圍內用以沖洗雜蛋白以提高純度，中濃度用以沖洗目標蛋白，高濃度確認有無殘留，純化 **BAA -835** 和 **isolate 05**、**isolate 02** 和 **isolate 04** 這兩組蛋白。

3. 離子交換層析緩衝液濃度對 Amuc_1100 純化的影響

利用帶正電的離子交換管柱(Q 管柱)固定相和帶負電的 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、1000 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。

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，我們配置 50 到 1000 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，我們將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

我們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 $\pm$ 3，我們希望能同時符合上述兩個條件，以達到最好的純化效果。因此我們配置 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。

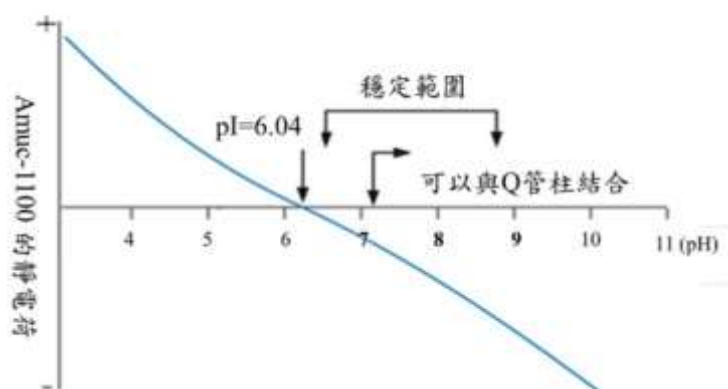


圖 6. 離子交換層析適合酸鹼性範圍(作者自行繪製)

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 3000 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. 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. 上下膠配方

下膠	Running gel	上膠	Stacking gel
10% SDS	0.15ml	10% SDS	0.05ml
acrylamide	3.33ml	acrylamide	0.5ml
Running buffer	1.25ml	Stacking buffer	0.625ml
ddH ₂ O	5.125ml	ddH ₂ O	3.78ml
TEMED	8.3μl	TEMED	8.3μl
10%APS	42μl	10%APS	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. BCA method

為了知道不同樣品中的蛋白質濃度，我們使用 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。

(1) 以濃度為 2000 μg/mL 的 BSA 作為母管，將其稀釋為 1000, 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。

伍、結果

一、電腦模擬蛋白質結構與電性

1. 序列差異

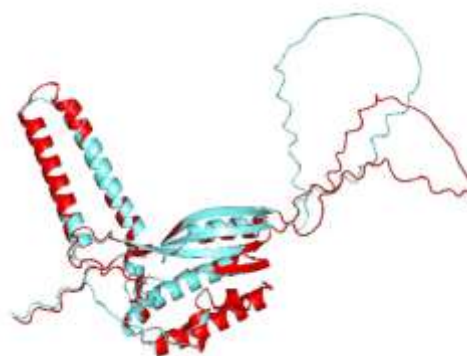
我們以 Blast 網站分析，**BAA-835** 和 **isolate 02** 的序列相似度僅有 91%，序列中有數個胺基酸不同，以此二菌株分為兩大組，其他菌株依序列相似度編入此二組。

2. 結構差異

將 **BAA-835** 和 **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 7. **BAA-835** 和 **isolate 02** 三維結構對齊比對圖，兩者 Loop 有所差異而無法完全重疊
(藍色：**BAA-835**；紅色：**isolate 02**)

(作者自行繪製)



由上圖可以觀察 **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。

3.電性差異

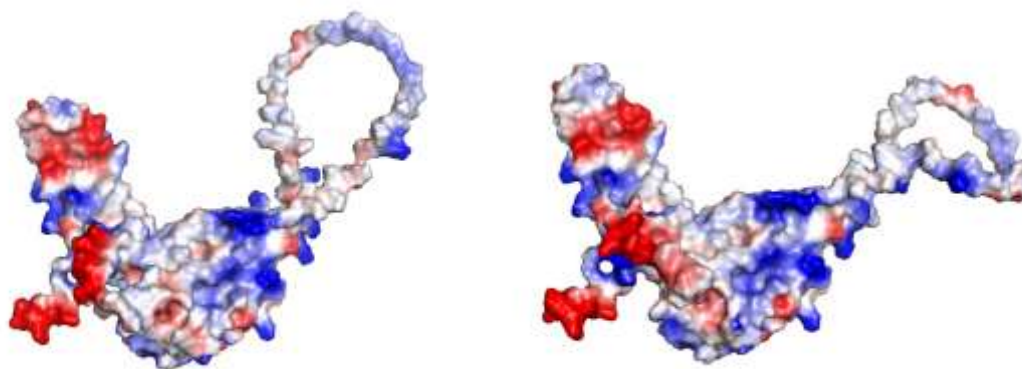


圖 8. BAA-835 與 **isolate 02** 的電性分佈圖，藍色代表帶正電，而紅色為帶負電，可觀察到 **isolate 02** 帶較多負電。(左：BAA-835；右：isolate 02) (作者自行繪製)

在圖 8.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，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，因此我們由 **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。本研究接下來將選用其他臺灣本土 Amuc_1100 樣品加以驗證，繼續進行更多電腦模型預測工作並配對到第一階段的純化製程，利用電腦模型結合分析化學製程，完善蛋白質純化方法學。

二、以傳統方法找出純化條件

(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

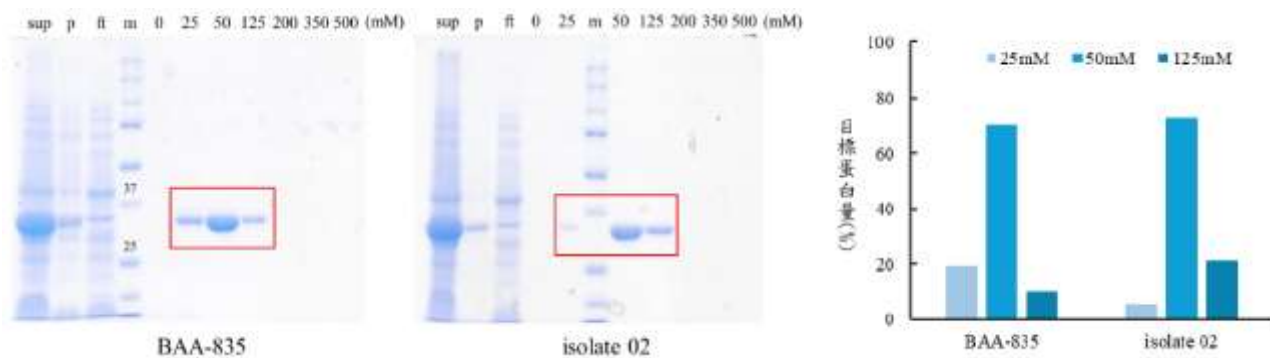


圖. 9 親和性層析 SDS-PAGE。(A) **BAA-835** 親和性層析 SDS-PAGE。(B) **isolate 02** 親和性層析 SDS-PAGE。(C)親和性層析純化 Amuc_1100 量的產率(作者自行拍攝)

由上圖 9 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。

將圖 9 之 SDS-PAGE 跑膠結果量化，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

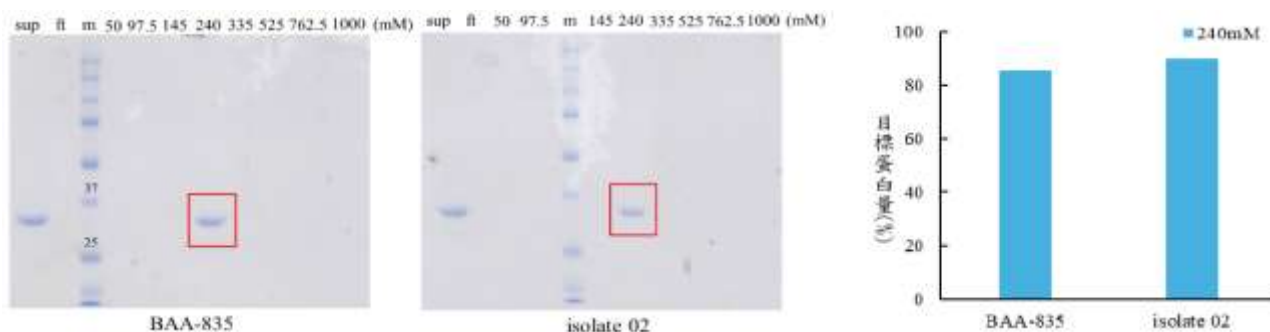


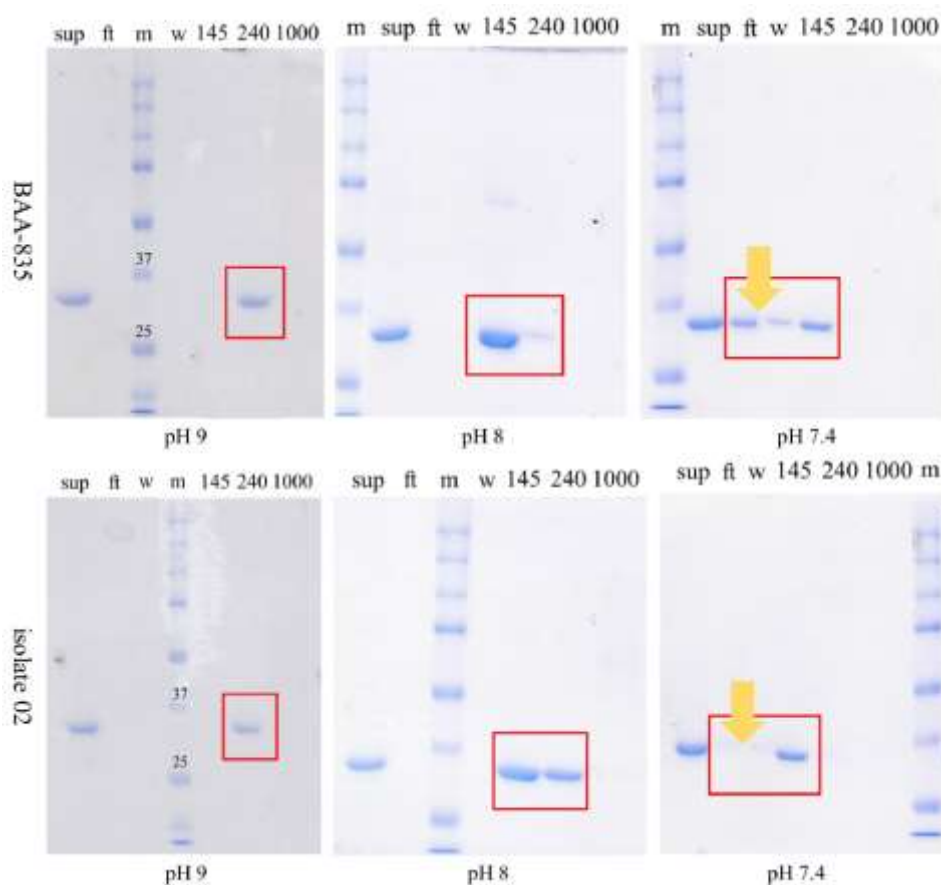
圖 10. 離子交換性層析 SDS-PAGE。(A) **BAA-835** 離子交換層析 SDS-PAGE pH 9。(B) **isolate 02** 離子交換層析 SDS-PAGE pH 9。(C) 離子交換層析純化 Amuc_1100 量的產率(作者自行拍攝)

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 10 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



	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			✓	

圖 11. 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)

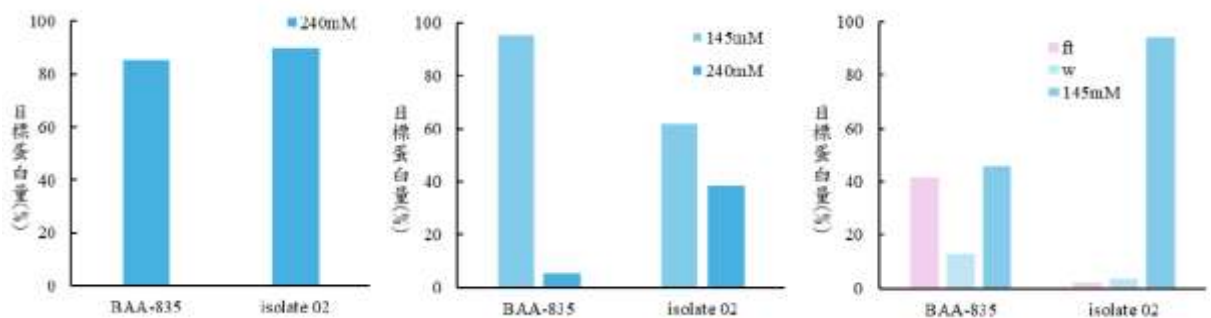


圖 12 不同酸鹼性環境離子交換層析純化 Amuc_1100 量的產率。

(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 11 的 SDS-PAGE 圖量化成圖 12，而由圖 12 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；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，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

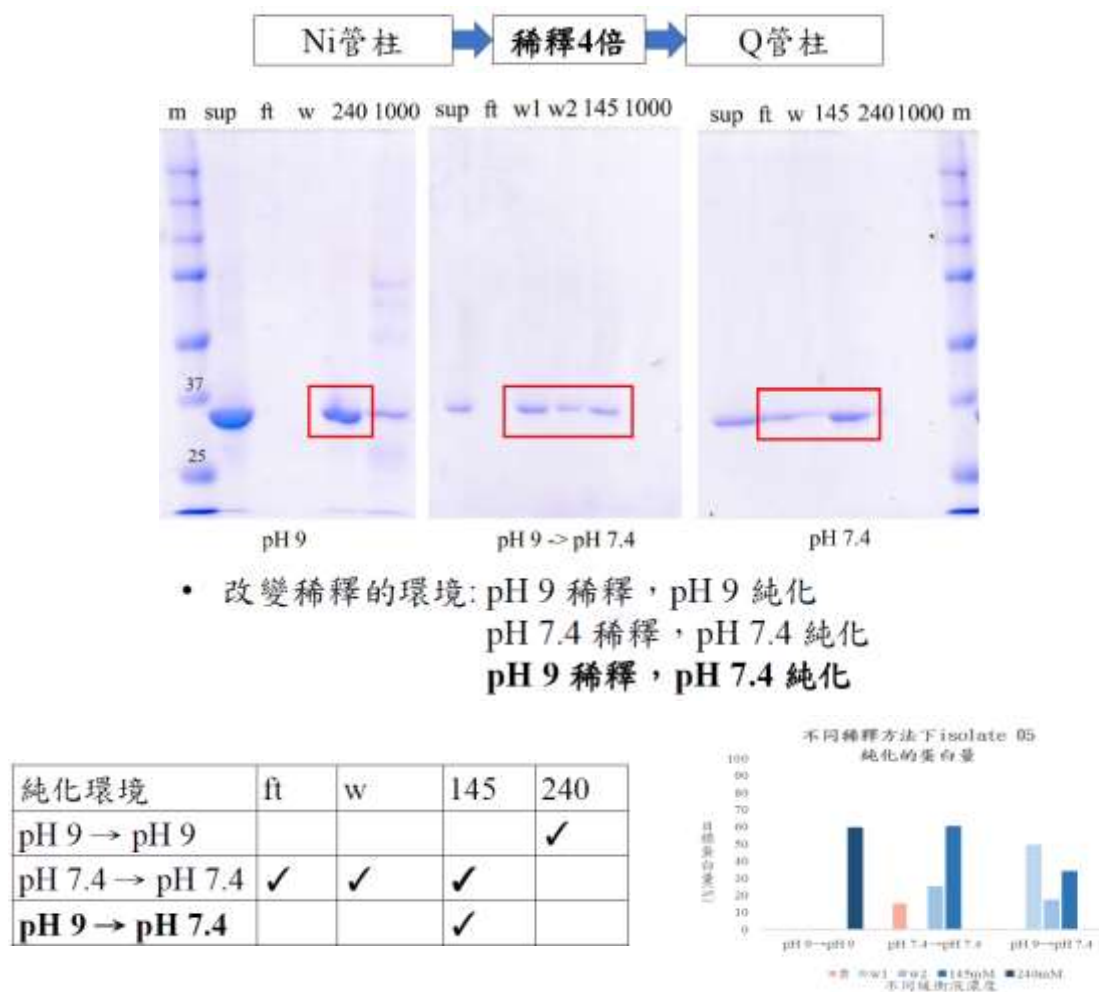


圖 13. **isolate 05** 在不同酸鹼性下的純化結果。(作者自行拍攝)

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 13)。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 13 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。

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 13 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 13 所示。

(三) 不同序列的 Amuc_1100 個別調整最適合的純化方法

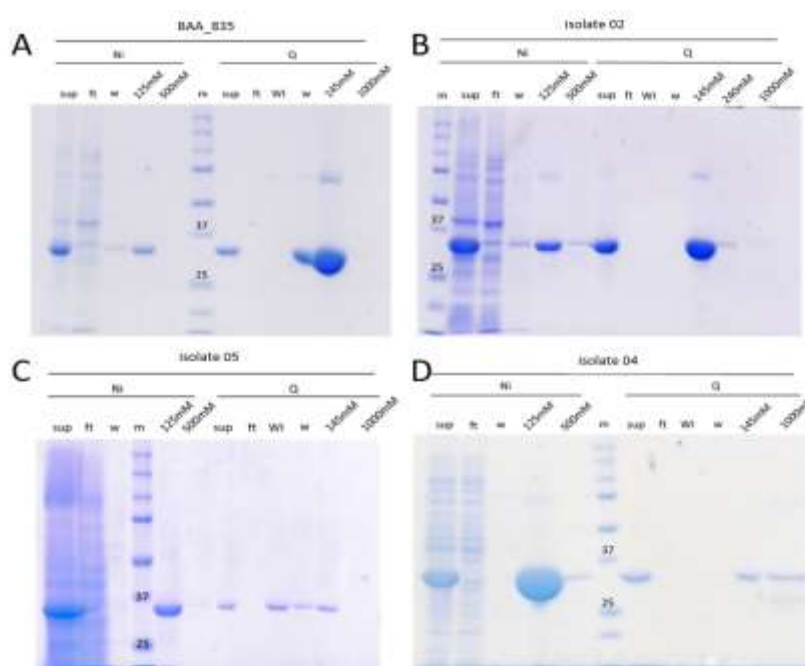


圖 14. 各序列蛋白質 SDS-PAGE (作者自行拍攝)

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 14)，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 14 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純化條件，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
isolate 05	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→1,000 mM
isolate 02	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1,000 mM
isolate 04	Ni 管: wash→125 mM→500 mM Q 管: wash→145 mM→240 mM→1,000 mM

(四) 探討不同酸鹼性下，純化出 Amuc_1100 的穩定度的影響

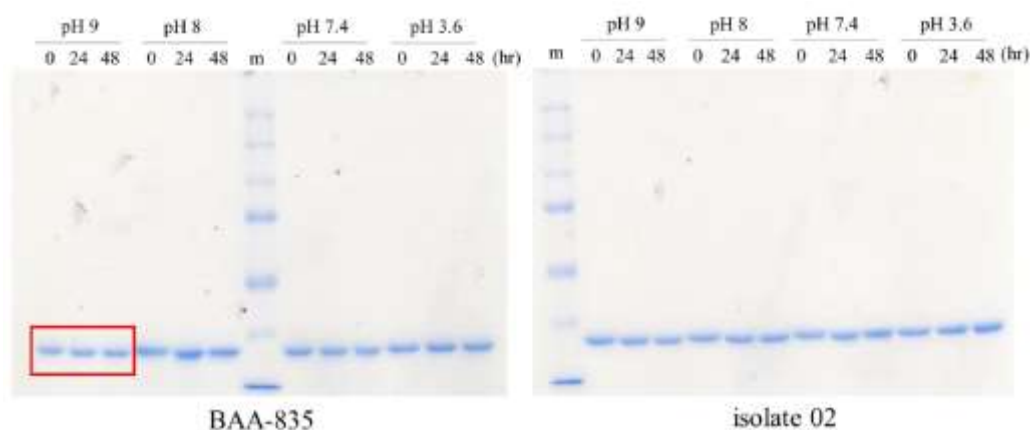


圖 15. 穩定度 SDS-PAGE(作者自行拍攝)

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。

陸、綜合討論

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、胰島素抵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，以較高的結合能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 **isolate 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。

柒、結論

- 一、利用 AlphaFold 人工智慧結合分析化學製程，驗證對應傳統費時的分析方法結果，利用預測蛋白質的結構與電性，可對應到合適的純化製程。
- 二、已找出最適合各序列蛋白質的純化條件，並順利純化出四種本土腸道菌 **isolate#**與一種國際菌株 **BAA-835** 之外膜蛋白 Amuc_1100，提供純化製程的兩大組標準化流程。依序列相似度分為第一組 **BAA-835**、**isolate 05**，和第二組 **isolate 02**、**isolate 04**。
- 三、研究結果發現蛋白質序列相似，所需的純化條件也相似。針對不同 Amuc_1100，測試緩衝液濃度及酸鹼性對純化的影響，親和性層析法中使用 25~125 mM imidazole 都有第一組(**BAA-835** 組)和第二組(**isolate 02** 組)目標蛋白被沖出。離子交換層析管柱中，第一組(**BAA-835** 組)較容易被沖出，145 mM 的 NaCl 即可沖出。第二組(**isolate 02** 組)較難被沖出，240 mM 的 NaCl 即可沖出。
- 四、純化後益生菌外膜蛋白可保持三日的穩定度。此蛋白質穩定度高，在中性及酸性環境皆能保持穩定。
- 五、確認以電腦模擬預測結構搭配標準化純化流程，完善蛋白質的純化方法學，同時提供全新展望，未來可為保健食品與藥物開發產業大幅降低研發成本，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。

捌、參考資料

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.
2. Anhê, F.F. and A. Marette, 2017 *A microbial protein that alleviates metabolic syndrome*. Nat Med., **23**(1): p. 11-12.
3. Guo, X., et al., 2017 *Genome sequencing of 39 Akkermansia muciniphila isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas*. BMC Genomics., **18**(1): p. 800.
4. Labrou, N.E., 2021 *Protein purification technologies*. Protein Downstream Processing: Design, Development, and Application of High and Low-Resolution Methods,; p. 3-10.
5. Bajzer, M. and R.J. Seeley, 2006. *Obesity and gut flora*. Nature, **444**(7122): p. 1009-1010.
6. David, L.A., et al., 2014. *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature, **505**(7484): p. 559-63.
7. Thursby, E. and N. Juge, 2017. *Introduction to the human gut microbiota*. Biochemical journal, **474**(11): p. 1823-1836.
8. Hills, R.D., Jr., et al., 2019. *Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease*. Nutrients, **11**(7).
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Luo, Y., Lan, C., Li, H. et al., 2022 *Rational consideration of Akkermansia muciniphila targeting. intestinal health: advantages and challenges*. npj Biofilms Microbiomes 8..

【評語】 030018

利用親和性層析和離子交換層析找出純化臺灣本土菌株 isolate 02 和國際標準菌株 BAA-835 之條件及其差異，確認純化蛋白質可維持 3 日穩定。本研究進行 AlphaFold 電腦模型預測蛋白質結構並進行蛋白質序列分析，發現蛋白質本身結構和電性不同才導致 isolate 02 和 BAA-835 純化製程條件有所差異。具 AI 的先進熱門內涵，然需加強 AlphaFold 如何幫助蛋白純化的論述並需以其他蛋白驗證。此外蛋白的等電位點及沖提液的 pH 值亦會影響分離，可納入考慮。