

# 同步輻射蛋白質結晶學之高通量暨高純度蛋白質純化設施應用

## Automation of High-Throughput Protein Purification for X-Ray Crystallography Study

劉思恒、黃詩芳、王聖宏、潘冠宇、林易弘

Szu-Heng Liu, Shih-Fand Huang, Takun Yudaw, Kuan-Yeu Pan, Yi-Hung Lin

同步輻射在蛋白質結構生物學上的應用與研究發展至今，已是一項非常成熟的技術。以 X 光繞射為工具，在原子解析度下，正確地鑑定並提供詳實的蛋白質晶體結構，以探討蛋白分子結構與功能的關係，有助於基礎生命科學的發展。研究結構基因體學過程中最大的挑戰在於大量 (high-throughput) 及同時並行 (parallel) 多種基因所相對應的蛋白質表現、純化及其結構的確定與分析。在蛋白質純化方面，主要的考量在於如何快速獲得大量高純度且溶解度高的蛋白質，以因應篩選高品質蛋白晶體時的大量需求與純度需要。因此，建立 AKTA explorer 3D 以及 AKTExpress 之高效能蛋白質自動純化裝置工作站，將會是解決此一瓶頸的最佳利器。AKTExpress 即專為純化大量且高純度重組蛋白所重新設計研發的自動化純化系統。

Advances in genomics research provide valuable information about the composition of proteins, but little about their structures and most crucially, little concerning their functions. Thus, it is essential to know their three-dimensional structures and further to understand how and why proteins function as they do. To date, structural genomics is a field of research that has been established in particular for deciphering of the 3-D structure of proteins via a high-throughput methodologies and techniques. The critical challenge in the studies of structural genomics in general, is the availability of milligram-quantity and most importantly high-quality soluble monodisperse proteins. The choice of protein purification and handling procedures plays a critical role in obtaining high-quality proteins. In this regard, we introduce AKTA explorer 3D and AKTExpress workstations that has been successfully applied to many structural genomics centers, capable of performing multidimensional chromatography. Various purification strategies, their design and their implementation are discussed in this study.

### 一、前言

生命科學的蓬勃發展是不同科技領域的結合。同樣的，同步輻射加速器之於生命科學方面的研

究，不僅提供全波段之不同光源以研究生物分子，更展示絕佳的解析能力以支援更為細膩的研究分析。同步輻射光源在於其光源強大、品質穩定，以及光源能量可調整，提供了大分子結構解析最佳的

工具。據此，同步輻射運用於結構生物學可說是一門整合了化學、物理、生物、資訊乃至於工程等科學的應用科學。

結構基因體計畫是繼基因體解碼計畫後的跨國大型計畫，其主要目的，簡單來說，是希望能快速的在基因資料庫中加入基因編碼之蛋白質的三度空間結構資料。因此 2000 年美國 National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) 設立了七個結構基因體中心，並陸續建立兩個以發展或是利用高通量為策略的專門機構，來完成這些最花時間的困難工作 (參考網站 <http://www.nigms.nih.gov/psi/>)。加拿大、日本和歐洲也相繼成立結構基因體中心，並組成國際性結構基因體組織 (ISGO, <http://www.isgo.org>)。因此，包括韓國、中國、法國、德國以及英國，至今已有超過 25 個以上的結構基因體計畫<sup>(1)</sup>。而隨著這些機構的成熟發展，成功地完成多項技術開發，以幫助生物學家解決蛋白質結構與功能的關係，以及發展新藥設計，特別是蛋白質結構預測方面的發展。而這些蛋白質結構將提供他們分子功能的重要線索，此項研究在發展較快的美國、歐洲及日本已經有了初步的實驗成果<sup>(1,2)</sup>。

結構基因體計畫的目標蛋白質主要是以基因重組蛋白為主。而重組蛋白的生產過程則包括基因選殖、蛋白質表現以及蛋白質純化等三大部分。各自擁有相當的技術深度與發展，並且相當程度地影響後續的純化設計與技巧<sup>(3,4,5)</sup>，這是必須了解與注意的。

本文僅針對經過精心設計 (非一般性) 重組蛋白質所研發出來的最新一代自動化純化設備與其實際的應用作介紹，至於難度較高或是較複雜的系統將不在此主題內。

## 二、重組蛋白質純化

運用基因重組的技術，將特定基因以選殖 (cloning) 的方式嵌入表現載體 (expression vector) 內，此一載體通常具有易於調控的特性。之後再將帶有特定基因的載體送入可快速生長的菌體中，如大腸桿菌 (*Escherichia coli*)<sup>(5)</sup>。在菌體快速生長的同時，也大量生產表現載體上的基因所轉譯出之蛋白質 (如圖 1 所示)。一般而言，純度越高的蛋白質比較有機會形成晶體。

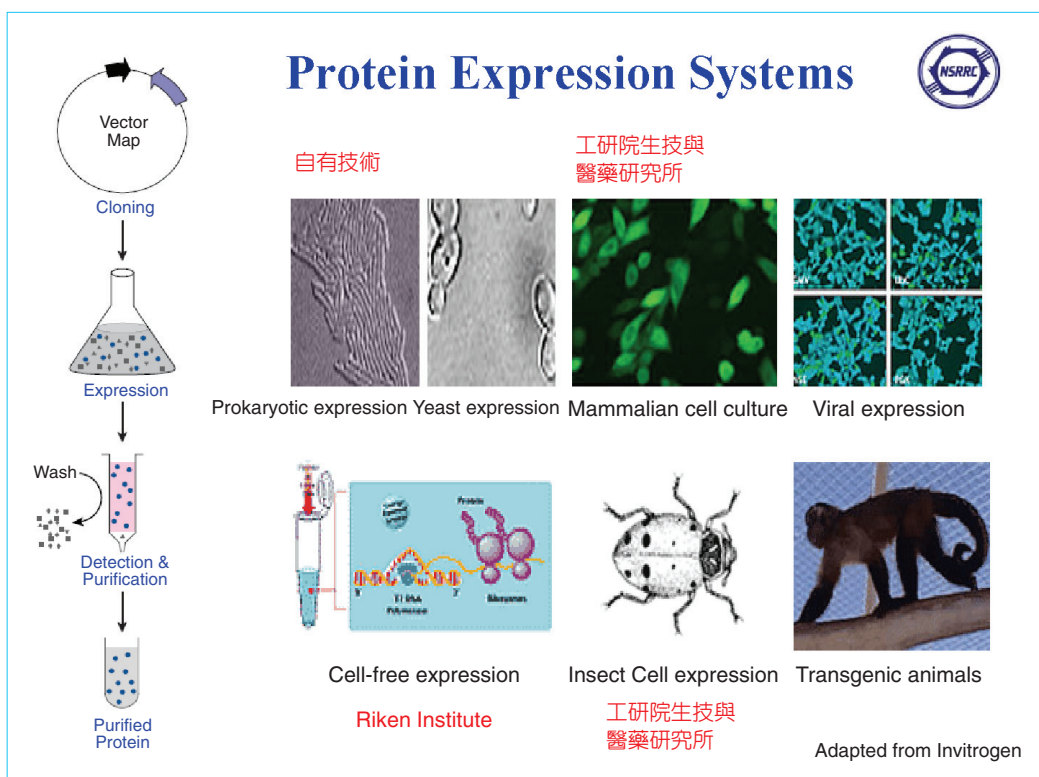


圖 1. 蛋白質異體表達步驟與宿主類型。

獲得蛋白質晶體結構的第一個瓶頸就是製備大量純化的蛋白質 (> 10 mg)，其濃度通常在 10 mg/mL 以上 (5–25 mg/mL)，並以此為基礎進行 5–250 個結晶條件的篩選，以長成符合 X 射線繞射品質的單晶。除此之外，大量純化的蛋白質也要因應冰凍晶體條件的建立以及製造合理含量的重金屬衍生蛋白以適合決定其結構。而這些必要的條件則使得蛋白質樣品的準備方法和步驟設下了許多的限制。關於這一點美國 Midwest Center for Structural Genomics (MCSG，參考網站 [www.mcsg.anl.gov](http://www.mcsg.anl.gov)) 為此發展了一套標準操作程序 (SOP)，讓蛋白質樣品適合以同步輻射 X 光繞射為基礎的自動化方式來分析蛋白質結構。而這些準則包括以下幾個要件：

- (1) 所有蛋白質都是以融合蛋白 (fusion protein) 的形式表現成單一型態，並且在其 N-terminal 前設計一可被酵素切除的親合標籤 (affinity tag)。
- (2) 以親和性層析管柱來分離純化此融合蛋白，並接著使用緩衝溶液置換之層析管柱 (buffer exchange chromatography)，以促進蛋白質的溶解度和有效的去除親合標籤。
- (3) 親合標籤必須以專一性高的蛋白酶 (此蛋白酶本身也帶有親合標籤) 來切除。經蛋白酶切除後的樣品再一次經由親和性層析管柱來分離純化，並接著使用緩衝溶液置換之層析管柱來置

換成理想的緩衝溶液。

- (4) 此緩衝溶液必須能與蛋白質濃縮和晶體培養方法相容。

一旦能夠符合上述原則並根據此 MCSG 的策略 (圖 2)，基本上就能夠得到高純度的蛋白質。而一般非經特意設計的重組蛋白質純化系統常會帶有許多不純物，例如背景蛋白、帶有親合標籤的蛋白酶、親合標籤、低分子量的污染蛋白，甚至於未被完全切除的融合蛋白。此 MCSG 標準作業步驟已經運用於 AKTA explorer 3D 和 AKTExpress 等自動化設備上，並成功地解決了 250 個來自於微生物的可溶性蛋白<sup>(1)</sup>。

### 三、設施與技術

自動化蛋白質純化設備要考慮的主要問題包括：(1) 多重純化步驟的信賴度、(2) 機械化程度、(3) 價格，以及 (4) 精簡人力。這方面的進展，以目前各大結構基因體中心為例，95% 以上都是採用 Amersham Biosciences (現已被 GE 併購) 的系統。其中 AKTExpress 的誕生，源自 MCSG 與 Amersham Biosciences 合作解決結構基因體計畫中，加速大量蛋白質自動純化效能所開發出來的機種。以當時的技術，Amersham Biosciences 以已開

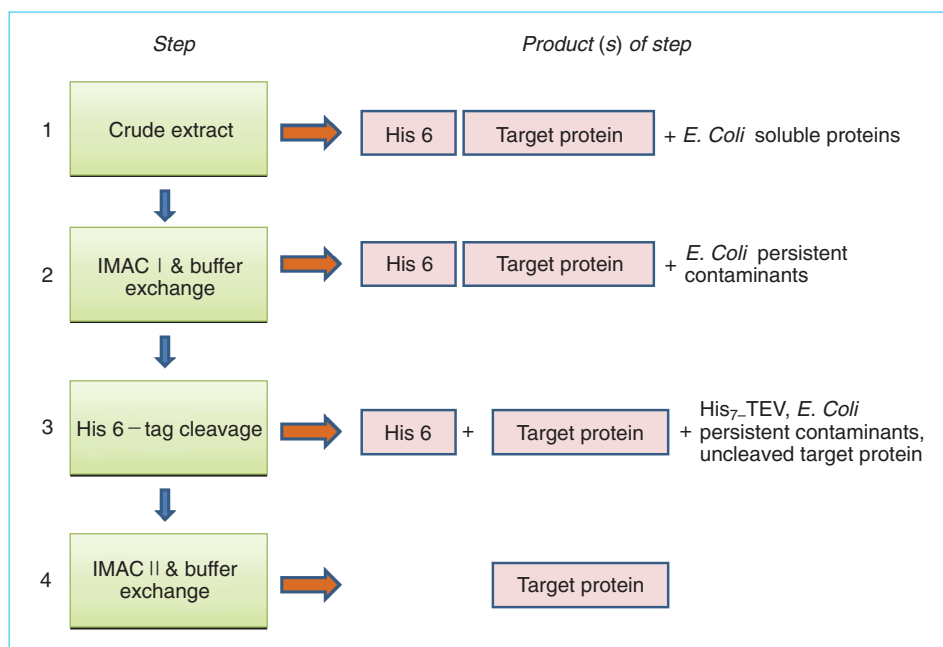

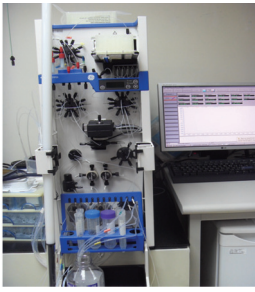
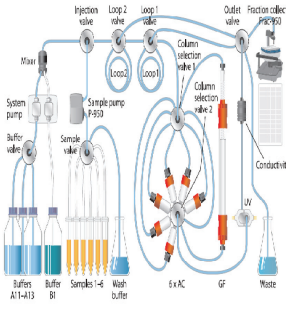
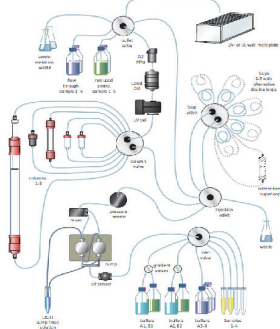
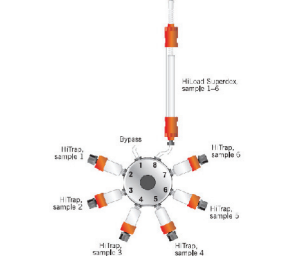
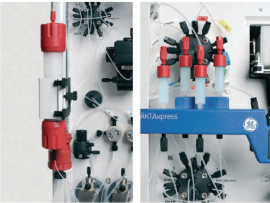


圖 2. MCSG 純化策略示意圖。

表 1. AKTA explorer 3D 以及 AKTExpress 之比較。

|           | 實機操作  |  | 官方說法   |
|-----------|---|--|--|
|           | AKTA 3D   | AKTExpress   |  |
| 發展現況      | 發展成熟之舊機種，價格昂貴<br>                          | 客製化研發之新產品，售價尚屬合理<br>      | 台灣已經賣得很便宜  |
| 系統流路      |   |                          | 流路邏輯精準   |
| 管柱配置      | 提供 8 個管柱槽，其中 1 個 bypass 用，其餘 7 個為管柱槽<br> | 提供 5 個管柱槽以及二個大尺寸管柱架<br> | 管柱配置多樣性  |
| 幫浦規格與效能   | 高精準度幫浦耐壓 25 MPa   | 高精準度幫浦耐壓 3 MPa   | <ul style="list-style-type: none"> <li>多段流速功能，可依不同實驗階段 (進樣、平衡、沖堤、流洗…) 做不同流速的設定</li> <li>流速調節功能，當實驗過程中瞬間過壓時，可自動降低流速減壓，避免產程停滯</li> </ul> |
| 純化方法      | 所有步驟可在最適化的條件下進行   | 同右   | <ul style="list-style-type: none"> <li>可自動配製不同 pH 及不同梯度鹽濃度的緩衝液</li> <li>監控平衡功能，可依照不同的訊號參數進行平衡認定，以達到最佳的純化狀態</li> </ul>                  |
| 再現性       | 純化結果再現性高、蛋白質樣品與空氣接觸機會小  | 同右   | 可進行連續串聯實驗達 99 次  |
| 軟體性能與作業環境 | 軟體提供多樣性編輯純化程式；多功能並同時處理多個樣品  | 同右   | <ul style="list-style-type: none"> <li>具有軟體精靈引導編輯純化程式，避免錯誤編輯</li> <li>內建所有預注管柱之資訊及實驗程式</li> <li>多作業環境，可同時進行實驗，程式編寫結果分析</li> </ul>      |

|          | 實機操作  |  | 官方說法  |
|----------|---|--|---|
|          | AKTA 3D   | AKTAxpress   |   |
| 樣品收集     | 傳統收集器佔據空間<br>  | 改良 96 孔盤空間利用佳<br> | 96 孔盤提供精密性樣品收集機構  |
| 樣品暫存槽    | 傳統的樣品暫存管<br>   | 重新設計且配置精簡<br>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>系統提供 5 個 10 mL 毛細管環</li> <li>Tefzel 材質製造</li> </ul>                              |
| 進樣槽裝置    | 7 個小口徑進樣管<br> | 8 個大口徑進樣管<br>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>電動七通閥用於樣品自動進樣</li> <li>三種不同的閥門位置 Load, Inject, Waste 可依照不同實驗階段的需求自動切換</li> </ul> |
| 擴充性      | 不可擴充  | 可擴充串聯至 12 組系統  | 擴充性佳  |
| 純化時間和樣品數 | 6 個蛋白質大約需 12–15 小時 (視樣品體積而定)  | 6 個蛋白質大約需 9 小時   | 4.5 小時內純化 8 個樣品   |

發機型 AKTA explorer 加上 3D kit 的方式，已經建構出多項且連續純化的策略。此系統導入幾項重要的功能 (表 1)。而同樣的设计邏輯，經過重新配置後，發展出另一串聯式機型 AKTAxpress。我們將兩者之間的差異以及實際操作後的優缺點整理如表 1 所示。

#### 四、純化方法與步驟

為了進一步揭露 MCSG 的方法，我們以表列的方式將其最精華也是最重要的步驟濃縮成表 2。

#### 五、結果與討論

有關 AKTAxpress 的實機測試，首先嘗試四個重組蛋白質樣品 (帶有 His-tag 的重組蛋白，分子量 53 kDa)，同時進行純化的效率與純度測試。所設計的純化步驟可分為兩個部分，分別是 (1) AC → DS (affinity → desalting)，(2) AC → DS → AC (affinity → desalting → affinity)，其結果如圖 3 所示。

若從純化的圖形來判斷，最後收集的樣品都能透過程式設定而正確的收集，但經由 SDS-PAGE 鑑定其純度時，大約只有 85–90% 的純度，因此我們改變策略，經過第二部分的设计 (AC → DS →

表 2. 以 MCSG 為純化策略之實驗步驟。

|      | Column                                      | Conditions   |                |  |   | Performed temp. | Machine          |
|------|---|--|----------------|--|---|-----------------|------------------|
|      |   | Binding  | Wash 1         | Wash 2                                     | Elute   |                 | AKTA explorer 3D |
| 步驟 1 | 5 mL HiTrap Ni <sup>2+</sup> -Chelating, HP | 1 mL/min Buffer A: 50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoethanol 5 % glycerol | 5 mL/min 10 CV | 5 mL/min 15 CV, Buffer A w/20 mM imidazole | 2 mL/min Buffer A w/250 mM imidazole (collected to loop) → Step 2 | 4 °C            |                  |
| 步驟 2 | HiPrep 26/20 desalting                      |  |                |  | 8 mL/min (fractionated collection) → Step 3                       | 4 °C            |                  |
| 步驟 3 | TEV protease                                | 50 mg sample/1mg protease, 16–24 hours → Step 4  |                |  |   | 4 °C            | Off-line         |
|      |   | Flow through   | Wash 1         | Wash 2                                     | Elute   |                 | AKTExpress       |
| 步驟 4 | 1 mL HiTrap Ni <sup>2+</sup> -Chelating, HP | 3 mL/min Buffer A Collected to loop → Step 5   |                |  |   | 22 °C           |                  |
| 步驟 5 | Sephadex G25 fine 26/20 XK desalting        | 20 mM Tris/HCl pH 7.5 500 mM NaCl 2 mM DTT   |                |  | 8 mL/min (fractionated collection) → Storage buffer               | 22 °C           |                  |

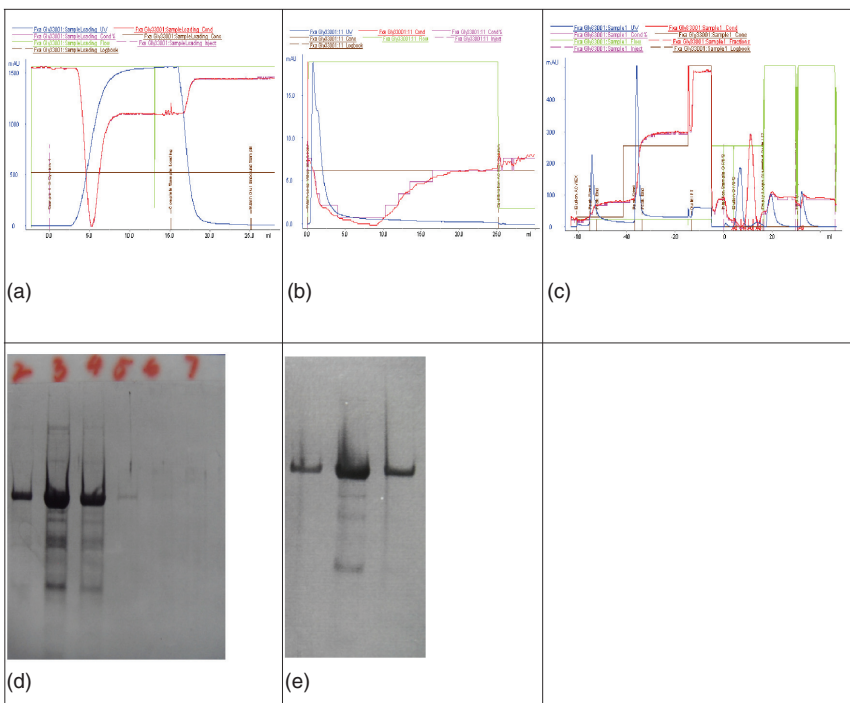


圖 3. 四個重組蛋白質樣品同時進行純化效率與純度鑑定之圖形。圖 (a) 至 (c) 為純化的圖形，分別代表：(a) sample loading，(b) wash，(c) elute、desalt，以及 collect 等動作。圖 (d) 和 (e) 則是純化樣品的 SDS-PAGE 電泳圖。圖上的數字代表收集的管數。

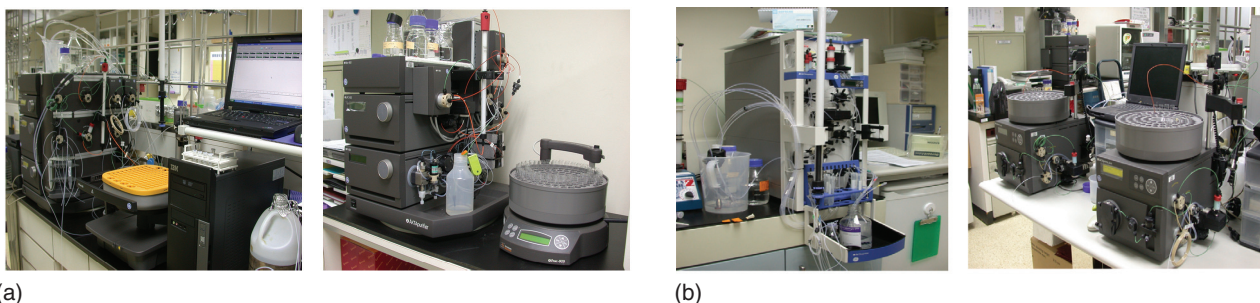


圖 4. 同步輻射研究中心建立大量蛋白質／酵素純化條件自動化篩選設施 (AKTA explorer，如圖 4(a) 左；AKTExpress，如圖 4(b) 左)，以供生命科學小組其他用戶人員進行蛋白質功能與結構研究之用；並完成第一階段的純化系統擴增 (如圖 4(a) 右) 及蛋白質濃縮系統整合 (如圖 4(b) 右)。

AC)，亦即經過二次 AC 純化，經由 SDS-PAGE 鑑定其純度，發現其純度可提高至 95% 以上。

初步證實此系統的穩定性、再現性以及效能。往後我們將進一步測試其不同的程式組合，並透過 on-column 進行重組蛋白質親合標籤切除技術，以期發揮完全自動化的要求。

## 六、結論

由於結構基因體學的發展，很多新的方法被發展出來，蛋白質大量純化和晶體的養成技術也逐漸進入機械化的階段，不論在速度、數量、樣品用量控制或是晶化技術都有顯著的進步。然而根據實驗統計的結果顯示，取得大量高純度且溶解度高的單一蛋白質 (monodisperse)，仍然是獲得晶體的最大瓶頸。對於蛋白質純化步驟的選擇以及選用機器的搭配，將決定取得高純度、高濃度的效率與速度。希望藉由本文的介紹，能夠提供有意發展或是進行結構基因體計畫的研究人員，對此設施有進一步的了解。

在此同時，為開拓並輔助生命科學相關之光束線前瞻領域之研究，同步輻射研究中心正積極地建構重組蛋白質表達實驗室以及全自動高效能、高通量蛋白質純化實驗室等實驗設施 (圖 4)，以提供用戶結合中心內 X 射線蛋白質晶體繞射實驗站 (BL13B、BL13C、SP12B2)、生物膜散射實驗站 (BL13A)、SRCD 光譜實驗站 (04B1) 以及小角度散射實驗站 (BL23A) 等對蛋白質樣品的需求 (圖 5)。

## 誌謝

筆者要感謝奇異亞洲醫療設備股份有限公司林恭仕先生和徐瑤蓉小姐提供 AKTA explorer 3D 及 AKTExpress 機器的詳細規格與資料，以及國家同步輻射研究中心生命科學小組陳俊榮副研究員、吳文桂副主任在重組蛋白質表達實驗室的建構上提供許多寶貴的意見與支持，同時感謝國家同步輻射研究中心的經費支持。

## 參考文獻

1. Y. Kim, I. Dementieva, M. Zhou, R. Wu, L. Lezondra, P. Quartey, G. Joachimiak, O. Korolev, H. Li, and A. Joachimiak, *J. Struct. Funct. Genomics*, **5**, 111 (2004).
2. Y. Peleg, J. Prilusky, G. Schreiber, I. Silman, T. Unger, and J. L. Sussman, *Acta Cryst.*, **D61**, 1364 (2005).
3. S. Yokoyama, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 39 (2003).
4. P. Listwan, J. Martin, B. Kobe, and N. Cowieson, *Australian Biochemist.*, **35**, 43 (2004).
5. N. S. Berrow, K. Büssow, B. Coutard, J. Diprose, M. Ekberg, G. E. Folkers, N. Levy, V. Lieu, R. J. Owens, Y. Peleg, C. Pinaglia, S. Quevillon-Cheruel, L. Salim, C. Scheich, R. Vincentlic, and D. Busssoh, *Acta Cryst.*, **D62**, 1218 (2006).

- 劉思恒先生為國立清華大學生命科學博士，現任國家同步輻射研究中心博士後研究員。
- 黃詩芳小姐為國立中興大學生命科學學士，現任國家同步輻射研究中心研究助理。
- 王聖宏先生為元培科技大學生物科技碩士，現任國家同步輻射研究中心專案助理。

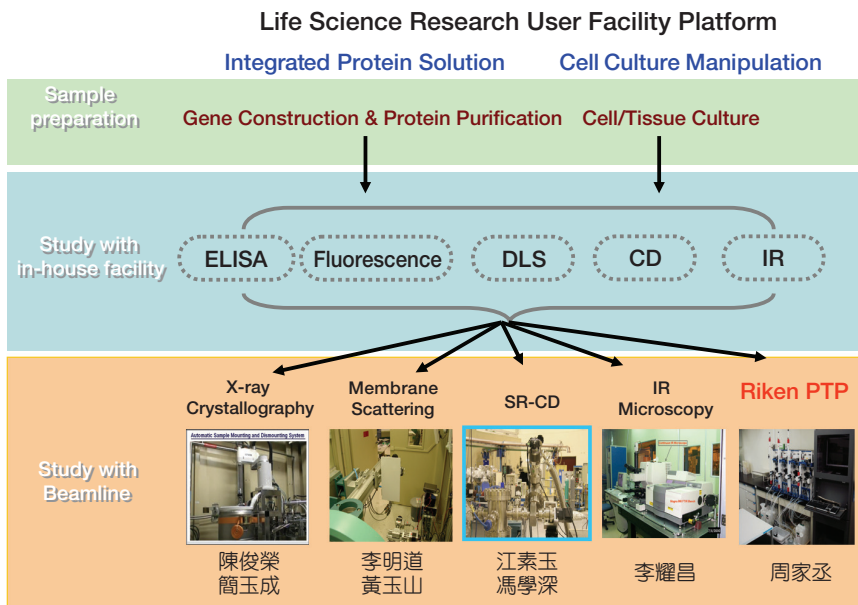


圖 5. 同步輻射生命科學研究設施應用架構圖。

- 潘冠宇先生為國立清華大學生命科學博士，現任國家同步輻射研究中心助工程師。
- 林易弘先生為國立清華大學生命科學博士，現任國家同步輻射研究中心助研究員。
- Szu-Heng Liu received his Ph.D. in life science from National Tsing Hua University. He is currently a postdoctoral fellow at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Shih-Fand Huang received her B.S. in life science from National Chung Hsing University. She is currently a research assistant at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Takun Yudaw received his M.S. in biotechnology from Yuanpei University. He is currently a supportive technician at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Kuan-Yeu Pan received his Ph.D. in life science from National Tsing Hua University. He is currently an assistant engineer at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Yi-Hung Lin received his Ph.D. in life science from National Tsing Hua University. He is currently an assistant researcher at National Synchrotron Radiation Research Center.