

## Functional Expression of Soluble Streptavidin in *Escherichia coli*

Seung Hee Han<sup>1</sup>, Hyeong Min Kim<sup>1</sup>, Myeong Woon Lim<sup>2</sup> and Jin-Kyoo Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>2</sup>JOONGKYEOM: ANTIBODY THERAPY INC., Shiwhagongdan 688, Seonggok-dong, Danwon-gu, Ansan 128-33, Gyeonggi-do, Korea

Received April 29, 2015 / Revised May 25, 2015 / Accepted May 27, 2015

Streptavidin, a protein produced by *Streptomyces avidinii*, strongly binds up to four molecules of vitamin H, d-biotin exhibiting the dissociation constant of about  $10^{-15}$  M. This strong binding affinity has been applied for detection and characterization of numerous biological molecules suggesting expression and purification of functional streptavidin should be very useful for the application of this streptavidin-biotin interaction. To express a soluble streptavidin in *Escherichia coli*, We synthesized streptavidin genes and cloned into pET-22b plasmid, which uses T7 RNA polymerase/T7 promoter expression systems containing pelB leader for secretion into periplasmic space and six polyhistidine tags at C-terminus for purification of expressed proteins. Although streptavidin is toxic to *Escherichia coli* due to strong biotin binding property, streptavidin was expressed very sufficiently in a range of 10-20 mg/ml. In SDS-PAGE, the size of purified protein was shown as 17 kDa in denatured condition (boiling) and 68 kDa in native condition (without boiling) suggesting tetramerization of monomeric subunit by non-covalent association. Further analysis by size-exclusion chromatography supported streptavidin's tetrameric structure as well. In addition, soluble streptavidin detected biotinylated proteins in westernblot indicating its functional activity to biotin. Taken these results together, it concluded that our simple expression system was able to show high yield, homotetrameric formation and biotin binding activity analogous to natural streptavidin.

**Key words :** pET-22b plasmid, streptavidin, size-exclusion chromatography, tetramerization, Westernblot

### 서 론

Streptavidin은 *Streptomyces avidinii*에서 발현되는 비당단백질(aglycosylated protein)로써 17 kDa 크기의 subunit가 비공유결합에 의해 tetramerization되어 68 kDa 크기를 나타내는 수용성 단백질이다[7]. Crystallography를 이용하여 streptavidin의 구조가 밝혀졌는데 즉, 4개의 같은 subunit로 구성되어지며 one subunit는 8 가닥의 anti-parallel β-barrel 형태를 띠며 biotin의 결합부위는 barrel의 중심부에 위치한다(Fig. 1). N-말단부위는 노출되어 있으며 biotin결합에 무관하다[3, 11, 18]. 그러므로 streptavidin은 vitamin H인 d-biotin 4분자에 결합할 수 있으며 즉, streptavidin 각 도메인에 한 분자의 d-biotin 결합부위를 가지고 있다(Fig. 1). Streptavidin의 d-biotin에 대한 결합은 해리상수(=Kd)값이  $10^{-15}$  M을 나타내는 강한 비공유결합이다. 이와 같은 streptavidin-biotin간의 강한 결합력은 일반적인 항원-항체반응의 결합력보다  $10^3\text{-}10^5$ 배 더

강한 결합을 나타내어 다양한 생체물질의 탐지 및 특징을 알아내는데 다양하게 이용되어지고 있다[2, 9]. 최근에 streptavidin은 *Escherichia coli* (*E. coli*)에서 단독으로 또는 다른 기능성 단백질 또는 single-chain 항체와 연결된 융합단백질형태로 발현되어지고 있다[5]. 따라서 이러한 융합단백질은 streptavidin의 biotin결합력을 이용하여 쉽게 탐지 및 정제 가능하다. 그러나 *E. coli*에서 발현되는 streptavidin은 주로 비수용성을 나타내어 복원(renaturation)을 거쳐 이용하였거나[13, 14, 16] 다른 숙주세포 즉 *Bacillus subtilis* [10] 또는 baculovirus expression system을 이용하여 발현시키기도 하였다[4]. 또한 *E. coli*에서 발현되는 streptavidin 단백질은 세포내의 endogenous biotin과 결합할 수 있으므로 숙주세포의 성장을 저해할 수 있어 *E. coli*에서의 streptavidin발현은 제한적이었다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위해 T7 promoter를 이용하고 N-말단에 pelB leader [8]을 첨가시켜 발현된 streptavidin단백질을 periplasmic space로 운반한 뒤 분비를 촉진시킴으로써 endogenous biotin에 결합할 가능성을 최소화하여 발현율을 향상시키는 연구를 수행하였으며 발현된 streptavidin은 C-말단에 융합되어있는 polyhistidine tag을 이용하여 정제한 후 정제된 단백질의 구조적 특징 및 biotin 결합력 등 기능검증 또한 수행하였다.

\*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3485, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : jkkim@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

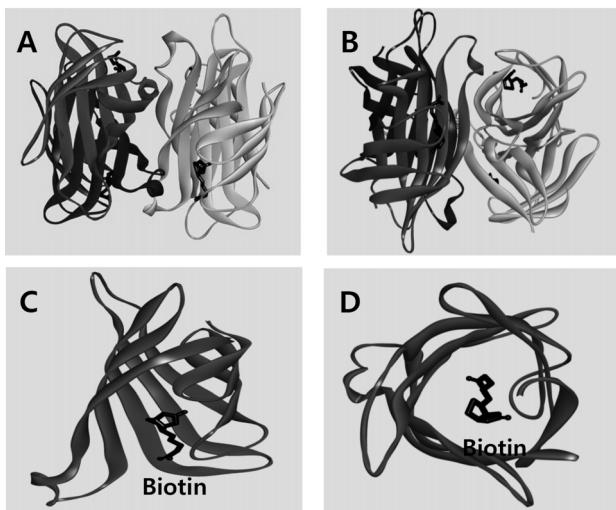


Fig. 1. Three-dimensional structure of streptavidin. (A) Side view of tetrameric streptavidin bound to four biotin, (B) Top view of tetrameric streptavidin bound to four biotin, (C) Side view of one streptavidin subunit bound to one biotin, (D) Top view of one streptavidin subunit bound to one biotin, \*Each subunit was colored as a different color.

## 재료 및 방법

### 세균 군주 및 배지

대장균 BL21 (DE3) Star (genotype: F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm mle131* (DE3), Invitrogen, USA)가 단백질 발현을 위해

사용되었으며 균 배양을 위한 배지는 2XTY (1% yeast extract, 1% tryptone, 0.5% NaCl, pH 7.0)를 사용하였다.

### Streptavidin 유전자의 증폭 및 클로닝

Streptavidin 유전자를 합성(Bioneer, Korea)한 후 클로닝에 필요한 *Nco* I (New England Biolab, USA) 과 *Bst* EII (New England Biolab, USA) DNA제한효소 절단부위를 갖는 streptavidin유전자를 증폭하기 위해 PCR을 수행하였다(Table 1 and Fig. 2). PCR 반응액은 5  $\mu$ l의 주형 DNA, 2.5  $\mu$ l의 STRNco-5' 프라이머, 2.5  $\mu$ l의 STRBst-3' 프라이머, 5  $\mu$ l의 2 mM dNTPs, 5  $\mu$ l의 10 X PCR reaction 완충용액(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatin), 1  $\mu$ l의 Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l), 29  $\mu$ l의 초순수 증류수(Mili-Q, USA)로 구성되었다[12]. PCR 증폭된 streptavidin 유전자는 전기영동된 후, gene cleaning과정을 수행하여 회수하였고, 회수한 streptavidin유전자는 10 unit의 *Nco* I과 *Bst* E II의 제한효소를 사용하여 발현벡터인 pET-22b (Novagen, USA)로 클로닝 하였다(Fig. 2). 제한효소반응조성은 10  $\mu$ l의 DNA, 4  $\mu$ l의 1 mg/ml BSA, 4  $\mu$ l 10x reaction 완충용액, 20  $\mu$ l의 초순수증류수로 구성되었다. 이 반응액은 1  $\mu$ l의 *Nco* I이 첨가되어 37°C에서 2시간 반응된 후, 1  $\mu$ l의 *Bst* EII를 첨가시켜 60°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 전기영동 후, gene cleaning과정을 거쳐 제한효소 처리 된 streptavidin유전자의 DNA를 회수하였다. 그리고 pET-22b 발현벡터와 ligation하여 대장균 BL21 (DE3) star를 형질 전환시켰다. 37°C에

Table 1. Primer lists for Streptavidin gene amplifications

Genes	Primer name	Base sequences
Streptavidin	STRNco-5' (39 mers)	5'-atc acc atg gcc gat ccg agc aaa gat agc aaa gcg cag-3'
	STRBst-3' (33 mers)	5'-gga tca ggt gac ctg ctg cac cgc atc cag cgg-3'

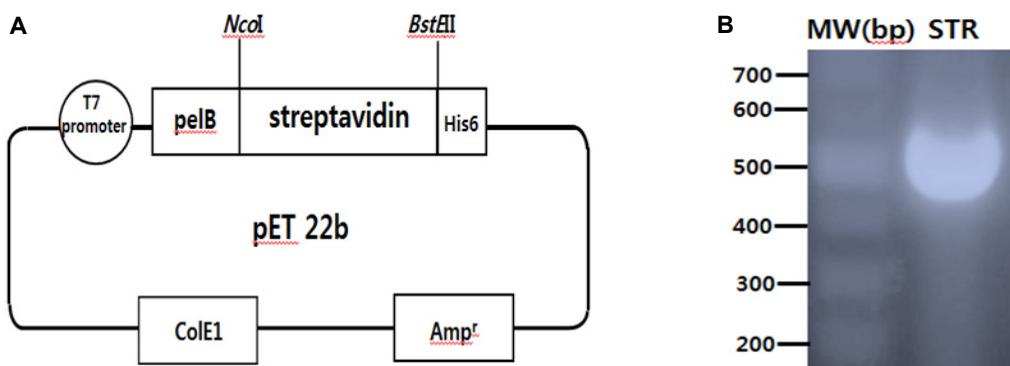


Fig. 2. Schematic outline for the construction of streptavidin gene in pET-22b vector. Streptavidin synthesized commercially (Bioneer, Korea) was amplified by using PCR with StrNco-5' primer and StrBst-3' primer (panel B). Final PCR product of streptavidin gene was digested with *Nco* I and *Bst* EII and cloned into pET-22b expression vector (panel A). T7 promoter is activated by IPTG for overexpression of streptavidin. PelB leader transports expressed proteins into periplasmic space for secretion. His6 is hexahistidine tag for detection and purification of expressed streptavidin proteins. pET-22b vector contains both ampicillin-resistance gene as a selection marker and ColE1 as a replication origin.

서 밤새 배양된 후 나타난 집락은 colony PCR [17]을 수행하여 클로닝된 발현 베터를 선별하고 DNA sequencing [19]으로 streptavidin유전자의 염기배열을 최종 확인하였다(Fig. 3).

### Streptavidin유전자 발현 및 정제

형질전환 된 BL21 (DE3) star세포를 100 µg/ml ampicillin, 1% glucose가 함유된 2XTY로 30°C, 밤새 진탕 배양되었다. 배양된 세포들은 3,000 g로 상온, 10분 동안 원심분리되어 수거되고, 2XTY로 재현탁되어 다시 원심분리되었다. 수거된 세포들은 배양액과 동일 부피의 100 µg/ml ampicillin (Sigma, USA), 0.25 mM IPTG (Sigma, USA)가 함유된 2XTY로 25°C, 5.5시간, 진탕 배양으로 단백질 합성을 유도한 후, 이를 세포는 3,000 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 수거된 세포에 차가운 TES 완충용액(0.5 M Sucrose, 0.1 mM EDTA and 200 mM Tris-Cl, pH 7.5)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 또한 TES buffer 처리 후 수거된 세포덩어리를 초음파 파쇄를 위한 buffer (0.1 M Tris-Cl, 0.5 M NaCl, pH 7.5)에 재현탁 한 후 초음파 파쇄하여 원심분리 후 상등액을 수거하였다. 수거된 단백질 샘플용액을 Ni<sup>+</sup>-NTA-agarose (Incopharm, Korea)에 결합시키고, Ni<sup>+</sup>-NTA-agarose 부피의 20배에 해당하는 TN 완충용액(0.1 M Tris-Cl, 0.5 M NaCl, pH 7.5 and pH 8.0)를 이용하여 세척하였다. 세척이 끝난 Ni<sup>+</sup>-NTA-agarose에 250 mM imidazole (Sigma, USA)이 섞여있는 PBS 완충용액을 처리하여 streptavidin단백질을 용출하였다. 그리고 용출된 streptavidin단백질 10 µl를 취하여 15% SDS-PAGE gel에 전기영동하고, 이를 0.25% coomassie brilliant blue R-25 용액을 이용하여 염색하여 정제된 streptavi-

din단백질의 존재 유무를 확인하였으며 Nanodrip spectroscopy (Allsheng, China)를 이용하여 농도를 결정하였다.

### Size-exclusion chromatography

정제한 streptavidin단백질의 경우 homotetramer를 형성하는 것은 비 공유결합에 의한 것이기 때문에 denaturation 조건인 SDS-PAGE를 통해서는 확실하게 결정할 수 없으므로 Superdex 200 increase 10/300 GL column (GE healthcare, USA)을 이용하고, 1X PBS buffer를 용출 완충용액으로, flow rate는 0.75 ml/min로 하여 size-exclusion chromatography (BioRad, USA)를 수행하여 정제된 streptavidin의 분자량 및 homotetramer 형성 유무를 결정하였다.

### 3D structure of streptavidin

단백질 3차구조 data bank인 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home>)에서 biotin과 결합된 streptavidin complex의 3차구조(PDB ID: 1STP)를 찾아내어 Discovery Studio 4.0 visualizer (Accelrys, USA) 프로그램을 이용하여 형상화하여 분석하였다(Fig. 1).

### SDS-PAGE

SDS-PAGE는 β-2 mercaptoethanol을 사용한 환원조건의 15% SDS-PAGE로 시행되었다[6]. Running gel은 10 ml의 30% acrylamide와 0.3% bis-acrylamide 혼합액, 2.5 ml의 3 M Tris-HCl pH 8.8, 7.5 ml의 dH<sub>2</sub>O, 200 µl의 10% SDS(sodium dodecyl sulfate), 25 µl의 TEMED, 25 µl의 25% ammonium persulfate로 제작되었다. Stacking gel은 1.7 µl의 30% acryl-

### A. DNA sequences of Streptavidin

atgaaataaccttgcctacggcagccgtggattgttattactcgctgcccaaccaggccatggcc(pelB leader)

gatccgagcaaagatagcaaagcgcagggtctgtcgccaagcggg cattaccggcacctggtaataatcatctggcagcacctttatt  
taaccgcgggagcagatggcgcttaactggcacatgaaagcgttgccaatcggaatctcgatgttcgtacccggccgttatgata  
gccccccacgcgaacgcgtggcagcggcacagctctggctggcgtcgcatggaaaaacaactatagtaatgctcacagcgcgacca  
ccaggagcgggcaatatgtgggtggggcggaggcgcgcataataaccctgggtctggctttaggtaccaccgaagcgaatgcctgg  
aaatccacgtgtggccatgataccattacaaaggaaaccggcgcgcagcaagcattgtatgcggcgaagaaaaccggcgtgaata  
atggcaatccgcgtggatgcggcgtcagcagcag(streptavidin gene: 477 bp)

gcggccgcactcgagcaccaccaccaccactga(polyhistidine)

### B. Amino acids sequences of Streptavidin

**MKYLLPTAAAGLLLAAQPAMA (pelB leader)**

**DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGYESAVGNAESRYVLTGRYDSA  
PATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLTSgtTEANAWKSTLV  
GHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ (streptavidin: 159 amino acids)**

**AAALEHHHHHH - (polyhistidine)**

Fig. 3. Sequence analysis of streptavidin. DNA sequences (panel A) and its deduced amino acid sequences (panel B) were shown. In panel A, The start codon and stop codon were underlined . In panel B, secondary structures were indicated as different colors (coil: black; sheet: blue; helix: red). Underlined amino acid residues are involved in biotin binding.

amide와 0.3% bis-acrylamide 혼합액, 1.25 μl의 1 M Tris-HCl pH 6.8, 7 ml의 dH<sub>2</sub>O, 100 μl의 10% SDS, 15 μl의 TEMED, 15 μl의 25% ammonium persulfate로 구성되었다. SDS-PAGE를 위해 단백질 시료 20 μl와 2 X SDS gel-loading buffer 20 μl를 혼합하여 100°C에서 5분간 가열하거나 또는 100°C에서 5분간 가열하지 않은 2종류의 streptavidin 단백질 20 μl를 분석에 사용하였다. 2 X SDS gel-loading buffer는 10% β-2 mercaptoethanol, 10% sucrose, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.5% SDS, 0.02% bromophenol blue로 구성되었다. SDS-PAGE running buffer는 2.85% glycine, 0.6% Tris base, 0.4% SDS로 구성되었다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie blue 염색용액(10% glacial acetic acid, 0.02% coomassie blue R-250)으로 염색한 후, 탈색액(10% glacial acetic acid, 10% methanol)을 처리하여 발현된 단백질의 존재유무 및 특징을 분석하였다.

### Western blot

Biotin의 coupling된 bovine serum albumin (BSA) 10 μl를 전기영동방법으로 SDS-PAGE하고 nitrocellulose membrane (Millipore, USA)으로 transfer하였다. 그리고 transfer된 membrane을 2%(w/v) 탈지우유를 포함한 PBS-T (PBS, 0.02% Tween 20) 완충용액을 이용하여 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음, PBS-T로 2회 세척하였다. BSA에 coupling된 biotin을 탈지하는지를 분석하기 위해 정제된 streptavidin 단백질을 일차항체로 사용하여 1시간 동안 반응시켰다. 이때 최적 결합 환경을 알아내기 위해 KCl 완충용액(300 mM KCl, 40 mM Tris, 5 mM 2-mercaptopethanol, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) NaCl 완충용액(20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.001% Triton X-100), phosphate 완충용액(16% of 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 84% of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5), phosphate 완충용액(92% of 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8% of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 5.8) 등 4종류의 완충용액을 사용하였다. 다시 3회 PBS-T로 세척한 후 2차 항체로 생쥐의 anti-polyhistidine-HRPO (horseradish peroxidase) (Santa Cruz, USA)를 blocking 완충용액에 1:1,000으로 희석하여 사용하였다. 최종적으로 PBS-T washing 완충용액으로 5회 세척한 다음 chemiluminescent 기질(Advasta, USA)을 이용해 X-ray 필름(Fuji, Japan)을 감광시켜 streptavidin의 biotin에 대한 결합유무를 확인하였다.

### 결과

#### Streptavidin의 발현 및 정제

합성된 streptavidin의 유전자를 주형으로 하여 PCR을 실시하여 증폭된 PCR산물(Fig. 2B and Fig. 3A)을 Nco I 및 Bst EII의 두 제한효소를 이용하여 pET-22b 발현벡터로 클로닝하였다(Fig. 2A). 완성된 발현벡터는 5' upstream에 T7 promoter

가 존재하는데 즉, 숙주세포로 이용된 BL21 (DE3) Star의 T7 RNA polymerase가 IPTG에 의해 유도되어 T7 promoter를 활성화시켜 streptavidin의 단백질 발현을 촉진시켰다(Fig. 2).

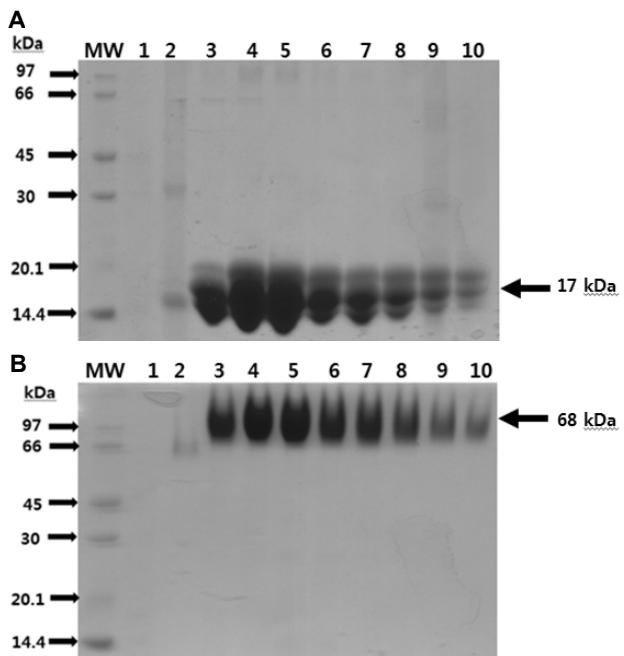


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of streptavidin expressed in *E. coli*. Expressed streptavidin protein was denatured with boiling or without boiling. Each sample was loaded onto 15% SDS-PAGE gels. Monomeric streptavidin with boiling was migrated as 17 kDa (panel A). Streptavidin without boiling was migrated as 68 kDa suggesting tetramerization of monomeric streptavidin by non-covalent association (panel B).

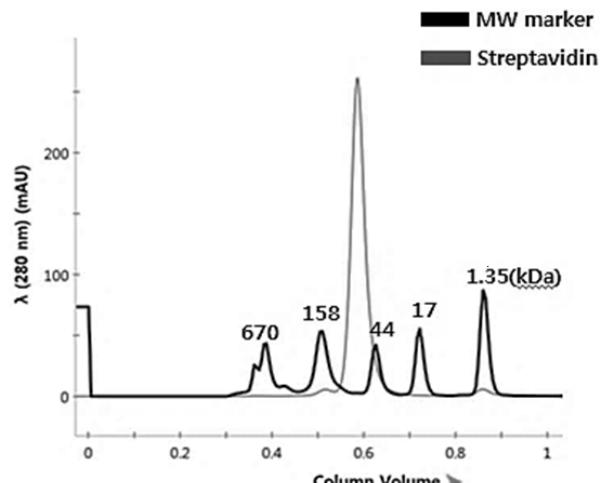


Fig. 5. Gel filtration of streptavidin expressed in *E. coli*. Purified streptavidin was loaded into Superdex-200 size exclusion chromatography column. The streptavidin was eluted as a 68 kDa suggesting tetramerization of monomer by non-covalent association.

특히 N-말단에 pelB leader sequences를 포함시킴으로써 첫째, 발현된 streptavidin을 *E. coli*의 periplasmic space로 운반하여 분비를 촉진하게 하였으며 둘째, 발현된 streptavidin 단백질의 periplasmic space로의 이동으로 숙주세포 세포질 내에서의 endogenous biotin과 결합을 최소화하여 숙주세포의 대사작용에 방해가 되지 않도록 하였으며 셋째, 세포질내의 streptavidin은 N-말단에 pelB leader sequence가 융합된 형태로 존재하여 최적의 3차 구조를 나타내지 못하므로 endogenous biotin과의 결합이 일어나지 않으며[14] periplasmic space에서 signal peptidase에 의해 leader sequence가 제거되어진 streptavidin만이 최적의 3차구조를 갖게 하여 biotin과 결합을 용이하게 하였다. 결과적으로 숙주세포의 성장에는 영향을 주지 않으면서 streptavidin을 발현시킬 수 있는 시스템을 구축하였다. 한편 C-말단에는 polyhistidine tag을 포함하게 하여 Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose affinity chromatography에 의한 정제를 가능하게 하였다(Fig. 2A).

#### 정제된 streptavidin의 구조적 특징 및 기능검증

정제된 streptavidin 단백질을 15% SDS-PAGE에서 분석한 결과 10 mg/ml ~ 20 mg/ml등의 상당히 좋은 회수율을 나타내었으며 특히 boiling 조건에서는 약 17 kDa의 monomer의 분자량을 나타내었으며(Fig. 3A and Fig. 4A) boiling을 하지 않은 경우 약 68 kDa의 tetramer의 분자량을 나타내었다(Fig.

4B). SDS-PAGE의 결과로 정제된 streptavidin은 수용성 단백질형태로 잘 정제되었으며 이때 sample loading buffer에 reducing agent인 β-mercaptoethanol을 첨가하여 disulfide bond에 의한 tetramerization을 분석하였으나 Fig. 4A의 boiling 조건에서는 monomer를 형성하고 Fig. 4B의 boiling하지 않은 조건에서는 β-mercaptoethanol을 첨가하였음에도 tetramer을 형성하는 것으로 보아 streptavidin의 tetramer 형성은 disulfide bond에 의해 형성되는 것이 아니라 비공유결합에 의해 tetramer가 형성됨을 확인할 수 있었다. 즉, 동일한 1개의 subunit가 비공유결합에 의해 homotetramer를 형성함을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 size-exclusion chromatography 분석에서도 68 kDa의 single peak를 나타내어 Fig. 4의 결과와 일치함을 나타내었으며 정제된 streptavidin 단백질은 압도적으로 tetramer 형태를 유지하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

정제된 streptavidin의 기능을 검증하기 위해 bovine serum albumin (BSA)을 biotinylation시키고 biotinylation된 BSA를 nitrocellulose membrane에 전기영동방법으로 흡착시킨 다음 정제된 streptavidin을 일차 항체로, anti-polyhistidine-HRPO 항체를 이차항체로 반응시켜 streptavidin의 biotin 결합력을 분석하였다. 이때 biotin 결합의 최적화를 시키기 위해 pH, salt 종류 및 detergent 농도를 달리하는 4종류의 다른 biotin 결합 완충용액을 사용하였는데, 그 결과 KCl, pH 7.5의 완충용액에서 streptavidin과 BSA의 biotin에 대한 결합력이 가장 높게

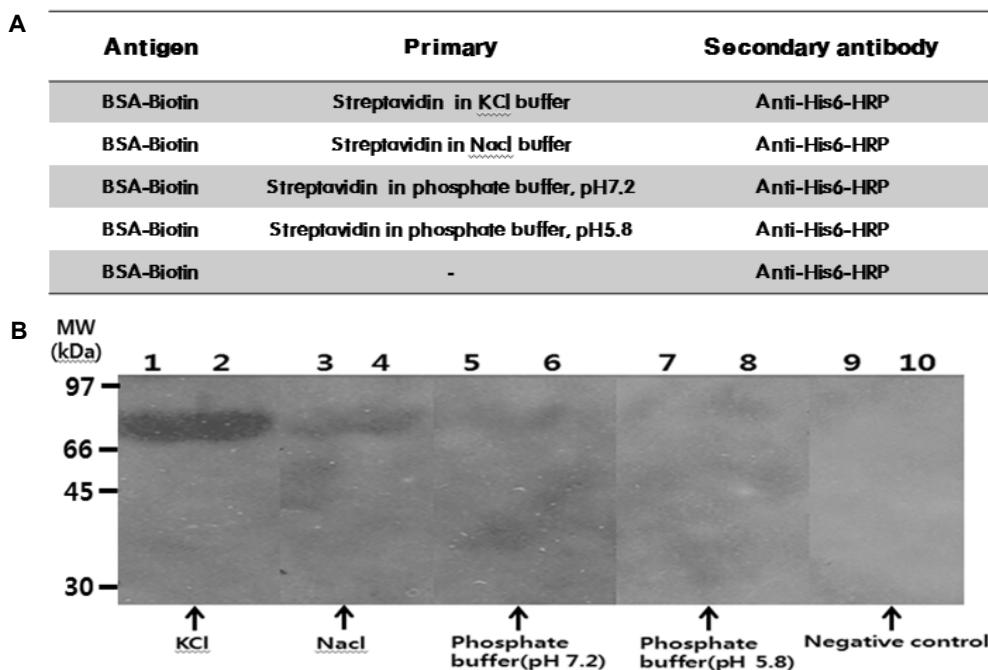


Fig. 6. Westernblot analysis of streptavidin expressed in *E. coli*. Biotinylated bovine serum albumin was coated onto nitrocellulose membrane. Purified streptavidins dissolved in four different buffer and negative control were added as a primary antibody and were followed by the addition of anti-polyhistidine - HRPO(horseradish peroxidase) as a secondary antibody (panel A). Chemiluminescent reagent detected binding between streptavidin and biotin coupled to bovine serum albumin in KCl, pH 7.5 buffer (panel B).

나타났다(Fig. 6B). 따라서 정제된 streptavidin 단백질은 *Streptomyces avidinii*에서 생성되는 streptavidin과 같은 tetramer 구조를 갖고 biotin에 결합하는 기능을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

이상의 결과를 종합해보면 streptavidin 유전자는 *E. coli*에서 성공적으로 발현 및 정제되어 높은 회수율을 나타내었으며 균일한 homotetramer 형태로 biotin에 대한 결합력을 나타내었다. 본 연구를 통해 얻어진 기능성 streptavidin 단백질은 biotin에 대한 높은 결합력을 나타내므로 앞으로 affinity chromatography로 활용하면 biotinylation된 단백질의 정제가 가능하며 또한 ELISA, Western blot 및 immunocytochemistry 등에서 단백질 상호결합을 탐지하는 목적으로도 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 streptavidin의 높은 발현율은 *E. coli* 발현 시스템으로 많이 이용되는 glutathione-S-transferase 발현 시스템[15] 또는 maltose binding protein [1]을 이용한 발현 시스템과 같이 융합단백질 형태의 발현 시스템으로 이용되어 질 수 있을 것이다. Streptavidin의 tetramer를 형성하는 구조적 특징은 융합되는 유용단백질의 tetramer 형성을 유도시켜 구조적 안정도 및 기능을 향상시킬 수 있을 것이다. 이와 같이 streptavidin은 다양하게 응용 가능 하므로 본 연구에서 수행한 biotin에 결합력을 나타내는 수용성 streptavidin 단백질의 대량생산은 앞으로 활용도가 클 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 창원대학교 교내 공모 과제 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

- di Guana, C., Lib, P., Riggisa, P. D. and Inouyeb, H. 1988. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30.
- Diamandis, E. P. and Christopoulos, T. K. 1991. The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin. Chem.* **37**, 625-636.
- Hendrickson, W. A., Pähler, A., Smith, J. L., Satow, Y., Merritt, E. A. and Phizackerley, R. P. 1989. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2190-2194.
- Karp, M., Lindqvist, C., Nissinen, R., Wahlbeck, S., Akerman, K. and Oker-Blom, C. 1996. Identification of biotinylated molecules using a baculovirus-expressed luciferase-streptavidin fusion protein. *BioTechniques* **20**, 452-456, 458-459.
- Kipriyanov, S. M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S. and Dübel, S. 1996. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment - core streptavidin fusion. *Protein Eng.* **9**, 203-211.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laitinen, O., Hytönen, V., Nordlund, H. and Kulomaa, M. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2992-3017.
- Lei, S. P., Lin, H., Wang, S. S., Callaway, J. and Wilcox, G. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J. bacteriol.* **169**, 4379-4383.
- Lindqvist, Y. and Schneider, G. 1996. Protein-biotin interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 798-803.
- Nagarajan, V., Ramaley, R., Albertson, H. and Chen, M. 1993. Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3894-3898.
- Pähler, A., Hendrickson, W., Kolks, M., Argarana, C. and Cantor, C. 1987. Characterization and crystallization of core streptavidin. *J. Biol. Chem.* **262**, 13933-13937.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sano, T. and Cantor, C. R. 1995. Intersubunit contacts made by tryptophan 120 with biotin are essential for both strong biotin binding and biotin-induced tighter subunit association of streptavidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3180-3184.
- Sano, T. and Cantor, C. R. 1990. Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 142-146.
- Takayama, S., Xie, Z. and Reed, J. C. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 781-786.
- Thompson, L. D. and Weber, P. C. 1993. Construction and expression of a synthetic streptavidin-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **136**, 243-246.
- Ward, A. C. 1992. Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. *BioTechniques* **13**, 350-350.
- Weber, P. C., Cox, M. J., Salemme, F. R. and Ohlendorf, D. H. 1987. Crystallographic data for *Streptomyces avidinii* streptavidin. *J. Biol. Chem.* **262**, 12728-12729.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J. and Ansorge, W. 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* **233**, 432-436.

---

## 초록 : 수용성 streptavidin의 *Escherichia coli*에서 기능적 발현

한승희<sup>1</sup> · 김형민<sup>1</sup> · 임명운<sup>2</sup> · 김진규<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>창원대학교 미생물학과, <sup>2</sup>(주)중겸 생명공학연구소)

*Streptomyces avidinii*에서 발현되는 Streptavidin은 vitamin H인 d-biotin 4분자에 결합하며 해리상수(Kd)가  $10^{-15}$  M를 나타내는 아주 강한 비공유결합이다. 이러한 streptavidin과 biotin 상호간의 강한 결합력을 수많은 생물체 분자들의 탐지 및 특징을 연구하는데 응용되어져 왔으므로 *Escherichia coli*에서 수용성 streptavidin의 기능적 발현에 대한 연구는 매우 유용하다. 즉 *Escherichia coli*에서 streptavidin을 발현시키기 위해 streptavidin유전자를 T7 RNA polymerase/T7 promoter를 이용하는 pET-22b 플라스미드로 클로닝하였다. 또한 N-말단에 pelB leader를 포함하여 발현된 streptavidin의 periplasmic space로 운반하여 수용성 단백질형태의 분비를 촉진하였으며 C-말단에는 6개의 polyhistidine tags를 두어 정제하는데 사용되었다. 정제된 streptavidin단백질은 10-20 mg/ml의 높은 회수율을 나타내었으며 SDS-PAGE에서 가열하는 경우 변성되어 17 kD인 monomer 형태를, 가열하지 않는 경우에는 68 kDa으로 원래의 tetramer 형태를 나타내었다. 따라서 streptavidin의 tetramer 구조는 비공유결합에 의해 이루어짐을 알 수 있었다. Size-exclusion chromatography에 의한 streptavidin의 구조 역시 tetramer를 재확인할 수 있었다. 정제된 수용성 streptavidin은 Westernblot 실험에서 biotinylation된 단백질을 탐지하였으며 이 결과는 정제된 streptavidin이 biotin에 결합하는 기능이 존재함을 나타내었다. 이상의 모든 결과를 종합해보면 본 연구에서 구축된 발현시스템을 통하여 발현된 streptavidin은 높은 회수율을 나타내어 대량생산이 가능하였으며 자연상태의 streptavidin과 동일한 homotetramer를 형성하고 biotin에 결합할 수 있는 기능을 나타내었다.