

原著論文

新規研究ツール開発のためのスト렙トアビジン 単量体の調製と高機能化

平岡 修¹⁾*, 寺井 琢也²⁾, 河野 萌²⁾, 杉山 成³⁾

¹⁾ 就実大学薬学部生体分子化学研究室, ²⁾ 東京大学大学院薬学系研究科,

³⁾ 大阪大学大学院理学研究科

Genetically engineered monomeric streptavidin for designing a new detection systems based on monovalent biotin interaction

Osamu Hiraoka¹⁾*, Takuya Terai²⁾, Moe Kohno²⁾, Shigeru Sugiyama³⁾

¹⁾ Department of Biomolecular Chemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

²⁾ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

³⁾ Graduate School of Science, Osaka University

(Received 19 October 2015; accepted 6 November 2015)

Abstract: Avidin and streptavidin are proteins widely utilized in a number of applications in life science, ranging from purification and labeling techniques to diagnostics, and from targeted drug delivery to nanotechnology. Although (avidin) streptavidin-biotin interaction is universally used in biology, it is not suitable for every application. For example, the dissociation constant of the order of 10^{-15} M is too strong for affinity purification and very harsh conditions are required to elute the biotin-conjugated molecules, which sometimes leads to alteration of the native function or conformation of the targets. Another potential problem with native (avidin) streptavidin-biotin complex is the multivalency, which might lead to aggregation or functional interference with molecules of interest. To address this issue, monomeric (avidin) streptavidin was developed by site-directed mutation. In this paper, we describe functional expression and characterization of the engineered monomeric streptavidin, 10 mutein (T76R, V125R, V55T, L109T, A72K, G74E, A89R, T91E, S93R, and W120A) using *E. coli* system. The 10 mutein was obtained about 1.5 mg from 1 liter culture as soluble form (not as inclusion body), and can selectively bind to biotin ($K_d = 3.8 \mu\text{M}$), and the thermostability ($T_m = 40.5 \text{ }^\circ\text{C}$) was higher than $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for applying to the mammalian cell culture. These results suggested that our recombinant 10 mutein might be candidate for application to construct the new detection systems of biomolecules.

Keywords : Streptavidin monomer; mutein, recombinant protein expression; fusion tag; *E. coli*

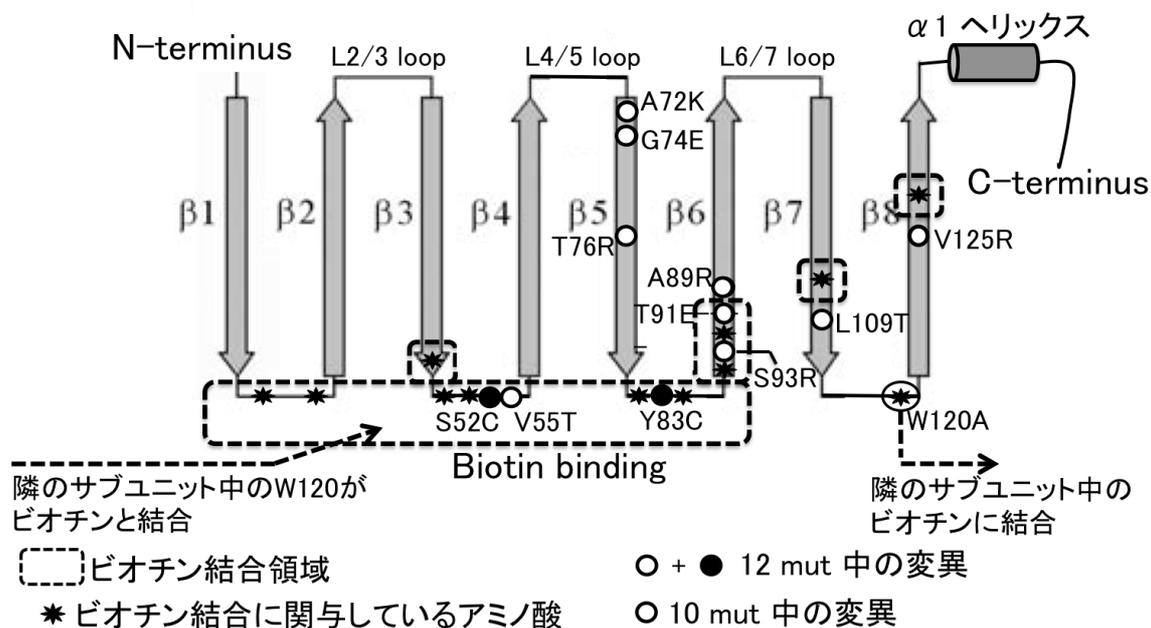


Fig.1 Topology of streptavidin 10 mut or 12 mut form

【緒言】

ストレプトアビジンはストレプトマイセス属の *Streptomyces Avidinii* によって産生される分子量 53 kDa の四量体タンパク質で、単量体当たり1分子のビオチンと特異的に結合する。一般的にストレプトアビジンとビオチンとの結合解離定数 (Kd) は $10^{-13} \sim 10^{-15}$ M にも及び、自然界に存在する非共有結合の中では、最も強い部類の結合である¹⁾。

現在、この結合の強さ及び特異性の高さを利用した各種生体分子検出システムが広く利用されており、(ストレプト)アビジン-ビオチン複合体は特定分子の検出や固定化、単離などに広く用いられている^{2), 3), 4)}。しかし、強い結合力による事実上不可逆的な結合であるため、精製に用いる場合にはカラムからの溶出が困難であり、遺伝子組換えタンパク質高発現系におけるタグとしての応用が難しく、四量体 (ストレプト)アビジン

に対しビオチンが何分子結合しているかがわからないため、定量的な解析が必要な際には不向きである。さらに、四量体形成に起因した立体障害のために、各種検出反応における感度低下の問題や、結合が強すぎて、化合物ライブラリーを利用した新規骨格を有する (ストレプト)アビジン結合分子の探索や立体構造情報に基づいた結合分子の誘導体化 (*In silico drug design*) 等には適さないことなど、研究ツールとしては使い勝手の悪さが指摘されている^{5), 6)}。そこで、これらの問題を解決するためにストレプトアビジンに変異を導入して適度な親和性と安定性を有する単量体の創製研究がこれまでにいくつか報告されてきた^{7), 8), 9)}。しかしながら、いずれの研究においても単量体の作成には成功したが、熱安定性、ビオチンに対する親和性、そして単量体の発現量や発現状況 (可溶性画分 または インクリュージョンボディ) などに問題があり、使い勝手の良い研究

ツールとして開発できるものはなかった.そのため,今回我々は,ストレプトアビジンに変異を導入し,新規研究ツールとして開発できるような適度の親和性と高い安定性を有する可溶性単量体ストレプトアビジンの創製に着手した.

その手がかりとして, Lim らが報告しているストレプトアビジンに12箇所の変異を導入した単量体, 12 mutein¹⁰⁾(以後12 mutと呼ぶ)に着目した(Fig.1). 論文によると12 mutは熱安定性($T_m = 46.7^\circ\text{C}$)が高く,適度な解離定数を持つ単量体であるが,リガンド結合領域内にあるS52とY83にシステインを導入してジスルフィド(SS)結合を形成させてリガンド結合領域の安定化,すなわち構造変化を起こしにくくさせているため,新しい母核を有する新規リガンドの検索が難しくなると予想された.そこで,このSS結合は導入せず,各サブユニット間の結合に関係している10箇所のアミノ酸のみに変異を導入した10 mutein(以後10 mutと呼ぶ)の発現を試みることにした.

Fig.1に示すように,10 mutは,76番目のトレオニン及び125番目のバリンをアルギニンに,55番目のバリン及び109番目のロイシンをトレオニンに変換し,さらに74番目のグリシン及び91番目のトレオニンをグルタミン酸に,89番目のアラニン及び93番目のセリンをアルギニンに,72番目のアラニンをリシンに,そして120番目のトリプトファンをアラニンに変換することにより,サブユニット間の接触面の親水性を向上させた変異体である.

今回,10 mutの大腸菌を用いた高発現及びその特性解析を行い,新規研究ツール開発への有用性を評価したのでここに報告する.

【方法】

発現プラスミドの構築

大腸菌を用いた単量体ストレプトアビジンの高発現には, pCold IVTM Cold Shock Protein Expression System (TAKARA) を使用し,低温下(15°C)で発現させた. ストレプトアビジンの全アミノ酸配列からアミノ末端のシグナル配列を除去した160アミノ酸(アミノ酸番号:24-183)に相当するDNAの5'末端に制限酵素,*Nde*I認識配列,そして3'末端に制限酵素,*Xho*I認識配列を挿入した人工遺伝子を合成し, pCold-IVのマルチクローニング部位に挿入した発現ベクター, pCold-IV-strept-10mutを構築した.

発現および精製条件

pCold-IV-strept-10mut DNAを発現用大腸菌である*E.coli* Lemo21(DE3)株(NEB社製)に形質転換し,以下に示す手順により目的タンパク質の大量発現及び完全精製を行った. Lemo21株を用いた発現システムは, T7 RNAポリメラーゼの活性を調節することにより,目的タンパク質の発現が人為的に調節できるシステムである.

pCold IV-strept-10mut/*E.coli* Lemo21(DE3) を抗生物質含有LB培地中で 37°C にて培養を開始し,濁度, O.D.600が1.0付近になるまで培養後,氷上で完全に冷却した.IPTG(終濃度 1mM)及びBiotin(終濃度20 μM)を添加して, 15°C で20時間培養後, BugBuster^R Protein Extraction Reagent (Novagen製)を用いて細胞内可溶性画分を調製した.次に, Biotin-agarose (Vector製)カラム(EDTA-free protease inhibitors cocktail (Roche), 0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化)に吸着させた後, 5 mM Biotin /TBS で溶出させ,最後に, Gel-filtration chromatography (SuperdexTM 75 HR10/30 10mm ID x 300mm L (GE製), 0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化)により完全精製を行った.

**超高感度等温滴定型マイクロカロリメトリー
(Isothermal Titration Calorimetry : ITC) 法による
ビオチンに対する親和性の測定**

超高感度等温滴定型マイクロカロリメトリー装置, iTC200 (GE Healthcare) 内のサンプルセルにセットされた140 μ Mの10 mut溶液に対し, 滴定シリンジ内にセットされた1.4 mMのビオチン溶液を25 $^{\circ}$ Cで数 μ lずつ滴下後, サンプルセル中の温度変化を測定して10 mutのビオチンに対するKd 値を算出した.

**PTS (Protein Thermal Shift) 法によるストレプト
アビジン単量体の熱安定性の測定**

10 mut (8 μ M), ビオチン (50 μ M), そして Protein Thermal ShiftTM Dye (Life Technologies) を 0.1 M sodium-phosphate buffer (pH 7.4)/0.15 M NaCl 中で混合し, StepOneTM Real-Time PCR 装置 (Applied Biosystems) を用いて解析した. 25 $^{\circ}$ Cから 99 $^{\circ}$ Cの温度範囲を 0.05 $^{\circ}$ C/sec の速さで変化させたときの蛍光強度の変化を測定し, 10 mut の熱安定性を融解温度 (Tm) の値で評価した.

SDS-PAGE 法による四次構造の解析

四次構造の解析は, SDS-PAGE 法により確認した. 一般に, ストレプトアビジン四量体は, 還元下の SDS-PAGE において熱処理を行うと単量体として検出されるが, 行わない場合には四量体として検出されることが知られている. 10 mut においても同様の手法により四次構造の解析を行った.

β ME 存在下において 100 $^{\circ}$ C, 5 分の熱処理を行った場合と, 行わない場合の 10 mut を 10%から 20%の濃度勾配のかかった SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (SDS-PAGE) を行い, クマシーブルー染色により検出を行った.

【結果】

SDS-PAGE解析により, 各精製ステップにおける発現産物 (10 mut) の精製度の状態を解析した (Fig.2).

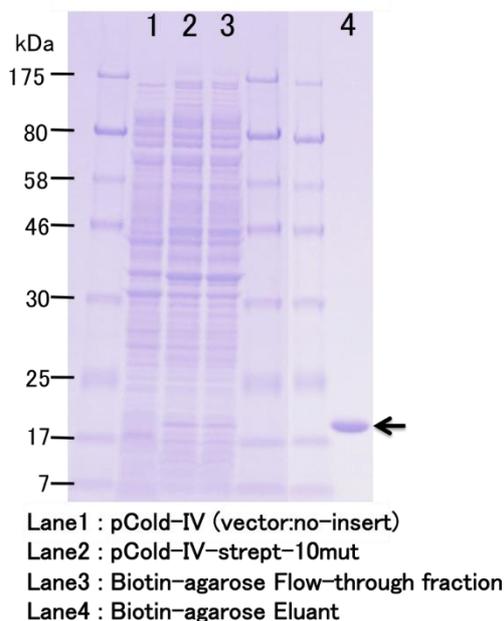


Fig.2 10-20% SDS-PAGE (+ β ME, boiled)

発現誘導後の菌体から可溶性画分を回収した後, Biotin-agaroseカラムに添加してアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ, Fig.2, Lane4に示すように, 10 mutが矢印の位置にのみ観察され, ほぼ単一にまで精製されたことがわかった.

この結果から, 発現産物はインクリュージョンボディーの状態ではなく, 可溶性画分に溶けた状態で存在しており, 大腸菌1リットル培養あたり, 約1.5 mgの完全精製された発現産物が得られることがわかった.ただし, Lane3において, ビオチンカラムに未吸着の10 mutのバンドが観察され, 約40%程度のリガンド結合活性を持たない可溶性の10 mutが存在していることがわかった.

次に, 得られた発現産物について, ゲルろ過HPLCにより分子の存在状態を調べた結果を Fig.3に示した. 市販品である野生型のストレプ

トアビジンは、保持時間が20分付近に1本のきれいな左右対象形のピークが観察され、このピークは分子量がおおよそ52000から55000であることから、報告されている通り四量体であることが示唆された。

一方、本研究にて発現及び精製された10 mutは、保持時間が25分付近に1本のきれいな左右対象形のピークとして観察され、分子量が18500 付近の単量体として存在していることが示唆された。また、リガンドであるビオチン(終濃度20 μ M)の添加によって四量体形成の有無をゲルろ過HPLC

により調べた結果をFig.4に示した。ビオチン存在下及び非存在下、いずれの場合においてもピークは分子量20000 付近に観察され、大過剰のリガンドが存在しても四量体形成に至らないことがわかった。

次に、ストレプトアビジン四量体は、SDS-PAGE解析において100 $^{\circ}$ Cの熱処理をすると単量体として検出され、熱処理を行わないと四量体として検出されることが知られている。そこで、今回得られた10 mutについても同様の解析を行い、四量体形成の有無を確認した (Fig.5)。

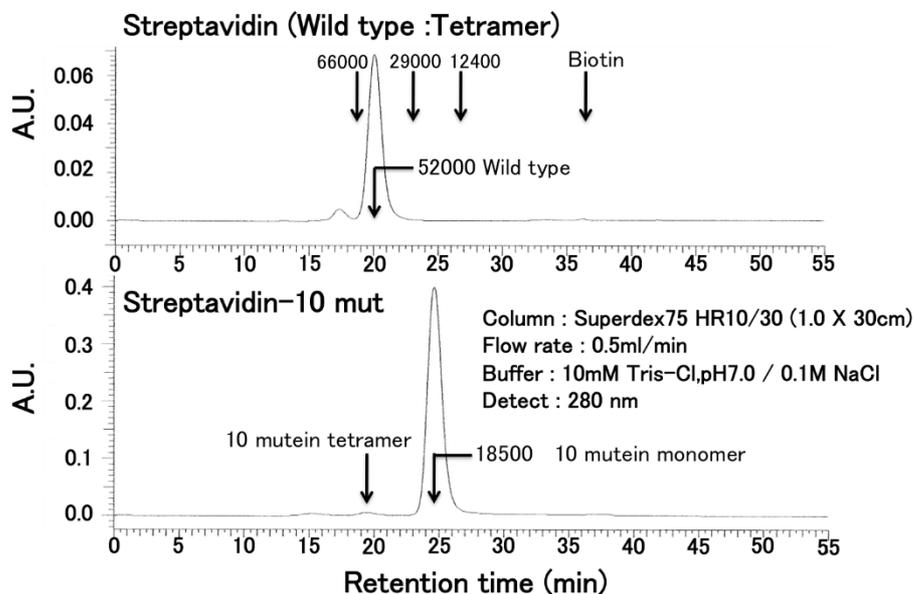


Fig.3 Gel filtration chromatography (HPLC)

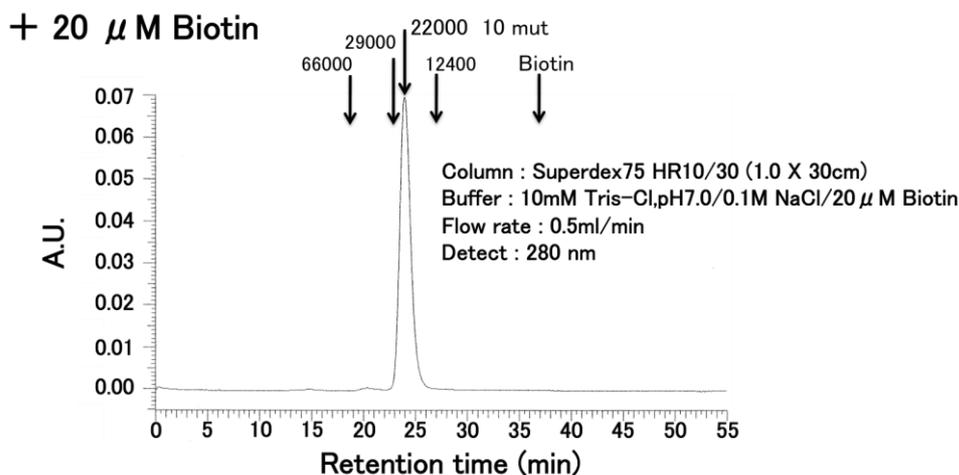


Fig.4 Gel filtration chromatography (HPLC)

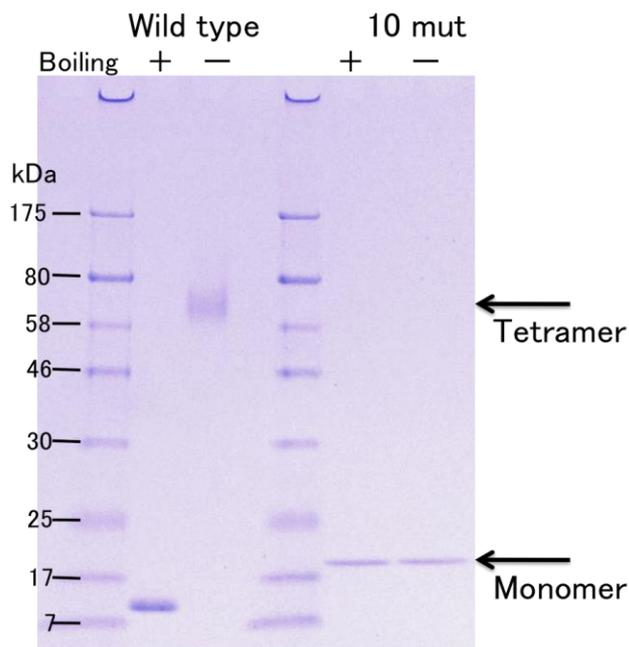


Fig.5 10-20% SDS-PAGE (+ β ME)

その結果, 10 mutは, 野生型とは異なり熱処理を行わなくても単量体として検出されることがわかった.以上, Fig.3, 4, 5より, 得られた10 mutは, 単量体として発現及び精製されていることがわ

かった. 次に, 超高感度等温滴定型マイクロカロリメトリー(Isothermal Titration Calorimetry:ITC)法により, 得られた10 mutのビオチンに対する親和性の測定を行った (Fig.6) .

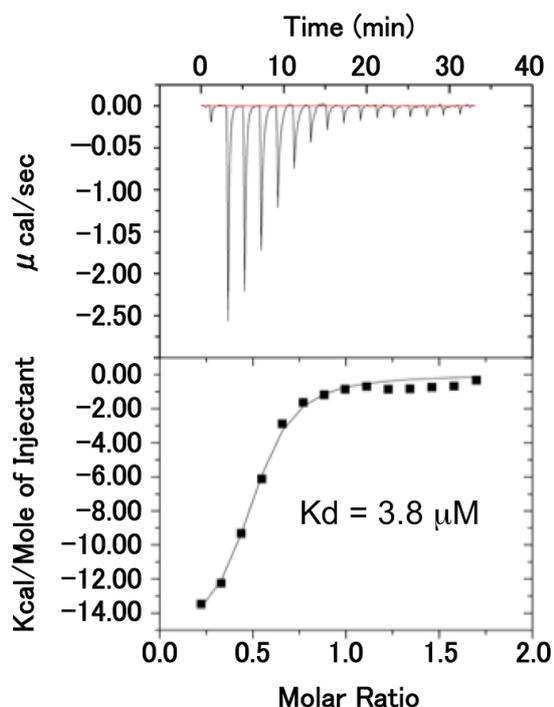


Fig.6 ビオチンに対する親和性測定

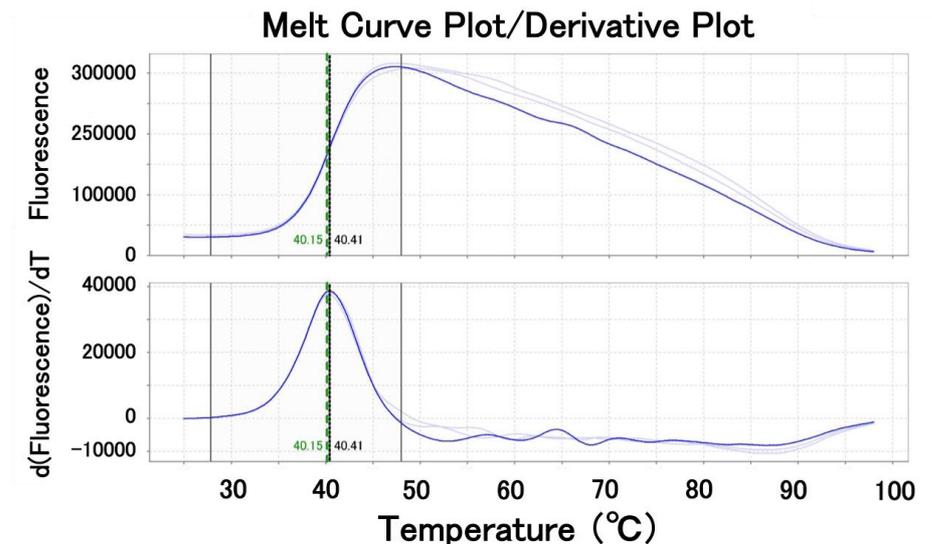


Fig.7 PTS法による10 mutの熱安定性(T_m)の測定

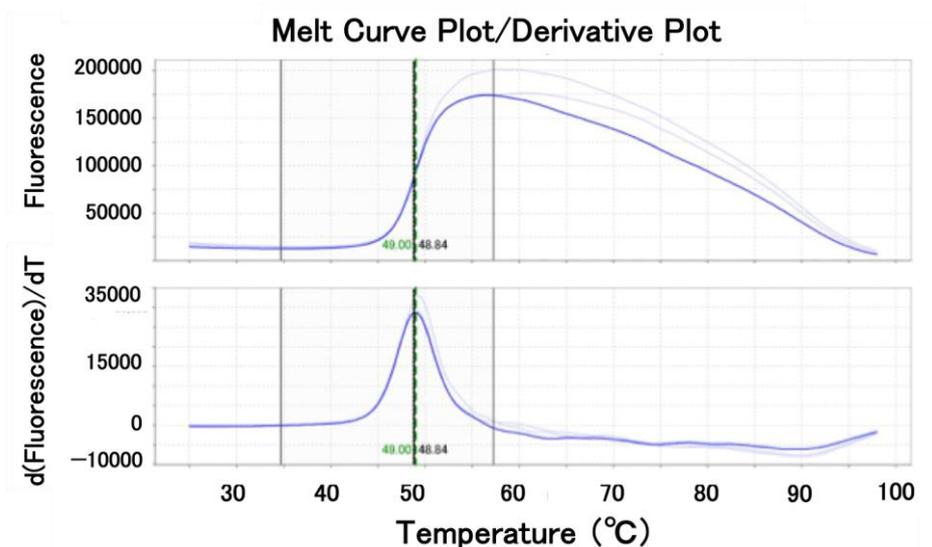


Fig.8 PTS法によるビオチン(200 μ M)存在下における10 mutの熱安定性(T_m)の測定

Fig.6より, ビオチンの滴下量を徐々に増加させていくと, ビオチンの10 mutへの結合により発生する熱量の減少が観察され, 最大発生熱量の50%の熱量を発生するビオチンの濃度, すなわち K_d 値は, 3.8 μ Mであった.このことは, 得られた10 mutがビオチンと適度な親和性で特異的に結合することを示している.

次に, PTS (Protein Thermal Shift) 法により, 得られた10 mutの熱安定性を調べた (Fig.7). Fig.7より, 測定された T_m 値は, 40.5 $^{\circ}$ C付近であり, 報告されている12 mutの値よりも約6 $^{\circ}$ C低い値となった.さらに, ビオチン存在下での熱安定性についても同様に測定したところ, 200 μ Mのビ

オチン存在下では、10 mutの安定性が向上し、 T_m 値が49 °C付近となった (Fig.8) .

【考察】

本研究は、特定分子の検出や固定化、単離、そしてタンパク質精製用のタグとして利用などを行うための新規研究ツールの開発を目的としている。今回、我々が研究対象として選んだのは、非共有結合では自然界において最も強いと考えられているストレプトアビジンとビオチンとの結合である。

アビジン/ストレプトアビジンファミリーを選択した理由を以下に示した。

- ・実際に、特定分子の検出ツールとして盛んに使用されており、その歴史は古いこと、
- ・特異性が高く強力な結合活性を有していること、
- ・ある程度、単量体作成研究が進んでおり、単量体に対するリガンドの親和性が適度であること、
- ・ストレプトアビジンに対して、 K_d 値が数 μM から数 nMの範囲で親和性を示す desthiobiotin や HABA¹¹⁾などの様々なビオチンアナログが実際に開発されており、それぞれの特性に応じたユニークな研究が展開された実績があること (ただし、単量体に対してビオチンよりも結合力が弱くなっているため研究ツールシステムとしての開発には至っていない)、
- ・立体構造がすでに解析済みであり、その後の *In silico drug design* 研究に移行させ易いこと、などの理由により選択した。

また、アビジンではなくストレプトアビジンを選択した理由は、アビジンよりもストレプトアビジンの方が変性に強く、さらに表面の糖鎖がなく等電点が中性 (アビジンは塩基性) 付近のため、非特異的結合が少ないなどの理由から、ストレプ

トアビジンの方が応用に適していると考えた。

さらに、我々が創製を目指すストレプトアビジン単量体に求められる条件を以下に示した。

- ・タンパク質発現及び精製のためのタグとして利用でき、さらに生体試料の検出の際に立体障害による感度の低下を解消できること、
- ・37 °Cの哺乳動物培養細胞実験に使用するために、熱安定性が T_m 値として45 °C以上であること、
- ・適度な親和性を有し、標的分子の検出後に容易に解離させることができ、また、化合物ライブラリーから新規リガンドのスクリーニングが行い易いこと、

以上の条件を満たすためには、ビオチンに対する親和性が10 μM から10 nM程度で、 T_m 値が45 °C以上である単量体の作成を目指すことになる。

今回、我々が創製した10 mutは、単量体であり、ビオチンと結合しても四量体を形成しなかった。さらに、ビオチンに対する親和性を示す K_d 値は、3.8 μM であり、またデータは示さないが、蛍光偏光法による測定では、 K_d 値は0.7 μM であった。この値は、タンパク質発現のタグとしての利用や標的分子の検出において適度な値であり、化合物ライブラリーのスクリーニング系への利用も可能であると思われる。さらに、熱安定性においては、 T_m 値が40.5 °Cであり、哺乳動物細胞の培養温度である37 °Cを超える値となった。

2005年にWuらによって報告されたストレプトアビジンに4箇所の変異 (T76R, V125R, V55T, L109T) を導入した4 mut¹²⁾は、リガンドに対する適度な親和性を有する単量体であるが、30 °C程度で変性してしまい、37 °Cの実験に使用できない不安定な分子であることが示されている¹⁰⁾。デ

ータは示さないが、実際に我々の研究室においても4 mutを作成して10 mutと同様の実験を行って比較したところ、ビオチンに対する親和性(Kd値は数 μ M)は同程度であったが、熱安定性がTm値で33.7℃であり、10 mutは4 mutよりも熱安定性に優れていることが示された。

また、Limらが報告している12箇所に変異を加えた単量体、12 mut¹⁰⁾(10 mutにさらにリガンド結合領域内に2つのシステインを導入してSS結合を形成させたもの)は、Tm値が46℃であり良好な熱安定性を示した。しかしながら、Tm値においては、確かに12 mutは10 mutよりも6℃高く良い単量体であると思われるが、我々が目指す全く新しい構造を有する新規リガンドの探索においては、リガンド結合領域の環境がフレキシブルである方が好ましいため、我々の研究目的には相応しくない。一方、今回得られた10 mutのTm値40.5℃は、哺乳動物細胞の培養温度である37℃よりも高い値を達成できており一見良さそうに思えるが、やや物足りない値であった。実際に、データは示さないが、予備的実験において、37℃で1時間以上前処理した10 mutは、PTS実験では変性する傾向を示した。これに関しては、測定条件の検討がまだ不十分であり、緩衝液の条件、安定化剤の種類、そしてタンパク質濃度の検討などをさらに重ねる必要がある。ただし、リガンド存在下ではその変性傾向は認められなかったので、単なる検出という面では現時点でも問題なく利用可能かもしれない。いずれにせよ、さらに安定性を向上させて研究ツールとして信頼できるものにするためには、Tm値を45℃以上に上げるさらなる工夫が必要であろう。その解決策の一つとして、ビオチン結合に関与しているコア領域(β 鎖のみで構成, Fig.1)を含む構造ドメインの外側

に位置するC末端付近の α 1ヘリックス及びそれ以降のC末端ペプチド(Fig.1)の除去は、リガンド結合活性に影響を及ぼすことなくタンパク質全体のフォールディングを向上させることが期待され、Tm値やKd値が望ましい方向に変化するかもしれない。

ところが、2013年にLimらによって、これまでにない新しいストレプトアビジン単量体であるmSAが報告された¹³⁾。mSAは、*Rhizobium etli*が産生するストレプトアビジン様のリズアビジン(天然型は二量体)の構造を参考にしてストレプトアビジン/リズアビジンハイブリッド体としてデザインされ、ビオチンに対する親和性がKd値で2.8 nM、熱安定性がTm値で59.8℃という驚異的な数値を示した。mSAの改良点は、第1に、分子表面の改良として、サブユニット間のインターフェースの相互作用に関与する7つのアミノ酸(A72K, G74E, T76R, A78E, A89R, T91E, S93R)への変異導入、第2に、分子全体の溶解性を向上させるための4つのアミノ酸(L109N, L124E, V125Q, H127Q)への変異導入、第3に、単量体形成に重要な2つのアミノ酸(V55T, V97Q)への変異導入、第4に、分子表面の疎水性を低下させるための1つのアミノ酸(I130T)への変異導入、第5に、リガンド結合領域の改良として、L3/4ループのS45からY54をリズアビジンのN43からY55への入れ替え、L4/5ループのY60からA72をリズアビジンのV61からF65への入れ替え、L5/6ループのK80からA86をリズアビジンのN73からC89への入れ替え、L7/8ループのS112からS122をリズアビジンのY106からA113に入れ替えた。さらに、第6に、疎水性アミノ酸L25をSerに変異導入し、そして最後に、L3/4ループとL5/6ループ間にSS結合を導入してリガンド結合領域の構造を安定化させた。以上

のように、mSAは、ストレプトアビジンとリズアビジンとのほぼハイブリッド体と言えるほどの大きな改変を試み、高機能のストレプトアビジン単量体の作成に成功した。

確かに、リガンドとの親和性及び熱安定性においては、mSA及び12 mutは、我々の10 mutよりもかなり高い数値を示している。しかしながら、次の2点において我々の10 mutの方が優れている。

1点目は、大腸菌で発現させた際に、mSA及び12 mutとは異なり、我々の10 mutはインクリュージョンボディーにならない点である。発現用タグとして利用するためには、必須の条件である。

今回、可溶性タンパク質として発現に至った原因として次のことが考えられる。我々の10 mutの発現は低温発現系を利用した初めての試みであり、細胞内可溶性画分での発現に成功した。mSA及び12 mutは、リガンド結合領域内に2つのシステインを導入して分子全体の安定性を向上させたものである。一般的には、安定性の向上は可溶性画分になり易いにもかかわらず、mSA及び12 mutはインクリュージョンボディーに、10 mutは可溶性になった。その結果に至った原因としては変異導入による効果ではなく低温発現効果によるものと考えられる。一方で、2つのシステインを導入しなかったことにより可溶化したことも原因として考えられる。一般的に、システイン残基の増加は、三次構造形成において不要なSS結合の形成につながり、フォールディングにおいて不利に働くと考えられる。さらに正しい位置にSS結合を形成させるためには発現量の低下を危惧しながらも細胞外に分泌発現させる等の工夫が必要となるが、今回は2つのシステイン残基を導入しなかったために、分泌発現に頼ることなく細胞内可溶性画分での高い発現(収量1.5mg)に至

った可能性も考えられる。しかしながら、現状においてビオチンカラムに吸着しない可溶性の不活性な10 mutが可溶性発現量全体の約40%程度存在していることから、任意のタンパク質を10 mutとの融合タンパク質として発現させる実験においては、この値がさらに増加することが推測されるため、可溶性の活性型10 mutの存在量をさらに上げていくことが今後の課題であろう。

2点目は、mSAはリガンド結合領域にSS結合を導入して構造を安定化させているが、我々の10 mutは、そのSS結合導入を施していないために構造のフレキシビリティが高く、化合物ライブラリーから新規な構造を有するリガンドの検索が可能となることや、*In silico drug design*を行う際にデザインの幅が広がるという利点がある。今後、これら2つの長所に加えて、10 mutの熱安定性及びリガンドに対する親和性をより高いものに改良できれば、10 mutの有用性がさらに高まると考えられる。

mSAは、10 mutの10箇所の変異に加えて、さらにループの置換など46個のアミノ酸の置換が追加されたものである。したがって、10 mutの2つの長所を維持しつつ、Tm 値を5℃以上上昇させ、かつビオチンに対する親和性をさらに10倍程度上昇させるような改良を達成するには、mSAは大変に参考となる存在であろう。

【引用文献】

- 1) Diamandis EP., Christopoulos TK. : The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology., *Clin. Chem.* 37 625-636 (1991).

- 2) Wilchek M., Bayer EA., : The avidin -biotin complex in bioanalytical applications., *Anal. Biochem.* 171 1–32 (1988).
- 3) McMahon RJ. ed., : Avidin-Biotin Interactions Methods and Applications, *Methods in Mol. Biol.*, 418 (New York: Humana Press) (2008).
- 4) Sakahara H., Saga T., : Avidin-biotin system for delivery of diag- nostic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 37 89–101 (1999).
- 5) Freitag S., Trong IL., Patrik LK., Stayton S., Stenkamp RE., : Structural studies of the streptavidin binding loop, *Protein Science*, 6 1157-1166 (1997).
- 6) Claire E., Crozat CE., Chu C., Moy VT., Sherratt DJ., Howarth M., : A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability, *Nat Methods.* 7(5) 391–393 (2010).
- 7) Laitinen OH., Nordlund HR., Hytönen VP., Uotila STH., Marttila AT., Savolainen J., Airene KJ., Livnah O., Bayer EA., Wilchek M., Kulomaa MS., : Rational design of an active avidin monomer, *J. Biol. Chem.* 278 4010–4014 (2003).
- 8) Qureshi MH., Wong SL., : Design, pro -duction, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins, *Protein Expr. Purif.* 25 409–415 (2002).
- 9) Howarth M., Chinnapen DJF., Gerrow K., Dorrestein PC., Grandy MR., Kelleher NL., El-Husseini A., Ting AY., : A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site, *Nat. Methods* 3 267–273 (2006).
- 10) Lim KH., Haung H., Pralle A., Park S., : Engineered Streptavidin Mono -mer and Dimer with Improved Stability and Function, *Biochemistry*, 50 8682-8691 (2011).
- 11) Green NM.,: Spectrophotometric determination of avidin and biotin, *Methods Enzymol.* 18 418–424 (1970).
- 12) Wo SC., Lam S., : Engineering Soluble Monomeric Streptavidin with Reversible Biotin Binding Capability, *J. Biol. Chem.* 280 23225-23231 (2005).
- 13) Lim HK., Haung H., Pralle A., Park S., : Stable High-Affinity Monomer for Protein Labeling and Monovalent Biotin Detection, *Biotechnol Bioeng.* 110(1) 57-67 (2013).