



# **Monovalentin traptavidiinin tuotto ja puhdistus**

Susanna Junkkari

OPINNÄYTETYÖ  
Marraskuu 2023

Laboratoriotekniikka

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratoriotekniikka

JUNKKARI, SUSANNA:  
Monovalentin traptavidiinin tuotto ja puhdistus

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 14 sivua  
Marraskuu 2023

---

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Protein Dynamics -tutkimusryhmässä, joka tutkii proteiinien konformaatioiden ja toiminnan välisiä suhteita. Työn tavoitteena oli tuottaa ja puhdistaa monovalenttia streptavidiinia, joka on hyödyllinen työkalu biotekniikan tutkimuksessa sen poikkeuksellisen biotiinin sitomiskyvyn vuoksi.

Streptavidiini on tetrameerinen proteiini, jonka vuoksi monovalentin muodon aikaansaamiseksi *E.colissa* tuotettiin kahta mutanttia: kuollutta streptavidiinia, joka ei sido biotiinia, sekä traptavidiinia, joka sitoo biotiinia streptavidiinia tiukemmin. Proteiinit puhdistettiin affiniteettikromatografialla, jonka jälkeen kuollut ja elävä muoto voitiin yhdistää. Traptavidiinia hyödynnettiin, koska eri tetrameerimuodot pystyttiin erottamaan sen C-terminuksesta löytyvän E6-glutamiinihappotagin avulla ioninvaihtokromatografialla. Tagin negatiivisen sähkövarauksen vuoksi eri variantit erottuivat tetrameerien sisältämien tagien lukumäärän mukaan, kun eluointipuskurin suolakonsentraatiota nostettiin ajon aikana. Tällöin saatiin kerättyä talteen myös haluttu monovalentti muoto.

Puhdistuksesta saaduista fraktioista karakterisoitiin traptavidiinin eri tetrameerimuodot SDS-PAGElla. Kun näytteisiin lisättiin biotiinia sisältävää peptidiä, eri muodot liikkuivat geelillä niiden biotiininsitomiskohtien mukaisessa järjestyksessä. SDS denaturoi lisätyn peptidin, muttei itse streptavidiinia, jolloin liikkuminen perustui proteiinien molekyyliainesten sijaan niiden sähkövarauksiin.

SDS-PAGE:n tulosten perusteella voitiin todeta, että muodot saatiin hyvin erotettua toisistaan. Lopputuotteista mitattiin myös niiden sisältämien proteiinien partikkelikokoa, homogeenisuutta ja massaa, jotka myös antoivat hyviä merkkejä niiden laadusta. Tulosten perusteella pystyttiin toteamaan, että työlle asetetut tavoitteet täyttyivät. Saadulle lopputuotteelle ja sen mukana laaditulle tuottoprotokollalle on työn toimeksiantajalle jatkokäyttöä; esimerkiksi tuotteen mahdollisesta kaupallistamisesta tutkimuskäyttöön on harkittu, jota varten tuottoprosessia voisi vielä optimoida tehokkaammaksi.

---

Asiasanat: proteiinituotto, proteiinien puhdistus, streptavidiini

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Engineering

JUNKKARI, SUSANNA:  
Production and Purification of Monovalent Traptavidin

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 14 pages  
November 2023

---

This thesis was done in a research group of Protein Dynamics at the Faculty of Medicine and Health Technology, at the University of Tampere. The goal of the thesis was to produce and purify monovalent streptavidin, because the protein is widely used in biotechnology for its extraordinary ability to bind strongly to biotin, which is a group B vitamin.

Being a tetrameric protein, to produce a monovalent form of streptavidin, two mutants had to be expressed in *E.coli*: dead streptavidin, which does not bind biotin, and traptavidin. The two forms had to be combined in a 1:2 ratio, where the final product had one biotin binding site and three dead monomers. The produced proteins were purified with affinity chromatography, and after that the different tetramer forms were separated by ion exchange chromatography, where they would be separated by E6-glutamic acid tag located at the C-terminus of traptavidin. Due to the negative electrical charge of the tag, the forms were separated by a linear gradient elution.

The different tetrameric forms of traptavidin were characterized by SDS-PAGE, utilizing the biotinylated protein called vinculin. When biotin-containing peptide was mixed in the samples, the protein bands of the forms moved on the gel in the order of the number of their biotin binding sites. This particular SDS-PAGE analysis was similar to native PAGE, because the SDS reagent denatured the added peptide, but not the streptavidin itself. In this case, the movement was based on the proteins' own electrical charges instead of their molecular masses.

Based on the results of the SDS-PAGE analysis, the tetrameric forms of different valencies were well separated from each other. Particle size and homogeneity of the samples were determined by dynamic light scattering measurements, where expected differences between the forms occurred. The molecular mass of the final monovalent traptavidin product was measured with mass photometry, and the result was compared to the theoretical value. In total, the measurements gave good indications of the quality of the final product. Both the end product obtained and the production protocol have further uses for the client. For example possibly the protein could be commercialized for research use.

---

Key words: protein expression, protein purification, streptavidin

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	6
2	MONOVALENTTI STREPTAVIDIINI.....	7
	2.1 Streptavidiini-biotiini-interaktio .....	7
	2.2 Proteiinituotto .....	7
	2.2.1 Plasmidit.....	9
	2.2.2 Tuottosolut.....	10
3	PUHDISTUS JA LAADUNVARMISTUS.....	11
	3.1 2-Iminobiotiini-sefaroosi-affiniteettikromatografia .....	11
	3.2 Traptavidiinin puhdistus ioninvaihtokromatografialla .....	12
	3.3 Tetrameerien erottelu SDS-PAGElla.....	13
	3.4 Fotometriset menetelmät .....	14
4	KOKEELLINEN OSIO .....	16
	4.1 Tuotto.....	16
	4.2 Puhdistus ja lopputuotteen karakterisointi.....	17
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	20
6	POHDINTA .....	28
	LÄHTEET.....	31
	LIITTEET .....	34
	Liite 1. Tuotto- ja puhdistusprotokolla .....	34
	Liite 2. Ioninvaihtokromatografia, puhdistusprotokolla .....	37
	Liite 3. DLS, näyte A .....	38
	Liite 4. DLS, näyte B .....	39
	Liite 5. DLS, näyte C .....	40
	Liite 6. DLS, näyte D .....	41
	Liite 7. DLS, näyte E .....	42
	Liite 8. 2-Iminobiotiinipuhdistuksen tulokset.....	43
	Liite 9. Protparam, kuollut streptavidiini .....	44
	Liite 10. Protparam, traptavidiini .....	46

**LYHENTEET JA TERMIT**

Band	Geelielektroforeesin näyterintama
Da	Dalton. 1 Da = 1 g/mol
DLS	Dynamic Light Scattering. Valon sirontaan perustuva menetelmä, jolla määritetään näytteen sisältämien partikkelien kokojakauma
Indusointi	Geenin luennan alkaminen
Inklusiobody	Inklusiokappaleita, jotka ovat tietynlaisten proteiinien liukenemattomia aggregaatteja, eli väärin laskostuneiden proteiinien kerääntymiä
IPTG	Isopropyyli-b-D-1-tiogalaktopyranosidi
JACKS	Journal of American Chemical Society, vertaisarvioitu tieteellinen aikakauslehti
Ladder	PAGEssa käytettävä proteiinien kokoa ilmaiseva mitta-asteikko
PAGE	Polyakryyliamidigeelielektroforeesi
SDS	Natriumlauryylisulfaatti
Tag	Molekyylikahva
TCEP	Tris(2-kloorietyyli)fosfaatti
Tris	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani

## 1 JOHDANTO

Proteiinit ovat suuri ryhmä biomolekyylejä, jotka osallistuvat moniin elämän kannalta tärkeisiin biokemiallisiin prosesseihin. Ne voivat toimia muun muassa vasta-aineina, entsyymeinä ja rakenteellisina komponentteina elimistössämme. Nykyaikana proteiineja tuotetaan paljon eri teollisuuden alojen käyttöön, minkä vuoksi niiden tutkiminen on tärkeää mahdollisia tulevaisuuden innovaatioita varten.

Opinnäytetyö suoritettiin Tampereen yliopiston Protein Dynamics - tutkimusryhmälle. Tavoitteena oli tuottaa monovalenttia traptavidiinia. Se on mutantti proteiinista nimeltä streptavidiini, jota hyödynnetään paljon biotekniikan tutkimuksessa korkean biotiinin sitomiskykyä vuoksi. Voimakkaita proteiini-ligandi-sidoksia voidaan hyödyntää esimerkiksi biologisissa sensoreissa ja affiniteettikromatografiassa. Monovalentissa muodossa on vain yksi biotiinia sitova yksikkö, jota hyödyntäessä proteiinien kanssa työskentely on helpompaa proteiinin natiiviin tetravalenttiin muotoon verrattuna.

Työn tarkoituksena oli tuottaa streptavidiinin mutanttia, jota mutaatioiden vuoksi sitoo biotiinia tiukemmin kuin natiivi streptavidiini, jonka vuoksi kutsutaan traptavidiiniksi. Lisäksi proteiinissa on glutamaattitagi, jossa on negatiivinen sähkövaraus. Traptavidiinin monovalentin muodon aikaansaamiseksi *E. Colissa* tuotettiin traptavidiinin lisäksi streptavidiinin mutanttia, joka ei sido biotiinia, eli niin sanottua kuollutta muotoa. Traptavidiini eroaa streptavidiinista siten, että sen sähkövarauksen vuoksi puhdistuksen loppuvaiheessa tetrameerien erotteluun käytetään hieman erilaisia kemiallisia metodeja. Huomion arvoista on myös se, että aikaisemman tutkimuskirjallisuuden mukaan traptavidiinia ei ole aikaisemmin puhdistettu monovalenttina.

## 2 MONOVALENTTI STREPTAVIDIINI

### 2.1 Streptavidini-biotiini-interaktio

Streptavidini on proteiini, joka on alun perin eristetty *Streptomyces avidinii* -bakteerista. Sillä on samankaltaisia ominaisuuksia, kuin kananmunasta peräisin olevalla avidiinilla. Tetrameerisessä muodossaan se on 52 kDa:n kokoinen. (Green 1975, 85-133.) Avidiinin ja streptavidinin tunnetuimpia ominaisuuksia on niiden voimakas sitoutuminen biotiiniin, B-ryhmän vitamiiniin, joka toimii niiden ligandina. Tämä sidos on voimakkain tunnettu proteiini-ligandi-sidos, minkä vuoksi sitä hyödynnetään paljon, esimerkiksi diagnostiikassa, affiniteettikromatografiassa ja sensoreissa. (Prescott, Sherwood, Willey & Woolverton 2009.) Ligandilla tarkoitetaan proteiinimolekyylin ulkopuolista atomia tai molekyyliä, joka rakenteensa vuoksi kykenee sitoutumaan proteiinien reseptoreihin. Streptavidinin tapauksessa biotiini sitoutuu streptavidinin aktiiviseen kohtaan kahdeksalla vetysidoksella, sekä van der Waalsin vuorovaikutuksilla molekyylin poolittomien ryhmien välillä. (Liu, Mei & Zhang 2016.)

Vaikka streptavidini sitookin biotiinia poikkeuksellisen voimakkaasti, sitoutumisen lisäksi tapahtuu myös dissosiaatiota, eli biotiinin irtoamista proteiinista. Natiiviin streptavidiniin verrattuna sen mutanteilla, kuten traptavidiinilla on todettu olevan yli kymmenen kertaa hitaampi biotiinin dissosiaatio, suurempi mekaaninen lujuus ja parempi termostabiilius. (Chivers, Crozat, Chu, Moy, Sherratt & Howarth 2010)

### 2.2 Proteiinituotto

Yhdistelmä-DNA-tekniikassa rekombinantteja proteiineja tuotetaan eristämällä geneettistä materiaalia ja siirtämällä sitä toiseen organismiin. Geenit, joita halutaan ilmentää kloonataan vektoriin, joka voi esimerkiksi olla bakteerisolun plasmidirengas. Kun yhdistelmä-DNA-molekyyli transformoidaan eli siirretään tuottosoluun, tapahtuu proteiinien tuottaminen solujen luonnollisen proteiinisynteesin tavoin, eli transkriptiolla ja translaatiolla. (Sino Biological N.d)

Tyypillisiä proteiinituoton perusvaiheita ovat

- Yhdistelmä-DNA-molekyylin valmistus, eli halutun geenin insertointi vektoriin
- Vektorin transformointi tuottosysteemiin
- Kasvatus
- Eristys ja puhdistus (Sino Biological N.d).

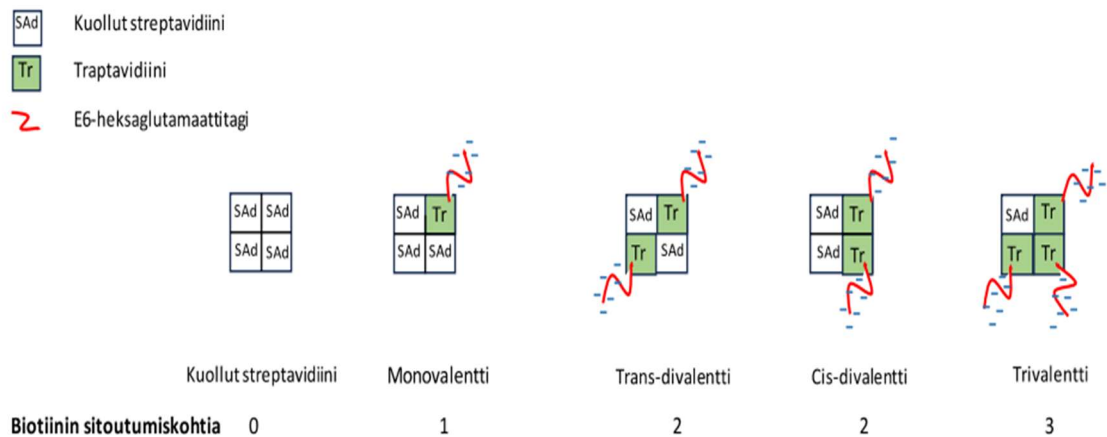
Proteiineja tuottaessa on kiinnitettävä huomiota soluihin, joilla proteiineja tuotetaan. Tuottosysteemin valintaan vaikuttavat muun muassa proteiinin ominaisuudet, sen yhteensopivuus tuottosolujen kanssa ja tavoiteltu saanto. Yleisin käytetty tuottosysteemi on enterobakteereihin kuuluva *E.Coli*. Lajin suosioon vaikuttavat pääasiassa kustannustehokkuus, nopea kasvu ja korkea saanto. Lisäksi lajin genomi tunnetaan laajasti. (Correa & Oppezzo 2015.)

Haastetta *E.Colia* tuottosysteeminä käytettäessä voi aiheuttaa se, etteivät ilmennetyt proteiinit aina ole liukoisessa muodossa, vaan ne ovat inkluusiokappaleissa, jotka ovat proteiinien liukenemattomia aggregaatteja ja väärinlaskostuneita. Liukenemattomien proteiinien kohdalla tarvitaan usein translaation jälkeisiä muokkauksia, jotta proteiini saataisiin toimivaan muotoonsa. Haasteita voidaan myös vähentää vektoria suunniteltaessa, esimerkiksi käyttämällä eri molekyylitageja, jotka ovat proteiineihin liitettyjä peptidisekvenssejä ja ne helpottavat proteiinien puhdistusta. (Correa & Oppezzo 2015.)

Luonnossa esiintyvässä muodossaan streptavidiinilla on neljä biotiinin sitomiskohtaa; yksi jokaisessa monomeeriyksikössä, eli se on tetravalentti. Tetravalentti streptavidini pystyy siis sitomaan itseensä yhteensä neljä biotiinimolekyyliä. Tetravalenttia muotoa käytettäessä biotiinia sitovien yksiköiden välillä voi kuitenkin tapahtua ei-toivottuja vuorovaikutuksia, jotka häiritsevät biomolekyylin normaalia toimintaa. Tämän vuoksi on optimaalisempaa käyttää muotoa, jossa sitoutumiskohtia on vain yksi. Jotta saataisiin muokattua monovalentti muoto, täytyy kolme monomeeriyksikköä korvata yksiköillä, jotka eivät sido biotiinia, eli niin sanotulla "kuolleella streptavidiinilla". (Chinnapen, Dorrestein, El-Husseini, Gerrow, Grandy, Howarth, Kelleher & Ting 2006.)



Traptavidiini on streptavidiinin mutantti, jota voidaan käyttää monovalenttia streptavidiinia tuottaessa biotiinia sitovana yksikkönä. Alla olevassa kuvassa (KUVA 1) on kuvattuna tetravalentista proteiinista poikkeavat muodot. Kuvassa on myös havainnollistettuna traptavidiinin C-terminuksessa sijaitseva negatiivisesti varautunut E6-heksaglutamaatti-molekyylitagi. (Fairhead, Veggiani, Lever, Yan, Mesner, Robinson, Dushek, Van der Merwe & Howarth 2014.)



KUVA 1. Streptavidiinin eri tetrameerimuodot pois lukien tetravalentti muoto

### 2.2.1 Plasmidit

Kuollut streptavidiini on alayksikkö, jota käytetään monovalenttin streptavidiinin tekemiseen, koska se ei sido biotiinia. Sitä voidaan tuottaa esimerkiksi Alice Tingin laboratorionsa saatavasta pET21a-Streptavidin-Dead -plasmidilla (Addgene #20859), jossa on luonnollisesta streptavidiinista poiketen kolme mutaatiota, joiden vuoksi tuotettu proteiini ei sido biotiinia. Transformoituna plasmidi saa aikaan resistenttöyden ampicilliini-antibiootille, jolla bakteerit voidaan kasvatusvaiheessa erottaa antibioottiselektiomaljoilla soluista, joissa transformatio ei ole onnistunut. (Chinnapen, ym. 2006) Monomeerisessä muodossaan kuollut streptavidiini on kooltaan 13371 Da. (Exspasy N.d.)

Traptavidiinia tuotetaan Mark Howarthilta saatavasta Traptavidin-E6-plasmidilla (Addgene #59549). Myös traptavidiinia tuottavien bakteerien pesäkkeet voidaan

selektiivisesti erottaa käyttämällä ampicilliini-maljoja. (Fairhead, ym. 2014.)  
Traptavidiinin monomeeriyksikkö on kooltaan 14106 Da. (Expasy N.d.)

Plasmideissa kyseisiä proteiineja koodaavat geenit ovat *Lac*-operonin alaisina. Tämän vuoksi geenien ilmentämiseen tarvitaan isopropyylitiogalaktosidia, eli IPTG:tä, joka on allolaktoosin molekyylijäljitelmä ja indusoi, eli aiheuttaa kyseisten geenien luvun. Geenien lukua säätelee *lac*-repressorin ja kun IPTG sitoituu repressorin sitoutumiskohtaan, repressorin affiniteetti operoniin vähenee. Kun repressorin vapautuu operonista, mahdollistaa se myös *lac*-geenien transkription. (Beel & Lewis 2000.)

### 2.2.2 Tuottosolut

BL21-solulinja on *E. Colin* kompetentti solulinja, joka solubiologian kontekstissa viittaa solujen kyvykkyyteen ottaa sisään solun ulkopuolista DNA:ta. Kompetenssinsa vuoksi vektorien transformointi, eli siirto solujen sisälle, on usein helppoa. Solulinja soveltuu myös hyvin geenien ekspressioon, eli ilmentämiseen sen vuoksi, että solut kykenevät ohittamaan *E. Colin* taipumuksen suosia jotain tiettyjä kodoneita, eli DNA:ssa tai RNA:ssa esiintyviä kolmen emäksen jaksoja. Taipuneisuutta kodonien suosimiseen tapahtuu siksi, että *E. coli*ssa harvoin ilmentyviä kodoneja sisältävän geenin pakotettu korkean tason ilmentäminen tyhjentää solun sisäiset siirtäjä-RNA-varastot. BL21-solut sisältävät geneettisen muokkauksen johdosta ylimääräisiä kopioita geeneistä, jotka koodaavat harvinaisille *E. Coli*-kodoneille tarvittavia siirtäjä-RNAita. Kun vaadittavia siirtäjä-RNAita on enemmän saatavilla, helpottuu myös monien rekombinanttigeenien korkeatasoinen ilmentyminen. Haasteita proteiinien tuotossa voi aiheuttaa tiettyjen RNAiden harvinaisuus, joita on runsaasti organismeissa, joista ilmennettävät proteiinit ovat alkujaan peräisin. (Agilent n.d.)

### 3 PUHDISTUS JA LAADUNVARMISTUS

Proteiinien tuottamisprosessissa tuottosysteemin lisäksi tarvitaan puhdistus- ja tunnistussysteemejä, jolla lopputuote saadaan haluttuun puhtauteen ja se voidaan identifioida. (Sino Biological n.d). Puhdistus on prosessin yksi työläin vaihe, sillä kontaminaatioiden poistamisen lisäksi proteiinien biologinen aktiivisuus ja kemiallinen rakenne halutaan säilyttää. Mahdollisia kontaminaatioiden lähteitä voivat olla esimerkiksi DNA, virukset ja muut proteiinit. Tämän lisäksi usein halutaan erottaa saman proteiinin eri muodot, jotka ovat peräisin translaation jälkeisistä muokkauksista. (Labrou 2014.)

Erottelu- ja puhdistusmenetelmissä hyödynnetään proteiinien kemiallisia, rakenteellisia ja toiminnallisia eroja. Näitä ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi koko, sähkövaraus, isoelektrinen piste ja proteiinin ligandin välinen affiniteetti. Yleensä yhdellä puhdistusmenetelmällä proteiineja harvoin saadaan haluttuun puhtauteen, joten puhdistuksessa usein yhdistellään useita tekniikoita. (Labrou 2014.)

Ammoniumsulfaattisaostus on menetelmä, jota käytetään usein proteiinien puhdistuksen alkuvaiheessa. Sen periaate on proteiinien "suolaaminen pois" liuksesta, kun siihen lisätään ammoniumsulfaattia, jolla on vahva ionivahvuus. Tällöin proteiinit eivät kykene muodostamasta vetysidoksia veden kanssa ja suola helpottaa niiden keskenäisiä vuorovaikutuksia, jolloin ne muodostavat saostumia ja osa kontaminaation lähteistä jää liukoiseksi. (Berenstein, E., Grodzki, A 2010.)

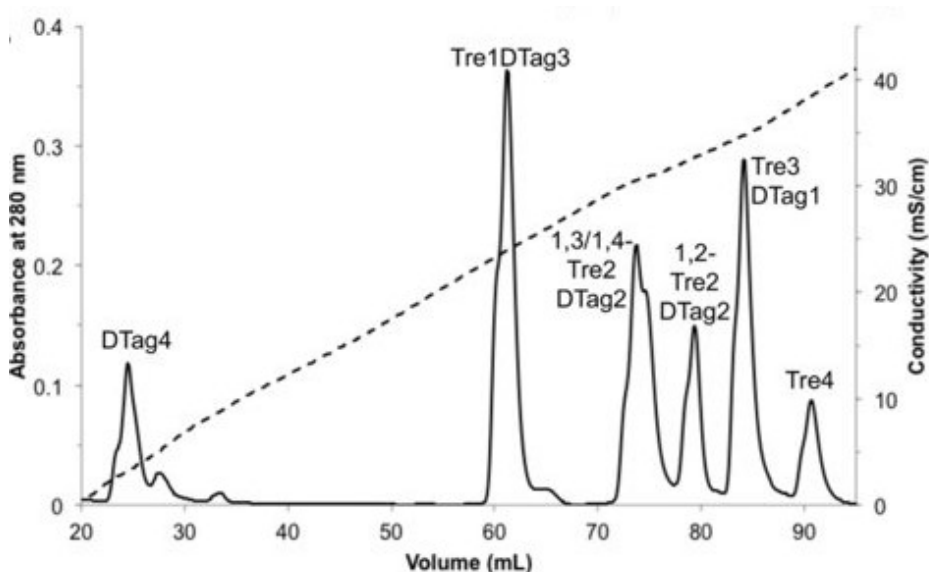
#### 3.1 2-Iminobiotiini-sefaroosi-affiniteettikromatografia

Kromatografisia menetelmiä käytetään laajasti proteiinien spesifiin puhdistukseen, joista yksi laajimmin hyödynnetyin menetelmä on affiniteettikromatografia. (Sino Biological N.d). Affiniteettikromatografiassa näytteen sisältämien komponenttien erottuminen toisistaan perustuu biomolekyyllisen tunnistamiseen, eli biologisesti aktiivisten makromolekyylien kykyä muodostaa spesifejä komplekseja niiden ligandien kanssa (Labrou, N. 2014).

2-iminobiotiini-sefaroosihartsit on affiniteettikromatografiassa hyödynnettävä pysyvä faasi, jota käytetään usein avidiinin tai streptavidiinin puhdistuksessa. Tekniikka hyödyntää proteiinien sitoutumiskyvyn pH-riippuvuutta, jossa avidiini tai streptavidiini sitoutuu sefaroosiin kiinnitettyyn iminobiotiiniin. Korkeassa, noin 11 suuruisessa pH:ssa streptavidiini sitoutuu hartsiin ja se irtoaa hartsista pH:n ollessa noin 4. (Brinton, Finn, Hofmann, Montibeller & Wood 1980)

### 3.2 Traptavidiinin puhdistus ioninvaihtokromatografialla

Ioninvaihtokromatografiassa yhdisteiden erottuminen perustuu ioninvaihtoon, eli näytteen sisältämien ionien sähköstaattiseen vuorovaikutukseen pysyvän faasin kanssa. Traptavidiinin tapauksessa eri tetrameerimuotojen erottuminen perustuu traptavidiinin C-terminuksesta löytyvään E6-glutamiinihappotagiin (Fairhead ym. 2014). Glutamiinihapon karboksyyliiryhmä tietyissä olosuhteissa menettää yhden protonin antaen sille negatiivisen varauksen, jolloin sitä kutsutaan glutamaatiksi (McLaughlin 2020.) Tämän vuoksi tagien määrän kasvaessa myös tetrameerin negatiivinen sähkövaraus kasvaa. Eri tetrameerimuodot voidaan erottaa tällöin gradientteluutiolla (kuvio 1), jossa puskurin suolakonsentraatio, eli sen ionipitoisuus nousee (Fairhead, ym. 2014).



KUVIO 1. Eri muotojen eluittuminen NaCl-konsentraation kasvaessa (Fairhead ym 2014)

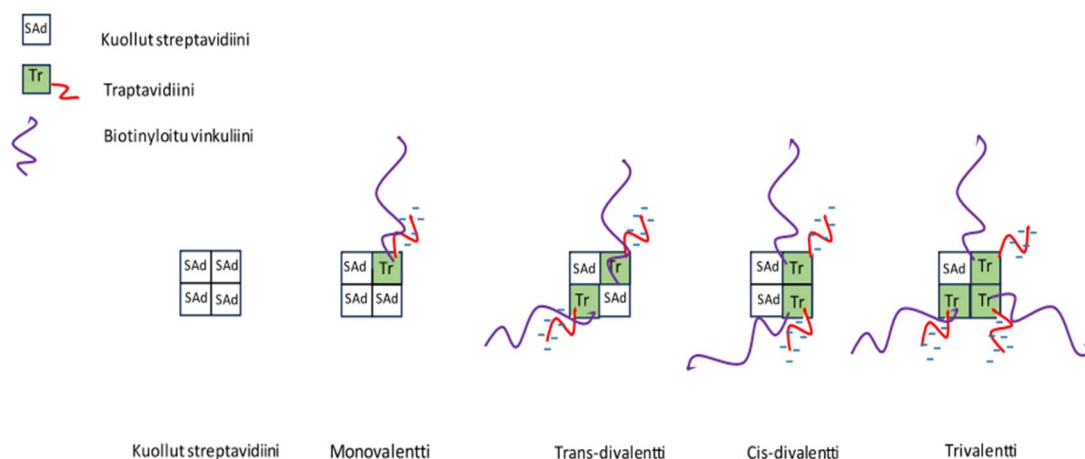
Kuvion 1 kromatogrammissa olevien piikkien selityksissä DTag viittaa kuolleen streptavidiinin monomeeriyksikköön ja Tre traptavidiiniin. Esimerkiksi Tre1DTag3 on tetrameeri, jossa on 1 traptavidiini ja 3 kuollutta streptavidiinia. Piikit, joissa lukee Tre2DTag2 ovat divalentin traptavidiinin 1,3- ja 1,4- isomeereja, joissa on 2 kpl traptavidiinia ja 2 kpl kuollutta streptavidiinia. Tre4 on tetravalentti muoto, joka koostuu pelkästä traptavidiinista.

### 3.3 Tetrameerien erottelu SDS-PAGElla

SDS-PAGE on geelielektroforeesin muoto, jossa näytteet esikäsitellään SDS:llä, eli natriumlauryylisulfaatilla. Se on detergentti, jonka rikkiatrioksidi-anioni kiinnittyy epäspesifisti proteiineihin; denaturoiden niiden tertiääri- ja kvaternäärirakenteen tehden molekyyleistä lineaarisia. Mitä suurempi proteiini on kooltaan, sitä enemmän siihen kiinnittyy negatiivisesti varautuneita ioneja, jolloin proteiinit erottuvat geelillä molekyylikokonsa mukaan. (Campbell, Farrell & McDougal 2017, 123–124.)

Kun geeliin kytketään sähkökenttä, SDS:n negatiivisella varauksella päällystetyt proteiinit kulkevat geeliä pitkin kohti positiivista elektrodiä. PAGE-geelin, eli polyakryyliamidin, huokokset rajoittavat kuitenkin suurempien molekyylien kulkeutumista, jolloin pienet proteiinit kulkeutuvat nopeasti verrattuna suurempiin proteiineihin. Proteiineja on myös mahdollista erottaa ilman SDS:ää, jolloin proteiinit eivät denaturoidu, vaan ovat natiivimuodossaan. Tällöin puhutaan natiivista PAGEsta. Natiivimuodossaan proteiinit eivät kulje geelillä kokonsa mukaan, vaan muotonsa ja sisäisen sähkövarauksensa mukaan. (Campbell ym. 2017, 123–124.)

Streptavidiini-biotiini-interaktiota pystytään hyödyntämään myös eri tetrameerien erottelussa SDS-PAGElla. Kun proteiineihin liitetään biotinyloitu molekyyli ne voivat sitoutuneen ligandin vaikutuksesta kulkea nopeammin geelillä. Koska kuollut streptavidiini ei sido biotiinia, kiinnittyvät biotinyloidut molekyylit vain traptavidiiniin, jolloin näytteet voidaan erottaa toisistaan traptavidiini-yksiköiden lukumäärän mukaan (KUVA 2). Kun näytteitä ei keitetä, pysyvät proteiinin eri variantit laskostettuina niiden ei-lineaarisessa muodossa, niiden liikkuvuus ei vastaa molekyyliainoa. (Fairhead, ym. 2014.)



KUVA 2. Tetrameerimuodot, joissa on liittynyt biotinyloitu proteiini. Kuvassa esimerkkinä on käytetty vinkuliinia

SDS-PAGEssa traptavidini ja muut streptavidinin pysyvät tetrameerimuodoissaan, mikäli näytteitä ei keitetä. Näytteiden sisältämät monomeeriyksiköt voidaan nähdä keitettyissä näytteissä niiden pienen kokoeron vuoksi. (Fairhead, ym. 2014.)

### 3.4 Fotometriset menetelmät

DLS, eli dynaaminen valonsironta on analyysimenetelmä, jossa hyödynnetään molekyylien vuorovaikutusta valon kanssa. Näyte altistetaan monokromaattiselle valon aallonpituudelle ja detektori mittaa syntyneen valon sirronnan intensiteetin. Kun valonsäde kohtaa makromolekyyliä sisältävän liuoksen, valo hajoo kaikkiin suuntiin molekyylien koon ja muodon funktiona. (McKenna, Patel & Stetefeld 2016.) Menetelmällä pystytään määrittämään näytteen partikkelikokoa, partikkelien sähkövaraus ja molekyyliaino. Partikkelikoon mitta-alue voi vaihdella esimerkiksi alle nanometristä muutamaan mikrometriin. (Malvern Panalytical 2023.)

Massafotometria on valonsirontaan perustuva tekniikka, jolla pystytään havaita yksittäisiä molekyyliä laimeissa liuoksissa. Sitä käytetään molekyylien massan määrittämiseen ja niiden suhteellisen määrän laskemiseen. (Piszczek & Wu 2021.) Mittauksen aikana liuoksessa oleviin proteiineihin kohdistetaan

valonsäde, jolloin osa valosta heijastuu mittauspinnasta ja osa siroaa mittauspinnan kanssa kontaktissa olevien proteiinien vaikutuksesta. Laite mittaa molekyylin vaikutuksesta siroavan valon ja mittauspinnan heijastaman valon välistä interferenssiä ja signaalien välinen kontrasti korreloi suoraan proteiinien molekyylimassan kanssa. (Refeyn 2021.)

## 4 KOKEELLINEN OSIO

### 4.1 Tuotto

Kasvatukseen ja näytteenkäsittelyyn käytettiin Liitteessä 1 olevaa protokollaa. Proteiinien tuottosoluiksi valittiin vertailun vuoksi kaksi solulinjaa: Agilentin BL21-CodonPlus (DE3)-RIL ja BL21 Star (DE3). Soluihin transformoitiin lämpöshokilla Alice Tingin laboratorion saatavaa kuollutta streptavidiinia koodaavaa plasmidia (Addgene plasmidi #20859) ja Mark Howarthilta traptavidiinin tuottoon käytettyä plasmidia (Addgene plasmidi #59549). Transformaation jälkeen bakteerisolut maljattiin ampisilliiniä sisältäville maljoille. Maljoja inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Maljoilta poimittiin yksi pesäke siemenkasvatukseen, jossa oli 10 ml LB-mediumia, 0,8 % glukoosia ja ampisilliinia. Kasvatuksia inkuboitiin ravistelussa lämpötilassa 37 °C.

Yön yli kasvatuksen jälkeen siemen laimennettiin noin litraan LB-mediumia, johon oli lisätty glukoosia ja ampisilliiniä. Soluja inkuboitiin 37 °C lämpötilassa ja sekoituksessa niin kauan, kunnes kasvatuksen optinen tiheys oli 600 nanometrin aallonpituudella 0,8. Tämän jälkeen aloitettiin indusointi, eli geenin lukeminen, 1M IPTG:llä, jota lisättiin kasvatukseen 1:1000 suhteessa. Ennen IPTG:n lisäystä jokaisesta kasvatuksesta otettiin 100 µl näyte SDS-PAGEa varten.

Indusoinnissa kasvatuksia inkuboitiin ravistelussa 37 °C lämpötilassa 4 tuntia. Inkubaation jälkeen otettiin 50 µl näyte SDS-PAGEen. Kasvatus pelletoitettiin sentrifugoimalla 4 °C:ssä. Pelletti liuotettiin pieneen määrään LB-mediumia ja sentrifugointi toistettiin. Ennen ja jälkeen indusointia otetut SDS-PAGE-näytteet ajettiin geelillä indusoinnin onnistumisen varmentamiseksi. Geeli värjättiin PAGE-Bluella.

Seuraavaksi solut hajotettiin eli lyysattiin. Sentrifugoinnista saatu pelletti liuotettiin 15 millilitraan 100 mM Tris-HCl-puskuria, jonka pH oli 8,0. Lisättiin lysotsyymiä 0,1 mg/ml konsentraatiossa ja pellettejä inkuboitiin sekoittimella huoneenlämmössä. Sekaan lisättiin vielä 0,5 % Triton-X100-detergenttiä ja EDTA:ta 5 mM loppukonsentraatiossa. Solut hajotettiin sonikoimalla, jonka



välissä näytteitä sekoitettiin varovasti ja lisättiin jäitä estämästä liikaa lämpenemistä.

Solujen hajottamisen jälkeen hajoamistuotteet pelletöitiin sentrifugoimalla 4 °C lämpötilassa. Pelletin inkluusiokappaleissa olevia proteiineja pestiin suspensoimalla ne 30 ml:aan 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), joka sisälsi 0,5 % Triton-X100-detergenttiä ja 5 mM EDTA:ta. Näytteitä sentrifugoitiin, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja pesu toistettiin. Pellettejä pestiin vielä kaksi kertaa puskurilla, joka ei sisältänyt Triton-X100:sta ja EDTA:ta.

Pelletti liuotettiin 8 ml:ään 6 M guanidiinihydrokloridiin, jonka pH oli 1,5. Proteiinien annettiin liueta huoneenlämmössä varovaisella sekoituksella, jotta kaikki inkluusiokappaleet liukenisivat. Liukenemattomat soluroskat poistettiin sentrifugoimalla 4 °C lämpötilassa. Koska proteiinit olivat tässä vaiheessa liuenneena, otettiin supernatantit talteen. Näytteistä mitattiin konsentraatiot Nanodropilla liukenemisen varmentamiseksi. Liuottamisen jälkeen BL21-RIL- ja BL21-Star solulinjojen näytteet yhdistettiin jatkokäsittelyä varten.

Traptavidiniä ja kuollutta streptavidiniä sekoitettiin niin, että muotojen molaarinen sekoitussuhde oli 1:2. Proteiinit uudelleenlaskostettiin tiputtelemalla seokset 4x250 ml:aan kylmää PBS:ää, jonka pH oli 7,4. Liuoksia sekoitettiin kovaa magneettisekoittajalla yön yli. Jokaiseen 250 ml:an pulloon lisättiin 7 ml seosta. Laskostetussa muodossaan proteiinit olivat liukoisina PBS:ssä ja sakka suodatettiin pois. Rinnakkaiset laskostumisreaktiot yhdistettiin.

## **4.2 Puhdistus ja lopputuotteen karakterisointi**

Puhdistus aloitettiin ammoniumsulfaattisaostuksella. Ensin näytteet sentrifugoitiin ja supernatanttiin lisättiin 120 g ammoniumsulfaattia jokaista 200 ml:aa kohden. Seosten annettiin saostua 90 min 4 °C:ssä hitaalla sekoituksella. Lopuksi sakka otettiin talteen sentrifugoimalla 24 000 g:ssa 4 °C asteessa. Supernatantti poistettiin ja sentrifugointi toistettiin.

Pelletit liuotettiin yhteensä 30 ml:aan 20 mM Tris-HCl 300 mM NaCl -puskuriin, jonka pH oli 8.5. Liukenematon materiaali poistettiin sentrifugoimalla 10 000 g:ssä 30 min lämpötilassa 4 °C. Saatu supernatantti otettiin talteen affiniteettikromatografiapuhdistusta varten.

2-iminobiotiini hartsia laitettiin kahteen pylvääseen 4 ml, joita inkuboitiin 30 min 0,5 M NaOH:ssa. Pylvästä pestiin 2 kertaa ultrapuhtaalla vedellä, 2 kertaa eluutiopuskurilla ja 2 kertaa sitoutuspuskurilla. Eluutiopuskurina käytettiin 20 mM natriumfosfaattia, jonka oli pH 2,0. Sitoutuspuskurina toimi 50 mM Natriumboraatti-300 mM NaCl -liuos, joka oli pH-arvoltaan 10,5.

Näytettä laimennettiin suhteessa 1:1 sitoutuspuskurilla, jotta näytteen pH olisi riittävän korkea hartsiin sitoutumiseen. Näyte lisättiin erissä pylvääseen ja sen annettiin virrata läpi painovoimaisesti. Pylväät pestiin vielä kolmesti sitoutuspuskurilla.

Eluutiofraktioille valmisteltiin 2 ml mikroputket, joiden pohjalle pipetoitiin 150 µl neutralisaatiopuskurina toiminutta 1M Tris-HCl:ää, jonka pH oli 8,0. Näytteet eluutiin pylvästä 20 ml:lla eluutiopuskuria. Pylväitä inkuboitiin 3 minuuttia, jonka jälkeen puskurin annettiin virrata pylväiden läpi painovoimaisesti. Eluoinnista kerättiin 1,5 ml fraktioita, joiden absorbanssi ja pitoisuus mitattiin Nanodrop-laitteella ja nollanäytteenä käytettiin neutraloitua eluutiopuskuria.

Kaikki fraktiot, joiden konsentraatio on yli 0,5 mg/ml, yhdistettiin ioninvaihtokromatografista puhdistusta varten. Seos dialysoitiin 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 -puskuriin. Seoksesta otettiin näyte SDS-PAGEen, joka jaettiin kahteen osaan ennen keittämistä. Vain toinen näytteistä keitettiin. Elektroforeesiajo suoritettiin tavanomaista hitaammin, eli pienemmällä jännitteellä, jotta tetrameerit pysyisivät ehjänä.

Ioninvaihtokromatografiapuhdistus suoritettiin käyttämällä liitteessä 2 kuvattua puhdistusprotokollaa, joka on Fairhead, ym. vuonna 2014 julkaistusta artikkelista Puhdistus tehtiin Bioradin NGC-nestekromatografilla ja siinä käytettiin gradientteluutiota, jossa NaCl-konsentraatio kasvoi välillä 0,15–0,4 M. Eluutiosta kerättiin 5 ml suuruisia fraktioita, kun virtausnopeus oli 4 mL/min. Eluutiosta

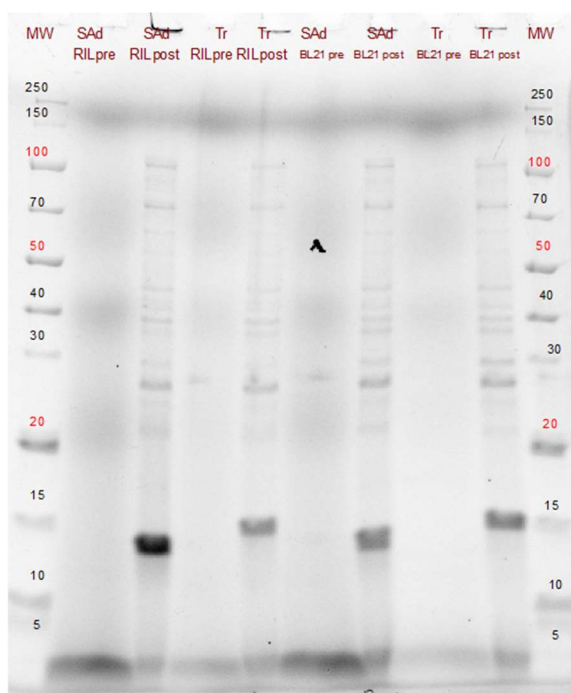
saaduista fraktioista otettiin näytteitä SDS-PAGEa varten. Kromatogrammien piikkien kohdalle osuvat fraktiot yhdistettiin ja niiden konsentraatiot mitattiin.

Streptavidiinin eri tetrameerimuodot karakterisoitiin SDS-PAGElla, jossa näytteisiin lisättiin biotinyloitua vinkuliinia. Analyysin periaatteena oli määrittää proteiinien liikkuvuus geelillä, kun niiden traptavidiini-yksiköihin oli sitoutunut biotiinimolekyyli. Reaktioihin pipetoitiin näytteitä 1  $\mu$ l ja vinkuliinia 2  $\mu$ l mikroputkiin, joissa oli noin 20  $\mu$ l laimentamiseen käytettyä PBS-puskuria. Näytteitä inkuboitiin yön yli jääkaapissa, jonka jälkeen niihin lisättiin 7,5  $\mu$ l SDS-reagenssia. Näytteet jaettiin kahteen 15  $\mu$ l erään, joista toinen puolikas keitettiin ja toinen jätettiin keittämättä. Keittämättömillä näytteillä haluttiin testata proteiinien liikkuvuus geelillä, kun niitä ei denaturoitu. Keitetyillä näytteillä taas pystyttiin havainnoimaan denaturoituneiden proteiinien välisiä eroja, kun ne keitettäessä palautuvat monomeeriyksiköikseen.

Näytteet mitattiin Malvern Panalyticalin Zetasizer DLS-laitteella, jotta eri tetrameerimuotojen välillä olevia eroavaisuuksia voitaisiin havaita. Monovalenttia traptavidiinia edustava fraktio mitattiin myös massafotometrillä sen molekyylipainon määrittämiseksi. Syöttämällä plasmidien geeneistä käännetyt aminohapposekvenssit Protparam-ohjelmaan (Liite 9 & 10) saatiin määritettyä monomeerisen kuolleen streptavidiinin ja traptavidiinin proteiinin laskennalliset arvot, joita käytettiin vertailuarvoina.

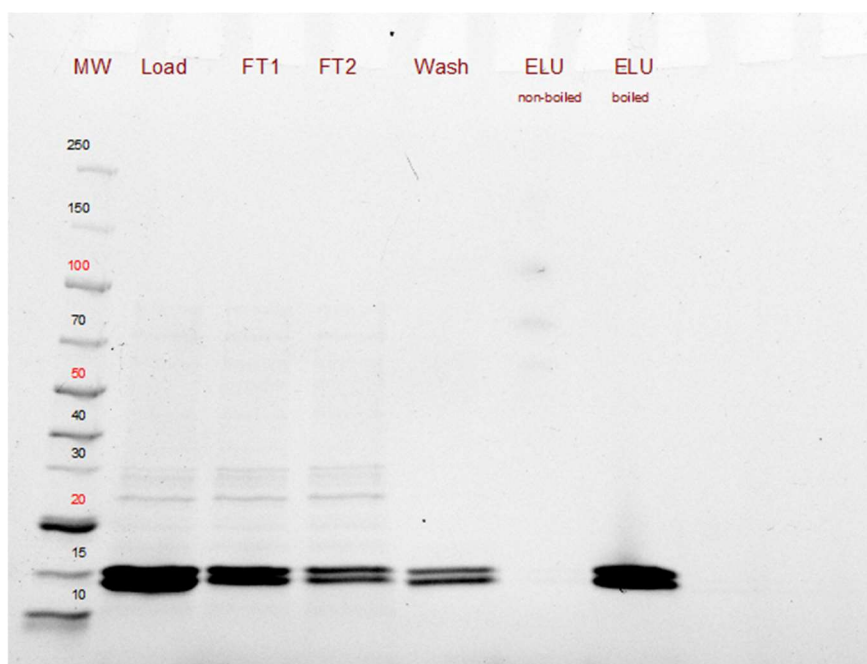
## 5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Indusoinnin onnistumista arvioitiin ottamalla kasvatuksista näytteet ennen ja IPTG:n lisäämisen jälkeen. Näytteet ajettiin SDS-PAGE-geelillä (KUVA 3), jossa post- eli indusoinnin jälkeen otetuissa näytteissä on selvästi tuottunut noin 15 kDa kokoisia proteiineja, joka vastaa streptavidiinin monomeeriyksiköiden kokoa. Koska solut olivat tuottaneet haluttuja proteiineja, oli indusointi ja sen kautta proteiinisynteesi selvästi tapahtuneet odotetulla tavalla. Huomion arvoista on myös se, että kuolleen streptavidiinin monomeerit ovat pienempiä kuin traptavidiinin, minkä vuoksi ne ovat liikkuneet geelillä pidemmälle. Kuvasta voidaan myös päätellä, että kuollut streptavidiini on tuottunut parhaiten BL21-CodonPlus (DE3)-RIL -soluissa, koska sen bandi on kaikista tummin, viitaten suurempaan proteiinien määrään.



KUVA 3. SDS-PAGE näytteet ennen ja jälkeen indusoinnin. Kuvassa näkyvät lyhenteet: SAd=Kuollut streptavidiini; Tr=Traptavidiini; RIL= BL21-CodonPlus (DE3)-RIL -solulinja; BL21= BL21 Star (DE3) -solulinja; pre= ennen indusointia; post= indusoinnin jälkeen

Tuotetut proteiinit puhdistettiin affiniteettikromatografialla, jossa pysyvänä faasina hyödynnettiin 2-iminobiotiini-sefaroosihartsia. Eluutio suoritettiin kahdessa rinnakkaisessa kolonnissa. Eluution eri vaiheista otettiin näytteet SDS-PAGE-analyysia varten (KUVA 4).



KUVA 4. 2-iminobiotiinieluution SDS-PAGE-geeli

Kuvassa "Load" viittaa ennen näytteen kolonniin lataamista otettuun näytteeseen. "FT1" ja "FT2" taas ovat kolonnin läpi virranneesta puskurista otettuja näytteitä. FT on lyhenne termistä "flow through". Wash on eluution pesuvaiheesta otettu näyte ja ELU on varsinaisesta eluutiosta otettu näyte.

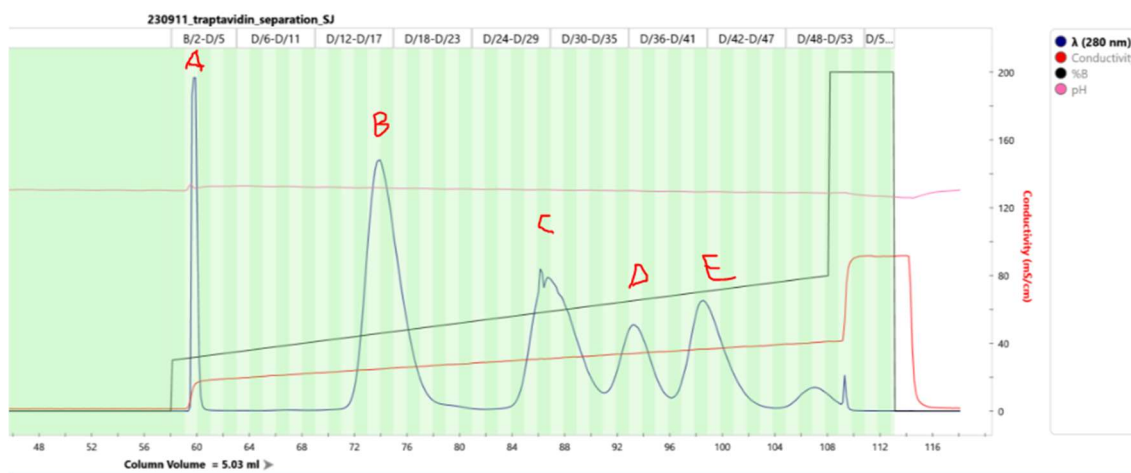
Puhdistuksesta kerättiin 14 fraktiota, joiden konsentraatiot mitattiin kahdella rinnakkaisella mittauksella allonpituudella 280 nanometriä (Liite 8). Fraktiot, joissa konsentraatio oli yli 0,5 mg/ml yhdistettiin. Taulukossa 1 on yhdistetyistä fraktioista mitattu konsentraatio.

TAULUKKO 1. Konsentraatio 2-iminobiotiini puhdistuksen jälkeen

Yhdistetty fraktiot 2-8			
	c(mg/ml)	A280	A260/A280
	1,81	5,38	0,5
	1,812	5,38	0,5

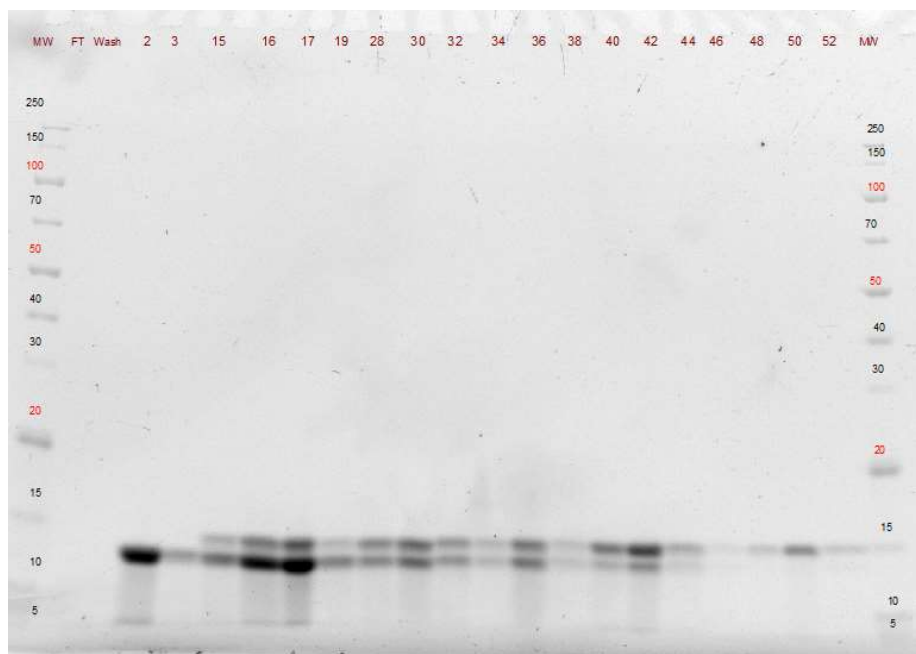
Affiniteettikromatografisen puhdistuksen jälkeen saatu proteiiniliuos jatkokäsiteltiin ioninvaihtokromatografialla. Ioninvaihtokromatografiasta saatiin seuraavanlainen kromatogrammi (kuvio 2), jonka piikit nimettiin kirjaimin A-E.

Kromatogrammia verrattiin kirjallisuuslähteisiin (Fairhead ym. 2014), joka muotonsa puolesta oli hyvin samankaltainen; siinä esimerkiksi esiintyy kaksiharjainen piikki, kuten piikissä C. Nämä kaksi limittäistä piikkiä ovat todennäköisesti divalentin muodon eri isomeerejä, eivätkä siksi täysin erotu toisistaan. Saadussa kromatogrammissa E-piikin jälkeen tullut pieni piikki on todennäköisesti traptavidiinin tetravalentti muoto, mutta sitä ei otettu jatkokäsittelyyn.



KUVIO 2. Ioninvaihtokromatografiapuhdistuksen kromatogrammi

Eluutiosta saatiin yhteensä 55 fraktiota, jotka näkyvät kromatogrammissa vihreinä pystyraitoina. Piikkien alueille osuvista fraktioista kerättiin näytteet SDS-PAGEen jotka nimettiin järjestysnumeroilla. Geelikuvassa (KUVA 5) näkyy 10-15 kDa välillä kaksi lähekkäin olevaa proteiinibandia: kuollutta streptavidiinia ja traptavidiinia. Pienemmän kokonsa vuoksi kuollut streptavidiini on todennäköisesti bandeista alempi. Eluution edetessä, eli fraktioiden numeron kasvaessa, voidaan huomata, että kuolleen streptavidinin bandi haalenee, eli sen määrä vähenee. Päinvastoin traptavidiinin määrä kasvaa, ja lopulta saadaan muotoa, jossa kaikki osat ovat traptavidiinia.



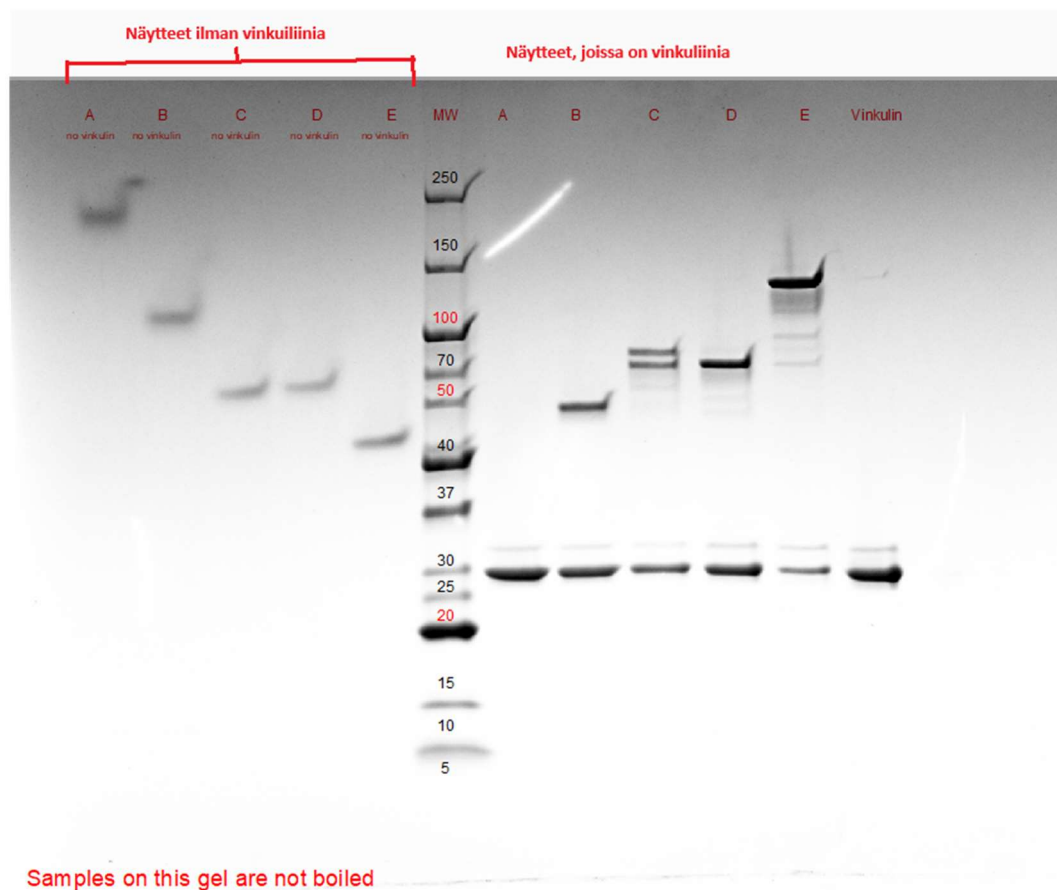
KUVA 5. SDS-PAGE ioninvaihtokromatografian eluutiofraktioista

Piikkien kohdalle osuvat fraktiot yhdistettiin, ja niistä mitattiin loppukonsentraatio Nanodrop-laitteella. Jokainen näyte mitattiin kaksi kertaa ja mittauksista laskettiin keskiarvo. Saadut tulokset ovat alla olevassa taulukossa 2. Lisäksi taulukossa on näytteen mitatut absorbanssit.  $A_{260}/A_{280}$  -absorbanssisuhde antaa tietoa proteiinien mahdollisesta DNA-kontaminaatiosta. Puhtaalla proteiinilla lukema on yleensä noin 0,6.

TAULUKKO 2. Mitattu loppukonsentraatio

		$c$ (mg/ml)	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	<b>Keskiarvo (mg/ml)</b>
<i>Kuollut streptavidiini (4x kuollutta streptavidiniä)</i>	Fraktio A	1,759	5,23	0,51	$c=1,7625$
		1,766	5,25	0,51	
<i>Monovalentti traptavidini</i>	Fraktio B				
		1,757	5,22	0,51	$c= 1,7695$
		1,782	5,3	0,51	
<i>1,3/1,4 -divalentti traptavidini</i>	Fraktio C				
		1,548	4,6	0,51	$c= 1,542$
		1,536	4,57	0,51	
<i>1,2-divalentti traptavidini</i>	Fraktio D				
		1,396	4,15	0,51	$c= 1,390$
		1,384	4,11	0,51	
<i>Trivalentti traptavidini</i>	Fraktio E				
		1,787	5,31	0,5	$c= 1,783$
		1,779	5,29	0,51	

Lopputuotteena saatuja proteiineja pyrittiin karakterisoimaan määrittämällä niiden biotiinia sitovien yksiköiden lukumäärä. Tämä tehtiin SDS-PAGE-analyysillä, jossa näytteisiin lisättiin biotinyloitua vinkuliini-nimistä proteiinia. Keittämättömässä näytteessä streptavidinin eri muodot eivät denaturoituneet, kuten voidaan nähdä kuvassa 6. Geelissä vinkuliini on selkeästi denaturoitunut, koska se on sijoittunut geelillä molekyylipainonsa mukaiseen kohtaan, eli noin 30 kDa kohdalle. Streptavidinin muodot taas ovat liikkuneet geelillä sen mukaan, kuinka monta biotiinia sitonutta traptavidini-yksikköä niissä on. Vertailun vuoksi geelille pipetoitiin myös näytteet, joihin ei lisätty vinkuliinia.

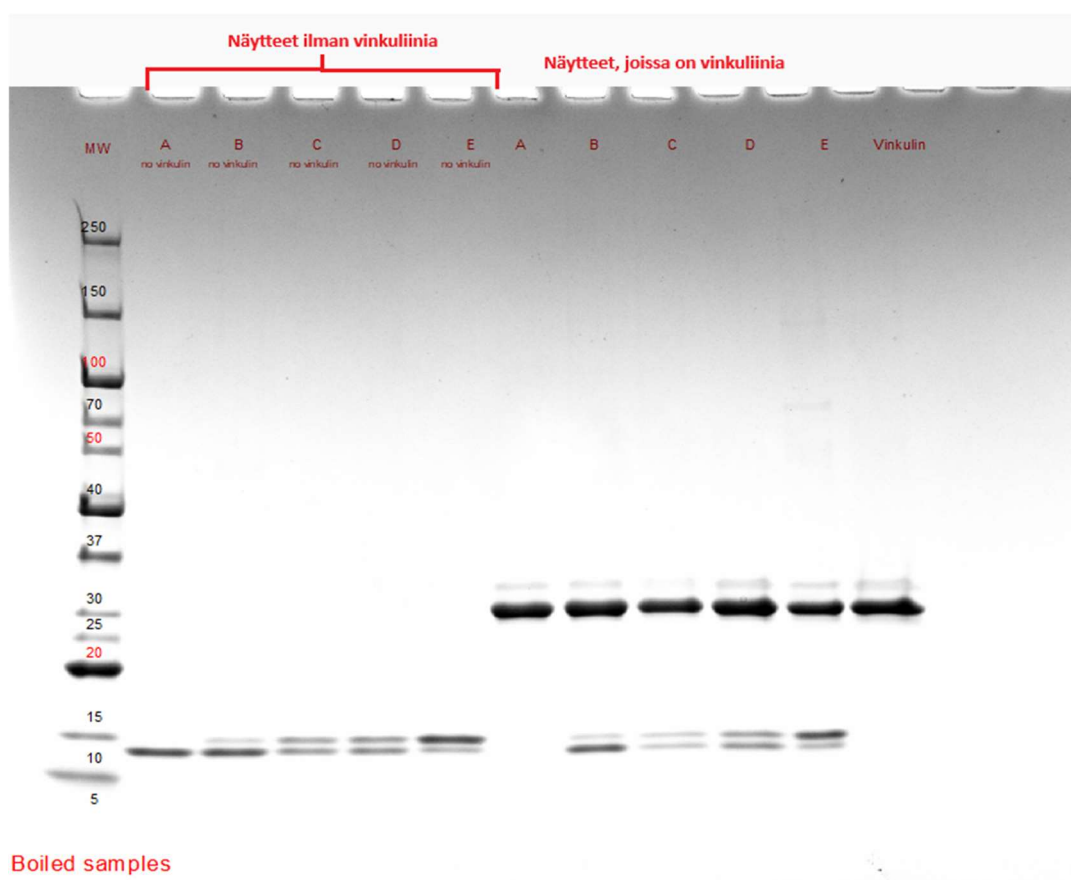


KUVA 6. Biotiinin sitomiskykytesti, keittämättömät näytteet

Keitetyissä näytteissä (KUVA 7) sekä kuollut streptavidini että traptavidini ovat selvästikin hajonneet monomeeriyksiköikseen, koska bandit sijoittuivat geelillä noin 15 kDa:n kohdalle. Koska kuollut streptavidini on traptavidiniä hieman pienempi, on se liikkunut geelillä nopeammin. 10-15 kDa:n kohdalla olevista



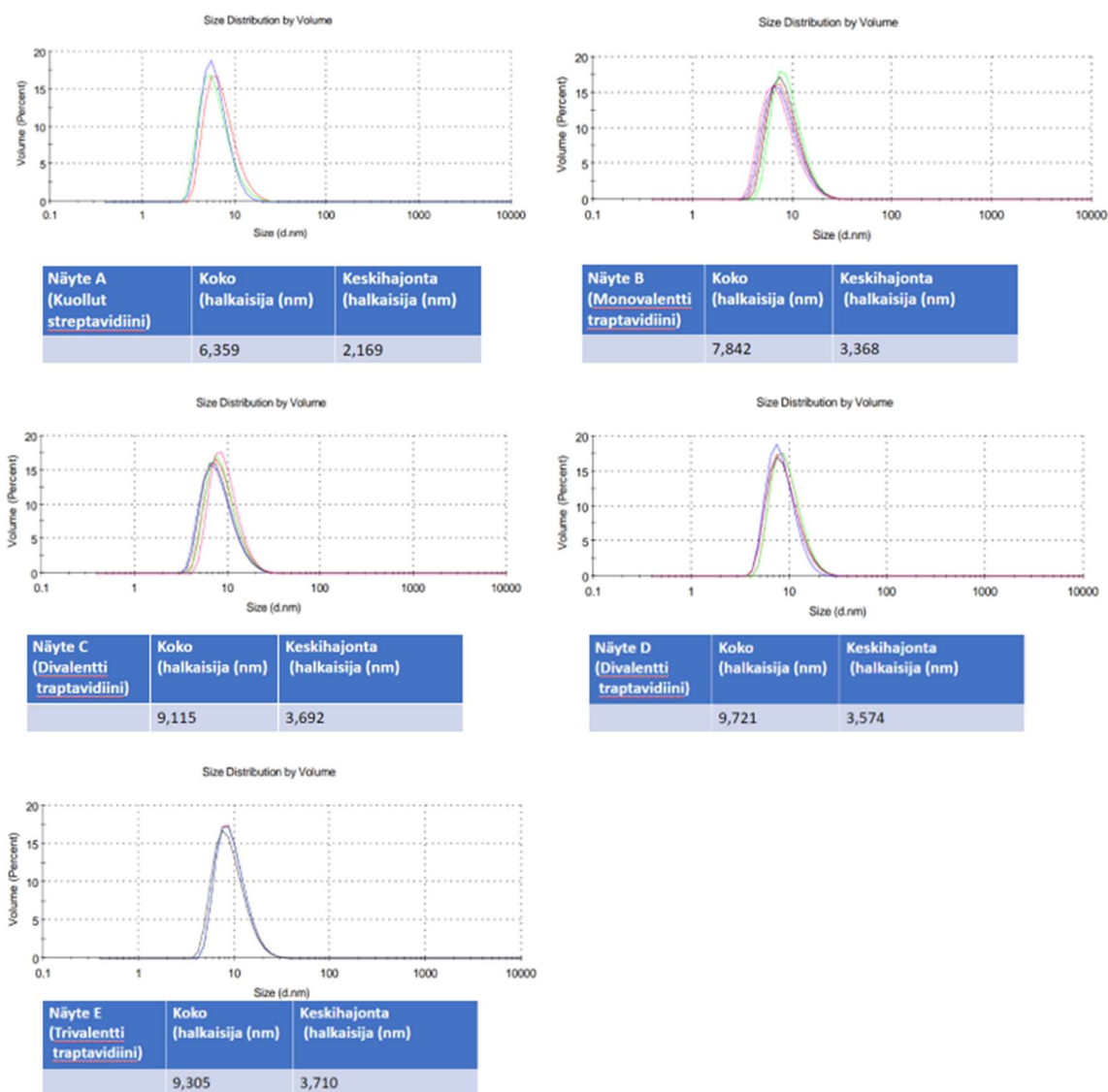
kaksoisbandeista streptavidiini on siis alempana ja traptavidiini sen yläpuolella. Bandien tummuudesta voidaan myös päätellä eri monomeeriyksiköiden suhteellista määrää. Esimerkiksi monovalenttia muotoa edustavassa näytteessä B kuolleen streptavidiinin bandi on selkeästi traptavidiinin bandia tummempi. Geelillä denaturoitunut vinkuliini näkyy myös geelillä kokonsa mukaisessa kohdassa, eli noin 30 kDa:n kohdalla. Kuvissa 6 ja 7 näytteen A kohdalla näkyy pelkästään vinkuliini, mikä todennäköisesti johtuu työn suorituksen aikana tapahtuneesta virheestä, esimerkiksi reaktioita pipetoidessa.



KUVA 7. Biotiinin sitomiskykytesti, keitetyt näytteet

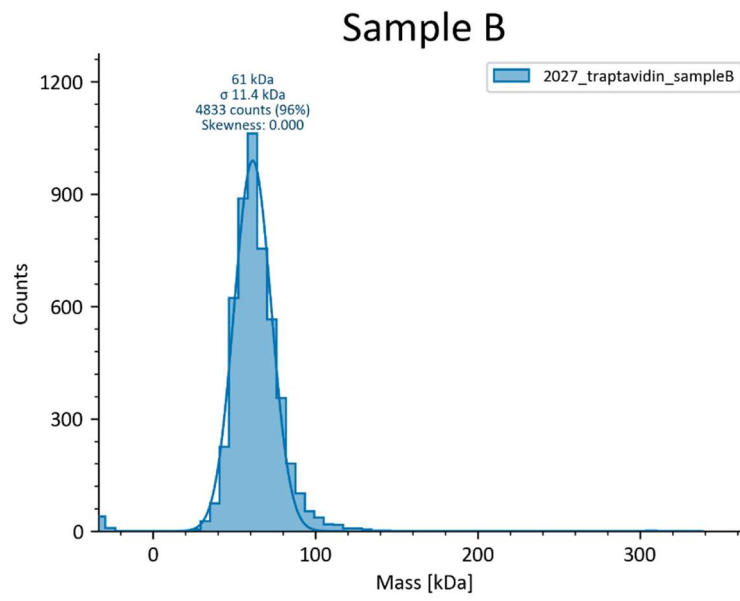
Näytteiden homogeenisuutta ja partikkelikokoa mitattiin DLS-mittauksella. Laite mittasi jokaisen näytteen 5 kertaa. Kuviossa 3 on ilmoitettu kunkin näytteen partikkelikoko nanometreinä, sekä rinnakkaisten mittausten kuvaajat. Partikkelikokonsa perusteella kuollut streptavidiini, monovalentti traptavidiini ja muut muodot erottuvat hyvin toisistaan. Kuolleen streptavidiinin (näyte A) halkaisija on tulosten mukaan noin 6,4 nanometriä, monovalentin traptavidiinin 7,8 nm (näyte B) ja divalentin traptavidiinin eri isomeerien (näytteet C ja D) ja trivalentin (näyte E) tulokset ovat todella lähellä toisiaan, eli 9,1 nm; 9,7 nm ja 9,3

nm. Näytteiden homogeenisyydestä kertoo se, että rinnakkaisten mittausten piikit menevät hyvin limittäin, eikä kuvaajissa näy useita piikkejä. Yksittäisten mittausten tulokset löytyvät liitteistä 3–7.



KUVIO 3. Fraktioiden DLS-mittausten tulokset

Monovalentista traptavidiinista, eli fraktiosta B, mitattiin molekyylipaino hyödyntämällä massafotometria. Massafotometrin kuvaajassa (kuvio 4) y-akselilla on mittauksen signaali ja x-akselilla proteiinin massa kilodaltona, joka oli 61 kDa. Tämä poikkesi noin 7 kDa:n verran Protparam-työkalulla määritetystä teorettisesta koosta, joka oli noin 54 kDa. Tämä teorettinen arvo saatiin laskemalla yhteen kolmen kuolleen streptavidinin ja yhden traptavidinin molekyylipainojen summa.



KUVIO 4. Monovalentin traptavidinin massakuvaaja

## 6 POHDINTA

Työn tavoitteena oli tuottaa monovalenttia traptavidiinia Tampereen yliopiston Protein Dynamics -tutkimusryhmän käyttöön. Kyseisellä proteiinilla on useita eri käyttökohteita ja toimeksiantajan tarkoituksena oli oman tuotannon käynnistäminen saatavuuden ja kustannustehokkuuden lisäämiseksi. Itse proteiinituoton lisäksi työhön sisältyi useita puhdistusvaiheita, sekä lopputuotteen karakterisointi.

Monovalentti streptavidiini on streptavidiinin muoto, joka sisältää vain yhden biitiinin sitoutumiskohdan, ja jossa tetraivalentin streptavidiinin kolme muuta monomeeriyksikköä täytyi korvata niin sanotulla kuolleen muodon mutantilla, jossa sitoutumiskohtia ei ollut. (Chinnapen ym. 2006.) Biotiinia sitovana yksikkönä käytettiin streptavidiinin mutanttia, jota kutsutaan traptavidiiniksi. Kuollutta streptavidiinia ja traptavidiinia koodaavia plasmideja transformoitiin kahteen *E. Colin* solulinjaan lämpöshokkia hyödyntämällä.

Geenien luennan alkamisen eli indusoinnin onnistumista arvioitiin SDS-PAGElla. Kasvatuksista otettiin näytteet ennen indusoinnin aloittamista ja sen jälkeen. Ajon tulokset näkyvät kuvassa 3, jossa ladderin asteikon perusteella indusoinnissa on tuottunut halutun kokoisia proteiineja. Itse indusointi suoritettiin lisäämällä kasvatukseen IPTG:tä, joka vapauttaa lac-geeneissä olevan repressorin; mahdollistaen lac-geenien transkription (Beel & Lewis, M 2000.).

Tuotettujen proteiinien puhdistukseen käytettiin ammoniumsulfaattisaostusta, affiniteettikromatografiaa (Liite 1) ja ioninvaihtokromatografiaa (Liite 2). Ammoniumsulfaattisaostuksella proteiinit saostettiin, jolloin saostuneet proteiinit pystyttiin erottamaan liukoisista kontaminanteista (Berenstein ym. 2010). Affiniteettikromatografiapuhdistuksessa hyödynnettiin proteiinien sitoutumisen pH-riippuvuutta. Proteiinit sitoutuivat korkeassa pH:ssa 2-iminobiotiini-sefaroosihartsin ja ne voitiin eluoida pylvästä ulos laskemalla pH:ta. (Brinton ym. 1980.)

Streptavidiinin eri tetrameerimuodot eroteltiin ioninvaihtokromatografialla. Erottuminen perustui traptavidiinin E6-glutamiinihappotagiin, jolla on negatiivinen

sähkövaraus. Mitä enemmän tetrameerisessä proteiinissa oli traptavidiinin monomeeriyksiköitä, sitä suurempi sen sähkövaraus oli. Eri tetrameerimuodot eroteltiin tällöin gradienttieluutiassa (kuvio 1), jossa puskurin suolakonsentraatiota nostettiin. (Fairhead, ym. 2014.) Karakterisointiin käytetyillä analyyseillä pyrittiin varmistamaan, että monovalentti traptavidiini oli erottunut muista muodoista.

Saatujen tuotteiden laatua arvioitiin SDS-PAGElla, jossa näytteisiin oli sekoitettu biotinyloitua vinkuliinia. Analyysin tuloksista (KUVA 6) voidaan päätellä, että keittämättömissä näytteissä SDS-reagenssi denaturoi vinkuliinin, muttei streptavidiinia. Koska streptavidiinit eivät denaturoituneet, ne kulkeutuivat geelillä natiivi-PAGE:n tapaan oman sähkövarauksensa mukaisesti (Campbell ym. 2017, 123–124; Fairhead, ym. 2014). Proteiinit liikkuvat siis geelillä sen mukaan, kuinka monta biotiinia sitovaa traptavidiini-yksikköä niissä on, minkä vuoksi eri näytteiden bandit ovat suhteellisen kaukana toisistaan.

Keitetyissä näytteissä (KUVA 7) streptavidiinit ovat denaturoituneet ja menettäneet siksi tetrameerirakenteensa. Geelikuvassa voidaan nähdä kaksi bandia ladderin 10–15 kDa:n välillä, jotka ovat traptavidiinin ja kuolleen streptavidiinin monomeerejä. Koska kuollut streptavidiini on kooltaan pienempi (Protparam N.d.), voidaan päätellä sen olevan bandeista alempi, koska pienemmät proteiinit kulkeutuvat SDS-PAGE-geelillä nopeammin (Campbell ym. 2017, 123–124). Kaksoisbandien tummuudesta voitiin myös päätellä eri monomeeriyksiköiden suhteellinen lukumäärä. Mikäli tetrameerinen proteiini sisälsi enemmän kuollutta streptavidiinia kuin traptavidiinia, oli bandeista alimmainen toista tummempi; näin oli muun muassa monovalentin traptavidiinin kohdalla, jossa kuolleen muodon monomeeriyksiköitä on kolme. Sekä keittämättömissä että keitetyissä fraktion A näytteissä kuitenkin on havaittavissa pelkkä vinkuliini. Todennäköisimmin kyseessä on pipetoinnista johtunut virhe, sillä näytettä käytettiin reaktioihin vain 1 µl, jolloin pipetointi vaatii erityistä tarkkuutta.

Muita laadunvarmistuksen keinoja olivat partikkelikokoa ja homogeenisyyttä määrittävä DLS ja massafotometria. DLS-tulosten perusteella (kuvio 3) näytteet olivat koostumukseltaan homogeenisiä, koska jokaisissa rinnakkaisissa

mittauksissa piikkejä oli vain yksi. Molekyylien koko vaikutti myös kasvavan traptavidiini-yksiköiden lisääntyessä, mikä oli odotettavaa. Monovalentin muodon kokoa yritettiin myös kokeilla mitata uudella massafotometrillä, mutta tulos (kuvio 4) poikkesi noin 7 kDa proteiinin teoreettisesta koosta (Protparam N.d). Tulos on kuitenkin suuntaa antava ja käytetty laite oli uusi, jonka vuoksi sille ei ollut vielä olemassa valmiita standardeja. Voi siis olla, että tarkemmilla standardeilla olisi päästy lähemmäs proteiinin oikeaa kokoa.

Biotiinin sitoutumiskohtien lukumäärän SDS-PAGE määrittelyllä pystyttiin toteamaan, että monovalentti traptavidiini saatiin erottumaan hyvin muista muodoista. Biotekniikan alan kirjallisuuslähteiden perusteella traptavidiinia ei ollut koskaan puhdistettu monovalenttina. Monovalenttia streptavidiinia ja sen eri variaatioita on kuitenkin tutkittu ja hyödynnetty pitkään, joten tuloksia oli helppo verrata muihin vastaavanlaisiin töihin, esimerkiksi Fairhead ym. vuonna 2014 julkaisemaan artikkeliin. Opinnäytetyössä käytettyä tuotto- ja puhdistusprosessia voisi kuitenkin vielä optimoida tulevaisuuden käyttöä varten. Esimerkiksi menetelmän toimivuuden varmistuessa kaikkia käytettyjä laadunvarmistuksen analyysijä ei välttämättä tarvitsisi suorittaa, mikä tekisi tuotannosta tehokkaampaa. Kunhan lopputuotteen laatu voidaan todeta tarpeeksi tarkasti, voisi tuotannon tehokkuus olla eduksi esimerkiksi lopputuotteen kaupallistamisen kannalta.

## LÄHTEET

Agilent. N.d. BL21-CodonPlus Competent Cells. Luettu 8.10.2023.  
<https://www.agilent.com/en/product/protein-expression/competent-cells-for-difficult-protein-expression/codon-bias/bl21-codonplus-competent-cells-232942>

Brinton, C., Finn, F., Hofmann, K., Montibeller, J. & Wood, S. 1980. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Luettu 1.11.2023.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349906/>

Beel, C., & Lewis, M. 2000. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. Nature Structural & Molecular Biology. Vol.7, 209-214.

Berenstein, E. & Grodzki, A. 2010. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. Methods in molecular biology. Clifton, N.J. Luettu 30.10.2023. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_3)

Campbell, M., Farrell, S. & McDougal, O. 2017. Biochemistry, 9th Edition. Boston: Cengage Learning, 123-124.

Chivers C., Crozat E., Chu C., Moy V., Sherratt D. & Howarth M. 2010. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. PubMed Central. Luettu 3.10.2023.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862113/>

Chinnapen, D., Dorrestein, P., El-Husseini A., Gerrow K., Grandy M., Howarth M., Kelleher N. & Ting A. 2006. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. Luettu 3.10.2023.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2576293/>

Correa, A. & Opezzo, P. 2015. Overcoming the Solubility Problem in E. coli: Available Approaches for Recombinant Protein Production. Insoluble Proteins. Methods in Molecular Biology, vol 1258. Humana Press, New York, NY.  
[https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_2](https://doi-org.libproxy.tuni.fi/10.1007/978-1-4939-2205-5_2)

Fairhead, M., Veggiani G., Lever, M., Yan, J., Mesner, D., Robinson, C., Dushek, O., Van der Merwe, A. & Howarth M. 2014a. SpyAvidin Hubs Enable Precise and

Ultrastable Orthogonal Nanoassembly. *Journal of the American Chemical Society*. Luettu 18.10.2023. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja505584f>

Green, N. M. 1975. Avidin."In *Advances in Protein Chemistry*, Volume 29. Academic Press, 85-133.

Labrou, N. 2014. Protein purification: An overview. *Methods in molecular biology*. Clifton, N.J. Vol 1129, 3-10.

Liu, F., Mei, Y. & Zhang, J. 2016. The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system: A computational investigation through molecular dynamics simulations. *Scientific reports* 6/2016. Luettu 17.10.2023. [https://www.nature.com/articles/srep27190.epdf?sharing\\_token=pjeoR7MOCdi5T4LJBIZcWdRgN0jAjWei9jnR3ZoTv0MfH3VMQbEaW58QuCx0HS2\\_Y8vLyrJldGOHduIPybNxlAioLXlujmWTrZDiHni1Ngw3A5hXH4XmxTXvbgSnnb6xSIKS65WhE4xhhuTlu\\_GJZw%3D%3D](https://www.nature.com/articles/srep27190.epdf?sharing_token=pjeoR7MOCdi5T4LJBIZcWdRgN0jAjWei9jnR3ZoTv0MfH3VMQbEaW58QuCx0HS2_Y8vLyrJldGOHduIPybNxlAioLXlujmWTrZDiHni1Ngw3A5hXH4XmxTXvbgSnnb6xSIKS65WhE4xhhuTlu_GJZw%3D%3D)

Malvern Panalytical. 2023. Zetasizer Advance Range: Light Scattering for every application. Luettu 25.10.2023.

[https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizeradvancerange?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=EN%20%20Malvern%20%20Product%20%20Zetasizer&utm\\_term=dls%20instrument&utm\\_content=2221741020&gad=1&gclid=CjwKCAjweKpBhAbEiwAqFL0muhRRMKUH6ACG\\_2LUCg2Ocpf7MEGYGGIxKcuTryZt5BpHf7FFBgEWhoCEbwQAvD\\_BwE](https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizeradvancerange?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=EN%20%20Malvern%20%20Product%20%20Zetasizer&utm_term=dls%20instrument&utm_content=2221741020&gad=1&gclid=CjwKCAjweKpBhAbEiwAqFL0muhRRMKUH6ACG_2LUCg2Ocpf7MEGYGGIxKcuTryZt5BpHf7FFBgEWhoCEbwQAvD_BwE)

McKenna, S. A., Patel, T. R. & Stetefeld, J. 2016. *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*. Biophys Rev. National Library of Medicine. Luettu 30.10.2023

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425802/>

McLaughlin, K. 2020. Glutamic acid. *Biology dictionary*. Luettu 27.9.2023.

<https://biologydictionary.net/glutamic-acid/>

Piszczyk, G. & Wu, D. 2021. Standard protocol for mass photometry experiments. *Eur Biophys J*. Luettu 1.11.2023.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8344692/#R1>

Prescott, Sherwood, Willey & Woolverton. 2009. *Prescott's principles of microbiology*. Boston. Mc-Graw-Hill, 378.

Protparam. N.d. *Expasy*. Käytetty 18.9.2023

<https://web.expasy.org/protparam/>

Refeyn. N.d. *Basics of mass photometry*. Refeyn Ltd. Luettu 1.11.2023.

<https://www.refeyn.com/app-notes-basics-of-mass-photometry>



Sino Biological. N.d. Recombinant Protein Production. Luettu 29.10.2023.  
<https://www.sinobiological.com/resource/protein-review/protein-production>

## LIITTEET

### Liite 1. Tuotto- ja puhdistusprotokolla

1(3)

## Monovalentin traptavidiinin tuotto ja puhdistus

### Puskurit:

- Hen egg lysozyme
- 100 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Triton-X100, 5 mM EDTA
- 6 M Guanidium hydrochloridi, pH 1.5
- Wash/binding buffer: 50 mM sodium borate + 300 mM NaCl pH 11.0
- Elution buffer: 20 mM Na-phosphate pH 2.0
- Dialysis buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8.0
- PBS pH 7.4

### Plasmidit:

pET21-core traptavidin = Tr

pET21a-Streptavidin-Dead =SAd

### Käytetyt solut:

- BL21-CodonPlus (DE3)-RIL
- BL21 Star (DE3)
- TOP10 (Minipreppiä varten)

### Punaiset merkinnät: poikkeamat ja lisäykset

1. Normaali transformaatio BL21(DE3) soluihin. Näiden pitäisi olla Amp. Maljalta yksi pesäke 10 ml startteriin, LB + 0.8% Glukoosi + Amp (tai carb). O/N ravistelu 37C:ssä 220 rpm.

2. Aamulla startteri laimennettu litraan LB + glukoosi + amp. Kasvatus kunnes OD600 = 0.8. Indusointi IPTG:llä (1:1000 laim.). Ota 100 µl Pre-Induction näyte 1.5 ml putkeen, fuugaa solut pohjaan, poista supernatantti ja pakasta pelletti

3. Ravistelu 37C 4h 220 rpm. Ota 50 µl Post-Induction näyte ja käsittele kuten edellä. Pelletointi fuugaamalla, esim 20 min 5000g +4C:ssä. Siirto 50 ml putkeen pakastusta vasten. ts. resuspaa pelletti pieneen määrään LB:tä, siirrä putkeen ja fuugaa uudelleen. Poista supernatantti ja pakasta -80C pakastimeen. Onnistuneen induktion jälkeen pelletti on noin 50 ml putken kartiomaisen osan kokoinen. Isompi pelletti voi tarkoittaa *huonompaa* indusointia.

4. Optional: Aja Pre/Post induction näytteet SDS-PAGEen, värjää PAGE-Bluella ja varmista, että indusointi onnistunut. Streptavidiinimonomeeri on pieni ~16 kDa, joten älä aja ajorintamaa ulos geeliltä.

5. Sulata solupelletti. Resuspaa huolella 15 ml:ään 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. Lisää lysozymi (0.1 mg/ml) ja inkuboi 30-45 min roller-shakerilla huoneenlämmössä. (jatkuu)

6. Lisää 0.5% Triton-X100 (750 µl 10% stokkia vedessä) ja EDTA:ta 5 mM 2(3) loppukonsentraatioon. Sekoita huolella ja siirrä jälle jäähtymään. Sonikoi tavallisen ohjeen mukaan, esim. 3x 2 min, 10sec on 20 sec off. Sekoita varovasti kääntelemällä väleissä ja lisää jäitä. Pidä tarvittaessa taukoja. Älä anna seoksen lämmetä! Puhdista proben pää näytteiden välissä paperilla ja vedellä.
7. Fuugaa 30 min 20 000 g, +4C. Poista *supernatantti*. Resuspaa pelletti huolellisesti 30 ml:ään 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Triton-X100, 5 mM EDTA. Aloita resuspaamalla 10 ml tilavuuteen ja lopuksi laimentaa 30 ml:ään.
8. Fuugaa uudelleen 30 min 20 000 g, +4C, poista supernatantti ja toista pesu. Inklusiobodyn pitäisi alkaa vaaleta.
9. Pese pellettiä kolmannen kerran, mutta jätä pois Triton-X100 ja EDTA. Eli siis 30 ml (10 + 20 ml) 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. Fuugaus voi myös olla kovemmilla kierroksilla, esim. 30 min 20 000 g, +4C.
10. Pese pelletti neljännen kerran, jälleen ilman Tritonia ja EDTA:ta.
11. Liuota pelletti 8 ml:ään 6 M Guanidium hydrochloridia, pH 1.5. Anna liueta huoneenlämmössä. Varovainen sekoitus pienellä magneetilla nopeuttaa liukenemistä. Katso, että kaikki inklusiobodyn kappaleet ovat liunneet.
12. Poista ei-liukoiset roskat ja partikkelit fuugaamalla 30 000g, +4C, 30 min. Siirrä supernatantti varovasti uuteen putkeen.
13. Laimenna pienet näytteet Nanodrop mittausta varten 6M Gu-HCl:llä, 1:10 ja 1:50. Mittaa nanodropilla A280. **Poolattu yhteen RIL ja BL21 näytteet. Tehty x10 laimennos, josta mitattu uusi konsentraatio**
14. Sekoita Traptavidiinia ja tapettua SA:ta molaarisessa suhteessa 1:2 (esim. 6 ml traptavidiinia + 12 ml dead-SA jos *molempien konsentraatiot samat*).
15. Valmistele PBS pH 7.4 refoldingia varten, jokaista 6-8 ml:ää kohden tehdään yksi pullo. Jäähdytä 250 ml 1x PBS:ää 500 ml pullossa jäällä +4C tai alle. Lisää isohko magneetti ja vie kylmähuoneeseen magneettisekoittajalle. Säädä magneettisekoittaja niin, että pyörre pullossa yltyä juuri ja juuri magneettiin asti.
16. Poista 20-30 ml ruiskusta mäntä ja kiinnitä 10 µl pipetin kärki (Esim. 200 ml kärki adapterina). Varmista kiinnitys esim. parafilmilla. Aseta ruisku statiiviin pystysuoraan PBS pullon yläpuolelle.
17. Lisää 6 ml (**laitettu 7ml**) straptavidiiniliuosta ruiskuun. Anna tippua 10 µl kärjen läpi nopeasti pyörivään PBS:ään, vortexin keskelle. Kun kaikki liuos on tippunut läpi, laske nopeus niin hitaalle, että magneetti vielä luotettavasti pyörii. Jätä pyörimään hitaasti yön yli +4C:ssä.
18. Siirrä ruisku seuraavan pullon kohdalle ja toista tiputtelu.
19. Foldattu streptavidiini on nyt liukoisena PBS:ssä. Valkoinen höttö on ei-foldannutta proteiinia ja pitää suodattaa pois. Taittele suodatinpaperi suppiloon ja suodata liuos uuteen pulloon. Rinnakkaiset refoldaus-reaktiot voi tässä vaiheessa tarvittaessa yhdistää

3(3)

1-2 litran pulloon. Vältä liuoksen vaahtoamista, valuta liuos tarvittaessa laitaa pitkin.

20. **Seokset fuugattu ja kerätty supernatantti.** Saosta streptavidiini ammoniumsulfaatilla. Jokaista 200 ml kohden lisää 120 g ammoniumsulfaattia. Kippaa ammoniumsulfaatti erissä suppiloon ja murskaa tarvittaessa kököt ennen lisäämistä.

21. Anna saostua 90 min +4C:ssä sekoittaen hitaasti magneettisekoittajalla. Pelletoi fuugaamalla erissä 20 000 - 30 000g, **(käytetty 24 000 G )** 20 min + 4C. Poista supernatantti, lisää seosta samaan putkeen ja toista fuugaus. 6-8 rinnakkaisen putken käyttö nopeuttaa pelletointia. **(Tehty suurempiin fuugiputkiin, joten rinnakkaisia ei tarvittu noin paljon)**

22. Liuota pelletit yhteensä 30 ml:ään 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.5 ja poolaa samaan putkeen.

23. Poista kaikki ei-liukoinen materiaali fuugaamalla 10 000g, 30 min +4C ja säästä supernatantti.

24. Valmistele 5 ml **(käytetty 4 ml resinpatsasta)** 2-iminobiotiiniresiiniä. **Pylvästä inkuboidaan 30 min 0,5 M NaOH:ssa.** Pylväs valmistellaan pesemällä: (a) 2x 20 ml MilliQ, (b) 2x 20 min Elution buffer (20 mM Na-phosphate pH 2.0), (c) 2x 20 ml Binding buffer (50 mM Na-boraatti, 300 mM NaCl, pH 10.5).

25. Laimenna näytettä 1:1 Binding bufferilla (50 mM Na-boraatti, 300 mM NaCl, pH 10.5), jotta pH riittävän korkea sitoutumiseen. Lisää näyte erissä pylväaseen ja anna virrata läpi painovoimaisesti. Pese pylvästä 3x 20 ml binding bufferilla.

26. Nimikoi ja valmistele eluutioputket (15 kpl). Lisää 2.0 ml eppariin valmiiksi 150 µl Neutralisaatiopuskuria (1M Tris-HCl, pH 8.0).

27. Eluoi streptavidiini pylvästä 20 ml:llä Eluutiopuskuria (20 mM Na-phosphate pH 2.0). Lisää pylväaseen, inkuboi 3 min ja kerää 1.5 ml fraktioita. Mittaa absorbanssi nanodropilla neutralisoitua eluutiopuskuria vasten.

28. Poolaa yhteen kaikki fraktiot, joissa absorbanssi > 0.5. **Yhdistetty näytteet, joiden konsentraatio on yli 0,5 mg/ml**

29. Dialysoi eluutiofraktiot 2x 2 litrassa 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (ilman suolaa).

30. Pese 2-iminobiotiiniresiini (a) 2x 20 ml MilliQ, (b) 1x 20 ml 0.1 M NaOH, (c) 2x 20 ml MilliQ, (d) 1x 20 ml 20% EtOH. Varastoi +4:ssä.

31. Aja näyte streptavidiinista SDS-PAGEeseen. Jaa näyte ennen keittämistä kahteen ja keitä vain toinen puolikas. Pidä ajolaite jäällä ja aja riittävän hitaasti (160-180V) niin streptavidiinitetrameeri pysyy ehjänä. Ei-keitetyn näytteen (tetrameeri) pitäisi näkyä noin 40-50 kDa kohdalla ja keitetyn näytteen (monomeeri) noin 12 kDa kohdalla.

## **Ioninvaihtokromatografia, Monovalentin avidiinin puhdistus**

The clarified mixture of either Tre/DTag or Tr/DCatch was first purified on a 5 mL iminobiotin-sepharose affinity column (Affiland, S.A.) using 50 mM sodium borate, 300 mM NaCl pH 11.0 as the binding and wash buffer and 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2.2 as the elution buffer.

The eluate was then exchanged into 20 mM Tris·HCl pH 8.0 by dialysis and loaded onto a 5 mL Q-HP column (GE Healthcare).

The different forms were isolated by using a 50 column volumes (i.e., 250 mL) linear gradient of 0.15–0.4 M NaCl and collecting 5 mL fractions with a 4 mL/min flow rate using 20 mM Tris·HCl pH 8.0 as the running buffer.

For closely eluting peaks, SDS-PAGE sometimes showed that separation was incomplete, in which case a second round of ion-exchange chromatography was performed by loading samples onto a 1 mL Mono-P 5/50 GL column (GE Healthcare) with 1 mL/min flow rate.

**Separation was performed by applying a 60 column volumes (i.e., 60 mL) linear gradient of 0.25–0.4 M NaCl and collecting 2 mL fractions. The eluted fractions were concentrated to 5–10 mg/mL using a Vivaspin centrifugal concentrator 30 kDa cutoff (GE Healthcare), dialyzed into PBS, and stored at –80 °C.**

**Protein concentrations were determined from A280 using the extinction coefficient calculated from the amino acid sequence using the ProtParam tool.** Concentrations of all streptavidin forms refer to the concentration of monomer. The pI of each monomer was estimated from the sequence using the ProtParam tool. The tetramer pI was estimated from the weighted mean of the pI of each monomer.

Lähde:

Fairhead, M., Veggiani G., Lever, M., Yan, J., Mesner, D., Robinson, C., Dushek, O., Van der Merwe, A, Howarth M. 2014a. SpyAvidin Hubs Enable Precise and Ultrastable Orthogonal Nanoassembly. *Journal of the American Chemical Society*. Luettu 18.10.2023.

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja505584f>

## Liite 3. DLS, näyte A

## Size Distribution Report by Volume

v2.2



## Sample Details

Sample Name: Traptavidin fraction A x10\_190923SJ 4

SOP Name: SOP\_Trīs\_NaCl\_seekop.sop

General Notes: in 50 mM Trīs, 100 mM NaCl, 10 mM TCEP, pH8  
stored at 4 degC

File Name: Example Results.dts

Dispersant Name: 50 mM Trīs, 100 mM NaC...

Record Number: 99

Dispersant RI: 1,332

Material RI: 1,45

Viscosity (cP): 0,9020

Material Absorbtion: 0,001

Measurement Date and Time: tiistai 19. syyskuuta 2023 ...

## System

Temperature (°C): 24,9

Duration Used (s): 100

Count Rate (kcps): 88,0

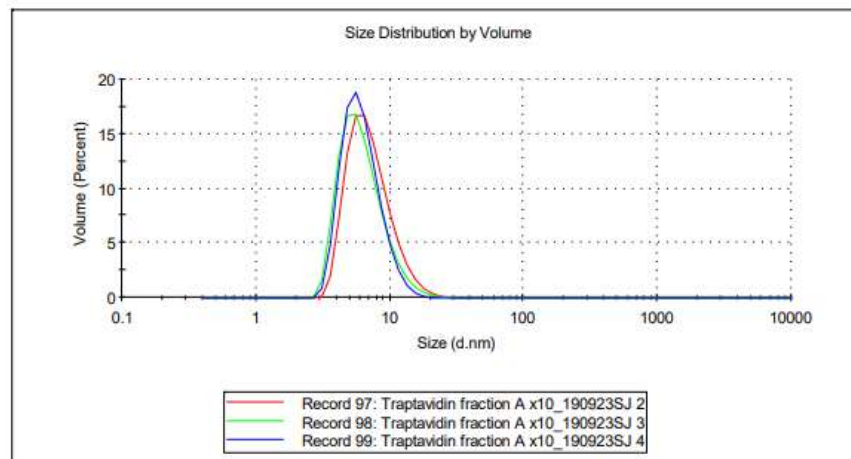
Measurement Position (mm): 3,00

Cell Description: Disposable micro cuvette (...)

Attenuator: 11

## Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 6,777	<b>Peak 1:</b> 6,359	100,0	2,169
<b>PdI:</b> 0,226	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,525	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality Refer to quality report</b>			



## Liite 4. DLS, näyte B

## Size Distribution Report by Volume

v2.2



## Sample Details

**Sample Name:** Traptavidin fraction B x10\_190923SJ 5  
**SOP Name:** SOP\_Trис\_NaCl\_seekop.sop  
**General Notes:** 290115NK  
 WPRE 2A  
 in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM TCEP, pH8  
 stored at 4 degC  
**File Name:** Example Results.dts      **Dispersant Name:** 50 mM Tris, 100 mM NaC...  
**Record Number:** 105      **Dispersant RI:** 1,332  
**Material RI:** 1,45      **Viscosity (cP):** 0,9020  
**Material Absorbtion:** 0,001      **Measurement Date and Time:** tiistai 19. syyskuuta 2023 ...

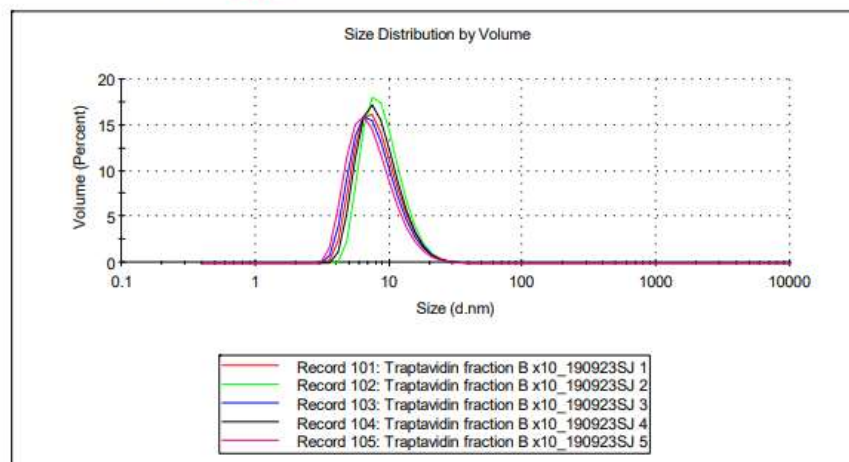
## System

**Temperature (°C):** 25,1      **Duration Used (s):** 70  
**Count Rate (kcps):** 178,3      **Measurement Position (mm):** 3,00  
**Cell Description:** Disposable micro cuvette (...      **Attenuator:** 11

## Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 10,31	<b>Peak 1:</b> 7,842	100,0	3,368
<b>Pdl:</b> 0,205	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,541	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



## Liite 5. DLS, näyte C

## Size Distribution Report by Volume

v2.2



## Sample Details

Sample Name: Traptavidin fraction C x10\_190923SJ 1

SOP Name: SOP\_Trīs\_NaCl\_seekop.sop

General Notes: in 50 mM Trīs, 100 mM NaCl, 10 mM TCEP, pH8  
stored at 4 degC

File Name: Example Results.dts

Dispersant Name: 50 mM Trīs, 100 mM NaC...

Record Number: 106

Dispersant RI: 1,332

Material RI: 1,45

Viscosity (cP): 0,9020

Material Absorbtion: 0,001

Measurement Date and Time: tiistai 19. syyskuuta 2023 ...

## System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 264,7

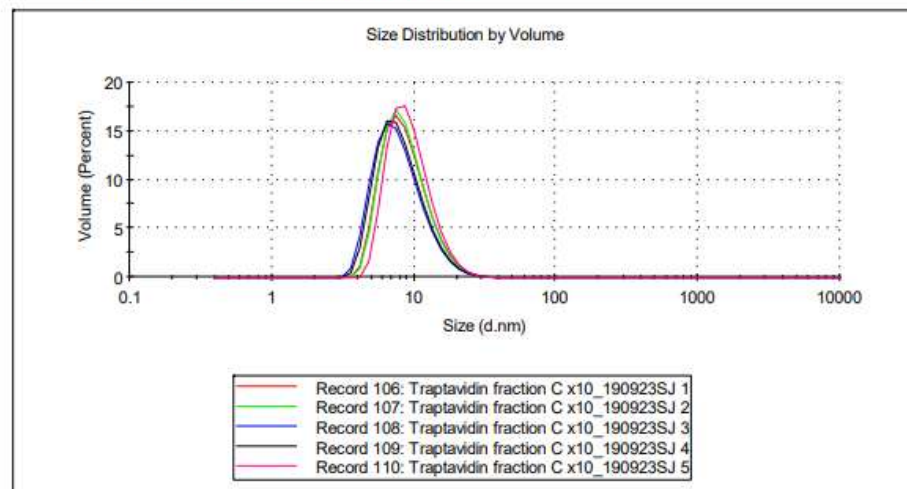
Measurement Position (mm): 3,00

Cell Description: Disposable micro cuvette (...)

Attenuator: 11

## Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 11,77	<b>Peak 1:</b> 9,115	100,0	3,692
<b>Pdl:</b> 0,169	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,496	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b> Refer to quality report			





## Liite 6. DLS, näyte D

## Size Distribution Report by Volume

v2.2



### Sample Details

**Sample Name:** Traptavidin fraction D x10\_190923SJ 1

**SOP Name:** SOP\_Trис\_NaCl\_seekop.sop

**General Notes:**

in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM TCEP, pH8  
stored at 4 degC

**File Name:** Example Results.dts

**Dispersant Name:** 50 mM Tris, 100 mM NaC...

**Record Number:** 111

**Dispersant RI:** 1,332

**Material RI:** 1,45

**Viscosity (cP):** 0,9020

**Material Absorption:** 0,001

**Measurement Date and Time:** tiistai 19. syyskuuta 2023 ...

### System

**Temperature (°C):** 25,0

**Duration Used (s):** 70

**Count Rate (kcps):** 195,0

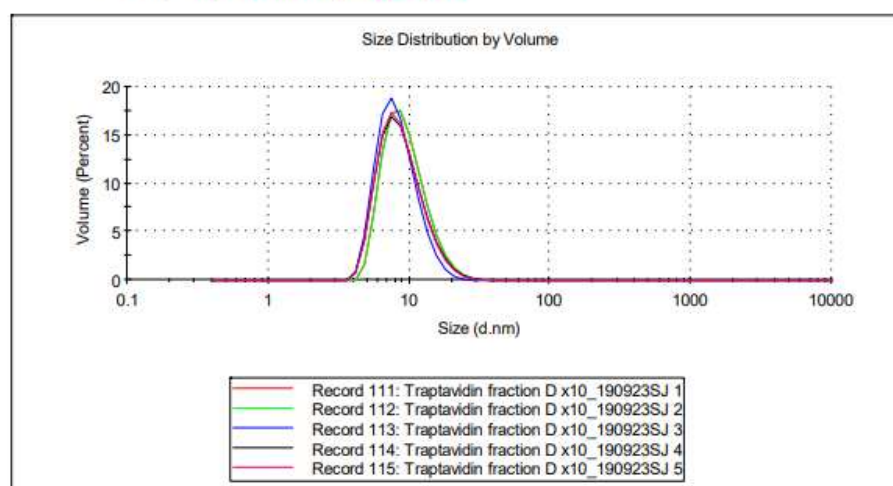
**Measurement Position (mm):** 3,00

**Cell Description:** Disposable micro cuvette (...)

**Attenuator:** 11

### Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 11,53	<b>Peak 1:</b> 9,721	100,0	3,574
<b>Pdl:</b> 0,177	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,521	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b> Refer to quality report			



## Liite 7. DLS, näyte E

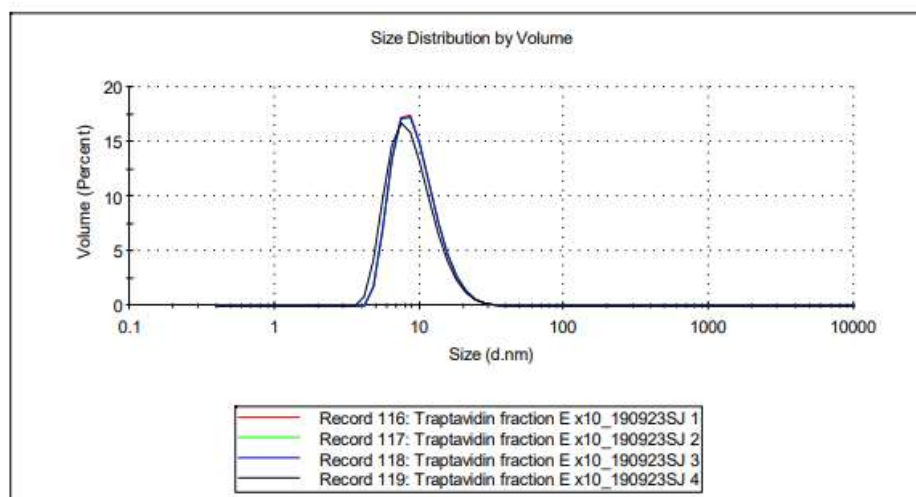
**Size Distribution Report by Volume**

v2.2

**Sample Details****Sample Name:** Traptavidin fraction E x10\_190923SJ 4**SOP Name:** SOP\_Trис\_NaCl\_seekop.sop**General Notes:**in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM TCEP, pH8  
stored at 4 degC**File Name:** Example Results.dts**Dispersant Name:** 50 mM Tris, 100 mM NaC...**Record Number:** 119**Dispersant RI:** 1,332**Material RI:** 1,45**Viscosity (cP):** 0,9020**Material Absorbtion:** 0,001**Measurement Date and Time:** tiistai 19. syyskuuta 2023 ...**System****Temperature (°C):** 24,9**Duration Used (s):** 60**Count Rate (kcps):** 292,2**Measurement Position (mm):** 3,00**Cell Description:** Disposable micro cuvette (...)**Attenuator:** 11**Results**

	<b>Size (d.nm):</b>	<b>% Volume:</b>	<b>St Dev (d.nm):</b>
<b>Z-Average (d.nm):</b> 11,93	<b>Peak 1:</b> 9,305	100,0	3,710
<b>Pdl:</b> 0,162	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,515	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** **Good**



## Liite 8. 2-Iminobiotiinipuhdistuksen tulokset

TAULUKKO 3. Affiniteettikromatografian fraktioiden konsentraatiot

fraktio	c(mg/ml)		A280		A260/A280		pylväs 1	pylväs 2
1	0,043	0,042	0,13	0,12	0,31	0,33		
2	0,132	0,071	0,39	0,21	0,44	0,45		
3	1,076	0,688	3,2	2,04	0,5	0,49		
4	2,399	0,084	7,13	0,25	0,5	1,57		
5	4,502	3,65	13,38	10,85	0,51	0,5		
6	3,812	6,648	11,33	19,76	0,5	0,51		
7	1,3	3,998	3,86	11,88	0,51	0,51		
8	0,105	0,342	0,31	1,02	0,49	0,5		
9	0,018	0,027	0,05	0,08	0,25	0,29		
10	0,015	0,019	0,05	0,06	0,15	0,29		
11	0,016	0,017	0,05	0,05	-	0,32		
12	0,007	0,007	0,2	0,02	-	-		
13	0,008	0,007	0,2	0,02	-	-		
14	0,006	0,006	0,2	0,02	-	-		

- -> negatiivinen  
tulos

## Liite 9. Protparam, kuollut streptavidini

**STREPTAVIDIN DEAD**

1(2)

**ProtParam****User-provided sequence:**

10 20 30 40 50 60  
 MAEAGITGTW YAQLGDTFIV TAGADGALTG TYEAAVGNAE SRYVLTGRYD SAPATDGSST  
 70 80 90 100 110 120  
 ALGWTVAWKN NYRNAHSATT WSGQYVGGAE ARINTQWLLT SGTTEANAWK STLVGHDFTF

KVKPSAAS

[References](#) and [documentation](#) are available.

**Number of amino acids:** 128**Molecular weight:** 13371.60**Theoretical pI:** 5.53

Top of Form

**Amino acid composition:** [Ohjausobjekti]

Ala (A)	21	16.4%
Arg (R)	4	3.1%
Asn (N)	6	4.7%
Asp (D)	5	3.9%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	3	2.3%
Glu (E)	5	3.9%
Gly (G)	16	12.5%
His (H)	2	1.6%
Ile (I)	3	2.3%
Leu (L)	7	5.5%
Lys (K)	4	3.1%
Met (M)	1	0.8%
Phe (F)	2	1.6%
Pro (P)	2	1.6%
Ser (S)	9	7.0%
Thr (T)	19	14.8%
Trp (W)	6	4.7%

Tyr (Y)	6	4.7%
Val (V)	7	5.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Bottom of Form

**Total number of negatively charged residues (Asp + Glu):** 10**Total number of positively charged residues (Arg + Lys):** 8**Atomic composition:**

(jatkuu)

Carbon	C	590	2(2)
Hydrogen	H	891	
Nitrogen	N	163	
Oxygen	O	192	
Sulfur	S	1	

**Formula:** C<sub>590</sub>H<sub>891</sub>N<sub>163</sub>O<sub>192</sub>S<sub>1</sub>

**Total number of atoms:** 1837

**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient      41940

Abs 0.1% (=1 g/l)    3.136

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 6.02

This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 62.73

**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.273

MAEAGITGTW YAQLGDTFIV TAGADGALTG TYEAAVGNAE SRYVLTGRYD  
 SAPATDGSGTALGWTVAWKN NYRNAHSATT WSGQYVGGAE ARINTQWLLT SGTTEANAWK  
 STLVGHDTFTKVKPSAAS

## Liite 10. Protparam, traptavidini

## TRAPTAVIDIN

1(2)

## ProtParam

## User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MAEAGITGTW YNQLGSTFIV TAGADGALTG TYESAVGNAE GDYVLTGRYD SAPATDGSST

      70      80      90     100     110     120
ALGWTVAWKN NYRNAHSATT WSGQYVGGAE ARINTQWLLT SGTTEANAWK STLVGHDFTT

      130
KVKPSAASEE EEEE

```

[References](#) and [documentation](#) are available.

**Number of amino acids:** 134

**Molecular weight:** 14106.18

**Theoretical pI:** 4.45

Top of Form

**Amino acid composition:** [Ohjausobjekti]

Ala (A)	19	14.2%
Arg (R)	3	2.2%
Asn (N)	7	5.2%
Asp (D)	5	3.7%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	3	2.2%
Glu (E)	11	8.2%
Gly (G)	17	12.7%
His (H)	2	1.5%
Ile (I)	3	2.2%
Leu (L)	7	5.2%
Lys (K)	4	3.0%
Met (M)	1	0.7%
Phe (F)	2	1.5%
Pro (P)	2	1.5%
Ser (S)	10	7.5%
Thr (T)	19	14.2%
Trp (W)	6	4.5%
Tyr (Y)	6	4.5%
Val (V)	7	5.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Bottom of Form

**Total number of negatively charged residues (Asp + Glu):** 16

**Total number of positively charged residues (Arg + Lys):** 7

**Atomic composition:**

Carbon	C	617
Hydrogen	H	925

(jatkuu)

Nitrogen	N	167
Oxygen	O	212
Sulfur	S	1

2(2)

**Formula:** C<sub>617</sub>H<sub>925</sub>N<sub>167</sub>O<sub>212</sub>S<sub>1</sub>**Total number of atoms:** 1922**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 41940

Abs 0.1% (=1 g/l) 2.973

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 17.72

This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 58.43**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.446

MAEAGITGTW YNQLGSTFIV TAGADGALTG TYESAVGNAE GDYVLTGRYD  
 SAPATDGS GTALGWTVAWKN NYRNAHSATT WSGQYVGGAE ARINTQWLLT SGTTEANAWK  
 STLVGHDTFTKVKPSAASEE EEEE