

## 단 보

# *Streptomyces subbrutilus* P5의 천연 Fe superoxide dismutase와 N-말단 6xHis-태그가 결합된 Fe superoxide dismutase의 활성비교

박종호 · 김재현\*

단국대학교 미생물학과

## Comparison of enzyme activities of the native and N-terminal 6xHis-tagged Fe superoxide dismutase from *Streptomyces subbrutilus* P5

Joong-ho Park and Jae-heon Kim\*

Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

(Received May 20, 2016; Revised June 13, 2016; Accepted June 17, 2016)

**ABSTRACT:** This study was carried out to analyze the differences in enzyme activity and stability between the native Fe superoxide dismutase (FeSOD) and the 6xHis-tagged superoxide dismutase (6xHis-FeSOD) of *Streptomyces subbrutilus* P5. The optimum pHs for both native FeSOD and 6xHis-FeSOD were 7, while the pH range of the activity was narrower for the 6xHis-FeSOD. The native FeSOD was stable at pH 4-9, but the 6xHis-FeSOD lost its stability at pH > 9. The temperatures of the optimum activities were same for both types of enzymes. However, the heat stability of the 6xHis-FeSOD was clearly decreased; even at 20°C the enzyme lost the activity after 360 min. In contrast, the native FeSOD was stable after 720 min at below 40°C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibition was occurred already at 0.5 mM for the 6xHis-tagged enzyme. Therefore, from the results that the 6xHis-FeSOD retained the enzyme activity at pH 6-7 and 20-40°C, it can be assumed that the protein structure became destabilized under different storage conditions and sensitive to the enzyme inhibitor.

**Key words:** *Streptomyces subbrutilus* P5, 6xHis tag, Fe superoxide dismutase, heat, pH, stability

Superoxide 음이온(O<sup>•-</sup>)은 대표적인 활성산소종(ROS)으로써 호기성대사과정의 전자전달계로부터 또는 다양한 효소반응의 결과 생성된다(Halliwell and Gutteridge, 1999). Superoxide 음이온은 단백질, DNA, 지질 등에 반응하여 유해한 작용을 하므로 이를 제거하는 superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 생물의 생존에 필요하다(Farr and Kogoma, 1991). SOD는 두 분자의 superoxide 음이온을 과산화수소와 산소 각각 한 분자씩으로 변화시켜서 산화적 스트레스를 줄이는 효소이다(Farr and Kogoma, 1991; Ames and Shigenaga, 1993). 실험에서 사용된 *Streptomyces subbrutilus* P5는 본 실험실에서 발견된 균주로서, 균주에서 생산되는 FeSOD는 superoxide 음이온을 제거하는 효소활성이 있는 것 외에 납과 같은 중금속을 흡착하는 특징을 가지고 있는 것으로 판명되었

으며, 중금속 내성을 나타내는 주요 원인이기도 하다(So *et al.*, 2001). 이 FeSOD를 *Escherichia coli*에서 N-말단 6xHis-태그가 부착된 재조합 FeSOD (6xHis-FeSOD)으로 발현시키면 효소활성이 유지되면서 *E. coli*의 납 저항성이 증가된다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2014). 이 결과는 *E. coli*에서 생산된 *S. subbrutilus* P5의 6xHis-FeSOD가 오염된 중금속을 제거하는데 이용될 수 있음을 보여주고 있다. 6xHis-태그는 재조합 단백질을 정제하기 위한 수단으로 널리 사용되고 있다. 보통은 6개의 히스티딘 잔기가 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 상태로 생산되며 6xHis-태그가 부착된 단백질은 금속친화성 크로마토그래피(IMAC)를 통하여 높은 순도로 손쉽게 정제될 수 있다. 6xHis-태그는 단백질의 구조와 활성에 중대한 영향을 미치지 않는다고 알려져 있으나(Carson *et al.*, 2007), 그렇지 않은 경우도 많이 보고되어 있다(Chant *et al.*, 2005). *S. subbrutilus* P5의 6xHis-FeSOD를 중금속 제거에 활용하기 위해서는 이 효소의 안정성이 필수적으로 요구된다. 따

\*For correspondence. E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr;  
Tel.: +82-41-550-3452; Fax: +82-41-559-7857

라서 본 실험에서는 *S. subtrutilus* P5가 생산한 세포 외로 분비된 천연 FeSOD와 *E. coli*에서 생산된 6xHis-FeSOD의 활성을 비교 분석하여 6xHis-태그가 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

본 실험을 위해 *S. subtrutilus* P5를 yeast extract-malt extract (YEME, ISP No. 2) 한천배지에서 계대배양하였고(30°C, 10 일), 같은 배양조건으로 YEME 한천배지에서 성장한 콜로니 표면을 긁어 모은 포자를 20% (w/v) 글리세롤 용액에 풀어서 -20°C에 보관하며 접종원으로 사용하였다. 전체 DNA를 추출하는 균체를 얻기 위해서는 34% (w/v)의 수크로스가 첨가된 YEME 배양액에서 30°C, 200 rpm으로 2일간 배양하였다. SOD의 클로닝과 발현을 위해서는 *E. coli* JM109 (Promega)와 *E. coli* M15 [pREP4] (Qiagen)를 LB에서 각각 200 rpm, 37°C에서 약 18시간 배양하였다. 필요에 따라서 ampicillin (100 µg/ml)이나 kanamycin (25 µg/ml)을 첨가하였다. PCR 산물의 클로닝을 위해서 pGEM-T easy 벡터(Promega)를 사용하였고, 6xHis-SOD를 발현시키기 위해서는 pQE30 (Qiagen)을 사용하였다.

*S. subtrutilus* P5의 전체 DNA는 guanidium thiocyanate, EDTA, lauroyl sarcosine이 포함된 세포용해 시약을 사용하여 추출하였다(Pitcher *et al.*, 1989).

*S. subtrutilus* P5가 생산한 세포외 FeSOD는 5일 동안 배양된 YEME 배양액으로부터 정제하였다. 배양액에 납을 첨가하여 침전된 단백질을 0.1 M EDTA가 첨가된 Tris-Cl (50 mM, pH 7.2)에 녹인 다음 투석을 통해 EDTA와 납을 제거하여 정제된 FeSOD를 얻을 수 있었고 SDS polyacrylamide gel 전기영동에서 단일 밴드를 확인하였다(Kim *et al.*, 2014).

6xHis-FeSOD를 생산하기 위해서 *S. subtrutilus* P5의 유전체 DNA를 주형으로 사용한 PCR를 통해서 *sodF* 유전자를 얻었다(GenBank KF826799). 정방향 프라이머는 5'-GGATCC GCCATCTACACGCTTC-3'이고 역방향 프라이머는 5'-AA GCTTGCCCTTGACGGGGAT-3'이었다. PCR은 30 cycle 수행되었는데 초기 변성(95°C, 5분), 변성(95°C, 1분), 프라이머 정열(68°C, 1분), 신장(72°C, 1분), 최종 신장(72°C, 10분) 순으로 진행되었다. 생성된 PCR 산물을 pQE30 (Qiagen)에 삽입하여 발현시켰다. 6xHis-FeSOD는 제조회사의 방법에 따라 Ni-NTA 수지와 이미다졸 농도구배를 이용한 비변성조건에서 정제되었으며 SDS polyacrylamide gel 전기영동에서 단일 밴드가 존재함을 확인하였다(Kim *et al.*, 2014).

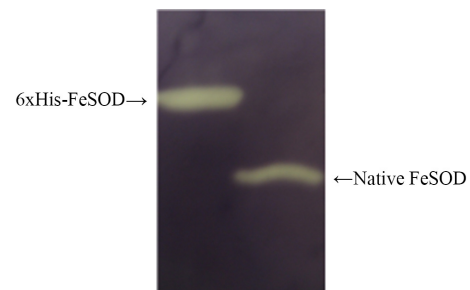
FeSOD의 활성염색을 위하여 12% polyacrylamide gel 비변성 전기영동을 실시하고 0.2% nitroblue tetrazolium 용액에 넣고 30°C에서 30분간 방치하였다. 그 후 *N, N, N', N'*-tetramethy-

lenediamine (0.028 M)과 리보플라빈( $2.8 \times 10^{-5}$  M)이 포함된 인산완충용액 (50 mM, pH 7.2)에 담근 후 조심스럽게 흔들면서 gel이 SOD 활성밴드를 제외하고 일정하게 푸른빛을 나타낼 때까지 형광을 쪼여주었다(Beauchamp and Fridovich, 1971). 필요에 따라서 다음과 같이 pH와 온도를 변화시키면서 염색하였다. 최적 pH 분석을 위해 활성염색 시 50 mM 인산 완충용액(pH 7.2)외에 50 mM 초산 완충용액(pH 4.2와 pH 5.2), 50 mM MES (pH 6.2), 50 mM TE (pH 8.2), 50 mM 붕산 완충용액 (pH 9.2와 pH 10.2)을 사용하였다. 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 효소를 1 M 초산 완충용액(pH 4.2와 5.2), 1 M MES (pH 6.2), 1 M HEPPO (pH 8.2), 1 M 글리신(pH 9.8) 1 M 인산 완충용액(pH 11)에 30분 동안 방치한 후 위에서 기술된 방법에 따라 활성염색을 실시하였다.

최적온도 분석을 위해 활성염색 시의 온도를 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 유지하였다. 또한 효소의 열 안정성을 조사하기 위해서는 효소용액을 각각의 온도에서 30분, 60분, 90분, 360분, 720분 동안 방치한 후 위에 기술한 방법에 따라 활성염색을 실시하였다.

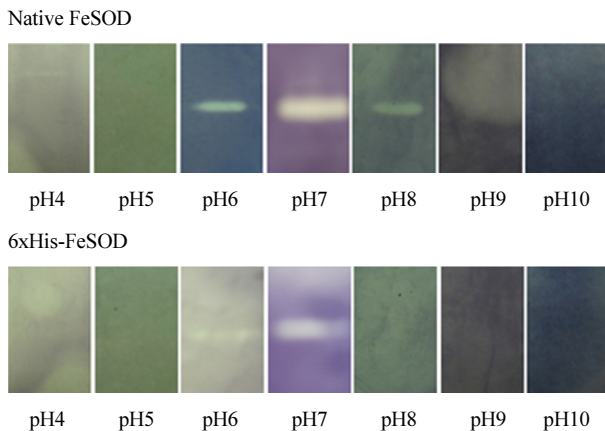
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 FeSOD 활성에 대한 저해농도를 측정하기 위하여 0.1 mM, 0.5 mM 및 5 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 처리한 후 활성염색을 실시하였다.

단백질 정제를 통하여 얻어진 천연 FeSOD와 6xHis-FeSOD를 비변성 조건으로 전기영동하고 활성염색을 실시한 결과 모두 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 6xHis-FeSOD가 천연 FeSOD보다 위쪽에 위치하는데 이것은 히스티딘 잔기의 긴 태그로 인해 분자의 이동이 방해 받은 결과인 것으로 생각된다. 활성 염색이 잘되는 것으로 보아 His-태그가 단백질의 활성에 미치는 영향이 크지 않다는 이전의 보고와 일치하는 것으로 생각된다(Carson *et al.*, 2007; Panek *et al.*, 2013).

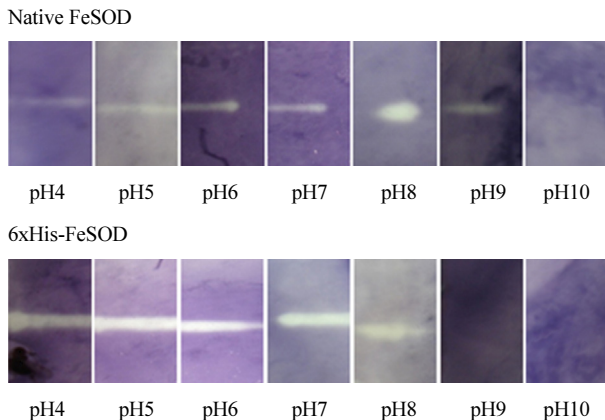


**Fig. 1.** Activity staining of 6xHis- and native FeSOD on native polyacrylamide gel. Native gel electrophoresis was carried out using 12% polyacrylamide slab gel. The enzyme bands were visualized by a negative staining through photochromatic reactions using nitroblue tetrazolium and riboflavin (Beauchamp and Fridovich, 1971).

SOD 활성에 대한 pH의 영향을 분석하였다. 천연 FeSOD는 pH 6, 7, 8에서 활성을 나타내며 pH 7에서 가장 강한 활성을 보였으며, 6xHis-FeSOD의 경우는 pH 6, 7에서만 활성이 나타났고 이중 pH 7에서 가장 강한 활성을 나타내어서 최적 pH는 두 경우에 모두 7.0으로 측정되었다(Fig. 2). FeSOD의 활성부위는 세 개의 히스티딘 잔기와 하나의 아스파르트산 잔기가 Fe와 배위결합을 이룬 특징적 구조를 이루고 있다(Miller, 2004). 6xHis-FeSOD는 pH변화에 보다 민감하여 pH 8에서는 활성이 상실되었는데 이는 활성부위의 구조에 미세한 변화가 유발되었음을 제시하고 있다. 특히 히스티딘 잔기에 수소이온의 결합되었는지 여부는 효소반응이 전이상태를 유지하는데 중요



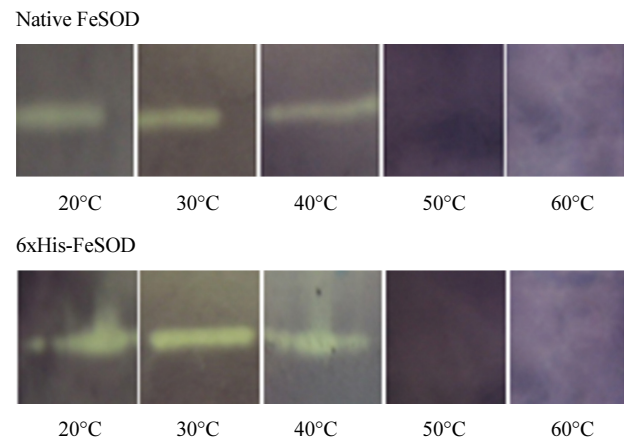
**Fig. 2.** Effects of pH on the activity of the native- and 6xHis-FeSOD. The buffers used for optimal pH determination were acetate (50 mM, pH 4.2 and 5.2), MES (50 mM, pH 6.2), phosphate (50 mM, pH 7.2), TE (50 mM, pH 8.2), and borate (50 mM, pH 9.2 and 10.2), respectively.



**Fig. 3.** The pH stability of the native- and 6xHis-FeSOD. The buffers used for pH stability were acetate (1 M, pH 4.2 and 5.2), MES (1 M, pH 6.2), phosphate (1 M, pH 7.2), HEPPSO (1 M, pH 8.2), and glycine (1 M, pH 9.8), phosphate (1 M, pH 11.0), respectively. The polyacrylamide gels were soaked into the appropriate buffers for 30 m before the activity staining procedure.

한 요인이 된다고 알려져 있다(Sato and Raleigh, 2002). 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 각기 다른 pH의 완충용액에 효소를 30분간 방치하면 두 종류의 FeSOD가 모두 산성 pH에서 안정성을 유지하지만 알칼리성 pH에서는 서로 상이한 결과를 보였다. 즉 pH 9에서 천연-FeSOD와는 달리 6xHis-FeSOD는 안정성을 상실하였다(Fig. 3). His-태그에 의해서 단백질의 활성은 유지되더라도 접힘이 변경되어 있음을 결정구조 분석을 통하여 보고되고 있다(Zhao *et al.*, 2015). 이러한 단백질 3차 구조의 미세한 변화는 내부의 아미노산 잔기의 겉보기 pKa를 변화시키고 이는 전하를 변화시켜 결국 단백질의 안정성에 큰 영향을 미칠 것이다(Sato and Raleigh, 2002). 그리고 높은 pH에서 금속이온의 활성부위 내에서의 기하학적 배치를 미세하게 변화시켜 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로 (Miller, 2004) 6xHis-FeSOD의 3차 구조는 천연 FeSOD와 다를 수 있고 그 영향이 알칼리성 용액에서 분명하게 나타남을 추측할 수 있다.

천연 FeSOD와 6xHis-FeSOD의 최적 온도 분석을 위해 각기 다른 온도에서 활성염색을 실시한 결과 두 효소 모두 20, 30 및 40°C에서 활성을 보였고 30°C에서 가장 강한 활성을 보였다(Fig. 4). 효소의 열안정성을 측정한 결과 천연 FeSOD의 경우 20–60°C에서 90분까지 활성을 유지하였고 40°C 이하에서는 720분까지 안정성을 유지하는 것으로 나타났다(Figs. 5 and 6). 반면에 6xHis-FeSOD는 50°C까지는 천연 FeSOD와 같았지만 60°C에서 90분 이상 방치했을 경우 활성을 나타내지 않았으며 360분 이상 방치할 경우 이 논문에서 제시한 모든 온도에서 활성을 상실한 것을 볼 수 있었다(Figs. 7 and 8). 6xHis-태그가 결합된 단백질의 경우 히스티딘 잔기가 단백질 소단위체

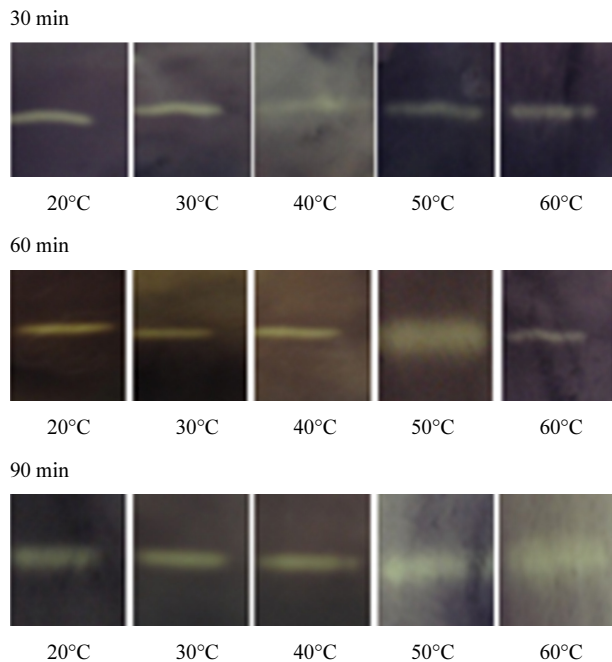


**Fig. 4.** Effects of temperature on the activity of the native- and 6xHis-FeSOD. The temperature was kept constant at 20, 30, 40, 50, or 60°C during the color development after riboflavin treatment.

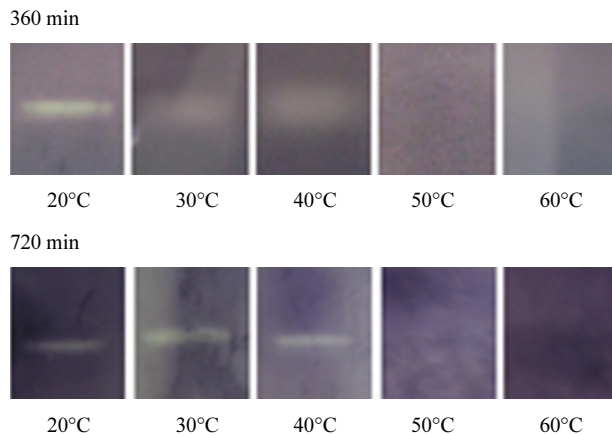
간의 결합을 방해함에 따라 단백질이 단량체로 분해되면서 열에 대한 안정성이 낮아지는 것이 보고되었다(van Gelder *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2015).

FeSOD에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 억제효과를 분석하기 위해 비변성 전기영동을 한 후에 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 처리한 후 활성염색을 실시하였다. 천연 FeSOD는 0.1 mM과 0.5 mM에서는 활성을 보인 반면 5 mM에서는 활성을 보이지 않았고 6xHis-FeSOD는 0.1 mM에서만 활성을 나타내었다(Fig. 9). FeSOD가 낮은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 억제되는 것은 잘 알려진

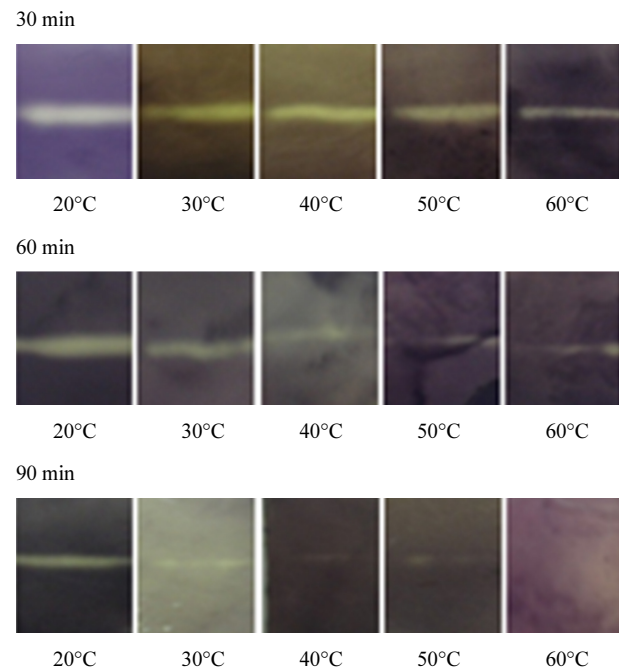
사실이다. 이번 실험에서도 그것을 확인할 수 있었다. 그리고 6xHis-FeSOD가 천연 FeSOD에 비해서 더 낮은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서도 억제 효과가 나타남을 알 수 있었다. 이는 His-태그에 의해서 활성부위의 Fe이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 더 쉽게 반응할 수 있도록 노출되어 있음을 보여준다. 효소의 Fe는 히스티딘 잔기와 배위결합으로 연결되어 있고 히스티딘 잔기는 트립토판 잔기, 글루타민 잔기, 타이로신 잔기들과 수소결합 네트워크를 형성한다고 한다. 이때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 Fe의 반응이 히스티딘 잔기 또는 트립토판 잔기를 파괴되어 억제효과를 보인다(Desai and Sivakami, 2007).



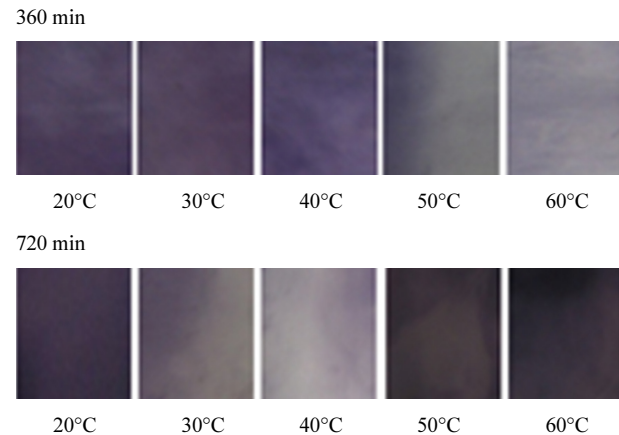
**Fig. 5.** The heat stability of the native FeSOD (30–90 min). The polyacrylamide gels were incubated for different times at constant temperatures indicated in this figure before the color development procedure.



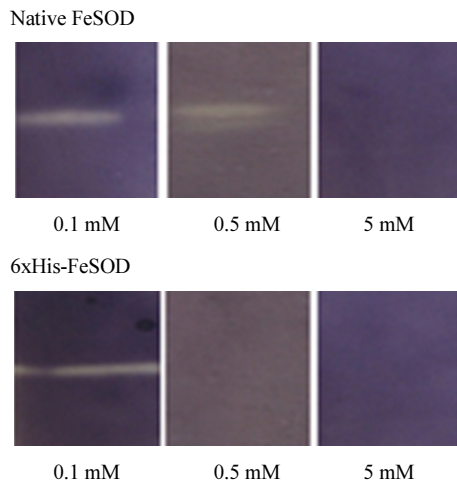
**Fig. 6.** The heat stability of the native FeSOD (360–720 min).



**Fig. 7.** The heat stability of the 6xHis-FeSOD (30–90 min).



**Fig. 8.** The heat stability of the 6xHis-FeSOD (360–720 min).



**Fig. 9.** The effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on native- and 6xHis-FeSOD. The polyacrylamide gels were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1, 0.5, and 5 mM, respectively) before the activity staining procedure.

온도와 pH와 억제물질의 영향을 알아본 결과 N-말단 6xHis-태그가 결합된 SOD가 천연 SOD에 비해 단백질 안정성이 낮은 것으로 보였다. 단백질이 생화학적 활성을 나타내기 위해서는 3차 구조로 접힘이 일어나야 하고 이때 나타나는 수소결합, 이온결합, 이황화결합, 염다리 등이 단백질의 안정성에 영향을 미치게 되며 특히 단백질의 수소결합은 pH의 안정성에 많은 영향을 미치게 된다(Horng *et al.*, 2004). 또한 단백질의 형태가 단량체인지 이합체인지도 단백질의 안정성에 영향을 미치는데 이합체의 형태로 존재하는 단백질이 단량체로 존재하는 단백질보다 pH와 온도에 대한 안정성이 더 높게 나타나는 것으로 보고되었다(Lin *et al.*, 1995).

비교적 짧은 길이의 His-태그는 단백질의 입체 구조와 기능에 미치는 영향이 미미할 것으로 생각되어 His-태그가 붙어 있는 상태로 실험이 수행되기도 한다. 그러나 많은 실험 결과들이 단백질의 기능에는 큰 영향이 없더라도 입체구조(conformation)가 크게 변할 수 있음을 나타내고 있다. *Aspergillus nidulans*의 질소대사 조절인자로 알려진 AreA의 N-말단에 His-태그가 결합되면 DNA와의 결합력에는 변화가 없으나 3차 구조의 변화는 유발된다. 이는 트립토판 잔기 주변의 입체적 배치가 달라진 때문인 것으로 생각되고 있다(Chant *et al.*, 2005). 쥐의 corticotropin-releasing factor receptor type 2a (CRF<sub>2(a)</sub>)의 경우에는 비록 리간드와의 친화성은 변하지 않지만 시스테인 잔기간의 이황화 결합 형성 양상(disulfide pattern)이 변화됨을 보여주고 있다(Klose *et al.*, 2004). *E. coli*에서는 N-말단 His-태그가 결합된 PhoE 소공 단백질(pore protein)이 정제 과정에서 단량체로 분리되는 반면에 천연 PhoE는 삼량체로 분리되

었다. 이러한 삼차구조의 변화는 단백질의 열안정성을 저하시킬 것으로 예상할 수 있는데 현재까지 보고된 몇 가지 논문에서 확인할 수 있다. *Staphylococcus*의 lipase는 N-말단 His-태그에 의해서 50°C에서의 효소활성 반감기가 40분에서 15분으로 크게 짧아졌다(Sayari *et al.*, 2007). 사람의 prolidase 경우에는 최적 온도(50°C)와 최적 pH (pH 7.8)은 변하지 않으나 37°C에서의 안정성이 약 1.5배 감소함을 관찰하였다(Lupi *et al.*, 2006). 말라리아 항원에 His-태그가 부착되면 천연 항원과는 다른 다중 접힘이 유발되어 열안정성의 변화뿐만 아니라 항원성의 변화도 일어나므로 His-태그 항원 단백질의 유용성이 떨어진다고 하였다(Khan *et al.*, 2012).

N-말단 6xHis-태그에 의해서 *S. subtrutilus* P5의 FeSOD의 열안정성이 뚜렷이 감소되는 것이 본 실험에서도 확인되었다. 즉 효소활성 자체는 변화가 없으나 미세한 3차 구조의 변화가 유발되었음을 시사하는 것으로 해석할 수 있다. 이 결과로부터 6xHis-태그가 결합된 FeSOD를 정제된 상태로 장기간 보관하면서 오염된 중금속 제거 물질로 이용하기에는 부적절한 것으로 생각되었다. 본 실험에서는 천연 FeSOD와 6xHis-태그가 결합된 FeSOD의 pH와 온도에 대한 안정성의 차이를 알아 보았다. 따라서 앞으로는 천연 FeSOD와 6xHis-태그가 결합된 FeSOD의 구조적인 부분을 더욱 연구하여 단백질 안에서의 여러 가지 결합을 비교하고 구조적인 차이를 연구하여야 할 것이다.

## 적 요

본 연구는 *Streptomyces subtrutilus* P5의 천연 Fe superoxide dismutase (FeSOD)와 유전자 재조합 기술로 생산된 6xHis-태그가 결합된 Fe superoxide dismutase (6xHis-FeSOD)의 활성을 비교하여 6xHis-태그의 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 수행되었다. 두 효소 모두 최적 pH는 7로 동일하였으나 6xHis-태그에 의해서 pH 범위는 축소되었다. 천연 효소는 pH 4-9의 범위에서 안정성을 보인 반면 6xHis-FeSOD는 pH 9에서 안정성이 상실되었다. 두 효소의 최적 온도는 차이가 없으나 열 안정성에 있어서는 천연 효소는 40°C 이하에서 720분까지 안정성을 유지하였으나 6xHis-FeSOD는 20°C에서도 360분 이내에 활성을 잃는 것으로 나타났다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 6xHis-FeSOD에 대한 저해는 0.5 mM에서 나타났다. 따라서 6xHis-FeSOD는 효소활성은 유지되더라도 열 안정성이 크게 감소되는 결과를 얻었다. 이것은 6xHis-태그가 활성부위 보다는 단백질 전체 구조에 더 많은 영향을 미친 결과라고 생각되었다.

## References

- Ames, B.N. and Shigenaga, M.K.** 1993. Oxidant are a major contributor to cancer and aging. pp. 1–15. In Halliwell, B. and Arouma, O.I. (eds.) DNA and Free Radicals. Ellis-Horwllid, New York, USA.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276–287.
- Carson, M., Johnson, D.H., McDonald, H., Brouillette, C., and DeLucas, L.J.** 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. Sect D: Biol. Crystallogr.* **63**, 295–301.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R., and Kneale, G.G.** 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expr. Purif.* **39**, 152–159.
- Desai, K. and Sivakami, S.** 2007. Purification and biochemical characterization of a SOD from the soluble fraction of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1661–1666.
- Farr, S.B. and Kogoma, T.** 1991. Oxidative stress in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561–568.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.** 1999. Free radical and toxicity. pp. 299–365. In Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Homg, J.C., Cho, J.H., and Raleigh, D.P.** 2004. Analysis of the pH-dependent and stability of histidine point mutants allows characterization of the denatured state and transition state for protein folding. *J. Mol. Biol.* **345**, 163–173.
- Khan, F., Legler, P.M., Mease, R.M., Duncan, E.H., Bergmann-Leitner, E.S., and Angov, E.** 2012. Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stability and immunodominance in mice. *Biotechnol. J.* **7**, 133–147.
- Kim, J., Han, K., Jung, H., and Lee, J.** 2014. Iron containing superoxide dismutase of *Streptomyces subbrutillus* P5 increases bacterial heavy metal resistance by sequestration. *Korean J. Microbiol.* **50**, 179–184.
- Klose, J., Wendt, N., Kubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., Bienert, M., Rudolph, R., and Rothmund, S.** 2004. Hexa-histidine tag position influences disulfide structure but not binding behavior of *in vitro* folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Sci.* **13**, 2470–2475.
- Lin, C.T., Lin, M.T., Chen, Y.T., and Shaw, J.F.** 1995. Subunit interaction enhances enzyme activity and stability of sweet potato cytosolic Cu/Zn-SOD purified by a His-tagged recombinant protein method. *Plant Mol. Biol.* **28**, 303–311.
- Lupi, A., Della Torre, S., Campari, E., Tenni, R., Cetta, G., Rossi, A., and Forlino, A.** 2006. Human recombinant prolidase from eukaryotic and prokaryotic sources. *FEBS J.* **273**, 5466–5478.
- Miller, A.F.** 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 162–168.
- Panek, A., Pietrow, O., Filipkowski, P., and Synowiecki, J.** 2013. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 163–166.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., and Owen, R.J.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 151–156.
- Sato, S. and Raleigh, D.P.** 2002. pH-dependent stability and folding kinetics of a protein with an unusual alpha-beta topology: the C-terminal domain of the ribosomal protein L9. *J. Mol. Biol.* **318**, 571–582.
- Sayari, A., Mosbah, H., Verger, R., and Gargouri, Y.** 2007. The N-terminal His-tag affects the enantioselectivity of staphylococcal lipases: A monolayer study. *J. Colloid Interface Sci.* **313**, 261–267.
- So, N.W., Rho, J.Y., Lee, S.Y., Hancock, I.C., and Kim, J.H.** 2001. A lead-absorbing protein with SOD activity from *Streptomyces subbrutillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**, 93–98.
- Van Gelder, P., Steiert, M., Khattabi, M., Rosenbusch, J.P., and Tommassen, J.** 1996. Structural and functional characterization of a His-tagged PhoE pore protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 869–875.
- Zhao, G., Jin, Z., Allewell, N.M., Tuchman, M., and Shi, D.** 2015. Structures of the N-acetyltransferase domain of *Xylella fastidiosa* N-acetyl-L-glutamate synthase/kinase with and without a His tag bound to N-acetyl-L-glutamate. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 86–95.