

## 사람의 p53 유전자와 Glutathione S-Transferase와의 융합 단백질의 대장균에서의 발현

오 상 진

전남대학교 자연과학대학 미생물학과

p53 유전자의 변화는 인간의 여러 암에서 가장 흔하게 발견되며 종양세포내에서는 이러한 변형된 p53 단백질 양의 증가가 초래된다. 세포내에 축적된 p53 단백질의 발견은 인간의 암증세를 판단할 유용한 기준이 되기도 한다. 본 연구에서는 이러한 면역조직화학 검사에 쓰일 수 있는 폴리클로날 항체를 만들기 위하여 사람의 p53 유전자를 glutathione S-transferase와의 융합 단백질의 형태로 대장균내에서 발현시켰다. p53의 아미노산 1-158번을 코딩하고 있는 *NcoI* fragment와 아미노산 159-393번을 코딩하는 *NcoI-BamHI* fragment를 *BamHI* linker를 이용하여 in frame으로 pGEX-2T의 *BamHI* 자리에 삽입하여 재조합 플라스미드 pGTNS와 pGTNL을 각각 만들었다. 또 PCR에 의한 증폭에 의하여 아미노산 38-145번을 코딩하는 유전자 부위를 증폭하였으며 *BamHI*과 *PvuII*로 절단하여 pGEX-2T의 *BamHI*과 *SmaI* 자리에 삽입함으로써 pGTBP를 제조하였다. 이들 재조합 균주들을 IPTG로 4시간 induction한 후 세포 추출물로부터 glutathione Sepharose bead를 이용하여 융합단백질을 분리하였다. Bead에 결합된 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였으며, 각각의 분자량은 54 kDa, 53 kDa와 40 kDa 였다. 이러한 방법으로 1리터 배양으로부터 약 1mg의 단백질을 정제하였다.

KEY WORDS □ p53 gene, pGEX-2T, glutathione S-transferase, fusion protein

p53 단백질은 53,000달톤의 분자량을 가지며, 정상세포의 핵에서 극미량 존재하는 인단백질(phosphoprotein)이다. p53의 발현은 세포주기를 통하여 엄격하게 조절되며, 실제로 세포증식의 조절에 관여하고 있다고 알려져 있다(1, 11, 13, 19, 20). 최근에 일련의 실험에 의하여 p53이 transcription activator로서의 기능을 함이 밝혀졌지만(9, 23) p53의 정확한 기능에 대해서는 아직도 불분명하다. 이에 덧붙여, p53 단백질은 cdc2 kinase의 기질로 이용되며, 이들 kinase중의 하나와 결합을 형성하므로 세포주기 조절과의 관련을 뒷받침하고 있다(21, 27). p53의 유전자는 암억제인자(tumor suppressor)로서 작용하며 야생형 p53 유전자는 여러 종류의 종양화 세포에서 세포성장과 분열을 억제하는 단백질을 코딩하고 있다(5, 11). p53 유전자에 돌연변이가 일어나게 되면 정상세포의 짧은 반감기의 p53 단백질을 안정화되어 세포내에 과량의 단백질이 축적되게 된다(6, 10, 17). p53 유전자의 변이는 인간의 암에서 가장 흔히 발견되는 유전적 특징이다(3, 14, 15, 22, 26, 28). p53의 돌연변이 빈도는 대장암, 유방암, 폐암 등에서 높으며, 백혈병, 골육종, 난소암, 위암, 뇌암 등에서도 보고되어지고 있다. p53 유전자의 돌연변이는 몇 가지 특징을 가지고 있는데, 첫째로 돌연변이가 종(species) 간에 진화적으로 잘 보존된 4군데의 conserved region(26)에 모여있다(아미노산 117-142, 171-181, 234-258과 270-286). 둘째로 이들 돌연변이는 주로

missense mutation으로 아미노산의 치환이 일어나서 단백질의 구조가 안정화 되도록 변화가 초래된다. 이와같은 p53 유전자의 돌연변이와 p53 단백질의 축적간에는 긴밀한 상관관계가 존재하므로(2) 암조직의 면역조직화학적 연구를 통하여 p53의 돌연변이와 증세를 알아내는데 이용할 수 있다. 셋째로 p53 단백질 안쪽에 숨겨져 있던 epitope가 돌연변이로 말미암아 바깥으로 드러나게 되어 단세포군 항체 PAb240에 의하여 인식되어진다(12). 또 암환자중의 일부는 이들 변형된 p53 단백질에 대한 항체를 형성하기도 한다(4, 7).

본 연구에서는 이러한 항원-항체 반응에 이용할 수 있는 폴리클로날 항체를 대량으로 얻기위해 단백질의 아미노말단과 카복시말단에 해당하는 유전자를 glutathione S-transferase 유전자와 in frame으로 연결하여 융합 단백질들을 제조하고 정제하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 plasmid

본 실험에서 사용된 야생형 p53 cDNA는 pC53Cx 27<sub>4</sub>와 pC53SN<sub>3</sub>이며, A.J. Levine 박사로부터 얻었다. 이들은 아미노산 72번에 arginine과 proline을 각각 가지고 있는 polymorphism을 나타내고 있다. Fusion vector로 사용한 pGEX2T는 Pharmacia로부터 구입하였으며, 형질전환에 쓰인 *E. coli* DH5 $\alpha$ 는 배

동규박사(전남대)로부터 얻었다.

#### Oligonucleotides

*Bam*HI linker 8-mer(CGGATCCG), 10-mer(CGGGATCCCG), 12-mer(CGCGGATCCGCG)들은 Promega로부터 구입하였으며 PCR을 위한 amplifier는 서울대학교의 유전공학연구소에 의뢰하여 제조하였다. Amplimer의 각 염기서열은 다음과 같다(5'-GTGGATCCCAAGCAATGGAT-3', 5'-GCGAATCCAAAGCTGTTCC-3').

#### Polymerase chain reaction

PCR은 50  $\mu$ l 반응에 0.5  $\mu$ g의 주형 DNA를 사용하였으며 반응혼합물에는 10 mM Tris-Cl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 각 primer 50 ng, 2.5 mM 4dNTPs, 1 unit *Taq* polymerase가 포함되어 있다. 반응혼합물 위에 mineral oil을 덮고 95°C에서 1.5분, 50°C에서 1.5분, 72°C에서 1.5분씩 30회 증폭하며 최종적으로 72°C에서 15분간 반응하였다. 5  $\mu$ l의 PCR 반응물을 꺼내어 *Taq*I, *Mbo*II, *Bsp*MI 등의 제한효소로 잘라서 mapping을 하여 확인한 다음, 나머지 PCR product를 2% low melting agarose(FMC SeaPlaque)로 elution하여 증폭된 700 bp DNA를 분리한다.

#### GST 융합 단백질의 발현 및 정제

GST 융합단백질은 *E. coli* 내에서 발현하였으며, Smith와 Johnson(1988)의 방법에 따라 분리하였다(25). 재조합 DNA로 형질전환시킨 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 overnight culture하여 그 다음날 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 배지로 1 : 10으로 희석하여 1시간 동안 37°C에서 배양한 다음, IPTG를 최종농도 0.5 mM로 가하여 4시간 동안 induction하였다.

융합단백질을 분리하기 위하여 박테리아 세포를 원심분리하고 1/10 volume의 NETN buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40)에 재분산하여 얼음위에서 sonication을 하여 세포를 깬다. Bacterial lysate를 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 상등액 1 ml에 0.5% skim milk를 포함한 NETN buffer로 세척된 30  $\mu$ l의 glutathione Sepharose(Pharmacia)를 가하여 30분간 4°C에서 rocking하였다. Glutathione Sepharose bead를 NETN으로 3번 세척하여 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하며 이를 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 하거나, 10 mM glutathione을 포함한 NETN buffer로 elution하였다. Degradation product가 섞이지 않은 순수한 융합단백질은 electroelution을 통하여 얻었다.

#### Thrombin cleavage

정제된 GST와의 융합단백질은 thrombin cleavage buffer[50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>]에서 human thrombin을 처리하는데 융합단백질의 0.2~1%(w/w) 정도를 가하였다. 반응은 25°C에서 30분~1시간 하고 cleavage pattern은 15% SDS-PAGE하여 분석하였다.

#### Electroelution

전기영동한 SDS-polyacrylamide gel의 양쪽 일부분을 잘라 Coomassie blue 용액에 30분간 담가 염색한 다음 2시간 동안 destaining하였다. 이 염색된 gel의 band를 기준으로 염색안된 나머지 gel을 잘라 내어 면도칼로 1 mm<sup>3</sup>의 작은 조각으로 잘게 썰었다. Elution cell과 elution apparatus는 Hunkapillar 등(16)에서 설명된대로 제작된 것을 사용하였다. Elution cell의 loading well을 음극으로 가도록 하고 여기에 잘게 썬 gel조각을 넣으며 elution buffer를 채웠다. 100 V로 2, 3, 4시간 지난 후 각각 400  $\mu$ l씩의 sample을 collecting well로부터 수거하고 mini gel apparatus로 전기영동하여 순도를 점검하였다.

## 결과 및 고찰

#### 융합단백질 유전자의 클로닝

pC53Cx27<sub>4</sub>는 야생형 p53 유전자의 72번 아미노산에 arginine polymorphism을 가지고 있다. pC53Cx27<sub>4</sub>를 *Bam*HI으로 잘라 생긴 1.8 kb의 fragment에는 p53유전자가 포함되어 있으며, 이를 *Nco*I으로 digestion하여 477 bp fragment(p53 단백질의 아미노달단 1-158번 아미노산을 coding)와 1.2 kb fragment(아미노산 159-393을 coding)를 분리하였다. 477 bp와 1.2 kb DNA fragment들을 Klenow enzyme로 gap filling을 하고, glutathione S-transferase (GST)와 같은 frame으로 삽입하기 위하여 p53 DNA 염기서열(29)을 분석하고 그에 따라 *Bam*HI linker 10-mer(Promega)를 사용하여 ligation 하였다(Fig. 1 A). Ligation한 DNA fragment를 *Bam*HI 효소로 overnight digestion하여 linker가 full digestion된 다음 low melting gel에서 elution하여 pGEX-2T의 *Bam*HI 자리에 cloning하였다(Fig. 1A). 이것으로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 형질전환하여 transformant들을 얻었으며, DNA를 miniprep하여 insert가 들어간 재조합 DNA를 찾아내었다(Fig. 2A). 또 이들의 orientation을 확인하기 위하여 477 bp fragment(아미노산 1-158)가 들어간 재조합 plasmid를 *Taq*I 효소로 digestion한 다음 그 전기영동 pattern을 비교하여 제대로 들어간 pGTNS와 거꾸로 들어간 pGTNSR을 찾아내었다(Fig. 2B). p53 단백질의 159-393번 아미노산을 포함한 1.2 kb의 DNA가 삽입된 재조합 DNA를 *Taq*I에 의한 제한효소 mapping으로 올바른 orientation으로 들어간 pGTNL과 거꾸로 들어간 pGTNLR을 찾아내었다(Fig. 2B). p53 단백질의 아미노산 11-212번을 포함한 607 bp의 *Taq*I fragment를 위와 같은 방법으로 Klenow enzyme로 gap filling하고 *Bam*HI linker 10-mer를 이용하여 pGEX-2T의 *Bam*HI 자리에 cloning하고 orientation을 분석하여 재조합 플라스미드 pGTTA를 분리하였다(Fig. 1A).

pC53SN<sub>3</sub>는 p53 단백질의 72번 아미노산에 pro-

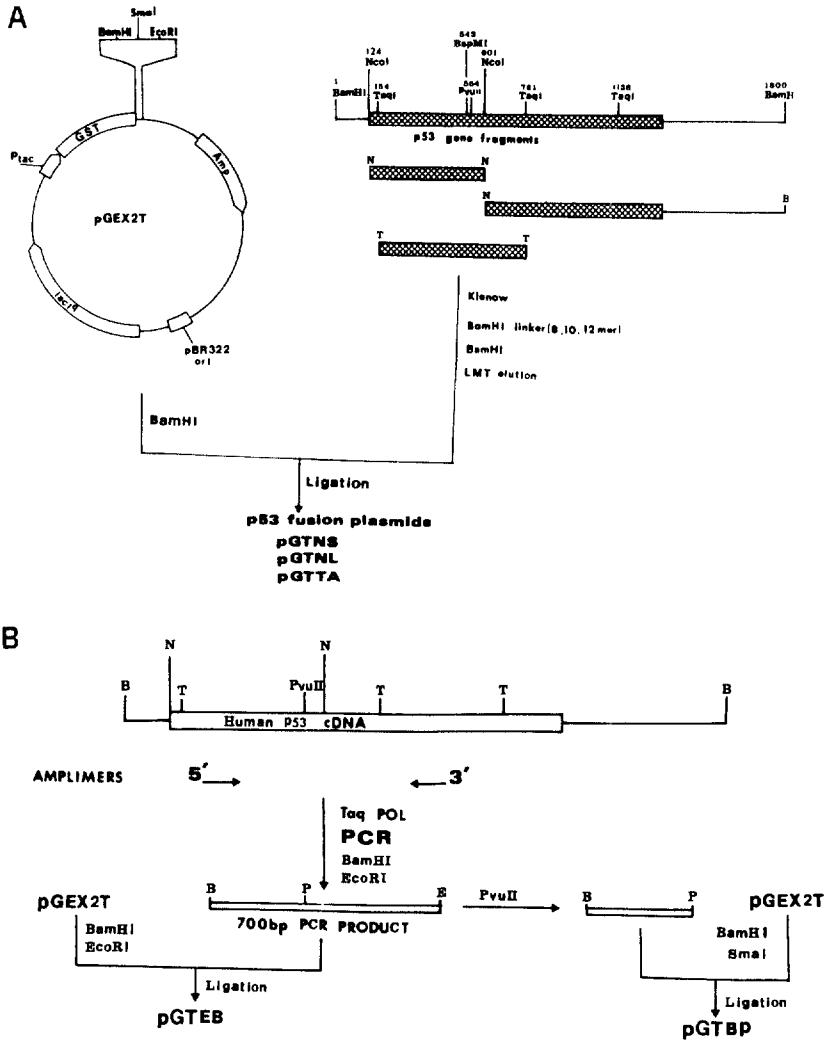


Fig. 1. Construction of p53 fusion plasmids.

(A) Construction using *Bam*HI linkers.

(B) Construction by PCR amplification.

5' Amplimer contained a *Bam*HI site, such that the resulting PCR product upon digestion with *Bam*HI could be ligated in frame into the unique *Bam*HI site present within the pGEX-2T polylinker. 3' Amplimer contained an *Eco*RI site, such that the resulting PCR product upon digestion with *Eco*RI could be ligated to the *Eco*RI site of pGEX-2T.

line polymorphism을 가지고 있으며 이 플라스미드에서 분리한, p53 유전자가 들어가 있는 1.8 kb의 *Bam*HI fragment를 주형으로 사용하여 PCR을 하였다(Fig. 1B). 증폭에 사용한 5'-amplimer와 3'-amplimer의 말단에는 각각 *Bam*HI 자리와 *Eco*RI 자리를 만들도록 고안하여 cloning에 용이하도록 하였다. PCR에 의해 증폭된 700 bp fragment를 *Taq*I, *Mbo*II과 *Bsp*MI 등으로 mapping한 결과, 제한효소 지도와 동일함을 알아내었고 정확하게 증폭되었음을 확인하였다(Fig. 3A). 증폭된 700 bp fragment를

*Bam*HI과 *Eco*RI으로 잘라 pGEX2T의 *Bam*HI과 *Eco*RI 자리에 삽입하여 pGTBE(아미노산 38-270을 coding)를 제조하였다(Fig. 3B). 700 bp PCR product를 *Pvu*II로 잘라 이것을 pGEX2T의 *Bam*HI과 *Sma*I 자리에 삽입하여 pGTBP(아미노산 38-145를 coding)를 만들었으며, *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 형질전환시켜 얻은 transformant들을 miniprep 하여 분석한 결과 325 bp insert가 들어가있는 재조합균주(pGTBP)를 찾았다(Fig. 3C).  
**융합단백질의 발현과 정제**

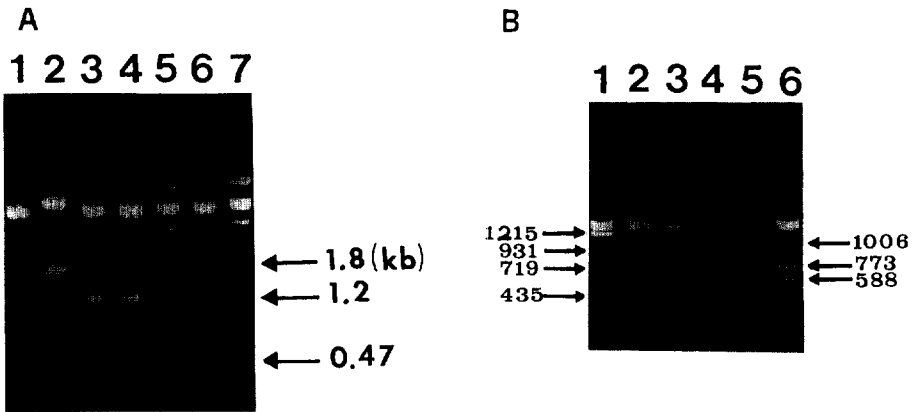


Fig. 2. Miniprep analysis of transformants.

(A) Identification of the inserts which are 477 bp and 1.2 kb. Lane 1, *Bam*HI-digested pGEX2T; 2, *Bam*HI-digested pC53Cx27<sub>4</sub>; 3,4, *Bam*HI-digested pGTNL; 6,7, *Bam*HI-digested pGTNS.  
 (B) Determination of orientations. In lane 1 and 2, the plasmids have the same insert, 1.2 kb-fragment generated from *Nco*I digestion, but orientations are different. Lane 1, *Taq*I-digested pGTNL; 2, *Taq*I-digested pGTNLR (reversed orientation); 3,4, *Taq*I-digested pGTNS; 5,6, *Taq*I-digested pGTNSR (reversed orientation).

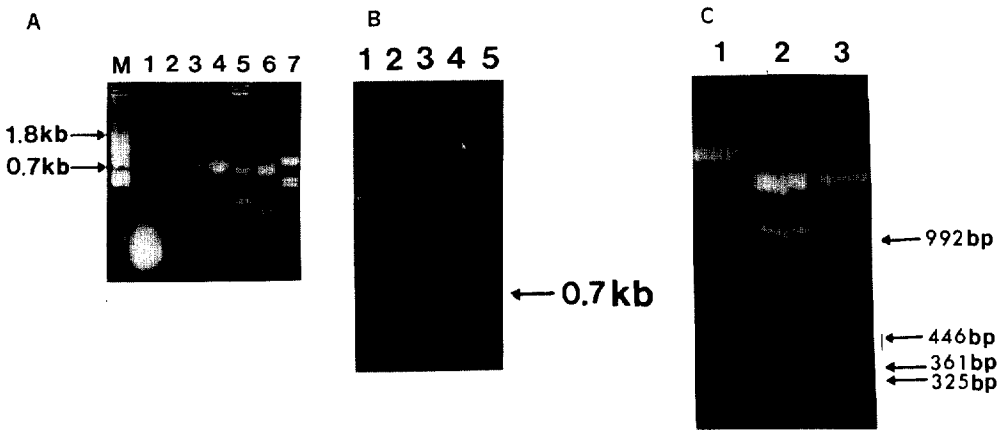
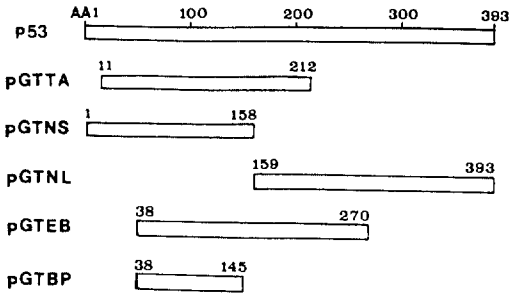


Fig. 3. PCR amplification and miniprep analysis.

(A) PCR reaction. M, marker; 1, reaction mixture without template DNA; 2, 1.8 kb-*Bam*HI fragment from pC53SN<sub>3</sub> as a template DNA; 3,4, PCR products; 5, PCR product digested with *Taq*I; 6, PCR product digested with *Mbo*II; 7, PCR product digested with *Bsp*MI.  
 (B) Identification of insert. Lane 1, linearized pGEX2T; 2,3,4,5, *Bam*HI-*Eco*RI digested pGTEB which contains amplified PCR product (700 bp).  
 (C) Identification of 325 bp-insert from pGTBP. Lane 1, *Bam*HI-*Eco*RI digested pGTBP; 2,3, molecular weight marker.

pGTNS(1-158), pGTNL(159-393), pGTTA(11-212), pGTEB(38-270), pGTBP(38-145) 등의 재조합된 플라스미드들(Fig. 4)을 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 도입하고 IPTG로 37°C에서 4시간 induction시켜 융합단백질을 발현하였다. Sonication한 cell extract를 glutathione Sepharose(Pharmacia)와 섞어 GST 융합단백질과 glutathione Sepharose bead를 결합시키고

비특이적으로 결합한 단백질을 NETN buffer로 세척하였다. 특이적으로 결합한 단백질들은 SDS sample buffer와 섞어 boiling하여 elution하고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 결과 pGTNS, pGTNL, pGTBP는 soluble fraction에 상당량의 융합단백질이 존재함을 발견하였으나(Fig. 5A, 5B) pGTTA와 pGTEB 경우는 융합단백질이 gel 상에서



**Fig. 4.** Schematic diagram of the fusion plasmids coding sequences.

Coordinates are measured in amino acids, with 1 representing the codon for the first amino acid at the N terminus of the protein.

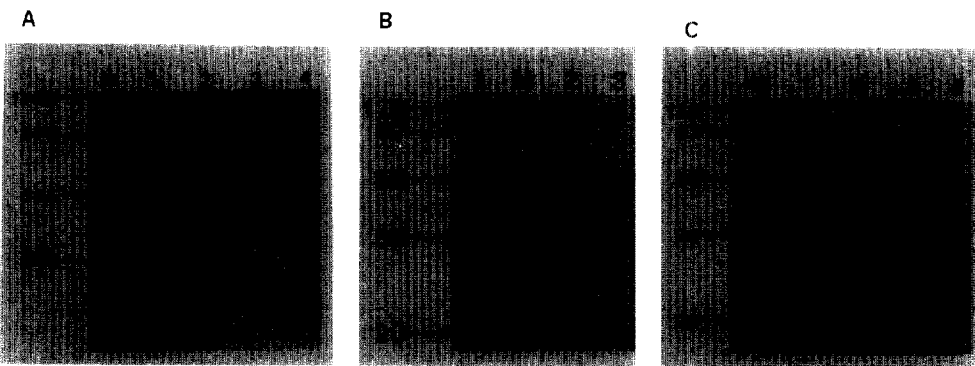
발견되지 않았으며 그 원인으로서는 단백질의 불안정성 또는 비효율적인 번역에 의해 초래되었을 가능성이 있다. pGTNS(1-158)에서는 54 kDa 위치에서 단백질의 band가 형성된 것에 비하여 동일한 유전자가 거꾸로 들어간 pGTNSR의 경우에는 54 kDa 위치에서 단백질의 발현이 안되는 것으로 보아 54 kDa 위치의 단백질이 GST와 p53(아미노산 1-158)과의 융합단백질임을 확인할 수 있다(Fig. 5A).

pGTNL의 경우에는 53 kDa 위치에 융합단백질이 형성되었으며 이것은 예상하였던 단백질의 분자량과 일치하였다(Fig. 5A). 그러나, 53 kDa band와 함께 70 kDa 위치에서 또다른 band가 발견되기도 하였는데(Fig. 5A), 이것은 53 kDa 융합단백질과 결합할 수 있는 단백질이 glutathione Sepharose에 의하여

함께 정제되었거나 또는 stop codon이 부분적으로 읽혔을 가능성이 있다. 또 pGTNS의 경우 pGTNL 보다 분자량이 더 크게 나오는 것은 아미노산 1-158 부분이 hydrophobic한 거대 아미노산과 proline-rich한 구조로 구성되어 있어 그 mobility에 영향을 주는 것으로 생각된다. pGTBP는 40 kDa 위치에서 융합단백질이 발현되었으며 단백질의 분해가 빠른 속도로 일어났다(Fig. 5B). 10 mM의 glutathione을 포함한 NETN buffer를 처리하여 융합단백질들을 elution하였으며 thrombin(Sigma)를 처리하였을 때 26 kDa의 GST band와 p53 단백질 band를 관찰할 수 있었다. 과다한 sonication과 융합단백질의 분해에 의한 degraded product들을 볼 수 있는데, 이러한 contamination을 방지하기 위하여 융합단백질을 10% SDS-polyacrylamide 전기영동한 다음, 해당 band를 잘라 electroelution에 의하여 순수분리 하였다(Fig. 5C). 전기영동을 시작한 후 2, 3, 4시간 마다 400  $\mu$ l씩 시료를 채취하고 이것을 Centricon-10을 통하여 salt의 제거와 단백질의 농축을 하였다. 이와같은 방법을 통하여 면역반응을 유도할 융합단백질을 순수 분리하였으며 1 liter의 배양으로 각각 1 mg 정도의 단백질을 정제할 수 있었다.

**GST-p53 융합단백질의 응용**

p53 유전자 돌연변이는 인간의 암에서 가장 흔하게 발견되는 유전적 변화이다(3, 14, 15, 22, 26, 28). p53의 돌연변이는 393개의 아미노산 중에서 아미노산 110 번에서 307번까지 돌연변이가 주로 모여 있으며(18) 그중에서도 6개 내외의 가장 변화가 많이 일어나는 hot spot이 분포하고 종양의 종류에 따라서 그 돌연변이의 양상에 차이가 있다. Hot spot이 일어나는 아미노산은 p53의 구조와 기능을 유지하는데 필수적



**Fig. 5.** Expression and purification of the fusion plasmids.

(A and B) Cell lysates expressing GST-p53 fusion proteins. In A, lane 1, pGEX-2T encoded GST; 2, pGTNS(1-159); 3, pGTNSR which has the same insert DNA as pGTNS but reversed orientation; 4, pGTNL(159-393). In B, lane 1, cell-lysate without IPTG induction; 2, pGTBP(38-145); 3, pGTNS(1-159).

(C) Electroelution of fusion proteins. Lane 1, 70 kDa-protein, which was appeared above the 53 kDa-protein of pGTNL; 2, pGTNL(159-393); 3, pGTNS(1-159); 4, pGTBP(38-145); M, molecular marker indicated in kilodaltons.

이라고 생각되며 여러 암에 있어서 나타나는 돌연변이 양상의 차이는 각 기관이 접하는 돌연변이원의 차이에 의존할 것이다. Schlichtholz 등(1992)에 의하면 유방암 환자의 혈청과 p53의 6개의 domain과의 면역블롯(immunoblot)실험을 통하여 아미노말단인 domain 1(아미노산 1-112)과 카복시말단인 domain 6(아미노산 306-393)가 높은 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다(24). 특히 p53의 아미노말단과 카복시말단 부분은 친수성 부분으로 항원의 표면에 나와있을 것으로 추정되며 B-세포의 면역반응을 유발시키는 가장 효과적인 epitope이다. 반면에 돌연변이가 주로 일어나는 hot spot 은 소수성인 p53 단백질의 중간 부분에 위치하며 단백질의 안쪽에 들어가있어 면역반응 유발에 비효과적이다.

p53의 돌연변이와 p53 단백질의 세포내 축적은 매우 긴밀한 상관관계를 갖고 있으며 p53의 활성화는 암의 전이와도 연관이 있다고 생각되기 때문에 이러한 세포면역화학반응은 임상적인 증세를 판정하는데 중요한 이용 가치가 있다. 본 실험에서는 면역조직화학, 면역침강, 면역블롯, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)(8) 등의 실험에 사용될 항체 생산을 위하여, p53의 아미노말단, 카복시말단, 그리고 그 중간 부분들을 포함한 유전자 부위를 glutathione S-transferase 유전자와 fusion시켜 다섯 종류의 fusion plasmid들을 만들고, 제한효소 mapping에 의하여 orientation과 함께 인접부위의 염기배열을 확인하였다. 각각의 플라스미드가 포함하는 p53의 부분은 Fig. 4에 요약되어 있다. 각 부분에 대한 융합단백질과 함께 이에 대하여 만들어진 항체를 이용해 p53의 돌연변이를 면역조직화학적(immunohistochemical) 검색에 의해서 찾아낼 수 있을 것이며 DNA 염기서열의 결정에 의하여 그것이 확인될 것이다. 이러한 방법에 의해 밝혀진 p53의 변화와 함께, 생존율과 치료에 대한 반응 등의 임상적 결과와의 상관관계를 조사 분석한다면 외부의 발암원과 내부에서 암의 진행을 도와주는 인자들에 관한 실마리를 찾을 수 있을 것이다.

## 감사의 말

본 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호 : 921-0400-041-1)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. Baker, S.J., S. Markowitz, E.R. Fearon, J.K.U. Wilson, and B. Vogelstein, 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**, 912-915.
2. Bartek, J., J. Bartkova, B. Vojtesek, Z. Staskova, J. Lukas, A. Rejthar, J. Kovarik, C.A. Midgley, J.V. Gannon, and D.P. Lane, 1991. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* **6**, 1699-1703.
3. Bressac, B., M. Kew, J. Wands, and M. Osturk, 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* **350**, 429-431.
4. Caron de Fromentel, C., L.F. May, H. Mouriessse, J. Lemerle, K. Chandrasekaran, and P. May, 1987. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer* **39**, 185-189.
5. Chen, P.-L., Y. Chen, R. Brookstein, and W.H. Lee, 1990. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* **250**, 1576-1580.
6. Clarke, C.F., K. Cheng, A.B. Frey, R. Stein, P.W. Hinds, and A.J. Levine, 1988. Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and *Escherichia coli* heat shock proteins: *in vitro* dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1206-1215.
7. Crawford, L.V., D.C. Pim, and R.D. Bulbrook, 1982. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* **30**, 403-408.
8. Epelbaum, R., A.H. Bartal, M. Rivkin, N. Tugendhaft, and C. Shalit, 1989. Competitive ELISA for detection of native *ras* gene-related products in sera of cancer patients. *J. Clin. Lab. Anal.* **3**, 209-214.
9. Fields, S. and S.K. Jang, 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**, 1046-1049.
10. Finlay, C.A., P.W. Hinds, T. Tan, D. Eliyahu, M. Oren, and A.J. Levine, 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms and hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 531-539.
11. Finlay, C., P. Hinds, and A.J. Levine, 1989. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.
12. Gannon, J.V., R. Greaves, R. Iggo, and D.P. Lane, 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* **9**, 1595-1602.
13. Hinds, P., C. Finlay, and A.J. Levine, 1989. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *J. Virol.* **63**, 739-746.
14. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. Harris, 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
15. Hsu, I., R. Metcalf, T. Sun, J. Welsh, N. Wang, and C. Harris, 1991. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* **350**, 427-428.
16. Hunkapillar, M.W., E. Lujan, F. Ostrander, and L.E. Hood, 1983. Isolation of microgram quantities of protein from polyacrylamide gels for

- amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol.* **91**, 227-236.
17. Levine, A.J., C. Finlay, and P.W. Hinds, 1989. The p53 protooncogene and its product. p. 21-37. In L. Villarreal (ed.), Common mechanisms of transformation by SV40, polyoma and papilloma viruses. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
  18. Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay, 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-456.
  19. Martinez, J., I. Georgoff, J. Martinez, and A.J. Levine, 1991. Cellular location and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Gene and Develop.* **5**, 151-159.
  20. Michalovitz, D., O. Halvey, and M. Oren, 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**, 671-680.
  21. Milner, J., A. Cook, and J. Mason, 1990. p53 is associated with p34cdc2 in transformed cells. *EMBO J.* **9**, 2885-2889.
  22. Nigro, J., S. Baker, A. Preisinger, J. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F. Collins, A. Weston, R. Modali, C. Harris, and B. Vogelstein, 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705-708.
  23. Raycroft, L., H. Wu, and G. Lozano, 1990. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* **249**, 1049-1051.
  24. Schlichtholz, B., Y. Legros, D. Gillet, C. Gaillard, M. Marty, D. Lane, F. Calvo, and T. Soussi, 1992. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res.* **52**, 6380-6384.
  25. Smith, D.B. and K.S. Johnson, 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
  26. Soussi, T., C. Caron de Fromentel, and P. May, 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**, 945-952.
  27. Sturzbecher, H.-W., T. Maimets, P. Chumakov, R. Brain, C. Addison, V. Simanis, K. Rudge, R. Philip, M. Grimaldi, W. Court, and J.R. Jenkins, 1990. p53 interacts with p34cdc2 in mammalian cells: implications for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene* **5**, 795-801.
  28. Takahashi, T., M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, and J.D. Minna, 1989. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**, 491-494.
  29. Zahut-Houri, R., B. Bienz-Tadmor, D. Givol, and M. Oren, 1985. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J.* **4**, 1251-1255.

(Received July 6, 1993)

(Accepted August 20, 1993)

---

**ABSTRACT: Expression of Human p53 Gene as Glutathione S-Transferase Fusion Proteins in *Escherichia coli***

**Sang-Jin Oh** (Department of Microbiology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

Alterations of the p53 gene are among the most frequent genetic changes in human cancer and often result in increased levels of p53 protein within the malignant cells. Detection of accumulated p53 protein can be a useful prognostic tool in human cancer. In order to make polyclonal antibodies for immunohistochemical screening, human p53 gene was expressed in *E. coli* in the form of GST (glutathione S-transferase) fusion proteins. Two p53 gene fragments, which were *NcoI* small fragment encoding amino acid residues of 1-158 and *NcoI* large fragment of 159-393, were subcloned into the unique *BamHI* site present within the pGEX-2T vector using *BamHI* linker and recombinant plasmids pGTNS and pGTNL were constructed, respectively. The p53 cDNA fragment (from pC53-SN<sub>3</sub>) encoding amino acid 38-145 (proline at residue 72) was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplified DNA was digested with *BamHI* and *PvuII* and inserted into the *BamHI-SmaI* sites of pGEX-2T and recombinant plasmid pGTBP was constructed. After IPTG induction of these plasmids for 4 hours, fusion proteins were purified from *E. coli* extracts with glutathione Sepharose beads. The bound proteins were resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the molecular weights were 54 kDa, 53 kDa and 40 kDa, respectively. Approximately one milligram of fusion proteins were purified from 1-liter cultures.