Thesis Title	Production and Characterization of Recombinant p53 Protein produced from pAK400 Vector and pET-15b Vector to be used as an Antigen for the Development of p53 Autoantibody Detection Kit in Cancer Patients
Author	Miss Saranya Pimpa
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis Advisory Committee	Assist. Prof. Dr. Ratchada Cressey — Chairperson Assist. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana — Member

ABSTRACT

An ideal tumor marker would allow a simple blood test to detect cancer. However, due to a lack of sensitivity and specificity, no single marker has been recognized as a true marker. Alterations of the p53 tumor suppressor gene are the most commonly observed genetic abnormalities in many different types of human cancers. The accumulation of mutant p53 often leads to the production of p53 autoantibody in the sera of patients with various cancers. A report concluded from 80 serological analyses of p53 status in 18 cancer types suggested that the presence of p53 possessed as high as 95% specificity for cancer, however this was compromised by the lack of sensitivity of only 20-40%. The limitation of sensitivity is believed to be partly dependent on the way p53 antigen was produced. An evaluation of the commercial ELISA kits using three different sources of p53 antigen revealed that the solid-phase ELISA using prokaryotically expressed wild-type p53 showed highest diagnostic accuracy. Therefore, in this study, two prokaryotic expression systems, pAK400 and pET-15b(+), were used to express p53 and the produced proteins were examined and characterized in order to develop a p53 autoantibody detection kit. Wild type full-length p53 cDNA was cloned into BCCP (biotin carboxyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

carrier protein) containing expression vector, pAK400 or hexahistidine-tag [$(His)_6$] containing vector, pET-15b(+). The BCCP in pAK400 vector serves as an *in vivo* substrate mimic for *E. coli* biotin ligase, thus p53-BCCP fusion protein produced from this expression system is readily biotinylated *in vivo* and without any further purification step can be selectively immobilized onto the avidin coated microtiter plate. The pET-15b vector, however, produced $(His)_6$-p53 protein which needed to be subsequently purified by using metal-affinity chromatography before coating onto an ELISA plate. In order to screen for p53 autoantibody-positive sera, the purified $(His)_6$-p53 fusion protein was subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with serum from lung cancer patients, which then along with a commercial p53 mAb (DO7) were used as positive controls to set up the ELISA. After obtaining optimal bacterial culture conditions and ELISA conditions, the results showed that $(His)_6$-p53 fusion protein, but not p53-BCCP, was able to differentiate p53 autoantibody-positive sera from those that were negative. When we used produced $(His)_6$-p53 protein to detect p53 antibody in 26 lung cancer patient's sera, Western blot analysis has identified 16 out of 26 (61.2%) cancer patients to be positive for producing p53 autoantibody and 6 out of 26 (23.0%) cancer patients were found positive using an established ELISA. When the ELISA cut off was designed by using the mean values of negative sera plus 3SD, it was found that ELISA only able to discriminate 6 strongly positive out of total 16 positive cases. Our data suggest that Western blot analysis should be used in combination in order to confirm and improve sensitivity of the ELISA result. Our preliminary results indicated that Thai lung cancer patients may develop p53 autoantibody as high as 61.2% of total patients tested, however, it remains to be further investigate their clinical implications and in a large group of sample.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีน พี53 ลูกผสมที่ผลิตจาก พีเอเค400 เวคเตอร์ และ พีอีที-15บี เวคเตอร์ เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับพัฒนาชุดตรวจหาออโต้แอนติบอดีต่อโปรตีน พี53 ในผู้ป่วยมะเร็ง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศรัญญา ปิมปา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. รัชดา เครสซี่ ประธานกรรมการ ผศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา กรรมการ

บทคัดย่อ

ตัวบ่งชี้มะเร็ง (Tumor marker) ในอุดมคติต้องสามารถที่จะใช้บ่งถึงการเกิดมะเร็งในร่างกายได้โดยเพียงแค่การเจาะเลือดมาตรวจ อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดทั้งทางด้าน ความจำเพาะ และความไว ยังไม่มี tumor marker ใดเลยที่มีคุณสมบัติของ tumor marker ในอุดมคติดังกล่าว ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับยีนต้านมะเร็ง p53 เป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในมะเร็งหลายๆชนิด ส่งผลให้มีการสะสมเพิ่มมากขึ้นของโปรตีน p53 ที่ผิดปกติ (mutant p53) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือด มีการสรุปผลจาก 80 รายงานวิจัยในมะเร็งกว่า 18 ชนิด แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 มีความจำเพาะต่อการเกิดโรคมะเร็งสูงถึงร้อยละ 95 แต่กลับมีความไวที่ต่ำเพียงร้อยละ 20-40 เท่านั้น ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 มีความไวต่ำ อาจเนื่องมาจากแหล่งของโปรตีน p53 ที่นำมาใช้เป็นแอนติเจน จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการประเมินเปรียบเทียบชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ซึ่งมีแหล่งที่มาของโปรตีน p53 ที่แตกต่างกัน 3 ชุด พบว่า ชุดตรวจ ELISA ชนิด solid-phase ที่ใช้ p53 โปรตีนที่ผลิตจากโปรแคริโอตให้ความถูกต้องในการวินิจฉัยสูงที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้สร้างโปรตีน p53 จากโปรแคริโอตโดยอาศัย vector 2 ชนิดได้แก่ pAK400 และ pET-15b(+) เพื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของโปรตีนที่ได้จากทั้ง 2 ระบบ สำหรับที่จะนำมาใช้พัฒนาชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ในซีรัมของผู้ป่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มะเร็งต่อไป ในงานวิจัยนี้ Wild type full-length p53 cDNA ถูกโคลนลงในเวกเตอร์ pAK400 ที่มียีนสำหรับสร้างโปรตีน BCCP (biotin carboxyl carrier peptide) และ pET-15b(+) ซึ่งมีลำดับ DNA สำหรับสร้าง histidine 6 ตัวติดอยู่ ส่วน BCCP ใน pAK400 vector จะทำหน้าที่เป็น substrate ให้เอนไซม์ biotin ligase ในแบคทีเรีย *E. coli* สำหรับให้นำ biotin มาเติม ดังนั้น p53-BCCP fusion protein ที่ได้จากระบบนี้จึงถูกติดฉลากด้วย biotin ตั้งแต่ในเซลล์ *E.coli* ทำให้สามารถ coat ลง ELISA plate ได้อย่างจำเพาะโดยอาศัยความจำเพาะของ avidin ที่ coat อยู่ในเพลท โดยไม่ต้องผ่านการแยกบริสุทธิ์มาก่อน ในขณะที่โปรตีนที่สร้างจาก pET-15b vector นั้นจะต้องแยกบริสุทธิ์ได้โดยอาศัย metal affinity chromatography ก่อนที่จะนำมา coat ลง ELISA plate ได้

เพื่อที่จะคัดเลือกซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ได้มีการนำ $(His)_6$-p53 ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาทำ SDS-PAGE แล้ว immunoblot จากนั้นนำไป probe ด้วยซีรัมของผู้ป่วยมะเร็ง โดยมี commercial p53 antibody (DO7) เป็น positive control หลังจากหาอุณหภูมิ และระยะเวลาการกระตุ้นที่เหมาะสมในการสร้าง p53 recombinant protein และ หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี ELISA แล้ว พบว่า biotinylated p53-BCCP recombinant protein ที่สร้างจาก pAK400 vector นั้นไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ระดับต่ำๆ (weakly positive) ออกจากผู้ป่วย Negative ได้ ในขณะที่ $(His)_6$-p53 recombinant protein สามารถแยกผู้ป่วยทั้งสองกรณีออกจากกันได้ หลังจากใช้ $(His)_6$-p53 protein ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอด 26 ราย พบว่ามีผู้ป่วย 16 ราย (61.2%) ที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ในขณะที่ระบบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับผู้ป่วยมะเร็งปอดรายเดียวกับที่ใช้ในวิธี Western blot พบว่าเมื่อใช้ค่าเฉลี่ยบวก 3SD ของผู้ป่วยที่ให้ผล Negative จาก Western blot มาใช้เป็นค่า cut off พบว่ามีผู้ป่วยเพียง 6 ราย จาก 26 รายเท่านั้น (23%) ที่ให้ผล Positive จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าควรมีการนำวิธี Western blot มาใช้เป็นเป็นวิธียืนยันผล และ ปรับปรุงความไวของวิธี ELISA แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยขั้นต้นนี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดในประเทศไทยมีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน p53 ถึงร้อยละ 61.2 แต่อย่างไรก็ตามควรจะมีการตรวจและศึกษาถึงความสำคัญทางคลินิกของการมีแอนติบอดีในซีรัมในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งจำนวนมากขึ้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved