

Phage Display 방법을 이용한 B형 간염 바이러스의 Terminal Protein 특이 scFv 항체 생산

아주대학교 의과대학 미생물학교실

이명신 · 권명희 · 박 선 · 신호준 · 김형일

Terminal Protein-specific scFv Production by Phage Display

Myung-Shin Lee, Myung-Hee Kwon, Sun Park, Ho-Joon Shin and Hyung-Il Kim

Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background: One of the important factors in the prognosis of chronic hepatitis B patient is the degree of replication of hepatitis B virus (HBV). It has been known that HBV DNA polymerase plays the essential role in the replication of HBV. HBV DNA polymerase is composed of four domains, TP (Terminal protein), spacer, RT (Reverse transcriptase) and RNaseH. Among these domains, tyrosine, the 65th residue of TP is an important residue in protein-priming reaction that initiates reverse transcription. If monoclonal antibody that recognizes around tyrosine residue were selected, it could be applied to further study of HBV replication. **Methods:** To produce TP-specific scFv (single-chain Fv) by phage display, mice were immunized using synthetic TP-peptide contains 57~80th amino acid residues of TP domain. After isolation of mRNA of heavy-variable region (V_H) and light-chain variable region (V_L) from the spleen of the immunized mouse, DNA of V_H and V_L were obtained by RT-PCR and joined by a DNA linker encoding peptide (Gly4Ser)₃ as a scFv DNA fragments. ScFv DNA fragments were cloned into a phagemid vector. ScFv was expressed in *E.coli* TG1 as a fusion protein with E tag and phage gIII. To select the scFv that has specific affinity to TP-peptide from the phage-antibody library, we used two cycles of panning and colony lift assay. **Results:** The TP-peptide-specific scFv was isolated by selection process using TP-peptide as an antigen. Selected scFv had 30 kDa of protein size and its nucleotide sequences were analyzed. Indirect- and competitive-ELISA revealed that the selected scFv specifically recognized both TP-peptide and the HBV DNA polymerase. **Conclusion:** The scFv that recognizes the TP domain of the HBV DNA polymerase was isolated by phage display. (*Immune Network* 2003;3(2):126-135)

Key Words: HBV, HBV DNA polymerase, phage display, scFv, TP (terminal protein)

서 론

B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV) 증식에서 P 유전자 산물로 알려진 HBV DNA 중합효소는 precore 내에서 pgRNA를 주형으로 minus strand DNA, plus strand DNA를 합성하는 기능을 한다. 이러한 기능을 하는 HBV DNA 중합효소는 서로 다른 기능을 가진 4개의 영역으로 구분된다. 이 단백질은 832개의 아미노산으로 이루어

져 있으며 N-말단부터 TP (terminal protein), spacer, RT (reverse transcriptase), RNaseH 영역으로 구성된다(2). 현재까지 각각의 영역의 기능으로 알려진 내용으로는, 첫 번째 영역인 TP 영역은 negative strand DNA를 합성하는데 필요로 하는 primer와 공유 결합하는 부분이고(1,3), 두 번째 영역인 spacer 영역은 변이가 일어나도 B형 간염 바이러스 DNA 중합효소의 기능에는 영향이 없는 것으로 알려져 있다. 세 번째 영역인 RT 영역은 YMDD consensus motif를 포함한 부분으로 역전사기능을 지닌 부분이다. 마지막 영역인 RNaseH 영역은 negative strand DNA 합성에 주형으로 사용되는 pgRNA를 제거한다고 알려져 있다(2,12). Precore 내에서 pgRNA를 주형으로

책임저자 : 김형일, 아주대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 442-721, 경기도 수원시 원천동 산 5
Tel: 031-219-5070, Fax: 031-219-5079
E-mail: hikim@ajou.ac.kr

negative strand DNA가 합성될 때, HBV DNA 중합효소의 영역 중에서 TP 영역의 65번째 아미노산인 타이로신이 인산디에스테르 결합을 형성하면서 4개의 뉴클레오타이드를 합성하여 negative strand DNA를 합성하기 위한 primer로써 쓰이게 된다. 이러한 기작을 단백질 priming 반응이라고 한다(3,13).

본 연구에서는 단백질 priming 반응에 관여하는 TP 영역을 특이하게 인지하는 scFv를 만들고자 한다. 현재까지 B형 간염 바이러스중합효소를 인지하는 단클론 항체가 보고된 것은 TP, spacer, RNaseH의 일부분을 인지하는 것이었다. 또한 이 단클론 항체를 사용하여 생체 외에서 단백질 priming 반응에 대해 억제 효과를 실험한 결과에서 TP 영역을 인지하는 단클론 항체만이 단백질 priming 반응을 억제하였다(4). 하지만 보고된 TP 특이 단클론 항체가 인지하는 부분은 TP의 8~20, 20~30번 아미노산 부위였다. 이 부분들은 단백질 priming 반응에 관여하지만 RNA와 중합효소의 결합에는 관여하지 않는 부위로 알려져 있고, 결합 자체에 관여하는 부분은 60번 아미노산 이후의 TP 영역으로 알려져 있다(4).

DNA 재조합 기술의 발달에 의해 단클론항체를 생산해내는 방법으로 phage display에 의해 단클론항체를 생산할 수 있게 되었다. 이 방법은 의하면 단클론의 library를 확보한 후 항원에 대해 선별하는 과정이 이루어지므로 단백질 기능과 DNA염기서열이 직접적으로 연관되어 유전자 확보와 조작이 용이하고, 기존의 하이브리도마 방법보다 선별과정에 있어 효과적일 수 있다(5,6,18).

본 연구는 기존의 TP 특이 단클론항체 생산과는 달리 항체를 선별할 때 항원으로 TP 전체 단백질대신에 TP의 65번째 타이로신 잔기 부근의 염기서열과 일치하는 합성 펩타이드를 사용하였다. 합성 펩타이드에 결합하는 단클론항체를 선별하고 선별된 단클론항체가 baculovirus에서 발현된 HBV DNA 중합효소인 pol 단백질과 결합하는 것을 확인함으로써 pol 단백질의 TP영역 중에서도 65번째 타이로신 잔기 주변을 인지할 수 있도록 하였다. 또한 기존의 하이브리도마 방법 대신에 phage display 방법으로 scFv를 생산함으로써 하이브리도마 방법보다 효과적으로 항체를 선별하고, 그 항체에 대한 유전자를 확보하고자 한다.

재료 및 방법

면역항원의 준비. 마우스 면역에 사용될 항원으로 합성한 펩타이드를 사용하였다. 즉, B형 간염 바이러스 DNA 중합효소의 TP 영역 중, 65번째 타이로신 부위를 포함한 24개 아미노산으로 구성된 펩타이드(KVGNFTGLYSS TVPIFNPEWQTPS)를 제작하였다. 이 펩타이드를 제작할 때 N-말단에 바이오틴(biotin)을 부착하여 carrier protein인 뉴트라비딘(NeutrAvidin)과의 결합을 용이하게

하였다(합성펩타이드의 제작은 Pepton, Korea에 주문제작하였다). TP 펩타이드는 DMSO를 사용하여 1 mg/ml로 녹였고, PBS를 완충액으로 사용하여 TP 펩타이드 80 μ l와 뉴트라비딘 (Pierce, Rockford, IL) 400 μ l (1 mg/ml)을 1.5 ml microcentrifuge tube에 섞은 후 4°C에서 하룻밤 동안 부착시켰다.

마우스 면역. 부착된 항원 480 μ l와 complete Freund's adjuvant (Sigma) 480 μ l를 혼합하여 에멀션화하였다. 완전히 에멀션화된 것을 확인한 후, BALB/c 마우스(female, 6~8주령) 1마리 당 200 μ l씩 4마리의 마우스의 복강으로 주사하였다. 21일째에 같은 방법으로 뉴트라비딘에 부착된 항원 480 μ l을 incomplete Freund's adjuvant (Sigma) 480 μ l와 혼합하여 에멀션화한 후, 복강 내로 주사하여 2차 면역시켰다. 2차 면역 시와 같은 방법으로 35일째 3차 면역을, 45일째 4차 면역을 시행한 후, 54일째에 마우스에서 혈청을 분리하여 ELISA로 면역정도를 확인하였다.ELISA의 방법은 다음과 같다. TP 펩타이드 (5 μ g/ml)를 50 μ l씩 ELISA plate (Corning)의 각각의 well에 넣은 후, 4°C에서 하룻밤 방치하였다. Plate의 TP 펩타이드 용액을 제거한 후, 0.05% PBST (PBS with 0.05% Tween 20)로 3회 세척하였다. 그 후, 100 μ l의 blocking solution (1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS)을 넣었고 한 시간 동안 상온에 방치하였다. Blocking solution을 제거한 뒤, 0.05% PBST로 씻어주고, 1 : 5,000, 1 : 20,000, 1 : 80,000, 1 : 160,000으로 희석된 마우스 혈청을 각 well에 100 μ l씩 넣어준 뒤 한 시간 동안 상온에 방치하였다. 한 시간 뒤 well에 있는 희석된 혈청을 모두 제거하고 0.05% PBST로 3회 세척하였고, 여기에 alkaline phosphatase가 결합된 rabbit anti-mouse IgG (Sigma)을 blocking solution으로 1 : 10⁴배 희석한 2차 항체 용액 100 μ l를 넣어주고 한 시간 상온에 방치시켰다. 한 시간 뒤 0.05% PBST로 3회 세척 후, 기질인 P-NPP (Sigma)용액을 넣고 한 시간 반응시킨 후에 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 추출과 mRNA의 분리. RNA extraction kit (Pharmacia)를 이용하여 마우스의 비장에서 총 RNA를 추출하였다. 요약하면, 면역된 BALB/c 마우스에서 비장을 적출하여 잘게 조각낸 뒤, 37°C에서 미리 배양된 extraction buffer 3.6 ml과 비장 200 mg을 섞은 뒤 냉동 보관한 분쇄기를 이용하여 비장조직을 분쇄하였다. 분쇄된 비장조직을 5,000 g로 15°C에서 20분간 원심분리하여 세포조직 파편을 제거하였고 분리된 액체를 18 게이지의 주사바늘과 50 ml 주사기를 사용하여 점성도가 떨어질 때까지 10회 이상 통과시켰다. Polyallomer tube에 5.5 ml의 CsTFA 용액을 채우고, 그 위에 조심스럽게 5 ml의 준비된 액체를 옮겨놓은 후, 125,000 g로 20시간 동안 원심분리하여 상층액을 모두 분리하고 바닥에 침전된 총 RNA를 200 μ l의 TE buffer [10 mM Tris HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA로 재부유시

켰다. 추출된 총 RNA를 oligo (dT)-cellulose column (Pharmacia)을 이용하여 mRNA를 분리하였다. Oligo (dT) cellulose column에 1 ml의 high salt buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl)를 중력을 이용하여 2회 통과시킨 뒤, 준비된 RNA를 1 ml의 TE buffer에 녹여 0.2 ml의 sample buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 3 M NaCl)와 섞은 뒤 oligo (dT) cellulose column에 넣어 중력에 따라 흡수되도록 하였다. 흡수된 후, 350 g로 4°C에서 2분간 원심분리하고 0.25 ml의 high salt buffer로 2회, 0.25 ml의 low salt buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl)로 3회에 걸쳐 같은 방법으로 원심분리를 반복하였다. 원심분리 후 세척액을 모두 제거하고 oligo (dT) cellulose column아래에 새로운 1.5 ml의 tube를 준비시킨 뒤, 65°C로 가온하여 준비된 0.25 ml의 TE buffer를 이용하여 같은 방법으로 4회에 걸쳐 원심분리하여 1 ml의 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA포함 용액을 100 μ l의 sample buffer, 10 μ l의 glycogen solution (glycogen 5~10 mg/ml), 2.5 ml의 ice-cold ethanol과 혼합하여 -70°C에 보관하였다.

scFv 유전자 제작과 phagemid vector에 삽입. RPAS mouse scFv module (Pharmacia)을 사용하여 scFv 유전자 절편을 제작하였다. mRNA 주형 10 μ l (200 ng-1 μ g)와 RNase free-water 11 μ l, primed first strand mix (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase random hexadeoxyribonucleotides [pd (N)6] primers) 11 μ l, DTT solution 1 μ l를 넣고 37°C에서 한 시간 동안 방치하여 first strand cDNA를 합성하였다. V_L cDNA 증폭을 위해 합성된 first strand cDNA 33 μ l에 light primer mix 2 μ l와 증류수 64 μ l, AmpliTaq DNA 중합효소(PE Biosystem) 1 μ l (10U)를 섞고 PCR 반응(30 cycle: 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 2분)을 시켰다. V_H cDNA 증폭을 위해 first strand 33 μ l, heavy primer mix I 2 μ l, heavy primer mix II 2 μ l와 증류수 62 μ l, AmpliTaq DNA 중합효소 1 μ l (10 U)를 혼합하여 같은 방법으로 PCR반응을 시행하였다. PCR에 의해 증폭된 각각의 DNA를 agarose gel상에서 gel extraction kit (QIAGEN)를 이용하여 정제한 후, 정제된 V_H, V_L cDNA를 scFv cDNA로 만들기 위해 다음과 같은 PCR 반응을 시행하였다. V_H cDNA 50 ng, V_L cDNA 50 ng, linker primer 4 μ l, 25 mM dNTP 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 8 μ l, AmpliTaq 1 μ l (10 U), 10 \times PCR buffer 5 μ l를 섞고 총 50 μ l가 되도록 증류수를 추가하였다. 이 혼합액을 PCR반응(94°C 3분 후, 7 cycle: 94°C 1분, 45°C 30초, 63°C 4분)으로 연결시킨 뒤, 증폭을 위해 10 \times PCR buffer 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RS primer 4 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, AmpliTaq 1 μ l (10 U), 증류수 35 μ l를 추가한 뒤 PCR 반응(35 cycle: 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 2분)을 시행하였다. 증폭된 scFv DNA를 1.2% agarose gel에서 전기영동시킨 후, V_H, V_L을 정제한 것과

같은 방법으로 정제하였다. scFv cDNA를 phagemid 벡터에 연결하기 위해 scFv 유전자에 제한효소처리를 시행하였다. 약 0.25~1 μ g의 scFv DNA를 *Sfi*I (NEB)와 *Not*I (NEB)로 각각 4시간씩 반응시킨 후, scFv DNA를 scFv marker와 함께 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 정량하였다. 정량된 150 ng의 scFv를 T4 DNA ligase (NEB)를 이용하여 phagemid vector인 pCANTAB5E 250 ng과 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE buffer 20 μ l로 DNA를 용해시켰다.

Competent cells의 준비. *E.coli* TG1 세포를 minimal medium plate (6 g of Na₂HPO₄ (diabasic), 3 g of KH₂PO₄ (monobasic) and 1 g of NH₄Cl, 15 g of Bacto-agar, 1 ml of 1 M MgCl₂, 1 ml of 1 M CaCl₂, 1 ml of 1 M thiamine hydrochloride and 5 ml of 20% glucose in 1 liter of autoclaved distilled water)에 선상도말하였다. 한천 평판 배지에서 자란 집락을 10 ml의 2 \times YT 배지에 접종한 뒤 37°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주면서 하룻동안 배양하였다. 배양된 10 ml의 세포들을 1 L의 2 \times YT 배지에 접종하고 같은 방식으로 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.5~0.7 사이가 될 때까지 배양하였다. 배양된 플라스크를 30분간 얼음에 방치한 뒤, 4°C에서 4,000 g로 20분간 원심 분리하여 가라앉은 세포들을 제외한 상청액을 모두 제거하고, 1 L의 냉각된 멸균 증류수로 재부유시켰다. 이것을 다시 같은 방식으로 원심분리하고 상청액을 제거한 뒤, 500 ml의 냉각된 멸균 증류수로 재부유시키고 같은 방식으로 20 ml로 세척을 반복하여 원심 분리한 후, 마지막으로 10% glycerol용액 2 ml로 재부유시킨 후, 50~100 μ l씩 분주하여 액체질소에 냉동시킨 뒤 -70°C에 보관하였다.

Electroporation. Phagemid 벡터 250 ng과 scFv DNA절편 150 ng으로 연결반응을 거친 20 μ l의 scFv/pCANTAB5E를 10개로 분주하여 electroporation하였다.

실험방법 5에서 만든 감응세포를 얼음위에서 녹이고, 50 μ l의 감응세포와 실험방법 4에서 준비한 scFv/pCANTAB5E 2 μ l을 혼합한 후, 냉각하여 준비된 0.2 cm 큐벳에 넣은 뒤 1분간 얼음 위에 두었다. Electroporator (Bio Rad, Hercules, CA)를 25 μ F, 2.5 kV at 200 ohms으로 프로그램하고 준비된 큐벳의 물기를 제거하고 electroporator에 위치시킨 뒤 pulse를 주었다(시간 상수 4.5~5 msec). pulse후 즉시 37°C로 준비된 1 ml의 LB-G 액체배지를 넣고 마이크로피펫을 이용하여 9회 재부유시켰다. 같은 방법으로 9번 반복하여 얻어진 10 ml의 세포를 50 ml 시험관에 옮겼다. 한 시간 동안 37°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주며 배양하여 SOBAG 한천 평판배지 (20 g of Bacto-tryptone, 5 g of Bacto-yeast extract and 0.5 g of NaCl, 15 g of Bacto-agar, 10 ml of sterile 1 M MgCl₂, 55.6 ml of sterile 2 M glucose and 5 ml of filter-sterilized 20

mg/ml ampicillin in 1 liter of autoclaved distilled water) 20 개에 500 μ l씩 갈아 고르게 분포시키고 30°C에서 하루 배양하였다. 20개의 한천 평판배지에서 자란 집락들은 각각의 한천 평판배지에 5 ml의 2×YT 액체배지(17 g of Bacto-tryptone, 10 g of Bacto-yeast extract and 5 g of NaCl in 1 liter of autoclaved distilled water)를 넣어 혼합한 후, 배지를 모두 모아 scFv에 대한 라이브러리로서 -70°C에 보관하였다.

라이브리에서 재조합 파아지 생산과 PEG 침전. Panning을 시행하기 위해 저장된 항체 library에서 재조합 파아지를 생산하였다. 500 ml 플라스크에 95 ml의 2×YT 액체배지를 넣은 후, -70°C에 보관된 scFv 라이브러리 1 ml을 녹여 넣고 600 nm 파장에서 흡광도가 0.3이 될 때까지 37°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주며 배양하였다. 배양된 배지에 ampicillin (100 μ g/ml)과 2% glucose를 추가하여 한 시간 동안 같은 조건으로 배양하였다. 여기에 1×10¹¹ pfu의 M13KO7 helper 파아지 (Pharmacia)를 넣고 다시 한 시간 동안 같은 조건으로 배양하였다. 1,000 g로 10분간 원심 분리하여 상청액을 제거하고 여기에 2×YT-AK 액체배지 100 ml을 넣고 같은 조건으로 하룻동안 배양하여 파아지를 생산하였다. 배양액을 3,000 g로 10분간 원심 분리하여 얻은 상청액 15 ml에 PEG/NaCl 3 ml을 잘 섞고 얼음에 1시간 동안 방치시킨 뒤, 4°C에서 20분간 1,000 g로 원심 분리하여 상청액은 조심스럽게 제거하고 2 ml의 2×YT 액체배지로 pellet을 재부유시켰다.

Panning. TP 펩타이드용액(10 μ g/ml) 4 ml를 immunotube (Nunc)에 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하였고, 다음날 0.05% PBST로 3회 세척하고 PBS로 희석한 5% skim milk를 사용하여 상온에서 2시간 동안 blocking한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.05% PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PEG로 침전된 파아지 포함용액 2 ml과 5% skim milk 2 ml을 잘 혼합하여 넣고 입구를 봉한 뒤 30분간 상온에서 반복하여 뒤집어주었고, 90분간 상온에 정치하였다. 시험관 안의 용액을 모두 제거하고 0.1% PBST로 10회 세척하고, PBS로 10회 세척한 뒤 0.1 M glycine/HCl (pH 2.2) 1 ml을 넣어 10분간 파아지를 용리시키고 여기에 2M Tris-base 60 μ l를 넣어 용액을 중화시킨 뒤 10 ml의 competent *E.coli* TG1 세포와 섞어 37°C에서 1시간 동안 250 rpm의 속도로 섞어주며 배양하였다. panning을 반복하기 위해 ampicillin (100 μ g/ml)과 2% glucose를 혼합한 뒤, 여기에 2×10¹⁰ pfu의 M13KO7 helper 파아지를 추가하여 37°C에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 섞어주며 배양하였다. 배양액을 1,000 g로 10분간 원심 분리한 뒤 상청액은 제거하고 가라앉은 세포들을 2×YT-AK 액체배지로 재부유하여 30°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주며 하룻밤 배양하였다.

Colony lift assay. Panning 후 용리된 파아지를 competent *E.coli* TG1 세포에 감염시킨 뒤에 이 감염된 *E.coli* TG1 세포 100 μ l를 SB-AG 한천 평판배지에 도말하여, 30°C에서 하룻밤 배양하였다. 두 장의 nitrocellulose membrane을 준비하여 한 장은 1.5 ml의 희석된 TP 펩타이드(10 μ g/ml in PBS)에 완전히 적시고 10분간 상온에 방치하였다. TP 펩타이드가 덮인 nitrocellulose membrane에서 물기를 제거하기 위해 10분간 상온에서 방치시킨 뒤, blocking buffer (3% skim milk)로 30분간 blocking하고 물기를 제거한 후 100~200 ml의 PBS로 짧게 세척하였다. 세척 후 상온에서 5~10분간 방치한 뒤, SB-AI 한천 평판배지에 위치시켰다.

다른 한 장의 nitrocellulose membrane는 배양된 SB-AG 한천 평판배지에서 자란 집락위에 얹어 집락들을 nitrocellulose membrane에 옮겨서 앞서 준비한 TP 펩타이드가 덮여진 nitrocellulose membrane위에 집락이 위쪽을 향하도록 위치시키고, 한천 평판 배지를 뒤집어 30°C에서 하룻밤 배양한다. 다음날 위쪽의 집락들이 배양된 nitrocellulose membrane을 분리하여 새로운 한천 평판배지에 위치시킨 뒤, 4°C에 보관시키고, 밑에 있는 TP 펩타이드가 부착된 nitrocellulose membrane은 blocking buffer가 담긴 용기에 넣어 15분간 상온에서 저속으로 흔들어주며 방치한 후, 0.05% PBST가 담긴 용기에 nitrocellulose membrane을 옮겨 15분간 흔들어주며 방치하는 세척과정을 2회 반복하였다. 세척 후, nitrocellulose membrane을 blocking buffer로 1 : 1,000으로 희석된 HRP 부착 Anti-E tag 단클론항체 2 ml에 넣어 1시간 동안 상온에서 방치하고, 0.05% PBST를 사용하여 6회 세척하여 상온에서 5분간 말린 뒤, 2 ml의 4-CN 기질 용액(Sigma)에 10~20분간 넣어 반응이 나타나는 것을 확인하고 증류수로 세척하였다.

선별을 위한 파아지 발현. Microtiter cluster tube (Costar)의 96개 well에 각각 400 μ l의 2×YT 액체배지를 넣고, 멸균된 이쑤시계를 사용하여 colony lift assay에 반응을 보였던 집락들을 각 well에 옮겨 30°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주며 하룻밤 동안 배양시켜 master plate를 준비하였다.

2.5×10¹⁰ pfu의 M13KO7을 포함한 2×YT-AG 액체배지 50 ml을 준비하여 새로운 96 well microtiter cluster tube의 각 well에 400 μ l씩 넣은 뒤 여기에 master plate에서 배양된 세포들을 well이 일치하도록 하여 40 μ l씩 넣고 2 시간 동안 37°C에서 150 rpm의 속도로 섞어주면서 배양하여 helper 파아지를 감염시켰다. 감염된 배양액 중, 40 μ l를 새로운 microtiter plate에 옮겨 1,500 g로 20분간 원심분리하고 상청액은 모두 제거한 뒤, 여기에 400 μ l의 2×YT-AK 액체배지를 넣어 37°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주며 하룻밤 동안 배양시켜 scFv를 지닌

파아지를 생산하였다. 생산된 microtiter plate를 1,500 g로 20분 동안 원심분리하여 파아지를 포함한 상청액을 이용하여 ELISA를 시행하였다.

TP 펩타이드 특이 scFv 선별을 위한 ELISA. ELISA plate (Corning Costar)에 항원으로 PBS에 희석한 TP 펩타이드(10 μ l/ml)를 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 항원이 부착된 ELISA plate에서 항원용액을 모두 제거하고 0.05% PBST로 3회 세척한 뒤, blocking solution (2% skim milk in PBS) 100 μ l를 넣고 1시간 동안 상온에서 blocking시키고 0.05% PBST로 3회 세척하였다. 실험방법 13에서 발현된 파아지를 포함한 용액 100 μ l를 각각의 well에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 0.05% PBST로 5회 세척하고, 여기에 blocking solution으로 1 : 5,000 희석된 100 μ l의 HRP 부착 anti-M13 단클론항체 (Pharmacia)를 넣어 1시간 동안 반응시키고 0.05% PBST로 6회 세척한 후, 각 well에 기질로 100 μ l씩 ABTS (Sigma)를 넣어 20분간 반응시킨 뒤, 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

***E.coli* HB2151 세포로 감염.** ELISA상에서 양성으로 확인된 well에 해당하는 master plate의 well에서 파아지 발현시킨 뒤, 발현된 파아지포함 용액 10 μ l를 log phage *E.coli* HB2151 400 μ l를 포함한 well에 접종하였다. 접종 후, 37°C에서 2시간 동안 130 rpm의 속도로 섞어주며 배양하여 파아지를 감염시켰다. 감염된 *E.coli* 세포를 포함한 배지 100 μ l를 SOBAG-N (SOBAG with 100 μ g/ml nalidixic acid) 한천 평판배지에 도말한 뒤, 30°C에서 하룻밤 동안 배양하여 배양된 집락을 얻었다.

Soluble scFv 발현 및 정제. SOBAG-N 한천 평판배지에서 배양된 집락을 40 ml의 2 \times YT-AG 액체배지에 접종하고 30°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주면서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양된 *E.coli* 세포를 1 liter의 2 \times YT-A 액체배지에 옮긴 뒤, 1시간 동안 30°C에서 250 rpm의 속도로 섞어주면서 배양하고 여기에 IPTG 1 mM를 추가하여 5시간 동안 배양하였다. 배양된 배지를 3,000 g로 20분간 원심 분리한 뒤, 상청액을 분리하여 보관하고 침전된 *E.coli* 세포는 periplasmic extract를 추출하였다. 추출한 방법은, 냉각된 20 ml의 1 \times TES buffer (0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.05 mM EDTA, 0.56 M sucrose)로 세포를 재부유시킨 뒤, 37.5 ml의 1/5 TES buffer (1 volume of 1 \times TES buffer to 4 volumes of distilled water)를 혼합하여 얼음에 30분간 방치시키고, 12,000 g로 10분간 원심분리하여 상청액만을 분리하였다. 추출된 scFv를 포함한 periplasmic extract를 RPAS purification module (Pharmacia)을 사용하여 정제하였다.

SDS-PAGE & Western blot. 정제된 scFv 단백질 포함 용액 16 μ l와 SDS 5 \times loading dye 4 μ l를 섞어 100°C에서 5분간 증탕하였다. 증탕 후 12% SDS gel에서 80 V에서

10분, 120 V로 30~40분간 전기영동한 뒤 Coomassie blue로 염색하거나 western blot에 사용하였다. Western blot을 시행하기 위해 nitrocellulose membrane에 250 mA로 1시간 동안 전기 이동한 후 nitrocellulose membrane을 blocking solution (5% skim milk in PBS)에 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝나고, blocking solution에 HRP가 결합된 anti-E tag 단클론 항체(Pharmacia)가 1 : 1,000으로 희석된 용액을 사용하여 1시간 동안 반응시킨 후 기질로 4-Chloro-1-naphthol 용액 (Sigma)을 사용하여 30~60분 후에 발색된 결과를 관찰하였다.

선별된 scFv의 염기서열 분석. 선별된 scFv의 V_H, V_L 유전자의 DNA서열분석을 pCANTAB5E sequence primer set (Pharmacia)을 사용하여 ABI Perkin Elmer 373A automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Norwalk, CT)에서 수행하였다. 분석된 염기서열을 Kabat database에서 비교분석하였다.

TP 단백질, B형 간염 바이러스 DNA 중합효소에 대한 binding 확인. 정제된 scFv를 이용하여 B형 간염 바이러스 DNA 중합효소에 대한 결합능을 확인하기 위하여 baculovirus/insect cell 발현 시스템을 통해 TP 영역만을 발현시킨 TP 단백질과 B형 간염 바이러스 DNA 중합효소 전체를 발현시킨 pol 단백질을 대한 indirect ELISA를 시행하였고, TP 펩타이드와 pol 단백질을 이용하여 competitive ELISA를 시행하였다. Indirect ELISA를 시행하기 위하여 우선, ELISA plate의 각 well에 항원으로, PBS에 희석한 TP 펩타이드(10 μ g/ml), TP 단백질(10 μ g/ml), pol 단백질(10 μ g/ml)을 50 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 항원이 부착된 ELISA plate에서 항원용액을 모두 제거하고 0.05% PBST로 3회 세척한 뒤, blocking solution (2% skim milk in PBS) 100 μ l를 넣고 1시간 동안 상온에서 blocking시키고 0.05% PBST로 3회 세척하였다. 각각의 well에 실험방법 10에서 준비된 파아지를 포함한 용액 100 μ l를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 0.05% PBST로 5회 세척하였다. 세척 후, blocking solution에 1 : 4,000으로 희석된 anti-M13 단클론 항체 100 μ l를 넣어 1시간 동안 반응시키고 0.05% PBST로 6회 세척하였다. 세척 후, alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-mouse IgG (Sigma)를 1 : 10,000으로 희석하여 각각의 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 배양한 후, 0.05% PBST로 6회 세척하였다. 각 well에 기질로 P-NPP 100 μ l를 넣어 반응시킨 뒤, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Competitive ELISA는 TP 펩타이드를 항원으로 10 μ g/ml의 농도로 PBS에 희석하여 ELISA plate의 각 well에 50 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 다음 날, 항원용액을 모두 제거하고 0.05% PBST로 3회 세척한 뒤, blocking solution (2% skim milk in PBS) 100 μ l를 넣고 1

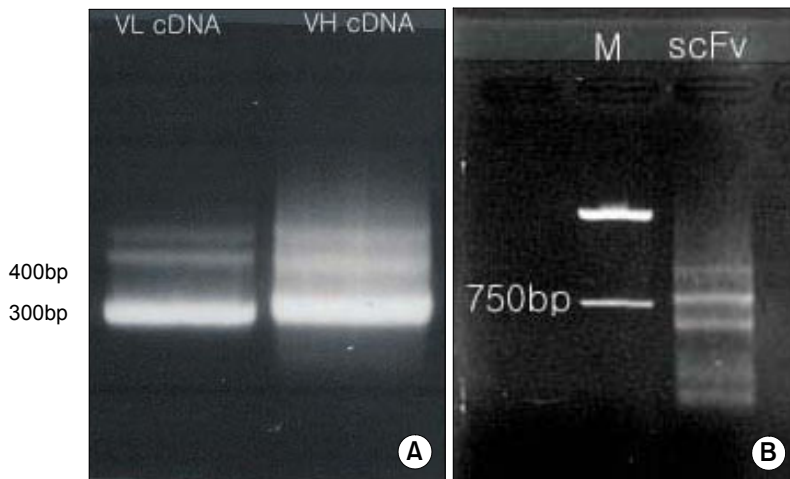


Figure 1. Assembly of scFv DNA. A. Electrophoresis of V_H , V_L cDNA on agarose gel. V_H , V_L PCR products. mRNA was used for synthesis of cDNA. MMLV reverse transcriptase and random hexadeoxyribonucleotides were used to prime cDNA synthesis. PCR amplification of antibody variable regions was carried out using primers complementary to the ends of the heavy- and light-chain variable regions. B. Assembled scFv DNA. The heavy- and light-chain DNA were linked by assembly PCR with linker fragment to form a scFv. M: scFv marker, scFv: scFv PCR products.

시간 동안 상온에서 blocking시키고 0.05% PBST로 3회 세척하였다. Competitor로 사용될 TP 펩타이드와 BSA (Sigma), pol 단백질을 blocking solution으로 40 μ g/ml의 농도가 되도록 희석시킨 뒤 각 well에 해당되는 competitor들을 50 μ l씩 넣고 아래쪽의 well로 2배씩 희석하여 넣었다. Competitor와 control solution이 들어간 well에 정제된 scFv를 포함한 용액을 50 μ l씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 0.05% PBST로 5회 세척하였다. 여기에 blocking solution에 1 : 4,000으로 희석된 마우스 anti-E tag 단클론항체를 100 μ l를 넣어 1시간 동안 반응시키고 0.05% PBST로 6회 세척한 후, alkaline phosphatase가 결합된 goat anti-mouse IgG (Sigma)를 1 : 10,000으로 희석하여 각각의 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 0.05% PBST로 6회 세척한다. 각 well에 기질로 P-NPP 100 μ l를 넣어 반응시킨 뒤, 405 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

마우스 면역 확인을 위한 ELISA. 합성 TP 펩타이드를 사용하여 면역시킨 후에 생성된 항체의 역가를 알아보기 위하여 ELISA를 시행하였다. BALB/c 마우스 4마리에 각각 4회에 걸쳐 면역시킨 후에 각각의 마우스로부터 얻은 혈청을 이용하여 ELISA를 시행하였으며, negative control로 면역 전 혈청을 사용하여 비교하였을 때, 4마리 중 2마리에서 1 : 160,000 이상의 항체 역가가 확인되었다.

RNA 추출과 scFv 라이브러리의 확보. 가장 높은 항체 역가를 보인 1번 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출한 후, 비장의 절반을 사용하여 총RNA를 추출하였다. 총RNA로부터 mRNA를 분리한 후, 흡광도를 측정하여 계산된 mRNA 양은 약 10 μ g이었다. 얻어진 mRNA를 주형으로 이용하여 V_H 와 V_L 에 대한 cDNA를 증폭하였다. V_H 와 V_L 의 cDNA를 증폭한 후 전기 영동하여 약 340 bp 크기의 DNA를 확인하였다. 확인된 V_H 와 V_L 의 cDNA를

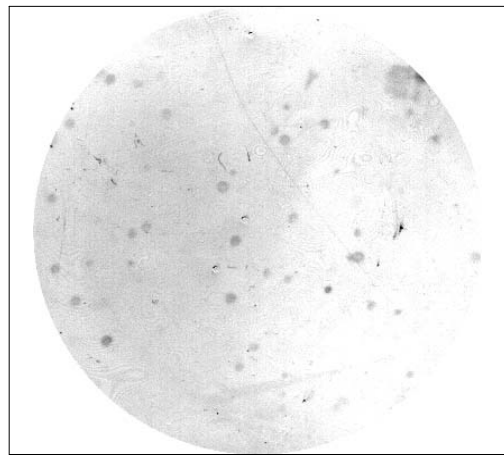


Figure 2. Colony lift assay for the selection of TP specific scFv expressing colony. Thirty four positive colonies were detected. Detected colonies were transferred to each well of 96 well microtiter cluster tube containing 2 \times YT-AG medium.

linker primer와 반응시켜 scFv DNA를 제작하였고, 전기 영동상에서 약 750 bp 크기의 DNA를 확인하였다(Fig. 1). scFv DNA와 pCANTAB5E를 연결시킨 후, 연결된 반응액을 감용세포에 electroporation시켰다. Electroporation된 *E.coli*를 SOBAG 한천 평판배지에 배양하였고, 배양된 세포를 모아 라이브러리로 보관하였다.

Colony lift assay. 라이브러리로 부터 phage를 얻어 panning 과정을 거친 후, 선별된 클론 중 항원에 결합하는 것만을 선별하였다. 선별은 한 번에 많은 수의 집락을 조사하기 위한 방법으로 colony lift assay를 시행하였다. colony lift assay상 600개의 집락들 중에서 34개의 양성반응을 보인 집락들이 관찰되었고(Fig. 2), 관찰된 각 집락들은 2 \times YT-AG 액체배지가 포함된 96 well microtiter cluster tube의 각 well로 옮겨졌다.

TP 펩타이드에 대한 ELISA. Colony lift assay에서 양성 반응으로 확인된 집락들에서 파아지를 발현시켜 TP-특이 항체를 발현하는 세포만을 선별하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 이 중에서 negative control로 사용된 phage에 비하여 높은 반응을 보인 well 3개를 선별하였고, 결합여부를 재확인하기 위하여 soluble scFv를 발현시켜 정제한 후, 정제된 용액을 1차 항체로 사용하고 HRP가 결합된 anti-E tag 단클론항체를 2차 항체로 사용하여 405 nm의 파장에서 흡광도에서 측정하였다. 측정된 결과를 Table I에 표시하였다.

SDS PAGE & Western blot. ELISA에서 양성반응으로 선별된 세포들 중에서 가장 높은 흡광도 수치를 나타냈던 1A phage clone에서 파아지를 구성하는 단백질 중 하나인 gIII 단백질이 붙어있지 않은 형태의 scFv를 얻어 그 크기를 확인하기 위하여, amber stop codon suppressor strain인 *E.coli* TG1에 들어있던 phagemid를 파아지를 통하여 non-suppressor strain인 *E.coli* HB2151로 감염시킨 후, soluble scFv를 발현시킨 후, anti-E purification module (pharmacia)를 이용하여 발현된 scFv를 정제하여 SDS PAGE와 western blot으로 30 kDa의 크기를 확인하였다 (Fig. 3).

선별된 scFv의 염기서열 분석. 1A phage에 삽입된 scFv DNA의 염기서열을 분석하였을 때 (Fig. 4), 345 bp로 이루어진 V_H와 330 bp로 구성된 V_L을 확인할 수 있었고, 완전한 형태의 linker와 E-tag의 염기서열을 확인하였다. V_H와 κ gene family를 International Immunogenetics Database (<http://imgt.cnusc.fr:8104/v2/DNAP/index.html>)에서 분석한 결과, V_H region은 V_{H1} family의 V_H gene segment, SP.2 D_H gene segment, J_{H3} gene segment로 구성되었고, V_L region은 κ 4와 κ 2 gene segment의 조합으로 이루어져 있었다. Kabat database에서 보고된 항체들 간의 Ho-

Table I. ELISA for TP-peptide

	1A	1~2	1~4	Negative control
Phage*	0.132	0.125	0.133	0.080
Soluble**	0.272	0.210	0.244	0.110

Microtiter plates were coated with 5µg/ml of TP peptide and blocked with blocking buffer (2% skim milk in PBS). phage*: phages expressed from 1A, 1~2 and 1~4 cells were used as a primary antibody, soluble**: purified periplasmic extracts expressed from 1A, 1~2 and 1~4 cells were used as a primary antibody. Bound phage-scFvs were detected with HRP-conjugated mouse anti-M13 antibody. Bound soluble scFvs were detected with HRP-conjugated mouse anti-E tag antibody. ABTS [2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)] was used as a substrate. Absorbance at 405 nm was read and represented as results. The irrelative phage and scFv was used as negative control.

mology분석 결과 anti-botulinum neurotoxin 항체, anti-poly (dC) 항체 등과 95% 이상의 homology를 보였으나, 이전에 보고되었던 TP의 8~20, 20~30번 아미노산 부위를 인지하는 단클론 항체와는 homology를 보이지 않았다 (data not shown).

선별된 scFv의 TP 단백질, pol 단백질에 대한 결합 확인. TP 펩타이드에 대해 선별된 phage 중 405 nm의 파장에서 가장 높은 흡광도를 보였던 1A phage clone에서 발현된 scFv의 TP 단백질과 pol 단백질에 대한 결합여부를 확인하기 위하여 정제된 1A scFv를 사용하여 각각의 단백질에 대한 indirect ELISA를 시행하고, TP 펩타이드와 pol 단백질을 이용하여 competitive ELISA를 시행하였다. Indirect ELISA상에서 negative control로 항원 대신에 BSA를 사용하여 비교하였다. TP 펩타이드를 항원으로 사용한 경우가 405 nm의 파장에서 가장 높은 흡광도를 보였고, TP 단백질, pol 단백질의 경우에는 그보다 낮은 흡광도를 보였다 (Table II). 선별된 scFv가 TP 펩타이드 부위를 특이하게 인지한다는 것을 확인하기 위하여, TP 펩타이드와 pol 단백질을 사용하여 competitive ELISA를 시행하였다. 항원으로 TP 펩타이드를 사용하였고, competitor로 pol 단백질, TP 펩타이드, BSA를 사용하였다. Competition 정도를 비교하기 위하여 산출된 결과를 백분율로 계산한 후, 그래프로 표시하였다 (Fig. 5). TP 펩타이드에 비하여 pol 단백질에 의한 억제정도가 낮게 나타났으나 희석정도에 따라 비교할 때, 그 경향은 같은 것을 알 수 있었다.

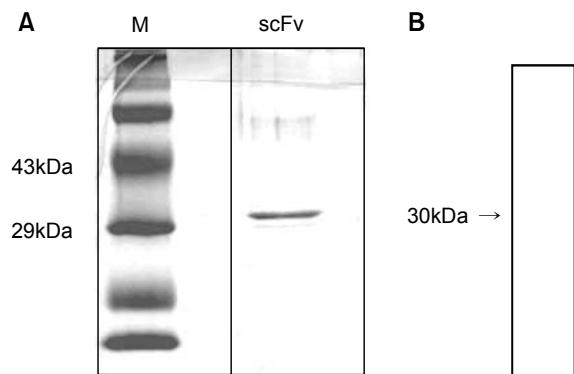


Figure 3. SDS-PAGE and western blot analysis of selected scFv. A. SDS-PAGE of selected scFv. Purified 1A scFv from periplasmic extracts was subjected to 12% SDS-polyacrylamide gels. The protein bands in the gel were stained with Coomassie brilliant blue G-250. B. Western blot analysis of selected scFv. Purified 1A scFv was subjected to 12% SDS-polyacrylamide gels. The protein bands in the gel were transferred to a nitrocellulose membrane. The transferred membrane was probed with anti-E tag antibody and then incubated with 4-chloro-1-naphthol H₂O₂ substrate.

A
1/1
CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGTTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTG
Q V Q6 L Q Q S G P E L V R P G T S V K V
61/21
CDR1
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTA <u>AATTACTTGTATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG</u>
S C K A S G Y A F T N Y L I E W V K Q R
121/41
CDR2
CCTGGACAGGGCCTTGGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAAGTGGTGGTACTAACTAT
P G Q G L E W I G V I N P G S G G T N Y
181/61
AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTAC
N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y
241/81
ATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGCTAC
M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R G Y
301/101
CDR3
TATGATTCTCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
Y D S W F A Y W G Q G T T V T V
B
1/1
GACATCGAGCTCACTCAGACTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACT
D I E L T Q T P T T M A A S P G E K I T
61/21
CDR1
ATCACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTTGCATTTGGTATCAGCAGAAG
I T C S A S S S I S S N Y L H W Y Q Q K
121/41
CDR2
CCAGGATTCTCCCCTAAACTCTTGATTTATAGGACATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCA
P G F S P K L L I Y R T S N L A S G V P
181/61
GCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATG
A R F S G S G S G T S Y S L T I G T M
241/81
CDR3
GAGGCTGAAGATGTTGCCACTTACTACTGCCAGCAGGGTAGTAGTATACCGTACACGTTTC
E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y T F
301/101
GGCTCGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCG
G S G T K L E I K R A

Figure 4. Nucleotide sequence of the V_H , V_L region of 1A, TP-specific scFv. Numbers shown at the top refer to codon numbers. The regions underlined indicate CDRs. Deduced amino acid sequences from the DNA sequence are shown below as a one letter. A. Sequence of the V_H region, B. Sequence of V_L region.

Table II. ELISA of purified 1A scFv for HBV DNA polymerase

Antigen	TP peptide	TP protein	Pol protein	Negative control
A405	0.45	0.37	0.33	0.09

The phage containing selected scFv was expressed and used as a primary antibody. Bound phage-scFvs were detected with mouse anti-M13 antibody and AP-conjugated goat anti-mouse IgG. Absorbance at 405 was read and represented as results. TP protein was TP domain expressed from the baculovirus/insect cell system. Pol protein was HBV DNA polymerase expressed from the baculovirus/insect cell system. BSA was used as an antigen in (-) control.

고찰

본 연구에서는 phage display 방법을 이용하여 TP 영역을 특이하게 인지하는 scFv를 선별하였다. 선별하는 항원으로 TP의 65번째 타이로신 잔기부근의 염기서열과 일치하는 합성 펩타이드를 사용하여 scFv를 선별하였고, 선별된 scFv를 TP 단백질과 pol 단백질에 대해 붙는 것을 확인하기 위하여 indirect ELISA를 사용하여 확인한 후, competitive ELISA를 이용하여 TP 영역에 특이하게 반응하는 것을 확인하였다.

Phage display로 단클론 항체를 선별하는데 있어서의 가장 중요한 과정은 항체의 library의 제작과 제작된 library에서 원하는 항원에 대한 항체를 선별하는 것이다 (7). 본 연구에서의 library 제작에 있어서, 사용된 항체의

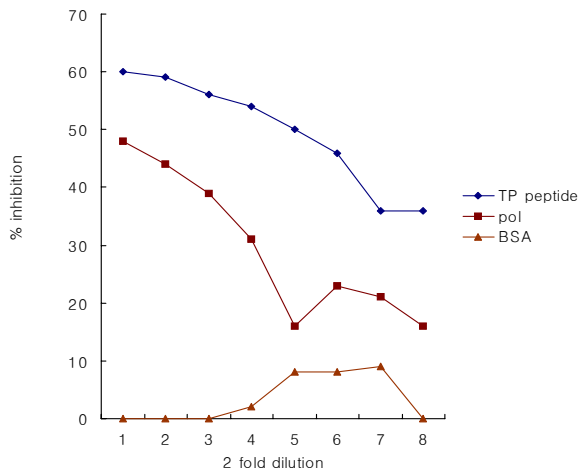


Figure 5. Competitive ELISA to measure the degree of inhibition. Both TP peptide and pol had inhibitory effects. The inhibition level by pol was lower than that by TP peptide. BSA had not inhibitory effect. % inhibition=100-(test OD-back-ground×100)/Range.

library의 크기는 10^4 정도였다. 일반적으로 면역을 할 경우, 10^5 정도 크기의 library에서 항체 선별을 하는 데 비해 본 실험에서 얻어진 library의 크기는 그보다도 10배 정도 작은 크기였다. 선별과정에 있어서는, 보편적으로 2~3회의 panning을 시행하여 항체를 얻지만 본 실험에서는 2~3회의 panning후 ELISA를 시행하였을 때, TP-특이 단클론 항체가 선별되지 않았고 항체 선별을 위하여 4~5회의 panning을 반복한 후 ELISA상에서 양성 결과를 얻었다. 하지만 염기서열을 분석한 결과 모두가 불완전한 형태의 scFv였다(data not shown). 이러한 결과가 나타난 이유를 예상하기 위해서는 panning 과정을 살펴볼 필요가 있다. Panning 과정은 크게 두 개의 과정으로 이루어진다. 우선 용리된 파아지들을 *E.coli* 세포들에 감염시켜 ampicillin을 포함한 한천 평판배지에 키우면 phagemid를 포함한 세포들만이 자라게 된다. 배양된 집락들을 평판배지에서 모아 액체배지에 접종한 후 배양하고, 배양된 배지를 희석하여 helper 파아지를 감염시켜 다음 panning에 사용될 파아지를 발현시킨다. 이러한 panning 과정을 반복할수록 원하는 항체가 다수 선별되어야 하지만, 감염을 반복하는 과정에서 불완전한 형태의 항체 조각들이 발견된다는 것이 다른 연구자들에 의해 보고된 바 있다(6). Phage display에 있어 가장 중요한 두 가지의 과정에 있어, 본 실험에서는 library 크기가 작고, 항체를 선별하는 것도 용이하지 않았기 때문에 원하는 단클론 항체를 얻기 위해서 panning이나 선별하는 방법에 대해 조정이 필요하였다. 본 연구에서는 한 번에 보다 많은 수의 클론을 선별하고, 완전한 형태를 지닌 scFv를 얻고자 하는 방법으로 colony lift assay를 시행하였다. 이 방

법을 이용하면 100~300개 정도의 집락들을 한 번에 선별하여 원하는 항체의 선별을 효과적으로 시행할 수 있는 장점이 있다(14). 실제로 Panning 후에 ELISA를 직접 시행하는 경우, 완전한 형태의 scFv가 전체 집락 중에서 얼마나 되는가를 확인할 수 있는 방법이 없으므로 불완전한 scFv가 많을 경우 이후의 phage 발현과 ELISA에서 원하는 항체를 선별할 수 있는 확률이 감소하게 되는데, phage 발현과 ELISA 시행에 소요되는 시간이 colony lift assay에 비해 몇 배의 시간과 노력이 소요된다는 점을 고려할 때, colony lift assay를 시행함으로써 panning후 직접 ELISA로 항체를 선별하는 것보다 많은 수의 집락을 한번에 선별하고, 완전한 형태의 항체를 얻는 것이 가능하였다. 비록 ELISA상에서 colony lift assay로 선별된 모든 집락들이 양성의 반응을 보이지는 않았으나 선별된 모든 집락들이 완전한 형태의 scFv를 이루고 있는 것을 염기서열 분석으로 확인하였다(data not shown). 선별에 있어서 하나의 과정이 추가되기는 하나 원하는 항체가 쉽게 선별되지 않거나, 선별된 항체가 불완전한 염기서열만을 가지고 있을 경우, colony lift assay를 시행함으로써 불필요한 노동을 줄일 수가 있었다.

B형 간염 바이러스의 증식을 억제하기 위한 연구들의 초점 중 한 가지는 숙주 세포의 대사에 영향을 주지 않으면서 선택적으로 바이러스의 증식에 필수적인 과정을 억제하는 물질을 개발하는 것이다. B형 간염 바이러스의 중합효소는 증식에 필수적인 작용을 하기 때문에, 바이러스의 증식을 억제한다는 목적에서 그 대상이 될 수 있다. 하지만 화학요법이 지속될 경우 HBV DNA 중합효소에 대한 유전자의 특정부위에 변화를 일으켜 바이러스에 저항성을 유도하였다(8,9). 따라서 치료의 다른 방법으로서 B형 간염 바이러스에 대한 유전자 치료에 대한 관심이 증대되고 있으며, 그중 한 가지 방법으로 감염된 세포의 세포 내에서 특정 항원에 특이적인 재조합 항체의 발현시킬 수 있다(17). 이러한 방법은 실험적으로 감염된 제1형 사람 면역 결핍 바이러스에서 효과가 있음이 발견되었는데, 제1형 사람 면역 결핍 바이러스의 역전사 효소에 대한 항체를 세포 내에서 발현시켰을 때 바이러스의 감염과 증식에 대해 방어적인 효과가 있음을 보여주었다(10,11). B형 간염 바이러스 감염 세포에서 HBV DNA 중합효소는 pregenomic RNA와 함께 뉴클레오캡시드내에 encapsidation되어 priming과정을 거쳐 negative strand DNA 합성을 시작하게 된다. TP domain내의 타이로신 잔기에 HBV DNA 중합효소의 결합이 이루어짐으로써 priming 과정이 시작되므로(3,15,16) 세포 내에서 발현된 TP 영역에 대한 항체가 HBV DNA 중합효소의 priming에 관여하는 TP 영역의 일부에 결합할 경우, priming과 negative strand DNA의 합성을 억제할 가능성이 높다. 따라서 TP 특이 항체의 세포 내 발현이 이루어

진다면, 이러한 기전에 의하여 HBV의 replication을 저해할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 향후 더 연구되어야 할 부분으로 선별된 TP 특이 항체인 1A scFv의 특성 분석과 선별된 scFv에 의한 HBV 중합효소의 priming작용에 대한 효과를 확인하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

TP protein과 pol protein을 공급하여 주신 김영호 교수님(수원대학교 생명과학과)께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bartenschlager R, Schaller H: The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein believed to prime reverse transcription. *EMBO J* 7;4185-4192, 1988
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H: Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64;613-620, 1990
- Weber M, Bronsema V, Bartos H, Bosserhoff A, Bartenschlager R, Schaller H: Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to primer reverse transcription. *J Virol* 68;2994-2999, 1994
- zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR: Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 73;1885-1893, 1999
- Mary AR: Monoclonal antibodies. 2nd ed. p 143, NY, Cambridge university press, 1995
- de Bruin R, Spelt K, Mol J, Koes R, Quattrocchio F: Selection of high affinity phage antibodies from phage display library. *Nature Biotechnology* 17;397-399, 1999
- Brian KK, Jill Winter, John McCaffery: Phage display of peptides and proteins. p79-111, CA, Academic Press, 1996
- Aye TT, Bartholomeuss A, Shaw T, Bowden S, Breschkin A, Mcmillan J, Angus P, Locarnini S: Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatology* 26;1148-1153, 1997
- Tipples GA, Fischer KP, Kneteman NM, Tyrrell DL: Mutation in Human hepatitis virus RNA-depent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 24;714-717, 1996
- Maciejewski JP, Weichold FF, Young NS, Cara A, Zella D, Reitz MS, Gallo RC: Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection in vitro. *Nat Med* 1;667-673, 1995
- Shabeen F, Duan L, Zhu M, Bagasra O, Pomerantz RJ: Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J Virol* 70;3392-3400, 1996
- Wei X, Peterson DL: Expression, purification, and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase. *J Biol Chem* 20;32617-32622, 1996
- Salas M: Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60;39-71, 1991
- Powers JE, Marchbank MT, Deutscher SL: The isolation of U1 RNA-binding antibody fragments from autoimmune human-derived bacteriophage display libraries. *Nucleic Acids Symp Ser* 33;240-243, 1995
- Molnar-Kimber KL, Manson WS: Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. *J Virol* 45;165-172, 1983
- Tavis JE, Ganem D: Expression of functional hepatitis B virus polymerase in yeast reveals it to be the sole viral protein required for correct initiation of reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci* 1;4107-4111, 1993
- Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M: Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 30(1);300-307, 1999
- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC: Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4(1);1-20, 1998