RRPG89120210(32.P)

行政院衛生署專題研究計劃成果報告

年度: 八十九

計畫名稱: 應用嗜菌體展出系統(phage display system)來生產對人類具專一性的B型肝炎病毒抗體及其基因的研究
(Generation and Characterization of Human Hepatitis B Virus Specific Antibodies Using Phage Display System and Studies of Their Variable Gene Usage)

主持人: 楊沂淵 台北醫學院醫技系

計畫編號: DOH89-DC-1019

執行期間: 88/09/15 至 89/12/31

中文摘要

B 型肝炎病毒(HBV)是目前主要引起慢性肝炎的病源之一，可能與肝硬化及肝癌的發生有關。HBV 的 surface 蛋白(HBsAg)在 HBV 的感染複製過程扮演一個非常重要的角色。因此對於治療慢性 B 型肝炎，HBsAg 應該是一個很重要的目標。單株抗體已普遍的應用於治療、診斷及基礎研究中，為了更深入地了解 HBsAg 的可能致病機轉及其單株抗體的可能應用，嗜菌體表現系統提供了一種方法用以產生大量的對 HBsAg 抗原具有特異性的單株抗體。在本研究中我們獲得了兩個含有重鏈結合 kappa 輕鏈或重鏈結合 lambda 輕鏈的抗體基因庫，分別具有 $4.65x10^4$ 和 $2.5x10^5$ 的大小。經過 4 次針對於 HBsAg 的篩選過程後，隨機挑選出的菌株利用限制酵素分析，同時具有 kappa 輕鏈及重鏈的菌株比例由 46.6%增加到 93.3%，同時具有 lambda 輕鏈及重鏈的菌株比例由 71.4%增加到 100%。更進一步由西方點墨分析法偵測到 50kD 大小的蛋白質，顯示輕鏈及重鏈都有被表現出來並構成正確的 Fab 抗體片段結構。初步的 ELISA 結果顯示，4 個菌株可能對 HBsAg 抗原具有特異性。DNA 序列的分析結果顯示 4 個菌株中有 2 個是完全相同但不同於另外 2 個相同的菌株，而且重鏈都是屬於 VH4 這一族。我們所獲得的菌株是否的確對於 HBsAg 具有特異性，仍需要更進一步的證實。經由 DNA 序列的分析比較，將可得知人類抗 HBV 抗體基因中的使用情形。而這些抗 HBV 單株抗體應有助於 B 型肝炎的治療以及闡明 HBsAg 在病毒感染過程中扮演的角色。另外，本實驗所建構的人類抗體基因庫亦可更進一步地應用於篩選對其他不同抗原具有特異性的單株抗體。

關鍵字:B 型肝炎病毒，HBV 的 surface 蛋白(HBsAg)，抗體基因庫，嗜菌體表現系統

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is one of the major pathogens of chronic hepatitis, which may lead to liver cirrhosis and hepatoma. HBV surface antigen (HBsAg) plays an important role in HBV infection. To further study HBsAg and the possible applications of monoclonal antibodies against the virus, phage display system offers an alternative method for the generation of large numbers of anti-HBsAg mono-specific antibody molecules. In the present study, two phage display antibody libraries were established by combining PCR products of heavy chain genes with those of either kappa or lambda light chain genes, resulting in $4.65x10^4$ and $2.5x10^5$ clones in size, respectively. After 4th panning against the purifies HBsAg, the results of restriction analysis on randomly selected clones showed that both heavy and light chain gene inserts increased from 46.6% to 93.3% (kappa library) and 71.4% to 100% (lambda library), respectively. Furthermore, the detection of a 50 kD protein molecule using western blotting technique suggested the heavy and light chain polypeptides have been expressed and associated into the correct configuration. The preliminary ELISA data suggested that 4 clones may be specific for HBsAg, but not for BSA. DNA sequences of 4 clones indicated that 2 clones are identical but different from the other 2 identical clones. Whether or not these Fab fragments are specific for HbsAg molecule remains to be determined. Taken together, our data suggested phage display system could offer an efficient way in the generation of virus-specific clones.

Key words: Hepatitis B virus (HBV), HBV surface antigen (HBsAg) combinatorial library technique, phage display system

Introduction

B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)是一種 42nm，有套膜的病毒，屬於 Hepadnavirus 的一員(17, 18, 22)，如今仍然無法成功地利用細胞培養的方式培養出來，不過，它的生化及生物物理方面的特性的研究已經利用分子生物的技術而有很好的發展(26, 29, 30, 31, 32, 36, 38, 40)。這個病毒有一個主要的外部表面醣蛋白，HBsAg，和一個內部核心蛋白，HBcAg。HBsAg 的主要成份是插入脂肪膜內具有 226 個氨基酸的 S 抗原，二個額外的 HBsAg，因為它們在 HBV 基因體上的位置而被命名為 pre-S1 和 pre-S2 也存在病毒顆粒表面上。不過，它們的量比 S 抗原少．除了完整的痛毒顆粒外，感染的病毒血清也含有不完全的球形和管狀的次病毒顆(22m)，這些主要是由 S 抗原加上不同量的 pre-S1 和 pre-S2 抗原和，在某些情況下，溶解性的 HBeAg 抗原所形成。包含在 HBV 核心的基因體是一個不完全的雙股，因形的 DNA 分子，HBV 的核心中也含有一種 DNA 依賴型 DNA 轉錄脢，它可以在病毒複製時製造 DNA(23, 24)。HBsAg 有多重的抗原特異性(anhgenic speciHcities);一種共同的血清型特異性被命名為 a 的抗原決定位(deteminant);和至少二種次抗原決定位，分別為 d 或 y 和 w 或 r(27)。因此，目前可以發現四種主要的表現型:adw，adr，ayw 和 ayr。這些次型(subtype)各有不同的分佈在世界上各個角落，而且在 B 型肝炎病毒感染的流行病學上是很有價值的診斷特徵。對於感染的保護作用很明顯地是決定於對 a 有特異性的抗體目前發現在 a 抗原決定位有一個特殊突變的 HBV 的變異種 這個突變主要在 S 抗原的第 145 個氨基酸 glycine 由 arginine 取代，一般假設，這是一種自然發生的 HBV 的變異種，因為病毒感染的個人在疫苗引起或是被動性的壓力之下，所作的篩選的結果因此，目前存在的單一特異性(mono-specific)B 型肝炎疫苗可能無法保証個人免於這種"逃避(escape)型變異病毒。這種變異病毒發生頻率到底如何，而且對於疫苗發展上有何整體的關聯目前並不清楚。

HBcAg 被認為是一種 HBV 特異性抗原。HBeAg 則是一種可溶解性的抗原，袖

HBcAg 共同擁有大部分的 HBcAg 的氨基酸序列(33,35)，且帶有一些額外從基因體 precore 區域而來的氨基酸，HBcAg 和 HBeAg 的抗原性反應並不相同。因為是一種病毒核蛋白，所以當病毒大量存在時。是一個很好的感染的標記，有一些在 precore 區域有突變的病毒所產生的病毒顆粒並不含有可以偵測到的 HBcAg 或是 HBeAg.感染到這些變異病毒的後果經常是猛烈的，或是嚴重的慢性肝臟疾病，B 型肝炎疫苗應該可以保護個人免於受到 HBVprecore 突變種的威脅，因為這些疫苗引起的免疫反應是對抗 HBV 表面抗原而不是核心抗原，HBV 病毒的聚合酶具有多重的酵素活性，包括反轉錄聚合酶，DNA 聚合酶，RNase H 和 5' DNA 結合蛋白，因為這個聚合酶缺乏 proofreading 的活性，所以當病毒使用它來進行 DNA 複製時，導致不尋常的高比例的 HBV 基因體突變機率(34) 。

對於慢性明顯的 B 型肝炎感染病人的研究指出肝細胞壞死經常緊接地發生 HBV 的排除及後續的復原，HBV 對於肝細胞並沒有直接的細胞病變作用，有些研究認為肝細胞壞死是由於寄主細胞性免疫(cell-mediated immunity)系統對病毒改變的肝細胞的攻擊，而這類的反應可能是利用特異性 HLA-I 抗原所用發的毒殺性的 T 淋巴球.B 型肝炎分布於全世界，目前大約有 3 億人口的帶原者，在北美和西歐的帶原者比率約為 0.5% 相對於此的亞洲和非洲則超過 5% HBV 有各種不同的傳染方式，主要是以接觸為 HBsAg 陽性的血液為主，全世界每年有不少人死於和慢性 B 型肝炎感染有關的肝硬化及肝臟腫瘤，這種嚴重的後果說明了對 B 型肝炎疫苗的迫切需要，對 B 型肝炎的免疫性主要分為二大類，一為被動性免疫(passive immunization)，一為主動性免疫(activeimmunizaton)．而以 B 型肝炎免疫球蛋白(hepahhs B immune globulin;HBIG)的被動式免疫則被建議在以下的情況作為暴露 B 型肝炎後的預防性治療:(i)皮膚或是粘膜意外地接觸到 HBsAg 的陽性血液;(ii)和 HBsAg 陽性個人發生性行為;和(iii)HBsAg 陽性母親所生產的嬰兒(4)這些 HBIG 是從具有高效價抗 HBs 抗體的綜合血清純化而來，這些不同時間純化而來的免疫球蛋白的安全性雖然一再地被確認，不過，它們受到致病性病毒，如

HIV 或是其他目前尚未能鑑定的痛毒的污染可能性卻不容忽視。

很多研究認為大部分的字體免疫抗替及發展過程中 重要的調節性抗體共同享有一小組的生殖體(gem-line)免疫球蛋白變化(variable)區域基因(8,9,11,18,20)，這些研究令人想起有些特定的自體抗體在發展過程不同時期扮演著重要的角色而且在維持成人的抗體 repertoire 的平衡有著主導的地位，(instrumental)，為了評估這一個假說，我們需要產生帶有對自體或其他抗原特異性的人類抗體，而且決定他們的輕鏈及重鏈的 V 基因使用情形。況且，經由傳統融合技術或是最近發展的噬菌體、展示系統(phage display system)或是聯合抗體基因庫技術(combinatorial antibody technique)來製造人類單株抗體也已經在診斷或治療試劑的發展中引起極大的興趣。非常惋惜的是，由於製造人類特異性抗體上的困難，目前為止，只有非常少的這種抗體的重鏈及輕鏈 V 基因被研究出來(12,13,15,16)為了矯正這類情形，我們提議利用這個新的技術來選殖和表現人類抗體的 Fab 片段在絲狀 M13 噬菌體的表面上(1,2,10,14)，然後再決定大量的 VH 和 VL 基因序列，這些選殖的重鏈及輕鏈基因可以隨意地在體外配對以產生帶有不同抗原結合能力的各類抗體的聯合基因庫，另外，重組的 Fab 抗體片段和 M13 噬菌體表面基因Ⅲ蛋白約共同表現可大大地降低從聯合基因庫中篩選抗原特異性的抗體的難度這個技術最重要的優點是利用一種幾乎完美的 panning 過程，可以同時篩選和強化非常大量我們所需要的特原特異性抗體。事實上，很多特異性的人類 Fab 抗體已經從不曾免疫過或是具有低效價血清抗體的個人分離出來 這使得這種噬菌體展示系統更令人注意雖然很難決定在所分離出的 Fab 片段中同樣的配對情形是否發生在原來的抗體 repertoire 裡，不過，這種技術的重要性在於我們可以利用它來找到所需要的你多帶有目標抗原具有高親和力及特異性的有作用的 Fab 抗體(3,5,6,7,21,25)。

我們在本研究中利用這個嗜菌體展出系統來製造一些抗 HBV 特異性抗原的抗體，其中抗 HBsAg 表面抗原的抗體已經被證明可以保護人類免於受 HBV 的感染

(23)，特別是我們將製造一些帶有 anti-HBsAg 的 Fab 片段，整體而言，從我們的研究所產生的結果，除了抗 HBV 特異性的抗體，在將來可以應用到 B 型肝炎病毒的被動疫苗的發展，用來防止和治療急性或慢性 HBV 感染外，另外在完成這些 B 型肝炎免疫球蛋白抗體變化區(variable region)基因的序列(sequence)之後，用來證明以前其他學者提出的，是否特定的 V 基因重複的被用來製造生物發展過程中重要的自體抗體和對抗一些常見環境中致病物質的抗體的假設，最後，我們從這個研究中所製造出來的抗 HBV Fab 抗體將可以被用來作為發展其他抗 HBV 物質例如雙特異性抗體(bi-specific antibody)和帶有抗病毒藥物抗體的應用。

實驗材料與方法

本實驗所使用的方法乃是利用基因工程的技術發展出聯合基因組庫技術(combinatorial library technique)用以製造 high specificity 以及 high affinity 的 human monoclonal antibody。其主要是藉著 Phage display system 將 Fab 表現在絲狀噬菌體(filamentous phage)的表面上，並藉由 Panning 的方式篩選出具有高度特異性的 Fab。

血液樣本的取得(Blood Sample)：我們希望從同一個體內建立起含有 anti-HBV and anti-HCV 抗體的 library. 因此血液樣本由國立台灣大學附設醫院楊培銘醫師提供，病人為慢性 C 型肝炎患者，分離出來的血清經由台北醫學院附設醫院使用 EIA 再次確認病人體內有抗 HBV 以及 HCV 抗體的存在(Table 1)。

分離單核球(Peripheral Blood Mononuclear Cell Separation):

取病人的血液約 10 ml，離心 2000 rpm 10 分鐘後將上層的血清取出儲存在-70℃中，下層的血球部份以 RPMI 1640 medium 稀釋到 10 ml，混合均勻後將此 10 ml 血球緩緩加到另一管已事先加入 5 ml Ficoll-Paque (Pharmacia)的 tube 中，讓血球保持在 Ficoll-Paque 的上面，離心 2000 rpm 30 分鐘後將單核球層分離到新的 tube 中並加入 RPMI 1640 medium 培養液清洗 1 次後，將細胞打散在 1 ml medium 中，計算細胞數目後，每 2.5 x 10^6 個細胞分裝成一管。

RNA 萃取(RNA extraction)

將 10^6~10^7 cells 加入 1 ml Trizol，靜置於 4℃ 5 分鐘，再加入 0.2 ml 氯仿(chloroform)，靜置 4℃ 5 分鐘後離心 12000 rpm 15 分鐘 4℃，將上面的 RNA 層約 0.5 ml 轉移到新的微量離心管中，加入 0.5 ml isopropanol 混合均勻置於-70℃隔夜，離心 12000 rpm 30 分鐘 4℃，將上清液移除，加入 1 ml 75% alcohol 清洗後真空乾燥 1~2 分鐘，沈澱物溶於 20 λ DEPC H_2O (Diethylpyrocarbonate) 中，再以 UV-spectrophotometer (Gene Quant II，phamacia Biotech) OD_{260}/OD_{280} 測 RNA 的吸光值、濃度及純度。

反轉錄反應-聚合酵素鏈鎖反應

取 RNA 20 μg 加入 oligo dT 320 pmole，再加入 DEPC H_2O 使體積為 27 λ，經過 70℃ 10 分鐘後再加入 5X RT buffer 10 λ，DTT 0.5 μmole，dNTP 75 nmole，Human placental ribonuclease inhibitor (RNAsin) 40 units，SuperScript II reverse transcriptase 400 units，加入 DEPC H_2O 使最終的體積為 50 λ。放入 PCR machine (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 2400/9600) 25℃ 10 分鐘，42℃ 50 分鐘，90℃ 15 分鐘之後便可得到 cDNA。取由 RT 所做出來的 cDNA 1 λ 加入 10X PCR buffer 5 λ，$MgCl_2$ 37.5 nmole，dNTP 6.25 nmole，sense primer 10 pmole，antisense primer 10 pmole (primers: Table 2,3,4)，Taq DNA polymerase (Gibco) 0.625 unit，再加入 Q H_2O 使總體積達到 25 λ。經過 94℃ 15 秒，52℃ 50 秒，72℃ 1 分 30 秒，三個溫度重複 36 次循環後，再給予 72℃ 10 分鐘，4℃ 便可得到 PCR 產物。PCR 產物與 6X DNA loading dye 2 λ混合後以 2% agarose gel [使用 0.5 X TBE 作為 buffer 內含 EtBr (0.2 μg/ml)]在電泳槽(Cosmo, Mupid-2 mini gel migration trough)中以 100v 分離。

抗體基因組庫的建立及篩選

分別將 κ 輕鏈，λ 輕鏈及重鏈的 PCR 產物混合在一起，加入 0.1 倍體積 3M sodium acetate & 0.7 倍體積 isopropanol 置於-70℃隔夜，離心 12000 rpm 20

分鐘 4℃，上清液去除後加入 75% alcohol 清洗後再將 DNA 真空乾燥 1～2 分鐘，DNA 溶於 20 λ Q H_2O 中。取 PCR 產物 5 μg 與 pComb3H vector 10 μg 以限制酵素作用(重鏈: SpeI/XhoI; 輕鏈: SacI/XbaI)，總體積為酵素體積的 10 倍，置於 37℃隔夜。將用限制酵素切過的 DNA 跑 2%洋菜膠電泳，在 UV 下將正確 DNA 大小的部份切下來(PCR 產物: 680 bp; pComb3H: 3.7 kb)。將 DNA 由洋菜膠中回收(DNA recovery) (試劑組 Qiagen Qiaxe II gel extraction kit)將前述切下的洋菜膠秤重，分成約 250 mg/片，加入 3 倍體積的 QX1 溶液及 10 λ 已先 vortex 30 秒的 QXII，再置於 50℃ 10 分鐘，再經過離心 10000 rpm 30 秒，將上清液移除後再加入 0.5 ml QX1，離心 10000 rpm 30 秒後將上清液移除，使用同樣方式加入 0.5 ml PE buffer 洗 2 次，將上清液移除後室溫乾燥再加入 20 λ Q H_2O，再離心 10000 rpm 30 秒後將上清液取出測濃度並保存在-80℃中。取經過限制酵素切過的 PCR 產物 1～2 μg 與 pComb3H 1.4 μg 加入 T4 DNA ligase 50 units (Biolab)，10X ligation buffer 20 λ再加 Q H_2O 使總體積為 200 λ，16℃隔夜後 70℃ 10 分鐘。以 sodium acetate & isopropanol 沈澱 DNA，再以 75% alcohol 清洗後溶在 15 λ Q H_2O 中。

電擊(Electroporation)

將全部接合的 DNA 加入 300 λ competent cell，4℃ 1 分鐘後放進 0.2 cm gap cuvette 做電擊[(Bio-Rad, Gene pulser II) 2.5 kv, 25 μFD and 200 Ω]，再使用 5 ml 預先溫熱的 SOC medium 將 competent cell 從 cuvette 中取出，37℃ 1 小時，加入 10 ml SB medium [Ampicillin 20 μg/ml ; Tetracycline 10 μg/ml] 並且從中取出 1 λ、10 λ、100 λ劃 LB plate (Ampicillin 50 μg/ml)。15 ml 培養液置於 37℃ 1 小時，加入 Ampicillin 使最後濃度為 50 μg/ml，37 ℃ 1 小時，將這 15 ml culture 倒進 100 ml SB (Ampicillin 50 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml)中，37℃隔夜。離心 4000 rpm 15 分鐘 4℃，沈澱物加入 8 ml P1 溶液混合均勻後加入 8 ml P2 溶液，上下倒置數次混合後靜置於室溫 5 分鐘，加入

8 ml P3 溶液，上下倒置數次混合後 4℃ 5 分鐘，離心 12000 rpm 30 分鐘 4℃，將上清液取出加入 0.7 倍體積 isopropanol，-70℃ 30 分鐘，離心 12000 rpm 20 分鐘，上清液除去後溶在 500 λ Q H_2O 中再以等體積 phenol/chloroform (1:1 混合) 萃取 plasmid DNA，之後加入 0.7 倍體積 isopropanol 沈澱 DNA 並以 75% alcohol 清洗，真空乾燥 2 分鐘，溶在 400 λ Q H_2O 中。若重鏈與輕鏈都接到載體上了則是與上述步驟類似，電擊後使用 5 ml 預先溫熱的 SOC 將 competent cell 從 cuvette 中取出，37℃ 1 小時，加入 10 ml SB (Ampicillin 20 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml) 並且從中取出 1 λ、10 λ、100 λ劃 LB plate (Ampicillin 50 μg/ml) 以決定基因組庫大小。15 ml 的培養液置於 37℃ 1 小時，加入 Ampicillin 使最後濃度為 50 μg/ml，37℃ 1 小時，加入 helper phage VCS M13 10^{12} pfu，室溫 10 分鐘後轉移到 100 ml SB (Ampicillin 50 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml) 中，37℃ 2 小時，加入 kanamycin 使其濃度達 70 μg/ml，37℃隔夜。離心 4000 rpm 15 分鐘 4℃，沈澱物使用 P1, P2, P3 溶液將 plasmid 分離出來，溶在 400 λ Q H_2O 中。含有嗜菌體的上清液加入 4% PEG-8000 和 3% NaCl，放在 shaker 中 5 分鐘使其完全溶解，放置於冰上 30 分鐘，離心 9000 rpm 20 分鐘 4℃，上清液去除後將瓶子倒置在吸水紙上 10 分鐘，將嗜菌體沈澱物溶在 2 ml PBS 中，分裝至微量離心管中，離心 12000 rpm 10 分鐘，上清液儲存於-20℃中。

測定嗜菌體的效價(Phage titer determination)

取出培養隔夜的 E. coli-XL1 blue (用含 Tetracycline 10 μg/ml 的 LB 培養) 200 λ加入 6 ml Top agar，在 Top agar 凝固前倒到不含抗生素的 LB plate 上，凝固後將經過一系列稀釋的嗜菌體(用 PBS 稀釋)，各取 1 λ滴在 plate 上(範圍從 10^{-7}~10^{-11})，37℃隔夜，計算 plaque 的數量決定 phage 的 titer。前述劃 1 λ、10 λ、100 λ的 plate 計算 colon 數量後任意挑出其中 15 colony 分別培養在 1 ml LB (Ampicillin 50 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml) 中，37℃隔夜後離心 12000 rpm 10 分鐘，沈澱物加入 100 λ P1 溶液混合均勻後加入 100 λ P2 溶液，上下倒置

數次混合後靜置於室溫5分鐘，加入100 λ P3溶液，上下倒置數次混合後4℃ 5分鐘，離心 12000 rpm 30 分鐘 4℃，將上清液取出加入 0.1 倍體積 3M sodium acetate & 0.7 倍體積 isopropanol，-70℃ 30 分鐘，離心12000 rpm 20 分鐘，上清液除去後以 75% alcohol 清洗，真空乾燥 2 分鐘，溶在 50 λ Q H_2O 中。取 2 λ跑洋菜膠電泳(electrophoresis)確定 plasmid 的 DNA size 是否正確與其所佔的比例。

重組基因庫的篩選(Biopanning)

將 ELISA plate wells 加入 50 λ抗原(0.5 μg/well)，4℃隔夜，把液體移除後用 Q H_2O 清洗 2 次，blocking 加入 3% BSA 200 λ （使用 PBS 或 TBST 泡製），37℃ 1 小時，液體移除後加入 50 λ嗜菌體，37℃ 2 小時，將嗜菌體移除後以 200 λ TBST 清洗，將液體移除(重複清洗的步驟 10 次)，加入 50 λ elution buffer，室溫靜置 10 分鐘，使用 pipette 快速持續吸放後吸出，將 elute 出來的液體吸出加入 3 λ 2M Tris 中和，再加入 2 ml 培養隔夜的 E. coli，室溫中 10 分鐘後加入10 ml SB (Ampicillin 20 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml)並且從中取出1 λ、10 λ、100 λ劃 LB plate (Ampicillin 50 μg/ml)，12 ml culture 置於 37℃ 1 小時，加入 Ampicillin 使最後濃度為 50 μg/ml，37℃ 1 小時，加入 helper phage VCS M13 10^{12} pfu，室溫 10 分鐘後轉移到 100 ml SB (Ampicillin 50 μg/ml; Tetracycline 10 μg/ml)中，37℃ 2 小時，加入 Kanamycin 使其濃度達 70 μg/ml，37℃ 搖隔夜。離心 4000 rpm 15 分鐘 4℃，含有嗜菌體的上清液加入 4% PEG-8000 和 3% NaCl，放在 shaker 中 5 分鐘使其完全溶解，再將之放置於冰上 30 分鐘，離心 9000 rpm 20 分鐘 4℃，上清液去除後將瓶子倒置在吸水紙上 10 分鐘，將嗜菌體沈澱物溶在 2 ml PBS 中，分裝至微量離心管，離心 12000 rpm 10 分鐘，上清液儲存於-20℃中。嗜菌體效價與挑 15 個抽跑電泳的步驟與前面所述相同。重複 panning 的步驟 4 次。在第 4 次將培養 100 ml 的 E. coli 用 P1, P2, P3 將 plasmid 分離出來。

可溶性抗體片段的製備(Soluble Fab preparation)

為了要得到可溶性抗體片段，第 4 次 panning 所純化的 plasmid DNA 5 μg 以限制酵素 SpeI及 NheI在 37℃作用隔夜。經洋菜膠電泳分離後，將 4.2 kb 的部份切下並使用試劑組(QIAGEN Qiaex II gel extraction kit)將洋菜膠中的 DNA 回收，取出回收的 DNA 200 ng 加入 T4 DNA ligase 1 λ，10X ligase buffer 2 λ，最後體積為 20 λ，16℃隔夜。取接合後的 DNA 1 λ加入 competent cells 40 λ 利用電擊方法(electroporation)做細胞轉形，再以 2 ml SOC 將之洗出，在 37℃ 培養 1 小時後取 1 λ, 10 λ以及 100 λ劃 LB plate (Ampicillin 50 μg/ml)，在 37℃培養。隔天，挑一些單一菌株純化 plasmid DNA 以確定哪些菌株含有正確的重組 DNA，這些菌株再分別培養在 10 ml SB ($MgCl_2$ 20 mM, Ampicillin 50 μg/ml)，37℃ 6 小時後加入 IPTG 使濃度達 0.1 mM 和 3 mM 之間。把溫箱溫度降至 30℃，經隔夜培養後離心 1500 rpm 15 分鐘，將細胞沈澱物溶在 1 ml PBS 中，利用冷凍及解凍方法(-70℃ 20 分鐘，37℃ 20 分鐘重複 4 次)將細胞打破，離心 12000 rpm 10 分鐘，將上清液取出保存在-70℃中。

聚丙醯氨膠體電泳(SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

分為上層 5%的 stacking gel [1M Tris-HCl (pH 6.8) 0.25 ml, 30% acrylamide 0.33 ml, 10% SDS 20 λ, ddH_2O 1.4 ml, ammonium persulfate 15 λ, TEMED 2 λ]與下層 12%的 separating gel [1.5M Tris-HCl (pH 8.4) 0.94 ml, 30% acrylamide 1.5 ml, dd H_2O 1.24 ml, 10% SDS 37.5 λ, ammonium persulfate 28 λ, TEMED 3.75 λ]，先將 separating gel 製備好後注入兩片玻璃片中，約注入到距離玻璃片上緣 3 cm 處(電泳梳 2 cm 與 stacking gel 1 cm)，再注入一些 2-butanol 將界面壓平，經過約 15 分鐘等 gel 凝固後將 2-butanol 移除，再注入 stacking gel 到滿，同時將電泳梳(comb)插進 gel 中，經過約 15 分鐘 gel 凝固後將 comb 移走。將 gel 架設於電泳槽中。將前述含有 soluble Fab 抗體的細胞溶解液 15 λ和 non-reducing protein loading buffer 5 λ混合後，95℃加熱 5

分鐘，再把此 sample 加進電泳槽中，直到 Bromophenol blue 跑出膠體為止。

西方點墨分析法(Western blot analysis)

以 100 mA 轉漬過夜，取出轉漬後的 NC paper 以 5%脫脂奶粉(用 TBST 配製)淹蓋並搖 1 小時之後加入 Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-human κ light chain or λ light chain antibody (1 : 4000)，1 小時後，將液體移去後加入多量的 TBST 沖洗，將 TBST 移去後加入呈色劑[DAB (0.5 mg/ml) in 10 ml 0.05M Tris pH 7.6 + 10 λ 30% H_2O_2]，搖 10~30 分鐘或直到蛋白明顯出現後觀察結果。

酵素連結免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

首先 coating 與 blocking 的步驟與先前的 panning 相同，將所得到的 Fab 取 50 λ加入各 well 中，37℃ 1 小時後甩掉溶液，利用 PBS 來清洗 wells 後再甩乾。加入 50 λ以 blocking solution 稀釋 4000 倍 HRP congugated goat anti-human kapppa light chain or lambda light chain antibody 至每一 well 中，作用一小時後清洗並甩乾，再加入50 λ受質溶液(TMB)，作用適當時間後加入25 λ 1N HCl 來停止反應，此時溶液呈黃色。再利用 ELISA reader (Molecular Devices, Emax, precision microplate reader)讀取 $OD_{450-650}$ 的吸光值。

DNA 序列分析(DNA sequencing)

一段和重鏈 constant region 互補的引子 SeqGb 5'-GTC GTT GAC CAG GCA GCC CAG 利用 sequencer (ABI PRISM 377-96 DNA sequencer, Perkin-Elmer, CA, USA; Reagent: ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, USA)來決定重鏈 variable region 的 nucleotide 序列。這些重鏈的 DNA 序列經由 V base 作抗體基因的分析比對，以找出可能製造出這段重鏈片段的 germline 基因。(http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/DNAPLOT.html)

實驗結果與分析

檢體抗體分析

本實驗中，由台大醫院提供慢性C型肝炎病患血液檢體，為了要確定我們的血液檢體含有我們所需要的抗體，亦即 anti-HBsAg and anti-HCV，於是將血清檢體做EIA檢定，分析結果證實此血液中含有抗B型肝炎病毒抗體存在(Table 1)。

cDNA的合成及抗體片段重鏈、輕鏈基因的放大

將萃取出來的全部 RNA 經由反轉錄反應得到的 cDNA，利用各組不同的引子(Table 2, 3, 4)分別將 IgG 的重鏈、kappa 輕鏈及 lambda 輕鏈的各族(Family)基因放大出來，在此我們另外加入幾組引子，ConGa/CG1z、ConKa/Ck1d 和 ConL1/CL2 分別作為重鏈 kappa 輕鏈及 lambda 輕鏈的 PCR 控制組，用以確定 cDNA 及 PCR 的反應使否確實執行。將 PCR 產物經由 2 %的洋菜膠電泳分析結果(Figures 1 and 2)來看，重鏈及輕鏈的各組在約 680 bp 的位置，控制組在約 330 bp 的位置都可看到主要的 band，與預期的結果相同。由此顯示 cDNA 的合成完全及抗體片段基因的成功複製。在電泳圖上除了主要的PCR產物之外仍有一些不同大小的產物出現，這可能由於引子的專一性不夠高所造成的。而在各族之間所放大的 PCR 產物含量並不一樣，而且不同個體來源所得到的 PCR 產物量也不盡相同，甚至於相同個體在不同時間所提供的血液檢體所做出來的 PCR 產物也會有差異，顯示個體之間，不同時間內B細胞的抗體表現略有不同。

抗體基因組庫的建立

由於以往的經驗來看，輕鏈的部份較重鏈容易被送入載體之中，於是我們先將輕鏈及 pComb3H 載體使用限制酵素 SacI/XbaI作用後跑洋菜膠電泳。而輕鏈部份則分為 kappa 輕鏈及 lambda 輕鏈，再使用 T4 DNA 連接酵素將輕鏈及載體接合。再經由電擊的方式將此重組 DNA 送入 E. coli 中計算此含有輕鏈的基因庫大小得到分別為 kappa library $1.6x10^6$ 及 lambda library $5.25x10^5$ (Table 5)。為了要確定輕鏈的確有被送入 pComb3H 中，我們將基因庫的全部 plasmid DNA (total DNA)及由個別菌株所得到的 plasmid 利用限制酵素作用後跑洋菜膠電泳(Figures

3 and 4)。由 Figure 3 中可看到含有 kappa 及 lambda 輕鏈的重組 DNA（以下分別簡稱為 K+P3H；L+P3H)經 SacI/XbaI分解後皆可看到一條約 680 bp 的片段，而經過 SpeI/XhoI作用後則出現一條約 300 bp 的片段。再觀察單一菌株所得到的 plasmid 跑電泳的結果(Figure 4)，所有的菌株位置不大一樣，其中約有一半估計是正確的，再經過限制酵素作用跑電泳後在 SacI/XbaI組可明顯看到與 P3H 的 1.2 kb 底下有一段約為 680 bp 的 band 出現而 SpeI/XhoI部份則有些菌株能切出 300 bp 的 band。由以上結果可確定輕鏈的部份確實有接進 P3H 中。

緊接著要把重鏈的部份送入 K+P3H 及 L+P3H 中之後，同樣將此重組 DNA 送入 E. coli 後計算其抗體基因庫的大小而得到 4.65×10^4 含有 kappa 輕鏈及重鏈的基因庫(簡稱為 K+P3H+HC)，2.5×10^5 含有 lambda 輕鏈及重鏈的基因庫(簡稱為 L+P3H+HC) (Table 5)。全部 DNA 的部份可明顯看到 K+P3H+HC 與 L+P3H+HC 經 SacI/XbaI與 SpeI/XhoI處理後都切出了約 680 bp 的片段，在此 K+P3H、L+P3H 與 P3H 被用來作為控制組對照。在個別菌株的部份也有同樣的結果，大部分的菌株經兩組限制酵素處理後都能切出 680 bp 大小的片段。由以上的結果顯示輕鏈及重鏈都成功地送入載體中。

Anti-HBsAg 抗體的菌株篩選

將前述的重組嗜菌體組庫經由 panning 來篩選並富化抗 HBsAg 抗原的菌株，由第一次 panning 到第四次的嗜菌體組庫大小都在 10^4 以內(Table 6)，似乎並沒有增加，但是由每次 panning 的個別菌株分析，DNA 大小正確的菌株/全部的菌株，kappa 由 46.6 增加為 93.3%，lambda 由 71%增加為 100%，在培養皿上的菌落外觀也顯示正確的菌株比例也有相同的結果(data not show)。第四次 panning 後的全部 DNA 及個別菌株的 DNA 皆用前述兩組酵素處理並跑 DNA 電泳來確定重鏈輕鏈的存在。由結果顯示第四次 panning 後的 DNA 輕鏈及重鏈都存在。由以上的實驗結果顯示可能有特定的菌株被篩選到並富化出來。

抗體片段的表現

將經過四次 panning 的全部 DNA 以限制酵素 SpeI/NheI將 pComb3H 上的 geneIII的部份切除並跑 DNA 電泳將之分離，可明顯看到在約 556 bp 的位置可看到一條 band，確定 geneIII有被切除後再將 4.2 kb 位置的洋菜膠切下，同樣利用試劑組將 DNA 回收，之後再以接合酵素做自體接合(self-ligation)並送入 E. coli 中。由全部 DNA 跑電泳的結果，切除 geneIII的 DNA 較切除前的 DNA 位置要低，顯示 geneIII被切除且也成功地自體接合。由培養皿中挑選 54 個菌株做抗體片段表現並且抽取其 plasmid DNA，由 DNA 正確(data not show)的菌株的細胞分解上清液做西方點墨分析確定抗體片段的表現，經由初步的酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)分析，由其中挑選出 4 個吸光值較高的再做重複性實驗。以此狀況下再做西方點墨分析，由結果可看到在 clone L4、L5、L15 都可在 50 kD 的位置看到 band。由此結果顯示，E. coli 的確有表現出人類的抗體基因片段。

ELISA 確認抗體片段對於 HBsAg 抗原的結合能力

初步的 ELISA 分析結果，4 個菌株對 HBsAg 的吸光值($OD_{450-650}$)減去對 BSA 的吸光值後得到 L4: 0.1655; L5: 0.356; L15: 0.3055; L21: 0.3605。而 negative control: P3H (只有 pComb3H 載體的菌株)減掉 BSA 後的吸光值為-0.3465。結果顯示，4 個菌株的吸光值明顯高於 negative control 的吸光值，顯示 4 個菌株對於 HBsAg 抗原可能具有結合特異性。

DNA 序列分析

4 個菌株的重鏈 DNA 序列(Table 7)經過 V base 的分析比對後，其中 L4 和 L15 完全相同，L5 和 L21 完全相同，而 L4、L15 和 L5、L21 則有相當多的差異，其中比較 L4 和 L5 的一段含有 399 個 nucleotides 的 V region 顯示總共有 46 個 nucleotides 不同。尤其在 CDR3 的區域，L4 和 L5 則有 24 個 nucleotides 差異，而且 4 個菌株都是屬於 VH4 這一族(L4 和 L15 屬於 VH4f; L5 和 L21 屬於 VH4g)。

討論

B 型肝炎病毒為最主要的肝臟疾病致病源，目前對於 B 型肝炎病毒而產生的

免疫反應知道的仍不多，而缺乏有效的治療方法則讓我們對於抗體在闡明 HBV 在致病機轉上所扮演的角色具有高度的興趣。由於病毒抗原部位的高複雜度，對於其 epitope 的完整特性研究對於單株抗體都具有廣大的需求。而先前研究顯示人體對於 B 型肝炎病毒感染而產生的抗體，抗 HBsAg 抗體的部份具有最高的中和能力。目前單株抗體大多是來自於融合瘤技術，但是此種技術大多是取自嚙齒動物，故其製作出來的抗體使用於人體中會引起不必要的免疫反應，於是便嘗試將嚙齒動物的抗體 Fab 接上人類的 Fc 部份，甚至僅移植動物抗體的補體決定部位(CDR)到人類抗體中，但是仍然無法克服以上所提的問題，而產生抗體的融合瘤細胞並不穩定，常在培養一段時間後便失去產生抗體的能力。目前只有少數的抗 HBC 單株抗體被製造出來，所以便嘗試使用重組 DNA 技術在 E. coli 中來選殖人類抗體基因片段，然後再使所有的抗體分子表現在 VCM13 嗜菌體上，以利篩選出抗原特異性的單株抗體。本研究即利用這種所謂的 phage display system 來建構抗體基因庫以及篩選對 HBsAg 蛋白有特異性的抗體分子，再分析它們的基因結構。以往的經驗，輕鏈接入載體的效率似乎較重鏈佳，因此我們選擇先將輕鏈接入載體中再接入重鏈，最後我們所得到的抗體基因庫約為 10^5 大小，相較於理論上要達到 10^7、10^8 似乎有一大斷的距離，效率不好似乎是大家共同的問題，這主要可能出現在限制酵素作用在 PCR 產物的效率不明(因為切出的片段太小，所以到底有沒有切，效果好不好並不知道)。嗜菌體在感染 E. coli 的過程中需要 E. coli 中的F因子作為進入的媒介，因此需要有Tetracycline的加入，因為Tetracycline是E. coli 產生F因子的重要誘導物。

從 4 次篩選後的 library size 來看(Table 6)，都維持在 10^3~10^4 之間，顯示這些菌株對於 HBsAg 抗原的結合已經達到飽和，有些研究報告的篩選過程也觀察到類似的情形。由 4 次篩選過後的單一菌株所分離出來的 DNA 大小可知，含有正確 DNA 的菌株比例由 kappa 的 46.6%增加為 93.3%，lambda 的 71.4%增加為 100%，這種結果顯示篩選的過程中某些特異性的菌株有被富化的情形。有些文章

也指出使用不同方式例如，利用原來篩選用的抗原當作 eluting agent，將嗜菌體 elute 出來也有可能會得到不同的菌株，這也是非常值得探討的有趣現象。由於 pComb3H 並不是一個好的表現載體，所以可溶性抗體片段的誘導方式更是重要。可溶性抗體片段的產生需要加入 IPTG 來誘導，而 IPTG 所使用的濃度由 0.1 mM~4 mM 都有人用(Shibui et al., 1992; McGregor et al., 1994)，而一般大都在 30℃ 的環境中讓 E. coli 表現抗體片段，而我們選擇較低濃度 0.1 mM 是因為根據我們的實驗結果 IPTG 在高濃度之下可能造成對 E. coli 的毒性，而若在 37℃ 培養則誘導出來的抗體片段濃度明顯較低(Sommerville et al., 1994)。由 western blot 的結果來看，等量的 cell lysate 之中的抗體片段含量也不一樣，這可能是各菌株之間的差異或是實驗誤差所致。ELISA 初步結果顯示，本實驗製備出的抗 HBsAg 抗體片段可能具有特異性。但是，4 個菌株對 NS3 的吸光值與對 BSA 的吸光值之間的差異並不是非常明顯。最主要的可能因素是使用未經純化的 cell lysate 來進行實驗，E. coli 中所含的各種物質可能會干擾抗體片段的結合特性。根據以往經驗來看，常常需要利用純化過的 Fab 抗體來確認抗體片段對抗原的結合特異性，而且需要再以 competitive ELISA 來更進一步加以證實。

由於目前抗 HBsAg 單株抗體的文獻並沒有很多，因此實際上要歸納各種不同抗體基因在人體中的使用情形仍需要有更多的數據。但由本實驗所得的結果顯示，所有的重鏈都是屬於 VH4 這一族，暗示人體中的抗 HBsAg 抗體可能是偏向於來自 germ line 上的某些族群，但實際上仍須更多的抗 HBsAg 單株抗體的基因序列資料才能加以證實。

References

1. Barbas, C.F. and Burton, D.R. 1992. Monoclonal antibodies from combinatorial libraries. Handout for 1992. Cold Spring Harbor Laboratory Course.
2. Barbas, C. F., Kang, A.S., Lerner, R.A. and Benkovic, S.J. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.
3. Barbas, S.M., Ditzel, H.J., Salonen, E.M., Yang, W.-P., Silverman, G.J. and Burton, D.R. 1995. Human autoantibody recognition of DNA. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2529-2533.
4. Beasley, R.P., Lin, C.C., Huang, L.Y. and Chen, D.S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. Lancet 2: 1 129-1133.
5. Burton, D.R., Barbas, C.F., Persson, M.A.A., Hoenig, S., Chanock, R.M. and Lerner, R.A. 1991. A large array of human monoclonal antibodies to type I human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10134-10137.
6. Chang, C. N., Landolfi, N.F. and Queen, C. 1991. Expression of antibody Fab domain on bacteriophage surfaces: Potential use for antibody selection. J. Immunol. 147:3610.
7. Chazenbalk, G. D., S. Portolano, S., Russo, D., Hutchison, J.S., Rapoporr B. and McLachlan, S.M. 1993. Human organ-specific autoimmune disease. Molecular cloning and expression of an autoantibody gene repertoire of a major autoantigen reveals an antigenic immunodominant region and restricted immunoglobulin gene usage in the target organ. J. Clin. Invest. 92:62-74.
8. Chen, P.P. and Carson, D.A. 1991. Molecular and genetic studies of human autoantibodies. In Molecular Autoimmunity: Molecular, Oncologic, Genetic Immunology and Clinical Aspects. N. Talal, editor. Academic Press Ltd., London. 65-179.
9. Chen, P.P., Olsen, N.J., Yang, P.M., Soto-Gil, R.W., Olee, T., Siminovitch, K.A. and Carson, D.A. 1990. From human autoantibodies to fetal antibody repertoire to B cell malignancy: It's a small world after all. Int. Rev. Immunol. 5:239-251.
10. Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. and Winter, G. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352:624-628.
11. Dersimonian, H., Long, A., ~Rubinstein, D., Stillao, B.D. and Schwartz, R.S. 1990. Vh genes of human autoantibodies. Int. Rev. Immunol. 5: 253-264.
12. Ermel, R.W., Kenny, T.P., Wong, A., Solomon, A., Chen, P.P. and Robbins, D.L. 1994. Preferential utilization of a novel Vlambda3 gene in monoclonal rheumatoid

factors derived from the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum 37:860-868.

13. Harindranath, N., Goldfarb, I.S., Ikematsu, H., Burastero, S.E., Wilder, R.L., Notkins, A.L. and Casali, P. 1991. Complete sequence of the genes encoding the Vh and V~, regions of low- and high-affinity monoclonal IgM and IgAI rheumatoid factors produced by CD5+ B cells from a rheumatoid arthritis patient. Int Immunol 3: 865-875.
14. Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S.A., Klang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D:R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. Science 246:1275-1281.
15. Jain, R.I., Fais, F., Kaplan, S., Sellars, B., Brooks, R., Chartash, E., Furie, R., Hashimoto, S. and Chiorazzi, N. h995. Ig H and L chain variable region gene sequence analyses of twelve synovial tissue-derived B cell lines producing IgA, IgG, and IgM rheumatoid factors structure/function comparisons of antigenic specificity, V gene sequence, and Ig isotype. Autoimmunity 22: 229-243.
16. Lu, E.W., Deftos, M., Olee, T., Huang, D.- ., to-Gil, R.W.; Carson, D.A. and Chen, P.P. 1993. Generation and molecular analyses two rheumatoid synovial fluid-derived IgG rheumatoid factors: Arthritis Rheum 36: 927-937.
17. Marion, P.L., Knight, S.S., Feitelson, M.A., Oshiro, L.S. and Robinson, W.S. I983. Major polypeptide of duck hepatitis B surface antigen particles. J. Virol. 48: 534-541 .
18. Marion, P.L., Oshiro, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. and Robinson, W.S. 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of human. Proc Natl Acad Sci USA 77: 2941-2945.
19. Pascual, V., Andris, J. and Capra, J.D. 1990. Heavy chain variable region geneutilization in human antibodies. Int. Rev. Immunol. 5: 231-238.
20. Pascual, V. and Capra, T.D. I991. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression. Adv. Immunol. 49: 1-74.
21. Portolano, S., McLachlan, S.M. and Rapoport, B. 1993. High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies. J. Immunol. 151:2839-2851.
22. Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4533-4537.
23. Twu, J.R.S. and Schloemer, R.S. 1987. Trans-activation function of hepatitis B virus. J. Virol. 61: 3448-3453.
24. Twu, J.R.S. and Robinson W.S. 1989. The hepatitis B virus X-gene can trans-

activate heterologous viral sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2046-2050.

25. Williamson, R.A., Burioni, R., Sanna, P.P., Partridge, L.J., Barbas, C.F. and Burton, D.R. 1993. Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4141-4145.
26. Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M. and Schaller, H. 1990. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. J. Virol. 64: 5324-5332.
27. Beasley, R.P., Lin, C.C., Huang, L.Y. and Chen, D.S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwari. Lancet 2: 1129-1133.
28. Bissett, J., Eisenberg, M., Gregory, P., Robinson, W.S. and Merigan; T.C. 1988. Recombinant fibroblast interferon and immune interferon for treating chronic hepatitis B virus infection: patient tolerance and the effect on viral markers. J. Infect. Dis. 157: 1076-1080.
29. Chen, H.-S., Kew, M.C., Hornbuckle, W.E., Tenriant, B.C; Cote, P.J, Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Ivliller, RH. 1992. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. J. Virol. 66: 5682-5684.
30. Chisari, F.V. 1992. Hepatitis B virus biology and pathogenesis. In Molecular Genetic Medicine, ed. T Friedmann, pp. 67-104. San Diego: Academic.
31. Chisari, F.V. and Ferrari, C. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol. 13: 29-60.
32. Chisari, F.V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. 1987. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6909-6913.
33. Gough, N.M. 1983. Core and E-antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messager RNAs. J. Mol. Biol. 165: 683-699.
34. Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, J., Varmus, H.E. and Ganem, D. 1990. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packing as well as for reverse transcription. Nature 344: 552-555.
35. Marion, P.L., Knight, S.S., Feitelson, M.A., Oshiro, L.S. and Robinson, W.S. 1983. Major polypeptide of duck hepatitis B surface antigen particles. J. Virol. 48: 534-541.
36. Marion, P.L., Oshiro, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. and Robinson, W.S. 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of human.

Proc Natl Acad Sci USA 77: 2941-2945.

37. Saibara, T., Onishi, S. and Ito, K. 1988. Clinical and immunological effects of recombinant interleukin-2 treatment in HBeAg-positive chronic .hepatitis B. In: Zuckerman AJ, ed. Viral hepatitis and liver disease. New York: Alan R Liss, 879-883.
38. Sherlock, S., Fox, R.A., Niazi, S.P. and Scheuer, P.J..1970. Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australian) antigen in serum. Lancet 2: 1243-1247.
39. Smith, C.I., Weissberg, J., Bernhardt, L., Gregory, P.B., Robinson, W.S. and Merigan, T.C. 1983. Acute Dane particle suppression with recombinant leukocyte A interferon in chronic hepatitis B virus infection. J. Infect. Dis. 148: 907-913.
40. Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis arid hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4533-4537.

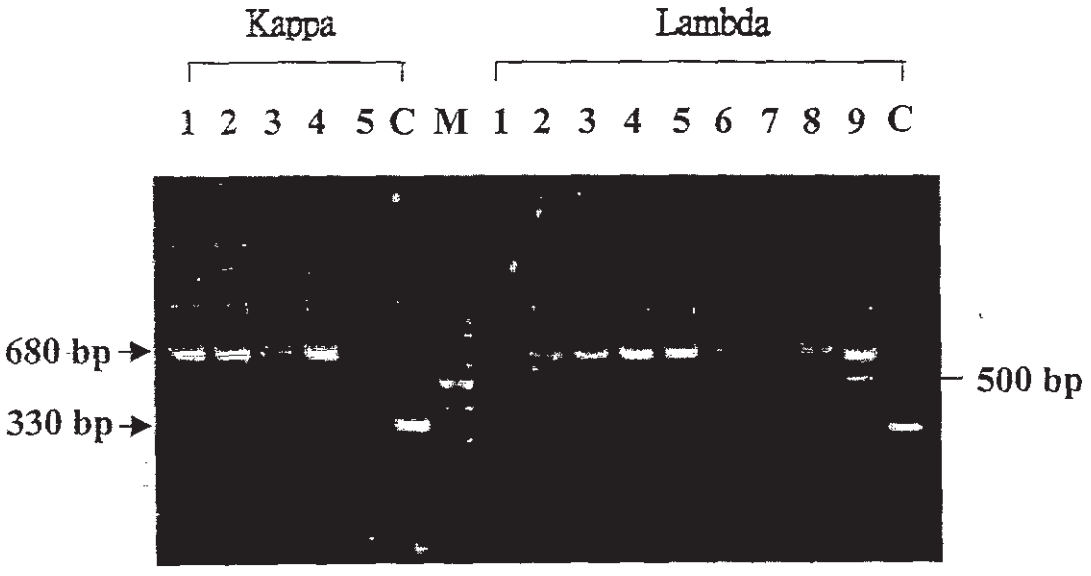

Figure 1. PCR amplification of human light chain gene. Lanes (in kappa panel) 1~5 represent κ LC and lanes (in lambda panel) 1~9 represent λ LC. Various 5' primers paired with common 3'primers (Table 2, 3) were used to amplify κ LC and λ LC genes. The PCR-amplified 680 bp band was indicated. Lanes C were positive control samples with 330 bp in molecular weight to monitor the quality of isolated total RNAs. Lane M is 100 bp ladder DNA markers.

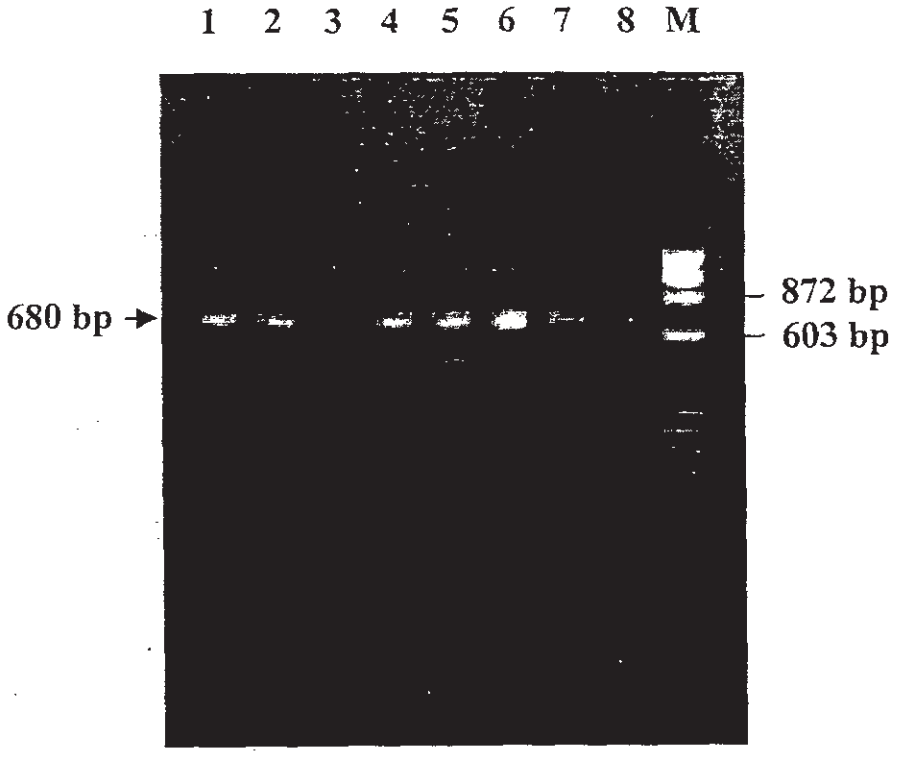

Figure 2. PCR amplification of human heavy chain gene. Lanes 1~8 represent the 680 bp products amplified by various 5' primers paired with common 3'primers (Table 4). Lane M is ϕx174RF/HaeIII DNA markers.

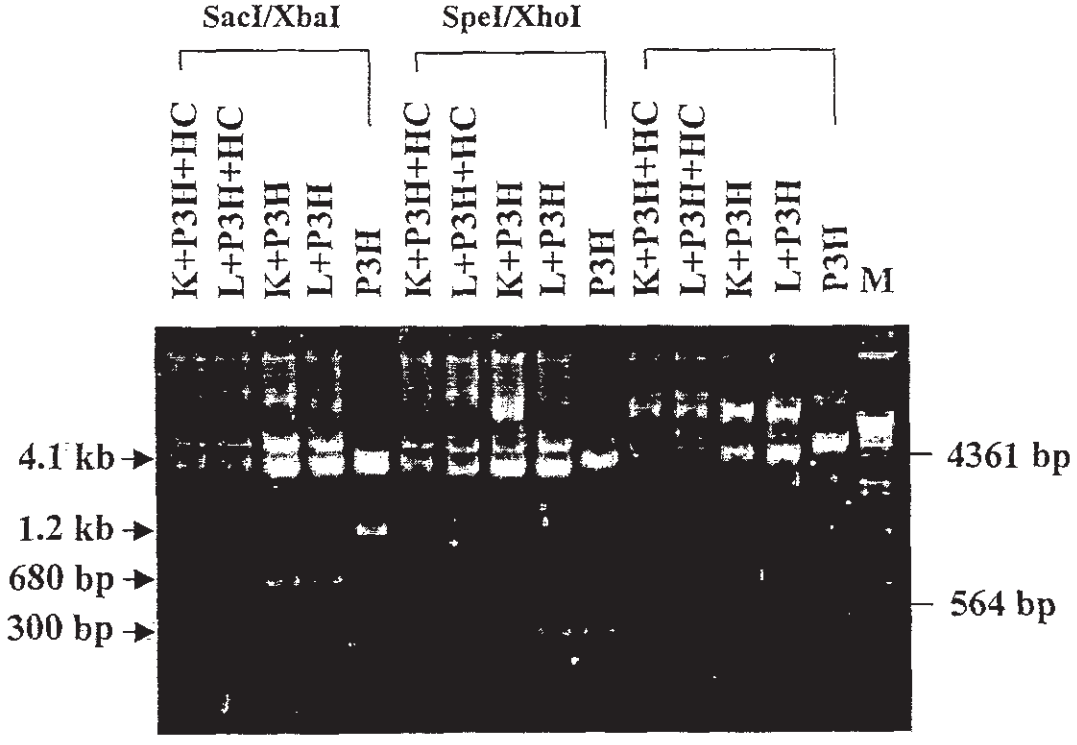

Figure 3. Analysis of recombinant DNA isolated from two antibody libraries. Two libraries containing either κ LC (K+P3H+HC) or λ LC (L+P3H+HC). The expected bane 680 bp (LC and HC inserts) were detected after SacI/XbaI and SpeI/XhoI digestion as described in the material and methods. The identical DNA samples were loaded in the last set without any digestion. Lane M is λ /HindIII DNA markers.

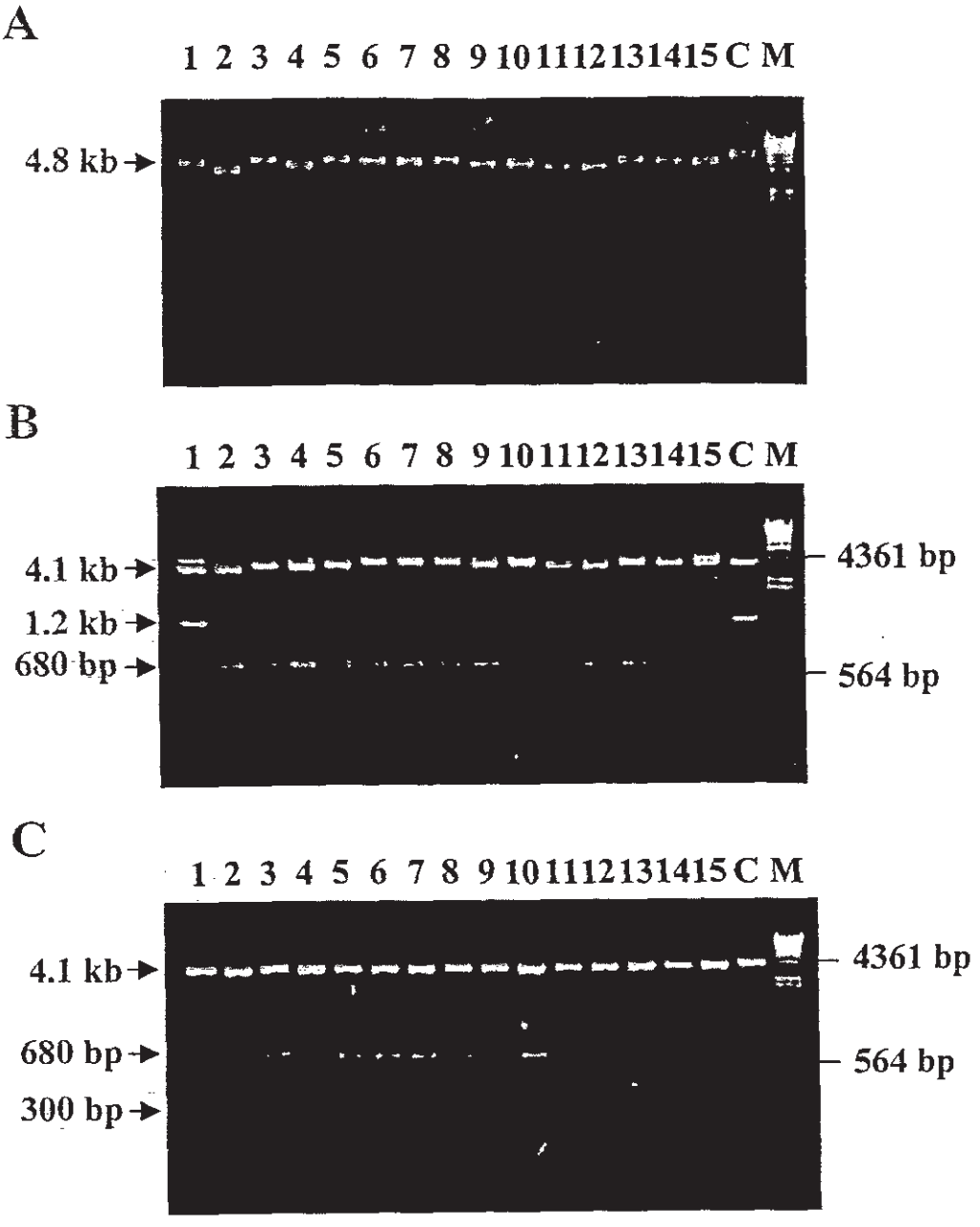

Figure 4. Gel electrophoresis of recombinant DNA from HBsAg specific clones (kappa). Plasmid DNA of 15 clones without restriction (A), SacI/XbaI (B) and SpeI/XhoI (C) digestion, were loaded onto 2% agarose gel. Six of 15 clones (40%) have both κ LC and HC chain inserts. Lane C (pComb3H vector only) in each panel was used as control. Lanes M donate λ /HindIII DNA markers.

Table 1. EIA analysis of Ags and Abs for HBV, HCV in patient serum.

HBsAg	Negative (—)
Anti-HBs	**Positive** (+)
HBeAg	Negative (+)
Anti-HBe	**Positive** (+)
Anti-HBc	**Positive** (+)
Anti-HBc IgM	Negative (—)
Anti-HCV	**Positive** (+)
GOT	77 U/L*
GPT	120 U/L*

*Normal range < 31 U/L

Table 2. PCR primers for human IgG kappa light chain genes.

KAPPA CHAIN VARIABLE DOMAIN 5' PRIMERS

VK1 a : 5' - GAC ATC **GAG CTC** ACC CAG TCT CCA - 3' (24 mer)

VK1 s : 5' - GAC ATC **GAG CTC** ACC CAG TCT CC - 3' (23 mer)

VK2a : 5' - GAT ATT **GAG CTC** ACT CAG TCT CCA - 3' (24 mer)

VK3a : 5' - GAA ATT **GAG CTC** ACG CAG TCT CCA - 3' (24 mer)

VK3b : 5' - GAA ATT **GAG CTC** AC(G/A) CAG TCT CCA - 3' (24 mer)

KAPPA CHAIN CONSTANT DOMAIN 5' PRIMERS

CONKa : 5' - ACT GTG GCT GCA CCA TCT G - 3' (19 mer)

KAPPA CHAIN CONSTANT DOMAIN 3' PRIMERS

CK1d : 5' - GCG CCG **TCT AGA** ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G - 3' (57 mer)

Table 3. PCR primers for human IgG lambda light chain genes.

LAMBDA CHAIN VARIABLE DOMAIN 5' PRIMERS

VL1 :	5' - AAT TTT **GAG CTC** ACT CAG CCC CAC - 3'	(24 mer)
VL2 :	5' - TCT GCC **GAG CTC** CAG CCT GCC TCC GTG - 3'	(27 mer)
VL3 :	5' - TCT GTG **GAG CTC** CAG CCG CCC TCA GTG - 3'	(27 mer)
VL4 :	5' - TCT GAA **GAG CTC** CAG GAC CCT GTT GTG TCT GTG - 3'	(30 mer)
VL5 :	5' - CAGTCT **GAG CTC** ACG CAG CCG CCC - 3'	(24 mer)
VL6 :	5' - CAG ACT **GAG CTC** ACT CAG GAG CCC - 3'	(24 mer)
VL7 :	5' - CAG GTT **GAG CTC** ACT CAA CCG CCC - 3'	(24 mer)
VL8 :	5' - CAG GCT **GAG CTC** ACT CAG CCG TCT TCC - 3'	(27 mer)
VL1β :	5' - CAG TCT **GAG CTC** ACT CAG CCA CC - 3'	(23 mer)

LAMBDA CHAIN CONSTANT DOMAIN 5' PRIMERS

CONL1 :	5' - AAG GCT GCC CCC ACG GTC ACT CTG - 3'	(24 mer)

LAMBDA CHAIN CONSTANT DOMAIN 3' PRIMERS

CL2 :	5' - CGC CGT **CTA GAA** TTA TGA ACA TTC TGT AGG - 3'	(30 mer)

Table 4. PCR primers for human IgG heavy chain genes.

HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN 5' PRIMERS

Vh1a : 5' - CAG GTG CAG **CTC GAG** CAG TCT GGG - 3' (24 mer)

VH1f : 5' - CAG GTG CAG CTG **CTC GAG** TCT GGG - 3' (24 mer)

VH2f : 5' - CAG GTG CAG CTA **CTC GAG** TCG GG - 3' (23 mer)

VH3a : 5' - GAG GTG CAG **CTC GAG** GAG TCT GGG - 3' (24 mer)

VH3f : 5' - GAG GTG CAG CTG **CTC GAG** TCT GGG - 3' (24 mer)

VH4f : 5' - CAG GTG CAG CTG **CTC GAG** TCG GG - 3' (23 mer)

VH4g : 5' - CAG GTG CAG CTA **CTC GAG** TGG GG - 3' (23 mer)

VH6a : 5' - CAG GTA CAG **CTC GAG** CAG TCA GG - 3' (23 mer)

HEAVY CHAIN CONSTANT DOMAIN 5' PRIMERS :

$IgG_1/IgG_2/IgG_3$:

CONGa : 5' - TCC ACC AAG GGC CCA TCG - 3' (18mer)

HEAVY CHAIN CONSTANT DOMAIN 3' PRIMERS

IgG1

CG1z : 5' - GCA TGT **ACT AGT** TTT GTC ACA AGA TTT GGG - 3' (30 mer)

Table 6. Eluted and amplified phage titers after each panning.

	Eluted phage		Amplified phage	
	Kappa	lambda	kappa	lambda
1st panning	2.4×10^3	4.8×10^3	9×10^8	2×10^9
2nd panning	1.5×10^3	5.0×10^3	1×10^9	8×10^8
3rd panning	9.0×10^3	5.0×10^3	3×10^9	4×10^9
4th panning	6.0×10^3	5.5×10^3	2×10^9	9×10^8
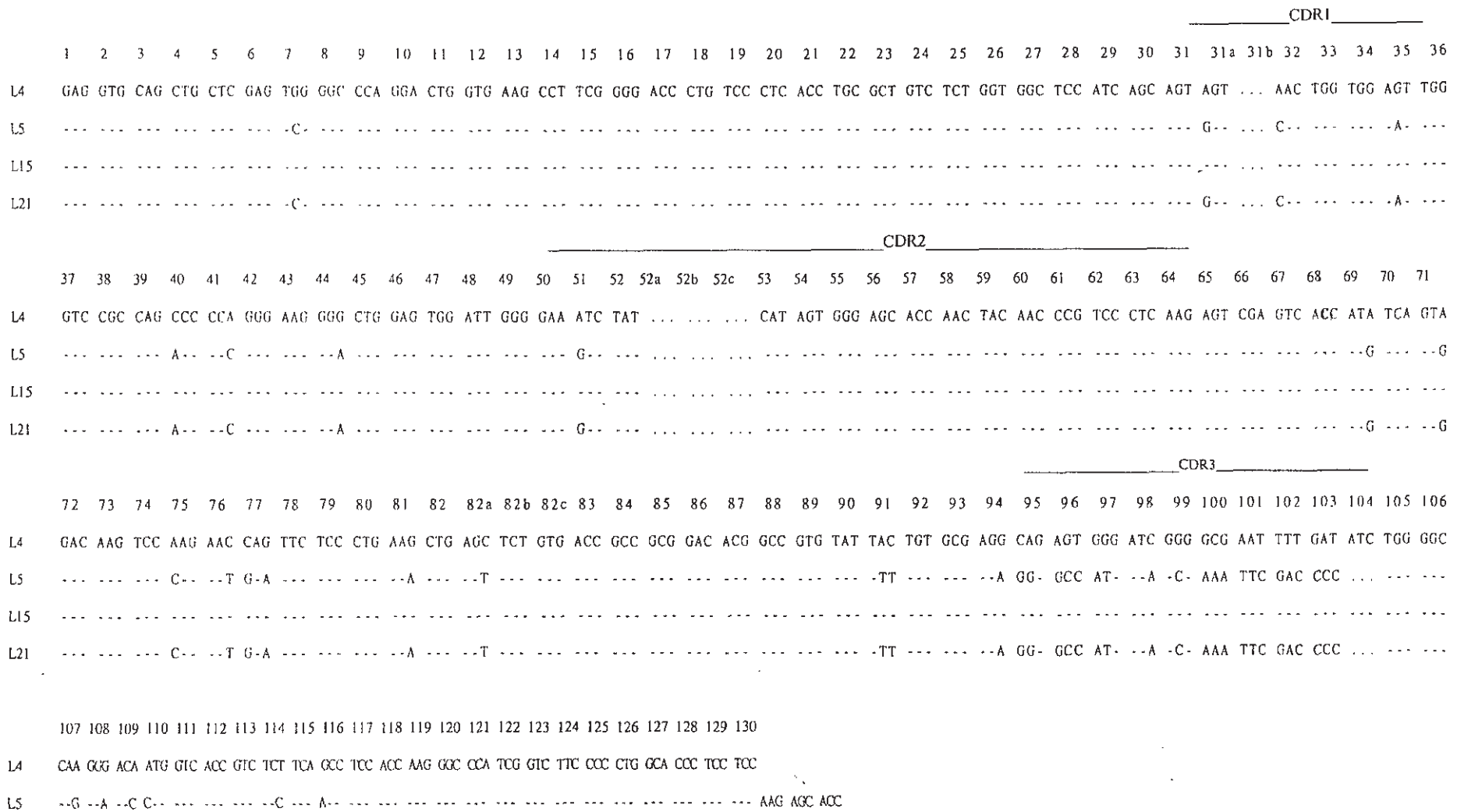
Table 7. Heavy chain gene sequences of L4, L5, L15, and L21 clones.