

## 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의한 HCV-RNA의 검출 : Biotin 및 방사성옥소 표지 Primer로 구성된 Kit의 이용

울산의대 서울중앙병원 핵의학과, 내과\*, 아산생명과학연구소\*\*

류진숙 · 문대혁 · 천준홍\*\* · 정윤영  
박홍동\* · 정영화\* · 이영상\*

= Abstract =

### Detection of HCV-RNA by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Using Biotinylated and Radioiodinated Primers

Jin-Sook Ryu, M.D., Dae Hyuk Moon, M.D., Jun Hong Cheon M.D.\*\*\*, Yoon Young Chung,  
Hung Dong Park, M.D.\*, Young Hwa Chung, M.D.\*, Young Sang Lee, M.D.\*

Department of Nuclear Medicine and Internal Medicine\*, Asan Institute for Life Sciences\*\*,  
Asan Medical Center, University of Ulsan, Seoul, Korea

This study was performed to evaluate the clinical applicability of the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) kit of HCV-RNA using biotinylated and radioiodinated primers.

Study subjects were 118 patients with positive anti-HCV. HCV-RNA in patient's serum was extracted by guanidium thiocyanate method. After first amplification, the product was reamplified by primers labelled with biotin and I-125. The final amplification product was detected by counting the radioactivity after incubation in avidin coated tubes. In 51 samples, the test was repeated for evaluation of reproducibility. This new method was also compared with conventional RT-PCR methods in 34 samples from patients with chronic liver disease.

The results were as follows;

- 1) HCV-RNA was positive in 85(97%) of 88 patients with chronic liver disease, and in 23 (73%) of 30 patients with normal liver function.
- 2) In comparison with conventional method, HCV-RNA was detected in 32(94%) of 34 patients with new method, whereas in 27(79%) of the same group with conventional method.
- 3) Repeated test with new method in 52 samples demonstrated 82% of concordant result.

In conclusion, new method with biotinylated and radioiodinated primers was more sensitive than conventional method. However, great care must be taken for quality control because there were considerable interassay variation and possibility of false positivity and false negativity.

**Key Words:** Polymerase chain reaction, HCV-RNA, Viral hepatitis

### 서 론

비A 비B형 간염의 원인 인자로 1989년에 C형 간염 바이러스(HCV)의 존재가 확인되었고<sup>1)</sup>, 그 이후

90% 이상의 수혈 후 발생하는 비A 비B형 간염과 대부분의 산발성 비A 비B형 간염의 발생에 HCV가 관여하는 것으로 알려지고 있다. 현재 C형 간염의 임상 진단에는 anti-HCV ELISA법이 널리 이용되고 있는데, 이는 임상적 이용에 있어서 몇가지 제한점을 지니

고 있다<sup>2)</sup>. 즉, anti-HCV가 감염후 양성으로 나타날 때까지 수개월이 걸린다는 점과 과거의 회복된 감염과 현재의 증식성있는 바이러스의 감염상태를 구별할 수 없다는 점, anti-HCV가 음성인 무증상의 HCV 보유자가 존재한다는 점등이 문제가 된다. 따라서 HCV 감염의 직접적인 증거를 나타내는 예민한 사방법이 요구되고 있는데, 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 방법에 의한 HCV-RNA의 검출방법도 그 해결책의 하나로 각광받고 있다<sup>3)</sup>. RT-PCR은 국내에서도 이미 연구가 활발히 진행되고 있으며<sup>4-6)</sup>, 이는 HCV의 염기서열과 역전사 중합효소를 이용하여 HCV-RNA에 대한 cDNA를 합성하고 PCR방법으로 증폭하여 혈청내에 존재하는 극미량의 HCV-RNA를 검출할 수 있는 방법이다. PCR에 의한 HCV-RNA의 검출은 곧 HCV바이러스 혈증을 의미하므로, anti-HCV ELISA 결과가 음성으로 나오는 급성기의 C형 간염을 진단하고, anti-HCV 양성혈액이 실제 감염력을 갖고 있는지도 판별하며, 항바이러스제 투여후의 치료반응을 판정하는데도 유용하게 쓰일 수 있다.

그러나 RT-PCR법은 이러한 장점에도 불구하고 실제 임상검사실에서 시행하기에는 문제점이 많다. 실험방법이 까다롭고 시간과 노력이 많이 요구되어 실용적이지 못하기 때문인데, 따라서 보다 간편하면서도 정확한 결과를 낼수 있는 kit의 개발이 요구되고 있는 실정이다<sup>7)</sup>. 최근 PCR을 임상에서도 수행코자하는 노력의 일환으로 PCR 증폭산물을 좀더 쉽고 빠르게 검출할 수 있도록 새로운 검출방법이 소개된 바 있는데<sup>8)</sup>, 이는 한 쌍의 primer에 biotin과 I-125를 표지시켜서 PCR을 시행하고 biotin과 친화력이 매우 강한 avidin이 코팅된 시험관에 반응시킨후, I-125를 감마선 계수하여 PCR 증폭산물을 확인하는 방법이다(Fig. 1). 저자들은 이러한 새로운 기법을 적용하여 상품화된 kit를 이용하여 HCV-RNA 검출을 시도하고, 그 유용성을 평가하여 보았다.

## 방법 및 대상

### 1. 연구대상

1993년 10월부터 1994년 3월까지 서울중앙병원 소화기 내과 클리닉을 방문하여 anti-HCV EIA

(Abott, USA) 양성인 성인환자 118명을 대상으로 하였으며, 이들 중 간기능검사에서 6개월이상 혈청 ALT치의 지속적인 증가 소견을 보이거나 간 조직검 사상 만성 간염이나 간경화 소견을 보인 환자들을 A군으로, 6개월 이상 간기능검사 정상이었던 환자들을 B군으로 분류하였고, 6개월간 한번 정도만 ALT 증가소견을 보인 환자나 B형간염 항원 양성인 환자와 이미 항바이러스제로 치료받은 환자는 연구대상에서 제외하였다.

## 2. 방법

### 1) 검체 채취 및 보관

대상 환자들에 대한 채혈은 무균적으로 시행하였으며, 미리 고압소독된 진공 시험관에 채혈한 후 즉시 혈청을 원심분리하고, 분획으로 나누어  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다가 사용하였다.

### 2) Kit를 이용한 RT-PCR에 의한 혈청내 HCV-RNA의 검출

RT-PCR를 이용한 HCV-RNA의 검출은 혈청내 HCV-RNA의 추출, 추출된 RNA의 cDNA로의 역전사, 유전자 증폭 및 증폭산물 확인의 네과정으로 구분된다.

혈청내 RNA의 추출은 guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform법<sup>9)</sup>을 이용하였다. 즉, 혈청  $150\mu\text{l}$ 에 추출용액 (0.5M guanidium thiocyanate, 7.25mM sodium citrate, 0.5% N-Lauroysarcosine sodium salt, 0.7% 2-mercaptoethanol)  $300\mu\text{l}$ 를 가하고 90초간 진탕하였다. 다시 pH 4의 sodium acetate  $45\mu\text{l}$ 를 추가한후, pH 4의 phenol  $495\mu\text{l}$ 를 가하고, chloroform-isoamylalcohol(49 : 1 V/V) 용액  $100\mu\text{l}$ 를 섞어서 10초간 진탕하였다.  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치 후 원심분리하고 상층액  $450\mu\text{l}$ 를 취하여 다른 시험관으로 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 혼합하고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 방치하여 RNA를 침전시켰다. RNA는 다시 80% ethanol로 정제 건조시킨 후 DEPC(diethylpyrocarbonate) 처리된 증류수  $10\mu\text{l}$ 에 넣어 재부유 시켰다.

다음에는 역전사효소와 AMPLICIS II HCV<sup>®</sup> (CIS, France) kit내의 RT-primer를 이용하여 추출된 HCV-RNA를 cDNA로 역전사 시켰다. RNA solution  $10\mu\text{l}$ 에 반응액혼합물 (primer  $1\mu\text{l}$ , 5X reaction

buffer 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, 25mM mixed dNTPs 0.5 $\mu$ l, DEPC treated D.W. 2 $\mu$ l, reverse transcriptase (Moloney murine leukemia virus 200U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l) 을 가지고 42°C에서 1시간 반응시켜 99°C에 5분간 두었다가 즉시 4°C에 보관 하였다.

cDNA의 1차 증폭과정은 DEPC 처리한 증류수 24 $\mu$ l, 10X buffer 3 $\mu$ l, 5'noncoding region에 대한 1쌍의 primer 2.5 $\mu$ l, Taq DNA polymerase 2.5 unit로 구성된 반응액 30 $\mu$ l에 cDNA 용액 20 $\mu$ l 넣어 혼합하고 10 $\mu$ l의 mineral oil을 첨가한 후 95°C에 5분간 두었다가 thermal cycler에 넣고 95°C 1분간 denaturation, 40°C 1분간 annealing 및 72°C 1분간의 extension 과정을 40회 반복한 후 72°C에서 7분간 방치하였다. 1차 증폭이 끝난후 1쌍의 변형된 primer (biotinylated, <sup>125</sup>I labelled primer)를 이용하여 2차 증폭을 시행하였다. 2차 증폭과정은 DEPC 처리한 증류수 6.25 $\mu$ l, 10 $\times$ buffer 2.5 $\mu$ l, 1.25mM dNTPs 5 $\mu$ l, capture primer 2 $\mu$ l, radioactive primer 7 $\mu$ l, Taq DNA polymerase 0.25 $\mu$ l로 구성된 반응액에 1차 증폭산물 2 $\mu$ l를 넣어 혼합하고 10 $\mu$ l의 mineral oil을 넣은 후 95°C 1분간 denaturation, 40°C 1분간 annealing 및 72°C 1분간 extension을 15회 반복하고 72°C에서 7분간 방치하였다.

최종 증폭산물을 확인하기 위하여 avidin이 코팅된 시험관에 fixation buffer 500 $\mu$ l를 가지고 2차 증폭산물 20 $\mu$ l를 넣어 혼합하고 37°C에서 1시간 둔 후 세척 과정을 거쳐 감마선 계수기로 계수하였다. Plasmid DNA로 된 2개 이상의 양성대조 검체와  $\phi$ X 174 phage DNA로 된 3개 이상의 음성대조 검체를 환자 검체와 같은 방법으로 항상 동시에 실험을 수행하였고 음성대조 계수치의 평균값에 표준편차의 5배수를 더하여 양성판정의 기준치로 하였다. 정도관리를 위해 양성대조 검체와 음성대조 검체의 계수비가 최소한 10이상이 되도록 하고, 전 실험과정에서 오염방지를 위한 수칙을 철저히 준수하였다.

### 3) 검사의 재현성 확인

Anti-HCV 양성인 환자 혈청 중 무작위로 51개의 검체를 선정하여, 냉동보관한 혈청의 다른 분획으로 같은 실험을 반복하였다.

### 4) 다른 기존의 RT-PCR 법과의 비교

A군 환자혈청 중 34개 검체는 본 연구소에서 정등<sup>4)</sup>

에 의해 확립된 방법으로도 동시에 RT-PCR를 시행하여 결과를 비교하였다. 즉, 혈청내 RNA의 추출은 guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 법을 이용하였고, 두쌍의 HCV-RNA의 5'-noncoding region에 특이성을 가지는 primer는 합성하여 이용하였다. 역전사 반응을 위해서 10 $\mu$ l의 RNA 추출용액에 외부 primer쌍중 antisense oligonucleotide 30pmole을 넣고 90°C수조에서 2분간 가열한 후 얼음으로 급속히 냉각시켜 RNA를 denature 시키고 50mM의 Tris HCl(pH 7.5), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, dNTP 각 0.5mM, ribonuclease inhibitor 10unit 및 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 10unit를 넣고 증류수로 20 $\mu$ l 용액을 만든 다음 잘 혼합하여 42°C에서 60분간 반응시켰다. 첫번째 PCR은 cDNA 표본 20 $\mu$ l와 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, Taq DNA polymerase 2.5unit, dNTP 각 0.5mM 씩과 외부 primer쌍 각 30pmole씩 넣고 증류수로 100 $\mu$ l를 만들어 시행하였다. cDNA의 증폭은 thermal cycler를 이용하였으며 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1.5분간 annealing 및 72°C에서 3분간의 extension 과정을 35회 반복하였다. 다음으로 PCR 산물 중 20 $\mu$ l를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 염색후 자외선하에서 221 bp의 cDNA 띠를 확인하였다. 첫번째 PCR에서 cDNA 띠를 확인할 수 없었던 표본에서는 1 $\mu$ l의 1차 PCR 산물과 내부 primer쌍을 이용하여 첫번째 PCR과 동일한 방법으로 재증폭한 후 2% agarose gel에서 145bp의 cDNA 띠를 재확인하였다.

## 결 과

Anti-HCV 양성이면서 간조직 검사상 만성간염이나 간경화 소견을 보이거나, 6개월 이상 지속적인 간기능 이상을 나타낸 환자 A군 88명 중 85명 (97%)에서 AMPLICIS II HCV<sup>®</sup> kit를 이용한 RT-PCR 방법으로 HCV-RNA 양성을 나타내었다. 반면, anti-HCV 양성이면서 6개월이상 간기능이 정상이었던 B군에서는 환자 30명 중 22명 (73%)에서 HCV-RNA 양성소견을 보였다(Fig 2). 기존의 다른 방법으로도 PCR을 병행한 A군 34명중, kit를 사용했을때

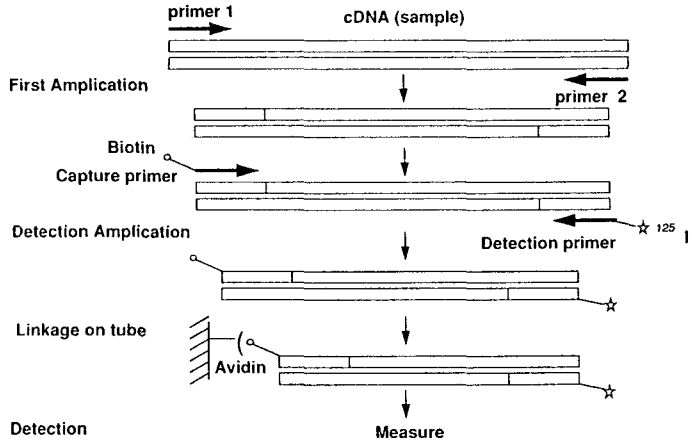


Fig. 1. Comparison of AMPLICIS II kit method and conventional method in positive rate.

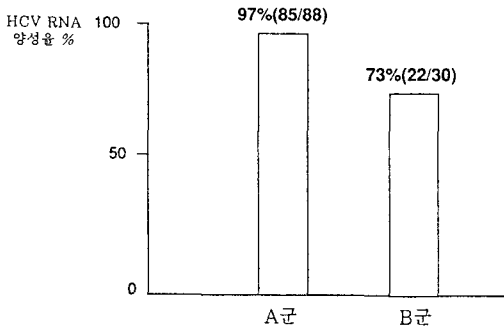


Fig. 2. Positive rate of HCV-RNA according to subgroup.

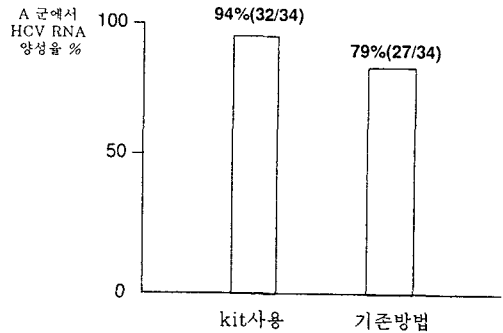


Fig. 3. Comparison of AMPLICIS II kit method and conventional method in positive rate.

는 32명 (94%)에서, 기존 방법을 사용했을 때는 27명(79%)에서 HCV-RNA 양성을 나타내었다(Fig. 3). 검사에 소요된 전체시간은 kit를 이용한 경우 평균 12시간, 기존방법의 경우 평균 15시간이 소요되었다. 검사의 재현성을 보기위하여 무작위로 anti-HCV 양성인 51개의 검체를 추출하여 kit로 2번 실험을 반복했을때, 42개(82%)에서 일치된 결과를 얻었다(Fig. 4).

### 고 찰

이상의 결과는 본 연구에서 새로 적용한 RT-PCR 방법이 기존방법에 비하여 상대적으로 간편하면서도 Southern blot법에 버금가는 예민도를 지닌다는 것을

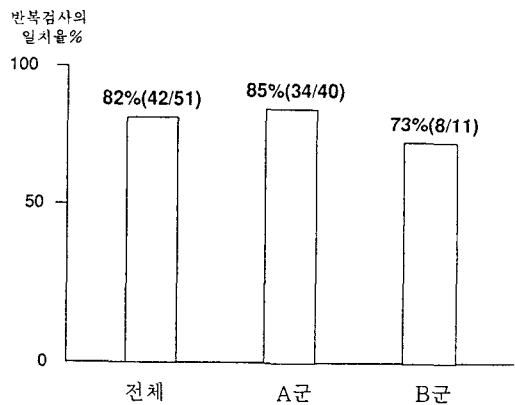


Fig. 4. Reroducibili of PCR

보여 주고 있다. 즉, HCV-RNA가 대부분 양성일 것으로 기대되는<sup>10)</sup> 만성 C형 간질환 환자에서 97%라는 높은 양성율을 보였고, 기존의 RT-PCR후 전기영동하는 방법과의 직접비교에서 기존방법으로 79%의 양성율을 보인 반면 새로운 kit를 사용했을때는 93%의 더 높은 양성율을 나타내었다. 만성 비A비B 간염시 C형 간염 항체 양성예중에서 HCV-RNA는 보고자에 따라 17-100%의 양성율을 보고하고 있는데, 위의 결과는 국내에 보고 된 정등<sup>6)</sup>의 결과에서의 85%보다 높은 양성율이며, 조등<sup>5)</sup>이 96%라고 보고한 것과 유사한 양성율을 나타낸다. 이는 biotin에 대한 avidin의 높은 친화력으로 DNA를 tube에 부착시키기에 편리하고 효과적이며, I-125는 일반 핵의학 검사실에서 흔히 사용되는 동위원소로서 PCR 산물의 계측이 전기영동상의 띠를 눈으로 보고 양성 여부를 결정하는 것보다 더 쉽고 객관적으로 판독할 수 있기때문으로 생각된다<sup>8)</sup>. 또한 anti-HCV 양성이나 ALT가 6개월 이상 정상이며 무증상이었던 환자군에서도 73%의 HCV-RNA 양성 소견을 보였다. 이들 환자군중의 HCV-RNA 양성율을 비교할만한 보고는 적은 편인데, Alberti 등<sup>11)</sup>의 보고에서는 25명중 16명인 64%에서 HCV-RNA 양성이었으며, 국내 정등<sup>6)</sup>의 보고에서는 16명중 15명인 93%에서 HCV-RNA 양성이었다. 특히 Alberti 등은 HCV-RNA가 양성인 경우는 모두 간 조직검사를 한 결과 만성 간염의 소견을 보였으며, HCV-RNA 음성인 경우는 모두 간 조직검사상 정상이었으므로 C형 간염항체 유무나 ALT치의 정상 유무보다 HCV-RNA가 더 중요하며, C형 간염 바이러스 간염시 진정한 의미의 "Healthy carrier"가 존재하는가에 의문을 제시하였다. 아직 건강 보균자의 존재 유무에 관하여는 논란의 여지가 많으나 anti-HCV의 위양성 가능성도 있으므로 HCV-RNA 유무를 확인하는 것이 중요하며, 향후 지속적인 추적 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

그러나 새로 적용한 방법으로 반복 검사하여 재현성을 평가했을때 양성인 양성으로, 음성이 음성으로 결과가 일치되게 나오는 경우는 51 검체중 82%였으므로, 음성이나 양성대조 검체와 항상 실험을 함께 시행하여 정도관리를 했다 하더라도 본 PCR 검사결과에도 위양성이나 위음성 결과가 상당히 존재하고 있을 가능성이 있다. 실제로 PCR 방법은 검사의 예민도가

너무 뛰어나 증폭된 표적분자의 미세한 오염에도 다른 검체들이 위양성을 초래할 위험성이 크고 검사과정의 실수나 조건변화에 의해 위음성이 초래될 위험성이 큰 것이 문제점으로 지적되어왔다. Zaaijer에 의하면,<sup>12)</sup> 양성 및 음성 표준검체를 31개 실험실에 보내어 각 실험실 고유의 PCR 기법으로 HCV-RNA를 검출하여 그 결과를 보고토록 하였을때, 양성을 양성으로 음성을 음성으로 모두 정확하게 보고한 경우는 오직 5개 실험실 뿐이었고, 이러한 부정확한 결과의 원인중 가장 중요한 것이 오염에 의한 위양성 결과 때문이라고 하였다. 또 위음성은 주로 농도가 낮은 경우에 발생하였으므로 검사의 예민도가 낮은 것이 주된 이유라고 하였다. 따라서 아직 믿을 만한 HCV-RNA 검출방법이 확립되기 이전에는 HCV-RNA 존재에 관한 실험 결과는 매우 주의깊게 판독해야 하겠고, 위양성 결과는 오히려 진단에 혼선을 초래할 수도 있으므로 임상적으로 PCR이 이용된다면 우수한 검사법의 수립과 더불어 방법의 표준화 및 정도관리에 세심한 주의가 요구된다고 하겠다.

최근 PCR 기법이 소개된 이후, 각종 병원균의 예민한 진단과 종양관련 유전자 및 각종 질환관련 유전자의 검출등 임상적으로도 그 이용가능성이 폭넓게 제시되었고, 특히 간염 중 상당한 부분을 차지하는 것으로 밝혀지고 있는 C형 간염에 관한 연구는 현실적으로 우리나라에서 깊이 파고들어야 할 부분으로 여겨진다<sup>13,14)</sup>. 그러나 PCR을 통한 HCV-RNA의 직접적인 검출을 임상검사실에서 시행하기 어려운 점은 또한 검사방법이 복잡하고 까다로우며 시간이 많이 소요된다는 데 있다. 즉, RNA를 분리할때 ribonuclease로부터 보호하여 분해없이 완전하게 얻으려면 모든 기구와 시약에 ribonuclease의 오염이 없도록 각별히 주의해야 하며,모두 기구는 멸균하거나 열처리하여 사용해야 하고, 단백질이 제거된 순수한 RNA를 얻기위해 강력한 단백질 분해제인 diethylpyzocarbonate로 처리한후 사용해야 한다. 또, 증폭된 PCR산물의 검출은 ethidium bromide가 포함된 agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 UV transilluminator로 확인하는 것이 보통이나, 이 방법에 의한 검출이 안될 경우는 gel내의 PCR 산물을 nylon membrane에 옮겨 Southern blot hybridization을 시킴으로써 예민도를 증가시키기도 하는데 이는 많은 과정을 거쳐야 하고 시약과 시간

이 많이 소모된다. 본 연구에서 사용한 기법은 이러한 문제들을 일부 개선하여, 증폭산물을 확인하는 과정을 전기영동 대신 방사측정법으로 처리하여 비교적 쉽게 한 것이고, 검사시간도 다소 절약되었다. 또한 이렇게 방사측정법을 사용하는 것은 향후 정량적인 PCR법에도 이용 가능할 것으로 여겨진다. Interferon등에 의한 C형 간염의 치료효과 판정을 위해서는 HCV-RNA의 정량적인 PCR법이 요구되고 있는데<sup>15)</sup>, 환자 검체들과 동시에 여러 농도의 표준 양성 검체들도 PCR을 수행하여 이 표준 양성검체의 농도와 방사능 치료 표준곡선을 얻고 환자검체의 방사능치를 대입하여 비교하면 정량적인 HCV-RNA의 검출도 가능할 것이다.

그러나 kit를 이용하여 전체검사가 다소 간편해지는 하였어도 RNA를 분리하는 과정의 까다로운 실험 과정들은 여전히 문제점으로 남아있으며, 그밖에도 PCR 방법은 향후 개발해야할 과제들이 많이 남아있다. HCV-RNA의 검출은 추출방법이나 primer의 구성에 의해서도 영향을 받은 것으로 알려져 있고<sup>16)</sup>, 본 연구에서는 RNA 추출방법 중 가장 성적이 우수하다고 보고된 바 있는 guanidium-thiocyanate법을 이용하였다. 향후 더 효과적이면서도 간편한 추출방법으로의 개선 및 이 과정에 있어서도 kit화가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 biotin 및 I-125 표지된 primer로 구성된 kit를 이용했을 때 기존 방법에 비하여 예민하게 HCV-RNA를 검출할 수 있었다. 그러나 여전히 검사에 많은 노력과 시간이 소요되고 반복검사시 검사간 변이가 상당히 존재하고 있어 정도관리에 세심한 주의가 필요하며, 향후 더욱 간편하고 정확하며, 정량적인 측정도 가능한 우수한 방법으로의 지속적인 개발이 요구된다.

## 요 약

RT-PCR법에 의한 HCV-RNA 검출을 임상검사에 적용하는 노력의 일환으로 biotin 및 <sup>125</sup>I을 표지시킨 primer를 이용하여 최근 개발되어 있는 상품화된 kit로 HCV-RNA 검출을 시도하고 그 결과를 평가하여 보았다.

연구대상은 anti-HCV 양성인 118명의 성인환자로,

방법은 환자 혈청내의 HCV-RNA를 guanidium-thiocyanate 용액을 이용하여 추출한 뒤 AMPLICIS II HCV<sup>®</sup>(CIS, France)kit를 이용하여 cDNA로 역전사 후 1차 증폭을 시행하고, 다시 소량의 1차 증폭산물을 biotin과 <sup>125</sup>I으로 각각 표지된 1쌍의 primer로 이용하여 2차 증폭을 시행하였다. 증폭산물은 avidin이 코팅된 시험관에 반응시키고 감마선 계수기로 계수하였다. 검사의 재현성을 보기 위하여 anti-HCV 양성인 환자 혈청 중 무작위로 51개의 검체를 선정하여 반복 실험하였고, 만성 간질환 환자로부터 얻은 34개의 검체는 본 연구소에서 확립된 다른 RT-PCR 방법으로도 검사를 병행하여 비교하였다.

결과는 다음과 같다.

1) Anti-HCV 양성이면서 조직검사상 만성감염이나 간경화 소견을 보이거나 6개월이상 지속적인 간기능 이상을 나타낸 환자 88명 중 85명 (97%)에서 HCV-RNA 양성하였고, 6개월 이상 간기능이 정상이었던 30명중에서는 73%인 22명에서 HCV-RNA 양성이었다.

2) 두가지 다른 방법으로 RT-PCR을 병행한 34명 중, kit를 사용한 경우는 32명(94%)에서 양성소견을 보였고, 기존방법대로 전기 영동 후 ethidium bromide로 염색한 경우는 27명 (79%)에서 양성을 나타내었다.

3) 검사의 재현성을 보기 위하여 anti-HCV 양성인 51개의 검체를 2번 반복 실험하였을때, 82%에서 일치된 결과를 얻을 수 있었다.

이상에서 biotin 및 <sup>125</sup>I 표지된 primer로 구성된 kit를 이용했을때 기존방법에 비하여 예민하게 HCV-RNA를 검출할 수 있었다. 그러나 여전히 검사에 많은 노력과 시간이 소요되고 반복 검사시 검사간 변이가 상당히 존재하고 있어 정도관리에 세심한 주의가 필요할 것으로 사료되었다.

## REFERENCES

- 1) Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B, viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
- 2) Weiland O, Schvarcz R: *Hepatitis C: Virology,*

- epidemiology, clinical course, and treatment. Scand J Gastroenterol* 27:337-342, 1992
- 3) 이효석, 임경옥 : 중합효소연쇄반응법을 이용한 간염바이러스 검출. *감염* 23:229-233, 1991
  - 4) 정영화, 전용철, 양석균, 민영일: HBsAg 음성 만성 간질환 환자에서 중합효소연쇄반응을 이용한 혈청내 B형 간염바이러스 DNA 및 C형 간염바이러스 RNA의 검출. *대한소화기병학회지* 24:1015-1022, 1992
  - 5) 조성원, 이준성, 이문성, 김진홍, 심찬섭, 이희발 : 비A 비B형 만성간염환자의 혈청에서 C형간염 바이러스 RNA의 검출. *대한소화기병학회지* 25:946-951, 1993
  - 6) 정정희, 이창구, 최형경, 손석호, 조옥현, 허충, 이진관, 김정철: 종합건강 상 발견된 C형 간염항체 양성자의 추적과 HCV-RNA 검출율. *대한소화기병학회지* 25:1183-1190, 1993.
  - 7) 이효석: C형 간염의 진단과 치료. *대한의학협회지* 36:1353-1363, 1993
  - 8) Sauraigo S, Fougner B, Roget A, Livache T, Bazin H, Chypre C, Teoule R: *Fast solid support detection of PCR amplified viral DNA sequences using radioiodinated or hapten labelled primers. Nucleic Acids Research* 18:3175-3183, 1990
  - 9) Chomczynski P, Sacchi N: *Single-step Method of RNA isolaton by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Analy Biochem* 162:156-159, 1987
  - 10) Cristlano K, Bisceglie AMD, Hoofnagle JH, Feinston SM: *Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A non-B hepatitis: Detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. Hepatology* 14:35-55, 1991
  - 11) Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A: *Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. Lancet* 340:697-699, 1992
  - 12) Zaaier HC, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelice PN: *Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. Lancet* 341:722-724, 1993
  - 13) 김광원: *Polymerase Chain Reaction (PCR)의 임상적 이용. 대한내과학회 잡지* 40:295-298, 1991
  - 14) 이효석: *PCR을 이용한 감염성 질환의 진단. 대한의학협회지* 36:205-209, 1993
  - 15) Hagiwara H, Hayashi N, Mita E et al: *Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alpha therapy. Gastroenterology* 104:877-883, 1993
  - 16) 양진모, 설희식: C형 간염바이러스 검정시 RNA 추출방법이 중합효소연쇄반응에 미치는 영향. *카톨릭 대학의학부 논문집* 45:81-92, 1992