



Digoxigenin 탐식자를 이용한 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 검출

Detection of Hepatitis B virus DNA in Serum by Digoxigenin Labeled DNA Probe

저자 (Authors)	김수희, 백원기, 서민호, 김재룡, 신동학 Su Hee Kim, Won Ki Baek, Min Ho Suh, Jae Ryong Kim, Dong Hak Shin
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 28(4) , 1993.8, 303-311 (9 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01485179
APA Style	김수희, 백원기, 서민호, 김재룡, 신동학 (1993). Digoxigenin 탐식자를 이용한 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 검출. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 28(4), 303-311.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/08 10:23 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

Digoxigenin 탐식자를 이용한 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 검출

계명대학교 의과대학 가정의학교실¹, 미생물학교실², 임상병리학교실³

김수희¹ · 백원기² · 서민호² · 김재룡³ · 신동학¹

= Abstract =

Detection of Hepatitis B virus DNA in Serum by Digoxigenin Labeled DNA Probe

Su Hee Kim¹, Won Ki Baek², Min Ho Suh², Jae Ryong Kim³ and Dong Hak Shin¹

*Department of Family Medicine¹, Microbiology² and Clinical Pathology³,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea*

To estimate the clinical efficiency of digoxigenin(DIG) labeled DNA probe for the detection of hepatitis B virus(HBV) DNA, 149 HBs Ag positive and 15 normal serum samples were tested by DNA dot blot hybridization using ³²P-dCTP-labeled HBV DNA probe and DIG-dUTP-labeled HBV DNA probe. Serological markers were tested by ELISA.

The sensitivity of ³²P-dCTP-labeled HBV DNA probe in detecting HBV DNA was 0.5 μ g, that of DIG-dUTP-labeled HBV DNA probe labeled by random primed labeling method was 4 μ g, and the sensitivity of DIG-dUTP-labeled HBV DNA probe labeled by polymerase chain reaction(PCR) was 0.5 μ g.

Expire time of ³²P-dCTP-labeled HBV DNA probe was within a week, that of DIG-dUTP-labeled HBV DNA probe labeled by random primed labeling method was 4 to 6 months, and that of DIG-dUTP-labeled HBV DNA probe labeled by PCR was 2 to 4 weeks.

Time needed for autoradiography was 24-48 hours, but in the case of DIG-labeled probe, visualization of the result needed only 6 hours.

The relationship between serum HBV DNA positivity by DIG-labeled probe and serological markers positivity was evaluated. Twenty-seven(79.4%) of 34 patients positive for both HBs Ag and HBe Ag were positive for HBV DNA compared with 25(21.7%) of 115 HBs Ag positive but HBe Ag negative individuals. There was a statistically significant correlation between the positivity of HBV DNA in serum and the presence or absence of HBe Ag. None of the 15 HBs Ag and HBe Ag negative individuals tested was positive for HBV DNA. But the detection rate of HBV DNA in the cases of HBe Ag negative was as high as 21.7%(25/115), so we concluded that dot blot hybridization technic using DIG-labeled HBV DNA probe could be very efficiently applied for both diagnosing HBV infection and evaluating the infectivity of the HBs Ag positive sera.

Key Words: Hepatitis B virus, Dot blot hybridization.

서 론

B형간염 바이러스(Hepatitis B virus:HBV)는

급만성 간염을 초래할 뿐만 아니라, 간경변증이나 간암 등의 직간접 원인이 되는 임상적으로 매우 중요한 질환으로서, 서구국가나 일본과는 달리 우리나라에서는 B형간염의 감염율

이 상당히 높아서 많은 사람이 감염되어 있다.^{7,15,16,23,28,30)} 특히 임산부가 B형간염에 감염되면 본인 뿐 아니라 태반을 통한 수직감염으로 태아에 감염이 생길 수 있어서 큰 위험을 초래하며, 소아는 일단 B형간염이 발병하면 어른에 비해 만성간염으로 이행되는율이 현저히 높다¹¹⁾. 또한 B형간염은 비경구적 뿐 아니라 경구적으로도 감염되기 때문에 공중보건학적으로도 문제가 되어, B형간염이 국민보건에 미치는 영향은 매우 크다고 하겠다.^{5,6,15,16)}

B형간염을 최소화하기 위해서는 무엇보다도 예방적인 조치가 가장 중요하며, 또한 원인 바이러스의 조기발견 및 정확한 정량분석이 진단 및 예후판정에 매우 중요하다¹¹⁾. B형간염의 검출법으로 병원에서 흔히 사용되는 검사법으로는 효소면역 측정법(Enzyme Immuno Assay), 방사면역 측정법(Radio-Immuno-Assay), 역수동 혈구응집법(Reverse Passive Hemagglutination test), 수동 혈구응집법(Passive Hemagglutination test)등의 면역학적 진단법이 널리 사용되고 있고 이들의 효용도 매우 크지만, 이러한 일반적 검사법으로는 검출되지 않는 경우도 많다^{8,18,19)}. 그리고 B형간염환자의 감염력을 판정하는 객관적 지표로서 주로 HBe 항원검사가 사용되고 있는데, 직접 바이러스를 검출하는 것이 아니고 간접적인 면역학적 표식자를 검사하는 것이기 때문에 정확한 판정을 얻기에는 충분치 않은 실정이다^{4,32)}.

그런데 최근에 급속히 발전되고 있는 분자생물학적 연구기법을 사용하여 B형간염으로 의심되는 환자의 혈청에서 직접 B형간염 바이러스 DNA를 검출함으로써, B형간염의 정확한 진단과 감염력의 객관적 판정에 도움을 줄 수 있는 Dot blot hybridization법이 개발되어 새로운 진단법으로 등장하였다.^{5,8,9,18)}

그러나 DNA 탐식자의 표지(labeling)에 있어서 대부분의 경우 ³²P-dCTP 등의 동위원소를 이용하고 있어서 방사능 위험성이나 엄격한 취급시설의 요구, 반감기의 제한성, 검사소요시간의 문제 등 여러가지 문제점이 제기되고 있어서 새로운 대안이 요구되는 실정이다^{20,25,33)}.

이러한 지견을 바탕으로 저자는 최근에 비동위원소성 표식물질로 각광받고 있는 digoxigenin(DIG)-dUTP를 사용하여^{20,25,33)} random prime표식법⁸⁾ 및 중합효소 연쇄반응(PCR)표식법^{3,8,27)}으로 DIG 탐식자를 만든 후, 기존의 동위원소 탐식자를 사용한 경우와 비교분석하

여 DIG 탐식자의 임상적 유용성 여부를 조사하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 혈청

계명대학교 동산의료원에 검사의뢰되어 각종 B형간염 혈청 표식자(marker)가 나타난 환자 혈청 149례와 정상혈청 15례를 실험에 사용하였고, HBs항원, HBe항원 및 항-HBe항체 등의 면역학적 검사는 효소면역측정 kit(미국 Abbott회사제)를 사용하여 측정하였다. 모든 혈청은 -20℃에 보관하며 사용하였다.

2. 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot blot검사

검사할 혈청을 녹인후 미량원심분리기로 12,000rpm으로 10분간 원심한 후 상청액 50μl를 취하여 실험에 사용하였다. 그리고 B형간염 바이러스 DNA(클로닝된 HBV DNA)를 1,024 picogram(pg)에서 부터 0.5pg까지 12단계로 배수희석하여 예민도 기준치 및 양성대조군으로 사용하였다. 혈청을 각각 50μl씩 microdilution plate에 점종하고, 50μl의 변성(denaturation)용액(4N NaOH)을 넣어 섞고, 65℃ dry bath에 5분간 세운 후, 100μl의 1M Tris(pH 8.0)액을 넣고 중화시켰다. 이상과 같이 전처리된 각각의 혈청을 dot blot장치(미국 Millipore제)에 점종하고 진공압을 가하여 nitrocellulose filter(pore size:0.4μm)에 blotting 시켰다^{5,31)}.

Blotting된 filter를 꺼내어 공기중에 30분간 건조시킨 후 80℃에서 40분간 가열시키고, 비닐로 포장하고 봉한 후 진공데시케이터에 넣어 보관하다가 hybridization을 실시하였다.

3. Nick translation에 의한 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자 제조

Rigby등의 방법에 의해 탐식자를 제작하였다²⁴⁾. 즉, 미국 Bethesda Research Laboratory 회사제 Nick translation kit를 이용하여 클로닝된 HBV DNA를 alpha-³²P-dCTP로 표지(labeling)시킨후 Sephadex G-50을 이용한 spun column chromatography를 실시하여 순수한 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 분리하여 사용하였다.

4. Random prime법에 의한 digoxigenin (DIG)-표지-HBV DNA 탐식자 제조

Feinberg 및 Vogelstein의 방법에 의해 탐식자를 제작하였다¹⁰⁾. 즉 독일 Boehringer Mannheim회사제 DIG labeling kit를 이용하여, 클로닝된 HBV DNA를 DIG-dUTP로 표지시킨 후, 4M LiCl과 냉각된 에탄올을 넣고 -20°C에서 2시간 방치후 원심하고 70% 에탄올로 세척하고, SpeedVac건조기(미국 Savant회사제)로 7분간 건조시킨 후 50μl의 Tris-EDTA액에 녹여 사용하였다.

5. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction:PCR)법에 의한 DIG-표지-HBV DNA 탐식자 제조

HBV 표면항원 유전자 영역에 특이하게 결합하는 23mer의 sense primer와 25mer의 antisense primer를 PCR에 사용하였으며, PCR된 DNA는 530염기쌍(base pair:bp)였고, 각 primer의 염기서열은 다음과 같다.^{12,13,21,26)}

Sense primer :

5'-CCTGGCCAAAATTCGCAGTCCCC-3'

Antisense primer :

5'-CACCAGCACGGGGCCATGCAAGACC-3'

먼저 DNA 시료를 94°C에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 다음과 같은 조건으로 30회 PCR을 시행하였다. PCR의 총량은 50μl로 하였고, 0.5ml microtube(독일 Sarstedt제)를 사용하였다. 50mM KCl, 10mM Tris HCl(pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01%(wt/vol) gelatin이 함유된 반응혼합액(reaction mixture;미국 Perkin Elmer Cetus제)를 사용하였고, dNTP로는 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP, 0.35mM DIG-dUTP가 들어있는 10X dNTP 표지 혼합액(labeling mixture)를 4μl를 사용하였으며, 2.5단위(unit)의 Taq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus제 및 KIST 유전공학연구소 생산품)를 사용하였다. Primer들은 각각 1μM씩 사용하였으며 최종적으로 30μl의 광유(mineral oil)로 덮은 후 PCR을 실시하였다^{3,12,13)}. DNA 변성은 94°C에서 60초, primer 결합(annealing)은 60°C에서 90초, DNA 합성(extension)은 72°C에서 90초간 실시하였고 마지막(30회) 단계의 합성시간은 240초간 실시하였다. PCR에 사용한 장비는 미국 Savant사

의 DNA Temperature cycler(공냉식)를 이용하였다. 양성대조군으로는 클로닝된 HBV DNA를 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다.

6. ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 hybridization 및 autoradiography

Dot blot된 nitrocellulose filter에 10ml의 prehybridization용액(0.75M sodium chloride, 0.075M sodium citrate, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% Ficoll 400, 0.02% bovine serum albumin, 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide)를 넣고 조심스럽게 기포를 제거한 후 다시 vinyl sealer로 봉한 후 42°C 수조에 4시간 두었다가 꺼내고, 여기에 ³²P로 표지된 HBV DNA probe액을 함유하는 10ml의 hybridization용액(성분은 prehybridization액과 동일함)을 넣고 조심스럽게 기포를 제거한 후 다시 봉하고 42°C 수조에 18시간 두어 hybridization을 시켰다.

Hybridization된 nitrocellulose filter를 2×SSC와 0.5% SDS액으로 실온에서 5분, 2×SSC와 0.1% SDS액으로 실온에서 15분, 0.1×SSC와 0.5% SDS액으로 37°C에서 30분, 0.1×SSC와 0.5% SDS액으로 60°C에서 30분, 0.1×SSC액으로 실온에서 2분 세척후, 공기중에서 10분 건조시켰다. 그후 강화스크린(intensifying screen)이 장착된 X-ray 카세트(8×10 inch 크기)안에 X-ray 필름과 함께 넣은 후 -70°C에서 24-48시간 노출시킨 다음, 필름을 현상하여 판독하였다. 필름에 나타난 음영을 Densitometer로 측정하여, 양성대조군의 음영과의 상대적인 크기로 HBV DNA의 양을 조사하였다⁴⁾.

7. DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 hybridization 및 발색

5×SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS가 함유된 prehybridization 용액을 넣고 68°C에서 2시간 prehybridization을 실시하였다. HBV DNA 탐식자를 95°C에 10분간 가열하여 변성시키고 얼음에 5분간 세운후 hybridization 용액과 섞어서 NC filter에 넣고, 68°C에서 15시간 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 NC filter를 2×SSC, 0.1% SDS액으로 실온에서 5분간 2회 세척한 후 0.1×SSC, 0.1% SDS액으로 68°C에서 15분간 2회 세척하였다. NC filter를 100mM

Tris-HCl, 150mM NaCl(pH 7.5)액으로 실온에서 1분간 씻은 후 blocking buffer에 30분간 부란후 alkaline-phosphatase가 결합된 항-DIG-항체액에 30분간 부란시켰다. NC filter를 NBT와 X-phosphate가 함유된 발색액에 담구고 6시간 정도 부란하여 발색시키고 TE액을 넣어 발색을 정지시킨후 사진촬영하여 판독하였다^{1,3,19)}.

성 적

Dot blot hybridization에 의한 HBV DNA 검사의 예민도는 ³²P-표지 HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 0.5pg/50μl였고, random prime법으로 제조한 DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 4pg/50μl였으며, PCR법으로 제조한 DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 0.5pg/50μl였다. 클로닝된 HBV DNA를 1,024pg에서 부터 0.5pg까지 순차적으로 배수 희석하여 각각의 탐식자를 사용하여 Dot blot hybridization을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다.

탐식자 종류별 HBV Dot blot hybridization 검사의 특징을 비교하면, 먼저 예민도는 앞서 언급한 바와 같고, 방사능 위험도는 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에만 있었으며, 탐식자의 유효기간은 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자는 1주일 이내, random prime법에 의한 탐식자는 4-6개월, PCR법에 의한 탐식자는 2-4주간 유효하였다. 발색후의 배경오염 정도는 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우가 높았고(++), DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우는 낮았다(+/-). Hybridization 및 세척후 발색되기까지의 소요시간은 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 24-48시간, DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한

경우에는 6시간 정도였다. 이상의 것을 정리하면 Table 1과 같다.

Fig. 2는 각종 B형간염 혈청 표식자를 가진 환자혈청을 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자(A) 및 PCR-DIG-표지-HBV DNA 탐식자(B)를 이용하여 Dot blot hybridization을 실시한 결과를 나타낸 것이다. PCR-DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 사용한 경우에 HBs 항원 양성 혈청 149례중 52례(34.9%)에서 HBV DNA 양성을

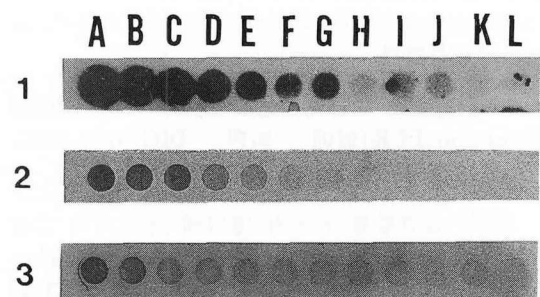


Fig. 1. Sensitivity of dot blot hybridization detection of serially diluted cloned HBV DNA. A) 1,024 picogram(pg), B) 512pg, C) 256pg, D) 128pg, E) 64pg, F) 32pg, G) 16pg, H) 8pg, I) 4pg, J) 2pg, K) 1pg, L) 0.5pg. 1. Autoradiogram hybridized with the ³²P-dCTP-labeled HBV DNA probe. Films were developed after 24 hours of autoradiographic exposure at -70°C. 2. Dot blot hybridization results obtained after hybridization with the digoxigenin-labeled HBV DNA probe which is made by random-primed labeling method. It took 6 hours of incubation at room temperature for colorization. 3. Dot blot hybridization results obtained after hybridization with the digoxigenin-labeled HBV DNA probe which is made by PCR labeling method. It took 6 hours of incubation at room temperature for colorization.

Table 1. Comparison of HBV dot blot hybridization protocols by probe labeling methods

Items	Probe labeling method		
	³² P-dCTP labeling by nick translation	Digoxigenin labeling by random primed technic	Digoxigenin labeling by PCR
Sensitivity	0.5 picogram(pg)	4pg	0.5pg
Radiation hazard	+	-	-
Duration of probe activity	1 week	several months	several weeks
Background noise	++	+/-	+/-
Time needed for visualization	24-48 hours(h)	6 h	6 h

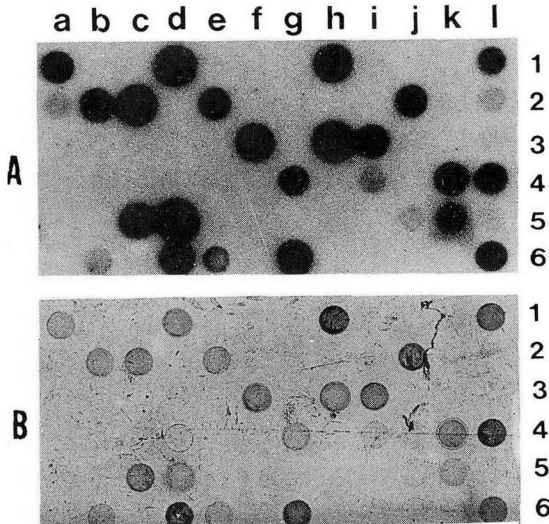


Fig. 2. Dot blot hybridization results obtained after hybridization of patient serum with the ^{32}P -dCTP-labeled HBV probe **A**) and with the digoxigenin-labeled HBV DNA probe which is made by PCR labeling method **B**). Dot i6 represent positive control, and dot k6 represent negative control. Sera from 70 patients are represented in dots a1 through j6.

나타냈으며, HBs항원 및 HBe항원 음성 혈청 15례는 모두가 HBV DNA 음성이었다. HBs 및 HBe항원 양성 혈청 34례중 27례(79.4%)가 HBV DNA 양성을 나타냈으며, HBs항원 양성, HBe항원 음성 혈청 115례중 25례(21.7%)가 HBV DNA 양성을 나타내었다. HBV DNA 양성 혈청 52례는 모두 HBs 항원 양성이었으며, 그중 27례(51.9%)가 HBe항원 양성/항 HBe항체 음성이었고, 25례(48.1%)는 HBe항원 음성/항 HBe항체 음성이었다(Table 2).

고 찰

경구 혹은 비경구감염으로 급만성 간염을 일으키고, 간경변증이나 간암등의 직간접적 원인이 되는 B형간염 바이러스(HBV) 감염은 보건교육이나 예방접종실시, 위생감독 철저 등으로 병을 예방하는 것이 가장 중요하다^{6,11)}. 그러나 일단 발병하면 초기에 정확한 진단을 하여 적절한 조치를 취하여야 한다. 일반적으로 병원 검사실에서 널리 사용되고 있는 B형간염 진단법으로는 혈청내에 HBs항원 항체, HBe항원 항체, HBe항체 등이 존재하는가를 검사하는 ELISA, RIA, RPHA, PHA 등의 면역학적 방법

Table 2. Correlation between HBV DNA detected by digoxigenin labeled probe and immunological markers in 164 serum samples

Types of Immunological markers	No. of specimen	No(%) of HBV DNA dot blot result	
		Positive ^a	Negative
HBs Ag(+) HBe Ag(+) Anti HBe(-)	34	27(79.4) ^b	7(20.6)
HBs Ag(+) HBe Ag(-) Anti HBe(-)	100	25(25.0)	75(75.0)
HBs Ag(+) HBe Ag(-) Anti HBe(+)	15	0	15(100.0)
HBs Ag(-) HBe Ag(-) Anti HBe(-)	15	0	15(100.0)

^a >0.5 picogram

^b chi-square test; $p < 0.01$

이 널리 쓰이고 있는데 이들은 바이러스의 존재를 직접 검사하는 것이 아니며, 원인을 검출하지 못하고 놓치게 되는 경우도 많다.^{2,18,19,31)} 그리고 현재 B형간염의 감염력 여부를 판정하는데 널리 사용되고 있는 HBe항원 검사, 항 HBe항체 양성인 환자로 부터도 경구 혹은 비경구적 경로로 다른 사람에게 B형간염이 감염되는 경우가 있고, 항 HBe항체 양성혈액을 실험동물에 접종하면 간염을 일으키는 경우가 있어서 HBe항원검사나 항 HBe항체검사만으로는 B형간염의 감염력 판정을 정확히 하기 어려운 실정이다.^{14,17,22,29)}

이러한 점을 보완코자 최근에 여러가지 분자생물학적인 기법이 개발되어 혈청내에 존재하는 HBV DNA를 직접 검출할 수 있게 되었다.^{5,8,9,18)} 즉 클로닝된 HBV DNA를 이용하여 Nick translation등의 방법²⁴⁾으로 손쉽게 HBV DNA 탐식자(probe)를 제작하여 DNA hybridization을 실시함으로써 혈중에 존재하는 미량의 B형간염 바이러스를 직접 검출할 수 있게 되었고, 그 결과 HBV DNA 검사가 B형간염의 감염력을 판정하는데 매우 정확하고 예민한 방법임이 밝혀졌다^{8,9,18)}. 그런데 DNA 탐식자의 표지(labeling)에 있어서 대부분의 경우 ^{32}P -dCTP등의 동위원소를 이용하고 있어서 방사능 위험성이나 엄격한 취급시설의 요구, 반감기의 제한성, 배경오염도의 문제, 검사소요시간의 문

제 등 여러가지 문제점이 제기되고 있어서 임상검사에서 적용하기에는 많은 어려움이 따른다^{20, 25, 33)}. 이러한 문제점을 최소화하기 위해 여러가지 대안이 소개되고 있으며, 그중에서도 비동위원소성 표식자인 digoxigenin(DIG)-dUTP를 이용하는 방법이 유력시 되고 있다.^{3, 20, 25, 33)}

저자는 DIG-표지-탐식자의 임상적 유용성을 조사하기 위해 Random prime법¹⁰⁾으로 DIG-표지 탐식자를 제작하고 Dot blot hybridization에 의한 HBV DNA 검사의 예민도를, Nick translation법으로 만든 ³²P-표지 탐식자의 경우와 비교해 보았다. ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 0.5pg/50μl로서 외국의 보고와 유사하였고³¹⁾, random prime법¹⁰⁾으로 제조한 DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 4pg/50μl여서, 예민도가 약 10배 정도 떨어졌다. 이에 저자는 최근에 개발된 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction:PCR)법^{1, 3, 27)}에 의한 탐식자 표지법을 사용하면 DIG-표지 탐식자의 예민도를 더 높일 수 있을 것으로 기대하여 PCR법으로 제조한 DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 결과, 예민도가 동위원소법의 경우와 같은 0.5pg/50μl까지 높일 수 있음을 알았다. 즉 DIG-탐식자 자체는 동위원소 탐식자에 비해 예민도가 떨어지지만, PCR 표지법을 이용하여 단시간에 대량의 DIG 탐식자를 만들어 사용하게 되면 동위원소 탐식자의 경우와 거의 같은 예민도를 얻을 수 있어서 예민도의 문제는 해결될 수 있었다. 그리고 동위원소 탐식자의 경우는 한번 제조하면 반감기가 짧기 때문에 1주일 내외 밖에 사용할 수 없는 데, DIG-탐식자의 유효기간은 random prime법에 의한 탐식자는 4-6개월간 유효하였고, PCR법에 의한 탐식자는 2-4주간 유효하였으며, 만일 PCR 산물을 정제하여 보관한다면 그 효과가 더욱 오래 지속될 수 있을 것이다. 발색후의 배경오염 정도는 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우는(++) 정도로 높았고, DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우는(+/-) 정도로 낮아서 DIG-탐식자를 사용시 더욱 깨끗한 배경을 얻을 수 있을 것으로 사료되었다. Hybridization 및 세척후 발색되기까지의 소요시간은 ³²P-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 24-48시간 정도로 길었으나, DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 경우에는 6시간 정도에 결과를 얻을 수 있어서, DIG-탐식자를 사용함으로써 검사기간을 단축시킬

수 있을 것으로 사료되었다.

실제 임상가검물에서 DIG-탐식자의 HBV DNA 검출능과 감염력 판정능 등 임상적 유용성 여부를 조사하고자, PCR로 표지한 DIG-탐식자를 사용하여 혈청내 HBV DNA를 검출하고, DNA 양성도와 B형간염의 혈청학적 표식자 양성도와의 관계를 비교한 결과 HBs항원 및 HBe항원 양성혈청의 79.4%가 HBV DNA 양성이고, HBs항원 및 HBe항원 음성 혈청 15례는 모두가 HBV DNA 음성으로 나타나서, HBe항원 양성혈청에서의 HBV DNA 검출율이 70-100%라는 국내외 연구자들의 보고와 유사하였고,^{4, 18, 19, 32)} 특이도도 높음을 알 수 있었다. 그리고 HBe항원 양성군이 음성군에 비하여 HBV DNA 양성율이 통계학적으로 유의하게 높아서($p < 0.01$), HBV DNA 검사결과와 HBe항원 검사결과가 서로 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 HBe항원 음성혈청의 21.7%가 HBV DNA 양성으로 나타나서, HBe항원 음성인 경우 DNA 검출율은 0-66%라는 보고들과 유사하였고,^{4, 18, 19, 32)} B형간염의 감염력 판정시에 HBe항원 검사만으로는 미흡하며 HBV DNA 검사의 병행이 필요함을 확인할 수 있었다.

이상을 종합해 볼때 B형간염의 정확한 진단과 감염력 판정은 면역학적 검사만으로는 불완전하며 HBV DNA 검색이 필요함을 알 수 있었고, 편리성, 안전성, 신속성, 경제성 등을 고려할 때 DIG-표지-HBV DNA 탐식자를 이용한 Dot blot hybridization검사가 임상적으로 유용할 것으로 사료된다. 그러나 더욱 신속하고도 예민한 진단을 위하여, 그리고 극소량의 가검물을 검사할 경우에는 HBV DNA의 특정 유전자를 증폭시켜 검사하는 Polymerase Chain Reaction(PCR)등의 새로운 방법들이 병행되어야 할 것으로 사료된다.^{12, 13)}

결 론

Digoxigenin(DIG)-표지-B형간염 바이러스(HBV) DNA 탐식자를 이용한 혈청내 HBV DNA 검출법의 유용성을 파악하고, 임상검사에서 실용화 토대를 마련코자 ³²P-dCTP 표지 탐식자와 DIG-표지 탐식자를 각각 사용하여 dot blot hybridization법으로 HBV DNA검출을 시행하고, 이들 두 방법의 결과를 비교 분석하였으며, 혈청내 HBV DNA 양성도와 B형간염의 혈청학적 표식자 양성도와의 관계를 조사하

여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 클로닝된 HBV DNA를 양성대조군으로 사용하여 dot blot 방법의 예민도를 검사한 결과 50 μ l 검체중 동위원소-표지 탐식자의 경우는 0.5 picogram(pg)인데 비해, random prime법의 DIG-탐식자의 경우는 4pg이었으며, 중합효소 연쇄반응(PCR)법의 DIG-탐식자의 경우는 0.5pg으로서 예민도가 높음을 알 수 있었다. 그리고 HBs항원 음성군 15례에서는 동위원소 및 DIG 탐식자 모두가 HBV DNA 음성으로 나타나서, 본 검사의 특이도가 높음을 알 수 있었다.

2. 탐식자의 유효기간은 동위원소 탐식자는 1주일 이내인데 비해 random prime법의 DIG 탐식자는 4-6개월, PCR법의 DIG-탐식자는 2-4주 정도 유효하여, DIG-탐식자를 사용시 훨씬 오랜기간 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 그리고 발색후의 배경오염상태도 DIG-탐식자의 경우가 더 깨끗하였으며, 발색되기 까지의 소요시간은 동위원소 탐식자가 24-48시간인데 비해 DIG 탐식자는 6시간 정도로서, 검사기간이 단축될 수 있었다. 또 동위원소 탐식자는 방사능 위험성이 있는데 비해 DIG 탐식자는 안전하고 간편하였다.

3. HBs항원 및 HBe항원 양성 혈청 34례중 27례(79.4%)가 HBV DNA 양성이었으며, HBe항원 음성 혈청 115례중 25례(21.7%)가 HBV DNA 양성으로 나타나서, HBe항원 양성군이 음성군에 비하여 HBV DNA 양성율이 통계학적으로 유의하게 높았다($p < 0.01$). 이것은 DIG 탐식자를 사용한 HBV DNA 검사결과와 HBe항원 검사결과가 서로 밀접한 관계가 있음을 뜻하며, HBV DNA 검사가 B형간염의 감염력을 판정하는 우수한 방법이 될 수 있음을 시사하였다.

4. HBe항원 음성 혈청 115례중 25례(21.7%)가 HBV DNA 양성으로 나타나서, B형간염의 감염력 판정에 있어서 HBe항원 검사에서 검출하지 못한 것도 DIG 탐식자에 의한 HBV DNA 검사로써 검출할 수 있음을 알 수 있어서, HBs항원 양성 혈청의 감염력 조사시에는 HBe항원 검사와, DIG-탐식자에 의한 HBV DNA 검사를 병행함으로써 검출율을 훨씬 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김현철, 박성배, 조원현, 백원기, 서민호: PCR을 이용한 인간 세포거대바이러스 (HCMV) DNA 중합효소 유전자의 검색. 대한미생물학회지 27:181, 1992.
- 2) 박승철:핵산 탐식자를 이용한 감염병의 진단. 대한의학협회지 33:859, 1990.
- 3) 서민호, 백원기, 이규석:임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. 대한미생물학회지 26:479, 1991.
- 4) 서민호, 서성일, 백원기, 이상숙, 김재룡:혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot Blot Hybridization에 의한 검출. 대한미생물학회지 27:87, 1992.
- 5) 최상운, 김정룡, 이효석, 송인성, 서정선:간염 B바이러스 DNA 혈중농도와 HBe Ag/Anti-HBe와의 상관관계. 대한소화기병학회잡지 21:876, 1989.
- 6) Alter MJ, Ahtone J, Weisfuse I, Starko K, Vacalis TD and Maynard JE:Hepatitis B virus transmission between heterosexuals. JAMA 256:1307, 1986.
- 7) Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S and Petit MA:In vitro infection of Human hepatoma(HePG2) cells with Hepatitis B virus. J Virol 64:3025, 1990.
- 8) Bonino F, Rosina F and Rizzeto M:Chronic hepatitis in HBs Ag carriers with serum HBV DNA and anti-HBe. Gastroenterology 90:1268, 1986.
- 9) Brechot C, Hadchouel M, Scotto J, Degos F, Charnay P and Trepo C:Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: A direct appraisal of the chronic carrier state. Lancet ii :765, 1981.
- 10) Feinberg AP and Vogelstein B:A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6, 1983.
- 11) Hollinger FB:Hepatitis B virus, p2171. In Fields BN and Knipe DH(ed.), Fields Virology. 2nd ed. Raven press, New York, 1990.
- 12) Kaneko S, Feinstone SM and Miller RH:Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using

- the Polymerase Chain Reaction technique. *J Clin Microbiol* 27:1930, 1989.
- 13) Keller GH, Huang DP and Shin WK: Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* 28:1411, 1990.
- 14) La Breque DR, Muhs JM and Lutwick LI: The risk of hepatitis B transmission from health care workers to patients in a hospital setting-A prospective study. *Hepatology* 6:205, 1986.
- 15) Lee HS, Byun JH and Kim CY: Etiology and outcome of acute viral hepatitis in Korean adults. *J Kor Med Sci* 5:149, 1990.
- 16) Lee HS, Kim ST and Kim CY: Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas in Korea. *J Kor Med Sci* 5:145, 1990.
- 17) Lee SD, Lo KJ and Wu JC: Prevention of maternal infant hepatitis B virus transmission by immunization; The role of serum hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 6:369, 1986.
- 18) Lieberman HM, La Breque DR and Kew MC: Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test; Comparison to HBE Ag/anti-HBe status in HBs Ag carriers. *Hepatology* 3:285, 1983.
- 19) Matsuyama Y, Omata M, Yokosuka O, Imazeki F, Ito Y and Okuda K: Discordance of hepatitis Be Antigen/Antibody and hepatitis B virus Deoxyribonucleic acid in serum. *Gastroenterology* 89:1104, 1985.
- 20) Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Gallinella G, Venturoli S, Gibellini D and La Placa M: Rapid detection of cytomegalovirus DNA in urine samples with a dot blot hybridization immunoenzymatic assay. *J Clin Microbiol* 28:2101, 1990.
- 21) O'Brien S: Viruses, p1. 121. In O'Brien S (ed.), Genetic maps, 5th ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990.
- 22) Okaka K, Kamiyama I and Inomata M: Antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Engl J Med* 294:746, 1976.
- 23) Raney AK, Milich DR, Easton AJ and McLachlan A: Differentiation-Specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus large surface antigen gene in human hepatoma cell lines. *J Virol* 64:2360, 1990.
- 24) Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237, 1977.
- 25) Riley LK and Caffrey CJ: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization with nonradioactive digoxigenin-labeled DNA probes. *J Clin Microbiol* 28:1465, 1990.
- 26) Rho HM, Kim K, Hyun SW and Kim YS: The nucleotide sequence and reading frames of a mutant hepatitis B virus subtype adr. *Nucleic Acids Res* 17:2124, 1989.
- 27) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487, 1988.
- 28) Schranz P, Zentgraf H, Loncarevic IF, Niepmann M and Schroder CH: Defective replication units of hepatitis B virus. *J Virol* 64:1851, 1990.
- 29) Shikata T, Abe TK and Uzawa T: Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 136:571, 1977.
- 30) Summers J and Mason W: Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403, 1982.
- 31) Valentine-Thon E, Steinmann J and Arnold W: Evaluation of the commercially available HepProbe kit for detection of hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol* 28:39, 1990.
- 32) Werner BG, O'Connell AP and Summers J: Association of e antigen with Dane particle DNA in sera from asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *Proc Natl*

Acad Sci **74**:2149, 1977.

- 33) Whetsell AJ, Drew JB, Milman G, Hoff R and Wolinsky SM:Comparison of three nonradioisotopic Polymerase Chain Reac-

tion based methods for detection of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* **30**:845, 1992.