



HBe항원 음성 만성간염 환자혈청에서 B형 간염 바이러스 C영역 DNA의 돌연변이 검색

Detection of Mutations in Hepatitis B Virus Core Region DNA from HBe Antigen Negative Sera of Chronic Hepatitis Patients

저자 (Authors) 서민호, 윤성희, 백성덕, 백원기, 서성일, 박종욱, 최병길
Min-Ho Suh, Sung-Hee Yoon, Sung-Duck Paik, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park, Byung-Kil Choe

출처 (Source) [The Journal of the Korean Society for Microbiology 30\(1\)](#), 1995.2, 67-76 (10 pages)

발행처 (Publisher) [대한미생물학회](#)
The Korean Society For Microbiology

URL <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01486689>

APA Style 서민호, 윤성희, 백성덕, 백원기, 서성일, 박종욱, 최병길 (1995). HBe항원 음성 만성 간염 환자혈청에서 B형 간염 바이러스 C영역 DNA의 돌연변이 검색. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 30(1), 67-76.

이용정보 (Accessed) 계명대학교
114.71.5.213
2016/01/08 11:28 (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).

HBe항원 음성 만성간염 환자혈청에서 B형 간염 바이러스 C영역 DNA의 돌연변이 검색

계명대학교 의과대학 미생물학교실, 면역학교실¹, 의과학연구소²

서민호² · 윤성희 · 백성덕 · 백원기² · 서성일² · 박종욱^{1,2} · 최병길^{1,2}

= Abstract =

Detection of Mutations in Hepatitis B Virus Core Region DNA from HBe Antigen Negative Sera of Chronic Hepatitis Patients

Min-Ho Suh², Sung-Hee Yoon, Sung-Duck Paik, Won-Ki Baek², Seong-Il Suh²,
Jong-Wook Park^{1,2} and Byung-Kil Choe^{1,2}

Departments of Microbiology, Immunology¹, and Institute for Medical Science², Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

To estimate the diagnostic and infectivity evaluation efficiency of polymerase chain reaction (PCR) in chronic hepatitis B, twelve HBs antigen positive and HBe antigen negative sera from chronic hepatitis patients were tested by PCR. Serological markers were tested by ELISA. All the sera tested showed 270 bp DNA bands and were PCR positive, so PCR was proven to be a very efficient diagnostic and infectivity evaluation method in chronic hepatitis B.

In order to investigate the mutations in HBc region DNA from HBe antigen negative sera of chronic hepatitis patients, PCR product DNAs were cloned into a T-vector system(pT7Blue) and the insert DNAs were identified by restriction enzyme digestion and by PCR. And the nucleotide sequences of HBc region DNA were analyzed by dideoxy-chain terminating method. In one serum tested, three point mutations were found in DNA sequences 2,119(Adenine to Thymine), 2,120(Adenine to Guanine), and 2,121(Guanine to Thymine) resulted in two codon changes(GGA to GGT, AGT to GTT) and one amino acid change(serine to valine). In another serum tested, one point mutation was found in DNA sequence 2,062(Adenine to Guanine) resulted in one codon change(GCA to GCG). The mutations in core region DNA might alter the core protein structure and its protease function, that could results in breaking the HBe antigen production.

Key Words: Hepatitis B virus, Core region DNA mutation, PCR.

서 론

B형간염 바이러스(Hepatitis B virus:HBV)는 급만성 간염을 초래하고, 간경변증이나 간암에도 깊이 관계되어 있으며, 우리나라에서는 감염율이 매우 높아서 임상적으로 큰 비중을 차지하고 있음은 주지의 사실이다.^{1~3,15,24,41)} 특히 임산부가 B형간염에 감염되면 본인뿐 아니라 태반을 통한 수직감염으로 태아에 감

염이 생길 수 있어서 큰 위험을 초래하며, 소아는 일단 B형간염이 발병하면 어른에 비해 만성간염으로 이행되는율이 현저히 높고^{15,41,50)} B형간염은 비경구적 뿐 아니라 경구적으로도 감염되기 때문에 국민보건에 미치는 영향은 매우 크다.^{4,20,21,23,25,34,51)}

그리고 현재 임상적으로 보편화되어 있는 B형간염의 검사법인 효소면역 측정법(Enzyme Immuno Assay), 방사면역 측정법(Radio-Immuno-Assay), 역 수동 혈구응집법(Reverse

Passive Hemagglutination test), 수동 혈구응집법(Passive Hemagglutination test)등의 면역-혈청학적 검사법으로는 검출되지 않는 경우도 많아서 새로운 검사법이 요망되고 있는데^{7, 16, 26, 28, 32}) 최근에 급속히 발전되고 있는 분자생물학적인 연구기법인 dot blot hybridization법 및 PCR(polymerase chain reaction)법을 사용함으로써 환자의 혈청에서 직접 B형간염 바이러스 DNA를 검출하여 B형간염을 신속 정확하게 진단하고, 감염력을 객관적으로 판정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다.^{2, 8, 17, 18, 26, 42, 52)}

현재 B형간염 환자의 감염력을 판정하는 객관적 지표로서 주로 HBe 항원검사가 사용되고 있는데, 이것은 직접 바이러스를 검출하는 것이 아니고 간접적인 면역학적 표식자를 검사하는 것이기 때문에 정확한 판정을 얻기에는 충분치 않은 실정이며^{2, 25, 47, 53)} HBe항원 음성인 경우에도 만성간염상태가 지속적으로 진행되는 경우가 많은데^{9, 10)} 최근에 그 원인중 하나로서 주로 B형간염 바이러스 pre-c영역 DNA의 돌연변이에 의해, 바이러스는 체내에서 증식하고 있지만 HBe항원 생산은 불가능하게 된다는 사실이 밝혀졌고,^{6, 11, 14, 33, 38, 45, 49)} 다른 부위의 바이러스 DNA에도 돌연변이가 존재한다는 보고도 있다^{36, 37, 39)}.

이에 저자들은 pre-c영역 DNA 이외의 바이러스 DNA의 돌연변이를 조사함으로써 만성 간염에서의 HBe항원 음성이 발생하는 또 다른 기전을 조사하고자 PCR에 의해 바이러스 DNA를 분리한 후, T vector cloning^{12, 27, 48)} 및 DNA의 염기서열분석을⁴³⁾ 통해 바이러스 DNA 돌연변이를 검색하여 만성 간염에서의 HBe항원 음성이 발생하는 기전을 이해하고, PCR에 의한 새로운 감염력 판정지표를 마련코자 이 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 혈청

계명대학교 동산의료원에 검사의뢰되어 HBs항원 양성이면서 HBe항원 음성인 만성 간염 환자혈청 12례를 실험에 사용하였고, HBs항원, HBe항원 및 항-HBe항체 등의 면역학적 검사는 효소면역측정 kit(미국 Abbott 회사제)를 사용하여 측정하였다. 모든 혈청은 -20℃에 보관하며 사용하였다.

2. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)법에 의한 HBV core 항원 영역 DNA의 증폭

Oligonucleotide primers는 B형간염 바이러스 DNA 염기서열 1,891에서 1,920사이의 30mer를 sense primer로 사용하였고, 2,160에서 2,131사이의 30mer를 antisense primer로 사용하여 PCR을 실시하였다.^{13, 17, 18, 31, 35, 44, 46)} PCR된 DNA 산물은 270bp였으며, 각 primer의 염기서열은 다음과 같다^{17, 52)}.

Sense primer:

5' - GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA-3'

Anti-sense primer:

5' - CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT-3'

DNA시료의 전처치는 혈청 50μl에 0.2M NaOH 50μl를 넣고 37℃에서 1시간 방치 후 0.2N HCl 50μl를 가하여 중화시켰다. 이것을 95℃에 60초간 가열하고 원심한 후 상청액 20μl를 PCR에 사용하였다.

PCR의 총량은 50μl로 하였고, 50mM KCl, 10mM Tris HCl(pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01% (wt/vol) gelatin이 함유된 reaction mixture (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)를 사용하였고, 각각 20μM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)와 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus제)를 사용하였다. Primer들은 각각 1μM씩 사용하였으며 최종적으로 30μl의 mineral oil(Perkin Elmer Cetus제)로 덮은 후 PCR을 30회 실시하였다⁴²⁾. PCR에 사용한 장비는 미국 Ericomp사의 Easy Cycler(수냉식)를 이용하였다.

DNA denaturation은 94℃에서 90초, primer annealing은 42℃에서 90초, DNA extension은 72℃에서 180초간 실시하였다. 매 실험마다 클론된 B형간염 바이러스 cDNA를 양성대조군으로 사용하였고, 음성대조군으로는 DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 사용하였다.

3. 전기영동에 의한 PCR 산물의 검색

PCR 산물 10μl를 취하여 2μl의 gel loading buffer(Type I)와 섞은 후 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에 점종 후 1X Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer와 minigel 영동

기로 100 volt, 30분간 수평형 잠수식 전기영동을 실시한 후, UV transilluminator(302nm 파장)와 Polaroid camera를 이용하여 사진촬영한 후 270bp 크기의 DNA band 유무를 보아 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 123 DNA ladder(BRL, U.S.A.)를 사용하였다.

4. Low melting agarose를 이용한 PCR 산물(HBc DNA)의 순수분리

미국 Sigma회사제 low melting agarose를 ethidium bromide가 함유된 TAE buffer로 녹여 1%로 만든 후 gel bed에 붓고 완전히 굳힌 후 PCR 산물을 점종하고, 4°C cold room에서 100 Volt로 40분간 영동시켰다. 영동이 끝난 후 gel을 360nm의 UV transilluminator 위에 얹고 면도칼로 270bp 크기의 DNA band만을 잘라내어 1.5ml microtube에 넣고 TE buffer 400μl를 넣고 70°C 수조에 넣어 agarose gel을 녹였다. 완전히 녹은 gel에 Tris-saturated phenol을 넣고 섞은 후 microfuge로 10분간 원심하고 상층액을 새 microtube로 옮겼다. 동량의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞은 후 10분간 원심하고 상층액을 다시 새 microtube로 옮긴 후 동량의 chloroform을 넣고 섞은 후 10분간 원심하고 상층액을 새 microtube로 옮겼다. 0.1 volume의 sodium acetate와 2 volume의 ethanol을 넣은 후 -20°C에 60분간 방치하고 microfuge로 15분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 침사에 70% ethanol을 넣고 실온에 10분간 방치 후 원심하고 상층액을 제거하고 speed vac dryer(Savant Co., U.S.A.)로 건조시킨 후 10μl의 TE buffer에 녹여 T-vector cloning에 사용하였다.

5. PCR된 HBc DNA의 T-vector로의 cloning

Low melting agarose를 이용하여 순수분리된 PCR 산물을 미국 Novagen사의 T-vector인 pT7Blue vector(Fig. 1)에 결합시켜 cloning 하였다.

먼저 T-vector로의 ligation은 10X ligation buffer, DTT(100mM), ATP(10mM), vector(50ng/μl), T4 ligase, PCR DNA 및 증류수를 섞어 총 10μl가 되도록 하고 16°C 저온수조에 5시간 ligation시킨 후 transformation에 사용하였다.

Transformation 실험은 -70°C에 보관중이던

competent cell을 얼음에서 녹인 후 0.5ml microtube에 20μl씩 분주하여 얼음에 세웠다. 여기에 ligation된 vector-PCR DNA recombinant액 5μl를 넣고 섞은 후 얼음에 30분간 방치한 후 42°C 수조에 넣고 2분간 heat-shock를 준 후 culture medium 80μl를 넣고 잘 섞은 후 37°C 부란기에서 1시간 배양시켰다. 배양액 50μl를 취하여 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside: 50mg/ml) 및 IPTG(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside: 0.1M)가 미리 도말된 agar plate(ampicillin 50μg/ml, tetracycline 15μg/ml 함유 배지)에 도말시킨 후, 37°C에서 15시간 배양하였다. 배양된 집락 중 백색 집락을 취하여 L broth에 진탕배양 후 alkaline lysis법으로⁵⁾ plasmid를 분리하여 직접 전기영동 및 제한효소(PstI 및 EcoRI) 처리 후 전기영동하여 recombinant plasmid를 확인하였다. 그리고 T-vector에 결합하는 T7 promoter primer와 U19mer primer(Fig. 1)를 이용하여 clone된 recombinant plasmid를 대상으로 PCR(94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분)을 35회 실시하여 450bp 크기의 PCR band 산생 유무로써 recombinant plasmid를 재확인하고, 최종 확인된 clone들을 DNA 염기서열 분석에 사용하였다.

6. HBc DNA 염기서열 분석

Cloning된 HBc DNA insert의 돌연변이 여부를 조사하기 위하여 미국 United States Biochemical사의 Sequenase version 2.0 sequencing kit를 사용하여 Sanger등의 dideoxy-chain termination법으로 double stranded DNA sequencing을 시행하였다⁴³⁾. Cloning된 plasmid DNA를 alkaline lysis법으로 분리하고, 분리된 5μg DNA액에 0.1 volume의 2M NaOH, 2mM, EDTA용액을 혼합한 후 37°C에 30분 incubation하여 denaturation시킨 다음 0.1 volume의 3M sodium acetate(pH 5.0)를 가하여 중화시키고 4 volume의 ethanol을 가하여 -70°C에 15분간 둔 후 원심(1,200rpm, 4°C, 15분)하여 DNA 침사를 얻은 후, 이를 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 DNA를 7μl의 증류수에 녹이고 reaction buffer 2μl, sequencing primer 1μl(0.5pM/μl, 5'-GTTTTCCCA GTCACGAC-3')를 더한 후 annealing, labeling reaction(³⁵S-dATP사용), termination reaction을 시행한 후 stop solution으로 반응을 정지

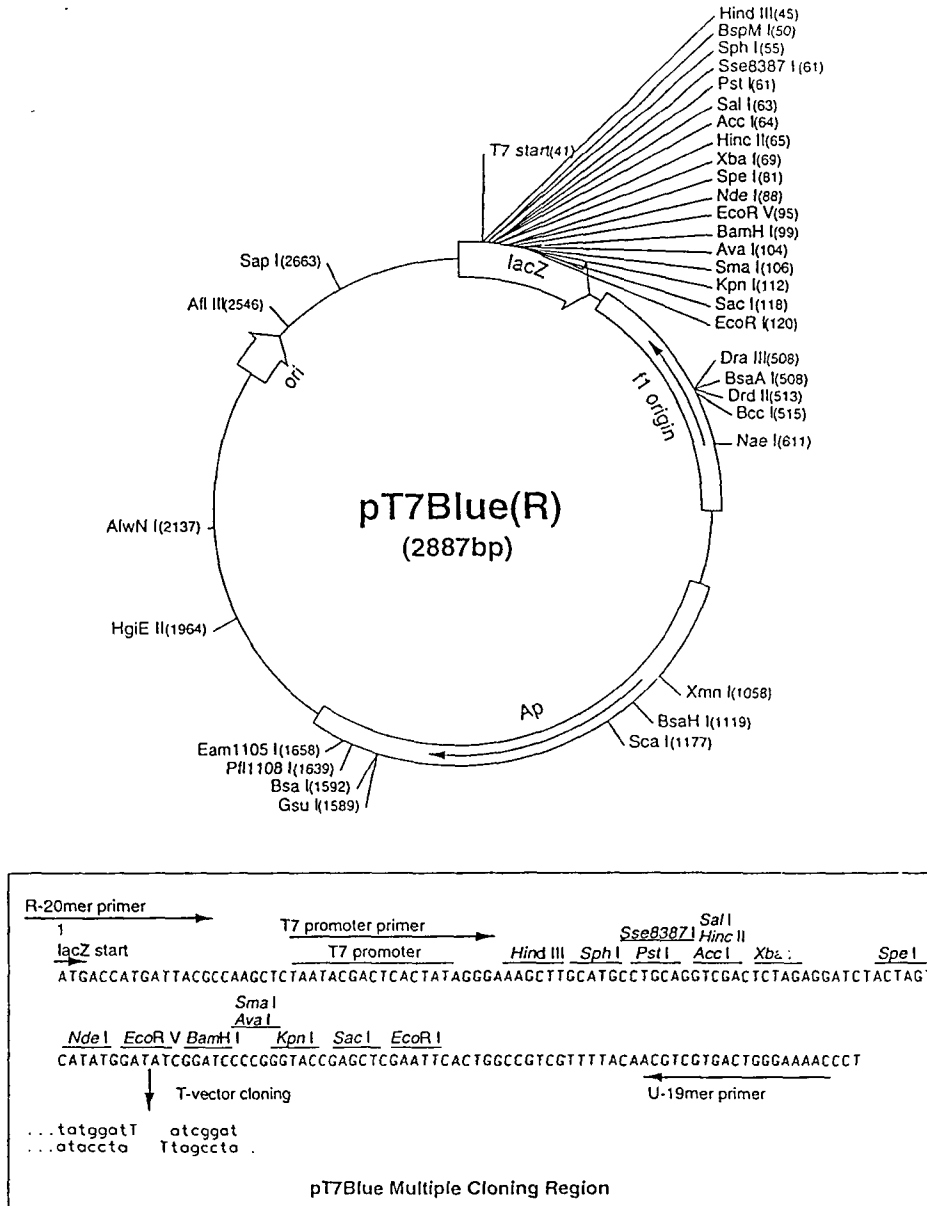


Fig. 1. Structure of pT7Blue Vector and its multiple cloning region.

시킴 75°C에 2분간 두어 denaturation시킨 후 6% urea(7.5M) polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 영동된 gel은 5% acetic acid-15% methanol액에 20분간 담구어 urea를 제거한 후 gel dryer를 사용하여 건조시키고, 실온에서 36시간 동안 autoradiography를 시행한 후 DNA 염기서열을 판독하였다.

성적

HBs항원 양성이면서 HBe항원 음성인 만성 간염 환자혈청 12례에 대해 HBe영역 DNA PCR을 실시한 결과 12례 모두에서 270bp의 DNA band가 나타나서 모두가 PCR 양성이었다(Fig. 2).

PCR된 HBe 영역 DNA를 순수분리한 후

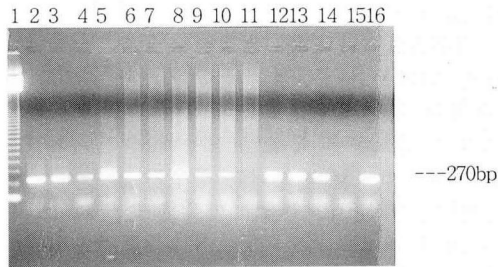


Fig. 2. Gel electrophoresis of the PCR products of HBV DNA amplification. Lane 1:DNA size marker(123 ladder), lane 2 to lane 14: PCR of HBs antigen positive and HBe antigen negative sera, lane 15:negative control, lane 16:positive control.

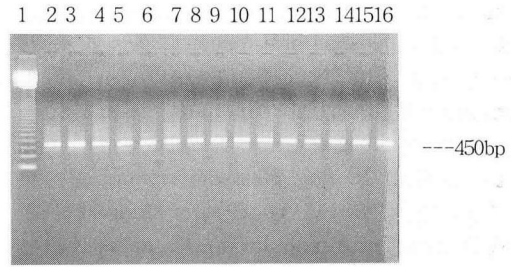


Fig. 5. Gel electrophoresis of the PCR products(450bp) of recombinant pT7Blue plasmid DNA amplification. Lane 1:DNA size marker (123 ladder), lane 2 to lane 16:PCR of recombinant pT7Blue plasmid DNAs.

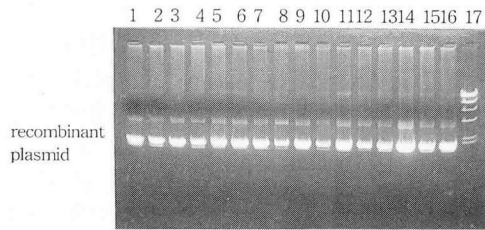


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis patterns of the recombinant pT7Blue plasmid DNA (Lanes 1 to 16). Lane 17:Hind III-digested lambda DNA(size ranges:23.1Kb, 9.4Kb, 6.6Kb, 4.4Kb, 2.3Kb, 2.0Kb).

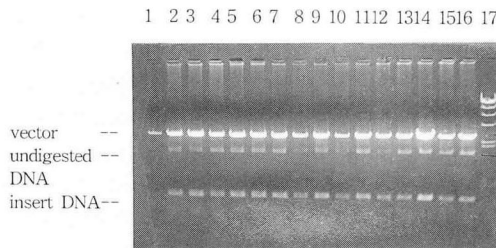


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns of restriction enzyme(EcoRI & PstI) digested recombinant pT7Blue plasmid DNA(Lanes 2 to 16). Lane 1:pT7Blue vector only, lane 17: Hind III-digested lambda DNA(size ranges:23.1Kb, 9.4Kb, 6.6Kb, 4.4Kb, 2.3Kb, 2.0Kb).

pT7Blue vector로 클로닝하고 recombinant plasmid를 분리하여 전기영동으로 확인한 결과, 모든 클론에서 recombinant plasmid를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

HBc insert DNA 존재를 확인하기 위해 recombinant plasmid를 EcoRI와 PstI으로 절단 후 전기영동시킨 결과, 모든 클론에서 HBc insert DNA가 존재함을 확인할 수 있었다

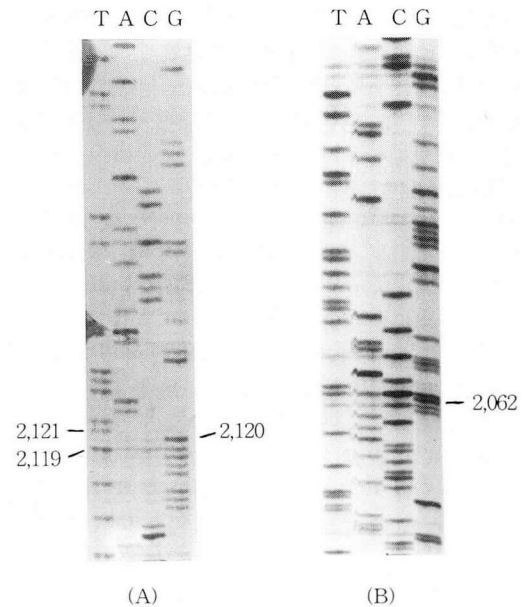


Fig. 6. Mutations detection by dideoxy-chain terminating DNA sequencing of HBV core region DNA. **A)** Point mutations in DNA sequences 2,119(A to T), 2,120(A to G), 2,121(G to T) resulted in two codon changes (GGA to GGT, AGT to GTT) and one amino acid change (serine to valine). **B)** Point mutation in DNA sequence 2,062(A to G) resulted in one codon change (GCA to GCG).

(Fig. 4).

HBc insert DNA의 존재를 PCR로 재확인하기 위해 pT7Blue vector의 T7 promoter에 결합하는 primer와 U-19mer primer를 사용하여 recombinant plasmid를 PCR해 본 결과, 모든 recombinant plasmid에서 450bp의 DNA band가 나타나서 insert DNA가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

Insert DNA가 확인된 recombinant plasmid 들을 대상으로 HBc 영역 DNA의 염기서열 분석을 실시한 결과, 염기서열 2,119의 Adenine이 Thymine으로, 2,120의 Adenine이 Guanine으로, 2,121의 Guanine이 Thymine으로 point mutation되어 아미노산 serine이 valine으로 돌연변이된 것을 1례 발견하였고(Fig. 6A), 염기서열 2,062의 Adenine이 Guanine으로 point mutation된 것을 1례 발견하였다(Fig. 6B).

고 찰

급만성 간염, 간경변증이나 간암등의 직간접적인 원인이 되는 B형간염 바이러스(HBV) 감염은 보건교육이나 예방접종실시 및 철저한 위생감독 등으로 병을 예방하는 것이 가장 중요하다^{15,41,50}. 일반적으로 임상에서 사용되고 있는 B형간염 진단법으로는 ELISA, RIA, RPHA, PHA등의 면역-혈청학적 방법이 널리 쓰이고 있으나 이들은 바이러스의 존재를 직접 검사하는 것이 아니며, 원인을 검출하지 못하는 경우도 많아서 새로운 검사법이 필요한 실정이다^{16,32,52}.

그리고 현재 B형간염의 감염력여부를 판정하는데 널리 사용되고 있는 HBe항원 검사는, 항 HBe항체 양성인 환자로 부터도 경구 혹은 비경구적 경로로 다른사람에게 B형간염이 감염되는 경우가 있고, 항 HBe항체 양성혈액을 실험동물에 접종하면 간염을 일으키는 경우가 있어서 HBe 항원검사나 항 HBe 항체검사만으로는 B형간염의 감염력을 정확하게 판정하기가 어렵다²².

이러한 점을 보완코자 최근에 급속히 발전되고 있는 분자생물학적 방법인 dot blot hybridization 및 PCR을 이용하여 혈청내에 존재하는 HBV DNA를 직접 검출하는 검사법이 소개되고 있으나, dot blot hybridization법의 경우 검사시간이 다소 길게 소요되고 예민도도 더 개선해야 하는 등 몇가지 단점 때문에 PCR법이 최선의 방법으로 간주되고 있다^{17,18}. 저자들은 이 연구에서 HBe항원 음성인 만성간염 환자에서의 PCR법의 감염력 판정 및 진단적 효율을 조사하기 위해 환자 혈청 12례에 대하여 PCR검사를 실시한 결과, 12례 모두가 혈청학적 표식자 HBe항원은 음성인데도 PCR에서는 100% HBV DNA양성으로 나타나서, B형간염의 정확한 진단과 감염력 판정은 면역

학적 검사만으로는 불완전하며 PCR에 의한 HBV DNA검사가 B형 간염의 감염력 판정과 진단에 있어서 매우 정확하고 예민한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

그리고 HBe항원 음성인 경우에도 만성간염 상태가 지속적으로 진행되는 경우가 많은데^{9,10} 면역학적 연구만으로는 그 이유를 알 수 없었으나 최근 바이러스 DNA 및 유전자발현에 대한 분자생물학적 연구에 의해 그 원인중 하나가 밝혀지게 되었다.^{6,14,29,38} 즉, B형 간염 바이러스 pre-c영역 DNA(염기서열1896)의 Guanine이 Adenine으로 point mutation되어 codon TGG가 TGA로 바뀌게 되어서 결국 pre-c DNA의 아미노산 tryptophan codon이 stop codon으로 바뀌어 pre-c 단백질의 기능에 장애가 초래되고 그 결과 HBe항원의 세포외 분비가 중단된다는 사실이 밝혀졌다. 그리고 HBe항원 음성인 만성 간질환 혈청에서 분리된 바이러스 DNA의 90% 이상이 염기서열 1896의 point mutation을 가진다고 보고되었다^{9,19,37}. 그리고 다른 연구자들에 의해 다른 다양한 DNA영역에도 여러가지 돌연변이가 존재함이 보고되었다^{36,37,39}.

이에 저자는 pre-c영역 DNA 이외의 바이러스 DNA의 돌연변이를 조사함으로써 만성간염에서의 HBe항원 음성이 발생하는 또다른 기전을 규명코자 B형간염 바이러스 core항원 영역 DNA의 염기서열분석을 실시한 결과 바이러스 DNA염기서열 2,119의 Adenine이 Thymine으로, 2,120의 Adenine이 Guanine으로, 2,121의 Guanine이 Thymine으로 point mutation되어 아미노산 serine이 valine으로 point mutation된 것을 1례 발견하였다. 이러한 HBc 영역 DNA의 돌연변이가 HBe항원 생산에 미치는 영향을 고찰해 보면, HBe항원이 HBc항원에서 분리되어 세포외로 분비되기 위해서는 core단백질의 protease기능이 중요하며 특히 threonine, valine 아미노산 부위가 protease 기능에 큰 영향을 미친다고 알려져 있는데^{30,40}, 만일 core단백질에 돌연변이가 초래되어 그 결과 protease 기능에 변화가 생기면 HBe항원의 생산은 불가능하게 된다. 이 연구에서는 1례에서 core단백질의 아미노산 serine이 valine으로 돌연변이가 된 것을 발견하였는데 그 결과 core단백질의 protease 기능에 변화가 초래되어 HBe항원 생산에 장애가 초래될 수도 있을 것으로 추측되나 이 연구에서의 HBe항

원 음성과 core영역 DNA의 돌연변이와의 정확한 관계를 밝히기 위해서는 향후 core단백의 기능 및 분자구조에 관한 연구 등이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

현재 B형간염 환자의 감염력을 판정하는 객관적 지표로서 주로 HBe 항원검사가 사용되고 있으나, HBe항원 음성인 경우에도 만성 간염상태가 지속적으로 진행되는 경우가 많아서 정확한 판정을 내리기가 어려운 실정이다. 이에 저자는 최근에 급속히 발전되고 있는 분자생물학적인 연구기법인 PCR(polymerase chain reaction)법을 사용하여 만성 간염 환자의 혈청에서 직접 B형간염 바이러스 DNA의 검출을 시도함으로써 B형간염의 정확한 진단과 감염력의 새로운 판정지표 마련에 도움을 주고자, HBs항원 양성이며 HBe항원 음성인 만성 간염 환자의 혈청 12례에 대해 PCR검사를 실시한 결과 12례 모두에서 바이러스 DNA를 검출할 수 있어서 향후 B형간염의 신속하고도 예민한 진단과 감염력의 새로운 판정지표 마련에 PCR검사가 매우 유용할 것으로 사료되었다.

그리고 HBe항원 음성인 경우에도 만성간염상태가 지속적으로 진행되는 경우가 많은데, 최근에 그 원인중 하나로서 B형간염 바이러스 pre-c영역 DNA의 돌연변이에 의해, 바이러스는 체내에서 증식하고 있지만 HBe항원 생산만은 불가능하게 된다는 사실이 밝혀졌다. 이에 저자는 pre-c영역 DNA 이외의 바이러스 DNA의 돌연변이를 조사함으로써 만성 간염에서의 HBe항원 음성이 발생하는 또다른 기전을 규명코자 PCR에 의해 바이러스 DNA를 분리한 후, T vector cloning 및 DNA sequencing법으로 B형간염 바이러스 core항원 영역 DNA의 염기서열분석을 실시한 결과 바이러스 DNA염기서열 2,119의 Adenine이 Thymine으로 2,120의 Adenine이 Guanine으로, 2,121의 Guanine이 Thymine으로 point mutation되어 아미노산 serine이 valine으로 돌연변이된 것을 1례 발견하였고, 염기서열 2,062의 Adenine이 Guanine으로 point mutation된 것을 1례 발견하였다. 이러한 HBc영역 DNA의 돌연변이가 HBe항원 생산에 미치는 영향은 아마도 돌연변이로 인해 바이러스 core항원

단백의 아미노산 서열이 변하게 되어 그 결과 core 단백질의 HBe항원 생산에서의 중요한 기능인 Protease기능에 장애가 초래되기 때문인 것으로 생각되나 정확한 기전을 밝히기 위해서는 향후 core항원 단백질의 기능 및 분자구조에 관한 연구 등이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김수희, 백원기, 서민호, 김재룡, 신동학: Digoxigenin 탐식자를 이용한 혈청내 B형 간염 바이러스 DNA의 검출. 대한미생물학회지 28:303-311, 1993.
- 2) 서민호, 서성일, 백원기, 이상숙, 김재룡: 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot Blot Hybridization에 의한 검출. 대한미생물학회지 27:87-92, 1992.
- 3) 최상운, 김정룡, 이효석, 송인성, 서정선: 간염 B 바이러스 DNA 혈중농도와 HBe Ag/Anti-HBe와의 상관관계. 대한 소화기병학회잡지 21:876-881, 1989.
- 4) Alter MJ, Ahtone J, Weisfuse I, Starko K, Vacalis TD and Maynard JE: Hepatitis B virus transmission between heterosexuals. JAMA 256:1307-1310, 1986.
- 5) Birnboim L and Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7: 1513-1523, 1979.
- 6) Bonino F, Rizzetto M and Will H: Hepatitis B virus unable to secrete e antigen. Gastroenterology 100:1138-1141, 1991.
- 7) Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, Rizzi R, Chiaberge E, Tardanico R, Callea F and Verme G: Chronic hepatitis in HBs Ag carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. Gastroenterology 90:1268-1273, 1986.
- 8) 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:765-768, 1981.
- 9) Brunetto M, Giarin M, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfaroano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H and Bonino F:

- Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4186-4190, 1991.
- 10) Carman W, Jacyna M, Hadziyannis S, Karayiannis P, MnGarvey M, Makris A and Thomas H: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* ii:588-590, 1989.
 - 11) Chang C, Enders G, Sprengel R, Peters N, Varmus H and Ganem D: Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J Virol* 61:3322-3325, 1987.
 - 12) Clark J: Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16:9677-9686, 1988.
 - 13) Ganem D: Assembly of hepadnaviral virious and subviral particles. *Current Topics Microbiol Immunol* 168:61-83, 1991.
 - 14) Garcia P, Ou J, Rutter W and Walter P: Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: After signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* 106:1093-1104, 1988.
 - 15) Hollinger FB: Hepatitis B virus, p2171-2238. In Fields BN and Knipe DH(ed): *Fields Virology*. 2nd ed. Raven press, New York, 1990.
 - 16) Hollinger F and Dreesman G: Immunobiology of hepatitis viruses, p558-572. In Rose N, Friedman H and Fahey J(ed): *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1986.
 - 17) 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* 27:1930-1933, 1989.
 - 18) Kaneko S, Miller R, Feinstone S, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N and Purcell R: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:312-316, 1989.
 - 19) Kim WH, Kim KH, Chung JP, Kang JK and Park IS: Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver diseases. *Yonsei Med J* 34:158-165, 1993.
 - 20) Krugman S, Hoofnagle J, Gerety R, Kaplan P and Gerin J: Viral hepatitis, type B: DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med* 290:1331-1335, 1974.
 - 21) Krugman S, Overby L, Mushahwar I, Ling C, Frosner G and Deinhardt F: Viral hepatitis, type B: Studies on natural history and prevention re-examined. *N Engl J Med* 300:101-106, 1979.
 - 22) 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* 6:205-208, 1986.
 - 23) Lee HS, Byun JH and Kim CY: Etiology and outcome of acute viral hepatitis in Korean adults. *J Kor Med Sci* 5:149-154, 1990.
 - 24) 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* 5:145-148, 1990.
 - 25) 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* 6:369-373, 1986.
 - 26) 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* 3:285-291, 1983.
 - 27) Marchuk D, Drumm M, Saulino A and Collins F: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning

- ing of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19:1154-1154, 1991.
- 28) 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* 89:1104-1108, 1985.
- 29) McLachlan A, Raney M, Riggs M, Sorge H and Chisari F: Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: Influences of pre-S and precore sequences. *J Virol* 61:683-692, 1987.
- 30) Miller R: Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum e antigen. *Science* 236:722-725, 1987.
- 31) Miller R, Kaneko S, Chung C, Girones R and Purcell R: Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 9:322-327, 1989.
- 32) Mushahwar I, McGrath L, Drnec J and Overby L: Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody. Results of clinical evaluation. *Am J Clin Pathol* 76:692-697, 1981.
- 33) Naoumov N, Schneider R, Grotzinger T, Jung M, Miska S, Pape G and Will H: Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 102:538-543, 1992.
- 34) Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Mitsunobu I, Miyakawa Y and Mayumi M: E 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* 294:746-749, 1976.
- 35) Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Iizuka H, Gotanda T, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M: Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr: Comparison with genomes of the other three subtypes. *J Gen Virol* 67:2305-2314, 1986.
- 36) Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M: Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 61:3030-3034, 1987.
- 37) Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M: Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 64:1298-1303, 1990.
- 38) Ou J, Laub O and Rutter W: Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and cause the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1578-1582, 1986.
- 39) 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.
- 40) Robinson W: Hepadnaviridae and Their Replication, p2137-2170. In Fields B and Knipe D(ed): *Fields Virology*. 2nd ed. Raven Press, New York, 1990.
- 41) Robinson W: Hepatitis B virus and Hepatitis Delta Virus, p1204-1231. In Mandell G, Douglas R and Bennett J(ed): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3rd ed. Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 42) 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* 239:487-491, 1988.
- 43) Sanger F, Nicklen S and Coulson A: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977.
- 44) Schaller H and Fischer M: Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Current Topics Microbiol Immunol* 168:21-39, 1991.

- 45) Schlicht H, Salfeld J and Schaller H: The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. *J Virol* **61**:3701-3709, 1987.
- 46) Seeger C, Summers J and Mason W: Viral DNA synthesis. *Current Topics Microbiol Immunol* **168**:41-60, 1991.
- 47) Shikata T, Abe TK and Uzawa T: Hepatitis Be antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* **136**:571-576, 1977.
- 48) Shuldiner A, Scott L and Roth J: PCR-induced(ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction(PCR) products. *Nucleic Acids Res* **18**:1920-1920, 1990.
- 49) Standring D, Ou J, Masiarz F and Rutter W: A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:8405-8409, 1988.
- 50) Swenson P: Hepatitis Virus, p959-983. In Hausler W, Herrmann K, Isenberg H and Shadomy H(ed): *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
- 51) Tiollais P, Pourcel C and Dejean A: The hepatitis B virus. *Nature* **317**:489-495, 1985.
- 52) 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**:39-42, 1990.
- 53) Werner BG, O'Connel 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 USA* **74**:2149-2151, 1977.