

### 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot Blot Hybridization에 의한 검출

Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum by Dot Blot Hybridization

저자 서민호, 서성일, 백원기, 이상숙, 김재룡

(Authors) Min-Ho Suh, Seong-II Suh, Won-Ki Baek, Sang-Sook Lee, Jae-Ryong Kim

출처 The Journal of the Korean Society for Microbiology 27(1), 1992.2, 87-92 (6

(Source) pages)

발행처 대한미생물학회

(Publisher) The Korean Society For Microblology

URL http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01486682

APA Style 서민호, 서성일, 백원기, 이상숙, 김재룡 (1992). 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의

Dot Blot Hybridization에 의한 검출. The Journal of the Korean Society for

Microbiology, 27(1), 87-92.

이용정보계명대학교(Accessed)114.71.5.213

2016/01/11 15:35 (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 질수 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).

## 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot Blot Hybridization에 의한 검출\*

계명대학교 의과대학 미생물학교실1, 병리학교실2, 임상병리학교실3

서민호' · 서성일' · 백원기' · 이상숙' · 김재룡'

=Abstract=

Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum by Dot Blot Hybridization

Min-Ho Suh<sup>1</sup>, Seong-Il Suh<sup>1</sup>, Won-Ki Baek<sup>1</sup>, Sang-Sook Lee<sup>2</sup> and Jae-Ryong Kim<sup>3</sup>

Department of Microbiology<sup>1</sup>, Pathology<sup>2</sup> and Clinical Pathology<sup>3</sup>, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

A total of 149 HBs Ag positive and 15 normal serum samples were tested for the detection of Hepatitis B virus(HBV) DNA to evaluate the relationship between serum HBV DNA positivity by DNA blot hybridization and serological markers positivity, by ELISA.

Twenty-seven(79.4%) of 34 patients positive for both HBs Ag and HBe Ag were positive for HBV DNA compared with 33(28.7%) of 115 HBs Ag positive but HBe Ag negative individuals.

In addition, among all patients positive for HBV DNA, there was a statistically significant correlation between the concentration 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 28.7%(33/115), so we concluded that detection of both HBe Ag and HBV DNA should be necessary in order to evaluate the infectivity of the HBs Ag positive sera.

Key Words: Hepatitis B virus, Dot blot hybridization, Infectivity.

### 서 론

DNA 바이러스의 일종인 B형간염 바이러스 (Hepatitis B virus: HBV)에 의해 초래되는 B 형간염은 비경구적 혹은 경구적으로 감염되어 급만성 간염을 초래하는 임상적으로 매우 중요한 질환이며, B형간염 바이러스는 간경변증이나 간암에 까지도 깊이 관여된다고 보고되어 있다. 7.14.21.24.26)

우리나라에서는 B형간염의 발병이 상당히 높아서 많은 사람이 감염되어 있다<sup>13)</sup>. 특히 임 산부에 있어서 B형간염이 발생하면 산모도 문 제이지만 태아에 수직감염을 초래하여 큰 위험

\*이 논문은 1991년도 계명대학교 갑종연구비로 이루어졌음. 을 초래하며, 소아는 어른에 비해 B형간염 발생후 만성화가 되는 율이 현저히 높기 때문에 B형간염이 국민건강에 미치는 영향은 매우 크다고 하겠다<sup>6,13,14)</sup>.

B형간염의 관리에 있어서는 무엇보다도 예방적인 조치가 가장 중요하며, 또한 원인 바이러스의 조기발견 및 정확한 정량분석이 진단 및 예후판정에 매우 중요하다. 그런데 현재 임상적으로 널리 쓰이고 있는 B형간염의 진단법으로는 ELISA(Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay:효소면역 측정법), RIA(Radio-Immuno-Assay:방사면역 측정법), RPHA(Reverse Passive Hemagglutination test:역 수동 혈구응집법), PHA(Passive Hemagglutination test:수동혈구응집법)등의 면역-혈청학적 진단법이 주종을 이루고 있으며, 이들의 효용도 매우 크지만,

이러한 일반적 검사법으로 검출되지 않는 경우도 많으며, 특히 B형간염의 감염력 판정에 있어서는 HBe항원검사 등의 단순한 면역학적 검사로는 충분치 않은 실정이다.<sup>8,17,18,28)</sup>

이에 저자들은 최근에 급속히 발전되고 있는 분자생물학 및 유전공학적인 연구기법과 cloned HBV DNA를 사용하여 B형간염으로 의심되는 환자의 혈청 및 정상혈청에서 DNA hybridization에 의해 직접 B형간염 바이러스 DNA를 검출함으로써, B형간염의 정확한 진단법과 감염력의 객관적 판정에 도움이 될 자료를 제공하고자 본 연구를 실시하였다.

### 재료 및 방법

### 1. 혈 청

계명대학교 동산의료원 임상병리과에 검사의 뢰되어 각종 B형간염 혈청 marker가 나타난 149례의 환자 혈청과 15례의 정상혈청을 실험 에 사용하였다. 모든 혈청에 대해 미국 Abbott 회사제의 효소면역측정 kit를 이용하여 HBs항 원, HBe항원 및 항-HBe항체를 측정하였다. 모 든 혈청은 -20℃에 보관하며 사용하였다.

### 2. 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 Dot blot 검사

검사할 혈청을 녹인후 미량원심분리기로 12000rpm으로 10분간 원심하고 상청액  $5\mu$ 를 실험에 사용하였다. 그리고 B형간염 바이러스 DNA(cloned HBV DNA)를 1,024picogram에서 부터 0.5picogram까지 12단계로 배수희석하여 양성대조군 및 예민도 기준치로 삼았다.

상청액 50μl를 microdilution plate에 접종하고 50μl의 denaturation용액(4N NaOH)을 넣어섞고, 65℃ dry bath에 5분간 세운 후 100μ의 1M Tris(pH 8.0)액을 넣고 중화시켰다.

이상과 같이 전처치된 각각의 혈청을 dot blot장치(미국 Millipore제)에 접종하고 진공압을 가하여 nitrocellulose filter(pore size: $0.4\mu$ m)에 blotting시켰다 $^{6.27}$ .

Filter를 꺼내어 공기중에 30분간 건조시킨후 80℃에서 40분간 baking시키고 비닐봉지에넣어 vinyl sealer로 봉한 후 진공데시케이터에넣어 보관하다가 hybridization을 실시하였다.

### 3. Nick translation에 의한 HBV DNA probe 제조

Rigby등의 방법에 의해 hybridization용 probe 를 제작하였다<sup>22)</sup>. 즉, Bethesda Research Laboratory회사제 Nick translation kit를 이용하여 cloned HBV DNA를 alpha-<sup>32</sup>P-dCTP로 표지(labeling)시킨 후 Sephadex G-50을 이용한 spun column chromatography를 실시하여 순수한 HBV DNA probe를 분리하여 사용하였다.

### 4. Hybridization

Dot blot된 nitrocellulose filter에 10메의 prehybridization용액(0.75M sodium chloride, 0.075M sodium citrate, 0.1% sodium dodesyl sulfate (SDS), 0.02% polyvinyl prolidone, 0.02% Ficoll 400, 0.02% bovine serum albumin, 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide)을 넣고 조심

Table 2. Comparison of HBV DNA concentration in patients with or without HBe Ag<sup>a</sup>

HBe Ag	HBV DNA concentration (picogram in 50µl serum)		
presence n	Mean	SD	Range
Positive 27	160.0 <sup>b</sup>	207.0	4-512
Negative 33	21.8	26.1	1-64

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>All patient sera were HBs Ag positive <sup>b</sup>Student's t test; P<0.01

Table 1. Correlation between HBV DNA and serological markers in 164 serum samples

HBV DNA* –	No. (%) with the indicated reaction of HBs Ag(+)			HBs Ag(-)
	HBe Ag(+)/ Anti HBe(-)	HBe Ag(-)/ Anti HBe(-)	HBe Ag(-)/ Anti HBe(+)	HBe Ag(-)/ Anti HBe(-)
Positive <sup>b</sup>	27(79.4)°	31(31.0)	2(13.3)	0
Negative	7(20.6)	69(69.0)	13(86.7)	15(100.0)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Hepatitis B virus DNA detected by dot blot DNA hybridization.

b>0.5 pico gram

chi-square test;p<0.01

스럽게 기포를 제거한 후 다시 vinyl sealer로 봉한 후  $42^{\circ}$ C 수조에 4시간 두었다가 꺼내고, 여기에  $P^{32}$ 로 표지된 HBV DNA probe액을 함 유하는, 10메의 hybridization용액(성분은 prehybridization액과 동일함)을 넣고 조심스럽게 기포를 제거한 후 다시 봉하고  $42^{\circ}$ C 수조에 18시간 두어 hybridization을 시켰다.

### 5. 세척 및 Autoradiography

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

### 성 적

본 실험에서 Dot blot hybridization에 의한 HBV DNA검사의 예민도는 0.5 picogram/50 $\mu$ l 였다. cloned HBV DNA를 1024 picogram에서 부터 0.5 picogram까지 순차적으로 배수희석하여 Dot blot hybridization을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 2는 각종 B형간염 혈청 marker를 가진 환자혈청을 Dot blot hybridization을 실시한 결 과를 나타낸 것이다.

HBs항원 양성 혈청 149례중 60례(40.3%)에서 B형간염 바이러스 DNA양성을 나타냈으며, HBs항원 및 HBe항원 음성 혈청 15례는 모두

# ABCDEFGHIJKL

Fig. 1. Autoradiogram of serial dilutions of HBV standard DNA(cloned HBV DNA). Filters were hybridized with the <sup>32</sup>P-dCTP-labeled HBV DNA probe, Films were developed after 24 h of autoradiographic exposure at -70°C. 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.

가 B형간염 바이러스 DNA음성이었다.

HBs 및 HBe항원 양성 혈청 34례중 27례(79.4%)가 B형간염 바이러스 DNA양성을 나타냈으며 HBs항원 양성, HBe항원 음성 혈청 115례중 33례(28.7%)가 B형간염 바이러스 DNA양성을 나타내었다.

B형간염 바이러스 DNA양성 혈청 60례는 모두 HBs항원 양성이었으며, 그중 27례(45.0%)가 HBe항원 양성/항 HBe항체 음성이었고, 31례(51.7%)는 HBe항원 음성/항 HBe항체 음성이었으며 2례(3.3%)는 HBe항원 음성/항 HBe항체 양성이었다.

B형간염 바이러스 DNA양성 혈청중 HBe항 원 양성군은 B형간염 바이러스 DNA농도가 평 균 160.0 picogram/50μ이었으며, HBe항원 음 성군은 21.8 picogram/50μ이었다.

### 고 찰

급만성 간염, 간경변증 및 간암에 까지 깊이 관여되는 B형간염 바이러스의 진단은 주로 HBs항원 항체, HBc항체등의 혈청학적 marker를 대상으로 검사하는 ELISA, RIA, RPHA, PHA등의 면역학적 방법이 널리쓰이고 있다. 그러나 이들은 원인 바이러스의 직접적 검사가 아니며, 원인을 검출하지 못하고 놓치게 되는 경우도 많다. 2.17.18.27) 특히 B형간염의 감염력 판정에 있어서는 비교적 간편한 HBe항원 검사가 흔히 쓰여 왔으나, 항 HBe항체 양성인 환자로 부터도 경구 혹은 비경구적 경로로 다른 사람에게 B형간염이 감염됨이 보고되었고, 항 HBe항체 양성혈액을 실험동물에접종한 결과 간염을 일으켰음이 보고되어서, B

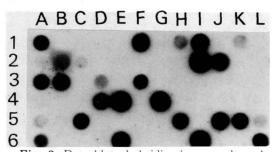


Fig. 2. Dot blot hybridization results obtained after hybridization of patient serum with the <sup>32</sup>P-dCTP-labeled HBV DNA probe and autoradiographed after 24h. Dot A1 represent positive control, and dot B1 represent negative control. Sera from 70 patients are represented in dots C1 through L6.

형간염의 감염력 판정은 단순히 면역학적인 HBe항원검사나 항 HBe항체검사만으로는 미흡 한 실정이다. 12.16.19.25)

최근에 분자생물학과 유전공학이 급속히 발 전하여 분자생물학적인 검사법이 감염병이나 종양, 유전병, 내분비 질환 등 광범위한 의학분 야에 응용되고 있다<sup>1~5,15)</sup>. 특히 B형간염 바이 러스 DNA가 클로닝됨으로써, 이것을 이용하 여 Nick translation등의 방법으로 손쉽게 B형 간염 바이러스 DNA probe를 제작하여 DNA hybridization을 실시하므로써 혈중에 존재하는 미량의 B형간염 바이러스를 직접 검출할 수 있게 되었고, 그 결과 B형간염 바어러스 DNA 검사가 B형간염의 감염력을 판정하는데 매우 정 확하고 예민한 방법으로 간주되게 되었다8.10.17). 그래서 국내외적으로 그간 사용되어 왔던 혈청 학적 marker와 B형간염 바이러스 DNA와의 관련성 및 예민도를 조사한 여러 연구가 보고 되고 있다.6,9,10,27)

저자들은 cloned HBV DNA를 1024 picogram 에서 부터 0.5 picogram까지 순차적으로 배수희 석하여 dot blotting에 의한 예민도를 검사한 결 과 0.5 picogram/ $50\mu$ l(즉  $5\times10^4$  genome/ $50\mu$ l) 로서 예민하였으며 외국의 보고와 유사하였고27, HBs항원 음성혈청은 모두가 B형간염 바이러 스 DNA음성으로 나타나서 특이도도 높음을 알 수 있었다. 그리고 HBs항원 및 HBe항원 양 성협청의 79.4%가 HBV DNA양성이어서, HBe 항원 양성혈청에서의 B형간염 바이러스 DNA 검출율은 70-100%이며, HBe항원 음성인 경우 DNA검출율은 0-66%라는 외국의 보고들과 유 사하였고,<sup>8,17,18,28)</sup> HBe항원 양성군이 음성군에 비하여 B형간염 바이러스 DNA양성율이 통계 학적으로 유의하게 높았으며(p<0.01), B형간 염 바이러스 DNA양성혈청중에서 HBe항원 양 성군의 B형간염 바이러스 DNA농도가 HBe항 원 음성군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높 게 나타나서(p<0.01), B형간염 바이러스 DNA 검사결과와 HBe항원 검사결과가 서로 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었으며, 비록 HBe항원 검사가 B형간염의 감염력 판정을 정확하게 결 정하지는 못해도 HBe항원이 양성일수록 감염 력이 더 높다는 것을 알 수 있었다.

한편 HBe항원 음성혈청의 28.7%가 B형간염 바이러스 DNA양성으로 나타나서 B형간염의 감염력 판정시에 HBe항원검사만으로는 미흡하 며 B형간염바이러스 DNA검사가 병행되어야 할 것으로 사료되었다. 그리고 항 HBe항체 양성혈청중에서도 13.3%가 B형간염 바이러스 DNA양성으로 나타나서 항 HBe항체가 양성인 경우에서도 B형간염의 감염을 일으킬 수 있음을 알 수 있었다.

그러나 Dot blot hybridization과 HBe항원검사로서는 검출할 수 없는 경우도 있으며, 신속하고도 더욱 예민한 진단을 위하여, 그리고 극소량의 가검물을 대상으로 검사할 경우에는 B형간염 바이러스 DNA의 특정 유전자를 증폭시켜 검사하는 Polymerase Chain Reaction(PCR) 등의 새로운 방법들이 병행되어야 할 것으로사료된다.<sup>5.11,20,23)</sup>

### 결 론

혈청내 B형간염 바이러스(HBV) DNA양성 도와 B형간염의 혈청학적 marker 양성도와의 관계를 조사하기 위해 149례의 HBs항원 양성 혈청과 15례의 정상혈청을 사용하여 DNA dot blot hybridization실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Cloned HBV DNA를 양성대조군으로 사용하여 dot blot방법의 예민도를 검사한 결과 50 $\mu$ l 검체중 0.5 picogram의 B형간염 바이러스 DNA만 있으면 검출가능하여 예민도가 비교적 높음을 알 수 있었다.

또한, HBs항원 음성군 15례에서는 모두가 B 형감염 바이러스 DNA음성으로 나타나서 본 검사의 특이도가 비교적 높음을 알 수 있었다.

- 2. HBs항원 및 HBe항원 양성 혈청 34례중 27례(79.4%)가 B형간염 바이러스 DNA 양성이었으며 HBe항원 음성 혈청 115례중 33례(28.7%)가 B형간염 바이러스 DNA 양성으로 나타나서, HBe항원 양성군이 음성군에 비하여 B형간염 바이러스 DNA 양성율이 통계학적으로 유의하게 높았는데(p<0.01) 이것은 B형간염 바이러스 DNA 검사결과와 HBe항원 검사결과가 서로 밀접한 관계가 있음을 뜻하며, B형간염 바이러스 DNA검사가 B형간염의 감염력을 판정하는 새로운 방법이 될 수 있음을 시사하였다.
- 3. B형간염 바이러스 DNA양성 혈청중에서 HBe항원 양성군은 B형간염 바이러스 DNA농도가 HBe항원 음성군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높아서(p<0.01), 혈청내 B형간염 바이러스 DNA농도와 HBe항원 존재유무와는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

4. HBe항원 음성 혈청의 28.7%가 B형간염 바이러스 DNA양성으로 나타나서 B형간염의 감염력 판정에 있어서 HBe항원 검사에서 놓칠수 있는 것도 B형간염 바이러스 DNA검사로써 검출할 수 있음을 시사하여, HBs항원 양성 혈청의 감염력 판정을 정확히 하기 위해서는 HBe항원 검사와 B형간염 바이러스 DNA 검사를 병행해야 할 것으로 생각되며 향후 Polymerase Chain Reaction(PCR)등의 방법을 사용하여, 소량의 혈청으로도 예민도를 더욱 높일 수있는 방법이 추가되어야 하리라고 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 1) 김석주, 이규석, 송준영, 서성일, 서민호:In situ hybridization에 의한 첨규 콘딜롬에서 의 human papillomavirus DNA의 형별 분류. 대한피부과학회지 28:702-707, 1990.
- 박승철:핵산 탐지자를 이용한 감염병의 진 단. 대한의학협회지 33:859-861, 1990.
- 3) 배옥석, 박성대, 강중식, 서민호:인체 대장 암 조직의 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자의 발현. 대한미생물학회지 26:389-393, 1991.
- 4) 서민호:암의 분자생물학적 진단. 계명의대 논문집 10:289-306, 1991.
- 5) 서민호, 백원기, 이규석:임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. 대한미생물학회지 26:479-486, 1991.
- 6) 최상운, 김정룡, 이효석, 송인성, 서정선:간 염 B바이러스 DNA 혈중농도와 HBe Ag/ Anti-HBe와의 상관 관계. 대한소화기병학 회잡지 21:876-881, 1989.
- 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 64:3025-3032, 1990.
- Bonino F, Rosina F and Rizzeto M:Chronic hepatitis in HBs Ag carriers with serum HBV DNA and anti-HBe. Gastroenterology 90:1268-1273, 1986.
- Brechot C, Degos F and Lugassy C:Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver diseases and negative tests for hepatitis B surface antigen. N Engl J Med 31:270 -276, 1985.
- 10) Brechott 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* ji:765-768, 1981.
- 11) 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 28:1411-1416, 1990.
- 12) 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.
- Lee HS, Byun JH and Kim CY:Etology and outcome of acute viral hepatitis in Korean adults. J Kor Med Sci 5:149-154, 1990.
- 14) 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.
- 15) Lee KS, Song JY and Suh MH:Collagen mRNA expression detected by in situ hybridization in Keloid tissue. J Dermatol Sci 2:316-323, 1991.
- 16) 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. Heptaology 6:369– 373, 1986.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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**:746-749, 1976.
- 20) Persing DH:Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285, 1991.
- 21) Raney AK, Milich DR, Easton AJ and MeLachlan A:Differentiation-Specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus large surface antigen gene in human hepatoma cell lines. J Virol 64:2360-2368, 1990.
- 22) Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P:Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113:237-251, 1977.
- 23) Saki 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.

- 24) Schranz P, Zentgraf H, Loncarevic IF, Niepmann M and schroder CH:Defective replication units of hepatitis B virus. J Virol 64:1851-1854, 1990.
- 25) Shikata T, Abe TK and Uzawa T:Hepatitis Be antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 136:571-576, 1977.
- 26) Summers J and Mason W:Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415, 1982.
- 27) 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.
- 28) 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.