대한임상미생물학회지 1999:2;89-94

역전사-모세관 중합효소연쇄반응법에 의한 혈청 C형 간염바이러스의 검출에 관한 연구

윤미애* 이혜수*,** ·김달식*,** 최삼임*,** Carl T. Wittwer***

전북대학교 의과대학 임상병리과학교실*, 의과학연구소**, 미국 Utah대학교 의과대학 병리학교실***

Detection of Serum HCV RNA by Rapid Cycle PCR Using Hot Air Thermocycler with Capillary Tubes

Mi Yae Youn*, M.D., Hye Soo Lee*,, M.D., Dal Sik Kim*,**, M.D.,**
Sam Im Choi*,, M.D. and Carl T. Wittwer***, M.D.**

Department of Clinical Pathology*, Chonbuk National University
Medical School and Institute for Medical Science**, Chonju, Korea,
Department of Pathology, University of Utah Medical School, Salt Lake City, USA*

Background **: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is the most sensitive method for the detection of Hepatitis C virus (HCV) RNA from serum. The PCR by conventional heat block thermocycler using small plastic tube is time and reagent consuming procedure, but rapid cycle PCR (RPCR) by hot air thermocycler using glass capillary tube is very rapid and economic. Therefore, RPCR have been recognized as a very convenient method for routine diagnostic test in clinical laboratories, but there are few reports about its usage for the detection of HCV RNA.**

Methods **: We selected two sets of primer pair from 5'noncoding region of HCV RNA genome, and optimized RPCR condition using hot air rapid thermocycler with master mix in capillary tubes. And RT-RPCR for detection of HCV RNA were performed on the serum of 58 patients, which were tested anti-HCV antibody by EIA.**

Results **: The optimized RPCR conditions were: denaturation; 94℃ for "0" sec, annealing; 55℃ (first) and 50℃ (nested) for "0" sec, elongation; 72℃ for "0" sec, and amplification cycles were 30 cycles. The consuming times per cycle were 30 sec (first) and 40 sec (nested), respectively, so the total involving times for nested RPCR were 35 min. Of the 42 EIA positive samples, 26 (62%) were RT-RPCR positive.**

Conclusions **: RT-RPCR using hot air thermocycler with glass capillary tubes for detection of HCV RNA in serum is very rapid and economic than conventional PCR using heat block thermocycler. Therefore HCV RNA detection by RT-RPCR appears to be very useful for routine clinical laboratory diagnostic method. (Korean J Clin Microbiol 1999;2:89~94)**

Key words : Hepatitis C Virus, Rapid cycle PCR, Hot air thermocycler, Capillary tubes

원본 접수 : 1999년 1월 19일 접수번호 : CM99-10
수정본접수 : 1999년 3월 8일
교신저자 : 이 혜 수
(561-712) 전북 전주시 덕진구 금암동 634-18
전북대학교병원 임상병리과
전화 : 0652-250-1218 Fax : 0652-250-1200

서 론

C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 약 9.4 Kb의 염기로 이루어진 한 가닥의 RNA바이러스로, 수

혈후 간염의 주요원인이 될 뿐 아니라 간경화증 및 간암으로도 잘 진행되는 것으로 알려져 있다[1]. HCV 감염의 진단검사법으로는 크게 HCV항체를 검출하기 위한 효소면역측정법과 이의 확인 검사인 면역블로팅법, 그리고 HCV RNA를 직접 검출하기 위한 역전사-중합효소연쇄반응법(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 등이 있다[1].

RT-nested PCR은 검체에서 추출한 RNA를 역전사시켜 cDNA로 만든 후 두 쌍의 시발체를 이용하여 연속적으로 증폭시킴으로써 혈청이나 조직에서의 HCV RNA를 직접 검출하는 방법으로, 현재까지 HCV에 의한 감염을 진단하는 방법 중 예민도가 가장 높은 방법이다[2-4]. 그러나 기존의 heat block thermocycler를 이용하는 PCR 법은 술식이 번거롭고 시약 및 시간의 소모가 많아, 일반적인 임상검사로 이용하기에는 적합치 못하다. Wittwer 등[5]에 의하여 개발된 rapid cycle thermocycler를 이용한 PCR 법(이하 RPCR로 약함)은 열전도체와 반응용기를 hot air와 유리모세관을 사용하기 때문에 검사시간과 시약을 절감할 수 있어[6-8] 임상검사실에서 이용하기에 적합한 방법[9-12]으로 평가되고 있으나, HCV RNA의 검출에 적용한 보고는 매우 드물다[13].

저자 등은 HCV RNA의 검출에 RPCR의 유용성을 검토해 보고자, 새로운 시발체를 제작하여 증폭조건을 설정하였으며, 간기능검사에서 양성을 보이고 HCV 감염이 의심되어 검사실에 혈청학적 검사가 의뢰된 혈청을 이용하여 효소면역측정법에 의한 HCV항체검사 및 RT-RPCR에 의한 HCV RNA검출을 시행하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR of HCV RNA

Primer	Position	Sequence (5' to 3')
Outer primer		
HPC 1	51-67	GGAACTGCTTTCACGCA
HPC 4	427-443	AACTCCACCAACGATAC
Inner primer		
HPC 2	136-152	AGCCATAGTGGTCTGAA
HPC 3	377-393	GGCGGTTGGTACGTTTG

재료 및 방법

1. 시발체(primer) 합성

PCR에 이용할 시발체는 HCV-RNA 유전자 중 5'-noncoding 부위에서 외측 및 내측의 두 쌍을 선택한 후 DNA합성기기(Gene Assembler Plus, Pharmacia LKB, Piscataway, USA)를 이용하여 합성하였다. 각 시발체의 위치 및 서열은 Table 1과 같다.

2. 증폭조건의 설정

Table 2와 같이 HCV cDNA, 외측 또는 내측시발체를 포함하는 master mix를 만들어 놓고 다음과 같은 조건으로 PCR을 시행하였다. 즉, 변성은 94℃- 0초로, 결합시간은 0초로 고정하고, 증폭회수는 15, 20, 25, 30회, 결합온도는 45, 50, 55, 60℃, 연장온도는 66, 69, 72, 75℃, 연장시간은 0, 5, 10, 15초로 정하고 서로 조합하여 rapid cycle PCR (RPCR)을 시행한 후 전기영동하여 시험 단계마다 가장 밝고 선명한 띠를 보이는 조건을 선정하였다.

3. HCV RNA 추출

Table 2. Reactant concentrations in master mix for RPCR of HCV cDNA

Component	10x solution	1x reaction	Volume/10 μL
HCV-cDNA			1 μL
Primer (sense & antisense)	5 μM(each)	0.5 μM	1 μL
Premaster mix			8 μL
Taq DNA polymerase in enzyme diluent	5 U/μL	0.4 U/μL	1 μL
Tris, pH 8.3	10 mM	1 mM	
BSA*	2.5 mg/mL	250 μg/mL	
dNTPs	2 mM(each)	200 μM	1 μL
Buffer			1 μL
$MgCl_2$	20 mM	2 mM	
BSA*	2.5 mg/mL	250 μg/mL	
Tris, pH 8.3	500 mM	50 mM	
Ficoll	5%	0.5%	
Tartazine	10 mM	1 mM	
Distilled water			5 μL

*BSA: Bovine serum albumin (total 500 μg/mL)

HCV 감염이 의심되어 혈청학적 검사가 의뢰된 혈청 중 효소면역측정법에 의한 HCV 항체검사를 시행한 58예를 대상으로 하였다. 효소면역측정법에 이용하고 남은 혈청은 즉시 -20℃에 보관하였다가 HCV RNA의 추출시에 사용하였으며, 모든 검체는 무균 캐비닛 내에서 처리하였고 microtiter plate, pipette tip, microcentrifuge tube 등 모든 소모품은 멸균하여 사용하였다. 오염에 의한 위양성을 배제하기 위하여 RNA 추출, cDNA 합성, RPCR 및 전기영동은 서로 다른 방에서 시행하였고, RPCR에 필요한 반응액은 시발체와 cDNA를 제외한 premaster mix용액을 준비하여 사용하였다. 또한 모든 과정은 얼음상자 안에서 시행하였고, 시약 제조에는 DEPC (diethylpyrocarbonate) 처리 증류수를 사용하였다.

HCV RNA 추출과정을 요약하면, 먼저 100 μL의 혈청을 멸균한 Eppendorf tube에 넣고, 400 μL의 차가운 변성용액(25 g of guanidine thiocyanate + 33 mL of citrate-sarcosin-βmercaptoethanol)을 가하여 강하게 흔들어 섞은 후 500 μL의 phenol/chloroform용액을 가하고 65℃에서 30분간 보온하였다가 14,000 rpm에서 5분간 원심시키고 상층액을 분리하여 다른 Eppendorf tube에 넣었다. 여기에 차가운 2 M sodium acetate 300 μL를 가하여 섞고 다시 동량의 차가운 isopropyl alcohol을 넣어 잘 흔들어 섞은 후, -20℃에서 밤새 침전시켰다. 다음 날 4℃에서 9,000 rpm으로 15분간 원심시켜 상층액을 제거하고, 다시 차가운 75% 알코올을 넣고 4℃에서 10,000 rpm으로 15분간 원심한 뒤, 상층액을 제거하고 실온에서 건조시킨 다음 20 μL의 DEPC처리 증류수를 가하여 섞은 후, 즉시 사용하거나 -20℃에 보관하였다가 사용하였다.

4. 역전사에 의한 cDNA합성

cDNA합성을 위하여 역전사에 사용되는 모든 시약은 -20℃의 냉동실에 보관한 것을 사용하였으며, 모든 시약의 혼합과정도 얼음 상자 안에서 시행하였다. 역전사는 준비된 HCV RNA용액 10 μL, 시발체(HPC4, 5 μM) 1 μL, 10 mM dNTPs 1 μL, 100mM DTT, RNAse inhibitor (RNAsin, 120U/μL) 1 μL, Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase (Mo-MLV RT, 200U/μL) 1 μL, 5X buffer (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) 4 μL를 Eppendorf tube에 넣고 잘 혼합한 뒤 37℃에서 15-30분간 보온한 후 2분간 끓여 잔여 역전사 효소를 불활성화 시킨 후 완료하였으며, 이렇게 합성된 cDNA를 PCR에 이용하였다.

5. Rapid cycle PCR(RPCR)

위음성을 배제하고 예민도를 높이기 위하여 nested PCR을 시행하였으며, 반응액은 오염율을 최소화하기 위하여 premaster mix 용액을 만들어 놓았다가 사용하였고, 양성대조에는 알고 있는 HCV RNA 양성 검체를, 음성대조로는 검체를 제외한 나머지 혼합물만을 혼합하여 환자의 검체와 동시에 증폭시켰다.

U형의 microtitration well내에 외측 시발체(HPC1/ HPC4, 0.5 μM) 1 μL, cDNA 용액 1 μL, 그리고 premaster mix 8 μL를 잘 혼합하여 총 10 μL가 되게 한 후, 25 μL의 유리모세관(Idaho Technology, Idaho Falls, USA)에 모세관 현상을 이용하여 넣고 양끝을 Bunsen burner를 이용하여 막은 후, hot air thermocycler (Idaho Technology, Idaho Falls, USA)를 이용한 1차 RPCR을 시행하였다. Nested PCR은 1차 증폭산물 1 μL와 내측 시발체(HPC2/ HPC3, 0.5 μM) 1 μL를 위와 같은 premaster mix 8 μL와 혼합하여 같은 방법으로 시행하였다.

6. PCR 산물의 검출

유리모세관의 양끝을 절단하고 microaspirator (Idaho Technology, Idaho Falls, USA)를 이용하여 유리 모세관 내에 들어있던 nested RPCR 산물 10 μL를 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel (Seakem, FMC, Rockland, USA)의 well내로 조심스럽게 주입하여 전기영동 시킨 후, 자외선 투조기에 올려놓고 육안으로 이동된 증폭산물을 관찰하였다.

결 과

1. 증폭 조건 및 증폭산물의 크기

HCV RNA의 검출을 위한 RT-RPCR의 적합한 증폭조건 및 증폭산물의 크기는 Table 3과 같으며, 전기 영동한 결과는 Fig. 1과 같다.

2. EIA와 RT-RPCR의 검사간 결과 비교

EIA에 양성이면서 RT-RPCR에 양성인 예는 62% (26/42)이었으며, EIA에 음성이면서 RT-RPCR에 음성인 예는 94% (15/16)이었다(Table 4).

고 찰

HCV RNA는 감염된지 1-2주 후부터 혈청에 나타나기 때문에 이를 검출하는 RT-PCR은 HCV 감염의 조기진단뿐아니라 감염능을 평가하고 항바이러스제제에 의한 치료 및 반응을 추적하는데 도움이 된다[14].

PCR에 영향을 미치는 요인은 DNA 및 RNA의 추출방법은 물론이고, 검체의 보관조건, 시발체의 선택, 반응액의 성분, thermocycler의 선택 및 증폭조건, 증폭산물의 검출방법 등 여러 가지가 있으며, 이 중 어느 한 가지라도 충족하지 못하면 결과가 만족스럽지 못하다. 따라서 이를 간편화하기 위한 여러 가지 방법들이 개발되고 있는데, 그 중 대표적인 것으로는 Ravaggi 등

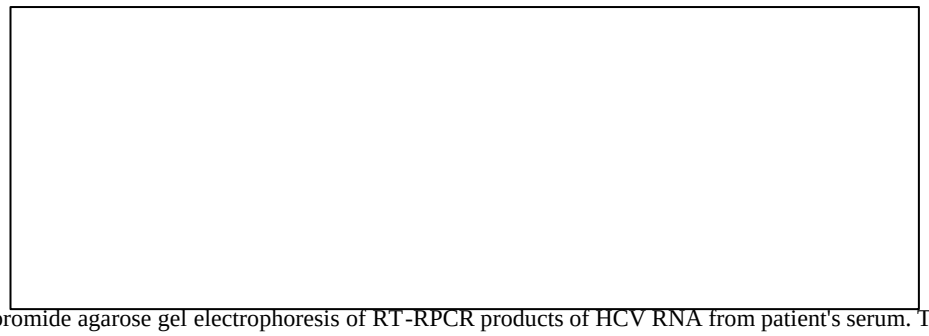

Fig. 1. Ethidium bromide agarose gel electrophoresis of RT-RPCR products of HCV RNA from patient's serum. The 258 base pairs bands are amplified products. Lane 1 and 15 are negative and positive control, respectively, and others are patient's samples. M is marker (BioMarker Low, BioVenture, Murfreesboro, USA) with bands at 1,000, 700, 500, 300, 200, 100, and 50 base pairs.

Table 3. Amplification protocol for RT-RPCR of HCV cDNA

	First amplification	Nested amplification
Primer pairs	HPC 1/4	HPC 2/3
Optimal temperature and time		
Denaturation	94℃ for “0”sec	94℃ for “0”sec
Annealing	55℃ for “0”sec	50℃ for “0”sec
Elongation	72℃ for “0”sec	72℃ for “0”sec
No. of cycles	30 cycles	30 cycles
Band size	393 base pairs	258 base pairs
Consuming time/cycle	30 sec	40 sec
Total amplification time	15 min	20 min

Table 4. Comparison of RT-RPCR with EIA

	EIA	
RT-RPCR	Positive	Negative
Positive (N=27)	26	1
Negative (N=31)	16	15

[15]의 HCV RNA의 추출과정이 생략된 RT-PCR, 그리고 Young 등[16]의 *Thermus thermophilus*를 이용한 single tube RT-PCR, Wittwer 등[5]의 rapid hot air thermocycler를 이용한 rapid cycle PCR 등이다.

HCV는 RNA로서 검체의 처리과정, 검체의 보관조건 및 검체 내의 여러 가지 방해물질 등에 의해서 영향을 받을 수 있으나, 시발체의 선택은 PCR과정에서 가장 중요한 조건 중의 하나이다. 특히 HCV RNA와 같이 유전자가

매우 다양한 경우에는 시발체의 선택에 더욱 신중을 기하여야 하는데, HCV RNA genome의 경우 5' noncoding 부위는 서로 다른 여러 유전자형간에 90%이상의 동질성을 갖는 부위로써 시발체 선택에 가장 많이 이용되며[17-20], 본 연구에서도 이 부위에서 시발체를 선택하였다. PCR의 반응완충액은 증폭 대상 및 조건에 따라 구성 성분의 종류 및 농도가 매우 다양하다. 특히 본 연구에서 사용한 RPCR 반응액은 일반적인 PCR반응액과 여러 면에서 다른데, 그 중 중요한 몇 가지는 유리모세관의 표면에서 중합효소가 변성되는 것을 막기 위하여 우혈청 알부민(bovine serum albumin)이 꼭 필요하고, KCl이나 gelatin은 오히려 증폭산물을 감소시키기 때문에 사용하지 않는다는 것이다. 한편, 증폭산물을 agarose gel에 정확히 loading하고 이동된 산물을 잘 관찰하기 위해서는 반응산물에 형광물질이나 염료를 섞은 후 전기영동을 시행하게 되는데, 본 연구에서는 Ficoll과 tartazine, 그리고 ethidium bromide를 미리 반응액에 혼합시켜 모세관에 넣은 후 동시에 증폭시키고 그 산물을 유리모세관에서 gel에 직접 loading시킴으로써 전기영동시의 불편함을 최소화시켰다[8].

또한 증폭 조건의 설정도 여러 가지 상황에 따라 매우 다양하다. 새로운 시발체를 증폭할 경우에는 증폭조건을 설정해야 하는데, 변성은 94℃가 일반적이며, 결합온도는 시발체의 염기 수나 guanine과 cytosine의 비율, Mg^{2+}의 농도 등에 따라 40-60℃ 사이가 적당하나 시간은 짧을 수록 비특이 반응이 적으며, 연장온도는 70℃ 전후로 증폭산물의 염기 수에 따라 연장시간이 길어지게 된다. Wittwer 등[5]은 열전도체로 공기를 이용하는 hot air thermocycler를 개발하고, 반응용기도 가

느다란 모세관을 이용함으로써 변성 및 결합과정이 적정온도에 도달하는 즉시 이루어지게 하였으며("0"-1초), 연장과정은 증폭산물이 100-500 bp일 경우 1-15초로 단축시킴으로서, 30회를 기준으로 할 때에 15-30분 정도의 빠른 시간 내에 효과적인 증폭이 가능한 rapid cycle PCR (RPCR)을 고안하였는데[6-8], 이는 2-4시간이 소요되는 heat block형에 비해 시간 및 시약의 소모가 훨씬 적어 임상에서 사용하기에 매우 유용한 방법이다. 본 연구에서는 이 방법에 의하여 HCV RNA의 검출을 시행하였는데, 50-100 μL의 반응액이 필요한 기존의 플라스틱 관 대신 10 μL의 반응액으로 충분한 유리모세관을 사용함으로써 각 과정에 머무르는 시간 없이("0"초) 매우 신속하게 PCR 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 이태수 및 이채호[13]는 같은 유리모세관을 이용한 HCV PCR에서 각 과정을 20-30초로 함으로서 본 연구에서보다 훨씬 많은 시간이 소요되었는데, 이는 본 연구에서보다 더 큰 모세관에 더 많은 반응액을 이용하여 PCR을 시행하였기 때문으로 생각된다. 또한 시간이 많이 소요되는 기존의 PCR은 일정시간 후에는 중합효소가 변성되어 증폭회수를 증가시켜도 증폭산물은 더 이상 증가하지 않는 plateau 현상이 나타나지만, 본 RPCR의 경우에는 증폭시간이 짧기 때문에 증폭회수를 2배 정도 증가시켜도 중합효소의 변성 없이 증폭이 가능하다[9].

한편, PCR의 검출예민도를 증대시키기 위하여는 PCR 후 Southern blot을 추가하거나, 외측과 내측의 두 쌍의 시발체를 이용하여 연속적으로 증폭시키는 nested PCR, 또는 여러 쌍의 시발체를 이용하는 multiple PCR을 이용하게 되는데[21], 특히 임상검체에서 미량으로 존재하는 HCV RNA의 검출은 nested PCR을 이용하는 경우가 대부분으로[2-4,17-20] 본 연구에서도 이 방법을 이용하였다.

HCV 감염의 진단방법, 특히 HCV 항체검사와 HCV RNA를 검출하는 RT-PCR의 유용성에 대해서는 많은 보고가 있는데, HCV 항체 양성인 검체에서 HCV RNA의 양성률은 보고자마다 달라, Nakatsuji 등[22]은 비A, 비B형 간염과 연관된 간 질환에서 90%이상의 높은 양성률을 보임으로써 PCR이 간 질환의 진단에 유용하다고 보고하였으며, 다른 보고자들도 이와 유사한 보고를 하고 있으나[23-26], 항체양성인 검체에서 RT-PCR의 양성률이 30%내외로 낮게 보고된 경우도 있다[27-29]. RT-RPCR을 이용하여 HCV RNA를 검출한 본 연구에서는 항체양성 검체에서 62%의 양성률을 보였는데, 이는 본 연구와 같은 방법을 이용한 이태수 및 이채호[13]의 결과와도 유사하다. 이와 같이 항체검사와 PCR의 결과가 다르게 나오는 요인으로는 각각의 검사법에 대한 위양성이나 위음성의 가능성과 함께, 연구대상이나 검사방법 등 외인적인 여건과 검체 자체의 내인적 요인을 고려하여야 하며, 따라서 검체의 채혈부터 보관방법, 시약, 시발체 및 장비의 종류, 검사실의 환경 및 검사자의 숙련도 등 여러 가지 요인에 대한 철저한 대책이 요구되며, 아울러 결과의 객관성을 위해서는 검사방법의 표준화가 이루어져야 한다.

요 약

배 경: C형 간염 바이러스(HCV)를 검출하기 위한 역전사-중합효소연쇄반응법(RT-PCR)은 HCV 감염을 진단하는 방법 중 예민도가 가장 높은 방법으로 알려져 있다. Hot air thermocycler에 의한 rapid cycle PCR (RPCR)은 열전도체로서 hot air를 사용하고, 반응용기는 유리모세관을 이용하기 때문에 기존의 플라스틱 tube를 사용하는 heat block PCR에 비하여 시약 및 시간을 절약할 수 있어 일반적인 임상검사에 이용하기에는 매우 적합한 방법이나, 이를 이용하여 HCV RNA의 검출을 보고한 예는 매우 드물다.

방 법: HCV RNA 유전자의 5' noncoding 부위에서 두 쌍의 시발체를 선정하여 제조한 후 hot air thermocycler의 적합한 증폭조건을 설정하였다. 또한 HCV 감염이 의심되어 효소면역측정법(EIA)에 의한 HCV항체검사를 시행한 58예의 혈청을 이용하여 RT-RPCR에 의한 HCV RNA검출을 시행하였다.

결 과: HCV RNA를 검출하기 위한 nested RPCR의 적절한 증폭조건으로는 변성과정 1, 2차 모두 94℃-"0"초, 결합과정 1차, 55℃-"0"초, 2차, 50℃-"0"초, 연장과정 1, 2차 모두 72℃-"0"초로 각각 30회로 설정하였고, 각 회당 소요시간은 1차 증폭의 경우 30초, 2차 증폭의 경우 40초이내로 nested RPCR에 소요된 시간은 모두 35분이었다. 한편 HCV가 의심되는 58예의 혈청에서 EIA에 양성인 42예 중 RT-RPCR에 양성인 경우는 26예로 62%이었다.

결 론: 이상으로 RT-RPCR법에 의한 혈청 내 HCV RNA의 검출은 기존의 방법에 비하여 매우 신속하고 경제적인 방법으로, 임상 검사실에서 일반적으로 사용하기에 유용한 방법이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Lemon SM and Brown EA. *Hepatitic C virus. In Mandell GL, Bennett JE, et al. eds. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1474-86.*
2. Kremsdorf D, Porchon C, Brechot C. *Hepatitis C virus (HCV)-RNA in non-A, non-B chronic hepatitis in France - Nucleotide sequence of a French HCV isolate. J Hepatol 1991;13:S24-32.*
3. Schlauder GG, Veverenz GJ, Mattson L, Weiland O, Mushawar IK. *Detection of hepatitis C viral RNA by the polymerase chain reaction in serum of patients with*

post-transfusion non-A, non-B hepatitis. J Virol Methods 1992;37:189-200.

4. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Smit JW, Jett B, et al. *A long term study of hepatitis C virus replication in Non-A, non-B hepatitis. N Eng J Med 1991;325:98-104.*
5. Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. *Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. Nucleic Acids Res 1989;17:4353-7.*
6. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. *Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Anal Biochem 1990;186:28- 31.*
7. Wittwer CT, Garling DJ. *Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. Biotechniques 1991; 10:76-83.*
8. Wittwer CT. *Buffers and reaction components for rapid cycling. Rapid cyclist 1992;1:6-8.*
9. Tan SS, Weis JH. *Development of a sensitive reverse transcriptase PCR assay, RT-RPCR, utilizing rapid cycle times. PCR Methods Appl 1992;2:137-43.*
10. **최삼임, 이혜수, 강명재. 중합효소연쇄반응과 바이러스 배양법을 이용한** Cytomegalovirus **검출의 비교연구. 대한임상병리학회지** *1993;13:607-16.*
11. **이혜수 및** Wittwer CT. **중합효소 연쇄반응에 의한** B**형 간염바이러스의 검출에 관한 연구. 대한임상병리학회지** *1993;13:617-23.*
12. **현정애, 전효진, 김재룡, 전동석, 이원길, 은상진 등. 모세관 중합효소연쇄반응에 의한 결핵균 검출. 대한임상병리학회지** *1995;15:250-63.*
13. **이태수 및 이채훈. 유리모세관을 이용한** HCV**역전사 중합효소연쇄반응. 임상병리와 정도관리** *1995; 17:205-11.*
14. Zonaro A, Puoti M, Fiordalisi G, Mantero G, Castelnuovo F, Primi D, et al. *Detection of serum hepatitis C virus RNA in acute non-A, non-B hepatitis. J Infect Dis 1991;163:923-4.*
15. Ravaggi A, Primi D, Cariani E. *Direct PCR amplification of HCV RNA from human serum. PCR Methods Appl 1992;1:291-2.*
16. Young KK, Resnick RM, Myers TW. *Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol 1993;31:882-6.*
17. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, et al. *Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. Jpn J Exp Med 1990;60:215-22.*
18. Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, Kato N, Ohto M. *Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: A sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA. Hepatology 1992;15:777-81.*
19. Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. *Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. Lancet 1990;336:878-9.*
20. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. *Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. Proc Natl Acad Sci USA 89;1992;189-91.*
21. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, et al. *Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and respond to interferon -* α *therapy: Relationship to genotype of hepatitis C virus. Hepatology 1992;16:293-9.*
22. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K. *Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: First-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. Hepatology 1992;16:300-5.*
23. van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Nello R, et al. *Confirmation of hepatitis C virus infection by new four antigen recombinant immunoblot assay. Lancet 1991;337:317-9.*
24. Zhang HY, Kuramoto IK, Mamish D, Sazama K, Holland PV, Zeldis JB. *Hepatitis C virus in blood samples from volunteer donors. J Clin Microbiol 1993; 31:606-9.*
25. **김대원, 권석운, 지현숙, 김인수.** C**형 간염 항체검출을 위한 제** 3**세대 효소면역측정법과 확인검사의 평가. 대한수혈학회지** *1994;5:115-26.*
26. **김종규, 성언문, 송경은, 이원길, 김재식.** C**형 간염 바이러스성 간염 진단에 있어서 효소면역측정법과 역전사-중합효소 연쇄반응간의 성적비교 및 연령별 분포. 대한임상병리학회지** *1995;15:139-45.*
27. **이미경, 박애자.** C**형 간염바이러스 감염 진단을 위한** RT-PCR**과** ELISA**법의 비교. 대한임상병리학회지** *1995;15:295-302.*
28. **박숙자, 이은정, 전정희, 전성숙, 김형. 임산부의** C **형 간염 항체 양성율과** PCR**법을 이용한** HCV **검출결과. 대한임상병리학회지** *1995;15:487-94.*
29. **은상진, 서장수, 김종규, 이원길, 김재식, 송달효 등. 한국인 헌혈자에서** EIA, **확인검사 및** RT-PCR**을 이용한** C**형 간염 양성률 비교. 대한수혈학회지** *1994; 5:9-15.*