

博士學位論文

5'-UTR 염기서열 분석에 의한 제주주민의
C형 간염 바이러스 (Hepatitis C Virus: HCV)

유전자형에 대한 연구

A Study on Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes
Occurred in Jeju Residents by Analysis of
5'-UTR Base Sequences



濟州大學校 大學院

生物學科

閔 丙 海

2002年 7月

5'-UTR 염기서열 분석에 의한 제주주민의
C형 간염 바이러스 (Hepatitis C Virus: HCV)
유전자형에 대한 연구

指導教授 吳 德 鐵

閔 丙 海

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함



2002 年 月

閔丙海의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	_____	印
委 員	_____	印
委 員	_____	印
委 員	_____	印
委 員	_____	印

濟州大學校 大學院

2002年 月

A Study on Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes Occurred in Jeju Residents by Analysis of 5'-UTR Base Sequences

Byung-Hae Min
(Supervised by professor Duck-Chul Oh)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY
2002. 7.

Abstract

A Study on Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes Occurred in Jeju Residents by Analysis of 5'-UTR Base Sequences

In this study one-tube RT-PCR technique was applied to detection of HCV RNA, and the data were comparatively analyzed with those obtained through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analysis of RT-PCR for a total of 81 samples identified as HCV positives by ELISA test revealed that only 54 samples (approx. 66.7%) were identified as HCV positive, suggesting high rate of inconsistency between ELISA and RT-PCR results. In order to determine HCV genotypes by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique, 54 cDNA products of HCV 5'-untranslated region obtained through RT-PCR were digested using 4 different restriction enzymes (*Bst*UI, *Hae*III, *Nci*I, *Rsa*I), revealing that HCV subtypes from Jeju were 1b (50.0 %), 2a (42.6 %), 1a (5.6 %), and 2b (1.8 %).

Sequence analyses of 54 HCV RNAs samples used for PCR-RFLP revealed that HCV genotypes were divided into 9 groups using the Lasergene MegAlign, each designated as G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, and G9. G1 and G2 demonstrated significant homology in RNA sequences with 1b subtypes of HCV; G3, G4, and G5, 1a subtypes; G6, G7, and G8, 2a subtypes; G9, 2b subtype. G1 and G2 (putative 1b subtypes of HCV)

were the groups containing most abundant clones, each occupying approx 26% and 24 % of total clones analyzed, respectively. Each clone of G3, G4, and G5 (putative 1a subtypes) occurred in the frequency of 1.8 %, respectively. G6, G7, and G8 (putative 2a subtypes) occurred in the frequency of 9.2 %, 18.5 %, and 14.8 %. And, approx 1.8% clone was placed into G9 (putative 2b subtype). These results were consistent with data obtained through RFLP analysis of the PCR products of HCV 5'-UTR region. However, some clones from Jeju demonstrated high divergence in the RNA sequences of 5'-UTR region. For G3, G4, and G5 that were placed into 1a subtypes, clones JHCV10 (G4) and JHCV48 (G5) shared 100 % identity in RNA sequences with H90 and H77 of HCV 1a subtypes, respectively. However, clone JHCV24 (G3) was found to have the substituted sequences in some locations of 5'-UTR, even though it shared extensive homology with the subtype, HCV-1 of HCV 1a. Substitution of some sequences were also observed in most abundant groups, G1 and G2 that were closest in RNA sequences to FR21 and HCV-J of 1b subtypes, suggesting some HCVs from Jeju have unique genotypes with high reliability and confidence in that all clones consisting G1 or G2 showed 100% identity in their RNA sequences. For G6, G7, and G8 that were assumed 2a subtypes, all the clones in G8 shared 100% similarity with E-B9 of HCV 2a subtype, whereas substitutions of some bases were observed in G6 and G7. Besides, clone JHCV19 in G9 that was a putative HCV 2b subtype was found to have different RNA sequences from known 2b subtype sequences. These results suggested that some HCV subtypes cannot be distinguished by RFLP, warranting sequence analysis for identification of a specific subtype of HCV.

In conclusion, sequence analysis of HCV 5'-UTR region in this study revealed that 9 groups of HCV from Jeju were divided into 4 subtypes (1a, 1b, 2a, 2b), of which HCV genotypes closest to 1b and 2a subtypes were most abundant. Some clones from each subtype were found to have unique RNA sequences that have never been found, suggesting the importance of sequence analysis for detection of a specific HCV.



목 차

Abstract	i
List of Tables	vi
List of Figures	vii
List of Abbreviations	ix
I. 서 론	1
1. 연구배경	1
2. 연구 목적	4
II. 재료 및 방법	9
1. 공시혈청	9
2. Primer의 선정 및 합성	9
3. HCV RNA의 추출	11
4. One-tube RT1차 PCR	11
5. 2차 PCR 및 전기영동	12
6. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법	12
7. RFLP를 위한 RT-PCR	13
8. 제한 효소의 선택 및 처리	14
9. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	14
10. PCR 산물의 염기서열 분석	15
III. 결 과	16
1. ELISA에 의한 anti-HCV 항체의 검출	16

2. RT-PCR에 의한 HCV RNA의 검출	16
3. RT-PCR과 ELISA의 비교	16
4. HCV 5'-UTR 염기서열의 분석	19
5. PCR-RFLP법에 의한 HCV 유전자형의 분석	19
6. 제주지역의 HCV 1a, 1b, 2a, 2b 염기서열의 확인	33
7. 제주 지역의 HCV 유전자형 분포	33
 IV. 고찰	 35
 요약	 54
 참고문헌	 56



List of Tables

Table 1. Sequence of PCR primers for detection of HCV-RNA by one-tube RT-PCR	10
Table 2. Comparison of HCV RNA by one-tube RT-PCR and anti-HCV by ELISA	18
Table 3. Sources and references of HCV 5'-UTR sequence used in this study	20
Table 4. DNA fragment sizes for HCV genotyping by restriction enzymes	26
Table 5. Comparative analysis of Hepatitis C virus (HCV) types identified over the world	37
Table 6. Distribution of HCV genotypes in 16 countries	39
Table 7. Four Restriction enzymes for HCV genotyping	42
Table 8. Distribution of HCV genotypes from Jeju residents based on PCR-RFLP	43

List of Figures

Figure 1. HCV genome organization	7
Figure 2. Amplified 5'-UTR region of HCV RNA by one-tube RT-PCR	17
Figure 3. Polymorphic region of HCV 5'-UTR for HCV genotyping	21
Figure 4. Restriction maps predicted from 5'-UTR for HCV genotyping	25
Figure 5. Amplified 5'-UTR region of HCV RNAs for HCV genotyping	27
Figure 6. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which were assumed subtype 1a	29
Figure 7. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which were assumed subtype 1b (JHCV 7)	30
Figure 8. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which were assumed subtype 2a	31
Figure 9. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which was assumed subtype 2b (JHCV19)	32
Figure 10. Divergence of the HCV clones originated from Jeju based on RNA sequence of 5'-UTR region of HCV genes	34
Figure 11. Dendrogram showing the phylogenetic relationship of HCVs from Jeju based on RNA sequences of 5'-UTR region	45
Figure 12. Comparative analysis of 5'-UTR region of HCV genes from Jeju and other areas	46
Figure 13. Phylogenetic tree(a) and multialignment(b) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 1a subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region. Number on the scale bar indicate the number of base substitutions.	47

Figure 14. Phylogenetic tree(a) and multialignment(b) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 1b subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region..	48
Figure 15. Phylogenetic tree(a) and multialignment(b) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 2a subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region.	49
Figure 16. Phylogenetic tree(a) and multialignment(b) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 2b subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region.	50
Figure 17. Comparative analysis of restriction enzyme maps of hepatitis C viruses obtained from Jeju residents which are assumed 1a or 1b subtypes	52
Figure 18. Comparative analysis of restriction enzyme maps of hepatitis C viruses obtained from Jeju residents which are assumed 2a or 2b subtypes	53

List of Abbreviations

ALT	;	Alanine aminotransferase
AMV	;	Avian myeloblastosis virus
bp	;	Base pair
cDNA	;	Complementary DNA
DEPC	;	Diethyl pyrocarbonate
DNA	;	Deoxyribonucleic acid
dNTP	;	Deoxyribonucleoside triphosphate
IFN- α	;	Interferon- α
ELISA	;	Enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	;	Ethidium bromide
HAV	;	Hepatitis A virus
HBV	;	Hepatitis B virus
HCC	;	Hepatocellular carcinoma
HCV	;	Hepatitis C virus
HDV	;	Hepatitis D virus
HEV	;	Hepatitis E virus
HGV	;	Hepatitis G virus
IRES	;	Internal ribosomal entry site
NANB	;	Non-A, non-B
ORF	;	Open reading frame
PAGE	;	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	;	Polymerase chain reaction

RFLP	;	Restriction fragment length polymorphism
RNA	;	Ribonucleic acid
RNasin	;	Ribonuclease inhibitor
RT	;	Reverse transcription
TBE	;	Tris-borate
UTR	;	Untranslated region
UV	;	Ultraviolet



I. 서 론

1. 연 구 배 경

한국인의 질병 부담률을 보면 청년과 중장년층에서는 만성간염이 가장 큰 요인으로 작용하고 있으며 진단과 치료에 소요되는 비용이 연간 약 1조원에 달하고 있다. 만성간염이란 피로, 오심, 식욕부진, 황달 등의 증상이 6개월 이상 계속되는 전반적인 간의 염증상태를 말하는데 원인에 따라 바이러스성 간염, 알콜성 간염 중독성 간염으로 나누는데 이중 한국에서는 C형과 B형 간염 바이러스에 의한 만성간염이 흔하다.

사람의 간염 바이러스는 B형(Hepatitis B virus: HBV)이 처음 발견(Blumberg 등, 1965)되었으며, A형(Hepatitis A virus: HAV) (Feinstone 등, 1973), D형(Hepatitis D virus: HDV) (Rizzetto 등, 1977), C형(Hepatitis C virus: HCV) (Choo 등, 1989), E형(Hepatitis E virus: HEV) (Tam 등, 1991) 그리고 최근의 G형(Hepatitis G virus: HGV) (Linnen 등, 1996)이 차례로 발견되었다. 이중 HAV와 HEV는 급성 간염만을 일으키지만 HBV, HCV, HDV, 및 HGV는 급성 및 만성 간염을 일으키는 것으로 보고되어 있다 (Desmet 등, 1994). 그리고 HBV와 HCV에 의한 만성간염은 간경변으로 발전되고 이어서 간암으로의 진행을 유발시키는 것으로 나타나 있다 (Di Bisceglie 등, 1994).

C형 간염 바이러스(HCV)는 급성간염에서 만성간염, 간경변 및 간암으로 진행되는 심각한 질병을 일으키는 요인이며 (Choo 등, 1990) 주로 수혈과 체액 및 불분명한 감염 경로에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다 (Saito 등, 1990). HCV는 편중된 감염분포를 보이는 HBV와는 달리 미국, 유럽, 일본등 선진국을 포함한 전세계에 널리 분포되어 있으며 실제로 미국에서는 HCV가 간이식 수술의 가장 큰 직접적인 원인이며, 해마다 5만명의 새로운 감염환자가 보고되고 있으며 전 세계적으로 약 4억명이 감염되어있다(Sherlock 등, 1992; Di

Bisceglie 등, 1994). 일본에서는 HCV가 모든 전염병 중 가장 심각한 병원체로 인식되어 국가적 연구 노력이 집중되고 있다. 한국에서는 전 인구의 1.6%인 약 80만 명이 HCV에 감염되어 있으며 (Park 등, 1995) 이들 중 대다수가 급만성 간염의 증상과 간경변이나 간암까지 진행되는 경우도 적지 않아 그 중 17%인 14만 명 정도가 사망에 이르고 있는 것으로 보고되어 있다. (Lee 등, 1993).

이러한 배경으로 HCV치료제 및 백신은 유전공학 및 제약계에서 중요한 과제로 대두되고 있다. 만성 간염 후에는 증상의 강약과는 무관하게 20-30%가 간경변으로 발전하게 되며 (Di Bisceglie 등, 1991) 간경변이 진행되면 보통 간암으로 발전하게 되는데 일본과 남부 유럽에서는 간암환자의 50-75%가 HCV에 의하여 발생된 것으로 보고되었으며 (Abacioglu 등, 1995; Alter 등, 1989; Nishioka 등, 1991), 한국에서도 간암 환자의 15% 내외가 HCV에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다 (Lee 등, 1993; Park 등, 1995).

간암 (간세포암; hepatocellular carcinoma; HCC) 발생은 바이러스에 의한 원인이 가장 높으며, 이밖에 aflatoxin B1에 감염된 음식물의 섭취, 알코올의 남용, 유전적 요인 등을 들 수 있다 (Bressac 등, 1991; Simonetti 등, 1991). 만성간염 환자의 간에서 염증 유발과 회복의 단계가 반복되는 동안 간 세포 생성의 단계에서 유전자에 이상이 발생하여 정상적인 세포가 생성되지 못하고 간암으로 진행되는 것으로 추정하고 있다 (Di Bisceglie 등, 1994).

감염경로는 일반적으로 혈액이 주 감염원이며 체액으로도 감염되는 것으로 보고되고 있다 (Alter 등, 1982). HCV의 스크리닝 검사가 개발된 1990년 이전에는 전체 감염자의 90% 이상이 수혈에 의해 감염되었다고 보고되었으나 현재는 수혈에 의한 감염률이 5% 정도로 낮아졌다 (Shakil 등, 1995). 그리고 드물게 임신 중인 산모로부터 태아에게 전염되기도 하나 이러한 수직 감염률은 10% 이하로 추정되며, 주사기나 성관계에 의해 전염되나, 아직도 감염자의 반수 정도의 감염경로가 불분명하여 감염의 위험은 계속 남아있다 (Houghton

등, 1991).

잠복기는 평균 7 주 (3-20 주)이며 일단 감염이 된 후 혈청내 HCV RNA는 1-3 주 사이에 측정이 가능하며 이때 바이러스의 양은 10^6 - 10^8 copy/mL까지 올라간다. 일반적으로 7 주를 전 후하여 (2-20주) 혈청내 ALT의 수치가 증가하고 감염 증상이 나타나며 대부분의 HCV 감염 환자가 간세포의 손상을 받게된다고 한다 (Farci 등, 1991). 만성 감염으로 전환된 후에는 급성 감염의 증상은 사라지지만 혈청 내 ALT는 상승하며 이때 혈액내의 HCV RNA도 측정 가능하다 (Zanetti 등, 1990).

항 바이러스제인 인터페론-알파 (interferon- α ; IFN- α)를 일반적인 치료제로 사용하고 있는데, 치료 효과로서 혈청내 ALT의 수치가 정상화되고 HCV RNA도 소실이 되기는 한다 (Ko 등, 2001). 하지만 치료를 중단하면 대부분의 환자에서 염증이 재발되고, 25% 정도만이 치료 후에도 정상적인 ALT 수치를 보여 주고 있다 (Chayama 등, 1991). 그럼에도 불구하고 IFN- α 는 매우 고가여서 환자들이 충분히 사용할 수 없으며 반면에 환자에 대한 부작용 또한 커서 이중 삼중으로 치료에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 치료 효과가 비교적 높은 경우로는 HCV 유전자형이 2와 3형일 때 양호하며, 아직 간경변으로 발전하지 않았을 때로 보고되고 있으나, 이에 관하여 아직까지 정확한 기전은 확인되지 않고 있다 (Ballardini 등, 1997; Hino 등, 1994). 백신 개발은 HCV의 가장 큰 특징인 유전적 변이 때문에 현재의 기술로는 거의 불가능하다 (Kuo 등, 1989; Ogata 등, 1991).

2. 연구 목적

일반적으로 간염의 원인 바이러스를 진단하는 검사법으로는 항원 검사와 항체검사로 나눌 수 있다. 간염 바이러스가 간세포 내에서 증식하는 과정에서 생성되는 바이러스를 직접 확인하는 항원 검사와, 바이러스 단백질이 항원으로 작용 우리 몸에서 반응하여 만들어진 항체를 검출하는 방법이 있다 (Alter 등, 1989).

처음 상업적으로 개발된 HCV ELISA 법은 NS4 region의 c100-3 (human superoxide dismutase recombinant protein)을 이용하여 환자의 혈청 내에 존재하는 항체를 진단하는 것이었다. 이 방법은 1990년 캐나다에서 처음 수혈자를 감별하는 데 사용되었는데 수혈을 통한 감염의 예방에 매우 효과적인 것으로 판명되었다. 그 후 민감도가 더욱 높아진 2세대 방법이 등장했는데 core region (c22-3)과 NS3와 NS4의 유전자 재조합 단백질 (c200)이 사용되었다. Core와 NS3의 사용으로 민감도가 현저하게 증가하였고 항체를 진단할 수 없는 잠복기에는 검출률이 낮아지지만 여전히 특이성은 높아지지 못했다. 현재는 NS5 region을 첨가하는 제3세대 ELISA가 높은 민감도와 특이성을 나타내어 널리 사용되고 있다. 제3세대 ELISA 검사가 개발됨에 따라 간염 환자의 screening test에서는 높은 민감도와 정확도를 나타내고 있으나 아직까지도 혈액 공여자 등의 저 위험 군에 대하여는 적당한 검사방법을 찾지 못하고 있으며 여전히 상대적으로 높은 간질환 환자율이 앓고 있는 고 감마 글로블린 혈증과 같은 위양성인 경우 확증을 위한 부가적인 시험이 꼭 필요하다. 1998년부터 유럽에서 널리 사용되고 있는 확증 시험방법으로는 RIBA-3 (Chiron사, U.S.A.)가 있다. 이것은 c100, c-22에서의 합성 펩타이드와 유전자 재조합 단백질인 c33c와 NS5를 이용한 것으로 전체 검체에서 intermediate의 검체비율을 6.7%에서 0.5%로 줄일 만큼 우수한 방법이다 (Urdea 등, 1997). 또한 Chiron사에서는 type specific epitopes를 구별할 수 있는 serotyping assay kit

를 개발하였는데 이것은 NS4에 대하여 5개의 합성 펩타이드와 core에 대하여 3개의 합성 펩타이드를 사용하여 HCV 유전자형 1, 2 와 3을 구별할 수 있게 고안된 것이다 (Dixit 등, 1995; Keeffe 등, 1999). 이와 같이 HCV 항체를 진단하는 방법에 수많은 진보가 이루어 졌지만 여전히 저 위험군에서 intermediates로 구분되는 검체가 상당량 존재하고 있다. 그러므로 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 HCV RNA 항원 자체를 진단하는 좀 더 우수한 방법을 개발하는 것이 무엇보다 필요한 상황이다.

환자의 혈청으로부터 RT-PCR에 의하여 직접 HCV RNA를 검출하는 방법을 사용할 수 있다 (Garson 등, 1990a). 이것은 HCV의 감염여부를 조기에 진단할 수 있고, 불확실한 검체에 대한 확진시험과 interferon 치료 경과를 검색하는 데 매우 중요한 방법으로 등장했다 (Houghton 등, 1991; Garson 등, 1990b; Kaneko 등, 1990). 그리고 ELISA 진단에서 여전히 높은 위양성 비율의 한계를 극복하는 등 그 효용성이 입증되어 점차로 관심이 높아지고 있다 (Choi 등, 1994). 전 세계적으로 직접 HCV RNA를 검출하고자 여러 가지 방법들이 고안되어 사용되고 있지만 유럽에서도 16%만이 표준화된 panel를 보유하고 있는 실정이며, 실험실마다 표준화된 방법의 설정이 부족한 상태이다. HCV를 직접 검출하기 위한 작업을 할 때는 특히 주의할 점이 많이 있다. 즉 감염된 검체를 다루는 방법, 혈청의 보관조건, primer선정, 반응조건과 오염 등에 의하여 각기 다양한 PCR의 결과가 보고되고 있다. 그럼에도 불구하고 HCV RNA의 검출 그 자체는 임상적 중요성이 입증되어지고 있으며 민감도가 매우 높은 것으로 (< 100 copy/mL) 보고되어 있다 (Damen 등, 1999). 1995년부터 Roche Molecular Diagnostics사에서는 RT-PCR 방법을 이용한 amplicor test kit를 개발하여 판매할 정도로 널리 사용되고 있지만 몇가지 문제점도 함께 보고되고 있다 (Nolte 등, 1995). 일반적으로 RT-PCR test kit를 사용하는 방법은 재현성이 높고 민감도와 특이성이 있는 것으로 나타나 있지만 그 객관적인 평가는 아직 속단할 수 없으며, 전문적이고 고유한 HCV 연구

실의 결과보다는 민감도가 낮은 것으로 보고 된 바도 있다 (Nolte 등, 1995). 그러므로 현 시점에서는 방법의 우수성은 인정되지만 수많은 변수들을 해결해야 하는 문제를 안고 있다.

HCV는 1989년 처음으로 Choo 등에 의해 침팬지의 혈장에서 얻은 non-A, non-B (NANB) 형 감염의 바이러스로부터 밝혀졌는데, 크기는 50 nm 정도이다 (Shimizu 등, 1996). 이 바이러스는 유전자의 구조와 특성으로 볼 때 flavivirus와 가장 가까운 성질을 지니고 있으며 pestivirus의 유전자와 유사한 부분도 가지고 있어, 현재는 Flaviviridae로 분류하고 있으며 hepacivirus로도 나타내고 있다 (Miller 등, 1990; Weiner 등, 1991a).

HCV RNA는 core, nucleocapsid, 및 envelope glycoprotein과 같은 3개의 구조 단백질과 helicase, viral protease, RNA-dependent RNA polymerase, transcriptase, 및 regulatory peptide 같은 6개의 비구조 단백질을 생성하는 하나의 open reading frame (ORF)으로 이루어져 있으며(Kato 등, 1990; Chou 등, 1991) 이것은 전체가 하나의 단백질로 합성된 후에 숙주와 바이러스의 단백질 분해효소 (protease) 등에 의해 기능 단백질로 분절된다. ORF의 양쪽 끝에는 단백질을 코딩하고 있지 않은 5'-untranslated region (5'UTR)과 3'UTR이 존재하는데 (Han 등, 1991), 5'UTR은 약 340 bp로 HCV genome에서 가장 보존이 잘 되어 있는 부위로서 stem-loop 구조로 되어 있으며 internal ribosomal entry site (IRES)를 지니고 있고 (Tsukiyama-Kohara 등, 1992), 3'-UTR도 2차 구조로 형성될 것으로 추측된다. ORF에서 가장 보존이 잘 되어 있는 부위는 capsid 부위이며 많은 다형성을 보이는 부위는 envelope 부위인데, 이중에서 E2 유전자의 90 bp 는 매우 높은 다형성을 나타내고 있다 (Kuma 등, 1993) (Figure1). 이로 인하여 HCV의 가장 중요한 특성인 높은 유전자 다형성을 보이고 있는데, 현재까지 크게 6가지의 형으로 분류하고 이에 따른 아형도 50여 개 이상 발견되고 있다 (Choo 등, 1991; Simmonds 등, 1993a). HCV는 수많은 유전적 변이를 일으킬 수 있고 그에 따른 유전적 이

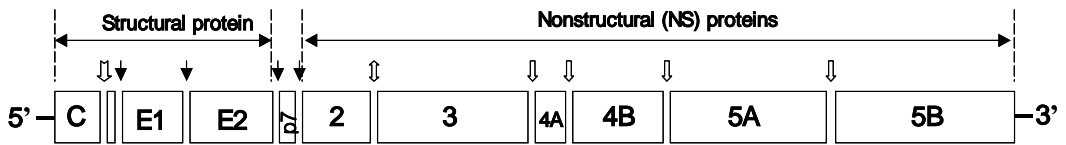


Figure 1. HCV genome organization. A schematic representation of the HCV genome indicating the positions of the structural and the nonstructural proteins within the polyprotein as well as the 5' and 3'-UTRs (thick lines). The polyprotein cleavage products are marked as arrows. Cleavage sites for host cell signalases (\downarrow), the NS2-3 proteinase (\Uparrow), the NS3 proteinase (\Downarrow) and an unknown cellular proteinase (\Uparrow) are marked. C is core or nucleocapsid protein. E1 and E2 are envelope proteins that are highly glycosylated type 1 transmembrane proteins. E2 was also known to interact with the interferon (IFN)-induced double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. Protein p7 is a highly hydrophobic polypeptide of unknown function. Most of the nonstructural (NS) protein 2-5B are required for replication of the viral RNA. NS2 and the amino-terminal domain of NS3 constitute the NS2-3 proteinase, catalyzing cleavage at the NS2/3 site. NS3 is a bifunctional molecule carrying a serine-type proteinase responsible for cleavage at the NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A and NS5A/B sites, and in the carboxy-terminal remainder, NTP/helicase activities essential for translation and replication of the HCV genome. NS4A is an essential cofactor of the NS3 proteinase and is required for efficient polyprotein processing. The function of hydrophobic NS4B is so far unknown. NS5A is a highly phosphorylated protein, and the level of phosphorylation is influenced by NS4A via direct interaction with NS5A. NS5B is the RNA-dependent RNA polymerase (Bartenschlager *et al.*, 2000).

질성이 존재하는 바이러스로 최소한 6개의 유전자형과 수많은 아형들이 존재하고 있다. 이러한 HCV 유전자형을 검사하고 결정하는 이유는 인터페론의 치료에 따른 효과가 유전자형에 의하여 다르게 나타나는 것으로 보고되어 있어 매우 중요한 방법으로 인식되어지고 있기 때문이다 (Zein 등, 2000). 1998년부터 Innogenetics사에서 6가지 유전자형을 결정할 수 있는 LiPA HCV assay kit를 판매하고 있으나 다른 PCR 방법과 마찬가지로 표준화 되어있지 않았고 효용성이 아직 검증되어 있지 않은 상태이다. 판매되고 있는 kit를 사용하는 방법은 비교적 간단하지만 실험실내에서 오차가 생기기 쉽고 제한된 primer의 사용으로 정확한 검사를 하기는 매우 어려운 실정이다. 그러므로 HCV 유전자 검사는 널리 사용되기에는 시기상조라 할 수 있고 보완되고 개발되어야 할 많은 문제점을 안고있는 것이 현실이다.

이러한 여러 가지 문제점을 극복하기 위하여, 본 연구에서는 HCV RNA를 측정하는 데 기존의 RT-PCR법을 개선한 one-tube RT-PCR법을 이용하였으며 이 방법을 응용한 HCV 유전자형 분석법을 이용하여 HCV 감염자의 혈액 내에 존재하는 바이러스 유전자형을 분석함으로써, HCV의 조기 진단은 물론 항바이러스제의 치료 효과와 감염 경로 등을 판단하고 백신 개발에 유용하게 활용할 수 있는 기초자료를 제공하고자 다음과 같은 연구를 수행하였다.

첫째, 혈액 내에서 HCV RNA를 측정하기 위해 하나의 PCR 튜브 내에서 간단하게 RT-PCR을 시행하는 one-tube RT-PCR법을 사용하였고, 이를 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 법과 비교 분석하였다.

둘째, HCV는 매우 많은 유전자 변이를 가지고 있어 국가와 인종마다 이들 유전자형의 분포가 다르므로 HCV 유전자형을 분석하는 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 법을 사용하여 제주 지역에서 HCV 유전자형의 분포를 분석하였으며 정확성을 확인하기 위하여 direct-sequencing 방법을 사용하여 염기서열을 분석하였다.

II. 재 료 및 방 법

1. 공 시 혈 청

1999년 1월부터 2001년 12월까지 약 3년간 제주도내 지역의 종합병원에 내원한 HCV의 감염이 의심된 사람 중에서 anti-HCV ELISA법에서 양성으로 확인된 81명의 혈청을 대상으로 하였다. PCR을 하는 데 오염을 방지하기 위해 멸균된 진공 튜브를 사용하였으며, 5 mL의 혈액을 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층으로 분리된 혈청을 -70°C 에서 보관하여 사용하였다.

2. Primer의 선정 및 합성

One-tube RT-PCR과 PCR-RFLP법에 사용한 primer는 HCV-1 (GenBank accession number M62321), HCV-J (D90208), HC-J6 (D00944)와 HC-J8 (D01221)의 염기서열을 이용하여 Okamoto 등 (1990b)이 발표한 것을 참조하여 5'UTR에서 선택하였으며, Hitachi 소프트웨어사 (Japan)의 DNAsis 프로그램을 이용하여 분석하고, 이를 다시 BLAST로 분석하여 HCV만을 증폭할 수 있는 primer의 적합성 여부를 확인하였다 (Table 1).

Primer 합성은 MWG(Germany)사에 의뢰 합성하여 사용하였다. 합성된 primer는 100 pmol의 농도로 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 녹여서 사용할 때까지 -20°C 에 보관하였다.

Table 1. Sequence of PCR primers for detection of HCV-RNA by one-tube RT-PCR

Primer name	Sequence (5' → 3')	%GC	TM(°C)
Outer sense	CTGTG AGGAA CTA CTACT GTCTT	45.0	50.0
Outer antisense	ACTCG CAAGC ACCCT ATCAG G	57.1	50.0
Inner sense	TTCAC GCAGA AAGCG TCTAG	52.2	56.1
Inner antisense	TATCA GGCAG TACCA CAAGG	60.3	54.9

The primers used in this study were designed based on the conserved sequences 5'- untranslated region (UTR) of HCVs, and synthesized in MWG(Germany).

3. HCV RNA의 추출

HCV RNA는 RNA STAT (Tel-Test Inc., Friendswood, TX, USA)를 사용하여 추출하였다. 혈청 150 μ L를 RNA STAT 750 μ L와 잘 혼합한 후 chloroform 150 μ L를 넣어 실온에서 5분간 반응시켰다. 이것을 4°C에서 15분간 13,000 rpm으로 원심분리하고 상정액 500 μ L를 튜브에 옮긴 후 isopropanol 375 μ L를 넣고 잘 혼합하였다. 이를 4°C에서 30분간 방치시키고 나서 4°C에서 10분간 13,000rpm으로 원심분리하였다. 상정액을 버리고 침전되어 있는 RNA를 75% 에탄올 1 mL로 세척한 후 DEPC로 처리된 증류수 30 μ L에 녹여서 PCR에 사용하였다.

4. One-tube RT1차 PCR

추출한 HCV RNA 5 μ L를 0.5 mL PCR tube에 넣고, 이것에 1X RT-PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT), 0.2 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10 pmol의 외측 primer와 15 unit의 RNasin, 3 unit의 AMV reverse transcriptase, 0.5 unit의 *Taq* DNA polymerase (Promega, U.S.A)를 넣어 반응액의 총량을 30 μ L로 되게 하였다. one-tube RT-PCR의 조건은 42°C에서 45분간 cDNA를 합성하게 하고 95°C에서 5분간 가열하여 AMV reverse transcriptase를 불활성화시켰다. 이것을 바로 94°C에서 1분간 변성반응, 52°C에서 1분간 결합반응, 72°C에서 1분간 중합반응을 1단계로 하여 30회 실시하였으며 맨 마지막 단계는 72°C에서 5분간 연장 시간을 주어 DNA가 충분히 증폭되도록 하였다. 이 모든 과정은 GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)에서 연속적으로 수행하였다.

5. 2차 PCR 및 전기영동

2차 PCR은 1차 PCR의 산물 2 μL 를 주형으로 내측 primer를 사용하여 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1단계로 하여 25회 반복하였다. 2차 PCR이 끝난 산물 5 μL 에 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll 400)를 넣고 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide (EtBr)가 함유된 2% agarose gel에서 100 volt로 30분 동안 전기영동한 후 UV transilluminator(UVP, U.S.A.)에서 특정 밴드를 확인하였다. 전기영동의 결과는 UV transilluminator가 부착된 화상분석기 (Image analyzer; Vilber Lourmat, France)에서 PCR 밴드를 확인하였다.

6. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법

HCV 항체 검사는 녹십자 (한국)의 anti-HCV ELISA 3.0 kit를 이용하여 지시서에 따라서 수행하였다. 이 kit는 HCV core, NS3, NS4, NS5 유전자재조합 항원을 이용한 제 3세대 항체진단 효소면역측정 시약으로 혈청이나 혈장 중에 HCV 항체가 존재하면 플레이트에 흡착된 유전자 재조합 항원과 반응하고 이어 산양유래 항 인간감마글로불린/과산화효소 반응 및 기질액 반응을 통하여 발색반응이 나타나게 한 것이다. 음성대조액 양성대조액 및 검체에 반응 정지액을 넣고 30분 내에 450nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 판정하였다.

7. RFLP를 위한 RT-PCR

RFLP를 위한 RT-PCR은 one-tube RT-PCR법을 유전자형 분석 조건에 맞게 변형시켜 수행하였다. 즉, RT-1차 PCR은 위에서 언급한 방법과 동일한 조건으로 하여 0.5 mL PCR 튜브에서 실시하였으며, 2차 PCR은 제한효소를 처리하기 위하여 전체량을 50 μ L로 증가시켜 0.2 mL thin-wall PCR tube에서 실시하였다. 즉 1X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$)에 1차 PCR 산물을 3 μ L, 2 mM의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)를 4 μ L, 10 pmole의 내측 primer를 4 μ L, 5 unit의 *Taq* DNA polymerase를 0.2 μ L를 넣어 반응액의 총량을 50 μ L로 하여 GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)에서 반응시켰다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분30초를 1 주기로 하여 33회를 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 연장 반응시켜 완전한 이중 구조를 형성하도록 하였다.

이렇게 하여 생성된 PCR 산물 5 μ L를 1 μ g/mL ethidium bromide (EtBr)이 함유된 2% agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator (UVP, U.S.A.)에서 특정 밴드를 확인하였다.

8. 제한 효소의 선택 및 처리

제한효소는 *Bst*UI, *Hae*III, *Nci*I, 및 *Rsa*I 등 (NEB, U.S.A.)을 사용하였으며 primer는 one-tube RT-PCR에 사용한 것과 동일한 것을 사용하였다.

제한효소의 선택을 위하여 HCV 유전자들을 DNAsis program (Hitachi, Japan)으로 분석하고, 반응액과 반응 조건은 총 부피 20 μ L에 10X buffer를 2 μ L, 제한효소를 10 unit, PCR 산물을 7 μ L를 넣고 제조회사의 지침에 따라 *Bst*UI은 60°C에서, *Hae*III와 *Nci*I와 *Rsa*I은 37°C에서 3시간 이상 반응시켰다.

9. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

제한효소 반응 산물을 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 하기 위하여 13% polyacrylamide gel (10X TBE buffer 5 ml, 30% acrylamide 22 mL, 10% ammonium persulfate 0.25 mL, TEMED 0.02 mL, 증류수 2.73 mL)을 제조하고, 100 volt에서 3시간 동안 수직형 미니 전기 영동기 (MGV-202, CBS scientific, USA)에서 전기영동을 하였다. 반응산물 10 μ L에 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll 400) 2 μ L를 혼합하고 전기영동을 실시한 후 특정 band들을 UV transilluminator가 부착된 화상분석기 (Image analyzer; Vilber Lourmat, France)에서 확인하였다.

10. PCR 산물의 염기서열 분석

2차 PCR 산물을 PCR purification kit (QIAquick PCR purification kit; Qiagen, Germany)로 정제하였다. 즉, PCR 산물 50 μL 와 PB buffer 250 μL 를 잘 혼합한 후 spin column에 주입하고 13,000 rpm에서 45초 동안 원심분리하였다. 다시 이 spin column에 750 μL 의 PB buffer를 주입하여 13,000 rpm에서 45초 동안 원심분리하였다. 그리고 새로운 1.5 mL tube에 이 spin column을 장착하고, EB buffer (Tris-Cl, pH 8.5) 50 μL 를 주입한 후 13,000 rpm에서 60초 동안 원심분리하여 PCR 산물을 분리 정제하였다.

이렇게 정제시킨 PCR 산물을 big dye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystems, USA)를 이용하여 0.5 mL의 PCR tube에서 제조회사의 지침에 따라서 수행하였다. 즉, 정제된 PCR 산물을 5 μL , PCR에서 사용한 것과 동일한 4 pmole의 primer를 1 μL , DMSO를 1 μL 를 넣고 증류수로 1 μL 를 채워서 전체량을 12 μL 로 하여 잘 혼합하였다. 여기에 8 μL 의 big dye sequencing reagent mixture와 잘 혼합한 후 PCR 기기 (GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler; Perkin Elmer Cetus, U.S.A.)에서 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 가열한 후에 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4분간을 1 주기로 하여 25회 반복하였다. 염기 서열 분석은 ABI 310 genetic analyzer (PE Biosystems, USA)로 Sequencing을 실시하여 얻은 결과를 이용 HCV 5'-UTR 에서의 유전자 상관관계를 분석하기 위하여 phylogenetic tree를 이용하였다. 이때 사용한 프로그램은 DNA STAR version 4.05 (Madison, Wisconsin, U.S.A.)를 이용하였다. 염기서열 분석의 정확성을 기하기 위해 sense primer와 antisense primer를 이용하여 결과를 비교하여 정확성을 기하였다.

III. 결 과

1. ELISA에 의한 anti-HCV 항체의 검출

ELISA시험결과에 따른 양성 판정기준치 (Cut Off Value) 계산은 제조회사의 지침서에 따라서 음성 대조액의 평균 흡광도에 0.3을 더 한 값으로 하였다. 판정기준치 이상의 흡광도 값을 갖는 검체를 양성으로 판정하고 미만의 흡광도 값을 갖는 검체는 음성으로 판정하였다. 이리하여 양성으로 확인된 81명의 anti-HCV 양성 혈청을 확보하였다.

2. RT-PCR에 의한 HCV RNA의 검출

본 연구를 위하여 -70°C 에 보관중인 HCV 항체가 확인된 81명의 혈청을 이용하여 RT-PCR을 수행하고 이를 확인하기 위해 2% agarose gel에 전기영동한 결과 Figure 2 와 같이 236 bp 크기의 HCV RNA 밴드가 확인되었다. 이 결과 anti-HCV 항체 양성인 81명 중에서 54명이 HCV RT-PCR에서 양성으로 나타났다.

3. RT-PCR과 ELISA의 비교

HCV 항체 양성인 81 명중에서 RT-PCR 양성인 54명으로 66.7%의 양성률을 나타내어 불일치율은 33.3% 였다 (Table 2).

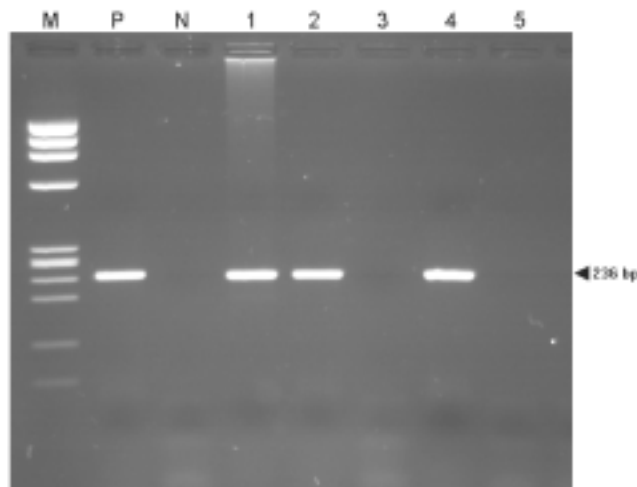


Figure 2. Amplified 5'-UTR region of HCV RNA by one-tube RT-PCR. HCV RNAs were amplified by one-tube RT-PCR from 5'UTR. The PCR products were separated by 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

M: ϕ X174/*Hae*III molecular weight marker;

P: positive control; PCR preparation with HCV RNA

N: negative control; PCR preparation without HCV samples

lane 1, 2, and 4: HCV positive samples;

lane 3 and 5: HCV negative samples.

Table 2. Comparison of HCV RNA by one-tube RT-PCR and anti-HCV by ELISA

	One-tube RT-PCR		Total
	Positive	Negative	
Number	54	27	81
Percent	66.7%	33.3%	100%

A total of 81 samples identified as HCV positives by ELISA test were used for RT-PCR using the primers based on the conserved sequences of 5'-UTR of HCVs.



4. HCV 5'-UTR 염기서열의 분석

기존에 알려져 있는 HCV 5'-UTR 염기서열 분석에 의한 HCV 유전자형은 HCV 1a는 5개 type, HCV 1b는 8개 type, HCV 2a는 4개 type, HCV 2b는 3개 type, HCV 3a는 4개 type, HCV 3b는 2개 type, HCV 4a는 2개 type, HCV 5a는 2개 type, HCV 6a는 3개 type 등 총 33개 아형의 HCV 유전자가 각기 다른 polymorphic region이 있음이 확인되었다 (Table 3, Figure 3). HCV 5'-UTR 부위는 4종류의 제한효소 *Bst*UI, *Hae*III, *Nci*I, 및 *Rsa*I에 의해 절단되는 부위가 달라, HCV 유전자형에 따라 서로 다른 제한효소 지도가 형성됨을 알 수 있다(Figure 4). HCV 5'-UTR 부위를 증폭한 PCR 생성물을 제한효소로 처리하였을 때 나타날 것으로 예상되는 DNA의 크기는 Table 4에 나타내었다. 이것을 살펴보면 1a에서는 *Bst*UI과 *Rsa*I에 의해 같은 유전자형 내에 존재하는 3개의 다른 형태가 나타났으며, 1b에서는 *Rsa*I에 의해 같은 유전자형 내에 존재하는 두 개의 다른 형태가 나타났다. 또한 2a에서는 *Hae*III와 *Rsa*I에 의해 같은 유전자형 내에 존재하는 3개의 다른 형태가 나타났으며, 2b에서는 *Nci*I에 의해 같은 유전자형 내에 존재하는 두 개의 다른 형태가 나타났다. 그리고 3a에서는 *Hae*III에 의해 같은 유전자형 내에 존재하는 두 개의 다른 형태가 나타났으며, 6a에서는 *Bst*UI와 *Nci*I에 의해 서로 차이가 다소 나는 같은 유전자형 내에 존재하는 2개의 다른 형태가 나타났다.

5. PCR-RFLP법에 의한 HCV 유전자형의 분석

HCV 유전자형의 분석을 위해 실시한 PCR 생성물을 agarose gel에서 확인한 결과 Figure 5에서 나타난 것과 같이 236 bp의 밴드가 관찰되었다. 이것을 각각의 제한효소로 처리하고 13% polyacrylamide gel에서 전기영동한 결과

Table 3. Sources and references of HCV 5'-UTR sequence used in this study

HCV genotype	HCV
1a	HCV-1 (M62321), PT-1 (Nakao <i>et al.</i> , 1991), H77 (AF009606), H90 (M62382), HC-J1 (D10749)
1b	HCV-J (D90208), HCV-BK (M58335), HCV-J4/83 (D13558), HCV-China (L02836), HCV-J4/91 (D10750), HCV-JT (D11355), HCV-L2 (U01214), FR21 (U51766)
2a	HC-J6 (D00944), K2A (D12507), Eb-9 (Chan <i>et al.</i> , 1992), FR5 (L38334)
2b	HC-J8 (D01221), MA (AB030907), K2B-1 (D12509)
3a	HCV-K3a (D28917), NZL1 (D17763), Eb-1 (D10123), CB (AF046866)
3b	HCV-Tr (D26556), TR-KJ (D49374)
4a	GB358 (L29608), ED43 (Y11604)
5a	BE96 (L29585), EUH1480 (Y13184)
6a	QC26 (U33431), HK2 (M84827), EUHK2 (Y12083)

Sequence sources and references for analysis of 5'-UTR sequences from Jeju were within brackets. Number¹ of the brackets indicate accession numbers of the Genbank.

1a	HCV-1	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	PT-1	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	H77	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	H90	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HC-J1	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
1b	HCV-J	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HCV-BK	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HC-J4/83	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HCV-China	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HCV-J4/91	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HCV-JT	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HCV-L2	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcaacctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	FR21	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
2a	HC-J6	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	K2A	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	E-B9	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	FR5	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
2b	HC-J8	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	MA	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	K2B-1	ggcgttagta	tgagtgtcat	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
3a	K3A	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	NZL1	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	E-B1	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	CB	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
3b	TR	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	TR-KJ	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
4a	GB358	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	ED43	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
5a	BE96	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	EUH1480	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
6a	QC26	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	HK2	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg
	EUHK2	ggcgttagta	tgagtgtcgt	gcagcctcca	ggaccccc	tccggggaga	gccatagtgg

Figure 3. Polymorphic region of HCV 5'-UTR for HCV genotyping. The position is from -265 to -62 in the 5'-UTR of HCV. The polymorphic region were indicated by black box.

1a	HCV-1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	PT-1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	H77	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	H90	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HC-J1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
1b	HCV-J	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HCV-BK	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HC-J4/83	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HCV-China	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HCV-J4/91	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HCV-JT	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HCV-L2	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	FR21	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
2a	HC-J6	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	K2A	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	E-B9	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	FR5	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
2b	HC-J8	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	MA	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	K2B-1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
3a	K3A	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	NZL1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	E-B1	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	CB	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
3b	TR	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	TR-KJ	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
4a	GB358	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	ED43	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
5a	BE96	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	EUH1480	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
6a	QC26	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	HK2	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa
	EUHK2	tctgcggaac cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggtccttt cttggatcaa

(Figure 3. Continued)

1a	HCV-1	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	PT-1	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	H77	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	H90	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HC-J1	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
1b	HCV-J	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HCV-BK	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HC-J4/83	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HCV-China	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HCV-J4/91	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HCV-JT	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	HCV-L2	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	FR21	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
2a	HC-J6	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	K2A	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	E-B9	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	FR5	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
2b	HC-J8	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	MA	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	K2B-1	cccactctat	gcccgggcat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
3a	K3A	cccgtcaat	accagaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
	NZL1	cccgtcaat	accagaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
	E-B1	cccgtcaat	accagaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
	CB	cccgtcaat	accagaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
3b	TR	cccgtcaat	gcccggaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
	TR-KJ	cccgtcaat	gcccggaaat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	tcactagccg	agtagtgttg
4a	GB358	cccgtcaat	gcccggaaat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	ED43	cccgtcaat	gcccggaaat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagtgttg
5a	BE96	cccgtcaat	gcccggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
	EUH1480	cccgtcaat	gcccggagat	ttgggcgtgc	ccccgcgaga	ctgctagccg	agtagtgttg
6a	QC26	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	HK2	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg
	EUHK2	cccgtcaat	gcctggagat	ttgggcgtgc	ccccgcaaga	ctgctagccg	agtagcgttg

(Figure 3. Continued)

Reference

1a	HCV-1	ggtcgcgaaa ggcc	(Choo <i>et al.</i> , 1991)
	PT-1	ggtcgcgaaa ggcc	(Nakao <i>et al.</i> , 1991)
	H77	ggtcgcgaaa ggcc	(Kolykalov <i>et al.</i> , 1997)
	H90	ggtcgcgaaa ggcc	(Ogata <i>et al.</i> , 1991)
	HC-J1	ggtcgcgaaa ggcc	(D10740)
1b	HCV-J	ggtcgcgaaa ggcc	(Kato <i>et al.</i> , 1990)
	HCV-BK	ggtcgcgaaa ggcc	(Takamizawa <i>et al.</i> , 1991)
	HC-J4/83	ggtcgcgaaa ggcc	(D13558)
	HCV-China	ggtcgcgaaa ggcc	(LO236)
	HCV-J4/91	ggtcgcgaaa ggcc	(D10750)
	HCV-JT	ggtcgcgaaa ggcc	(D11355)
	HCV-L2	ggtcgcgaaa ggcc	(Cho <i>et al.</i> , 1993)
	FR21	ggtcgcgaaa ggcc	(U51766)
2a	HC-J6	ggttgcgaaa ggcc	(Okamoto <i>et al.</i> , 1991)
	K2A	ggttgcgaaa ggcc	(Enomoto <i>et al.</i> , 1990)
	E-B9	ggttgcgaaa ggcc	(Chan <i>et al.</i> , 1992)
	FR5	ggttgcgaaa ggcc	(L38334)
2b	HC-J8	ggttgcgaaa ggcc	(Okamoto <i>et al.</i> , 1992)
	MA	ggttgcgaaa ggcc	(AB030907)
	K2B-1	ggttgcgaaa ggcc	(D12509)
3a	K3A	ggtcgcgaaa ggcc	(Yamada <i>et al.</i> , 1994)
	NZL1	ggtcgcgaaa ggcc	(Sakamoto <i>et al.</i> , 1994)
	E-B1	ggtcgcgaaa ggcc	(Chan <i>et al.</i> , 1992)
	CB	ggtcgcgaaa ggcc	(AF046866)
3b	TR	ggtcgcgaaa ggcc	(D26556)
	TR-KJ	ggtcgcgaaa ggcc	(Chayama <i>et al.</i> , 1994)
4a	GB358	ggtcgcgaaaca ggcc	(L29608)
	ED43	ggtcgcgaaa ggcc	(Chamberlain <i>et al.</i> , 1997a)
5a	BE96	ggtcgcgaaa ggcc	(L29585)
	EUH1480	ggtcgcgaaa ggcc	(Chamberlain <i>et al.</i> , 1997b)
6a	QC26	ggttgcgaaa ggcc	(Bernier <i>et al.</i> , 1996)
	HK2	ggttgcgaaa ggcc	(Bukh <i>et al.</i> , 1992)
	EUHK2	ggttgcgaaa ggcc	(Y12083)

(Figure 3. Continued)

Type \ Size	(bp)	1	25	50	75	100	125	150	175	200	225	
		:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	
1a	HCV-1	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↑	-----
	H90	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----↓	-----↑	-----
	HC-J1	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↓	-----↑
1b	HCV-J	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↓	-----↑
	FR21	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----↓	-----↓	-----↑
2a	HC-J6	-----‡	↑-†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----
	K2A	-----↑	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----
	E-B9	-----‡	↑-†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	↑	-----	-----↑
2b	HC-J8	-----‡	↑-†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----
	K2B-1	-----↑	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----
3a	K3A	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----↓	-----↓	-----↑
	CB	-----‡	-----↑	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↓	-----↑
3b	TR	-----‡	-----↑	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↓	-----↑
4a	GB358	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↑
5a	Be96	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↓	-----↓	-----↑
6a	QC26	-----‡	↑-†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----
	EUHK2	-----‡	↑-↓	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----†	-----‡	-----↑	-----

Figure 4. Restriction maps predicted from 5'-UTR for HCV genotyping. The size from position -280 to -44 in the 5'UTR of HCV is 236 bp. Type 1a and 1b have specific band with *Bst*UI; type 2a with *Hae*III and *Nci*I; type 2b with no *Bst*UI; type 3a with *Hae*III and *Rsa*I; type 3b with *Nci*I and *Rsa*I. These unique restriction site for HCV types and subtypes can make distinction between type and type, or subtype and subtype. Restriction site ↓: *Bst*UI; ↑: *Hae*III; †: *Nci*I; ‡: *Rsa*I.

Table 4. DNA fragment sizes for HCV genotyping by restriction enzymes

Type	Subtype	<i>Bst</i> UI CG/CG	<i>Hae</i> III GG/CC	<i>Nci</i> I CC/C(G)GG	<i>Rsa</i> I GT/AC
Type 1a	HCV-1 ①	209, 27	216, 20	111, 68, 57	134, 102
	H90	209, 27	216, 20,	111, 68, 57	134, 58, 44
	HC-J1	171, 38, 27	216, 20,	111, 68, 57	134, 102
Type 1b	HCV-J ②	179, 30, 27	216, 20,	111, 68, 57	134, 102
	FR21	179, 30, 27	216, 20,	111, 68, 57	134, 58, 44
Type 2a	HC-J6	236	160, 56, 20	79, 68, 48, 41	134, 58, 44
	K2A	236	160, 56, 20	79, 68, 48, 41	134, 102
	E-B9 ③	236	104, 56, 56, 20	79, 68, 48, 41	134, 58, 44
Type 2b	HC-J8 ④	236	160, 56, 20	168, 68	134, 58, 44
	K2B-1	236	160, 56, 20	120, 68, 48	134, 102
Type 3a	K3A ⑤	179, 30, 27	216, 20,	111, 68, 57	134, 69, 33
	CB	179, 30, 27	160, 56, 20	111, 68, 57	134, 69, 33
Type 3b	TR ⑥	179, 30, 27	160, 56, 20	79, 68, 48, 32, 9	134, 69, 33
Type 4a	GB358 ⑦	209, 27	216, 20	79, 68, 48, 32, 9	134, 58, 44
Type 5a	BE96 ⑧	179, 30, 27	216, 20	79, 68, 48, 32, 9	134, 102
Type 6a	QC26 ⑨	236	160, 56, 20	111, 68, 57	134, 58, 44
	EUHK2	167, 69	160, 56, 20	125, 111	134, 58, 44

The head subtypes represent the others.

①: HCV-1; HCV-1, PT-1, H77

②: HCV-J; HCV-J, HCV-BK, HC-J4/83, HCV-China, HCV-J4/91, HCV-JT, HCV-L2

③: E-B9; E-B9, FR5

④: HC-J8; JC-J8, MA

⑤: K3A; K3A, NZL1, E-B1

⑥: TR; TR, TR-KJ

⑦: GB358; GB358, ED43

⑧: BE96; BE96, EUH1480

⑨: QC26; QC26, HK2

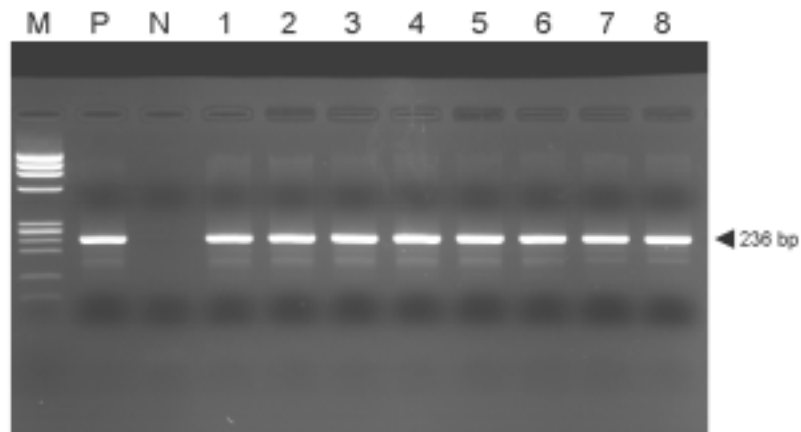


Figure 5. Amplified 5'-UTR region of HCV RNAs for HCV genotyping. Analysis in this study 5'-UTR region of HCV RNAs were amplified by RT-PCR from HCV 5'UTR for genotyping. The PCR products were separated by 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

M: ϕ X174/*Hae*III molecular weight marker;

P: positive control; PCR preparation with HCV RNA

N: negative control; PCR preparation without HCV samples

lane 1 to 8: HCV positive samples for genotyping.

Figure 6에서 Figure 9까지의 RFLP pattern을 보여주었다. Figure 6은 HCV 1a형과 가장 가까운 클론의 제한 패턴을 보여주는 것으로, *Bst*UI에서 209 및 27 bp의 특이 밴드와 *Nci*I에서 111, 68, 및 57 bp의 특이 밴드가 나타나므로 다른 유전자형과 구분이 가능하였으며, H90과 H77 혹은HCV-1 형으로 판명되었다.

Figure 7은 HCV 1b형과 가장 가까운 클론의 제한 패턴을 보여주는 것으로, *Bst*UI에서 179, 30, 및 27 bp의 특이 밴드와 *Nci*I에서 111, 68, 및 57 bp의 특이 밴드와 *Rsa*I에서 134 및 102 bp의 특이 밴드가 관측되어 다른 유전자형과 구분이 가능하였으며, HCV-J 형으로 판명되었다.

Figure 8은 HCV 2a형과 가장 가까운 클론의 제한 패턴을 보여주는 것으로, *Bst*UI에서 239 bp의 특이 밴드와 *Nci*I에서 79, 68, 48, 및 41 bp의 특이 밴드가 형성되어 다른 유전자형과 구분이 가능하였으며, *Hae*III에 의해 HC-J6 형과 E-B9 형으로 구분이 되어 판명되었다.

Figure 9는 HCV 2b형과 가장 가까운 클론의 제한 패턴을 보여주는 것으로, *Bst*UI에서 236 bp의 특이 밴드와 *Nci*I에서 168, 68 bp의 특이 밴드가 관찰되어 다른 유전자형과 구분이 가능하였으며, HC-J8a형과 계통학적 관계가 가장 가까운 것으로 판명되었다.

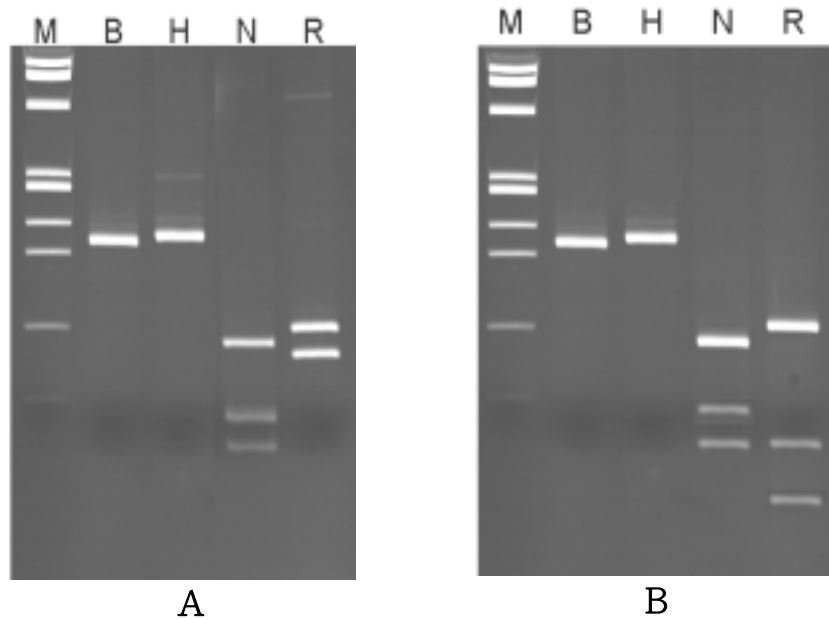


Figure 6. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which were assumed subtype 1a. 5'-UTR region of HCV RNA was amplified and digested with four restriction enzymes. The HCV subtype 1a produce two restriction fragments by *Rsa* I, and two fragments of 209 bp and 27 bp by *Bst*UI, and specific pattern of 111 bp, 68 bp and 57 bp by *Nci*I. The digested products of JHCV 10(A) and JHCV 48(B) were separated by 13% polyacrylamide gel and visualized by staining with ethidium bromide. M: ϕ X174/*Hae*III molecular weight marker; B: *Bst*UI digested; H: *Hae*III digested; N: *Nci*I digested; R: *Rsa*I digested.

A : A representative of G4(JHCV10)

B : A representative of G5(JHCV48)

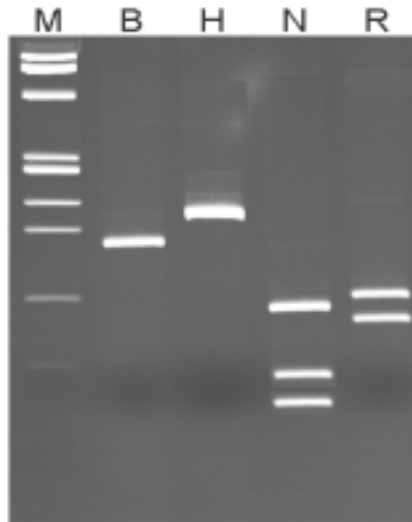


Figure 7. RFLP patterns of the HCVs found in Jeju, which was assumed subtype 1b (JHCV 7). 5'-UTR region of HCV RNA was amplified and digested with four restriction enzymes. The HCV subtype 1b produces 111 bp, 68 bp and 57 bp when digested by *NciI*, and specific pattern of 134 bp and 102 bp by *RsaI*. The digested products of JHCV 7 were separated by 13% polyacrylamide gel and visualized by staining with ethidium bromide.

M: ϕ X174/*HaeIII* molecular weight marker;

B: *BstUI* digested; H: *HaeIII* digested; N: *NciI* digested; R: *RsaI* digested.

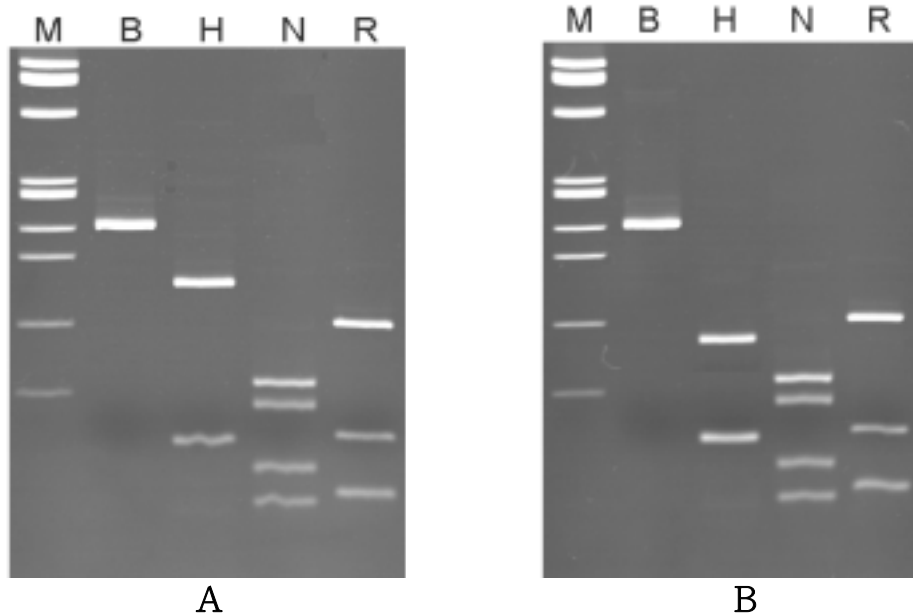


Figure 8. RFLP patterns of HCVs found in Jeju, which were assumed subtype 2a. 5'-UTR region HCV RNA was amplified and digested with four restriction enzymes. HCV 2a produces two restriction fragments when digested by *HaeIII*, and four fragments of 79, 68, 48, and 41 bp by *NciI*. The digested products of JHCV 1(A) and JHCV 2(B) were separated by 13% polyacrylamide gel and visualized by staining with ethidium bromide.

M : ϕ X174/*HaeIII* molecular weight marker;

B : *BstUI* digested; H: *HaeIII* digested; N: *NciI* digested; R : *RsaI* digested.

A : A representative of G7 (JHCV 1)

B : A representative of G8 (JHCV 2)

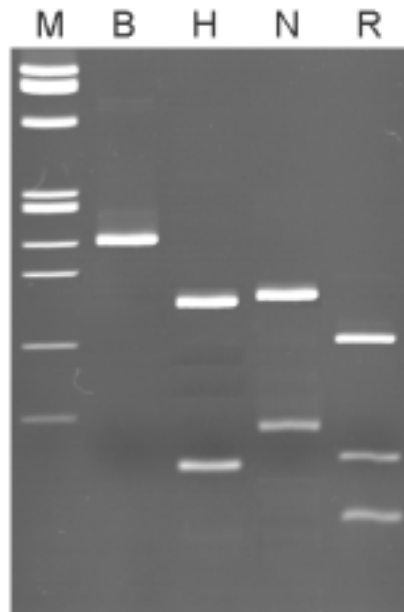


Figure 9. RFLP patterns of the HCVs found in Jeju, which was assumed subtype 2b (JHCV19). 5'-UTR region of HCV RNA was amplified and digested with four restriction enzymes. The HCV subtype 2b produces specific pattern of 236 bp by *Bst*UI, and two fragments of 168 and 68 bp by *Nci*I. The digested products of JHCV19 was separated by 13% polyacrylamide gel and visualized by staining with ethidium bromide.

M : ϕ X174/*Hae*III molecular weight marker;

B : *Bst*UI digested; H: *Hae*III digested; N: *Nci*I digested; R : *Rsa*I digested.

6. 제주지역의 HCV 1a, 1b, 2a, 2b 염기서열의 확인

제주지역의 HCV에 감염된 환자의 유전자형을 나타내고 있는 54개 sample의 결과를 염기서열 분석을 하여, PCR-RFLP법에 의한 HCV 유전자형을 확인하였다. 자동 유전자 분석기 ABI 310으로 direct-sequencing을 하여 염기서열을 분석하였다.

총 54명의 양성 환자에서 분석한 염기서열을 DNA STAR Version 4.05(Madison, Wisconsin, USA)을 사용하여 분석한 결과 Figure 10과 같은 phylogenetic tree를 얻을 수가 있었다. 54개의 염기서열을 분석해 본 결과 대표성을 나타내는 것이 9개의 group으로 구분되어졌고 각 group을 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, 그리고 G9으로 명명하였다. G1에는 14, G2에는 13, G7에는 10, G8에는 8, G6에는 5개가 포함되어 있었다. 그리고 G4, G9, G3 및 G5는 각각 1개의 대표성을 나타내었다. 이들 중에서 G1, G2, G3, G4 및 G5는 HCV 1형에 속하는 것으로 나타났으며, G6, G7, G8, 및 G9은 HCV 2형에 속하는 것으로 나타났다.

7. 제주 지역의 HCV 유전자형 분포

HCV에 감염된 54명의 HCV 유전자형을 분석한 결과는 1b가 27명으로 50.0%를 차지하고 2a가 23명으로 42.6%를 차지하여 두형의 합이 92.6%로 주된 HCV 형으로 확인되었다. 또한 1a가 3명으로 5.6%를 차지하고 있었으며, 2b가 1명으로 1.8%를 나타내었다. 그러나 3a, 3b, 4a, 5a 및 6a는 발견되지 않았다.

좀더 세분화하여 분석하여 보면 1b의 HCV-J 형이 가장 많은 형으로 27명(50%)을 차지하고 있었으며, 다음으로 2a의 E-B9으로 15명(27.8%)과 HC-J6 형으로 8명(14.8%)을 나타내었다.

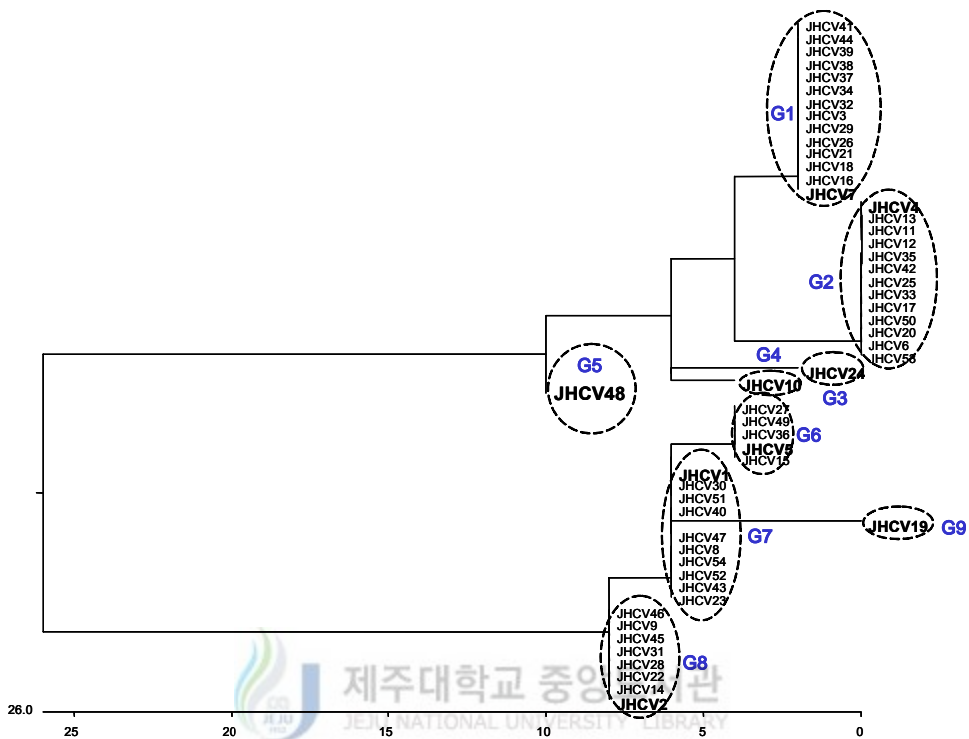


Figure 10. Divergence of the HCV clone originated from Jeju based on RNA sequence of 5'-UTR region of HCV genes. Fifty four sequences each originated from 54 HCV positive samples were used for phylogenetic analysis, and the phylogenetic tree was drawn (using the Lasergene MegAlign program) based on 198-bp sequences of the RT-PCR products. The bold letters indicate the representative of each HCV group used for RFLP.

IV. 고 찰

HCV는 주로 수혈에 의한 혈액이 주감염원이며 체액에 의해 감염되는 바이러스로 (Alter 등, 1982) 약 9,500개의 염기로 이루어져 있다 (Cho 등, 1993; Choo 등, 1989). 이 HCV 유전자의 일부를 유전공학적으로 발현시켜 얻은 polypeptide C100-3에 대한 환자의 혈청내에 존재하는 항체의 검출이 가능하게 되었고 non-A, non-B (NANB) 간염의 약 80%가 C100-3 항체에 양성으로 나타났다 (Choo 등, 1990; Miyamura 등, 1990). 그러나 C100-3 항체 음성인 경우에도 HCV의 감염이 확인되고 있으며, 수혈을 할 경우 공여자의 혈액으로부터 HCV 감염이 문제시되고 있다 (Alter 등, 1989; Wang 등, 1994; Zanetti 등, 1990).

HCV는 혈액에서 바이러스 농도가 낮아 면역학적 방법으로는 HCV 항원을 검출할 수가 없고, 숙주 세포에 감염되었을 경우에는 면역 체계를 빠져나가 HCV에 대한 중화 항체를 형성하지 못하게 된다 (Taniguchi 등, 1993). 환자의 혈청내에 나타나는 HCV 항체 검사는 간접적인 측정법으로서 정확도가 떨어지나, 분자생물학적 기법인 RT-PCR법을 이용한 HCV RNA의 검출방법은 HCV 감염의 직접적인 증거가 된다 (Choi 등, 1994; Garson 등, 1990a; Weiner 등, 1990). 그러나, 이 방법은 특이도와 민감도가 높다는 장점이 있지만, 검사 과정에 있어 고도의 기술이 필요하고, 시간과 노동력이 많이 들뿐만 아니라 너무 예민도가 뛰어나 오히려 오염에 의한 위양성을 나타내며, 실험 과정의 복잡성 때문에 위음성의 결과를 초래할수 있다 (Kwok 등, 1989). 혈청으로부터 proteinase K-phenol를 사용하거나 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski 등, 1987)을 사용하여 HCV RNA를 추출하고 이것의 일부분을 사용하여 RT-PCR을 실시한다. 이렇게 하여 합성된 cDNA를 이용하여 1차 PCR을 시행한 다음 2차 PCR을 시행하는데 많은 시간과 고도의 기술 및 노동력이 요구된다.

본 연구에서는 복잡한 기존의 RT-PCR법을 개선하여 추출한 HCV RNA를 RT와 PCR 반응을 하나의 튜브에서 연속적으로 시행하는 one-tube RT-PCR법을 이용 HCV 감염 의심자를 대상으로 하여 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법 (Bresters 등, 1992)과 비교하여 보았다. ELISA법을 이용한 항체 검사와 one-tube RT-PCR에 의한 HCV RNA 검사의 비교에서 서로가 33.3%의 높은 오차율을 나타내고 있었다. 이는 보통 급성 감염 증상이 발생하고 HCV 항체가 나타난 후에 만성감염으로 전환되지 않고 회복되는 경우에도 항체가 오랜 기간동안 혈액내에 남아 있게 되므로 차이가 나타나는 것으로 판단된다.

HCV는 변이가 심해 종에 따라 30% 이상의 불일치를 나타내고 있으나, 5'UTR은 매우 보존이 잘된 부분으로 모든 종에서 85-95%의 RNA 염기서열의 상동성을 보이고 있어 RT-PCR에 의한 진단시 주로 이부위를 이용하고 있다 (Karachristos 등, 1995; Okamoto 등, 1990a).

HCV 유전자의 구성은 5'-UTR, core, envelope, nonstructure, 및 3'-UTR 부분으로 구성되어 있다 (Okamoto 등, 1991). 돌연변이율이 매우 높아 대략 1년에 $(1.44-1.92) \times 10^{-3}$ bp 정도의 염기 치환이 발생하는데 (Ogata 등, 1991; Okamoto 등, 1992a), HCV 유전자 중에서 5'UTR과 capsid가 가장 보존이 잘되어 있고 E1과 E2에서 변이가 가장 많이 나타나고 있다 (Kuma 등, 1993; Hada 등, 1993; Stuyver 등, 1994). 이런 높은 변이율로 인하여 HCV는 유전자 다양성을 나타내고 있는데 현재까지 크게 6개의 형으로 분류를 하고 그 속에 속하는 아형도 50여개 이상 발견되고 있다.(Choo 등, 1991; Cha 등, 1992; Simmonds 등, 1993a; Weiner 등, 1991b). 아직까지 이들 형을 분류하는데 표준화된 방법이 없어 연구자마다 서로 다른 명명법을 사용하고 있으나 (Table 5), 현재는 Simmonds 등 (1993a)이 제안한 분류법이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 이 분류법은 유전자형에 숫자 (1, 2, 3 등)를 붙이고 아형에 문

Table 5. Comparative analysis of Hepatitis C virus (HCV) types identified over the world

Simmonds ^①	Okamoto ^②	Enomoto ^③	Prototype	principal loation(s)
1a	I	K-PT	HCV-1	Europe, USA
1b	II	KI	HCV-J	Global
2a	III	K-2a	HC-J6	Korea, Japan
2b	IV	K-2b	HC-J8	Japan
3a	V	-	E-b1	Thailand
3b	VI	-	Tr	Thailand
4a	VI	-	GB358	Egypt, Zaire
5a	-	-	BE96	South Africa
6a	-	-	QC26	Hong Kong

①, Simmonds *et al.*, 1993a

②, Okamoto *et al.*, 1992b

③, Enomoto *et al.*, 1990

자 (a, b, c 등)를 붙이는 방법이다. 이들 분류법에 따르면 HCV는 유전자형간에는 31-35%의 차이가 있고 아형에서는 20-23%의 차이를 나타내고 있으며, 같은 아형 내에서도 1-10%의 차이를 보이고 있다 (Bukh 등, 1994; Simmonds 등, 1993b).

HCV는 다양한 유전자 다형성을 나타내고 있어 이들 유전자형의 분포는 지역과 민족에 따라 다른 분포를 보이고 있다 (Kato 등, 1989; Mellor 등, 1996; Wu 등, 1997; Zein 등, 1996). 한국에서의 HCV 유전자형은 1b형이 51.2%, 2a형이 41.8%로 1b와 2a가 전체의 93%를 나타내는 것으로 보고되었고 (Park 등, 1998), 일본에서는 1b형이 82.3%를 (Okamoto 등, 1991) 차지하고 있고, 태국에서는 1a형이 20%, 3a형이 39.1%를 (Kanistannon 등, 1997) 나타내며, 동양에서는 1b 와 2a가 주종을 이루고 있다 (Reid 등, 1999; Widell 등, 2000). 미국에서는 1a형과 1b형이 74.1% (Vargas 등, 1997)를 차지하는 것으로 나타났고, 유럽에서는 주로 3a 형이 각 나라마다 20%이상을 나타내었다 (Castelian 등, 1997; Davidson 등, 1995; Viazov 등, 1997). 특징적으로 남아프리카에서는 다른 나라에서는 보기 드문 5a 형이 58.7%로 나타났다 (Davidson 등, 1995). 북아프리카 지역에서 주로 발견되는 4a가 미국과 유럽에서 나타나는 것은 이곳 국가에 아프리카 민족이 많이 살고 있기 때문일 것이다. 그러나 아직도 많은 지역에서의 HCV 유전자형이 분석되어 있지 않고 있기 때문에 앞으로 많은 연구가 필요할 것이며, 이에 따라 더 많은 형과 아형이 나타날 것으로 추측된다 (Table 6). 또한 염기서열에서 한국형 HCV는 일본형 HCV와는 5.9%정도가 다르며, 미국형 HCV와는 23%의 커다란 차이를 나타내고 있다. 그러므로 다른 국가단위에서 감염된 HCV의 유전정보와 그로 인하여 코딩되는 항원 단백질은 상당부분 이질성을 나타내며, 한국인에서의 HCV 또한 특이적인 염기서열을 나타내고 있음이 확인되었다 (Cho 등, 1993).

HCV 유전자형의 분석은 HCV 감염의 확인, 감염 경로, 및 IFN- α 의 치료 효과를 예측하는 등에 이용되고 있다 (Ballardini 등, 1997; Hino 등, 1994;

Table 6. Distribution of HCV genotypes in 16 countries

Continent	Country	No. of sample	Percent of HCV genotype										References	
			1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	5a	6a	other		
Asia	Korea (Jeju)	54	5.6	50.0	42.6	1.8	-	-	-	-	-	-	-	This study
	Korea	256	2.0	51.2	41.8	2.0	-	-	-	-	-	-	3.0	Park <i>et al.</i> (1998)
	Korea	138	2.2	71.0	23.9	1.4	-	-	-	-	-	-	1.4	Lee <i>et al.</i> (1996a)
	Japan	159	3.8	82.3	10.1	3.8	-	-	-	-	-	-	-	Okamoto <i>et al.</i> (1992b)
	China (Beijing)	63	-	52.4	28.6	-	-	-	-	-	-	-	19.0	Wang <i>et al.</i> (1994)
	China (Yangtze)	41	-	85.4	7.3	-	-	-	-	-	-	-	7.3	Yao <i>et al.</i> (1994)
	Taiwan	505	0.4	60.1	15.5	11.9	2.0	-	-	-	-	-	10.1	Wu <i>et al.</i> (1997)
	Thailand	220	9.1	20.0	-	-	39.1	-	-	-	-	18.2	13.8	Kanistanon <i>et al.</i> (1997)
Europe	Soviet Union	131	4.6	81.7	3.8	-	9.9	-	-	-	-	-	-	Viazov <i>et al.</i> (1997)
	Finland	264	14.1	23.9	-	20.1	40.9	-	-	-	-	-	1.0	Pohjanpelto <i>et al.</i> (1996)
	Scotland	144	38.9	7.6	11.1	3.5	38.9	-	-	-	-	-	-	Davidson <i>et al.</i> (1995)
	Germany	379	14.0	55.9	4.0	-	26.1	-	-	-	-	-	-	Berg <i>et al.</i> (1997)
	France	134	16.4	46.3	7.5	-	20.9	-	4.5	0.7	-	-	3.7	Castelain <i>et al.</i> (1997)
	Turkey	89	19.1	75.3	3.4	-	-	-	2.2	-	-	-	-	Abacioglu <i>et al.</i> (1995)
	Sweden	25	24.0	52.0	-	16.0	8.0	-	-	-	-	-	-	Widell <i>et al.</i> (2000)
	Africa	Morocco	105	2.8	47.6	37.1	-	-	-	-	-	-	-	12.5
South Africa		63	4.8	25.4	1.6	-	3.2	-	6.3	58.7	-	-	-	Davidson <i>et al.</i> (1995)
America	U.S.A.	185	46.0	28.1	1.1	7.6	2.7	-	7.0	-	-	-	7.5	Vargas <i>et al.</i> (1997)
	Brazil	83	24.1	38.6	3.6	-	21.7	-	-	-	-	-	12.0	Silva <i>et al.</i> (2000)

Nolte 등, 2001; Zein 등, 1996). 또한 지역과 민족에 따라 다른 분포를 보이고 있기 때문에 (Greene 등, 1995; McOmish 등, 1994; Takada 등, 1993), 분포도 조사 및 백신 개발에도 이용되고 있다. 대개 치료자의 50% 이상이 반응을 보이는 것은 하지만 25% 정도만이 간의 작용이 정상적으로 돌아오고 혈청내 HCV가 사라진다고 한다. 이때 IFN- α 치료 효과와 HCV형과 관련성이 보고되고 있는데, 유전자형 1a, 2, 3, 및 5형에서는 치료 효과가 뛰어나지만, 1b형과 4형에서는 효과가 떨어진다고 한다 (Takada 등, 1992; Yoshioka 등, 1992). 또한 1b형과 4형은 만성간염으로의 전환이 빠르는데 반하여 1a형과 2a형은 증상 호전이 훨씬 좋다고도 나타나 있다 (Lopez-Labrador, 1997). Enomoto 등 (1995)은 HCV 1b형 중 IFN- α 에 민감하게 반응하는 아형과 반응하지 않는 아형의 유전자를 비교하여 보았는데, IFN- α 민감성 유전자형의 NS5A 부위에 있는 codon 2154-2383에 돌연변이가 발견되어 이를 IFN 민감성 부위라고 하였다. 그러나 IFN- α 의 작용과 HCV 유전자형과의 본질적인 상관관계는 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있다.

HCV 유전자형을 분석하는 방법은 크게 다섯 가지 방법이 있다. 첫째는 HCV 유전자형에 특이성을 지닌 primer를 사용하는 sequence specific primer (SSP) PCR 방법이다 (Dusheiko, 1994). 이 방법은 core 부위에서 여러 유전자형에 특이한 primer를 조합 RT-PCR을 실시하는 하여 바로 결과를 얻을 수 있으나 primer 인식 부위에 돌연변이가 발생하거나 새로운 형에 대하여서는 결정을 못하는 단점이 있다. 둘째는 5'-UTR 부위를 RT-PCR로 증폭하여 유전자형에 특이한 oligonucleotide probe로 결합시키는 것인데, probe의 종류에 따라 정확한 결과를 얻을 수 있으나 시간과 노동력이 많이 소요된다. 셋째는 5'-UTR 부위를 RT-PCR로 증폭하고 제한효소를 사용하는 RFLP법인데 (McOmish 등, 1993; Park 등, 1998; Thiers, 1997), 간단하고 쉽게 정확한 결과를 얻을 수 있으나 사용하는 제한효소가 변이 부분을 인식하지 못하면 분석하지 못하는 단점이 있다. 그러나 RFLP법은 손쉽게 실험실에서 이용할 수가

있어 암 유전자의 변이를 찾아낼 수 있고 유전자 다형성의 형태 분류가 가능하여 많은 곳에서 사용되고 있다 (Lee 등, 1997; Oh 등, 1997). 넷째는 셋째 방법과 유사한 방법으로 PCR과정 중에 동위원소 ^{32}P 를 사용하고 제한효소로 처리한 후 sequencing용과 같은 큰 gel을 이용하여 X-ray film에 현상하는 것이다 (McOmish 등, 1993). 다섯째는 최근에 HCV 유전자형을 분석하는 데 5'-UTR을 PCR로 증폭하고 형에 따라 다르게 나타나는 염기를 분석하는 방법을 사용하고 있는데 (Halfon 등, 2001; Simmonds 등, 1993b). 이는 5'-UTR 내의 염기 변화가 특정 부위에 국한되어 있어 primer 선택에 용이하고 돌연변이나 새로운 형에 대하여도 RT-PCR을 시행할 수 있는 장점이 있으며 (Germer 등, 1999; Okamoto 등, 1990a), 또한 이곳에서의 결과가 core, NS3, 및 NS5의 결과와 같기 때문이다 (Karachristos 등, 1995; Stuyver 등, 1994).

본 연구에서는 HCV 유전자형을 쉽고 간단하게 결정하기 위하여 중합효소 연쇄반응-제한효소 절편길이 다양성 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP) 법을 사용하여 제주주민의 HCV 양성환자 54명을 대상으로 유전자형을 분석하였다. 즉, one-tube RT-PCR 법으로 HCV 5'-UTR부위의 RNA를 증폭하고, 이를 선택한 4개의 제한효소 (Table 7)를 처리하여 HCV 유전자형을 결정하였다. 본방법을 이용하여 제주도 주민의 HCV RT-PCR 양성자 54명의 유전자형을 조사한 결과 Table 8과 같이 HCV 1a, 1b, 2a, 및 2b 등 4개의 형이 나타났는데 이중 1b가 50.0%와 2a가 42.6%로 대부분을 차지하고 있었다. 이것은 Park 등 (1998)이 발표한 1b (51.2%)와 2a (41.8%)와는 매우 유사하였으며, Lee 등 (1996)이 발표한 1b (71.0%)와 2a (23.9%)와는 다소 차이가 있었으나 이들 두형을 합산하여 보면 90% 이상으로 유사한 확률을 보이고 있었다.

본 연구에서는 PCR-RFLP법으로 제주주민에서 나타나는 HCV 유전자형을 분석하고 그결과의 신뢰도를 확인하고자 direct-sequencing 방법을 사용하여 염기서열을 분석하였다. DNA STAR Version 4.05 (Madison. Wisconsin.

Table 7. Four Restriction enzymes for HCV genotyping

Name	Recognition sequence	Incubation temperature	Source
<i>Bst</i> UI	▼ CGCG GCGC ▲	60°C	NEB, U.S.A.
<i>Hae</i> III	▼ GGCC CCGG ▲	37°C	NEB, U.S.A.
<i>Nci</i> I	▼ CC(C/G)GG GG(G/C)CC ▲	37°C	NEB, U.S.A.
<i>Rsa</i> I	▼ GTAC CATG ▲	37°C	NEB, U.S.A.

The sites for four restriction enzymes used in this study have been often found in 5'-UTR of Hepatitis C virus gene, and different restriction fragment can be produced according to the virus types.

Table 8. Distribution of HCV genotypes from Jeju residents based on PCR-RFLP

Genotype	1a	1b	2a	2b	Total
Cases	3	27	23	1	54
Percent (%)	5.6	50.0	42.6	1.8	100

The RT-PCR products were cut and analyzed restriction endonucleases (*Bsu* I *Hae* III *Nci* I *Rsa* I) for genotyping of HCVs obtained in this study.



USA) program 를 사용하여 54개의 염기서열을 분석해 본 결과 대표성을 나타내는 것이 9개 group으로 구분되었고 각 group을 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9으로 명명하였다. 9개의 대표성을 나타내 것을 기존에 발표된 HCV 형과 비교하여 phylogenetic tree로 표시한 결과 HCV 1a 형에 속하는 것으로 추정되는 G3, G4, G5는 각각 아형 HCV-1, H90, 그리고 H77과 가장 가까운 것으로 나타났다. HCV 1b 형에 속하는 G1과 G2는 FR21 또는 HCV-J로 추정된다. HCV 2a 형에 속하는 G6와 G7은 HC-J6에, G8은 E-B9에 가장 가까운 것으로 나타났으며, HCV 2b 형에 속하는 것으로 추정되는 G9은 HC-J8에 가장 가까운 것으로 나타났다(Figure 11, Figure 12).

본 연구에서 얻어진 제주주민의 HCV군인 G4와 G5는 G3에 비하여 기존의 HCV 1a형과 더 가까운 염기서열을 나타냄을 알 수가 있었다(Figure 13). 그러나 PCR-RFLP 법으로는 HCV-1과 H77을 구분할 수가 없게 나타났지만 현재 국제적으로 통용되고 있는 아형을 나타내는 기준까지의 형인 1a에 모두 속함을 확인할 수가 있었다. G1과 G2는 하나의 염기서열에서 차이가 나지만 모두가 HCV 1b의 아형인 HCV-J라는 대표적인 형과 계통학적 관계가 가장 가까운 것으로 나타났다(Figure 14). 이들 형이 총 27개로 제주도의 대표적인 형임을 확인할 수가 있었다. HCV 2a 형으로 추정되는 G7은 아형 HC-J6와 일치하였으며, G8은 E-B9과 일치하였다. 그러나 G6는 HC-J6와는 한 개의 염기서열이 차이가 있었고, E-B9과는 두 개의 염기서열이 차이가 있음을 보여주었다 (Figure 15). HCV 2b 형으로 추정되는 G9은 HC-J8보다 MA에 가까운 형으로 나타났는데(Figure 16), PCR-RFLP 법으로는 HC-J8과 MA를 구분할 수가 없었다. 이와같이 본 연구에서 얻어진 자료를 종합하여 보면 PCR-RFLP 법은 PCR-direct sequencing 방법에 비교하여 간단하고 저렴하게 일반 실험실에서 아형까지 분석할 수 있는 장점이 있으나 아형보다도 세부적인 종까지는 분석하지 못하는 것이 확인되었다. PCR-RFLP 법을 사용하여 분석한 이들 HCV 형을 참고로 하여 항바이러스제 치료에 사용하게 될 시에는, 아형 상태

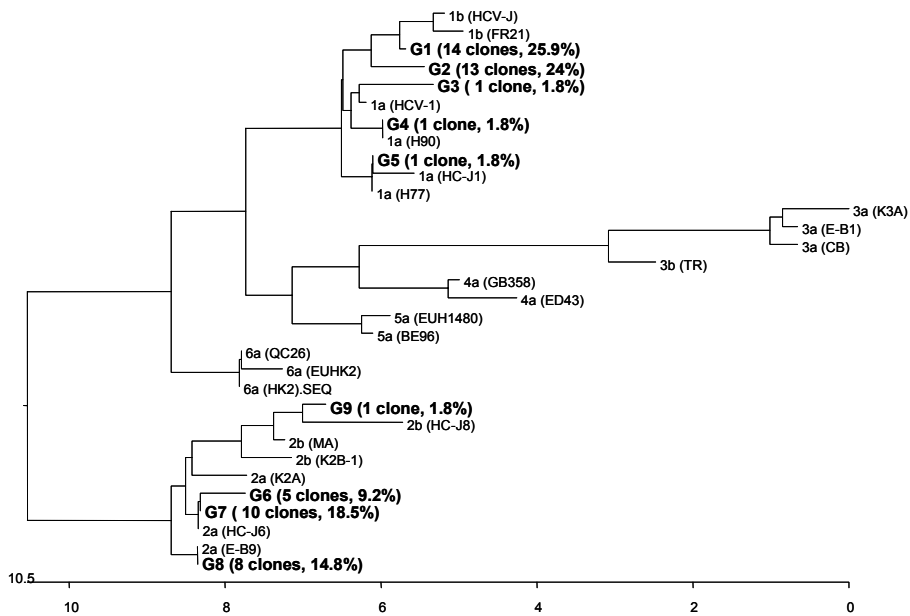


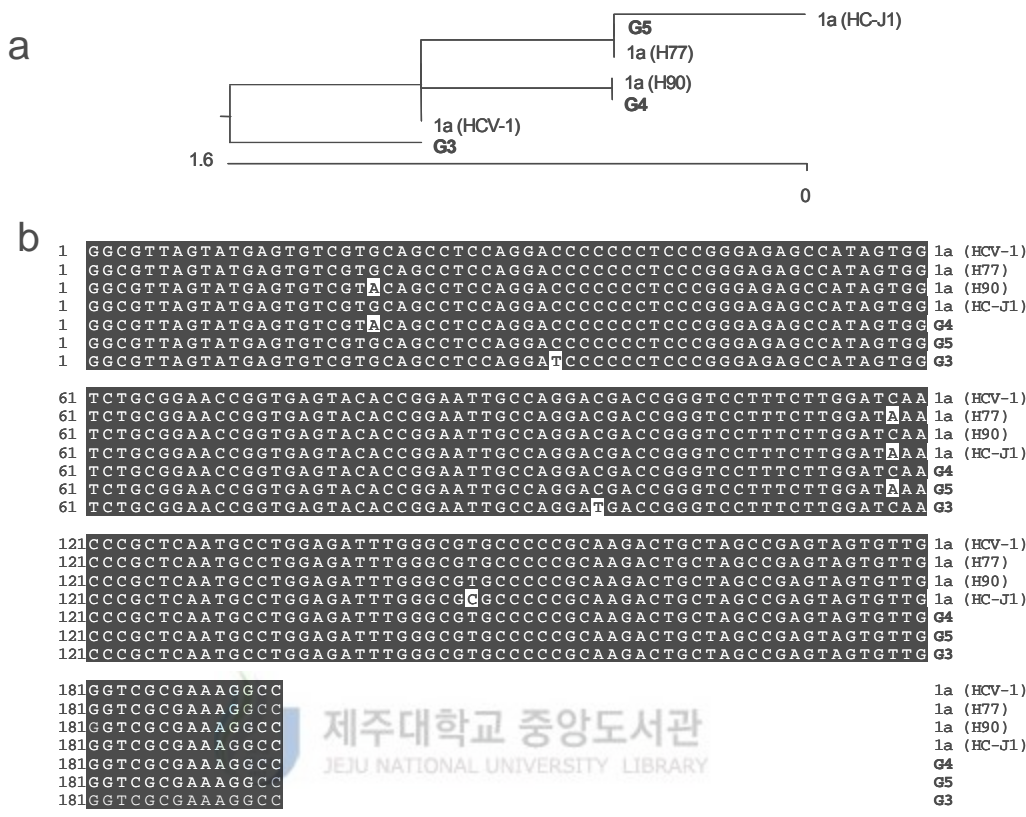
Figure 11. Dendrogram showing the phylogenetic relationship of HCVs from Jeju based on RNA sequences of 5'-UTR region. Numbers on the scale bar indicate the number of base substitutions. Similarity searches were performed with the BLAST program and the NCBI databases.

```

1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G7
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G4
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G9
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1a (H77)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1a (H90)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1a (HC-J1)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1a (HCV-1)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1b (FR21)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  1b (HCV-J)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G3
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G8
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2a (E-B9)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2a (HC-J6)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2a (K2A)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2b (HC-J8)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2b (K2B-1)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  2b (MA)
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G2
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G5
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G6
1  GGCGTTAGTATGAGTGTGCTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTAG  G1
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G7
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G4
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G9
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1a (H77)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1a (H90)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1a (HC-J1)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1a (HCV-1)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1b (FR21)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  1b (HCV-J)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G3
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G8
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2a (E-B9)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2a (HC-J6)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2a (K2A)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2b (HC-J8)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2b (K2B-1)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  2b (MA)
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G2
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G5
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G6
81  ACCGGAATTGCCGGAAGACGGGGTCTTTCTTGGATAAAACCACTCTATGCGCGGTCATTGGGCGTGCCCCCGCAAGA  G1
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G7
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G4
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G9
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1a (H77)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1a (H90)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1a (HC-J1)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1a (HCV-1)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1b (FR21)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  1b (HCV-J)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G3
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G8
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2a (E-B9)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2a (HC-J6)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2a (K2A)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2b (HC-J8)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2b (K2B-1)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  2b (MA)
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G2
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G5
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G6
161  CTGCTAGCCGAGTAGCTTGGGTTCGGAAGGCC  G1

```

Figure 12. Comparative analysis of 5'-UTR region of HCV genes from Jeju and other areas. Nucleotide sequence alignments were done by using Clustal method of the Lasergene program MegAlign (DNA star version 4.05). One representative of each HCV group found in Jeju residents was compared with 5'-UTR sequences of HCV 1 or 2 types.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 13. Phylogenetic tree(A) and multialignment(B) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 1a subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region. Numbers on the scale bar indicate the number of base substitutions.

A B A B A B A B A B

A B

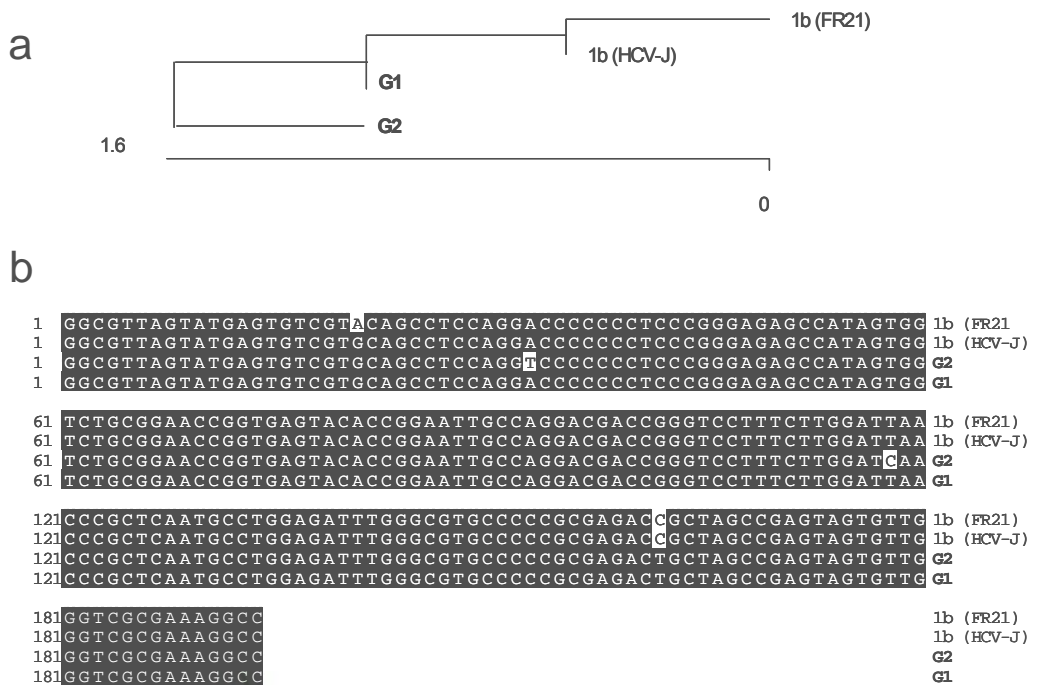


Figure 14. Phylogenetic tree(A) and multialignment(B) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 1b subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region. Numbers on the scale bar indicate the number of base substitutions.

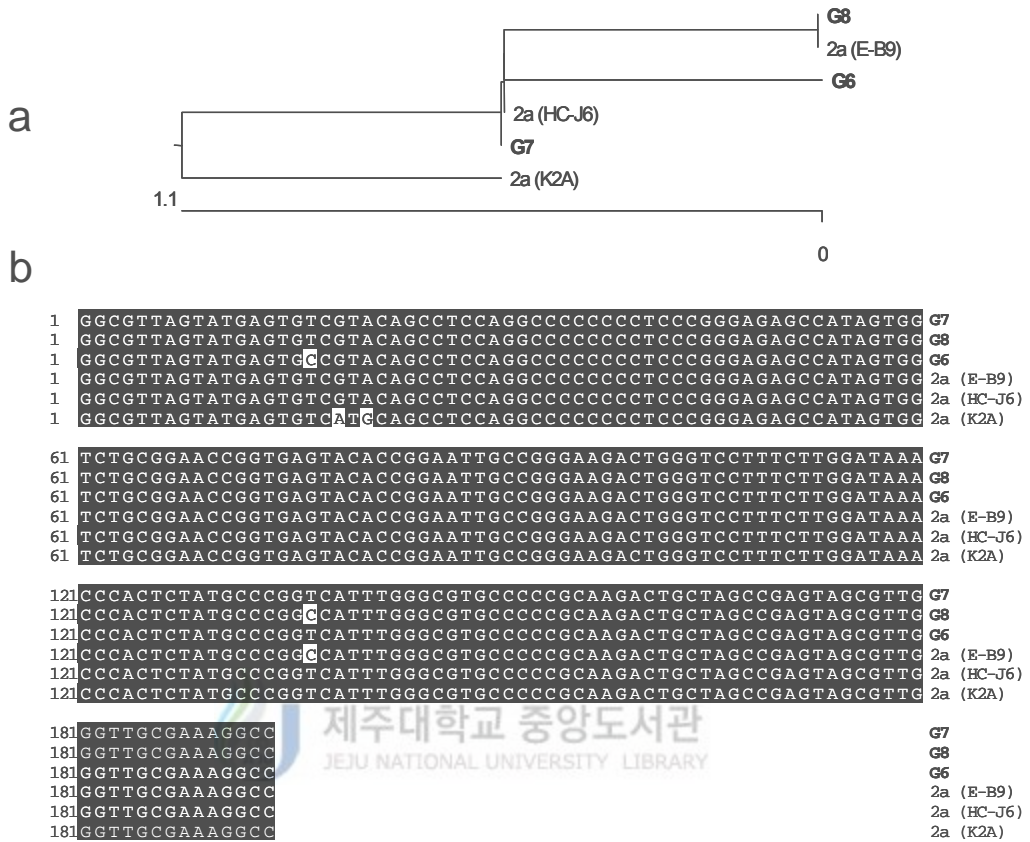


Figure 15. Phylogenetic tree(A) and multialignment(B) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 2a subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region. Numbers on the scale bar indicate the number of base substitutions.

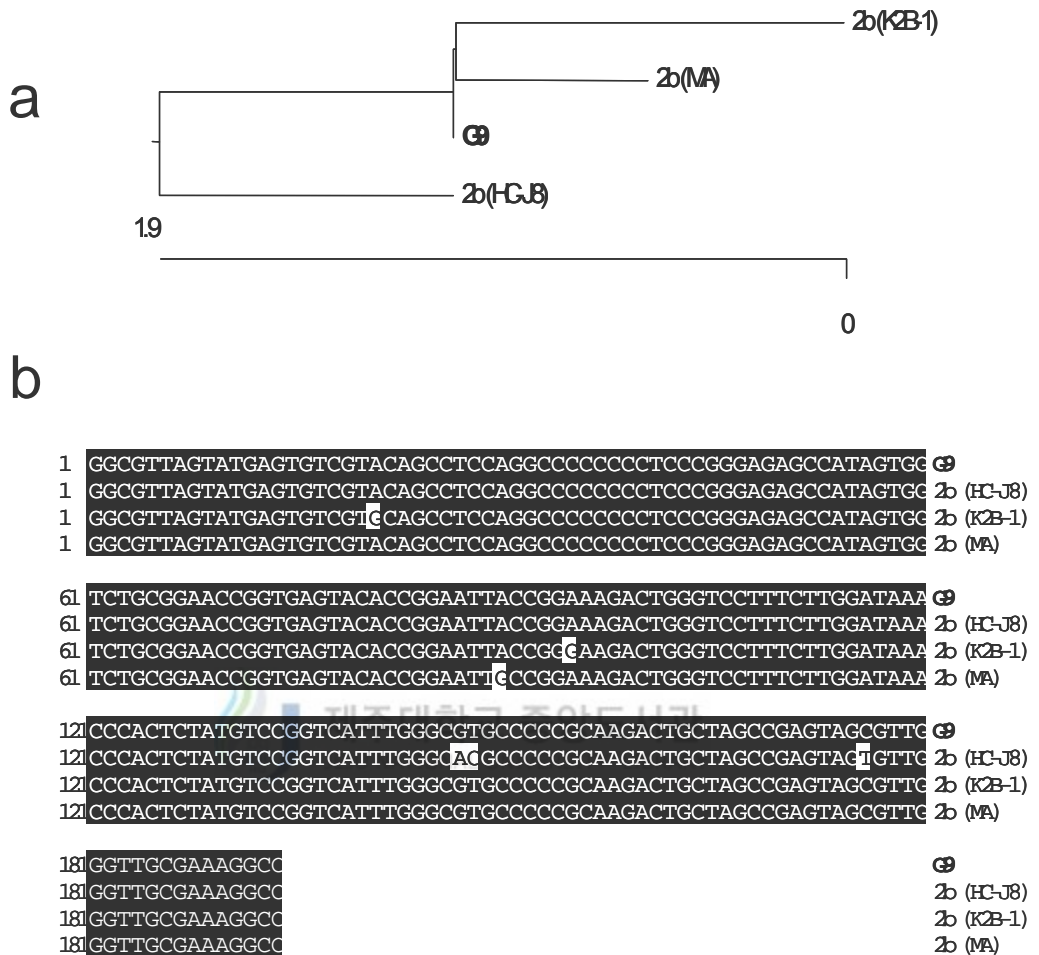


Figure 16. Phylogenetic tree(A) and multialignment(B) of hepatitis C viruses from Jeju which are close to 2b subtypes based on RNA sequences of 5'-UTR conserved region. Numbers on the scale bar indicate the number of base substitutions.

에서의 치료 효과와 일치하지 않을 경우에는 더욱 정확한 염기서열 분석이 필요할 것으로 여겨진다.

제주 주민에서 나타나는 HCV 1형에 속하는 클론들의 염기서열에 대한 제한부위를 분석한 결과, G3, G4, G5는 1a형에, 그리고 G1과 G2는 1b형에 속함을 알 수 있었다 (Figure 17). G4와 G5는 서로다른 제한효소 부위를 갖고 있었지만 기존의 HCV 1a형인 아형 H90 및 H77 제한 부위와 각각 동등함을 알 수 있었다. 반면, G3는 G5와 같은 제한 부위를 갖고 있음에도 불구하고 염기서열이 몇군데서 치환되어 있음을 알 수 있었다. HCV 2형에 속하는 것으로 추정되는 G6, G7, G8, 그리고 2b형에 속하는 G9에 대한 제한부위를 분석한 결과, G6와 G7은 한 개의 염기서열에서 차이가 나타났으나 제한효소 지도상에서는 E-B9으로 나타났으며, G8은 *Hae*III 부위가 존재함으로써 HC-J6로 분류되었다 (Figure 18). 기존의 HCV 유전자형과 본 논문에서 분석한 제주주민에서 나타난 9개의 HCV 유전자 형의 염기서열을 비교 분석하여 보면 HCV는 매우 다양한 염기서열의 차이를 나타남을 확인할 수가 있었다. 이로써 현재 일반적으로 사용하는 PCR-RFLP 법이나 PCR-hybridization 법보다는 PCR-direct sequencing 법이 정확하게 분석을 할 수가 있을 것으로 여겨진다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 첫째, HCV 5'-UTR부위의 RNA 서열분석을 통해 제주주민에서 나타나는 9개 group의 HCV가 4개의 아형인 1a, 1b, 2a, 2b형으로 나누어짐을 밝혔고,

둘째, 1b와 2a 아형과 가장 가까운 HCV 유전자형이 제주주민에서 가장 흔하게 나타남을 확인할 수가 있었다.

셋째, 제주주민에서 나타나는 몇몇 HCV 클론은 현재까지 전혀 알려져 있지 않았던 독특한 RNA 서열을 가지고 있음을 규명하여 특정 HCV의 탐지를 위해서는 RNA서열 분석의 중요성을 제시해 주었다.



Figure 17. Comparative analysis of restriction enzyme maps of hepatitis C viruses obtained from Jeju resident which are assumed 1a or 1b subtypes.

The restriction sites for four enzymes, *Bst* I, *Hae*III, *Nci* I, and *Rsa* I, used for PCR-RFLP analyses were indicated in the maps.

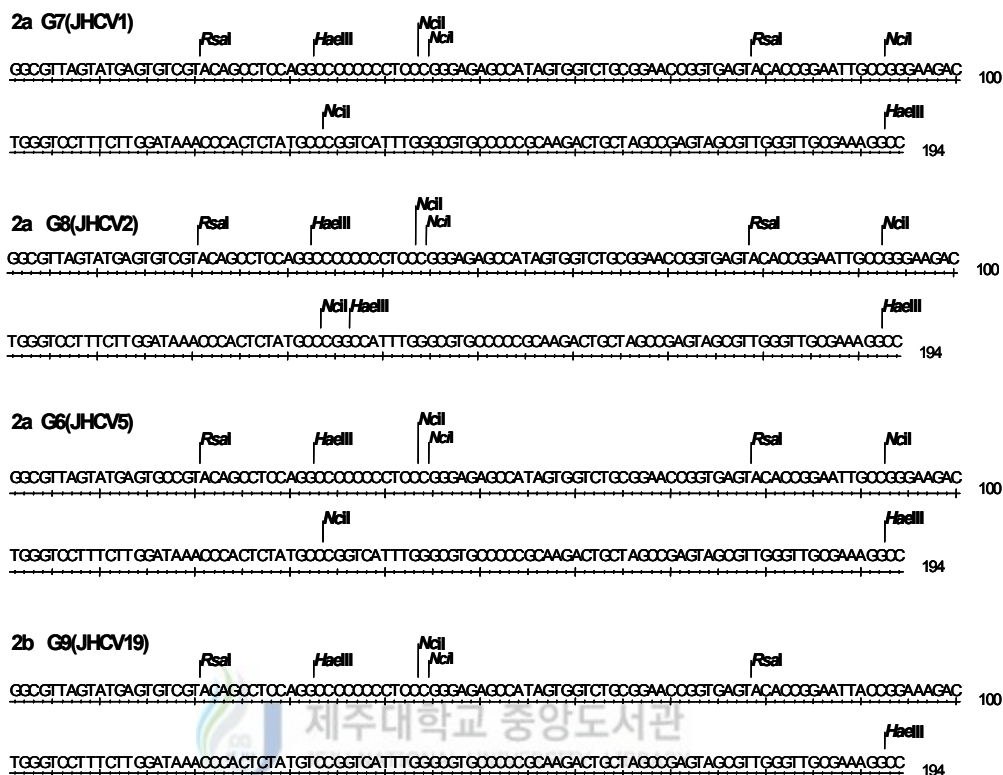


Figure 18. Comparative analysis of restriction enzyme maps of hepatitis C viruses obtained from Jeju residents which are assumed 2a or 2b subtypes.

The restriction sites for four enzymes, *Bst* I, *Hae*III, *Nci* I, and *Rsa* I, used for PCR-RFLP analyses were indicated in the maps.

요 약

본 연구에서는 HCV RNA를 측정하는 데 있어 기존의 RT-PCR법을 개선한 one-tube RT-PCR법을 이용하고, 이를 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)법과 비교하여 보았다. 총 81명이 ELISA 법에서 양성으로 나타났으나, one-tube RT-PCR법에서는 54명 (66.7%)이 양성을 나타내어, 33.3%의 높은 불일치율을 보였다.

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 법으로 HCV의 유전자형을 결정하기 위하여, RT-PCR을 통해 얻어진 54개의 HCV의 5'UTR 부위 cDNA 산물을 4개의 제한효소 (*Bst*UI, *Hae*III, *Nci*I, *Rsa*I)를 이용하여 절단한 결과, HCV 1a형이 5.6%, 1b형이 50.0%, 2a형이 42.6%, 2b형이 1.8%로 나타났다.

RT-PCR법에 의해 양성으로 밝혀진 총 54명의 HCV환자의 혈액에서 얻은 RNA의 염기서열을 분석해본 결과 제주지역의 HCV 유전자형은 모두 9개의 group으로 구분되었고, 각 group을 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, 그리고 G9으로 명명하였다. HCV 1b 아형으로 추정되는 G1과 G2는 가장 흔하게 나타나는 클론이었으며, 본 연구에서 분석한 전체 클론 중 각각 약 26%와 24%의 빈도로 나타났다. 1a 아형으로 추정되는 G3, G4, 그리고 G5는 모두 1.8%의 출현빈도를 보였으며, 2a 아형으로 추정되는 G6, G7, 그리고 G8은 각각 9.2%, 18.5%, 그리고 14.8%의 빈도로 나타났다. 마지막으로, 2b 아형인 G9이 약 1.8%의 빈도로 나타났다. 이러한 결과는 HCV 5'-UTR부위의 PCR 산물에 대한 RFLP 분석을 통해 얻어진 결과와 일치함을 보여주었다. 그렇지만, 제주 지역에서 나타난 몇몇 클론은 5'-UTR부위의 RNA 서열에 있어 높은 다양성을 보여주었다. 1a 아형에 속하는 group, G3, G4, G5의 경우, G4에 속하는 클론 JHCV10과 G5에 속하는 클론 JHCV48은 각각 기존에 알려져 있는 HCV 1a 아형인 H90 및 H77과 100% 상동성을 보여주었다. 하지만, G3에 속하는

클론 JHCV24는 1a 아형인 HCV-1과 가장 높은 상동성을 나타내었지만 5'-UTR부위의 몇몇 군데의 염기가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 몇몇 염기의 치환은 가장 흔하게 나타난 group, G1과 G2에서도 확인되었는데, G1 혹은 G2에 속하는 여러 개의 클론의 RNA서열이 100% 상동성과 일치성을 보여주는 실험상의 신뢰도를 고려해 볼 때 제주주민에서 나타난 HCV가 독특한 유전자형을 가지고 있음을 제시해 주었다. 2a 아형에 속하는 G6, G7, 그리고 G8의 경우, G8에 속하는 모든 클론이 기존의 2a형인 E-B9과 100% 상동성을 보여주었지만, G6와 G7에 속하는 클론들에서는 군데군데 염기가 치환되어 있음을 확인할 수가 있었다. 그리고, 2b형으로 추정되는 G9에 속하는 유일한 클론 JHCV19 또한 기존의 알려져 있는 RNA의 염기서열과는 다른 염기배열을 하고 있음을 본 연구에서 규명하였다. 이러한 사실은 몇몇 HCV 아형들이 RFLP에 의해서는 구분되어 질 수 없으며 따라서 특정 HCV 아형들을 동정하기 위해서는 RNA 염기서열 분석이 필요함을 제시해 주었다.



참 고 문 헌

- Abacioglu, Y. H., Davidson, F., Tuncer, S., Yap, P. L., Ustacelebi, S., Yulug, N., and Simmonds, P. 1995. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J. Viral Hepat.* 2, 297-301.
- Alter, H. J., Gerety, J., and Smallwood, L. A. 1982. Sporadic non-A, non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban US population. *J. Infec. Dis.* 145, 886-893.
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Shin, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q.-L., and Kuo, G. 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New Engl. J. Med.* 321, 1494-1500.
- Ballardini, G., Manzin, A., Giostra, F., Francesconi, R., Groff, P., Grassi, A., Solforosi, L., Ghetti, S., Zauli, D., Clementi, M., and Bianchi, F. B. 1997. Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment. *J. Hepatol.* 26, 779-786.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V. 2000. Replication of hepatic C virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1631-1648.
- Blumberg, B. S., Alter, H. J., and Visnich, S. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *J. Am. Med. Assoc.* 191, 541.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., and Ozturk, M. 1991. Selective G to T mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350, 429-431.

- Bresters, D., Cuypers, H. T. M., Reesink, H. W., Schaasberg, W. P., Poel, C. L., Mauserbunschoten, E. P., Houghton, M., Choo, Q.-L., Kuo, G., Lesniewski, R., Troonen, H., and Lelie, P. N. 1992. Enhanced sensitivity of a 2nd generation ELISA for antibody to hepatitis C virus. *Vox. Sang.* 62, 213-217
- Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R. H. 1994. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8239-8243.
- Castelain, S., Zawadzki, P., Khorsi, H., Darchis, J. P., Capron, D., Sueur, J. M., Eb, F., and Duverlie, G. 1997. Comparison of hepatitis C virus serotyping and genotyping in French patients. *Clin. Diagn. Virol.* 7, 159-165.
- Cha, T. A., Beall, E., Irvine, B., Kolberg, J., Chien, D., Kuo, G., and Urdea, M. S. 1992. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7144-7148.
- Chayama, K., Saitoh, S., Arase, Y., Ikada, K., Matsumoto, T., Sakai, Y., and Kobayashi, M. 1991. Effect of interferon administration of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 13, 1040-1043.
- Cho, Y. G., Yoon, J. W., Jang, K. L., Kim, C. M., and Sung, Y. C. 1993. Full genome cloning and nucleotide sequence analysis of hepatitis C virus from sera of chronic hepatitis patients in Korea. *Mol. Cells* 3, 195-202.
- Choi, C. S., Kim, E. A., Park, Y. S., Lee, K. O., Lee, K. P., and Lee, Y. T. 1994. Detection of hepatitis C virus RNA in clinical sera

- by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Kor. Soc. Virol.* 24, 87-92.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Choo, Q.-L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina, S. R., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G., and Houghton, M.** 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2451-2455.
- Choo, Q.-L., Weiner, A. J., Overby, L. R., Kuo, G., Houghton, M., and Bradley, D. W.** 1990. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 46, 423-441.
- Chou, W. H., Sheu, L., Shu, F. C., Shu, H. S., Chih, F. L., Saito, I., Miyamura, T., Sheng, Y. L., and Jau, S. W.** 1991. Molecular cloning of cDNA of hepatitis C virus genome from a healthy carrier in an aboriginal community with high prevalence of HCV infection. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 4, 147-157.
- Damen, M., Sillekens, P., Cuypers, H. T., Frantzen, I., and Melsert, R.** 1999. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J. Virol. Methods.* 82, 45-54.

- Davidson, F., Simmonds, P., Ferguson, J. C., Marvis, L. M., Dow, B. C., Follett, E. A. C., Seed, C. R. G., Krusius, T., Lin, C., Medgyesi, G. A., Kiyokaea, H., Olim, G., Duraisamy, G., Cuypers, T., Saeed, A. A., Teo, D., Conradie, J., Kew, M. C., Lin, M., Nuchapreyoon, C., Ndimbie, O. K., and Yap, P. L. 1995. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J. Gen. Virol.* 76, 1197-1204.
- Desmet, V. J., Gerber, M., Hoofnagle, J. H., Manns, M., and Scheuer, P. J. 1994. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19, 1513-1520.
- Di Bisceglie, A. M., Goodman, Z. D., Ishak, K. G., Hoofnagle, J. H., Melpolder, J. J., and Alter, H. J. 1991. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 14, 969-974.
- Di Bisceglie, A. M., Simpson, L. H., Lotze, M. T., and Hoofnagle, J. H. 1994. Development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease due to hepatitis C viral infection. *J. Clin. Gastroenterol.* 19, 222-226.
- Dixit, V., Quan, S., Martin, P., Larson, D., Brezina, M., and DiNello, R. 1995. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2978-2983.
- Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P. L., Sherlock, S., McIntyre, N., and Simmonds, P. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific

differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19, 13-18.

- Enomoto, N., Sakuma, T., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., and Yamamoto, C.** 1995. Comparison of full length sequences of interferon sensitivity and resistant hepatitis C virus 1b: sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitution in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 96, 224-230.
- Enomoto, N., Takada, A., Nakao, T., and Date, T.** 1990. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1021-1025.
- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D., Miller, R. H., Shin, J. W., Jett, B., and Purcell, R. H.** 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New Engl. J. Med.* 325, 89-104.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., and Purcell, R. H.** 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 7, 1026-1028.
- Garson, J. A., Ring, C., Tuke, P., and Tedder, R. S.** 1990a. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 336, 878-879.
- Garson, J. A., Tedder, R. S., Briggs, M., Tuke, P., and Glazebrook, J. A.** 1990b. Detection of hepatitis C viral sequence in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335, 1419-1422.
- Germer, J. J., Rys, P. N., Thorvilson, J. N., Persing, D. H.** 1999. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence

- analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2625-2630.
- Greene, W. K., Cheong, M. K., Ng, V., and Yap, K. W. 1995. Prevalence of hepatitis C virus sequence variants in South-East Asia. *J. Gen. Virol.* 76, 211-215.
- Hada, H., Koide, N., Hanafusa, T., Takabatake, H., Sakaguchi, K., Shinji, T., Sakaki, S., Oka, T., Takayama, N., Yumoto, Y., and Tsuji, T. 1993. Classification of hepatitis C virus into subgroups on the basis of sequence variations in the envelope protein. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 70-74.
- Halfon, P., Trimoulet, P., Bourliere, M., Khiri, H., de Ledinghen, V., Couzigou, P., Feryn, J. M., Alcaraz, P., Renou, C., Fleury, H. J., Ouzan, D. 2001. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J. Clin. Microbiol.* 39, 1771-1773.
- Hino, K., Sainokami, S., Shimoda, K., Iino, S., Wang, Y., Okamoto, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. 1994. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 42, 299-305.
- Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. and Choo, Q.-L. 1991. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14, 381-391.
- Kaneko, S., Unoura, M., Kobayashi, K., Kuno, K., Murakami, S., and Hattori, N. 1990. Detection of serum hepatitis C virus RNA. *Lancet* 335, 976.

- Kanistanon, D., Neelamek, M., Dharakul, T., and Songsivilai, S.** 1997. Genotypic distribution of hepatitis C virus in different regions of Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1772-1776.
- Karachristos, A., Linardopoulos, S., Ergazaki, M., and Spandidos, D. A.** 1995. Detection and analysis of hepatitis C virus by a combined RT-PCR method: variation in the 5' non-coding region of the viral genome. *J. Med. Microbiol.* 42, 367-371.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K.** 1990. A structural protein encoded by the 5' region of the hepatitis C virus genome efficiently detects viral infection. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1092-1094.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., and Shimotohno, K.** 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9524-9528.
- Kato, N., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K.** 1989. Japanese isolates of the non-A, non-B hepatitis viral genome show sequence variations from the original isolate in the USA. *Proc. Jpn. Acad.* 65, 219-223.
- Keeffe, E. B., Dusheiko, G. M., James, S. P., Mullen, K. D., Everson, G. T., Pimstone, N. R., Donovan, J., Albert, D.** 1999. Utility of hepatitis C virus serotypes in predicting response to treatment of chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 5, 207-210.
- Ko, J. S., Choe, Y. H., Kimm, E. J., Lee, E. H., Jang, J. J., Seo, J. K.**

2001. Interferon-alpha treatment of chronic hepatitis C in children with hemophilia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32, 41-44.
- Kuma, U., Brown, J., Monjardino, J., and Thomas, H. C.** 1993. Sequence variation in the large envelope glycoprotein (E2/NS1) of hepatitis C virus during chronic infection. *J. Infect. Dis.* 167, 726-730.
- Kuo, G., Choo, Q.-L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., and Miyamura, T.** 1989. An assay for circulating antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362-364.
- Kwok, S., and Higuchi, R.** 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
- Lee, H. S., Han, C. J., and Kim, C. Y.** 1993. Predominant etiologic association of hepatitis C virus with hepatocellular carcinoma compared with hepatitis B virus in elderly patients in a hepatitis B-endemic area. *Cancer* 72, 2564-2567.
- Lee, J. K., Hong, S. I., Min, W. K., Hwang, Y. S., Lee, S. H., Sung, Y. S., and Lee, D. S.** 1996. Distribution of hepatitis C virus genotypes among patients with HCV RNA positive liver diseases and blood donors in Korea. *Kor. J. Clin. Pathol.* 16, 528-539.
- Lee, S. S., Song, N. S., and Park, Y. S.** 1997. Polymorphism analysis of *Helicobacter pylori* urease A gene in gastric cancer samples. *J. Kor. Cancer Assoc.* 29, 375-382.
- Linnen, J., Wages, J., Zhang-Keck, Z.-Y., Fry, K. E., Krawczynski,**

K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shin, J. W.-K., Young, L., Piatak, M., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J.-C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Hess, G., Fung, S. K. H., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H., and Kim, J. P. 1996. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271, 505-508.

Lopez-Labrador, F. X., Ampurdanes, S., Forns, X., Castells, A., Saiz, J. C., Costa, J., Bruix, J., Sanchez, A. U., Tapias, J. M., Jimenez de Anta, M. T., and Rodes, J. 1997. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 27, 959-965.

McOmish, F., Chan, S. W., Dow, B. C., Gillon, J., Framr, W. D., Crawford, R. J., Yap, P. L., Follett, E. A. C., and Simmonds, P. 1993. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donor: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* 33, 7-13.

McOmish, F., Yap, P. L., Dow, B. C., Follett, E. A. C., Seed, C., Keller, A. J., Cobain, T. J., Krusius, T., Kolho, E., Naukkarinen, R., Lin, C., Lai, C., Leong, S., Medgyesi, G. A., Hejjas, M., Kiyokawa, H., Fukada, K., Cuypers, T., Saeed, A. A., Al-Rasheed, A. M., Lin, M., and Simmonds, P. 1994. Geographical distribution of different hepatitis C virus

- genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.* 32, 884-892.
- Mellor, J., Walsh, E. A., Prescott, L. E., Jarivis, L. M., Davidson, F., Yap, P. L., and Simmonds, P.** 1996. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in South East Asia by using a core-based genotyping assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 417-423.
- Miller, R. H., and Purcell, R. H.** 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 2057-2061.
- Miyamura, T., Saito, I., and Katayama, T.** 1990. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 983-987.
- Nakao, T., Enomoto, N., Takada, N., Takada, A., and Date, T.** 1991. Typing of hepatitis C virus (HCV) genomes by restriction fragment length polymorphisms. *J. Gen. Virol.* 72, 2105-2112.
- Nishioka, K., Watanabe, J., Furuta, S., Tanaka, E., Iino, S., Suzuki, H., Tsuji, T., Yano, M., Kuo, G., Choo, Q.-L., Houghton, M., and Oda, T.** 1991. A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 67, 429-433.
- Nolte, F. S.** 2001. Hepatitis C virus genotyping: Clinical implications and methods. *Mol. Diagn.* 6, 265-277.
- Nolte, F. S., Thurmond, C., and Fried, M. W.** 1995. Pre-clinical

- evaluation of amplicor hepatitis C Virus test for detection of hepatitis C Virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1775-1778.
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H., and Purcell, R. H. 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3392-3396.
- Oh, M. J., Chung, E. K., Shin, Y. M., Lee, K. O., and Park, Y. S. 1997. The apolipoprotein E genotyping using the PCR-RFLP was useful to linkage analysis of Alzheimer's disease families. *Exp. Mol. Med.* 29, 161-164.
- Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S. I., Yoshizawa, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Muchmore, E. E., Peterson, D. A., Ito, Y., and Mishiro, S. 1992a. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190, 894-899.
- Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Kurai, K., Iizuka, H., Machida, A., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.* 72, 2697-2704.
- Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Tanaka, T., Sugai, Y., Akahane, Y., Machida, A., Mishiro, S., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. 1990a. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5' non coding region. *Jpn. J. Exp. Med.* 60, 215-222.

- Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, S., Tanaka, T., Yoshizawa, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. 1990b. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn. J. Exp. Med.* 60, 167-177.
- Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y., Tanaka, T., Sato, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. 1992b. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.* 73, 673-679.
- Park, B. C., Han, B. H., Ahn, S. Y., Lee, S. W., Lee, D. H., Lee, Y. N., Seo, J. H., and Kim, K. W. 1995. Prevalence of hepatitis C antibody in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Korea. *J. Viral Hepat.* 2, 195-202.
- Park, Y. S., Lee, K. O., Oh, M. J., and Chai, Y. G. 1998. Distribution of genotypes in the 5' untranslated region of hepatitis C virus in Korea. *J. Med. Microbiol.* 47, 643-647.
- Reid, A. E., Koziel, M. J., Aiza, I., Jeffers, L., Reddy, R., Schiff, E., Lau, J. Y., Dienstag, J. L., Liang, T. J. 1999. Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1619-1626.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., and Verme, G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18, 997-1003.

- Saito, I., Miyamura, M., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q.-L., Houghton, M., and Kuo, G. 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6547-6549.
- Shakil, A. O., Conry-Cantilena, C., and Alter, H. J. 1995. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic and histologic features. *Ann. Intern. Med.* 123, 330-337.
- Sherlock, S. 1992. Viral hepatitis. *Lancet* 339, 802.
- Shimizu, Y. K., Feinstones, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 23, 205-209.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., and Urdea, M. S. 1993a. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* 74, 2391-2399.
- Simmonds, P., McOmish, F., Yap, P. L., Chan, S. W., Lin, C. K., Dusheiko, G., Saeed, A. A., and Holmes, E. C. 1993b. Sequence variability in the 5' non coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J. Gen. Virol.* 74, 661-668.
- Simonetti, R. G., Camma, C., Fiorello, F., Politti, F., D'amico, G., and Pagliaro, L. 1991. Hepatocellular carcinoma: a worldwide

- problem and the major risk factors. *Dig. Dis. Sci.* 36, 962-972.
- Stuyver, L., Van der Arnhem, W., Wyseur, A., Hernandez, F., Delaporte, E., and Maertens, G.** 1994. Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10134-10138.
- Takada, N., Takase, S., Enomoto, N., Takada, A., and Date, T.** 1992. Clinical backgrounds of the patients having different type of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 14, 35-40.
- Takada, N., Takase, S., Takada, A., and Date, T.** 1993. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J. Hepatol.* 17, 277-283.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., and Reyes, G. R.** 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120-131.
- Taniguchi, S., Okamoto, H., Sakamoto, M., Kojima, M., Tsuda, F., Takana, T., and Munekata, E.** 1993. A structurally flexible and antigenetically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 195, 297-301.
- Thiers, V., Jaffredo, F., Tuveri, R., Chodan, N., and Brechot, C.** 1997. Development of a simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) based assay for HCV genotyping and comparative analysis with genotyping and serotyping tests. *J.*

Viol. Methods. 65, 9-17.

- Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, I., and Nomoto, A.** 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66, 1476-1483.
- Urdea, M. S., Wuestehube, L. J., Laurensen, P. M., and Wilber, J. C.** 1997. Hepatitis C-diagnosis and monitoring. *Clin. Chem.* 43, 1507-1511.
- Vargas, H. E., Wang, L. F., Laskus, T., Poutous, A., Lee, R., Demetris, A., Dodson, F., Casavilla, A., Fung, J., Gayowski, T., Singh, N., Marino, I., and Rakala, J.** 1997. Distribution of infecting hepatitis C virus genotypes in end-stage liver disease patients at a large American transplantation center. *J. Infect. Dis.* 175, 448-450.
- Viazov, S., Kuzin, S., Paladi, N., Tchernovetsky, M., Isaeva, E., Mazhul, L., Vasychova, F., Widell, A., and Roggendorf, M.** 1997. Hepatitis C virus genotypes in different regions of the former Soviet Union (Russia, Belarus, Moldova, and Uzbekistan). *J. Med. Virol.* 53, 36-40.
- Wang, Y., Tao, Q. M., Zhao, H. Y., Tsuda, F., Nagayama, R., Yamamoto, K., Tanaka, T., Tokita, H., Okamoto, H., and Miyakawa, Y.** 1994. Hepatitis C virus RNA and antibodies among blood donors in Beijing. *J. Hepatol.* 21, 634-640.
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K., and Bonino, F.** 1991a. Variable and hypervariable domains are found in the region of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and

- the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848.
- Weiner, A. J., Christoperson, C., Hall, J. E., Bonino, F., Saracco, G., Maurizia, R. B., and Crawford, K. 1991b. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. *J. Hepatol.* 13, 6-14.
- Weiner, A. J., Kuo, G., and Bradley, D. W. 1990. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 335, 1-3.
- Widell, A., Verbaan, H., Wejstal, R., Kaczynski, J., Kidd-Ljunggren, K., Wallerstedt, S. 2000. Hepatocellular carcinoma in Sweden: its association with viral hepatitis, especially with hepatitis C viral genotypes. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 147-152.
- Wu, C. H., Lee, M. F., and Kuo, H. S. 1997. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors in Taiwan. *Jpn. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 625-628.
- Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T., Itoh, Y., Takayanagi, M., Higashi, Y., Shibata, M., and Morishima, T. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16, 293-299.
- Zanetti, A. R., Tanzi, E., Zehender, G., and Magni, E. 1990. Hepatitis C virus RNA in symptomless donors implicated in post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 336, 448.
- Zein, N. N. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 23-35.
- Zein, N. N., Rakela, J., Krawitt, E. L., Reddy, K. R., Tominaga, T., and Persing, D. H. 1996. Hepatitis C virus genotypes in the

United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann. Intern. Med.* 125, 634-639.



감 사 의 글

주님의 은총으로 오늘의 결실을 맺게 됨을 감사 드립니다.

그동안 저에게 도움을 주신 분들께 일일이 찾아 뵙고 고마움을 전하여야겠지만 먼저 지면으로 인사드립니다.

부족함이 많은 저에게 따뜻한 격려와 자상한 지도 편달을 아끼지 않으신 오덕철 교수님께 진심으로 감사드립니다. 논문이 완성될수 있도록 세심한 지도를 하여주신 오문유 교수님, 김세제 교수님, 이두식 교수님, 고영상 교수님의 고마움을 항상 간직하면서 살아가겠습니다.

학위를 마칠 수 있도록 배려하여 주신 김병찬 학장님께 감사드립니다. 곁에서 는 염려와 사랑으로 잘 가르쳐주신 김문홍 교수님, 허인옥 교수님, 이용필 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사드립니다. 존경하는 선두현 교수님 내외분께 감사의 말씀과 항상 건강하시길 빕니다. 미처 생각지 못한 부분까지 상세히 지적하고 보완해 주신 강형일 박사님께 감사의 마음을 드리며 많은 도움을 준 미생물 실험실 식구들, 조교선생들에게 고마움을 전합니다.

늘 마음으로 위로와 도움을 주신 임상병리과 문인경 교수님, 김인환 교수님, 박신영 교수님, 박지은 조교에게 고마움을 표합니다

평생 자식을 위해 헌신하시고 인내와 염려로 끝까지 보살펴주신 사랑하는 부모님께 정말 고마움을 전하고 싶습니다. 묵묵히 지켜보면서 응원하여주신 장인 장모님 그리고 처가집 식구들에게 감사의 마음을 전합니다. 친지 어르신들과 병보, 병흠, 병학, 민호가족에게도 고마움을 전하며 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

어렵고 힘든 현실에서도 늘 큰힘이 되어주고 언제나 따뜻한 마음으로 멀리서 응원해준 친구 강정구씨 가족, 김철수씨 가족, 김현철씨 가족, 김홍식씨 가족, 박성수씨 가족, 박희곤씨 가족, 윤유영씨가족에게 고마움을 전합니다. 오늘에 이르기까지 사랑과 인내로 지켜준 나의 가족 아내와 딸에게 이 모든 영광을 돌리고자 합니다.

2002년 7월