

Micro-PCR과 Real-Time PCR을 이용한 B형 간염 바이러스 검출

강 원 · 박상범 · 남윤형 · 인영창 · 이싱현 · 장원철* · 박수민[†] · 김종완[‡] · 정성춘[§]

단국대학교 첨단과학부 화학과, 기초과학연구소

^{*}제넷바이오

[†]단국대학교 의과대학 임상병리과

[‡]삼성테크윈

(2006. 5. 22 접수)

Detection of Hepatitis B Virus Using Micro-PCR and Real-Time PCR Methods

Won Kang, Sang-Bum Park, Youn-Hyoung Nam, Young-Chang An, Sang-Hyun Lee,

Won-Cheoul Jang*, Su-Min Park[†], Jong-Wan Kim[‡], and Song-Chun Chong[§]

Dept. of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute Dankook University,
Cheonan 330-714, Korea

[†]Chungnam Animal Science Center GenetBio, Konyang Univ, Nonsan 320-711, Korea

[‡]Dept. of Clinical Pathology, Dankook University Medical College, Cheonan 330-714, Korea

[§]Samsung Techwin, Sungnam 462-121, Korea

(Received May 22, 2006)

요 약. B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)는 만성감염, 간암의 원인이 되는 등 가장 큰 공중보건문 제 중의 하나이다. 그리하여 감염 초기에 바이러스의 DNA 농도를 측정하여 관찰 하는 것이 중요하다. 본 연 구에서는 기존의 Real Time-PCR과 새로운 방법인 Micro-PCR를 이용하여 HBV를 검출하였다. 단국대학교 병원 에서 HBV 감염 환자의 혈청 샘플 120개를 얻은 후 분석하였고 각각 장비에서의 검출한계와 재현성, 민감성, 특 이성, 분석시간을 비교해 보았다. 그 결과 Micro-PCR과 Real-Time PCR은 높은 검출한계와 재현성, 민감성, 특이 성을 가지고 있었다. 그러나 Micro-PCR은 Real-Time PCR보다 빠른 시간 안에 증폭이 가능하며 조작하는데 있 어 간편하였고 적은 양의 시약이 소비됨을 알 수 있었다. 그러므로 Micro-PCR은 신뢰성 있고 빠른 임상적 진단 이나 각종 검사가 요구되는 곳에서 이용 가치가 높은 장비라 할 수 있겠다.

주제어: B형간염바이러스, Real-Time PCR, Micro-PCR

ABSTRACT. Hepatitis B is a serious public health problem leading to chronic infection and liver cancer. Quantitation of circulating hepatitis B virus (HBV) is important for monitoring disease progression and for assessing the response to antiviral therapy. In this study, by using Real-Time PCR and novel Micro-PCR assay method, we measured HBV concentration in the clinical sample. A total of 120 serum samples from patients with HBV infection collected was in Dankook university hospital to compare the detection limit, sensitivity, specificity and reproducibility of the two assay methods. These findings of this study suggest that Micro-PCR and Real-Time PCR assay methods are comparable to each other in there detection limit, sensitivity, and reproducibility for HBV DNA quantitation. However, Micro-PCR assay is more efficient than Real-Time PCR method, because Real-Time PCR is not so time - consuming, technically easy and need to reagent of a small quantity. It will be useful for rapid and reliable clinical diagnosis of HBV in many countries.

Keywords: Hepatitis B Virus, Real Time-PCR, Micro-PCR

서 론

세계 전체 인구의 약 20억에 해당되는 사람들이 HBV에 감염된 적이 있고 3억 5천만명 정도가 만성 HBV 감염자이다. 매 해마다 약 1백만명이 HBV로 인한 간암 혹은 간기능 마비로 사망한다.

HBV는 내부에 genome을 함유하는 core와 외부에 B형 간염 표면항원(HBsAg)이 있는 lipoprotein envelope로 구성되어 있다. 혈청에서 전자현미경으로 관찰하면 3가지 particle(Dane particle, spherical particle, filamentous particle)이 관찰된다. Genome은 3200개의 nucleotide로 구성되어 있으며 긴 minus-strand DNA와 짧은 plus-strand DNA로 구성되어 있고 4개의 ORF(open reading frame) 또는 gene을 포함하고 있다. Core(pre-c/c) gene은 nucleocapsid를, pol(p) gene은 DNA polymerase를, surface(S) gene은 envelop protein의 생산에 관여한다. S gene에는 pre-S1, pre-S2 있고 그 외에 X gene이 있다. X gene의 기능은 정확히 규명되어 있지 않으나 HBx는 바이러스 증식을 증가시키고 세포 유전자와 바이러스 유전자의 transcription을 transactivation 시켜서 간세포암의 발생에 관여한다.¹⁻¹⁰

최근 HBV를 검출하기 위해 기존 PCR법보다 빠르고 농도 측정을 정확하게 할 수 있는 Real-Time PCR법이 도입되었다. Real-Time PCR법은 반응용액 속에 형광물질을 첨가하여 이 형광물질이 DNA 이중나선 사이에 결합되면서 실시간으로 정량측정 할 수 있는 장비이다. Real-Time PCR법에 첨가하는 형광물질로는 SYBR Green, TaqMan probe, Molecular beacon, Scorpion probe, FRET probe 등이 있으며 이중 SYBR Green이 저렴하면서 비교적 정확한 값을 나타내어 가장 많이 사용되고 있다.

SYBR Green은 반응 중에 나타나는 threshold cycle(Ct) value와 반응이 끝난 후 melting temperature(Tm) value를 이용하는 방법으로 Ct value는 baseline 형광값 표준 편차의 10배의 수치에 도달하는 PCR cycle 수로 정의한다. template의 농도가 높을수록 빠른 시간 안에 나타나는 점을 이용하여 시간대별로 정량 곡선을 그려 측정할 수 있다. Tm value는 증폭된 PCR산물에 SYBR Green이 intercalating 된 후 온도가 높아짐에 따라 이중나선이 떨어지면서 같이 SYBR Green도 PCR산물에서 분리된다. 분리되기 시작한 온도부터 모두 분리된 온도의 값의 평균을 구한 값이 Tm이 된다.

따라서 이를 이용하여 증폭여부 및 종을 판단 할 수 있다.¹¹⁻¹⁸

Micro-PCR법은 Real-Time PCR법과 검출 방법은 같지만 마이크로칩의 개념을 도입하여 소량의 시료를 이용하고 온도 조절을 보다 빠르고 정확하게 할 수 있는 새로운 Real-Time PCR법이다.¹⁹

본 연구에서는 HBV의 검출을 위해 Real-Time PCR과 Micro-PCR법을 사용하였고 두 장비의 검출한계와 재현성, 민감성, 특이성, 분석시간에 대한 반복 테스트를 시행하여 비교, 평가하였다.

실험 및 방법

환자 및 Control 샘플

본 연구에서는 단국대학교 병원에서 HBV에 감염된 환자의 혈청 샘플 120개를 대상으로 하였다.

Positive Control(HBV plasmid DNA, ATCC 45020D)은 제넷바이오(GeNet Bio, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

시약 및 기기

시약

혈청에서 HBV-DNA 추출에는 PrimePrep™ Genomic DNA Isolation Kit(GeNet Bio, Korea)를 사용하였고 Real-Time PCR과 Micro-PCR에 사용된 반응 시약은 Master mix™(GeNet Bio, Korea)을 사용하였다. 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™(Q-bio gene, USA)을 이용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA), GENSPECTOR TMC-1000 SYSTEM(Samsung, Korea), Rotor-Gene™ 3000(Corbett research, USA)을 사용하였고, PCR 증폭물 확인은 Mupid-a(Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다.

실험 방법

혈청에서 HBV-DNA를 추출하여 PCR법을 통하여 타겟(target) 부위를 증폭을 시킨 후 증폭된 DNA를 전기영동법에 의해 확인하였고 이를 정제하였다. 정제

된 증폭산물이 HBV-DNA가 맞는지 최종적으로 확인하기 위해서 DNA 염기서열분석법을 시행하였다. 그 후 동일한 Master mix를 가지고 HBV plasmid DNA와 임상 샘플을 Micro-PCR과 Real-Time PCR법에 적용시켰다.

혈청에서 HBV-DNA의 추출

혈청 600 μ L를 1.5 mL 원심 분리 관에 proteinase K(20 mg/mL) 20 μ L와 결합완충용액(binding buffer) 200 μ L 넣고 vortex 시킨 후 56 °C에서 10 분간 반응시켰다.

2 mL 시험관에 수집 컬럼(collection column)을 넣고 컬럼에 반응용액을 조심스럽게 옮긴 후 8000 rpm에서 1 분간 원심 분리하여 여과되어서 모아진 용액은 버리고 500 μ L 세척완충용액 1(washing buffer 1)로 세척하고 이것을 12,000 rpm에서 1 분간 원심 분리 후 여과되어서 모아진 용액을 버리고 500 μ L 세척완충용액 2 (washing buffer 2)로 반복 하였다. 마지막으로 12,000 rpm에서 2 분간 원심 분리하였다. 그리고 수집 컬럼을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 50 μ L 용리완충용액(elution buffer)을 넣고 실온에서 2 분간 반응하고 13,000 rpm에서 1 분간 원심 분리하여 모아진 용액을 1.5 mL 마이크로 시험관에 옮긴 후 4 °C에 보관하거나, 장기간 보관하기 위해서는 -20 °C에 저장하였다.

프라이머 제작(Primer design)

HBV-DNA core region에서 증폭하기 위한 프라이머 세트(Table 1)를 제작하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)

우선 94 °C에서 5 분간 주형 DNA를 완전히 변성시킨 후(hot start) 다시 94 °C에서 30 초간 변성(denaturation), 60 °C에서 30 초간 결합(annealing), 72 °C에서 40 초간 신장(extension) 단계를 40 회 반복하고 마지막으로

로 72 °C에서 7 분간 마지막 신장(last extension)을 실시하였다. PCR 반응 용액은 총 볼륨 20 μ L이며 10X reaction buffer(100 mM tris-HCl; pH 9.0, (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂, PCR enhancers) 2 μ L, 10 mM dNTP mix (2.5 mM each.) 2 μ L, forward and reverse primer(10 pmole/ μ L each.) 1 μ L, *Taq.* polymerase(5 U/ μ L) 0.1 μ L, template DNA(1 ng/ μ L) 10 μ L, deionized water 3.9 μ L로 구성되어 있다. DNA 증폭은 GeneAmp[®] PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)를 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

Agrose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

2%(w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-*at*(Advanc, Japan) 전기 영동장치로 PCR 산물을 분석하였다.

Agarose 2 g과 0.5X TBE(tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL 섞어 2% gel을 만든 후 PCR 산물 4 μ L와 6X bromophenol blue(BPB) dye 0.8 μ L를 섞어서 gel에 loading하고 100 V에서 25 분 동안 전기영동 시켰다. 그 후에 gel을 ethidium bromide(EtBr)로 10 분간 염색하고 다시 10 분간 증류수로 DNA와 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다.

마지막으로 UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려놓고 PCR 여부를 확인했다.

실시간 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

Master mix와 DNA를 1:1로 섞어 20 μ L의 PCR 반응 용액을 0.2 mL PCR 반응 시험관에 넣은 후, Real-Time PCR(Corbett, Rotor-Gene, USA)을 이용해서 우선 50 °C에서 2 분간 Uracil-N-Glycosylase를 활성화시키고 95 °C에서 1 분간 주형 DNA를 완전히 변성시킨 후 다시 94 °C에서 20 초간 변성, 60 °C에서 20 초간 결합, 72 °C에서 30 초간 신장 단계를 40회 반복하여 DNA를 증폭시켰고 마지막으로 60~90 °C 까지 melting curve를 그려 분석하였다.

PCR 반응을 위한 Master mix는 한번에 100 μ L를 제조하여 사용하였으며 조성은 아래와 같다. 10X reaction buffer(100 mM tris-HCl; pH 9.0, (NH₄)₂SO₄, PCR enhancers, BSA, Stabilizer) 20 μ L, 10 mM dNTP mix (2.5 mM each.) 20 μ L, MgCl₂(100 mM) 10 μ L, SYBR[®] Green (20X) 10 μ L, Primer mix(10 pmole/ μ L each.) 10 μ L, *Taq.* Polymerase(5 U/ μ L) 4 μ L, Deionized water 26 μ L.

Table 1. Primer sequence sets used to amplify HBV-core region for PCR

	Sequence of primers Sense (5' → 3') Antisense (5' → 3')	Size of fragment (bp)
Sense	ATT TGG TGT CTT TCG GAG TGT G	113
Antisense	GGA CCT GCC TCG TCG TCT AA	

마이크로칩 중합효소연쇄반응(Micro-PCR)

Master mix와 DNA를 1:1로 섞어 3 μL 의 PCR 반응 용액을 준비한 후 마이크로칩 표면에 붙어있는 보호 tape을 뚫은 핀셋을 이용하여 조심스럽게 떼어낸다. 준비된 반응 용액에서 1 μL 을 취하여 마이크로칩 안에 분사하고 optical tape을 붙인 후 모듈 안에 넣는다. Micro-PCR(Samsung, TMC-1000, Korea)을 이용해서 우선 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 Uracil-N-Glycosylase를 활성화 시키고 91 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 주형 DNA를 완전히 변성시킨 후 다시 92 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1초간 변성, 62 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초간 결합 및 신장, 단계를 40회 반복하여 DNA를 증폭시켰고 마지막으로 60-90 $^{\circ}\text{C}$ 까지 melting curve를 그려 분석하였다.

Master mix는 Real-Time PCR과 동일한 것으로 사용하였다.

결과 및 고찰

HBV plasmid DNA를 통한 재현성 테스트

동일한 샘플을 Micro-PCR과 Real-Time PCR법을 이용하여 한번에 6개의 동일 샘플을 30번 반복 시행하여 각 실험간 재현성을 테스트 하였다. 실시간 모니터링 시스템은 Master mix속에 들어있는 SYBR Green이 DNA 이중나선 사이로 결합되어 나타나는 형광을 측정함으로써 Ct와 Tm을 알 수 있고 이를 통해 샘플의 농도, 증폭유무 및 종을 확인 할 수 있다. Ct value는 증폭이 초기에 나타나는 copy의 형광 값으로 Template의 농도가 많을수록 빠른 시간 내에 나타난다. Tm value는 반응이 끝난 후 65-90 $^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 올려주게 되면 DNA의 이중나선이 단일 가닥으로 떨어지면서 SYBR Green이 방출되게 되는데 염기서열에 따라 방출되는 온도가 다르다. 이 특정 온도를 이용하여 원하는 DNA가 맞는지 확인할 수 있다. 재현성 테스트 결과 Real-Time PCR법의 Ct value와 Tm value는 17.5 \pm 0.5 cycle과 79.5 \pm 0.8를 Micro-PCR법의 경우는 12.6 \pm 0.4 cycle과 79 \pm 1를 나타냈다(Table 2, Fig. 1-4).

HBV plasmid DNA를 통한 민감성 테스트

HBV-DNA 원액($1.3 \times 10^8 \text{ copy}/\mu\text{L}$)을 serial dilution 하여 $1.3 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 의 농도에서 검출 테스트를 한 결과 각각의 장비에서 농도별 Ct 간격이 3-4 cycle을 유지하며 나타나는 것을 확인하였다(Table 3, Fig. 5-7).

Table 2. Comparison of the PCR results conducted on Micro-PCR with Real-Time PCR

Test	Machine	Micro-PCR	Real-Time PCR
Detection range		$10^5 \sim 10^3 \text{ (copy}/\mu\text{L)}$	$10^5 \sim 10^3 \text{ (copy}/\mu\text{L)}$
PCR time		25 min	30 min
PCR volume		1 μL	20 μL
Ct/deviation		12.6 \pm 0.4cycle	17.5 \pm 0.5cycle
Tm/deviation		79 \pm 1	79.5 \pm 0.8

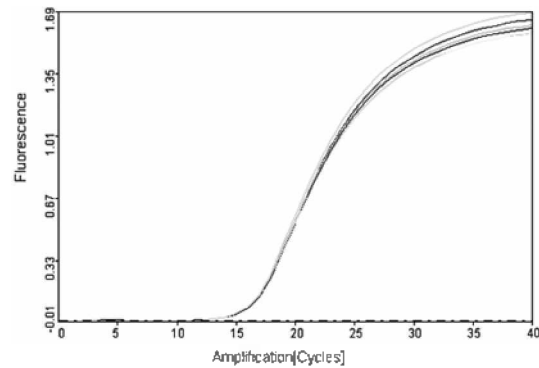


Fig. 1. Micro-PCR amplification of HBV plasmid DNA ($10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$).

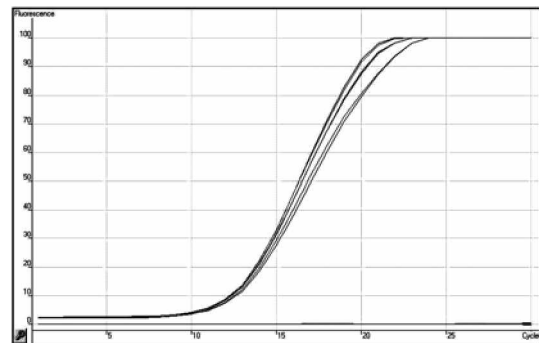


Fig. 2. Real-Time PCR amplification of HBV plasmid DNA ($10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$).

임상 샘플을 통한 특이성 테스트

HBV 감염 환자로 판정된 혈청 샘플 120개 이용하여 두 장비에 대한 특이성 테스트 하였다(Table 4). 그 결과 Micro-PCR법은 57개의 샘플에서 Real-Time PCR법은 56개의 샘플에서 검출이 되었다.

결 론

HBV-DNA를 실시간으로 모니터링 하기 위하여 기

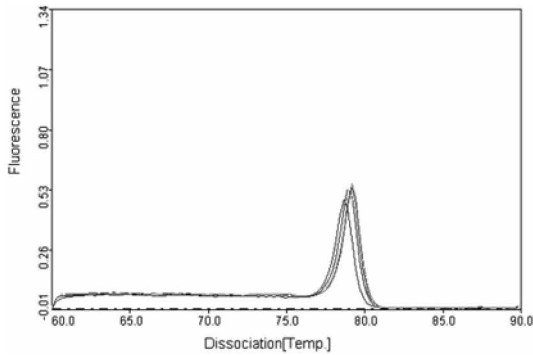


Fig. 3. Melting curve analysis of Micro-PCR.

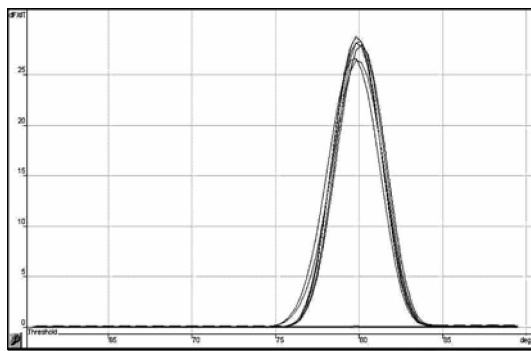


Fig. 4. Melting curve analysis of Real-Time PCR.

Table 3. Comparison of the sensitivity conducted on Micro-PCR with Real-Time PCR

Machine Concentration(copy/ μ L)	Micro-PCR	Real-Time PCR
1.3×10^8	10.3 cycle	14.4 cycle
1.3×10^7	13.4 cycle	17.9 cycle
1.3×10^6	17.4 cycle	21.4 cycle
1.3×10^5	21.6 cycle	25.0 cycle
1.3×10^4	26.1 cycle	28.6 cycle
1.3×10^3	31.2 cycle	30.9 cycle

존에 알려져 있고 현재 많이 사용하고 있는 Real-Time PCR법과 마이크로칩의 개념을 도입하여 새롭게 개발된 Micro-PCR법을 가지고 비교실험을 하였다.

첫 번째로 재현성 테스트 결과 Real-Time PCR법의 Ct와 Tm value는 17.5 ± 0.5 cycle과 79.5 ± 0.8 , Micro-PCR법의 경우는 12.6 ± 0.4 cycle과 79 ± 1 가 나타남으로써 편차 범위가 비슷함을 알 수 있었다. 두 번째로 검출 가능한 농도 범위 테스트 결과는 $1.3 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^3$ copy/

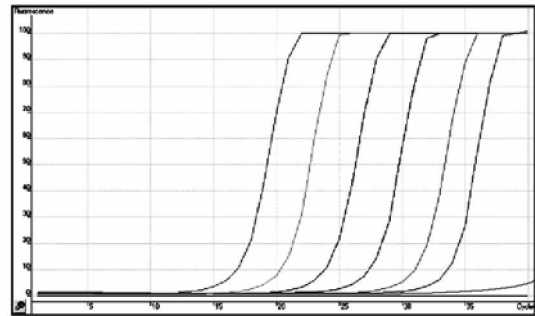


Fig. 5. In situ monitoring of Real-Time PCR with a broad range of concentration from 1.3×10^9 to 1.3×10^8 copies/ μ L of HBV plasmid DNA, from left to right (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , N).

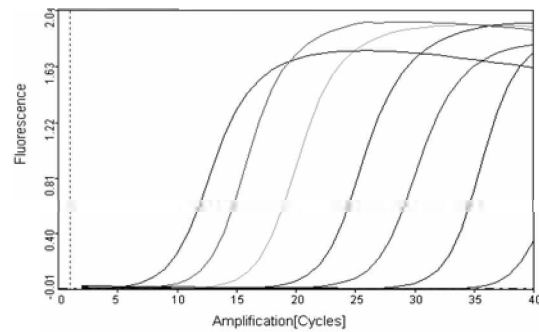


Fig. 6. In situ monitoring of Micro-PCR with a broad range of concentration from 1.3×10^9 to 1.3×10^8 copies/ μ L of HBV plasmid DNA, from left to right (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , N).

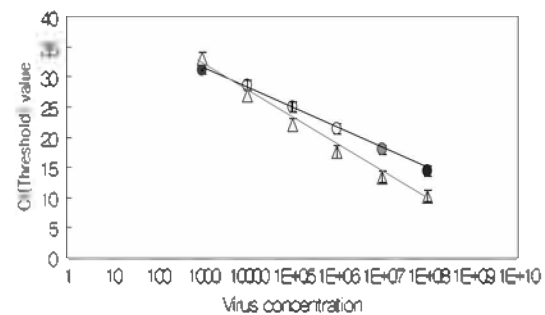


Fig. 7. Serially diluted HBV plasmid DNA was amplified and analysed in real time. The Ct values were plotted against virus concentration.

μ L의 범위로 동일한 결과를 나타냈다. 세 번째로 임상 샘플에 대한 특이성 테스트 결과에서는 전체 120개의 혈청 샘플 중에서 Real-Time PCR법은 56개의 샘플에서 Micro-PCR법은 57개 샘플에서 검출이 됨

Table 4. Comparison of the clinical sensitivity and specificity conducted on Micro-PCR with Real-Time PCR.

Concentration(copy/ μ L)	Machine	Micro-PCR	Real-Time PCR
1.3×10^8		0/57	0/56
1.3×10^7		0/57	0/56
1.3×10^6		6/57	6/56
1.3×10^5		9/57	9/56
1.3×10^4		13/57	13/56
1.3×10^3		29/57	28/56

으로써 두 장비가 가지고 있는 특이성 또한 매우 유사하다는 것을 보여줬다. 검출 된 수가 낮은 이유는 B형 간염 바이러스 DNA의 소멸과 낮은 검출 한계의 영향이라 볼 수 있다. 그 외에 PCR에 소요되는 시간은 Micro-PCR법이 25 분, Real-Time PCR법은 80 분이 소요됐고 소모되는 시약의 양도 Micro-PCR법이 1/10~1/50 적게 소모됨을 확인함으로써 각종 진단이나 검사법에 매우 유용하다는 사실을 알 수 있었다. 더욱이 Micro-PCR법은 6 개의 모듈로 이루어져 있어 여러 가지의 조건으로 실험할 수 있고 서로 다른 유전자를 동시에 검출해 낼 수 있고 컴퓨터와 PCR machine이 하나로 이루어져 있어 이동이 용이 하여 다 방면에 응용 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 Micro-PCR법은 많은 수의 샘플을 동시에 할 수 없고 PCR 불륨이 적기 때문에 연구목적으로 사용하기에는 다소 어려운 점이 있다.

본 저자는 앞으로 Micro-PCR과 Real-Time PCR법을 응용하여 B형 간염 바이러스 이외에도 결핵, 탄저균, 살모넬라, 브루셀라 등 다양한 균 및 바이러스에 적용할 계획이다. 그리고 마지막으로 인간 유전자의 돌연변이 검출까지 확대, 응용하여 기존의 방법으로 5시간 이상 걸리는 돌연변이 검출시간을 1 시간 이내로 단축시킴으로써 돌연변이 검출의 새로운 방법을 제시하고자 한다.

인용문헌

1. Ruben Bonilla Guerrero, Lewis R. Roberts. *The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology* **2005**, *42*, 760.
2. Ponsiano Ocama, MD, Christopher K. Opio, MD, William M. Lee, MD. *Hepatitis B virus infection: Current*

- status. The American Journal of Medicine* **2005**, *118*, 1413.e15.
3. Chemin, I.; Trépo, C. *Clinical impact of occult HBV infections. Journal of Clinical Virology* **2005**, *34*, S15.
4. Barros, M. F.; Rodrigues, P. A.; Matias, S. R.; Carreira, L. M.; Machado-Caetano, J. A. *Detection of hepatitis B virus core mutants by PCR-RFLP in chronically infected patients. Journal of Virological Methods* **2004**, *120*, 125.
5. Guy Vernet, Nathalie Tran. *The DNA-Chip technology as a new molecular tool for the detection of HBV mutants. Journal of Clinical Virology* **2005**, *34*, S49.
6. Stephen Locarnini, William S. Mason. *Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. Journal of Hepatology* **2006**, *44*, 422.
7. Rodolfo H. Campos, Viviana A. Mbayed, Flavia G. Pineiro y Leone. *Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. Journal of Clinical Virology* **2005**, *34*, S8.
8. Xiaodong Zhang, Hang Zhang and Lihong Ye. *Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **2006**, *147*, 58.
9. Alba Maria Ropero, M. Carolina Danovaro-Holliday.; Jon K. Andrus. *Progress in vaccination against hepatitis B in the Americas. Journal of Clinical Virology* **2005**, *34*, S14.
10. Faure, E. *Alternative peptide-fusion proteins generated by out-of-frame mutations, just upstream ORFs or elongations in mutants of Human Hepatitis B Viruses Virus Research* **2006**, *117*, 185.
11. Sunchai Payungporn, Pisit Tangkijvanich, Pojchanad Jantaradsamee, Apiradee Theamboonlers, Yong Poovorawan. *Simultaneous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Virological Methods* **2004**, *120*, 131.
12. Shiou-Hwei Yeh, Ching-Yi Tsai, Jia-Hong Kao; Chun-Jen Liu, Ti-Jung Kuo, Ming-Wei Lin, Wen-Ling, Huang, Shu-Fen Lu, Jane Jih, Ding-Shinn Chen, Pei-Jer Chen. *Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Hepatology* **2004**, *41*, 659.
13. Watzinger, F.; Ebner, K.; Lion, T. *Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular Aspects of Medicine* **2006**, *27*, 254.
14. Garson, J. A.; Grant, P. R.; Ayliffe, U.; Ferns, R. B.; Tedder, R. S. *Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. Journal of Virological Methods* **2005**, *126*, 207.
15. Jim O'Mahony, Colin Hill. *A real time PCR assay for*

- the detection and quantitation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using SYBR Green and the Light Cycler. Journal of Microbiological Methods* **2002**, *51*, 283.
16. Dixon, T. J.; Taggart, J. B.; George S. G. *Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (Platichthys flesus). Marine Environmental Research* **2002**, *54*, 267.
17. Martin E. Adelson, Melanie Feola, Jason Trama, Richard C. Tilton, Eli Mordechai. *Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. Journal of Clinical Virology* **2005**, *33*, 25.
18. 김재현, 최국선. *Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. 생물학전문연구보존센터(BRIC) BioWave* **2003**, *5*, 2.
19. Yoon-Kyoung Choa, Jintae Kima, Youngsun Lee, Young-A. Kim, Kak Nankoong, Heekyun Lim, Kwang W. Oha, Suhyeon Kim, Jungim Han, Chinsung Park, Y. Eugene, Pak, Chang-Seok Ki, Jong Rak Choi, Hyeon-Koon Myeong, Christopher Ko. *Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21*, 2161.
-