

## 온도 기울기(temperature gradient) 젤에서 Heteroduplex Analysis 기법을 이용한 돌연변이 DNA의 검출

조용석 · 구미자 · 박귀근\* · 박영서\* · 강종백

경원대학교 자연과학대학 화학과

\*공과대학교 식품생물공학과

(1998. 4. 8 접수)

## Detection of Mutated DNA Fragment by the Heteroduplex Analysis at the Temperature Gradient Gel

Yong-Suk Jo, Mi-Ja Goo, Gwi-Gun Park\*, Young-Seo Park\* and Jong-Back Gang

Department of Chemistry and \*Department of Food Science and

Biotechnology, Kyungwon University, Sunnam 461-701, Korea.

**ABSTRACT** : To detect the mutation in a given sequence, there are variety of methods developed by use of the gel electrophoresis. One of the methods, TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), is a popular technique because it can detect mutations in DNA fragment with ease and at low cost. This study used 200 bp BamHI-digested DNA fragment containing the human  $\epsilon$ -globin promoter which was mutated[ $\epsilon$ F1\*(-141), GATA-1\*(-163), and GATA-1\* &  $\epsilon$ F1\*]. This BamHI-digested DNA fragment was directly used to detect the mutated DNA fragment on 50% denaturant gel with temperature gradient of 45°C through 53°C. In agreement with the theoretical result of MELTSCAN program (Brossette and Wartell, 1994) the mobilities of mutated DNA fragments were shown to be nearly distinguished on the temperature gradient gel. In contrast to the above result, the heteroduplex analysis under the temperature gradient condition was shown to detect the mutated DNA fragments through the heteroduplex formation between strands of mutated DNA and wild-type DNA.

**Key words** : TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), Heteroduplex Analysis, Mutant DNA

### 서 론

돌연변이 유전자의 간편한 검출법은 유전자와 관련된 질환의 조기 진단에 필요할 뿐만 아니라 돌연변이 유전자를 필요로 한 연구에서 돌연변이의 일차적인 선별에 도움을 줄 것이다. 그래서 다양한 돌연변이 유전자 검출법의 개발로 방사능 동위원소를 사용하지 않고 간단한 실험으로 수행이 가능해졌다. 이런 다양한 돌연변이 유전자의 검출기법 중에서(Meyer *et al.*, 1986; Rosenbaum and riesner, 1987; Borresen *et al.*, 1991; Orita *et al.*, 1989) 보통의 수직 젤에 온도 기울기(temperature gradient)의 설정으로 유전자의 melting temperature 차이에 의하여 돌연변이 유전자를

검출할 수 있는 기법인 TGGE(Temperature Gradient Gel Electrophoresis) 그리고 야생형과 돌연변이 DNA 조각의 혼합으로 형성된 heteroduplex는 돌연변이된 부위의 single strand bubble로 인해 젤에서 이동속도의 감소로 돌연변이를 검출하는 Heteroduplex Analysis 기법을 병행하여 사용하였다.

여기서 사용된 유전자는 사람의  $\epsilon$ -글로빈 프로모터 부위로  $\epsilon$ F1\*과 GATA-1\*이 돌연변이 되었다.  $\epsilon$ F1\* 결합부위는 범존(汎存) 인자가 결합하며 일시적인 발현실험의 결과(Motamed *et al.*, 1993)에 의하면 음의 조절인자(negative regulatory element)로 작용한다. 그리고 GATA-1\*(Gong *et al.*, 1991) 결합부위는 적혈구 특이적 인자로 NF-E1나 Ery-

\*To whom correspondence should be addressed.

f1이 결합하며 5' HS-II enhancer와 상호작용에 필요한 것으로 알려져 있다.

일반적으로 TGGE 기법으로 돌연변이 유전자를 검출할 때는 MELTSCAN(Brossette and Wartell, 1994) 프로그램을 이용한 이론적인 계산이 선행되어야 한다. 왜냐하면 Ke *et al.*(1993)에서 제시한 조건에 의하면 돌연변이된 부위의 위치와 DNA 조각의 선정이 돌연변이의 검출을 좌우하기 때문이다. 그래서 본 연구는 임상적으로 돌연변이 유전자의 진단에 활용 가능성을 모색하기 위하여 앞에서 선정된 DNA 조각을 사용치 않고 단순히 제한효소의 절단으로 얻은 DNA 조각을 사용하였다. 역으로 이 DNA 조각을 MELTSCAN(Brossette and Wartell, 1994) 프로그램으로 계산한 결과는 Ke *et al.*(1993)에서 제시한 돌연변이 유전자의 검출 가능한 조건에 적합하지 않았다. 이 DNA 조각을 사용한 TGGE 실험에서 예상되듯이 각각의 돌연변이 DNA가 비슷한 이동거리를 보여 검출이 어려웠다. 그래서 검출능을 증가시키기 위해 온도기울기 젤에서 heteroduplex analysis 기법을 사용하여 돌연변이 검출의 가능성을 높였다.

## 재료 및 방법

### DNA 및 시약

본 연구에 사용된 DNA는 사람의  $\epsilon$ -글로빈 프로모터 부위가 클론된 pBlue- $\epsilon$ 870GH 플라스미드이며 캘리포니아 대학(University of California at Davis)의 Dr. James Shen에게 기증 받았다(Motamed *et al.*, 1993). 그리고  $\epsilon$ F1\*, GATA-1\*, GATA-1\* &  $\epsilon$ F1\*은 site-directed mutagenesis 방법으로 돌연변이 하였으며 염기배열의 변화는  $\epsilon$ F1\* (TGG  $\rightarrow$  CAT), GATA-1\* (GAT  $\rightarrow$  TGG)이며 손쉽게 돌연변이된 유전자를 선별하기 위하여 pBlue- $\epsilon$ 870GH 플라스미드에 유일한 제한효소 절단부위를 생성할 수 있도록 프라이머(primer)를 제작하였다. BamHI 제한효소는 New England Biolabs에서 구입했으며 40% 아크릴아마이드 용액(acrylamide/bisacrylamide, 37.5/1)은 시그마에서 구입했다. 그리고 이 실험에서 사용한 대부분의 시약은 시그마에서 구입하였다.

### MELTSCAN을 이용한 계산

pBlue- $\epsilon$ 870GH 플라스미드를 BamHI 제한효소로 절단하여 얻은 200bp DNA의 염기배열로 MELTSCAN 프로그램(Dr. R. Wartell 개발, Georgia Tech)을 이용하여 돌연변이 부위의 위치와 여러 정해진 변수들의 값을 입력하여 최적의 DNA 조각을 선별하였으며 그리고 염기배열에 따른 용해온도를 나타내는 melting profile 그래프와 derivative melting curve(DMC)를 얻었다(Brossette and Wartell, 1994).

### TGGE 실험

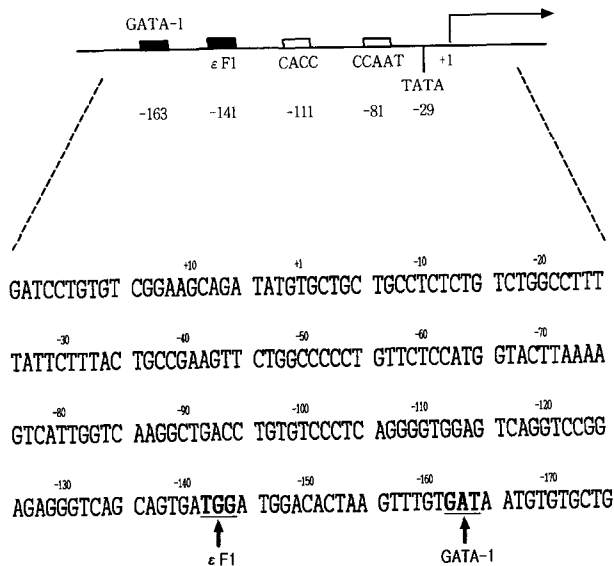
TGGE 실험에 6.5% polyacrylamide gel, 3.5M Urea 그리고 20% formamide를 포함한 50% denaturant 젤이다. TGGE는 수직 전기영동장치에 두 개의 알루미늄 블록(aluminum block)을 이용하여 위에서 아래로 또는 왼쪽에서 오른쪽으로 온도 기울기가 형성되게 하였다. 본 실험에 사용한 DNA는 pBlue- $\epsilon$ 870GH 플라스미드를 BamHI 제한효소로 절단한 후 더 이상의 분리 없이 사용하였다. 샘플을 젤에 loading 하기 전에 40~60분 동안 미리 전기영동을 수행했다. 전기영동 방향과 수직으로 온도 기울기를 걸어주어 DNA가 어떤 온도 범위에서 melting 되는지를 알아보기 위하여 30°C에서 70°C의 사이의 온도 기울기를 DNA 이동과 수직인 방향으로 설정하여 돌연변이 DNA를 포함하는 혼합물로 100V에서 7시간동안 전기영동시켰다. 다음으로 DNA 이동방향과 수평인 방향으로 온도 기울기를 45°C에서 53°C로 걸어준 후 DNA 샘플을 각각 10  $\mu$ l씩 전기영동하였다. 전기영동후 ethidium bromide로 staining시켜 결과를 디지털 카메라를 통하여 컴퓨터에 보관하였다.

### 온도기울기 젤에서 heteroduplex analysis 실험

온도기울기 젤에서 heteroduplex analysis 실험을 수행하기 위하여 동일한 량의 야생형과 돌연변이 유전자를 제한효소인 BamHI로 절단한 후 1% 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동하여 200bp의 DNA 조각을 잘라내어 dialysis bag를 사용하여 분리하였다. 그리고 페놀 추출과 에탄올 침전을 거친 후 20  $\mu$ l의 TE에 녹였다. 동일한 비율의 200bp DNA를 혼합하여 5분 동안 95°C에서 가열하여 재빨리 얼음에 둔다. 그리고 온도 기울기가 설정된 아크릴아마이드 젤에 샘플을 loading하여 전기영동 시킨다.

## 결 과

야생형  $\epsilon$ -글로빈 유전자의 프로모터 부위의 염기배열을 사용하여 MELTSCAN 프로그램으로 계산한 결과 250bp 길이의 DNA 조각이 선정되었다. 그러나 선정된 DNA 조각이 다음의 조건을 만족해야 TGGE 기법에 의하여 돌연변이 DNA를 분리할 수 있다(Ke *et al.*, 1993): 첫번째는 돌연변이된 부위가 선정된 DNA 조각에서 최초 용해 도메인(first melting domain)에 위치해야 한다. 둘째로 DMC 그래프에서 적어도 두 개의 피크(peak)를 가지며 피크의 간격이 최소 1°C는 되어야 한다. 여기서 DMC 그래프는 짝짓지 않은 염기쌍의 분율을 온도로 미분한 값( $d\theta/dT$ )의 온도(T)와의 상관관계를 나타낸다. 선정된 250bp DNA 조각은 DMC 그래프에서 하나의 피크만 나타내었다. 그러나 melting profile 그래프에서 돌연변이된 부위가 최초 용해

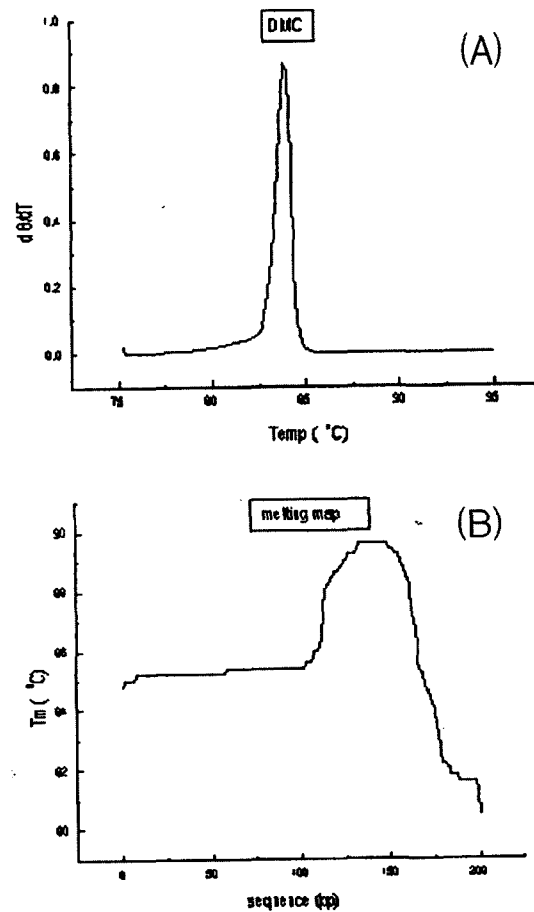


**Fig. 1.** Sketch of 200 bp BamHI-digested DNA fragment of pBlue-E870GH which contains the upstream region of the human  $\epsilon$  globin gene and part of the growth hormone gene.  $\epsilon$ F1 and GATA-1 sites are shown at -141 and -163. The sequences of 200bp human  $\epsilon$ -globin promoter region is shown along with the location of mutations at  $\epsilon$ F1\*(TGG→CAT), GATA-1\*(GAT→TGG), and  $\epsilon$ F1\*(TGG→CAT) & GATA-1\*(GAT→TGG).

도메인 가까이 위치한다(자료생략).

본 연구는 METSCAN 프로그램이 선정한 DNA 조각도 TGGE 실험에 이상적이지 않았다. 그래서 플라스미드 pBlue-ε870GH를 BamHI 제한효소에 의해 절단된 길이가 200bp DNA를 사용하였다. 이 200bp DNA 조각의 염기배열과 돌연변이 부위는 Fig. 1에서 표시하였다. 그리고 이 DNA 조각의 MELTSCAN 프로그램의 계산결과도 250bp DNA 조각과 비슷하였다(Fig. 2). 그래서 DNA에 부가적인 조각없이 TGGE 기법에 의하여 돌연변이 유전자의 검출이 어려울 것으로 여겨진다(Sheffield *et al.*, 1989). 200bp DNA 조각에 20 base GC clamp(5'-GGCGCGCGCGCGCGC-GCGCG-3')를 부가하여 얻은 DMC 그래프는 부가적인 작은 피크가 나타남을 볼 수 있다(Fig. 3-A). 그러나 melting profile 그래프에서 돌연변이된 부위 가까이는 큰 변화가 없었다(Fig. 3-B). 그리고 GC clamp의 길이를 40 base로 증가해도 그래프에 큰 변화를 나타내지 못하였다(자료생략).

본 연구는 임상적인 이용 가능성을 높이기 위하여 TGGE 기법으로 돌연변이된 200bp DNA의 검출을 시도하였다. TGGE 실험에서 알루미늄 판에 물을 순환시켜 형성된 온도 기울기가 알루미늄 판의 위치와 온도사이의 선형적인 관계를 보였다(자료 생략). 이론적인 결과로부터



**Fig. 2.** (A) Calculated DMC of 200 bp BamH I-digested DNA fragment described in Fig. 1. The temperature derivative of the the fraction of broken base pair,  $d\theta/dT$ , is plotted vs. temperature. (B) Calculated melting profile of 200 bp DNA fragment. The fragment includes the sequence from -175 to +25 in the upstream region of the human  $\epsilon$  globin gene. Melting temperature is plotted to the DNA sequence in 200 bp DNA fragment.

TGGE 실험의 온도범위를 산출하였다. 그래서 대략  $\sim 35^\circ\text{C}$ 에서 TGGE 실험을 수행하였으나 돌연변이 유전자의 검출이 불가능하였다(자료생략). 그래서 TGGE 실험의 최적 온도 조건을 결정하기 위하여 돌연변이 DNA인  $\epsilon$ F1\*, GATA-1\*, 야생형, GATA-1\* &  $\epsilon$ F1\* 등으로 수직 TGGE 실험을 행하였다(Fig. 4). 수직 TGGE는 DNA의 이동방향과 온도의 증가방향이 수직인 실험을 말한다. 이 실험의 결과는 Fig. 4에서  $30^\circ\text{C}$ 에서  $70^\circ\text{C}$  사이에서  $\epsilon$ F1\*과, GATA-1\*, 야생형, GATA-1\* &  $\epsilon$ F1\*의 분리가 대략  $50^\circ\text{C}$  주위에서 이동하는 속도가 차이가 났다. 이런 결과는  $50^\circ\text{C}$  주위의 온도 범위에서 돌연변이 주위의 염기배열에 따른 염기쌍의 용해에서 차이가 남을 볼 수 있다. 이 실험에서 어느 DNA

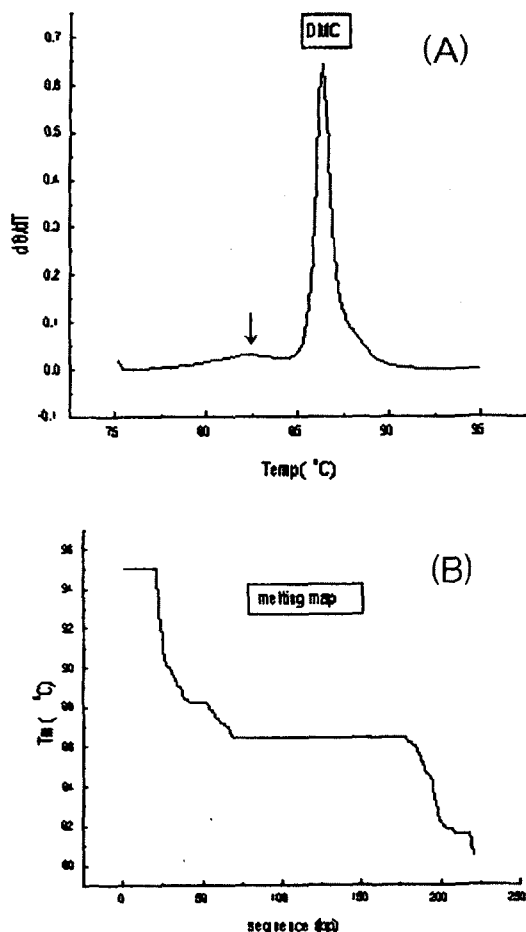


Fig. 3. Calculated DMC (A) and melting profile (B) described Figure 2 except that 20 bp GC clamp was attached to 5' end of 200 bp DNA fragment in Figure 1. The new peak was appeared in (A) with arrow.

의 이동속도가 빠르지는 결정하지 않았지만 돌연변이 유전자의 분리의 가능성과 적당한 온도를 확인할 수 있다. 그래서 45~53°C의 온도에서 돌연변이 DNA로 TGGE 실험을 수행하였으며 그 결과는 Fig. 5-B에서 나타내었다. 이 그림에서 보듯이  $\epsilon F1^*$ 과 GATA-1\* 돌연변이 혹은  $\epsilon F1^*$  & GATA-1\* 돌연변이가 겔에서 분리되지만 이동거리에서 큰 차이를 볼 수 없었다. Fig. 5-B에서 볼 수 있듯이 돌연변이 유전자의 이동속도는 대략 GATA-1\*,  $\epsilon F1^*$  & GATA-1\*, 야생형,  $\epsilon F1^*$ 의 순서이다. 여기서 돌연변이 DNA의 검출에 TGGE 기법의 이용에는 한계가 있음을 알 수 있다.

최근의 연구 결과(Ke and Wartell, 1993)에 의하면 METSCAN 프로그램의 계산으로 선정된 최적의 DNA 조각으로 수행한 TGGE 실험에서 부가적으로 생성된 heteroduplex가 homoduplex보다 훨씬 느린 이동 속도를 보였다. 그래서 본 연구는 온도기울기 겔에서 heteroduplex

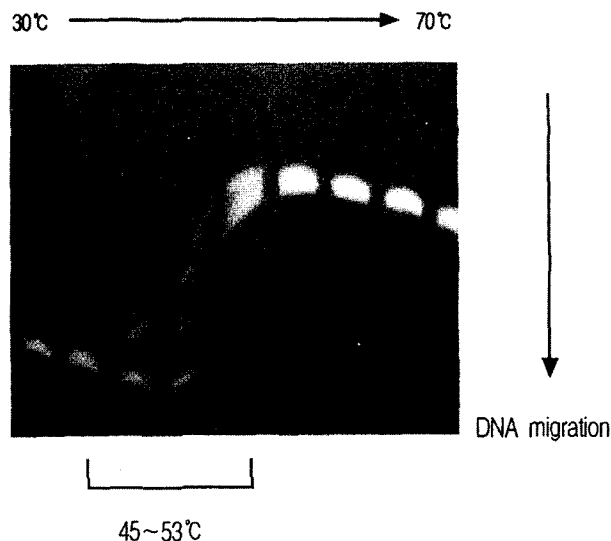


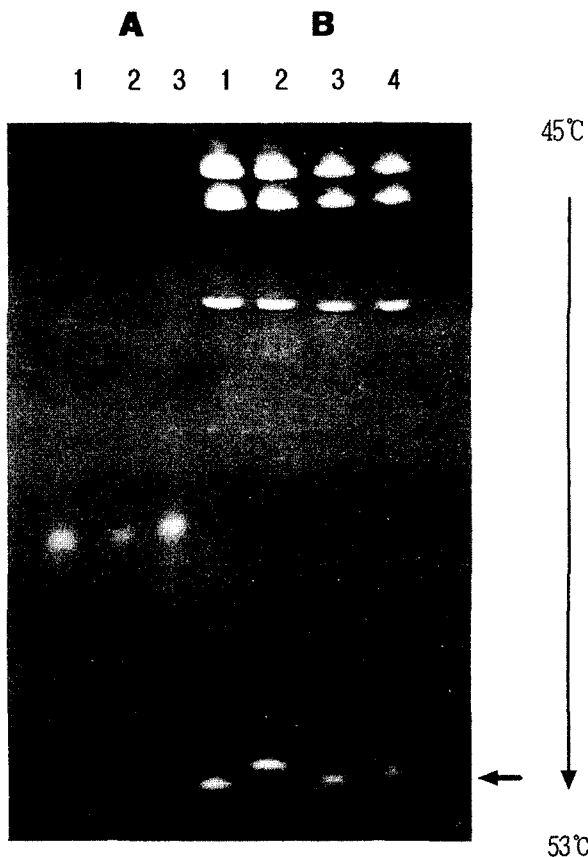
Fig. 4. A perpendicular temperature gradient gel of 200 bp DNA fragment. Temperature gradient was 300°C to 70°C from left to right. Sample contained wild-type,  $\epsilon F1^*$ , GATA-1\*, and GATA-1\*+ $\epsilon F1^*$ . The arrow in left is the direction of DNA migration.

analysis 기법으로 돌연변이의 검출 가능성을 확인하였다. Fig. 5-A와 Fig. 5-B를 비교해보면 DNA의 이동거리에서 현저한 차이가 남을 볼 수 있다. Fig. 5-A에서 세번째인  $\epsilon F1^*$  & GATA-1\* 돌연변이는 다른 것보다 훨씬 느린 이동 속도를 나타낸다. 이것은 형성된 heteroduplex에서 인접한 두 부위에 돌연변이된 염기가 존재하여 single strand bubble을 형성하기 때문이다. 여기에서 볼 수 있듯이 온도 기울기 겔에서 heteroduplex analysis 기법을 사용함으로써 돌연변이를 쉽게 검출할 수 있었다.

그리고 앞의 수직겔 실험의 결과에서 돌연변이 DNA의 분리가 최대인 온도는 ~48.5°C였다(Fig. 4). 그래서 48.5°C의 일정한 온도를 겔에 유지시킨 즉 CTGE(Constant Temperature Gel Electrophoresis) 조건에서 돌연변이 DNA의 검출 가능성을 확인하였으나 TGGE 실험의 결과보다 돌연변이된 DNA의 분리에서 약간 향상된 결과를 보였으나 온도 기울기에서 heteroduplex analysis 기법에 의한 분리보다 향상되지 않았다(결과 생략).

## 고 찰

본 연구는 사람의  $\epsilon$ -글로빈 프로모터에서 전사단계의 조절에 중요한 역할을 하는  $\epsilon F^*$ 과 GATA-1\* 위치에 돌연변이된 DNA조각을 검출하는 기법을 모색함으로써 선천적이거나 후천적인 유전질환의 조기 진단에 필요한 방법을 제공할 것이다. 최근에 돌연변이 유전자의 검출에 다양한 기법들



**Fig. 5.** (A) Heteroduplex analysis of 200 bp DNA fragment at the temperature gradient of 45°C to 53°C. Lane 1, 2, and 3 contained wild-type+GATA-1\*,  $\epsilon$ F1\*+wild-type, and  $\epsilon$ F1\* & GATA-1\*+wild-type, respectively. Experimental condition was described in Methods. (B) Parallel temperature gradient of 200 bp DNA fragment. Lane 1, 2, 3, and 4 contained GATA-1\*,  $\epsilon$ F1\*,  $\epsilon$ F1\* & GATA-1\*, and wild-type, respectively. The upper fragments in (B) were derived from the digestion of pBlue-E870GH. The fragments which mutated were shown with arrow. Electrophoresis was done on 50% denaturant polyacrylamide gel.

이 개발되었으며 이 중에서 손쉽게 이용 가능하며 비싼 장비가 필요 없는 기법은 TGGE이다. TGGE 기법으로 돌연변이 유전자를 쉽게 검출하기 위해서 돌연변이를 포함하는 적당한 DNA 조각을 MELTSCAN 프로그램을 이용하여 선정한다. 그러나 선정된 DNA 조각이 앞에서 언급한 조건 (Ke *et al.*, 1993)에 적합하면 TGGE 기법에 의한 돌연변이 유전자의 검출이 가능하다. 이것은 DNA 조각에서 돌연변이 부위가 최초 용해 도메인에 포함되어 온도에 의해 용해될 때 염기의 조성과 염기의 배열에 따른 차이가 DNA의 melting에 차이를 주어 DNA의 이동거리에 영향을 미친다. 이때 다른 쪽의 DNA 이중가닥은 그대로 유지되어야 한다.

그러나 Fig. 2에서 보듯이 TGGE 기법으로 200bp DNA 조각의 돌연변이를 확인하기가 어렵다. 일반적으로 이런 경우는 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 통하여 인위적으로 GC clamp(40개의 GC로 이루어진 조각)가 부착된 DNA 조각으로 검출에 이용하고 있다(Sheffield *et al.*, 1989). 그러나 이 경우에 적어도 돌연변이가 일어난 주위의 염기배열이 알려져 있어야 한다. 돌연변이 유전자의 검출이 이런 제한으로 인해 임상에 이용되기 어렵다.

Fig. 5-B에서 보듯이 TGGE 실험에서 가장 작은 이동거리를 나타내는  $\epsilon$ F1\*은 야생형의 염기배열인 TGG가 CAT로 바뀌어 이중가닥 사이의 수소 결합력이 강한 G·C 염기쌍이 결합력이 약한 A·T 염기쌍으로 치환되어 이동속도에 영향을 주었으며 그리고 염기배열의 stacking 상호작용에 의한 영향도 또한 이동속도에 영향을 주는 요소이다 (Wartell and Benight, 1985). 가장 큰 이동속도를 나타내는 GATA-1\*은 야생형이나  $\epsilon$ F1\*보다 많은 G·C 염기쌍을 보유하기 때문이다. 하지만 염기쌍의 비율이 같은 야생형과  $\epsilon$ F1\* & GATA-1\*의 이동속도의 차이는 수소 결합보다 염기배열에 의한 base stacking의 영향으로 생각된다. 그러나 매우 비슷한 이동거리로 인해 돌연변이 유전자의 검출이 쉽지 않았다. 이런 사실은 MELTSCAN 프로그램으로 계산한 결과와 일치한다.

돌연변이의 검출율을 높이기 위하여 온도기울기 젤에서 야생형과 돌연변이 DNA 조각으로 heteroduplex를 형성시킨 후 전기영동장치로 확인하였다. heteroduplex는 돌연변이된 부위에서 single strand bubble이 형성되어 야생형으로 이루어진 이중가닥보다 이동속도가 느리고 이와 더불어 열에 의하여 bubble 주위의 염기가 용해되어 이동속도를 더욱 감소시킨다. 여기서 예상할 수 있듯이  $\epsilon$ F1\* & GATA-1\*과 야생형으로 이루어진 heteroduplex가 가장 작은 이동거리를 보였다.

본 연구에서 TGGE 기법에 의한 돌연변이 유전자의 검출보다 온도기울기 젤에서 heteroduplex analysis를 사용함으로써 TGGE에 의한 돌연변이 유전자의 검출이 어려운 DNA 조각으로 부가적인 유전자 조작 없이 돌연변이 DNA의 검출이 가능하여 임상적으로 돌연변이 DNA 검출의 폭을 넓힐 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 '97년도 경원대학교에서 학술진흥을 목적으로 지급한 연구비로 수행된 과제이다. 이에 감사드립니다. 그리고 본 연구의 이론적인 계산에 도움을 준 Professor R. Wartell(School of Biology, Georgia Tech)에게 감사드립니다.

## 참고문헌

- Borresen, A.-L., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Maikin, D., Lystrad, S., Andersen, T.I., Nesland, J.M., Isselbacher, K. J. and Friend, S.H. (1991): Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p<sup>53</sup> mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8405-8409.
- Brossette, S. and Wartell, R.M. (1994): A program for selecting DNA fragment to detect mutations by denaturant gel electrophoresis methods. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4321-4325.
- Gong, Q., Stern, J. and Dean, A. (1991): Transcriptional role of a conserved GATA-1 site in the human  $\epsilon$ -globin gene promoter. *Mol. Cell. Biology*, **17**, 2558-2566.
- Ke, S.-H., Kelly, P.J., Wartell, R.M., Hunter, S.H. and Varma, V.A. (1993): Selecting DNA fragment for mutation detection by temperature gradient gel electrophoresis: Application to the p<sup>53</sup> gene cDNA. *Electrophoresis*, **14**, 561-565.
- Ke, S.-H. and Wartell, R.M. (1993): Influence of nearest neighbor sequence on the stability of base pair mismatches in long DNA: determination by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5137-5143.
- Meyer, R.M., Maniatis, T. and Lerman, L.S. (1986): Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymol.*, **155**, 501-511.
- Motamed, K., Bastiani, C., Zhang, Q., Bailey, A. and Shen, C.-K.J. (1993): CACC box and enhancer response of the human embryonic  $\epsilon$  globin promoter. *Gene*, **123**, 235-240.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989): Derection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770.
- Rosenbaum, V. and Riesner, D. (1987): Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.*, **26**, 235-246.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. and Myers, R.M. (1989): Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 232-236.
- Wartell, R.M. and Benight, A.S. (1989): Thermal Denaturation of DNA Molecules: A comparison of Theory with Experiment. *Physics Reports*, **126**, 67-107.