

SSCP와 DHPLC에 의한 β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이 분석

박상범 · 한상만 · 남윤형 · 장원철*

단국대학교 자연과학대학 화학과

(2003. 11. 25 접수, 2003. 12. 19 승인)

Mutation Analysis in β_2 -Adrenergic Receptor Gene by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Sang-Bum Park, Sang-Man Han, Youn-Hyoung Nam and Won-Cheoul Jang*

Dept. of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received Nov. 25, 2003, Accepted Dec. 19, 2003)

요 약 : 현재 일반적으로 많이 사용되는 single strand conformation polymorphism (SSCP)나 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)같은 돌연변이 검출법은 많은 시간과 비용, 그리고 노동력이 소모된다는 단점과 실험자의 실험에 대한 숙련도에 의해 실험 결과가 달라지는 한계점을 가지고 있다. 이런 단점들을 보완하기 위하여 ion-pair reversed phase chromatography (IP-RPC)방식을 이용한 denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)방법을 사용하여 기관지 천식 (bronchial asthma)을 조절하는 베타2-교감신경수용체 유전자의 돌연변이를 검출하였다. 80명의 천식 환자의 혈액에서 genomic DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction)을 이용해 증폭하고, 그 산물을 SSCP와 DHPLC로 분석하였다. 그 결과, 베타2-교감신경수용체 유전자에서 SSCP는 80명의 sample 가운데 19개 (23.75%)의 돌연변이를 검출하였고, DHPLC는 25개 (31.25%)의 변이를 검출하였다. 돌연변이 검출법으로 DHPLC 분석법이 SSCP보다 더 빠르고 효과적인 방법임을 확인하였다.

Abstract : Up to now, methods for the detection of genetic alterations as single strand conformation polymorphism (SSCP) or denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) have been used. It is too labor-intensive and expensive to serve for routine analysis. Moreover, lower in its sensitivity and specificity being also strongly dependent on the experience of the investigator. To improve these problems, we analysed mutation of β_2 -adrenergic receptor gene that controls bronchial asthma by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) according to ion-pair reversed phase chromatography (IP-RPC). We extracted genomic DNA from 80 asthma patients and then amplified

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)41-550-1890 Fax : +82+(0)41-550-1895

E-mail : wcjang@dankook.ac.kr

DNA using PCR and analysed PCR product by SSCP and DHPLC. As a result, we analysed mutation frequency is 19 (23.75%) on SSCP and 25 (31.25%) on DHPLC in β_2 -adrenergic receptor gene. We conclude that DHPLC is a fast and simple screening method rather than SSCP analysis.

Key words : DHPLC, SSCP, PCR, β_2 -adrenergic receptor gene

1. 서 론

천식은 전체 인구의 3-4%의 발병율을 차지하는 비교적 흔한 질환으로 인간의 생산성을 감소시키고, 활동장애를 초래하는 중대한 질환이다. 오늘날 공업화와 산업화에 따른 대기의 오염으로 천식의 발병률이 날로 증가하고 있는 추세이다. 발병원인으로는 유전적 요인이 가장 빈번하고 그밖에 알레르기 물질, 호흡기 감염 그리고 대기 오염의 환경적인 요인에 의해 발생한다. 기관지 천식에서 β_2 -교감신경수용체 작용제는 가장 강력한 기관지 확장제로서 경증의 기관지 천식 뿐만 아니라 중증의 기관지 천식 발작에서도 기본적인 치료제로 사용된다. 최근 외국에서는 기관지 천식을 조절하는 유전자로서 중요한 역할을 하는 β_2 -교감신경수용체의 구조가 밝혀지면서 많은 연구가 되어지고 있는 반면에 국내에서는 아직 유전적인 분석이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 천식의 경우 가장 큰 문제점은 진단이 명확하지 못하다는 것이다. 임상양상과 병인이 일치하지 않을 때가 많고, 특별한 진단기준이 확립되어 있지도 않다. 따라서 유전자의 연구로 인한 진단 방법이 확립된다면 국내 천식의 진단 및 연구에 큰 역할을 할 것으로 사료된다.^{1,4}

그 동안의 일반적인 분자생물학적 연구방법인 single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE), allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO) 등은 검출감도나 실험의 재현성에서 한계를 보이고 있으며 많은 비용 및 시간, 그리고 노동력이 소모된다는 단점을 가지고 있다. 이런 문제점을 보완하면서 β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이 검출능 및 정확도, 경제성등이 뛰어나고 많은 양의 샘플을 처리할 수 있는 우수한 방법으로 DHPLC가 개발되었다.⁵⁻⁸ 이 분석기술은 IP-RPC 방식을 이용한다. PCR방법에 의해 증폭된 이중가닥의 DNA를 완전히 변성시켰다가 다시 천천히 식혔을 때 형성되는 이형접합체 (heteroduplex)가

동형접합체 (homoduplex)보다 column에서의 머무름 시간이 더 짧아지는 점을 이용하여 단 하나의 염기서열의 삽입, 제거 그리고 치환 형태의 돌연변이까지 검출할 수 있다.⁹⁻¹² 가장 이상적인 돌연변이 분석법은 100%의 sensitivity와 specificity를 갖고, 분석 비용이 적게 들어야 하며, 빠른 시간 안에 결과를 보여주는 방법이어야 한다. 또한 많은 sample을 대상으로 하므로 사용하기에 편리하여야 하며, 한 샘플로 여러 유전자 군을 동시에 분석해야 하기 때문에 적은 양의 DNA를 요하는 방법이 좋다.¹³⁻¹⁶ 따라서 본 연구에서는 β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이를 분자생물학적 돌연변이 검출법인 SSCP와 IP-RPC 방식인 DHPLC 분석방법을 이용하여 비교 분석하고, DHPLC의 높은 감도와 정확성을 확인하며, 한국인 천식 환자에서 가장 효과적이고 정확히 돌연변이를 검출함으로써 임상적으로 적용하기 위한 기초연구자료를 제공하고자 한다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시료

본 연구에서는 단국대학병원 이비인후과에서 기관지 천식환자로 진단 받은 성인 80명의 혈액과, 10명의 정상 건강 대조군을 대상으로 하였다.

2.2. 시약 및 기기

2.2.1. 시약

혈액에서 genomic DNA를 추출하기 위한 AccuPrep™ Genomic Extraction Kit와 PCR에 사용된 Taq polymerase, 그리고 PCR product의 정제에 사용된 AccuPrep™ PCR Purification Kit와 DNA PrepMate™ Kit, silver stain을 하기 위해 사용한 Silverstar™ Staining Kit는 Bioneer의 제품을 구입해 사용하였다.

Agarose는 Sigma chemical에서 구입하였고, DHPLC의 ion-pair 용매로 쓰이는 TEAA는 Transgeno-

mic사에서, elution 용매인 acetonitile은 Merck사에서 구입해 사용하였다.

2.2.2. 기기

DNA의 증폭은 GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin-Elmer, USA)를 사용하였고 PCR band는 Agaro Power[™] (Bioneer, KOR) 전기영동장치로 확인하였다. SSCP는 Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control System (Novex, USA)를 사용하였고, DHPLC는 WAVE[®] SYSTEM (Transgenomic, USA)를 사용해 돌연변이를 검출하였다.

2.3. 실험 방법

본 연구에서는 정상 및 천식 환자의 혈액에서 DNA를 추출하고, PCR방법을 이용하여 DNA를 증폭한 후, SSCP와 DHPLC법에 의해 β_2 -교감신경수용체 유전자의 점 돌연변이를 검출한다. 최종적으로 DNA 염기서열 결정법으로 확인하여 위의 두가지 돌연변이 검출법의 정확성과 효율성을 비교한다 (Fig. 1).

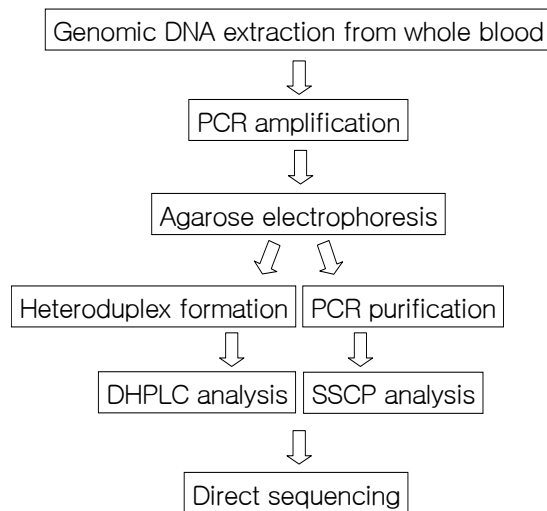


Fig. 1. Schematic procedures of analytical methods.

2.3.1. 혈액에서 genomic DNA의 추출

AccuPrep[™] Genomic Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하고 25 ng/ μ L로 농도를 일정하게 맞추어 PCR에 사용하고 장기간 보존하기 위해서 -20 $^{\circ}$ C에 저장해 두었다.

2.3.2. 중합효소연쇄반응 (PCR)

β_2 -교감신경수용체 유전자에서 hot spot을 포함하도록 PCR primer를 제작하여 200 bp의 크기의 PCR 산물을 얻었다 (Table 1). PCR은 10 \times Reaction buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl), 10 mM dNTP mix (2.5 mM ea.), 25 mM MgCl₂, Taq. polymerase (1 U/ μ L), template DNA (25 ng/ μ L)를 20 μ L의 PCR 반응용액으로 사용하였다. PCR 반응 용액을 0.2 mL PCR tube에 넣은 후, DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, GeneAmp[®] PCR System 2400, USA)에서 먼저 주형 DNA를 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시켜 완전히 단일가닥 DNA를 만든 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 변성 (denaturation)시키고 57 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 primer를 결합 (annealing)시키고 72 $^{\circ}$ C에서 50초 동안 중합효소를 이용하여 새로운 DNA를 합성 (extension)시키는 3단계를 30회 반복한 후에, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 온도를 유지하였다. 그리고 2% 아가로스 젤 전기영동을 통해 PCR 산물을 확인하였다.

Table 1. Primer sequence used to amplify β_2 -adrenergic receptor gene

	Sequence of primers	Position	Length (bp)
Forward	5' CATGTCCTCATCGTCCTGGC 3'	1704-1903	200
Reverse	5' TGGACTTTTAGCAACTTCTGGT 3'		

2.3.3. PCR 산물의 정제

PCR 산물의 정제는 바이오니아의 AccuPrep[™] PCR Purification Kit와 DNA PrepMate[™] Kit를 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. Binding column 시험관을 2 mL 시험관에 넣은 후, PCR 산물 50 μ L와 PB buffer 150 μ L를 넣고 잘 섞었다. 이 혼합물을 binding column 시험관으로 옮겨서 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 후에 여과액은 버린 후에, 새로운 2 mL 시험관으로 binding column을 옮기고 washing buffer 500 μ L를 첨가 후에 상온에서 5분 동안 반응시켰다. 그리고 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 여과액을 버리고 washing buffer 250 μ L를 첨가하여 한번 더 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 새로운 2 mL 시험관으로 binding column을 옮기고 에탄올을 완전히 제거하기 위해 10,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 하였다. 그 후에 새로운 1.5 mL 시험관으로 binding column을 옮기고 elution buffer 60 μ

L를 첨가 후에 상온에서 1분 동안 반응시킨 후에 원심분리 하여 여과액을 회수하였다.

2.3.4. PCR SSCP방법을 이용한 돌연변이 검출

PCR 산물을 정제한 후에 SSCP를 이용하여 돌연변이를 검출하였다.

1) Electrophoresis

전기영동은 Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control System (Novex, USA)을 사용하여 pre-cast 4-20% TBE 겔 (Novex, USA)에서 실시하였다. 전기영동 장치에 Pre-cast TBE 겔을 장착하고 1× TBE buffer를 채운 후에 온도를 10 °C로 맞추고 겔 전체의 온도가 안정화 될 수 있게 100 V에서 1시간 동안 전기를 흘려주었다. 그런 다음 PCR 산물 1 µL와 loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol) 5 µL를 혼합하여, 98 °C에서 7분 동안 변성시키고 이 혼합물을 에탄올을 부어서 -70 °C에서 보관한 얼음에서 2분 동안 급속 냉각 시켰다. 그 후에 5 µL씩 loading하고 200 V에서 2시간 동안 전기영동 하였다.

2) Silver stain

Silverstar™ Staining Kit (Bioneer, Kor)를 사용하였다. 전기영동 후에 조심스럽게 겔을 떼어 내고 이것을 fix-stop solution에서 30분 동안 반응시키고, enhancing solution에서 30분 동안 반응시킨다. 그런 다음 증류수로 3분씩 두 번 세척하였다. Staining solution에서 30분 동안 그런 다음 developing solution 100 mL와 37% formaldehyde 150 µL를 섞고, 여기에 차가운 sodium thiosulfate 20 µL를 첨가한 후에 5분 동안 반응 시켰다. 그런 후에 fix-stop solution에서 5분 동안 반응시키고 증류수로 5분 동안 세척하였다.

2.3.5. DHPLC방법을 이용한 돌연변이 검출

DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic, USA) 기기를 사용하여 돌연변이를 검출하였다.

1) Heteroduplex formation

95 °C에서 10분 동안 변성시킨 후에 상온에서 45분 동안 천천히 식혀서 이형접합체를 형성 시켰다.

2) 정지상과 이동상

정지상은 alkylated nonporous poly(styren-diviny-

lbenzene) 형태의 DNASep® Cartridge (Transgenomic, USA)를 사용하였고, 이동상으로 TEAA (Transgenomic, USA)와 acetonitrile (Merck, Ger)을 사용하였다. Buffer A(0.1M triethylammonium acetate, pH 7.0)와 Buffer B(0.1M TEAA와 25% acetonitrile, pH 7.0)를 gradient solution으로 사용하였고, washing solution으로 8% acetonitrile (syringe washing solution)과 75% acetonitrile (DNASep® Cartridge UltraClean and Storage Solution)을 사용하였다.

3) DHPLC 분석

Column oven의 온도를 60 °C로 맞추고 buffer D (75% acetonitrile)를 0.9 mL/min으로 30분 동안 흘려주어서 column을 세척한 후에 buffer A (0.1M, TEAA)와 buffer B (0.1M TEAA+25% acetonitrile)를 50%대 50%로 하여 0.9 mL/min로 60분 동안 흘려주어서 안정화 시켜주었다. 그런 다음 시료를 분석하기 전에 gradient를 3-5회 정도 흘려주었다. Column과 buffer의 상태를 확인하기 위해 mutant control (Transgenomic, WAVE Mutation Standard)와 size control (Transgenomic, WAVE DNA Sizing Standard)를 주입하여 분석하였다. 이 같은 방법으로 column과 buffer의 상태를 확인한 후에 변성시키지 않은 시료를 50 °C에서 0.9 mL/min로 5 µL 주입하여 PCR 산물의 상태를 확인하였다. 그런 후에 column oven의 온도를 63 °C로 맞추고 0.9 mL/min로 5 µL 주입하여 260 nm에서 돌연변이를 검출하였다.

2.3.6. DNA 염기서열결정법에 의한 돌연변이 분석

자동서열분석기 ABI 3700 (Biosystems) System을 이용하여 염기서열의 돌연변이를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. SSCP방법에 의한 돌연변이 분석

SSCP 방법은 손쉽게 유전자의 변이를 검출하는 방법으로 가장 많이 이용되고 있는 방법 중 하나이다. 분석하고자 하는 유전자를 PCR로 증폭하여 이 PCR산물을 알칼리나 열로 변성시킴으로써 두 가닥 DNA를 단일 가닥 DNA로 만든 후 급속히 냉각시켜 이 산물을 전기영동한 다음, 겔을 silver stain 하여 변이를 확인한다. 알칼리나 열로 변성한 후에 얼음 속에서 급속히 냉각하면 단일 가닥

DNA는 각각의 염기서열차이에 따라 고유한 형태로 바뀌게 된다. 따라서 돌연변이에 의해 하나의 염기가 변해도 전체적인 구조가 변하므로 전기영동 시키면 정상 DNA와 다른 이동 속도를 보이게 되므로 돌연변이를 확인할 수 있다. SSCP분석법은 PCR산물의 크기가 약 200 bp 정도 될 때 60-90%의 변이를 검출할 수 있다. 그러나 이보다 크기를 경우에는 감지할 수 있는 변이에 대한 민감도가 크게 떨어진다. 또한 실험자의 실험에 대한 숙련도에 따라서도 검출률이 많이 달라질 수 있다. 전기영동과정 중 높은 전압에 의한 열이 발생하면 열에 의해 단일 가닥 DNA분자의 형태가 불안정해져 밴드를 관찰할 수 없기 때문에 젤의 온도를 일정하게 유지해 주는 냉각 시스템이 필요하다.

Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control System (Novex, USA)을 이용해 SSCP로 분석한 결과, 80 명의 천식환자 시료에서 19 개 (23.75%)의 돌연변이를 검출하였다. Fig. 2 에서와 같이 1-4 번 시료는 정상 시료와 같은 형태를 보이는데 반해 5-9 번 시료에서는 밴드가 다르게 이동된 것을 관찰할 수 있었다. 이들 5-9 번 시료는 DNA 염기서열결정법을 통해 β₂-교감신경수용체 유전자의 G1839A로 치환된 점 돌연변이임을 확인하였다.

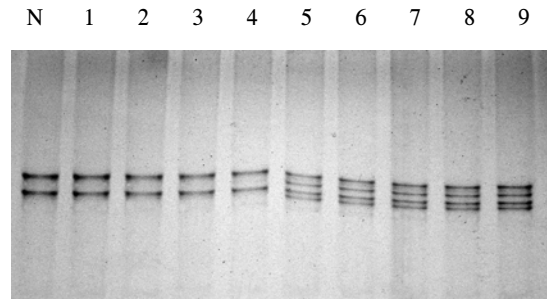


Fig. 2. SSCP analysis of fragments of the β₂-adrenergic receptor gene. Lanes 1-4; wild type, lanes 5-9; mutant type.

3.2. DHPLC방법에 의한 돌연변이 분석.

DHPLC분석법은 모든 실험과정이 자동화되어 있어서 실험의 재현성이 뛰어나다. 두 가닥의 DNA를 95 °C에서 변성시키고 천천히 식히면 heteroduplex와 homoduplex가 형성된다. 양친매성 이온을 가지고 있는 이온쌍 시약인

TEAA가 먼저 소수성 고정상에 흡착되어 양전하를 고정상 표면에 형성시키게 된다. 이것은 phosphate ion을 가지고 있는 DNA와 결합하고 더 큰 양전하를 가진 acetonitrile에 의해 column을 빠져나온다. 따라서 부분적으로 변성된 heteroduplex가 고정상과의 결합력이 약해 homoduplex보다 column을 빨리 빠져나오고 이 원리를 이용해 돌연변이를 검출할 수 있다. PCR 산물의 염기서열의 정보를 알면 WAVEMAKER™ 프로그램에 의해 column의 온도에 따른 helical fraction과 base position에 따른 helical fraction (Fig. 3)이 계산되고 이 데이터를 근거로 하여 가장 적당한 column의 온도와 buffer의 gradient를 결정하게 된다. 돌연변이가 존재하더라도 helical fraction의 정도에 따라 돌연변이의 검출 여부가 결정되므로 helical fraction이 70-80% 사이가 되도록 온도와 gradient (Fig. 4)를 잡아주는 것이 중요하다. Column의 온도가 63 °C일 때 wild type은 단일 피크의 모양으로 검출되었고, mutant type은 두 개의 피크 모양으로 검출되어 돌연변이를 정확히 검출할 수 있었다 (Fig. 5).

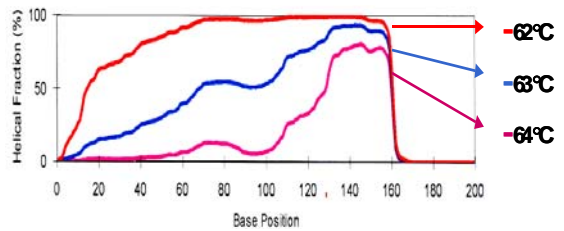


Fig. 3. Predicted three-temperature melting trial in WAVEMAKERTM.

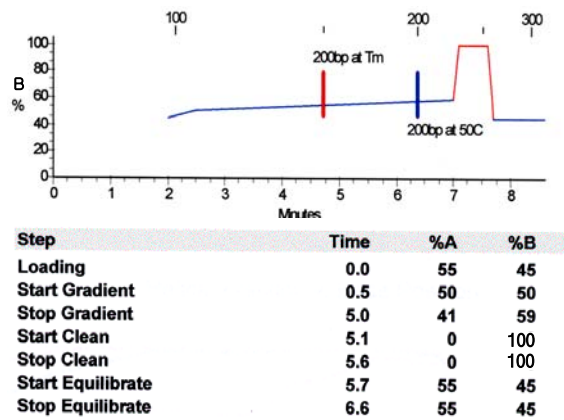


Fig. 4. Separation gradient for β₂-adrenergic receptor gene.

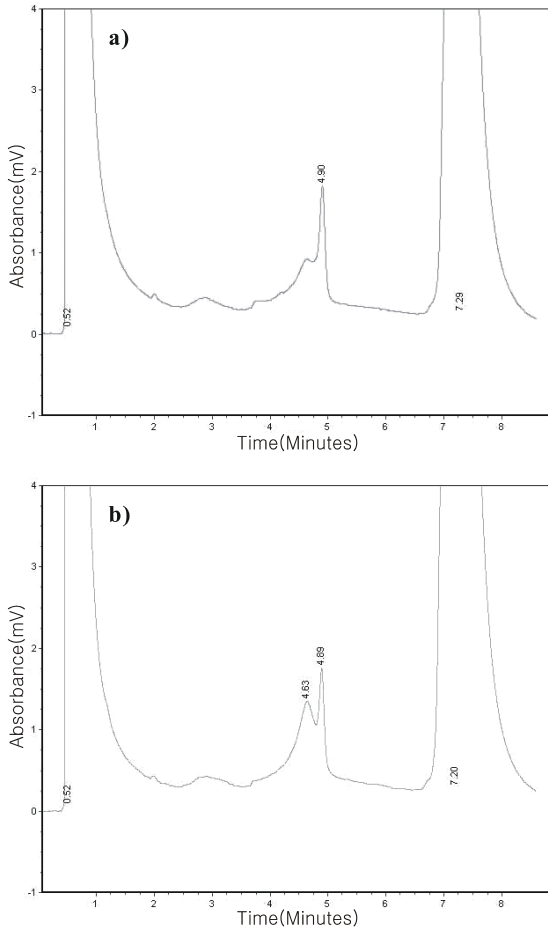


Fig. 5. Chromatograms produced by DHPLC analysis. a) wild type b) mutant type.

SSCP나 DGGE 같은 일반적인 분자 생물학적인 돌연변이 검출법에서는 분석을 하기 전에 정제 과정을 거쳐야 하지만 DHPLC는 정제를 하지 않고 PCR 산물을 곧바로 분석해도 같은 형태의 크로마토그램을 얻을 수 있어서 노동력과 시간을 절약할 수 있었다. β_2 -교감신경수용체 유전자에서 돌연변이를 분석한 결과, 80개의 시료 중 25개 (31.25%)의 돌연변이를 검출하였다. DHPLC로 검출한 돌연변이를 DNA 염기서열결정법을 통해 G1839A로 치환된 점 돌연변이임을 확인하였다.

4. 결 론

80명의 천식 환자의 혈액에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 증폭하고, 그 산물을 SSCP와

DHPLC로 분석하였다. 그 결과, β_2 -교감신경수용체 유전자에서 SSCP는 80개의 시료 가운데 19개 (23.75%)의 돌연변이를 관찰할 수 있었고, DHPLC는 25개 (31.25%)의 변이를 관찰하였다. 그리고 유전자 염기서열결정법을 통해 DHPLC의 돌연변이 검출률이 100% 정확함을 확인하였다.

SSCP 분석 결과, 정상시료와 돌연변이 시료 사이에 밴드상의 뚜렷한 차이를 보였다. 하지만 SSCP방법은 PCR 생성물을 정제하여야 하고, 전기영동 4시간, silver stain 3시간이 소모되며, 실험자의 숙련도에 따라 결과가 달라지기도 하고 PCR 생성물의 크기가 400bp 이상이 되면 감도가 떨어지는 단점을 가지고 있다. DHPLC 결과에서는, 정상시료와 돌연변이 시료는 컬럼 오븐의 온도가 63 °C일때 상이한 크로마토그램을 관찰 할 수 있었다. PCR 생성물의 정제 과정을 거치지 않고 바로 분석해도 결과에 전혀 영향을 미치지 않았고, 샘플 당 10분이면 분석이 가능하고 또한 모든 조작이 자동으로 되기 때문에 실험결과 재현성이 매우 우수하였다.

본 연구를 통하여 DHPLC는 SSCP 방법에 비해 많은 시간과 노동력, 비용을 절약할 수 있었으며 실험의 재현성과 감도가 뛰어난 강력한 방법임을 확인하였고, β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이를 가장 효과적이고 정확히 검출함으로써 임상적으로 적용하기 위한 유용한 방법이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

“이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음”

참고 문헌

1. W. P. Hausdorff and M. G. Caron, et al., *Faseb J*, **4**, 2881-2889(1990)
2. D. G. Marsh and J. D. Neely, et al., *Science*, **264**, 1152-1156(1994)
3. C. Ober and N. J. Cox, et al., *Hum Mol Genet*, **7**, 1393-1398(1998)
4. K. U. Lentz, W. H. Berrettini, et al., *Nucleic Acids Res*, **16**, 1359(1998)
5. W. Xiao and P. J. Oefner, *Hum. Mutat.*, **17**,

- 439-474(2001)
6. T. R. Skopek, W. E. Glaab, J. J. Monroe, K. L. Kort and W. Schaefer, *Mutat. Res.*, **430**, 13-21(1999)
 7. P. J. Oefner and G. K. Bonn, *Amer. Lab.*, **26**, 28C - 28J(1994)
 8. A. C. Jones, J. Austin, N. Hansen, B. Hoogendoorn, P. J. Oefner, J. P. Cheadle and M. C. O'Donovan, *Clin. Chem.*, **45**, 1133-1140 (1999)
 9. T. R. Skopek, W. E. Glaab, J. J. Monroe, K. L. Kort and W. Schaefer, *Mutat. Res.*, **430**, 13-21(1999)
 10. T. Wagner, D. Stoppa-Lyonnet, E. Fleischmann, D. Muhr, S. Pages, T. Sandberg, V. Caux, R. Moslinger, G. Langbauer, A. Borg and P. J. Oefner, *Genomics*, **62**, 369-376(1999)
 11. L. A. Ellis, C. F. Taylor and G. R. Taylor, *Hum. Mutat.*, **15**, 556-64(2000)
 12. E. Gross, N. Arnold, K. Pfeifer, K. Bandick and M. Kiechle, *Hum. Mutat.*, **16**, 345-353 (2000)
 13. M. L. Nickerson, G. Weirich, B. Zbar and L. S. Schmidt, *Hum. Mutat.*, **16**, 68-76(2000)
 14. P. Benit, A. Kara-Mosterfa, M. Berthelon, K. Sengmany, A. Munnich and J. P. Bonnefont, *Hum. Mutat.*, **16**, 417-421(2000)
 15. C. G. Huber and N. Berti, *Anal. Chem.*, **68**, 2959-2965(1996)
 16. P. J. Oefner and P. A. Underhill, *U.S. Patent* 5795976(1998)