Journal of the Korean Chemical Society
2003, *Vol. 47, No. 5*
Printed in the Republic of Korea

대장암에서 PCR-SSCP와 DHPLC를 이용한 p53 돌연변이의 검출

박상범 · 한상만 · 남윤형 · 장원철*
단국대학교 자연과학대학 화학과
(2003. 6. 12 접수)

Detection of p53 Mutation in Colorectal Cancer Using PCR-SSCP and DHPLC

Sang-Bum Park, Sang-Man Han, Youn-Hyoung Nam, and Won-Cheoul Jang*
Department of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received June 12, 2003)

요 약. p53 유전자의 변이는 다양한 인체암 중 가장 일반적인 유전자적 변화로 알려져 있으며, 양성에서 악성 대장암으로 전이되는 과정에서 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCR-SSCP와 DHPLC를 이용하여 대장암 환자의 조직에서 p53 유전자의 엑손 5-8에서 돌연변이를 분석하였다. SSCP에서는 50개의 샘플중 엑손 5에서 C13109>T 형태의 돌연변이가 7례가(14%) 발견되었고, DHPLC에서는 C13109>T 7례와 C13202>A, C13204>G 형태의 돌연변이 2례, 모두 9례의(18%) 변이가 검출되었다. DHPLC 분석법을 이용하여 SSCP에서 발견하지 못했던 2례(4%)의 변이를 더 발견하였다. 최종적으로 염기서열분석법을 통해 위의 결과를 확인하였고, p53 돌연변이 검출법으로 SSCP보다 DHPLC가 더 감도가 좋고 효과적인 검출법임을 확인하였다.

주제어: p53, 대장암, PCR-SSCP, DHPLC, 돌연변이

ABSTRACT. Structural alteration of p53 and overexpression of p53 protein are the most common genetic abnormalities in various kinds of human cancer. Mutations in the p53 tumor-suppressor gene are usually associated with an advanced development of colorectal cancer characterized by the transition from the adenoma to carcinoma stage. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene were analyzed by the polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) and denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC). SSCP analysis detected 7 mutations(C13109>T) in 50 colorectal cancer samples(14%) at exon 5, and DHPLC analysis detected 7 mutations (C13109>T) and 2 mutation(C13202>A, C13204>G) in 50 colorectal cancer samples(18%) at exon 5. All of 9 mutations were proved by sequencing analysis. We conclude that DHPLC is a highly sensitive and specific method for p53 gene mutations.

Keywords: p53, Colorectal Cancer, PCR-SSCP, DHPLC, Mutation

서 론

최근 들어 암에 대한 기초적인 연구가 비약적인 발전을 이루면서 암의 생성은 내인성 또는 외인성 인자에 의한 정상 세포내 유전자 이상으로, 비정상적인 세포 성장에 의한 것으로 밝혀지고 있다. 정상세포는 성장과 분화가 전체기관의 필요에 의해서 조절되지만 암세포는 정상적인 조절범위를 벗어나서 자율적, 비조절적으로 복제가 되는 것이 특징이다. 이러한 암발생에 관여하는 유전자는 크게 두 가지로 하나는 암유전자(oncogene)이며 이들의 과다 발현, 전좌 및 돌연변이 등에 의한 암유전자의 활성화가 암발생에 기여하고, 다른 하나는 암

억제유전자(tumor suppressor gene)로서 이들의 결손 및 돌연변이에 의한 비활성화가 암발생에 기여한다.[1-3] 암의 발생 및 진행과정을 밝히기 위해서 보다 정확하고 효과적인 유전자 분석방법의 필요성이 대두되고 있다.

현재 가장 일반적으로 사용되는 돌연변이 검출법에는 direct sequencing(DS), single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE), conformation sensitive gel electrophoresis(CSGE), allele-specific oligonucleotide hybridization(ASO)등이 있다.[4-6] DS의 경우, 돌연변이를 결정하는데 아주 결정적인 방법을 제시하지만 그 비용면에서 비경제적이라 할 수 있다. DGGE나 SSCP의 경우에는 검출감도나 실험의 재현성에서 한계를 보이고 있으며 많은 비용 및 시간, 그리고 노동력이 소모된다는 단점을 가지고 있다. 최근에 이러한 단점들을 보완하고 충족시킬 수 있는 새로운 돌연변이 검출방법으로써 DHPLC가 개발되었다.[7-9] 이 분석기술은 ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography(IP-RP-HPLC) 방식을 이용한다.[10-12] PCR 방법에 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.[13-16] DHPLC는 정제하지 않은 PCR 산물을 바로 분석하여 보통 하나의 시료 당 6-10분 정도의 시간밖에 걸리지 않기 때문에 많은 노동력과 시간의 소모를 줄일 수 있고, 또한 다양한 유전자의 돌연변이를 92.5%에서 100%까지 정확하게 검출할 수 있다.

대장암은 서구에서는 폐암에 이어 암 사망률 2위를 차지하는 흔한 질병으로 최근의 우리나라에서는 암 사망률의 4위를 차지하고 있다. 앞으로 우리나라에서도 식생활의 변화와 노령 인구의 증가 등에 따라 점점 그 발생 빈도가 상승하리라 예상되고 있다. 대장암의 발생과정을 보면, 암으로의 진행을 앞둔 전암단계에서부터 APC(adenomatous polyposis coli), ras, DCC(deleted in colon cancer), p53등의 여러 유전자들이 돌연변이 또는 대립유전자의 소실의 형태로 암종의 형성에 작용한다. 특히 p53 유전자의 변이는 여러종류의 암에서 가장 흔히 발견되는 유전적 특징으로 종양생성에 있어 중요한 단계로 인식되어지고 있다. 인체의 정상세포에서 p53유전자는 염색체 17p 13.1에 위치하여 11개의 엑손으로 이루어진 20 Kb의 DNA이며, mRNA의 크기는 2.8 Kb이고 그 산출물은 핵에 미량 존재하는 인단백질로 크기가 53 kDa으로 알려져 있다. p53 유전자의 돌연변이에 대한 연구는 엑손 5에서 엑손 8까지의 잘 보존된 지역(conserved domain)에서 이루어지며 이중에서 codon 117-142, codon 171-181, codon 234-258, codon 270-286 등이 주요 지점들로 알려져 있다. 변이된 p53단백은 DNA에 대한 친화력이 야생형(wild type) p53단백에 비하여 감소되어 있으며, 비정상적인 기능을 갖게 되어 세포증식을 유발시킨다. 대장암에서의 p53 유전자변이는 주로 약 75%가 대립유전자를 소실하는 형태로 나타나며 변이를 지닌 것의 90% 이상이 점 돌연변이를 지니고 있는 것으로 보고 된다. 그러나 이러한 결과는 모두 외국의 경우에서 밝혀진 것들이다.[17-20]

본 연구에서는 한국인의 대장암조직에서 p53의 돌연변이를 SSCP와 DHPLC방법을 이용하여 비교 분석하고, DS를 통해 DHPLC의 높은 감도와 정확성을 확인하며, 대장암의 발병과 유전적인 변이와의 상관관계를 밝힘으로써 질병 유전자 진단 및 치료에 관한 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 단국대학병원 외과에서 대장-직장암으로 수술 시행 받은 50례를 대상으로 하였고, 수술실에서 절제하자 마자 액체질소에 급속냉동시킨후 –70 ºC의 deep freezer에서 보관하였다. 정상대조군으로 수술실에서 정상조직 2례를 따로 떼어내어 위와 같이 보관하였다.

시약 및 기기

시약. 조직에서 genomic DNA를 추출하기 위한 AccuPrep™ Genomic Extraction Kit와 PCR에 사용된 Taq. polymerase, 그리고 PCR 산물의 정제에 사용된 AccuPrep™ PCR Purification Kit와 DNA PrepMate™ Kit는 Bioneer의 제품을 구입해 사용하였다. DHPLC의 이동상으로 사용된 triethylammonium acetate(TEAA)는 Transgenomic사에서, acetonitrile은 Merck사에서 구입해 사용하였다.

기기. DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, U.S.A.)를 사용하였고, DHPLC는 WAVE® SYSTEM(Transgenomic, U.S.A.)를 사용해 돌연변이를 검출하였다. 염기서열분석은 자동서열분석기 ABI 3700

(Biosystems) System을 이용하여 최종적으로 돌연변이를 확인하였다.

실험 방법

본 연구에서는 정상 및 대장암 조직에서 DNA를 추출하고 p53유전자의 exon5-8에서 돌연변이 유무를 검사한다. 이를 위해서 SSCP와 DHPLC 방법으로 일차 검사를 시행하고 결과의 차이가 있는 경우에 염기서열 확인법으로 돌연변이의 존재를 최종적으로 확인한다.

조직에서 genomic DNA의 추출. –70 °C에서 보관중인 조직에서 약 1 mg의 시료를 떼어낸 후 잘게 갈아 AccuPrep™ Genomic Extraction Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하고, DNA의 농도는 25 ng/μl로 일정하게 맞추어 PCR에 사용하고 장기간 보존하기 위해서는 –20 °C에 저장해 두었다.

중합효소연쇄반응(PCR). 조직에서 추출한 genomic DNA에서 다음과 같은 조건으로 엑손 5에서 엑손 8까지의 PCR 산물을 얻었다(*Table* 1).

10× Reaction buffer(10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl), 10 mM dNTP mix(2.5 mM ea.), 25 mM $MgCl_2$, *Taq*. polymerase (1 U/μl), template DNA(25 ng/μl)를 20 μl의 PCR 반응용액으로 사용하였다. DNA thermal cycler(Perkin-Elmer, GeneAmp® PCR System 2400, U.S.A.)에서 주형 DNA를 94 °C에서 5분 동안 변성시켜 완전히 단일가닥 DNA를 만든 후, 94 °C에서 30초 동안 변성(denaturation)시키고 57 °C에서 30초 동안 primer를 결합(annealing)시키고 72 °C에서 50초 동안 중합효소를 이용하여 새로운 DNA를 합성 °C(extension) 시키는 3단계를 30회 반복한 후에, 마지막으로 72 °C에서 5분간 온도를 유지하였다. 그리고 PCR이 완전히 종료된 후에는 PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다.

Silica binding method를 이용한 PCR 산물의 정제. 1.5 ml 시험관에 결합완충용액 240 μl와 PCR 산물 80 μl를 섞은 후에 실리카 40μl를 첨가 후에 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 12,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 후에 상층액을 제거하였다. 그런 다음 70% 에탄올 1 ml을 첨가한 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 이 과정을 3번 반복하였다. Elution buffer 60μl를 첨가한 후에 50 °C에서 10분 동안 반응시킨 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하여 여과액을 회수하였다.

SSCP방법을 이용한 돌연변이 검출. PCR 생성물을 정제한 후에 SSCP를 이용하여 돌연변이를 검출하였다.

얼음과 boiling system(water bath or thermocycler)을 준비한다. 0.2 ml microfuge tube에 각각의 PCR 생성물을 표시하고 각각의 튜브에 5 μl의 formamide loading dye와 2 μl의 PCR 생성물을 넣는다. 이때 튜브 벽에 염료가 닿지 않게 주의한다. 각각의 튜브를 boiling water bath나 thermocycler에 넣는다. 결과적으로 변성을 98 °C에서 5분 한후 즉시 얼음위에 옮기고 0 °C에서 2분 정도 방치한다. 이것을 젤에 즉시 loading한다. 200 V에서 2시간 정도 전개 하고 silver staining(Novex, USA)을 한다(*Table* 2).

DHPLC방법을 이용한 돌연변이 검출. 95 °C에서 10분 동안 변성시킨 후에 상온에서 45분 동안 천천히 식혀서 이형접합체를 형성 시켰다. DHPLC의 gradient solution으로 0.1 M TEAA(pH 7.0)와 0.1 M TEAA, 25% acetonitrile을 사용하였고, washing solution으로 8% acetonitrile (syringe washing solution), 75% acetonitrile(DNASep® Cartridge UltraClean and Storage Solution)을 사용하였다. Column은 alkylated nonporous poly(styren-divinylbenzene) 형태의 DNASep® Cartridge(Transgenomic, U.S.A.)을 사용하였다.

Table 1. Primer sequence used to amplify p53 tumor suppressor gene

	Sequence of primer	Length (bp)	Position
exon5	5'-ctcttcctacagtactcccctgc-3' 5'-gccccagctgctcaccatcgcta-3'	211	13033-13243
exon6	5'-gattgctcttaggtctggcccctc-3' 5'-ggccactgacaaccaccccttaacc-3'	182	13308-13489
exon7	5'-gtgttatctcctaggttggctctg-3' 5'-caagtggctcctgacctggagtc-3'	139	13986-14124
exon8	5'-acctgatttccttactgcctctggc-3' 5'-gtcctgcttgcttacctcgcttagt-3'	200	14404-14603

Table 2. The list of preparations of working solution for silver staining (Silverstar™ Staining Kit, Bioneer, Korea)

Fix-stop solution	acetic acid 100 ml
(10% glacial acetic acid)	D.W 900 ml
Enhancing solution	enhancing solution 1 ml
	D.W 999 ml
Staining solution	Silver nitrate 1 g
	D.W 1000 ml
	37% formaldehyde 1.5 ml
Developing solution	D.W 1000 ml
	37% formaldehyde 1.5 ml
	Sodium thiosulfate 200 μl

Column oven의 온도를 60 ºC로 맞추고 buffer D(75% acetonitrile)를 0.9 ml/min으로 30분 동안 흘려주어서 column을 세척한 후에 buffer A(0.1 M, TEAA)와 buffer B(0.1 M TEAA+25% acetonitrile)를 50%대 50%로 하여 0.9 ml/min로 60분 동안 흘려주어서 안정화 시켜주었다. 변성시키지 않은 시료를 50 ºC에서 0.9 ml/min로 0.5 μl 주입하여 PCR 산물의 상태를 확인하였다. 그런 후에 column oven의 온도를 63 ºC로 맞추고 0.9 ml/min로 0.5 μl 주입하여 260 nm에서 돌연변이를 검출하였다.

DNA 염기서열결정법에 의한 돌연변이 분석. 자동서열분석기 ABI 3700(Biosystems) System을 이용하여 염기서열의 돌연변이를 확인하였다.

결과 및 고찰

SSCP에 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, gel을 silver stain하여 변이를 확인한다. 알칼리나 열로 변성시킨 후에 얼음 속에서 급속히 냉각하면 단일 가닥 DNA는 각각의 염기서열차이에 따라 고유한 형태로 바뀌게 된다. 따라서 돌연변이에 의해 하나의 염기가 변해도 전체적인 구조가 변하므로 전기영동시키면 정상의 DNA와 다른 이동 속도를 보이게 되므로 돌연변이를 확인할 수 있다. SSCP분석법은 PCR 산물의 크기가 약 200 bp 정도 될 때 60-90%의 변이를 검출할 수 있다. 하지만 이보다 크기가 클 경우에는 감지할 수 있는 변이에 대한 민감도가 크게 떨어진다. 또

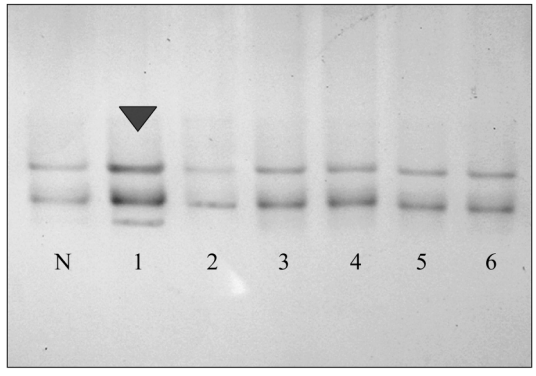


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of the p53 gene. DNA samples of tumor and nomal tissue were amplified using PCR primer for the exon 5. N; nomal control sample, patient 1; mutant type, patient 2-6; wild type.

한 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 관찰 할 수 없기 때문에 gel의 온도를 일정하게 유지해 주는 냉각시스템이 필요하다.

Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control Systmem(Novex, USA)을 이용해 SSCP한 결과, 50개의 대장암조직에서 7례(14%)의 돌연변이를 검출하였다. *Fig*. 1에서 2-6번 환자 시표는 정상시료와 같은 밴드이동 패턴을 보이는데 반해 1번 환자 시료에서는 밴드가 다르게 이동된 것을 관찰할 수 있었다. 1번 시료는 DNA 염기서열결정법을 통해 C13109>T 형태의 돌연변이를 확인하였다.

DHPLC 에 의한 돌연변이 분석

DHPLC분석법은 돌연변이를 검출하는 가장 강력한 방법으로 SSCP나 DGGE보다 감지할 수 있는 변이에 대한 민감도가 더 큰 새로운 검출법이다. PCR 산물을 정제하지 않고 바로 분석할 수 있고 한 시료당 10 분이면 분석이 가능하기 때문에 노동력과 시간을 절약할 수 있다. 또한 모든 실험과정이 자동화 되어 있어서 실험의 재현성이 뛰어나다.

IP-RP-HPLC 방식을 이용하고 poly(styren-divinylbenzen)으로 채워진 DNASep® Cartridge(Transgenomic, USA)을 고정상으로 사용하였다. 두가닥의 DNA를 95 ºC에서 변성시킨 후 천천히 식히면 heteroduplex와 homoduplex가 형성된다. 양친매성 이온을 가지고 있는 ion-pair 시약인 TEAA가 먼저 소수성 고정상에 흡착시켜 양전하

를 고정상 표면에 형성시키게 된다. 이것은 인산 이온을 가지고 있는 DNA와 결합하고 더 큰 양전하를 가진 acetonitrile에 의해 용출된다. 따라서 부분적으로 변성된 heteroduplex가 고정상과의 결합력이 약해 homoduplex보다 컬럼을 빨리 빠져나오고 이 원리를 이용해 돌연변이를 검출할 수 있다. 또한 DNA 가닥의 크기가 작을수록, 컬럼의 온도가 높을수록 머무름 시간이 빠르다.

PCR 산물의 sequence를 입력하면 WAVEMAKERTM 프로그램에 의해 컬럼의 온도에 따른 helical fraction과 염기 위치에 따른 helical fraction이 계산되고 이 데이터를 근거로 하여 가장 적당한 컬럼의 온도와 buffer의 gradient를 결정하게 된다. 돌연변이가 존재하더라도 helical fraction의 정도에 따라 돌연변이의 검출 여부가 결정되므로 helical fraction이 70-80% 사이가 되도록 온도와 gradient를 잡아주는 것이 중요하다. 컬럼의 온도가 63 °C일 때 야생형과 돌연변이형의 크로마토그램의 형태를 확실히 구분할 수 있었다. 야생형은 단일 피크의 모양으로 검출되었고, 돌연변이형은 두 개의 피크 모양으로 검출되었다. SSCP에서 정상 형태로 나왔던 5번 환자 시료가 DHPLC에서는 돌연변이형으로 나와서 DNA 염기서열결정법을 통해 C13202>A, C13204>G 형태의 돌연변이를 확인하였다(*Fig*. 2).

DNA 염기서열결정법에 의한 돌연변이 분석

SSCP와 DHPLC분석법으로 검출된 돌연변이형의 시료를 자동서열분석기 ABI 3700(Biosystems) System을 이용하여 최종적으로 C13109>T 7례와 C13202>A, C13204>G 형태의 돌연변이 2례를 대장암 조직의 p53 유전자의 돌연변이를 엑손 5에서 확인하였다(*Fig*. 3).

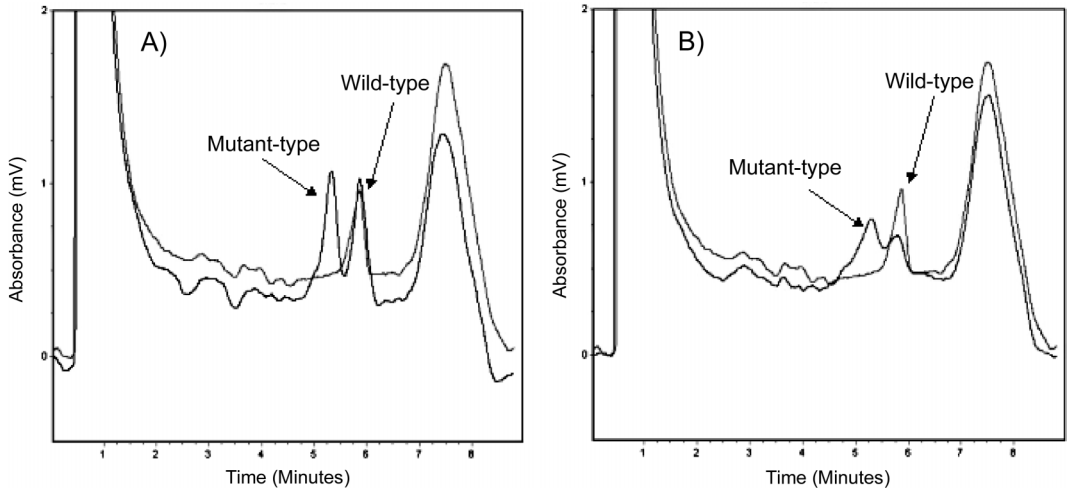


Fig. 2. Chromatograms produced DHPLC analysis of wild type and mutant type in colorectal cancer. (A); patient 1, (B); patient 5.

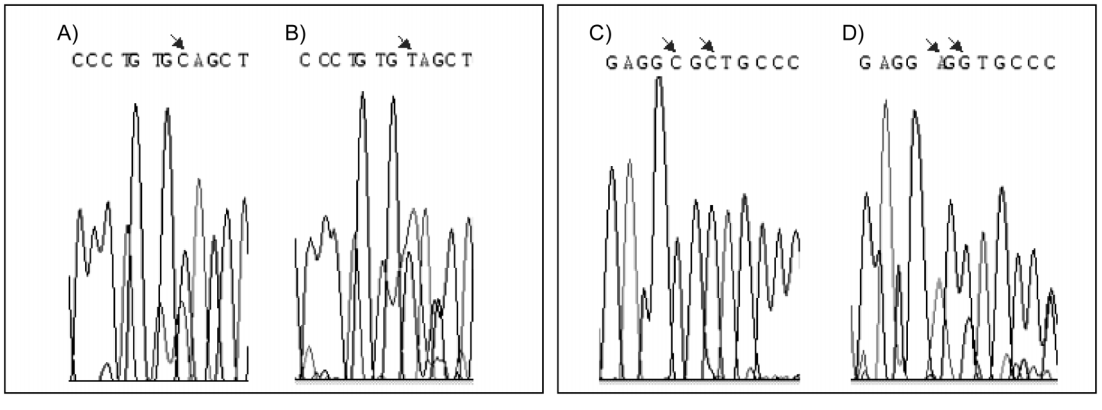


Fig. 3. Automatic sequencing analysis of exon 5 in colorectal cancer. (A) wild type, (B) mutant type (C13109>T), (C) wild type, (D) mutant type (C13202>A,C13204>G).

결 론

50명의 대장암 환자의 조직에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 증폭하고, 그 산물을 SSCP와 DHPLC분석 방법으로 p53유전자의 엑손 5-8까지의 영역에서 돌연변이를 분석하였다. 그 결과, 엑손 6, 7, 8에서는 변이가 발견되지 않았고 SSCP방법으로는 p53 유전자의 엑손 5에서 50개의 시료 중 C13109>T형태의 돌연변이 7례(14%)를 발견하였고, DHPLC에서는 C13109>T형태의 돌연변이 7례(14%)와 C13202>A, C13204>G 형태의 돌연변이 2례(4%), 모두 9례의(18%) 변이를 검출하였다. SSCP방법으로 검출하지 못했던 변이 2례(4%)를 DHPLC방법으로 검출할 수 있었다. 그리고 최종적으로 염기서열분석법을 통해 위의 결과를 확인하였다.

SSCP 분석 결과, 정상시료와 돌연변이 시료사이에 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 400 bp 이상이 되면 감도가 떨어지는 단점을 가지고 있다. DHPLC 결과에서는, 정상시료와 돌연변이 시료는 컬럼 오븐의 온도가 63 ℃ 일때 상이한 크로마토그램을 관찰 할 수 있었다. PCR 생성물의 정제 과정을 거치지 않고 바로 분석해도 결과에 전혀 영향을 미치지 않았고, PCR 생성물의 시퀀스를 입력하면 프로그램에 의해 helical fraction과 염기 위치가 계산되고, 이 데이터를 근거로 하여 가장 적당한 컬럼 온도와 buffer의 gradient를 결정하게 된다. 이렇게 조건을 잡으면 샘플 당 10분이면 분석이 가능하고 또한 모든 조작이 자동으로 되기 때문에 실험결과의 재현성이 매우 우수하였다.

본 연구를 통하여 DHPLC는 새로운 돌연변이 검출법으로써 SSCP 분석법과 비교해 많은 시간과 노동력, 비용을 절약할 수 있었으며 실험의 재현성과 감도가 뛰어난 방법임을 확인하였다. p53 종양억제 유전자의 돌연변이는 여러 인체암에서 나타나기 때문에 환자의 예후 관찰에 있어서 보다 빠르고 정확한 돌연변이 검출법으로 DHPLC 분석방법이 상당히 유용할 것으로 생각되며 향후 실험을 통해 DHPLC의 피크 모양과 돌연변이의 형태와의 상관관계를 연구하여야 할 것이다.

"이 연구는 2002학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음".

인 용 문 헌

1. Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. *Cancer Res.* **1994**, *53*, 4855-4878.
2. Murphree, A. L.; Benedict, W. F.; Retinoblastoma. *Science* **1984**, *223*, 1028-1033.
3. Hollstein, M.; Shomer, B.; Greenblatt, M.; Soussi, T.; Hovig, E.; Montesano, R.; Haarris, C. C. *Nucleic Acid Res.* **1996**, *24*, 141-146.
4. Xiao, W. and Oefner P. J. *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 439-474.
5. Skopek, T. R.; Glaab, W. E.; Monroe, J. J.; Kort K. L.; Schaefer, W. M*utat. Res.* **1999**, *430*, 13-21.
6. Oefner, P. J.; Bonn, G. K. *Amer. Lab.* **1994**, *26*, 28C-28J.
7. Jones, A. C.; Austin, J.; Hansen, N.; Hoogendoorn, B.; Oefner, P. J. Cheadle, J. P.; O'Donovan, M. C. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1133-1140.
8. 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* **1999**, *62*, 369-376.
9. Ellis, L. A.; Taylor, C. F.; Taylor, G. R. *Hum. Mutat.* **2000**, *15*, 556-64.
10. Gross, E.; Arnold, N.; Pfeifer, K.; Bandick, K.; Kiechle, M. *Hum. Mutat.* **2000**, *16*, 345-353.
11. Nickerson, M. L.; Weirich, G.; Zbar, B.; Schmidt, L. S. *Hum. Mutat.* **2000**, *16*, 68-76.
12. Benit, P.; Kara-Mosterfa, A.; Berthelon, M.; Sengmany, K.; Bonnefont, J. P. *Hum. Mutat.* **2000**, *16*, 417-421.
13. Huber, C. G.; Berti, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2959-2965.
14. Oefner, P. J.; Underhill, P. A. **1998**, *U.S. Patent* 5795976.
15. Hansen, N. F.; Oefner, P. J. **1997**, *U.S. Patent* 5795976.
16. Takahashi, T.; Nau, M.; Chiba, M.; Birrer, M.J.; Rosenberg, R. K.; Vinocour, M.; Levitt, M.; Pass, H.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. *Science* **1989**, *246*, 491-494.
17. Kim, J.; Takahashi, T., Chiba, I.; Park, J. G.; Birrer, M. J.; Roh, J. K.; Lee, H.; Kim, J. P.; Minna, J. D.; Gazda, A. F. *J Natl Cancer Inst.* **1999**, *83*, 938-943.
18. Soussi, T.; Fromental, C.C.; May, P. *Oncogene* **1990**, *5*, 945- 952.
19. Hollstein, M.; Sidrowsky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C. *Science* **1991**, *253*, 49-53.
20. Gannon, J. V.; Greave, R.; Iggo, R.; Lane, D. P. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1595-1602.