

Dual Priming Oligonucleotide (DPO) system을 이용한 듀시엔/베커형 근이영양증 진단법

서울아산병원 선천성 기형 및 유전질환 유전체센터¹, 의학유전학클리닉²
울산대학교 의과대학 소아과학교실³, 씨젠생명과학연구소⁴

김주현¹ · 김구환² · 이진주² · 이대훈⁴ · 김종기⁴ · 유한욱^{1,2,3}

Diagnostic testing for Duchenne/Becker Muscular dystrophy using Dual Priming Oligonucleotide (DPO) system

Joo Hyun Kim¹, Gu-Hwan Kim², Jin Joo Lee², Dae-Hoon Lee⁴
Jong-Kee Kim⁴ and Han-Wook Yoo^{1,2,3}

¹Genome Research Center for Birth defects and Genetic Diseases, Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea

²Medical Genetics Clinic and Laboratory, Asan Medical Center, Seoul, Korea

³Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

⁴SeeGene Institute of Life Science, Seoul, Korea

Purpose : Large exon deletions in the DMD gene are found in about 60% of DMD/BMD patients. Multiplex PCR has been employed to detect the deletion mutation, which frequently generates noise PCR products due to the presence of multiple primers in a single reaction as well as the stringency of PCR conditions. This often leads to a false-negative or false-positive result. To address this problematic issue, we introduced the dual primer oligonucleotide (DPO) system. DPO contains two separate priming regions joined by a polydeoxyinosine linker that results in high PCR specificity even under suboptimal PCR conditions.

Methods : We tested 50 healthy male controls, 50 patients with deletion mutation as deletion-positive patient controls, and 20 patients with no deletions as deletion-negative patient controls using DPO-multiplex PCR. Both the presence and extent of deletion were verified by simplex PCR spanning the promoter region (PM) and 18 exons including exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43-48, 50-52, and 60 in all 120 controls.

Results : DPO-multiplex PCR showed 100% sensitivity and specificity for the detection a deletion. However, it showed 97.1% sensitivity and 100% specificity for determining the extent of deletions.

Conclusion : The DPO-multiplex PCR method is a useful molecular test to detect large deletions of DMD for the diagnosis of patients with DMD/BMD because it is easy to perform, fast, and cost-effective and has excellent sensitivity and specificity.

Key Words : Dual priming oligonucleotide (DPO) system, Multiplex PCR, Duchenne/Becker muscular dystrophy

서 론

듀시엔/베커형 근이영양증(DMD/BMD; OMIM#310200/30076)은 X-염색체 연관 유전질환으로 진행성 근육 퇴화를 가져오는 질환이다. 듀시엔형 근이영양증(DMD)은 어린나이에 일반적으로 나타나는 근육질환으로 남자 신생아의 3,500명 중 한 명 꼴로 발생하고, 증상은 3-4세경에 나타나기 시작한다. 골반대퇴근 등 하지의 근위부 근육이 먼저 이완되고 보행 장애가 주 증상으로 나타나며 대체로 지능이 저하되고, 12세 이전에 휠체어를 사용하게 되거나 30대에 일찍 사망할 수 있는, 남아에게 치명적인 질병이다¹⁾. 반면 베커형 근이영양증(BMD)은 18,500명 중 한 명 정도로 발생하고 약 12세경에 발병하고, 평균 16세 이후에 휠체어를 사용하게 되는 근육질환으로, 듀시엔형에 비하여 비교적 늦게 발병이 되며 진행도 천천히 일어난다²⁾.

듀시엔/베커형 근이영양증은 근육 손상에 의해 증가되는 혈청내의 크레아틴 카이네이스(creatine kinase, CK)의 활성도를 측정함으로써 진단이 가능하며, 또한 근육 손상의 정도를 예측할 수 있는 지표로 사용된다. 듀시엔형 근이영양증에 대한 여성 보인자의 약 50%에서 CK 값이 증가되는 것을 확인할 수 있으며, 베커형 근이영양증에 대한 여성 보인자의 30%에서 CK 값을 통한 진단이 가능하다^{3,4)}. 이 외에도 근육 생검을 통한 디스트로핀 단백질의 염색에 의한 조직학적 검사로 진단이 가능하다⁵⁾. 근전도법에 의한 진단도 가능하나 거의 모든 근육질환에서 근전도의 이상이 나타나므로 실질적으로 근이영양증을 구분하기 어렵다.

듀시엔/베커형 근이영양증은 Xp21.2에 위치한 디스트로핀(DMD) 유전자의 돌연변이에 의한 근육질환으로 DMD 유전자의 돌연변이 여부를 확인함으로써 근이영양증의 확인이 가능하다. DMD 유전자는 알려져 있는 가장 큰 유전자 중 하나로 Xp21.2에 위치한다. 2.4Mb의 크기이며 79개의 엑손(exon)과 8개의 조직 특이적인 promoter(PM)로 구성되어 있

다⁶⁾. 이 유전자의 일반적인 돌연변이로는 하나 또는 그 이상 exon의 큰 결실 또는 중복돌연변이가 전체 돌연변이의 약 51.4%를 차지한다. 듀시엔형의 경우 50-60% 정도, 베커형의 경우에는 80% 정도 DMD 유전자의 거대 결실이 발견된다^{7,8)}. DMD 유전자의 exon 44-53에서 결실돌연변이가 가장 자주 일어나고(hot spot), exon 3-17이 그 다음으로 빈도가 높다⁹⁾. 거대결실 돌연변이를 찾아내기 위해서 hot spot으로 알려진 exon들을 위주로 복합 중합효소 연쇄반응(multiplex PCR)을 이용하고 있다. 17개의 DMD 유전자의 exon과 하나의 PM를 분석하게 되며¹⁰⁾, 한 개의 시험관에 3-4개의 exon을 인지할 수 있도록 시발체(primer)가 들어가게 된다. 하지만 이 방법의 경우 시발체의 제작에서부터, 각기 다른 민감도와 효능을 갖고 있는 시발체들을 한 가지 최적반응조건으로 맞추기에 까다롭고 엄격할 뿐만 아니라, 하나의 시험관에 복합적인 시발체가 존재하기 때문에 중합효소 연쇄반응 동안 원치 않는 비특이적 생성물이 빈번하게 생성되어 잘못된 음성 또는 양성결과를 일으키는 원인이 된다.

이러한 단점을 보완하기 위해 Dual Priming Oligonucleotide(DPO) system을 DMD 유전자의 결실돌연변이 검색에 도입하였다. DPO는 polydeoxyinosine linker(poly(I) linker)를 시발체 사이에 삽입함으로써 길이가 서로 다른 두 개의 시발체 부위(5'-말단 안정판과 3'-말단 결정판)를 가져 기존의 시발체와 구조적, 기능적으로 차별화 된다. poly(I) linker는 자체적으로 증폭과정의 개시에 관여하지는 않으나 일반적인 온도보다 상대적으로 낮은 온도 값(<2°C)을 가짐으로써 약한 수소결합으로 인해 특정 온도에서 5'-말단 안정판과 3'-말단 결정판부위를 각각 구분화 시켜주면서 기포같은 구조를 형성한다. 그리하여 한 개의 시발체에서 안정판과 결정판 부위로 표적 염기서열과 이 중의 교잡과정을 겪게 되어 더욱 정밀하게 목표 유전자만을 특이적으로 증폭시키게 된다(Fig. 1). 우선 DPO의 긴 염기 서열의 5'-말단 안정판이 먼저 주형의 목표 염기서열에 안정적으로 교잡하고, 그 후에 짧은 염기 서열의 3'-말단 결정판이 주형의 나머지 목표 염기서열

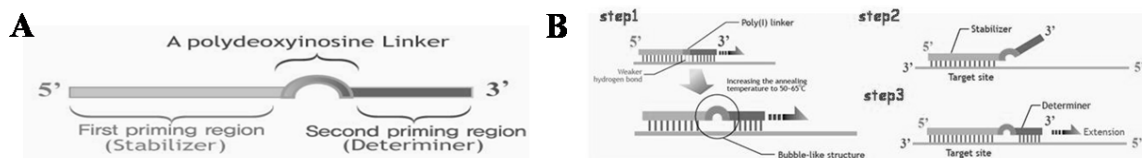


Fig. 1. Schematic diagram of DPO system (cited from http://www.seegene.co.kr/kr/service/dso_1.php#002). (A) The linker serves flexibility of the primer between first and second priming region. (B) This increases sensitivity of priming due to dual check by two separated priming regions.

부위에 교잡을 진행하면 이후 신장 단계를 거쳐 중합효소 연쇄반응을 거듭하게 된다¹¹⁾. DPO 방법을 이용한 복합 중합효소 연쇄반응은 많은 분야에서 그 안정성이 검증되어^{12, 13)} *DMD* 유전자의 거대 결실돌연변이를 확인하기 위한 복합적 중합효소 연쇄반응에서도 안정된 중합효소 연쇄반응 생성물을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 건강한 남자 정상군과 기존의 복합 중합효소 연쇄반응에서 양성반응과 음성반응이 확인된 환자들을 대상으로 DPO-복합 중합효소 연쇄반응법의 특이성과 민감성을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

50명의 건강한 남자와 기존 방법의 복합 중합효소 연쇄반응에서 양성결과를 얻은 50명의 환자, 그리고 음성 결과를 얻은 20명의 환자, 3개의 그룹을 대상으로 하였다. 게놈 DNA는 120명의 남자의 말초혈액으로 부터 PureGene Blood Kit(Gentra, MN, USA)를 이용하여 분리하였다. 기존 방법의 복합 중합효소 연쇄반응은 18쌍의 *DMD* 유전자 exon 및 PMter에 대한 시발체를 사용하여 6세트의 복합적 중합효소 연쇄반응으로 확인하였다^{10, 14)}. 결실 돌연변이에 대한 검증을 위하여 18쌍의 각각의 시발체를 *GJB2*(13q11)에 대한 시발체를 PCR 증폭 대조군으로 포함하여 이중 중합효소 연쇄반응(duplex PCR)을 하였다. 중합효소 연쇄반응 과정은 최종용적이 20 μ L로, 100 ng의 주형 DNA, 1 μ M의 각 시발체들, 200 μ M의 dNTP와 1 unit의 Taq 중합효소(Promega, WI, USA)를 사용하여 94°C에서 30초간 변성, 55°C에서 30초간 교잡, 그리고 72°C에서 45초간 신장반응을 30회 반복하여 증폭하였

다. 증폭 산물은 에티디움브로마이드가 포함된 1.2% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 exon의 결실여부를 확인하였다.

DPO-복합 중합효소 연쇄반응에 사용된 시발체는 씨젠(SeeGen, Seoul, Korea)에서 개발한 DPO 방식을 바탕으로 poly(I) linker로 연결된 안정판과 결정판을 갖는 시발체로 구성된 PM부위와 exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43-48, 50-52, 60을 포함하는 19쌍들을 세 개의 그룹으로 나누었다(Fig. 2). DPO 복합적 중합연쇄반응의 조건으로는 50 ng의 주형 DNA와 *DMD* mix, 8-Mop solution, master mix(See Gene, Seoul, Korea) 등을 혼합하여 총 양을 20 μ L로, 94 °C에서 30초의 변성, 60°C에서 90초 교잡, 그리고 72°C에서 90초 신장과정을 35회 반복하였다. 복합 중합효소 연쇄반응의 산물을 에티디움브로마이드가 포함된 1.5% 아가로오스 겔에 전기영동하여 PCR 증폭의 여부로 결실 돌연변이를 확인하였다.

결 과

50명의 정상인을 대상으로 한 DPO-복합 중합효소 연쇄반응에서 모두 결실이 없이 증폭과정이 잘 이루어 졌다. 기존 방법에 의해 결실돌연변이를 확인했던 50명의 양성환자와 20명의 결실돌연변이 음성환자를 대상으로 DPO-복합 중합효소 연쇄반응을 이용하여 결실 돌연변이 여부를 확인한 결과, 2명을 제외한 모든 환자에서 기존방법으로 검증된 결실돌연변이 부위와 동일한 결실돌연변이가 확인되었다. 기존 방법에서의 결실돌연변이 부위와 일치하지 않은 결과를 보인 2명의 환자에서 공통적으로 DPO-복합 중합효소 연쇄반응의 첫 번째 그룹에 해당하는 exon 8, PM, exon 13과 exon 12의 부위가 증폭되지 않았다(Fig. 3). 위 2명의 환자는 기존 방법에 의해 exon 13, 17, 19, 43에서 결실을 확인한 환자와 exon 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52에서 결실을 확인했던 환자이다. PM 부분과 exon 8, 12 및 13에 해당하는 exon의 증폭이 불일치하였다. 정상군과 환자군에게서 DPO-복합 중합효소 연쇄반응을 통한 결실돌연변이 검색과정은 결실돌연변이의 존재 여부 확인에는 100%의 특이성과 민감성을 보였지만, 결실돌연변이의 정확한 범위를 결정하는 데는 97.1%(환자군 중 2명의 환자에서 보인 PCR의 오류)의 민감성과 특이성을 보였다(Table 1).

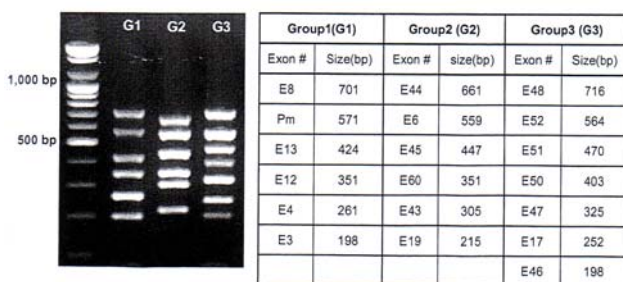


Fig. 2. The primer design of *DMD* gene for DPO-multiplex PCR. Nineteen sets of hot spot regions were divided to three groups. The example of 1.5% agarose gel electrophoresis for DPO-multiplex PCR was shown in the left. Each exon and the size were listed in table.

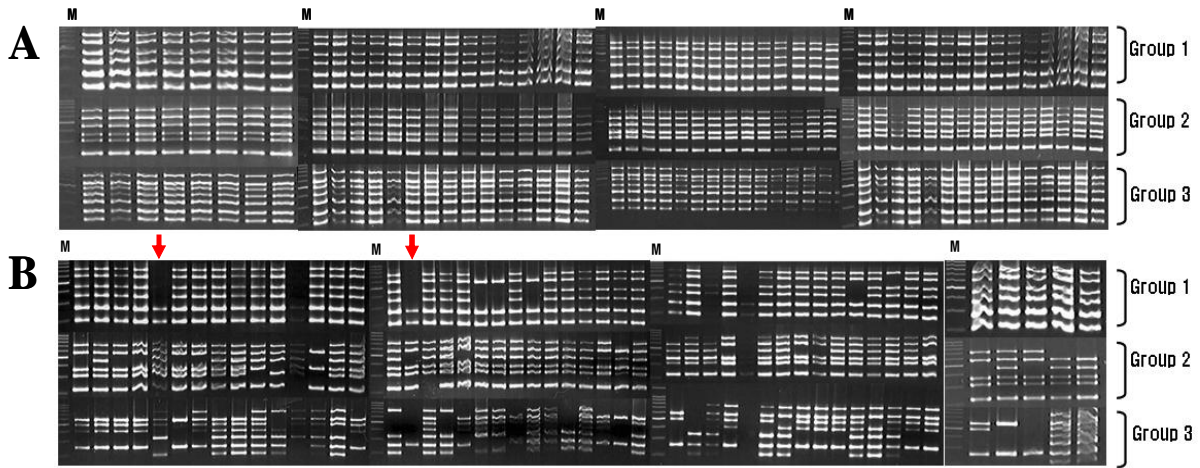


Fig. 3. The results of DPO-multiplex PCR.(A) The agarose gel electrophoresis of PCR products for 50 normal controls. All exons were successfully amplified. (B) The agarose gel electrophoresis of PCR products for 50 patients, deletion-positive controls. Two mis-amplifications are shown with arrows. "M" indicates DNA size marker, 100bp ladder.

Table 1. Sensitivity and specificity of the DPO-multiplex PCR

DPO-multiplex PCR	Sensitivity	Specificity
Selection of the patient with deletion mutation	100%	100%
Accuracy of exon deletions in patients	97.1%	97.1%

DPO, Dual printing oligonucleotide

고찰

듀시엔/베커형 근이영양증(DMD/BMD)의 *DMD* 돌연변이는 50-60%가 거대 결실돌연변이를 보이며, 현재까지 사용되고 있는 방법은 복합 중합효소 연쇄반응 과정을 통한 특정 exon의 결실 여부 확인으로 거대 결실돌연변이 여부를 확인하고 있고, 검색되는 결실 돌연변이의 범위는, 결실이 주로 발견되어지는 3-12와 40-50번째 exon들로 구성되어 있다. 이러한 방법으로는 현재까지 알려진 결실돌연변이의 98%에 해당하는 결실변이를 탐지할 수 있는 민감도를 가지고 있다¹⁰. 그러나 이러한 복합 중합효소 연쇄반응은 하나의 시험관에 여러 개의 시발체에 해당하는 DNA 조각(oligonucleotide)이 포함되어 이들 DNA 조각들 서로 간의 간섭에 의한 위양성 및 위음성의 PCR 증폭 가능성을 내포하고 있다. 최근에 개발된 poly(I) linker를 이용한 DPO 방법을 도입하여 중합효소 연쇄반응의 priming 과정을 훨씬 정교하게 함으로써 *DMD* 유전자의 복합 중합효소 연쇄반응에서 나타나는 문제점을 해결하고자 하였다.

120명의 정상군과 환자군을 대상으로 DPO-복합 중합효소

연쇄반응을 실험한 결과 PM 부위와 exon 8, 12, 13에 해당하는 증폭이 2명의 환자에게서 동일하게 이루어지지 않았으며, 기존 방법에 의한 결과와 일치하지 않았다. DPO-복합 중합효소 연쇄반응에서 결실된 exon이 불연속성을 보이는 것으로 보아 중합효소 연쇄반응 과정 중의 잘못으로 여겨진다. 이는 아마도 대상 DNA를 추출하는 과정에서 DNA의 질이 떨어졌기 때문으로 판단된다. DPO-복합 중합효소 연쇄반응 방법은 민감성과 특이성이 높기 때문에 복합 중합효소 연쇄반응에서 적은 시료를 사용하더라도 정확하게 목표 유전자를 증폭할 수 있어 *DMD* 유전자의 거대 결실돌연변이를 진단하는데 매우 민감하고 특이적이었다. 또한 실행하기가 간단하고 쉬우며 진행시간도 빨라 단 시간에 거대 돌연변이의 여부를 확인할 수 있으므로 비용적·시간적인 면에서 경제적이라 할 수 있다. 그러나, DPO-복합 중합효소 연쇄반응으로 6-10%를 차지하는 *DMD* 유전자의 중복돌연변이와 30-35%를 차지하는 점돌연변이^{15,16}를 발견할 수 없다.

최근에 개발된 MLPA(Multiple-Ligation Probe Amplification) 방법은 모든 *DMD* 유전자의 exon에 해당하는 올리고뉴클레오타이드 소식자(probe)를 하나의 염기 차이를 두고 이어지도록 2개의 조각으로 만들어, 전체 *DMD* 유전자에 교잡시키고, 연결(ligation)시킨 후, 연결된 산물을 PCR 증폭하여 증폭 산물의 양을 측정함으로써 결실 및 중복돌연변이 여부를 확인하는 방법이다. MLPA 방법을 이용하면 결실 또는 중복돌연변이의 여부를 확인할 수 있으며, 또한 여자 보인자들에게서도 결실이나 중복 돌연변이의 보인여부를 확인할 수 있으나, 소식자가 교잡되는 부위에 점변이가 있으면 위양성

의 결과가 나올 수도 있고, 실험적인 과정이 복잡하며, 비용이 많이 든다는 단점이 있다¹⁷⁾.

30-35%에 해당하는 *DMD* 유전자의 결실돌연변이 검색을 위하여 최근 single-condition amplification internal primer sequencing(SCAIP)과 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)^{18, 19)} 방법 등을 이용한 빠르고, 정확하며, 경제적으로 전체 유전자를 scanning하는 방법들이 소개되고 있으며, 또한 6-10%에 해당하는 중복 돌연변이 여부의 확인을 위하여 *DMD* 유전자에 대한 서던 교잡법이 사용되어지고 있다. 최근 근육생검을 이용하여 *DMD* 유전자의 cDNA 염기서열 분석법이 포함된 단백질과 mRNA 수준에서의 검사법으로 거의 100%의 돌연변이 검색이 가능한 방법²⁰⁾이 소개되기도 하였으나, 이들 방법은 *DMD* 유전자 돌연변이의 전체 빈도에 비하여 많은 노력과 시간 그리고 비용이 소요된다.

따라서 50-60%의 높은 비중을 차지하는 거대 결실돌연변이의 검색이 우선되어야 하며, 방법적인 면에서 간단하고 저렴해야 한다. *DMD* 유전자의 exon 3-17 그리고 43-53 범위에서의 고안되어 *DMD* 유전자 결실돌연변이의 98%를 검출할 수 있는 민감도¹⁰⁾와 DPO 방법에 의해 만들어진 이중의 교잡과정을 통해 priming의 정확도를 높인 이 방법은 높은 수준의 특이도와 민감도를 보이며, 간단한 방법과 저렴한 비용으로 빠른 시간 안에 거대결실변이를 진단할 수 있어 듀시엔/베커형 근이영양증 환자들의 *DMD* 유전자의 거대 결실돌연변이에 대한 유용한 진단방법으로 생각된다.

한글요약

목적 : 듀시엔/베커형 근이영양증(Duchenne and Becker type muscular dystrophy; DMD/BMD)은 남아에게 나타나는 일반적인 X 염색체 연관 유전성 근육 질환으로 *DMD* (dystrophin) 유전자의 돌연변이로 인해 생긴다. 그 중 큰 exon 결실이 전체 *DMD* 환자의 약 50-60%에서 발견된다. 이 유전자의 돌연변이를 찾기 위해 여러 방법들이 사용되고 있지만 결실 돌연변이를 찾아내기 위한 가장 일반적인 방법으로 복합적 중합효소연쇄반응을 이용하고 있다. 하지만 이 방법의 단점은 하나의 시험관 안에 복합적인 시발체가 존재하여 정확한 반응 조건을 찾기 힘들 뿐 아니라 시발체 상호간의 간섭으로 중합효소 연쇄반응의 비특이적 생성물을 빈번하게 일으켜 잘못된 음성 또는 양성 결과를 가져올 수 있다. 이런 문제를 보완하고자 Dual Primer Oligonucleotide(DPO) 방

법을 도입하였다. DPO는 polydeoxyinosine 연결에 의해 두 영역으로 분리된 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로 표적 DNA 염기서열과의 교잡반응에 높은 특이적 반응을 보여 복합 중합효소 연쇄반응의 정확도를 높여준다. 본 연구에서는 3 그룹을 대상으로 *DMD* 유전자의 결실돌연변이 검색을 위한 DPO-복합 중합효소 연쇄반응법의 특이성과 민감성을 알아보려고 하였다.

방법 : 50명의 건강한 남자 대조군, 50명의 결실 돌연변이를 갖고 있는 양성반응 환자그룹 그리고 20명의 결실 돌연변이를 가지고 있지 않은 음성반응 환자 그룹으로 구성된 3 그룹을 대상으로 DPO-복합 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 실험하였다. 이들 120명의 실험군 모두 PMter영역과 exon 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43-48, 50-52, 60을 포함하는 18개의 exon에서의 결실의 여부와 결실 범위를 확인하였다.

결과 : DPO-복합 중합효소 연쇄반응법은 결실 여부를 발견하는데 100%의 특이성과 민감성을 보였다. 하지만 결실 범위의 결정에는 97.1%의 민감성과 특이성을 보였다.

결론 : DPO-복합 중합효소 연쇄반응법은 기존의 복합 중합효소 연쇄반응법 보다 높은 분석 확실성을 보일뿐 아니라 빠르고 저렴한 비용으로 쉽게 할 수 있기 때문에 듀시엔/베커형 근이영양증 환자의 *DMD* 유전자의 결실돌연변이 여부를 확인하는데 유용한 방법이다.

참고문헌

- 1) Bushby KM. Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular dystrophy. *J Inher Metab Dis* 1992;15:551-64.
- 2) Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002;359: 687-95.
- 3) Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello RDC, et al. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1991;102:190-6.
- 4) Sumita DR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira AM, Canovas M, Otto PA, et al. Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am J Med Genet* 1998;80:356-61.
- 5) Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988;318: 1363-8.

- 6) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-17.
- 7) Kim UK, Chae JJ, Lee SH, Lee CC, and Namkoong Y. Molecular Diagnosis of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy by Polymerase Chain Reaction and Microsatellite Analysis. *Molecules and Cells* 2002;13:385-8.
- 8) K Foster, H Foster and JG Dickson. Gene therapy progress and prospects: Duchenne Muscular Dystrophy. *Gene therapy* 2006;13:1677-85.
- 9) Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJ, Davies KE. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988;2:109-14.
- 10) Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-8.
- 11) Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP219 gene. *Nucleic Acide Research* 2007;35:e40.
- 12) Yoo SJ, Kuak EY, Shin BM. Detection of 12 respiratory viruses with two-set multiplex reverse transcriptase-PCR assay using a dual priming oligonucleotide system. *Korean J Lab Med* 2007;27:420-7.
- 13) Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int J Food Microbiol* 2007;117:99-105.
- 14) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11141-56.
- 15) White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, et al. Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat* 2006;27:938-45.
- 16) Dolinsky LC, de Moura-Neto RS, Falcao-Conceicao DN. DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and carriers of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 2002;12:845-8.
- 17) Lai KK, Lo IF, Tong TM, Cheng LY, Lam ST. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Clinical Biochemistry* 2006;39:367-72.
- 18) Flanigan KM, von Niederhausen A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:931-9.
- 19) Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, de Koning-Gans PA, Kraak M, Ginjaar IB, et al. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2004;23:57-66.
- 20) Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, Peccate C, et al. Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat* 2007;28:183-95.