

## 듀센형근이영양증 유전자의 결실 돌연변이 검출을 위한 Dual Priming Oligonucleotide 다중 PCR법의 평가

박윤희 · 김주원 · 최종락 · 송재우 · 정종신 · 이경아

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

### Evaluation of Multiplex PCR Assay Using Dual Priming Oligonucleotide System for Detection Mutation in the *Duchenne Muscular Dystrophy* Gene

Younhee Park, M.D., Juwon Kim, M.D., Jong Rak Choi, M.D., Jaewoo Song, M.D., Jong Shin Chung, M.T., and Kyung-A Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** Exon deletions of Duchenne muscular dystrophy (*DMD*) gene account for most of the alterations found in *DMD* and Becker muscular dystrophy (*BMD*). This study was to evaluate the usefulness of dual priming oligonucleotide multiplex PCR (*DPO PCR*) in detection of exon deletions of *DMD* gene.

**Methods :** Thirty-seven *DMD* or *BMD* patients who had known exon deletions detected by conventional multiplex PCR (conventional PCR) and nine control subjects were enrolled in this study. When a discrepancy was shown between the results of conventional PCR and *DPO PCR*, the multiplex ligation-dependent probe amplification (*MLPA*) technique was performed as a confirmation test.

**Results :** The same deletions previously identified by conventional PCR in 32 out of 37 subjects were also detected by *DPO PCR*. For the five subjects (13.5%) showing discrepant results between the conventional PCR and *DPO PCR*, *MLPA* was performed and its results were found to correlate better with those of *DPO PCR*. The discrepancies were due to false positive or false negative results of the conventional PCR.

**Conclusions :** *DPO PCR* shows a high agreement of results with the conventional PCR and is considered an adequate method to be used as a primary genetic test for the diagnosis of *DMD*. Because of an improved accuracy, especially for determining the boundaries of *DMD* gene deletions, *DPO PCR* can be very useful as a supplement to the conventional PCR. (*Korean J Lab Med* 2008;28:386-91)

**Key Words :** *DMD gene, Deletion, Multiplex PCR, Dual priming oligonucleotide PCR, Multiplex ligation-dependent probe amplification*

## 서 론

접 수 : 2008년 5월 22일      접수번호 : KJLM2133  
수정본접수 : 2008년 7월 16일  
게재승인일 : 2008년 7월 17일  
교 신 저 자 : 이 경 아  
우 135-720 서울시 강남구 언주로 612  
연세대학교 영동세브란스병원 진단검사의학과  
전화 : 02-2019-3531, Fax : 02-3462-9483  
E-mail : KAL1119@yuhs.ac

\*본 논문은 2007년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임 (6-2007-0026).

듀센형근이영양증(Duchenne muscular dystrophy, *DMD*) 과 베커형근이영양증(Becker muscular dystrophy, *BMD*)은 염색체 Xp21에 위치하는 *DMD* 유전자의 돌연변이가 성염색체 열성으로 유전되는 질환이다. *DMD*는 소아에서 발생하는 가장 흔한 근육질환으로 약 3,500명의 출생남아 중 1명의 비율로 발

생하며, 이환된 환자는 30대 이전에 호흡부전이나 심부전으로 사망에 이르게 된다[1]. BMD는 DMD에 비해 상대적으로 경미한 질환으로 40-50대의 비교적 늦은 나이에 발현되며 임상경과가 급격하지 않은 경우가 전형적이다[2].

DMD 유전자는 2.4 Mb, 79개의 엑손으로 구성되어 있는 커다란 유전자로 골격근과 뇌에 발현되는 14 kb의 mRNA를 전사한다[3, 4]. DMD 유전자의 산물인 dystrophin은 427 kDa 크기의 근형질막 단백질(sarcolemmal protein)으로 세포 외 바탕질(extracellular matrix)과 세포골격물질(cytoplasmic cytoskeleton) 사이의 결합에 관여한다[5, 6]. DMD 또는 BMD 환자에서는 DMD 유전자 산물인 dystrophin이 결핍 또는 감소되어 있는 것이 특징이므로 근육 생검조직의 면역화학염색을 통해 dystrophin의 분포와 양을 검사하여 진단에 이용하게 된다. 그러나 근생검을 시행하지 않고도 좀 더 신뢰성 있고 표현형 예측이 가능한 진단법이 요구됨에 따라 유전자 돌연변이 검사는 DMD 및 BMD 진단에 필수적인 검사법이 되었다[2, 7, 8].

DMD 유전자 돌연변이의 가장 흔한 형태인 부분적 결실은 DMD와 BMD 환자의 약 60-70%에서 관찰되며[9, 10] 서던블롯이 DMD 유전자 재조합을 탐색하는 가장 고식적인 방법으로 사용되어 왔다. 그러나 서던블롯은 시간과 노동력의 소모가 많아 실제 임상 검사실에서는 다중 PCR (multiplex PCR, 이하 전통적인 다중 PCR)이 가장 널리 사용되어 오고 있다. 전통적인 다중 PCR은 결실 빈도가 높은 hot spot을 동시에 증폭하여 돌연변이를 검출하는 방법으로 전체 결실의 약 90-98%를 검출할 수 있는 빠르고 효과적인 방법으로 평가되고 있다[2, 11]. 국내에서는 DMD 및 BMD 환자에서 전통적인 다중 PCR을 통해 약 50% 가량의 결실을 검출하였다는 보고가 있다[12].

본 연구에서는 DMD 유전자의 결실 돌연변이 검출을 위하여 개발된 dual priming oligonucleotide (DPO)법을 이용한 다중 PCR 키트를 평가하고자 하였다. DPO 다중 PCR은 5' 쪽에 18-25 뉴클레오티드, 3' 쪽은 6-12 뉴클레오티드의 길이가 다른 시발체를 이용하여 PCR 반응의 특이도를 향상시킬 수 있는 기술로 보고된 바 있다[13].

저자들은 DPO 다중 PCR과 전통적인 다중 PCR 결과를 비교하고 불일치 결과를 보이는 경우 79개 엑손에 대한 유전자 정량 분석이 가능한 multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)법으로 확인하여[14] DMD 유전자 결실 돌연변이 검출을 위한 DPO 다중 PCR의 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

본원에 내원한 DMD 또는 BMD 환자 중 전통적인 다중 PCR에서 결실 돌연변이가 검출되었던 37명의 환자와 9명의 대조 검체를 대상으로 하였다. 대조 검체로는 MLPA 분석 결과 음성을 보였던 8명(남자 6명, 여자 2명)과 엑손 결실에 대한 여성 본인자 1명을 사용하였다.

### 2. 전통적인 다중 PCR법[2, 11, 15]

흔히 결실되는 18개 엑손(3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60) 및 프로모터 부위를 증폭하였다. 각 증폭부위에 대한 시발체는 각각 Abbs-5'-set (프로모터, 3, 4, 6, 8, 13, 19), Abbs-3'-set (43, 47, 50, 51, 52, 60), Chamberlain-set (12, 17, 44, 45, 48), Beggs-set (49)를 참고하였다. PCR 혼합액은 PCR 완충액(50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8.3)에 dNTP 각 0.25 mM씩 넣고 genomic DNA 2 µL, Taq DNA polymerase 1 unit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)로 제조하였으며 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 94°C에서 2분간 처리한 후 다음 반응(94°C에서 10초, 62°C에서 10초, 72°C에서 15초)을 40회 반복하고 72°C에서 5분간 연장처리 하였다. PCR 증폭 산물은 전기영동을 통해 확인하였다.

### 3. DPO 다중 PCR

SeeGene의 DMD multiplex PCR kit (SeeGene, Seoul, Korea)를 이용하여 사용 설명서에 따라 분석하였다. DPO 다중 PCR은 18개 엑손(3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 60) 및 프로모터 부위를 증폭하였으며 다음과 같이 세 군으로 나누어 분석하였다. 1군은 엑손 8 (701 bp), Pm (571 bp), 13 (424 bp), 12 (351 bp), 4 (261 bp), 3 (198 bp), 2군은 44 (661 bp), 6 (559 bp), 45 (447 bp), 60 (351 bp), 43 (305 bp), 19 (215 bp), 3군은 48 (716 bp), 52 (564 bp), 51 (470 bp), 50 (403 bp), 47 (325 bp), 17 (252 bp), 46 (198 bp)로 증폭산물의 크기에 따라 각 엑손을 구분하여 결과를 판정하였다. PCR 혼합액은 2x master mix에 각 엑손군 특이 DPO 시발체와 dT15-ACP2 (SeeGene)을 이용하여 94°C에서 15분간 처리한 후 94°C

에서 30초, 60°C에서 90초, 72°C에서 90초를 45회 반복하고 72°C에서 10분간 연장처리 하였다. PCR 증폭 산물은 전기영동을 통해 확인하였다.

**Table 1.** Concordant results between conventional multiplex PCR and DPO multiplex PCR

No. case	Deleted exons		Frame shift
	Conventional PCR	DPO PCR	
1	19	19	Yes
2	45	45	Yes
3	50	50	Yes
4	50	50	Yes
5	51	51	Yes
6	52	52	Yes
7	12, 13	12, 13	Yes
8	13, 17, 19	13, 17, 19	Yes
9	3, 4	3, 4	No
10	3, 4	3, 4	No
11	3, 4, 6, 8	3, 4, 6, 8	No
12	43, 44, 45	43, 44, 45	Yes
13	43, 44, 45	43, 44, 45	Yes
14	44, 45, 47, 48, 49, 50	44, 45, 46, 47, 48, 50	Yes
15	45, 47	45, 46, 47	No
16	45, 47	45, 46, 47	No
17	45, 47	45, 46, 47	No
18	45, 47	45, 46, 47	No
19	45, 47, 48, 49	45, 46, 47, 48	No
20	45, 47, 48, 49, 50	45, 46, 47, 48, 50	Yes
21	47	46, 47	Yes
22	47, 48, 49, 50, 51	46, 47, 48, 50, 51	Yes
23	47, 48, 49, 50, 51, 52	46, 47, 48, 50, 51, 52	Yes
24	48, 49, 50	48, 50	Yes
25	50, 51, 52	50, 51, 52	Yes
26	49, 50, 51, 52	50, 51, 52	Yes
27	51, 52	51, 52	No
28	8, 12, 13, 17, 19	8, 12, 13, 17, 19	No
29	45, 47	45, 46, 47	No
30	45, 47, 48	45, 46, 47, 48	No
31	8	8	Yes
32	49, 50	50	Yes

Abbreviation: DPO, Dual priming oligonucleotide.

**Table 2.** Results of MLPA performed on the five cases that produced discrepant results between conventional-multiplex PCR and DPO multiplex PCR

No. case	Deleted exons		MLPA
	Conventional PCR	DPO PCR	
33	45, 47, 48, 49, 50, 51, 52	44, 45, 46, 47, 48, 50, 51	44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51
34	49	48	48, 49
35	49	48	48, 49
36	12, 13	12, 13, 17	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
37	51	51, 52, 60	51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60

Abbreviations: DPO, Dual priming oligonucleotide; MLPA, Multiplex ligation-dependent probe amplification.

#### 4. MLPA법

MLPA DMD test kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands)를 이용하였다. 20-500 ng의 DNA를 단일 가닥으로 만든 후 SALSA 프로브 혼합물 034 (DMD 엑손 1-10, 21-30, 41-50, 61-70), 035 (DMD 엑손 11-20, 31-40, 51-60, 71-79)와 하룻밤 동안 60°C에서 교잡하여 결합시켰다. 그 후 54°C에서 15분간 ligase를 처리하였다. PCR 증폭은 특이 SALSA FAM PCR 시발체를 이용하여 시행하였다. 증폭산물은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)으로 분석하였다.

#### 결 과

증폭된 유전자 부위 중 49번 엑손은 전통적인 다중 PCR에만, 46번 엑손은 DPO 다중 PCR에만 포함되어 있으며 나머지 엑손 부위는 동일하였다. 분석된 hot spot 부위의 차이를 고려하여 두 검사 결과를 비교하였더니 전통적인 다중 PCR 검사에서 결실 돌연변이가 검출되었던 37중례 중 32예가 DPO 다중 PCR과 일치하였다(Table 1). 두 검사 결과 불일치를 보였던 5예(13.5%)에 대해 MLPA 분석을 시행한 결과 5예 모두 DPO 다중 PCR과 MLPA 결과의 일치를 보였다(Table 2, Fig. 1). DPO 다중 PCR과 전통적 다중 PCR 결과의 불일치를 보였던 중례 중 4예에서는 각각 17, 48, 52, 60번 엑손에 대해 전통적인 다중 PCR에서 위음성 결과를 보였으며 1예에서는 44번 엑손의 위음성과 52번 엑손의 위양성을 보였다. MLPA 검사 결과 79개 엑손에 대해 결실 돌연변이가 검출되지 않았던 8예 모두 DPO 다중 PCR에서 일치된 결과를 보였으며 연관성분석 및 MLPA 검사 결과 50번 엑손 결실에 대한 보인자로 진단되었던 1예에서도 DPO 다중 PCR 결과는 음성을 보였다.

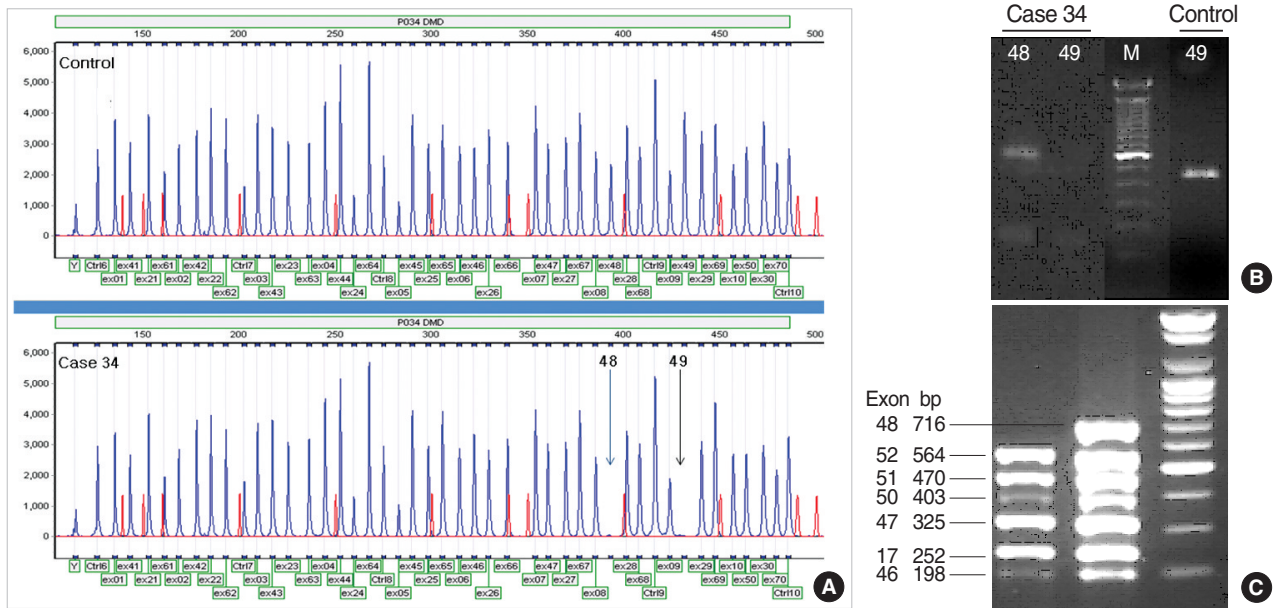


Fig. 1. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), conventional-multiplex PCR, and dual priming oligonucleotide (DPO) multiplex PCR of case 34. (A) Deletion of exons 48 and 49 of the DMD gene (arrows) in MLPA. (B) Deletion of exon 49 in lane 2 and presence of exon 48 band in lane 1 of conventional-multiplex PCR. (C) Deletion of exon 48 in group 3 DPO multiplex PCR. M, the 100-bp-size marker.

### 고찰

전통적인 다중 PCR과 DPO 다중 PCR의 비교 결과 결실 양성 검체의 대부분(86.5%)에서 결과가 일치하였다. 불일치한 경우의 주된 원인은 전통적인 다중 PCR에서 일부 엑손에 대한 위음성 또는 위양성 반응으로 인하여 결실 부위의 경계 지점을 명확히 결정할 수 없는 경우로 분석되었다.

전통적인 다중 PCR의 경우 시발체의 비특이적인 결합, 시발체 결합 부위의 염기서열 치환, 엑손 연결부에 국한된 염기치환 혹은 결실 등과 관련하여 발생될 수 있는 위음성 또는 위양성의 가능성을 고려해야 한다. 또한 다중 PCR의 경우 각 시발체에 적절한 결합온도의 조절이 중요한데 일부 시발체에서는 증폭에 필요한 최적의 온도 조절이 어려운 경우가 있어 이러한 경우 증폭산물을 얻지 못하는 경우도 있다. 검사실에서 발생될 수 있는 가능한 기술적 문제로서 크기가 작은 증폭산물을 확인하는 과정의 오류를 생각할 수 있다. 예를 들어 엑손 52의 경우 증폭산물의 크기가 113 bp로 전기영동 조건에 따라 띠(band) 확인이 상대적으로 어려운 경우가 있을 수 있다. 그러므로 전통적인 다중 PCR은 경우에 따라 다른 시발체를 사용한 재검 등을 추가로 시행할 필요가 있음이 제안된 바 있다[2, 16].

DPO 다중 PCR은 구조적, 기능적으로 전통적인 다중 PCR과는 다른 시발체를 사용한다. 시발체는 18-25 뉴클레오티드로 구성된 5' 쪽과 6-12 뉴클레오티드로 구성된 3' 쪽으로 나뉘며

길이가 다른 양쪽은 polydeoxyinosine [poly (I)] linker로 연결되어 있다. Deoxyinosine (I)는 약한 수소결합으로 인해 일반적인 염기에 비해 낮은 용해온도를 가지므로[13, 17] poly (I) linker가 끈은 구조를 가진 염기 사이에 삽입되면 기능적으로 다른 두 부위를 가지는 하나의 시발체가 형성된다. 각 부위는 뉴클레오티드의 분포가 달라 다른 결합 온도를 가지는데, 길이가 긴 5' 쪽은 DNA에 더 쉽게 결합하고 안정적인 반면 짧은 3' 쪽은 원하는 DNA 부위에만 선택적으로 결합하여 비특이적인 결합을 저지하는 역할을 한다고 보고되었다[13, 17].

본 연구에서 불일치를 보인 증례들의 경우 전통적인 다중 PCR에서 결실 돌연변이의 경계를 명확히 규정하는 데 문제는 있었지만 결실 돌연변이를 전혀 가지고 있지 않았던 증례를 전통적인 다중 PCR 결과에 의해 환자로 진단한 경우는 없었다. 그러나 위에서 언급한 PCR의 기술적 한계를 고려할 때 특히 전통적인 다중 PCR에서 하나의 엑손만 결실을 보이는 경우 염기서열 확인에 앞서 DPO 다중 PCR과 같이 분석적 특이도가 향상된 다른 종류의 시발체를 사용한 확인이 필요할 것으로 생각된다.

이 논문에서 비교법으로 이용한 MLPA는 45개 이상의 대상 염기서열을 동시에 증폭하여 큰 유전자의 재배열을 검출할 수 있는 방법이다. 22-43개의 두 올리고핵산염기로 구성된 MLPA 프로브는 환자의 DNA와 하룻밤 가량 교잡하면 탐색자가 연결 효소(ligase)에 의해 결합된다. 이 산물이 PCR을 통해 증폭되며, 각 PCR 산물의 상대적인 양은 원하는 염기의 증복된 수에 비해

하므로 DMD 유전자의 결손과 중복을 알 수 있다. 각 엑손에 대응하는 그래프의 최고치는 표준물질에 대한 상대적인 이동거리의 차이로 구분할 수 있고 최고점의 차이로 결손과 중복 및 보인자를 감별을 할 수 있다. 하지만 MLPA 법도 탐색자가 부착하는 부위나 연결효소 절단부위에 존재하는 작은 변이 등으로 해당 엑손 전체가 결손된 것과 같은 위양성 결과를 보일 수도 있어 직접 염기서열 분석과 같은 확인검사가 필요한 경우가 있다 [14, 18].

불일치를 보였던 5예(case 33-37) 중 4예(case 33, 34, 35, 37)는 reading frame rule[19]에 의한 표현형 예측결과가 세 검사 모두 일치하였다. 그러나 36번 증례의 경우 MLPA 결과와 전통적인 다중 PCR의 경우 out-of-frame 결실로 예측된 반면 DPO 다중 PCR의 경우 in-frame 결실에 해당하였다. MLPA 분석 결과 결실은 엑손 10번부터 17번까지이므로 17번 엑손까지 검출한 DPO 다중 PCR이 결실 경계를 검출하는데 있어 더 민감한 것으로 평가할 수 있다. 그럼에도 불구하고 표현형 예측 결과의 차이를 초래한 것은 전통적인 다중 PCR과 DPO 다중 PCR에서 분석되는 hot spot 부위에 10번 또는 11번 엑손이 포함되어 있지 않기 때문인 것으로 생각된다. 즉 엑손 10번부터 17번까지 결실되는 경우 frameshift가 발생하는데 hot spot 부위에 대해서만 분석을 시행할 경우 12번에서 17번까지 결실이 존재하는 것으로 해석되므로 frameshift가 없는 것으로 예측 결과를 얻게 된다. 모든 엑손에 대해 검사하지 않는 다중 PCR의 결과만으로 frameshift를 예측하는 것은 한계가 있을 수 있으나 대부분의 경우 다중 PCR 결과를 이용한 DNA 수준에서의 표현형 예측은 임상적으로 유용한 정보이므로 PCR에서 분석되는 엑손 부위를 선정할 경우 돌연변이 고빈도 부위와 함께 표현형 예측의 정확성 향상을 위하여 hot spot 인접 부위에 대해서도 고려해야 할 것으로 생각된다.

DPO 다중 PCR은 전통적인 다중 PCR과 높은 결과 일치율을 보여 DMD 진단의 일차 유전검사로 사용하는데 적절한 기법으로 평가되었다. 특히 DMD 유전자의 결실 경계부위 결정에 정확도를 높일 수 있어 전통적인 다중 PCR에 보완적인 용도로도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경 :** 듀센형근이영양증과 베커형근이영양증은 Duchenne muscular dystrophy (DMD) 유전자의 결실이 질환의 주요 원인이다. 본 연구에서는 DMD 유전자의 결실 돌연변이가 검출을 위하여 개발된 dual priming oligonucleotide (DPO)를 이용

한 다중 PCR 키트의 유용성을 평가하였다.

**방법 :** 전통적인 다중 PCR에서 결실 돌연변이가 검출되었던 37명의 환자와 9명의 대조 검체를 대상으로 하였다. 시행된 전통적인 다중 PCR과 DPO 다중 PCR에서 불일치한 결과에 대해 multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 법으로 확인하였다.

**결과 :** 전통적인 다중 PCR 검사 결과 결실 돌연변이가 검출되었던 37증례 중 32예는 DPO 다중 PCR과 일치하였다. 두 검사 결과 불일치를 보였던 5예(13.5%)에 대해 MLPA 분석을 시행한 결과 5예 모두 DPO 다중 PCR과 MLPA 결과의 일치율을 보였다. DPO 다중 PCR과 전통적인 다중 PCR 결과의 불일치 원인은 전통적 다중 PCR 결과의 위음성 및 위양성으로 인하였다.

**결론 :** DPO 다중 PCR은 전통적인 다중 PCR과 높은 결과 일치율을 보여 DMD 진단의 일차 유전검사로 사용하는데 적절한 기법으로 평가되었다. 특히 DMD 유전자의 결실 경계부위 결정에 정확도를 높일 수 있어 전통적인 다중 PCR에 보완적인 용도로도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
2. Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991;28:304-11.
3. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, et al. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1992;1:19-28.
4. Nobile C and Marchi J. A refined restriction map of YAC clones spanning the entire human dystrophin gene. *Mamm Genome* 1994; 5:566-71.
5. Ervasti JM and Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66:1121-31.
6. Ervasti JM and Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993;122:809-23.
7. Choi JR, Song KS, Park SJ. Genetic polymorphism analysis for the detection of Duchenne muscular dystrophy carriers. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:236-41. (최종락, 송경순, 박숙자. 듀센형 근이영양증 보

- 인자 진단을 위한 유전자 다형 분석. *대한임상병리학회지* 2000;20:236-41.)
8. van Essen AJ, Kneppers AL, van der Hout AH, Scheffer H, Ginjaar IB, ten Kate LP, et al. The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J Med Genet* 1997;34:805-12.
  9. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989;45:835-47.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Park SY, Koh KN, Lim BC, Kang HS, Lee KY, Hwang H, et al. Molecular genetic analysis of dystrophin gene in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Korean Child Neurol Soc* 2004;12:50-8. (박수연, 고경남, 임병찬, 강호석, 이경연, 황희 등. Duchenne/Becker 근이영양증에서의 Dystrophin 유전자 분석. *대한소아신경학회지* 2004;12:50-8.)
  13. 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 CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e40.
  14. 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). *Clin Biochem* 2006;39:367-72.
  15. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, et al. eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1990:272-81.
  16. Fujimura FK, Northrup H, Beaudet AL, O'Brien WE. Genotyping errors with the polymerase chain reaction. *N Engl J Med* 1990;322:61.
  17. Bergstrom DE, Zhang P, Johnson WT. Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CGCAATTGCG)-3'. *Nucleic Acids Res* 1997;25:1935-42.
  18. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
  19. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-5.