

위암에서 종합효소 연쇄반응후 SSCP와 Non-Isotopic RNase Cleavage Assay(NIRCA)를 이용한 P⁵³유전자 변이의 발견

¹전남대학교 의과대학 외과학교실, 전남대학교 의과학 연구소, ²전남대학교 병원 임상연구소
³전남대학교 의과대학 임상병리학교실, ⁴서울대학교 의과대학 외과학교실

김영진¹ · 국지연² · 이지희² · 김형록¹ · 주재환¹
김동의¹ · 김신곤¹ · 서순팔³ · 김진복⁴

= Abstract =

Detection of p53 Gene Mutations in Gastric Cancers

—Comparative study of Single Strand Conformational polymorphism migration
Technique(SSCP) and Non-Isotopic RNase Cleavage Assay(NIRCA)—

Young-Jin Kim, M.D.¹, Ji-Yun Kook², Ji-Hee Lee², Hyeong-Rok Kim, M.D.¹
Jae-Hwan Joo, M.D.¹, Dong-Yi Kim, M.D.¹, Shin-Kon Kim, M.D.¹
Soon-Pal Suh, M.D.³ and Jin-Pok Kim, M.D.⁴

¹Department of Surgery, The Research Institute of Medical Science,

²The Research Institute of Clinical Medicine,

³Department of Clinical Pathology, Chonnam University Medical School;

⁴Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine

Purpose: The aim of the present study was: (a) to determine the frequency of p53 mutations by single strand conformational polymorphism analysis of polymerase chain reaction products (PCR-SSCP), Non-Isotopic RNase Cleavage Assay (NIRCA) and immunohistochemical staining with monoclonal antibody; and (b) to compare the correlations among these methods.

Materials and Methods: Abberations of the p53 gene in 24 primary gastric carcinomas were examined by PCR-SSCP, NIRCA and immunohistochemical staining. Of these surgically resected gastric adenocarcinomas, 23 were advanced gastric carcinomas and 1 was early gastric cancer. Using PCR-SSCP and NIRCA, the presence of mutations in exons 4-9 was evaluated. Using the mouse specific anti-human p53 monoclonal antibody, we also looked for overexpression of the p53 protein in tissue sections.

Results: In 5 cases shifted bands were reproducibly identified by PCR-SSCP, and two mutations were identified in exon 4 and three in 5 & 6. The mutations of exon 4 were detected by NIRCA in 5 cases, exon 5 & 6 in 6 cases, and exon 7 in 2 cases. The p53

책임저자 : 김영진, 광주시 동구 학동 8, 전남의대 외과학교실, 501-190

This research was partially supported by Korean Foundation for Cancer Research Grant No.95-4 and Grant of the Research Institute of Medical Science, Chonnam University Medical School

접수일 : 1996년 11월 15일, 게재승인일 : 1997년 3월 28일

mutations detected by PCR-SSCP were also detected by NIRCA except one case. Thirteen of the tumor samples were positively stained with the monoclonal antibody for p53 protein. There was no correlation between p53 mutations detected by NIRCA and expression of p53 protein by immunohistochemical staining.

Conclusions: Our results in this group of patients suggest that NIRCA is more sensitive than PCR-SSCP in detecting p53 mutations, and expression of p53 protein by immunohistochemical staining does not directly represent the genetic changes of p53 gene.

Key Word: Gastric cancer, p53, PCR-SSCP, Non-Isotopic RNase Cleavage Assay, Immunohistochemical staining

서 론

암의 발생과 진행에는 세포의 성장과 분화에 관여하는 많은 유전자적인 변화가 일어난다고 알려져 있는데 이를 대별하면 암유전자 활성화와 종양억제 유전자의 불활성화가 있다. 종양억제유전자는 정상 세포 유전자로써 이들이 불활성화되면 세포의 증식에 장애를 초래하여 암이 발생한다. p53유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하는 16~20kb의 DNA로 11개의 exon으로 이루어져 있고 p53 유전자가 결손되거나 돌연변이에 의한 그 기능 상실이 암 발병의 한가지 요인이라고 생각되고 있다(1).

p53 유전자의 돌연변이를 검색하는 방법으로는 염기서열 확인법(nucleotide sequencing), 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)검사법, 면역조직화학 염색(immunohistochemical staining) 등이 있다. 염기서열 확인법은 유전자의 구조이상을 확인하는데 흔히 이용되고 돌연변이의 유무 및 그 양상을 직접 확인할 수 있는 방법이나 시간과 노력이 많이 드는 단점이 있다. 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법은 핵산의 구성 염기의 차이와 염기서열의 차이에 따라서 전기영동시 핵산의 이동속도의 차이를 이용하는 방법인데 감수성과 특이성이 높다. 면역조직화학적 염색은 돌연변이형 단백질의 반감기가 수시간 혹

은 그 이상으로 연장되는 특성을 이용하여 돌연변이형 p53 단백질을 확인하는 방법인데 감수성과 특이성이 낮다.

연구자들은 위암조직에서 p53 유전자 변이를 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법, Non-Isotope RNase Cleavage Assay (NIRCA) 방법 (2)과 면역조직화학염색의 방법을 이용하여 이들 검사 방법의 장단점을 알아보고, p53유전자의 변이와 환자의 암병기 및 분화도 등과 비교 분석하였다.

연구 대상 및 방법

연구대상은 이전에 다른 치료를 받지 않았던 24예의 진행된 위암환자에서 위암 및 전이성 위암조직을 채취하여 실험하였고 실험방법은 다음과 같다.

1) 종양 조직으로부터 DNA의 추출

(1) **대상 조직의 준비:** 위절제술후 15분 이내의 신선한 위암조직에서 지방이나 결체조직을 제거한 후 영하 80°C로 냉각시킨후 조직을 마쇄한 후 PBS로 씻어낸다.

(2) **Proteinase K 처리:** 37°C에서 3시간 동안 둔 후 세포 pellet에 1 ml의 PBS를 가하고 2.5 mg/ml의 proteinase K를 넣고 섞어서 최종 농도가 100 µg/ml이 되도록 한다. 50°C의 수조에서 50~170 rpm으로 움직이는 혼합기에서 처리한다.

(3) **DNA추출:** 실온에서 식힌후 phenol/chloro-

form용액을 샘플에 동량 가한 후, 아주 강하게 흔들고 vortex하여 불순물을 제거한다. 5,000×G로 15분간 원심분리하여 상층액을 다른 튜브에 옮긴다. 이런 과정을 두번 반복한 후에 10M ammonium acetate(pH 5.0)를 1/5 넣는다. 실온에서 100% ethanol (-20°C)을 2배 넣고 10~15회 충분히 혼합하면 실타래 모양의 DNA가 나타난다. 원심분리후 응집된 DNA를 모은 후 100% ethanol, 70% ethanol로 차례로 원심분리한 후 실온에서 말린다. 1 ml의 TE buffer(10 mM Tris.Cl, 0.1 mM EDTA; pH=8.0)를 가한 후 spectrophotometer로 DNA의 양을 측정한다. 그리고 4°C에서 보관한다.

2) Polymerase chain reaction (PCR)

1.5 ml Eppendorf tube에 100 μ l의 PCR반응 혼합물(reaction buffer, dNTP, primer, template DNA, taq DNA polymerase)을 만든후 50~100 μ l의 mineral oil을 첨가한다.

샘플을 92°C에서 5분 반응시키고 나서, denaturation(92°C, 1분), annealing(56°C, 1분) 및 extension(72°C, 1분)의 과정을 35회 반복한다. 이후 72°C에 10분간 두어 반응을 종료시킨 후 2% agarose gel상에서 전기영동한다.

3) SSCP(Single strand conformational polymorphism)분석

1 μ l의 PCR산물을 20 μ l의 20mM EDTA/0.1% SDS로 희석하고 이용액 2 μ l를 2 μ l의 sequencing stop용액과 섞는다. 샘플을 95°C로 8분간 denaturation한후 6% 중성 polyacrylamide gel로 전기영동을 한다. gel을 건조한 후 autoradiography하여 single strand DNA를 분석한다. 이과정을 exon 4, 5&6, 7, 8&9에 대하여 각각 시행하였다.

4) NIRCA(Non-Isotopic RNase Cleavage Assay)

PCR로 만든 exon 4, exon 5-6, exon 7, exon 8-9의 산물에 T7과 SP6 phage promotor를 이용하여 실험실에서 transcription을 하여 RNA를 얻어서 자연상태의 정상 RNA probe와 hybridization을 시킨

다. RNase A가 접돌연변이가 있어서 정상 RNA probe와 접합되지 않는 RNA를 끊게 된다. 이들 산물을 ethidium bromide가 포함된 agarose gel상에서 1시간 이내의 짧은 시간동안 전기영동하여 접돌연변이가 없이 접합이 잘되는 대조실험과 비교하여 접돌연변이 유무를 검색한다.

(1) **In Vitro Transcription:** PCR산물에 부착된 T7 및 SP6 promotor의 염기서열을 이용하여 T7 및 SP6 polymerase를 이용하여 sense와 antisense RNA strand를 만든다. 대조실험을 위해서 wild type을 transcription하여 sense 및 antisense probe를 만든다.

(2) **Hybridization:** 각 샘플에 동일량의 wild type의 대조 transcript를 첨가하여 혼든 후 95°C에서 3분간 반응시킨 후 실온에 10분간 두어 transcription된 대상 sample의 sense 및 antisense RNA와 wild type의 RNA probe를 hybridize시킨다.

(3) **RNA cleavage 및 전기영동:** 실험대상 샘플과 RNA probe가 hybridize된 후 이 샘플에 RNase A 20 unit를 첨가하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 loading한다. 그후 30분에서 1시간 정도 전기영동하여 RNA의 파손물을 검출한다.

5) 면역조직화학적 염색

10% 중성 formalin으로 고정된 조직을 4 μ m의 두께로 절단하여 파라핀 및 가수를 한 후 mouse antihuman p53 monoclonal antibody PAb 1801 (Novocastra)를 이용하여 immunohistochemical staining을 시행하였다. 염색은 일차항체로 4°C에서 하루밤 반응시킨 후 mouse immunoglobulin에 대한 biotinylated horse antibody와 2차 반응시켰다. 반응은 chromogen으로 발색되도록 하였다. 정상 mouse혈청을 음성대조군으로 사용하였다.

6) 통계적인 처리

Fisher exact방법으로 chi square test를하여 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적인 의의가 있는 것으로 처리하였다.

결 과

중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법으로 검출한 p53유전자의 변이는 전체 24예중 exon 4에서 2예(8.3%)의 변이를 보였고(Fig. 1), exon 5,6에서 3예(12.5%)의 변이를 보였다(Table 1). 그러나 exon 8번 및 9번은 변이를 발견할 수 없었다. NIRCA 방법에 의한 p53유전자의 변이는 전체 24예중 exon 4에서 5예 (20.8%), exon 5, 6에서

Fig. 1. PCR-SSCP analysis of p53 mutations in gastric cancers. Aberrantly migrated DNA fragment of exon 4 were noted, which are indicated by arrows.

Fig. 2. NIRCA analysis of p53 mutations in gastric cancers. The mutations in sense gene of exon 4 are indicated by arrows.

Fig. 3. NIRCA analysis of p53 mutations in gastric cancers. Mutation in antisense gene of exon 5,6 is indicated by an arrows.

Fig. 4. NIRCA analysis of p53 mutations in gastric cancers. Mutations in sense DNA of exon 5,6 are indicated by arrows.

Table 1. p53 mutations and clinicopathological characteristics of the patients

	Sex, Age	Histologic type	TNM	p53 protein	PCR-SSCP	NIRCA
1.	m53	p-tube	T2N1M0	p53(-)	Exon4	Exon 4S,Exon 7AS
2.	f55	p-tube	T3N1M0	p53(+)		
3.	m72	p-tube	T3N2M0	p53(-)		
4.	m63	mucin	T4N2M0	p53(+)	Exon4	Exon 4S
5.	m53	m-tube	T3N1M0	p53(-)		
6.	m56	p-tube	T2N0M0	p53(-)		
7.	m67	p-tube	T3N0M0	p53(+)		Exon 4S
8.	f52	p-tube	T3N3M0	p53(+)		Exon 7S
9.	m60	p-tube	T3N2M0	p53(+)		Exon 5,6AS
10.	f43	p-tube	T3N1M0	p53(+)		
11.	f55	p-tube	T3N2M0	p53(+)		
12.	f34	p-tube	T3N1M0	p53(+)		Exon 4S
13.	m63	m-tube	T4N2M0	p53(-)		
14.	f57	signet	T1mN0M0	p53(-)	Exon5,6	Exon 5,6S&AS
15.	f67	mucin	T3N0M0	p53(-)	Exon5,6	Exon 4S, Exon5,6AS
16.	f33	p-tube	T3N0M0	p53(-)		
17.	m59	p-tube	T3N1M0	p53(+)		
18.	m56	m-tube	T3N1M0	p53(-)		
19.	m62	p-tube	T3N1P2	p53(-)	Exon 5,6	
20.	m47	m-tube	T3N1M0	p53(-)		Exon 5,6S&AS
21.	f52	p-tube	T4N2M0	p53(+)		Exon 5,6S&AS
22.	f67	p-tube	T3N2M0	p53(+)		Exon 5,6S
23.	m67	m-tube	T3N2P2	p53(+)		
24.	f34	p-tube	T4N3M0	p53(+)		

6예 (25.0%), exon 7에서 2예 (8.3%)의 변이를 보였고, exon 8, 9에서는 돌연변이를 발견할 수 없었다(Fig. 2, 3, 4, Table 1). 중합효소연쇄반응-단

일가닥구조다형 검사법으로 exon 5, 6에서 돌연변이가 발견된 1예에서는 NIRCA방법으로 돌연변이를 발견할 수 없었으나, 나머지 전예에서

Table 2. p53 mutations and histologic types

p53 Mutations	Tubular	Poorly	Mucinous	Signet
PCR-SSCP or NIRCA				
p53(+)	1	9	2	1
p53(-)	4	7	0	0
Immunohistochemical				
p53(+)	1	11	1	0
p53(-)	4	5	1	1

p=0.08: between well or moderately differentiated adenocarcinomas and poorly or mucinous adenocarcinomas compared whether p53 mutation in PCR-SSCP or NIRCA.

Table 3. p53 mutations and TNM stages

p53 mutations	I	II	IIIa	IIIb	IV
PCR-SSCP or NIRCA					
p53(+)	1	3	2	2	4
p53(-)	1	1	5	2	3
Immunohistochemical					
p53(+)	0	1	4	3	5*
p53(-)	2	3	3	1	2

*p = 0.037

NIRCA방법으로 동일한 exon에 돌연변이를 발견할 수 있었고, 한편 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법으로 발견할 수 없었던 경우 NIRCA방법으로 exon 4에서 3예, exon 5, 6에서 4예, exon 7에서 2예의 돌연변이를 추가로 발견할 수 있었다(Table 1).

p53유전자의 변이와 조직학적인 소견과의 관계를 살펴 보면 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법이나 NIRCA방법에 의한 p53유전자의 변이를 보이는 경우에는 저분화암이 9예, 중등도 분화암이 1예, 점액성암이 2예, 인환세포암이 1예로 분화암의 비율이 p53 유전자의 돌연변이가 없는 군에 비해서 낮았으나 통계적인 의의는 없었다(p=0.08)(Table 2).

면역조직화학법으로 시행한 mutant형의 p53단

Table 4. p53 mutations by NIRCA and expression of p53 protein by immunohistochemical staining

p53 mutations	Sense only	Sense & antisense	Antisense only
p53 protein(+)	5	1	1
p53 protein(-)	0	4	0

p<0.05

백은 총24예중 13예에서 발견되어 54.2%의 양성율을 보였다(Table 3). 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법이나 NIRCA방법에 의해 검출된 p53 유전자의 돌연변이 여부와 면역조직화학법으로 검출된 p53단백의 발현과는 상관관계를 발견할 수 없었다. 다만 확실한 의미는 불명이나 NIRCA 방법에 의한 p53 유전자 변이에서 sense 유전자만 변이를 보이는 경우에 면역조직화학법에 의한 p53유전자 단백질이 모두 양성으로 나타나고 antisense 유전자에 변이를 같이 보이는 경우에는 음성인 경우가 많았다(Table 4).

암병기는 I이 2예(8.3%), II가 4예(16.7%), IIIa가 7예(29.2%), IIIb가 4예(16.7%), IV가 7예(29.2%)였는데, 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법이나 NIRCA에 의한 p53유전자의 돌연변이가 양성인 경우에는 암병기가 I이 1예, II가 3예, III이 4예, IV가 4예로 p53유전자의 돌연변이와 암병기와는 관계가 없었고, 면역조직화학법으로 검출한 p53유전자의 변이가 양성인 경우에는 II는 1예, IIIa가 4예, IIIb가 3예, IV가 5예로 p53유전자의 변이가 음성인 경우보다 암병기가 진행된 경우가 많았다(p=0.037 by Mandel-Haenszel)(Table 3).

고 찰

p53유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하는 16-20kb의 DNA로 11개의 exon으로 이루어져 있고, p53 유전자의 중요한 생화학적 기능의 하나는 세포주기중 G1에서 정지를 가져와 S기에 돌입하

기 전에 핵산의 손상부위를 교정하거나 혹은 아포토시스를 유발함으로써 손상된 핵산을 가진 세포의 지속적인 증식을 방지하는 것으로 알려져 있다. 염색체상의 p53 유전자가 결손되거나 돌연변이 등에 의해 그 기능이 소실되는 것이 발암기전의 한가지 요인이라고 생각되고 있다(3,4). 위암에서의 경우 원발암 병소에서는 20%에서, 전이성 암에서는 대부분에서 p53 유전자의 이상이 발견된다고 보고하고 있다(5). 결장 및 직장암에서는 45%에서 발견되고(6) 간암에서는 31.5%에서 면역조직화학적 방법으로 과발현이 보고되었는데 종양의 크기가 크고, 진행된 경우에서 발현이 증가하여 예후인자로서의 가능성이 시사되고 있다(7,8).

p53 유전자의 돌연변이를 검색하는 방법으로는 염기서열 확인법(9), 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법(10), 면역조직화학 염색(11) 등이 있다. 염기서열 확인법은 유전자의 구조 이상을 확인하는데 흔히 이용되고 돌연변이의 유무 및 그 양상을 직접 확인할 수 있는 방법이나 시간과 노력이 많이 드는 단점이 있다. 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법은 핵산의 구성염기의 차이와 염기서열의 차이에 따라서 전기영동시 핵산의 이동속도의 차이를 이용하는 방법인데 감수성과 특이성이 높다(10). 면역조직화학적 염색은 돌연변이형 단백질의 반감기가 수시간 혹은 그 이상으로 연장되는 특성을 이용하여 돌연변이형 p53 단백질을 확인하는 방법인데 감수성과 특이성이 낮다. p53 단백질의 염색이 양성인 경우는 p53 유전자에 돌연변이가 있는 경우, P53 단백질이 축적되어 있는 경우, 또는 p53 유전자의 작용 경로 하부 유전자의 이상 등에 의한다. 그러나 p53 유전자에 돌연변이가 있는 경우에도 유전자의 소실이나 전체적인 유전자의 이동이 있는 경우는 검출하지 못한다(12). Rodrigues 등(13)은 대장암 세포에서 p53 유전자의 변이가 있음에도 면역조직화학법으로 검출하지 못하는 경우가 있다고 하였는데 저자의 경우도 유전자의 변이와 p53 단백질의 발현과는 차이를 보였다. 또한 저자의 경우 NIRCA 방법에 의한 p53 유전자의 변이에서

sense 유전자만 변이를 보이는 경우에 면역조직화학법에 의한 p53 유전자 단백질이 모두 양성으로 나타나고 antisense 유전자에 변이를 같이 보이는 경우에는 음성인 경우가 많았다. 이러한 결과는 향후 p53 유전자의 염기서열에 대한 조사나 다른 방법에 의한 검색이 필요하다고 하겠다.

NIRCA 방법은 점돌연변이의 기초조사에 이용되어 왔는데 (2), PCR 산물에 T7과 SP6 phage promotor의 염기서열을 sense와 antisense primer의 5' 말단에 첨가하여 이 PCR 산물을 transfer template로 T7 및 SP6 polymerase를 이용하여 실험실에서 transcription을 시킨다. In Vitro transcription으로 얻은 RNA를 자연상태의 정상 p53 RNA probe와 hybridization을 시킨다. RNase A가 점돌연변이가 있어서 정상 RNA와 접합되지 않는 RNA를 끊게 된다. 이들 산물을 ethidium bromide가 포함된 agarose gel 상에서 1시간 이내의 짧은 시간동안 전기영동하여 점돌연변이가 없이 접합이 잘되는 대조실험과 비교하여 점돌연변이를 발견한다. 본기법의 장점은 첫째 전기영동의 시간이 1시간 이내여서 짧은 시간에 결과를 알 수 있고, 둘째 실험도중 RNA가 hybridization 상태이므로 RNase를 불활성화 시킬 필요가 없으며, 셋째 비특이적인 반응이 일어나는 경우가 매우 적다는 점 등이다. 저자의 경우 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법에 비해서 그 민감성이 높은 결과를 보였고, 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법에서 변이가 발견된 경우에는 1예를 제외하고 전예에서 NIRCA 방법에서도 동일한 exon에서 변이를 발견할 수 있었다.

결 론

p53 유전자의 변이의 검출방법으로 NIRCA 방법에 의한 것이 PCR-SSCP법보다 간편하고, 짧은 시간에 가능하며, 검출율이 높아 p53 유전자의 돌연변이의 검출에 더욱 유용한 방법으로 생각되고, 면역조직화학적 방법에 의한 p53 단백질의 검출은 유전자에서의 돌연변이와 일치하지 않

아서 p53 단백질의 발현은 유전자의 돌연변이 뿐아니라 p53유전자의 작용경로의 하부유전자의 이상이나 유전자의 소실이나 전체적인 유전자의 이동이 있는 경우로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Smith ML, Fornace AJ. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Current Opinion in Oncology* 1995; 7: 69-75.
2. Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science* 1985; 230: 1242-1246.
3. Harris CC. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; 262: 1980.
4. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
5. Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Rho JK, De Lee H, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma and tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 938-943.
6. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104: 57-64.
7. Hsu HC, Tseng HJ, Lai PL, Lee PH, Peng SY. Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. *Cancer Res* 1993; 53: 4691-4694.
8. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short term prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778-2784.
9. Tabor S, Richardson CC. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 86: 4767-4771.
10. Orita M, Iwahan M, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-2770.
11. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 244-249.
12. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene; Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
13. Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 7555-7559.