

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4550416号
(P4550416)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010. 9. 22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010. 7. 16)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 27/62 (2006. 01)	GO 1 N 27/62 V
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 P
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 2 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2003-529991 (P2003-529991)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年9月12日 (2002. 9. 12)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2005-503570 (P2005-503570A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成17年2月3日 (2005. 2. 3)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/010235		T
(87) 国際公開番号	W02003/025219		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		グレンツアーヘルストラツセ１２４
審査請求日	平成17年6月20日 (2005. 6. 20)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	A 1444/2001		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001. 9. 14)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の配列決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸の推定される配列について計算された衝突誘発された解離 (C I D) スペクトルの値が、前記核酸の測定される C I D スペクトルの値と比較され、そして前記計算された C I D スペクトルと前記測定された C I D スペクトルとの一致の程度が計算される、核酸の配列決定方法であって、

4つの可能なヌクレオチド A、T 又は U、G 及び C の個々が、前記推定された配列の各々の位置で他のヌクレオチドのすべてと置換され、そして前記測定された C I D スペクトルと前記計算された C I D スペクトルとの一致の程度が再計算され、

アルゴリズムが、測定される値が前記測定された C I D スペクトル中の計算された位置で存在するか否かの決定に基づく、前記計算された C I D スペクトルと前記測定された C I D スペクトルとの一致を計算するために使用され、

そして、前記測定された値がより高い強度 (I) 及び m/z についての正確な値からのより小さな偏差 (Δ) を有し、並びに割り当てられたフラグメントイオン (K) の数が大きくなればなるほど、及びいずれの可能な電荷状態のフラグメントも割り当てられなかったスペクトルの位置 (M) の合計が低くなればなるほど、より高い一致度は推定される、ことを特徴とする、前記方法。

【請求項 2】

前記一致を計算するためのアルゴリズムが、前記測定された C I D スペクトルが推定される配列に正確に一致すると仮定して、前記推定される配列と前記測定された C I D スペ

10

20

クトルとを比較することによって決定されることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、推定される配列について計算された、CIDスペクトルの値が核酸の測定されたスペクトルと比較され、そして一致の程度が計算される、核酸の配列決定方法に関する。

そのような方法においては、核酸が最初にイオン化され、第1分光計において選択され、そして次に、気体原子又は分子との衝突（衝突誘発された解離（CID）として言及される）によりフラグメント化される。このフラグメント化は、そのフラグメントの質量分光写真試験が初期イオンについての推論を可能にする理由である既知の規則に従う。

【0002】

核酸がフラグメント化される場合、イオン（a-Bイオン）がその5'末端及び3'末端（wイオン）で形成さえる。末端から出発して完全な配列を完全に誘発するための方法は、Ni, J.; Pomerantz, S.C.; Rozenski, J.; Zhang, Y.; McCloskey J.A. Anal. Chem. 1996, 68, 1989-99に記載されている。多数の解決できない欠陥が存在するので、この方法は短い長さ（多くとも15マー）の核酸に限定される。他方では、上記に定義される型の方法は、アメリカ特許第6,017,693号（Yatesなど）に記載されており、ここでペプチドのライブラリーが、それらの測定されたスペクトルに応答する化合物を含むかどうかに関して試験される。この公報においては、前記方法はオリゴヌクレオチドに拡張されることが提案されているが、しかしその方法は典型的には、試験されるべき莫大な数の初期値のために、10マー及びそれ以下に制限される。

【0003】

本発明の目的は、既知方法を、相当に長い配列に適用できるようにすることである。これは、要求される問題が主に正しい配列についてではないが、しかしむしろ、測定されるスペクトルとの一致が初期配列を組織的に変えることによって改良されるかどうかであることに於いて本質的に達成される。従って、本発明は、推定される配列の少なくとも1つの位置が修飾され、そして測定されるスペクトルとの一致の程度が再計算されることに於いて特徴づけられる。

【0004】

基本的には、本発明は、前記方法を反復して適用することによって、好都合であることが推定されるランダム初期配列から出発して正しい配列への上昇する接近性を可能にする。しかしながら、前記方法の実際の強さは、既知の配列における核酸モノマーの点突然変異及び切除又は挿入の決定及び位置決定において存在する。特に、ヌクレオチドの数が知られている場合、4種の可能なヌクレオチドの個々が特定位置で使用され、そして個々の場合、スペクトルとの一致の程度が計算されることが好都合である。この方法が配列の個々の位置に関して実施され、そして個々の場合、最良の適合性を有するヌクレオチドがその配列に配置される場合、これが最終的に、完全な配列のための最適な適合性をもたらす。

【0005】

本発明の範囲においては、計算されたスペクトルと測定されたスペクトルとの間の一致の程度を多くの値により特徴づけるために種々の方法を使用することは、基本的に可能である。しかしながら、それは、測定された値が測定されたスペクトルにおける計算された位置で存在するか、又は否かの決定に基づかれる、計算されたスペクトルと測定されたスペクトルとの間の一致を計算するために、アルゴリズムが使用される場合、特に単純である。

【0006】

あるフラグメントについてのm/z値は、高い精度で計算されるべきであり、そして測定される値の強度、すなわち種々のフラグメントの度数分布は予測するのに非常に困難である。従って、最初に、強度の予測をやめ、むしろ測定される強度が高い場合、測定される

スペクトルにおける予測される、測定される値の発生をより高い比率にすることが適切である。 m/z 値はそれらの測定よりも高い程度の精度を伴って計算されるべきであるので、1つの予測を実現されるものとして見なす異なった値が定義されるべきである。この定義は、誤った陽性及び誤った陰性の数が最少にされるべき必要条件に基づかれる。

【0007】

タンデム質量分析方による配列決定の原理：

核酸は衝突誘発されたフラグメント化により配列一特異的態様で分解され、それにより、ホスホジエステル基における結合分裂の型及び残る電荷に従って示される、前駆体イオンのフラグメントが形成される。損なわれていない5'-末端を有する電荷フラグメントは、a, b, c, dフラグメントとして言及され、そして損なわれていない3'-末端を有する荷電されたフラグメントは、w, x, y, zフラグメントとして言及される(図1a)。フラグメントのデオキシリボース残基の番号は、下付き番号により示され、そして電荷状態は上付き番号により示される。従って、 $(a_5)^{2-}$ は、5個のヌクレオチド単位から成り、そして2度、負に荷電されている一連のフラグメントを表す。さらに塩基が切除されているフラグメントは、-Bを付加することによって、例えば $(a_n-B_n)^{m-}$ として示される。

【0008】

フラグメント化は基本的にいずれかの結合で生じるが、オリゴヌクレオチドアニオンのための主なフラグメント化路が存在することがわかっている。この工程においては、最初に、糖の3'-C-O結合の分解が存在し、続いて塩基の損失及びw及び相補的(a-B)イオンの形成が導かれる(図1b)。特定タイプのフラグメントイオンは、一定のイオン系に属し、ここでイオン系内の質量差異が配列における塩基の質量により決定される。従って、フラグメント化された核酸の配列は、イオン系における質量差異に基づいて読み取られ得る(図1c)。

【0009】

比較配列決定法：

本発明の配列決定アプローチの出発点は、配列の完全な新しい決定が多くのゲノム一特異的適用のために必要でない事実である。それは通常、配列を確証するか、又は既知配列からの小さな偏差を見出すために十分である。この場合、MS/MSによる配列決定は、従来使用されるSangerの配列決定方法に変わる魅力的な手段である。この理由は、配列一特異的データが衝突一誘発されたフラグメント化により、及びフラグメントイオンの続く分析により、数秒以内で得られることである。

【0010】

測定されたMS/MSスペクトルと、推定される参照に基づいて計算され得る一連のフラグメントとの間の一致の接近性は、いずれかの数学的アルゴリズムにより説明され得る。アルゴリズムは、測定されたスペクトルと計算されたフラグメントイオンとの間の一致が適合値(FS)により特徴づけられる例として解明されるであろう。適合性は、測定された m/z 値と計算された m/z 値との間の絶対的差異 Δ 、フラグメントイオンの相対的強度I%、割り当てられたフラグメントKの数、及びフラグメントイオンにより保護されないヌクレオチド位置Mの数を組み込む。適合性についての値は、測定されたスペクトルと計算された m/z 値との間の一致の程度の上昇と共に、小さくなる。

【0011】

MS/MSスペクトルの実験データと最良に適合する配列を見出すためには、最初の参照配列は、配列の個々の位置ですべての可能な4個のヌクレオチドA, T, G及びCを組み込むことによって連続的に変更され得る。次に、最も低い適合値を有する配列が、正しい配列として同定される。

【0012】

配列決定アルゴリズムの開発：

図2は、核酸の比較配列決定のための方法を示す。入力パラメーターは、一方では、前駆体イオンの電荷状態と共に参照配列であり、そして他方では、実験的な決定された一連の m/z 値及びそれらの相対的強度I%である。1から前駆体イオンの電荷状態までのフラグ

10

20

30

40

50

メントイオンのすべての可能な電荷状態を考慮してのa, a-B, w及びw-Bイオン系についての一連の単異性体m/z値が、前記参照配列から計算される（段階1、図2）。続いて、計算されたm/z値及び実験的に見出されたそれらの値が比較される（段階2a、図2）。

【0013】

この比較の結果は、計算されたm/z値を割り当てられ得たフラグメントイオン（K）の数、及び保護されていないa及びw位置（M）の合計である。保護されていないa位置は、a-Bも、いずれの可能な電荷状態のフラグメントも見出されないスペクトルにおけるそれらの位置である。同様に、保護されていないw位置は、w-Bも、いずれかの可能な電荷状態のwフラグメントも割り当てられ得なかったスペクトルにおけるそれらの位置である。aフラグメントを割り当てるためには、測定されたm/z値と計算されたm/z値との間の差異の絶対値が、許容値（ Δ ）よりも小さいか又はその値に等しくあるべきである。

10

【0014】

K及びMについての値は、0.1段階における0.2～0.8のすべての Δ 値について、上昇する順序で計算される（段階2b、図2）。続いて、最適 Δ 値が、誤った陽性（大き過ぎる Δ ）及び誤った陰性（小さ過ぎる Δ ）の割り当ての数が最少にされる（段階2c、図2）。最適 Δ 値は、曲線が定常値に達する直前、 Δ 値としてのM対 Δ のプロットから推定され得る（図3）。

【0015】

アルゴリズムの次の段階は、質量偏差及び強度に関して、m/z値の割り当ての性質に影響を及ぼす適合因子MFを計算することである（段階3、図2）。適合因子MFは、絶対質量偏差 Δ 、及び割り当てKの合計数にわたって平均された強度I（強度は%で入力されるので、その値は100により掛け算される）のすべての商の合計として定義される。これは、次の等式： $MF = 1/K \cdot \Sigma (100 \cdot \Delta / I\%)$ をもたらし（図2）。3種のパラメーター、すなわち適合因子MF、割り当てられたフラグメントイオンKの数及び保護されていない位置Mの合計が、配列の適合性を記載するために次の等式： $FS = a \cdot MF - b \cdot K + c \cdot M$ により要約される。

20

【0016】

適合性についての値は、より小さな質量差異、より高いシグナル強度、より多数の割り当て及び保護されていない位置のより低い合計数を伴って、より小さくなる。図4が明白に示すように、配列は、等式の3種の個々の項（適合因子MF、割り当てられたフラグメントイオンKの数及び保護されていない位置Mの合計）の中心層により正しく確証され得る（図4d）。対照的に、他の配列は、個々の場合、3種の個々の項が単独で考慮される場合、MS/MSスペクトルとの良好な適合性を有するものとして割り当てられている（図4a-c）。

30

【0017】

等式の項を比較考量する3種の係数、a、b及びcが、適合因子MFと、割り当てられたフラグメントイオンKの数及び保護されていない位置Mの合計とを組合すために導入された。係数aについての値は、定義により1として選択され、そしてb及びcは実験的に決定される。係数bは、等式MF： $(b \cdot k)$ の第1項：第2項の比が1：1.3であるような手段で選択される。従って、 $b = MF/K \cdot 1.3$ である（段階4、図2）。係数cについての0.1の値は、本明細書に記載されるすべての例のために適切であることが見出された。係数が上記等式に挿入される場合、次のようなFSを得ることができる（段階5、図2）：

40

【0018】

【数 1】

$$FS = 1/K \cdot \sum \left| 100 \cdot \frac{\Delta}{I\%} \right| - b \cdot K + 0.1 \cdot M$$

【0019】

10

適合性についての第1の計算された値は、参照配列に基づいて計算されたフラグメントイオンと、測定されたMS/MSスペクトルとの一致の尺度である。より良好な一致を有する配列を見出すか、又は測定された配列と参照配列との同一性を確かめるために、参照配列は、あらゆる点で組織的に変更され、そして続いて、新しい適合性がそれらの突然変異誘発された配列の個々について計算される。これは個々の位置での塩基を3種の他の塩基により連続的に置換することによって行われ、そして配列の残りは一定に維持される（段階6a、図2）。配列がわずか1つの突然変異を含むと仮定して、FSの3n計算がn個のヌクレオチドの配列のために行われる（段階6b-e、図2）。

【0020】

20

これに関しては、重量因子bがすべての変更された配列に関して一定に維持され、そしてオリジナルの参照配列の割り当てられたフラグメントイオンKの数及び保護されていない位置（M）の合計からのアルゴリズムの段階4で計算された値（ $b = MF/K \cdot 1.3$ ）に一致することを示すことが重要である。全体の計算の結果は、参照配列（太字型でプリントされた番号、図2）、及び配列の種々の位置での変更された配列（図2）の適合性を包含するマトリックスである。例えば、マトリックスの第1行のFS（T）（-5.53）は、配列TGGCの適合性を示す。対照的に、FS（A）は、位置1でのTがAにより置換された配列についての値（15.93）である。この例においては、最低のFS値が、最良の一致が実験スペクトルと参照配列との間に存在する結論を導く参照配列に関して得られたことが見出され得る。塩基の置換は、参照配列のFS値よりも低い突然変異誘発された配列についてのFS値により示される。

30

【実施例】

【0021】

例1. 20マーのオリゴデオキシヌクレオチドの比較配列決定

配列（GACAGGAAAGACTTTCTGGC）（配列番号1）を有する20マーのMS/MSスペクトルが図5に示される。実験を次の条件下で行った：カラム：モノリシックポリ（スチレン/ジビニルベンゼン）、60×0.2mm（内径）；移動相：（A）25mMのTEAB、pH8.4、（B）25mMのTEAB、pH8.4、20%アセトニトリル；線状グラジエント：10分で5～50%のB；流速：3.0μl/分；温度：50℃；走査：420–2000amu；エレクトロスプレー電圧；3.40kV；シースガス：40単位；シース液体：アセトニトリル、3.0μl/分；m/z1542.5の生成物イオン（電荷状態：4-）；4.0amuの単離幅；35%の相対的衝突エネルギー；サンプル222ngの20マー。次に、この態様で得られる質量分光データ（m/z, I%）を、比較配列決定アルゴリズムのための入力として使用する。

40

【0022】

位置13でTの変わりにAを含む配列（GACAGGAAAGACATTCTGGC）（配列番号2）を、参照配列として使用した。表1は、上記に記載されるフラグメント化機構に基づいて計算された電荷状態1-～4-についてのa, a-B, w及びw-Bフラグメントイオンのm/z値を要約する。次に、FS値のマトリックスを、前のセクションにおいて概略されるようにして、計算した。結果をより容易に可視化するために、マトリックスは、文字A, T, G及びCにより表される個々の塩基のFS値がオリゴデオキシヌクレオチド配列における位置に対してプロットされている図形の形で示される。図6aは、参照配列が最初の6個の塩基に関して最良の一

50

致を生成したが、しかし位置7以後においては、他の塩基についてのFS値は良好な適合性を有したことを示す。

【0023】

特に、AによるTの置換は、AからTへの突然変異を強く示す適合性についての有意に低い値をもたらした。突然変異の正確な位置は、位置13でのAからTへの突然変異を明白に同定するFS値の最低値に起因した。この態様で得られた塩基配列（GACAGGAAAGACTTTCTGGC）（配列番号1）は、理論的塩基配列（GACAGGAAAGACTTTCTGGC）（配列番号1）と完全に一致する。この配列が現在、図5からの質量分光データと共にアルゴリズムにおける参照配列として使用される場合、これは図6bをもたらす。予測されるように、参照配列は、完全な配列に対して最少のFS値をもたらす。その図は、参照配列及び従って、試験されたオリゴデオキシヌクレオチドの配列の同一性を明白に確証する。それらの2種の例は、この方法が参照配列と未知の配列との同一性を調べるために、及び既知の参照配列に比較して点突然変異を検出するために使用され得ることを示す。

10

【0024】

例2. 51マーのオリゴデオキシヌクレオチドの配列決定

比較配列決定のための興味ある適用分野は、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）により増幅されたゲノムDNAセグメントにおける配列変異の検出である。増幅反応は、DNA二本鎖ヘリックスの一本鎖への変性の後、一定配列の2種の異なったオリゴデオキシヌクレオチド、いわゆるプライマーが、続いて、酵素触媒された重合反応において二本鎖を再び形成するように延長されるために、特定の相補的部位にハイブリダイズされるサイクルで反復される3種の段階から成る。増幅されるべきゲノムDNAのセグメントは、2種のプライマーにより限界を定められる。

20

【0025】

PCRプライマーは通常、約20個の長さのデオキシヌクレオチドを有するので、増幅されたPCR生成物は、適切な配列情報を得るために、40個以上の長さの塩基対を有するべきである。従って、本発明者は、比較的長いDNA分子の同一性の調査を可能にすることを示すために、51マーを選択した。これに関しては、配列（AAACCACATT CTGAGCATAC CCCCCAAAAA TTTCATGCCG AAGCTGTGGT C）（配列番号3）を有する51マー（分子質量：15580.0）を、フラグメント化し、そして測定した。

【0026】

実験を次の条件下で行った：カラム：モノリシックポリ（スチレン/ジビニルベンゼン）、60×0.2mm（内径）；移動相：（A）25mMのブチルジメチルアンモニウム炭酸水素塩、pH8.4、（B）25mMのブチルジメチルアンモニウム炭酸水素塩、pH8.4、40%アセトニトリル；線状グラジエント：10分で5～70%のB；流速：2.0μl/分；温度：50℃；走査：470–2000amu；エレクトロスプレー電圧；3.40kV；シースガス：40単位；シース液体：アセトニトリル、3.0μl/分；m/z1729.7の生成物イオン（電荷状態：9-）；4.0amuの単離幅；17%の相対的衝突エネルギー；サンプル635ngの51マー。測定されたMS/MSスペクトルを、参照配列と比較し、そして適合値に基づいて、正しいものとして明確に同定した（図7）。

30

【0027】

例3. 80マーのオリゴデオキシヌクレオチドの配列の調査

長いオリゴヌクレオチドを同定するためにアルゴリズムの適用性を示すことが意図されるもう1つの例が図8に示される。この場合、次の80マーの配列の正確さを、MS/MSスペクトルとの比較により調べた：CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG（配列番号4）。

40

【0028】

実験を次の条件下で行った：カラム：モノリシックポリ（スチレン/ジビニルベンゼン）、60×0.2mm（内径）；移動相：（A）25mMのブチルジメチルアンモニウム炭酸水素塩、pH8.4、（B）25mMのブチルジメチルアンモニウム炭酸水素塩、pH8.4、40%アセトニトリル；線状グラジエント：10分で5～70%のB；流速：2.0μl/分；温度：70℃；走査：470

50

−2000amu；エレクトロスプレー電圧；5.0kV；シースガス：100単位；シース液体：アセトニトリル、3,0 μ l/分；m/z1065.4の生成物イオン（電荷状態：23−）；4.0amuの単離幅；17%の相対的衝突エネルギー；サンプル478ngの80マー。参照配列についてのFS値は、すべての突然変異誘発された配列に比較して、最小値を常に有したことがわかった。従って、推定される配列の同一性が明確に証明された（図8）。

表1：参照配列GACAGGAAAGACATTCTGGC（配列番号2）のa, a-B, w及びw-Bフラグメントイオンの電荷状態1−〜4−のm/z値を計算する：

【0029】

電荷状態					電荷状態				
型	-1	-2	-3	-4	型	-1	-2	-3	-4
a1-B1	97.04	48.02	31.68	23.51	w11-B10	3258.51	1628.76	1085.50	813.88
w1-B20	195.01	97.01	64.34	48.00	a11-B11	3267.58	1633.29	1088.53	816.15
a1	248.09	123.55	82.03	61.27	a11	3402.63	1700.82	1133.54	849.91
w1	306.06	152.53	101.35	75.77	w11	3409.56	1704.28	1135.85	851.64
a2-B2	426.09	212.55	141.36	105.77	a12-B12	3580.64	1789.82	1192.88	894.41
w2-B19	484.06	241.53	160.69	120.27	w12-B9	3587.56	1793.28	1195.19	896.14
a2	561.14	280.07	186.38	139.54	a12	3691.68	1845.34	1229.89	922.17
w2	635.11	317.06	211.04	158.03	w12	3722.62	1860.81	1240.21	929.91
a3-B3	739.15	369.08	245.72	184.04	a13-B13	3869.68	1934.34	1289.23	966.67
w3-B18	813.11	406.06	270.37	202.53	w13-B8	3900.62	1949.81	1299.54	974.41
a3	850.19	424.60	282.73	211.80	a13	4004.74	2001.87	1334.25	1000.44
w3	964.16	481.58	320.72	240.29	w13	4035.67	2017.34	1344.56	1008.17
a4-B4	1028.19	513.60	342.06	256.30	a14-B14	4182.74	2090.87	1393.58	1044.94
w4-B17	1142.16	570.58	380.05	284.79	w14-B7	4213.68	2106.34	1403.89	1052.67
a4	1163.25	581.13	387.08	290.06	a14	4308.78	2153.89	1435.59	1076.45
w4	1268.21	633.61	422.07	316.30	w14	4348.73	2173.87	1448.91	1086.43
a5-B5	1341.25	670.13	446.42	334.56	a15-B15	4486.79	2242.90	1494.93	1120.95
w5-B16	1446.21	722.61	481.40	360.80	w15-B6	4526.73	2262.87	1508.24	1130.93
a5	1492.30	745.65	496.77	372.33	a15	4612.83	2305.92	1536.94	1152.46
w5	1557.25	778.13	518.42	388.56	w15	4677.78	2338.39	1558.59	1168.70
a6-B6	1670.30	834.65	556.10	416.83	a16-B16	4790.83	2394.92	1596.28	1196.96
w6-B15	1735.26	867.13	577.75	433.07	w16-B5	4855.79	2427.40	1617.93	1213.20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

【図 2】 図 2 は、計算された及び測定されたスペクトルを比較するための方法に関する。

【図 4】 図 4 は、図 2 のアルゴリズムの因子の相対的重要性を示す。

【図 5】図 5 は、20 マーのオリゴデオキシヌクレオチドの測定されたスペクトルである。

【図 6】図 6a 及び 6b は、図 5 と最大的一致を有する配列の推定を示す。

【図 7】図 7 は、51 マーのオリゴデオキシヌクレオチドの配列決定に関する。

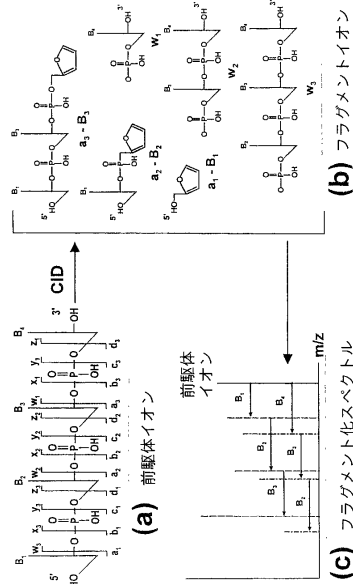
【図 8】図 8 は、80 マーのオリゴデオキシヌクレオチドの配列の試験に関する。

【配列表】

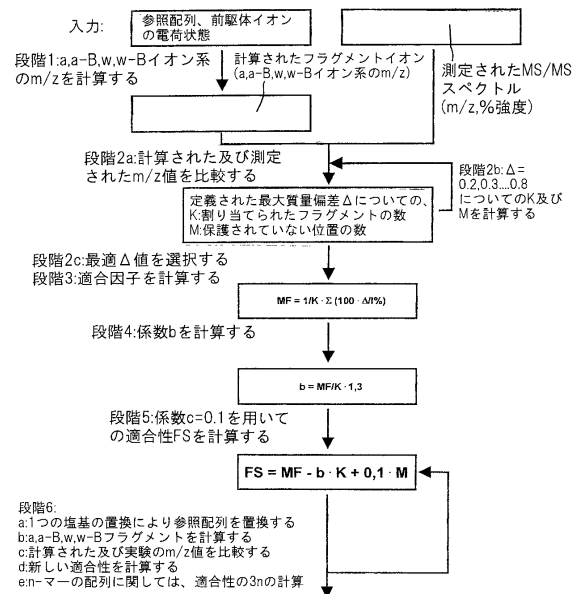
SEQUENCE LISTING

<110>	F.Hoffmann-La Roche AG		
<120>	Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren		
<130>	21385WO-Ra		10
<150>	AT 1444/2001		
<151>	2001-09-14		
<160>	4		
<170>	PatentIn version 3.1		
<210>	1		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	artificial		
<400>	1		
	gacaggaaaag actttctggc	20	20
<210>	2		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	artificial		
<400>	2		
	gacaggaaaag acattctggc	20	
<210>	3		
<211>	51		
<212>	DNA		
<213>	artificial		
<400>	3		30
	aaaccacatt ctgagcatac cccccaaaaa ttctatgccg aagctgtggt c	51	
<210>	4		
<211>	80		
<212>	DNA		
<213>	artificial		
<400>	4		
	ccccagtgt gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat	60	
	aaaccagcca gccggaaggg	80	

【図 1】



【図 2】



出力:

位置	配列	FS(A)	FS(C)	FS(G)	FS(T)
1	T	15.93	15.75	15.17	-5.53
2	G	23.34	20.26	-5.53	12.26
3	A	1.34	6.90	-5.53	-2.78
4	C	5.20	-5.53	11.59	-4.27

Figure 2

【図 3】

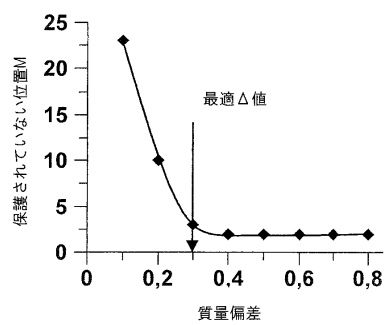


Figure 3

【図 4】

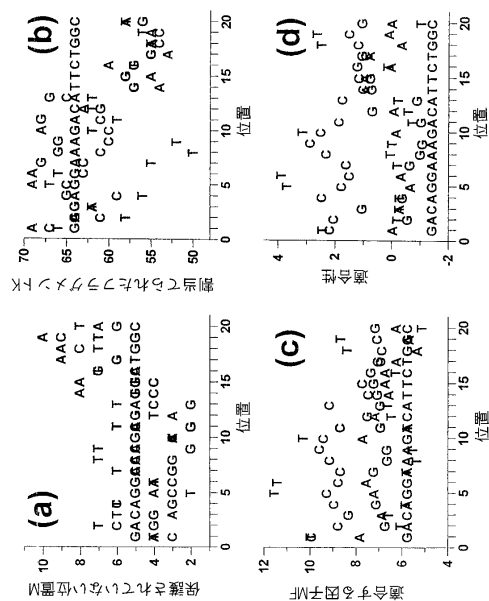


Figure 4

【図 5】

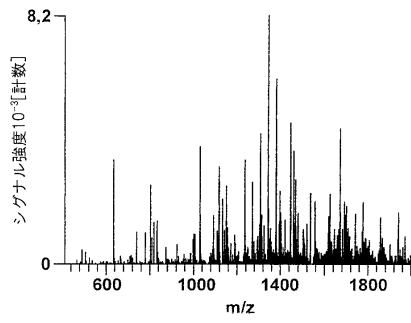


Figure 5

【図 6】

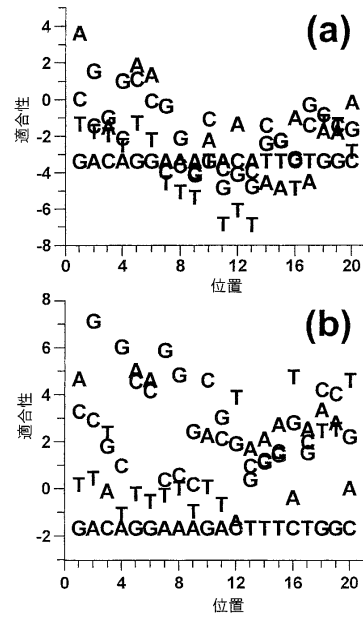


Figure 6

【図 7】

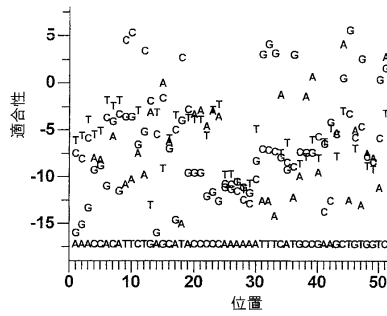


Figure 7

【図 8】

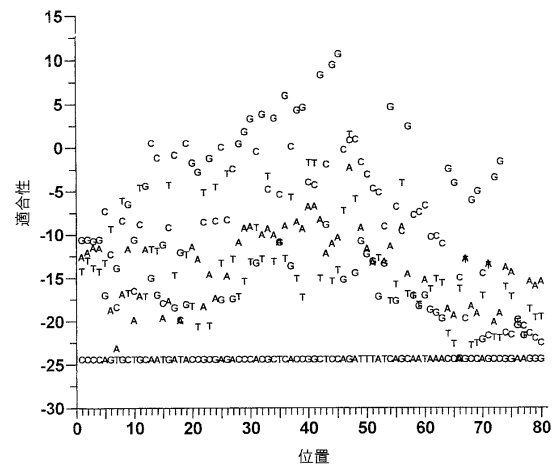


Figure 8

フロントページの続き

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 フーバー, クリスチアン

ドイツ連邦共和国, 6 6 1 1 7 ザールブリュッケン, ペーターミヒェリーシュトラッセ 2
1

(72)発明者 オベラヒャー, ヘルベルト

ドイツ連邦共和国, 6 6 1 2 5 ザールブリュッケン, キルヒェンシュトラッセ 3 アー

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 国際公開第00/066771 (WO, A2)

特表平09-510780 (JP, A)

Jinsong Ni et al., Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of
Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem., 1
996年, 68, 1989-1999

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/60-27/70

G01N 33/48-33/98

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)