COMMENTARY

MS によるゲノム解析の基礎—SNP を中心として—

Genome Analysis by Mass Spectrometry: SNP Genotyping

和田 芳 直^{a)}

Yoshinao WADA

(Received February 7, 2003; Accepted February 10, 2003)

Mass spectrometry (MS) is proud of its high-throughput and sensitivity in the proteomic studies. However, the measurement of DNA by MS has not been in practice mainly due to its inherently large molecular size, though various applications of genetic analysis have been proposed so far. Now in the post-genome era, one of the highest demands on the genome analysis is the single nucleotide polymorphism genotyping, which is, in principle, the determination of single nucleotide substitutions at specific sites. A number of different methods using MS have been developed for this purpose, and some of those enabling multiplex analysis have advantages over other gel- or hybridization-based methods.

1. はじめに

過去 20 年間に行われたゲノム研究は、それを支える基盤技術（パルスフィールド電気泳動、酵母人工染色体、耐熱ポリメラーゼと PCR、そしてダイデオキシ塩基配列解析法）の開発と改良、すなわち高速化、自動化によって推進された。MS はこれらのゲノム研究にほとんど貢献しておらず、タンパク質・ペプチドの質量分析がプロテオミクスで果たしている地位・役割との対比は著しい。特に、ペプチドマスフィンガープリントによるタンパク質の同定は、質量分析計が高価であるにもかかわらず、その高感度と高スループットが支持されて普及していることから、ゲノム解析への MS の実用化にもこの点での改良と考案が重要である。

遺伝子、すなわち DNA や RNA などポリヌクレオチドの MS 分析には大きな障害がある。それは、ヌクレオチド単位の質量が約 300 Da (Table 1) なので、わずか 30 塩基長でもその質量が約 10 kDa になることである。このくらいのサイズでは、約 1% 存在する安定同位体炭素 13 のために、モノアイソトピック質量の決定は難しい。また、検出器に到達する分子イオン数は、イオン化プロセスや衝突断面積の増大によるホスホジエステル結合を中心とした衝突開裂のために減少する。さらに、主としてリボースの水酸基にアルカリ金属が付加しやすいために、分子イオンが $[M+H]$, $[M+Na]$, $[M+K]$ などに分かれてしまう。以上、すべて、分子イオンシグナルの強度あるいは S/N 比の低下をきたし、MS による遺伝子解析の障害となる。

2. オリゴヌクレオチドの基本的な測定条件

2.1 MALDI-TOF-MS

試料調製ではアルカリ金属の除去が重要で、ペプチドやタンパク質の精製脱塩に使用される ODS をピペットチップ先端内面に固相化した Ziptip[®] (Millipore) や、DNA 吸着性担体を磁気ビーズに固相化した Genopure[®] (Bruker Daltonics) などが使われる。PCR の場合には、反応終了後に、通常フェノール抽出、エタノール沈殿の後にこの操作を行って測定試料とする。

DNA 測定に適したマトリックスの選択や試料スポットの方法については 1990 年代半ばからさまざまに報告されてきた。マトリックスとしては、3-hydroxypicolinic acid (HPA) あるいは 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) が用いられている^{1), 2)}。これにアルカリ金属の除去と開裂防止のためにクエン酸アンモニウムを添加する。

試料ターゲットヘスポットは次のように行う。DNA 試料 (1~10 μ M), HPA (50 mg mL⁻¹ 50% アセトニトリル溶液)、クエン酸アンモニウム (diammonium citrate, 10 mg mL⁻¹) を 1:1:1 に混和し試料プレート上で乾燥する。あるいは、THAP をアセトニトリル、20 mM クエン酸アンモニウムの 1:1 混合液に 1 mg mL⁻¹ となるように溶解し、DNA 溶液と混和してスポットする。このスポット法で形成される結晶は固まった三日月様である。均一に広がった繊細な結晶を形成するためには、あらかじめマト

Table 1. Relative Molecular Mass (M_r) of Deoxyribonucleoside Triphosphate

C, 307.2
T, 322.2
A, 331.2
G, 347.2

^{a)} 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 (〒594-1101 和泉市室堂町 840)
Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health (840 Murodo-machi, Izumi 594-1101, Japan)

リックス溶液をプレートに塗布乾燥しておいてから、上記試料混合液を添加する overlayer 法や、試料マトリックス混和溶液をプレートに塗布して真空中で急速乾燥した後に空気中の湿気にさらす方法がある^{3)~5)}。試料プレートも通常のステンレスでなく、その上に置いたパラフィルムなど疎水面上で乾燥することで試料とマトリックスの共結晶化を促す方法が報告されている⁶⁾。

測定モードは、正イオン、負イオンのどちらも用いられている。開裂断片イオンや付加イオン検出の程度が両者においてやや異なるものの、感度に大きな差はない。

通常の測定条件では、二本鎖 DNA を分析しても、各鎖のイオンが独立のイオンとして観測される。

2.2 ESI-MS

ESI は MALDI に比べてスループットを期待できないが、高分解能のデータを得るには優れている^{7), 8)}。ESI では MALDI よりもさらに徹底したアルカリ金属の除去が必要で、スプレイ前にオンラインで微量透析 microdialysis を行う方法が最も有効である⁹⁾。25 mM ピペリジンあるいはイミダゾールの 50% アセトニトリル溶液に試料を溶解して、負イオンモードで測定する。この測定条件では、二本鎖 DNA を試料としても、各鎖が独立に観測される。

3. 応 用

3.1 合成ヌクレオチドの検定

最もやさしい応用は、polymerase chain reaction (PCR) のプライマーなどとして使用される合成オリゴヌクレオチドの質量検定である。PCR として合成され、通常、カートリッジによる簡単な脱塩処理の後に供給される DNA は、量的な問題が少なく、特別の脱塩操作は不要である。

Fig. 1 に PCR のプライマー用として合成した 20mer のオリゴヌクレオチドの MALDI-TOF マススペクトルを示す。クエン酸アンモニウム添加前には $[M+Na]^+$ が強く検出されるが、添加後には $[M+K]^+$ が残存しているものの、 $[M+H]^+$ は添加前よりも格段に高 S/N 比で検出されている。Fig. 1 では、合成の過程でできた不完全伸長 DNA 分子が観測されている。その他、側鎖塩基（主としてプリン）を脱離したシグナルが観測されることもある。

3.2 PCR との組み合わせ

PCR 法を使えば容易に大量の DNA 分子コピーを得ることができるから、遺伝子の特定部分を増幅して、その増幅した DNA の質量を測定すれば、その遺伝子上の 1~数ヌクレオチドの欠失の検出や反復配列の反復数のカウント、さらにタンパク質のアミノ酸置換に対応するヌクレオチドの置換（塩基置換ともいう）を検出できる。方法としての可能性については、1996 年ごろから筆者らをはじめとしていくつか報告されてきたが、これらは実用的とはいいがたかった^{10)~16)}。なぜなら、PCR には 15mer 以上のプライマーが上流と下流に合計 2 個必要であり、それだけで 30mer 以上になってしまう。目的とする遺伝子領域をその間に挟むと、測定すべき DNA の質量は 1 万を容易に超

Fig. 1. MALDI-TOF mass spectra of a synthesized oligonucleotide. Before (a) and after (b) addition of diammonium acetate. Positive ion mode.

える。ヌクレオチド置換の場合には最小 9 Da の変化を検出しなければならないから、0.1% の測定精度は最低限必要である。この精度はタンパク質なら十分に達成可能であるが、DNA では容易でない。

4. SNP

4.1 SNP とは

ゲノム上の塩基の違いが集団中に 1% 以上検出される時「多型 polymorphism」といい、その中でも塩基が置き換わっている場合を SNP と呼ぶ。これは Single Nucleotide Polymorphism の略で、スニップあるいは複数形にしてスニップスと読み、日本語訳は一塩基多型である。SNP の解析はまさに塩基置換の同定である。しかし、以下に述べるそのニーズの高さゆえに、MS による SNP 解析は PCR を使用せず、もっと短い DNA を測定試料とするよう工夫することによって、実用に耐えるものとなった。

SNP は、ゲノムの多様性を表現するのに使用される 3 種類のゲノム多型マーカーの一つである。最も古典的なゲノム多型マーカーは RFLP (restriction fragment length polymorphism, 制限酵素切断断片長多型) マーカーである。特定のゲノム領域に比較的大きな違い、例えば、ある部分が数百塩基対程度欠けている、あるいは挿入配列が存在するような場合、制限酵素による切断後に電気泳動で分離し、ハイブリダイゼーションによって検出する。RFLP マーカーは数ヌクレオチドオーダーの細かな違いを網羅的に解析するには向いていない。

次に、かつてゲノム多型解析の主流だったのが、短い 2 ヌクレオチド単位の反復配列（例えば CA の繰り返し）と

その周辺のユニークな配列を利用した SSLP (simple sequence length polymorphism) マーカーである。マイクロサテライトマーカーとも呼ばれるこの反復配列を挟むようにプライマーを設定して PCR を行えば、増幅 DNA 断片のサイズの違いでゲノムの多様性を特徴づけることができる。SSLP マーカーを利用するゲノム多型の解析はスループットにおいて優れているが、マーカーの存在密度が高ければ高いほど、詳細なゲノムの違いの解析が可能であり、その意味において、マイクロサテライトマーカーは SNP マーカーに及ばない。

SNP マーカーはマイクロサテライトマーカーの数百倍の頻度、すなわち 300~500 塩基対に一つの割合で存在していると言われており、ゲノムに最も多く見られる多型なのである。

4.2 SNP 解析の有用性

SNP は個々人のゲノムの個性についての理解をこれまでより格段に進めることで、ポストゲノムの医学にとって、次のように重要な役割を果たすと考えられている。

一つは疾患感受性遺伝子の同定である。マイクロサテライトマーカーによる連鎖解析では、遺伝子座位を数メガベースの領域に絞り込んだ後に、この領域に知られている SNP の多型頻度を、罹患者集団と健常集団と比較し、さらに複数 SNP の組み合わせ頻度の差を連鎖不均衡 (linkage disequilibrium) 解析で検出することで、目的遺伝子を同定する。この手法は、糖尿病、高血圧、動脈硬化などの「ありふれた病気」、いわゆる「生活習慣病」の大部分を占める多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子の同定に威力を発揮する。

次に、薬剤への応答性の差、すなわち薬剤が有効な患者（レスポンド）と無効な患者（ノンレスポンド）の選別、あるいは、副作用を引き起こす患者と引き起こさない患者の選別である。それぞれの群に対して相関の高い特定の SNP（特に SNP が遺伝子コード領域や遺伝子発現調節領域にある場合などは直接的な関連が示唆される）や複数の SNP の組み合わせを明らかにしておけば薬剤副作用のリスクを予想でき、いわゆるテーラーメイド医療（遺伝的素因など個人の特性に応じた医療）が可能になると期待されている。

SNP のゲノム上の位置や頻度は人種により異なるので、コーカソイド（西ユーラシア人集団）のゲノムの多型情報を日本人の多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子や薬剤感受性遺伝子の同定にそのまま適用することは不適當である。したがって、わが国では 2000 年度からのミレニアムプロジェクト「ヒトゲノム多様性解析」において日本人の SNP データベース構築が開始されている。このような SNP データベース構築の基本となる SNP マーカーは、基本的には、10 人以上の人の全ゲノム塩基配列を比較することによって収集される。

4.3 SNP 解析の方法

MS も含めてあらゆる SNP 解析法は、大きく分けて、3 種類の基本原則（ハイブリダイゼーション法、プライマー

伸長・ライゲーション・ヌクレアーゼ切断など酵素法、サンガー法を中心とする DNA シーケンシング）と、4 種類の検出法（ゲル電気泳動、アレイ、MS、プレートリーダー）のいずれかの組み合わせである。検出法としての MS がよく組み合わせられているのはプライマー伸長法を中心とする酵素法である。

ペプチドのアミノ酸配列解析の場合には基本原理と検出法を MS のみによって（タンデム MS 法で）行うことが可能であるが、DNA の場合には同様の手法の開発は不十分である。

5. MS による SNP 解析

5.1 MS のアドバンテージ

Table 2 に MS による SNP 解析法をまとめた。SNP は一塩基の置換であるから、結果としての質量変化、すなわち最小で 9 Da、最大で 30 Da の違いを同定できることが基本である。10 kDa を超える生体高分子における 9 Da の変化を検出同定することは、上に述べたような理由から容易でないので、Table 2 のうち、測定対象分子の質量が 10 kDa を超える方法は現実的でない。すなわち、SNP マーカーの新規同定はダイデオキシ dideoxy 法（いわゆるサンガー法）と電気泳動の組み合わせで大規模に進められているのであるが、その電気泳動部分を単純に MS に置き換えることに意味はないと考える¹⁷⁾。

MS による SNP 解析に期待されているのは多数検体を扱う場合に要求される高いスループットであり、それを支えるのは MALDI 法である。MS を使うアドバンテージは次のように要約できる。

- 1) 1 検体の測定に要する時間が短い
- 2) 1 個人についての複数 SNP マーカーについて一斉多重解析 (multiplex analysis) が可能
- 3) 多検体 DNA の等量混合試料から得られる質量スペクトルのピーク強度から、アレル頻度を推定する pooled sample analysis が可能

5.2 プライマー伸長法

プライマー伸長法 (primer extension) とは、DNA に 20 塩基長程度のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせたのち、DNA ポリメラーゼによってプライマー

Table 2. Samples of Mass Measurements for SNP Genotyping^{a)}

- 1) Dideoxysequencing of PCR products (~10 kDa)
- 2) Restriction endonuclease fragments of PCR products (~50 kDa)
- 3) Allele-specific PCR or ligase chain reaction products (~20 kDa)
- 4) Single nucleotide extension with dideoxynucleotides (mini-sequencing) (~10 kDa)
- 5) Invader assay from Third Wave Technologies Ltd. (~2 kDa)
- 6) Peptide nucleic acid after hybridization (~4 kDa)
- 7) Masscode from Qiagen (400 Da, non-nucleotides)

^{a)} Target mass range of the sample is indicated in parentheses.

の3'側にヌクレオチドを付加していく反応である。反応系に4種類のdNTPを存在させておけば伸長は続くが、1種類の塩基をダイデオキシヌクレオチドにしておけば、それが取り込まれて伸長は停止する。DNA鎖が伸長する際のエステル結合に必要なリボース水酸基が欠けているからである。精製の後に塩基伸長したオリゴヌクレオチドの質量を測定する。

最も単純には、Fig. 2に示すように、目的のSNP位置のすぐ手前5'側までのプライマーを作製し、例えば、次の塩基がGであれば、そこで停止させるために相補的なdCTPをddCTPに置き換えた反応液を用いて伸長反応を行う。GではなくTに置き換わっている可能性があればddATPを入れておく。いずれの場合も、1塩基の伸長産物が検出されるかどうかによって判定可能であるが、プライマーの3'端にddCが付加した質量であるか、それともddAが付加した質量であるかを24 Daの質量差 (Table 1 参照) で確認すれば、判定はより確かとなる。ヘテロ接合体は両方のシグナルが出ることでわかる。これが最も単純なプライマー伸長法によるSNP解析であるが、Fig. 2に示したddCTPを用いる反応において、多型部位の塩基がAである場合に、伸長はさらに3塩基進み、次のGのところでddCTPが入って停止する。このようにして得られたオリゴヌクレオチドを測定すれば、多型塩基がGかTかを上のように24 Daの差ではなく、3塩基長、約1000 Daの質量差をもって明確に判定できることになる (Fig. 3)。

プライマーとしてのオリゴヌクレオチドに特異性をもたせるには最低15ヌクレオチド長以上が必要である。一方、オリゴヌクレオチドの実用測定上限は上に述べたように

10 kDaである。したがって、この方法で使用する質量域は5~10 kDaである。複数標的部位についての伸長反応産物がこの質量範囲内で互いに重なることがなければ、それらを混合試料として測定することが可能である。これを多重解析 (multiplex analysis) という。Fig. 4にSequenom社のMassARRAY[®]システムによる分析例を示した。

プライマー伸長を基本としながら、測定試料の質量を小さくする試みがされている。GOOD[®] assayと呼ばれる方法では、プライマーの3'端寄りにあらかじめDNA分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) に抵抗性の修飾構造 (phosphorothioate) と荷電タグを仕込んでおいて、伸長反応の後にPDEによる分解を行う¹⁸⁾。修飾構造のために切断されなかったプライマー3'端部分とそれにつなが

Fig. 2. SNP genotyping by primer extension reaction.

Fig. 3. MALDI-TOF mass spectra of the products of primer extension. (a) The reaction stops by ddC incorporated for "G" allele. (b) The reaction stops at the next G, in case of "T" allele.

Fig. 4. Multiplex analysis by MassARRAY. The reaction products targeted at five different SNP sites are analyzed at once. The ions of primer oligonucleotides are denoted by asterisks.

る伸長部分のみが残存するので、それを MALDI 法によって測定する。測定質量域は 2000 Da 以下である。加えて、測定前のアルキル化や修飾部分へのアミノ基付加などによってイオン化効率を上げる工夫も追加されている¹⁹⁾。

5.3 フラップエンドヌクレアーゼを用いる方法

Fig. 5 のように、多型部位を中心として 5' 側から多型部位に至る標的配列相補的なオリゴヌクレオチド (Invader[®] oligonucleotide と呼ぶ) を作製しておく。多型部位塩基については相補的である必要はない。これと、多型部位から 3' 側が相補的で 5' 側には標的配列とは無関係の配列をもったプローブオリゴヌクレオチドが共存して標的 DNA にアニールするとき、フラップエンドヌクレアーゼ (flap endonuclease) は、プローブオリゴヌクレオチドを多型部位塩基の 3' 側で切断する。耐熱酵素を使用すれば、連続的に切り出し反応が起こり、プローブオリゴヌクレオチドの 5' 側断片が生成蓄積する²⁰⁾。この断片を測定するのが Invader assay 原法である。さらなる増幅とピオチン標識を組み合わせた "Invader squared assay" では、最終的に測定されるピオチン化オリゴヌクレオチドの質量は 2000 Da 以下にデザインされている。

5.4 ハイブリダイゼーションを利用する方法—ペプチド核酸 peptide nucleic acid—

DNA 塩基の相補性に基づくハイブリダイゼーション法は DNA チップなど遺伝子解析の最も基本的な原理である。そこで、プローブとしてのオリゴヌクレオチドを標的配列にハイブリダイズし、ミスマッチプローブを洗浄除去した後に、完全マッチして残存するオリゴヌクレオチドを MS によって検出することは不可能ではない。しかし、ミスマッチを正確に選別できる洗浄条件設定の繊細さや、数 kDa の DNA を測定することの難しさゆえに、蛍光で検出する方法より優れているとはいいがたい。核酸塩基をアミ

Fig. 5. Invader assay.

ド骨格に結合させた peptide nucleic acid はリボース・リン酸基骨格をもたないために、MS の試料とするには、もともとのオリゴヌクレオチドに比べて分子量の小ささやイオン化効率などの点で有利である^{21), 22)}。SNP のアレル特異的な配列をもつ 2 種の peptide nucleic acid にそれぞれ異なる質量のタグを付けておき、SNP 部位を含む PCR 増幅産物に対してアニールさせた後に、洗浄して、完全マッチして残存した peptide nucleic acid 鎖を測定する方法が報告されている。測定質量は 3 kDa 程度に抑えられている。

5.5 ヌクレオチドを測定試料としない方法

紫外線照射によって遊離するタグを付けた SNP アレル特異的なプライマーを用意する。その際、アレルによって質量の異なるタグを付けておく。この修飾プライマーを使って PCR 反応を行う。増幅しなかったプライマーをエタノール沈殿などの方法で除いた後に、紫外線照射によってタグを遊離し、LC-MS (APCI あるいは ESI が用いられる) によって測定する。測定されたタグの質量によって SNP 部位の塩基タイプを判定できる。測定試料はヌクレ

Fig. 6. Masscode system.

オチドでなく 400 Da あまりの小分子で、イオン化効率がよく、フェントモル量のタグが回収できれば SNP 多型を判定できる²³⁾ (Fig. 6). この Masscode[®] と名づけた解析システムを推進している Qiagen 社では 30 以上の異なる質量のタグを用意して、多重解析 multiplex analysis も可能にしている。

6. ま と め

以上、最もニーズの高い SNP 解析への MS の応用手法を解説した。DNA, RNA の情報単位が約 300 Da であり、その質量サイズが MS による SNP 解析の障害である。同位体分布を狭めるために、安定同位体組成を人為的に操作した測定試料を作製する試みもなされているが²⁴⁾、なお、測定分子サイズの大きさに起因する低イオン化効率や衝突開裂は回避できない。しかし、SNP 解析のように、新規の構造決定でなく、「同定」は MS の得意とするところである。そして、ここに解説したいいくつかの方法は、測定質量を小さくする工夫をこらしながら、実用に供されている。

一方、大分子の分子イオンを観測し、その質量を正確に測ることは MS に課せられた基本命題である。例えば、MALDI においても UV でなく近赤外 IR レーザーを用いた試みが続けられている²⁵⁾、ESI によって得られたイオンを高分解能の FTICR-MS によって測定することも行われている²⁶⁾。このような試みは、旧来のハイブリダイゼーション法や酵素反応を基盤にした化学的原理による SNP 解析技法の検出部分を単純に MS に置き換えるのではなく、CID など MS 固有の方法によって、配列解析までのすべてを行う方向を目指している。

このように、MS 固有の手法と、従来の DNA 解析法の基本原理を MS につなぐ手法という二つの方向で MS によるゲノム解析法が開発されている。

謝 辞 MassARRAY による多重解析のマススペクトルは日立製作所ライフサイエンス推進事業部の藤田 毅氏に提供していただきました。

文 献

- 1) L. K. Zhang and M. L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 854 (2000).
- 2) J. M. Koomen, W. K. Russell, S. E. Tichy, and D. H. Russell, *J. Mass Spectrom.*, **37**, 357 (2002).
- 3) P. Roepstorff and M. Mann, *Anal. Chem.*, **66**, 3281 (1994).
- 4) J. M. Koomen, W. K. Russell, J. M. Hettick, and D. H. Russell, *Anal. Chem.*, **72**, 3860 (2000).
- 5) D. I. Papac, A. Wong, and A. J. Jones, *Anal. Chem.*, **68**, 3215 (1996).
- 6) K. C. Hung, H. Rashidzadeh, Y. Wang, and B. Guo, *Anal. Chem.*, **70**, 3088 (1998).
- 7) A. P. Null, J. C. Hannis, and D. C. Muddiman, *Anal. Chem.*, **73**, 4514 (2001).
- 8) S. Hahner, A. Schneider, A. Ingendoh, and J. Mosner, *Nucl. Acids Res.*, **28**, E82 (2000).
- 9) C. Liu, Q. Wu, A. C. Harms, and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **68**, 3295 (1996).
- 10) M. J. Doktycz, G. B. Hurst, S. Habibi-Goudarzi, S. A. McLuckey, K. Tang, C. H. Chen, M. Uziel, K. B. Jacobson, R. P. Woychik, and M. V. Buchanan, *Anal. Biochem.*, **230**, 205 (1995).
- 11) Y. H. Liu, J. Bai, Y. Zhu, X. Liang, D. Siemieniak, P. J. Venta, and D. M. Lubman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 735 (1995).
- 12) N. I. Taranenko, K. J. Matteson, C. N. Chung, Y. F. Zhu, L. Y. Chang, S. L. Allman, L. Haff, S. A. Martin, and C. H. Chen, *Genet. Anal.*, **13**, 87 (1996).
- 13) T. Tsuneyoshi, K. Ishikawa, Y. Koga, Y. Naito, S. Baba, H. Terunuma, R. Arakawa, and D. J. Prockop, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 719 (1997).
- 14) Y. Wada and M. Yamamoto, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1657 (1997).
- 15) Y. Wada, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 187 (1998).
- 16) Y. Wada, K. Mitsumori, T. Terachi, and O. Ogawa, *J. Mass Spectrom.*, **34**, 885 (1999).
- 17) F. Kirpekar, E. Nordhoff, L. K. Larsen, K. Kristiansen, P. Roepstorff, and F. Hillenkamp, *Nucl. Acids Res.*, **26**, 2554 (1998).
- 18) S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, H. Lehrach, J. L. Escary, N. Fox, and I. G. Gut, *Nucl. Acids Res.*, **28**, E13 (2000).
- 19) S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, C. Plancon, A. Heuermann, H. Lehrach, and I. G. Gut, *Nucl. Acids Res.*, **28**, E100 (2000).
- 20) T. J. Griffin, J. G. Hall, J. R. Prudent, and L. M. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6301 (1999).
- 21) D. R. Corey, *Trends Biotechnol.*, **15**, 224 (1997).
- 22) T. J. Griffin, W. Tang, and L. M. Smith, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1368 (1997).
- 23) M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines, and A. Duesterhoeft, *Mol. Diagn.*, **5**, 329 (2000).
- 24) K. Tang, M. Shahgholi, B. A. Garcia, P. J. Heaney, C. R. Cantor, L. G. Scott, and J. R. Williamson, *Anal. Chem.*, **74**, 226 (2002).
- 25) S. Berkenkamp, F. Kirpekar, and F. Hillenkamp, *Science*, **281**, 260 (1998).
- 26) D. S. Wunschel, L. P. Tolic, B. Feng, and R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 333 (2000).

Keywords: DNA, Single nucleotide polymorphism, Primer extension