

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 412 649 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1314/2003
(22) Anmeldetag: 20.08.2003
(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.2004
(45) Ausgabetag: 25.05.2005

(51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(73) Patentinhaber:
SY-LAB VGMBH
A-3011 NEUPURKERSDORF,
NIEDERÖSTERREICH (AT).

(72) Erfinder:
VOLLENHOFER-SCHRUMPF SABINE DR.
EBENFURTH, NIEDERÖSTERREICH (AT).
BURESCH RONALD
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER NUKLEINSÄURE

(57) Bei einem Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure mittels einer zur Nukleinsäure komplementären, markierten Detektorsonde, wobei die Markierung aus zwei separaten Komponenten besteht, die aneinander binden, von welchen Komponenten eine mit der Detektorsonde und die andere mit einem detektierbaren Marker konjugiert ist, wird die Nukleinsäure in Anwesenheit beider Komponenten mit der Detektorsonde hybridisiert und anschließend nachgewiesen.

AT 412 649 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure mittels einer zur Nukleinsäure komplementären, markierten Detektorsonde, wobei die Markierung aus zwei separaten Komponenten besteht, die aneinander binden, von welchen Komponenten eine mit der Detektorsonde und die andere mit einem detektierbaren Marker konjugiert ist.

5 In der Molekularbiologie werden zum Nachweis biologischer Moleküle verschiedene Markierungen verwendet. Ein häufig verwendetes Markierungssystem besteht aus zwei Komponenten, die ein Paar bilden, das mit hoher Selektivität und Affinität aneinander bindet und daher, wenn eine Komponente mit dem nachzuweisenden Molekül konjugiert und die andere zwecks Detektion modifiziert wird, einen sicheren Nachweis des Moleküls ermöglicht.

10 Biotin, ein kleines Vitamin mit einem Molekulargewicht von 244 Da, bindet mit hoher Affinität an Avidin, ein basisches Glycoprotein aus Hühnereiweiß, das wiederum mit verschiedenen Markern wie Enzymen, Ferritin oder kolloidalem Gold konjugiert werden kann. Das Biotin/Avidin-System wird daher seit Jahrzehnten zum Nachweis verschiedener biologischer Moleküle, wie etwa Proteinen und Nukleinsäuren, vor allem bei immunocytochemischen Anwendungen und für in situ Hybridisierungen verwendet (Chevalier, J., Yi, J., Michel, O., und Tang, X.-M. (1997): Biotin and Digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: Where do we stand?, J. Histochem. Cytochem. 45 (4): 481-491). Bereits 1974 wurde erstmals ein Biotin-Avidin-System zum Nachweis von Antigenen im Elektronenmikroskop entwickelt (Heitzmann, H., und Richards, F. M. (1974): Use of avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3537-3541).

20 Avidin weist eine unspezifische Bindung an Nukleinsäuren auf und ist daher für deren Nachweis nur bedingt einsetzbar. Auch in anderen Anwendungen traten immer wieder Probleme mit unspezifischen Reaktionen auf, dennoch wurde das Biotin-Avidin-System intensiv in der Immunocytochemie eingesetzt. Auch in der Immunologie wurden biotinylierte Moleküle gerne verwendet, z. B. für ELISAs. Normalerweise wird dabei der Analyt auf verschiedene Weise indirekt mit Biotin versehen, und dieses danach mittels enzymmarkierten Avidins (oder auch enzymmarkierten Anti-Biotin-Antikörpers) nachgewiesen.

30 Streptavidin, das aus *Streptomyces avidini* isoliert wurde, hat ähnliche Eigenschaften wie Avidin, ist aber im Allgemeinen aufgrund geringerer Probleme betreffend unspezifische Reaktionen ein geeigneteres Reagenz zum Nachweis von biotinylierten Molekülen (Chevalier et al., siehe oben) und wird daher viel häufiger zu diesem Zweck eingesetzt.

Wie oben erwähnt, können nicht nur Proteine, sondern auch viele andere Moleküle, zum Beispiel Nukleinsäuren, auf unterschiedliche Weise mit Biotin markiert werden, wodurch sich die verschiedensten Anwendungen ergeben (Diamandis, E. P., und Christopoulos, T. K. (1991): The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. Clin. Chem. 37/5: 625-636). In der Molekularbiologie werden beispielsweise häufig biotinylierte Oligonukleotide eingesetzt, entweder in Hybridisierungen als markierte Gensonden zur Detektion von Nukleinsäuren oder dazu, Nukleinsäuren zu immobilisieren bzw. aufzureinigen, z. B. durch Bindung an Streptavidin-beschichtete Kügelchen oder Mikrotiterplatten.

40 Vor einiger Zeit wurde als Alternative zu Biotin die Markierung von Nukleinsäuren mit dem Hapten Digoxigenin (DIG) eingeführt. Der Nachweis des DIG erfolgt hier durch einen spezifischen enzymmarkierten Anti-DIG Antikörper bzw. ein Fab-Fragment (US Patent 5,198,537 A; Hölte, H.-J., und Kessler, C. (1990): Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten Digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection., Nucl. Acids Res. 18: 5843). Es konnten dadurch auch Probleme bezüglich des Hintergrunds, die mit Avidin, aber auch mit Streptavidin immer wieder auftraten, beseitigt werden.

50 Normalerweise umfasst ein Nachweis von z.B. immobilisierten Nukleinsäuren mit biotinylierten oder DIG-markierten Nukleinsäuren als Gensonden nach dem Stand der Technik die folgenden Schritte (Gebeyehu, G., Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A., und Klevan, L. (1987): Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA, Nucleic Acids Res. 15 (11): 4513-4534; Schmitz, G. G., Walter, T., Seibls, R. und Kessler, C. (1991): Nonradioactive Labeling of Oligonucleotides in Vitro with the Hapten Digoxigenin by Tailing with Terminal Transferase, Analytical Biochemistry 192: 222-231; Miller, N., Infante, S., und Cleary, T. (2000): Evaluation of the LIPA MYCOBACTERIUM Assay for Identification of Mycobacterial Species from BACTEC 12B Bottles, J. Clin. Microbiol. 38 (5): 1915-1919).

1. Hybridisierung mit biotinylierter oder DIG-markierter Gensonde (30 Minuten bis mehrere Stunden)
2. Waschen (mindestens 2x einige Minuten)
3. eventuell Abblocken der Membran (30 Minuten)
- 5 4. Inkubation mit Streptavidin-Enzymkonjugat bzw. Antikörper-Enzymkonjugat (30 Minuten)
5. Waschen (2x einige Minuten)
6. Äquilibrieren (1-2 Minuten)
7. Farbreaktion (30 Minuten bis mehrere Stunden)

Da die Hybridisierung von biotinylierten oder Digoxigenin-markierten Nukleinsäuren mit anschließender colorimetrischer Detektion durch ein Enzymkonjugat also eine Reihe von Inkubationsschritten umfasst und daher etwas umständlich ist, werden auch immer wieder Gensonden eingesetzt, die direkt mit einem Enzym gekoppelt sind. Dadurch entfallen die oben angeführten Schritte 3 bis 5, und das Protokoll wird sowohl vereinfacht als auch verkürzt (Salisch, H. Ryll, M. Leise, R. und Neumann, U. (2000): Use of an alkaline Phosphatase-Labelled Probe for the Detection of Mycoplasma synoviae in Chickens, J. Vet. Med. B 47: 27-35).

Enzymmarkierte Sonden haben jedoch einige Nachteile: Sie werden nur von wenigen Firmen angeboten, sind extrem teuer und manchmal von Anbieter zu Anbieter bzw. von Charge zu Charge unterschiedlich. Außerdem ist die Stabilität einer Charge kaum vorherzusagen, während biotinylierte und DIG-markierte Sonden sich bei -20 °C in jedem Fall jahrelang halten und kaum anbieter- oder chargenabhängige Unterschiede aufweisen. Chargenabhängige Unterschiede, etwa in der spezifischen Aktivität, führen dazu, dass die im Assay einzusetzenden Mengen jedes Mal neu bestimmt werden müssen. Somit ist eine routinemäßige Anwendung vor allem in kommerziellen Testsystemen, deren Herstellung nach einer möglichst gleichbleibenden Standardprozedur erfolgen und deren Haltbarkeit möglichst kalkulierbar sein sollte, mit gewissen Schwierigkeiten verbunden.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, die oben genannten Nachteile und Schwierigkeiten zu überwinden und ein Verfahren der eingangs genannten Art bereitzustellen, das den Nachweis einer Nukleinsäure in geringerer Zeit, mit weniger Arbeitsschritten, mit geringerem Reagenzienverbrauch und/oder zu einem geringeren Preis ermöglicht. Insbesondere sollen die zur Markierung eingesetzten Materialien Robustheit und gute Stabilität aufweisen und gut verfügbar sein.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass die Nukleinsäure in Anwesenheit beider Komponenten mit der Detektorsonde hybridisiert und anschließend nachgewiesen wird.

Die Erfindung beruht auf der Entdeckung, dass der Nachweis einer Nukleinsäure mit zufriedenstellender Genauigkeit und Sicherheit möglich ist, wenn die Inkubation der Nukleinsäure mit der mit einem detektierbaren Marker konjugierten zweiten Markierungskomponente zur selben Zeit wie die Hybridisierung mit der ersten Komponente erfolgt.

Eine wesentliche Verbesserung dieser Erfindung gegenüber dem Stand der Technik betreffend das konventionelle Verfahren mit dem 2-Komponenten-Markierungssystem ist eine Ersparnis an Zeit, Arbeitsaufwand und/oder Reagenzien. Vorteile gegenüber einem System, das sich direkt enzymmarkierter Oligonukleotidsonden bedient, liegen vor allem in der höheren Stabilität und Haltbarkeit und dem weitaus günstigeren Preis der erfindungsgemäßen Sonden, sowie der Tatsache, dass es im Gegensatz zu enzymmarkierten Sonden, deren spezifische Aktivität chargenabhängig ist, nicht nötig ist, für jede Charge die optimale zuzugebende Menge an Gensonde neu zu bestimmen. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn in einem Assay mehrere Gensonden gleichzeitig verwendet werden.

Für den Nachweis von Potyviren wurde ein immunologischer Assay beschrieben, bei dem, um Zeit einzusparen, eine simultane Inkubation mit biotinyliertem Antikörper und Streptavidin/Enzymkonjugat versucht wurde (Dietzgen, R. G., und Herrington, M. E. (1991): A Sensitive Semi-quantitative Biotin-Streptavidin ELISA for the Detection of Potyviruses Infecting Cucurbits; Austr. J. Agric. Res., 42; 417-427). Dadurch wurde jedoch das Signal im ELISA um 30-80% schwächer.

Abgesehen davon, dass bei diesem Verfahren ein Virus und keine Nukleinsäure nachgewiesen wurde und auch keine Hybridisierung stattfand, hätte es jedoch allein aufgrund der schwachen Signale keinen Grund zur Annahme gegeben, dass die gleichzeitige Reaktion mit beiden Komponenten des Markierungssystems bei einem Nachweisverfahren der eingangs genannten Art ein brauchbares Ergebnis liefern könnte.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung ein Biotin/Streptavidin-Enzymkonjugat-System ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Markierung ein Digoxigenin/Anti-DIG-Antikörper-Enzymkonjugat-System oder ein Digoxigenin/Anti-DIG-Fab-Enzymkonjugat-System.

Vorzugsweise ist der detektierbare Marker Alkalische Phosphatase.

Bevorzugt ist weiters, dass die nachzuweisende Nukleinsäure vor der Hybridisierung amplifiziert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Nukleinsäure, vorzugsweise während der Hybridisierung, mittels einer Fangsonde immobilisiert, z.B. an eine Membran gebunden.

Besonders vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis eines pathogenen oder nicht-pathogenen Mikroorganismus in einer biologischen Probe, wobei der Mikroorganismus vorzugsweise ein *Salmonella*-Stamm ist. Zum Nachweis der Mikroorganismen wird ein für den Mikroorganismus spezifisches Gen verwendet, aus dessen Sequenz stark konservierte Bereiche als nachzuweisende Nukleinsäuren ausgewählt werden.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele und Figuren näher erläutert.

Als Vergleichsprotokolle zum erfindungsgemäßen Verfahren wurden die Protokolle zum Nachweis von DIG-markierten bzw. biotinylierten Sonden laut Durchführungsprotokoll für das Multicolor Detection Set von Roche Diagnostics GmbH, Engelhorngasse 3, A-1211 Wien, Österreich, durchgeführt, sowie ein Protokoll, das sich direkt enzymmarkierter Sonden bedient.

Beispiele:

Material und Methoden

Bakterienstamm: *Salmonella enteritidis* Phagentyp 4 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Leopold Reiner (Lebensmittelversuchsanstalt, Blasstrasse 29, A-1190 Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt. Der Stamm wurde auf Plate-Count Agarplatten gehalten, Über-Nacht Kulturen wurden in flüssigem LB-Medium hergestellt.

DNA-Sequenzen:

Die DNA-Sequenzen für das Invasin-Gen *invA* (*Salmonella*-spezifisch) und das KCNJ9-Gen (ein Humangen als interne Positivkontrolle für die PCR), die für das Design von geeigneten Oligonukleotiden verwendet wurden, stammen aus der GenBank Datenbank der NIH (National Institutes of Health, (www.ncbi.nlm.nih.gov)) und wurden mit Hilfe des DNA-Analyseprogramms GeneRunner (www.generunner.com) aufbereitet und analysiert. Nach multiplen Sequenzvergleichen (Higgins, D. G. und Sharp, P. M. (1988): CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, *Gene* 73 (1): 237-244) wurden stark konservierte Bereiche der jeweiligen Gene ausgesucht. In diesen Bereichen wurden dann Amplifizierungsprimer, Fangsonden und Detektorsonden festgelegt (Rychlik, W., Spencer, W. J., and Rhoads, R. E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucl. Acids Res.* 18 (21): 6409-6412), wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Annealingtemperatur der Primer für die Multiplex-Amplifizierungsreaktion nicht zu stark voneinander unterscheiden.

Primer-Oligonukleotide, Fangsonden und Detektorsonden:

Die Sequenzen der Primer und Sonden sind unten angegeben. Fangsonden weisen am 5'-Ende zusätzlich zur spezifischen Sequenz 12 Desoxy-Thymidine auf. Sämtliche Oligonukleotide (außer den direkt enzymmarkierten Sonden) wurden von VBC-GENOMICS Bioscience GmbH (Rennweg 95B, 1030 Wien, Österreich) bezogen. Oligonukleotide wurden mittels Phosphoramidit-Chemie (Beaucage, S. L., und Caruthers, M. H. (1981): Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxynukleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862) in automatisierten Systemen synthetisiert. Alkalische Phosphatase-markierte Oligonukleotide wurden von der Firma DNA Technology A/S (Science Park Aarhus, Gustav Wieds Vej 10A, DK-8000 Aarhus, Dänemark) bezogen.

Sequenzen:

Für *Salmonella*:

Primer INV-f1: 5' - aac agt gct cgt tta cga cc -3'
 Primer INV-r1: 5' - gcg atc agg aaa tca acc ag -3'
 Fangsonde INV-CPDS3: 5' - ttt ttt ttt ttt ctg att ctg gta cta atg -3'
 Markierte Detektorsonde INV: 5' -cat ttc tat gtt cgt cat tcc att ac -3'

5

Für KCNJ9:

Primer KCN-f1: tac gtg gag aag gat ggc cg -3'
 Primer KCN-r1: 5' - cca gga cga aga aca aca ggc t -3'
 Fangsonde KCN-CPD2: 5' - ttt ttt ttt ttt gcg cca ctg cag gtc cac ca -3'
 Markierte Detektorsonde KCN: 5' - gaa cag gtc cgt cag gta -3'

10

Als Negativkontrolle für Hybridisierung:

Zufallsoligonukleotid RAN 1: 5' - ttt ttt ttt ttt ata caa cag ggt ttc ggc ata gat c -3'
 Zufallsoligonukleotid RAN 2: 5' - ttt ttt ttt ttt atg cta tct acc gaa ccg gct agc a -3'
 Zufallsoligonukleotid RAN 4: 5' - ttt ttt ttt ttt tgg gag gat aac cgg gta tca cgc g -3'

15

Immobilisierung der Fangsonden auf Membranen zur Verwendung als Teststreifen:

Fangsonden wurden in 5xSSC (20xSSC = 3M NaCl und 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; pH 7) in einer Konzentration von 2 µg/µl gelöst. Je 1 µg (0,5 µl) der jeweiligen Fangsonden wurden nebeneinander auf positiv geladene, bedruckte Nylonmembranen (Roche Diagnostics GmbH, Engelhorngasse 3, A-1211 Wien, Österreich) mittels 16-Nadel-Replikator aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Mischung aus 3 verschiedenen Oligonukleotiden mit zufälliger Nukleotidsequenz. Die aufgetragene DNA wurde in einem BIO-LINK crosslinker (Vilber Lourmat, B. P. 66 - Z. I. sud Torcy, 77202 Marne-La-Vallee Cedex 1, Frankreich) durch UV-crosslinking immobilisiert (120 J/cm² Standardeinstellung).

20

Reihenfolge der Oligonukleotide von links nach rechts:

INV-CPDS3 (*Salmonella*-spezifisch), KCN-CPD2 (interne Positivkontrolle), Mischung aus RAN 1, 2 und 4 (Hybridisierungsnegativkontrolle).

Streifen wurden danach eine Stunde in Prähybridisierungslösung (5xSSC (20x SSC = 3M NaCl und 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; pH 7), 0,1% N-Lauroylsarkosin, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz (Roche Diagnostics), 100 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA (Roche) vorgeblockt (0,2 ml pro Teststreifen), getrocknet, in Streifen geschnitten und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

25

Anzucht:

Der *Salmonellen*-Stamm wurde über Nacht in LB-Medium angezüchtet.

DNA-Extraktion:

DNA aus der Über-Nacht-Kultur wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche Diagnostics) extrahiert. DNA-Konzentrationen wurden in einem SmartSpec3000 Spektrophotometer (Bio-Rad Laboratories Ges. m. b. H., Auhofstrasse 51-55, A-1130 Wien, Österreich) nach Standardmethoden bestimmt (Sambrook, J., Fritsch, E. F.; Maniatis, T.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989, Anhang E.5).

30

Multiplex-PCR:

Amplifizierungsreaktionen erfolgten standardmäßig mittels thermostabiler DNA-Polymerase (Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schare, S. S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science 239: 487-491). Amplifizierungen wurden auf einem GP-001 Thermocycler (Corbette Research, 1/14 Hilly St., Mortlake 2137, N.S.W. Australien) in einem Volumen von 25 µl unter Verwendung des folgenden Zeit/Temperaturprofils durchgeführt:

35

15 Minuten Denaturierung bei 95°C, dann 2 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Annealing bei 65°C und 30 Sekunden Extension bei 72°C. Anschließend 40 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Annealing, wobei die Temperatur 5 Zyklen

40

lang in jedem Zyklus um 1°C abgesenkt wurde, bis 60°C erreicht waren (Touchdown-Amplifizierung), 30 Sekunden 72°C, abschließende Extension 10 Minuten bei 72°C.

Reaktionsbedingungen (Endkonzentrationen): 1x Amplifizierungspuffer, 2,5 mM MgCl₂ (beides von Qiagen, Max-Volmer-Straße, D-40724 Hilden, Bundesrepublik Deutschland), Nukleotidmix (je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und 600 µM dUTP), je 1 µM INV-f1, INV-r1, KCN-f1 und KCN-r1, 0,7 ng/µl Human-DNA (Sigma, Hebbelplatz 7, A-1100 Wien, Österreich, Kat. No. D7011), 0,8 µg/µl BSA (Sigma, Kat. No. A3912), 1 U thermostabile DNA-Polymerase (HotStar, Qiagen, Max-Volmer-Straße, D-40724 Hilden, Bundesrepublik Deutschland). Nukleotidmix und einzelne Nukleotide von Genecraft, Tresckow-Strasse 10, D-48163 Münster, Bundesrepublik Deutschland.

Für Amplifizierungsreaktionen wurden verschiedene Mengen an genomischer *Salmonella*-DNA entsprechend 10⁶ bis 10⁰ Genomkopien sowie Negativkontrollen (Wasser statt DNA) eingesetzt. Von jeder Probe wurden mehrere Ansätze gemacht, die nach der Amplifizierung vereinigt wurden, um genug homogenes Material für mehrere Hybridisierungen zu haben.

Nachweisprotokolle

Protokoll A: erfindungsgemäßes Protokoll

Hybridisierung:

Hybridisierungslösung (Endkonzentrationen): 5xSSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz (Roche), Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics) 500 mU/ml, 20 ng/ml biotinylierte INV-Detektorsonde, 20 ng/ml biotinylierte KCN-Detektorsonde. Eine Mischung der Detektionssonden wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung etwa 10 Minuten bei 45 ° C erwärmt.

- 10 µl der Proben aus der Multiplex-Amplifizierungsreaktion wurden mit 10 µl 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert.
- Denaturierte DNA einer Probe und ein vorgeblocktes Streifchen wurden jeweils gemeinsam in 0,5 ml Hybridisierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler in einer Inkubationswanne geschüttelt.
- Danach wurde das Streifchen zweimal mit 2 ml Waschlösung (0,1xSSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur für 10 Minuten gewaschen.

Farbdetektion:

Die Detektion erfolgte in diesem Beispiel enzymatisch mittels Umsetzung von NBT (Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat) (AppliChem GmbH, Ottoweg 10b, D-64291 Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) durch das während der Hybridisierung an die biotinylierten Detektorsonden gebundene Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat. NBT-Stocklösung: 22,5 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid mit 0,25 M MgCl₂. BCIP-Stocklösung: 37,5 mg/ml BCIP in Dimethylformamid.

- Die Streifchen wurden kurz in Substratpuffer ohne Substrate (0,1M Tris/HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5) geschwenkt.
- Inkubation der Streifchen in Substratpuffer mit Substraten (je 100 µl NBT- bzw. BCIP-Stocklösung pro 10 ml Substratpuffer, 1 ml pro Streifchen) bei 37 ° C (2 Stunden).
- Abbruch der Farbreaktion durch Schwenken der Streifchen in destilliertem Wasser und Auswertung des Ergebnisses unmittelbar nach dem Trocknen der Streifchen.

Gesamtdauer der Inkubationen einschließlich Farbreaktion: 170 Minuten

Anzahl der Schritte: 4 (Hybridisierung + Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll B: Nachweis von biotinylierten Sonden gemäß Multicolor Detection Set von Roche Diagnostics (Punkt C)

Als vergleichbares Protokoll wurde jenes für den Nachweis von biotinylierten bzw. DIG-markierten Sonden des Multicolor Detection Set (Roche Diagnostics, Kat. No. 1 465 341) ausgewählt, da dieses Protokoll im Vergleich zu Methoden aus der Literatur bereits kürzer ist.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgte wie bei Protokoll A, jedoch wurde zur Hybridisierungslösung kein

Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat zugegeben.

Inkubation mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat:

Mengen wurden so angepasst, dass eine bequeme Inkubation in den Inkubationswannen möglich war. Jedoch wurden vorgeschriebene Mindestmengen und die jeweiligen angegebenen Konzentrationen eingehalten.

- Die Streifchen wurden 30 Minuten in 5% Blockierungslösung (5% Blocking Reagenz in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH 7,5) geschwenkt (1 ml/Streifchen).
- 30 Minuten Inkubation der Streifchen in verdünnter Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugatlösung (150 mU/ml in 5% Blockierungslösung, 0,5 ml/Streifchen).
- Danach wurden die Streifchen 2 x 15 Minuten mit Maleinsäurelösung (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH 7,5) gewaschen (1 ml/Streifchen).

Farbdetektion:

Die Farbdetektion erfolgte wie bei Protokoll A.

Gesamtdauer: 260 Minuten

Anzahl der Schritte: 8 (Hybridisierung, 2x waschen, Abblocken, Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll C: Nachweis mittels direkt enzymmarkierter Sonden

Die gesamte Durchführung erfolgte genau wie bei Protokoll A, jedoch wurden statt biotinylierter Detektionssonden in Kombination mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in diesem Fall direkt enzymmarkierte Detektionssonden eingesetzt (20 ng/ml für INV und 6 ng/ml für KCN).

Gesamtdauer: 170 Minuten

Anzahl der Schritte: 4 (Hybridisierung, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll D: Nachweis von DIG-markierten Sonden gemäß Multicolor Detection Set von Roche Diagnostics (Punkt A)

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgte wie bei Protokoll A, jedoch wurde zur Hybridisierungslösung kein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat zugegeben. Außerdem wurden statt der biotinylierten Sonden DIG-markierte Detektionssonden gleicher Sequenz in der gleichen Konzentration verwendet.

Inkubation mit Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat:

- Die Streifchen wurden 30 Minuten in 1% Blockierungslösung (1% Blocking Reagenz in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH 7,5) geschwenkt (1 ml/Streifchen).
- 30 Minuten Inkubation der Streifchen in Anti-DIG-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugatlösung (150 mU/ml in 1% Blockierungslösung, 0,5 ml/Streifchen).
- Danach wurden die Streifchen 2 x 15 Minuten mit Maleinsäurelösung (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH 7,5) gewaschen (1 ml/Streifchen).

Farbdetektion:

Die Farbdetektion erfolgte wie bei Protokoll A und wurde aufgrund der Stärke der Signale bereits nach 30 Minuten gestoppt.

Gesamtdauer: 170 Minuten

Anzahl der Schritte: 8 (Hybridisierung, 2x waschen, Abblocken, Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll E: Protokoll B mit höherer Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugatkonzentration

Dieses Protokoll wurde durchgeführt, um festzustellen, ob eine erhöhte Menge an Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat auch im Standard-Protokoll möglich ist und eine höhere Signalstärke bzw. schnellere Farbreaktion ermöglicht. Durchführung wie in Protokoll B, jedoch wurden bei

der Konjugatinkubation 500 mU/ml Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, also gleich viel wie bei Protokoll A, eingesetzt.

Gesamtdauer: 260 Minuten

Anzahl der Schritte: 8 (Hybridisierung, 2x waschen, Abblocken, Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll F: verkürztes DIG-Protokoll

Hybridisierung:

Hybridisierungslösung (Endkonzentrationen): 1% Blocking Reagenz in 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 450 mU/ml Anti-DIG-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat, 20 ng/ml DIG-markierter INV-Detektorsonde und 20 ng/ml DIG-markierter KCN-Detektorsonde. Eine Mischung der Detektionssonden wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung etwa 10 Minuten bei 45 ° C erwärmt.

- 10 µl der Proben aus der Multiplex-Amplifizierungsreaktion wurden mit 10 µl 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert.
- Denaturierte DNA einer Probe und ein vorgeblocktes Streifen wurden jeweils gemeinsam in 0,5 ml Hybridisierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler in einer Inkubationswanne geschüttelt. Danach wurde das Streifen zweimal mit 1 ml Waschlösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur für 15 Minuten gewaschen

Farbdetektion: wie bei Protokoll A

Gesamtdauer: 180 Minuten

Anzahl der Schritte: 4 (Hybridisierung + Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Protokoll G: verkürztes DIG-Protokoll mit SSC-Puffer

Durchführung der Hybridisierung + Konjugatinkubation in 5xSSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz (Roche), mit je 20 ng/ml der jeweiligen DIG-markierten Detektionssonden und 450 mU/ml Anti-DIG-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat. Gewaschen wurde mit 0,1xSSC, 0,1% SDS. Nur eine Probe (10⁴ Genomkopien Salmonella) wurde verwendet

Farbdetektion: wie bei Protokoll A

Gesamtdauer: 180 Minuten

Anzahl der Schritte: 4 (Hybridisierung + Konjugatinkubation, 2x waschen, Farbreaktion)

Ergebnisse:

Fig. 1 a-e zeigt die Ergebnisse aus den verschiedenen Protokollen A bis E. In allen Fällen konnten 100 Genomkopien von *Salmonella enteritidis* Phagentyp 4 eindeutig nachgewiesen werden. Extrem schwache Signale wurden auch bei 10 und 1 Genomkopien beobachtet. Mit dem erfindungsgemäßen Protokoll A wurde somit z.B. die gleiche Nachweisgrenze erreicht wie mit den direkt vergleichbaren Protokollen B und C (klassische Biotin/Streptavidin-Methode bzw. Verwendung von enzymmarkierten Sonden). Natürlich ist aufgrund der Tatsache, dass mehrere Reaktionen zugleich statt hintereinander stattfinden müssen, eine Erhöhung der normalerweise (bei der klassischen Methode) eingesetzten Menge an Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat nötig, um die gleiche Sensitivität zu erreichen. Dies stellt jedoch im Gegensatz zur klassischen Methode, bei der eine Erhöhung der Konjugatkonzentration nicht zu einer Sensitivitätssteigerung sondern zu starkem Hintergrund und unspezifischen Reaktionen führt (Fig. 1 e) kein Problem bezüglich des Hintergrundes dar.

Das konventionelle Verfahren unter Verwendung des DIG-Systems erreichte von allen Protokollen die vergleichsweise stärksten Signale in der kürzesten Zeit, hier konnte die Farbreaktion bereits nach 30 Minuten gestoppt werden. Der Arbeitsaufwand und der Materialeinsatz konnten jedoch gegenüber dem konventionellen Verfahren beim erfindungsgemäßen Verfahren durch das Weglassen mehrere Schritte vorteilhaft verringert werden. Die erfindungsgemäße Abkürzung des DIG-Systems ist, wie gezeigt, möglich, egal ob zur Hybridisierung Maleinsäurepuffer (Protokoll F)

oder SSC (Protokoll G) eingesetzt werden. Die resultierenden Signale sind zwar etwas schwächer als beim Biotin/Streptavidin-System (Fig. 2 a und b), der Hintergrund ist jedoch zufriedenstellend.

Das erfindungsgemäße Verfahren liefert somit Ergebnisse wie die klassischen Nachweisverfahren mit einem 2-Komponenten-Markierungssystem sowie ein System, das direkt enzymmarkierte Sonden verwendet. Trotz der Verkürzung des üblichen Protokolls (Integration des Inkubationsschrittes mit dem Konjugat der zweiten Komponente in den Hybridisierungsschritt) und des Weglassens von Abblock- und Waschschritten waren die Signale für die einzelnen Gene stark genug, um bei akzeptablem Hintergrund eine eindeutige Auswertung zu ermöglichen. Es konnten teilweise 100 Genomkopien von *Salmonella enteritidis* mit diesem Verfahren nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren für Nachweismethoden, die Hybridisierungen beinhalten, geeignet ist. Das neuartige Verfahren stellt ein Nachweissystem für Nukleinsäuren dar, das die jeweiligen Vorteile zweier verschiedener herkömmlicher Systeme (Geschwindigkeit, weniger Arbeitsschritte, weniger Reagenzienverbrauch, geringerer Preis, gute Verfügbarkeit, Robustheit, gute Stabilität) in sich vereint, ohne deren Nachteile aufzuweisen.

Legende zu Fig. 1:

- a) Protokoll A
- b) Protokoll B
- c) Protokoll C
- d) Protokoll D
- e) Protokoll E

Proben (von oben nach unten):

- Negativkontrolle (Wasser statt Probe) - Streifen 11, 2, 20
- Salmonella enteritidis* 10⁰ Genomkopien - Streifen 12, 3, 21
- Salmonella enteritidis* 10¹ Genomkopien - Streifen 13, 4, 22
- Salmonella enteritidis* 10² Genomkopien - Streifen 14, 5, 23
- Salmonella enteritidis* 10³ Genomkopien - Streifen 15, 6, 24
- Salmonella enteritidis* 10⁴ Genomkopien - Streifen 16, 7, 17
- Salmonella enteritidis* 10⁵ Genomkopien - Streifen 17, 8, 18
- Salmonella enteritidis* 10⁶ Genomkopien - Streifen 18, 9, 19

Legende zu Fig. 2:

- a) Protokoll F
- b) Protokoll G

Proben (von oben nach unten):

- Negativkontrolle (Wasser statt Probe) - Streifen 13
- Salmonella enteritidis* 10⁰ Genomkopien - Streifen 14
- Salmonella enteritidis* 10¹ Genomkopien - Streifen 15
- Salmonella enteritidis* 10² Genomkopien - Streifen 16
- Salmonella enteritidis* 10³ Genomkopien - Streifen 17
- Salmonella enteritidis* 10⁴ Genomkopien - Streifen 18, 23
- Salmonella enteritidis* 10⁵ Genomkopien - Streifen 19
- Salmonella enteritidis* 10⁶ Genomkopien - Streifen 20

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure mittels einer zur Nukleinsäure komplementären, markierten Detektorsonde, wobei die Markierung aus zwei separaten Komponenten besteht, die aneinander binden, von welchen Komponenten eine mit der Detektorsonde und die andere mit einem detektierbaren Marker konjugiert ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nukleinsäure in Anwesenheit beider Komponenten mit der Detektorsonde hybridisiert und anschließend nachgewiesen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Markierung ein Biotin/Streptavidin-Enzymkonjugat-System ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Markierung ein Digoxigenin/Anti-DIG-Antikörper-Enzymkonjugat-System oder ein Digoxigenin/Anti-DIG-Fab-Enzymkonjugat-System ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der detektierbare Marker Alkalische Phosphatase ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nukleinsäure vor der Hybridisierung amplifiziert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nukleinsäure, insbesondere während der Hybridisierung, mittels einer Fangsonde immobilisiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Nachweis eines pathogenen oder nicht-pathogenen Mikroorganismus in einer biologischen Probe.
8. Verfahren nach Anspruch 7 zum Nachweis von *Salmonella*-Stämmen.

HIEZU 2 BLATT ZEICHNUNGEN

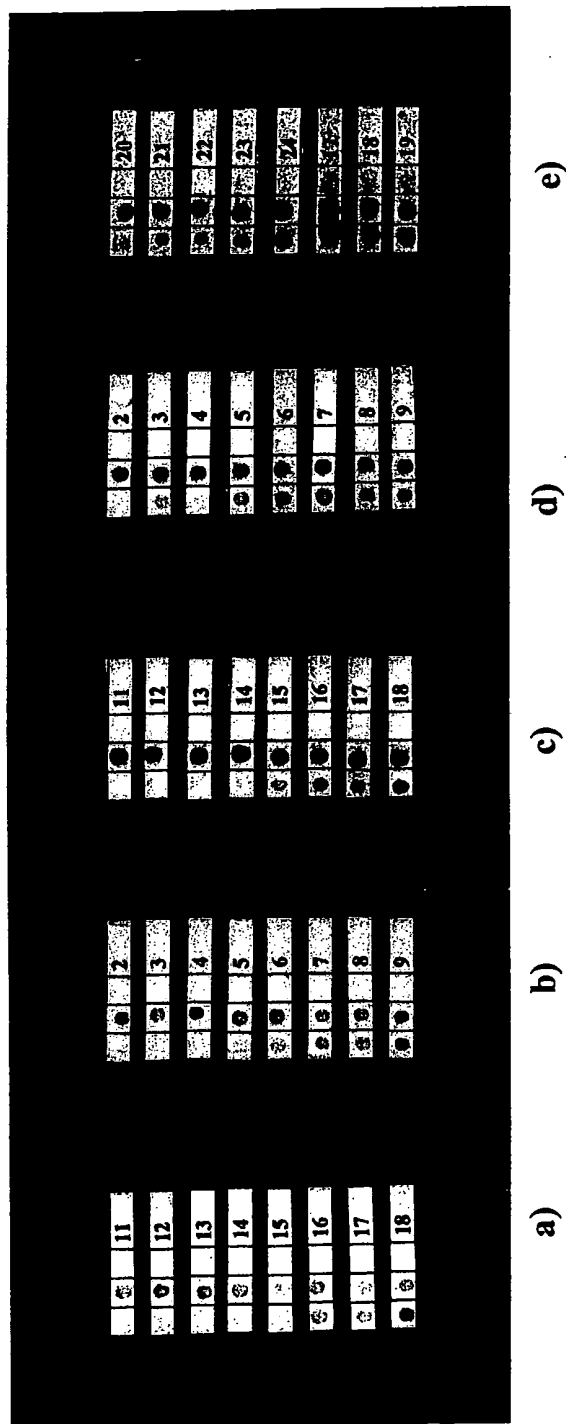
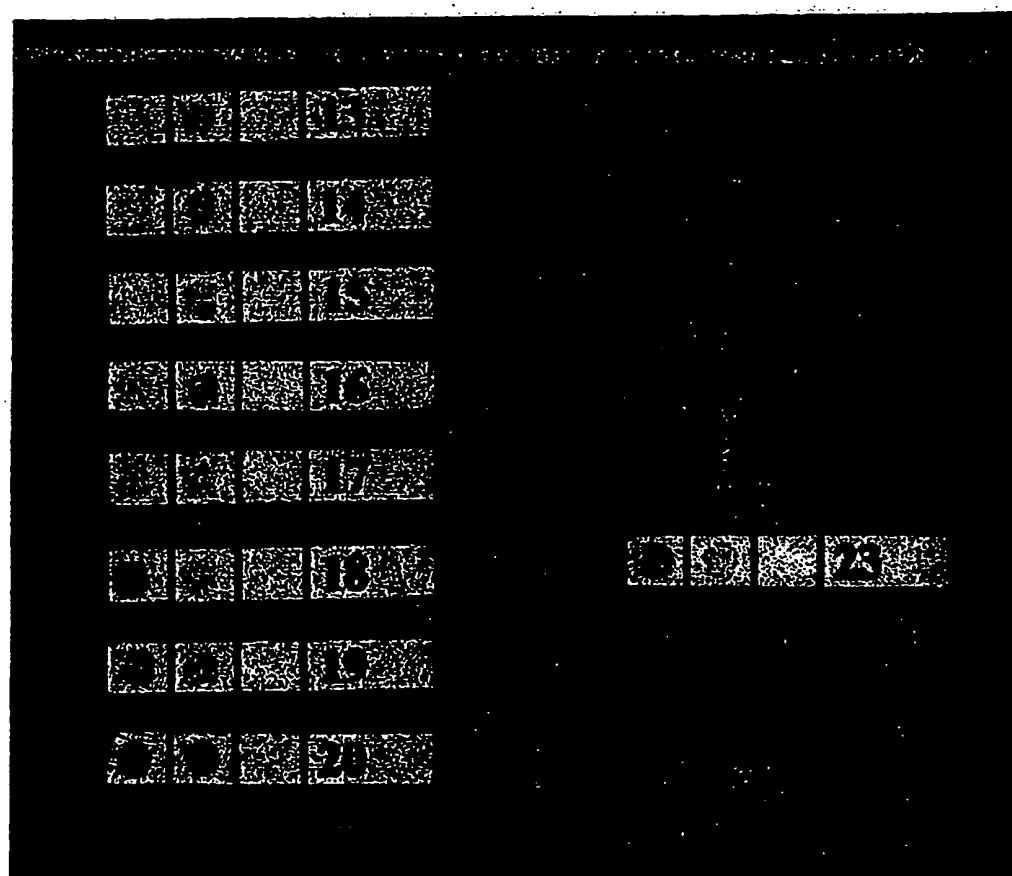


Fig. 1



a)

b)

Fig. 2