(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 59 677 A1** 2004.07.08

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 59 677.8**
(22) Anmeldetag: **18.12.2002**
(43) Offenlegungstag: **08.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(71) Anmelder:
Büddefeld, Jürgen, 47239 Duisburg, DE; Jaszczuk, Wieslar, Dipl.-Phys., 48167 Münster, DE; Klauth, Peter, 41352 Korschenbroich, DE; Kynast, Ulrich, Prof. Dr., 48565 Steinfurt, DE; Rietz, Manfred, 41812 Erkelenz, DE

(74) Vertreter:
König Szynka von Renesse, 40549 Düsseldorf

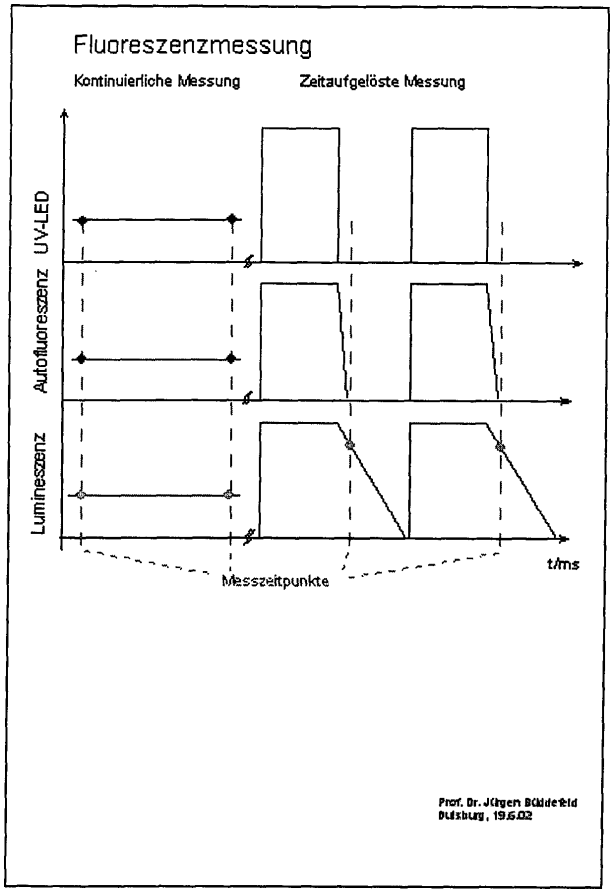
(72) Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren, insbesondere zum Nachweis pathogener Keime in Lebensmitteln**

(57) Zusammenfassung: Sonde zum Nachweis eines Ereignisses in einer Probenumgebung, umfassend zwei Fluorophoren, die ein FRET-Paar bilden, wobei die Fluorophoren so gewählt sind, daß erst nach dem Eintreten des Ereignisses ein Signal von dem Fluorophor emittiert wird, das durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von der Autofluoreszenz der Probenumgebung differenzierbar ist.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Sonde zum Nachweis eines molekularen Ereignisses, insbesondere zum Nachweis der Hybridisierung der Oligonukleotidsonden mit einem Zieloligonukleotid, vorzugsweise mit Hilfe von molecular beacons. Das erfindungsgemäße System dient vorzugsweise dem Nachweis pathogener Keime in Lebensmitteln.

[0002] Molecular beacons (MB) sind Einzelstrang-DNA-Moleküle mit einer Haarnadelstruktur (hair pin). Sie besitzen demnach eine "stem and loop structure". Die Schleife (loop) weist eine Nukleotidsequenz auf – die sog. Probensequenz, die zu einer vorbestimmten Zielnukleotidsequenz komplementär ist. Der Stamm (stem) wird durch die Hybridisierung zweier komplementärer Armsequenzen gebildet, die die Probensequenz flankieren. Ein Fluoreszenzfarbstoff befindet sich am Ende eines Armes, während ein Quencher am Ende des anderen Arms gebunden ist. Durch den Stamm werden diese beiden Einheiten in einer definierten räumlichen Nähe zueinander gehalten, die zu einem möglichst vollständigem Quenchen (Löschen) der Fluoreszenz-Strahlung des Fluorophors durch den sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) führt. Dazu ist es erforderlich, das FRET-Paar "Fluorophor-Quencher" aufeinander abzustimmen.

[0003] Trifft der molecular beacon auf eine Zielsequenz, hybridisieren die Probensequenz und die Zielsequenz über einen Bereich, der stabiler und länger ist als der Stamm aus den beiden Armsequenzen. Der Stamm wird daher in seine Arme getrennt und der Fluorophor und der Quencher nehmen eine definierte räumliche Distanz zueinander ein. Damit wird der FRET unterbrochen da der FRET mit der 6. Potenz Radius abnimmt. Fluoreszenz-Emission des Fluorophors wird detektierbar.

[0004] Die Struktur und das Funktionsprinzip der molecular beacon sind ausführlich beschrieben von Tyagi und Kramen (1996): "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" in Nature Biotechnology 14, 303 – 308. Ebenso sind sie Gegenstand der US Patentschrift 5,925,517, die hiermit zu Offenbarungszwecken hinsichtlich der Struktur und Funktion der MBs sowie der Wahl geeigneter FRET-Paare vollumfänglich in Bezug genommen wird.

[0005] Als bekanntes ideales Fluorophor-Quencher Paar, das in der Stammformation des MB zu einem fast vollständigen Löschen der Fluoreszenz-Emisson führt, ist die 5'-(2-Aminoethyl)Aminonaphtalin-1-Sulfonsäure (EDANS) am 5'-Ende und als Quencher die 4-(4'-Dimethylaminophenylazobenzolsäure (DABCYL) am 3'-Ende bekannt. Ebenso ist auch die Verwendung des DABCYL in Kombination mit Fluorescein am 5'-Ende geeignet (G. Leone, von Schijndel H., van Gemen B., Kramen R. F. und Schön D. (1998) "Molecular Beacon Probes combined with Amplification by NASBA enable homogeneous real-time Detection of RNA" in: Nucleic Acids Research 26, 9, 2150-2155).

[0006] Da MBs aufgrund des durch FRET verursachten Quenchings im Ergebnis solange keine oder kaum eine Fluoreszenzstrahlung emittieren, oder spektrale Verschiebung bei Verwendung von zwei Fluorophoren verursachen und damit das Signal aus dem Meßbereich entfernen, wie die Probensequenz nicht mit der Zielsequenz hybridisiert vorliegt, haben sich MB in jüngeren Vergangenheit besonders als Sonden in Nachweissystemen bewährt, in denen das Auswaschen überschüssiger Sonden nicht gewünscht oder möglich ist. Dies gilt insbesondere bei der real-time PCR oder bei der Detektion von Nukleinsäuren in lebenden Zellen (Liu X., Farmerie W., Schuster S., Tan W. (2000): "Molecular beacons for DNA Biosensors with a Micrometer to Submicrometer Dimension" in: Analytical Biochemistry 283, 56-63).

[0007] Gerade in komplexen biologischen Systemen wie lebenden Zellen hat sich jedoch die unspezifische Fluoreszenz beispielsweise zellulärer Bestandteile als wesentliche systematische Fehlerquelle erwiesen, die die Aussagekraft und Spezifität der Nachweismethoden selbst mit den bekannten MB deutlich vermindert. So zeigen beispielsweise Hämoglobine oder aromatische Kohlenwasserstoffe bei Anregung mit UV-Licht ungewollte eine unspezifische Fluoreszenz, die sich als Hintergrundstrahlung bemerkbar macht. Das eigentliche Meßsignal wird somit überlagert. Diese Hintergrundstrahlung wird nachfolgend auch als Autofluoreszenz der Probenumgebung oder des Probenmilieus bezeichnet.

[0008] Der vorliegenden Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes System zum Nachweis von Ereignissen in einer Probenumgebung zur Verfügung zu stellen, wobei der Nachweis des Ereignisses insbesondere dem Nachweis der Gegenwart eines Zielmoleküls dient. Das Zielmolekül kann beispielsweise ein Iligonukleotid oder auch ein Peptid oder Protein (Enzym) sein. Damit soll insbesondere eine Sonde zum Nachweis von Nukleinsäuren, sowie ein entsprechendes Auswertesystem unter Verwendung dieses Systems bereitgestellt werden, mit dem vor allem das Problem der ungewollten Hintergrundstrahlung bei UV-Anregung reduziert wird. Des weiteren soll eine Vorrichtung zur Durchführung einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens bereitgestellt werden.

[0009] Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe beruht im Kern darin, eine Sonde mit zwei ein FRET-Paar bildenden Fluorophoren einzusetzen, wobei das Paar so gewählt ist, daß der Donor des FRET-Paares bei Anregung im Falle des Eintritts des Ereignisses ein Meßsignal emittiert, daß eine gegenüber der Floureszenz-Emission der Probenumgebung verlängerte Lebensdauer aufweist. Durch die zeitliche Differenz der Lebensdauern des Meßsignals und der Hintergrundstrahlung wird eine Diskriminierung der Emissionen durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung möglich.

[0010] Sofern es sich um eine Sonde für den Nukleinsäurenachweis handelt, stellt das "Ereignis" beispielsweise die Hybridisierung der Sonde mit dem Zieloligonukleotid dar. Umfaßt die erfindungsgemäße Sonde jedoch einen Oligo- oder Polypeptidanteil, kann das Ereignis beispielsweise auch die Spaltung oder aber die Bindung des Peptids an einen Liganden sein. Das "Ereignis" kann somit generell jede Aktivität darstellen, die zu einer Veränderung der räumlichen Anordnung der FRET-Paare zueinander führt, die eine diskriminierende Erfassung des Donor-Signals in der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung ermöglicht.

[0011] Die Diskriminierung zwischen der Fluoreszenz des gewünschten Meßsignals und der unspezifischen Hintergrundstrahlung wird erfindungsgemäß daher erst möglich durch einen Fluorophor, der sein Signal in zeitlicher Hinsicht um mindestens des Faktor 10 länger abgibt als die Fluoreszenz-Emission der Probenumgebung. Damit wird das in den derzeit bekannten Verfahren störende "Hintergrundrauschen" durch unspezifische Autofluoreszenz bei Verwendung von bekannten MBs verhindert bzw. erheblich reduziert. Klingt z. B. die Autofluoreszenz – d. h. die Störfluoreszenz der Probenumgebung – bereits nach 200 ns nach Beendigung des UV-Anregung in Form eines Pulses ab und emittiert der erfindungsgemäße molecular beacon bei Hybridisierung an seine Targetsequenz insgesamt über einen Zeitraum von 0,5 ms bis 2 ms sein Meßsignal, so kann das nach dem Ablauf von 200 ns nach Beendigung des UV-Pulses erfaßbare Fluoreszenzsignal ausschließlich der Emission der erfindungsgemäßen Sonden zugeordnet werden. Eine schematische Darstellung der Erfassung der Autofluoreszenz sowie der SEF-Fluoreszenz mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung zeigt **Fig.** 1.

[0012] Die Applikation der dafür erforderlichen gepulsten UV-Anregung sowie die Vorrichtung und die Verfahren zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung entsprechen dabei den im Stand der Technik bekannten Verfahren. Diese sind beispielsweise aus der deutschen Patentanmeldung 196 34 873 A1 bekannt (siehe auch R. Müller, C. Sanden, M. Sauer, M. Deimel, D.S. Ko, S. Siebert, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, K.H. Drexhage, J. Wolfrum: Time-resolved identification of single molecules in solution with a pulsed semiconductor diode lasen, Chem. Phys. Lett. 262, 716-722 (1996). Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Sonden besteht in der Möglichkeit, eine sehr viel höhere Anregungsenergie zu applizieren, ohne daß damit die Störung durch eine anderenfalls ebenso erfaßte Autofloureszenz der Probenumgebung zunähme. Diese erfindungsgemäß verwendete Anregungsenergie (UV-Diode) kann beispielsweise 300% über der üblicherweise verwendeten Anregungsenergie liegen. Die hohe Quantenausbeute und das extrem schmalbandige Emissionsspektrum der verwendeten Sonden führen zu einer hohen Emissionsintensität in einem engen Frequenzbereich, während die UV-Diode die Sonde optimal anregen kann. Damit erhöht sich auch das spezifische Meßsignal (Ausgangssignal) der Fluorophor-Emission deutlich gegenüber konventionellen Fluorophoren. Des weiteren geht damit vorteilhafterweise die Erniedrigung der Nachweisgrenze des Detektionssystems einher.

[0013] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Seltene-Erden-Farbstoffe (nachfolgend auch SEF) als Fluorophore für den erfindungsgemäßen molecular beacon eingesetzt. Dabei handelt es sich um Farbstoffe, die unter anderen. Lanthanide wie Europium oder Terbium enthalten. SEF weisen in der Regel Fluoreszenzlebensdauern von etwa 0,5 bis 2,5 ms nach einem Anregungsimpuls auf (Hemmilä, I. (1990) Applications of fluorescence in Immunoassays, Wiley-Interscience). Dagegen sind organische Farbstoffe meist durch Fluoreszenzlebensdauern von nur wenigen ns bis zu µs gekennzeichnet. So emittiert der Farbstoff Cy5 nur bis zu etwa 1 ns nach der Anregung ein Fluoreszenzsignal (Quelle: Amersham Bioscience).

[0014] Die Seltenerd-Komponente kann bevorzugt ein Diketonato-Komplex sein der koordiniert mit einem Chelatbildner ist.

[0015] Als Diketonat kann Euttaphen oder substituierte Derivate, als Chelatbildner können Phenanthrolin oder Bipyridin und ihre substituierten Abkömmlinge verwandt werden. Als Substituenten sind solche funktionellen Gruppen geeignet, die zur einer Kopplung (mit dem Linker) befähigt sind. Zu nennen sind insbesondere Amin-, Carboxylat-, Isocyanat-, Thioisocaynat-, Epoxy-, Thiol- oder Hydroxy-Substituenten.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Sonden Euttaphen (1-thenyl-,4,4,4-trifluor-1,3-butane-,1,3-dionato)(1,10-phenanthrolinato) Eu (+III)) als SEF auf (**Fig.** 2). Dieser Farbkomplex ist gekennzeichnet durch eine Fluoreszenz-Emission noch bis etwa 1 ms nach seiner Anregung. Das Lumineszenzspektrum von Euttaphen zeigt **Fig.** 3.

[0017] Zur Bildung eines erfindungsgemäßen MB kann beispielsweise Euttaphen als Donor mit Cy5 als Akzeptor-Chromophor zu einem FRET-Pärchen kombiniert werden.

[0018] Die Auswahl von Chromophoren als geeignete FRET-Partner kann mittels der Untersuchung der Fluoreszenz-Emission eines möglichen Donors in Gegenwart eines möglichen Akzeptors erfolgen, wobei die Konzentration des Akzeptors variiert wird. Das Absorptionsspektrum muß dabei mit den Emissionsspektrum des Donors deutlich überlappen. Die für einen Quenching-Effekt erforderliche Wechselwirkung (insbesondere der räumlichen Nähe) zwischen Donor und Akzeptor wird z. B. durch Konzentration der potentiellen FRET-Partner eingestellt. Die räumliche Nähe kann ggf. auch dadurch erzielt werden, daß ein Partner chemisch an ein Linker- oder Spacer-Molekül gebunden ist, welches bei Zusatz des zweiten

Partners diesen zusätzlich anzubinden vermag. Nimmt die Emission des Donors bei steigender Konzentration des Akzeptors ab, ist dies ein deutliches Zeichen für die Quenchingaktivität des Akzeptors und damit für die Kompatibilität der verwendeten Farbstoffe als FRET-Paar. Beispielhaft für dieses Vorgehen ist die Darstellung der Abnahme der Fluoreszenz-Emission von Euttaphen in Abhängigkeit von der Konzentration von Cy5 in **Fig.** 4.

[0019] Nach der Wahl geeigneter FRET-Paare werden diese zur Bildung der erfindungsgemäßen Sonden miteinander verbunden. Diese kann beispielsweise mittels des Protokolls von Min Li und Paul R. Sevin (Amine-Reactive Forms of a Luminescent Diethylenetriaminepentaacteic Acid Chelate of Terbium an Europium: Attachment to DNA and Energy Transfer Measurements. Bioconjugate Chem. 1997, 8, 127-132) erfolgen. Dazu wird beispielsweise das Euttaphen-NHZ verwendet und zunächst durch die Behandlung mit $CSCl_2$ an seinem NH_2 isothiocynatisiert. Anschließend erfolgt an dem Thiocynat-Rest eine Kopplung an einen aminomodifizierten Linker, beispielsweise ein aminomodifiziertes Oligonukleotid. Für die Kopplung des Linkers kann ebenso auf das Protokoll von Li und Sevin zurückgegriffen werden. Der Linker trägt ebenso einen Chromophor, beispielsweise Cy5. Die Kopplung des Farbstoffs an den Linker ist über bekannte Standardmethoden möglich.

[0020] Wie bereits ausgeführt, ermöglichen die erfindungsgemäßen Sonden die Diskriminierung zwischen Sondensignal und unspezifischer Hintergrundstrahlung über die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung. Gleichzeitig zeigen die erfindungsgemäß an die MB gekoppelten Farbstoffe ein Emissionsspektrum mit scharfen Emissionsbanden.

[0021] Die beiden Faktoren – nämlich die scharten Emissionsbanden der Farbstoffe und die weitgehende Ausschaltung der unspezifischen Autofluoreszenz selbst bei Erhöhung der Anregungsenergie – ermöglichen den Verzicht auf aufwendige Laser- und Auswertesysteme (z.B. ICCD (Intensified Coupled Charge Device)), die in dem Stand der Technik zur Optimierung der Meßsignale vor dem Hintergrund störender Autofloureszenz entwickelt wurden. Diese befinden sich in den handelsüblichen real-time PCR Thermocyclern in der Peripherie der Geräte – d.h. außerhalb des eigentlichen Thermoblocks – und kommunizieren mit den Proben über Lichtleitsysteme, in denen ggf. Filter oder Verstärker untergebracht sind.

[0022] Solche konstruktiv aufwendigen Systeme zur UV-Anregung können erfindungsgemäß nunmehr durch eine handelsübliche UV-Leuchtdiode zur Anregung der Fluorophore und eine handelsübliche Photodiode zur Erfassung des Meßsignals ersetzt werden. Vorteilhafterweise wird damit die Konstruktion einer auf die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angepaßte Vorrichtung erheblich vereinfacht und kostengünstiger.

[0023] In einer vorteilhaften Ausführungsform sind die handelsüblichen Dioden unmittelbar in den Thermoblock eines Thermocyclers für eine real-time-PCR integriert. Die Integration der Dioden unmittelbar in den Thermoblock ermöglicht eine kompakte Bauweise des Thermocyclers, so daß dieser vorzugsweise auch tragbar oder mobil konstruiert sein kann.

[0024] Die erfindungsgemäßen Sonden erlauben demnach u.a. die spezifische und aussagekräftige real-time Detektion der Amplifikation von Zielnukleinsäuren mit einer niedrigen Nachweisgrenze, insbesondere die real-time-PCR in einem kompakt und einfach gestalteten Thermocycler. Die gegenüber z.B. einem Photomultiplier möglicherweise verringerte Empfindlichkeit einer Photodiode wird durch das intensive sowie zeitaufgelöste Signal der erfindungsgemäßen Sonden ausgeglichen. Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Sonden jedoch auch in isothermalen Amplikationsverfahren wie die Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) einsetzbar. Auch können die erfindungsgemäßen Sonden in der Array-Technologie Verwendung finden. Dies ist bereits für die klassischen molecular beacons bekannt (Liu X. et al. (2000)). Damit eröffnet sich für die erfindungsgemäßen Sonden das breite Anwendungsfeld der gesamten medizinischen, molekularbiologischen oder biochemischen Analytik und Diagnostik.

[0025] Darüber hinaus kann das System der Seltene-Erde-Farbstoffe als Fluorophor und einem dazu angepaßten Quencher – also das FRET-Pärchen – auch in einer Bindung an Oligopeptide oder Proteine erfolgreich eingesetzt werden. Der Einsatz des erfindungsgemäß verwendeten FRET-Pärchens ist somit nicht auf die Kopplung an Nukleinsäuren beschränkt. So ist es ebenso möglich, daß es zunächst in definierter Nachbarschaft zueinander gebunden an einem Protein vorliegt und im Falle einer Spaltung des Proteins oder auch aufgrund einer Konformationsänderung im Falle der Bindung an einen Liganden in räumlicher Distanz zueinander liegt, so daß die Fluoreszenz-Emission des Donor-Fluorophors nachweisbar wird. Damit sind diese hier vorgeschlagenen FRET-Pärchen auch in der Protein- oder Peptid-Analytik vorteilhaft einsetzbar.

[0026] Zur Bildung eines Protein-FRET-Komplexes kann beispielsweise über das Protokoll von Li and Selvin erfolgen (Min Li and Paul R. Selvin: Amine-Reactive Forms of a Luminescent Diethylenetriaminepentaacetic Acid Chelate of Terbium and Europium: Attachment to DNA and Energy Transfer measurements, Bioconjugate Chem., 1997, 8, 127-132). Dazu wird Euttfaphen-NH_2 wiederum in seine Isothiocyanat-Form überführt. Dieser Schritt kann analog zur Kopplung an DNA erfolgen.

[0027] In einem zweiten Schritt wird die Isothiocyanat-Form von Euttfaphen mit einem Protein/Peptid gekoppelt, welches mit Cy5 markiert ist. Dies kann nach Takalo et al. erfolgen (Harri Takalo, Veli-Matti Mukkala, Heikki Mikola, Päivi Liitti, and Ilkka Hemmilä: Synthesis of Europium (III) Chelates suitable for

Labelling of Bioactive Molecules, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 278-282, siehe Synthesis of Chelates.pdf). Dazu wird das Protein/Peptid in Gegenwart der Isothiocyanat-Form von Euttfaphen in Carbonat-Puffer (pH 9,3) bei Raumtemperatur für 16 h inkubiert. Die Aufreinigung ist anschließend über Gelchromatographie möglich.

[0028] Alternativ kann die Kopplung von Euttfaphen-NH_2 über Derivate von DTA (4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-ylamin) nach einem Protokoll von Karsilayan et al. (Huriye Karsilayan, Ilkka Hemmilä, Harri Takalo, Airi Toivonen, Kim Petterson, Timo Lövgren, and Veli-Matti Mukkala: Influence of coupling Method on the Luminescence Properties, coupling Efficiency, and binding Aftinity of Antibodies labelled with Europium(III) Chelates, Bioconjugate Chem., 1997, 8, 71-75, siehe Influence of Coupling Method on the Luminescence Properties.pdf) geschehen. Für eine spätere industrielle Herstellung mittels Syntheseautomaten ließe sich das Euttfaphen-NH_2 auch nach einem Protokoll von Peuralahti et al. (Jari Peuralahti, Harri Hakal, Veli-Matti Mukkala, Kristiina Loman, Pertti Hurskainen, Outi Mulari, and Jari Hovinen: Introduction of Lanthanide(III) Chelates to Oligopeptides on Solid Phase, Bioconjugate Chem, 2002, 13, 870-875, siehe Introduction of Lanthanide(III) Chelates to Oligopeptides on Solid.pdf) an Peptide anbinden.

[0029] In einem weiteren alternativen Verfahren kann ein Oligopeptid zunächst mit einem Isocyanat bestückt werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Kondensation mit einem Amin-Liganden und dann erst die Komplexbildung mit Euttaphen. Auch hier kann das Oligopeptid zuvor mit einem Farbstoff gekoppelt werden. Dieses Vorgehen ist schematisch gezeigt in **Fig.** 5.

Ausführungsbeispiel:

[0030] Die Sonden, das Verfahren und die Vorrichtung gemäß der Erfindung lassen sich bevorzugt zum Nachweis pathogener Keime in Lebensmitteln sowie ihrer Quantifizierung in der Ausgangsprobe einsetzen.

[0031] Zur Bestimmung von Pathogenen in Proben wie beispielsweise Lebensmitteln sind vielfältige Verfahren bekannt, die überwiegend auf der Bestimmung der Keimzahl bzw. die Erfassung der vermehrungsfähigen Keime oder auf immunologischen oder biochemischen Nachweisreaktionen beruhen. Insbesondere die Keimzahlbestimmung impliziert eine vorherige Anreicherung der Pathogene, die einerseits zu einer langen Dauer (bis zu 72 Stunden) des Nachweises führt und das Verfahren aufgrund der Gefahr der Vermehrung auch potentiell pathogener Mikroorganismen nach dem Infektionsschutzgesetz anzeige- und genehmigungspflichtig macht.

[0032] Mit den erfindungsgemäßen Sonden kann dazu eine einfache, kostengünstige und auch von wenig geschultem Personal durchführbare Alternative zum Nachweis und zur Quantifizierung pathogener Keime bereitgestellt werden.

[0033] Dieses komplexe Nachweisverfahren umfaßt folgende Schritte, die nachfolgend im einzelnen beschrieben werden:

1. Isolierung der Pathogene aus der Lebensmittelprobe
1a. ggf. Lyseschritt
2. Amplifikation der Zielnukleinsäuren durch eine real-time-PCR mit verzögerter Fluoreszenzmessung als Marken für die Pathogene
3. Quantifizierung der Pathogen-Konzentration in der Ausgangsprobe über eine Standardkurve mit Kalibrierfaktoren.

zu 1. Isolierung der Pathogene (Beispiel Salmonella)

[0034] Die Keime werden vorzugsweise durch immunologische Verfahren aus der Probenumgebung spezifisch isoliert. Dabei wird bevorzugt auf die mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle der nachzuweisenden Mikroorganismen beschichtete paramagnetische Partikel zurückgegriffen. Zum Nachweis von Salmonella kann dazu auf die sogenannten "Dynabeads anti-Salmonella" (Prod. No. 710.02) von der Fa. Dyna Biotech zurückgegriffen werden.

[0035] In einem konkreten Ausführungsbeispiel werden 25 g Lebensmittel mit 225 ml PBS Puffer suspendiert. Der Suspension werden Immunomagnetische Partikel hinzugegeben. Die Partikel tragen Antikörper gegen Oberflächenmoleküle der nachzuweisenden Keime. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten unter Rühren. Nachfolgend werden die magnetischen Partikel über einen Magneten entfernt. Das Pellet wird einmal mit 20 ml PBS-Puffer oder TEST Puffer (10 mM Tris [pH 8], 150 mM NaCl, 0,05 % TWEEN 20) gewaschen.

zu 1a. Lyse der isolierten Mikroorganismen

[0036] Für Mikroorganismen, die nicht durch den ersten Schritt der PCR lysiert werden, erfolgt ein Lyseschritt mit einem Lysepuffer mit Proteinase K (z. B. 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1mM EDTA, 0,1 % SDS und 1 mg/ml Proteinase K). Die Lyse erfolgt für eine Stunde bei 55°C, wobei permanent geschüttelt/gerührt wird. Danach wird die DNA über eine Affinitätschomatographiesäule (z. B. QI Aamp DNA Mini Kit von Qiagen) gebunden und eluiert. Ein Aliquot (< 50 µl) wird für die PCR verwendet.

zu 2. Amplifikation der Target-Nukleinsäuren

[0037] Die paramagnetischen Partikel einschließlich der gebundenen Mikroorganismen – oder ggf. ein Aliquot aus der Lyse – werden in ein PCR-Gefäß überführt, das mit den für die PCR erforderlichen Komponenten bestückt ist.

[0038] Die PCR für Salmonella entspricht dem Pro-

tokoll von W. Chen, G. Martinez, A. Mulchandani (2000): Molecular Beacon: A real time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting Salmonella, Analytical Biochemistry, 280, 166-172. Dabei werden allerdings die erfindungsgemäßen Sonden verwendet.

[0039] Die PCR für Legionella pneumophila wird nach dem Protokoll von N. Wellinghausen, C. Frost, R. Marre (2001): Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative real time Lightcycler PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3985-3993 durchgeführt.

[0040] Zuvor wurde über eine serielle Verbindung eine Kalibrierfunktion (Standardfunktion) für den Keim sowie für den Referenzkeim unter genau diesen konkreten PCR Bedingungen durchgeführt. Das Prinzip der Aufstellung einer Kalibrierfunktion und der nachfolgenden Quantifizierung der Pathogene in der Ausgangsprobe entspricht dabei dem dem Durchschnittsfachmann bekannten Verfahren, das beispielsweise von Fortin N Y, Mulchandani A. und Chen W. beschrieben wird ("Use of real-time Polymerase Chain Reaction and Molecular Beacons for the Detection of Escherichia coli O157:H7 (2001) in: Analytical Biochemistry 289, 281 bis 288).

[0041] In dem PCR-Verfahren werden erfindungsgemäße Sonden eingesetzt, die folgende Struktur aufweisen:

5' SEF-CGCTATACTGACACTGAGCGACGAAAG-CGTAGCG Cy5 3'

[0042] Als SEF wurde Euttaphen eingesetzt. Als Linker diente ein C6 Aminolinker mit folgender Struktur **Fig.** 6.

Thermocycler mit Thermoblock

[0043] Der Thermocycler **1** (**Fig.** 7) weist einen Patterngenerator **2** mit einem Ausgang **3** auf zur Triggerung und Synchronisation der Pulssignale. Für den Generator kann je nach Bedarf und Ausbaustufe ein programmierbarer Timerstein, ein handelsübliches Microcontroller-Board oder ein PC mit I/O-Karte inklusive entsprechender Zusatzfunktion verwendet werden. Daneben ist ein über das Triggersignal getaktetes Ansteuermodul **4** für die UV-Diode sowie ein synchronisierter Leseverstärker mit Sample/Hold-Schaltung **5** für die Photodiode vorgesehen. Das analoge getaktete Ausgangssignal **6** kann für die weitere Auswertung mit handelsüblichen Analog/Digital-Konvertern digital gespeichert und weiterverarbeitet werden.

[0044] Der Thermoblock **8** (siehe **Fig.** 8) kann aus einem quaderförmigen Aluminium-Heizblock zur Aufnahme des Probengefäßes und der Sensorbauelemente für die real-time-Detektion bestehen. Dazu umfaßt er Peltier-Elemente **9** mit Kühlern **10** und Lüftern **11**. Eine UV-LED-Diode **12** ist unterhalb des Probengefäßes **13** in einer Bohrung **14** untergebracht. Seitlich neben dem Probengefäß ist eine handelsübliche Photodiode **15** angeordnet.

Patentansprüche

1. System zum Nachweis eines Ereignisses in einer Probenumgebung umfassend ein Sonde mit mindestens zwei Fluorophoren, die ein FRET-Paar bilden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fluorophoren so gewählt sind, daß erst nach dem Eintreten des Ereignisses ein Signal von dem Fluorophor emittiert wird, das durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von der Autofluoreszenz der Probenumgebung differenzierbar ist.

2. System nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Anordnung der Fluorophoren relativ zueinander durch das Ereignis veränderbar ist.

3. System nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Differenz zwischen der Lebensdauers des Signals und derjenigen der Probenumgebung mindestens Faktor 10 beträgt.

4. System nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde einen mit einem Fluorophor Seltene-Erde-Farbstoff umfaßt.

5. System nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Seltene-Erde-Farbstoff einen Diketonat-Komplex oder Derivate davon umfaßt, der mit einen Chelatbinder oder Derivate davon koordiniert.

6. System nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daßder Chelatbinder ausgewählt ist aus der Gruppe der Phenanthrolin oder Bipyridin sowie deren Derivate.

7. System nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Derivate Substituenten mit folgenden funktionellen Gruppen aufweisen: Amin-, Carboxylat-, Isocyanat-, Thioisocaynat-, Epoxy-, Thiol- oder Hydroxy-Gruppen.

8. System nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das FRET-Paar von Euttaphen und Cy5 gebildet wird.

9. System nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gekennzeichnet durch ein Oligonukleotid als Sonde.

10. System nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde einen zu einem Zielmolekül im wesentlichen komplementären Oliogonukleotidabschnitt umfaßt.

11. System nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, daß das Signal nach einer Hybridisierung des Oligonukleotidabschnitts mit dem Zielmolekül detektierbar wird.

12. System nach einem der Ansprüche 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde ein Oligo-

peptid ist.

13. Oligonukleotid als Sonde zur Detektion eines Zieloligonukleotids in einer Probenumgebung umfassend eine zu dem Zieloligonukleotid komplementäre Detektionssequenz und zwei die Probensequenz am 3'- und 5'-Ende flankierende, zueinander komplementäre Oligonukleotidsequenzabschnitte, die entweder mit einem Quencher oder einem Fluorophor zur Bildung eines gemeinsamen FRET-Paars verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß das FRET-Paar so gewählt ist, daß im Falle der Hybridisierung der Detektionssequenz mit der Zielsequenz ein Signal von dem Fluorophor emittiert wird, das durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung von der Autofluoreszenz der Probenumgebung differenzierbar ist.

14. Verfahren zur Detektion von Zieloligonukleotiden in einer Probenumgebung umfassend folgende Schritte:
– Inkubieren einer Zielnukleinsäure mit einem System nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 13
– Bestrahlung des Inkubationsansatzes
– Erfassen der Fluoreszenzemission mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung.

15. Verfahren nach Anspruch 14, gegenzeichnet durch eine real-time PCR zur Amplifikation der Zielnukleinsäuren.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß entweder die Zielnukleinsäure und das Oligonukleotid als Sonde auf einem Träger gebunden ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16 gekennzeichnet durch eine NASBA.

18. Verwendung des Systems nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder des Oligonukleotids nach Anspruch 13 zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen, insbesondere von Mikroorganismen und Lebensmitteln.

19. Verwendung des Systems nach Anspruch 18, gekennzeichnet durch eine Anreicherung der Mikroorganismen über mit Mikroorganismen spezifischen Liganden beschichteten Träger.

20. Vewendung nach Anspruch 19, gekennzeichnet durch Antikörper beschichtete Mikropartikel.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, gekennzeichnet durch die Angabe eines Kalibriertaktors zur Quantifizierung der Mikroorganismen.

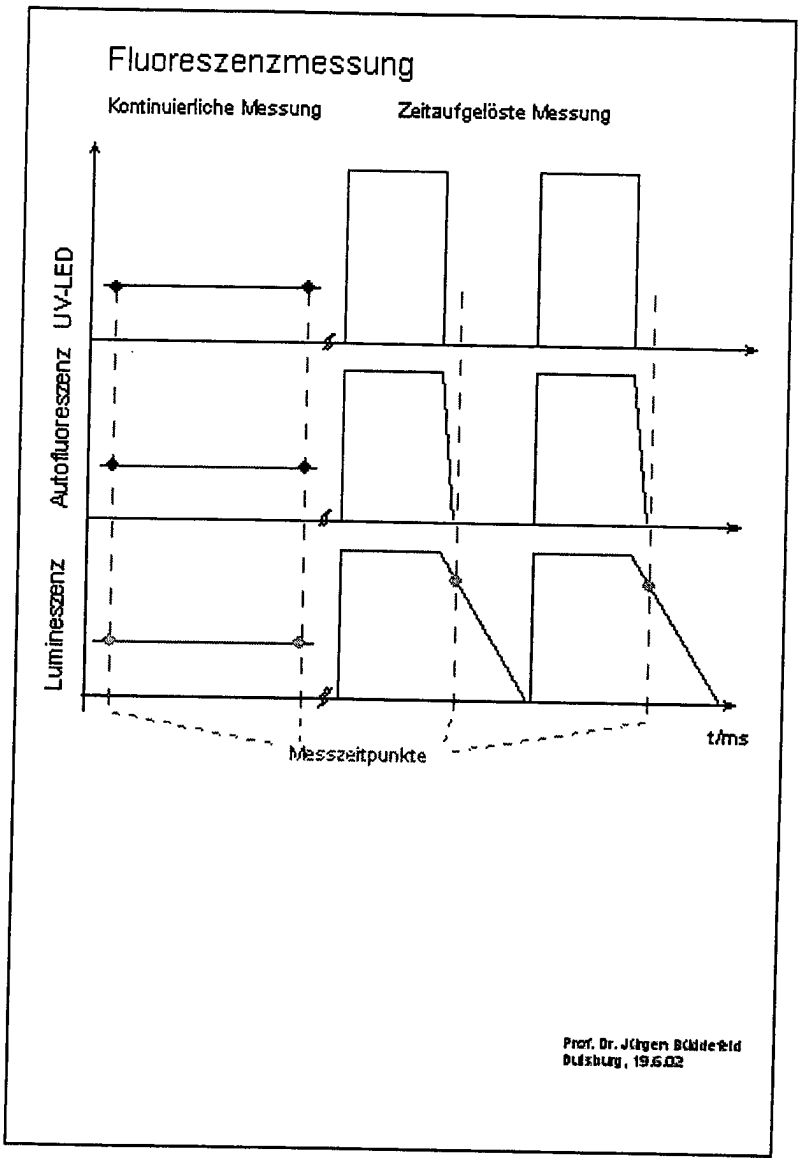
22. Vorrichtung insbesondere zur Durchführung einer real-time PCR mit einem Heizblock, Mitteln zum Kühlen, Mitteln zum Heizen, Mitteln zum Anregen von PCR-Reportern sowie Mitteln zum Erfassen der von den PCR-Reportern ausgesendeten Meßsignale, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zum Anregen der Reporter durch eine UV-LED und die Mittel zum Erfassen der Meßsignale durch eine Photodiode dargestellt werden.

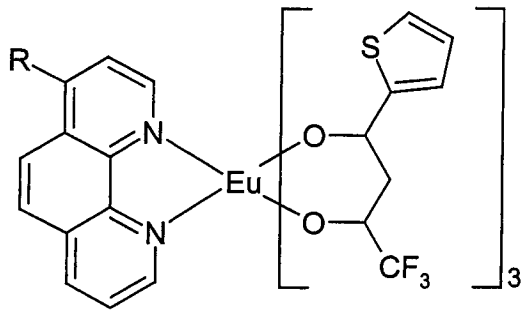
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die UV-LED und die Photodiode in den Heizblock integriert sind.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1





R=H
(R=NH_2 für Proteinankopplung)

FIG. 2

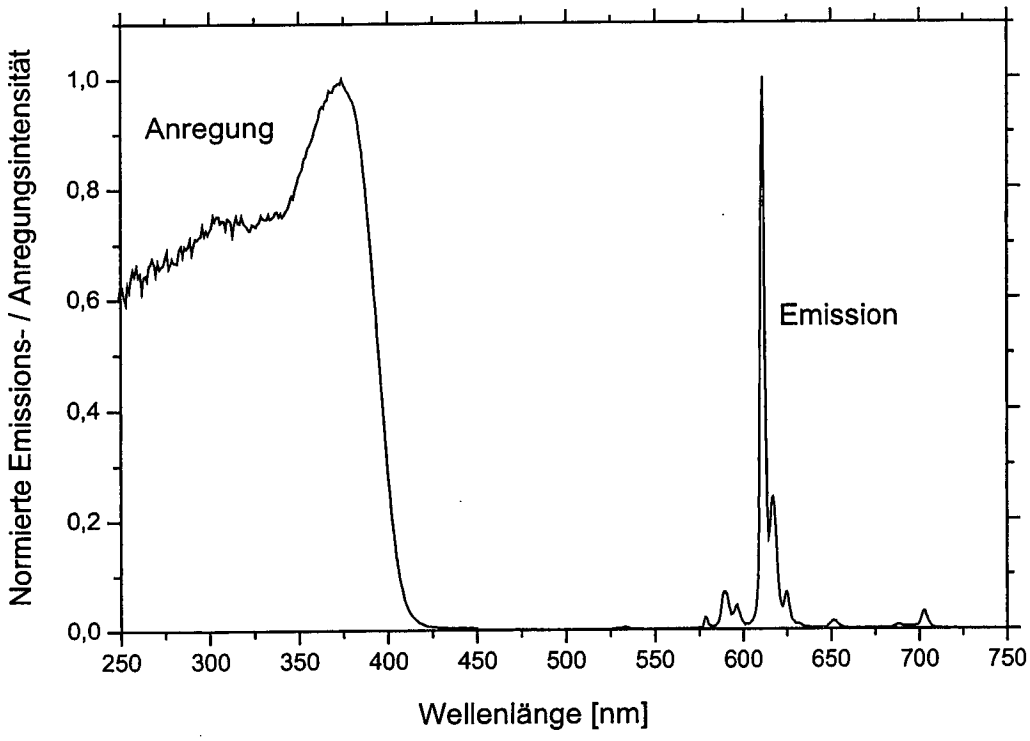


FIG. 3

FIG. 4

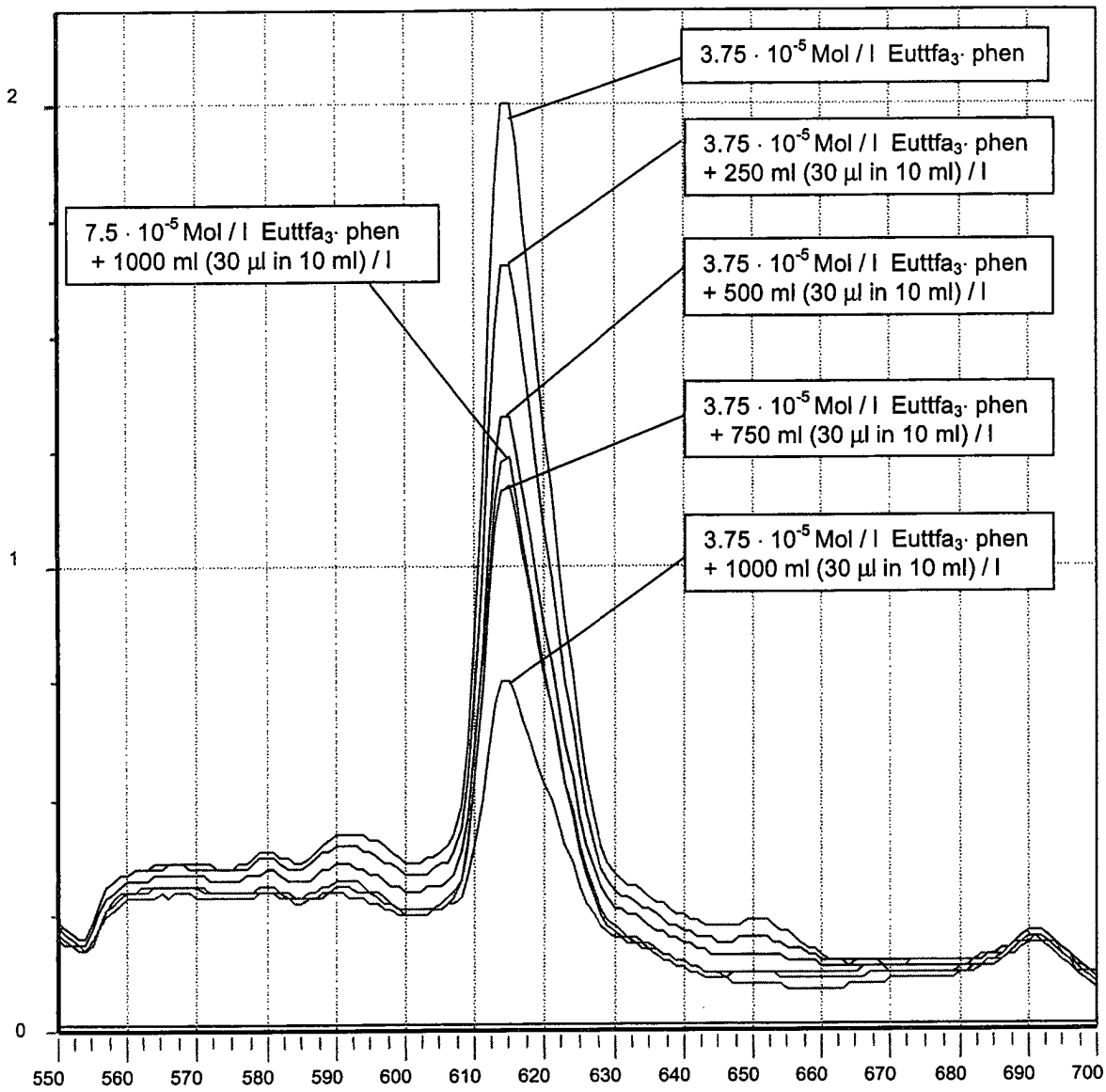
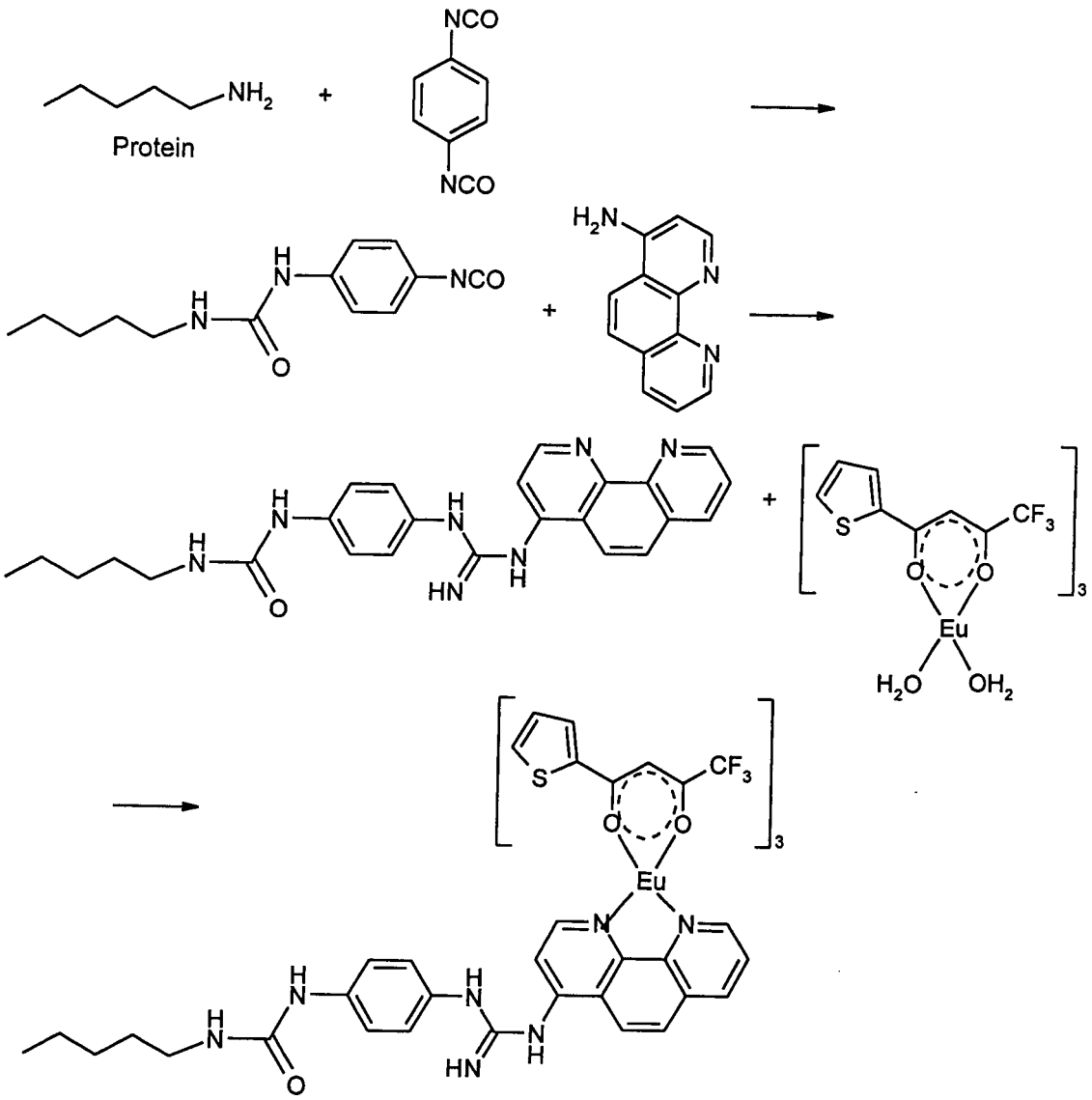

3.75 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen
3.75 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen + 250 ml (30 µl in 10 ml) / l
3.75 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen + 500 ml (30 µl in 10 ml) / l
3.75 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen + 750 ml (30 µl in 10 ml) / l
3.75 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen + 1000 ml (30 µl in 10 ml) / l
7.5 · 10-5 Mol / l Euttfa3· phen + 1000 ml (30 µl in 10 ml) / l
2
1
0
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700

FIG. 5



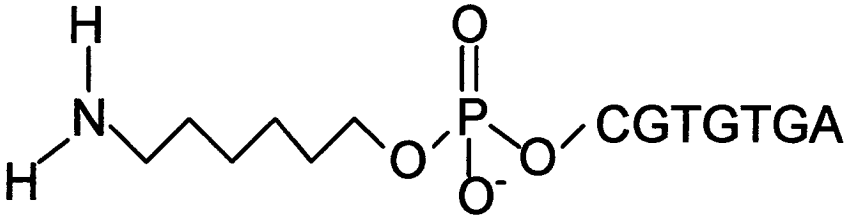


FIG. 6

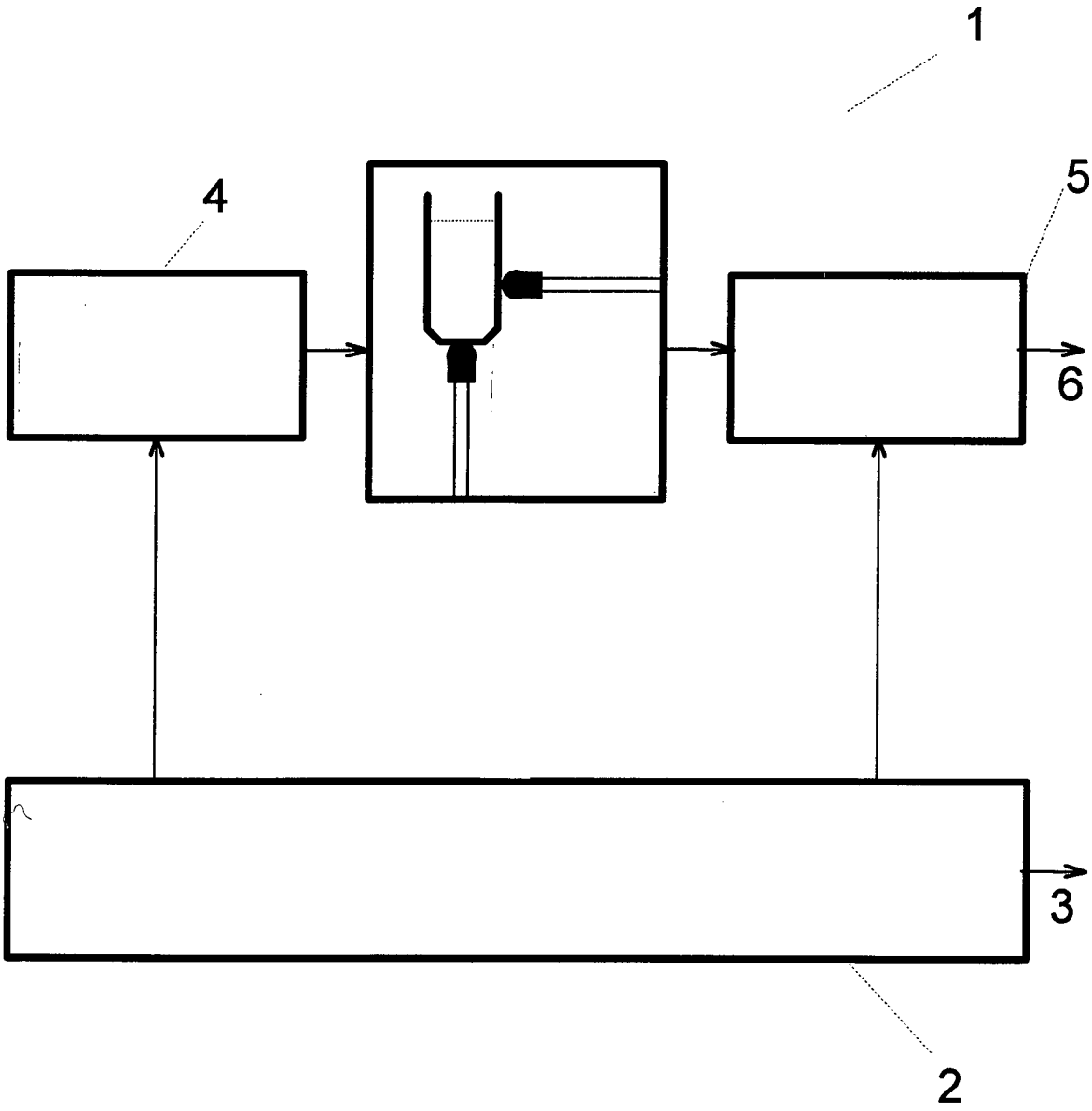


FIG. 7

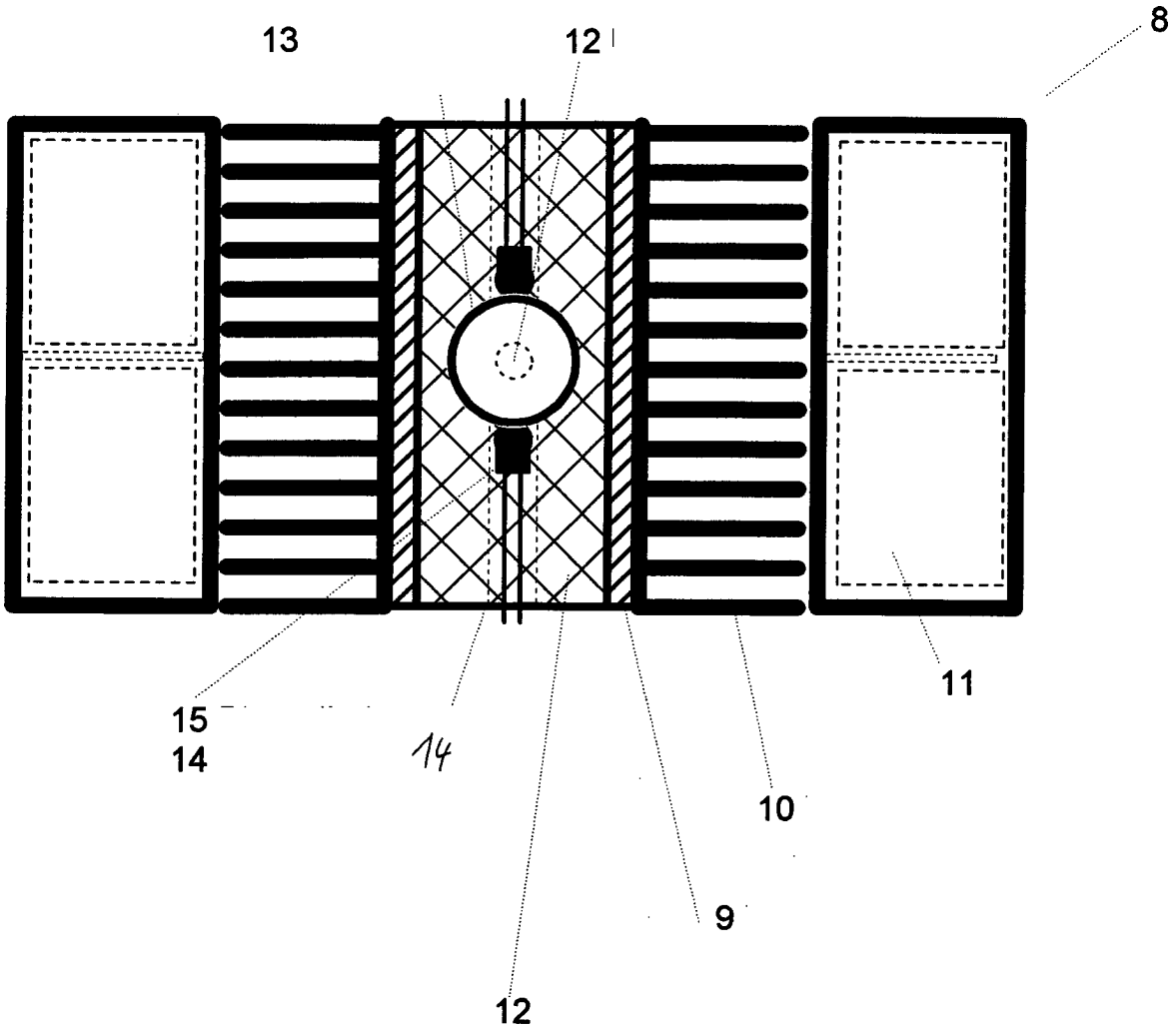


FIG. 8