

(19)



Republik
Österreich
Patentamt

(10) Nummer:

AT 006 635 U1

(12)

GEBRAUCHSMUSTERSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: GM 757/02

(51) Int.Cl.⁷ : C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 11.11.2002

(42) Beginn der Schutzdauer: 15.12.2003

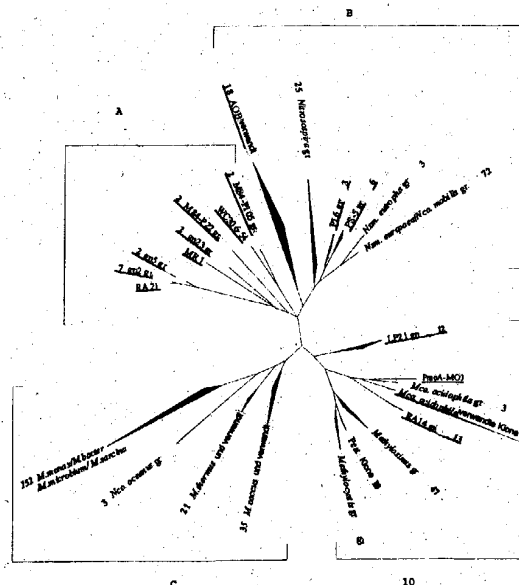
(45) Ausgabetag: 26. 1.2004

(73) Gebrauchsmusterinhaber:

ARC SEIBERSDORF RESEARCH GMBH
A-1010 WIEN (AT).

(54) OLIGONUKLEOTID-SET

(57) Es wird ein Set von Oligonukleotidmolekülen, die für Methanotrophe, aerobe, Ammoniak oxidierende Bakterien und funktionell verwandte Bakterien spezifisch sind, zur Verfügung gestellt, wobei es mindestens 5, vorzugsweise mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 50 Oligonukleotidmoleküle umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotidmolekülen, die die Sequenzen SEQ ID No 1 bis SEQ ID No 59 umfassen.



AT 006 635 U1

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Set von Oligonukleotidmolekülen, die für Methanotrophe, aerobe, Ammoniak oxidierende Bakterien und funktionell verwandte Bakterien spezifisch sind, sowie auf einen festen Träger, ein Verfahren zur Herstellung eines festen Trägers, ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Methanotrophen, aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien und funktionell verwandten Bakterien, in einer Probe.

DNA-Mikroarrays sind ein wirksames Mittel zum parallelen Nachweis mit großem Durchsatz sowie zur Quantifizierung vieler Gene. Ursprünglich wurden DNA-Mikroarrays zur Genexpressionsanalyse ganzer Genome entwickelt, sie haben jedoch auf vielen Gebieten der Mikrobiologie ein sehr großes Anwendungspotential. Wenn entsprechende SONDENSSETS zur Verfügung stehen, ermöglichen sie den Nachweis von bis zu mehreren tausend Mikrobenstämmen, Spezies oder Speziesgruppen (je nach dem Aufbau der Sonde) in einem einzigen Assay. In der klinischen, Veterinär- und Pflanzen-Mikrobiologie, bei der Lebensmittel- und Wasserqualitätskontrolle bedeutet dies, dass ein einziger Test entwickelt werden kann, um alle pathogenen / nützlichen / kontaminierenden Bakterien nachzuweisen, die in der untersuchten Probe vorhanden sein könnten. Die Möglichkeiten in der Umwelt-Mikrobiologie sind sogar noch größer. Durch die Anwendung einer Serie von Sets von Oligonukleotidsonden, die auf Gene abzielen, die die Phylogenie des Trägerorganismus widerspiegeln, wird es möglich, die gesamte prokaryontische Diversität einer Umwelt zu bestimmen. Das offensichtlichste Ziel für solche Studien sind das 16S rRNA-Gen und, für die stammspezifische Identifizierung, die intergene Spacer-(IGS-) Region zwischen den Genen 16S rRNA und 23S rRNA. Andere - oft als „funktionell“ bezeichnete, d.h. verwandte, eine bestimmte Funktion erfüllende Enzyme kodierende - mögliche Targetgene können auch zumindest für eine physiologisch eingeschränkte Gruppe von Mikroorganismen verwendet werden. Die Anwendung funktioneller Gene schränkt die Analyse auf eine funktionell (manchmal auch phylogenetisch) definierte Gruppe von Mikroben ein. Der größte Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass er auch den Nachweis und die Analyse nicht kultivierter Mitglieder der untersuchten Mikrobengruppen ermöglicht.

Sets von Oligonukleotidsonden, die auf Nylon oder Nitrozellulosemembranen gespottet sind („Makroarrays“), sind für die Diagnose von Bakteriämie, Lebensmittelkontamination, den Nachweis von Enterokokken oder Cyanobakterien verwendet worden. Ein spezielles Mikroarrayformat, das aus einzelnen Mikropads aus Polyacrylamidgel mit immobilisierten Oligonukleotiden besteht, wurde für die Charakterisierung von aromatischen, Kohlenwasserstoffabbauenden Konsortien und die Bestimmung von Rifampicin-resistenten Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis* verwendet. Für die Diagnose von Staphylokokken wurde ein „traditioneller“ Glas-Mikroarray, bestehend aus 7 Sonden, entwickelt. Es wurde eine Gesamtgenom-DNA-DNA-Hybridisierung für den Nachweis und die Gemeinschaftsanalyse von Mikroorganismen verwendet. Es wurde ein hochdichter Affymetrix GeneChip verwendet, der über 30 000 auf 16S rRNA abzielende Oligosonden enthält, um Spezies einer Kultursammlung zu identifizieren und in der Folge Populationen von über die Luft übertragenen Bakterien auf dem Niveau höherer phylogenetischer Taxa zu charakterisieren.

Strukturen von Mikrobengemeinschaften können mit Hilfe der quantitativen Analyse von Ergebnissen der Mikro- oder Makroarrays ermessen werden. Vor Kurzem ist ein einfaches und elegantes Verfahren zur Quantifizierung spezifischer Mikrobengene aus einer Probe beschrieben worden. Bei diesem Verfahren wurden Genfragmente (500 – 900 bp lang) als Sonden verwendet. Jeder Spot bestand aus einer Mischung einer einzelnen Sonde und einem gemeinsamen Referenzgenfragment. Die Hybridisierung erfolgte mit einer mit Cy3 markierten Umgebungsmischung und einer mit Cy5 markierten Referenz-DNA. Die Quantifizierung basierte auf den Verhältnissen von Cy3/Cy5. Unglücklicherweise kann das gleiche Prinzip auf Grund der inhärenten Unterschiede bei der Effizienz der Hybridisierung zwischen den Oligonukleotidsonden nicht auf die Quantifizierung von Ergebnissen von Oligonukleotidchips angewendet werden. In der Praxis sollte für jede Sonde ein anderes Referenz-Oligo erstellt werden.

Obwohl die Erwartungen für diagnostische mikrobielle Mikroarrays hoch sind, wartet man noch immer auf Anwendungen, die ihr gesamtes Potential ausnützen (Nachweis großer Zahlen von Mikroben mit hohem Durchsatz und quantitative Beurteilung ihrer Ge-

meinschaftsstrukturen). Teilweise liegt der Grund dafür darin, dass es noch immer an einer technischen Plattform von vernünftigen Kosten, basierend auf leicht verfügbaren Hilfsstoffen und Ausrüstung, mit einem deutlichen Potential in der quantitativen mikrobiellen Diagnostik mit hohem Durchsatz mangelt.

Bei Methanotrophen handelt es sich um Bakterien, die in der Lage sind, Methan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Sie sind überall in der Natur vorhanden und stellen das größte biogene Becken für das Treibhausgas Methan dar, wodurch sie in hohem Ausmaß zur Abschwächung des Treibhauseffektes beitragen. Sie oxidieren Methan über Methanol und Formaldehyd zu Kohlendioxid oder inkorporieren Kohlenstoff von Methan in Zellbiomasse auf dem Oxidationsniveau von Formaldehyd. Der erste Schritt auf dem Weg wird von einem der beiden Typen des Enzyms Methanmonooxygenase (MMO) katalysiert. Die lösliche MMO ist in nur einigen dieser Bakterien zu finden, während die partikuläre MMO (pMMO) in allen bekannten Methanotrophen vorkommt. Es hat sich gezeigt, dass die Sequenz des pmoA-Gens, das die 27 kDa Untereinheit von pMMO kodiert, evolutionäre Verwandtschaften zwischen den tragenden Organismen widerspiegelt. Die Ammoniakmonooxygenase (AMO) von autotrophen, Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) ist evolutionär mit pMMO und amoA verwandt, und das Gen, das für die korrespondierende Untereinheit der AMO kodiert, weist ein hohes Maß an Identität mit pmoA-Genen auf. Es gibt pmoA/amoA-verwandte Gene, die von Umweltproben geklont wurden, wo die Natur des kodierten Enzyms nicht klar ist. Es gibt eine rasch wachsende Datenbank (mit über 700 Einträgen) von pmoA, amoA und verwandten Gensequenzen von kultivierten Stämmen und „Umgebungs“-Klons, die mittels PCR direkt aus der Umgebung erhalten wurden. Methanotrophe spielen eine wesentliche Rolle bei der Milderung des Treibhauseffektes, indem sie den Großteil des biogen produzierten Methans metabolisieren. Daher ist das Verständnis der Faktoren, die ihre Diversität beeinflussen, von größter Bedeutung. Es sind DGGE und Klonbibliotheksanalyse verwendet worden, um saisonale Veränderungen in der Diversität der Methanotrophen oder durch Umwelteinflüsse hervorgerufene Veränderungen, wie Entwässerung oder Durchlüftung, zu beobachten.

Auf Grund der Wichtigkeit dieser Bakterien wäre es wichtig, in der Lage zu sein, die Bakteriengruppen von Methanotrophen, aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien und funktionell verwandten Bakterien in Proben nachzuweisen sowie ihre Entwicklung in vitro und in vivo zu verfolgen und zu analysieren. Auf Grund ihrer Diversität war es jedoch bisher nicht möglich, ein einfaches Verfahren zur Verfügung zu stellen, das es in einem einfachen und raschen Verfahren möglich macht, die unterschiedlichen Spezies und Subspezies dieser Bakteriengruppe in einer Probe nachzuweisen und schließlich auch zu quantifizieren.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung liegt daher darin, ein Verfahren zur Analyse dieser Bakteriengruppe in vitro und/oder in vivo zur Verfügung zu stellen und das Verfolgen ihrer Entwicklung zu ermöglichen. Ein weiteres Ziel ist die Validierung eines diagnostischen Werkzeugs zum Nachweis dieser Bakterien mit hohem Durchsatz sowie zur Analyse von deren Gemeinschaftsstruktur.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, dass ein Set von Oligonukleotidmolekülen wie oben definiert zur Verfügung gestellt wird, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es mindestens 5, vorzugsweise mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 50 Oligonukleotidmoleküle umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotidmolekülen, die die Sequenzen SEQ ID No 1 bis SEQ ID No 59 umfassen. Überraschender Weise wurde gefunden, dass es möglich ist, ein Set von Oligonukleotidmolekülen zur Verfügung zu stellen, die für diese umfassende Bakterienfamilie spezifisch sind, die jedoch auch alle gleichzeitig im selben Hybridisierungsschritt unter den selben Hybridisierungsbedingungen verwendet werden können, und dass die Oligonukleotidmoleküle für die verschiedenen Bakterien gleichermaßen spezifisch sind. Daher wird also zum ersten Mal ein Werkzeug zur Verfügung gestellt, mit welchem bei einer Analyse in einem einzigen Schritt der Nachweis mit hohem Durchsatz und die Analyse der Gemeinschaftsstruktur von methanotrophen, aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien und funktionell verwandten Bakterien möglich ist. Das erfindungsgemäße Set von Oligonukleotidmolekülen ist entsprechend den spezifischen Kriterien ausgewählt worden, und Tests mit diesem Set haben sich als äußerst effizient erwiesen.

Der Ausdruck „Oligonukleotidmoleküle“ im Bereich der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf jegliche Art von Oligonukleotidmolekülen, vorzugsweise DNA- oder RNA-Moleküle, die eine Länge umfassen, die wirksam ist, um für bestimmte Bakterien spezifisch zu sein. Diese Länge sollte jedoch nicht über ein Maximum hinausgehen, damit die Moleküle ohne sterische Hinderung in der Analyse mit hohem Durchsatz verwendet werden können.

Der Ausdruck „Methanotrophe“ im Bereich der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf Bakterien, die Methan über Methanol und Formaldehyd zu Kohlendioxid oxidieren, oder die Kohlenstoff aus Methan in der Oxidationsstufe von Formaldehyd wie oben erwähnt in Zellbiomasse inkorporieren.

Der Ausdruck „Ammoniak oxidierende Bakterien“ bezieht sich auf Bakterien, die Ammoniak oxidieren und die mit den oben genannten Methanotrophen verwandt sind.

Der Ausdruck „funktionell verwandte Bakterien“ bezieht sich auf Bakterien, die mit Methanotrophen und aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien hinsichtlich der Methanmonooxygenase- und Ammoniakmonooxygenase-Gene (pmoA/amoA-Gene) verwandt sind.

Es ist klar, dass in der Gruppe der Oligonukleotidmoleküle ein Oligonukleotidmolekül eine der Sequenzen SEQ ID No 1 bis No 59 umfasst.

Vorzugsweise umfassen die Oligonukleotidmoleküle Spacer-Moleküle, die vorzugsweise an ihrem 5'-Ende hängen. Wenn sie an einen festen Träger gebunden sind, verhindern diese Spacer-Moleküle die negativen sterischen Auswirkungen und Störungen der Hybridisierungseigenschaften der immobilisierten Oligonukleotidmoleküle, die sich aus der Anhäufung dieser immobilisierten Moleküle ergeben. Durch die Spacer-Moleküle wird die Zugänglichkeit der immobilisierten Oligonukleotidmoleküle gewährleistet.

Noch mehr bevorzugt umfassen diese Spacer-Moleküle einen C-Linker, vorzugsweise einen C5-C20-Linker, besonders bevorzugt ist dies ein C12-Linker. Es hat sich erwiesen, dass dieser C-Linker ein wirksames und funktionelles Spacer-Molekül ergibt, ohne den Hybridisierungsschritt zu beeinflussen.

Vorteilhafter Weise umfassen diese Spacer-Moleküle weiters Thymidinreste, vorzugsweise 2 bis 10 Thymidinreste. Es sind zum Beispiel 5 zusätzliche Thymidinreste am 5'-Ende an das Oligonuk-

leotidmolekül oder an den C-Linker angehängt. Diese Thymidinreste gewährleisten zusätzlich optimale Abstände.

Für einen schnellen und einfachen Nachweis ist bevorzugt, dass diese Oligonukleotidmoleküle markiert sind. Der Fachmann wird in der Lage sein, die optimale Markierung auszuwählen, wobei vorzugsweise derartige Markierungen verwendet werden, die ein Signal geben oder ein Signal verändern, wenn es zur Hybridisierung mit dem Target kommt. Diese Markierungen können zum Beispiel enzymatische oder chemische Markierungen sein.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein fester Träger zur Verfügung gestellt, der, immobilisiert an seiner Oberfläche, das Set von Oligonukleotidmolekülen gemäß der vorliegenden Erfindung wie oben definiert umfasst. Dieser feste Träger kann beim Nachweis mit hohem Durchsatz sowie bei Quantifizierungsassays leicht und wirksam eingesetzt werden. Im Stand der Technik ist eine große Vielzahl von verschiedenen festen Trägern beschrieben, und der Fachmann wird in der Lage sein, je nach der Menge der zu immobilisierenden Oligonukleotidmoleküle, der Menge der nachzuweisenden Proben, den Möglichkeiten in seinem Labor und anderen Kriterien die optimalsten auszuwählen. Es ist möglich, einen festen Träger zur Verfügung zu stellen, der mindestens 5 Oligonukleotidmoleküle des erfindungsgemäßen Sets immobilisiert hat, noch mehr bevorzugt sind jedoch mindestens 20 und am meisten bevorzugt mindestens 50 Oligonukleotidmoleküle des erfindungsgemäßen Sets am festen Träger immobilisiert, um ein Werkzeug für die Analyse mit hohem Durchsatz zu ergeben.

Vorzugsweise ist der feste Träger ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Objektträger, einer Membran, einer Säule, Kugeln und einer Platte. Dies sind herkömmliche feste Träger für den Nachweis und die Quantifizierung spezifischer Targets in einer Probe und sind im Stand der Technik wie oben erwähnt gut beschrieben.

Noch mehr bevorzugt ist der feste Träger ein Mikroarray. Ein Mikroarray umfasst eine große Anzahl von immobilisierten Oligonukleotidmolekülen, die in hoher Dichte auf dem festen Träger zur Verfügung stehen. Ein Mikroarray ist ein äußerst wirksames Werkzeug zum Nachweis von Hunderten bis Millionen von Targetmolekülen in einem einzigen Nachweisschritt. Solche Mikroarrays

liegen oft als Objektträger oder Platten, insbesondere Mikroti-
terplatten vor. Die Oligonukleotidmoleküle sind mit Hilfe einer
Druckvorrichtung auf dem Mikroarray immobilisiert, die eine
Immobilisierung in hoher Dichte auf dem festen Träger sicher-
stellt. Dieser Mikroarray ist insbesondere dann nützlich, wenn
eine große Anzahl von Proben analysiert wird.

Vorteilhafter Weise sind die Oligonukleotidmoleküle in Spots
an der Oberfläche immobilisiert. Mit Hilfe der Spots werden spe-
zifisch definierte Regionen geschaffen, die die immobilisierten
Oligonukleotidmoleküle umfassen. Wenn ein Spot für bestimmte
Bakterien spezifisch ist, ist es möglich, die in der analysier-
ten Probe vorhandenen Bakterien genau zu definieren. Weiters ist
es möglich, in den Spots ein Referenz-Oligonukleotidmolekül zur
Verfügung zu stellen, das nicht nur eine positive Kontrolle dar-
stellt, sondern auch als Referenz für die Quantifizierung ver-
wendet werden kann.

Vorzugsweise sind in einem Spot identische Oligonukleotid-
moleküle immobilisiert. Ein positives Hybridisierungssignal ei-
ner bestimmten Probe ermöglicht spezifische Aussagen in Bezug
darauf, welche Bakterien in der getesteten Probe genau vorhanden
sind, da jeder Spot für bestimmte Bakterien spezifisch ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich
auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen festen
Trägers wie oben definiert, wobei ein erfindungsgemäßes Set von
Oligonukleotidmolekülen wie oben definiert vorzugsweise in Spots
auf der Oberfläche dieses festen Trägers immobilisiert wird. Für
diesen Aspekt gelten die gleichen Definitionen und bevorzugten
Ausführungsformen, wie sie oben für die anderen Aspekte der vor-
liegenden Erfindung genannt sind. Mit diesem Verfahren wird ein
fester Träger zur Verfügung gestellt, der für die Analyse jegli-
cher gegebenen Probe mit hohem Durchsatz verwendet werden kann.

Vorzugsweise wird dieses Set mit einer Einzelnadel auf die
Oberfläche gespottet. Durch das Spotten mit einer Einzelnadel
wird die Variation vermieden, die dem Spotten mit mehreren Na-
deln innewohnt. Daher wird jeder Spot mit einer genau definier-
ten Menge und Konzentration von Oligonukleotidmolekülen ausge-
stattet.

Noch mehr bevorzugt erfolgt das Spotten mit einem Druckpuffer, vorzugsweise mit DMSO in H_2O . Der Druckpuffer wird verwendet, damit der feste Träger während langer Spotten-Vorgänge nicht austrocknet. Es wird DMSO in H_2O , vorzugsweise etwa 50% DMSO in H_2O , verwendet, da dieser Druckpuffer im Vergleich zu wässrigen Lösungen, wie 3 x SSC oder Phosphatpuffern, optimal zum Feuchthalten des festen Trägers war.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Methanotrophen, aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien und funktionell verwandten Bakterien, in einer Probe, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- Zugabe der Probe zu dem erfindungsgemäßen festen Träger wie oben definiert,
- Durchführung eines Hybridisierungsschrittes zum Hybridisieren von Nukleinsäuremolekülen aus den Bakterien mit den immobilisierten Oligonukleotidmolekülen, vorzugsweise gefolgt von mindestens einem Waschdurchgang,
- Nachweis von Hybridisierungsprodukten, wobei ein Hybridisierungsprodukt das Vorhandensein irgendeines der genannten Bakterien in dieser Probe anzeigt.

Wieder gelten hier die selben Definitionen und bevorzugten Ausführungsformen, wie sie oben angeführt sind.

Der Waschdurchgang wird durchgeführt, um jegliche nicht immobilisierten Oligonukleotidmoleküle sowie jegliche weiteren Substanzen wegzuwaschen, die während des Hybridisierungsschritts verwendet wurden und die den Nachweis von Hybridisierungsprodukten beeinflussen könnten.

Der Nachweis von Hybridisierungsprodukten erfolgt gemäß irgendeinem bekannten Verfahren, z.B. umfassen die immobilisierten Oligonukleotidmoleküle entweder eine Markierung, die ein Signal abgibt, wenn es zur Hybridisierung kommt, oder die Nukleinsäuremoleküle von bestimmten Bakterien sind markiert, wobei diese Markierung dann nach dem Waschdurchgang nachgewiesen wird. Natürlich kann jegliche erforderliche Vorbehandlung der Probe vor der Zugabe dieser Probe zum festen Träger durchgeführt werden, insbesondere die Behandlung zum Aufbrechen von Bakterienwänden und zur Freisetzung der Nukleinsäuremoleküle der Bakterien und

der Amplifizierung der Nukleinsäuremoleküle, zum Beispiel mit PCR.

Der Hybridisierungsschritt erfolgt unter strengen Hybridisierungsbedingungen, die eine ausreichend spezifische Hybridisierung gestatten, z.B. wird die Anzahl falscher positiver Ergebnisse minimiert. Der Fachmann ist in der Lage, die optimalen Hybridisierungsbedingungen zu wählen, indem er aus einer Reihe von Hybridisierungspuffern, Temperaturen und Waschbedingungen auswählt. Dabei ist die Schmelztemperatur T_m zur Auswahl optimaler Hybridisierungsbedingungen nützlich. Diese T_m kann mit Hilfe bekannter Formeln berechnet werden, wie z.B. in Sambrook et al., 1989 angegeben.

Vorzugsweise hybridisieren die Nukleinsäuremoleküle von bestimmten Bakterien mit Oligonukleotidmolekülen, die in einem bestimmten Bereich, vorzugsweise einem bestimmten Spot, auf dieser Oberfläche immobilisiert sind. Dies findet statt, wenn identische Oligonukleotidmoleküle, die für ein Bakterium spezifisch sind, in einem bestimmten Bereich immobilisiert werden, vorzugsweise in einem bestimmten Spot. Ein nachgewiesenes Hybridisierungsprodukt in irgend einem gegebenen Bereich oder Spot ermöglicht daher Aussagen in Bezug auf das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein spezifischer Bakterien in dieser Probe.

Vorteilhafter Weise wird die Probe durch Isolieren und Reinigen der Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien vorbehandelt. Dies kann gemäß jeglichem bekannten Protokoll erfolgen, wobei die Nukleinsäuremoleküle intakt bleiben müssen, z.B. keinen Mutationen oder Rekombinationen unterworfen werden.

Noch mehr bevorzugt werden die Nukleinsäuremoleküle von den Bakterien fragmentiert, vorzugsweise auf eine Größe von 30 bis 70, vorzugsweise 45 bis 55 Nukleotiden. Eine solche Fragmentierung führt zu einer signifikanten Erhöhung der Hybridisierung. Weiters vermindert die Fragmentierung in vielen Fällen die Unterschiede zwischen den Hybridisierungskapazitäten der Sonden. Eine durchschnittliche Fragmentgröße von 50 Nukleotiden ist optimal.

Gemäß einem vorteilhaften Verfahren wird die Probe derart vorbehandelt, dass diese Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien RNA-Moleküle sind. RNA-Moleküle haben den Vorteil, dass sie

durch chemische Fragmentierung auf beliebige Weise fragmentiert werden können. Weiters ermöglichen RNA-Moleküle die direkte Inkorporierung von Markierungsnukleotiden zum Beispiel durch T7 RNA-Polymerase, die sehr effizient ist. RNA-Moleküle können zum Beispiel hergestellt werden, indem z.B. ein Transkriptionsschritt durchgeführt wird, zum Beispiel nach einer PCR-Reaktion, z.B. nach der Amplifizierung von DNA-Molekülen.

Vorteilhafter Weise werden die Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien markiert, vorzugsweise mit Cy3 bzw. Cy5. Dies wird vorzugsweise durch direktes Inkorporieren der Markierung während der Polymerasereaktion erreicht, zum Beispiel mit der T7 RNA-Polymerase, was sehr effizient durchgeführt wird. Obwohl Cy-Färbungen gegenüber nukleophilen Attacken empfindlich sind, ermöglichen diese Färbungen einen signifikanten Anstieg der Signale. Weiters sind Cy3- und Cy5-Färbungen wohl bekannt und sind in der Literatur extensiv charakterisiert worden. Daher umfasst ein bevorzugtes Verfahren die Schritte der DNA-Isolierung von der Sonde, PCR, in vitro-Transkription einschließlich eines Markierungsschrittes und Fragmentierung der RNA.

Vorzugsweise erfolgt der Schritt der Hybridisierung unter Bedingungen, die eine Perfect-Match- und Single-Mismatch-Hybridisierung zulassen. Die Single-Mismatch-Hybridisierung reicht aus, um einen spezifischen Nachweis eines der in Frage kommenden Bakterien zu erbringen. Solche Hybridisierungsbedingungen können zum Beispiel erreicht werden, indem eine Hybridisierungsmischung mit 124 µl DEPC-behandeltem Wasser, 2 µl 10% SDS, 4 µl 50 x Denhardt's Reagents (Sigma), 60 µl 20 x SSC und 10 µl Target-Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung gestellt und bei etwa 55°C mehrere Stunden lang hybridisiert wird. Diese Hybridisierungsbedingungen stellen ein optimales und äußerst effizientes Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung jeglicher der oben definierten Bakterien dar.

Noch mehr bevorzugt wird der Hybridisierungsschritt über Nacht durchgeführt, vorzugsweise unter Verwendung eines Schüttelapparates. Die Hybridisierung über Nacht stellt eine vollständige Hybridisierung sicher, der Schüttelapparat ermöglicht eine optimale Verteilung der Probe auf dem festen Träger, und falls sich bei der Hybridisierung Blasen bilden sollten, werden

diese durch die Bewegung des Schüttelapparates an den Rand des festen Trägers gedrängt. Mit einem Schüttelapparat findet ausreichend zusätzliche Vermischung statt, um eine angemessen gleichmäßige Hybridisierung über den gesamten festen Träger zu ermöglichen. Dadurch wird eine effiziente Hybridisierung erreicht.

Vorteilhafter Weise wird der Hybridisierungsschritt in einer geklebten („sticky“) Hybridisierungskammer durchgeführt. Dies ist ein selbstklebender Plastikfilm, der, wenn er auf einen Glasarray geklebt wird, eine geschlossene Hybridisierungs-„Kammer“ bildet, zum Beispiel mit einem Volumen von etwa 200 µl. Eine solche Hybridisierungskammer ist auf

http://www.arraying.com/products/hybriwell_seal_sys.htm

beschrieben, die durch Bezugnahme hier aufgenommen ist. Eine solche Hybridisierungskammer ermöglicht signifikant höhere Volumina als jene, die zwischen einem Mikroarray und einem traditionellen Abdeckstreifen vorhanden sind.

Die vorliegende Erfindung wird nun an Hand der folgenden Beispiele und Zeichnungen noch detaillierter beschrieben, wobei Fig. 1 ein phylogenetischer Baum ist, der aus pmoA-Sequenzen mit voller Länge und mit fast voller Länge konstruiert ist; Fig. 2a ein schematisches Diagramm des Aufbaus des Mikroarrays ist; Fig. 2b ein detailliertes Design eines einzelnen Arrays ist; Fig. 2c repräsentative Hybridisierungen zeigt; Fig. 3 ein Bereich der Strangabdeckung für Oligonukleotidsonden ist; und Fig. 4 die Quantifizierung künstlicher Mischungen von pmoA-Sequenzen unter Zuhilfenahme des diagnostischen Mikroarrays zeigt.

Beispiele

Beispiel 1: Aufbau der Oligonukleotidsonde

Unter Verwendung des phylogenetischen Software-Package ARB wurden Datenbank und phylogenetische Bäume konstruiert sowie Oligonukleotidsonden zusammengestellt. Es wurde eine umfassende Datenbank erstellt, die alle publizierten pmoA/amoA und verwandte Sequenzen sowie zahlreiche nicht veröffentlichte enthielt. Mit Hilfe der „Old Aligner“-Funktion in ARB_EDIT wurden Ausrichtungen vorgenommen. Es wurden nur so viel DNA und Eiweißbäume konstruiert und verwendet, wie notwendig waren, um den Prozess

des Sondenaufbaus zu leiten. Sonden wurden unter Verwendung der Funktionen „Probe Design“ und „Probe Match“ zusammengestellt, wobei auf eine PT-Server Datenbank Zugriff genommen wurde, die von der obigen ARB-Datenbank erstellt worden war. Ergebnisse der „Probe Match“-Funktion wurden in Excel importiert, und es wurde eine Drehtabelle konstruiert, die die Anzahl der Mismatches zwischen jedem Sonde-Target-Paar angab. Diese Tabelle wurde durch Anwendung eines Sets empirischer Regeln verbessert, wie sie unten in Beispiel 7 beschrieben sind. Die Schmelztemperaturen der Sonden wurden mit Hilfe des Verfahrens des nächsten Nachbarn vorhergesagt, wobei die folgende öffentliche Website verwendet wurde: <http://www.idtdna.com/program/oligocalc/oligocalc.asp>.

Beispiel 2: Herstellung des Mikroarrays

Oligonukleotide für die Immobilisierung wurden mit einer 5' NH₂-Gruppe für diesen Zweck synthetisiert (VBC Genomics, Vienna, Austria), gefolgt von einem C12 Spacer und 5 Thymidinresten vor der Sondensequenz. Es wurde eine Platte mit flachem Boden und 384 Näpfchen mit 30 µl von 50 µM Oligonukleotidlösungen in 50% DMSO vorbereitet. Proben wurden mit einem OmniGrid Spotter (1 TeleChem SMP3 Pin) mit 50% relativer Feuchtigkeit (unter Verwendung des Feuchtigkeitsregulators des Spotters) bei 22°C auf silylierte Objektträger (mit Aldehydchemie, Cel Associates, Houston) aufgespottet. Arrays wurden immer dreifach gespottet, um eine statistische Korrektur von Fehlern zu ermöglichen. Bespottete Objektträger wurden über Nacht bei Zimmertemperatur bei <30% relativer Feuchtigkeit inkubiert und zwei Mal in 0,2% (Gewicht/Volumen) SDS 2 min lang bei Zimmertemperatur unter heftiger Bewegung gespült, um die nicht gebundene DNA zu entfernen. Die Objektträger wurden dann 2 Mal 2 min lang bei Zimmertemperatur unter heftiger Bewegung in destilliertem Wasser (dH₂O) gespült, 2 min lang in auf 95-100°C vorgeheiztes dH₂O gebracht und bei Zimmertemperatur abkühlen gelassen (ca. 5 min). Die Objektträger wurden 5 min lang bei Zimmertemperatur in einer frisch (direkt vor der Verwendung) hergestellten Natriumborhydridlösung behandelt, um freie Aldehyde zu reduzieren. Herstellung der Natriumborhydridlösung: 0,5 g NaBH₄ wurde in 150 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄,

0,24 g KH_2PO_4 , in 1000 ml H_2O , pH 7,4, autoklaviert) gelöst, dann wurden 44 ml 100% Ethanol zugesetzt, um die Blasenbildung zu reduzieren. Die Objektträger wurden drei Mal in 0,2% (Gewicht/Volumen) SDS und ein Mal in dH_2O jeweils 1 min lang bei Zimmertemperatur gespült. Schließlich wurden die Objektträger einzeln mit einer Luftkanone getrocknet, die innen mit einem Wattefilter ausgestattet war (um Ölmikrotröpfchen von der Oberfläche des Objektträgers fern zu halten). Die getrockneten Objektträger wurden vor der Verwendung bei Zimmertemperatur dunkel gelagert.

Beispiel 3: Herstellung des Targets

pmoA/*amoA*-Gene wurden mit Hilfe des Forward-Primers *pmoA*189 (GGBGACTGGGACTTCTGG) (SEQ ID No 60) und einem der beiden Revers-Primer T7-mb661 (TAATACGACTCACTATAGCCGGMGCAACGTCYTTACC) (SEQ ID No 61) oder T7-A682 (TAATACGACTCACTATAGGAASGCNGAGAAGAASGC) (SEQ ID No 62) amplifiziert, wobei B = (CGT), M = (AC), Y = (CT), S = (CG) und N = (ACGT) ist. Die Primer T7-mb661 und T7-A682 waren spezifisch für Methanotrophe bzw. Formethanotrophe / AOBs / homologe Gene von Umweltbibliotheken. Die Revers-Primer enthielten die T7 Promotorstelle (TAATACGACTCACTATAG) (SEQ ID No 63) an ihrem 5'-Ende, was eine von T7 RNA-Polymerase medierte in vitro-Transkription unter Verwendung der PCR-Produkte als Template ermöglichte. Für jedes Target wurden 3 PCR-Reaktionen mit jeweils 50 µl Volumen, bestehend aus 1 x PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl_2 , 50 nM für jeweils 4 dNTPs, 15 pMol beider Primer, 1 ng genomischer DNA oder 0,1 ng geklontem PCR-Produkt als Templat sowie 1 U Taq-Polymerase (Gibco BRL) in einem Hybaid Combi Thermal Reactor TR2 durchgeführt, wobei Taq DNA-Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Amplifizierungsbedingungen waren: 95°C für 5 min vor der Zugabe des Templats, dann 32 Zyklen von: 1 min bei 95°C, 1 min bei Annealing-Temperatur, 1 min bei 72°C; gefolgt von einem letzten Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C. Parallele PCR-Produkte wurden zusammengefasst und unter Verwendung des HighPure PCR Reinigungskits (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in ultrareinem Wasser gelöst, die DNA-Konzentration wurde auf 50 ng/µl eingestellt, und sie wurde bei -20°C gelagert.

Unter RNase-freien Bedingungen wurde eine in vitro-Transkription wie folgt durchgeführt. 8 µl gereinigtes PCR-Produkt (50 ng/µl), 4 µl 5 x T7 RNA Polymerasepuffer, 2 µl DTT (100 mM), 0,5 µl RNA-sin (40 U/µl) (Promega), je 1 µl ATP, CTP, GTP (10 mM), 0,5 µl UTP (10 mM), 1 µl T7 RNA Polymerase (40 U/µl) (Gibco BRL) und 1 µl Cy3 oder Cy5-UTP (5 mM) wurden in eine 1,5 ml Mikrozentrifugenröhre gegeben und 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert. RNA wurde sofort unter Verwendung des Quiagen RNeasy Kit gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Die gereinigte RNA wurde in 50 µl dH₂O eluiert.

Gereinigte RNA wurde fragmentiert, indem sie mit 10 mM ZnCl₂ und 20 mM Tris.Cl pH 7,4 bei 60°C 30 min lang inkubiert wurde. Die Fragmentierung wurde durch die Zugabe von 10 mM EDTA pH 8,0 zur Reaktion und Auf-Eis-Legen gestoppt. 1 µl 40 U/µl RNasin wurde dem fragmentierten Target zugesetzt. Fragmentierte, markierte RNA-Targets wurden bei -20°C gelagert.

Referenztargets und künstliche Targetmischungen zum Testen des Quantifizierungspotentials wurden synthetisiert, indem bekannte Mengen gereinigter PCR-Produkte gemischt und eine in vitro-Transkription und Target-Fragmentierung durchgeführt wurden wie oben beschrieben.

Beispiel 4: Hybridisierung

Es erfolgte keine Vorhybridisierung. Die Hybridisierung wurde in einem für diese Bedürfnisse zugeschnittenen Aluminiumblock durchgeführt, der als Einsatz für ein temperierbares Belly Dancer (Stovall Life Sciences Inc., Greensboro, NC, USA) Set bei Maximalkrümmung (etwa 10°) verwendet wurde. Der Hybridisierblock wurde mindestens 30 min lang auf 55°C vorgeheizt, um eine Stabilisierung der Temperatur zu ermöglichen. Ein Eppendorf-Inkubator wurde ebenfalls auf 65°C vorgeheizt. Auf die Objektträger, die die Arrays enthielten, wurden HybriWell (Grace BioLabs) Hybridisierungskammern (200 µl Volumen) zum Aufkleben aufgebracht. Gesammelte Objektträger wurden oben auf dem Hybridisierblock vorgewärmt. Für jede Hybridisierung wurden 124 µl DEPC-behandeltes Wasser, 2 µl 10% SDS, 4 µl 50 x Denhardt's Reagens (Sigma), 60 µl 20 x SSC und 10 µl Target-RNA in eine 1,5 ml Eppendorf-Röhre gegeben und 1 - 15 min lang bei 65°C inkubiert. Vorgewärmte Hybridisierungsmischungen wurden über die Öffnung in den unteren

Positionen auf gesammelte Objektträger aufgebracht (um die Gefahr von in der Kammer gefangenen Luftblasen zu minimieren). Die Kammern wurden mit Versiegelungssspots versiegelt und über Nacht bei einer Zirkulation von 30 - 40 Upm und maximaler Krümmung bei 55°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden Klebekammern einzeln entfernt und die Objektträger sofort bei Zimmertemperatur in 2 x SSC, 0,1% SDS getaucht. Die Objektträger wurden durch 5 min Schütteln bei Zimmertemperatur in 2 x SSC, 0,1% SDS; zwei Mal 5 min in 0,2 x SSC und schließlich 5 min in 0,1 x SSC gewaschen. Die Objektträger wurden einzeln unter Verwendung einer Luftkanone mit einem Wattefilter drinnen getrocknet. Die Objektträger wurden bei Zimmertemperatur dunkel gelagert und am selben Tag gescannt.

Beispiel 5: Scannen und Datenanalyse

Hybridisierte Objektträger wurden mit einem GenePix 4000A Laserscanner (Axon, Foster City, Calif., USA) bei Wellenlängen von 532 nm und 635 nm mit 3 Linien bis Durchschnitt auf Cy3 bzw. Cy5 gescannt. Fluoreszierende Abbildungen wurden als mehrschichtige Tiff-Bilder eingefangen und mit der Software GenePix Pro 3.0 (Axon) analysiert. Microsoft Excel wurde für die statistische Auswertung und die Präsentation der Ergebnisse verwendet.

Die Ergebnisse wurden mit einer positiven Kontrolle normiert. Das Hybridisierungssignal für jede Sonde wurde als Prozentsatz des Signals (Mittelwert des Signals minus Hintergrund) der positiven Kontrollsonde mtrof173 am selben Array ausgedrückt. Da jeder Objektträger dreifache Arrays enthielt, wurde die Signalstärke der dreifachen Spots auf einem Objektträger verwendet, um das Durchschnittsergebnis und die Standardabweichung zu bestimmen.

Für zweifarbige Hybridisierungen wurden die Daten der Mittelwerte von Verhältnissen verwendet, normiert auf mtrof173 und bezüglich der relativen Mengen verschiedener, der Referenz-Zargetmischung zugesetzter Sequenzen korrigiert.

Alle berichteten Ergebnisse stellen den Durchschnitt von mindestens drei Wiederholungen dar.

Zugangsnummern für die Nukleotidsequenz. Die in dieser Studie für die Validierung des Sondensets verwendeten Teil-pmoA-Sequen-

zen sind unter den Zugangsnummern AB484595, AB484597, AB484601, AF148521, AF148522,5, AF150764, AF177325, AF211872, AF211879, AF211883, AF211889, AF264115, AF264116, AF264119, AF264136, AF264137, AF358041, AF358045, AF358050, AF358053, AF358054, AF358055, AF368358, AF368373, AJ278727, AJ299947, AJ299948, AJ299951, AJ299955, AJ299957, AJ299963, AJ299964, AJ459006, U31650, U31654, U72670, U81596, U89302, U89303 und U94337 erhältlich.

Beispiel 6: Protokolloptimierung

Eines der Hauptprobleme bei der Zusammenstellung von Oligonukleotid-Mikroarrays besteht darin, fast idente Schmelztemperaturen für alle Proben auf dem Array zu erzielen. Ein möglicher Lösungsansatz zur Erreichung dieses Ziels ist die Verwendung von Hybridisierungspuffern, die tertiäre Aminsalze enthalten. Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) oder Tetraethylammoniumchlorid (TEACl) sind erfolgreich angewendet worden, um eine vom GC-Gehalt unabhängige Hybridisierung auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen zu ermöglichen. Die derzeitige Schwäche dieses Ansatzes besteht darin, dass der thermodynamische Hintergrund fehlt, wodurch es unmöglich gemacht wird, die Auswirkungen weiterer Faktoren auf das Verhalten einer gegebenen Oligosonde vorherzusagen. Außerdem ist die Wirkung tertiärer Aminsalze auf die verschiedenen derzeitigen und zukünftigen Oberflächenchemien weitgehend unbekannt. Daher wurde ein anderer Weg gewählt, indem Oligos konstruiert wurden, die in „traditionellen“ Hybridisierungspuffern fast idente Schmelztemperaturen haben sollten.

Zahlreiche unabhängige Studien haben gezeigt, dass sterische Effekte (Störungen der Hybridisierungseigenschaften der immobilisierten Oligos durch den festen Träger und sterische Hinderung auf Grund der Ansammlung immobilisierter Oligos) die Zugänglichkeit der immobilisierten Oligonukleotidsonden stark beeinträchtigen können. Diese Effekte werden durch die Anwendung von Spacer-Molekülen erfolgreich gemildert. Es wurde gefunden, dass ein C12-Linker und zusätzliche 5 Thymidinreste am 5'-Ende optimale Abstände ergaben; die Zugabe von weiteren Thymidinresten hatte keine signifikante Auswirkung auf die Hybridisierungskapazität (Zugänglichkeit) der getesteten Oligos.

50% DMSO in dH₂O wurde als Druckpuffer gewählt, weil er im Gegensatz zu wässrigen Lösungen, wie 3 x SSC oder Phosphatpuffern während langer Spotrunden (ein routinemäßiges Spotten von 100 Oligos auf 100 Objektträger dauert etwa 6 Stunden) nicht austrocknete. Weiters ergab er gleichmäßige Spots auf den Objektträgern. Standardabweichungen bei der Signalstärke zwischen replizierten Spots betrugen 10 - 15% im Gegensatz zu 20-30% bei 3 x SSC. Das Spotten erfolgte mit einer Einzelnadel, um Variationen zu verhindern, wie sie beim Spotten mit mehreren Nadeln unweigerlich auftreten.

Für die Vorbereitung des Targets wurden mehrere alternative Ansätze getestet. Diese beinhalteten die direkte Inkorporierung von mit Cy markierten dNTPs in dsDNA bei der PCR, die Anwendung eines markierten PCR-Primers für die Generierung von dsDNA-Targets und die Anwendung eines markierten PCR-Primers und eines biotinylierten für die Generierung von ssDNA-Targets über die folgende Auftrennung der beiden Stränge unter Verwendung von mit Streptavidin beschichteten Magnetkugeln. Da die Sekundärstruktur des Targets bei der Bestimmung des mit einer bestimmten Sonde maximal erhältlichen Hybridisierungssignals eine sehr wichtige Rolle spielt („Hybridisierungskapazität“), war es absolut notwendig, das Target vor der Hybridisierung zu fragmentieren. Da RNA mittels chemischer Fragmentierung auf beliebige Weise fragmentiert werden kann, wurde beschlossen, RNA-Targets zu verwenden. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von RNA-Targets besteht darin, dass die direkte Inkorporierung von mit Cy markierten Nukleotiden durch T7 RNA-Polymerase sehr effizient ist. Als 50% UTP bei der in vitro-Transkription durch Cy3-UTP ersetzt wurde, wurde eine nur vierfache Verringerung der RNA-Ausbeute beobachtet. Die erzielten Ausbeuten der Targetpräparation liegen im Bereich der Konzentration von 50 ng/µl (in 50 µl Endvolumen, angefangen mit 8 µl 50 ng/µl Templat), wobei jedes zehnte bis zwölfte Nukleotid markiert ist.

Die Fragmentierung der Target-RNA auf eine durchschnittliche Fragmentgröße von 50 nt führte zu einer signifikanten Verstärkung der Hybridisierung. Trotz der Empfindlichkeit der Cy-Farben gegenüber einer nukleophilen Attacke (wie eine Alkalibehandlung mit zweiwertigen Kationen, die zur Fragmentierung von RNA ver-

wendet wird) wurde ein Anstieg von Cy3- sowie Cy5-Signalen von über einer Größenordnung beobachtet. Weiters verminderte die Fragmentierung in vielen Fällen die Unterschiede zwischen den Hybridisierungskapazitäten der Sonden.

Cy3- und Cy5-Farben wurden wegen der relativ extensiven Literatur verwendet, die über das Verhalten dieser Farben erhältlich ist. Es wurde gezeigt, dass Cy5 während des Scanvorgangs einem signifikanten Lichtbleichen unterworfen war. Daher wurden alle begonnenen Scanvorgänge bis zum Schluss weitergeführt, um selektives Lichtbleichen von nur einigen der Cy5-Signale auf dem Array auszuschließen.

Es wurden Hybridisierungsbedingungen gewählt, die locker genug waren, um die Hybridisierung von sowohl Perfect Match- (PM) als auch Single Mismatch- (1MM) Targets zu ermöglichen. Da es sich bei der Hybridisierung zwischen Oligonukleotiden und jeglichem anderen Nukleotid um einen reversiblen Vorgang handelt, wurden alle Hybridisierungen über Nacht durchgeführt, um eine vollständige Hybridisierung sicherzustellen. Bei Mikroarray-Hybridisierungen ergibt sich oft das Problem, dass sich die Hybridisierungslösung nicht bewegt und die Diffusion der einzige Vorgang ist, der für eine gewisse Vermischung sorgt. In einem solchen, auf die Diffusion beschränkten System sind statistische Fehler im Endsignal inhärent. Außerdem führen solche Umstände üblicherweise dazu, dass die Ränder von SONDENSETS effizienter hybridisieren und so ein relativ starkes Signal für den Rand des Spots und ein wesentlich schwächeres für die Mitte ergeben. Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden ein auf die Bedürfnisse zugeschnittener BellyDancer-Laborschüttelapparat und klebende Hybridisierungskammern mit signifikant größeren Volumina als jene verwendet, die es zwischen einem Mikroarray und einem traditionellen Abdeckstreifen gibt. Die winzigen Bläschen, die sich unweigerlich in dieser Kammer bildeten, wurden durch die Bewegung des BellyDancers langsam an den Rand bewegt, und dies ergab ausreichend zusätzliche Vermischung, um für eine angemessen gleichmäßige Hybridisierung über den gesamten Mikroarray zu sorgen.

Die Standardabweichung der Ergebnisse für (dreifache) Spots einzelner Sonden lag bei 3% bis 30% zwischen parallelen Objekt-

trägern, die mit parallel hergestellten Targets hybridisiert wurden.

Es wurde untersucht, in welchem Maße die Anwendung verschiedener pmoA/amoA-spezifischer PCR-Primer die Ergebnisse beeinflusste. Für die Amplifizierung des Targets wurden zwei alternative Revers-Primer verwendet. Der Primer pmoA682 kann pmoA, amoA und ähnliche Sequenzen amplifizieren und ergibt ein Produkt mit 531 bp mit dem Vorwärts-Primer pmoA189. Der Primer mb661 ist spezifisch für Sequenzen vom pmoA-Typ und ergibt ein geringfügig kürzeres Produkt (508 bp). Da viele der Umgebungs-pmoA-Klone mit dem letzteren Primer erhalten wurden, wurden beide Primerpaare angewendet. Die Standardabweichungen zwischen den mit den verschiedenen Primerpaaren erzeugten Ergebnissen betrugen 10 - 30% und gehen nicht über jene zwischen parallelen Experimenten unter Verwendung der selben Primerpaare hinaus.

Beispiel 7: Zusammenstellung des Sondensets und Validierung

Aus öffentlichen Datenbankeinträgen und teilweise von noch unveröffentlichten Sequenzen wurde eine Datenbank mit über 700 pmoA/amoA-Sequenzen erstellt. Sequenzen mit voller Länge und fast voller Länge (d.h. enthaltend die Positionen 206-661 des *Mc. capsulatus* (Bath) pmoA-Gens) sowie einige der (einzigen) kürzeren Sequenzen (514 Einträge) wurden verwendet, um einen phylogenetischen Baum (Fig. 1) zu erstellen, wobei gr für „Gruppe“ steht, A Umweltklone unbekannter Physiologie sind, B AOB und verwandte sind, C Typ I-Methanotrophe und D Typ II-Methanotrophe und verwandte sind.

Es wurden 118 auf pmoA/amoA basierende Oligonukleotidsonden zusammengestellt. Eine Serie von 68 Sonden (Tabelle 1) wurde ausgewählt, indem redundante Sonden ausgelassen wurden.

TABELLE 1				
Name a	Sequenz 5' ? 3' b	Länge	Tm	Seq ID No
Mb460	GACAGTTACAGCGGTAATCGGTGG	24	60,9	1
Mb478	TGGTATGGCATGGGGTCTGT	20	59,7	2
Mb271	TTGTGGTGGCGTTACCGT	18	58,0	3
511-436	GTTTTGATGCTGTCTGGCAG	20	55,5	4
BB51-299	GCGCGGTTGTTTGTGTCT	18	57,4	
Mb292	CCGTTACCGTCTGCCTTTTCG	20	59,1	5
Mm275	GTGGTGGAGATACCGTTTGCC	21	59,2	6
Mm391	ATTGCTTCCCATCTAACCTG	21	54,0	
PS80-291	ACCAATAGGCGCAACACTTAGT	22	58,3	7
peat1-3-287	AACTGCCCTTTAGCGCTACC	20	58,6	8
Mb_SL#1-421	GCGATCGTATTAGACGTTATCCTG	24	56,4	
Mb_SL-299	GGGGTGCAACTCTGTGTATCTTAGG	25	60,5	9
Jpn284	ACCGTATCGCATGGGGTG	18	58,0	10
Mm_pel467	ACTGCGGTAATCGATGGTTTGCC	23	61,6	11
Est514	AATTGGCCTATGGTTGCGCC	20	59,9	12
LP20-644	GGTACACTGCGTACTTTTCGGTAA	23	58,2	13
Mmb303	CAATGCTGGCTGTTCTGGGC	20	60,3	14
Ia193	GACTGGAAGATAGACGTCT	20	51,9	
Ia577	TGGCTGACTTGCAAGGTTACC	21	58,9	15
Nc_oce426	CTTGATGCCATGCTTGCGA	20	59,8	16
Mth413	CACATGGCGATCTTTTAGACGTTG	25	58,3	17
Mc396	CCCTGCCTCGCTGGTGC	17	61,9	18
501-286	GTCAGCCGTGGGGCG	15	59,0	
fw1-639	GAAGGGCACGCTGCGTACG	19	62,0	19
M90-201	CGGCTGCTGTACAGGCGTTC	20	61,8	20
Mcl408	GGTTCCGGGTGCGATTTTG	19	57,8	21
Ib453	ggCAGCTACCTGTTACCCGC	20	61,7	22
Ib561	GGCATGCTGATGTCGATTGCCG	22	60,5	23
Mcy262	CAGGCGTTCGGTGGGTGAA	20	61,0	24
Mcy409	ATCGTTCGGCGATCTGGC	19	61,0	25
Peat267	GGCGTTTCTGCGGTCAACTTCC	23	60,3	26
Msi520	GCGATCGCGCTCTGCA	17	61,6	27
Msi_tri309	CGCGGTTCTGGGTCTGCTC	19	61,4	28
Msi270	GTTCTTCTGGGAGAACTTCAAGC	23	57,1	
Msi232	CCTGGGCGTGACCTTCGC	18	61,0	29
II510	CGAACAACTGGCCGGCG	17	60,0	30
II630	CATGGTTCGAGCGCGGC	16	59,7	31
RA14-598	AACGTTCTGATCCTCGATGCC	20	58,3	32
B2rel260	GCCAGTATTATTTCTGGACCCCAT	25	60,4	33
B2-400	ACCTCTTTGGTCCCGGCTG	19	60,5	34
B2all343	AACCGCTACACCAATTTCTGGCG	23	61,8	35
pmoAM03-400	CCCAGATGATCCCGTCGGC	19	60,8	36
xb6-539	AGGCCGCCGAGGTCGAC	17	63,0	37
LP21-190	ATCGACTTCAAGGATCGCCG	20	58,2	
LP21-232	ATCGTCGCCATGTGCTTCGC	20	61,9	38
mtrof173	GGbGACTGGGACTTCTGG	18	58,2	39
mtrof362-I	TGGGGCTGGACCTACTTCC	19	59,5	40
mtrof656	ACCTTCGGTAAGGACGT	17	53,2	
mtrof661	GGTAARGACGTTGCKCCGG	19	61,9	41
mtrof662-I	GGTAAGGACGTTGCGCCGG	19	61,9	
NmNc534	cAACCCATTTGCCAATCGTTGTAG	24	58,6	42

Nsm_eut381	CCACTCAATTTTGTAACCCCAGGTAT	26	59,0	43
Pl6-306	GGCACTCTGTATCGTATGCCTGTTAG	26	60,5	44
PS5-229	ACCCCGATTGTTGGGATGATGTA	23	59,9	45
NsNv207	TCAATGGTGGCCGGTGG	17	58,5	46
NsNv363	TACTGGTGGTCGCACTACCC	20	59,6	47
Nit_rel223	GTCACACCGATCGTAGAGGT	20	56,9	48
Nit_rel351	GTTTGCCTGGTACTGGTGGG	20	59,2	49
Nit_rel470	CGATATTCGGGGTATGGGCG	20	58,4	50
Nit_rel304	CGCTCTGCATTCTGGCGCT	19	61,8	51
M84P105-451	AACAGCCTGACTGTCACCAG	20	58,1	52
WC306_54-385	AACGAAGTACTGCCGGCAAC	20	59,2	53
M84P22-514	AACTGGGCCTGGCTGGG	17	61,0	54
gp23-454	AACGCGCTGCTCACTGCG	18	62,3	55
MR1-348	AATCTTCGGTTGGCACGGCT	20	61,1	56
gp391	ATCTGGCCGGCGACCATG	18	61,1	57
gp2-581	ACATGATCGGCTACGTGTATCCG	23	60,0	58
RA21-466	CGGCGTCTTGGCGGCAT	18	62,4	59

Die Sonden zielten auf unterschiedliche Spezies, Speziesgruppen, Genera sowie höhere taxonomische Gruppen von Methanotrophen, AOBs und verwandten Bakterien. Zwei Sonden (mtrof173 und mtrof661) wurden zusammengestellt, um auf die PCR-Primer pmoA189 bzw. mb661 zu zielen. Eine dritte, für Methanotrophe „universelle“ Sonde (mtrof362-I) wurde für eine Region in der Mitte der pmoA-Sequenz zusammengestellt, die bei Methanotrophen ziemlich erhalten ist.

Der kritischste Schritt beim Vorgang der Zusammenstellung der Sonden ist die Feinabstimmung des SONDENSETS in der Weise, dass alle Sonden im Set ein so weit wie möglich identes Hybridiserverhalten aufweisen. Im ersten Schritt wurde ein Versuch unternommen, Oligos mit vorhergesagten Schmelztemperaturen (gemäß dem Modell des nächsten Nachbarn) von $60 \pm 2^\circ\text{C}$ zusammenzustellen. Derzeitige Modelle können Schmelztemperaturen jedoch nur in Lösung vorhersagen.

Das Hybridiserverhalten von auf einer festen Oberfläche immobilisierten Oligonukleotidsonden hängt von mehreren Faktoren ab:

(i) Länge, GC-Gehalt und genaue Sequenz der Sonde. Diese zusammen werden bei der Vorhersage von T_m für die Oligos unter

Verwendung des Verfahrens des nächsten Nachbarn in Betracht gezogen.

(ii) Position von GC- und AT-Paaren. Die Mitte der Sonde ist bei der Stabilisierung der Hybridisierung wichtiger. Eine Sonde, bei der die Mitte alle Gs und Cs enthält, bindet ihr Target stärker als eine andere mit einer homogenen GC-Verteilung (aber mit identischer Länge und GC-Gehalt).

(iii) Sekundäre Strukturen der Sonde und des entsprechenden Targets. Wenn eine dieser beiden von signifikanter Stärke ist, verglichen mit der Stärke der Hybridisierung zwischen der Sonde und dem Target, ist ein signifikanter Abfall der Hybridisierungseffizienz zu erwarten.

(iv) Das genaue Wesen der überhängenden Nukleotide am Target (Nukleotide direkt neben dem Gebiet, auf das die Sonde abzielt). Dies kommt vom Modell der Methode des nächsten Nachbarn, wird jedoch normaler Weise nicht beachtet, da die Überhänge der Targetsequenz nicht in Betracht gezogen werden.

(v) Anzahl und Typ der Mismatches. Einige Mismatches haben geringe, andere jedoch sehr stark destabilisierende Wirkung.

(vi) Position der Mismatches. Mismatches in der Mitte destabilisieren stärker als Mismatches an Endpositionen.

(vii) Faktoren, die sich aus der immobilisierten Natur der Sonden ergeben. Sterische Effekte können die Bildung von Hybriden zwischen dem Target und der gebundenen Sonde behindern. Diese Wirkung ist für das immobilisierte Ende der Sonde wesentlich stärker. Daher spielt das gebundene Ende der Sonde eine geringere Rolle bei der Hybridisierung als das freie Ende. Dies gilt für die Punkte 2 und 6.

(viii) Die Hybridisierung zwischen DNA-Oligos und RNA-Fragmenten, wie im vorliegenden Fall, hat eine geringfügig andere Thermodynamik als jene der DNA-DNA-Hybridisierung.

Auf Grund der obigen Kriterien erstellten wir an Hand anfänglicher Ergebnisse von Tests des Hybridisierungsverhaltens unserer Sonden und publizierter Daten ein Set von einfachen Regeln, die die Vorhersage des Hybridisierungsverhaltens der Sonden signifikant verbesserten. Diese Regeln sind:

(i) U -> C Veränderungen in der Targetsequenz führen zu einer Bindung rG-dT, die fast so stark ist wie die ursprüngliche

Bindung rA-dT (im Falle eines Perfekt Match). Diese werden nicht als Mismatch gewertet.

(ii) G -> A Veränderungen in der Targetsequenz führen zu einer Bindung rU-dG, die fast so stark ist wie die ursprüngliche Bindung rC-dG (im Falle eines Perfekt Match). Diese Mismatches werden nur gewertet, wenn sie zusammen mit anderen Arten von Mismatches vorkommen.

(iii) Mismatches in den Endpositionen werden nicht in Betracht gezogen. Mismatches neben den Endpositionen werden nur in Betracht gezogen, wenn sie zusammen mit anderen Arten von Mismatches vorkommen.

(iv) Wenn sich der Großteil des GC-Gehalts einer Sonde in der Nähe des (immobilisierten) 5'-Endes befindet, weist die Sonde eine signifikant niedrigere Schmelztemperatur auf als ursprünglich vorhergesagt. Wenn das 3'-Nukleotid G oder C ist, wird es auf die gleiche Weise gewertet.

(v) Sonden mit starken Haarnadelstrukturen ($\Delta G \geq -2,0$) wurden betrachtet, als würden sie ein zusätzliches Mismatch mit dem Target haben.

(vi) Sonden mit großem GC-Gehalt, die in der Länge kürzer als 17 Nukleotide sind, weisen unter den angewendeten Versuchsbedingungen ein unverlässliches Hybridisierverhalten auf.

In Anbetracht der obigen Regeln wurden weitere 9 Sonden ausgeschlossen, und die Anzahl der Mismatches wurde auf den letzten Stand der „Mismatch-Äquivalente“ gebracht. Das resultierende Set von 59 Oligonukleotidsonden (siehe Tabelle 1) wurde in Bezug auf ein Referenzset von 69 reinen Strängen und Umweltklons validiert, die fast die gesamte bekannte Diversität von Methanotrophen, AOBs und Bakterien, die pmoA/amoA-Homologe tragen, abdecken. Die Hybridisierungen wurden bei 55°C mit dem Ziel durchgeführt, die Hybridisierung von PM und 1MM (oder „1MM-Äquivalenten“) Sonden-Target-Paaren zu ermöglichen. Fig. 2 zeigt einige typische Hybridisierungsergebnisse, wobei Fig. 2a eine schematische Darstellung des Mikroarray-Designs ist, Fig. 2b ein Design eines einzelnen Arrays im Detail ist und Fig. 2c repräsentative Hybridisierungen zeigt, wobei r.c. „verwandte Klone“ bedeutet. Die Hybridisierung zwischen einer Sonde und einem Target wurde als positiv angesehen, wenn das Signal mindestens 10% des am

gleichen Array für mtrof173 erhaltenen Signals betrug. Leider gab es Gruppen von Klonen, für welche kein Repräsentant zur Verfügung stand. Fig. 3 zeigt das vorhergesagte Hybridisierungsverhalten der Sondensets und die erhaltenen Ergebnisse:

Von 59 Sonden im Sondenset konnten Referenztargets für 7 nicht erhalten werden, welche daher auch nicht validiert werden konnten. Die meisten (42) Sonden wiesen ein Hybridisierverhalten wie vorhergesagt auf. Bei zwei Sonden, II510 und II630, wurde auf Grund ihrer Kürze (in Kombination mit einer starken Sekundärstruktur bei II510) ein unverlässliches Hybridisierverhalten erwartet. Diese beiden Sonden wurden im Sondenset gelassen, da keine bessere Region für eine für die Typ II-Methanotrophen spezifische Sonde identifiziert werden konnte. Acht Sonden zeigten einige unvorhergesehene Ergebnisse. Das unerwartete positive Ergebnis von Mcy409 ergab sich aus der Kombination einer starken Sekundärstruktur mit einem Mismatch. Die unerwarteten negativen Ergebnisse von Msi232 wurden mit Targets erhalten, die zwei nebeneinander liegende Mismatches genau am 3'-Ende plus ein drittes an verschiedenen inneren Stellen der Sonde aufwiesen. Sonde Ia577 wies bei drei Targets, die alle eine einzige zentrale Mismatch U -> A Veränderung hatten, unerwartete negative Ergebnisse auf, was zu einem Paar rU-dT führte, das das Perfect Match-Paar rA-dT ersetzte.

Zusammenfassend ergibt sich, dass das empirische Verfahren, das für die Vorhersage des Hybridisierverhaltens der Sonden beschrieben wurde, eine Erfolgsrate von 84% hatte (42 von 50 gewerteten). Wenn redundante Sondensets (3 oder mehrere Sonden für jede ins Auge gefasste Spezies oder taxonomische Gruppe) zusammengestellt werden und werden können, ist diese Erfolgsrate annehmbar, und es können Sondensets ohne gründliche Validierung zusammengestellt und angewendet werden.

Beispiel 8: Quantifizierungspotential

Das Quantifizierungspotential des entwickelten Mikroarrays wurde mit künstlichen Mischungen von pmoA-Sequenzen getestet. Auf diese Weise war es möglich, die Einführung von Verzerrungen zu vermeiden, die bei der DNA-Reinigung von Umweltproben und PCR mit degenerierten Primern inhärent ist. Durch Verwendung einer Referenzmischung mit bekannter Zusammensetzung war es möglich,

Variationen in der Morphologie der Spots und lokale Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz, sowie die signifikante Variation der Hybridisierungskapazitäten zwischen verschiedenen Sonden zu normieren.

Die vorliegenden Ergebnisse, die in Fig. 4 dargestellt sind, zeigen eine sehr gute Korrelation zwischen der echten Zusammensetzung der künstlichen Mischungen und den Ergebnissen der quantitativen Analyse der Hybridisierungsergebnisse. Die Standardabweichung von erwarteten Verhältnissen lag im Bereich von 0,4 - 17,2%.

Das Set von Techniken, die hier dargestellt sind, ermöglicht die Zusammenstellung, die Herstellung und die Anwendung diagnostischer mikrobieller Mikroarrays durch ein durchschnittliches mikrobiologisches Labor mit Zugang zu standardmäßiger molekularbiologischer Ausstattung und irgendeinem handelsüblichen Spotter und Scanner.

Die Quantifizierung von Umweltproben ist in zwei Stufen möglich. In der ersten Stufe wird eine Einfarben-Hybridisierung durchgeführt, die einen groben Überblick über die Gemeinschaftsstruktur geben kann, indem sie die relativen Intensitäten auf dem Array mit den Ergebnissen des Referenzstrang/Klon-Sets in Zusammenhang bringt. Diese Information kann auch verwendet werden, um ein Subset von Referenzsträngen/Klonen auszuwählen, das in der nächsten Stufe verwendet werden soll, wo das gleiche Target dann gegen das ausgewählte Referenzset hybridisiert wird und quantitative Daten von den Verhältnissen der beiden Signale gezogen werden.

Um den entwickelten pmoA-Mikroarray in der Analyse mit hohem Durchsatz von Umweltproben für die Methanotroph- und AOB-Diversität erfolgreich einsetzen zu können, ist es erforderlich, die DNA-Extraktion, Reinigung und „universelle“ pmoA/amoA PCR-Protokolle zu optimieren, um eingeführte Verzerrungen zu minimieren. Auch dieses Target wird durch diesen Mikroarray vereinfacht.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> ARC Seibersdorf Research GmbH

<120> Oligonukleotid Set

<130> Methanotrophe

<140>

<141>

<160> 63

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 1

gacagttaca gcggtaatcg gtgg

24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 2

tggtatggca tggggctctgt

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 3

ttgtggtggc gttaccgt

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 4

gttttgatgc tgtctggcag

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 5

ccgttaccgt ctgcctttcg

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 6

gtgggtggaga tacggttgc c

21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 7

accaataggc gcaacactta gt

22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 8

caacccattt gccaatcggt gtag

24

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 9

ggggtgcaac tctgtgtatc ttagg 25

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 10

accgtatcgc atggggtg 18

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 11

actgcggtaa tcgatggtt ggc 23

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 12

aattggccta tggttgcgc 20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 13

ggtacactgc gtacttcgg taa 23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 14

caatgctggc tgtctgggc 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 15

tgctgactt gcaaggttac c 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 16

cttggatgcc atgcttgcca 20

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 17

cacatggcga tcttttaga cgttg 25

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 18

ccctgcctcg ctggtgc 17

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 19

gaagggcacg ctgcgtacg

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 20

cggctgctgt acaggcgttc

20

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 21

ggtccgggt gcgatttg

19

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 22

ggcagctacc tgttcaccgc

20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 23

ggcatgctga tgtcgattgc cg

22

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 24
 caggcgttct ggtgggtgaa 20

<210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 25
 atcggtccgg cgatctggc 19

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 26
 ggcgttttc tgggtcaact tcc 23

<210> 27
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 27
 gcgatcgcggt ctctgca 17

<210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 28
 cgcggttctg ggtctgctc 19

gcccagtatt atttctggac cccat

25

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 34

acctctttgg tcccggtg

19

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 35

aaccgctaca ccaatttctg gcg

23

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 36

cccagatgat cccgtcggc

19

<210> 37

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 37

aggccgccga ggtcgac

17

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 38
atcgctgccca tgtgcttcgc 20

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 39
ggbgactggg acttctgg 18

<210> 40
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 40
tggggctgga cctactcc 19

<210> 41
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 41
ggtaargacg ttgckccgg 19

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 42
caaccattt gccaatcggt gtag 24

<210> 43
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 43

ccactcaatt ttgtaacccc aggtat

26

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 44

ggcactctgt atcgatgcc tgtag

26

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 45

accccgattg ttgggatgat gta

23

<210> 46

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 46

tcaatggtgg ccggtgg

17

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 47

tactggtggt cgactaccc

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 48

gtcacaccga tcgtagaggt

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 49

gtttgcctgg tactggtggg

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 50

cgatattcgg ggtatgggcg

20

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 51

cgctctgcat tctggcgct

19

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 52

aacagcctga ctgtcaccag

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 53

aacgaagtac tgccggcaac

20

<210> 54

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 54

aactgggcct ggctggg

17

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 55

aacgcgctgc tcaactgcg

18

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 56

aatcttcggt tggcacggct

20

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 57

atctggccgg cgaccatg

18

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 58

acatgatcgg ctacgtgtat ccg

23

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonukleotid

<400> 59

cggcgttctt ggcgcat

18

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 60

ggbgactggg acttctgg

18

<210> 61

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 61

taatacgact cactatagcc ggmgaacgt cyttacc

37

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 62

taatacgact cactatagga asgngagaa gaasgc

36

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 63

taatacgact cactatag

18

A n s p r ü c h e :

1. Set von Oligonukleotidmolekülen, die für Methanotrophe, aerobe, Ammoniak oxidierende Bakterien und funktionell verwandte Bakterien spezifisch sind, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens 5, vorzugsweise mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 50 Oligonukleotidmoleküle umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotidmolekülen, die die Sequenzen SEQ ID No 1 bis SEQ ID No 59 umfassen.
2. Set gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass diese Oligonukleotidmoleküle Spacer-Moleküle umfassen, die vorzugsweise an ihrem 5'-Ende hängen.
3. Set gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass diese Spacer-Moleküle einen C-Linker umfassen, vorzugsweise einen C5-bis C20-Linker.
4. Set gemäß den Ansprüchen 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass diese Spacer-Moleküle weiters Thymidinreste umfassen, vorzugsweise 2 bis 10 Thymidinreste.
5. Set gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass diese Oligonukleotidmoleküle markiert sind.
6. Fester Träger, dadurch gekennzeichnet, dass er, immobilisiert an seiner Oberfläche, das Set von Oligonukleotidmolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.
7. Fester Träger gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass er aus der Gruppe bestehend aus einem Objektträger, einer Membran, einer Säule, Kugeln und einer Platte ausgewählt ist.
8. Fester Träger gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Mikroarray handelt.
9. Fester Träger gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese Oligonukleotidmoleküle in Spots an der Oberfläche immobilisiert sind.
10. Fester Träger gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass in einem Spot idente Oligonukleotidmoleküle immobilisiert sind.
11. Verfahren zur Herstellung eines festen Trägers gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Set von Oligonukleotidmolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 vor-

zugsweise in Spots auf der Oberfläche dieses festen Trägers immobilisiert sind.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass dieses Set mit einer Einzelnadel auf diese Oberfläche gespottet wird.

13. Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass dieses Spotten mit einem Druckpuffer, vorzugsweise mit DMSO in H_2O , durchgeführt wird.

14. Verfahren zum Nachweis von Bakterien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Methanotrophen, aeroben, Ammoniak oxidierenden Bakterien und funktionell verwandten Bakterien, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- Auftragen dieser Probe auf den festen Träger gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10,
- Durchführung eines Hybridisierungsschrittes zum Hybridisieren von Nukleinsäuremolekülen aus den Bakterien mit den immobilisierten Oligonukleotidmolekülen, vorzugsweise gefolgt von mindestens einem Waschdurchgang,
- Nachweis von Hybridisierungsprodukten, wobei ein Hybridisierungsprodukt das Vorhandensein irgendeiner der genannten Bakterien in dieser Probe anzeigt.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass Nukleinsäuremoleküle von spezifischen Bakterien mit Oligonukleotidmolekülen hybridisieren, die in einem bestimmten Bereich, vorzugsweise einem bestimmten Spot, dieser Oberfläche immobilisiert sind.

16. Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe durch Isolieren und Reinigen der Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien vorbehandelt wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuremoleküle von den Bakterien fragmentiert werden, vorzugsweise auf eine Größe von 30 bis 70, vorzugsweise 45 bis 55 Nukleotiden.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass diese Probe derart vorbehandelt wird, dass diese Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien RNA-Moleküle sind.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuremoleküle von diesen Bakterien markiert werden, vorzugsweise mit Cy3 bzw. Cy5.

20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Hybridisierungsschritt unter Bedingungen durchgeführt wird, die Perfect-Match- und Single-Mismatch-Hybridisierung zulassen.

21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Hybridisierungsschritt über Nacht durchgeführt wird, vorzugsweise unter Verwendung eines Schüttelapparats.

22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Hybridisierungsschritt in einer geklebten Hybridisierungskammer durchgeführt wird.



Fig. 1

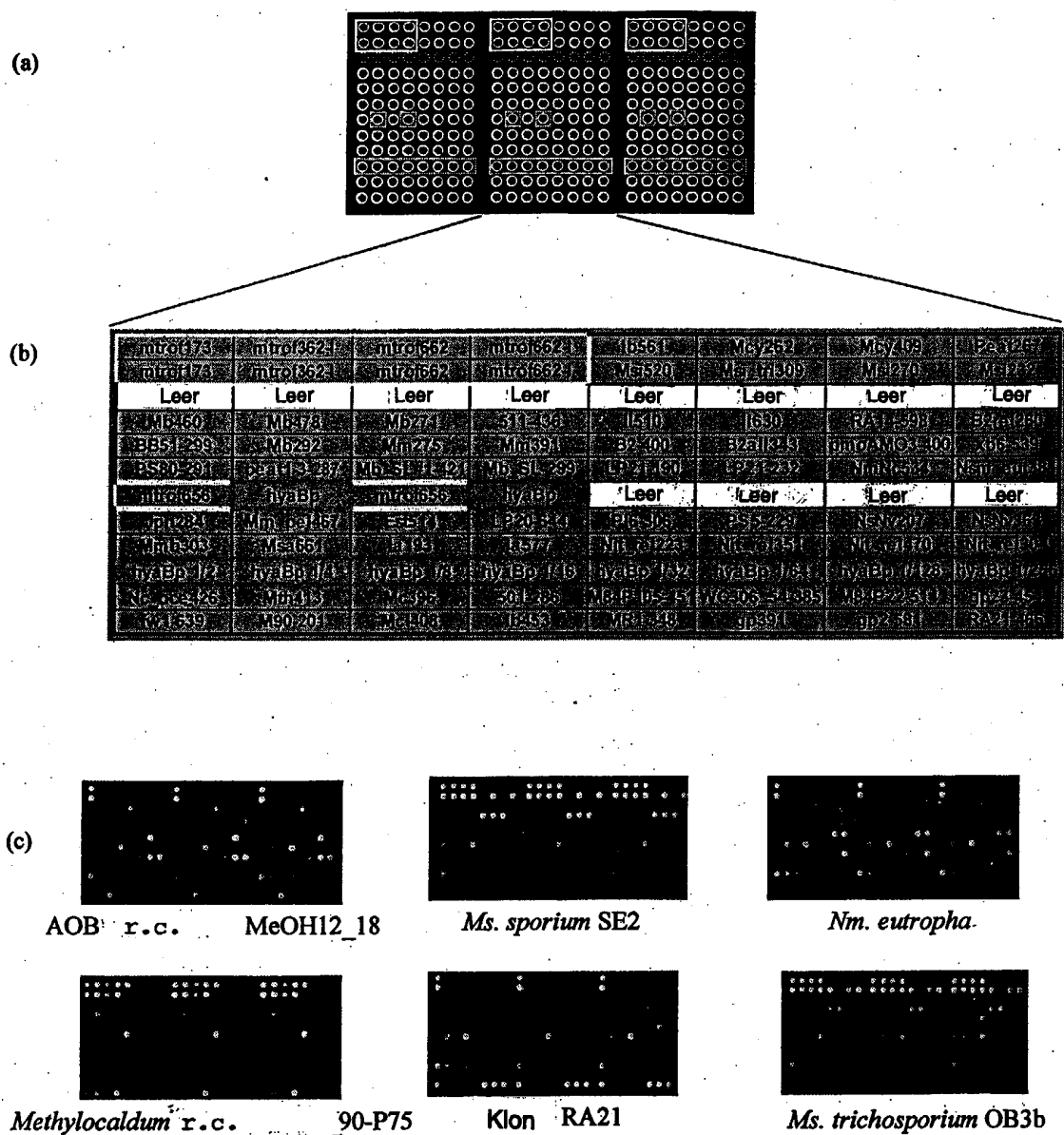


Fig. 2

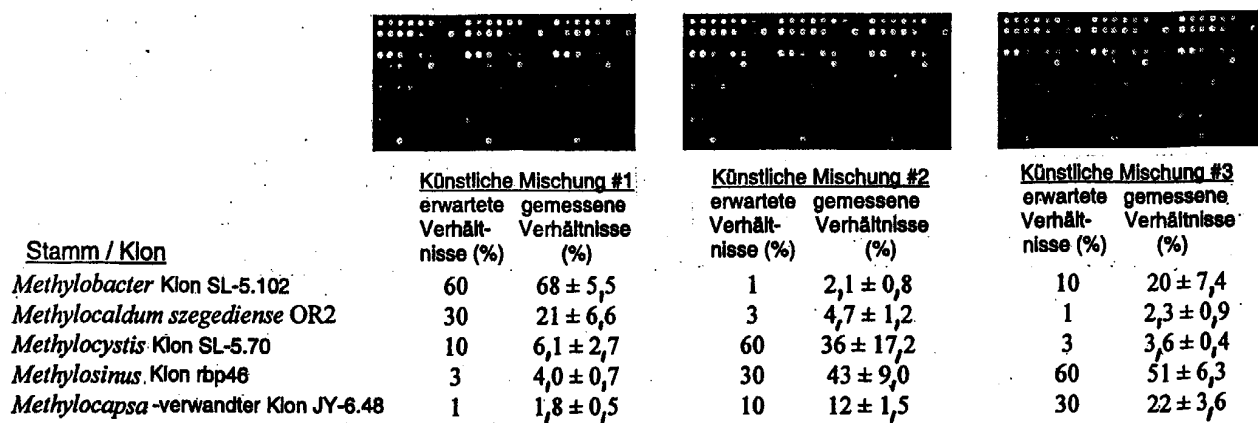
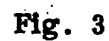
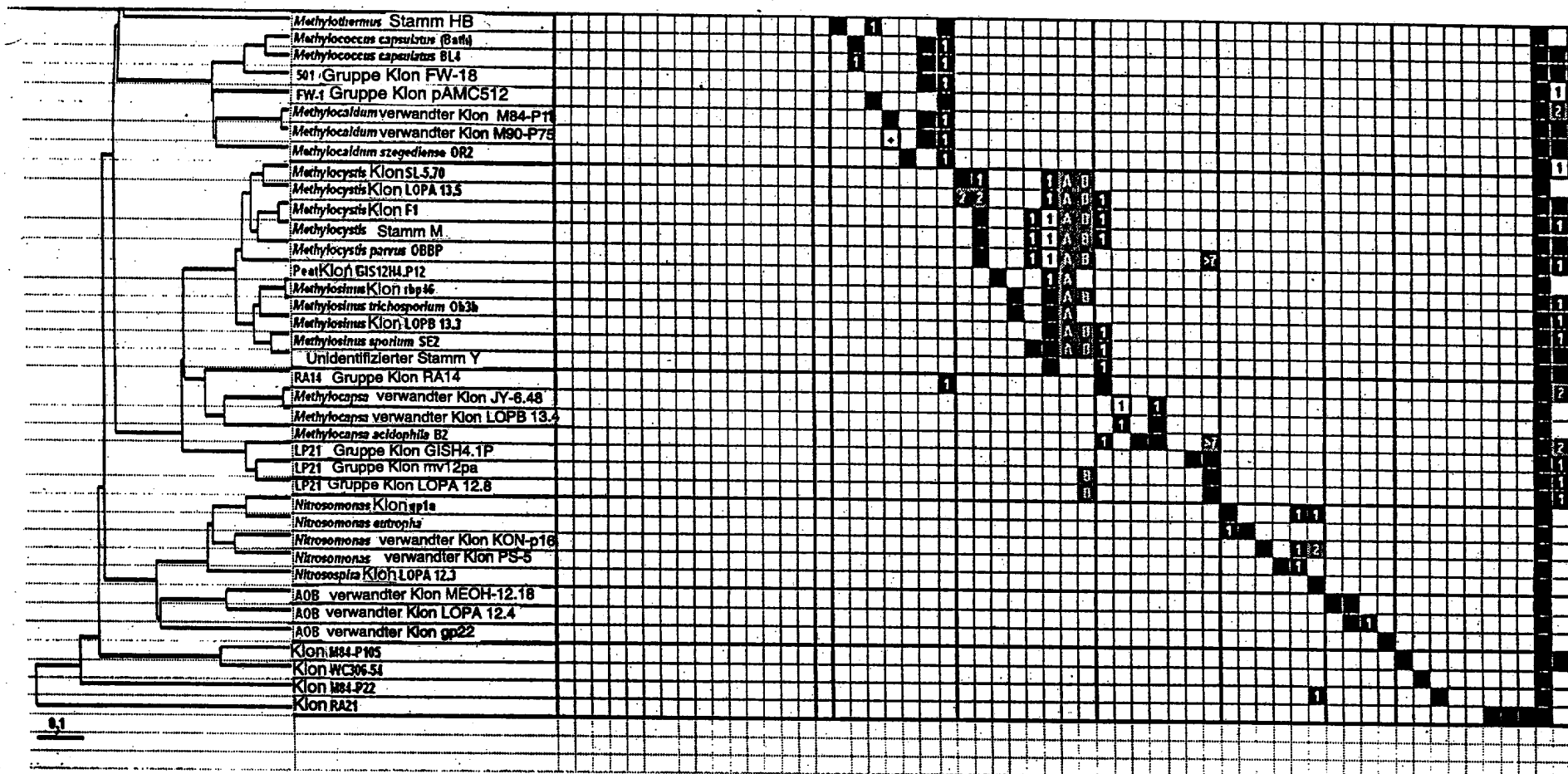


Fig. 4





Fortsetzung Fig. 3



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Recherchenbericht zu GM 757/2002

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ¹ :		
C 12 Q 1/68		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):		
C 12 Q 1/68		
Konsultierte Online-Datenbank:		
WPI, CAS, STN-registry		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 11.02.2003 eingereichten Ansprüchen erstellt. Die in der Gebrauchsmusterschrift veröffentlichten Ansprüche könnten im Verfahren geändert worden sein (§ 19 Abs. 4 GMG), sodass die Angaben im Recherchenbericht, wie Bezugnahme auf bestimmte Ansprüche, Angabe von Kategorien (X, Y, A), nicht mehr zutreffend sein müssen. In die dem Recherchenbericht zugrundeliegende Fassung der Ansprüche kann beim Österreichischen Patentamt während der Amtsstunden Einsicht genommen werden.		
Kategorie*)	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode ²⁾ , Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	JP 9121868 A (EBARA SOGO KENKYUSHO KK, KO-KURITSU KANKYO KENKYUSHOCHO) 13. Mai 1997 (13.05.97) (Zusammenfassung) WPI [online]. London, U.K.: Derwent Publications, Ltd. [heruntergeladen am 21-05-2003]. DW 199729, AN: 1997-314228 [29]	1-22
A	MORRIS, S.A. et al. Identification of the Functionally Active Methanotroph Population in a Peat Soil Microcosm by Stable-Isotope Probinglocks. Applied and Environmental Microbiology, März 2002, Vol. 68, No. 3, Seiten 1446-1453 das ganze Dokument	1-22
Datum der Beendigung der Recherche:		Prüfer(in):
21. Mai 2003		Mag. MOSSER
*) Bitte beachten Sie die Hinweise auf dem Erläuterungsblatt!		
☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt		



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Erläuterungen zum Recherchenbericht

Die **Kategorien** der angeführten Dokumente dienen in Anlehnung an die Kategorien der Entgegenhaltungen bei EP- bzw. PCT-Recherchenberichten nur zur raschen Einordnung des ermittelten Stands der Technik. Sie stellen keine Beurteilung der Erfindungseigenschaft dar:

"A" Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.

"Y" Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese **Verbindung für einen Fachmann naheliegend** ist.

"X" Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.

"P" Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie „X“), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung **veröffentlicht** wurde.

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben **Patentfamilie** ist.

Ländercodes:

AT = Österreich; **AU** = Australien; **CA** = Kanada; **CH** = Schweiz; **DD** = ehem. DDR; **DE** = Deutschland; **EP** = Europäisches Patentamt; **FR** = Frankreich; **GB** = Vereinigtes Königreich (UK); **JP** = Japan; **RU** = Russische Föderation; **SU** = Ehem. Sowjetunion; **US** = Vereinigte Staaten von Amerika (USA); **WO** = Veröffentlichung gem. PCT (WIPO/OMPI); weitere Codes siehe **WIPO ST. 3**.

Die genannten **Druckschriften** können in der Bibliothek des Österreichischen Patentamtes während der Öffnungszeiten (Montag bis Freitag von 8 bis 12 Uhr 30, Dienstag von 8 bis 15 Uhr) unentgeltlich eingesehen werden. Bei der von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamts betriebenen Kopierstelle können **Kopien** der ermittelten Veröffentlichungen bestellt werden.

Auf Bestellung gibt die von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamts betriebene Serviceabteilung gegen Entgelt zu den im Recherchenbericht genannten Patentdokumenten allfällige veröffentlichte **"Patentfamilien"** (den selben Gegenstand betreffende Patentveröffentlichungen in anderen Ländern, die über eine gemeinsame Prioritätsanmeldung zusammenhängen) bekannt.

Auskünfte und Bestellmöglichkeit zu diesen Serviceleistungen erhalten Sie unter der Telefonnummer

01 / 534 24 - 738 bzw. 739;

Schriftliche Bestellungen:

per FAX Nr. 01 / 534 24 – 737 oder per E-Mail an Kopierstelle@patent.bmvit.gv.at