



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 18 723 T2 2009.01.15

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 537 238 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 18 723.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FI03/00544

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 762 698.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/005545

(86) PCT-Anmeldetag: 04.07.2003

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.01.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.06.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 16.01.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 15.01.2009

(30) Unionspriorität:

20021325 05.07.2002 FI

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR

(73) Patentinhaber:

Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus, Espoo, FI

(72) Erfinder:

SÖDERLUND, Hans, FIN-02940 Espoo, FI;  
SATOKARI, Reetta, FI-21610 Kirjala, FI; KATAJA,  
Kari, FIN-02760 Espoo, FI; TAKKINEN, Kristiina,  
FIN-02200 Espoo, FI

(54) Bezeichnung: METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON POLYNUKLEOTIDEN IN EINEM GEMISCH

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung einer quantitativen Bestimmung, bei der die Mengen oder relativen Anteile von mehr als einer vorliegenden individuellen Ziel-Ribopolynukleotidsequenz in einem Gemisch von Polynukleotidsequenzen unter Verwendung eines Gemisches von Polynukleotid-Sonden mit ungefähr der gleichen Anzahl von Nukleotiden gleichzeitig bestimmt werden. Das Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung von dynamischen Variationen einer Vielzahl von individuellen Organismen sowie verwandter Unterpopulationen, die in einer Probe vorliegen, welche ein Gemisch von Organismen enthält, d. h. eine Ziel-Population. Die Erfindung basiert auf einer quantitativen affinitätsgestützten Lösungshybridisierung mit Trennung bereitstellender Fraktionierung. Die Erfindung steht in engem Zusammenhang mit der in der Internationalen Patentanmeldung WO 02/055734 offenbarten Erfindung, in der die individuellen Polynukleotidsequenzen des Sondengemisches eindeutige und unterscheidbare Größen aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die erkennenden Sonden der vorliegenden Erfindung ungefähr die gleiche Anzahl von Nukleotiden auf. Das Verfahren ist brauchbar im Gesundheitswesen, bei der Umweltforschung, in der pharmazeutischen Industrie und der Nahrungsmittelindustrie, und ist anwendbar für viele andere diagnostische, biotechnologische und wissenschaftliche Zwecke.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Die sich schnell ansammelnde genetische Information in Kombination mit kombinatorischer Chemie und Bioinformatik, welche die Handhabung enormer Informationsmengen ermöglicht, schuf einen Bedarf an neuen, genaueren Verfahren, welche gleichzeitige und/oder sequentielle Untersuchungen von dynamischen Situationen und Variationen in natürlichen Umgebungen ermöglichen. Dementsprechend werden völlig neue Ansätze zur Durchführung von Forschung in der Molekularbiologie, dem Gesundheitswesen, der Epidemiologie, der pharmazeutischen und der Nahrungsmittelindustrie benötigt.

**[0003]** Insbesondere im Gesundheitswesen sowie auch in der pharmazeutischen und der Nahrungsmittelindustrie besteht bei praktizierenden Ärzten, Umweltberatern, Industriehygienespezialisten, Sicherheitsbeauftragten, Gesundheitsinspektoren, Umweltberatern, Tierärzten und/oder anderen Personen, die im Zusammenhang mit der Beurteilung von möglichen Gesundheitsrisiken oder epidemiologischen Risiken arbeiten oder dafür verantwortlich sind, ein Bedarf an neuen, wirksamen Hilfsmitteln zur Bestimmung der Wirkungen von heilenden, sanitären oder anderen Maßnahmen auf ganze Populationen von Organismen. Beispielsweise existiert ein steigender Bedarf an Verfahren und Hilfsmitteln zur Beurteilung der Wirkungen neuer und herkömmlicher Behandlungsmodalitäten, einschließlich sanitärer und heilender Maßnahmen.

**[0004]** Auf der Grundlage der sich ansammelnden Informationen, einschließlich der Verfügbarkeit genetischer Schlüsselemente und des Wissens über deren biologische Rolle und Funktionen, werden laufend neue Verfahren entwickelt. Ein leistungsfähiges neues Hilfsmittel ist die Oligomer-Chip-Technologie. Das gemeinsame Kennzeichen der Mikroarray-Techniken und das Merkmal, das diese von der vorliegenden Erfindung unterscheidet, besteht darin, dass die Sonden oder die Polynukleotidsequenzen, die als Reagenzien verwendet werden, immobilisiert oder an einen festen Träger gebunden sind. Die Immobilisierung der Sonden wirkt als sterische Behinderung und verhindert, dass die Hybridisierung auf stöchiometrische Weise erfolgt, womit eine geringe Ausbeute erzielt wird. Die Oligomer-Chip-Technologie ermöglicht eine gleichzeitige Handhabung enormer Probenmengen, jedoch sind die Ergebnisse nicht quantitativ und ermöglichen keinen quantitativen Vergleich in einem breiten dynamischen Bereich.

**[0005]** Die Prinzipien der affinitätsgestützten Lösungshybridisierung sind allgemein bekannt und wurden beispielsweise in den Patenten US 6,136,531 und US 4,968,602 offenbart. Die Diagnostik und der Nachweis von DNA unter Verwendung massenspektrometrischer Verfahren wurden beschrieben, beispielsweise im Patent US 6,043,031 und in der Internationalen Patentanmeldung WO 99/37663.

**[0006]** Das Patent US 5,807,682 offenbart ein Verfahren, bei dem affinitätsgestützte Lösungshybridisierung und Fraktionierung zum Nachweis einer oder mehrerer Mutationsstellen im gleichen Gen verwendet wird. Da-her sind die Sonden kurze Oligonukleotidsequenzen, und die Hybridisierungstemperatur spielt eine kritische Rolle, was die gleichzeitige Verwendung einer großen Anzahl von Sonden schwierig macht, da mehrere Sonden wahrscheinlich unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen. Eine oder mehrere dieser Sonden, die spezifische Mutationsstellen identifizieren, werden getrennt und über selektive Modifizierung der Sonden mit einem synthetisch hergestellten, ungeladenen Polymer modifiziert, das den Ladungs-/Fraktionszug verändert,

wodurch es den Sonden ermöglicht wird, sich in einem Nicht-Siebmedium mit unterschiedlichen Mobilitätsraten zu bewegen.

**[0007]** Keines der oben erwähnten Verfahren löst das Problem der Bereitstellung eines Verfahrens zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung mehrerer unterschiedlicher Polynukleotide.

**[0008]** In der Internationalen Patentanmeldung WO 02/055734 werden ein Verfahren und ein Testkit zur Lösung des Problems, quantitative Ergebnisse zu erhalten, beschrieben. Die Patentanmeldung offenbart ein Verfahren und einen Testkit, einschließlich der Reagenzien für eine quantitative Bestimmung von Polynukleotiden oder Variationen von deren Mengen in einer Zell- oder Gewebeprobe. Das Verfahren und der Testkit verwenden organisierte Pools löslicher Polynukleotid-Sonden mit eindeutigen, unterscheidbaren Größen, die von 16 bis zu mehreren Tausend Basenpaaren reichen. Das quantitative Verfahren ermöglicht eine vergleichende Bestimmung von Variationen, z. B. hinsichtlich der Transkriptionsprofile oder Expressionsmuster. Das Verfahren beruht auf den variierenden und eindeutigen Größen löslicher Polynukleotid-Sonden. Es ist der Größenunterschied der Sonden, der die Bestimmung der individuellen Nukleinsäuresequenzen ermöglicht.

**[0009]** Es ist bekannt, dass Sonden aus mehr oder weniger konservierten oder hypervariablen Regionen eine Klassifizierung und Organisation von verschiedenen Organismen in phylogenetische Stufen einschließlich Gruppen, Gattungen, Arten oder Unterarten ermöglichen. Eine quantitative Bestimmung der Mengen individueller Organismen, deren Unterpopulationen in einem Gemisch unter Verwendung der Sonden würde Untersuchungen zur dynamischen Variation in Ziel-Populationen ermöglichen. Für solche Bestimmungen gäbe es mehrere nützliche Anwendungen. Leider ist das in der WO 02/055734 offenbarte Verfahren nicht anwendbar auf Sonden, die Polynukleotidsequenzen mit ungefähr der gleichen Anzahl von Nukleotiden darstellen, da eine ausreichende Trennung zum Lesen der Ergebnisse nicht erreicht werden kann.

**[0010]** Folglich besteht die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe in der Bereitstellung eines neuen und wirksamen Mittels, um es Spezialisten, die im Zusammenhang mit Untersuchungen und Bestimmungen möglicher Gesundheitsrisiken und dem Bedarf an Abhilfe oder anderen heilenden Maßnahmen arbeiten oder dafür verantwortlich sind, zu ermöglichen, quantitative Daten für die Bestimmung der Risiken und Abhilfemaßnahmen zu erhalten.

**[0011]** Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens und eines Testkits nicht nur für die quantitative Bestimmung der Mengen und relativen Anteile von individuellen Organismen, oder bestimmter Untergruppen in einer Population, sondern sie ermöglicht auch vergleichende Bestimmungen sequentieller Zeitvariationen in der Population aufgrund interner oder inhärenter Kontrollmechanismen, die in der Zelle stattfinden, oder aufgrund ausgewählter Maßnahmen oder Eingriffe, die extern auf die Organismen oder Populationen von Organismen oder deren Polynukleotide angewendet werden. Vergleichende Bestimmungen von Populationen in einer Probe, die von unterschiedlichen Stellen gewonnen wurde, können über dieses Verfahren ebenfalls erfolgen. Gleichzeitig besteht eine Aufgabe in der Bereitstellung eines sehr sensitiven Tests, der die quantitative Bestimmung sehr kleiner Menge von Analyten-Polynukleotiden ermöglicht, die andernfalls unter der Nachweigrenze liegen würden. Dies wird erreicht durch PCR-Amplifizierung der Sonden, die der Menge von Analyten-Polynukleotiden mit einer zu der Sonde in der Probe komplementären Sequenz entsprechen. Aufgrund der Tatsache, dass die Sonden im Vergleich mit den Analyten-Polynukleotiden in einem Überschuss vorliegen, können sie quantitativ gewonnen und vor der PCR-Amplifizierung freigesetzt werden.

**[0012]** Die Vorteile im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sowie mit dem Verfahren und den Testkits, die in der WO 02/055734 beschrieben sind, beinhalten die Tatsache, dass die Qualität der zu analysierenden Polynukleotidpräparation, insbesondere der RNA, keine kritische Bedeutung hat. Beispielsweise kann RNA, die bekanntermaßen aufgrund ihrer Instabilität eine spezielle Behandlung erfordert, ohne Zugabe irgendwelcher Trennung ermöglichernder Tags für die quantitative Bestimmung verwendet werden. Die Herstellung von Testkits, die keine immobilisierungsschritte und bestimmte im Handel erhältliche Reagenzien enthalten müssen, ermöglicht die Herstellung einfach anpassbarer maßgeschneiderter Tests, bei denen das Augenmerk auf bestimmte Untergruppen von Genen in einem jeweiligen Organismus oder in verwandten Organismen gerichtet ist.

**[0013]** Das Verfahren kann in vollautomatisierten oder halbautomatisierten Anordnungen verwendet werden. Das Verfahren kann bei mehreren Stufen unterbrochen werden. Die Proben und Reaktionsprodukte können aufbewahrt werden, bis ausreichend Daten gesammelt wurden oder es zweckmäßig ist, das Verfahren fortzusetzen und die Ergebnisse aufzuzeichnen.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0014]** Zusammengefasst wird durch die vorliegende Erfindung ein gleichzeitiges, quantitatives Erfassen der Änderungen und Variationen der Mengen und/oder relativen Anteile von mehr als einer individuellen Ribopolynukleotidsequenz in einem Gemisch ermöglicht. Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Mengen und/oder relativen Anteile von individuellen Organismen oder Untergruppen davon aus einer Probe oder einem gemischten Populations-Pools, die/der von unterschiedlichen Stellen oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen wurden, vor oder nach bestimmten internen oder externen Behandlungen oder Eingriffen. Dies ist insbesondere nützlich bei der Untersuchung der Wirkungen und der Einflüsse verschiedener physikalischer und chemischer Stimuli, denen die Ziel-Population ausgesetzt wird, einschließlich Behandlung mit Antibiotika, hygienischen Maßnahmen oder weiteren Eingriffen. Die Erfindung ermöglicht weiterhin die Bestimmung inhärenter Veränderungen in einer Population. Die Erfindung ermöglicht die gleichzeitige vergleichende Bestimmung mehrerer biologischer Phänomene.

**[0015]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht nur quantitativ, sondern kann auch sehr sensitiv gemacht werden und den quantitativen Nachweis von Ribopolynukleotidsequenzen ermöglichen, die in sehr geringen Mengen vorliegen. Die charakteristischen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie dessen Anwendungen werden in den Ansprüchen bestimmt.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0016]** [Fig. 1](#) zeigt die Trennung einzelsträngiger DNA-Fragmente und Polynukleotide mit verschiedenen Fluorophoren durch Kapillarelektrophorese.

**[0017]** [Fig. 2A](#) veranschaulicht den Hybridisierungsvorgang zwischen Sonden (P), die mit Tracern (Stern) versehen sind, und einzelsträngigen RNA-Analyten-Sequenzen, die mit Affinitätsmarkern oder Biotin (B) versehen sind, und die Bildung von Hybriden (H) zwischen den Analyten (A) und den Sonden (P).

**[0018]** [Fig. 2B](#) veranschaulicht den Hybridisierungsvorgang zwischen Sonden (P) mit Tracer-Tags (Stern), die gleichzeitig als Trennung ermögliche Tags fungieren, und mit Affinitäts-Tags oder Biotin (B) versehene doppelsträngige Polynukleotid- oder RNA-Analyten-Sequenzen und die Bildung von Hybriden (H) zwischen den Analyten (A) und den Sonden (P). Sonden, die nicht zu den Analyten-Sequenzen passen oder in molarem Überschuss vorhanden sind, bleiben frei in Lösung.

**[0019]** [Fig. 3A](#) zeigt das Einfangen der mit Affinitäts-Tags (B) versehenen Hybride (H) an einem festen, die Trennung unterstützenden Mittel (SAT), das mit dem Gegenstück des Affinitäts-Tags (B) beschichtet ist.

**[0020]** [Fig. 3B](#) zeigt das Einfangen der mit einem Affinitäts-Tags (B) versehenen Hybride (H) an einem festen, die Trennung unterstützenden Mittel (SAT), das mit dem Gegenstück des Affinitäts-Tags (B) beschichtet ist. Mit Tracer-Tag versehene Sondensequenzen, die nicht mit einer Analyten-Sequenz, die mit einem Affinitäts-Tag versehen ist, hybridisiert haben, werden nicht eingefangen. Die Trennung unterstützenden Mittel (SAT) binden natürlicherweise freie Affinitäts-Tags sowie auch solche mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten, mit denen keine Sondensequenz hybridisiert hat.

**[0021]** [Fig. 4](#) zeigt die Freisetzung durch Elution der mit Tracer-Tags versehenen Sonden (P) von dem festen, die Trennung unterstützenden Mittel (SAT)/das Verbleiben der mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten-Sequenz (A) an dem die Trennung unterstützenden Mittel (SAT) und die mit Tracer-Tag versehene Sonde (P) in Lösung.

**[0022]** [Fig. 5A–B](#) zeigen einen 16 rRNA-Ansatz in der mikrobiellen Ökologie.

**[0023]** [Fig. 5A](#) zeigt ein Operon eines ribosomalen RNA-Gens einschließlich 16S, 23S und 5S rRNA, wobei die variablen Regionen 1–9 der 16S rRNA hervorgehoben sind.

**[0024]** [Fig. 5B](#) zeigt die Struktur von 16S rRNA mit den variablen Regionen, welche die Identifizierung von Arten ermöglichen, und mehr oder weniger konservierte Regionen, welche die Identifizierung von mikrobiellen Gruppen ermöglichen.

**[0025]** [Fig. 6](#) zeigt einen phylogenetischen Stammbaum von Clostridien und verwandten Bakterien.

[0026] [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse, die aus einem Elektropherogramm und aus einer Datendatei erfasst werden können, wenn das erfundungsgemäße vergleichende Verfahren gemäß Beispiel 1 durchgeführt wird. Alle Sonden sind bei der Hybridisierung mit *C. symbiosum* E981051 RNA funktionsfähig. Die Bact- und Erec-Sonden weisen unterschiedliche Größen (18 beziehungsweise 19 Basen) und unterschiedliche Mobilitäten auf. Die elektrophoretische Mobilität der Sonde Erec-5A unterscheidet sich von der der Sonde Erec aufgrund des Anhängens eines A-Schwanzes.

[0027] Die [Fig. 8A](#)-B zeigen das Ergebnis, das aus einem Elektropherogramm und einer Datendatei erhalten werden kann, wenn das erfundungsgemäße vergleichende Verfahren gemäß Beispiel 2 durchgeführt wird.

[0028] [Fig. 8A](#) zeigt das Ergebnis mit den Sonden Bact und Chis. Die Sonde Chis identifiziert nur den Stamm *C. tyrobutyricum* E99908, während die Sonde Bact alle Bakterienstämme identifiziert. Keine der Sonden identifiziert den Pilz *Trichoderma reesei*.

[0029] [Fig. 8B](#) zeigt das Ergebnis mit den Sonden Bact und Chis. Die Sonde Erec identifiziert nur den Stamm *C. symbiosum* E981051, während die Sonde Bact alle Bakterienstämme identifiziert. Keine der Sonden identifiziert den Pilz *Trichoderma reesei*.

[0030] [Fig. 9](#) zeigt die Ergebnisse, die aus einem Elektropherogramm und einer Datendatei erhalten werden können, wenn das erfundungsgemäße quantitative Verfahren gemäß Beispiel 3 durchgeführt wird. Die Signalintensitäten der Sonden Bact und Chis entsprechen der Menge an RNA von *C. tyrobutyricum* E908, die für die Hybridisierung verwendet wurde.

[0031] Die [Fig. 10A](#)-B zeigen die Ergebnisse, die aus einem Elektropherogramm und einer Datendatei erhalten werden können, wenn das erfundungsgemäße qualitative und quantitative Verfahren gemäß Beispiel 4 durchgeführt wird.

[0032] [Fig. 10A](#) zeigt die Ergebnisse, die erhalten werden, wenn RNA von *C. symbiosum* E1051 mit den Sonden Bact und Erec, RNA von *C. tyrobutyricum* E908 mit den Sonden Bact und Chis, und eine RNA von *C. butyricum* E908, *C. symbiosum* E1051 und *C. lituseburens* E1853 umfassende mikrobielle Population mit den Sonden Bact, Chis und Erec analysiert wird. Die Sonde Bact identifiziert alle Stämme, während die Sonde Chis nur den Stamm E908 und die Sonde Erec nur den Stamm E1051 identifiziert. Die Menge an Fluorophoren, welche die Sonden Bact und Chis markieren, ist gleich, während die der Sonde Erec geringer ist. Der Anteil an RNA von jedem Stamm ist als Prozentsatz der für die Hybridisierung verwendeten Gesamt-RNA angegeben.

[0033] [Fig. 10B](#) zeigt die Ergebnisse, die erhalten werden, wenn eine *C. tyrobutyricum* E908 und *C. symbiosum* E1051 umfassende mikrobielle Population mit den Sonden Bact und Chis analysiert wird. Die Sonde Bact identifiziert beide Stämme, während die Sonde Chis nur den Stamm E908 identifiziert. Der Anteil an RNA von jedem Stamm ist als Prozentsatz der für die Hybridisierung verwendeten Gesamt-RNA angegeben.

[0034] [Fig. 11](#) zeigt den halbautomatisierten Ablauf des Verfahrens als Flussdiagramm.

[0035] [Fig. 12](#) zeigt die Ergebnisse, die aus einem Massenspektrogramm und einer Datendatei bei Durchführung des erfundungsgemäßen qualitativen und quantitativen Verfahrens gemäß Beispiel 5 erfasst werden können. Die Signalintensitäten der Sonden Bact und Chis entsprechen deren Konzentrationen in der Probe.

[0036] [Fig. 13](#) ist eine schematische Darstellung der Herstellung der Sonden über PCR.

[0037] [Fig. 14](#) zeigt Elektropherogramme, welche die Flächen (Fluoreszenzeinheiten) von Sonden aus Assays mit der gleichen Menge von mRNA ohne (nicht amplifiziert) und mit PCR-Amplifizierung (= 15 PCR-Zyklen) und eine Negativkontrolle zeigen. Die Proben wurden auf einem genetischen Analysegerät ABI310 untersucht.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0038] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe weisen die Bedeutung auf, die sie üblicherweise auf dem Gebiet der rekombinanten Gentechnologie und der Nukleinsäure-Hybridisierungstechnologie haben. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden jedoch einige Begriffe breiter oder in etwas unterschiedlicher Art verwendet. Daher werden einige der Begriffe nachfolgend detaillierter definiert.

## DEFINITIONEN

**[0039]** Der Begriff „Ziel-Population“ bedeutet ein Gemisch mehrerer unterschiedlicher Organismen, die in einer Probe vorhanden sind, welche unterschiedliche, mehr oder weniger verwandte Organismen umfasst, die in Gruppen oder Unterpopulationen organisiert sein können, beispielsweise entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft. Beispiele für solche gemischten Ziel-Populationen sind in allen Roh-Proben zu finden, die beliebige lebende oder tote Organismen enthalten oder enthielten, einschließlich Bakterien, Pilzhefen, Pflanzen und Tiere, usw. Umweltstudien können beispielsweise mit verseuchten Bodenproben durchgeführt werden. Bakterienpopulationen, welche die Eingeweide bewohnen, können im Mittelpunkt des Interesses von Hygienefachleuten stehen. Die Mengen oder relativen Anteile von *Salmonella*, *Shigella* und *E. coli* in einer Probe zeigen die Hygienestandards und möglichen Gesundheitsrisiken in der Nahrungsmittelindustrie, in Restaurants und Küchen an. Hefepopulationen können auf das Vorhandensein von *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, usw. überprüft werden. Diese Information ist wichtig, z. B. um das Vorhandensein von Kontaminanten auszuschließen. Die Mengen oder relativen Anteile von *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* und weiteren Pilzen kann als Hinweis auf eine Pilzkontamination in Gebäuden verwendet werden. Eine weitere nützliche Anwendung des Verfahrens, die letztendlich lebensrettende Ergebnisse liefert, ist die Bestimmung der Wirkung bestimmter Antibiotika auf eine Probe von einem Patienten, der an einer Krankheit leidet, die durch antibiotikaresistente Bakterien verursacht wird. Sogar Pflanzen und Tiere einschließlich des Menschen stellen Populationen dar, die durch das erfindungsgemäße Verfahren in Gruppen zusammengefasst und untersucht werden können.

**[0040]** Die Organismen können beliebige einzellige oder mehrzellige Organismen mit charakterisierten, teilweise charakterisierten oder nicht charakterisierten Genomen umfassen, die vorzugsweise hochkonservierte, teilweise konservierte oder hypervariable Regionen umfassen, welche die Identifizierung der Organismen und deren Organisation in Gruppen oder Unterpopulationen ermöglichen. Die Ziel-Population kann von beliebigen Proben stammen, die lebende Organismen, einschließlich Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren sowie Menschen, umfassen oder umfassten. Die Genome von *E. coli*, *S. cerevisiae* und Menschen repräsentieren Organismen mit Genomen, die gegenwärtig mehr oder weniger vollständig charakterisiert sind. Das Vorliegen von Polymorphismen ist ein besonders interessanter Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

**[0041]** Erfindungsgemäß wird die Population in Form eines Polynukleotid-Gemisches untersucht, das aus einer die Population umfassenden Probe isoliert wurde. Das Polynukleotid-Gemisch der Probe umfasst individuelle Polynukleotidsequenzen oder Gruppen davon, die mit gemeinsamen, mehr oder weniger konservierten Sonden identifiziert werden können. Die Population kann in Unterpopulationen unterteilt werden, die unterschiedliche phylogenetische Stufen repräsentieren, einschließlich Gruppen, Gattungen, Arten oder Unterarten. Durch Bestimmung der Mengen oder relativen Anteile der individuellen Polynukleotidsequenzen oder Untergruppen davon ist es möglich, dynamische Variationen hinsichtlich der Mengen und/oder relativen Anteile von Organismen oder individuellen Polynukleotidsequenzen, die in einem Gemisch von Polynukleotidsequenzen oder in einer Ziel-Population erfolgen, durch Entnahme sequentieller Proben oder durch Vergleichen von Proben von unterschiedlichen Stellen oder Orten zu bestimmen.

**[0042]** Es ist anzumerken, dass die Polynukleotidsequenzen in der Probe, d. h. die Analyten, jede beliebige Größe aufweisen können. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um mehr oder weniger fragmentierte Polynukleotidsequenzen. Bei der vorliegenden Erfindung sind die für eine Identifizierung verwendeten Reagenzien oder Sonden Polynukleotidsequenzen, die ungefähr die gleiche Anzahl von Nukleotiden aufweisen. Die Polynukleotid-Sonden werden eindeutig gemacht durch unterscheidbare Größen, indem sie mit einer Trennung ermöglichten Tags versehen werden, die beispielsweise Polynukleotidsequenzen sind, die als Affinitäts-Tags, Primer-Tags oder einfach als eine Trennung ermöglichte Tracer-Tags fungieren können. In der vorliegenden Erfindung umfassen Oligonukleotide 2–12 Basenpaare, während Sonden mit mehr als 15, z. B. 18–35 Basenpaaren bevorzugt sind. Insbesondere in sensitiveren Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei denen eine PCR-Amplifizierung verwendet wird, sollten die Sonden mehr Basenpaare aufweisen, vorzugsweise wenigstens 30 Basenpaare. Daher sind die Sonden der vorliegenden Erfindung als Polynukleotidsequenzen definiert. Im Prinzip gibt es keine obere Grenze, aber es versteht sich von selbst, dass kurze Sonden kosteneffizienter und einfacher in der Herstellung und Handhabung sind. Lange Sonden sind durch Anhängen kurzer, eine Trennung ermöglichter Tags auch schwieriger unterscheidbar zu machen. Aus diesem Grund besteht das besondere Problem, das durch das charakteristische Merkmal der vorliegenden Erfindung gelöst wird, nicht in der Länge der Polynukleotid-Sonden, sondern darin, wie man Polynukleotidsequenzen mit ungefähr der gleichen Anzahl von Nukleotiden ausreichend unterscheidbar macht, um ein genaues Erfassen der Ergebnisse zu ermöglichen.

**[0043]** Der Begriff „Pool“ bedeutet ein Gemisch, eine Untergruppe oder eine Bibliothek von löslichen Polynukleotid-Sonden oder Polynukleotid-Sonden, die in Lösung gebracht werden können, d. h. relativ kurzer Polynukleotide, die ungefähr die gleiche Anzahl von Nukleotiden aufweisen, d. h. die gleiche Größe, welche zu den gewünschten Ziel-Polynukleotidsequenzen in der Probe komplementär sind und daher in der Lage sind, diese zu identifizieren. Jeder Pool umfasst eine optional vorgegebene Anzahl von Polynukleotid-Sonden. Eine praktische vorgegebene Anzahl stellen beispielsweise ungefähr 10 Sonden dar. Jedoch kann das Verfahren mit bis hinunter zu zwei oder drei Sonden durchgeführt werden, aber drei bis fünf Sonden in jedem Pool stellen eine geeignete Anzahl von Sonden dar. Testkits mit Pools, die Hunderte löslicher Sonden umfassen, können im Rahmen des quantitativen und/oder vergleichenden erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt werden. Wenn es möglich ist, Pools herzustellen, die Tausende von Sonden umfassen, scheint eine bevorzugte obere Grenze bei ungefähr 300–500 unterschiedlichen Sonden zu liegen, um eine zufriedenstellende Trennung bei der Erfassung der Ergebnisse zu erzielen. Anders ausgedrückt muss es möglich sein, die Sonden durch Massenspektrometrie, Chromatographie oder elektrophoretische Verfahren voneinander zu unterscheiden. Die Pools werden als „organisiert“ bezeichnet, weil die Inhalte jedes Pools bekannt sind und sich auf organisierte, definierte und erkennbare Weise in deren jeweiligen Gefäßeln befinden, die markiert und benannt sind, um deren Identifizierung zu ermöglichen. Wenn beispielsweise Serien von Pools auf identischen Mikrowell-Platten hergestellt werden, ist jedes Well nicht nur durch dessen Inhalt, sondern auch durch dessen Position charakterisiert. Daher ist eine Identifizierung auf genaue Weise möglich.

**[0044]** In der vorliegenden Erfindung bedeuten die „Pools von Polynukleotid-Sonden“ einen Satz oder ein Gemisch aus löslichen Polynukleotidsequenzen, d. h. DNA-Fragmenten, die aus ausgewählten Polynukleotid-Sonden bestehen, welche in der Lage sind, die gewünschten Gruppen von Organismen zu identifizieren, die eine Polynukleotidsequenz gemeinsam haben, z. B. konservierte Motive. Solche gemeinsamen Polynukleotidsequenzen sind allgemein bekannt und umfassen mehr oder weniger konservierte Regionen, die insbesondere in ribosomaler RNA (rRNA), usw. anzutreffen sind, aber auch in anderen Geweben und Organellen vorliegen, die Polynukleotidsequenzen enthalten.

**[0045]** Ribosomen kommen in allen lebenden Zellen vor und enthalten bekannterweise Proteine und ribosomale RNA (rRNA). Die rRNA enthält wiederum abwechselnd konservierte und variable Regionen, wobei beispielsweise neun variable Regionen in der bakteriellen 16S rRNA anzutreffen sind (**Fig. 5**). Die rRNA-Gene (rDNA) sind in rrn-Operons organisiert, in denen rDNA-Gene durch hypervariable Spacer-Regionen getrennt sind. Die meisten Organismen weisen mehrere rrn-Operons in ihrem Genom auf, und in den meisten Fällen sind die intragenomischen Sequenzen der strukturellen rRNA hochgradig ähnlich. Die Analyse von rDNA-Sequenzdaten, insbesondere denen von rDNA der kleinen Untereinheit, enthüllte variable Regionen in den Gensequenzen, die für unterschiedliche phylogenetische Stufen spezifische Information enthalten; Gruppen, Gattungen, Arten oder Unterarten (**Fig. 6**). Dementsprechend können Sequenzen anzutreffen sein, die für bestimmte Organismen einzigartig sind. Dies wurde benutzt, um art- und gruppenspezifische Nukleinsäure-Sonden für den Nachweis und die Identifizierung von Bakterien und anderen Mikroorganismen zu entwerfen. Solche mehr oder weniger konservierten Regionen oder Motive, die einer Vielzahl weiterer Organismen mehr oder weniger gemeinsam ist, ermöglichen es, die individuellen Organismen in einer Ziel-Population in bestimmte Gruppen oder Unterpopulationen zu organisieren. Daher wird die Identifizierung und vergleichende Bestimmung von Variationen individueller Organismen und Untergruppen in der Ziel-Population ebenfalls ermöglicht. DNA und RNA aus anderen Quellen enthalten ebenfalls mehr oder weniger variable oder konservierte Regionen, die für eine spezifische Identifizierung individueller Organismen oder bestimmter Untergruppen in Ziel-Populationen verwendet werden können. Polynukleotid-Sonden für andere Gene und die entsprechende Boten-RNA (mRNA) können verwendet werden, um funktionale Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotikaresistenz in Bakterien oder Gen-Allel-Polymorphismen zu überwachen.

**[0046]** Der Begriff „Überschuss“ bedeutet, dass die Polynukleotid-Sonden im Vergleich mit den Analyten-Polynukleotiden in der Probe in einem molaren Übermaß vorliegen, um eine genaue Erfassung zu ermöglichen, welche eine Voraussetzung für die quantitative Bestimmung darstellt. Für eine genaue Erfassung müssen die löslichen Polynukleotid-Sonden in einem molaren Übermaß oder Überschuss vorliegen und unterscheidbar sein, beispielsweise durch deren Masse.

**[0047]** In der vorliegenden Erfindung wird die „Unterscheidbarkeit“ dadurch erreicht, dass die Sonden mit so genannten „Trennung ermöglichen Tags“ versehen werden. Die Polynukleotid-Sonden der vorliegenden Erfindung, welche die Identifizierung verwandter Gruppen von Organismen ermöglichen und bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung besonders brauchbar sind, weisen im Allgemeinen ungefähr die gleiche Anzahl an Nukleotiden auf. Vor der Verwendung können die Polynukleotidsequenzen modifiziert und mit Merkmalen versehen werden, die sie unterscheidbar machen in einem Trennungs-, Fraktionierungs- oder Erfas-

sungssystem auf der Grundlage von Größe. Dies kann dadurch erreicht werden, dass man am Ende der Polynukleotidsequenzen „Trennung ermöglichte Tags“ anhängt, welche die Masse der Sonden verändern und diesen dadurch in den verwendeten Fraktionierungs-, Trennungs- oder Erfassungssystemen unterschiedliche Mobilitäten verleihen. Die eine Trennung ermöglichen Tags sollten vorzugsweise gleichzeitig als Affinitäts-, Tracer- oder Primer-Tags fungieren. Vorzugsweise sollten die Tags mehr als eine der gewünschten Funktionen aufweisen.

**[0048]** Beispielsweise können die Polynukleotid-Sonden, die im Vergleich mit den Ziel-Polynukleotiden, welche quantifiziert werden, im Überschuss vorliegen, mit Polynukleotidsequenzen versehen werden, einschließlich polyA, polyT, polyU, polyC, polyG, gemischten Polynukleotiden, z. B. polyATs, polyGCs oder weiteren Nukleotidkombinationen oder weiteren Oligonukleotidsequenzen einschließlich beliebiger Gemische davon. Zusätzlich zu ihrer Eigenschaft als Trennung ermöglichte Tags können diese Oligonukleotidsequenzen als Affinitäts-Tags und Primer-Tags fungieren. Tracer-Tags oder -markierungen, z. B. Fluorophore verschiedener Größen, ermöglichen nicht nur einen Nachweis, sondern sind auch brauchbar als eine Trennung ermöglichte Tags, wenn sie ausreichende Unterschiede hinsichtlich ihrer Größe oder Masse aufweisen. Aminosäuren oder Peptide, welche die Hybridisierungsreaktion nicht stören, können als eine Trennung ermöglichte Tags verwendet werden, sie können jedoch auch als Affinitäts-Tags und Tracer-Tags fungieren. Es wurden mehrere Strategien für die Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten beschrieben, die auf einfache Weise mit Hinblick auf die vorliegende Erfindung angepasst werden können. Um die Hybridisierung nicht zu stören, empfiehlt es sich, den eine Trennung ermöglichten Tag nur an einem Ende der Sonde anzuhängen. Wenn jedoch Primer als Tags verwendet werden, befinden sie sich natürlich an beiden Seiten der Sonde.

**[0049]** „Tracer-Tag“ bedeutet eine Markierung oder einen Marker, die/der den Nachweis oder das Erfassen der Sonde ermöglicht. Gemäß der grundlegenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Tracer-Tag ein nachweisbarer oder erfassbarer Marker oder eine nachweisbare oder erfassbare Markierung wie beispielsweise ein Fluorophor. Es ist anzumerken, dass der Tracer-Tag sich vorzugsweise an einem Ende der Sonde befindet. Die Sonde ist endständig mit einem Tag versehen, um zu verhindern, dass der Tag die Hybridisierungsreaktion zwischen der Sonde und dem Analyten stört. In der vorliegenden Erfindung kann der Tracer-Tag auch als eine Trennung ermöglichter Tag fungieren, indem er den Sonden unterschiedliche Massen und dadurch unterschiedliche Mobilitäten verleiht.

**[0050]** „Tracer-Tags“ bedeutet Markierungen oder Marker, die sichtbar oder auf andere Weise nachweisbar sind, d. h. direkt erfassbar sind oder bei Kontakt mit weiteren Reagenzien nachweisbar oder erfassbar gemacht werden können. Tracer-Tags, die durch ihre elektrochemischen oder magnetischen, einschließlich ihrer massenspektrometrischen Eigenschaften, durch Fluoreszenz, Lumineszenz, Infrarotsorption, Radioaktivität oder enzymatische Reaktionen erfassbar sind, sind besonders geeignet. Es ist jedoch ersichtlich, dass beliebige weitere, hier nicht erwähnte Tracer-Tags, die auf einfache Weise über automatisierte Mittel oder Instrumente erfassbar sind, verwendet werden können. Es ist anzumerken, dass kein Tracer-Tag erforderlich ist, wenn massenspektrometrische oder chromatographische Verfahren für die Erfassung verwendet werden, jedoch müssen die Polynukleotid-Sonden, welche die gleiche Anzahl von Nukleotiden aufweisen, mit weiteren, eine Trennung über Größe oder Masse ermöglichten Gruppen versehen werden.

**[0051]** Fluoreszierende Farbstoffe wie beispielsweise 2-((Iodacetyl)amino)ethyl)aminonaphthylen-1-sulfonsäure (1,5-IEDANS), Fluorescein, Bodipy, FTC, Texas Red, Phycoerythrin, Rhodamine, Carboxytetramethylrhodamin, DAPI, Indopyras-Farbstoffe, Cascade Blue, Oregon Green, Eosine, Erythrosin, Pyridyloxazole, Benzoxydiazole, Aminonaphthalene, Pyrene, Maleimide, Coumarine, Lucifergrau, Propidiumiodid, Porphyrine, CY3, CY5, CY9, Lanthanide, Cryptate, Lanthanid-Chelate, oder Derivate oder Analoga der Tracer-Moleküle sind Beispiele für geeignete Tracer-Tags. Die fluoreszierenden Polynukleotid-Sonden sind besonders brauchbar bei der automatisierten oder halbautomatisierten Erfassung der Ergebnisse in Kombination mit kontinuierlichen Fließsystemen und -instrumenten. Fluorophore mit Größen und Massen, die sich in einem solchen Ausmaß unterscheiden, dass sie die Polynukleotid-Sonden unterscheidbar machen, sind unter den oben genannten zu finden. Insbesondere Phosphoramidite, wie beispielsweise 6-FAM<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup> und PET<sup>TM</sup> (die alle Marken von Applied Biosystems darstellen) können zur endständigen Markierung von Polynukleotid-Sonden verwendet werden.

**[0052]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung müssen sehr kleine Mengen des Analyten-Nukleotids identifiziert werden, und ein sensitiverer Test ist erforderlich. In solchen Fällen wird die Sonde mit einem Paar endständiger Primer-Sequenzen oder „Primer-Tags“ versehen, welche die Amplifizierung der quantitativ gewonnenen Sonden ermöglichen. Auch in diesem Fall können die Sonden weiter mit optionalen Tracer-Tags versehen werden, beispielsweise mit Fluorophoren unterschiedlicher Größen, insbesondere wäh-

rend eines PCR-Amplifizierungsprozesses. Diese an den 3'-terminalen und 5'-terminalen Enden der Sonde befindlichen Primer-Tags ermöglichen die Amplifizierung der Sonden nach einer quantitativen Gewinnung der Sonden, die mit den mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten hybridisieren. Eine der Primer-Sequenzen kann ziemlich kurz sein, während die andere länger sein und gleichzeitig als Affinitäts-Tag und als eine Trennung ermöglicher Tag fungieren kann. Gemäß dieser Ausführungsform können die Sonden während oder nach der Amplifizierung mit einem optionalen Tracer-Tag versehen werden. Wenn Massenspektrometrie für die Erfassung verwendet wird, sind keine Tracer erforderlich. Es reicht aus, dass die individuellen Sonden mit Tags versehen sind, die eine Trennung ermöglichen, beispielsweise Oligonukleotiden, die als Primer oder Affinitäts-Tags fungieren.

**[0053]** Aminosäuren und Peptide, welche die Hybridisierungsreaktion nicht stören, können angehängt werden, vorzugsweise am Ende der Polynukleotid-Sonden. Für die Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten wurden mehrere Strategien beschrieben, die alle in einfacher Weise mit Hinblick auf die vorliegende Erfindung angepasst werden können. (Siehe z. B. Lönnberg, H. Annu. Rep. Prog. Chem., Sect B 1999, 95, 207–234 und 2001, 97, 177–208). Ähnliche chemische Verfahren zur Herstellung von Sonden verschiedener Größen können verwendet werden, um auch andere organische chemische Reste als Peptide mit den Polynukleotiden zu verknüpfen. Die Aminosäure- oder Peptidsequenzen können gleichzeitig als „Affinitäts-Tags“ und/oder „Tracer-Tags“ fungieren. Die Aminosäure Histidin ist ein brauchbares Beispiel. Peptide einschließlich Liganden können als „Affinitäts-Tags“ verwendet werden. Peptide mit enzymatischen Aktivitäten können als „Tracer-Tags“ fungieren. Peptide, die als Antikörper-Antigen-Paare fungieren, können als Affinitäts- und Tracer- sowie als Trennung ermöglichte Tags fungieren.

**[0054]** Der Begriff „Analyten“ bezeichnet die Polynukleotidsequenzen, die von einer Ziel-Population umfassenden Probe erhalten werden. Das Gemisch aus Polynukleotidsequenzen aus der Ziel-Population kann beliebige Nukleotidsequenzen, (DNA oder RNA), einschließlich Boten-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) umfassen, jedoch sind ribosomale RNA (rRNA) oder diese kodierende Gene besonders brauchbar. Die Ziel-Population kann an unterschiedlichen Stellen oder Orten, und zu unterschiedlichen Zeitpunkten, z. B. vor und nach einer Behandlung, die eine Wirkung auf die Ziel-Population haben sollte, als Probe genommen werden. Die Polynukleotidsequenzen in der Probe der Ziel-Population werden über an sich bekannte Verfahren isoliert, z. B. (Sambrook, J. und Russel, D., Molecular Cloning – A Laboratory Manual, dritte Auflage (2001)). Die Zubereitung der die Analyten-Polynukleotidsequenzen umfassenden Probe kann dahingehend modifiziert werden, dass sie einen geeigneten Affinitäts-Tag umfasst.

**[0055]** Die Analyten-Polynukleotide können über eine chemische Reaktion mit Affinitäts-Tags versehen werden, bei der z. B. Biotin-Reste kovalent mit den zu untersuchenden Polynukleotiden oder Nukleinsäuremolekülen unter Bildung von modifizierten Polynukleotid-Analyten, d. h. biotinylierten Polynukleotid-Analyten, verknüpft werden. Um zu vermeiden, dass sterische Behinderungen die Hybridisierungsreaktion zwischen den mit Tracern versehenen Sonden und den Polynukleotid-Analyten stören, werden die Polynukleotid-Analyten mit einem kleineren Gegenstück eines Affinitätspaares markiert, während dessen größeres Gegenstück mit einem festen Träger oder einem eine Trennung unterstützenden Mittel verbunden wird. Zur Untersuchung der Zusammensetzung von Populationen, die durch Polynukleotidsequenzen repräsentiert werden, können die mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten-Polynukleotidsequenzen Polynukleotidsequenzen jeglicher Art sein, einschließlich Gesamt-RNA- oder rRNA- oder Genpräparationen. Der Affinitäts-Tag und sein Gegenstück oder Paarbildner stellen ein sogenanntes Affinitätspaar bereit, wodurch der Einfang von mit Affinitäts-Tags versehenen Substanzen an einen festen Träger ermöglicht wird, der in diesem Fall als Trennung unterstützendes Mittel bezeichnet wird.

**[0056]** „Affinitätsgestützte Lösungshybridisierung“ ist ein allgemein bekanntes Verfahren, bei dem man die Hybridisierungsreaktion zwischen einer Sonde und einer Analyten-Nukleotidsequenz ohne irgendwelche sterische Behinderungen in einer Lösung stattfinden lässt. Der Affinitäts-Tag ermöglicht das Einfangen der Hybride auf einer festen Phase, welche die Trennung und das Waschen der eingesammelten Nukleinsäuren ermöglicht, und anschließend können die eingefangenen Hybride oder Sonden freigesetzt und gemessen werden.

**[0057]** „Affinitäts-Tags“, die auch als Trennung ermöglichte Tags verwendbar sind, finden sich unter Oligonukleotidresten, Aminosäureresten wie beispielsweise Histidin, Peptiden oder Zuckerresten und umfassen auch Haptene wie beispielsweise Biotin. Einige dieser Tags können auch als Tracer-Tags fungieren. Beispielsweise können markierte oder nichtmarkierte Oligonukleotidreste als Affinitäts-Tags, Primer-Tags oder eine Trennung ermöglichte Tags verwendet werden.

**[0058]** Der Begriff „Affinitäts-Tag“ bedeutet, dass die Analyten-Polynukleotide mit einer Markierung oder einem Marker versehen werden, die/der eine hohe Affinität zu einer anderen Substanz aufweist. Anders ausgedrückt besteht eine Neigung des Affinitäts-Tags, eine starke Bindung mit dessen Gegenstück oder ein Affinitätspaar zu bilden. Die starken Bindungen, die zwischen Affinitätspaaren gebildet werden, ermöglichen es dem Affinitätspaar, als Mittel zum Einfang der gewünschten Substanzen zu fungieren. Ein brauchbares Affinitätspaar ist beispielsweise Biotin-Avidin oder Biotin-Streptavidin, jedoch können weitere synthetische oder nicht-synthetische „Affinitätspaare“ oder bindende Substanzen ebenfalls verwendet werden. Geeignete „Affinitätspaare“ sind zu finden unter Rezeptoren und Liganden, Antigenen und Antikörpern sowie unter Fragmenten davon. Die bevorzugten „Affinitäts-Tags“ der vorliegenden Erfindung umfassen kleinere Moleküle wie beispielsweise Biotin, Histidin, Oligonukleotide, Haptene, Glycane, usw., während die bevorzugten Gegenstücke der „Affinitäts-Tags“ größere Moleküle umfassen, wie beispielsweise Avidin, Streptavidin, Metallchelate, Antikörper, Lektine, usw., und zum Beschichten des „Trennung unterstützenden Mittels“ verwendet werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugte Affinitäts-Tags sind Polynukleotide, wie beispielsweise poly(dA), poly(dT), poly(dG), poly(dC) und Gemische davon. Zusätzlich zu ihrer Eigenschaft als Affinitäts-Tags stellen sie Trennung ermöglichte Tags verschiedener Größen bereit.

**[0059]** Der Begriff „Trennung unterstützendes Mittel“ bedeutet vorzugsweise feste Träger, wie beispielsweise Microbeads, Latex-Partikel, magnetische Partikel, Fasern, Stifte, Stäbe, Mikrowells, Affinitätssäulen, die versehen sind mit dem Gegenstück oder Affinitäts-Gegenstück des „Affinitäts-Tags“. Optional kann das eine Trennung ermöglichte Mittel z. B. Phasenseparations- oder elektrophoretische Mittel umfassen, die vom Vorliegen des Gegenstücks des Affintäts-Tags abhängig sind.

**[0060]** Die Pools „löslicher Polynukleotid-Sonden“ werden vorzugsweise unter Verwendung verschiedener Verfahren, einschließlich Isolierung aus der Natur, synthetischen Verfahren, PCR-Techniken oder Techniken rekombinanter DNA oder Kombinationen davon (Sambrook, J. und Russel, D., Molecular Cloning – A Laboratory Manual, dritte Auflage (2001)), aus einer mehr oder weniger charakterisierten Bibliothek von Polynukleotidsequenzen hergestellt. Die verschiedenen Polynukleotid-Sonden, die zum Aufzeigen einer spezifischen Untergruppe oder eines Individuums in der Lage sind, werden in Pools angeordnet oder befinden sich darin, so dass alle Polynukleotid-Sondenmoleküle, die eine bestimmte Unterpopulation repräsentieren, eine eindeutige oder charakteristische Größe oder Masse aufweisen, die deren Identifikation bei Verwendung von Chromatographie, Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie ermöglichen.

**[0061]** Wenngleich die Verwendung charakterisierter Sonden bevorzugt ist, ist es möglich, Sonden-Pools für wenig charakterisierte Genome auf die gleiche Weise wie in der WO 02/055734 beschrieben herzustellen und anschließend diese Polynukleotid-Sonden mit den oben beschriebenen, Trennung ermöglichen Tags zu versehen, wodurch deren Trennung und Erfassung ermöglicht wird.

**[0062]** Der Begriff „modifizierte Polynukleotidsequenzen“ bedeutet, dass der Satz synthetisch herstellter Polynukleotid-Sonden in geeigneter Weise modifiziert werden kann, beispielsweise kann das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nukleotidsequenzen durch Peptidbindungen ersetzt werden oder aus so genannten fixierten („locked“) Nukleosidanalogen hergestellt werden. Modifizierte Polynukleotide sind, beispielsweise, Peptid-Nukleinsäuren (PNAs), die beispielsweise in der WO 96/20212 beschrieben sind, oder fixierte („locked“) Nukleinsäuren (LNA), die beispielsweise in der WO 99/14226 beschrieben sind. Die modifizierten Polynukleotid-Sonden können in geeigneter Weise beim Verfahren und den Testkits der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Sie können unter Verwendung von genetischer DNA oder cDNA als Modellen kopiert werden. Sie weisen oftmals verbesserte Eigenschaften auf, einschließlich besserer Stabilität, und sie können auch den Vorteil haben, dass sie auf einfache Weise als unmodifizierte DNA-Sonden mit Tracer-Tags versehen werden können.

**[0063]** Der „lösliche organisierte Pool“, der „lösliche Polynukleotid-Sonden oder Polynukleotid-Sonden, die in Lösung gebracht werden können“ umfasst, kann in jeder beliebigen Art von Gefäßen enthalten sein, die völlig voneinander getrennt oder miteinander entweder auf nicht fixierte oder in einer fest fixierten Weise verbunden sein können. In seiner einfachsten Form umfasst ein organisierter Pool ein oder mehrere Gefäße, beispielsweise Reagenzgläser oder Flaschen, die auf eine nicht fixierte Weise miteinander verbunden sein können, beispielsweise in einem Ständer für Reagenzgläser. Ein praktisches Beispiel für organisierte, in Gefäßen befindliche Pools, die miteinander auf eine fest fixierte Weise verbunden sind, wird bereitgestellt durch die Kompartimente oder Wells in oder auf einer Mikrotiterplatte. Wie oben ausgeführt liegen die organisierten Pools vorzugsweise auf eine organisierte Weise vor, beispielsweise in den Wells auf einer Mikrotiterplatte. Die löslichen Pools sind in einer solchen Weise organisiert, dass jeder Pool und jede Polynukleotid-Sonde in dem Pool eindeutig identifizierbar ist. Mikrotiterplatten mit ihren Wells sind typische, im Handel erhältliche Ausführungsfor-

men, welche die Organisation und die gleichzeitige Handhabung vieler organisierter Pools ermöglichen. Natürlich können weitere maßgeschneiderte, auf passendere Weise organisierte Pools mit mehrfachen Kompartimenten entwickelt und konstruiert und mit geeigneten Markierungen und Anweisungen für die Verwendung versehen werden.

**[0064]** Die Ergebnisse werden über optionale automatische oder halbautomatische Mittel oder Instrumente erfasst, einschließlich chromatographischer Techniken sowie auch Massenspektrometrie. Das gesamte System kann vollständig oder teilweise automatisiert sein. Die Techniken zur Unterscheidung der Sonden umfassen Trennung oder Fraktionierung in Siebmedien oder Nicht-Siebmedien mit oder ohne Elektrophorese. Siebmedien umfassen chromatographische Trennung in einer Matrix, wie beispielsweise einem Gel, das die Sonden auf der Grundlage der Größe oder Masse trennt. Elektrische Ladungen sind für die Trennung nicht wesentlich, selbst wenn sie die Mobilitätsrate der Sonden erhöhen können. In einem Nicht-Siebmedium, bei dem es keine Matrix gibt, welche das zu fraktionierende Material siebt, bewegen sich Sonden mit einem konstanten Verhältnis zwischen Masse und Ladung alle unabhängig von der Größe mit der gleichen Rate. Bei Polynukleotidsequenzen verändert das Anhängen von Oligonukleotiden dieses Verhältnis von Masse zu Ladung nicht. Um unterschiedliche Mobilitäten in Nicht-Siebmedien zu erzielen, müssen die Sonden daher mit ungeladenen Substanzen versehen werden, die es ihnen ermöglichen, sich mit verschiedenen Raten zu bewegen. Dieser Mobilitätsunterschied wird nicht erreicht durch das Anhängen von Primer-Tags oder Affinitäts-Tags, die aus Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Größen bestehen, oder durch das Anhängen von Substanzen, die das Verhältnis von Masse zu Ladung im Vergleich mit dem normalen Verhältnis bei Nukleotidsequenzen nicht verändern.

**[0065]** Daher sollten die Verfahren zur Fraktionierung und Trennung der quantitativ gewonnenen Sonden in der vorliegenden Erfindung im Hinblick auf die oben angesprochenen Faktoren angepasst werden. Die bevorzugten Verfahren zur Unterscheidung Sonden im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind daher die Trennung durch Massenspektrometrie oder Chromatographie in Siebmedien. Wenn eine Trennung durch Kapillarelektrophorese erzielt wird, besteht die bevorzugte Ausführung in der Verwendung eines Siebmediums, welches die Mobilität der Sonden mit größeren Molekülmassen verringert. Herkömmliche Gelelektrophorese in beispielsweise Polyacrylamid stellt ebenfalls ein bevorzugtes Verfahren dar. Das wesentliche Merkmal der organisierten Pools von Sonden besteht darin, dass alle Sonden in einem einzigen Pool über das gewählte Fraktionierungsverfahren getrennt und quantifiziert werden können, wobei das Prinzip, über welches die Fraktionierung erreicht wird, nicht entscheidend ist.

#### ALLGEMEINE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0066]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, welches die gleichzeitige, quantitative Bestimmung der Mengen oder relativen Anteile von mehr als einem individuellen Ribopolynukleotid oder Untergruppen davon in einem Gemisch von Polynukleotidsequenzen unter Verwendung von Polynukleotid-Sonden mit ungefähr der gleichen Größe ermöglicht. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung repräsentieren die Ribopolynukleotidsequenzen ausgewählte individuelle Organismen, Untergruppen, Gattungen, Arten oder Stämme, die in einer Probe vorliegen, die eine Ziel-Population mehr oder weniger verwandter Organismen repräsentiert. Variationen hinsichtlich der Mengen an Untergruppen oder individuellen Organismen in der Population aufgrund von inhärenten Ursachen, wie beispielsweise Altern, oder externen Stimuli, wie beispielsweise Behandlung mit Antibiotika, hygienischen Maßnahmen, können bestimmt werden. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können Variationen hinsichtlich der Mengen oder relativen Anteile von Transkripten von Polynukleotidsequenzen in einem einzelnen Organismus bestimmt werden. Dies ermöglicht beispielsweise das Aufzeigen von Unterschieden hinsichtlich der Expression von nicht-homologen, allelen Genen in einem Chromosom und kann die Ursachen für die unterschiedliche Manifestation bestimmter Krankheiten erklären. Es ermöglicht auch Untersuchungen von Polymorphismen in einem Organismus. Das Verfahren und der Testkit sind anwendbar für Umwelt- und Populationsuntersuchungen. Das grundlegende Prinzip des erfundungsgemäßen Verfahrens umfasst eine Hybridisierungsreaktion, die man in einer Lösung ablaufen lässt, und das gebildete Hybrid wird auf einem festen Träger gesammelt oder eingefangen, der mit dem Gegenstück oder Affinitäts-Gegenstück eines Affinitäts-Tags versehen oder beschichtet ist. Das Beschichten wird über chemische Mittel, beispielsweise über Konjugation erzielt. Manchmal ist die Affinität zwischen der Oberfläche (den Oberflächen) des festen, eine Trennung unterstützenden Mittels und des Gegenstücks des Affinitäts-Tags ausreichend, um eine stabile Bindung zu bilden. Mit Tracer-Tag versehene, vorzugsweise am Ende markierte Polynukleotid-Sonden aus einem zuvor charakterisierten, teilweise charakterisierten oder nicht charakterisierten Pool (Bibliothek) werden in Kontakt gebracht mit den mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten-Polynukleotidsequenzen, die aus der zu untersuchenden Probe erhalten werden.

**[0067]** Ein oder mehrere Pools werden in vorbestimmen, jedoch optionalen Anzahlen bereitgestellt, die vorzugsweise zwischen 2–500, besonders bevorzugt zwischen 5–400, und ganz besonders bevorzugt zwischen 10–300 löslichen Polynukleotidsequenzen variieren. Eine Voraussetzung für das Verfahren besteht darin, dass die Polynukleotid-Sonden, die ungefähr die gleiche Größe aufweisen, unterscheidbar gemacht sind, indem den Polynukleotid-Sonden „Trennung ermöglichte Tags“ angehängt oder am Ende hinzugefügt werden, die deren Trennung oder Fraktionierung ermöglichen und eine Trennung der individuellen Polynukleotid-Sonden in einer solchen Weise ermöglichen, dass eine genaue Identifizierung und Berechnung der Ergebnisse erhalten werden kann, beispielsweise über elektrophoretische Techniken, Massenspektrometrie oder Chromatographie.

**[0068]** Die löslichen Polynukleotid-Sonden können ohne jegliche Tracer-Tags beispielsweise unter Verwendung von Massenspektrometrie identifiziert werden. Alternativ können sie mit Tracer-Tags versehen werden, die gemäß der grundlegenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung direkt nachweisbare oder erfassbare Markierungen und Marker sind, die gleichzeitig als eine Trennung ermöglichte Tags fungieren können. Gemäß einer weiter fortgeschrittenen Ausführungsform der Erfindung, welche einen ultrasensitiven Nachweis oder eine vergleichende Bestimmung ermöglicht, ist die Verwendung von Polynukleotid-Sonden und nicht zu kurzer Oligonukleotide und das Versehen der Polynukleotid-Sonden mit einem Paar endständiger Primer-Tags, den Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach der quantitativen Gewinnung der Sonden ermöglichen, bevorzugt. Während der Amplifizierung können die Sonden mit Tracer-Tags unter Verwendung von beispielsweise mit Tracern versehenen Primern oder markierten Nukleotiden versehen sein. In diesem Fall darf der eine Trennung ermöglichte Tag kein Tracer-Tag sein. Die löslichen Pools befinden sich in einer organisierten Weise in ihren eigenen Gefäßen, die getrennt, auf lose Weise verbunden oder entfernbar sein können. Die organisierten Pools können auch in oder auf einer kompakteren Struktur angeordnet sein, in der die Gefäße mehr oder weniger starr miteinander verbunden sind wie die Wells auf einer Mikrotiterplatte.

**[0069]** Gemäß der grundlegenden Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lässt man eine Trennung ermöglichte Tags, welche die Polynukleotid-Sonden mit Unterschieden hinsichtlich des Verhältnisses von Größe oder Masse zu elektrischer Ladung versehen, mit oder ohne Tracer- oder Primer-Tags mit der Analyten-Polynukleotid-Präparation hybridisieren, die durch Isolierung aus der Ziel-Population enthaltenden Probe gewonnen wurde. Die Analyten-Polynukleotidsequenzen, die in der als Probe genommenen Ziel-Population vorliegen, werden über an sich bekannte Verfahren isoliert. Im Allgemeinen sind die aus der Ziel-Population zu bestimmenden Analyten-Polynukleotide ribosomale RNA (rRNA), Boten-RNA (mRNA) oder deren entsprechende Gene (DNA). Die Analyten werden mit wenigstens einem Affinitäts-Tag, wie beispielsweise Biotin, Histidin, Oligonukleotidsequenzen, wie beispielsweise oligo(dT), -(dA), -(dC), -(dG) oder Gemischen davon, sowie auch Haptenen oder Glycanen, versehen. Die Analyten-Polynukleotide werden vorzugsweise mit Biotin markiert.

**[0070]** Nach diesen Reagenz-Präparationsschritten lässt man die Hybridisierungsreaktion zwischen den Sonden und den Analyten ablaufen. Hybride werden in einer molekular genauen quantitativen Weise zwischen den löslichen Polynukleotid-Sonden und den mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten gebildet. Da die verschiedenen, in den Pools vorliegenden Polynukleotid-Sonden bekannt sind und da im Vergleich zu den Analyten jede Sonde im Überschuss vorliegt, ist es offensichtlich, dass die Hybridisierungsreaktion zwischen den Analyten und den Sonden, die zu einem Hybrid führt, stöchiometrisch verläuft und die Menge der gewonnenen Sonde der Menge an in der Probe vorhandenen Analyten-Polynukleotiden entspricht. Selbstverständlich braucht die Analyten-Sequenz keine rRNA-Sequenz zu sein. Mit dem vorliegenden Verfahren ist es möglich, jede beliebige einzelsträngige Sequenz sowie auch jede beliebige doppelsträngige Sequenz, nach einem Denaturierungsschritt, der den doppelsträngigen Analyten in eine einzelsträngige Form überführt, zu quantifizieren.

**[0071]** Wie oben beschrieben bilden sich durch die Hybridisierung in Lösung DNA-RNA (DNA:DNA) Hybride. Im Allgemeinen wird die Lösunghybridisierung unter Bedingungen durchgeführt, welche die Hybridisierung in Richtung der Bildung von Hybriden, einschließlich DNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNA, PNA:DNA, PNA:RNA, LNA:DNA, LNA:RNA, usw., verschieben. Die am meisten bevorzugten Bedingungen variieren in Abhängigkeit von den Polynukleotid-Sonden, den Analyten, usw. Danach werden die Hybride, mit Hilfe der den Affinitäts-Tag tragenden Analyten-Polynukleotidsequenzen aufgrund ihrer Affinität zu ihrem Gegenstück auf dem die Trennung unterstützenden Mittel, welches mit dem Gegenstück des Affinitäts-Tags beschichtet ist, gesammelt oder eingefangen. Nur solche Polynukleotid-Sonden, die zur Hybridisierung mit den Analyten-Sequenzen in der Lage waren, werden auf dem eine Trennung unterstützenden Mittel gesammelt und können quantitativ gewonnen, und optional amplifiziert und erfasst werden. Die eingefangenen und gesammelten Hybride werden entfernt oder von der Hybridisierungslösung getrennt und können von anderen Reagenzien und Sonden, die nicht

reagiert haben, freigeswaschen werden. Die Polynukleotid-Sonden, die keine Hybride mit den mit Affinitäts-Tags versehenen Polynukleotidsequenzen gebildet haben, bleiben in den Hybridisierungs- oder Waschlösungen und werden dementsprechend entfernt. Die eingefangenen und gesammelten Hybride können von überschüssigen Sonden, einschließlich solchen Sonden, die nicht zur Hybridisierung mit einer mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten-Sequenz in der Lage waren, freigeswaschen werden. In solchen Fällen lag eine Analyten-Sequenz, die einen bestimmten individuellen Organismus oder eine Untergruppe in der Ziel-Population repräsentiert und der Polynukleotid-Sonde entspricht, in der Probe nicht vor. Die gesammelten Polynukleotid-Sonden, die vom Analyten getrennt oder freigesetzt werden können, sind optional mit einem Tracer-Tag versehen. In diesem Fall braucht der eine Trennung ermöglichte Tag kein Tracer-Tag zu sein. Redundante Affinitäts-Tags und mit Affinitäts-Tags versehene Analyten-Sequenzen, die zur Hybridisierung nicht in der Lage waren, weil keine entsprechenden Sonden im Pool vorlagen, werden natürlich auf dem eine Trennung unterstützenden Mittel eingefangen, können jedoch von den Hybriden während der Elutions- und der nachfolgenden Trennungsvorgänge getrennt werden. Weiterhin werden solche mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten, zu denen unter den Sonden kein komplementärer Strang existiert, auf dem eine Trennung unterstützenden Mittel eingefangen, sie stören jedoch nicht die Stöchiometrie des Hybridisierungsprozesses und sie stören nicht die nachfolgenden Nachweisschritte. Sie können beispielsweise zerstört oder entfernt werden, wenn die Sonden isoliert oder von dem Hybrid und/oder dem eine Trennung unterstützenden Mittel freigesetzt werden.

**[0072]** Eine Trennung unterstützende Mittel (SAT) werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren benötigt, um die zwischen den optional mit Tracer-Tags versehenen Sonden und den mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten gebildeten Hybride zu gewinnen. Die eine Trennung unterstützenden Mittel, die feste Träger darstellen, wie beispielsweise Mikropartikel, Microbeads, Latex-Partikel, magnetische Partikel, Fasern, Stifte, Stäbe, Mikrowells und Affinitätssäulen, werden versehen oder beschichtet mit dem Gegenstück (den Gegenstücken) oder Affinitäts-Gegenstück(en) der Affinitäts-Tags. Das eine Trennung unterstützende Mittel kann Mittel zur Phasenseparation oder elektrophoretische Mittel zum Einfang des Gegenstücks des Affinitäts-Tags umfassen.

**[0073]** Die auf dem eine Trennung unterstützenden Mittel gewonnenen Hybride werden anschließend zuerst durch Elution von dem Mittel freigesetzt, und danach durch Aufbrechen der Wasserstoffbindungen der Hybride, und die optional markierten individuellen Sonden, die von den Hybriden freigesetzt wurden, werden isoliert, anhand ihrer Größen getrennt und mit Mitteln erfasst, die deren Quantifizierung ermöglichen. Da jede Sonde eine Analyten-Polynukleotidsequenz in der Probe repräsentiert, können die Mengen oder relativen Anteile individueller Polynukleotidsequenzen, die individuelle Organismen repräsentieren, auf einer molekularen Grundlage quantifiziert werden. Alternativ werden zuerst die Bindungen der Hybride aufgebrochen und danach werden der feste Träger und die Lösung, welche die Sonden enthält, über ein geeignetes Verfahren in Abhängigkeit von dem verwendeten, eine Trennung unterstützenden Mittel voneinander getrennt. Danach werden, beispielsweise über Zentrifugation, die Sonden auf der Grundlage ihrer Größe voneinander getrennt und über Mitteln erfasst, die deren Quantifizierung ermöglichen. Die aufgereinigten und isolierten Sonden auf den eine Trennung ermöglichen Mitteln werden mit einer Lösung eluiert, wie beispielsweise NaOH, NH<sub>4</sub>OH oder Formamid, die in der Lage ist, die Bindungen zwischen den Polynukleotidsträngen aufzubrechen.

**[0074]** Folglich werden nur diejenigen Polynukleotid-Sonden, die in der Lage waren, mit einem Analyten-Polynukleotid zu hybridisieren, das einen bestimmten individuellen Organismus oder eine Untergruppe von Organismen in einer Ziel-Population repräsentiert, d. h. solche Polynukleotid-Sonden, für die eine komplementär-strängige Analyten-Polynukleotidsequenz in der Probe vorliegt, von dem eine Trennung unterstützenden Mittel eingefangen und können für die Erfassung gewonnen werden.

**[0075]** Dies bedeutet, dass die automatisch oder halbautomatisch nachweisbaren oder erfassbaren, optional mit einem Tracer-Tag versehenen Sonden, die aufgrund ihrer eindeutigen Größen identifizierbar sind oder unterscheidbar gemacht werden können, eingefangen oder gewonnen und anschließend für eine Erfassung freigesetzt oder isoliert werden. Für den Fachmann auf dem Gebiet ist es offensichtlich, dass die Reihenfolge der Durchführung der Schritte in bestimmten Fällen geändert werden kann.

**[0076]** Wenn der Tracer-Tag fehlt, können die Sonden direkt über Massenspektrometrie erfasst werden. Wenn der Tag ein Tracer ist, beispielsweise eine fluoreszierende Substanz, kann die Sonde ebenfalls direkt erfasst werden, wenn sie von dem Analyten-Polynukleotid getrennt wurde, das keinen Tracer-Tag aufweist. Die optional mit Tracer-Tags versehenen Reagenz-Sonden liegen nun in einer isolierten und freien Form vor, und ihre Menge entspricht exakt der Menge der Analyten-Nukleinsäure, die zuvor mit ihnen hybridisiert war.

**[0077]** Wenn der Tag ein Paar von endständigen Primern ist, die optional mit einem Tracer-Tag versehen sind, kann die Sonde nach Trennung von der Analyten-Polynukleotidsequenz amplifiziert und mit einem Tracer-Tag

versehen werden, entweder während oder nach der Amplifizierung. Beispielsweise können nach einer optionalen Anzahl von Amplifizierungszyklen die Polynukleotid-Sonden mit einem Tracer-Tag versehen und erfasst werden. Alternativ können die komplementären Primer mit Tracer-Tags versehen werden, wodurch die Sonden während der Amplifizierung mit Tracer-Tags versehen werden. Die Amplifizierung ermöglicht das Erfassen von Unterpopulationen oder Polynukleotidsequenzen, die in so geringen Mengen vorliegen, dass sie unter der Nachweigrenze liegen, wenn andere Methoden verwendet werden. In der fortgeschrittenen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, die eine sensitivere Bestimmung der Analyten-Polynukleotide ermöglicht, sind die Tags auf den Sonden endständige Primer-Sequenzen. Man lässt die endständig mit Primer-Tags versehenen Sonden mit den mit Affinitäts-Tags versehenen Analyten-Polynukleotiden auf die gleiche Weise hybridisieren wie in der grundlegenden Ausführungsform der Erfindung. Nach der stöchiometrischen Hybridisierungsreaktion werden die Hybride auf einem eine Trennung unterstützenden Mittel eingefangen und die mit Primer-Tags versehenen Sonden werden über an sich bekannte Methoden gewonnen. Die Menge der gewonnenen Sonden, die der Menge in der Probe vorliegenden Analyten-Polynukleotiden entspricht, kann über eine optionale Anzahl von Malen über an sich bekannte PCR-Techniken amplifiziert werden. Nach oder während der PCR-Amplifizierung werden die Sonden optional mit Tracern versehen und die Menge der Sonden wird erfasst. Da die Gewinnung der mit Primer-Tags versehenen Sonde quantitativ ist und der Anzahl der Analyten-Moleküle entspricht, und da es, mit Hilfe der enthaltenen Moleküle bekannter Menge, bekannt ist, wie viele Male die Sonden amplifiziert wurden, d. h. multipliziert oder kopiert wurden, ist die Menge des Analyten in der ursprünglichen Probe einfach zu berechnen. Dies ermöglicht eine quantitative Bestimmung selbst solcher Analyten-Polynukleotide, die ohne die Amplifizierung unter der Nachweigrenze gelegen hätten und somit nicht erfassbar gewesen wären. Dementsprechend kann die Sensitivität des erfundungsgemäßen Verfahrens in hohem Maße gesteigert werden. Dies stellt einen großen Vorteil dar, wenn ein sehr sensitiver Test benötigt wird, beispielsweise wenn die als Probe genommene Population, beispielsweise eine Biopsieprobe, nur wenige Organismen oder Zellen enthält.

**[0078]** Dementsprechend kann das Profil der affinitätsselektierten Sonden über sensitive automatisierte oder teilweise automatisierte, quantitative Erfassungssysteme bestimmt werden, nachdem die Sonden auf der Grundlage ihrer Größe, beispielsweise über chromatographische, elektrophoretische Techniken, einschließlich Kapillar- oder Gelelektrophorese sowie Massenspektrometrie, voneinander getrennt wurden. Die Polynukleotid-Sonde, die dadurch erfassbar gemacht wird, dass sie mit einer unterscheidbaren Größe oder Masse versehen wird, und die in einem spezifischen Pool vorliegt, entspricht immer einem komplementären Analyten-Molekül, das durch die bekannte Sonde identifiziert werden kann. Daher kann sehr genau auf die individuellen Polynukleotide in einem Gemisch von Polynukleotiden oder in einer gemischten Ziel-Population geschlossen werden.

**[0079]** Eine vergleichende quantitative Bestimmung von Variationen hinsichtlich der Mengen verschiedener in einer Zell- oder Gewebeprobe vorliegender Polynukleotide als Antwort auf inhärente Veränderungen aufgrund von inhärenten Kontrollmechanismen oder als Antwort auf externe Stimuli, einschließlich Wirkstoffen, pathologischen Zuständen, erfordert wenigstens zwei organisierte lösliche Pools, vorzugsweise jedoch wenigstens einen organisierten Pool für jede zu testende Probe. Jeder Pool umfasst identische Polynukleotid-Sonden, jedoch sind die organisierten Pools, beispielsweise jeder in seinem eigenen Well auf einer Mikrotiterplatte, optional mit einem erfassbaren Tracer-Tag versehen. Wenn Tracer-Tags verwendet werden, ist es vorteilhaft, unterscheidbare Tracer zu verwenden, beispielsweise Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die löslichen Pools auf Mikrotiterplatten bereitgestellt. Jede Mikrotiterplatte ist ansonsten identisch, jedoch weist jede ihre eigenen spezifischen erfassbaren Tracer auf, die im Fall von Fluorophoren vorzugsweise bei verschiedenen unterscheidbaren Emissionswellenlängen emittieren, wodurch ein gleichzeitiges Erfassen der Variationen ermöglicht wird. Es ist möglich, die Mengen ohne Tracer-Tags unter Verwendung von Massenspektrometrie zu vergleichen und computergestützte automatisierte System die erfassten Ergebnisse berechnen und vergleichen zu lassen.

**[0080]** Das folgende Flussdiagramm des Verfahrens beschreibt, wie die vorliegende Erfindung auszuführen ist:

#### PRÄPARATIVE SCHRITTE

Schritt 1 – Herstellung organisierter Pools löslicher Polynukleotid-Sonden mit ungefähr gleicher Größe

Fall 1 – Auswählen von Regionen aus ribosomaler RNA

**[0081]** Die rDNA-Fragmente werden so ausgewählt, dass sie mehr oder weniger konservierte oder variable

Regionen repräsentieren, die eine bestimmte Art oder Gruppe von Bakterien oder Mikroorganismen repräsentieren. Die DNA-Fragmente werden mit einer Trennung ermöglichen Tags oder Schwänzen oder Markierungen versehen, die eine gute Trennung in der Stufe der Größenfraktionierung ermöglichen.

- (a) Modifizierung von Polynukleotid-Enden (siehe Schritt 2)
- (b) Tracer-Markierung (siehe Schritt 2)
- (c) Modifizierung von Protein-Enden (siehe Schritt 2)

#### Fall 2 – Auswählen von Regionen aus anderen Quellen

**[0082]** Die Polynukleotide werden so ausgewählt, dass sie Regionen anderer Gene repräsentieren, beispielsweise Gene für Antibiotikaresistenz oder deren entsprechende RNA. Polynukleotidsequenzen, die in der Lage sind, zwischen verschiedenen Allelen des gleichen Gens zu unterscheiden, können ebenfalls selektiert werden.

Schritt 2 – Markieren der Enden der DNA-Sonden mit einem Tracer, Fluorophoren oder einem Größe verleihenden Schwanz

**[0083]** Es werden vorzugsweise zwei (oder mehr) Sätze der DNA mit unterscheidbaren Farbstoffen hergestellt. Dies ermöglicht gleichzeitige vergleichende Untersuchungen von Variationen der Polynukleotid-Mengen, insbesondere von rRNA-Mengen aufgrund von Verschiebungen in Populationen oder interner Mechanismen, beispielsweise pathologischer Zustände, oder aufgrund externer Stimuli, wie beispielsweise Wirkstoffen. Die Schritte 1 und 2 sind präparativ und die Grundlagen für die kommerziell wertvollen Testkits. Die DNA-Pools können in großen Mengen für eine große Anzahl von Experimenten hergestellt werden. Dementsprechend sollte keine Notwendigkeit dafür bestehen, diese ziemlich mühsame Phase oft zu wiederholen.

### ANALYTISCHE SCHRITTE

#### Schritt 1 – Herstellung eines einzelsträngigen Polynukleotid-Analyten

**[0084]** Nukleinsäure wird aus der gemischten Population über an sich bekannte Methoden isoliert. Die Isolierung von RNA aus den Zellen wird angewendet unter geeigneten experimentellen Bedingungen unter Verwendung von an sich bekannten Methoden, beispielsweise (Sambrook, J. und Russell, D., Molecular cloning – A Laboratory Manual, dritte Auflage (2001)). Wenn der Polynukleotid-Analyt doppelsträngig ist, muss der Analyt denaturiert werden, um die einzelsträngigen Sequenzen bereitzustellen, die für das erfindungsgemäße Verfahren benötigt werden.

#### Schritt 2 – Herstellung mit Affinitäts-Tags versehener Analyten

**[0085]** Die isolierte DNA oder RNA wird mit Affinitäts-Tags versehen, beispielsweise unter Verwendung eines nicht-enzymatischen Verfahrens biotinyliert. Das photoaktivierte Reagenz Photobiotin ist für diesen Zweck geeignet und im Handel erhältlich. Da die RNA nicht in cDNA transkribiert wird oder anderweitig für das Markieren enzymatisch modifiziert wird, kann die RNA hergestellt und in starken Detergentien wie beispielsweise SDS aufbewahrt werden. RNAsen werden durch SDS inhibiert, so dass es einfach ist, intakte RNA zu isolieren. Fragmentierung stellt jedoch kein Problem dar, wenn sie nicht zu stark auftritt. Die Größe der RNA-Fragmente beeinflusst die Einfangkapazität nicht.

#### Schritt 3 – Lösungshybridisierung

**[0086]** Jeder der mit den löslichen Tracer-Tags versehenen Sonden-(DNA)-Pools (DNA) wird mit einem Aliquot der mit Affinitäts-Tags markierten Analyten-(RNA)-Präparation in Kontakt gebracht. Man lässt die Hybridisierung in der freien Lösung in dem kleinen Volumen, das von dem jeweiligen Kompartiment des Pools bereitgestellt wird, ablaufen. Dies führt zu einer schnellen und quantitativen Reaktion.

#### Schritt 4 – Trennungsschritt

**[0087]** Man gibt Microbeads oder ein anderes eine Trennung unterstützendes Mittel zu, welches das Affinitäts-Gegenstück trägt, beispielsweise Avidin, um die RNA-Moleküle einzufangen. Man wäscht, um freie DNA zu entfernen.

## Schritt 5 – Gewinnungsschritt

**[0088]** Man eluiert mit einer Lösung, die das DNA:RNA-Hybrid aufbricht, wie beispielsweise Formamid oder NaOH. Falls erforderlich engt man die Sonden durch Verdampfung der Elutionslösung ein oder fällt und wäscht die einzelsträngige DNA. Man nimmt die einzelsträngige DNA in einer Elektrophorese-Proben- oder -Pufferlösung auf. Vorzugsweise werden solche Bedingungen verwendet, dass die Elektrophorese des Eluats direkt durchgeführt werden kann und die verschiedenen Sonden gleichzeitig erfasst werden können.

## Schritt 6 – Erfassen von Ergebnissen

**[0089]** Man bestimmt die Größe und Menge der von DNA:DNA- oder DNA:RNA-Hybridien eluierten DNA durch Chromatographie oder Gelelektrophorese. Massenspektrometrie kann ebenfalls verwendet werden. Unterschiede zwischen zwei DNA/RNA-Präparationen sind leicht zu beobachten durch Hybridisieren mit DNA-Fragmenten, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, und Mischen der DNAs vor der Elektrophorese.

## Schritt 7 – Interpretation der Ergebnisse

**[0090]** Im Fall 1 wird die Zusammensetzung der Population hinsichtlich der Unterpopulationen, für die Sonden im Pool umfasst waren, direkt bestimmt. Im Fall 2 wird das Vorliegen bestimmter funktionaler Eigenschaften (Vorliegen oder Expression von Genen) in einem individuellen Organismus oder einer Population gleichermaßen direkt bestimmt.

## Schritt 8 – Optionale Amplifizierung

**[0091]** Wenn ein sehr sensitiver Assay benötigt wird, können die Reagenz-Polynukleotidsequenzen, d. h. die mit Tracer-Tags versehenen, vom Trennung unterstützenden Mittel eluierten Sonden nach dem quantitativen Selektionsschritt über PCR amplifiziert werden. Wenn dieser Ansatz verwendet wird, sollten die Reagenz-Polynukleotidsequenzen, d. h. die Sonden, so modifiziert sein, dass sie eine gemeinsame endständige Sequenz enthalten, welche die Amplifizierung aller Sonden im gleichen Pool mit dem gleichen PCR-Primer-Paar ermöglichen, das mit einem Tracer-Tag versehen ist.

**[0092]** Wenn die Sonden mit Tags oder Schwänzen versehen sind, wird deren Trennung über Größe oder Mobilität ermöglicht. Sie können auch auf der Grundlage ihrer Massen unter Verwendung von Massenspektrometrie erfasst werden. In diesem Fall sind keine Tracer-Tags erforderlich und eine weitere Verbesserung des Verfahrens ist möglich. Indem die Verwendung von Tracer-Tags weggelassen wird, kann das Verfahren vereinfacht und das Erfordernis teurer erfassbarer Markierungen vermieden werden. Ansonsten entspricht das Verfahren vollständig dem oben beschriebenen Verfahren und umfasst die folgenden aufeinanderfolgenden Schritte:

- Bereitstellen eines oder mehrerer organisierter Pools mit einer vorbestimmten, optionalen Anzahl löslicher Sonden-Polynukleotid-Sequenzen mit eindeutigen Größen, die deren Identifizierung oder Erfassung ermöglichen, wobei sich die Pools auf organisierte Weise in eigenen Gefäßen befinden, die getrennt oder miteinander verbunden sind;
- Isolieren der Analyten-Polynukleotidsequenzen, die in einer Zell- oder Gewebeprobe des Ziel-Organismus vorliegen, und Versehen der Analyten mit wenigstens einem Affinitäts-Tag;
- Ermöglichen einer Hybridisierungsreaktion zwischen den löslichen Sonden aus dem Schritt (a) und dem Analyten aus dem Schritt (b), was zu einer Bildung von löslichen Hybriden zwischen Sonde:mit Affinitäts-Tag versehenem Analyten führt;
- Isolieren des im Schritt (c) gebildeten Sonde:Analyten-Hybrids durch Einfangen des Hybrids auf einem eine Trennung unterstützenden Mittel, das mit dem Affinitäts-Gegenstück des Affinitäts-Tags des Analyten versehen ist; und
- Gewinnen der Sonde von dem eine Trennung unterstützenden Mittel; und
- Erfassen der Größe und der Menge der Sonde mit elektrophoretischen Techniken oder Massenspektrometrie.

## TESTKITS

**[0093]** Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen Testkit zur Durchführung der quantitativen Bestimmung. Der Testkit umfasst einen oder mehrere lösliche organisierte Pools mit einer vorbestimmten optionalen Anzahl an löslichen Polynukleotid-Sonden, die mit komplementären Analyten-Nukleotidsequenzen hybridisie-

ren, einschließlich mehr oder weniger konservierter oder variabler Regionen, die einer ganzen Population gemeinsam sind oder für eine bestimmte Untergruppe von Organismen spezifisch sind. Alternativ umfasst der Testkit Sonden, die mit spezifischen, für bestimmte Funktionen kodierenden Genen und deren entsprechender mRNA hybridisieren, beispielsweise solchen für Antibiotikaresistenz. Die Polynukleotid-Sonden sind optional mit Tags versehen, entweder Tracer-Tags oder einem Paar endständiger Primer-Tag-Sequenzen. Vorzugsweise sind die Tracer-Tags endmarkierte nachweisbare Tracer-Tags, wie beispielsweise Fluorophore, welche den Polynukleotid-Sonden unterschiedliche Größe verleihen.

**[0094]** Der Testkit umfasst lösliche organisierte Pools, wobei jeder Pool mehr als eine, vorzugsweise mehr als zehn, besonders bevorzugt ungefähr hundert oder mehr Sonden aufweist. Die Pools befinden sich vorzugsweise auf organisierte Weise in eigenen Gefäßen, beispielsweise Reagenzgläsern, Flaschen oder in den Wells oder Kompartimenten einer Mikrotiterplatte. Selbst wenn der Testkit zur Durchführung der vorliegenden quantitativen Bestimmung vorzugsweise eine Mikrotiterplatte oder eine entsprechende maßgeschneiderte Struktur ist, kann der Testkit eine optionale Anzahl an Reagenzgläsern, Flaschen, usw. aufweisen, die in mehr oder weniger fixierten Anordnungen organisiert sein können, einschließlich Ständern und/oder anderen festen Strukturen. Die Testkits können bedarfsgespannt oder maßgeschneidert sein und mit geeigneten Markierungen und Anweisungen für die Verwendung versehen sein.

**[0095]** Die Pools der löslichen Polynukleotid-Sonden für die Testkits können aus DNA-Fragmenten hergestellt werden. Sie können synthetische Polynukleotide und modifizierte DNAs sein. Wenn der Testkit für die Untersuchung charakterisierter Genome hergestellt wird, umfassend die Pools des Testkits vorzugsweise wenigstens ein Polynukleotid-Fragment (Sonde) jedes zu untersuchenden Gens in dem Genom. Auch wenn nicht-charakterisierte Genome untersucht werden sollen, können die Pool in vorteilhafter Weise für allgemeinere oder spezifischere Untersuchungen in großen Mengen hergestellt werden, wobei eine kommerzielle Herstellung keinesfalls ausgenommen ist.

**[0096]** Wenn die Reagenz-Polynukleotid-Sonden aus einem charakterisierten Genom abgeleitet sind, so weiß man, dass jedes Sondenmolekül einem bestimmten Gen entspricht, und jede Sonde wird spezifisch durch ihre Größe und ihren Pool identifiziert. Die Variationen der Mengen und relativen Anteile von Organismen oder Untergruppen davon in einer bestimmten gemischten Population können somit aus den automatisch erfassten Ergebnissen direkt verglichen und automatisch berechnet werden. Wenn die Reagenz-Polynukleotid-Sonden wenig charakterisiert sind, beispielsweise aus einem Organismus abgeleitet sind, dessen Genom nicht sequenziert wurde, können immer noch wertvolle Ergebnisse erhalten werden.

**[0097]** Eine bevorzugte Ausführungsform des Testkits kann auf einer Mikrotiterplatte hergestellt werden. In einer solchen praktischen Ausführungsform der Erfindung können Pools mit DNA-Fragmenten von bekannten oder unbekannten Sequenzen von Hefen, Clostridien, Lebensmittelvergiftung verursachenden Bakterien, usw. zur Herstellung der Testkits verwendet werden. Wenn jeder Pool beispielsweise ungefähr 10–100 Sonden oder Fragmente umfasst, so liefert er eine ausreichend gute Auflösung. Wenn jede Sonde in dem Pool eine bestimmte Bakterienart repräsentiert, können Sonden für Tausende von Arten sich auf einer einzelnen Mikrotiterplatte befinden und es gibt immer noch Platz für eine Anzahl von Kontrollen. Die eingefangenen DNA-Sonden werden teils über den Pool oder das Mikrotiter-Well, zu dem sie gehören, und teils durch ihre Größe identifiziert.

**[0098]** Der optional erfassbare Tracer-Tag wird in vorteilhafter Weise ausgewählt aus einer Gruppe von Tracern, die nachweisbar sind durch Fluoreszenz, Infrarotsorption, elektromagnetische Eigenschaften, Radioaktivität und enzymatische Aktivität. Der bevorzugte Tracer-Tag, der durch seine Fluoreszenz erfassbar ist, ist ein Fluorochrom oder ein Fluorophor. Massenspektrometrie stellt eine weitere bevorzugte Weise dar, die ein Erfassen und eine Quantifizierung ohne irgendwelche Tracer-Tags ermöglicht. Selbst wenn Tracer-Tags bevorzugte Ausführungsformen darstellen, sind sie für das erfindungsgemäße Verfahren nicht wesentlich, die einzige Bedingung für den erfindungsgemäßen Testkit besteht darin, dass die Sonden in den löslichen organisierten Pools eindeutige Größen aufweisen oder unterscheidbar gemacht werden können. Sie sind optional markiert, entweder mit Tracer-Tags oder endständigen Primer-Tags. Dementsprechend wird ein funktionsfähiger Kit durch einen organisierten Pool von endständig mit Primer-Tags versehenen Sonden bereitgestellt, selbst wenn kein Tracer bereitgestellt wird.

**[0099]** Der erfindungsgemäße Testkit in seiner einfachsten Form ist ein organisierter Pool löslicher markierter Sonden mit eindeutigen Größen. Es ist anzumerken, dass der Testkit in dieser Form vollständig ist, jedoch mit optionalen Tracern, Affinitätspaarern und/oder eine Trennung unterstützenden Mitteln komplementiert werden kann. Die Hilfsreagenzien stellen jedoch keine Bedingung dar. Die Hilfsreagenzien und Mittel zur Durchführung

des erfindungsgemäßen Verfahrens sind sogar von verschiedenen anderen Quellen im Handel erhältlich. Dementsprechend können das Verfahren und der Testkit der vorliegenden Erfindung für die spezifischen Bedürfnisse des Endanwenders maßgeschneidert werden, und sie sollten insbesondere einer automatisierten oder halbautomatisierten Handhabung zugänglich sein.

**[0100]** Die Art der Herstellung des Testkits, die dementsprechend keine Immobilisierungsschritte zu umfassen braucht, ermöglicht eine einfache Anpassung an maßgeschneiderte Tests, wobei die Aufmerksamkeit auf bestimmte Untergruppen oder Unterpopulationen von Organismen in einer bestimmten Population gerichtet wird. Der Testkit kann einen optionalen Affinitäts-Tag zum Markieren der Polynukleotide in der Zell- oder Gewebeprobe und optional ein Trennung unterstützendes Mittel umfassen, das versehen oder beschichtet ist mit einem Gegenstück des Affinitäts-Tags zum Markieren des Analyten. Die optionalen Affinitätspaare, welche die Affinitäts-Tags für die Analyten und die Gegenstücke für die Trennung unterstützenden Mittel bereitstellen, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, beispielsweise Biotin und Avidin oder Streptavidin, Histidin und Metallchelate, Haptene und Antikörper oder Glycane und Lektine.

**[0101]** Das optionale, eine Trennung unterstützende Mittel, das in den Testkit aufgenommen werden kann oder getrennt bereitgestellt werden kann, ist ausgewählt aus einer Gruppe fester Träger, die aus Mikropartikeln, Microbeads, Latex-Partikeln, magnetischen Partikeln, Fasern, Stiften, Stäben, Mikrowells oder Affinitätsräulen besteht. Das eine Trennung unterstützende Mittel kann Mittel zur Phasentrennung oder elektrophoretische Mittel zum Einfangen des Gegenstücks des Affinität-Tags umfassen.

**[0102]** Zur vergleichenden Bestimmung von Variationen der Mengen oder relativen Anteile individueller Polynukleotidsequenzen oder Untergruppen davon in einem Gemisch von Polynukleotidsequenzen können organisierte Pools mit identischen Sätzen von Sonden bereitgestellt werden. In diesem Fall wird jeder organisierte Pool oder Testkit optional mit optional unterschiedlichen oder unterscheidbaren Tracer-Tags bereitgestellt, wobei die Tags unterscheidbar sind aufgrund ihrer Größen oder Mobilitäten und vorzugsweise bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren.

**[0103]** Wenn die Tags endständige Primer-Tags sind, die gleichzeitig als eine Trennung ermögliche Tags fungieren, sind die Testkits identisch, jedoch können nach der Amplifizierung die gewonnenen und/oder amplifizierten Sonden optional mit unterscheidbaren Tracer-Tags versehen werden. Alternativ kann das komplementäre Primer-Paar mit einem Tracer-Tag versehen werden, was eine Markierung mit Tracer während der Amplifizierung ermöglicht. Diese Hilfsreagenzien können optional in den Testkit aufgenommen werden oder aus anderen kommerziellen oder nicht-kommerziellen Quellen bereitgestellt werden. Um eine einfache vergleichende Bestimmung von Variationen in Polynukleotidmengen in einer Probe zu ermöglichen, ist es zweckmäßig Testkits herzustellen, die mit verschiedenen und unterscheidbaren Tracer-Tags versehen sind, die bei unterschiedlichen Emissionswellenlängen emittieren und die mit automatisierten oder halbautomatisierten Instrumenten erfasst werden können.

**[0104]** Testkits für die vergleichende quantitative Bestimmung von Variationen bei den Mengen verschiedener individueller Polynukleotide oder Organismen oder Untergruppen davon in einem Gemisch von Polynukleotiden oder einer Ziel-Population als Antwort auf inhärente Veränderungen oder externe Stimuli, einschließlich Antibiotika, pathologischen Zuständen, epidemiologischen Bedingungen, umfassen praktischerweise wenigstens zwei feste Träger oder Mikrotiterplatten. Jeder feste Träger oder jede Mikrotiterplatte wird mit identischen Pools von Polynukleotid-Sonden bereitgestellt, die optional mit den Tracer-Tags versehen sind. Jeder feste Träger oder jede Mikrotiterplatte sollte optional mit seinem eigenen unterscheidbaren Tracer-Tag bereitgestellt werden, der ein gleichzeitiges Erfassen von Zell- oder Gewebeproben ermöglicht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden, beispielsweise vor oder nach einer Behandlung mit Wirkstoff. Eine Populationsprofil-Erstellung, d. h. das Analysieren der Unterschiede bei zwei oder mehr Analyten-Polynukleotid-Präparationen, ist auf einfache Weise erfassbar durch Hybridisieren der Analyten-Proben mit Reagenz-Polynukleotid-Sonden, die mit verschiedenen, unterscheidbaren und automatisch erfassbaren Tracer-Tags endständig markiert sind. Nach dem Hybridisierungsschritt können die verschiedenen Proben optional gemischt werden und ihre Unterschiede durch Messen des Verhältnisses der Tracer-Tags zueinander in jedem Peak direkt beobachtet werden. Der Testkit kann auch bereitgestellt werden mit wenigstens einem Paar von Primern zum Amplifizieren der mit Tracer-Tags versehenen Sonden, die im letzten Schritt erhalten werden, um die Sensitivität des Tests zu erhöhen.

**[0105]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist brauchbar für die quantitative und vergleichende Bestimmung von Variationen bei den Mengen bestimmter Organismen und Untergruppen davon in einer Probe einer ausgewählten gemischten Population.

**[0106]** Der menschliche Gastrointestinaltrakt ist wahrscheinlich das komplexeste beschriebene mikrobielle Ökosystem, und man schätzt, dass der menschliche Darm wenigstens 400 Bakterienarten beherbergt. Um dieses extrem komplexe Ökosystem zu untersuchen sind analytische Mittel mit hohem Durchsatz wie beispielsweise die beschriebene Erfindung erforderlich. Die vorliegende Erfindung ermöglicht das gleichzeitige Screening auf das Vorhandensein zahlreicher Bakteriengruppen und -arten und deren relative Quantifizierung in gastrointestinalen Proben. Beispielsweise besteht bei funktionalen Nahrungsmitteluntersuchungen ein besonderes Interesse daran, Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Populationen zu verfolgen. Bifidobakterien und Laktobazillen gehören zur angestammten mikrobiellen Population im menschlichen Darm, und sie gelten als Leitorganismen gut ausbalancierter Darm-Mikrobiota. Bifidobakterien und Laktobakterien werden bei Eingriffen in die Ernährung oft überwacht. Gattungs- und gruppenspezifische Sonden sowie viele artspezifische Sonden sind für Bifidobakterien und Laktobazillen verfügbar, und dementsprechend kann die beschriebene Erfindung einfach für den Nachweis dieser Bakterien angepasst werden. Eine weitere wichtige Gruppe intestinaler Bakterien stellen Clostridien dar, von denen einige potentiell pathogen sind. Das Auszählen von Clostridien ist aufgrund unzureichender Selektivmedien mühsam, jedoch wird durch die beschriebene Erfindung ein kulturunabhängiger Ansatz für die qualitative und quantitative Überwachung von Clostridien sowie weiterer mikrobieller Gruppen bereitgestellt.

**[0107]** Die beschriebene Erfindung kann weiterhin in der klinischen Mikrobiologie verwendet werden, beispielsweise bei der Bestimmung der Wirksamkeit einer Antibiotikabehandlung mit Hinblick auf Bakterienpopulationen. Um die richtige Antibiotikabehandlung in Notfallsituationen mit durch antibiotikaresistente Bakterien verursachten Infektionen zu finden, sind schnelle Screening-Verfahren besonders wertvoll.

**[0108]** Bei der Trinkwasserversorgung und der Nahrungsmittel- und Futtermittelherstellung sind hygienische Maßnahmen und eine gute Kontrolle erforderlich. Auf der Grundlage der beschriebenen Erfindung können Testkits für die Kontrolle der mikrobiologischen Qualität von Trinkwasser oder Nahrungsmittelprodukten entworfen werden. In der Nahrungsmittelindustrie liegt die Priorität auf verlässlichen Tests für pathogene Mikroben wie beispielsweise Salmonella, Listeria, Bacillus und E. coli, jedoch werden auch oft Tests für nicht-pathogene, Nahrungsmittel verderbende Mikroben wie beispielsweise Laktobazillen und Hefen benötigt.

**[0109]** Ein weiteres Anwendungsgebiet der Erfindung sind Testkits zum Nachweis von Pilzen, die in Gebäudestrukturen wachsen können und dadurch ernsthafte Gesundheitsprobleme für Menschen durch Freisetzung von Toxinen und Sporen in die Raumluft verursachen können. Mikroben können auch Schäden an Gebäuden und historisch wichtigen Artefakten wie beispielsweise Gemälde, Skulpturen usw. hervorrufen. Geeignete Testkits können für den Nachweis verursachender Mikroben und die Überwachung der Wirksamkeit von Kontrollmaßnahmen entworfen werden.

**[0110]** In der mikrobiellen Ökologie sind kulturunabhängige Überwachungsmethoden von wesentlicher Bedeutung, da die Laborwachstumsbedingungen es oft nicht schaffen, die natürlichen Umgebungen von Mikroben nachzuahmen und folglich nur ein Teil der Mikroben in Umweltproben auf Labormedien gezüchtet werden können. Für die Überwachung von unkultivierten mikrobiellen Populationen in verschiedenen Boden- und Wasserproben können verschiedene Tests entworfen werden, welche die Beurteilung der Auswirkungen von Verschmutzung, Landwirtschaft und anderen Maßnahmen des Menschen auf natürliche Ökosysteme und die Wirksamkeit korrigierender Maßnahmen hinsichtlich Umweltschäden wie beispielsweise einer Ölpest ermöglichen. Für die ökologische Grundlagenforschung ist die Überwachung natürlicher jahreszeitlicher Variationen in den mikrobiellen Ökosystemen und der Vergleich ähnlicher Ökosysteme an unterschiedlichen geographischen Stellen von Interesse.

**[0111]** Testkits können Polynukleotid-Sonden umfassen, die zwischen bestimmten Allelen oder Genen unterscheiden können. Solche Kits können für Populationsstudien verwendet werden, beispielsweise um die Verteilung bestimmter Allele von Genen zu untersuchen. In ähnlicher Weise können Polynukleotide, die Punktmutationen in verschiedenen Genen erkennen, in den Kits verwendet werden.

**[0112]** Zusätzlich zu den oben aufgezählten Anwendungen können das Verfahren und die Testkits für evolutionäre Studien und zur Beurteilung von Verwandtschaften verwendet werden. In der Archäologie kann eine Verwendung zur Untersuchung der Ursachen für den Verfall alter Wandzeichnungen und Statuen und weiterer Artefakte durch Mikroben und für die Überwachung der Wirkung präventiver Maßnahmen erfolgen.

**[0113]** Das Verfahren und die Testkits können für den Nachweis von Punktmutationen mit potentiell schädlichen Wirkungen für die Gesundheit von Menschen und Tieren und für Populationsstudien einschließlich der Verteilung bestimmter Allele von Genen in der Population verwendet werden.

**[0114]** Der erfindungsgemäße Testkit in seiner einfachsten und billigsten Form ist ansonsten der gleiche wie die oben beschriebenen Testkits und umfasst einen oder mehrere organisierte Pools mit einer vorbestimmten optionalen Anzahl an löslichen Polynukleotidsequenz-Sonden, die mit eindeutigen Größen versehen sind, welche deren Identifizierung und Erfassung über Massenspektrometrie ermöglichen. Die Sonden können mit endständigen Primer-Tags versehen sein, um eine Amplifizierung vor der quantitativen Messung mit massenspektrographischen oder massenspektrometrischen Mitteln zu ermöglichen. Die Pools nicht-markierter Sonden befinden sich auf organisierte Weise in ihren Gefäßen, die getrennt oder miteinander verbunden sind.

**[0115]** Der erfindungsgemäße Testkit einschließlich der Reagenzien sind vorzugsweise anwendbar für die Durchführung automatisierter oder halbautomatisierter Prozesse, für die ein Beispiel als Flussdiagramm in [Fig. 11](#) gezeigt ist. Der Prozess kann unterbrochen und die Reagenzien auf andere fester Träger übertragen werden, falls die automatischen Vorrichtungen nicht vollständig kompatibel sind. Die ersten Schritte werden vorteilhafterweise in einer automatisierten Pipettierstation durchgeführt, in der die biotinylierte Proben-RNA in jeden Pool pipettiert wird, der die eindeutige Größen aufweisenden Sonden in deren Pools enthält. Anschließend kann der Testkit unter Verwendung eines Lyophilisators getrocknet werden. Das Trocknen erfolgt, um den Einfluss jeglicher Volumenunterschiede zu eliminieren. Die optionale Lyophilisierung ermöglicht eine Unterbrechung der Arbeit, bis eine Fortsetzung der Arbeit zweckmäßig ist.

**[0116]** Die Arbeit kann fortgesetzt werden durch Zugabe eines geeigneten Hybridisierungspuffers zu den Pools in einer automatisierten Pipettierstation. Die Platte wird mit geeigneten Mitteln versiegelt, beispielsweise einem Film oder einer Folie, um ein Verdampfen im nachfolgenden Schritt zu vermeiden. Wenn der Testkit mit einer geeigneten Hitzeversiegelung versehen ist, wird er in einen automatisierten Thermoblock gegeben, in dem die Temperatur je nach Bedarf hoch- und heruntergeregelt werden kann, um eine Denaturierung und Hybridisierung der Sonden zu ermöglichen. Nach der Hybridisierung wird die Sonde:Analyt-Hybride enthaltende Lösung in einen Prozessor für magnetische Partikel gegeben, um den Affinitätseinfang, die Wasch- und Elutionsschritte durch Überführen der Streptavidin/Avidin-beschichteten magnetischen Beads von Schritt zu Schritt durchzuführen, beispielsweise auf einer KingFisher-Platte gemäß dem programmierten Protokoll. Die Eluate können optional in eine neue Platte überführt werden, wenn die automatisierten Stationen unterschiedliche Arten von Mikrotiterplatten verwenden. Die Wells können für einen quantitativen Transfer mit Elutionspuffer gespült werden, und die vereinigten Lösungen werden anschließend in einen Lyophilisator verdampft, was die Aufbewahrung der Proben und das Erfassen der Proben zu einem zweckmäßigeren Zeitpunkt ermöglicht. Anders ausgedrückt kann der Prozess auf einfache Weise mit Hinblick auf unterschiedlichen Zeitpläne und Protokolle für die Durchführung der Bestimmung angepasst werden. Die Sonden-Fragmente, Größenstandards und Konzentrationsstandards werden entweder direkt oder nach einem geeigneten Schritt automatisch in einen automatisierten Analysator injiziert. Die Intensitäten der an die Sonden-Fragmente angehängten Markierungen werden als Peakhöhen oder Peakflächen bestimmt. Die Flächen der Konzentrationsstandards, mit bekannten Mengen, werden anschließend verwendet, um die absoluten Mengen jedes Sonden-Fragments zu bestimmen.

**[0117]** Das experimentelle Design und die allgemeinen Prinzipien der vorliegenden Erfindung werden detaillierter unter Verwendung von Bakterienstämmen, die im Labor der Erfinder verfügbar sind, und synthetischer Polynukleotide beschrieben. Die Stämme und Polynukleotide dienen lediglich der Veranschaulichung. Die Erfindung ist in keiner Weise auf die Stämme und Polynukleotide oder Reaktionslösungen beschränkt.

**[0118]** Die Prinzipien der Erfindung können überprüft werden durch Ersetzen des in den Beispielen verwendeten Konstrukts durch beliebige andere Stämme oder Polynukleotidsequenzen und Sonden, die reichlich verfügbar sind. Der Fachmann auf dem Gebiet kann die Prinzipien der Erfindung für verschiedene Anwendungen anpassen.

## BEISPIEL 1

### Mobilität von Sonden im elektrischen Feld und Modifizierung von Sonden

**[0119]** Gesamt-RNA wurde aus *Clostridium symbiosum* Stamm VTT E-981051<sup>T</sup> (nachfolgend E1051) extrahiert und mit zwei gegen 16S rRNA gerichteten Sonden Bact (Amann R. I. et al., Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919–1925, 1990) und Erec (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998) hybridisiert. Die Sonde Bact ist spezifisch für Bakterien (früher Eubacteria) (Amann et al., 1990), während die Sonde Erec spezifisch ist für Bakterien, die zur Gruppe von *Clostridium coccoides* – *Eubacterium rectale* gehören (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998). Die Art *Clostridium symbiosum* gehört zur *Clostridium coccoides* – *Eubacterium rectale*-Gruppe und deren rRNA/rDNA wurde somit von beiden Sonden Bact

und Erec erkannt. Darüber hinaus wurde Erec-5A – eine modifizierte Version der Sonde Erec mit einem angehängten 5A-Schwanz (fünf zusätzliche Adenosine) – in dem Modellexperiment verwendet. Das Experiment erfolgte nach den unten angegebenen Schritten:

#### Präparative Schritte:

**[0120]** RNAse-freie Einweg-Mikrozentrifugenröhrenchen, Pipettenspitzen, Reagenzien usw. wurden falls erforderlich in den präparativen und analytischen Schritten verwendet.

#### Schritt 1 – Sonden

**[0121]** Gegen 16S rRNA gerichtete Oligonukleotid-Sonden

5' GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3' (SEQ ID NO:1)  
 5' GCTTCTTAGTCARGTACCG 3' (SEQ ID NO:2) und  
 5' GCTTCTTAGTCARGTACCGAAAAAA 3' (SEQ ID NO:3),

wobei R = A/G ist, sind in der Tabelle 1 aufgeführt und mit 6-FAM<sup>TM</sup> Fluorophor am 5'-Ende markiert, und wurden von Applied Biosystems bezogen.

TABELLE 1. Sonden

Name der Sonde	Sequenz	Länge (Nukleotide)	Literaturstelle
Bact	SEQ ID NO: 1	18	Amann et al., 1980
Erec	SEQ ID NO: 2	19	Franks et al., 1998
Erec-5A	SEQ ID NO: 3	24	buu

#### Schritt 2 – Präparation des Analyten

**[0122]** Clostridium symbiosum E1051 wurde als Reinkultur in verstärkter Clostridienbrühe (Difco) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Gesamt-RNA von E1051 wurde gemäß Zoetendal, E. G., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3854–3859 (1998) extrahiert.

#### ANALYTISCHE SCHRITTE:

##### Schritt 1 – Versehen von Analyten-Sequenzen mit Affinitäts-Tags

**[0123]** RNA wurde mit PHOROPROBE<sup>R</sup> Biotin SP-1000 gemäß den Herstelleranweisungen (VECTOR Laboratories) affinitätsmarkiert. Anschließend wurde die biotinylierte RNA mit einem RNeasy Mini Kit unter Anwendung des Protokolls für RNA-Reinigung gemäß den Herstelleranweisungen (Qiagen) von freiem Biotin gereinigt.

##### Schritt 2 – Lösungshybridisierung

**[0124]** Ein Aliquot der RNA-Probe (102 ng) wurde mit Polynukleotid-Sonde (1 pmol) in Hybridisierungslösung mit einer Endkonzentration von 5 × SSC (0,75 M NaCl – 75 mM Natriumcitrat, pH 7,0), 0,1% (Gew./Vol.) SDS und 1 × Denhardt's (0,02% (Gew./Vol.) Ficoll, 0,02% (Gew./Vol.) Polyvinylpyrrlidone, 0,02% (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin) gemischt. Das Volumen des Hybridisierungsgemisches betrug 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde 2 min bei 70°C und anschließend 30 min bei 40°C inkubiert.

##### Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

**[0125]** Nach der Hybridisierung wurde ein KingFisher magnetischer Partikelprozessor (ThermoLabsystems) verwendet, um den Affinitätseinfang, die Wasch- und Elutionsschritte durchzuführen, indem mit Streptavidin beschichtete magnetische Beads von Schritt zu Schritt auf einer KingFisher-Mikrotiterplatte gemäß einem programmierten Protokoll bewegt wurden. Die Lösungen für jeden Schritt wurden zuvor in spezifizierte Wells auf der Mikrotiterplatte pipettiert und das Verfahren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

**[0126]** Die Hybridisierungsreaktionen wurden in spezifizierte Wells auf der KingFisher-Platte (den KingFisher-Platten) übertragen. Um die NaCl-Konzentration auf geeignete Werte (1 M) für den Affinitätseinfang einzustellen,

stellen und das Hybridisierungsgemisch quantitativ in die King-Fisher-Wells zu übertragen, wurden die Hybridisierungsröhrchen/Wells mit 40 µl Spülösung gespült und die Spülösung anschließend zu den selben King-Fisher-Wells mit den Hybridisierungsgemischen gegeben. Die Spülösung besteht aus einem Teil 2 M NaCl-10 mM Tris-HCl (pH 7,5) – 1 mM EDTA und 2,33 Teilen Hybridisierungslösung (siehe Schritt 2).

**[0127]** Biotinylierte RNA und RNA-Oligonukleotid-Hybide wurden 30 min auf Streptavidinbeschichteten magnetischen Partikeln Dynabeads® M-280 (50 µg, Dynal A. S., Norwegen) gesammelt. Nach dem Einfangen wurden die Partikel drei Mal mit 150 µl 1 × SSC (0,15 M NaCl – 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0) – 0,1% SDS und zwei Mal mit 150 µl Wasser (entionisiert, ultrafiltriert, RNase-frei) gewaschen und die Sonden mit 30 µl Formamid eluiert. Anschließend wurde das Formamid in einem Lyophilisator verdampft und die Sonden in 10 µl Wasser resuspendiert.

#### Schritt 4 – Identifizierung der eluierten Sonden

**[0128]** Die eluierten Sonden wurden unter Verwendung einer ABI310 Kapillarelektrophorese-Apparatur (Applied Biosystems) analysiert. Die eluierten Sonden wurden aufgrund ihres Migrationsverhaltens identifiziert. Zuvor ließ man freie Sonden auf derselben Apparatur unter den gleichen Laufbedingungen laufen und bestimmte deren Migrationsverhalten. Um den Vergleich individueller Läufe (d. h. Proben) zu erleichtern, wurden den Proben ein Größenstandard zugegeben. Das Ergebnis wurde aus dem Elektropherogramm und aus der Datendatei wie in [Fig. 7](#) gezeigt abgelesen.

**[0129]** Wie in [Fig. 7](#) zu sehen ist, wurden Oligonukleotid-Sonden, die sich in ihrer Größe nur um ein Nukleotid unterschieden, als individuelle Peaks in der Kapillarelektrophorese getrennt, und das Anhängen eines 5A-Schwanzes zur Erec-Sonde veränderte deren Migrationsverhalten signifikant. Trotz der Modifizierung der Sonde Erec durch das Anhängen des 5A-Schwanzes erkannte diese die Ziel-RNA aus dem Stamm E1051.

#### BEISPIEL 2

##### Spezifität der Sonden in einem erfindungsgemäßen Protokoll

**[0130]** Die Spezifität der zwei Sonden Chis und Erec (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998) unter den angegebenen Reaktionsbedingungen wurde durch Hybridisieren der Sonden mit einer Anzahl von Bakterienstämmen sichergestellt. Die Sonde Bact wurde als interne Kontrolle bei der Hybridisierung verwendet, um die Unversehrtheit der bakteriellen rRNA sicherzustellen. Chis ist spezifisch für Bakterien, die zur Clostridium histolyticum-Gruppe gehören (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998). Die Sonden Bact und Erec wurden zuvor in Beispiel 1 beschrieben. Das Experiment erfolgte nach den unten angegebenen Schritten:

##### PRÄPARATIVE SCHRITTE:

###### Schritt 1 – Sonden

**[0131]** Chis 5' TTATGCGGTATTAATCTRCCTTT 3' (SEQ ID NO: 4), wobei R = C/T ist; (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998), markiert mit 6-FAM™ am 5'-Ende, wurde von Applied Biosystems bezogen. Die Sonden Bact und Erec wurden zuvor im präparativen Schritt 1 im Beispiel 1 beschrieben.

###### Schritt 2 – Präparation der Analyten

**[0132]** Reinkulturen verschiedener Mikroorganismen aus der VTT Culture Collection (Tabelle 2) wurden in geeignetem Nährmedium kultiviert und Gesamt-RNA aus den Bakterien wurde wie von Zoetendal, E. G., et al. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3854–3859 (1998) beschrieben oder mit dem RNeasy Mini Kit unter Anwendung des Protokolls für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien gemäß den Herstelleranweisungen (Qiagen) extrahiert. Gesamt-RNA aus Trichoderma wurde unter Verwendung der TRIzol® Reagent-Methode (Life Technologies; Gibco BRL) extrahiert.

TABELLE 2. Test-Organismen

Art	Alternative Stam-Codes VTT	Internationale Kultur- sammlung ATCC 824	Ziel der Sonde			Chis
			Bact	Erec		
Clostridium acetobutylicum	E-00022 <sup>T</sup>	ATCC 824	+	-	+	
Clostridium tyrobutyricum	E-99908	DSM663	+	-	+	
Clostridium symbiosum	E-981051 <sup>T</sup>	ATCC 14940	+	+	-	
Eubacterium rectale	E-022088	ATCC 33656	+	+	-	
Clostridium leptum	E-021850 <sup>T</sup>	DSM 753 <sup>T</sup>	+	-	-	
Clostridium lituseburnense	E-021853 <sup>T</sup>	DSM 797 <sup>T</sup>	+	-	-	
Trichoderma reesei	D-74075	ATCC 26921	-	-	-	

## ANALYTISCHE SCHRITTE:

## Schritt 1 – Versehen von Analyten-Sequenzen mit Affinitäts-Tags

**[0133]** RNA wurde wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben mit Biotin affinitätsmarkiert. Nach der Biotinylierung wurde die biotinierte RNA gemäß dem von VECTOR Laborstories bereitgestellten Protokoll oder mit dem RNeasy Mini Kit unter Anwendung des Protokolls für RNA-Reinigung gemäß den Herstelleranweisungen (Qiagen) von freiem Biotin gereinigt.

## Schritt 2 – Lösungshybridisierung

**[0134]** Ein Aliquot der RNA-Probe (50 bis 80 ng) wurde mit Hybridisierungslösung (siehe analytischer Schritt 2 in Beispiel 1), welche die Oligonukleotid-Sonden Bact und Chis oder Bact und Erec enthielt (jeweils 1 pmol), gemischt. Das Endvolumen des Hybridisierungsgemisches betrug 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde 2 min bei 70°C und anschließend 30 min bei 50°C inkubiert.

## Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

**[0135]** Der Affinitätseinfang, die Waschschrifte und die Elution wurden unter Verwendung des KingFisher magnetischen Partikelprozessors (ThermoLabsystems) wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

## Schritt 4 – Identifizierung der eluierten Sonden

**[0136]** Die eluierten Sonden wurden unter Verwendung einer ABI310 Kapillarelektrophorese-Apparatur (Applied Biosystems) wie im analytischen Schritt 4 in Beispiel 1 beschrieben analysiert.

**[0137]** Wie in **Fig. 8** zu sehen ist, zeigten die Oligonukleotid-Sonden Chis und Erec die erwartete Spezifität (Tabelle 2) unter den angegebenen Hybridisierungsbedingungen und ergaben Signale nur mit Stämmen, die zu ihrer Ziel-Gruppe gehören. Die Sonden zeigten die erwartete Spezifität auch mit den Stämmen E-00022<sup>T</sup> und E-022088, die in **Fig. 8** nicht gezeigt sind. Weiterhin zeigte die Sonde Bact ebenfalls die gewünschte Spezifität und erzeugte kein Signal mit RNA von Trichoderma reesei. Die RNA aus dem Stamm E-021850 war zum Teil abgebaut, ergab jedoch noch ein Signal mit der Sonde Bact, was zeigt, dass das Verfahren auch verwendet werden kann, um RNA zu analysieren, die beispielsweise während der präparativen Schritte geschnitten („shared“) wurde. Die angegebenen Hybridisierungsbedingungen waren bei allen drei Sonden die gleichen, und folglich können diese Sonden als Pool von Sonden verwendet werden.

## BEISPIEL 3

## Quantitative Bestimmung

**[0138]** Gesamt-RNA wurde aus Clostridium tyrobutyricum VTT E-99908 (nachfolgend E908) extrahiert und verschiedene Menge an RNA (0,01–10 ng) wurden mit den Sonden Bact und Chis hybridisiert. Das Experiment

erfolgte nach den unten angegebenen Schritten:

PRÄPARATIVE SCHRITTE:

Schritt 1 – Sonden

**[0139]** Die zuvor im präparativen Schritt 1 in Beispiel 1 beschriebenen Sonden Bact und Chis wurden in dem Experiment verwendet.

Schritt 2 – Präparation von Analyten

**[0140]** E908 wurde als Reinkultur in verstärkter Clostridien-Brühe (Difco) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert und Gesamt-RNA wurde unter Anwendung des Protokolls für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien gemäß den Herstelleranweisungen (Quiagen) mit dem RNeasy Mini Kit isoliert.

ANALYTISCHE SCHRITTE:

Schritt 1 – Versehen von Analyten-Sequenzen mit Affinitäts-Tags

**[0141]** RNA wurde wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben mit Biotin affinitätsmarkiert. Nach der Biotinylierung wurde die biotinierte RNA von freiem Biotin gemäß dem von VECTOR Laborstories bereitgestellten Protokoll gereinigt.

Schritt 2 – Lösungshybridisierung

**[0142]** Gesamt-RNA-Extrakt aus E908 wurde in geeigneter Weise verdünnt und ein Aliquot der RNA-Probe (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 und 10,0 ng) wurde mit Hybridisierungslösung gemischt (siehe analytischer Schritt 2 in Beispiel 1), welche die Oligonukleotid-Sonden Bact und Chis (jeweils 1 pmol) enthielt. Das Endvolumen des Hybridisierungsgemisches betrug 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurden 2 min bei 70°C und anschließend 30 min bei 50°C inkubiert.

Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

**[0143]** Der Affinitätseinfang, die Waschschrifte und die Elution wurden unter Verwendung des KingFisher magnetischen Partikelprozessors (ThermoLabsystems) wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Schritt 4 – Identifizierung der eluierten Sonden

**[0144]** Die eluierten Sonden wurden unter Verwendung einer AB1310 Kapillarelektrophorese-Apparatur (Applied Biosystems) wie im analytischen Schritt 4 in Beispiel 1 beschrieben analysiert.

**[0145]** Wie in [Fig. 9](#) zu sehen ist, korrelierte die Sonden-Signalintensität (Peakhöhe und Peakfläche) gut mit der in der Hybridisierung verwendeten Menge an RNA. Beide Sonden haben Ziel-Stellen innerhalb des 16S rRNA-Moleküls, jedoch in unterschiedlichen Regionen des Moleküls. Die Sonden Bact und Chis wiesen eine gleiches Maß an Fluoroprot-Markierung auf, und daher waren die Signalintensitäten der Sonden vergleichbar.

BEISPIEL 4

Analyse von mikrobiellen Populationen

**[0146]** Gesamt-RNA wurde aus den Stämmen E1051, E908 und Clostridium lituseburens VTT E-021853 (nachfolgend E1853) extrahiert. Verschiedene Mengen an RNA aus diesen drei Stämmen wurden gemischt und mit einem Pool von Sonden hybridisiert, der aus den Sonden Bact, Erec und Chis bestand. Das Experiment erfolgte nach den unten angegebenen Schritten:

## PRÄPARATIVE SCHRITTE:

## Schritt 1 – Sonden

**[0147]** Die Sonden Bact, Erec und Chis, die zuvor im präparativen Schritt 1 in Beispiel 1 und im präparativen Schritt 1 in Beispiel 2 beschrieben wurden, wurden in dem Experiment verwendet.

## Schritt 2– Präparation von Analyten

**[0148]** Gesamt-RNA aus Reinkulturen von E1051, E908 und E1853 wurde wie zuvor im präparativen Schritt 2 in Beispiel 2 beschrieben extrahiert.

## ANALYTISCHE SCHRITTE:

**[0149]** Schritt 1 – Versehen von Analyten-Sequenzen mit Affinitäts-Tags RNA wurde wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben mit Biotin affinitätsmarkiert. Nach der Biotinylierung wurde die biotinierte RNA wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 2 beschrieben von freiem Biotin gereinigt.

## Schritt 2 – Lösungshybridisierung

**[0150]** Bestimmte Mengen von RNA von verschiedenen Bakterien (Tabelle 3) wurden gemischt und Hybridisierungslösung (siehe analytischer Schritt 2 in Beispiel 1), welche die Oligonukleotid-Sonden Bact, Chis und Erec (jeweils 1 pmol) enthielt, wurde zugegeben. Das Endvolumen des Hybridisierungsgemisches betrug 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurden 2 min bei 70°C und anschließend 30 min bei 50°C inkubiert.

TABELLE 3. In Beispiel 4 durchgeführte Hybridisierungsexperimente

Hybridisierungsreaktion	Sonden-Pol	% RNA der Gesamt-RNA	E 1051	E908	E1853
I	Bact, Erec, Chis	100	-	-	-
II	Bact, Erec, Chis	-	100	-	-
III	Bact, Erec, Chis	20	20	60	-
IV	Bact, Chis	50	50	-	-
V	Bact, Chis	80	20	-	-

## Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

**[0151]** Der Affinitätseinfang, die Waschschrifte und die Elution wurden unter Verwendung des KingFisher magnetischen Partikelprozessors (ThermoLabsystems) wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

## Schritt 4 – Identifizierung der eluierten Sonden

**[0152]** Die eluierten Sonden wurden unter Verwendung einer AB1310 Kapillarelektrophorese-Apparatur (Applied Biosystems) wie im analytischen Schritt 4 in Beispiel 1 beschrieben analysiert.

**[0153]** Wie in [Fig. 10A](#) zu sehen ist, war das Signal von der Sonde Erec geringer als das Signal von der Sonde Bact, wenn RNA von *C. symbiosum* E1051 analysiert wurde. Dies war zurückzuführen auf den geringeren Grad an Fluorophor-Markierung der Sonde Erec im Vergleich mit der Sonde Bact. Der Grad der Fluorophor-Markierung der Sonden Bact und Chis war gleich, und dementsprechend waren die Signalintensitäten der Sonden Bact und Chis bei Analyse von RNA von *C. tyrobutyricum* E908 gleich. Der Grad der Sonden-Markierung könnte somit verwendet werden, um die Nachweisgrenze auf einen angemessenen Grad anzupassen. Bei der qualitativen Analyse einer mikrobiellen Population, welche RNA von *C. tyrobutyricum* E908, *C. symbiosum* E1051 und *C. lituseburensis* E1853 umfasste, führten erwartungsgemäß alle Sonden Bact, Chis und Erec zu einem Signal. Die Bact-Sonde identifizierte alle Stämme, während Chis nur den Stamm E908 identifizierte und Erec nur den Stamm E1051 identifizierte.

**[0154]** Wie in [Fig. 10B](#) zu sehen ist, konnten die Sonden Bact und Chis, die einen gleichen Grad an Fluorophor-Markierung aufweisen, in einer gemischten Bakterienpopulation (*C. tyrobutyricum* E908 und *C. symbiosum* E1051) zur Quantifizierung der relativen Anteile von Bakterien, die zur *C. histolyticum*-Gruppe gehören

(C. tyrobutyricum E908), verwendet werden. Die Bact-Sonde identifizierte beide Stämme, während Chis nur den Stamm E908 identifizierte.

#### BEISPIEL 5

Nachweis und Quantifizierung von gegen 16S rRNA gerichteten Sonden über Massenspektrometrie

**[0155]** Der relative Anteil der gegen 16S rRNA gerichteten Sonden Bact (Amann R. I., et al., Appl., Environ. Microbiol. 56: 1919–1925, 1990) und Chis (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998) in einer Probe wurde unter Verwendung von Massenspektrometrie quantifiziert. Der experimentelle Ansatz ahmt eine Situation für den Sondennachweis nach, bei der zur C. histolyticum-Gruppe gehörende Bakterien einen Teil der gesamten Bakterienpopulation bilden. Die Sonde Bact erkannte alle Bakterien (früher Eubakterien) (Amann R. I., et al., Appl., Environ. Microbiol. 56: 1919–1925, 1990), während die Sonde Chis Bakterien erkannte, die zur Gruppe von Clostridium histolyticum gehören (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3336–3345, 1998). Das Experiment erfolgte nach den unten angegebenen Schritten:

##### Schritt 1 – Sonden

**[0156]** Die gegen 16S rRNA gerichteten Oligonukleotid-Sonden Bact und Chis, die zuvor im präparativen Schritt 1 im Beispiel 1 und im präparativen Schritt 1 im Beispiel 2 beschrieben wurden, wurden in dem Experiment verwendet.

##### Schritt 2 – Präparation von Analyten

**[0157]** Es wurde eine Probe hergestellt, die 1 µM der Sonde und 0,1 µM der Sonde Chis enthielt.

#### ANALYTISCHE SCHRITTE:

##### Schritt 1 – Nachweis und Quantifizierung der Sonden über Massenspektrometrie

**[0158]** Die die Sonden Bact und Chis enthaltenden Proben wurden unter Verwendung von matrixunterstützter Desorption/Ionisationsflugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) gemäß den Anweisungen des Instrumentenherstellers (Sequenon) analysiert. Die Sonden wurden anhand ihrer Masse identifiziert und ihre relative Menge in der quantifizierten Probe wurde durch die Signalintensität quantifiziert (Peakhöhe).

**[0159]** Wie in [Fig. 12](#) zu sehen ist, konnten die Sonden Bact und Chis als individuelle Peaks in der Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Sonde Chis wurde durch zwei Peaks repräsentiert, da die Sonde zwei unterschiedliche Sequenzen aufwies (die sechste Base vom 3'-Ende gesehen ist entweder C oder T), die folglich unterschiedliche Massen aufwiesen. Das Signal der Sonde Bact war ungefähr zehn Mal höher als das kombinierte Signal der zwei Peaks der Sonde Chis. Die Signalintensitäten der Sonden korrelierten gut mit ihren relativen Anteilen in der Probe.

#### BEISPIEL 6

Quantitative und/oder vergleichende Bestimmung von Variationen bei den Polynukleotid-Mengen in Zell- oder Gewebeproben unter Verwendung von biotinyliertem oligo (dT)

#### PRÄPARATIVE SCHRITTE:

**[0160]** Genomische DNA und Oligonukleotide wurden verwendet, um spezifische Sonden mit eindeutigen Größen herzustellen.

##### Schritt 1 – Präparation genomicscher DNA

**[0161]** *Saccharomyces cerevisiae* VTT-H1346 (wt) Zellen wurden kultiviert, geerntet, und genomische DNA wurde aus den Zellen isoliert wie im Supplement 39, Current Protocols in Molecular Biology (1997) 13.11.1–13.11.4, John Wiley & Sons, Inc. beschrieben.

## Schritt 2 – Entwurf und Herstellung von Primern

**[0162]** Spezifische Sondensequenzen für einen Satz von Genen wurden erhalten unter Verwendung von Methoden und einem Computerprogramm, die beschrieben sind in Kivioja et al., Bioinformatics, 2002 Juli; 18 Suppl 1: S199–206 (Sonden für die *S. cerevisiae* Gene YAL054c-ACS1, YCR005c-CIT2, YMR083w-ADH3 und YBL015w-ACH1) oder unter Verwendung der Programme: EBI Genomes Server (2001) unter <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>, zum Herunterladen kodierender Sequenzen (CDS) vom *S. cerevisiae* Genom; Steve Rozen, Helen J.. Skaletsky (1998) Primer3. Code verfügbar unter [http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html), zum Auffinden von einzigartigen Primern in CDSs und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> zum Überprüfen der Einzigartigkeit von Primern und in silico hergestellten Produkten in Genome/CDS (Sonde für das *S. cerevisiae* Gene YFL039c-ATCT1).

**[0163]** Die erhaltenen Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Sequenzen waren entsprechend (in der Richtung 5'-3')

YAL054c-ACS1:

ACAATGCCAGGGTTGACAATG (SEQ ID NO:5) und  
AAAGACATCGGCCATTG (SEQ ID NO:6),

YCR005c-CIT2:

TTAGCACGCCCATGAAGTGG (SEQ ID NO:7) und  
AGGATGAAGATTCGTGGACTTGA (SEQ ID NO:8),

YMR083w-ADH3:

AAGCTACCAAAGGTGGCCCTC (SEQ ID NO:9) und  
AGGCTTCTCTCGTATCAGCTCTGT (SEQ ID NO:10),

YBL015w-ACH1:

GCCCTCTGACGACATGTCCAG (SEQ ID NO:11) und  
ATTGGCGTGC CGCGTAAATGT (SEQ ID NO:12) und

YFL039c-ACT1:

GCCCCAGAAGAACACCCTGT (SEQ ID NO:13) und  
ACCGGCCAAATCGATTCTCA (SEQ ID NO:14).

**[0164]** Für jedes für ein bestimmtes Gen erhaltenes Primer-Paar wurden sogenannte universelle Primer-Sequenzen an die Vorwärts- und Rückwärts-Primer angehängt, die Sequenz 5'-tgcttaggcgcggccgtc-3' (SEQ ID NO: 15) an den Vorwärts-Primer und die Sequenz 5'-ggatcgccgcgttc-3' (SEQ ID NO: 16) an den Rückwärts-Primer des Primer-Paares. Dementsprechend war beispielsweise für das Gen YBL015w-ACH1 der Vorwärts-Primer in voller Länge

5'-tgcttaggcgcggccgtcGCCCTCTGACGACATGTCCAG-3' (SEQ ID NO:17)

und der Rückwärts-Primer in voller Länge war

5'-ggatgcggccgcttcATTGGCGTGCCTAAATGT-3' (SEQ ID NO:18).

[0165] Die endgültigen Größen der Sonden, die über Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Primern, die sowohl spezifische als auch universelle Sequenzen enthielten, waren folgendermaßen:

YAL054c-ACS1: 193 Basen;  
YCR005c-CIT2: 207 Basen;  
YMR083w-ADH3: 248 Basen;  
YFL039c-ACT1: 290 Basen; und  
YBL015w-ACH1: 453 Basen.

[0166] Aus universellen und spezifischen Teilen bestehende Primer wurden von der Sigma-Genosys Ltd. bezogen. Die universellen Primer, 5'-tgctaggcgccgtc-3' (SEQ ID NO: 15) und 5'-ggatgcggccgcttc-3' (SEQ ID NO: 16), mit 5'-angehängtem 6FAM<sup>TM</sup> Fluorophor wurden von der ThermoElectron Corporation bezogen.

#### Schritt 3 – Herstellung der Sonden

[0167] Eine PCR-Reaktion wurde durchgeführt, um die spezifischen Sonden-Sequenzen aus der genomischen DNA (aus Schritt 1) zu amplifizieren. Die Pufferbedingungen wurden den Erfordernissen der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonuklease-Aktivität) angepasst. Ein PCR-Programm bestehend aus 98°C, 30 s; 10 Zyklen bei 98°C 10 s, 70°C 20 s (-0,5°C/Zyklus), 72°C 25 s; 20 Zyklen bei 98°C 10 s, 65°C 20 s; 72°C 25 s; 72°C 10 min wurde verwendet.

[0168] Anschließend wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAquick<sup>R</sup> Spin Handbuch, März 2001; QIAGEN) aufgereinigt. Man ließ die Sonden-Fragmente in 2,5–4% Agarosegelen (gefärbt mit Ethidiumbromid) in horizontaler Gelelektrophorese 1–2 h bei 75 V laufen, isolierte und reinigte weiter auf unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAquick<sup>R</sup> Spin Handbuch, März 2001; QIAGEN).

[0169] Fluoreszierende Markierungen wurden in die Sonden während der zweiten PCR-Reaktion eingeführt. Universelle Primer mit 5'-angehängten Fluorophoren, 6FAM<sup>TM</sup>, wurden verwendet, um die aufgereinigten Sonden unter Bedingungen zu amplifizieren, die im Wesentlichen den oben beschriebenen ähnlich waren. Anschließend wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAquick<sup>R</sup> Spin Handbuch, März 2001; QIAGEN) aufgereinigt. Die Sonden wurden anschließend auf einem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät ABI PRISM<sup>R</sup> 310, Genetic Analyser (Applied Biosystems) unter Verwendung der GeneScan<sup>R</sup> Analysis Software (Applied Biosystems) analysiert. Die Sonden-Proben wurden auf geeignete Konzentrationen verdünnt und mit einer bekannten Menge an GeneScan-500 Größenstandard (Applied Biosystems) gemischt, und Formamid wurde zugegeben, um ein geeignetes Injektionsvolumen zu erhalten.

[0170] Ein Agilent 2100 Bioanalyzer<sup>R</sup> und ein DNA 500 LabChip Kit (#5064-8284, Agilent) wurden verwendet, um die Qualität und Quantität der aufgereinigten Produkte nach jeder PCR zu überwachen.

[0171] Die Herstellung der Proben über PCR ist in [Fig. 13](#) gezeigt.

#### Schritt 4 – Präparation der RNA-Analyten

[0172] Zellen von *S. cerevisiae* VTT-H2217 wurden auf „Yeast Nitrogen Base“-Medium (Difco, #291940) mit essentiellen Aminosäuren (Modifikation von Sherman et al., Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1983) und mit 3% Glukose bis zu einer O. D. von 3,5–4,0 kultiviert und die Boten-RNA wurde gemäß einem auf kleinere Mengen angepassten Protokoll isoliert, das beschrieben ist im Promega Notes Magazin Nummer 41, Seite 14 (1993). Die Ausbeute und Unversehrtheit der mRNA wurde unter Verwendung eines Agilent 2100 Bioanalyzer<sup>R</sup> und eines RNA 6000 Nano LabChip Kits (#5064-4476, Agilent) überprüft.

[0173] Das Experiment erfolgte gemäß den unten angegebenen Schritten:

#### ANALYTISCHE SCHRITTE:

##### Schritt 1 – Zusammenstellung des Hybridisierungsassays

[0174] Die Hybridisierungsassays wurden auf einer PCR-Platte (#AB-0600, Abgene) zusammengestellt, wo-

bei  $2 \times$  Hybridisierungslösung: 1,2 M NaCl, 0,12 M Natriumcitrat (pH 7), 0,2% (Gew./Vol.) SDS, 40% Formamid und 0,04% (Gew./Vol.) Ficoll, 0,04% (Gew./Vol.) Polyvinylpyrrolidon, 0,04% (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin ( $2 \times$  Denhardt's Lösung); Sonden-Gemisch (enthaltend 100 fmol jeder 6FAM™-markierten Sonde); 200, 400 oder 600 ng mRNA (jede Menge in den Duplikaten A und B); 3,5 fmol/(ng mRNA) Biotinylierte Oligo (dT) Sonde (Z5261, Promega) und Rnase-freies Wasser zur Verdünnung der Hybridisierungslösung auf  $1 \times$  im Endvolumen zusammengegeben wurden. Ein typisches Endvolumen eines Assays beträgt 30–60 µL.

#### Schritt 2 – Denaturierung und Hybridisierung von Sonden und oligo (dT) mit mRNA in Lösung

**[0175]** Die PCR-Platte wurde unter Verwendung von abziehbarer hitzeversiegelbarer Folie (EASY Peel, AB-0745 Abgene) und Thermosealer (AB-0384/240 Abgene) versiegelt. Die zusammengeführten Assay-Gemische wurden in einem Thermoblock (DNA Engine™ PTC200, MJ Research) 5 min bei 75°C, 8 h bei 58°C und 8 h bei 45°C inkubiert. Schließlich wurden die Hybridisierungsreaktionen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (um die Biotinylierte Oligo(dT) Sonde mit den mRNAs zu hybridisieren).

#### Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

**[0176]** Nach der Hybridisierung wurde ein KingFisher magnetischer Partikelprozessor (ThermoLabsystems) verwendet, um den Affinitätseinfang, die Wasch- und Elutionsschritte durchzuführen, indem mit Streptavidin beschichtete magnetische Beads von Schritt zu Schritt auf einer KingFisher-Mikrotiterplatte gemäß einem programmierten Protokoll bewegt wurden. Die Lösungen für jeden Schritt wurden zuvor in spezifizierte Wells auf der Mikrotiterplatte pipettiert und das Verfahren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

**[0177]** Die Hybridisierungsreaktionen aus den Inkubations-Wells wurden in spezifizierte Wells in einer KingFisher-Platte übertragen. Um die Hybridisierungsgemische quantitativ in die KingFisher-Wells zu übertragen, wurden die Inkubations-Wells in Schritt 2 einmal mit  $1,5 \times$  Hybridisierungsvolumen an  $0,5 \times$  SSC (0,075 M NaCl – 7,5 mM Natriumcitrat, pH 6,5) – 0,1% SDS-Lösung gespült, und die Spülösungen wurden denselben KingFisher-Wells mit den Hybridisierungsgemischen zugegeben.

**[0178]** Biotinylierte Oligo(dT):mRNA:Sonden-Hybride wurden 30 min auf Streptavidinbeschichteten magnetischen Partikeln (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, 25241, Promega) gesammelt. Nach dem Einfangen wurden die Partikel drei Mal mit  $0,2 \times$  SSC – 0,1% SDS und zwei Mal mit  $0,1 \times$  SSC – 0,1% SDS gewaschen und die Sonden mit 30 µL Formamid eluiert. Anschließend wurde das Formamid in einem Lyophilisator verdampft und die Sonden in 5 µL Wasser resuspendiert.

#### Schritt 4 – Identifizierung und Analysen eluierter Sonden

**[0179]** Die eluierten Sonden wurden unter Verwendung eines Kapillarelektrophorese DNA Sequenziergeräts ABI PRISM® 310, Genetic Analyser (Applied Biosystems) und der GeneScan® Analysis Software (Applied Biosystems) analysiert. Die resuspendierten Proben wurden mit einer bekannten Menge an GeneScan-500 Größenstandard (Applied Biosystems) gemischt und Formamid wurde zugegeben, um ein geeignetes Injektionsvolumen zu erhalten.

**[0180]** Die eluierten Sonden wurden aufgrund ihres Migrationsverhaltens in der Kapillarelektrophorese identifiziert, im Vergleich mit den Größenstandards und den für einzelne Sonden durchgeföhrten Läufen im präparativen Schritt 3 unter den gleichen Laufbedingungen. Die Menge der eluierten Sonden wurde anhand der Peak-Fläche (Fluoreszenz-Flächeneinheiten, AU) bestimmt. Das Ergebnis wurde aus dem Elektropherogramm und der Datendatei gelesen. Das Fluoreszenz-Verhältnis (AU) der Sonden YBL015w-ACH1 (Größe 453 Basen) und YCR005c-CIT2 (Größe 207 Basen) in allen Assays (mRNA-Mengen 200, 400 und 600 ng) wurde berechnet (Duplikate A und B) wie in Tabelle 4 gezeigt, ebenso wie der Mittelwert und die Standardabweichung der Verhältnisse in den sechs Assays.

## TABELLE 4

Das Verhältnis der Signale der Sonden YBL015w-ACH1 (Größe 453 Basen) und YCR005c-CIT2 (Größe 207 Basen) in den Assays A und B

mRNA-Menge im Assay (ng)	Assay A	Assay B	Mittelwert	Standard-abweichung
200	4,7	4,5		
400	5,5	4,6		
600	6,0	6,1		
			5,2	0,7

## BEISPIEL 7

Quantitative Bestimmung kleiner Mengen von Analyten

## PRÄPARATIVE SCHRITTE:

[0181] Die präparativen Schritte wurden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

## ANALYTISCHE SCHRITTE:

[0182] Die analytischen Schritte hinsichtlich der Sonden unterschieden sich von denen in Beispiel 6 wie unten beschrieben hinsichtlich des experimentellen Ansatzes zum Nachweis sehr geringer RNA-Mengen.

## Schritt 1 – Zusammenstellung des Hybrisierungs-Assays

[0183] Die Hybridisierungs-Assays wurden wie im analytischen Schritt 1 in Beispiel 6 beschrieben zusammengestellt (jede mRNA-Menge 200, 400 und 600 ng in den Duplikaten C und D).

## Schritt 2 – Denaturierung und Hybridisierung von Sonden und oligo (dT) mit mRNA in Lösung

[0184] Die Denaturierung und Hybridisierung wurde wie im analytischen Schritt 2 in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

## Schritt 3 – Affinitätseinfang, Waschschrifte und Elution

[0185] Der Affinitätseinfang, die Waschschrifte und die Elution wurden wie im analytischen Schritt 3 in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

## Schritt 4 – Amplifizierung eluierter Sonden

[0186] Die eluierten Sonden (in 5 µl Wasser resuspendiert) wurden unter Verwendung von Fluorophor-markierten Primern (beschrieben im präparativen Schritt 2 in Beispiel 6) in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die Pufferbedingungen wurden hinsichtlich der Erfordernisse der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonuklease-Aktivität) angepasst. Ein PCR-Programm, bestehend aus beispielsweise 98°C 30 s; 15 Zyklen von 98°C 10 s, 72°C 30 s, wurde verwendet. Eine Negativkontrolle (ohne Template) wurde unter Verwendung des gleichen PCR-Programms durchgeführt.

## Schritt 5 – Aufreinigung der amplifizierten Sonden

[0187] Anschließend wurden die PCR-Reaktionsansätze unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Protocol (QIAquick® Spin Handbook, März 2001; QUIAGEN) aufgereinigt.

## Schritt 6 – Verdünnen aufgereinigter Sonden

[0188] Die aufgereinigten Sonden wurden 1:100 in Wasser verdünnt. Die Negativkontrolle wurde nicht verdünnt.

## Schritt 7 – Identifizierung und Analyse verdünnter Sonden und der Negativkontrolle

**[0189]** Die verdünnten Sonden wurden unter Verwendung eines Kapillarelektrophorese DNA Sequenziergeräts ABI PRISM® 310, Genetic Analyser (Applied Biosystems) und der Gene-Scan® Analysis Software (Applied Biosystems) unter den gleichen Bedingungen wie die eluierten Sonden im analytischen Schritt 4 in Beispiel 6 identifiziert und analysiert. 0,5 µl der verdünnten Proben oder 1 µl der unverdünnten Negativkontrolle wurde mit einer bekannten Menge GeneScan Größenstandard (Applied Biosystems) gemischt und Formamid wurde zugegeben, um ein geeignetes Injektionsvolumen zu erhalten.

**[0190]** Die amplifizierten und verdünnten Sonden wurden aufgrund ihres Migrationsverhaltens in der Kapillarelektrophorese identifiziert, im Vergleich mit den Größenstandards und den für einzelne Sonden durchgeführten Läufen im präparativen Schritt 3 unter den gleichen Laufbedingungen. Die Menge der amplifizierten und verdünnten Sonden wurde anhand der Peak-Fläche (AU) bestimmt. Das Ergebnis wurde aus dem Elektrophrogramm und der Datendatei gelesen.

**[0191]** Die Elektropherogramme der mit 600 ng mRNA (Analytischer Schritt 1) zusammengestellten Assays ohne Amplifizierung (Beispiel 6) und mit Amplifizierung und eine Negativkontroll-Amplifizierung sind in [Fig. 14](#) gezeigt. In der nicht-amplifizierten Probe ist nur der Peak der Sonde YCR005c-CIT2 (207 Basen) deutlich zu sehen. In den amplifizierten (und verdünnten) Assays war YCR005cCIT2 als starker Peak zu sehen, und auch die Peaks der Sonden YAL054c-ACS1 (193 Basen) und YFL039c-ACT1 (Größe 290 Basen) sind deutlich zu sehen, ebenso wie Spuren der Peaks des Sonden-Gens YMR083w-ADH3 (248 Basen). Die Negativkontroll-PCR zeigte keine Amplifizierung der betreffenden Sonden.

**[0192]** Das Verhältnis der Sonden-Fluoreszenz (aU) der Sonden YBL015w-ACH1 (Größe 453 Basen) und YCR005c-CIT2 (Größe 207 Basen) in allen amplifizierten Assays (mRNA-Mengen 200, 400 und 600 ng) wurden berechnet (Duplikate C und D) wie in Tabelle 5 gezeigt, ebenso wie der Mittelwert und die Standardabweichung der Verhältnisse in den sechs Assays. Die aus den amplifizierten Assays (Tabelle 5) und den nicht-amplifizierten Assay (Tabelle 4) errechneten durchschnittlichen Verhältnisse der zwei Sonden waren unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Aufreinigung, Verdünnung und die Ungenauigkeit beim Pipettieren kleiner Volumina die Quantifizierung beeinflussen können, gut vergleichbar.

TABELLE 5

Das Verhältnis der Signale der Sonden YBL015w-ACH1 (Größe 453 Basen) und YCR005c-CIT2 (Größe 207 Basen) in den Assays C und D nach 15 PCR-Zyklen

mRNA-Menge im Assay (ng)	Assay C	Assay D	Mittelwert	Standard-abweichung
200	3,5	3,8		
400	4,6	4,4		
600	3,8	4,5		
			4,1	0,5

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Valtion Teknillinen tutkimuslaitos (VTT)

<120> Verfahren und Testkit zur quantitativen Bestimmung von Polynukleotiden in einem Gemisch

<130> A2469PC

<140>

<141>

<150> FI20021325

<151> 2002-07-05

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<220>

<223> Bact, eine konservierte bakterielle rRNA-Sequenz

<220>

<223> Amann et al., 1990

<400> 1

gctgcctccc gtaggagt

18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<220>

<223> Erec, rRNA-Sequenz, bakterielle phylogenetische Gruppe  
**Clostridium cocoides - Eubacterium rectale**

<220>

<223> Franks et al., 1998

<400> 2

gcttcttagt c argt accg

19

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<220>

<223> Erec-5A, rRNA-Sequenz mit einer Verlängerung von fünf  
zusätzlichen As

<220>

<223> R=A/G

<400> 3

gcttcttagt c argt accg aaaa

24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<220>

<223> Chis, rRNA-Sequenz, bakterielle phylogenetische Gruppe  
**Clostridium histolyticum**

<220>

<223> Franks et al., 1998

<220>

<223> R=C/T

<400> 4

**tatgcggta ttaatctrcg ttt****23****<210> 5****<211> 22****<212> DNA****<213> Künstliche Sequenz****<220>****<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch****<400> 5****acaatgccag ggtttgacaa tg****22****<210> 6****<211> 20****<212> DNA****<213> Künstliche Sequenz****<220>****<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch****<400> 6****aaagacatcg ggccatttgc****20****<210> 7****<211> 20****<212> DNA****<213> Künstliche Sequenz****<220>****<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch****<400> 7****ttagcacgcc catgaagtgg****20****<210> 8****<211> 24****<212> DNA****<213> Künstliche Sequenz****<220>****<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch****<400> 8**

**aggatgaaga tttcggtggac ttga****24**

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 9  
**aagctaccaa agggtggccct c**

**21**

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 10  
**aggcttctct cgtatcagct ctgt**

**24**

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 11  
**gccctctgac gacatgtcca g**

**21**

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 12

**attggcgatgc gcgtaaatgt****20**

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 13  
**gccccagaag aacaccctgt**

**20**

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 14  
**accggccaaa tcgattctca**

**20**

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

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

<400> 15  
**tgcgttgcgc gcccgtc**

**16**

<210> 16  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

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

&lt;400&gt; 16

**ggatgcggcc gctctc****16**

<210> 17  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 17  
**tgcttaggcgc gccgtcgccc tctgacgaca tgtccag**

**37**

<210> 18  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 18  
**ggatgcggcc gctctcattg gcgtgcgcgt aaatgt**

**36**

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Mengen oder relativen Anteile von mehr als einer individuellen Polynukleotidsequenz oder Untergruppen davon in einem Polynukleotidgemisch unter Verwendung einer quantitativen, affinitätsgestützten Lösungshybridisierung in Kombination mit einer Fraktionierung auf der Grundlage von Größe oder Masse, um eine Trennung zu erzielen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren folgende aufeinanderfolgende Schritte umfasst:

(a) Bereitstellen eines oder mehrerer organisierter Pools mit einer vorbestimmten, optionalen Anzahl löslicher Polynukleotid-Sonden, wobei jede Sonde zu einer individuellen Ziel-Ribopolynukleotidsequenz in einer Probe komplementär ist, in einem molaren Überschuss im Vergleich mit den Ziel-Polynukleotidsequenzen vorliegt, und ungefähr die gleiche Anzahl von hybridisierenden Nukleotiden aufweist, wobei die Sonden dadurch unterscheidbar gemacht sind, dass man die Sonden mit einem oder mehreren, eine Trennung ermöglichen Tags versieht, welche die Größe oder Masse verändern und dadurch den Sonden eine unterschiedliche Mobilität in den Fraktionierungs-, Trennungs- oder Erfassungssystemen verleihen, ohne die Hybridisierung oder die Einfangreaktion zu stören;

(b) Versehen der aus der ein Gemisch von Ziel-Ribopolynukleotidsequenzen umfassenden Probe isolierten Ziel-Polynukleotidsequenzen mit wenigstens einem Affinitäts-Tag; und anschließend

(c) Durchführen der Schritte (i) und (ii) gleichzeitig, oder aufeinanderfolgend in der Reihenfolge (i) und (ii), wobei die Schritte (i) und (ii) umfassen

(i) Ermöglichen einer Hybridisierungsreaktion zwischen dem molaren Überschuss löslicher Sonden aus Schritt (a) und den Ziel-Ribopolynukleotidsequenzen aus Schritt (b), was zu einer quantitativen Bildung von löslichen Hybriden führt;

(ii) Gewinnen der Hybride, die in Schritt (i) quantitativ gebildet wurden, durch Einfangen der Hybride auf einem eine Trennung unterstützenden Mittel, das mit dem Affinitäts-Gegenstück des Affinitäts-Tags der Ziel-Polynukleotidsequenzen versehen ist;

(d) Quantitatives Freisetzen der Sonden in einer unmodifizierten Form aus den Hybriden, die an dem die Trennung unterstützenden Mittel eingefangen sind;

(e) Trennen und Erfassen der Menge oder der relativen Anteile von Sonden, die unterscheidbar gemacht wurden, wobei deren Menge der Menge an komplementären Ziel-Ribopolynukleotidsequenzen in dem Gemisch

aus Ziel-Polynukleotiden in der Probe entspricht.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für die Bestimmung der dynamischen Variationen bei den Mengen oder relativen Anteilen von Polynukleotid-Transkripten oder deren Untergruppen in einem individuellen Organismus die löslichen Sonden auf der Grundlage von Art- oder Gruppen-spezifischen Ribopolynukleotidsequenzen entworfen sind, die mit ausgewählten, mehr oder weniger konservierten oder hypervariablen Regionen aus intragenomischen Sequenzen hybridisieren, welche für Untergruppen, Arten, Unterarten von Transkripten, die in dem Organismus exprimiert werden, spezifisch sind.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der die gemischte Ziel-Population umfassenden Probe isolierten Ziel-Ribopolynukleotidsequenzen Boten-RNA (mRNA) sind.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung der dynamischen Variationen bei den Mengen oder relativen Anteilen von Ribopolynukleotidsequenzen, die individuelle Organismen oder Unterpopulationen davon in einer Ziel-Population repräsentieren, die löslichen Sonden aus Art- oder Gruppen-spezifischen Ribopolynukleotidsequenzen entworfen sind, die mit einer ausgewählten, mehr oder weniger konservierten oder hypervariablen Region aus intragenomischen Sequenzen hybridisieren, welche spezifisch sind für verschiedene phylogenetische Stufen und/oder verschiedene phylogenetische Stufen repräsentieren, wodurch die Identifizierung von Untergruppen, Arten, Unterarten innerhalb der gemischten Ziel-Population ermöglicht wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der die gemischte Ziel-Population umfassenden Probe isolierten Ziel-Polynukleotidsequenzen ribosomale RNA sind.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag gleichzeitig als Tracer-, Affinitäts- und/oder Primer-Tag fungiert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag in einem Siebmedium trennbar ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als ein Affinitäts- und/oder Primer-Tag fungiert, ein Oligonukleotidrest ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als ein Affinitäts-Tag und/oder als ein Tracer-Tag fungieren kann, eine Aminosäure oder ein Peptid ist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als Tracer-Tag fungieren kann, ausgewählt ist unter Markierungen, die erfassbar sind durch Fluoreszenz, Lumineszenz, Infrarotsorption, elektromagnetische Eigenschaften, Radioaktivität und enzymatische Aktivität.

11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die vorbestimmte, optionale Anzahl löslicher Sonden in dem Pool mehr als eins, vorzugsweise mehr als fünf, ganz besonders bevorzugt mehr als zehn beträgt.

12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der individuellen, quantitativ eingefangenen und freigesetzten Sonden mit einem vollautomatischen oder teilautomatischen Erfassungssystem erfasst wird, das auf der Grundlage der angewendeten, die Trennung ermöglichen Tags ausgewählt ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Erfassungssystem ausgewählt ist auf der Grundlage der die Trennung ermöglichen Tags und Massenspektrometrie, elektrophoretische oder chromatographische Techniken umfasst.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–13, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der quantitativ gewonnenen, mit Primern versehenen Sonden freigesetzt und anschließend amplifiziert wird und gegebenenfalls vor, während oder nach der PCR-Reaktion mit einem Tracer versehen wird und anschließend mit einem Erfassungssystem, das auf der Grundlage der die Trennung ermöglichen Tags ausgewählt ist, erfasst wird.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die mit Primern versehenen Sonden Primer mit spezifischen und universellen Teilen aufweisen.

16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden stabile DNA-Fragmente, synthetische oder rekombinante Polynukleotidsequenzen oder modifizierte Polynukleotidsequenzen sind.

17. Verfahren gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine vergleichende, quantitative Bestimmung von Variationen der Mengen individueller Polynukleotidsequenzen oder deren Organismen oder Untergruppen in einer Population oder einem Gemisch aus Polynukleotidsequenzen durch Bereitstellen eines Satzes multipler Testkits, wobei wenigstens ein Testkit für jede zu vergleichende Probe vorliegt, wobei jeder der Testkits versehen ist mit einem oder mehreren identischen, organisierten Pools mit einer vorbestimmten optionalen Anzahl an löslichen Sonden, wobei jede Sonde komplementär ist zu einer individuellen Ziel-Ribopolynukleotidsequenz in der Probe, in einem molaren Überschuss im Vergleich zu den Ziel-Polynukleotidsequenzen in den Proben vorliegt, und ungefähr die gleiche Anzahl hybridisierender Nukleotide aufweist, wobei die Sonden dadurch unterscheidbar gemacht sind, dass man jede Sonde mit einem oder mehreren eine Trennung ermöglichen Tags versieht, welche die Größe oder Masse verändern und dadurch den Sonden in den Fraktionierungs-, Trennungs- oder Erfassungssystemen unterschiedliche Mobilitäten verleihen, ohne die Hybridisierung oder die Einfangreaktion zu stören, wobei sich die Pools von Sonden auf organisierte Weise in eigenen Gefäßen befinden, die getrennt oder miteinander verbunden sind.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass bei den individuellen Testkits, bei denen der die Trennung ermöglichte Tag kein Tracer-Tag ist, ein Satz multipler Testkits mit Tracer-Tags bereitgestellt wird, die voneinander durch das emittierte Signal unterscheidbar sind.

19. Verwendung eines Testkits zum Durchführen eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1–18, dadurch gekennzeichnet, dass der Testkit einen oder mehrere organisierte Pools mit einer vorbestimmten, optionalen Anzahl löslicher Sonden umfasst, wobei jede Sonde komplementär ist zu einer individuellen Ziel-Ribopolynukleotidsequenz, in einem molaren Überschuss im Vergleich mit den Ziel-Ribopolynukleotidsequenzen in den Proben vorliegt, und ungefähr die gleiche Anzahl an hybridisierenden Nukleotiden aufweist, wobei die Sonden dadurch unterscheidbar gemacht sind, dass man jede Sonde mit einem oder mehreren eine Trennung ermöglichen Tags versieht, welche die Größe oder Masse verändern und dadurch den Polynukleotid-Sonden in den Fraktionierungs-, Trennungs- oder Erfassungssystemen eine unterschiedliche Mobilität verleihen, ohne die Hybridisierung oder die Einfangreaktion zu stören, wobei sich die Pools von Sonden auf organisierte Weise in eigenen Gefäßen befinden, die getrennt oder miteinander verbunden sind.

20. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass für die Bestimmung von dynamischen Variationen bei den Mengen oder relativen Anteilen von Polynukleotidtranskripten oder deren Untergruppen in einem individuellen Organismus die löslichen Sonden entworfen sind auf der Grundlage von Art- oder Gruppen-spezifischen Polynukleotidsequenzen, die mit ausgewählten, mehr oder weniger konservierten oder hypervariablen Regionen aus intragenomischen Sequenzen hybridisieren, die für Untergruppen, Arten, Unterarten von in dem Organismus exprimierten Transkripten spezifisch sind.

21. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der die gemischte Ziel-Population umfassenden Probe isolierten Ziel-Polynukleotidsequenzen Boten-RNA (mRNA) sind.

22. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass für die Bestimmung von dynamischen Variationen bei den Mengen oder relativen Anteilen von Ribopolynukleotidsequenzen, die individuelle Organismen oder Unterpopulationen davon in einer Ziel-Population repräsentieren, die löslichen Sonden entworfen sind auf der Grundlage von Art- oder Gruppen-spezifischen Ribopolynukleotidsequenzen, die mit ausgewählten, mehr oder weniger konservierten oder hypervariablen Regionen aus intragenomischen Sequenzen hybridisieren, die spezifisch sind für unterschiedliche phylogenetische Stufen und/oder verschiedene phylogenetische Stufen repräsentieren, wodurch die Identifizierung von Untergruppen, Arten, Unterarten innerhalb der gemischten Ziel-Population ermöglicht wird.

23. Verwendung gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der die gemischte Ziel-Population umfassenden Probe isolierten Ziel Polynukleotidsequenzen ribosomale RNA sind.

24. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermöglichte Tag gleichzeitig als Tracer-, Affinitäts- oder Primer-Tag fungieren kann.

25. Verwendung gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag in einem Siebmedium trennbar ist.
26. Verwendung gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als Affinitäts-Tag und/oder Primer-Tag fungieren kann, ein Oligonukleotidrest ist.
27. Verwendung gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als Affinitäts-Tag und/oder als Tracer-Tag fungieren kann, eine Aminosäure oder ein Peptid ist.
28. Verwendung gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der die Trennung ermögliche Tag, der zusätzlich als Tracer-Tag fungieren kann, ausgewählt ist unter Markierungen, die erfassbar sind durch Fluoreszenz, Lumineszenz, Infrarotsorption, elektromagnetische Eigenschaften, Radioaktivität und enzymatische Aktivität.
29. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die vorbestimmte, optionale Anzahl an löslichen Sonden in dem Pool mehr als eins, vorzugsweise mehr als fünf, ganz besonders bevorzugt mehr als zehn beträgt.
30. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die löslichen Sonden-Pools in den Wells einer Mikrotiterplatte vorliegen.
31. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden stabile DNA-Fragmente, synthetische, rekombinante oder modifizierte Polynukleotidsequenzen sind.
32. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung für eine vergleichende, quantitative in vitro-Bestimmung von Variationen der Mengen individueller Ribopolynukleotidsequenzen oder deren Organismen oder Untergruppen in einer Population oder einem Gemisch von Polynukleotidsequenzen einen Satz von Testkits umfasst, wobei wenigstens ein identischer Testkit identische Pools von Sonden für jede zu vergleichende Probe aufweist.
33. Verwendung gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass jeder individuelle Testkit in dem Satz von multiplen Testkits mit Tracer-Tags versehen ist, die voneinander durch das emittierte Signal unterscheidbar sind.
34. Verwendung gemäß Anspruch 32 zur in vitro-Bestimmung von hygienischen Zuständen und epidemiologischen Gegebenheiten, Wirkungen von externen Stimuli oder Behandlungsmodalitäten auf eine mikrobielle Population.
35. Verwendung gemäß Anspruch 34, wobei der externe Stimulus oder die Behandlung ausgewählt ist unter einer Behandlung mit Antibiotika oder hygienischen Maßnahmen.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

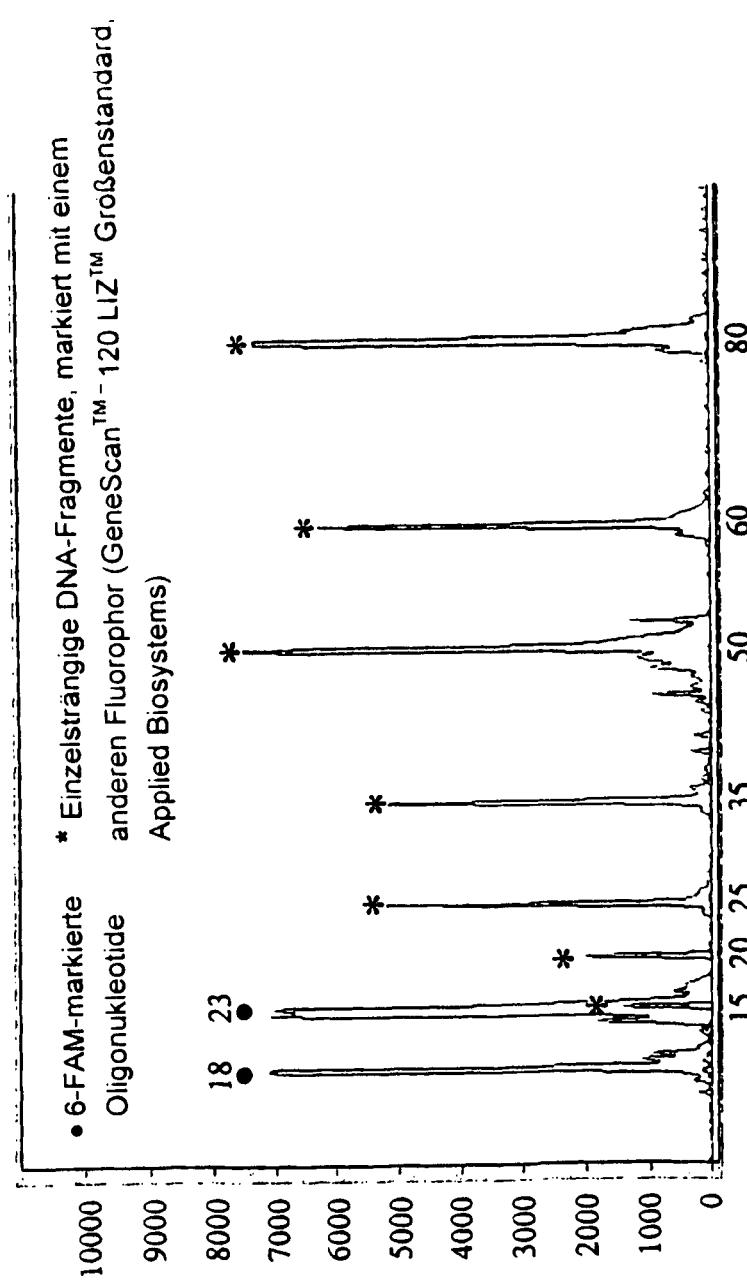
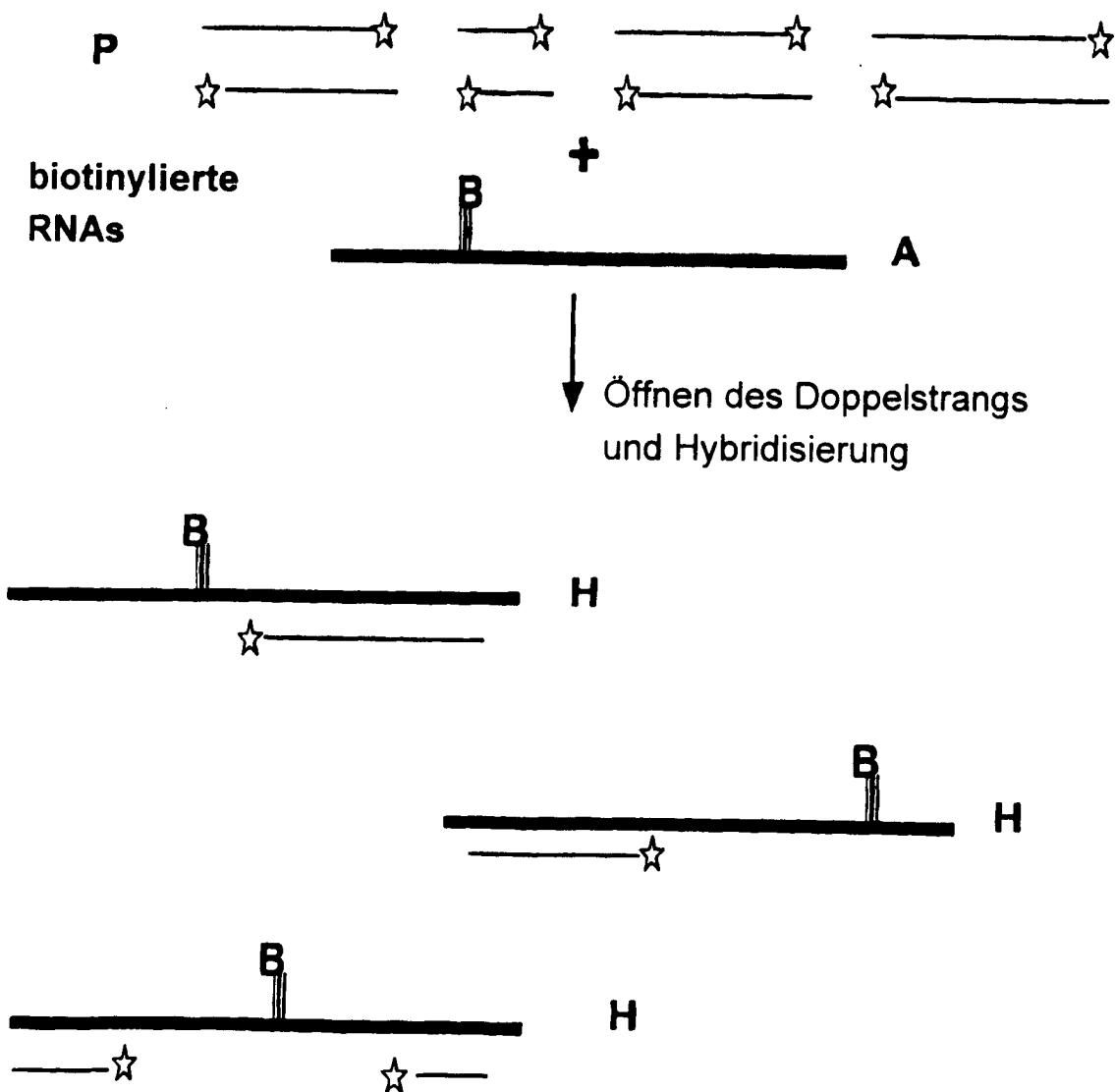
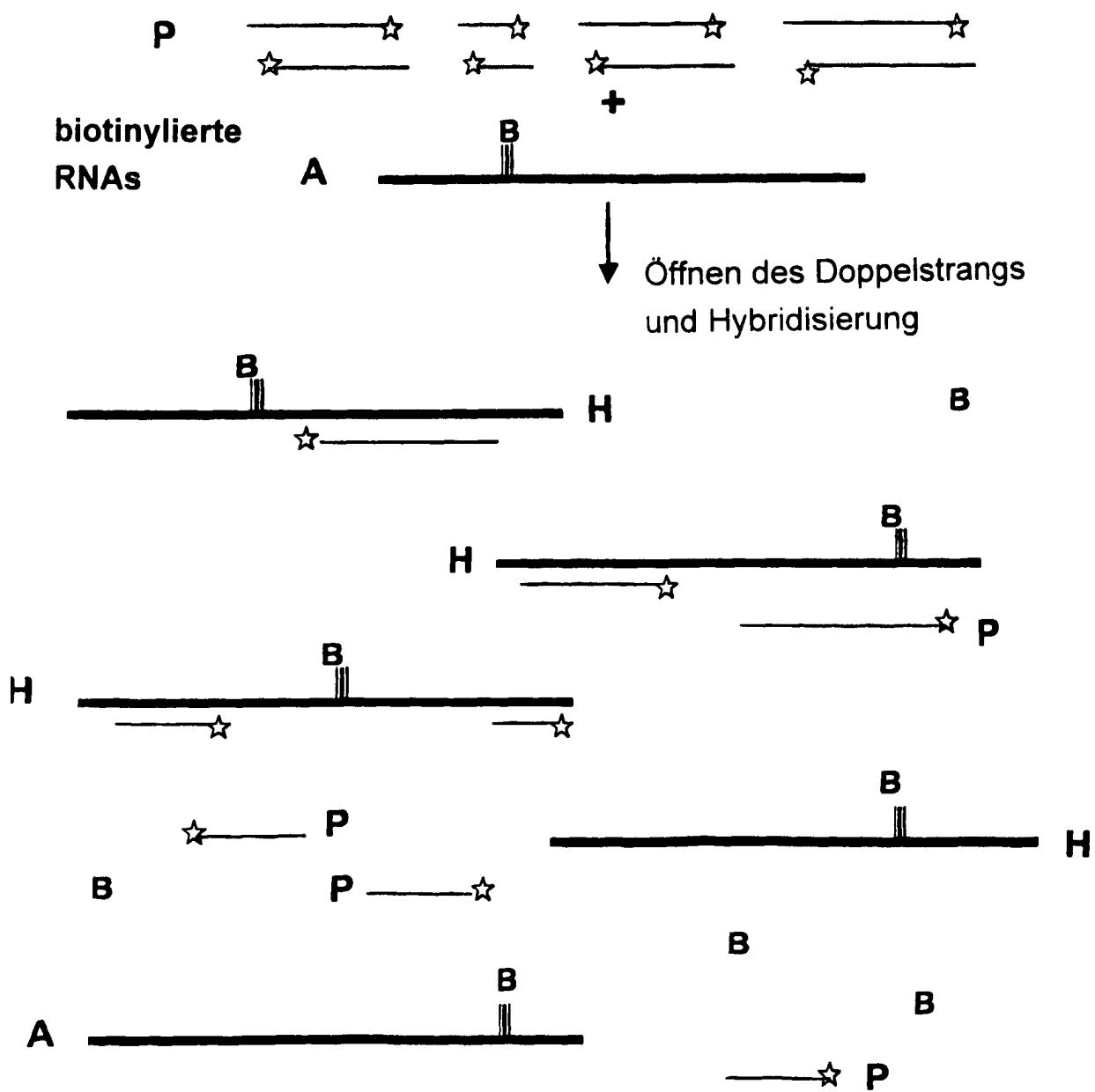


Fig. 1

**mit Tracer versehene Sonden**



**Fig. 2A**

**mit Tracer versehene Sonden****Fig. 2B**

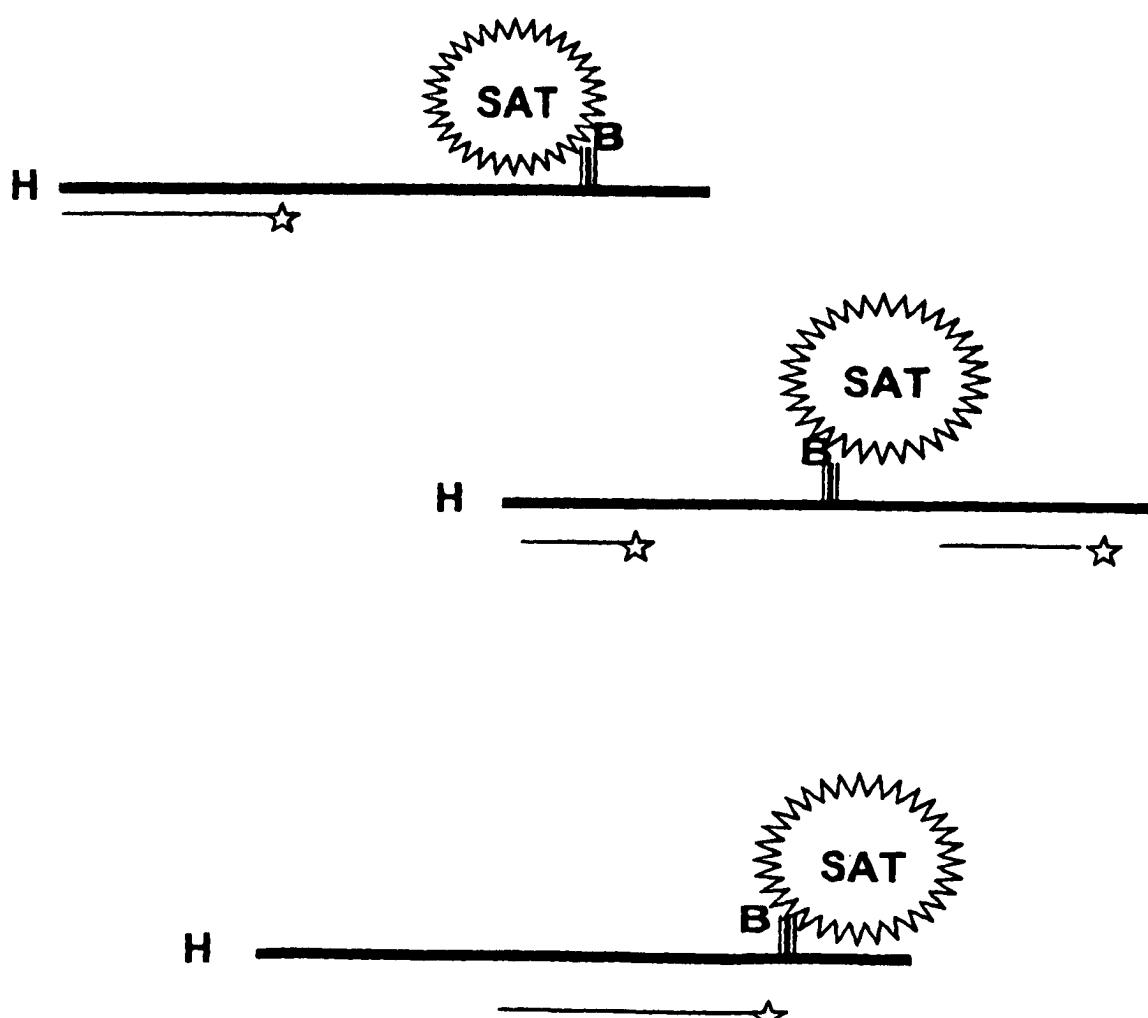


Fig. 3A

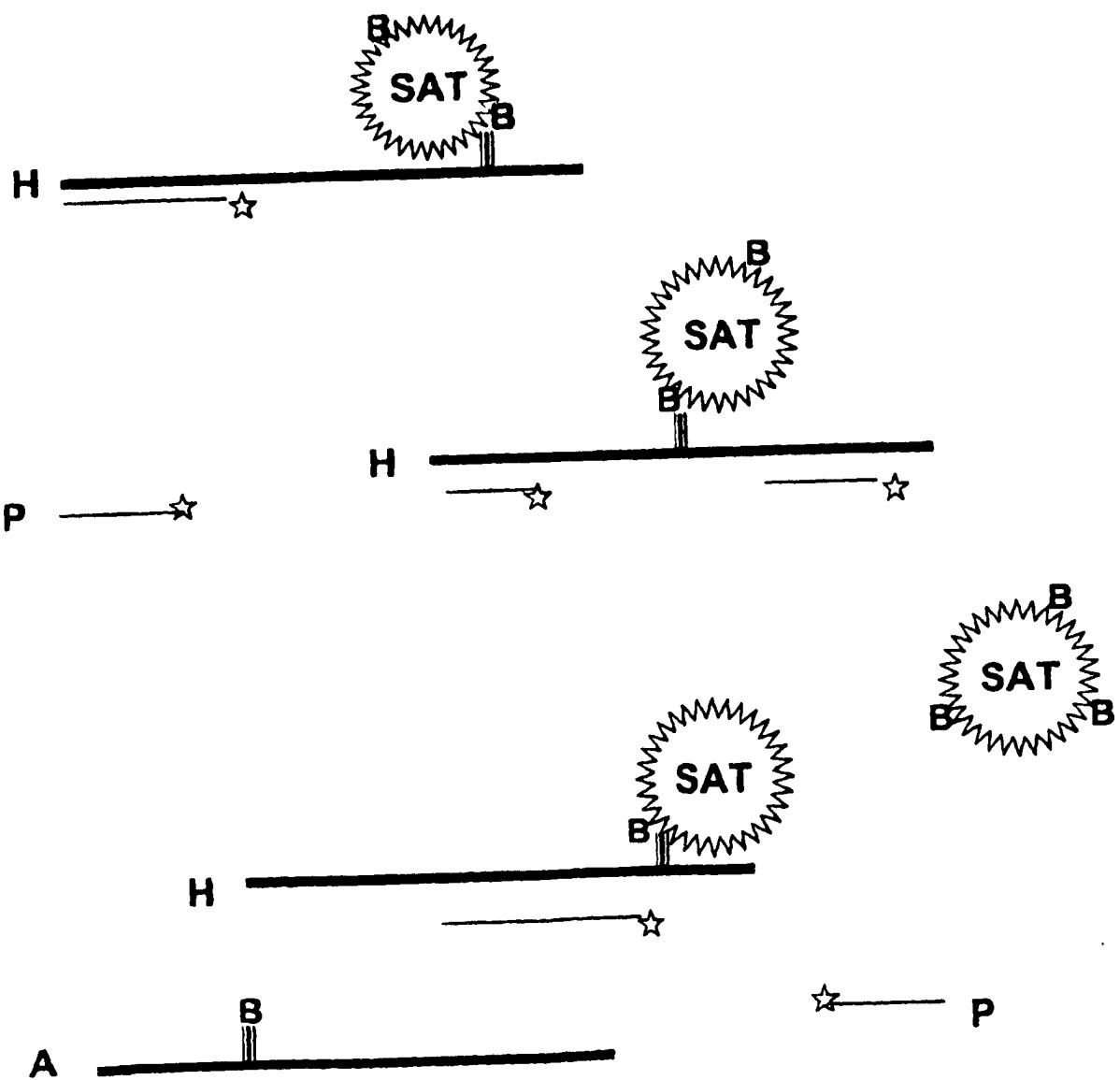
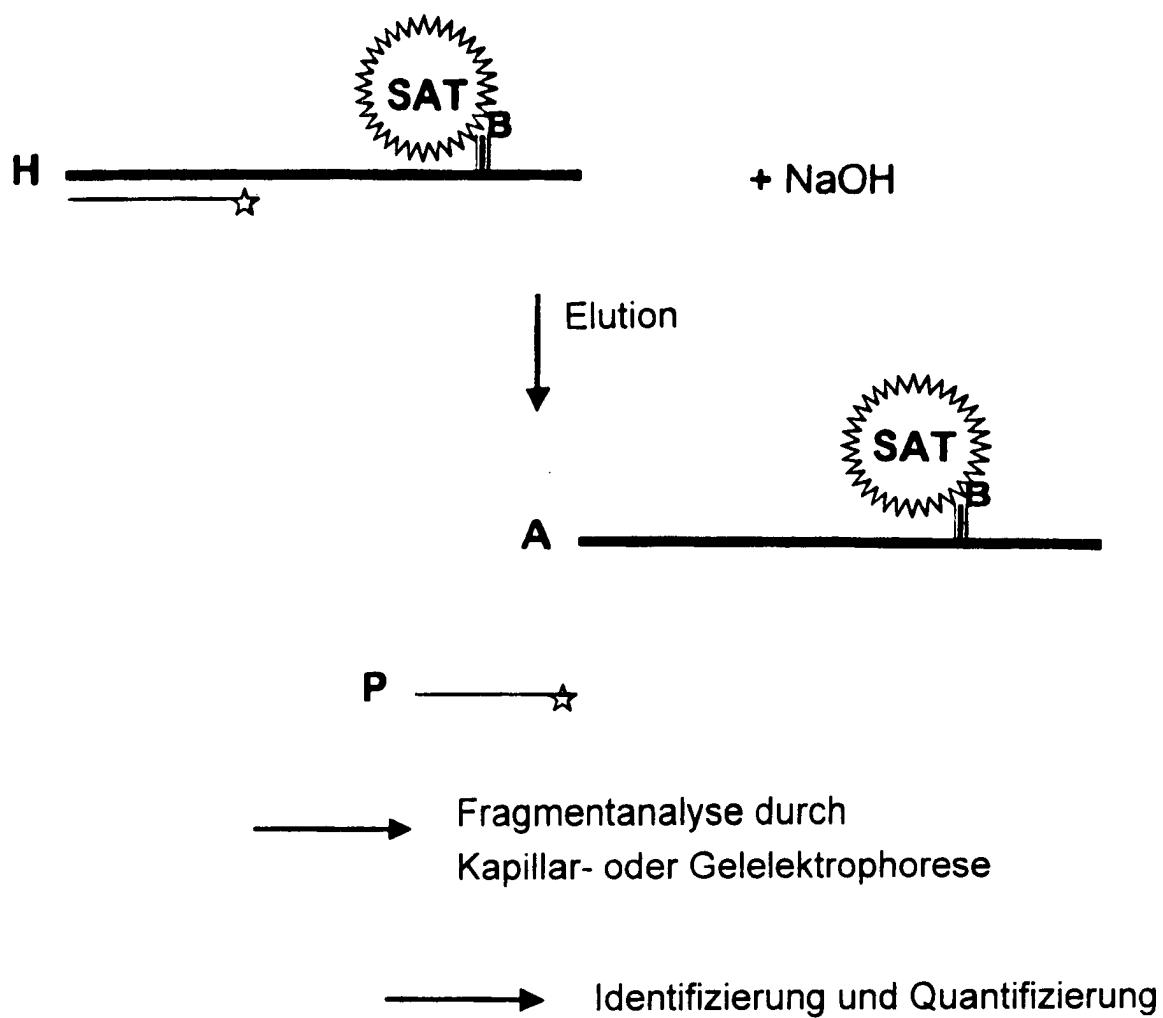


Fig. 3B



**Fig. 4**

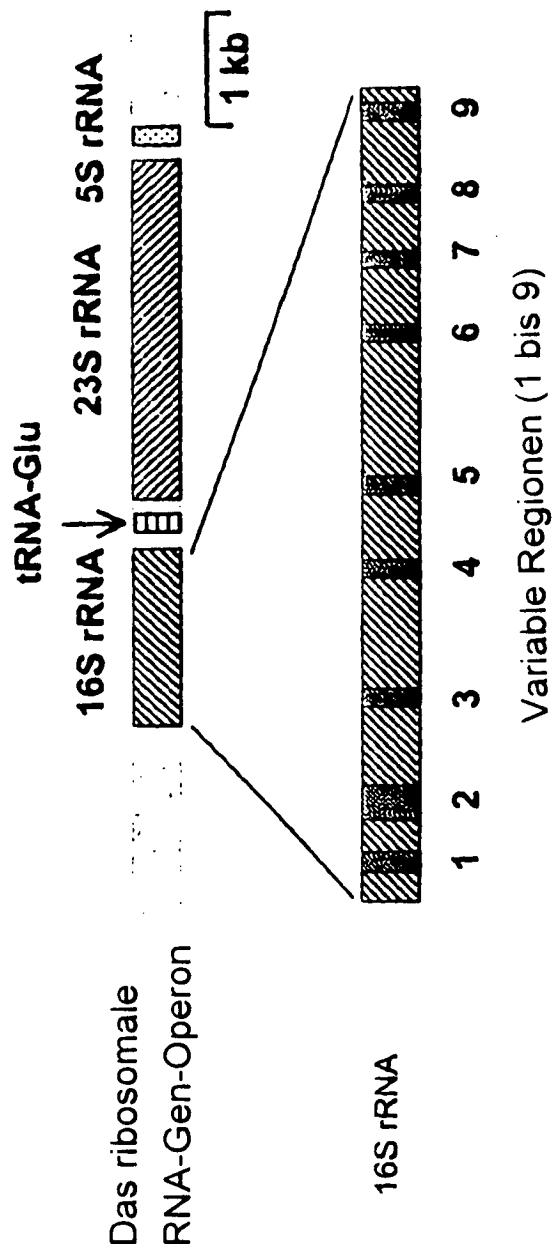


Fig. 5A

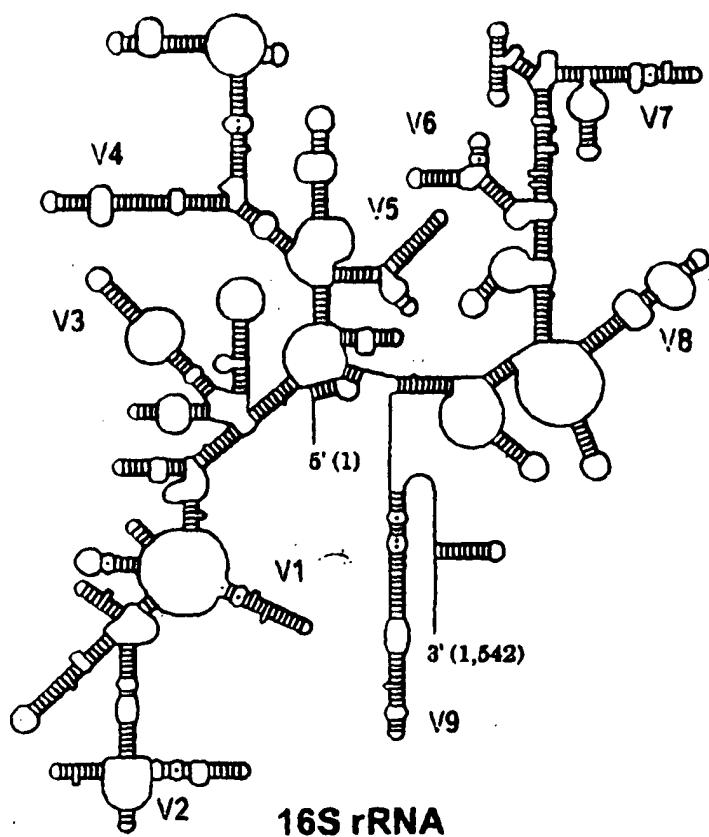
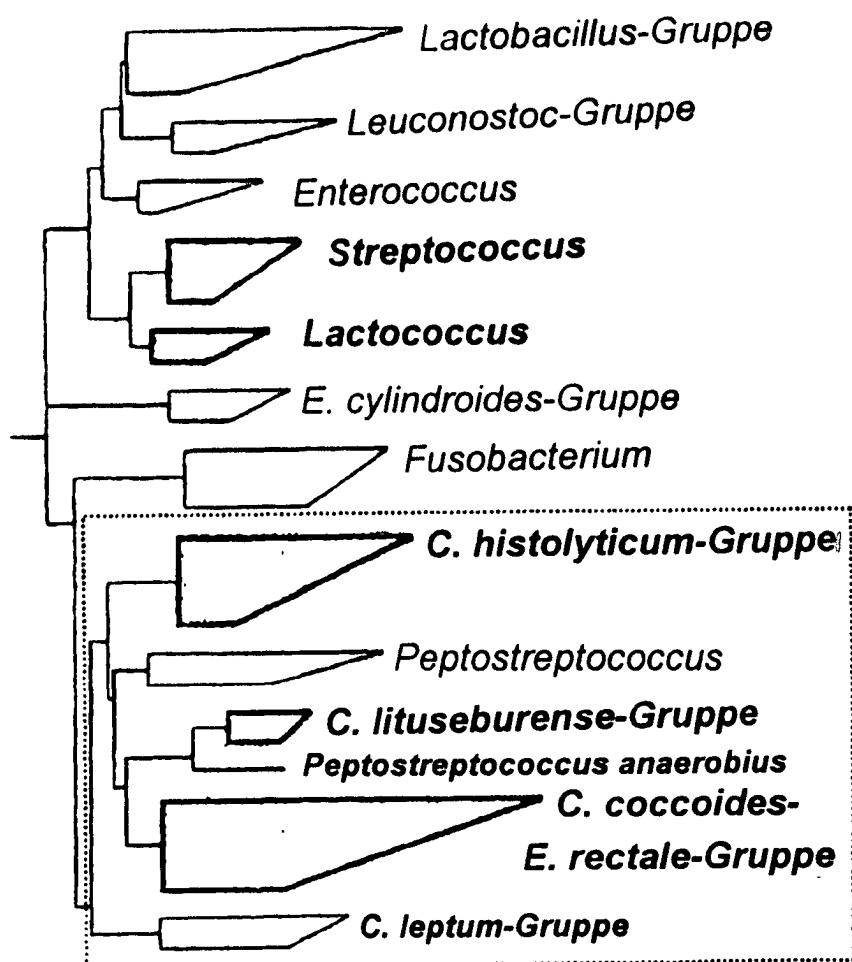


Fig. 5B



Basierend auf Franks et al., 1998

Fig. 6

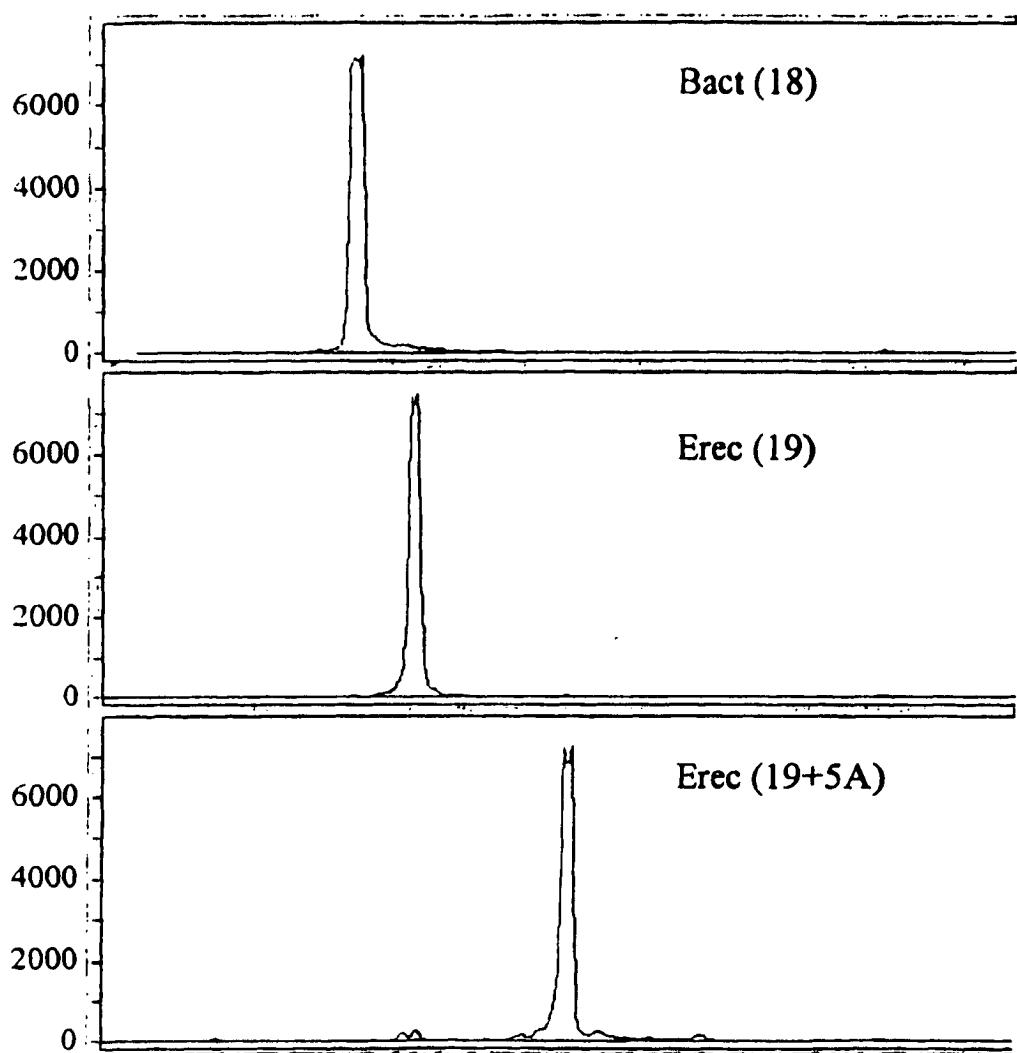
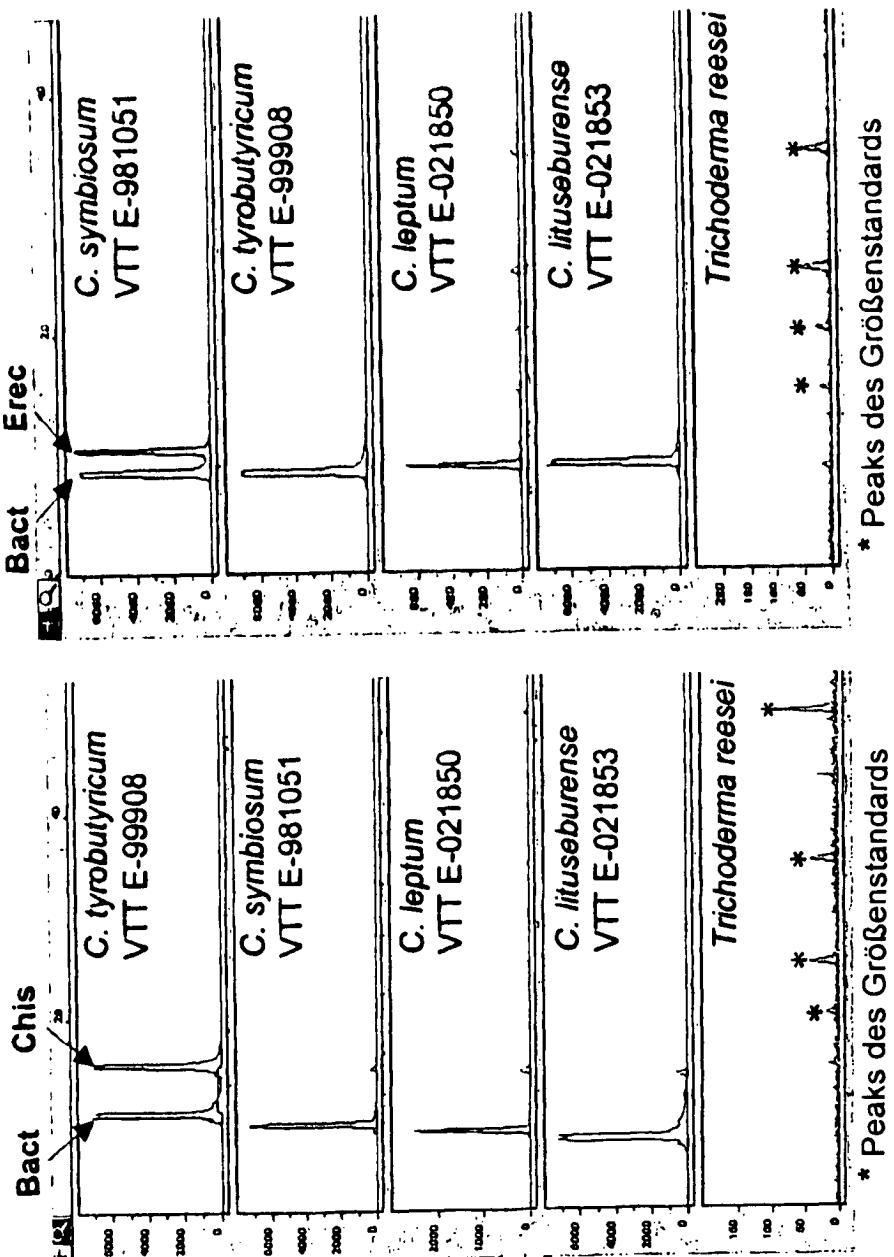


Fig. 7



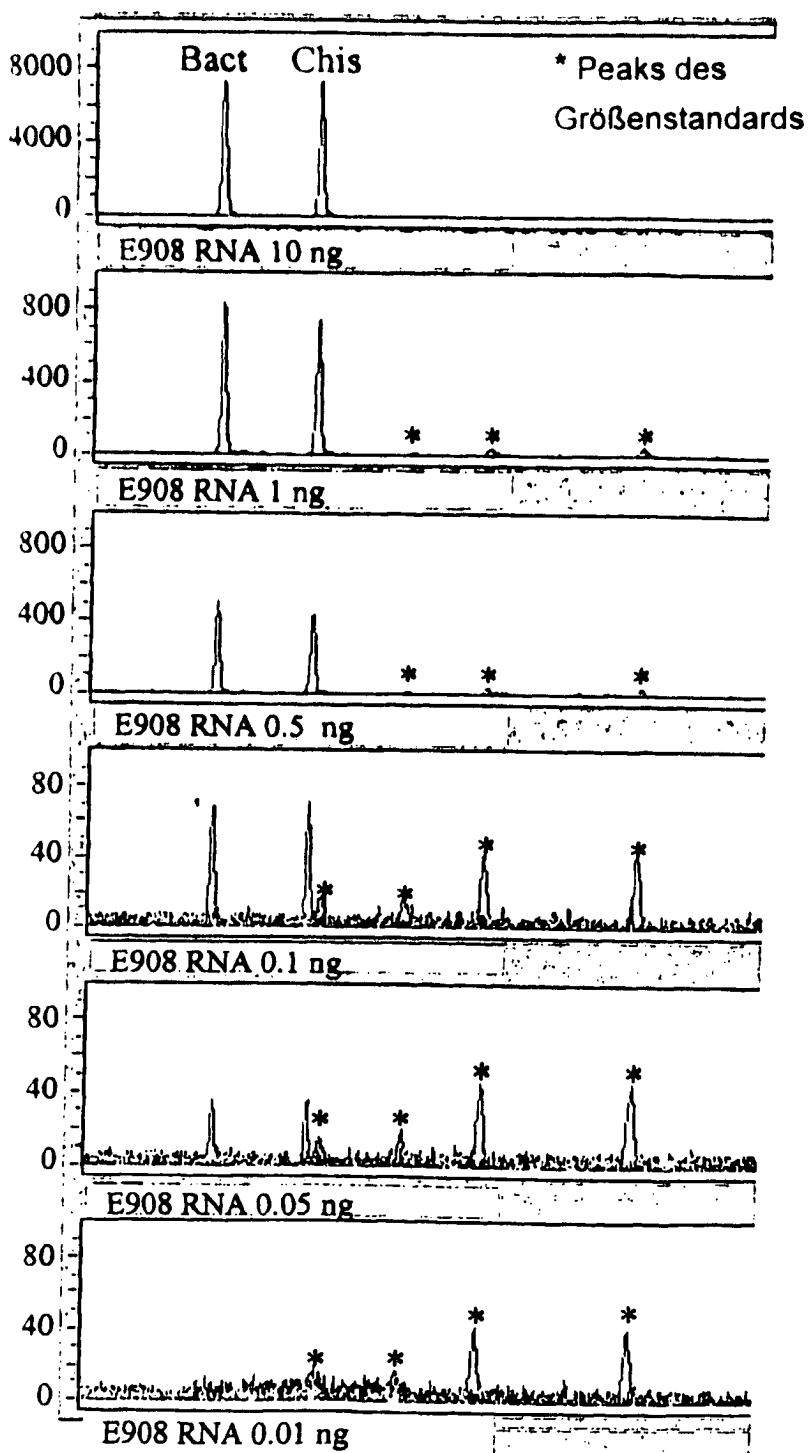


Fig. 9

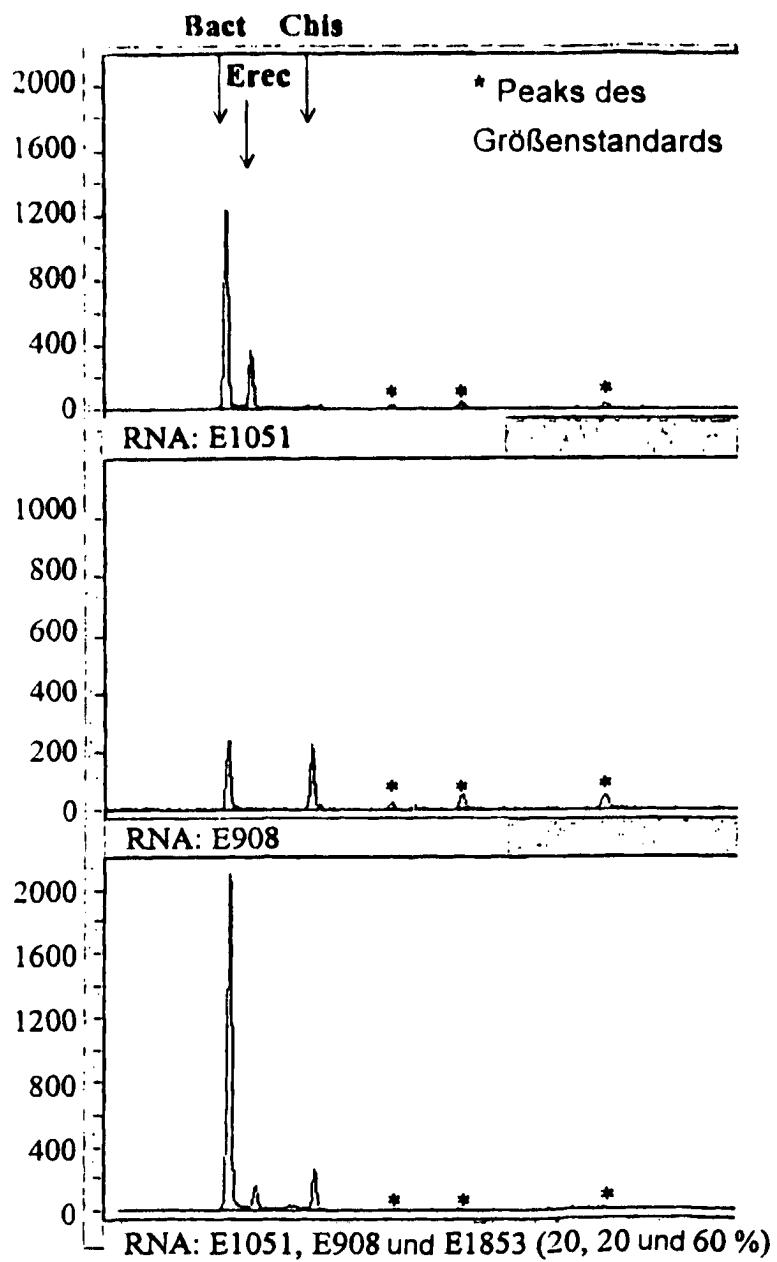


Fig. 10a

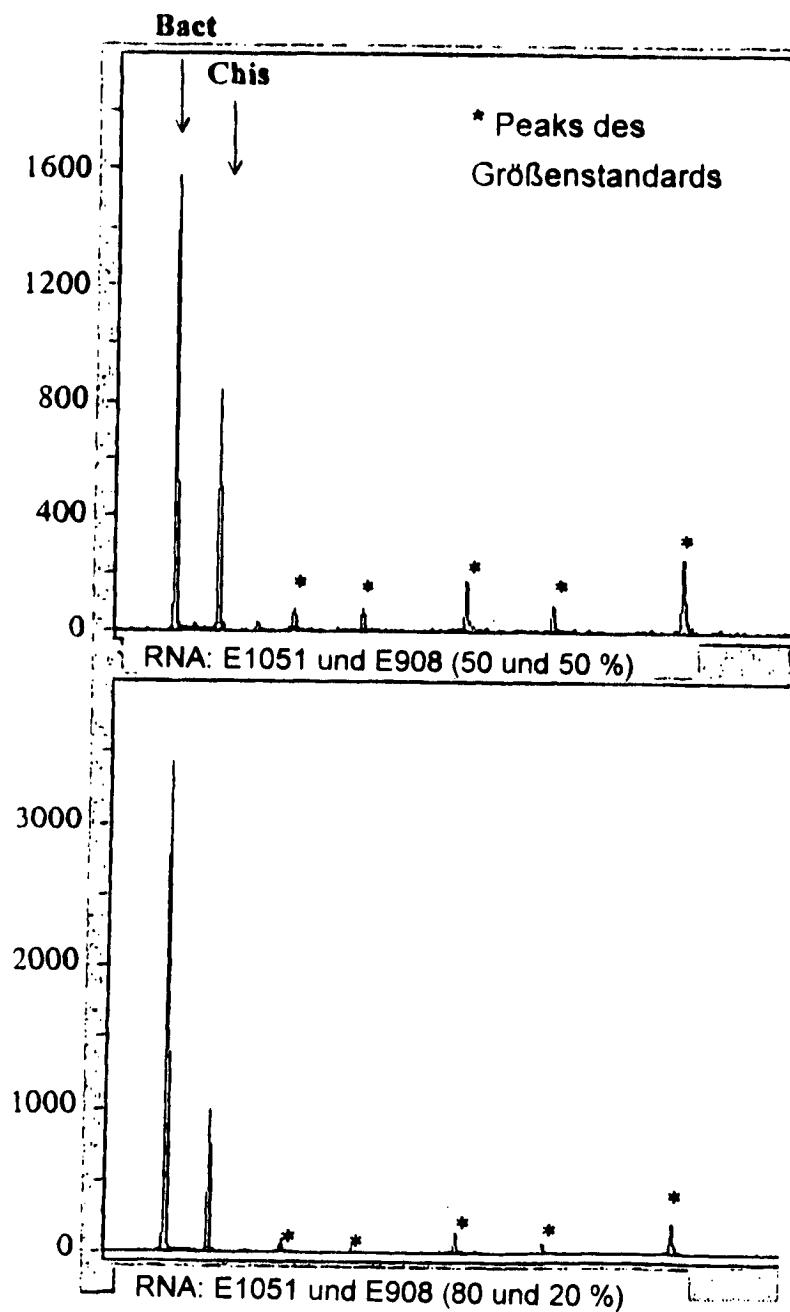


Fig. 10b

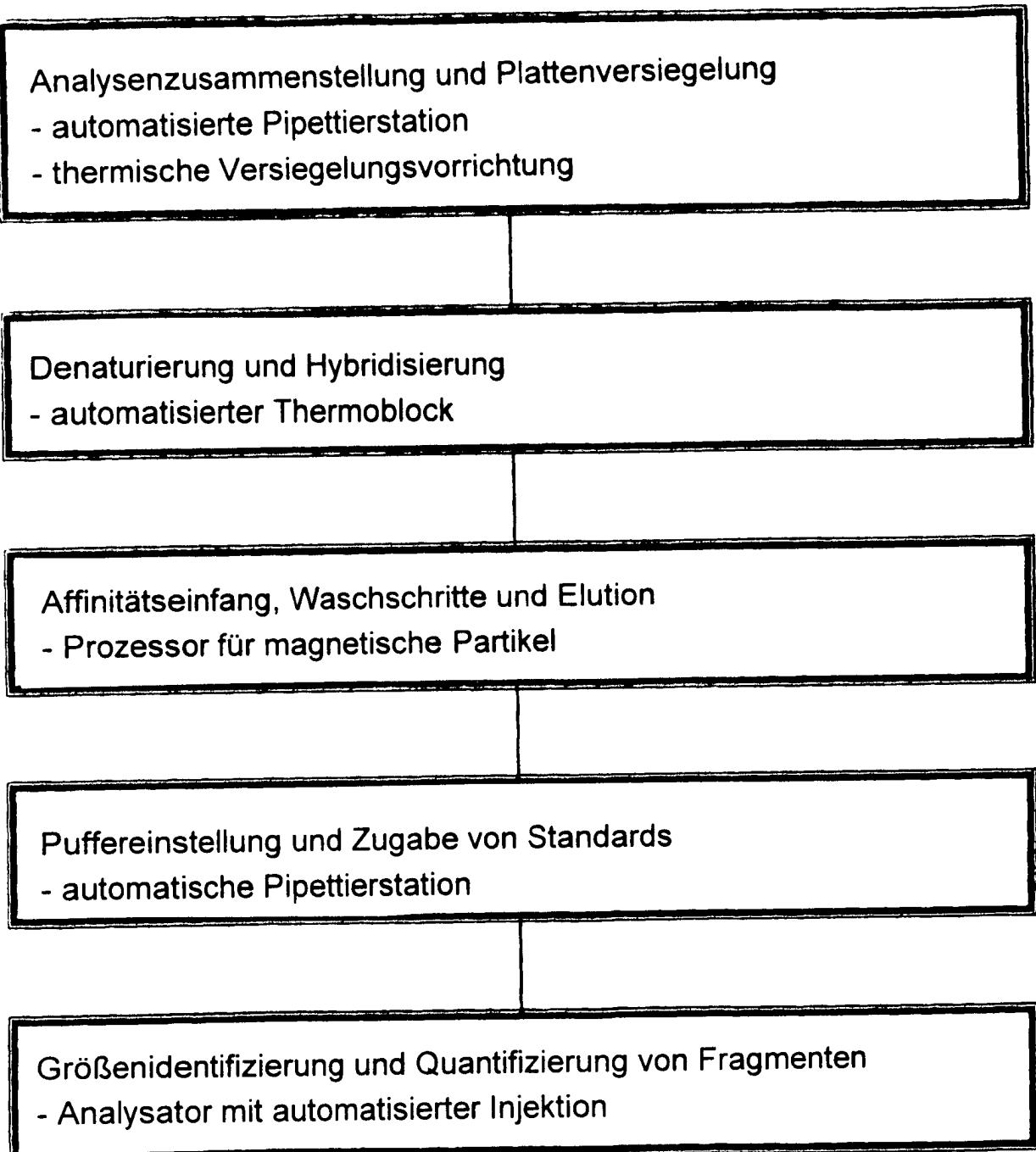


Fig. 11

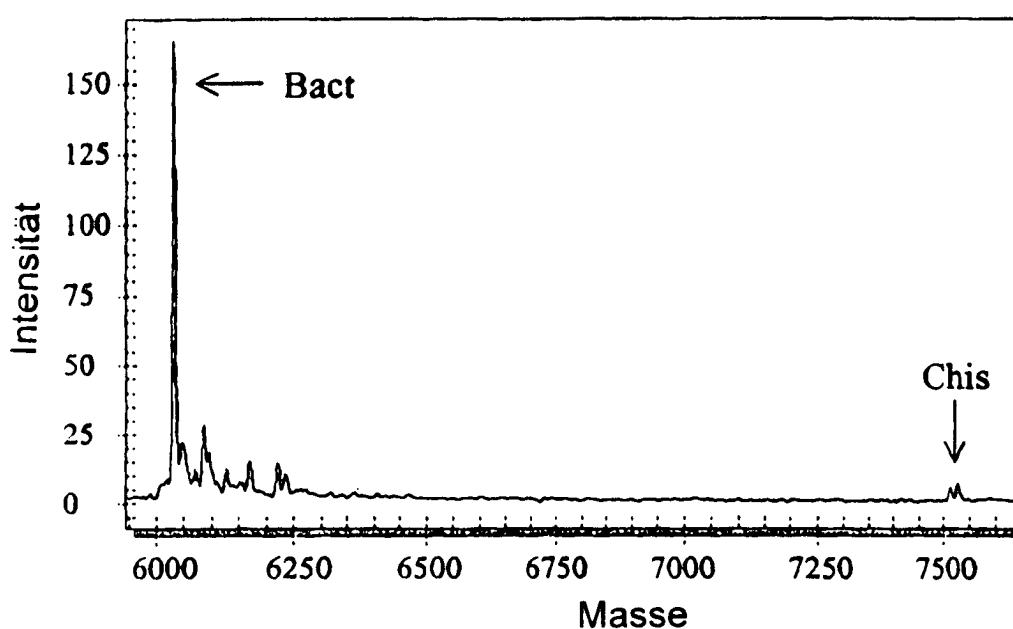


Fig. 12

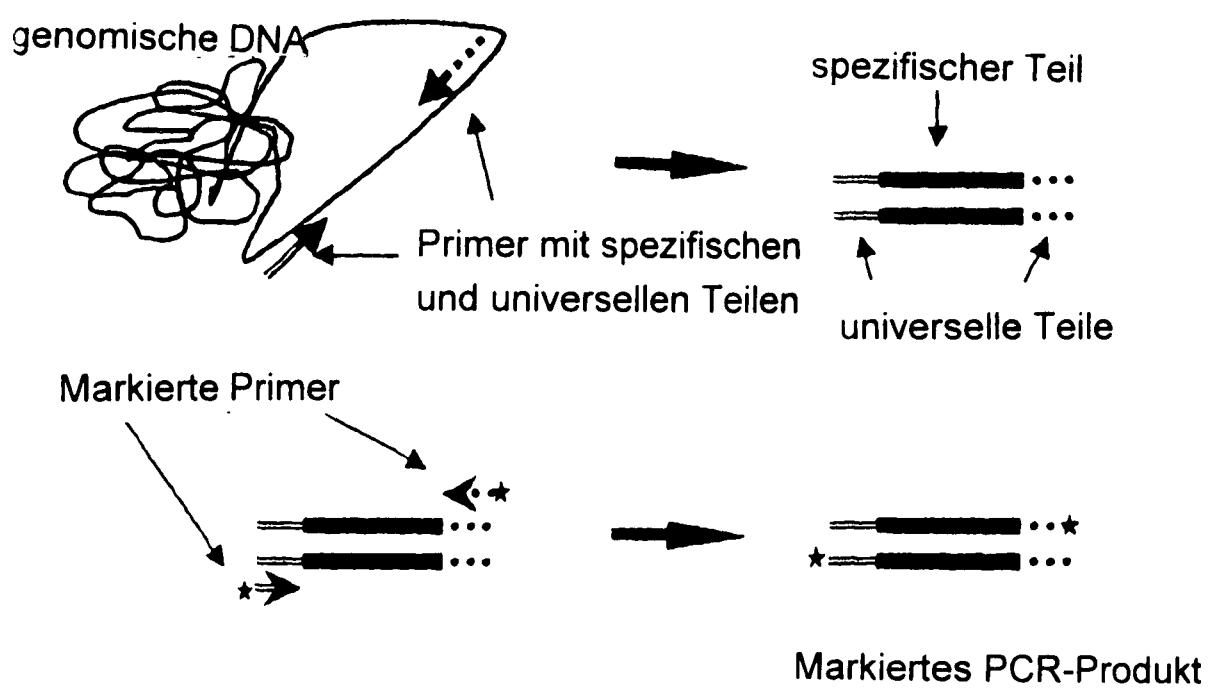


Fig. 13

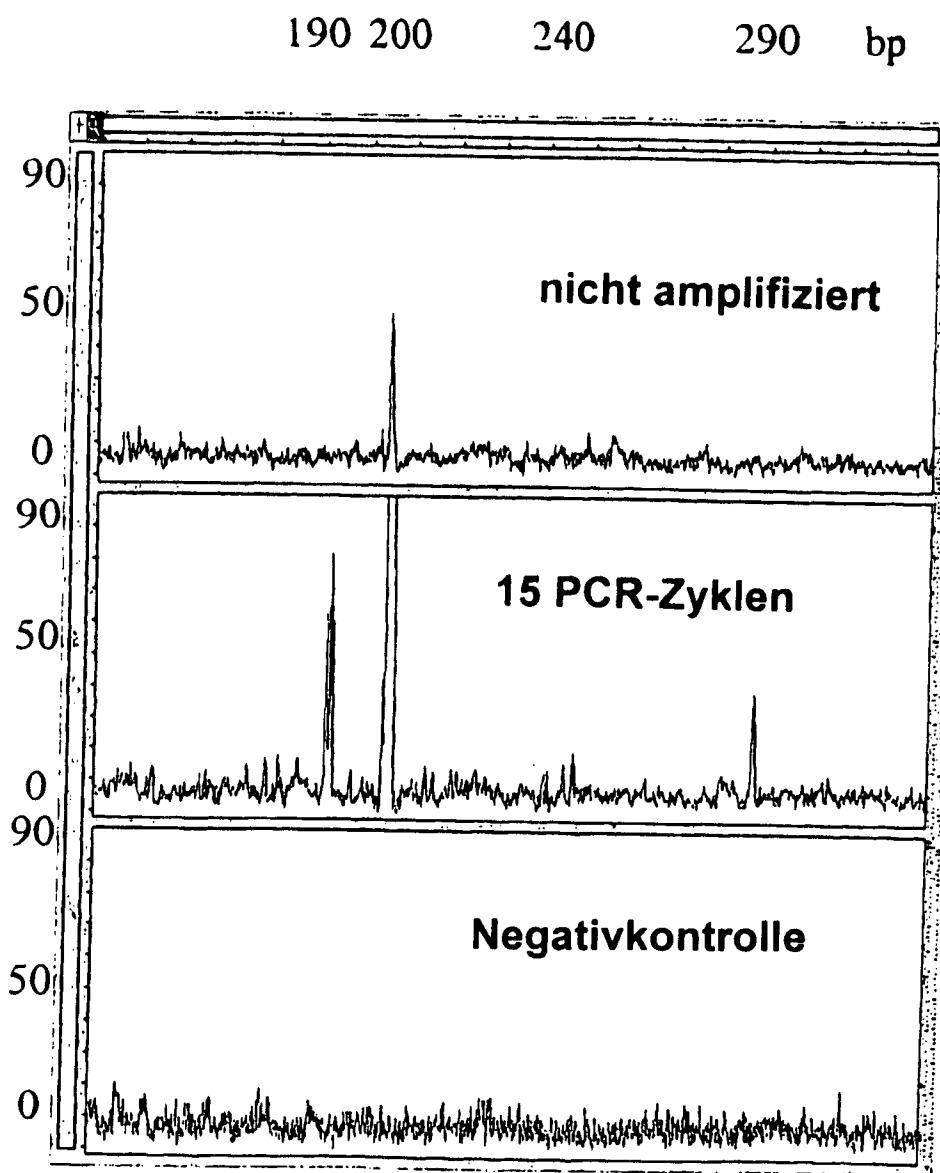


Fig. 14.