

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 616/2006**

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

(22) Anmeldetag: **10.04.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.10.2007**

(73) Patentanmelder:

AUSTRIAN RESEARCH CENTERS GMBH  
- ARC  
A-1010 WIEN (AT)

(54) **MICROARRAY ZUR ERKENNUNG VON PATHOGENEN**

(57) Die vorliegende Erfindung stellt ein Set von Oligonukleotiden zur Verfügung, die spezifisch für das *gyrB*-Gen eines Mikroorganismus sind, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 mit gegebenenfalls 1 oder 2 Punktmutation(en) aufweist.

**AT 503 401 A1 2007-10-15**

007673

- 33 -

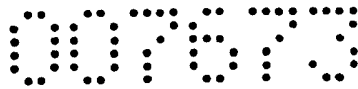
### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung stellt ein Set von Oligonukleotiden zur Verfügung, die spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus sind, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 mit gegebenenfalls 1 oder 2 Punktmutation(en) aufweist.

**NACHGEREICHT**

Die vorliegende Erfindung betrifft das mikrobiologische Gebiet der auf Nukleotiden basierenden Detektion und Identifikation von Mikroorganismen.

Mikroarrays sind genomische Werkzeuge, die ursprünglich zur Überwachung der Genexpression entwickelt wurden, auch zur Detektion von spezifischen Mutationen in DNA-Sequenzen angewendet wurden und in jüngster Zeit bei der Paralleldetektion und -identifikation von Mikroorganismen in Umwelt- oder klinischen Proben eingesetzt werden. Auch wenn in letzter Zeit vermehrt mikrobielle Diagnose-Arrays (MDMs) verwendet werden (Loy et al., 2002; Bodrossy et al., 2003; Lee & Chao, 2005; Hashsham et al., 2004; Tiquia et al., 2004; DeSantis et al., 2005; Schadt et al., 2005; Bae et al., 2005; Wang et al., 2005; Lehner et al., 2005; Leinberger et al., 2005; Neufeld et al., 2006), bringt die umwelttechnische Anwendung weiterhin große Herausforderungen hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Quantifizierung mit sich (Zhou, 2003). Die MDM-Sensitivität kann auf verschiedene Weise definiert werden. Die für eine erfolgreiche Detektion nötige Menge an Nukleinsäure; das Verhältnis von mikrobieller Nukleinsäure zu Hintergrund-, Wirts-Nukleinsäure; und das Verhältnis von Target- zu Non-Target-mikrobieller Nukleinsäure. Meist wirkt sich die dritte Art der Sensitivitätsschwelle, die in direktem Zusammenhang mit der relativen Häufigkeit der Zielmikrobe(n) innerhalb der Mikrobengemeinschaft steht, einschränkend auf die Anwendbarkeit von MDMs aus. Die derzeit berichtete Sensitivitätsschwelle von MDMs liegt bei 1 bis 5 % relativer Häufigkeit (Bodrossy et al., 2003; Deneff et al., 2003; Tiquia et al., 2004). MDMs für Analysen der Mikrobengemeinschaft müssen in der Lage sein, Mikroben aus einem weiten phylogenetischen Bereich nachzuweisen. Ihre Anwendung kann wiederum eine relativ niedrige Sensitivität hinsichtlich der relativen Häufigkeit tolerieren. Andererseits sind eine hohe Spezifität und Sensitivität Hauptanforderungen an MDMs, die zum Nachweis von Pathogenen verwendet werden. Solche MDMs, die in der klinischen Mikrobiologie, in der Veterinär- und Nahrungsmittelmikrobiologie sowie in der allgemeingesundheitlichen Mikrobiologie verwendet werden, stützen sich typischerweise auf art- oder gattungsspezifische PCR-Amplifikationen zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität einer Detektion (Sergeev et al., 2004; Lee & Chao, 2005; Maynard et al., 2005). Der Nachteil dabei ist, dass sie dann auf einen engen



Bereich von Pathogenen beschränkt sind. Um einen Bereich von verschiedenen Pathogenen abzudecken, erfordert dieser Ansatz die Durchführung von Mehrfach-PCR- oder Multiplex-PCR-Reaktionen (PCR mit mehreren Primerpaaren auf einmal). Epidemiologische und allgemeingesundheitliche Erhebungen sowie die Durchmusterung von veterinären, Nahrungsmittel- und Wasserproben auf Pathogene erfordern einen unterschiedlichen Ansatz, der eine breite Abdeckung mit hoher Spezifität und gesteigerter Sensitivität kombiniert.

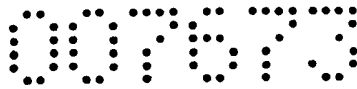
Die CN 1396270 beschreibt einen DNA-Mikroarray zum Nachweis von in Wasser häufig anzutreffenden pathogenen Bakterien wie Escherichia-Bakterien, Salmonella, Staphylococcus etc., bei welchem das 16s-rRNA-Gen, zwei in der Konservierungsregion des 16s-rRNA-Gens designte Primer und eine Sonde für die variable Region des 16s-rRNA-Gens verwendet werden.

Die DE 199 45 916 beschreibt mehrere Oligonukleotidsequenzen für bakterielle 23S/5S-rRNA-Sonden, die in Assays zur Unterscheidung von Bakterien unterschiedlicher Kategorien verwendet werden können.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung von Oligonukleotidsonden zum sensitiven und spezifischen Nachweis eines weiten Bereichs von Mikroorganismen aus Proben, die komplexe Mikrobengemeinschaften enthalten.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Set von Oligonukleotiden zur Verfügung, die spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus sind, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71, oder ein Fragment einer Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 mit 14 bis 30 Nukleotiden, mit gegebenenfalls 1 oder 2 Punktmutation(en), aufweist. Dabei sind die vollständigen Nukleotide der angegebenen Sequenzen, aber auch Fragmente mit einer Länge von mindestens 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 oder 30 nt möglich. Die Sequenzen können gegebenenfalls auch weitere nt-Sequenzen umfassen. Die Mutationen gestatten den Nachweis von anderen nahe verwandten Mikroorganismen, die zu Nichtübereinstimmungen bei Hybridisierungsversuchen mit genetischem Probenmaterial oder amplifiziertem Material eines oder mehrerer Mikroorganismen führen. Bei einer Punktmutation ist ein Nukleotidaustausch, aber auch eine Deletion oder Insertion möglich. Besonders bevorzugt sind die Mutationen am 3'-Ende der Oligonukleotidsequenzen. Bevorzugt werden jedoch die in SEQ ID NOs 1 bis 71 angeführten Sequenzen.

**NACHGEREICHT**



Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Set von Oligonukleotiden zur Verfügung, die spezifisch für das gyrB-Gen von mindestens zwei Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen sind, welches für das hierin beschriebene Verfahren verwendet werden kann.

Bevorzugt umfassen die Oligonukleotide Sequenzen ausgewählt aus mindestens zwei, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30, verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 71. Die Sequenzen dieses Sets sind spezifisch für das gyrB-Gen von unterschiedlichen Arten oder Gattungen ausgewählter Mikroorganismen und können zu deren Detektion oder Identifikation verwendet werden. Je nach den verschiedenen Verfahren, z.B. Hybridisierungsverfahren, Verfahren auf PCR-Basis oder Mikroarray-Verfahren, bei denen unterschiedliche Stringenzbedingungen angewendet werden, kann jedes Oligonukleotid nur einen Mikroorganismus oder einen nahe verwandten Mikroorganismus (z.B. über eine geringere Stringenz) nachweisen.

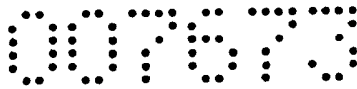
Vorzugsweise umfasst das Set Oligonukleotide, worin jedes Oligonukleotid spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus ist und das Set Oligonukleotide umfasst, die spezifisch für mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 24 oder 32 Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen sind, wodurch ein breites Spektrum von nachweisbaren Mikroorganismen möglich ist.

Vorzugsweise umfasst das Set Oligonukleotide, worin verschiedene Oligonukleotide Sequenzen ausgewählt aus mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 24, 30 oder 32 verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 71 aufweisen.

Gemäß einem anderen Aspekt wird ein Set von Oligonukleotiden zur Verfügung gestellt, das Oligonukleotide umfasst, die komplementär revers zu den Oligonukleotiden einer Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 sind. Solche Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär revers zu Template-Oligonukleotiden ist, können somit an diese Template-Oligonukleotide hybridisieren. Komplementär reverse Oligonukleotide sind auch spezifisch für den Gegensinnstrang eines genetischen (oder amplifizierten) DNA-Strangs. Dieses Sets können auch weitere Oligonukleotide, insbesondere für Mikroorganismen spezifische Oligonukleotide, z.B. direkt ausgewählt aus SEQ ID NOs 1 bis 71, umfassen und so Mischungen in der Spezifität für den gyrB-Strang in der Sinn- und Gegensinnrichtung bilden.

Vorzugsweise sind die Oligonukleotide des Sets markiert.

**NACHGEREICHT**



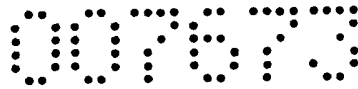
Gemäß einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen festen Träger zur Verfügung, worin die Oligonukleotide des Sets oder Oligonukleotide, die zu den Oligonukleotiden des Sets komplementär revers sind (und somit die Oligonukleotide des Sets hybridisieren können), auf dem festen Träger immobilisiert sind.

Gemäß einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen festen Träger mit mindestens zwei Sonden zur Verfügung, die spezifisch für das gyrB-Gen von mindestens zwei Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen sind, die auf dem festen Träger immobilisiert sind.

Weiters bevorzugt umfassen die Sonden auf dem Träger Sequenzen, die ausgewählt sind aus mindestens zwei, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30 verschiedenen Sequenzen, die komplementär revers zu SEQ ID NOs 1 bis 71 sind (und daher diese Sequenzen hybridisieren können).

Vorteilhaft sind diese Oligonukleotidmoleküle an verschiedenen Spots auf der Oberfläche immobilisiert. Durch Vorsehen von Spots werden spezifisch definierte Regionen mit den immobilisierten Oligonukleotidmolekülen erzeugt. Ist ein Spot spezifisch für bestimmte Mikroorganismen, dann kann der in der untersuchten Probe vorhandene Mikroorganismus genau definiert werden. Weiters ist es möglich, ein Referenz-Oligonukleotidmolekül in den Spots vorzusehen, welches nicht nur eine positive Kontrolle darstellt, sondern auch als Referenz für die Quantifizierung herangezogen werden kann.

Vorzugsweise bildet der feste Träger einen Mikroarray. DNA-Mikroarrays sind ein wirksames Werkzeug zur leistungsstarken Paralleldetektion und Quantifizierung vieler Gene. Ursprünglich für Genexpressionsanalysen ganzer Genome entwickelt, haben DNA-Mikroarrays ein sehr starkes Anwendungspotential auf vielen Gebieten der Mikrobiologie. Bei Verfügbarkeit entsprechender Sonden sets ermöglichen sie den Nachweis von bis zu mehreren Tausend Mikrobenstämmen, Arten oder Artengruppen (je nach Sondendesign) in einem einzigen Assay. Für die klinische Mikrobiologie, die Veterinär- und Pflanzenmikrobiologie sowie die Nahrungsmittel- und Wasser-Qualitätskontrolle bedeutet das, dass ein einziger Test entwickelt werden kann, um sämtliche pathogenen/nützlichen/kontaminierenden Bakterien nachzuweisen, die in der untersuchten Probe anwesend sein könnten. Das Potential für die Umweltmikrobiologie ist noch höher. Durch die Anwendung von verschachtelten



Oligonukleotidsondensets, die Zielgene anvisieren, welche die Phylogenie des Trägerorganismus widerspiegeln, wird es möglich, die ganze Prokaryonten-Diversität einer Umwelt grob zu bestimmen.

Ein Mikroarray umfasst eine große Anzahl von immobilisierten Oligonukleotidmolekülen in hoher Dichte auf dem festen Träger. Ein Mikroarray ist ein hochwirksames Werkzeug zum Nachweis von Hunderten bis Millionen von Zielmolekülen in einem einzigen Detektionsschritt. Solche Mikroarrays werden oft als Slides oder Platten, insbesondere Mikrotiterplatten, vorgesehen. Im Stand der Technik wird ein Mikroarray entweder als Miniaturanordnung von Bindungsstellen (d.h. Material, Träger) oder als Träger mit Miniatur-Bindungsstellen (d.h. Array) definiert. Beide Definitionen können auf die Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung angewendet werden. Für die erste Definition ist die bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Miniaturanordnung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide in einem Mikroarray. Die Oligonukleotidmoleküle werden vorzugsweise mit Hilfe einer Druckeinrichtung auf dem Mikroarray immobilisiert, die die Immobilisierung in hoher Dichte auf dem festen Träger gewährleistet. Dieser Mikroarray ist besonders bei der Analyse einer großen Anzahl von Proben nützlich.

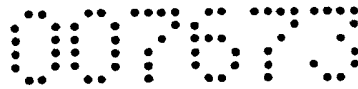
Besonders bevorzugt weist der feste Träger eine Aldehyd-Oberfläche auf. Eine Aldehyd-Oberfläche kann zur Immobilisierung von Oligonukleotidsonden, insbesondere mit einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe an einem Ende, die vorzugsweise im Linker enthalten ist, verwendet werden. Der Linker ist vorzugsweise ein  $\text{C}_1$ - bis  $\text{C}_{10}$ -, vorzugsweise ein  $\text{C}_2$ - bis  $\text{C}_6$ -Linker, der an ein kurzes, z.B. 4,5,6 nt langes T-Stretch gebunden ist.

Gemäß einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren eines Mikroorganismus zur Verfügung, umfassend das

- i) Vorsehen von DNA des *gyrB*-Gens des Mikroorganismus,
- ii) Hybridisieren der *gyrB*-DNA mit dem erfindungsgemäßen Oligonukleotidset oder dem festen Träger, worin die Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen immobilisierte Sonden bilden,
- iii) gegebenenfalls Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
- iv) Sichtbarmachen von hybridisierten Oligonukleotiden.

Durch die spezifische Hybridisierung mit dem erfindungsge-

**NACHGEREICHT**



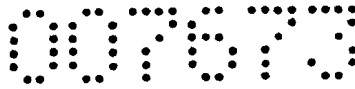
mäßen Set kann eine Vielzahl von Mikroorganismen über das gyrB-Gen nachgewiesen und identifiziert werden. Die Spezifität von MDMs definiert sich in erster Linie über den Grad der Konservierung des Markergens und die Länge der Oligonukleotidsonde (Loy & Bodrossy, 2006). Das gyrB-Gen, das für die Untereinheit B der Bakteriengyrase codiert, erfüllt sämtliche Voraussetzungen für ein phylogenetisch nützliches Protein-codierendes Gen: es ist in den meisten Bakterienarten zu finden und wird scheinbar nicht häufig horizontal übertragen. Weiters ist die Rate der gyrB-Evolution nicht nur schneller als die der ribosomalen Gene, sondern scheint auch schnell gegenüber anderen Protein-codierenden Housekeeping-Genen zu sein (<http://seasquirt.mbio.co.jp>) (Yamamoto & Harayama, 1995). Kurze Oligonukleotidsonden ermöglichen die Differenzierung der Unterschiede einzelner Oligonukleotide. In Kombination mit einem hochauflösenden phylogenetischen Marker kann eine optimale Leistung hinsichtlich MDM-Spezifität erzielt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren eignet sich zur sensitiven und spezifischen Detektion eines weiten Bereichs von Mikroorganismen aus Proben, die komplexe Mikrobengemeinschaften enthalten.

Bevorzugte stringente Bedingungen sind 60°C Annealing-Temperatur zur Markierung und 55°C zur Hybridisierung mit den Sonden des festen Trägers, mit 6xSSC, 1xDenhardt-Reagens (Sigma, St. Louis, Mikroorganismus, USA), 0,1% SDS, insbesondere dann, wenn die reaktiven Oligonukleotide für eine Schmelztemperatur  $T_m$  von 60°C ausgelegt sind (z.B. +/-2°C, jedoch kann auch ein signifikanter Anteil von Oligos mit niedrigerer  $T_m$  nach wie vor funktionieren), u.zw. zur Hybridisierung der reaktiven Oligonukleotide (RC-Oligos) an die Probe (z.B. das PCR-Produkt) und/oder der Sonden an den Träger. Oligonukleotide mit unterschiedlichen Gesamtschmelztemperaturen können jedoch ebenfalls gebildet werden, z.B. 55°C durch Auswählen von gyrB-Stretches mit unterschiedlichem GC-Gehalt, wodurch die bevorzugte Stringenztemperatur auf die Schmelztemperatur abgesenkt wird. In besonders bevorzugten Fällen wird die Stringenz durch Erhöhung der konzipierten Schmelztemperatur um 5°C über die durchschnittliche Schmelztemperatur der Oligonukleotide erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform ist ein Verfahren zum Identifizieren eines Mikroorganismus vorgesehen, umfassend das

- a) Vorsehen des erfindungsgemäßen Sets von für das gyrB-Gen

**NACHGEREICHT**



- des Mikroorganismus spezifischen Oligonukleotiden,
- b) Vorsehen eines Trägers mit immobilisierten Sonden, welche Sonden unter stringenten Bedingungen an die Oligonukleotide hybridisieren können,
  - c) Vorsehen einer Probe von Mikroorganismus-DNA oder -RNA, die vorzugsweise mittels PCR, am meisten bevorzugt mittels für das *gyrB*-Gen spezifischer PCR, amplifiziert wird,
  - d) Hybridisieren der Oligonukleotide mit der Probe unter stringenten Bedingungen,
  - e) Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
  - f) Hybridisieren der Oligonukleotide gegen die Sonden auf dem Träger unter stringenten Bedingungen,
  - g) Sichtbarmachen der an die Sonden gebundenen markierten Oligonukleotide.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Sonden die revers komplementären Sequenzen der Oligonukleotide (zur Ermöglichung der Hybridisierung an die Oligonukleotide) und vorzugsweise einen Linker zum Binden an den Träger.

Vorzugsweise bilden der vorzugsweise feste Träger und die immobilisierten Sonden einen Mikroarray.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Sonden Oligonukleotidsonden, insbesondere DNA oder RNA mit Längen zwischen 10 und 30 nt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Markierung durch Zugabe von mindestens einem markierten ddNTP. Die Zugabe von ddNTPs verhindert eine weitere Markierung und Signalveränderung. Vorzugsweise ist die Markierung eine fluoreszierende Markierung oder eine radioaktive Markierung, z.B. <sup>32</sup>P. Vorzugsweise sind die markierten Nukleotide ddCTP.

Vorzugsweise sind während einer Hybridisierung kompetitive Oligonukleotide anwesend, die sich von den Oligonukleotiden des Sets durch mindestens eine Nichtübereinstimmung, vorzugsweise 1 bis 6 Nichtübereinstimmungen, am meisten bevorzugt 1 bis 3 Nichtübereinstimmungen, unterscheiden. Diese kompetitiven Oligonukleotide (CO-Oligos) können mit geringerer Spezifität an die Probe binden als ein entsprechendes RC-Oligo und dabei helfen, falschpositive Signale zu verringern oder zu verhindern.

In einer besonderen Ausführungsform können die kompetitiven Oligonukleotide eine Markierung nicht binden und haben vorzugsweise eine 3'-Phosphatmodifikation, die mit einer Nukleotid-Ad-

ditionsreaktion unvereinbar ist (z.B. sequenzspezifische Endmarkierung) - somit können die kompetitiven Oligonukleotide eine Markierung nicht binden.

In bevorzugten Ausführungsformen umfassen die kompetitiven Oligonukleotide mindesten eine, vorzugsweise mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens sechs verschiedene Sequenzen ausgewählt aus SEQ ID NOs 72 bis 82 gemäß der nachstehenden Tabelle 3.

Vorzugsweise ist der Mikroorganismus ein Pathogen, insbesondere ausgewählt aus *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *A. hydrophila*, *V. cholerae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica* und *C. jejuni*.

Besonders bevorzugt werden die Schritte (z.B. die Schritte i) bis iv) oder a) bis g) der obigen Verfahren) einer ersten Analyse in mindestens einer zweiten Analyse mit einem Set von Oligonukleotiden ohne Oligonukleotide für Mikroorganismen, die in einer früheren Analyse verwendet wurden, wiederholt. Besonders bei Umweltproben verbessert sich dadurch der Nachweis und die Identifikation von weniger häufigen Mikroben in einer komplexen Mikrobengemeinschaft.

Vorzugsweise werden mindestens 4, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 24 oder 26, vorzugsweise mindestens 30, 36 oder 40, am meisten bevorzugt mindestens 50, 60 oder 70, verschiedene Sonden auf dem Träger immobilisiert.

Ebenfalls bevorzugt umfassen die Oligonukleotide (eine) Sequenz(en) ausgewählt aus mindestens 1, bevorzugter mindestens 4, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 24 oder 26, vorzugsweise mindestens 30, 36 oder 40, am meisten bevorzugt mindestens 50, 60 oder 70, verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 71, wie nachstehend in Tabelle 1 angeführt.

In einer anderen Ausführungsform umfassen die Sonden auf dem Träger (eine) Sequenz(en) ausgewählt aus mindestens 4, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 24 oder 26, vorzugsweise mindestens 30, 36 oder 40, am meisten bevorzugt mindestens 50, 60 oder 70, verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 71, wie nachstehend in Tabelle 1 angeführt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figuren:

Fig. 1: Sondenset-Validierung

Vorhergesagte (gewichtete Nichtübereinstimmungswerte, berechnet

**NACHGEREICHT**

mit CalcOligo 2.03) und experimentell nachgewiesene Sondenspezifität.

Fig. 2: Detektionssensitivität

Mikroarray-Bilder, die die Hybridisierungsergebnisse aus einer Boden-DNA-Probe (A) und aus derselben Boden-DNA, versetzt mit 0,1% *Vibrio cholerae* (B), zeigen. Jeder Array enthält die gleichen Sonden dreifach. Die Bilder wurden mit 100 % Laserkraft, 750 V PMT, gescannt und sind in Regenbogenfarben dargestellt. Die Helligkeitseinstellung betrug 78% in beiden Fällen; für Kontrast 78 bzw. 81%. Die normalisierten Signalwerte für Vch\_1776 und Vch\_1839 betragen 4,6 bzw. 7,2, entsprechend etwa 3% des hierfür mit reinen Kulturen erhaltenen maximalen Signals (während der Validierung). 1: Interne Kontrolle Msi\_294. 2: Vch\_1776 3: Vch\_1839.

Fig. 3: Anwendung von kompetitiven Oligonukleotiden

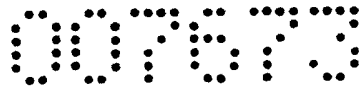
Mikroarray-Bilder, die die Hybridisierungsergebnisse von *Enterobacter cloacea*, markiert ohne (A) und mit (B) kompetitiven Oligonukleotiden, zeigen. Jeder Array enthält die gleichen Sonden dreifach. Die Bilder wurden mit 100 % Laserkraft, 750 V PMT, gescannt und sind in Regenbogenfarben dargestellt. 1: Interne Kontrolle Msi\_294. 2: Eco\_1402 und 3 - Eco\_1404 falschpositive Signale, die durch Zugabe des kompetitiven Oligonukleotids CO\_2 erfolgreich geräuschgedämpft werden konnten. 3: Yer\_1740 falschpositive Signale, die durch Zugabe des kompetitiven Oligonukleotids CO\_7 erfolgreich geräuschgedämpft werden konnten.

Fig. 4: Sequenzspezifisches Endmarkieren von Oligonukleotiden (SSELO) Prinzip

B e i s p i e l e:

Detektions- und Identifikationsverfahren für Pathogene müssen in vielen Fällen weniger häufige Mikroben innerhalb einer komplexen Mikrobengemeinschaft nachweisen. Darüber hinaus wird eine hohe Spezifität verlangt, die eine haltbare, verlässliche Identifikation liefert, zumindest was die Arten betrifft. Es wurde ein Ansatz zur Mikrobendiagnose mittels Mikroarray entwickelt, bei dem ein eindeutiges Markierverfahren, *gyrB* als Markergen und die Anwendung von kompetitiven Oligosonden kombiniert wurden, wodurch der sensitive und spezifische Nachweis eines weiten Bereichs von pathogenen Bakterien aus Proben, die komplexe Mikrobengemeinschaften enthielten, möglich wurde. Der Ansatz wurde

**NACHGEREICHT**



erstmalig mit einem Set von 35 Oligosonden getestet, die auf *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *A. hydrophila*, *V. cholerae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica* und *C. jejuni* abzielten. Die Einbringung von kompetitiven Oligonukleotiden in die Markierungsreaktion unterdrückte erfolgreich eine Kreuzhybridisierung durch nah verwandte Sequenzen. Die umwelttechnische Anwendbarkeit wurde mittels Umwelt- und Veterinärproben getestet. Es wurde eine Detektionssensitivität im Bereich von 0,1% nachgewiesen.

### **Beispiel 1: Materialien und Verfahren**

#### Sondenkonstruktion und Mikroarray-Herstellung

Die *gyrB*-Sequenz-Datenbank wurde durch Herunterladen von Sequenzen von der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und durch Sequenzieren der für die Mikroarray-Validierung verwendeten Stämme erstellt. Die Ausrichtung und der Nachbar-verknüpfende phylogenetische Baum der *gyrB*-Sequenzen wurden unter Verwendung des ARB-Softwarepakets (Ludwig et al., 2004) konstruiert, welches anschließend auch für die Konstruktion der Sonde verwendet wurde. Der entscheidende Punkt bei der Sondenkonstruktion war die Platzierung der diagnostischen Nichtübereinstimmung(en) so nahe wie möglich am 3'-Ende. Dieses Merkmal ist von äußerster Wichtigkeit für die sequenzspezifische Endmarkierung der Oligonukleotide.

Die Sonden werden derart konstruiert, dass:

- sie zu 100% mit dem Zielorganismus übereinstimmen
- Nichtübereinstimmungen von nicht anvisierten, aber verwandten Sequenzen (jenen mit ein, zwei oder drei Nichtübereinstimmungen gegenüber der Sonde) vorzugsweise zum 3'-Ende der Sonde hin liegen.

Im nächsten Sequenzbeispiel ist das Oligonukleotid unterstrichen (es ist in einer 5' → 3'-Richtung dargestellt). Darunter sind die entsprechenden Sequenzen vom Target (*Salmonella*) und von einigen Non-Targets, aber verwandten Bakterien angeführt. Jeder Non-Target-Organismus weist eine Nichtübereinstimmung an der 3'-Position auf (durch Schrägstellung hervorgehoben). Manche Sonden haben Nichtübereinstimmungen weiter weg vom 3'-Ende. Eher wie jene, die in Fettdruck hervorgehoben sind - auch wenn die 3'-Nichtübereinstimmungen bereits genügen, um Spezifität zu gewährleisten.

**NACHGEREICHT**



RC-Oligo: Sal\_1451

Name	Vollständ. Name	mis	N_mis	wmis	pos	ecoli	rev	'AGGCACCCUGGCCGUC'
*Syhim	gy00019:S.typhimurium	0	0	0,0	1451	1451	0	GCGUGCCGC-----ACUGGCGAU
*Etrbc	Enterobacter_cloacae	2	0	1,7	1451	1451	0	GCGUGCCGC-----G-----u-ACCGGCGAU
*Klbsl	Klebsiella_pneumoniae	2	0	2,2	1451	1451	0	GUGUGCCGC-----G-----G-ACUGGCGAA
*EslYyy23	Escherichia_coli	3	0	2,8	1451	1451	0	GUGUACCGC-----G-----G==u-ACCGGCGAG
*Esrch134	Escherichia_coli	4	0	3,9	1451	1451	0	GUGUACCGC-----U==G-----G==u-ACCGGCGAG
*Shgll.1	Shigella_sonnei	4	0	3,4	1451	1451	0	GUGUACCGC-----Gu====G==u-ACCGGCGAG
*Erbct_5	Enterobacter_cloacae	2	0	1,7	1451	1451	0	GCGUGCCGC-----G-----u-ACUGGCGAA
*SnsMar	Serratia_marcescens	4	0	3,9	1451	1451	0	GCGAGCCGC-----g==G===A====G-UGGGCGAA

Weiters wurden sämtliche Sonden mit einem 3'-terminalen Cytosinrest konstruiert, der über terminales Markieren der Oligonukleotide (in Anwesenheit eines entsprechenden Templates) hinzugefügt wurde. Andere Faktoren, die bei der Konstruktion der Sonde berücksichtigt wurden, waren eine ähnliche Schmelztemperatur  $T_m$  (Ziel:  $60^\circ\text{C}$ ) und eine Länge zwischen 17 und 28 Nukleotiden. Die Ergebnisse der Sonden-Übereinstimmungsfunktion wurden in CalcOligo 2.03 (Stralis-Pavese et al., 2004) importiert. CalcOligo wurde zur Erstellung einer Excel-Tabelle verwendet, die die vorhergesagten Schmelztemperaturen (auf Basis des Modells des nächstkommenen Nachbarn und von SantaLucia-Parametern (SantaLucia, Jr. et al., 1996)), die Länge und den GC-Gehalt der Sonden und die Anzahl von gewichteten Nichtübereinstimmungen zwischen jedem Sonde-Target-Paar anzeigte. Die  $T_m$ -Werte des nächstkommenen Nachbarn wurden mit Konzentrationseinstellungen von 250 nmol für das Oligonukleotid und 50 mmol für  $\text{Na}^+$  berechnet. Die Faktoren zur Gewichtung von Nichtübereinstimmungen in CalcOligo waren wie folgt. Positionen: 5' 1. 0,3; 5' 2. 0,6; 5' 3. 0,8; 3' 1. 4,0; 3' 2. 2,0; 3' 3. 1,2; alle anderen Positionen 1,0. Basenpaare dArC 1,2; dTrC 1,2; dGrU 0,7; dTrG 0,4; alle anderen nicht übereinstimmenden Basenpaare 1,0 (worin sich "d" auf die Sonde auf dem Array und "r" auf die Zielsequenz bezieht). Von Sonde-Target-Paaren mit gewichteten Nichtübereinstimmungswerten von bis zu 0,5 wurde erwartet, dass sie eine positive Hybridisierung unter den angewendeten Bedingungen liefern. Eine vollständige Liste der in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide ist in Tabelle 1 zu finden. Das Kontroll-Oligonukleotid (Msi 294), welches das pmoA-Gen von *Methylosinus trichosporium*

007573

- 12 -

OB3b anvisiert, wurde dem Diagnose-Mikroarray für methanotrophe Bakterien (Bodrossy et al., 2003) entnommen .

Tabelle 1: Oligonukleotid-Sondenset. Die angeführten Sequenzen sind jene der RC-Oligosonden, die bei der Markierungsreaktion verwendet wurden. Alle Sequenzen sind ohne 3'-terminalem C-Rest angeführt. Die angegebenen Tm- und G+C-%-Werte wurden unter Verwendung von CalcOligo 2.03 berechnet. Die SEQ-ID-Nummern sind für PCR-Reaktions-Oligonukleotide ("RC-Oligos") des Sets angegeben. Die Sequenzen der auf dem Träger immobilisierten Einfang-Oligonukleotide sind komplementär und revers (um eine Hybridisierung mit den RC-Oligos zu gestatten) und enthalten einen Oligo-T-Tail-Linker zur Immobilisierung.

NACHGEREICHT



SEQ ID No	Name	Sequenz - RC-Oligos	L	Im	GC%	Sequenz - Einfang-Oligos	beabsichtigte Spezifität
1	Mav 1653	CGACATCTTCGAGACCACCGAGTA	24	61,9	56,0	NH2-C6-tttttGACTCGGTGGTTCGGAAGATGTCG	Mycobacterium group IIB
2	Mav 1657	ATCTTCGAGACCACCGAGTACGA	23	61,3	54,2	NH2-C6-tttttGCTGACTCGGTGGTTCGGAAGAT	Mycobacterium group IIB
3	Mav 1659	CTTCGAGACCACCGAGTACGACTT	24	61,8	56,0	NH2-C6-tttttGAAGTCTACTCGGTGGTTCGGAAG	Mycobacterium group IIB
4	Mb 2112	GAACAAGTACGCCAAGGACCG	21	61,8	59,1	NH2-C6-tttttGCGGTCTTGGCGTACTTGTTC	Mycobacterium group Ic
5	Hpy 1516	GATGAAGCGGTGATGGAAGT	20	55,0	47,6	NH2-C6-tttttGACTTCCATCAGCCTTTCATC	Helicobacter pylori
6	Hpy 1647	TTTCTATGAAGACCGTGAACAATT	27	58,1	35,7	NH2-C6-tttttGAATTGTTTCAAGCCGTTCATAGAAA	Helicobacter pylori
7	Hpy 1960	GTGAGCTGAAAATGACCGAGC	22	60,3	52,2	NH2-C6-tttttGGCTCGCTCATTTTCAAGCTCAC	Helicobacter pylori
8	Hpy 2242	GAGAGTGAATCTTTTAGTGGAGGG	26	59,3	44,4	NH2-C6-tttttGCCCTCCACTAAAAGATTTCACCTCTC	Helicobacter pylori
9	Prt 1882	AACATATGGATAAAGAAAGG	20	48,3	33,3	NH2-C6-tttttGCTTCTTTATCCAEATAGTT	Proteus spp
10	Prt 2152	GCGCGTAAAGCACGTGAGATGA	22	62,1	56,5	NH2-C6-tttttGTACTCTCAGCTGCTTACGCGC	Proteus spp
11	Sal 1451	AGGCACCCCTGGCCGT	16	63,5	76,5	NH2-C6-tttttGACGCCAGGGGGTGCCT	Salmonella spp
12	Sal 1457	CCCTGGCCGCTACTGG	16	61,6	76,5	NH2-C6-tttttGCCAGTGACGGCCAGGG	Salmonella spp
13	Sal 1950	AGGTCTGATTGCGGGGTTC	21	61,1	54,5	NH2-C6-tttttGGAACACCGCAATCAGACCT	Salmonella spp
14	Eco 1402	CAGCGCAGGGTAAAATTCAC	21	60,0	54,5	NH2-C6-tttttGGTGAATTTTACCCTCGCGCTG	Escherichia spp and Shigella spp
15	Eco 1404	GCGCGAGGGTAAAATTCACCGT	22	62,0	56,5	NH2-C6-tttttGACGGTGAATTTACCCTCGCGC	Escherichia spp and Shigella spp
16	Eco 1472	GCGAGACTGAAAACCGG	19	58,1	55,0	NH2-C6-tttttGCGGTTTTTTCAGTCTCCG	Escherichia spp and Shigella spp
17	Eco 1521	AACCTCACCAATGTGACGAGTT	24	61,0	48,0	NH2-C6-tttttGAACCTCGTACATTTGGTGAAGTT	Escherichia spp and Shigella spp
18	Aer 1195	TTCTGGCGGAGCCGAC	17	63,1	72,2	NH2-C6-tttttGGTCCGGCTCGGCCAGAA	Aeromonas spp
19	Aer 1374	GAACCAAGAACAGCCCGATC	22	60,9	56,5	NH2-C6-tttttGGATCGGGGCTTGTCTCGGTTT	Aeromonas spp
20	Aer 1585	GAGGATTTCGCAAGAAGGCCAAGT	25	61,2	50,0	NH2-C6-tttttGACTTGGCCCTTCTGCTGAATCCTC	Aeromonas spp
21	Aer 1984	GCCAAGCAGGTCGCAA	17	60,3	66,7	NH2-C6-tttttGTTGGACCCCTGCTGGC	Aeromonas spp
22	Cam 1556	TTTTGGCTAAAAGATTTCGTGAAGTTG	27	59,1	35,7	NH2-C6-tttttGCAAGTTCACGAAATCTTTAGCCAAA	Campylobacter spp
23	Cam 2027	CTTATGCGTCTCTATAGTTCAAAG	27	58,1	39,3	NH2-C6-tttttGCTTTTGAACACTAGGAGCCACATAAG	Campylobacter spp
24	Cam 2221	GCTGATTTCAAAGTAAAGATC	22	53,4	39,1	NH2-C6-tttttGGATCTTTACTTTGACAATCAGC	Campylobacter spp
25	Cje 2000	GACAACCAAAAGAAAACCTTGGTCAA	27	59,5	39,3	NH2-C6-tttttGTGAACCAAGTTTCTCTTGGTTTGTGTC	Campylobacter jejuni
26	Cje 2016	ACTTGGTCAACTTATGTGCGCT	23	59,4	45,8	NH2-C6-tttttGGAGCCACATAAGTTGAACCAAGT	Campylobacter jejuni
27	Yer 1740	AGATGATATCGGTGTGAAGTGG	23	60,3	50,0	NH2-C6-tttttGCCACTCCACCGATATCATCT	Yersinia spp
28	Yer 1512	GAGCTTCGACAGCTTCCACAATAATA	26	59,2	44,4	NH2-C6-tttttGTATTATTTGGTGAACGCTGGAAGCTC	Yersinia enterocolitica
29	Yer 1425	GCAGACTTCAAGATGGGTGTGC	23	61,6	54,2	NH2-C6-tttttGGCACACCCACTTGTAAAGTCTGC	Yersinia enterocolitica
30	Yer 1407	TGAAGTAAAGTTCACGAGCAGACTTA	27	60,3	42,9	NH2-C6-tttttGTAAGTCTGCTGTAACCTTCACTTCA	Yersinia spp
31	Yer 1704	GATCCACGAAAGTGTCTATTCT	26	59,1	44,4	NH2-C6-tttttGAGAATAAGACACTTTCCGGTGGATC	Yersinia spp
32	Vch 1776	GCTTGAAGTCAAGTGAATGAGAAG	25	61,6	50,0	NH2-C6-tttttGCTTCTCATCTATGGCTGACTCAACC	Vibrio cholerae, Vibrio mimicus, V.fluvia
33	Vch 1795	GAGAGACTGGGGGATTCCTAG	22	61,1	56,5	NH2-C6-tttttGCTAGAAAATCGCCAGCTTCTC	Vibrio cholerae, V.fluvalis
34	Vch 1839	AAACGTTTGTTCGAAGATTATTGATG	26	57,0	33,3	NH2-C6-tttttGCTATCAATAATCTTGAACAACCGTTT	Vibrio cholerae, Vibrio mimicus, V.fluvia
35	Vib 1627	AAAGAAGGCTTCTCGAAGAAAG	22	57,1	43,5	NH2-C6-tttttGCTTCTTCGAGAGCCCTCTTCT	Vibrio spp
36	Bfrag 1609	AAUGCCGGUUGCGCAUCU	19	61,6	60,0	NH2-C6-tttttGAGATGCCAGACCCGGCATT	Bacterioides fragilis
37	Bfrag 2478	GGAAGAAGCAGCAAGCUGC	21	60,0	54,5	NH2-C6-tttttGGCAGCTTTGCTGTCTTCTTCC	Bacterioides fragilis
38	Citro 1031	CCCUUGAGAAAUUCGAGGC	19	56,7	55,0	NH2-C6-tttttGGCCTCGAATTTCTCAAGGG	Citrobacter spp
39	Citro 1145	GCAAAUGGACACGCAAACTUA	22	57,0	43,5	NH2-C6-tttttGTAAGTTTGTCTGATGCACTTTCG	Citrobacter spp
40	Cperl 1222	GAUGACGGAAGGUAUGC	19	55,8	55,0	NH2-C6-tttttGGCATACCTCTTCCGTATC	Clostridium perfringens
41	Cperl 2431	GCAAUUGGAGCUGGUAUAGGAC	22	58,9	52,2	NH2-C6-tttttGGTCTATACCGCTCCAAATGC	Clostridium perfringens
42	Elaec 1711	GACGUUAUUUCCGAGGC	19	54,4	50,0	NH2-C6-tttttGGCTCTGGGAAAATAACGTC	Enterococcus faecalis
43	Elaec 2426	CAGCUAUGGGAACAGGCUUCGG	22	63,6	60,9	NH2-C6-tttttGCCGAAGCCGTTCCCATAGCTG	Enterococcus faecalis
44	Kierr 1468	ACCGGCACACUGAUGCUA	19	60,6	60,0	NH2-C6-tttttGTAGCATCAGTGTCCGCGGT	Klebsiella terrigena
45	Kierr 2097	AGACGCCAAGAUUCGGUAGG	21	62,5	59,1	NH2-C6-tttttGGCTACCAGATCTGGCGTCT	Klebsiella terrigena
46	Lpneumo 194	CAGCAGUAGAUAUCCTUGUGUUG	22	59,4	52,2	NH2-C6-tttttGCAACACAGGATTTACTGCTGG	Legionella pneumophila
47	Lpneumo 200	CUGCAGAAAUAUCUUCGUAG	21	58,1	50,0	NH2-C6-tttttGCTACGATGGATTTTGTCTGCG	Legionella pneumophila
48	Muber 1831	GAAACGCCGACCGAAUCCA	19	62,6	65,0	NH2-C6-tttttGTGGATTCGGCTGCGCGTCT	Mycobacterium group Ic
49	Paero 1207	CCGGAGACCUUCAGCAA	17	56,0	61,1	NH2-C6-tttttGTGCTGAAGGCTCCCG	Pseudomonas aeruginosa
50	Paero 1397	GCCUGACCAUCCGUCGCA	19	63,9	70,0	NH2-C6-tttttGTGGCAGCGGATGGTCAGGC	Pseudomonas aeruginosa
51	Prt 1505	UCUGGCCAAGUCUUGAUAC	19	55,2	50,0	NH2-C6-tttttGGTATCAAGACTTGGCCAGA	Proteus spp
52	Pshiq 1623	GCGUAACGACAAAGCAGGAUCA	21	59,6	54,5	NH2-C6-tttttGTATCTGCTTGTCTGTACGC	Plesiomonas shigelloides
53	Pshiq 2061	CGAGCGUCGCAAGAGUAC	19	58,5	60,0	NH2-C6-tttttGGTACTCTTCAGACGCTCG	Plesiomonas shigelloides
54	Rhodoc 1554	CCGCUACACAGACUACGCA	21	60,2	59,1	NH2-C6-tttttGCTAGGCTGTGTGTAGCGG	Rhodococcus spp
55	Rhodoc 1835	AACAAGCCGAGGUCGCUUC	19	61,2	60,0	NH2-C6-tttttGGAAGCCAGCTCGGCTTGT	Rhodococcus spp
56	Sagal 2072	GCGAAGCUUAUCUUGAUUC	20	55,8	47,6	NH2-C6-tttttGGAATCGATTGAAAGCTTCGC	Streptococcus agalactiae
57	Sagal 2143	GCAUCUAAAGCCCUUAUUG	19	55,1	50,0	NH2-C6-tttttGCAATACGGGCTTATAGATGC	Streptococcus agalactiae
58	Saur 2106	UCCACAAGUCGACGUA	17	55,4	55,6	NH2-C6-tttttGTACTGCGACTTGTGGA	Staphylococcus aureus
59	Saur 2320	CCUGACUCUAGAAGCGCAGG	19	58,5	60,0	NH2-C6-tttttGCTGCTTCTAGAGTCCAG	Staphylococcus aureus
60	Vmimi 715	GUGUGGCAAGAUUCACACC	20	59,8	57,1	NH2-C6-tttttGGGTGGAATCTGCCACCAC	Vibrio mimicus
61	Vmimi 1684	GCCUUAACAGCAAGUUGUGU	19	55,1	50,0	NH2-C6-tttttGACACAAGCTGTTAAGCC	Vibrio mimicus
62	Vpara 1352	GCGAAGCGGACAAAGGAUCA	22	62,3	56,5	NH2-C6-tttttGTGATCTTGTCTGTCGCTTCGC	Vibrio parahaemolyticus
63	Vpara 1769	AAUCAGCGGUUGAUCGG	18	57,0	52,6	NH2-C6-tttttGCCGATTCACCCGCTGATT	Vibrio parahaemolyticus
64	Lmono 1561	ACGCTTCTGACGCTACAGC	20	62,4	61,9	NH2-C6-tttttGCGTACGCGTACGAAGCCT	Listeria monocytogenes
65	Lmono 2041	AAGCCGTTCAATCAGGATAAG	23	59,7	50,0	NH2-C6-tttttGCTTATCCGTGATTGAAAGGCTT	Listeria monocytogenes
66	Lmono 2129	GAGGGCGTTGFGCTTCT	19	58,8	60,0	NH2-C6-tttttGAGAACCCACAGCCCTTC	Listeria monocytogenes
67	Vflu 1694	CAGTGGTTTCGGTGAGAGTG	20	58,3	57,1	NH2-C6-tttttGCACTCTCACGAAACCACTG	V. fluvalis
68	Blong 993	AAAGCGAGCCGACTCCGA	20	61,8	61,9	NH2-C6-tttttGCTGGAGATCGGCTCGCCTT	Bifidobacterium longum
69	Blong 1483	AACAATCCGCGCGGTG	17	62,3	66,7	NH2-C6-tttttGCACCGCGCGGATGTT	Bifidobacterium longum
70	RC mtof 173	CCAGAAGTCCAGCTCNC	17			NH2-C6-tttttGGNACTGGGACTTCTGG	Positive control
71	RC Msi 294	GCGAAGGTCGCGCGAA	17			NH2-C6-tttttGTGCGCGGACCTTCGC	Positive control

- a - Die Zahlen am Ende der Sondennamen beziehen sich auf ihre relative Position auf dem E. coli gyrB-Gen
- b - M. avium, M. intracellulare, M. malloense

**NACHGEREICHT**

c - *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri*

Oligonukleotide zur Immobilisierung wurden mit einem 5'-Aminolink, gefolgt von fünf Thymidinresten vor der SONDENSEQUENZ, eigens synthetisiert (VBC Genomics, Wien, Österreich). Eine flache Bodenplatte mit 384 Vertiefungen (Ritter GmbH, Schwabmünchen, Deutschland) wurde mit 30 µl 50 µM Oligonukleotidlösung in ArrayIt-Spotting-Puffer (TeleChem Inc., Sunnyvale, CA, USA) hergestellt. Mikroarrays wurden mit einem OmniGrid-Spotter (1 TeleChem SMP3-Stift) bei 55 % relativer Luftfeuchtigkeit und 21°C auf Aldehyd-silylierte Slides (CEL Associates Inc., Pearland, TX, USA) gespottet. Die Arrays wurde dreifach gespottet, um eine statistische Fehlerkorrektur zu gestatten. Die Verarbeitung der Slides erfolgte wie oben beschrieben (Stralis-Pavese et al., 2004). Die verarbeiteten Slides wurden feuchtigkeitsfrei bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

#### DNA-Templates

Die für die Mikroarray-Validierung verwendeten Stämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Genomische DNA-Proben aus Reinkulturen wurden unter Verwendung des DNeasy-Extraktionskits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt. Archivierte Veterinärproben, die zum Testen der Leistung des Verfahrens verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Clyde Hutchinson (Institute of Zoology, London, UK) zur Verfügung gestellt. Diese DNA-Proben wurden unter Verwendung des DNeasy-Extraktionskits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aus Tierarten hergestellt, von denen man wusste, dass sie mit einem oder mehr der bakteriellen Pathogene kontaminiert waren. Genomische DNA aus Bodenproben wurde unter Verwendung des UltraClean-Soil-DNA-Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) nach Anweisungen des Herstellers extrahiert.

Tabelle 2: Auflistung von zur Mikroarray-Validierung verwendeten Bakterienarten. Die Stämme waren Umwelt- oder klinische Isolate aus der Kultursammlung der Universität Sassari, Fakultät für Biologie, mit Ausnahme von *Pseudomonas putida*, das von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) stammte.

Name	Bezeichnung	gyrB Zu- gangsnummer
Aeromonas hydrophila	SSM 4131	DQ386876
Campylobacter jejuni	SSM 4129	-
Enterobacter cloacae	SSM 2554	DQ386885
Escherichia coli	SSM 1771	DQ386875
ETEC (E.coli enterotoxic)	SSM 4135	DQ386871
EHEC slt-I (E.coli enterohaemorrhagic)	SSM 4134	DQ386872
EHEC slt-II (E.coli enterohaemorrhagic)	SSM 4140	DQ386873
EIEC (E.coli enteroinvasive)	SSM 4137	DQ386888
EPEC (E.coli enteropathogenic)	SSM 4136	DQ386874
Helicobacter pylori	SSM 4138	DQ386880
Mycobacterium avium	SSM 4139	DQ386879
Mycobacterium tuberculosis	-	-
Proteus mirabilis	SSM 2105	DQ386881
Pseudomonas spp	SSM 2506	DQ386884
Salmonella spp	SSM 1592	DQ386877
Serratia marcescens	SSM 2560	DQ386886
Shigella spp	SSM 2023	DQ386882
Staphylococcus aureus	SSM CI-1	DQ386887
Vibrio cholerae	SSM 2508	DQ386878
Yersinia enterocolitica	SSM 4130	DQ386883

#### DNA-Amplifikation

Das gyrB-Gen wurde unter Verwendung der universellen Primer UP1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGGNAARTTYGA-3') und UP2r (3'-TACTGNCTRCGNCTRCANCTRCCGAGCGTGTAGGCATGGGACGA-5') amplifiziert. Für mehrere Stämme mussten die alternativen Primer UP1G (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGGNAARTTYGG-3') und UP2Ar (3'-TACYGNCTRCGNCTRCANCTRCCGAGCGTGTAGGCATGGGACGA-5') verwendet werden. PCR-Reaktionen wurden in 100- $\mu$ l-Aliquoten bestehend aus 1x PCR-Puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4U Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 50  $\mu$ M für jedes der vier dNTPs, 150 nM für jeden Primer, mit 50 bis 100 ng DNA als Template durchgeführt. Für Boden-DNA und DNA-Mischungen erfolgte die Amplifikation mit allen vier Primern in einer "Multiplex"-Reaktion unter Verwendung von FailSafe PCR Premix E (Epicentre, Madison, WI, USA). Die Amplifikationsbedingungen waren 5 min bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen von 1 min bei 95°C, 1 min bei 58°C, 2 min bei 72°C, ge-

**NACHGEREICHT**



folgt von einem abschließenden Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C (<http://seasquirt.mbio.co.jp/icb/protocols/protocols.php>). Die PCR-Produkte wurden anschließend unter Verwendung eines handelsüblichen PCR-Reinigungskits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt und in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung eines NanoDrop-Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) gemessen und auf eine Endkonzentration von 50 ng/µl eingestellt.

#### Klonierung und Sequenzierung

Die gereinigten PCR-Produkte wurde unter Verwendung eines TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Anweisungen des Herstellers kloniert. 25 µl der chemisch kompetenten Zellen (die mit dem Klonierungskit geliefert wurden) wurden mit 6 µl des Ligationsansatzes transformiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten enthaltend 100 µg/ml Ampicillin aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Template für die Kolonie-PCR wurde durch Resuspendieren einzelner Kolonien in 20 µl dH<sub>2</sub>O und Denaturieren der Zellsuspension 10 min lang bei 95°C in einem Thermozykler unter anschließender Abkühlung auf 4°C hergestellt. 1 µl dieser Suspension wurde als Template für 50 µl PCR-Reaktionen verwendet. M13-PCR-Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt, aber unter Verwendung des M13-Forward-Primers (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') und des M13-Reverse-Primers (3' GTCCTTTGTCGATACTG 5') und bei einer Annealing-Temperatur von 50°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend unter Verwendung des PCR-Reinigungskits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt und in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung eines NanoDrop-Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) gemessen. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Sequenzierungsreaktion wurde in 10-µl-Ansatzaliquoten bestehend aus 4 µl gereinigtem PCR-Produkt, 2 µl Sequenzierungsmischung und 400 nM Primer (M13-Forward oder M13-Reverse). Die Sequenzierungsbedingungen waren 2 min bei 5°C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 s bei 95°C, 25 s bei 50°C, 4 min bei 60°C ohne abschließendem Verlängerungsschritt. Die Sequenzierungsansätze wurden unter Verwendung von Sephadex-G-50-Säulen (Amersham Biosciences, Piscataway,

NJ, USA) gereinigt und über den automatischen ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) laufen gelassen. Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Sequencher v 4.5 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) analysiert und einer Nukleotid- Nukleotid-BLAST-Voranalyse innerhalb der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) unterzogen, u.zw. vor Importieren in die gyrB-Datenbank in ARB, wo die eigentliche phylogenetische Analyse stattfand. Die Zugangsnummern der gyrB-Sequenzen der in dieser Studie verwendeten Stämme sind in Tabelle A angeführt.

#### pmoA-PCR-Kontrollprodukt

Eine interne positive Kontrolle, ein pmoA-PCR-Produkt aus *Methylosinus trichosporium* OB3b, wurde in jeden Markierungs- und Hybridisierungsversuch aufgenommen und anschließend zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Die genomische DNA-Extraktion und PmoA-PCR-Amplifikation erfolgten wie zuvor beschrieben (Bodrossy et al., 2003). Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung eines PCR-Reinigungskits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung eines NanoDrop-Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) gemessen und auf eine Endkonzentration von 50 ng/µl eingestellt.

#### DNA-Markierung

Für die sequenzspezifische Endmarkierung der Oligonukleotide wurde ein modifiziertes Protokoll von Rudi und Mitarbeitern (2003) angewendet. Nach der Reinigung wurden gyrB-PCR-Produkte mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (SAP) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) behandelt, um verbleibende Nukleotide zu dephosphorylieren. Proben bestehend aus 20 µl gereinigtem PCR-Produkt (50 ng/µl), 2 µl Thermo Sequenase Reaktionspuffer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) und 4 µl SAP (1 E/µl) wurden bei 37°C 30 min lang inkubiert, gefolgt von 10 min bei 95°C zur Inaktivierung der Enzymaktivität. Die SAP-behandelten gyrB-PCR-Produkte wurden dann für die zyklische Markierungsreaktion verwendet. Das pmoA-PCR-Kontrollprodukt wurde auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl weiter verdünnt.

Zum Markieren wurde ein Set von revers komplementären Oligonukleotiden, denen der 3'-terminale Cytosinrest fehlte, eigens synthetisiert (VBC Genomics, Wien, Österreich). Lyophilisierte Oligonukleotide wurden auf eine Endkonzentration von 100 pmol/µl

gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die Markierungsreaktion wurde eine Oligonukleotidmischung ("RC-Mischung"), die jedes revers komplementäre Oligonukleotid in einer Endkonzentration von 1 pmol/ $\mu\text{l}$  enthielt, hergestellt. Kompetitive Oligonukleotide wurden, wenn überhaupt, in derselben Konzentration zur RC-Mischung zugegeben.

Das zyklische Markieren erfolgte in 10- $\mu\text{l}$ -Aliquoten bestehend aus 1x Thermo-Sequenase-Reaktionspuffer, 10 ng SAP-behandeltem pmoA-PCR-Kontrollprodukt, 1 pmol von jedem revers komplementären Oligonukleotid, 10 pmol Tamra-ddCTP (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA), je 10 pmol von ddATP, ddTTP, ddGTP (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany), 3 E Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oder 3,2 E Thermo Sequenase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) und 100 ng SAP-behandeltem gyrB-PCR-Produkt. Die Reaktionsbedingungen waren 25 Zyklen zu 30 s bei  $95^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von 75 s bei  $60^{\circ}\text{C}$ , ausgeführt in einem Thermozykler. Nach dem zyklischen Markieren wurden Proben direkt, ohne weitere Reinigung, für die Hybridisierung verwendet. Für die Versuche zur Untersuchung der Möglichkeit einer Verwendung von bis zu 1000 verschiedenen Sonden wurden RC-Oligos in einer Endkonzentration von 0,1 pmol/ $\mu\text{l}$  zugegeben. Die Markierungsversuche wurden ebenfalls unter Verwendung aller vier Nukleotide in Form von Tamra-markierten ddNTPs (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) in einer Endkonzentration von 10 pmol und unter Weglassen sämtlicher geräuschkämpfender ddNTPs durchgeführt.

#### Enzym-Inaktivierung

Sämtliche Versuche wurden unter Zugabe von Inaktivierungsmittel während des zyklischen Markierens (10  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen) und während der Hybridisierung (210  $\mu\text{l}$  Volumen) durchgeführt. Die Reaktionsvolumen wurden durch Einstellen des zugesetzten  $\text{dH}_2\text{O}$ -Volumens konstant gehalten. Die Inaktivierung der Thermo Sequenase wurde mit 2 E alkalischer Shrimp-Phosphatase, 100 mg Proteinase K und 1 M Guanidinthiocyanat versucht. Weiters wurde die Reinigung des markierten Target unter Verwendung des Phenol/Chloroform-Verfahrens sowie von Microcon-YM-30-Röhrchen (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) untersucht.

#### Sensitivitätstests

Zur Ermittlung der Detektionssensitivität der Mikroarray-Analyse wurden Versuche mit sowohl künstlich gemischten Proben

(die Target-Stämme in unterschiedlichen Verhältnissen enthielten) also auch mit Umweltproben, die mit 1% und 0,1% der anvisierten Stämme versetzt wurden, durchgeführt.

#### Mikroarray-Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie oben beschrieben (Stralis-Pavese et al., 2004). Markierte Targets (10 µl) wurden mit 200 µl Hybridisierungspuffer (vorerhitzt auf 65°C) gemischt. Die Endkonzentration des Hybridisierungspuffers war 6xSSC, 1x-Denhardt-Reagens (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,1% SDS. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach der Hybridisierung wurden die Slides in einer Waschlösung mit 2xSSC und 0,1% SDS 5 Minuten lang gewaschen, gefolgt von zwei Waschzyklen in 0,2xSSC 5 Minuten lang und einer abschließenden Waschung in 0,1xSSC 5 Minuten lang, alle bei Raumtemperatur. Die Slides wurden mit einer ölfreien Druckluftpistole getrocknet und sofort gescannt.

#### Scanning und Datenanalyse

Die Mikroarrays wurden in drei Rastern zum Mittelwert (at three lines to average) und mit einer Auflösung von 10 µm unter Verwendung eines Laserscanners GenePix 4000A (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) gescannt. Die PMT-Verstärkung wurde so eingestellt, dass die Spots unterhalb des Sättigungsniveaus gescannt wurden. Die gescannten Bilder wurden als Mehrschicht-TIFF-Bilder abgespeichert und mittels GenePix Pro 6.0 Software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) analysiert. Microsoft Excel wurde für die statistische Analyse und Präsentation der Ergebnisse verwendet. Die Ergebnisse der Mikroarray-Hybridisierung wurde auf das vom internen Kontroll-Oligonukleotid (Msi\_294) erhaltene Signal normalisiert und in Prozent ausgedrückt, wobei 100% dem Signal der Kontrollsonde entsprechen. Bei der Validierung wurden jene Sonden als positiv angesehen, deren normalisiertes Signal mindestens 10% (des Kontrollsignals Msi\_294) betrug.

#### **Beispiel 2: Ergebnisse und Diskussion**

##### Adaptation der Methodik

Die sequenzspezifische Endmarkierung von Oligonukleotiden (SSELO) (Rudi et al., 1998; Rudi et al., 2003; Rudi et al., 2002b), ursprünglich für Makroarrays auf Membranbasis entwickelt, stellt eine signifikante Verbesserung der Nachweisgrenze von MDMs dar, indem der Fokus der Markierung auf Regionen gelegt wird, die tatsächlich bei der Hybridisierung an den Mikroarray

verwendet werden. Das Verfahrensprinzip ist in Fig. 4 gezeigt. Einfang-Oligonukleotide werden auf dem Mikroarray immobilisiert. Reverse Komplementäre der Einfang-Oligos (RC-Oligos) werden in einer linearen Amplifikationsreaktion nach Verfügbarkeit der entsprechenden Target-Sequenz endmarkiert. Die gesamte Mischung wird dann auf den Mikroarray hybridisiert, um die Sequenzen auszusortieren, die markiert worden sind. Auf diese Weise wird die Menge der markierten Nukleinsäuren, insbesondere jene ohne wirkliche Einfangsonde auf dem Mikroarray, drastisch verringert. Und damit der Grad an unspezifischer Hintergrund-Hybridisierung, der die Detektionssensitivität einschränkende Hauptfaktor. Das sequenzspezifische Endmarkieren von Oligonukleotiden (SSELO) wurde an Glas-Mikroarrays und zur Anwendung auf relativ komplexen Systemen adaptiert.

Unter Verwendung von Thermo Sequenase wie im ursprünglichen Protokoll wurden falschpositive Signale nachgewiesen, die offensichtlich nichts mit der für die Markierung verwendeten DNA-Probe zu tun hatten. Durch Substitution des Enzyms durch seinen Wildtyp-Ahnen, der Taq-Polymerase (Vander Horn et al., 1997) verschwanden alle diese falschpositiven Signale ohne Beeinträchtigung der Signalintensität. Interessanterweise versagten alle versuchten Enzym-Inaktivierungsverfahren beim Ausschalten dieser falschpositiven Signale. Schließlich wurde über eine Reihe von Ausschlussversuchen festgestellt, dass nur vier Faktoren (nämlich Thermo Sequenase, Tamra-ddCTP, RC-Oligos und Einfang-Oligos) für das Auftreten von falschpositiven Signalen wesentlich waren - nicht einmal der im Markierungsprotokoll verwendete thermische Kreisprozess oder irgendeine Template-DNA waren notwendig. Fehlte einer dieser vier Faktoren, verschwand das Hybridisierungssignal. Ohne eine umfassende Erklärung für dieses Phänomen finden zu wollen, sei gesagt, dass das Thermo-Sequenase-Protokoll auf Nylonmembranen und Amino-Mikroarray-Oberflächen entwickelt und erfolgreich verwendet wurde (Rudi et al., 2002a; Rudi et al., 2003). Beim vorliegenden Versuchsaufbau werden Aldehyd-Mikroarray-Oberflächen verwendet, und es können die Unterschiede in den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche, die räumliche Organisation der immobilisierten Oligos und anschließende sterische Faktoren für diesen beobachteten Effekt verantwortlich sein.

Es zeigte sich, dass die Spezifität des Assay in erster Li-

**NACHGEREICHT**

nie durch die Stringenz des Annealing-Schritts während der Markierung und nicht durch jene der anschließenden Hybridisierung bestimmt wurde. Als optimale Annealing-Temperatur unter den angewendeten Bedingungen erwiesen sich 60°C, darunter und darüber begannen zunehmend falschpositive und -negative Ergebnisse zu erscheinen. Andererseits brachte eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur vom Standard (55°C) auf 60°C bei der Verwendung von unter optimierten Bedingungen markierten Targets keine weitere Verbesserung der Spezifität. Insbesondere wurden auch nicht die wenigen falschpositiven Signale beeinflusst. Die einzige Auswirkung war eine globale Absenkung der Intensität sämtlicher Signale.

Einer der Mechanismen zur Verleihung von Spezifität im Markierungsschritt ist die Anwendung des markierten ddCTP in Kombination mit den anderen drei, unmarkierten ddNTPs (geräuschkämpfenden ddNTPs). Dadurch verringert sich die Chance einer unerwarteten Hybridisierung des RC-Oligos an ein PCR-Produkt, das ein markiertes Oligo liefert, um 75% (unter der Annahme einer Zufallschance, dass das nächste Nukleotid in der 3'-Richtung auf dem PCR-Produkt G ist, das als Template für die Zugabe des markierten ddCTP dient). Dieses System schränkt jedoch die Möglichkeiten des Sondendesigns ernsthaft ein. Dadurch ist es möglich, nur Sonden auszuwählen, wo das Nukleotid stromaufwärts des RC-Oligos ein Cytosin ist. Auch wenn das vorliegende SONDENSET unter Berücksichtigung dieser Regel konzipiert wurde, wurde überprüft, ob eine Relaxation desselben die Spezifität beeinträchtigen würde. Eine Umweltprobe wurde unter Standardbedingungen sowie in einer modifizierten Reaktion, bei der alle vier dNTPs markiert wurden, markiert. Die Ergebnisse bei Verwendung aller vier Tamra-ddNTPs und keiner geräuschkämpfenden ddNTPs zeigten falschpositive Ergebnisse nur bei einer von 35 Sonden (nämlich Sal\_1950).

Ein entscheidender Faktor bei der Bestimmung der potentiellen Leistung des Verfahrens ist die maximale Anzahl von Sonden, die parallel verwendet werden könnten. Im Standardprotokoll werden 1 µl einer Mischung von RC-Oligonukleotiden mit 1 pmol/µl Endkonzentration pro Oligo verwendet. Oligonukleotid-Stocklösungen haben üblicherweise eine Konzentration von 100 pmol/µl, wobei ein weiterer Anstieg derselben rasch zu einer instabilen Lösung und schließlich zu Ausfällung, ungleichmäßigem Mischen

**NACHGEREICHT**

etc. führt. So ist die maximale Anzahl von Sonden bei der verwendeten Menge von RC-Oligos auf einen Bereich von 100 bis 200 beschränkt (beim vorliegenden Array und damit Markierungsverfahren werden 35 Oligonukleotidsonden pro Assay verwendet). Eine Verringerung der Menge von RC-Oligos von 1 auf 0,1 pmol brachte jedoch keinen signifikanten Abfall der Signalintensität der entsprechenden Spots, was zeigt, dass das Verfahren auf bis zu 1000-2000 verschiedene Oligonukleotide aufgestockt werden könnte, mit der einzigen Einschränkung der zunehmenden Anzahl von potentiellen Wechselwirkungen zwischen den Oligos.

#### Sondenset-Validierung

Das Sondenset wurde mit Reinkulturen von Referenzstämmen validiert (Fig. 1). Von den 35 validierten Sonden zeigte nur eine (nämlich Prt\_1882) falschnegative Hybridisierungsergebnisse. Das lässt sich am ehesten durch die niedrige  $T_m$  ( $48,3^\circ\text{C}$ ) erklären, die mit der Markierungstemperatur von  $60^\circ\text{C}$  unvereinbar war. Mehrere Sonden zeigten falschpositive Signale bei Non-Target-Stämmen, die eine signifikante Sequenz-Ähnlichkeit mit den entsprechenden Sonden aufwiesen (berechnete, gewichtete Nichtübereinstimmungen zwischen 1,0 und 2,7). Es wurde jedoch ein kompetitives Oligonukleotidsystem entwickelt, mit dem dieses Problem erfolgreich gelöst wurde. Eine Übersicht über die Validierungsdaten ist in Fig. 1 gegeben.

#### Kompetitive Oligonukleotide

Zur Unterdrückung von falschpositiven Signalen wurde eine Reihe von kompetitiven Oligonukleotiden ("CO-Oligos") konstruiert und getestet. Kompetitive Oligonukleotide wurden als Variation eines RC-Oligos konstruiert, das falschpositive Signale bei Non-Target-Stämmen zeigte. Die Sondensequenz wurde derart verändert, dass eine neue Sonde konstruiert wurde, die perfekt zu dem falschpositive Signale aufweisenden Stamm passte. Diese CO-Oligos sollten daher eine höhere Spezifität gegenüber der zu einem falschpositiven Signal führenden Sequenz aufweisen als die entsprechenden RC-Oligos. Zur Gewährleistung des geräuschkämpfenden Merkmals wurden CO-Oligos mit einer 3'-Phosphat-Modifikation (VBC Genomics, Wien, Österreich) synthetisiert. CO-Oligos wurden in derselben Konzentration wie die RC-Oligos in die Markierungsreaktion aufgenommen. Von den sieben kompetitiven Oligonukleotiden, die entwickelt wurden (Tabelle 3), dämpften sechs das falschpositive Signal, gegen das sie gerichtet waren. Fig. 3

zeigt die Hybridisierungsprofile von *E. cloacae*, die mit und ohne CO-Oligos erhalten wurden. Eines der kompetitiven Oligos (CO\_1) versagte bei der vollständigen Dämpfung des falschpositiven Signals (d.h. unterhalb der Detektionsschwelle). Dennoch wurde eine signifikante Schwächung des Signals erreicht. Es sei bemerkt, dass dies das stärkste falschpositive Signal war, das erhalten wurde. Weiters war es jenes, das aus der stärksten Ähnlichkeit zwischen dem RC-Oligo und der zum falschpositiven Signal führenden Sequenz resultierte (gewichteter Nichtübereinstimmungswert 0,7) - und daher den geringsten Unterschied in den Bindungsspezifitäten für die CO- und RC-Oligos zeigte. Die Anwendung der CO-Oligos hatte keine statistisch signifikante Auswirkung auf die spezifischen (d.h. erwarteten) Signale, die mit den anvisierten Stämmen erhalten wurden. Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Anwendung von kompetitiven Oligonukleotiden während des Markierungsschritts die Spezifität signifikant erhöhen können, ohne die Sensitivität zu beeinträchtigen.

Tabelle 3: Set von kompetitiven Oligonukleotiden. Die Positionen von Nichtübereinstimmungen mit der ursprünglichen Sonde (RC-Oligo, siehe Sequenz in Tabelle 1) sind mit Großbuchstaben vermerkt.

Seq ID NO	Name	Sequenz - RC-Oligos	L	Für Sonde ...	Gegen ...
72	CO_1	gcgcgtaaagcGcgtgagatgac	23	Prt_2152	<i>Serratia marcescens</i>
73	CO_2	cagcgcgaaAggCaaaattcacc	22	Eco_1402, Eco_1404	<i>Enterobacter cloacae</i>
74	CO_3	cagcgAgaTggCaaaattcacc	22	Eco_1402, Eco_1404	<i>Salmonella</i> sp
75	CO_4	gaacAagaacaaAaccccgatcc	23	Aer_1374	<i>Serratia marcescens</i>
76	CO_5	gccaaagcagggGcgcaac	18	Aer_1984	<i>Serratia marcescens</i>
77	CO_6	agatgatatcggCgtggaagtggc	24	Yer_1740	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i>
78	CO_7	agatgGtatcggCgtggaagtggc	24	Yer_1740	<i>Enterobacter cloacae</i>
79	CO_8	CAGTGGTTTCGGTGAAAGTGC	21	Miuv_1694	<i>Vibrio cholerae</i>
80	CO_9	gcgcgtaaagcacgtgaAatgac	23	Prt_2152	<i>Vibrio</i> sp, <i>Aeromonas</i> sp, <i>Acinetobacter</i> sp
81	CO_10	gcgcgtaaagcCcgtgagatgac	23	Prt_2152	<i>Pseudomonas</i> sp
82	CO_11	gcgcgtaaagcUcgtgagatgac	23	Prt_2152	<i>Vibrio</i> sp

#### Sondensetentwicklung

Bei diesem Ansatz ist es nicht die Hybridisierung auf dem Array, die in erster Linie die Sondenspezifität bestimmt, da jede gespottete Sonde ihr perfektes revers komplementäres Gegenstück trifft (entweder fluoreszierend markiert oder nicht). Das bestätigte sich auch dadurch, dass praktisch die gleichen Hybridisierungsprofile bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C

und von 60°C erhalten wurden (wie oben detailliert ausgeführt). Der Spezifität verleihende Schritt des Assays ist die zyklische Markierung, die Verlängerung der RC-Oligos durch ein einziges fluoreszierend markiertes Didesoxynukleotid. Daher ist die am meisten kritische Region das 3'-Ende des Oligos, gefolgt von der Mitte. Das zeigt sich in den Parameters zur Berechnung von gewichteten Nichtübereinstimmungen, die sich signifikant von den Parametern unterscheiden, die für einen Ansatz verwendet werden, bei dem die Hybridisierung auf dem Array den die Spezifität bestimmenden Schritt darstellt (Stralis-Pavese et al., 2004).

Daher liegt eine wesentliche Voraussetzung bei der Konstruktion einer Sonde in der Feineinstellung des SONDENSETS derart, dass ihr Verhalten kompatibel mit den Bedingungen der zyklischen Markierungsreaktion ist und die Sonden eine ausreichende Unterscheidungskraft aufweisen. Es wurden drei wesentliche Richtlinien für das SONDENSET definiert: i) eine Position der diagnostischen Nichtübereinstimmung(en) so nahe am 3'-Ende wie möglich, ii) eine ähnliche Schmelztemperatur (wenn möglich  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ ) und iii) eine ähnliche SONDENSETLÄNGE (17-28 nt). Sonden, die eventuell Haarnadelstrukturen oder 3'-Selbstdimere ausbilden, welche sich zum Selbstprimen eignen könnten, wurden vermieden. Von SONDENSET-TARGET-PAAREN mit gewichteten Nichtübereinstimmungswerten (wMM) von bis zu 0,5 wurde erwartet, dass sie unter den angewendeten Bedingungen eine positive Hybridisierung liefern. Da, wie zu sehen war, die meisten der entwickelten Sonden erwartete Hybridisierungsergebnisse lieferten, waren die für das SONDENSET festgelegten, ursprünglichen Richtlinien für diese Anwendung tatsächlich angebracht. Die einzige Sonde, die falschnegative Ergebnisse lieferte, war nämlich jene, die von diesen Anforderungen am stärksten abwich (Prt\_1882,  $T_M = 48,3^\circ\text{C}$ ).

In-silico-Vorhersagen zur Spezifität konnten jedoch nicht immer experimentell bestätigt werden. Mehrere Sonden mit wMM-Werten zwischen 0,7 und 2,7 zeigten unerwartete ("falsche") positive Signale. Parameter zur Gewichtung von Nichtübereinstimmungen können zweifelsohne durch Berücksichtigung dieser und weiterer Ergebnisse verfeinert werden. Daraus kann sich eine höhere Erfolgsrate von in-silico-Vorhersagen zur Spezifität ergeben.

#### Sensitivität

Die Sensitivität von MDMs wird üblicherweise als die geringste relative Häufigkeit der nachweisbaren TARGET-GRUPPE (in-

**NACHGEREICHT**

nerhalb der analysierten Gemeinschaft) definiert. Bei Berichten liegt sie bei etwa 5% (Loy et al., 2002; Bodrossy et al., 2003; Tiquia et al., 2004; Deneff et al., 2003). Bei kurzen Oligosonden-Arrays beruht diese Einschränkung darauf, dass das Target aus (mehrere Hundert Nukleotide langen) markierten Nukleinsäurefragmenten besteht, die das gesamte amplifizierte Target-Gen überspannen und das Potential für die Akkumulation von Hintergrundsignalen aufgrund einer niedrigen Rate von unspezifischer Hybridisierung erhöhen. In der Praxis entwickelt jede Sonde bei Verwendung dieser "konventionellen" Ansätze ein schwaches Hintergrundsignal von etwa 1-5% gegenüber dem maximal erzielbaren Signal (Bodrossy & Sessitsch, 2004). Durch Schwerpunkt-Markieren nur der von den jeweiligen Sonden anvisierten Region wird beim SSELO-Ansatz dieses Hintergrundsignal minimiert.

Versuche mit Umwelt-DNA aus gewöhnlicher Gartenerde, die offensichtlich frei von den durch den vorliegenden Mikroarray anvisierten Bakterien war, zeigten fast kein nachweisbares Signal an den Sonden des Arrays. Eine sorgfältige Analyse ergab, dass das stärkste Signal, das an einer der Sonden nachgewiesen wurde, immer noch geringer als 0,1% des während der Validierung erhaltenen Signals (d.h. des maximalen Signals der Sonde) war. Bei Versetzen derselben Boden-DNA mit 0,1% *Vibrio cholerae* führte die DNA zu deutlich nachweisbaren Signalen bei zwei der vier *V. cholerae*-Sonden (Fig. 2). Ähnliche Resultate wurden mit *E. coli*, in Boden-DNA hineingemischt, sowie mit künstlichen Mischungen von reinen genomischen DNAs erzielt.

Während der Array-Validierung mit Reinkulturen wurden einige Stellen von detektierbarer Querhybridisierung nachgewiesen, von denen die meisten durch die Anwendung von kompetitiven Oligos angesprochen wurden. Dadurch erhöht sich jedoch die Möglichkeit, dass solche schwache Querhybridisierungen mit Signalen von wenig häufigen Bakterien verwechselt werden. Solche Signale zeigten sich jedoch nur während der Validierung und beim Versetzen von Umweltproben mit einem Pathogen in einem vernünftigen Verhältnis (nämlich >1%) - d.h. bei Anwesenheit einer anvisierten Sequenz mit hoher Häufigkeit. Die schwachen falschpositiven Signale in diesen Fällen gingen auf die für dieses Pathogen mit hoher Häufigkeit spezifische(n) Sonde(n) zurück, die auf spezifische Weise markiert war(en), aber eine leicht unspezifische Hybridisierung zeigte(n). Solche potentiellen Unsicherheiten können durch

wiederholtes Markieren und Hybridisieren, aber Weglassen der für das bzw. die in starker Häufigkeit nachgewiesene(n) Pathogen(e) spezifischen RC-Oligos aus der Markierungsmischung behoben werden. Daher wird für Umweltsanwendungen ein Ansatz in zwei Schritten vorgeschlagen, nämlich zuerst das Analysieren der gesamten Gemeinschafts-DNA mit einem vollständigen SONDENSET und anschließend das neuerliche Analysieren der Probe mit einem SONDENSET, das keine Sonden für häufig auftretende Arten enthält. Die Sensitivität der Analyse wird auch durch die inhärenten systematischen Fehler bei der PCR-Amplifikation des *gyrB*-Gens beeinflusst.

#### Proof-of-Concept

Die Anwendbarkeit des Mikroarrays wurde auch durch Analysieren zweier archivierter Veterinärproben (mit freundlicher Genehmigung von Clyde Hutchinson, Institute of Zoology, London, UK) unter Beweis gestellt. Die beiden Proben waren pathologische Stuhlproben von einem Hafendelfin und einem Grünling, die beide pathologische Symptome einer Salmonelleninfektion zeigten. Der Mikroarray ließ bei beiden Proben die Anwesenheit von *Salmonella* sowie ein geringeres, aber deutliches Signal für *Vibrio cholera* erkennen. Leider konnte der zweite Befund nicht durch Versuche auf Basis einer Kultivierung bestätigt werden, weil die Lagerung der Proben kein langes Überleben der Bakterien zuließ. *Vibrio*-Signale wurden jedoch bei keiner Hybridisierung mit Referenzstämmen und Kontrollhybridisierungen mit Umgebungs-DNA gefunden, was stark dafür spricht, dass bei beiden Proben tatsächlich eine Mischinfektion mit *Salmonellen* und *Vibrio* gegeben war. Sogar diese vorläufigen Ergebnisse zeigen das Potential von Parallel-Screening für multiple Pathogene auf, indem neue, wertvolle Informationen über verschiedene Aspekte der Ökologie, Diversität, Wechselwirkungen und Epidemiologie von bakteriellen Pathogenen geliefert werden.

#### Zusammenfassung

Verfahren zur Detektion und Identifikation von pathogenen Bakterien müssen in den meisten Fällen sehr spezifisch und hochsensitiv sein. Die Kombination eines einzigartigen Markierungsverfahrens (SSELO, sequenzspezifische Endmarkierung von Oligonukleotiden), eines Housekeeping-Gens mit einer robusten phylogenetischen Auflösung auf Artenniveau (*gyrB*), einer Mikroarray-Technologie und des Konzepts von kompetitiven Oligos während der

007673

- 27 -

Markierung führte zu einem hochspezifischen Verfahren mit signifikant verbesserter Sensitivität (0,1% der gesamten analysierten Mikrobengemeinschaft), das sehr komplexe Mikrobengemeinschaften ansprechen kann.

NACHGEREICHT

## Quellenangabe

- Bae et al. 2005. Nucleic Acids Res. 33: e113.
- Bodrossy et al. 2004. Current Opinion in Microbiology 7: 245-254.
- Bodrossy et al. 2003. Environmental Microbiology 5: 566-582.
- Denef et al. 2003. Environmental Microbiology 5: 933-943.
- DeSantis et al. 2005. FEMS Microbiol Lett 245: 271-278.
- Hashsham et al. 2004. Biosens.Bioelectron. 20: 668-683.
- Lee et al. 2005. J.Microbiol.Methods 61: 87-94.
- Lehner et al. 2005. FEMS Microbiology Letters 246: 133-142.
- Leinberger et al. 2005. Journal of Clinical Microbiology 43: 4943-4953.
- Loy et al. 2006. Clinica Chimica Acta 363: 106-119.
- Loy et al. 2002. Applied and Environmental Microbiology 68: 5064-5081.
- Ludwig et al. 2004. Nucleic Acids Res. 32: 1363-1371.
- Maynard et al. 2005. Applied and Environmental Microbiology 71: 8548-8557.
- Neufeld et al. 2006. Environmental Microbiology 8: 126-140.
- Rudi et al. 2002a. Applied and Environmental Microbiology 68: 1146-1156.
- Rudi et al. 1998. Applied and Environmental Microbiology 64: 2639-2643.
- Rudi et al. 2002b. Bio/Techniques 33: 496, 498, 500.
- Rudi et al. 2003. ScientificWorldJournal. 3: 578-584.
- SantaLucia et al. 1996. Biochemistry 35: 3555-3562.
- Schadt et al. 2005. Methods In Microbiology 34: 332-368.
- Sergeev et al. 2004. Biosens.Bioelectron. 20: 684-698.
- Stralis-Pavese et al. 2004. Environmental Microbiology 6: 347-363.
- Tiquia et al. 2004. Bio/Techniques 36: 664-665.
- Vander et al. 1997. Bio/Techniques 22: 758-5.
- Wang et al. 2005. Journal of Clinical Microbiology 43: 4121-4128.
- Yamamoto et al. 1995. Appl.EnvIRON Microbiol 61: 1104-1109.
- Zhou 2003. Current Opinion in Microbiology 6: 288-294.

## Patentansprüche:

1. Set von Oligonukleotiden, die spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus sind, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71, oder ein Fragment einer Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 mit 14 bis 30 Nucleotiden, mit gegebenenfalls 1 oder 2 Punktmutation(en), aufweist.
2. Set nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine vollständige Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 71 aufweist.
3. Set nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Oligonukleotid spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus ist und das Set Oligonukleotide umfasst, die spezifisch für mindestens zwei Mikroorganismen verschiedener Gattungen sind.
4. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide Sequenzen ausgewählt aus mindestens zwei, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30, verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 71 umfassen.
5. Set von Oligonukleotiden bestehend aus Oligonukleotiden, die komplementär revers zu den Oligonukleotiden des Sets nach einem der Ansprüche 1 bis 4 sind, und gegebenenfalls weiteren Oligonukleotiden.
6. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide markiert sind.
7. Fester Träger, worin die Oligonukleotide des Sets nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Oligonukleotide, die komplementär revers zu den Oligonukleotiden des Sets nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sind, auf dem festen Träger immobilisiert sind.
8. Fester Träger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass verschiedene Oligonukleotide jeweils an verschiedenen Spots auf dem festen Träger immobilisiert.

9. Fester Träger nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Mikroarray bildet.

10. Fester Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der feste Träger eine Aldehyd-Oberfläche aufweist.

11. Verfahren zur Identifikation eines Mikroorganismus, umfassend das

- i) Vorsehen von DNA des gyrB-Gens des Mikroorganismus,
- ii) Hybridisieren der gyrB-DNA mit dem Set nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder dem festen Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 10, worin die Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen immobilisierte Sonden bilden,
- iii) gegebenenfalls Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
- iv) Sichtbarmachen von hybridisierten Oligonukleotiden.

12. Verfahren zum Identifizieren eines Mikroorganismus, umfassend das

- a) Vorsehen des Sets von für das gyrB-Gen des Mikroorganismus spezifischen Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
- b) Vorsehen eines Trägers mit immobilisierten Sonden, welche Sonden unter stringenten Bedingungen an die Oligonukleotide hybridisieren können,
- c) Vorsehen einer Probe von Mikroorganismus-DNA oder -RNA, die vorzugsweise mittels PCR, am meisten bevorzugt mittels für das gyrB-Gen spezifischer PCR, amplifiziert wird,
- d) Hybridisieren der Oligonukleotide mit der Probe unter stringenten Bedingungen,
- e) Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
- f) Hybridisieren der Oligonukleotide gegen die Sonden auf dem Träger unter stringenten Bedingungen,
- g) Sichtbarmachen der an die Sonden gebundenen, markierten Oligonukleotide.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden die revers komplementären Sequenzen der Oligonukleotide und vorzugsweise einen Linker zum Binden an den Träger umfassen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger und die immobilisierten Sonden einen Mikroarray bilden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung durch Zugabe von mindestens einem markierten ddNTP, vorzugsweise ddCTP, erfolgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass während einer Hybridisierung kompetitive Oligonukleotide anwesend sind, die sich von den Oligonukleotiden des Sets durch mindestens eine Nichtübereinstimmung, vorzugsweise 1 bis 6 Nichtübereinstimmungen, am meisten bevorzugt 1 bis 3 Nichtübereinstimmungen, unterscheiden.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die kompetitiven Oligonukleotide eine Markierung nicht binden können und vorzugsweise eine 3'-Phosphatmodifikation haben, die mit der Nukleotid-Additionsreaktion unvereinbar ist.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die kompetitiven Oligonukleotide mindesten eine, vorzugsweise mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens sechs, verschiedene Sequenzen ausgewählt aus SEQ ID NOS 72 bis 82 aufweisen.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein Pathogen ist.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Pathogen ausgewählt ist aus *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *A. hydrophila*, *V. cholerae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica* und *C. jejuni*.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte i) bis iv) oder a) bis g) einer ersten Analyse in mindestens einer zweiten Analyse mit einem Set von Oligonukleotiden ohne Oligonukleotide für Mikroorganismen, die in einer früheren Analyse verwendet wurden, wiederholt wer-

007573

- 32 -

den.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 10, vorzugsweise mindestens 30, am meisten bevorzugt mindestens 70, verschiedene Sonden auf dem Träger immobilisiert werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden auf dem Träger (eine) Sequenz(en) ausgewählt aus mindestens einer, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30, verschiedenen Sequenzen aufweisen, die komplementär revers zu SEQ ID NOs 1 bis 71 sind.

NACHGEREICHT

Fig. 1

	SONDE	SEQUENZ	Länge		GC%
			Min	Max	
	Mtrf1				
	Mtrf2				
	Mtr_1683	CGACATGTCGAGACACCAGATAC	18	21	50
	Mtr_1687	ATCTTCGAGACCAGGATGAC	14	24	51
	Mtr_1688	CTTCGAGACACCAGATGACTTC	18	23	51
	Mtr_2112	GATCAGTACGCGGAGGACCC	18	22	51
	Hpy_1616	GATGATGCGGATGATGATG	18	21	48
	Hpy_1647	TTCCTGATGATGATGCGCTGATGATG	18	28	48
	Hpy_1980	GTGATCTGATGATGATGATGATG	18	23	50
	Hpy_2142	GATGATGATGATGATGATGATG	18	21	44
	Prl_1862	TACTATGATGATGATGATG	18	21	33
	Prl_2152	GCGCTGATGATGATGATGATG	17	23	57
	Sal_1451	AGCCATCCCTGCGCCGTC	14	17	64
	Sal_1457	CCCTGGCCCTGCTGTC	12	17	77
	Sal_1950	AGCTCTGATGATGATGATG	12	17	66
	Eco_1402	CAGCCGATGATGATGATGATG	12	17	66
	Eco_1404	GCCTGATGATGATGATGATG	12	17	57
	Eco_1472	GCAGATGATGATGATGATG	12	17	66
	Eco_1521	TACTCTGATGATGATGATG	12	17	48
	Amr_1195	TTCCTGCGATGCGCCGTC	12	16	63
	Amr_1374	GATCAGATGATGATGATGATG	12	16	57
	Amr_1585	GATGATGATGATGATGATGATG	12	16	51
	Amr_1984	GCCTGATGATGATGATGATG	12	16	50
	Cam_1656	TTCCTGATGATGATGATGATG	12	16	66
	Cam_2027	CTTATGATGATGATGATGATG	12	16	58
	Cam_2221	GCCTGATGATGATGATGATG	12	16	58
	Cje_2000	GATCAGATGATGATGATGATG	12	16	58
	Cje_2016	ACTGCTGATGATGATGATGATG	12	16	46
	Yen_1740	AGATGATGATGATGATGATG	12	16	50
	Yen_1215	GATCCTGATGATGATGATGATG	12	16	44
	Yen_1425	GCCTGATGATGATGATGATG	12	16	54
	Yer_1407	TTCCTGATGATGATGATGATG	12	16	43
	Yer_1704	GATCAGATGATGATGATGATG	12	16	44
	Vch_1776	GATCAGATGATGATGATGATG	12	16	50
	Vch_1795	GATCAGATGATGATGATGATG	12	16	57
	Vch_1639	TACTGATGATGATGATGATG	12	16	33
	Vib_1627	TACTGATGATGATGATGATG	12	16	44
<i>Mycobacterium avium</i>			50	101	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	p135a6		30	34	
<i>Helicobacter pylori</i>	p132a34		34	34	
<i>Proteus mirabilis</i>	p132a25		38	38	
<i>Proteus mirabilis</i>					
<i>Proteus mirabilis</i>					
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	p133a18		43	43	
ETEC	p132a22		43	43	
EHEC sh-1	p132a31		43	43	
<i>E. coli</i>	p133a17		43	43	
<i>Escherichia coli</i>			70	30	
<i>Shigella</i> spp	p132a35		43	43	
<i>Shigella sonnei</i>			51	70	
<i>Shigella flexneri</i>			51	70	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	p133a02		76	61	
<i>Campylobacter jejuni</i>	p136a9		61	61	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	p132a36		71	34	
<i>Vibrio cholerae</i>	p133a19		29	27	
Enterobacter cloacae	p133a23		26	53	
<i>Pseudomonas putida</i>	p132a37		42	42	
<i>Serratia marcescens</i>	p133a67		69	43	
OE3b	p133a24		69	43	

NACHGEREICHT

007673

2/3

Fig. 2A

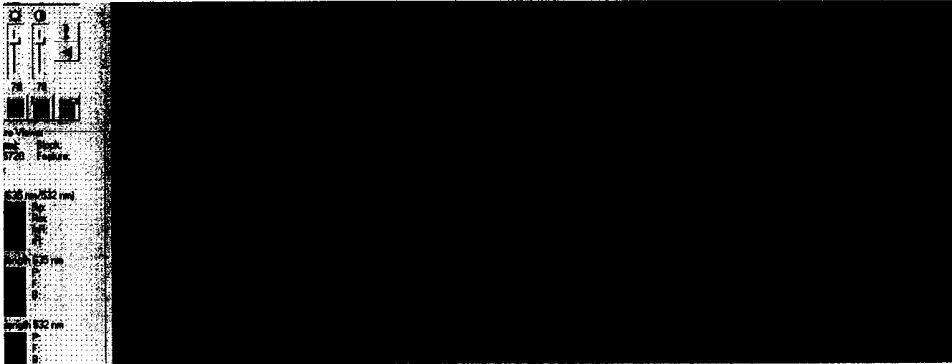


Fig. 2B

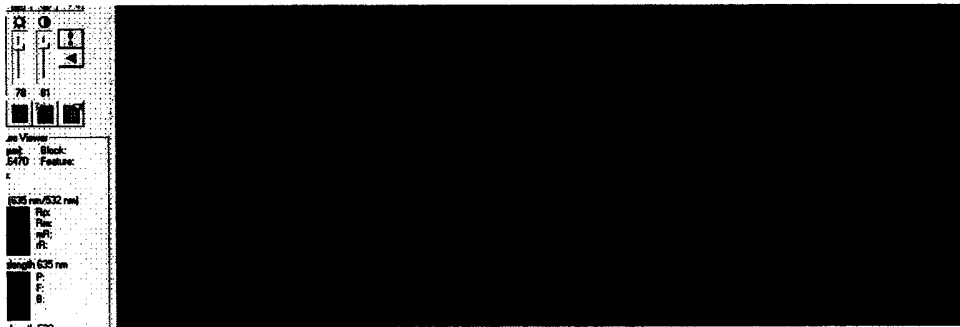
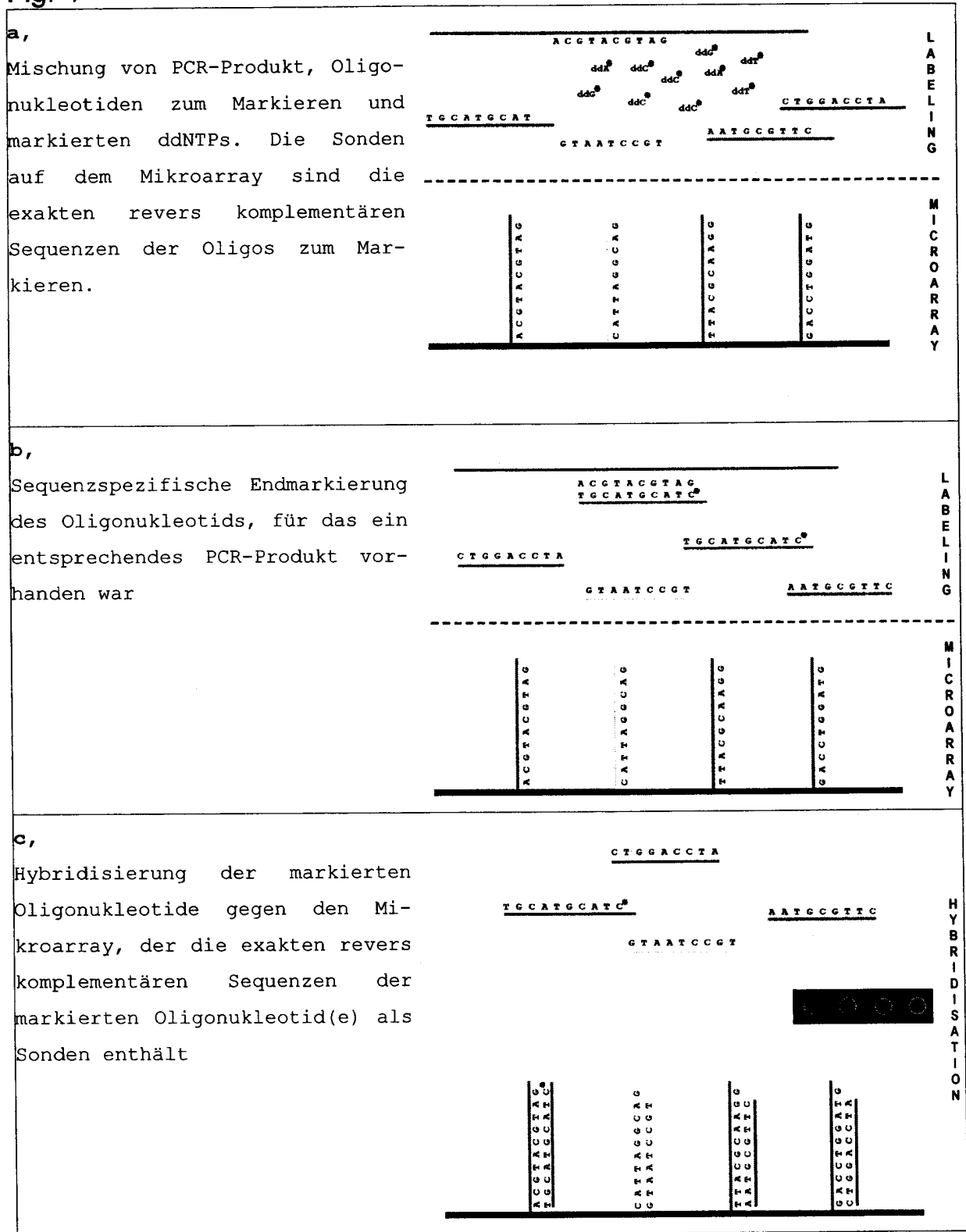


Fig. 3



NACHGEREICHT

Fig. 4



## Patentansprüche:

1. Set von Oligonukleotiden, die spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus sind, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 69, oder ein Fragment einer Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 69 mit mindestens 14 Nukleotiden, mit gegebenenfalls 1 oder 2 Punktmutation(en), sowie komplementäre reverse Sequenzen hierzu, aufweist.
2. Set nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid eine vollständige Sequenz SEQ ID NOs 1 bis 69 aufweist.
3. Set nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Oligonukleotid spezifisch für das gyrB-Gen eines Mikroorganismus ist und das Set Oligonukleotide umfasst, die spezifisch für mindestens zwei Mikroorganismen verschiedener Gattungen sind.
4. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide Sequenzen ausgewählt aus mindestens zwei, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30, verschiedenen Sequenzen SEQ ID NOs 1 bis 69 umfassen.
5. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Set die komplementär reversen Sequenzen umfasst.
6. Set nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide markiert sind.
7. Fester Träger, worin die Oligonukleotide des Sets nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Oligonukleotide, die komplementär revers zu den Oligonukleotiden des Sets nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sind, auf dem festen Träger immobilisiert sind.
8. Fester Träger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass verschiedene Oligonukleotide jeweils an verschiedenen Spots auf dem festen Träger immobilisiert sind.
9. Fester Träger nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Mikroarray ist.

**NACHGEREICHT**

10. Fester Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der feste Träger eine Aldehyd-Oberfläche aufweist.

11. Verfahren zur Identifikation eines Mikroorganismus, umfassend das

- i) Vorsehen von DNA des *gyrB*-Gens des Mikroorganismus,
- ii) Hybridisieren der *gyrB*-DNA mit dem Set nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder dem festen Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 10, worin die Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen immobilisierte Sonden bilden,
- iii) gegebenenfalls Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
- iv) Sichtbarmachen von hybridisierten Oligonukleotiden.

12. Verfahren zum Identifizieren eines Mikroorganismus, umfassend das

- a) Vorsehen des Sets von für das *gyrB*-Gen des Mikroorganismus spezifischen Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
- b) Vorsehen eines Trägers mit immobilisierten Sonden, welche Sonden unter stringenten Bedingungen an die Oligonukleotide hybridisieren können,
- c) Vorsehen einer Probe von Mikroorganismus-DNA oder -RNA, die vorzugsweise mittels PCR, am meisten bevorzugt mittels für das *gyrB*-Gen spezifischer PCR, amplifiziert wird,
- d) Hybridisieren der Oligonukleotide mit der Probe unter stringenten Bedingungen,
- e) Markieren von hybridisierten Oligonukleotiden,
- f) Hybridisieren der Oligonukleotide gegen die Sonden auf dem Träger unter stringenten Bedingungen,
- g) Sichtbarmachen der an die Sonden gebundenen, markierten Oligonukleotide.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden die revers komplementären Sequenzen der Oligonukleotide und vorzugsweise einen Linker zum Binden an den Träger umfassen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch ge-

kennzeichnet, dass der Träger und die immobilisierten Sonden ein Mikroarray ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung durch Zugabe von mindestens einem markierten ddNTP, vorzugsweise ddCTP, erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass während einer Hybridisierung kompetitive Oligonukleotide anwesend sind, die sich von den Oligonukleotiden des Sets durch mindestens eine Nichtübereinstimmung, vorzugsweise 1 bis 6 Nichtübereinstimmungen, am meisten bevorzugt 1 bis 3 Nichtübereinstimmungen, unterscheiden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die kompetitiven Oligonukleotide eine Markierung nicht binden können und vorzugsweise eine 3'-Phosphatmodifikation haben, die mit der Nukleotid-Additionsreaktion unvereinbar ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die kompetitiven Oligonukleotide mindesten eine, vorzugsweise mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens sechs, verschiedene Sequenzen ausgewählt aus SEQ ID NOs 72 bis 82 aufweisen.

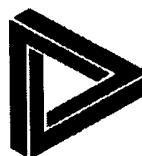
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ausgewählt ist aus *E. coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *A. hydrophila*, *V. cholerae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica* und *C. jejuni*.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte i) bis iv) oder a) bis g) einer ersten Analyse in mindestens einer zweiten Analyse mit einem Set von Oligonukleotiden ohne Oligonukleotide für Mikroorganismen, die in einer früheren Analyse verwendet wurden, wiederholt werden.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 10, vorzugsweise mindestens 30, am

meisten bevorzugt mindestens 70, verschiedene Sonden auf dem Träger immobilisiert werden.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden auf dem Träger (eine) Sequenz(en) ausgewählt aus mindestens einer, bevorzugter mindestens 10, am meisten bevorzugt mindestens 30, verschiedenen Sequenzen aufweisen, die komplementär revers zu SEQ ID NOS 1 bis 69 sind.



Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC<sup>8</sup>:  
**C12Q 1/68 (2006.01)**

Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß ECLA:  
**C12Q1/68B10A, C12Q1/68M10B**

Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):  
**C12Q**

Konsultierte Online-Datenbank:  
**BLASTn, STN-registry, WPI, Fulltext**

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 17. Juli 2006 eingereichten Ansprüchen 1-23 erstellt.

Kategorie <sup>1)</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 2004/046379 A1 (MOBIDIAG OY) 3. Juni 2004 (03.06.2004) <i>das ganze Dokument</i>  ---	1-23

Datum der Beendigung der Recherche:  
29. Jänner 2007

Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):  
Mag. MOSSER

<sup>1)</sup> Kategorien der angeführten Dokumente:

- X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.

- A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert.
- P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.