(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 023 188 A1** 2005.12.08

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2004 023 188.5**
(22) Anmeldetag: **11.05.2004**
(43) Offenlegungstag: **08.12.2005**

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

(71) Anmelder:
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE

(74) Vertreter:
HUBER & SCHÜSSLER, 81825 München

(72) Erfinder:
Blohm, Dietmar, 27711 Osterholz-Scharmbeck, DE; Brandt, Petra, 27570 Bremerhaven, DE; Glöckner, Christiane, 28357 Bremen, DE; Peplies, Jörg, 28207 Bremen, DE; Schmidt, Michael, 28219 Bremen, DE; Wagner-Prigge, Katrin, 20148 Hamburg, DE; Weiß, Stefan, 28213 Bremen, DE; Würdemann, Chris, 28870 Ottersberg, DE

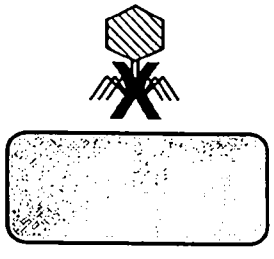
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Blohm, D.H.: Einsatzmöglichkeiten der DNA-Chip Technologie im Milchverarbeitungsprozess. Vortrag auf der "Ideenbörse Forschung - Technologien für die Zukunft" des Milchindustrieverbandes, Fulda (5./6. November 02) (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Glöckner, C.B. & Blohm, D.H.: Vortrag über das Projekt beim Nordmilch-Workshop "Mikrobiologie", 25. Juni 02, Hamburg (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Glöckner, C.B. & Blohm, D.H.: Vortrag "Stand und Perspektiven der Einsatzmöglichkeit von DNA-Mikroarrays im Milchverarbeitungsprozess", Lebensmitteltechnologie, Stuttgart (25.-27. September 03) (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Glöckner, C.B. & Blohm, D.H.: Vortrag bei der action 853 "Agricultural biomarkers for array technology" der Europäischen Union, Working group 4: Applying microarray technology in milk industry, Bremen (24.-26. September 03) (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Glöckner, C.B. u.a.: Analysis of milk products as an example for the applicability of the microarray technology in the food industry. Posterpräsentation auf dem DECHEMA-Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt (24/25. Januar 04) (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Wagner-Prigge, K.: Untersuchungen zur Verwendbarkeit ausgewählter Oligonukleotide als Fängermoleküle auf DNA-Microarrays für den Nachweis von milchrelevanten Bakterien. Diplomarbeit an der Universität Bremen, Fertigstellung im September 02 (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];
Würdemann, C.A.: Die Psoralen-PEO-Biotin Markierung für den Einsatz in der DNA-Mikroarray Technologie, untersucht am Beispiel der Phagenresistenzgene in Milchsäurekulturen. Diplomarbeit an der Universität Bremen, Fertigstellung im Juli 02 (gutachtlich genannt) [rech. am 28.01.05];$

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtung zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie, bei dem eine Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Vielzahl von produktrelevanten Gensequenzen untersucht wird.
Die Untersuchung erfolgt vorzugsweise mittels eines DNA-Arrays, wobei eine Vielzahl von Nukleotidsonden vorgesehen werden, von denen jede für eine bestimmte produktrelevante Gensequenz spezifisch ist.
Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise so ausgestaltet, dass das genomische DNA unmittelbar, d. h. ohne Amplifikation untersucht wird.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Milchveredelung, und dort insbesondere die Qualitätssicherung in Milchveredelungsverfahren. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Untersuchung von Kulturen sowie Vorrichtungen zur Durchführung der genannten Verfahren. Schließlich betrifft die Erfindung Verfahren zur gezielten Auswahl einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen für die Durchführung von Milchveredelungsverfahren.

Stand der Technik

Hintergrund der Erfindung

[0002] In Milchveredelungsverfahren werden die in der Milch enthaltenen Rohstoffe mit Hilfen von Mikroorganismen in Stoffwechselprodukte mit neuem Geschmack oder anderer Konsistenz umgebaut. Das Ausgangsprodukt Milch wird dabei mit Hilfe von Starterkulturen veredelt.

[0003] Die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung von Lebensmittelzusatzstoffen und Lebensmittelinhaltsstoffen definiert eine "Starterkultur" wie folgt: "Starterkulturen sind aufgrund spezifischer Eigenschaften selektierte, definierte und lebensfähige Mikroorganismen in Reinkultur oder Mischkultur. Sie werden Lebensmitteln in der Absicht zugesetzt, das Aussehen, den Geruch und Geschmack und die Haltbarkeit zu verbessern" (Weber, 1996).

[0004] Für die Herstellung von Milchprodukten werden vorrangig Milchsäurebakterien, die den Gattungen Lactobacillus, Lactococcus und Leuconostoc zuzuordnen sind, eingesetzt (Daly et al., 1996). Sie bilden Milchsäure aus Lactose. Durch diese Freisetzung von Lactat und die damit verbundene Ansäuerung der Milch koaguliert das Casein und es kommt am isoelektrischen Punkt des Milchproteins bei einem pH-Wert von 4,7 zur Dicklegung der Milch. Die Milchsäure und andere freigesetzte Komponenten wie Essigsäure, Wasserstoffperoxid, organische Säuren und Bacteriocine wirken antagonistisch auf saprophytische oder pathogene Bakterien und verbessern dadurch die Haltbarkeit des Produkts. Stoffwechselnebenprodukte, wie Diacetyl und Acetaldehyd, die überwiegend aus dem Citratstoffwechsel stammen, sind charakteristische Aroma- und Geschmackskomponenten der verschiedenen Milchprodukte.

[0005] Die Anforderungen an eine industriell einsetzbare Starterkultur gehen mittlerweile weit über die Erhöhung der Haltbarkeit und die Ausbildung produkttypischer Eigenschaften hinaus. Neben der Beeinflussung des Kohlenhydrat- und Citrat-Stoffwechsels, der Proteolyse und der Produktion von Exopolysacchariden und Bacteriocinen steht die Resistenz gegenüber Bakteriophagen an oberster Stelle (Daly et al., 1996; McKay und Baldwin, 1990).

[0006] Die Gewährleistung mikrobiologischer Qualität und hygienischer Sicherheit liegt im Interesse der Lebensmittelindustrie, da die Vernichtung des Produktes oder eine Rückrufaktion zu erheblichen finanziellen Verlusten und zu großem Imageschaden führen. Eine schnelle und zuverlässige Überwachung der am Produktionsprozeß beteiligten Organismen und ihrer Eigenschaften bildet dafür die Grundvoraussetzung. In der Produktionsroutine milchverarbeitender Betriebe wird dabei zumeist noch auf die Methoden der klassischen Mikrobiologie zurückgegriffen. Die Organismenidentifizierung erfolgt nach zum Teil mehrtägiger Kultivierung auf Differenzierungsmedien. Die Charakterisierung von produktbestimmenden Eigenschaften basiert, sofern sie überhaupt durchgeführt wird, auf zeitaufwendigen physiologischen Tests.

[0007] In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Identifizierung von Genen und Genomen erreicht. Neben zahlreichen Sequenzen für Eukaryoten, Archaea und Viren stehen derzeit 142 vollständige Sequenzen von Bakteriengenomen zur Verfügung (http://www.genomesonline.org/index.cgi?want=Published+Complete+Genomes, Stand April 2004). Darunter befinden sich die Sequenz des Milchsäurebakteriums L. lactis ssp. lactis IL1403 und die Genomsequenzen von Bakterien, die als Schadflora in Milchprodukten vorkommen, wie z.B. Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus ssp. aureus MW2 oder 2 Vertreter der Gattung Salmonella (Baba et al., 2002; Bolotin et al., 2001; Glaser et al., 2001; McClelland et al., 2001).

[0008] Derzeit sind in Datenbanken mehr als 25.000 16S rRNA-Sequenzen verfügbar (ARB, 2002: http://www. arb-home.de). Das bedeutet, dass die 16S rRNA von mehr als 70% der gültig beschriebenen Bakterienarten zur Organismenidentifizierung zur Verfügung steht (Glöckner, 1998). Ribosomale Nukleinsäuren bieten verschiedene für phylogenetische Marker unabdingbare Vorteile. Sie sind ubiquitär verbreitet, als Bestandteil des Translationsapparates weisen sie funktionelle Konstanz auf, und sie besitzen unterschiedlich

stark konservierte Sequenzabschnitte.

[0009] In den letzten Jahren wurden diverse auf vergleichender rDNA-Analyse beruhende Methoden zur Organismenidentifizierung etabliert.

[0010] Die in situ-Hybridisierung mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-Sonden (FISH) bietet die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Bakterienspezies während des gesamten Fermentationsprozesses zu überwachen. Diese kultivierungsunabhängige Methode erlaubt die in situ-Identifizierung mikrobieller Zellen in ihrem natürlichen Umfeld unter Vermeidung methodisch bedingter Populationsverschiebungen (Amann et al., 1997). Der gleichzeitige Einsatz mehrerer, mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markierter Sonden ermöglicht die simultane Identifizierung verschiedener Mikroorganismen in einer Fermentationsprobe.

[0011] Die Identifizierung der an der Fermentation beteiligten Bakterienspezies ist nur ein Teilaspekt der umfangreichen Bemühungen, die Herstellung von fermentierten Milchprodukten zu überwachen und zu verbessern. So hat sich z.B. die Suche nach neuen geeigneten Starterkulturstämmen dadurch erheblich verstärkt. Oft stammen diese neuen Isolate aus Milchprodukten, die noch nicht mit kommerziellen Starterkulturen hergestellt wurden (Cogan et al., 1997). Neben guten Säuerungs- und Geschmackseigenschaften müssen sie hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Bakteriophagen, ihres Kohlenhydrat- und Citratstoffwechsels, ihrer Bacteriocinproduktion und ihrer Proteolyseeigenschaften gut charakterisiert sein (Davidson und Hillier, 1995). Die Bestimmung dieser Eigenschaften erfolgt meist durch kosten- und arbeitsintensive Assays bei denen phänotypische Charakteristika getestet werden.

[0012] Seit etwa 10 Jahren werden zur Erforschung und Entwicklung neuer Starterkulturen DNA-analytische Methoden eingesetzt, deren Ziel die genetische Charakterisierung von Starterkulturstämmen ist. Soll ein Bakterienstamm bestimmte genetisch manifestierte Eigenschaften aufweisen, reichen herkömmliche Methoden nicht aus. Der gezielte Nachweis eines Genes erfolgt in den meisten Fällen durch PCR mit spezifischen Primern.

[0013] Die hohe autolytische Aktivität mancher Lactococcus-Stämme ist für ihren Einsatz als Starterbakterien bei der Herstellung von Käse unerläßlich. Garde et al. entwickelten ein Nachweissytem für das acmA-Gen, das für das Enzym N-Acetylmuramidase codiert und durch Hydrolyse der Peptidoglykanschicht Peptidasen freisetzt (Garde et al., 1999). Diese tragen wiederum zur Reifung und Geschmacksbildung des Käses bei. Wichtige Eigenschaften wie die Aufnahme von Citrat, die Proteolyseaktivität und die Produktion der Bacteriocine Nisin A oder Z wurden durch die PCR-Amplifikation der Gene citP, prtP und nisA und nisZ nachgewiesen (Klijn et al., 1995). Zur Identifizierung von Bacteriocin-produzierenden Milchsäurebakterien etablierten Rodriguez et al. ein PCR-basiertes Nachweissystem für Nisin und Lacticin 481 aus L. lactis und Enterocin AS-48 aus Enterococcus (Rodriguez et al., 2000). Die Anwesenheit einiger Lactococcus-Phagen-Spezies in Referenzproben konnte ebenfalls durch PCR nachgewiesen werden (Labrie und Moineau, 2000).

[0014] Die genannten Screening-Verfahren beleuchten einzelne Teilaspekte der Gesamtanforderung an einen Starterkulturstamm und können als Grundlage für die molekularbiologische Stammtypisierung des weit verbreiteten Starterkulturstamms Lactococcus lactis dienen. Mit Hilfe biotechnologischer Methoden sollte es daher möglich sein, neue Stämme zu identifizieren, die den hohen Anforderungen der Milchindustrie gerecht werden (Konings et al., 2000).

[0015] Die Fortschritte bei der Entwicklung der DNA-Chip-Technologie und der Erforschung von Genen und Genomen bietet die Möglichkeit, die Errungenschaften dieser beiden Bereiche zu einem Ansatz der vergleichenden Genotypisierung zu verknüpfen (Harrington et al., 2000; Landers, 1999; Lee und Lee, 2000). DNA-Mikroarrays können dazu benutzt werden, Tausende DNA-Sequenzen gleichzeitig in Genexpressionsstudien, vergleichenden Genomanalysen oder dem gezielten Nachweis bestimmter Gene zu analysieren (Case-Green et al., 1998; Ferea und Brown, 1999). Generell stehen verschiedene Mikroarray-Typen zu Verfügung. Mehrere hundert Basenpaar lange Sequenzen, meist ganze Gene, können als Sonde auf der Chip-Oberfläche fungieren (de Risi et al., 1997). Wird z.B. cDNA aus Kontroll- und Test-Organismen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, lassen die Hybridisierungssignale Aussagen über unterschiedlich exprimierte Gene zu (Duggan et al., 1999). Sollen Oligonukleotide als Sonden auf dem DNA-Chip eingesetzt werden, können diese entweder durch photolithographische Prozesse auf der Oberfläche synthetisiert werden oder als fertige Oligonukleotide an die Oberfläche gekoppelt werden (Chee et al., 1996). Ein Vorteil der Oligonukleotid-Arrays besteht darin, dass durch die kurzen Sondensequenzen Kreuzhybridisierungen mit ähnlichen Genen vermieden werden.

[0016] Bisher gibt es nur wenige Beispiele für die Anwendung der Mikroarray-Technologie in der Bakterienanalytik. De Saizieu et al. konnten zeigen, dass bei der Hybridisierung von Gesamt- RNA verschiedener Zellen Unterschiede in der Genexpression zu erkennen sind (de Saizieu et al., 1998). Dieser Ansatz wurde für den Expressionsvergleich von 4.290 E. coli-Genen genutzt, bei dem die Zellen entweder auf Minimal- oder auf Vollmedium gewachsen waren (Tao et al., 1999). Nach der Aufklärung des Genoms von Mycobacterium tuberculosis wurden 97% der identifizierten ORFs als Sonden für die Mikroarray-Analyse eingesetzt und die Genexpression nach Einsatz des Tuberkulose-Hemmstoffes Isoniazid untersucht (Wilson et al., 1999).

[0017] Seit einigen Jahren bietet die Firma Genescan den ersten kommerziell erhältlichen DNA-Array zur Identifizierung der Krankheitserreger Listeria monocytogenes, Campylobacter jejunii und Salmonella ssp. in Lebensmitteln an. Dieser "Nutri-Chip" nutzt allerdings das Analysepotential, das die Mikroarray-Technologie bietet, bei weitem nicht aus.

[0018] In Milchveredelungsverfahren kommt es häufig zu Fehlfermentationen. Diese können verschiedene Ursachen haben. 70-80% aller Produktionsstörungen werden durch Phagen verursacht (Hunger, 1986), die durch die Milch, unzureichend desinfizierte Fermenter oder durch das semisterile Molkereiumfeld in die Produktionstanks gelangen (Riemelt et al., 1996). Die anschließende Lyse der Starterkulturspezies führt zu Säuerungsstörungen (Klaenhammer und Fitzgerald, 1994). Aber auch bakterielle Verunreinigungen können die in der Starterkultur enthaltenen Mikroorganismen verdrängen. Dadurch wird die Milch nicht mehr zum gewünschten sondern zu einem minderwertigen Produkt umgesetzt. Außerdem können Enzyme für produkt-typische Eigenschaften, die bei der Gattung Lactococcus häufig Plasmid-codiert sind, bei Verlust der extrachromosomalen DNA nicht mehr exprimiert werden. Eigenschaften wie Phagenresistenzen, Citratstoffwechsel oder die Bildung von Geschmacksstoffen können auf diese Weise verloren gehen.

[0019] Speisequark und andere Milchprodukte sind aufgrund ihres hohen Wasser- und Nährstoffgehalts sowie ihrer Kontaminationsanfälligkeit ein leicht verderbliches Produkt. Obwohl die Anzahl der mikrobiologischen Lebensmittelvergiftungen in den letzten Jahren ständig zugenommen hat, sind Aussagen über das tatsächliche Auftreten bestimmter mikrobieller Lebensmittelvergifter nur bedingt möglich. Zum einen ist der Anstieg auf bessere mikrobiologische Nachweisverfahren und eine verschärfte Meldepflicht zurückzuführen, andererseits werden von der Statistik nur Lebensmittelvergiftungen erfasst, bei der eine größere Anzahl von Personen erkrankt. Routinemäßig durchgeführte Laboruntersuchungen schließen auch nicht alle potentiell pathogenen Mikroorganismen ein, da nur wenige Erreger nach dem Bundesseuchengesetz meldepflichtig sind. Darüber hinaus sucht nur ein Teil der Erkrankten den Arzt auf und nur selten werden dann die Ursachen der Erkrankung erforscht. Die meisten Lebensmittelvergiftungen, die nach dem Verzehr von Milch und Milchprodukten auftreten, sind auf Bakterienarten wie Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Campylobacter, enterotoxisches Escherichia coli (ETEC), Yersinia enterocolitica oder Staphylococcus aureus zurückzuführen (Krämer, 1997).

[0020] Neben coliformen Bakterien gehören aber auch Enterokokken, Bacillus cereus, B. sphaericus, Clostridien und Mikrokokken zur thermoresistenten Restflora des Speisequarks (Zickrick, 1996). Enterokokken und zahlreiche Clostridien bilden in der Milch durch Decarboxylierung von Aminosäuren sogenannte biogene Amine wie z.B. das Tyramin, das für den Menschen toxisch sein kann (Krämer, 1997). Nach Brechdurchfällen wurden häufig Bacillus-Arten (>105/g) aus eiweißreichen Milchprodukten isoliert. Für den Nachweis des krankmachenden Enterotoxins stehen noch keine für die Laborroutine geeigneten Methoden zur Verfügung (Krämer, 1997; Beck, 2002).

[0021] Typisch für die Gattung Lactococcus ist die ungewöhnlich hohe Zahl von Plasmiden. Die Größe dieser extrachromosomalen DNA-Fragmente reicht von 2 bis über 100 kb. (Teuber et al., 1993). Die Anzahl der verschiedenen aus Einzelisolaten von Starterkulturen identifizierten Plasmide variiert zwischen einem und 12 DNA-Elementen (Andresen et al., 1984; Davies et al., 1981). Plasmid-freie Stämme erhält man lediglich durch "Plasmid curing" mit Akridin- oder Ethidiumbromid-haltigen Lösungen und durch Wachstum bei erhöhten Temperaturen (Pechmann und Teuber, 1980). Durch diese Behandlung bzw. den anschließenden Transfer bestimmter Plasmide konnte ein Zusammenhang zwischen wichtigen Stoffwechseleigenschaften wie Lactose-Verwertung bzw. Proteinase-Aktivität und den jeweiligen Plasmiden gezeigt werden (Kuhl und McKay, 1979). Weitere Plasmid-codierte Eigenschaften sind Phagenresistenz, Citratfermentation, Bakteriozin-Produktion und der Transport bzw. Metabolismus von Zuckern. Um auf die ständige Bedrohung durch Bakteriophagen schnell und flexibel reagieren zu können, müssen in der Starterkultur verschiedene Verteidigungsmechanismen vorhanden sein (Forde und Fitzgerald, 1999b). Abhängig davon, in welcher Infektionsphase die Abwehr erfolgt, werden die Phagenresistenzgene in die vier Gruppen A, B, C, und D unterteilt (Allison und Klaenhammer, 1998; Garvey et al., 1995b; Hill, 1993):

A Verhinderung der Phagenadsorption
B Blockierung der DNA-Penetration
C Restriktion der Phagen-DNA
D Abortive Phageninfektion – Inhibition des Phagenzusammenbaus.

[0022] Die beiden ersten Mechanismen verhindern ein Eindringen der Phagen-DNA in das Bakterium, indem sie entweder die Adsorption des Phagen an die Bakterienhülle oder die Injektion der DNA unterbinden. Phagenresistenzen, bei denen keine Adsorption stattfindet, basieren vermutlich auf der Produktion von extrazellulären Polymeren wie z.B. Polysacchariden, die den Phagenrezeptor blockieren, oder auf Mutationen im Phagenrezeptor (Forde und Fitzgerald, 1999a).

[0023] Beim Resistenzmechanismus, der die Injektion der Phagen- DNA verhindert konnte nachgewiesen werden, dass sich der Phage zwar an die Zelle anheften, diese aber nicht penetrieren kann (Garvey et al., 1996). Die auf Restriktion und Modifikation basierende Abwehr wirkt nicht gezielt gegen Phagen-DNA, sondern erkennt Fremd-DNA aufgrund von Basen-Methylierungen, die nicht dem für die Bakterienzelle typischen Muster entsprechen. Die zellfremde DNA wird geschnitten und abgebaut. Restriktions-/Modifikationssyteme (R/M-Systeme) werden aufgrund der Struktur ihrer Untereinheiten, der Sequenzerkennung, der Position der Schnittstelle und des Bedarfs an Cofaktoren in 3 Typen eingeteilt.

[0024] Am weitesten verbreitet sind Typ II R/M-Systeme, von denen bei der Gattung Lactococcus bisher 8 verschiedene identifiziert werden konnten. Die Enzyme bestehen aus zwei getrennten Untereinheiten, von denen eine für die Modifikation des bei der semikonservativen Replikation neu synthetisierten DNA-Stranges verantwortlich ist. Die andere Untereinheit erkennt palindromische Sequenzen von 4 bis 8 by Länge und schneidet die DNA innerhalb dieser Sequenz, wenn keine korrekte Methylierung vorliegt. Die Enzyme LlaII, LlaAI und LlaKR2I erkennen die Schnittstelle 5'-↓GATC-3' und schneiden die Sequenz in Abhängigkeit von ihrer Methylierung am Adenin (2 m6A) bzw. Cytosin (m5C). Eine Besonderheit stellt das Enzym LlaI dar, dessen Sequenz von dem konjugativen Plasmid pTR2030 kodiert wird. Bei diesem, Typ IIs genannten R/M-System liegt die Schnittstelle außerhalb der Erkennungssequenz (O'Sullivan et al., 1995).

[0025] Typ III R/M-Systeme bestehen aus 2 Untereinheiten, die gemeinsam ein Holoenzym mit Restriktions- und Modifikationsfunktion bilden. Das Enzym erkennt asymmetrische Sequenzen und schneidet die DNA in einem definierten Abstand von 25 bis 27 bp zur Erkennungssequenz.

[0026] Das Typ I R/M-System, von dem bisher zwei Beispiele aus Lactococcus bekannt sind, stellt den komplexesten Typ dar (Deng et al., 1999; Schouler et al., 1998a). Es besteht aus 3 Untereinheiten, genannt "host specificity determinants" (Hsd), die zusammen ein Holoenzym bilden. Die HsdS-Untereinheit bestimmt die Nukleotid-Spezifität. Die zweite Komponente, HsdM dient der Modifikation. Die ATP-abhängige Restriktion, die von der dritten Untereinheit HsdR bewerkstelligt wird, kann mehr als 1 kb von der Erkennungssequenz entfernt stattfinden (Yuan, 1981).

[0027] Viele dieser Abwehrmechanismen sind Plasmid-codiert. Meist liegen die Untereinheiten auf einem Plasmid nebeneinander. Die Enzyme sind aber auch funktionsfähig, wenn die Nukleotidsequenzen der Komponenten auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert sind (Schouler et al., 1998b).

[0028] Die vierte Gruppe der Phagenresistenzgene wird unter dem Begriff "Abortive Infection", kurz abi zusammengefaßt. Darin sind Mechanismen enthalten, die wichtige Schritte bei der Replikation, der Transkription oder der Translation der Phagen-DNA bzw. RNA stören.

[0029] Abi-ähnliche Mechanismen sind bei verschiedenen Bakterienspezies beschrieben worden, ihre Funktionsweise wurde aber hauptsächlich in E. coli untersucht. Modelle für die Wirkungsweise wurden für drei Resistenzmechanismen erstellt: Rex, Lit und PrrC (Snyder, 1995). RexA und RexB fungieren als "Sensor-Aktivator"- und "Response-Regulator"-Paar. Als Antwort auf die Phageninfektion aktiviert RexA das RexB-Protein und ein Ionenkanal, der das Membranpotential zerstört, bildet sich aus (Parma et al., 1992). Die anderen beiden Mechanismen blockieren die Translation, indem sie entweder auf den Elongationsfaktor EF-Tu oder auf die tRNALys wirken. Durch die Protease-Aktivität von Lit wird EF-Tu degradiert (Kao und Snyder, 1988). Nach T4-Infektion schneidet die Ribonuklease PrrC die tRNALys (Levitz et al., 1990).

[0030] Der genaue Wirkmechanismus der abi-Gene von Lactococcus ist nur selten bekannt. Am Beispiel von AbiA konnte gezeigt werden, dass es die Replikation von kleinen isometrischen Phagen beeinflußt (Dinsmore und Klaenhammer, 1994; Moineau et al., 1993a). Parreira et al. zeigten, dass AbiB die Degradation der Pha-

gen-mRNA fördert (Parreira et al., 1996a). Ein Produkt der frühen Phagengene könnte die RNase-Aktivität in abiB+-Zellen erhöhen. AbiC verhindert nicht die Replikation der Phagen-DNA, sondern reduziert die Synthese der Strukturproteine des Phagen (Durmaz et al., 1992). Am Beispiel des Phagen bIL66 konnte gezeigt werden, dass AbiD1 in Wechselwirkung mit dem Produkt des Gens orf1 tritt. Dadurch wird die Translation des orf3 verhindert und die Vermehrung des Phagen unterbunden (Bidnenko et al., 1995). Während in Zellen, die abiF exprimieren, keine Replikation der Phagen-DNA auftritt, greift das AbiE Protein erst in der späten Phase des lytischen Zyklus in die Phagenreifung ein (Garvey et al., 1995a). Gleiches gilt auch für AbiG, bei dem die Phagen-DNA ungehindert repliziert wird. Der phagenresistente Phänotyp äußert sich erst in der späten lytischen Phase, in der die Synthese der Phagen-RNA gestört wird (O'Connor et al., 1999). In welchem Stadium AbiK bei der Reifung der Phagen interveniert, hängt vom Phagen selbst ab. Während bei der Infektion des zur P335-Spezies gehörenden Phagen ul36 keine Replikation mehr stattfindet (Emond et al., 1997), wurde bei den zur 936-Spezies gehörenden Phagen p2 und P008 die Reifung der konkatemeren Phagen-DNA verhindert (Boucher et al., 2000). AbiL beeinflußt die Reifung des Phagen in der posttranslationalen Phase des lytischen Zyklus (Deng et al., 1999). Das in AbiM gefundene "Helix-Turn-Helix"-Motiv, das für DNA-bindende Proteine charakteristisch ist, deutet auf eine Interaktion mit der Phagen-DNA hin (Deng et al., 1997). Ebenso wie bei AbiK findet in durch AbiQ geschützten Bakterienzellen keine Reifung der konkatemeren Phagen-DNA mehr statt (Emond et al., 1998) und AbiR stört die Replikation von Phagen-DNA der Spezies c2 (Twomey et al., 2000).

[0031] Die durch abi-Gene vermittelte Resistenz beschränkt sich nicht nur auf einzelne Phagen, sondern gilt, soweit getestet, für mehrere Phagen der gleichen Spezies. Darüber hinaus wirkt die Phagenresistenz bei den meisten Mechanismen sogar auf Phagen mit verschiedener Spezieszugehörigkeit. Das einzig erkennbare Charakteristikum, das alle abi-Gene gemeinsam haben, ist ihr im Vergleich zur Lactococcus-DNA signifikant niedrigerer G+C-Gehalt (Twomey et al., 2000). Die einzelnen Gene weisen nur wenig Sequenzähnlichkeiten auf. Lediglich abiF zeigt 26% Sequenzhomologie zu abiD bzw. 46% zu abiD1 (Rince et al., 2000). Während die meisten Resistenzmechanismen des "abi"-Typs auf nur einem Genort basieren, sind im Fall von abiE, abiG, abiL und abiR zwei ORFs für die Expression des phagenresistenten Phänotyps nötig.

[0032] Um sich effektiv gegen Phagen schützen zu können, enthalten natürliche Isolate der Gattung Lactococcus mehrere Phagenresistenzmechanismen. Im Stamm L. l. ssp. lactis ME2 konnte z.B. ein Gen für die Adsorptionsresistenz, 2 R/M-Systeme und die Gene für abiA und abiC identifiziert werden (Durmaz et al., 1992). Auf dem Plasmid pKR223 befindet sich sowohl ein Gen für die Restriktion- und Modifikation von Fremd-DNA (IlaKR2I) als auch der abiR-Mechanismus (Twomey et al., 2000). Werden natürliche "Abi"-Mechanismen in phagensensitive L. lactis Stämme eingeführt, lassen sich diese Stämme erfolgreich zur industriellen Milchfermentation einsetzen (Sanders et al., 1986). Der extensive Einsatz dieser Stämme mit verbesserter Phagenresistenz führte allerdings zu neuen Phagenmutanten, die in der Lage sind das Abwehrsystem zu überwinden (Alatossava und Klaenhammer, 1991).

[0033] Um Milchfermentationen langfristig vor Phagen zu schützen, müssen Starterkulturen über ein breites Spektrum von Phagenresistenzgenen verfügen. Dabei sollte nicht nur ein Vertreter der 4 verschiedenen Abwehrmechanismen vorhanden sein. Durch Kombination der Resistenzgene mit unterschiedlicher Phagenspezifität kann eine leistungsfähige Verteidigungsstrategie verfolgt werden.

[0034] Eine erfolgreiche Fermentation erfordert neben der Phagenabwehr auch die Ausbildung von produkttypischen Eigenschaften wie Aroma und Geschmack. Die dafür nötigen Inhaltsstoffe wie Diacetyl, Acetat, Ethanol, Formiat, Acetoin und 2,3-Butandiol entstammen dem Lactose- Metabolismus und der Citratfermentation von L. l. ssp. lactis biovar. diacetylactis und Leuconostoc mesenteroides (Ramos et al., 1994). Milchsäurebakterien benötigen drei Enzyme, um das Citrat der Milch zu Pyruvat umzusetzen. Die Citrat-Permease (CitP) importiert das Citrat in die Zelle, die Citrat-Lyase (CL, EC 4.1.3.6) setzt es zu Acetat und Oxalacetat um und die Oxalacetat-Decarboxylase katalysiert den Abbau zu Pyruvat und CO_2 (Bekal-si Ali et al., 1999). Benson et al. konnten die ilvBN-Gene für das Enzym α-Acetolactat-Synthase (ALS, EC 4.1.3.18) in L. lactis identifizieren, das Pyruvat zu α-Acetolactat umsetzt (Benson et al., 1996). Dieses instabile Zwischenprodukt zerfällt entweder durch oxidative Decarboxylierung zu Diacetyl oder wird von der α-Acetolactat- Decarboxylase (ALD, EC 4.1.1.5) zu Acetoin umgesetzt (Hugenholtz, 1993). In allen bisher untersuchten Citratverstoffwechselnden Lactococcus-Stämmen war die genetische Information für die Aufnahme des Citrats an ein Plasmid gebunden (Kempler und MacKay, 1979). Ohne das citP-Gen findet kein Citrat-Transport statt (Magni et al., 1994). Für das Enzym Citrat-Lyase liegen keine Sequenzinformationen aus L. l. spp. lactis biovar. diacetylactis bzw. Leuc. mesenteroides vor. Durch Charakterisierung des Citratclusters citMCDEFGRP des phylogenetisch nah verwandten Bakterienstamm Leuc. paramesenteroides konnte jedoch gezeigt werden, dass die darin enthaltenen Enzyme Citrat-Permease und Citrat-Lyase durch ein Plasmid codiert werden (Martin et al., 1999).

[0035] Phagenbefall kann die Ursache für Fehlfermentationen in Milchprodukten sein (Whitehead und Cox, 1935). Als Infektionsursachen kommen dabei auch heute noch unzureichende Milcherhitzung bzw. Desinfektion der Fermenter oder der Eintrag der Phagen über die Luft in die meist noch offenen Kulturtanks in Frage (Riemelt et al., 1996). Zudem finden Milchfermentationen im großindustriellen Maßstab in 50.000 l Tanks statt, die aus wirtschaftlichen Gründen zum Teil mehrmals am Tag befüllt werden (Daly, 1983). Nicht selten erfolgt eine Anreicherung der Phagen im Großfermenter, die schließlich zur Lyse der Starterkultur und zum Ausfall der Säuerungsaktivität führen.

[0036] Die Klassifizierung von Lactococcus-Phagen in 12 Spezies erfolgt auf der Basis von Morphologie und DNA-Homologie und umfaßt sowohl lytische als auch lysogene Vertreter (Jarvis et al., 1991). Diese Taxonomie wurde später auf 10 Spezies reduziert (Jarvis et al., 1995; Moineau et al., 1995a). Die Größe der linearen Phagengenome mit kohesiven Enden beträgt zwischen 18 und 54 kb (Braun et al., 1989). Weltweite Studien haben gezeigt, dass Störungen bei industriellen Milchfermentationen hauptsächlich auf Mitglieder der Spezies 936, P335 und c2 zurückzuführen sind (Jarvis et al., 1991; Moineau et al., 1996; Moineau et al., 1992). Bei den Spezies 936 und c2 sind ausschließlich virulente Vertreter bekannt. Bei der Spezies P335 wurden sowohl lytische als auch lysogene Phagen identifiziert (Chopin et al., 2001). Alle drei der genetisch nicht miteinander verwandten Gruppen besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom und lange, nicht-kontraktile Schwänze. Folglich gehören sie zur Familie der Siphoviridae. Die Phagen des Morphotyps B1, zu dem die Spezies 936, P335 und BK5-T gehören, haben kleine isometrische Köpfe und besitzen morphologische Ähnlichkeit zum Phagen λ aus E. coli und SPP1 aus B. subtilis (Emond et al., 1998). Die unter Bakteriophagen einzigartige Spezies c2 hat prolate Köpfe und gehört dem Morphotyp B2 an. Das Taxon c2 ist die einzige Gruppe der Lactococcus-Phagen, die vom "International Committee on Taxonomy of Viruses" als eigener Genus eingestuft wurde (Pringle, 1996).

[0037] In den Datenbanken sind zwar zahlreiche Teilsequenzen der oben aufgeführten Phagen hinterlegt, vollständige Sequenzen der Spezies 936 liegen jedoch nur für die Phagen sk1 (Chandry et al., 1994b) und bIL170 (Crutz-Le Coq et al., 2002) vor. Für sk1 wurden 54, für bIL170 63 ORFs identifiziert. Nach der Infektion von L. lactis durch sk1 lassen sich drei verschiedene Phasen der DNA-Transkription, eine frühe, eine mittlere und eine späte, unterscheiden (Beresford et al., 1993; Chandry et al., 1994a). Als Vertreter der P335 Spezies wurden r1t, bIL285, bIL286, bIL309, ul36, TP901-1, Tuc2009 und 4268 sequenziert (Brondsted et al., 2001; Chopin et al., 2001; Labrie und Moineau, 2002; van Sinderen et al., 1996). Bei der c2-Spezies liegt das komplette Genom der Phagen bIL67 und c2 vor (Lubbers et al., 1995; Schouler et al., 1994). Die Genome enthalten 39 bzw. 37 ORFs und zeigen auf Nukleinsäureebene 80% Identität, die vor allem durch Deletionen oder Insertionen unterbrochen wird. Das führt zum Verlust oder Erwerb der für den jeweiligen Phagen typischen ORFs.

[0038] Um einem Ausfall der Säuerungsaktivität durch Phagen vorzubeugen, wurden umfangreiche Hygiene-Konzepte erarbeitet, die unter dem Stichwort "Hazard Analysis of Critical Control Points" (HACCP) zusammengefaßt werden (Ropkins und Beck, 2000). Zu den Grundsätzen eines "Good Manufacturing Practice" (GMP) gehört die räumliche Trennung von Säurewecker- und Produktionsbereichen ebenso wie die Konstruktion der Produktionsanlage unter dem Gesichtspunkt einer vereinfachten Säuberung (Coffey et al., 2001). Die Gefahr von Phagenkontaminationen kann verringert werden, wenn alle Geräte täglich mit Phageninaktivierenden Chemikalien wie Chlor und Peressigsäure gereinigt werden (Lembke und Teuber, 1981) und die Anzucht von Vorkulturen bzw. die Fermentationen zur Herstellung von Starterkulturen in Phagen-inhibierenden Medien stattfindet (Sandine, 1977). Sie enthalten Phosphat und/oder Citrat, das in der Lage ist, die für die lytische Phagenentwicklung essentiellen zweiwertigen Ionen, hauptsächlich Ca^{2+}, zu binden (Potter und Nelson, 1952). Außerdem kann durch Rotation von Starterkulturen mit unterschiedlichen Phagenspektren dem vermehrten Auftreten hochinfektiöser Phagenspezies vorgebeugt werden (Durmaz und Klaenhammer, 1995; Huggins, 1984). Ein kontinuierliches Monitoring der in der Produktion auftretenden Phagen könnte aufzeigen, wann ein schneller Wechsel der bedrohten Starterkultur erforderlich wird (Hull, 1977). Da diese Maßnahmen aber kostenträchtig sind, fordert die Industrie die Neu-Etablierung von Starterkulturen mit breitem Phagenresistenzspektrum.

[0039] Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle diese erwähnten Details nur mit zeitaufwändigen Verfahren analysierbar sind, die erst am fertigen Produkt oder nach Produktionsende an Rückstellmustern, nicht aber produktionsintegriert durchführbar sind. Wünschenswert aber ist eine Analytik der beschriebenen Vorgänge, die bereits während der Laufzeit der Vor-Fermenter zu Ergebnissen führt, so dass der Fermentationsverlauf im Großfermenter bereits vor dessen Start abgeschätzt werden kann.

Aufgabenstellung

[0040] Demgemäß besteht die Aufgabe darin, ein Verfahren zur Qualitätssicherung in Milchveredelungsverfahren bereit zu stellen, das produktionsintegriert, kostengünstig und rasch durchführbar ist. Ein solches Ver-

fahren sollte es ermöglichen, die Anzahl von Fehlfermentationen in Milchveredelungsverfahren zu verringern. Ein solches Verfahren sollte es ferner ermöglichen, eine möglichst gleichbleibende Qualität der Produkte zu gewährleisten, und im Hinblick auf die Qualitätssicherung geeignete Starterkulturen auszuwählen.

Lösung

[0041] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie, bei dem eine Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Vielzahl von produktrelevanten Gensequenzen untersucht wird, und bei dem:

- die Probe aufbereitet wird,
- eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für eine bestimmte produktrelevante Gensequenz spezifisch ist,
- die Nukleotidsonden mit der aufbereiteten Probe unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden, und
- daraus resultierende Hybridisierungsprodukte detektiert werden.

[0042] Produktrelevante Gene im Sinne der Erfindung sind:

- Gene, die es der Zelle ermöglichen mehr als nur primäre Zellfunktionen auszubilden, also nicht zwingend für das Überleben erforderlich sind,
- Gene, die der Zelle zusätzliche Vorteile bringen, wie z.B. Verteidigung gegenüber Phagen, Bildung von Bakteriozinen, Verwertung von weiteren Substanzen zur Gewinnung von Energie und Kohlenstoffäquivalenten. Als Nebeneffekt dieser alternativen "Verwertungsstrategien" der Zelle entsteht eine andere Zusammensetzung von Stoffwechselendprodukten, die der Konsument beispielsweise in Form von Änderungen des Geschmacks, des Geruchs oder der Konsistenz wahrnimmt,
- Gene, die eine zusätzliche gesundheitsfördernde Wirkung hervorrufen, wie z.B. eine vermehrte Bildung von konjugierten Linolsäureisomeren, φ-3-Fettsäuren und ACE-inhibitorischen und immunmodulatorischen Peptiden bzw. die Senkung des Gehalts von Cholesterin, Trans-Fettsäuren oder biogenen Aminen. Von biotechnologischem Interesse wäre auch eine vermehrte Bildung von Transglutaminasen und Tyrosinasen,
- Gene, die oft auf extra-chromosomaler DNA, wie Plasmiden kodieren, z.B. 95% der Phagenresistenzgene.

[0043] Das vorliegende Verfahren hat gegenüber den bisher in der Milchindustrie zur Qualitätssicherung durchgeführten Verfahren den Vorteil, dass es vergleichsweise wenig Zeit erfordert, und dass bei dem genannten Verfahren eine Vielzahl von Produktparametern simultan in einer Nachweisreaktion unter identischen Bedingungen analysiert werden. Aufgrund der hohen Zeitersparnis und der hocheffizienten Verwendung der Markierungsreagenzien ist das Verfahren auch außerordentlich günstig. Ein solches Verfahren gestattet eine Aussage über eine Vielzahl von für den jeweiligen Produktionsprozess relevanten Parametern.

[0044] In erfindungsgemäßen Verfahren kann die Probe einer Milchveredelungskultur, einem Edukt, einem Zwischenprodukt oder einem Endprodukt in einem Milchveredelungsverfahren und/oder aus einer in einem Milchveredelungsverfahren verwendeten Apparatur entnommen sein.

[0045] Die Analyse derartiger Proben gestattet neben einer Aussage über das Vorliegen produktrelevanter Gensequenzen auch eine Lokalisierung eventueller Störungen im Produktionsprozess. In Abhängigkeit von den jeweiligen Ergebnissen können dann entsprechende Maßnahmen ergriffen werden. Beispielsweise lässt sich durch die Analyse einer Probe aus einer in einem Milchveredelungsverfahren verwendeten Apparatur feststellen, ob diese mit Phagen verunreinigt ist und daher vor einer Durchführung eines Milchveredelungsverfahrens gereinigt werden muss, oder ob ein mit Phagen oder pathogenen Bakterien verunreinigtes Zwischenprodukt vorliegt, das aus dem Produktionsprozess entfernt werden muss.

[0046] In weiteren erfindungsgemäßen Verfahren umfasst die Probe Milchsäurebakterien, vorzugsweise Milchsäurebakterien einer der folgenden Gattungen: Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Bifidobacterium und Leuconostoc.

[0047] Derartige Verfahren ermöglichen die Untersuchung von Kulturen hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in Milchsäureveredelungsverfahren auf kostengünstige und einfache Art und Weise. Dadurch, dass die Proben zugleich auf eine Vielzahl produktrelevanter Gensequenzen analysiert werden, kann die Eignung der jeweiligen Kultur etwa für eine fehlerfreie Fermentation mit besonders großer Sicherheit vorhergesagt werden, ebenso wie eine Aussage über eine Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften der untersuchten Probe, in Abhängigkeit von den im Verfahren eingesetzten Nukleotidsonden möglich ist.

[0048] Die Probe kann Milchsäurebakterien aus einer Kultur
- aus einem einzigen Stamm,
- aus mehreren Stämmen der gleichen Bakterienspezies, oder
- aus mehreren verschiedenen Spezies

umfassen.

[0049] Im erfindungsgemäßen Verfahren können die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen umfassen, die spezifisch sind für Bakteriophagen und/oder pathogene oder nichtpathogene Bakterien sowie für produktspezifische Eigenschaften.

[0050] Mit Hilfe derartiger Verfahren lassen sich potentielle Störfaktoren für einen Fermentationsprozess leicht identifizieren, wodurch die Störung durch das Treffen geeigneter Maßnahmen, die dem Fachmann bekannt sind, vermieden werden kann. Auf diese Weise werden Produktionsausfälle vermieden und der Produzent, der ein solches Verfahren einsetzt, kann seine Anlagen wirtschaftlicher betreiben.

[0051] Vorzugsweise umfassen die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen, die spezifisch sind für eine oder mehrere der folgenden Bakteriophagenspezies: 936, c2 und P335, sowie dem zur 936-Spezies gehörenden Phagen P482, wobei die jeweiligen Nukleotidsonden vorzugsweise eine oder mehrere der folgenden Sequenzen aufweisen, die spezifisch sind für den Nachweis der/des

- Phagenspezies 936: CATTCATAAAGTAACCTGTC,
  GTATTACCGTATATCTCGAC,
  TTAGACTTGAACGTGATAAT,
  CTTTGGAATGTACAAGATAT,
  TACCGTATATCTCGACCT,
  TCAGTAATTTCTCCGTCT,
  TCCGTCATTATTAGAACC,
  TGCTCATAAATCAGAACT,
  AATTGAACCGACTACATA,
- Phagenspezies P335: GCATTATTCTTTGACCTT,
  TCCTGATTAAACTTGCTT,
  CTCTGATATTTCTTCGCA,
  GCTCAATGTAACCGTAAT,
  TTGTTACTTCTTCTTCAAAC,
- Phagenspezies c2: GTCACTTTAGCACCTTTAT,
  GTCAGAAATTGAGCATTC,
  TACTATTCTTCTTTATCTCCT,
  TGTTTCCTCAATCTTTTC,
  TCTTCTCTTACTTTTGTCAC,
  TTTCATAGCACCGTCATA,
  CAACTGCGTCAGTAATAC,
- Phage P482: CTTTTACATCGTGACCTTT,
  TAAAAATGCTAAAGTGGTT,
  TGGATAGACTTACAGAGGA.

[0052] Die oben angegebenen Sequenzen sind von links nach rechts in Richtung vom 5'-Ende zum 3'-Ende angegeben. Dies gilt auch für alle weiteren unten beschriebenen Sequenzen, sofern nichts anderes angegeben ist.

[0053] Da weltweite Studien gezeigt haben, dass Störungen bei industriellen Milchfermentationen hauptsächlich auf Mitglieder der Spezies 936, P335 und c2 zurückzuführen sind (vgl. Beschreibungseinleitung), ist ein erfindungsgemäßes Verfahren mit den eben beschriebenen Merkmalen von besonderem Vorteil, da es einem Milchsäure verarbeitenden Betrieb gestattet, die hauptsächlichen Ursachen eventueller Störungen in einem Milchfermentationsprozess rechtzeitig zu identifizieren. Die Funktion des Phagen P482 ist noch nicht vollständig geklärt. Das Vorsehen von Nukleotidsonden, die für diesen Phagen spezifisch sind, ermöglicht die Durchführung weiterer Nachforschungen bezüglich dieses Phagen.

[0054] In einem erfindungsgemäßen Verfahren umfassen die Nukleotidsonden solche Sequenzen, die spezifisch für den Nachweis des Phagen P482 sind und mit einem Abschnitt oder mehreren Abschnitten aus folgenden Sequenzabschnitten des Phagen

[0055] P482 Hybride bilden können:

>P482 - ORF 11

ATGAGTTTAGATAATTTTAGAAATAGAACGATTTTGTGGGACACAGTCAATAAAGACTTCCCTCAGCCAA
TACAAATAATGCAAGGCGATGTCAATGCTAGAACGTTATTAATTAAAATAGTTGATAACGGAACTGAAAT
TGATTTAACTGGTCATTCATTAAAACTTACATATCAATACACTAATAGTAGTAATTCTGGTTTTGTTATG
ATCCCTCCTAAGGACTTAGCTAAGGGAGAATTTATTTTGGCAATTCCTACCGAAATGACAGCGACAGGAG
TTATTGAAGCGAACTTAATACTTCTCAATAAAGACAAAGAGCAAGTTATTGTCAGTAAGAATCTTACATT
TATATCAGACAGTTCTACTGTTTCTGATTTAGCTCAAGAAATAAATAATAATATTGATGATTTTACGAAA
TTATTATTAGAAAAAATGCCACAAGTACTGCGTAGTGAGTTGAATGATTTACATGCTCAAACTGATTCAA
ACAAGAGCAATATTGAGCTTAAAGCAAATCTAGCTGATATGACTAGCTTACAAAGTGCAATGACAGAGCT
AAAAAATGAAGTAGAAGCATTTGGTATTAGTCCTGAAAATTTAGTTACTATAAAATCGCTATTAGACGCA
ATTGCAAGCAATGCAAGTGAATCGGAAGTTGTTGAACTAATAAATTCAGTAAAGATTTTAACAAGTAATA
TTTCTCTTATGAGTAACGGAGATTACTCCCCTAAAGCTAATCAAACAGATTTAGAAAGTTTACAGCATAC
TGTTAATAACCAATCGGCGACTATTTCAACAAAAGCCAATCAAACGGATTTAGACAACTTACAAGCTACT
GTTGATAAACAAGGTGTTGCAATTTCAACAAAAGCTGAACAATCAGAGTTATCAATAACAAATAAAAATG
TAACAACTGCTCAAGAAACAGCAAAACAAGCTGAAAGTGAAGCCAAAAATGCAATGGCAAAGGCTACCGA
AGCACAAGCGAACAGTTTACCACTTAATGGCAATGCGGTCAGTGCAAGCAAACTGGAAACAGCTAGAAAA
CTTGGAGTAAATCTCCAAGCCTCAGCGTTTCAAAACTTTGACGGGACTGCTGACGCAACTAATATTGGAG
TTTCAGGGGTGCTGCCTATTTCAAACGGTGGTACTTCAACAAGTGACGGAGTTATAAATACAATAGCTTA
TTCCAACAGCGCAGACGGCACTGACGGTTTCACAACTGTTTATCCTAATTTGAATCTATTAGACGGAACT
AAAGATTTTAGTGGGGATTGGATTAATGCACGTGCTTGGGACAAGAATGGTACTTATAAGGGTTTGACTG
TGGTGTCATACAATGGAGCTTATAACGCAGGTATAGCTAAAGGTTTTACTATCCCTTCCGACGGTATTTA
TTCATTTTCTATAATTGTTAAAGTAAAAACTGGTTATGTCGGTCAATTTATTGTTGAAACGTATAAACCA
ACAGGGGTACCTGCTGTTACAATAAATGTAACCGATACAGGTGGGAAATTTGTAATTCAGTCTTATACAG
GTAGTTTTAAAGCAGGTCAAGAGATTGCAATGTATTTTCGGTTTGATAGTGGAGCCACTATTAAAGGTGG
TTTAGAGGTCGCAGGGCATAAAATTGAACACGGAGAAACACCAACTCCATACATGCCATCAGCTAGCGAA
GTCACGGTTGCAGACTATYCGAAGTATGTAGGGTTTAGTAATATCATTAAACCTAATAAGAAAAGTTCTG
ATTACAAATGGTTACCAATGGGGTTAGTAGCAATTGATAGTGCTACTGGCTCACTCAAACCTGCGGTTAT
AGGTATAGATTACGCTCAAGCTCACCCAGTTGGCTCGGTAGTCACAAATAACTCAAATTTGTCATCAGGG
TATTCCACAGGAAAATGGGAAAATATCGGTTCAGCAGTAATTGGTTTAACAACAATATATTATTGGAAAC
GTACTGCATAA

>P482 - ORF 13

TTGTTAAAAGGAACTGATTTTAAGAATTACACACCAAAAGTACAAGAACAT
CTTAGTGCTACAGTAAAAACTGGGGGAGTGTTTAATAAACCTTACGTCAGCGCGTCATAC
AATAATCCAACTGTAAACAGTTGGACAGACGTTCTTGAATGGGATTTTGATAAAGAACAT
TTTAAGCCATCAACAACTTAATACTTTTAGTTTTTATGTAAAAGGAAAGGGAAAAATTAG
AACTCATATTTACCCTTCTCTAATTGATACAAGTGTTGATGTATTAGCTGATGGAAAAGC
AATAAAACCTGCTGCTGATGGTGCATATGATTGGAATCTTACTAATGAATGGGTTAGACA
TACATATACGTTTACTACTAAAAGTAGTATAACTGAAGGACAACATGTACTATTTAGACT
ATTCACAGGAAATAGTGCTGATATATGTTTACCTAAAATTGAAGAAGGCTCAACCGCTAC
TCCTTGGACGCCTTCATTTAGTGAACTAACAGCCGAAGATTATCCAAGTTATATTGGAAC
ATATACTGATAATAACTCTAACACACAAAGTACAGACCCAGAAAAATATACTTGGAAAAA
AATAGAATAA

>P482 - ORF 31

TTGATAGAATGTAATTATGAAAGAGGTGCAGAGATGACAATCACTGAAAAGCAATTCTATGACATGTTAA
ATGTTGATGAACACATGAATTTCACAAACAGAATTAAAGAGCTTGTTTTTGATAAAAAAGGACGTGAAGA
ATTTTACTCTAAAATATTAAATATCCACCATGACATGGGAGTTGATTTCTTTAGGGACTATTTTATGGCT
CATTCAGCTGTTTCAGCAAAAGGTCAGCATTATACACCAGATGAACTTGGTAAACTCACAGCGTTGCTTG
TAGGTGGTTCTGGAGGTGCTGATTTAACCGGAGCAGGAACAGGAACTCTAATTATTCAAAAGTGGCAAGA
CGACCGAATGAATACAGACTTTTTTGACTATTTGCCGAGTAACTACTGGTATCAGGCATTAGAATTATCA
GATGAAGCTATTTCATTCTTGATTCATGCCTTTGCAATTAGAGGAATGAATGGTGTAATTATTCACGGTG
ACGCATTGGAAATGGCTGTAAAACAAGTTTATTTCATTCAAAACAGCGATAACAACCCAATTGGCTTTTC
GGAAGTAAATGTTATACCACACAGCGAAGACGCAATGGAATTTTTAGGTATTAATGAATGGACGGAACAG

GCAATTGAACATATTGAAAGTAAATTTCCTGACTGGATTCCACTAACAGAAGAAAGCAAAGGATAG

>P482 - ORF 32

ATGCTTAAGTTAGACGAGAAGAAAATTAGAAAAGGTAAACCAATCGGACTACCATACCAAGGAAGTAAGA
AAAAGATAAGCAAGAAGATAATTGAAATTATCAAACAGAACTTTGGCACAGACAGGCCGATATACGACAT
CTTCGGAGGTGGAGGAGCAATTACAGCCGAATGTATTTTAAATGGTTTAGAAGTGTATTATAACGACTTA
GACAAGGATATAACCAACGCATTTGAACGAGTTATCTCTCAAGACCGCGAATGGATAAAAACCCTTATTG
TTTCACGTACAGAGTTTACCGAGATTAAGTCTAAAGAAAACAAGACAACAGATGACTTTTTGAAGTTGCT
GATTAACTCTTTTGGAAATAGCATGAAAGCCTATATGTTTTCTAAAGAAAAATCAGATTTGAAATATAAT
CTTGCTAAAAAAATTATTGAAAAGCATGACGTTTTTAGCGGTTATAAACAAACAGAAACATATAAGAAAG
TTACTTCTGGACTGGACTGGAATTGGTTTAACGCTAAGCCAGAAAAGAATAAAACTTTAGAACAACTTCA
ACACCTTCAACAACTTGAACGACTTCAACGACTTCAACAACTTGACGAAGTAAAAGCAACGAATAAAAGT
TATCACGATTTTGGCGAAGTTTCTGGAGCTATTCTATATCTTGACCCTCCTTATGAAGGAAGTCACCAAA
AAAGTTATATCAATTCATTTGATAGTCAAGAGTTTTATAACTGGGCATTTGAAATGGCTAAAACTAATAT
CGTGATAATTTCAAGTTATTCAATTTCAGATGAACGTTTTGAAGCTGTATATTCTTTTGATAAAGCACGT
AGTTGTTTGCAGGGTGGTACGAGCAATAAAAGGAAAAATGAGAAATTATTTATGGTTAAGGGGAGTTAA

>P482 - ORF 35

ATGGAAAACAAATTAATTAAAATCAACTCAATGGAAACTTTAGAAAATGGCTTCATCTCAGTTAATGCAG
ATTTTGAACTAGGACACTTAGAGTTTTGGACTAATCAATGTGAAATTGATAGACTGATCGCCGGCGGTAA
CATGGATAGACTTACAGAGGATAGATATGAATAA

>P482 - ORF 47

ATGGGATTTTTATTATATAGAATCAGAACCAATGGAGGTAACCTA
GTGACTAAATTGAGAAAATTTATAAAGTATAAAGAGAAGTATATGGTTAGTGATGACGGGGAAGTTTGGG
AAATACAGAAAAACAATTTAAAAAAGAAACCACTATCAAAAAACAATAGCGGTTATCTTTACACTTCTAT
AAACGGAAAACCTTTAGGGGTACATAGGATTGTTTTAGAAGCATTTACTGGTTATTCTAGTGAAGAAGTA
GCCATAAAGATAGAAATAAAGCTAATAACTGTTTGTCTAATCTTGAATATGTTTCTCATAAAGAAAATGT
ACGTAGATACAATTCAAAAAAAGTAA

>P482 - ORF 48

TTGTGGTGTAAGAAAAGGAAAAAAATGAAAATTTACTATGTGGCACTAACAACTAATAAAGACATAGTGG
CTAAAAATTATAGCGGAAAACGATTGTCTCTTTATACAAAAAAACACGAAGCTATTAAGACTTGTGTTTT
ATTAAATTATCAATGGGAGCTATTTTTCGGAAATGGAGTAAAAGAAGAAAAACCATTCAAAGTTTATTGC
GTAGAATCAGAGCCAATGGAGGTGACTAGTGACTAG

>P482 - ORF 50

ATGAGATATAAAAAAATAGATACTGTTATAGTATTAGAAAATGGAAAAGTTTATAGAGAGTTAAAAGATA
GATGTAGACTGATAAAAGGAACTTTAAGAAATAATGGATATTTACAATTAACGATTAAAAATAAAACTAT
AAAGGTACATAGATTAGTAATAGAGGCTTTTAAAGGTAAAAGTGATTTAACTGTTGACCATATAGACGGA
AATAAACTAAATAATTCATTAGATAATTTACAATATTTAACTAGAGAAGAAAATTTAATAAAGTCTATAG
CTATCCCAATTTATTATGACAATGTGAAATACAGAAGCACTAATGAGTTATCAAGAAAATTAAATGTTTC
AAAAAATACTATTAAGTATAATTTGAATAAATATGGTTCTTATAAGGGTAAAAAATTAAATTACTAA

[0056] Ein solches Verfahren ermöglicht ebenfalls die Erforschung der Wirkungsweise des Phagen P482 im Produktionsprozess.

[0057] In einem erfindungsgemäßen Verfahren umfassen die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen von Bakterien, die als Schadflora in Milchprodukten vorkommen.

[0058] Ein solches Verfahren ermöglicht die leichte Identifizierung von Bakterien, die als Schadflora in Milchprodukten vorkommen und ermöglicht es so einem Milch verarbeitenden Betrieb, die negativen Auswirkungen derartiger Schadfloren durch geeignete, dem Fachmann bekannte Maßnahmen zu vermeiden.

[0059] In einem erfindungsgemäßen Verfahren sind die produktrelevanten Gensequenzen spezifisch für einen oder mehrere Organismen aus der folgenden Gruppe: Listerien, Salmonellen, Staphylokokken, Enterobactericeae, Bacillae, Campylobacter, Clostridien, Pseudomonadaceae, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, enterotoxisches Escherichia coli, Yerisinia enterocolitica, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, B. sphaericus, Mikrokokken, Bakteriophagen.

[0060] Solche Verfahren ermöglichen den Nachweis von Organismen, die auf die eine oder andere Art und Weise die Milchfermentation stören können oder deren Anwesenheit in einem Fermentationsprodukt unerwünscht ist. Die leichte Identifizierung anhand eines erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht es dem Fachmann, geeignete Maßnahmen zu treffen, um die Anwesenheit der genannten Organismen bzw. deren negative

Auswirkung auf einen Fermentationsprozess zu vermeiden.

[0061] Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur Untersuchung von Kulturen, bei dem eine oder mehrere dieser Kulturen auf das gleichzeitige Vorliegen von Phagenresistenz vermittelnden Genen untersucht wird, bei dem:

- eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für ein bestimmtes oder zumindest für eine Gruppe bestimmter Phagenresistenz vermittelnder Gene spezifisch ist,
- die Nukleotidsonden mit einer entsprechend aufbereiteten Probe der zu untersuchenden Kultur unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden, und
- daraus resultierende Hybridisierungsprodukte nachgewiesen werden.

[0062] Die Möglichkeit, Kulturen auf das Vorliegen von Phagenresistenz vermittelnden Genen hin zu untersuchen, ermöglicht es einem Milch verarbeitenden Betrieb, geeignete Starterkulturen auszuwählen, bzw. zu ermitteln, ob eine Kultur eine Phagenresistenz aufweist, die für die sichere Durchführung eines Fermentationsverfahrens von Vorteil ist.

[0063] Gemäß einer Abwandlung dieses Verfahrens werden dabei ein oder mehrere Phagenresistenz vermittelnde Gene nachgewiesen, bei denen es sich um Gene handelt, die wirken wie folgt:

- Phagenadsorption inhibierend,
- Injektion von Phagen-DNA blockierend,
- Restriktion von Phagen-DNA bewirkend, und/oder
- Phageninfektion abortierend.

[0064] Gemäß einer weiteren Abwandlung dieses Verfahrens sind die Phagenresistenzgene aus einer oder mehreren der folgenden Gruppe von Genen ausgewählt:

Inhibition der Phagenadsorption:	ads
Blockade der DNA-Injektion:	pip
Restriktion der Phagen-DNA:	IId I, IIa1403, scrF I, IIa I, IIa II, IIa BI, IIa BII, IIa CI, IIa DII, IIa KR2I, IIa FI,
Abort der Phageninfektion:	abiA, AbiB, abiC, abiD, abiDI, abiE, abiF, abiG, abiH, abiI, abiK, abiL, abiM, abiN, abiO, abiP, abiQ, abiR, abiS, abiT, abiU

[0065] In einem solchen Verfahren zum Nachweis Phagenresistenz vermittelnder Gene sind eine oder mehrere Nukleotidsonden vorgesehen, die vorzugsweise folgende Sequenzen aufweisen:

Nachgewiesenes Gen bewirkt	Sondename	Sequenz
Inhibition der Phagenadsorption	EpsC S1	CCT GAT ATA TTA TTT GAT TTT
	EpcC S2	AAG GAG TAC TAA GTC AGA TAA
	Inj-Pip S1	CAG GAC TTA GTA CTA GAA TGA
	Inj-Pip S2	ACG AAT TTA TTA CTT ATT TAC
Restriktions & Modifikationsystem I	LldI S1	ATA ATA ATA CGA TTT TAG TGA

	LldI S2	CAG ATT CCT CTA GAG TAG ATC
	LldI S3	CTA TAT ATT GAT CGA GAA ATG
	LldI S4	AAC GAA TTA AGA AAA TAT TAC
	Lla1403 S1	ATA TTA ATA CGA TTT ATA TGG
	Lla1403 S2	TTA TAT GAC CAT GAG ATT ATT
Restriktions & Modifikationsystem II	ScrFI M S1	ATA GAA AAA CAG CTA AAT ATA
	ScrFI M S2	TAT TAA ATA CTT TGG AAG AAC
	ScrFI R S1	ATT TAC GAT ATA ATA AGT TTG
	ScrFI R S2	GTA TAT TTT GAT AGT GGT ATG
	LlaI M S1	TAT ACA ATT ACC CAA TAT ACT
	LlaI R S1	TTA TAA ATA AAA AAC TAA CCA
	LlaII S1	AAG ATG TAT CTC TAC TAG CAA
	LlaII S2	CTG TAG AAA ATC TAG TAA ACC
	LlaBI S1	GTA AAA CAT GAA CTA ATA AGA
	LlaBI S2	TAA TCA AGT TAA GTT CAA GTC
	LlaBII S1	ATA ATT TTA GTT TGG TAT ATG
	LlaBII S2	CTA TTC ATT AGA ACA TCC TAC
	LlaCI S1	ATA TAA CCT GAT GTA ATT AGA
	LlaCI S2	TAA GAA ATA AGC TAA ATA ATG
	LlaDII S1	CTT AGG ATA TCT ATG GAA TAG
	LlaDII S2	ATC GAA GAT AAT AGA CAC TAA
	LlaKRII S1	AGT ACG GTA ATA ATA TTG AGA
	LlaKRII S2	AAA GTA GGG TTA ATA AAG TAA
Restriktions & Modifikationsystem III	LlaFI S1	TCT ATA ACT CGA ACA ATA AAC
	LlaFI S2	GTA TTT CGT TAG ACA GTC TAT
Abortive Phagen Gene	AbiA S1	AGT CAT CTA CAT ATC GAA CTA
	AbiA S2	TAT ATA ACT TCC GTC AGA TAC
	AbiB S1	CAT TTA ATA CAT CTC TCG TAT
	AbiB S2	AGG GTA GTA GTT TTT TAA TAA
	AbiC S1	AGT TAG TAT AGG AGC AAT TAA
	AbiC S2	GTA TAC TTA ATG TGT TCA TGA
	AbiD S1	TTT CTG AAT TAC TAT ATA TGC
	AbiD S2	CTA TAT ATG CTA AAA TCT AAA

AbiDI S1	TAA TGA AAG TAT TTA TTT GTC
AbiDI S2	TTC TCT TTT ATA TGA TCA TTC
AbiEII S1	TAC ATA TTT CAG TAA TTA CCC
AbiEII S2	ATA AGC TAA TAC TTC TAT CTG
AbiF S1	ATC ACC ACT ATA TAG ATC TTT
AbiF S2	CTG TAT AAC CTA ACT ACG TTC
AbiGI S1	TAT ATA TCT CCA CTC ATG TTC
AbiGI S2	TGA TTC TTC TCA TAT ACT CAA
AbiH S1	GAT AAA CAT CTT CCA TAG TAT
AbiH S2	CAG TAT CGA ATG TAC TAT CTT
AbiI S1	TTC TCT TAG TTA AGT AAT GGT
AbiI S2	AAT CTT AAC TTT GTA TAG ACC
AbiK S1	TAT TAC CGA ACT ATA TAT GTG
AbiK S2	ATACACATAGTATACCATGGA
AbiL S1	CGT AAA ACT ATG ACT ATC TCT
AbiL S2	TTA CCT TCT TTT AAA TTA CTC
AbiM S1	TCT TCT ACT TCT GTG TAT TTC
AbiM S2	CTT TAT TAT TTT GTT CTG ATT
AbiN S1	CTG TTA GTA ATT TAA CTG TTC
AbiN S2	GAA GAC CTA TTT ATA GAT TCA
AbiP S1	TAT AAT TTC AAC AAT ATC ATC
AbiP S2	ACA TCT GTA TAA AGC TCT AAA
AbiQ S1	CTA GTT ACT ATT CGA CTT CTT
AbiQ S2	AGT CTA GTT ACT ATT CGA CTT
AbiT S1	AGT ATC TTT CAT AAT CAT AGG
AbiT S2	TCT CAG TAT CTT TCA TAA TCA
AbiU S1	TTT ATC TCT TAC TAC TTC GTT
AbiU S2	TAA TAG TCA TAC CAA TGT AAG

[0066] Gemäß einer weiteren Abwandlung dieses Verfahrens kann dabei auch das folgende, neu entdeckte Phagenresistenz vermittelnde Gen abiP2 nachgewiesen werden:

>abiP2

ATGGATATTTTATTTTTAGAAAAAGCATTGACCAATTCTGATTGGTTAGGTTTTTTGGGG
AATATTGTAAGTGGTATAATTGGGCTAATTGGAGCTGGATTAGGTGTTTATGGGGCATAC
TATGTGATGCAAAAGGAATTAAAAGCAGAGAATGAACAGTATAGAAAAGATAAAATTGAT
AATACTTTTTTCAATTTATTGGGTTTGTTTCAAAATATACGAGAGGAACTTGATAGTCCA
AATTTGTTAGTCGCTATCAATAGTTATAATAGTACTGAAGAAGAATATCAAAAAGATAAA
TATTATAAGGCACTTTTCGAGTCAAAAAAATCTGATTTCATAAAAGATATAGAGAAATTT
AAGGTAGAAACAGGGCAATTCGATGAAAAGAGCAATTCTTTGATAAATGCATTAGAACAA
TCAGATTATAGTTCTAATGTTTATATTCGTGGATTAAATAATTTAGAAAGAGTGGTAGAA
TCCGAAAATACCCATATTGAGTTATTCGAAGAATGTGCAAAAGATTTGAAGGAGTTTGTT
GATGATAAGAATGGTGGAATTTCCTTCAAATATGAAGTTGATGAAGAGTTTATAAAAGTA
TGCGTTGAAAACGGTTTTTTGAATAGTAAATATTACTCTGGGAATTATTTTAGAGCTTTA
TACAGATGCTTAAAATATATTATCGATTCTGATTTAAAAATGGAAGATAAAAAGTTTTAT
TCAGGAGTGCTTAGAGGGATTCTATCATCTAAGGAAATGTTAGTAGTGTTTTATAATTGC
ATGTATTTTGAAAAAGGTGAGAAATTCAAAGAACTACTTGAAAAAGAAGAAAAAGGTAAA
AGAATTGACTTTTTTGGTGATAAAGAGGATTTGAAAAACTTAAGTGAAGGATATGACCTA
CCTTTCTTTAGTAAAGAGGATTTATTATTTTCGAAAACCGATATGCAAAAATTAGAGGAA
CTTATAAAAGGAAACTAG

[0067] Die genannten Verfahren ermöglichen es, Kulturen auf das Vorliegen bestimmter Phagenresistenzgene zu untersuchen. Insbesondere ermöglichen es derartige Verfahren Kulturen auf die potentielle Fähigkeit hin zu untersuchen, Phagen mittels eines bestimmten Abwehrmechanismus abzuwehren. Dies eröffnet dem Fachmann und der Milch verarbeitenden Industrie die Möglichkeit, Starterkulturen im Hinblick auf das Vorliegen bestimmter Kombinationen von Phagenresistenz vermittelnden Genen hin zu untersuchen und geeignete Maßnahmen zur Vermeidung von Fehlfermentationen zu treffen und die Wirkung der neu entdeckten Phagenresistenz vermittelnden Gene genauer zu untersuchen.

[0068] Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur Untersuchung von Kulturen, bei dem eine oder mehrere dieser Kulturen auf das Vorliegen von gewünschten Genen untersucht wird, wobei die gewünschten Gene einen oder mehrere der folgenden Faktoren in einem Milchveredelungsverfahren beeinflussen: Geschmack, Geruch, und Konsistenz des Endproduktes des Milchveredelungsverfahrens, bei dem:

– eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für ein bestimmtes oder zumindest für eine Gruppe gewünschter Gene spezifisch ist,
– die Nukleotidsonden mit einer entsprechend aufbereiteten Probe der zu untersuchenden Kultur unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden,
und
– daraus resultierende Hybridisierungsprodukte nachgewiesen werden.

[0069] In einem solchen Verfahren zum Nachweis weiterer produktbildender Gene sind eine oder mehrere Nukleotidsonden vorgesehen, die vorzugsweise folgende Sequenzen aufweisen:

Sonden-name	Sondensequenz in 5'-3'-Richtung
ald_B_Lc07	CAAGGGTATTATATTGAAA
ald_B_Lc06	CTAAAGTTCCAATTCCTA
ald_B_Lc03	ATTTCAACAGTACCATTATC
ald_C_Lc04	TCTCATCTTCTTCAACTAAT
ald_C_Lc16	TAACAATAGTATAAGCGGT
ald_C_Lc24	AAAGTTTTCATCATCGTC
als_lc03	CTAATAAATCAAAAACCC
als_lc06	TGAATATTTTGTTGCTGA
als_lc16	TCTTCAGTATTTTCAGTATC
but_A_lc03	AAATGAGTTTTCTCCTTG
but_A_lc04	CGGCATTATTAACTACAA
but_A_lc07	AGCATTAGATTTGGATTT
but_B_lc01	GGTTCATTAATTTCATCA
but_B_lc07	ACGTTCATCAACAGAAAT
but_B_lc14	TTGATTACTAATTTTGCC
but_B_lc10	CTTCTTGTGCTTTTTTAC
cit_E_lc02	ACGGATGACTTCGATAC
cit_E_lc05	CATCAGGATAAGACTTGG
cit_E_lc10	CCCTCATCTAACACATTT
cit_F_lc03	ATACCATCTTTAACAGTTTT
cit_F_lc10	GTTGATTTTTGTTGAGGT
cit_F_lc14	TCAATCTTTAACTTCACG
cit_P_lc+l08	CAAGGTAGTAAAACACGT
cit_P_lc+l12	GATATAAAGACCCAAAAA
cit_P_lc+l29	AGCTTAGACAAAATTCCT
cit_P_lc+l33	TACGTGAGATAAGTCCAG
pdh_A_lc01	AAATGTAGTGTCTTGCAGT
pdh_A_lc04	CAGTCTTCGTCAGTGAA
pdh_A_lc06	CAATGTCTTCTTTAGTACG
pdh_B_lc07	TTCAAAGATAAAGGTTCC
pdh_B_lc13	AGCAGTATCAAGTGGTGT
pdh_B_lc19	CAGTCATAGTCAACCACC
pfl_lc03	TAGCATCGATATATCCAG
pfl_lc11	TGTTCAGTAAATGTTCCA
pfl_lc23	TGTTAGCACGAACTTTAG
pfl_lc32	ACGTTCAGTTAATTCTTG

[0070] Solche Verfahren ermöglichen es, Starterkulturbakterien im Hinblick auf gewünschte Eigenschaften eines Endproduktes wie Geschmack, Geruch oder Konsistenz auszuwählen, bzw. sicherzustellen, dass ein bestimmter Geschmack, Geruch oder eine bestimmte Konsistenz eines Endproduktes eines Milchveredelungsverfahrens erzielt wird.

[0071] Es können mehrere der bisher genannten Verfahren zugleich durchgeführt werden.

[0072] Die Durchführung mehrerer der bisher genannten Verfahren zugleich gestattet eine besonders ökonomische Analyse einer Vielzahl von Faktoren, die für das Endprodukt eines Milchveredelungsverfahrens und den störungsfreien Ablauf eines solchen Verfahrens von hoher Relevanz sind.

[0073] In erfindungsgemäßen Verfahren können zugleich Nukleotidsonden vorgesehen sein, die eine Aussage darüber ermöglichen, ob die jeweils nachgewiesenen oder untersuchten Organismen teilungsfähig/stoff-

wechselaktiv sind oder nicht.

[0074] In einem solchen Verfahren sind die zugleich vorgesehenen Nukleotidsonden zum Nachweis von ISR-Regionen ausgebildet und umfassen vorzugsweise folgende Sequenzen:

– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von E.coli: CGTATCAGTCTGCTTCGC und/oder CACTCACAAACCAGCAAG,

– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von Lactococcus lactis: TTCTTGCTTAGGTTTATCA und/oder TTGGTTTATTTATCGTTAT, und/oder

– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von Lactobacillus delbrückii: CAGTGTGCTTCCGTAACT und/oder ACTCTCTCGGTCGCTTTG.

[0075] Solche Verfahren gestatten es zu ermitteln, ob Organismen, teilungsfähig bzw. stoffwechselaktiv sind oder ob sie ihre Teilungsfähigkeit bzw. Stoffwechselaktivität verloren haben. Je nach Ergebnis kann der Fachmann aufgrund seines Fachwissens dann entscheiden, welche Maßnahmen getroffen werden müssen, um negative Auswirkungen zu vermeiden. Im Falle von pathogenen Organismen wie E. coli muss sichergestellt sein, dass die Bakterien keine Teilungs- oder Stoffwechselaktivität zeigen. Im Falle der Starterkulturspezies Lactobacillus und Lactococcus sind diese Aktivitäten Grundvoraussetzung für eine fehlerfreie Produktveredelung. ISR bedeutet Inter Spacer Region – diese Region liegt zwischen den ribosomalen Genen, und wird mit diesen gemeinsam transkribiert. Um funktionsfähige rRNA zu erhalten, werden diese Bereiche herausgeschnitten und abgebaut. Die Menge an Transkript ist abhängig von der Stoffwechselaktivität, und damit auch von der Teilungsaktivität einer Zelle. In stoffwechselinaktiven, sich nicht teilenden, vielleicht toten Zellen sind keine ISR-Sequenzen nachweisbar.

[0076] In erfindungsgemäßen Verfahren können die Nukleotidsonden auf einem Mikroarray angeordnet sein.

[0077] Die Nukleotidsonden können bestehen aus: synthetischen, insbesondere ex-situ synthetisierten Oligonukleotiden, DNA, cDNA, RNA, LNA, PNA und/oder anderweitig modifizierten Nukleinsäuren.

[0078] Die Nukleotidsonden weisen meist eine Länge von unter 100 Basen auf.

[0079] In erfindungsgemäßen Verfahren kann die Aufbereitung der Probe folgende Schritte

– DNA- oder RNA Extraktion aus der Probe,

– Markierung mit Psoralen-Biotin.

– Farbentwicklung durch einen Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff oder ggfs. andere Reagenzien

[0080] In weiteren erfindungsgemäßen Verfahren kann die Aufbereitung der Probe folgende Schritte umfassen:

– DNA- oder RNA Extraktion aus der Probe,

– Fragmentierung der Nukleinsäuren in hybridisierbare Fragmente,

– Markierung mit Psoralen-Biotin,

wobei zur Fragmentierung vorzugsweise eine chemische Nuklease eingesetzt wird, die Fragmente zwischen 500 und 1000 bp produziert.

[0081] Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass Fragmente mit einer Länge zwischen 500 und 1000 bp bei einer späteren Detektion die stärksten Signale zeigen.

[0082] Erfindungsgemäße Verfahren, bei denen die Proben wie eben dargestellt aufbereitet werden, ermöglichen den Nachweis von Hybriden mittels Kopplung von Streptavidin an das Biotin. An das Streptavidin ist meist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der die Auswertung des Hybridisierungsereignisses ermöglicht. Die erfindungsgemäßen Verfahren können mit oder ohne Fragmentierung durchgeführt werden, je nach den Bedürfnissen oder Vorlieben des Anwenders. Eine PCR-Amplifikation ist Dank der mittels der Biotin-Streptavitin-Kopplung erzielten Steigerung der Signalintensität nicht unbedingt erforderlich. Die genannten Verfahren sind dadurch besonders ökonomisch.

[0083] In weiteren erfindungsgemäßen Verfahren kann die Aufbereitung der Probe eine PCR-Amplifikation, vorzugsweise eine Multiplex-PCR, umfassen. Eine solche PCR-Amplifikation ermöglicht die weitere Steigerung der Empfindlichkeit der erfindungsgemäßen Verfahren.

[0084] In weiteren erfindungsgemäßen Verfahren kann eine Markierung mittels Psoralen-Biotin erfolgen und

das Psoralen-Biotin nach der Hybridisierung mit einem Streptavidin-Enzymkomplex, vorzugsweise Streptavidin-Peroxidase, gekoppelt werden, wobei das mit Psoralen-Biotin markierte Material aus genomischer DNA, mRNA, cDNA, rRNA, rDNA und/oder einem PCR-Produkt besteht, und wobei vorzugsweise im Anschluß an die Biotin-Streptavidin-Kopplung die Hybridisierungsprodukte mit einem Tyramid-Farbstoff-Komplex enthaltenden Signalamplifikationspuffer in Verbindung gebracht werden.

[0085] Ein solches Verfahren ermöglicht den Nachweis von Gensequenzen, die in geringen Mengen in einer Probe vorkommen, ohne dass hierbei eine PCR-Reaktion durchgeführt werden müsste. Dadurch wird das erfindungsgemäße Verfahren besonders ökonomisch. Sollte die Empfindlichkeit dennoch nicht ausreichend sein, lässt sich die Sensitivität des Verfahrens durch den kombinierten Einsatz von Multiplex-PCR und Streptavidin-Enzymkomplex weiter steigern. Erfindungsgemäße Verfahren sind daher auch dann vorteilhaft einsetzbar, wenn nachzuweisende Gensequenzen in sehr geringen Mengen in einer Probe enthalten sind. Ein solches Verfahren ist besonders vorteilhaft, da es unnötige Kosten an Arbeitszeit und Material vermeidet.

[0086] Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass sich die Psoralen-Biotin-Markierungsmethode auch für den Nachweis von rRNA eignet. Dies ermöglicht einen Verzicht auf Amplifikationsmethoden oder Fragmentierungen zum Zweck einer Signalamplifikation, da native RNA-Moleküle in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

[0087] In erfindungsgemäßen Verfahren kann die aufbereitete Probe bestehen aus: PCR-Produkten, cDNA, rDNA, rRNA, mRNA und/oder genomische DNA.

[0088] Die Aufgabe wird ferner gelöst durch einen Mikroarray zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0089] Ein erfindungsgemäßer Mikroarray umfasst eine oder mehrere der Sonden mit der SEQ ID No. 1 bis No. 208 gemäß dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

[0090] Erfindungsgemäße Mikroarrays ermöglichen die gleichzeitige Durchführung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Verfahren auf engstem Raum. Sie eignen sich darum besonders für die Lösung der gestellten Aufgabe.

[0091] Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur gezielten Auswahl einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen für die Durchführung von Milchveredelungsverfahren, das folgende Schritte aufweist:

a) Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 10 bis 17 mit Kulturen der gewünschten Art,

b) Bestimmen der in den jeweiligen Kulturen vorliegenden Phagenresistenz vermittelnden Gene und/oder weiterer produktrelevanter Gensequenzen anhand der in Schritt a) erhaltenen kulturspezifischen Hybridisierungsprodukte, und

c) Auswählen einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen, die gewünschte Phagenresistenz vermittelnde Gene und/oder andere gewünschte Gene aufweist.

[0092] Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur gezielten Auswahl einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen für die Durchführung von Milchveredelungsverfahren, das folgende Schritte aufweist:

a) Durchführen eines Verfahrens nach einem der Schritte 1 bis 9, wobei die Probe einem Edukt oder einem Zwischenprodukt entnommen wurde,

b) Ermitteln von in der Probe enthaltenen Phagen anhand der in Schritt a) erhaltenen Hybridisierungsprodukte, und

c) Auswahl der Kultur oder der Kombination von Kulturen, die gegenüber in Schritt b) ermittelten Phagen Phagenresistenz vermittelnde Gene aufweist.

[0093] In einem solchen erfindungsgemäßen Verfahren kann Schritt c) mittels des unmittelbar davor beschriebenen Verfahrens durchgeführt werden.

[0094] Erfindungsgemäße Verfahren ermöglichen es, Starterkulturen für die Durchführung eines Fermentationsverfahrens auszuwählen, die bestimmte Phagenresistenz vermittelnde Gene und/oder andere Gene, die das Erzielen gewünschter Eigenschaften in einem Endprodukt fördern, enthalten. Die Verfahren ermöglichen es insbesondere, die Starterkulturen so auszuwählen und den Fermentationsprozess so zu steuern, dass das Fermentationsverfahren den beabsichtigten Verlauf nimmt, sofern die übrigen Rahmenbedingungen (Temperatur etc.) eingehalten werden. Von besonderem Vorteil ist hierbei, dass es solche Verfahren ermöglichen, Starterkulturen mit breiten Phagenresistenzspektra schnell und kostengünstig zu ermitteln. Solche Starterkul-

turen hätten den Vorteil, dass bei einem Wechsel der Starterkultur ein Auftreten von Phagen in der Produktion besser vermieden werden kann. Die Produktion wird dadurch kostengünstiger. Derartige Verfahren tragen darum in ökonomischer Weise zu einer Verbesserung der Qualitätssicherung in Milchveredelungsverfahren bei.

Ausführungsbeispiel

Beschreibung der Erfindung

[0095] Die vorstehende Aufgabe, die Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung können unter Berücksichtigung der folgenden Beschreibung der Figuren und eines Ausführungsbeispiels der vorliegenden Erfindung besser verstanden werden.

[0096] Die Figuren zeigen in:

[0097] Fig. 1A-Fig. 1D schematisch die bereits in der Einleitung erläuterten Mechanismen zur Abwehr von Phagen, wie sie von Phagenresistenzgenen vermittelt werden,

[0098] Fig. 2 schematisch den Ablauf eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

[0099] Fig. 3 eine Tabelle mit Sequenzen erfindungsgemäßer Nukleotidsonden,

[0100] Fig. 4 eine Tabelle mit Primern für eine Multiplex-PCR-Reaktion zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

[0101] Fig. 5, Fig. 6 jeweils Graphen, welche die mittels eines erfindungsgemäßen Verfahrens erzielte Signalamplifikation verdeutlichen,

[0102] Fig. 7 einen Graph, der die Nachweisgrenze für den direkten Nachweis von genomischer DNA verdeutlicht,

[0103] Fig. 8 einen Graph, der Hybridisierungsergebnisse von mit Psoralen-Biotin markierter RNA verdeutlicht,

[0104] Fig. 9 schematisch den Citrat-und Lactose-Metabolismus,

[0105] Fig. 10 einen Graph, der die Hybridisierungsergebnisse mit Psoralen-Biotin markierten Multiplex-PCR Ansätzen von Starterkultur Probat 505 zeigt,
und

[0106] Fig. 11 einen Graph, der die Hybridisierungsergebnisse mit Psoralen-Biotin markierten Multiplex-PCR Ansätzen von Starterkultur Probat 8/0 zeigt.

[0107] **Fig.** 1 stellt schematisch die Phagenresistenzmechanismen bei Lactococcus spec. dar. Diese Mechanismen wurden bereits in der Einleitung geschildert. Sie sind die Ursache für die Resistenz einer Kultur gegenüber Phagen. Man kann daher den störungsfreien Ablauf eines Milchveredelungsverfahrens dadurch fördern, dass man Starterkulturen mit einem möglichst breiten Phagenresistenzspektrum vorsieht. Man kann aber auch, wenn bestimmte Phagen in einer Starterkultur oder in einem Edukt vorhanden sind, beurteilen, ob diese Phagen den Fermentationsprozess stören werden, und zwar in Abhängigkeit von den zugleich in der Starterkultur nachweisbaren Phagenresistenz vermittelnden Genen. Zu diesem Zweck kann ein erfindungsgemäßes Verfahren durchgeführt werden, wie es schematisch in Fig. 2 dargestellt ist. Dabei wird aus einer Probe, bei der es sich typischerweise um Milch oder Starterkulturen handelt, die als Edukt in einem Milchveredelungsprozess eingesetzt werden sollen, DNA extrahiert. Die extrahierte DNA kann einer Fragmentierung unterworfen werden. Dies ist aber nicht unbedingt notwendig. Die unfragmentierte oder fragmentierte DNA, je nach dem wie vorgegangen wurde, wird mit Psoralen-Biotin markiert. Bei einer Fragmentierung hat sich eine Fragmentierung in Fragmente mit einer Länge von 500 by bis 1000 bp als besonders vorteilhaft erwiesen, da diese bei der Detektion die stärksten Signale zeigen. Dies scheint die optimale Länge zu sein, bei der einerseits viele Markierungsmoleküle eingefügt werden können, die die Signalamplifikation bewirken. Andererseits sind diese Fragmente noch nicht so lang, dass starke sterische Hinderungen bei der Hybridisierung auftreten. Die Fragmentierung kann enzymatisch mittels Nukleasen oder mechanisch erfolgen, besonders vorteilhaft ist aber die chemische Spaltung mittels der Fenton-Reaktion, da diese sequenzunabhängig erfolgt.

[0108] Im Anschluss an die Markierung der fragmentierten oder unfragmentierten DNA mit Psoralen-Biotin wird die Probe mit einem Mikroarray in Verbindung gebracht, auf dem sich eine Vielzahl von Nukleotidsonden befinden. Möchte man Phagenresistenzgene nachweisen, so sind dort auch Sonden zum Nachweis derartiger Gene vorhanden. Es wird eine Hybridisierungsreaktion durchgeführt.

[0109] Ein Beispiel für eine Hybridisierung ist wie folgt:
Blockierte Slides werden mit 25 ml Prähybridisierungspuffer (2 mg/ml BSA, 500 µg/ml Heringssperma, 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,01 % SDS) für eine Stunde bei 48°C prähybridisiert (Anmerkung: Bei weniger komplexen Proben kann auch auf die Prähybridisierung verzichtet werden). Die Slides werden nach dem Prähybridisieren kurz mit Wasser abgespült und mit Luftdruck getrocknet. Die markierte DNA oder RNA wird in 2x Hybridisierungspuffer aufgenommen und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Endkonzentration des Hybridisierungspuffers beträgt 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5 mg/ml BSA und 0,01 % SDS. Die Probenlösung wird 10 min bei 95°C denaturiert, für 10 min auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wird die Probe mittig auf den Slide pipettiert. Der Slide wird mit einem Deckglas versehen, so dass sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilen kann. Es folgt eine Hybridisierung für 1-2 Stunden bei 46°C in einer feuchten Hybridisierungskammer in einem Wärmeschrank. Nach der Hybridisierung wird das Deckglas durch leichtes Schwenken des Slides in einer mit Wasser gefüllten Küvette abgelöst. Die Slides werden in eine Glasküvette überführt und mit 100 ml Waschpuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS) bei 46°C auf einem Schüttler für 10 min gewaschen. Im Anschluss werden sie kurz mit Wasser abgespült und erneut mit Luft getrocknet. Die Slides können nach der Hybridisierung von endmarkierten PCR-Produkten sofort mit einem Fluoreszenzscanner (Axon), bei einer PMT von 500 im Cy3-Kanal und 750 für den Cy5-Kanal, gescannt werden.

[0110] Für PCR-Produkte, die Psoralen-PEO-Biotin markiert werden, erfolgt eine Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (Zytomed). Dazu wird der getrocknete Slide mit 100 µl STV-Cy5 Detektionslösung inkubiert, die 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS und 80 pmol Streptavidin-Cy5 enthält. Der Slide wird mit einem Deckglas abgedeckt. Die Anbindung des Streptavidin an die biotinylierte DNA oder RNA findet für 20 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln statt. Das Deckglas wird nach der Inkubation mit einer wassergefüllten Küvette durch vorsichtiges Schwenken entfernt und der Pico-Slide für 10 min mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Der Slide wird mit Luftdruck getrocknet und mit den oben beschriebenen Einstellungen am Axonscanner gescannt.

[0111] Im Anschluss an die Hybridisierungsreaktion wird das Produkt mit Streptavidin-Cy-5 in Verbindung gebracht, was eine Kopplung von Streptavidin und Biotin zur Folge hat. Danach wird der Mikroarray in einem Fluoreszenzscanner analysiert, in dem sich der Farbstoff Cy-5 an den Stellen auf dem Mikroarray nachweisen lässt, an denen sich Sonden befinden, die mit DNA aus der Probe Hybride gebildet haben. Da die Nukleotidsonden so ausgewählt sind, dass sie spezifisch für den Nachweis bestimmter Sequenzen sind, die wiederum spezifisch für das Gen sind, in dem sie enthalten sind, und der Anwender des Verfahrens weiß, wo sich auf dem Mikroarray welche Sonde befindet, ermöglicht die Detektion eines Fluoreszenzsignals eine Aussage darüber, ob ein bestimmtes Gen in der Probe vorhanden ist. In diesem Zusammenhang sind beliebige andere Markierungen denkbar, jedoch hat es sich erwiesen, dass die Markierung mittels Psoralen-Biotin und anschließende Kopplung an Farbstoff aufweisendes Streptavidin sehr hohe Signalintensitäten bewirkt, was erfindungsgemäße Verfahren wirtschaftlich besonders attraktiv erscheinen lässt, weil es hierdurch bei der Probenaufbereitung nicht unbedingt erforderlich ist, kostspielige Amplifikationsverfahren durchzuführen. Lediglich in Einzelfällen kann es notwendig sein, die Konzentration der Ausgangs-DNA in der Probe mittels PCR-Amplifikation zu erhöhen. Sollte die Signalintensität nicht ausreichend sein, so lässt sich darüber hinaus nach der Kopplung eines Streptavidin-Enzym-Komplexes an das Biotin eine Tyramidsignalamplifikation auf dem DNA-Mikroarray durchführen, die im Vergleich zu PCR-Amplifikationen erheblich einfacher und kostengünstiger zu bewerkstelligen ist. In diesem Fall lässt sich vorteilhaft Streptavidinmeerrettich-Peroxidasekonjugat einsetzen. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid lässt sich das Enzym aktivieren, wodurch sich das Tyramid, ein inaktives Substrat, in ein aktives Substrat umsetzen lässt. Dabei entstehen hochreaktive Tyramid-Intermediate, die an Proteine oder an das Enzym selbst binden können. Die Tyramid-Moleküle lassen sich mit einem Farbstoff koppeln wie zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoff Cy-5 oder FITC, um die Signalamplifikation detektieren zu können.

[0112] Als vorteilhaft hat sich auch die Möglichkeit erwiesen, rRNA mittels Psoralen-Biotin zu markieren – im Gegensatz zur Hybridisierung genomischer DNA kann hier bei geringen Konzentrationen auf eine Steigerung der Signalintensität durch Fragmentierung verzichtet werden, da native RNA-Moleküle hybridisiert werden, die typischerweise Längen von ~ 100-2300 Basenpaare aufweisen.

[0113] Die Wahl von Psoralen-Biotin als Markierungsmittel ist gegenüber anderen Verfahren, wie zum Beispiel Random-geprimtes Labeling oder Nick-Translation sehr viel kostengünstiger, da der Farbstoff nicht über

markierte, sehr teuere Nukleotide eingeführt werden muß.

[0114] Alternative Markierungsmethoden sind unter anderem:
– enzymatische Markierungsmethoden:
Random geprimte Markierung, Einführung von markierten Nukleotiden durch Nick-Translation, Markierung mittels Terminaler Transferase,
– Markierung während einer PCR-Reaktion:
Einsatz von markierten Primern oder Einbau von markierten Nukleotiden,
– chemische Markierungsmethoden:
Anbindung eines Platin-Farbstoff-Komplexes an das Guanin in DNA oder RNA,
– photochemische Markierungsmethoden:
Verwendung von photoreaktiven Substanzen wie
– Coumarin-Verbindungen (ähnlich der hier verwendeten Psoralen-Markierung),
– Acridin-Farbstoffe,
– Phenanthroline,
– Phenazine,
– Phenothiazine.

[0115] Mit oder ohne zusätzlicher Signalamplifikation durch Multiplex-PCR-Reaktionen oder enzymatischer Signalverstärkung lässt sich das Verfahren vorteilhaft einsetzen zum Nachweis von Phagenresistenzgenen in Starterkulturen aber auch zum Nachweis von Phagen in Edukten oder Zwischenprodukten, ebenso wie es einsetzbar ist zum Nachweis von unerwünschten Organismen in Starterkulturen, Edukten, Zwischenprodukten oder einfach in Medien, die mit dem Produkt oder seinem Vorläufer irgendwann in Berührung kommen.

[0116] Im folgenden wird die Erfindung in Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Ausführungbeispiel 1 Chipherstellung, Sondenpositionierung

[0117] Für die Hybridisierung der PCR-Produkte und der genomischen DNA auf DNA-Microarrays werden Slides verwendet, an die aminomodifizierte Oligonukleotide kovalent gebunden werden können, z.B. Slides, die eine Phenyldiisothiocyanat (PDITC) Oberfläche besitzen. Die Sonden (siehe Fig. 3) werden mit einer 5'C6-Aminolink Modifikation bestellt und in Wasser aufgenommen (100 µM Stammlösung). Die Sondenoligonukleotide werden mit Wasser auf 10 µM verdünnt. Mit einem Spotter werden die Sonden, in einer Arraygröße von 6 × 4 Spots, auf einen Slide aufgebracht und immobilisiert. Die Anzahl der Arrays auf den einzelnen Slides ist variabel. Nach dem Aufbringen der Sonden erfolgt die kovalente Sondenanbindung für 24 Stunden in einer feuchten Kammer, bevor die freien reaktiven Gruppen auf dem Slide nach den Angaben des Herstellers in einem Blockierungsschritt deaktiviert werden. Unter Argon Schutzgas werden die Slides luftdicht in Slideboxen eingeschweißt. Die Lagerung der Chips erfolgt bei –20°C mit einer maximalen Haltbarkeit von 3 Monaten.

Ausführungbeispiel 2 Hybridisierungsprotokoll 1

[0118] Die blockierten Slides werden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und in 25 ml Prähybridisierungspuffer (2 mg/ml BSA, 500 µg/ml Heringssperma, 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,01 % SDS) für eine Stunde bei 48°C prähybridisiert. Die Slides werden nach dem Prähybridisieren kurz mit Wasser abgespült und mit Luftdruck getrocknet. Die markierte DNA und RNA wird in 2x Hybridisierungspuffer aufgenommen und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Endkonzentration des Hybridisierungspuffers beträgt 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) und 0,01 % SDS. Die Probenlösung wird 10 min bei 95°C denaturiert, für 10 min auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wird die Probe mittig auf den Slide pipettiert. Der Slide wird mit einem Deckglas versehen, so dass sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilen kann. Es folgt eine Hybridisierung für 1-2 Stunden bei 46°C in einer feuchten Hybridisierungskammer in einem Wärmeschrank. Nach der Hybridisierung wird das Deckglas durch leichtes Schwenken des Slides in einer mit Wasser gefüllten Küvette abgelöst. Die Slides werden in eine Glasküvette überführt und mit 100 ml Waschpuffer bei 46°C auf einem Schüttler für 10 min gewaschen. Im Anschluss werden sie kurz mit Wasser abgespült und erneut mit Luft getrocknet. Die Slides können nach der Hybridisierung von endmarkierten PCR-Produkten sofort mit einem Fluoreszenzscanner (Axon), bei einer PMT von 500 im Cy3-Kanal und 750 für den Cy5-Kanal, gescannt werden.

[0119] Für PCR-Produkte, die Psoralen-PEO-Biotin markiert wurden, erfolgt eine Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (Zytomed). Dazu wird der getrocknete Slide mit 100 µl STV-Cy5 Detektionslösung inkubiert, die 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS und 80 pmol Streptavidin-Cy5 enthält. Der Slide wird mit einem Deckglas abgedeckt. Die Anbindung des Streptavidin an die biotinylierte DNA und RNA findet für 20 min bei

RT im Dunkeln statt. Das Deckglas wird nach der Inkubation mit einer wassergefüllten Küvette durch vorsichtiges Schwenken entfernt und der Slide für 10 min mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Der Slide wird mit Luftdruck getrocknet und mit den oben beschriebenen Einstellungen am Axonscanner gescannt.

Ausführungbeispiel 3 Hybridisierungsprotokoll 2

[0120] Für die Hybridisierung von genomischer DNA wird das Hybridisierungsprotokoll variiert. Die extrahierte, fragmentierte und markierte DNA wird mit einem GeneFrame (AP-Gene) auf einen prähybridisierten Slide für 20 Stunden hybridisiert [900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS und 0,5 µg/µl BSA]. Das Volumen wird durch den Geneframe auf 70 µl reduziert. Anschließend erfolgt ein Waschschritt mit dem Waschpuffer II [900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 % SDS und 4 Milchpulver] bei 46°C auf einem Schüttler für 10 min. Der Hybridisierungsnachweis erfolgt mit 35 µl STV-Cy5 Detektionslösung, die 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS und 29 pmol Streptavidin-Cy5, enthält. Die Detektionslösung wird auf den Array pipettiert, mit einem Deckglas (24 mm × 24 mm) abgedeckt und 20 min bei RT inkubiert. Das Deckglas wird mit einer wassergefüllten Küvette vorsichtig durch Schwenken entfernt und der Slide für 10 min mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Der Slide wird wie im Ausführungsbeispiel 2 beschrieben getrocknet.

Ausführungsbeispiel 4 Nachweis von rDNA-Genen durch Markierung mit Psoralen-Biotin bei der Hybridisierung mit genomischer DNA

[0121] Die Nachweisgrenze der rDNA-Gene, bei der direkten Hybridisierung von genomischer DNA, wird durch die Hybridisierung von unterschiedlichen Mengen von genomischer DNA aus Lactococcus lactis ssp. cremoris bestimmt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 2 beschrieben. Der DNA-Gehalt wird nach dem Fragmentieren gemessen und 5, 10 bzw. 15 µg genomische DNA mit Psoralen-PEO-Biotin markiert.

[0122] Wie aus der Fig. 7 zu erkennen ist, zeigen die eingesetzten Mengen von 10 und 15 µg gDNA bei allen Sonden Hybridisierungssignale. Bei der Hybridisierung von 5 µg genomischer DNA, kann für die Sonde EUB338 kein Hybridisierungssignal mehr detektiert werden. Die restlichen Sonden weisen bei dieser Menge noch schwache Signale auf. Die Nachweisgrenze für die Detektion der rDNA-Gene liegt bei ca. 5 µg genomische DNA. Für die Detektion von Bakterien sollte demnach mindestens 5 µg genomische DNA eingesetzt werden, um noch Hybridisierungssignale messen zu können.

Ausführungsbeispiel 5 Signalverstärkung mittels TSA

[0123] Für die Signalverstärkung mit TSA auf dem DNA-Microarray wird genomische DNA wie im Ausführungsbeispiel 3 beschrieben vorbereitet. Auf die Prähybridisierung und das BSA in der Hybridisierungslösung wird verzichtet. Die Hybridisierungslösung enthält dafür 1 % Blockierungsreagenz (Roche). Die Hybridisierung erfolgt im Geneframe für 18 Stunden bei 46°C auf dem Slide. Anschließend erfolgt ein 10 minütiger Waschschritt bei 46°C im Waschpuffer. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt mit 35 µl STV-HRP Detektionslösung pro Subarray, die 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,01 % SDS und 1,4 µg Streptavidin-HRP (Zymed) enthält. Die Detektionslösung wird auf den Array pipettiert, mit einem Deckglas (24 mm × 24 mm) abgedeckt und 20 min bei RT inkubiert. Der Slide sollte ab diesem Zeitpunkt nicht mehr trocken fallen. Das Deckglas wird entfernt und der Slide für 10 min im Waschpuffer bei RT gewaschen. Im Anschluss erfolgt ein Pufferaustausch für die Signalamplifikation für 5 min auf einem Schüttler in 1x PBS. Anschließend wird auf den nassen Slide 25 µl des frisch angesetzten TSA-Amplifikationspuffers pipettiert, der durch die Zugabe von 1 µl Tyramid-Cy5 (Perkin-Elmer) und 10 µl der H_2O_2 Lösung (5 µl 30% H_2O_2 in 1000 µl PBS) zu 1000 µl Amplifikationspuffer hergestellt wurde. Der Slide wird mit einem Deckglas für 15 min bei 37°C in einer feuchten Kammer (Hybridisierungskammer) inkubiert. Das Deckglas wird entfernt und es folgt ein fünfminütiger Waschritt bei RT in 1x PBS auf einem Schüttler. Der Slide wird wie im Ausführungsbeispiel 2 beschrieben getrocknet und gescannt.

Ausführungsbeispiel 6 Signalverstärkung durch Multiplex-PCR als Alternative bzw. zusätzliche Signalamplifikation zu TSA

[0124] Eine Vervielfältigung der Phagenresistenzgene der Gruppe I-III in 28 Uniplex-PCR-Reaktionen ist für den Einsatz in der Routineanalytik nicht geeignet und wird daher durch die Verwendung von vier Primerpaaren in einer Multiplex-PCR vereinfacht (Fig. 4a-Fig. 4e). Hierfür wird die DNA mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit, laut dem Protokoll für Gram-positive Bakterien von Qiagen, extrahiert. Die DNA wird mit Aqua dest. von der Säule eluiert. Die gleichzeitige Amplifikation von bis zu 4 Phagenresistenzgenen erfolgt mit 30 PCR-Zyklen. 50 µl eines Multiplex-PCR Ansatzes enthält 800 ng aufgereinigte DNA, 3 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl

pH 9,0, je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 1 Unit Taq-Polymerase (Pharmacia), sowie je 0,2 µM Primer. Die für die Multiplex-PCR verwendeten Primerkombinationen sind in Fig. 4f dargestellt.

[0125] Die Multiplex-PCR Produkte werden anschließend gepoolt, mit dem Qiagen Purification Kit aufgereinigt und mit TE-Puffer eluiert. Die Markierung wird mit Psoralen-PEO-Biotin durchgeführt.

[0126] Beispielhaft wurden die Starterkulturen Probat 505 und Probat 8/0 untersucht. Da bis zu vier Primerpaare in einem Reaktionsansatz verwendet werden, ist eine Identifizierung der Produkte im 3%igen Agarosegel nicht mehr eindeutig, da sich die PCR-Produkte nur um wenige Basenpaare unterscheiden. Alle vorhandenen Banden liegen im Bereich zwischen 385 und 550 Basenpaaren. Die korrekte Amplifikation, und somit der Nachweis der Gene in den Starterkulturen, wird mit dem DNA-Microarray überprüft. Die Multiplex-PCR Ansätze der Starterkulturen werden vor der Aufreinigung vereinigt, mit Psoralen-PEO-Biotin markiert und komplett auf den DNA-Microarray hybridisiert.

[0127] Das Hybridisierungsergebnis der Multiplex-PCR Ansätze der Starterkultur Probat 505 ist in Fig. 10 dargestellt. Für die spezifischen Sonden der Phagenresistenzgene der Gruppe I-III können Hybridisierungssignale zwischen 1000 und 53000 absoluten Signalintensitäten gemessen werden. Die Sonden EpsC S1, EpsC S2, Inj Pip S1, Inj Pip S2, LlaI R S1, Lla1403 S2, LlaCI S1 und LlaDII S1 zeigen schwächere Hybridisierungssignale (Fig. 10). Für die Sonden LlaKRII S1, LlaKRII S2 und LlaFI S1 können keine Hybridisierungssignale detektiert werden. Diese Gene können in der PCR ebenfalls nicht detektiert werden. Somit wurden keine falsch-positiven oder falschnegativen Hybridisierungsereignisse gemessen. Im Vergleich zur direkten Hybridisierung von genomischer DNA der Starterkultur Probat 505, bei der nur 5 Phagenresistenzgene nachgewiesen werden, können durch den Einsatz der Muliplex-PCR mit anschließender Hybridisierung auf dem DNA-Microarray alle in der Starterkultur vorhandenen Phagenresistenzgene der Gruppe I-III nachgewiesen werden.

[0128] Die Hybridisierung der Multiplex-PCR Ansätze der Starterkultur Probat 8/0 führt ebenfalls zu positiven Ergebnissen. Wie aus der Fig. 11 zu erkennen ist, können Hybridisierungssignale zwischen 850 und 47000 absoluten Signalintensitäten gemessen werden. Für die Sonde LlaDII S1 und LlaDII S2, LlaKRII S1 und LlaKRII S2, Inj-Pip S1 und Inj-Pip S2, LlaFI S1, LlaBI S1 und LlaBI S2 können keine Hybridisierungssignale detektiert werden. Die Ergebnisse der Multiplex-PCR mit anschließender Hybridisierung stimmen mit den Ergebnissen der Uniplex-PCR für die Starterkultur Probat 8/0 überein. Somit traten keine falsch-positiven oder falsch-negativen Hybridisierungsereignisse auf. Es können alle 7 vorhandenen Phagenresistenzgene detektiert werden, während bei der direkten Hybridisierung von genomischer DNA nur 5 Gene ermittelt werden können.

[0129] Der Nachweis der Phagenresistenzgene kann mit der Multiplex-PCR mit anschließender Hybridisierung auf dem DNA-Microarray demnach im Vergleich zur Uniplex-PCR für beide Starterkulturen korrekt gezeigt werden. Die parallele Amplifizierung mit den eingesetzten Primer-Paaren ist spezifisch.

[0130] Da alle Gene erfolgreich in den 7 Multiplex-PCR Ansätzen amplifiziert und mit dem DNA-Microarray nachgewiesen werden können, erweist sich der Einsatz der Multiplex-PCR als eine sensitive Alternative zur direkten Hybridisierung von genomischer DNA, setzt aber eine Amplifikation über die PCR voraus.

Ausführungsbeispiel 7 Vergleichsbeispiel mit/ohne TSA (Tyramid Signalamplifikation)

[0131] Um funktionelle Gene auch bei geringen Konzentrationen ohne PCR-Amplifikation nachweisen zu können, wird die Einsatzfähigkeit der Tyramid Signalamplifikation zur Steigerung der Sensitivität des DNA-Microarrays getestet. Es werden je 10 µg genomische DNA der Starterkultur Probat 505 auf dem DNA-Microarray hybridisiert. Um die Signalamplifikation messen zu können, wird eine Hybridisierung ohne Signalamplifikation mit Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (analog Ausführungsbeispiel 4) und parallel dazu eine zweite Hybridisierung mit Signalamplifikation unter Verwendung von Streptavidin-HRP und Tyramid-Cy5 durchgeführt (analog Ausführungsbeispiel 5). Die Ergebnisse der Hybridisierung sind in Fig. 5 und Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Fig. 5 zu erkennen ist, können die Signalintensitäten mit Signalamplifikation mindestens um einen Faktor zehn, im Vergleich zu den Signalintensitäten ohne Signalamplifikation, gesteigert werden.

[0132] Für die Sonden EUB338 und Lll68 können ohne Signalamplifikation schwache Signalintensitäten von 425 bzw. 621, mit Signalamplifikation stärkere Signale von 2000 bis 4300 detektiert werden. Die Signalintensität der Sonde LGCc354 erhöht sich von 1400 auf 12000 absolute Signalintensitäten. Für die Sonde Lla271 und Llc68 können die höchsten Signalamplifikationen festgestellt werden. Die Signale erhöhen sich von 6600 auf 37000 für die Sonde Lla271 bzw. von 12500 auf 60100 für die Sonde Llc68.

Ausführungsbeispiel 8 Markierung, Hybridisierung und Nachweis von rRNA

[0133] Zur Überprüfung, ob sich die Psoralen-PEO-Biotin Markierungsmethode auch für den Nachweis von rRNA eignet, wird RNA aus der Starterkultur Probat 8/0 extrahiert. 5 µg RNA wird mit Psoralen-PEO-Biotin markiert und auf dem DNA-Microarray für 2 Stunden hybridisiert. Im Gegensatz zur Hybridisierung von genomischer DNA, kann bei der Hybridisierung von RNA auf die Fragmentierung verzichtet werden, da native RNA-Moleküle hybridisiert werden (ca. 100-2300 Basenpaare).

[0134] Wie aus der Fig. 8 zu entnehmen ist, führt die Hybridisierung von RNA, zu positiven Hybridisierungssignalen der 16S und 23S rRNA-Sonden. Für die 23S Sonde Lla271 können die deutlichsten Hybridisierungssignale und für die Sonden EUB338 und Lll68 die schwächsten Signale gemessen werden. Mittlere Signalintensitäten können für die Sonden Llc68 und LGCc354 detektiert werden. Die Psoralen-PEO-Biotin Markierungsreaktion kann somit ebenfalls für die Markierung von rRNA verwendet werden und wäre für den Nachweis von Bakterien eine Alternative.

[0135] Die vorliegende Erfindung wurde unter Verwendung eines Mikroarrays und unter Verwendung bestimmter Kopplungsreagenzien und Markierungsreagenzien erläutert. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht darauf beschränkt, im Zusammenhang mit Hybridisierungsarrays bzw. Mikroarrays verwendet zu werden. Ebenso lassen sich andere als die beschriebenen Markierungsreagenzien einsetzen, um die Erfindung durchzuführen. So lassen sich andere Farbstoffe als Cy-5 verwenden, oder aber Markierungsreagenzien, die auf andere Art und Weise detektiert werden als mittels Fluoreszenzanregung. Die Tatsache, dass die Erfindung besonders vorteilhaft mit genomischer DNA oder rRNA durchgeführt werden kann, bedeutet nicht, dass Verfahren nach der vorliegenden Erfindung nicht auch mit anders aufbereiteten Proben als oben beschrieben durchgeführt werden können. Die obigen Ausführungsbeispiele und die obige Beschreibung der Erfindung sollen dem Fachmann die Erfindung lediglich erklären und erläutern, und ihm eine nachvollziehbare Anleitung zur Durchführung der Erfindung geben. Sie sind daher nicht beschränkend auszulegen.

[0136] Das beiliegende Sequenzprotokoll enthält die in Fig. 3 gezeigten Sonden in der selben Reihenfolge.

Literaturliste

1. Alatossava, T. und T. R. Klaenhammer (1991) Molecular characterization of three small isometric-headed bacteriophages which van in their sensitivity to the lactococcal phage resistance plasmid pTR2030. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1346-1353.
2. Allison, G. E. und T. R. Klaenhammer (1998) Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 8: 207-226.
3. Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chrisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S RRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925.
4. Amann, R., F. O. Glöckner und A. Neef (1997) Modern methods in subsurface microbiology – in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. 20: 191-200.
5. Andresen, A., A. Geis, U. Krusch und M. Teuber (1984) Plasmid profiles of mesophilic dairy starter cultures. Milchwissenschaften 39: 140-143.
6. Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto und K. Hiramatsu (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired Staphylococcus aureus MRSA. Lancet 359: 1819-1827.
7. Bavykin, S.G., Akowski, J.P., Zakhariev, V.M., Barsky, V.E., Perov, A.N., Mirzabekov, A.D. (2001) Portable System for Microbial Pample Preparation and Oligonucleotide Microarray Analysis. App. Environ. Microbiol., 922-928.
8. Beck, H. (2002) Übersicht über pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln. Vortrag bei der Tagung "Molekularbiologische Nachweismethoden für pathogene Mikroorganismen" des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, 1./2. Juli.
9. Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig,W., Schleifer, K.H. (1993) In situ identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. Syst. Appl. Microbiol 16, 450-456.
10. Bekal-si Ali, S., C. Divies und H. Prevost (1999) Genetic organization of the citC-DEF locus and identification of mae and clyR genes from Leuconostoc mesenteroides. J. Bacteriol. 181: 4411-4416.
11. Benson, K. H., J. J. Godon, P. Renault, H. G. Griffin und M. J. Gasson (1996) Effect of ilvBN-encoded a-acetolactate synthase expression on diacetyl production in Lactococcus lactis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 107-111.
12. Beresford, T. P. J., L. J. H. Ward und A. W. Jarvis (1993) Temporally regulated transcriptional expression

of the genomes of lactococcal bacteriophages c2 and sk1. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3708-3712.
13. Bidnenko, E., D. Ehrlich und M. C. Chopin (1995) Phage operon involved in sensitivity to the Lactococcus lactis abortive infection mechanism abiD1. J. Bacteriol. 177: 3824-3829.
14. Boldt, L. (1999) Methodische Untersuchungen im Vorfeld der Entwicklung miniaturisierter DNA-analytischer Verfahren. Dissertation, Universität Bremen.
15. Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich und A. Sorokin (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403. Genome Res. 11: 731-753.
16. Boucher, I., E. Emond, E. Dion, D. Montpetit und S. Moineau (2000) Microbiological and molecular impacts of AbiK on the lytic cycle of Lactococcus lactis phages of the 936 and P335 species. Microbiology UK 146: 445-453.
17. Braun, J. V., S. Hertwig, H. Neve, A. Geis und M. Teuber (1989) Taxonomic differentiation of bacteriophages of Lactococcus lactis by electron microscopy, DNA-DNA hybridization and protein profiles. J. General Microbiol. 135: 2551-2560.
18. Brondsted, L., S. Ostergaard, M. Pedersen, K. Hammer und F. K. Vogensen (2001) Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. Virology 283: 93-109.
19. Case-Green, S. C., K. U. Mir, C. E. Pritchard und E. M. Southern (1998) Analysing genetic information with DNA arrays. Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 404-410.
20. Chandry, P., B. Davidson und A. Hillier (1994a) Temporal transcription map of the Lactococcus lactis bacteriophage sk1. Microbiology 140: 2251-2261.
21. Chandry, P., S. Moore, B. E. Davidson and A. Hillier (1994b) Analysis of the cos region of the Lactococcus lactis bacteriophage sk1. Gene 138: 123-126.
22. Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris and S. P. A. Fodor (1996) Accessing genomic information with high-density arrays. Science 274: 610-614.
23. Chopin, A., A. Bolotin, A. Sorokin, S. D. Ehrlich and M.-C. Chopin (2001) Analysis of six prophages in Lactococcus lactis IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. Nucl. Acids Res. 25: 644-651.
24. Coffey, A., D. Stokes, G. F. Fitzgerald and R. P. Ross (2001) Traditional and molecular approaches to improving bacteriophage resistance of Cheddar and Mozzarella cheese starters. Irish J. Agricul. Food Res. 40: 239-270.
25. Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchisalvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. C. Rea and E. Rodriquez (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res. 64: 409-421.
26. Crutz-Le Coq, A.-M., B. Cesselin, J. Commissaire and J. Anba (2002) Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. Microbiology 148: 985-1001.
27. Daly, C. (1983) The use of mesophilic cultures in the dairy industry. A. v. Leeuwenhook Int. J. Gen. M. 49: 297-312.
28. Daly, C., G. F. Fitzgerald and R. Davis (1996) Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M. 70: 99-110.
29. Davidson, B. E. and A. J. Hillier (1995) Developing new starters for fermented milk products. Aust. J. Dairy Technol. 50: 6-9.
30. Davies, F. L., N. M. Underwood and M. J. Gasson (1981) The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between Streptococcus lactis 712, ML3 and C2. J. Appl. Bacteriol. 51: 325-337.
31. de Risi, J. L., V. R. Iyer and P. O. Brown (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression patterns with a complementary DNA microrarray. Science 270: 680-686.
32. de Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck and J. Mous (1998) Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 16: 45-48.
33. Deng, Y. M., M. L. Harvey, C. Q. Liu and N. W. Dunn (1997) A novel plasmidencoded phage abortive infection system from Lactococcus lactis biovar. diacetylactis. FEMS Microbiol. Lett. 146: 149-154.
34. Deng, Y. M., C. Q. Liu and N. W. Dunn (1999) Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive infection system, AbiL, from Lactococcus lactis. J. Biotechnol. 67: 135-149.
35. Dinsmore, P. K. and T. R. Klaenhammer (1994) Phenotypic consequences of altering the copy number of abiA, a gene responsible for aborting bacteriophage infections in Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1129-1136.
36. Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer and J. M. Trent (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. Suppl. Nat. Genet. 21: 10-14.
37. Durmaz, E., D. L. Higgins and T. R. Klaenhammer (1992) Molecular characterization of a 2nd abortive phage

resistance gene present in Lactococcus lactis subsp. lactis ME2. J. Bacteriol. 174: 7463-7469.
38. Durmaz, E. and T. R. Klaenhammer (1995) A starter culture rotation strategy incorporating paired restriction/modification and abortive infection bacteriophage defenses in a single Lactococcus lactis strain. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1266-1273.
39. Emond, E., B. Holler, I. Boucher, P. Vandenbergh, E. Vedamuthu, J. Kondo and S. Moineau (1997) Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism abiK from Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1274-1283.
40. Emond, E., E. Dion, S. A. Walker, E. R. Vedamuthu, J. K. Kondo and S. Moineau (1998) AbiQ, an abortive infection mechanism from Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4748-4756.
41. Ferea, T. L. and P. O. Brown (1999) Observing the living genome. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 715-722.
42. Forde, A. und G. F. Fitzgerald (1999a) Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid pCI658 isolated from Lactococcus lactis ssp. cremoris HO2. Int. Dairy J. 9: 465-472.
43. Forde, A. und G. F. Fitzgerald (1999b) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. A. v. Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 76: 89-113.
44. Garde, S., M. Babin, P. Gaya, M. Nunez und M. Medina (1999) PCR amplification of the gene acmA differentiates Lactococcus lactis subsp. lactis and L. lactis subsp. cremoris. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5151-5153.
45. Garvey, P., G. F. Fitzgerald und C. Hill (1995a) Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4321-4328.
46. Garvey, P., D. van Sinderen, D. P. Twomey, C. Hill und G. F. Fitzgerald (1995b) Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defense systems in the genus Lactococcus. Int. Dairy J. 5: 905-947.
47. Garvey, P., C. Hill und G. F. Fitzgerald (1996) The lactococcal plasmid pNP40 encodes a 3rd bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. Appl. Environ. Microbiol. 62: 676-679.
48. Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. Entian, H. Fsihi, F. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland und P. Cossart (2001) Comparative genomics of Listeria species. Science 294: 849-852.
49. Glöckner, F. O. (1998) Phylogenie und in situ-Identifizierung von Prokaryoten in limnischen und marinen Ökosystemen. Doktorarbeit, Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, München.
50. Harrington, C. A., C. Rosenow und J. Retief (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. Curr. Opin. Microbiol 3: 285-291.
51. Hill, C. (1993) Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 87-108.
52. Hugenholtz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 165-178.
53. Huggins, A. R. (1984) Progress in dairy starter culture technology. Food Technol. 38: 41-50.
54. Hull, R. R. (1977) Methods for monitoring bacteriophage in cheese factories. Aust. J. Dairy Technol. 32: 63-64.
55. Hunger, W. (1986) Bakteriophagen in der milchverarbeitenden Industrie. Deutsche Molkerei-Zeitung DMZ 51/52: 1762-1769.
56. Jansen, G.J., Mooibroek, M., Idema, J., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Degener, J.E. (2000) Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. J. Clin. Microbiol., 814-817.
57. Jarvis, A. W., G. F. Fitzgerald, M. Mata, A. Mercenier, H. Neve, I. B. Powell, C. Ronda, M. Saxelin and M. Teuber (1991) Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirology 32: 2-9.
58. Jarvis, A. W., M. W. Lubbers, N. R. Waterfield, L. J. Collins and K. M. Polzin (1995) Sequencing and analysis of the genome of lactococcal phage c2. Int. Dairy J. 5: 963-976.
59. Kao, C. and L. Snyder (1988) The lit gene product which blocks bacteriophage T4 late gene expression is a membrane protein encoded by a cryptic DNA element e14. J. Bacteriol. 170: 2056-2062.
60. Kempler, G. M. and L. L. MacKay (1979) Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in Streptococcus lactis ssp. diacetylactis: evidence for plasmid-linked citrate utilization. Appl. Environ. Microbiol. 37: 316-323.
61. Klaenhammer, T. R. and G. F. Fitzgerald (1994) Bacteriophages and bacteriophage resistance, p. 106-108, in M. J. Gasson and W. M. de Vos, eds. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
62. Klijn, N., A. H. Weerkamp und W. M. Devos (1995) Detection and characterization of lactose-utilizing Lactococcus spp. in natural ecosystems. Appl. Environ. Microbil. 61: 788-792.

63. Konings, W. N., J. Kok, O. P. Kuipers und B. Poolman (2000) Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium [Review]. Curr. Opin. Microbiol. 3: 276-282.
64. Krämer, J. (1997) Lebensmittelmikrobiologie. 3rd. Ulmer, Stuttgart.
65. Kuhl, S. A. und L. L. McKay (1979) Plasmid profiles of lactose-negative and proeinase-deficient mutants of Streptococcus lactis C10, ML3 and M18. Appl. Environ. Microbiol. 37: 1193-1195.
66. Labrie, S. und S. Moineau (2000) Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 66: 987-994.
67. Labrie, S. und S. Moineau (2002) Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: demonstration of phage heterogeneity within the P335 quasi-species of lactococcal phages. Virology 269: 308-320.
68. Landers, E. (1999) Array of hope. Suppl. Nat. Genetics 21: 3-4.
69. Lee, P. S. und K. H. Lee (2000) Genomic analysis. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 171-175.
70. Lembke, J. und M. Teuber (1981) Inaktivierung von Bakteriophagen durch Desinfektionsmittel. Deutsche Molkerei-Zeitung 102: 2-6.
71. Levitz, R., D. Chapman, M. Amitsur, R. Green und L. Snyder (1990) The optional E. coli prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. EMBO J. 9: 1383-1389.
72. Lubbers, M. W., N. R. Waterfield, T. P. J. Beresford, R. W. F. Lepage und A. W. Jarvis (1995) Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage C2 genome and identification of the structural genes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4348-4356.
73. Magni, C., F. L. Defelipe, F. Sesma, P. Lopez und D. Demendoza (1994) Citrate transport in Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis – expression of the plasmid-borne citrate permease citP. FEMS Microbiol. Lett. 118: 75-82.
74. Martin, M., M. A. Corrales, D. de Mendoza, P. Lopez and C. Magni (1999) Cloning and molecular characterization of the citrate utilization citMCDEFGRP cluster of Leuconostoc paramesenteroides. FEMS Microbiol. Lett. 174: 231-238.
75. McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston and R. K. Wilson (2001) Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar. typhimurium LT2. Nature 413: 852-856.
76. McKay, L. L. and K. A. Baldwin (1990) Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 3-14.
77. Meier, H. (1996) Nachweis von Fäkalstreptokokken mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden zur Anwendung in der hygienischen Trinkwasserkontrolle. Dissertation. Technische Universität München.
78. Moineau, S., J. Fortier, H. W. Ackermann and S. Pandian (1992) Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. Can. J. Microbiol. 38: 875-882.
79. Moineau, S., E. Durmaz, S. Pandian and T. R. Klaenhammer (1993a) Differentiation of two abortive mechanisms by using monoclonal antibodies directed toward lactococcal bacteriophage capsid proteins. Appl. Environ. Microbiol. 59: 208-212.
80. Moineau, S., S. A. Walker, E. R. Vedamuthu and P. A. Vandenbergh (1995a) Cloning and sequencing of LlaII restriction-modification genes from Lactococcus lactis and relatedness of this system to the Streptococcus pneumoniae DpnII system. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2193-2202.
81. Moineau, S., M. Borkaev, B. J. Holler, S. A. Walker, J. K. Kondo, E. R. Vedamuthu and P. A. Vandenbergh (1996) Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. J. Dairy Sci. 79: 2104-2111.
82. Niemeyer, C.M., Burger, W., Hoedemakers, R.M. (1998) Hybridization characteristics of biomolecular adaptors, covalent DNA-streptavidin conjugates. Bioconjug Chem, 9, 168-175.
83. O'Connor, L., M. Tangney und G. F. Fitzgerald (1999) Expression, regulation, and mode of action of the AbiG abortive infection system of Lactococcus lactis subsp. cremoris UC653. Appl. & Environ. Microbiol. 65: 330-335.
84. O'Sullivan, D. J., K. Zagula und T. R. Klaenhammer (1995) In vivo restriction by LlaI is encoded by 3 genes, arranged in an operon with IlaIM, on the conjugative Lactococcus plasmid pTR2030. J. Bacteriol. 177: 134-143.
85. Parma, D. H., M. H. Snyder, S. Sobolevski, M. Nawroz, E. Brody und L. Gold (1992) The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. Genes and Dev. 6.
86. Parreira, R., S. D. Ehrlich und M. C. Chopin (1996a) Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. Mol. Microbiol. 19: 221-230.
87. Pechmann, H. und M. Teuber (1980) Plasmid pattern of group N (lactic) streptococci. Int. J. Microbiol. Hyg. 1: 133-136.
88. Potter, N. N. und F. E. Nelson (1952) Effects of calcium on proliferation of lactic Streptococcus bacteriophages. J. Bacteriol. 64: 105-111.
89. Pringle, C. R. (1996) Virus taxonomy 1996 – a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. Arch. Virol. 141: 2251-2256.

90. Ramos, A., K. N. Jordan, T. M. Cogan und H. Santos (1994) ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1739-1748.
91. Riemelt, I., B. Bartel und M. Malczan (1996) Phageninfektionen in der Milchwirtschaft, p. 172-174, in I. Riemelt, ed. Milchwirtschaftliche Mikrobiologie, Hamburg.
92. Rince, A., M. Tangney und G. F. Fitzgerald (2000) Identification of a DNA region from lactococcal phage sk1 protecting phage 712 from the abortive infection mechanism AbiF. FEMS Microbiol. Lett. 182: 185-191.
93. Rodriguez, E., B. Gonzalez, P. Gaya, M. Nunez und M. Medina (2000) Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. Int. Dairy J. 10: 7-15.
94. Ropkins, K. and A. J. Beck (2000) HACCP in the home: a framework for improving awareness of hygenie and safe food handling with respect to chemical risk. T. Food Sci. Technol. 11: 105-114.
95. Sanders, M. E., P. J. Leonhard, W. D. Sing and T. R. Klaenhammer (1986) Conjugal strategy for construction of fast acid producing, bacteriophage resistant lactic streptococci for use in dairy fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1001-1007.
96. Sandine, W. E. (1977) New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. J. Dairy Sci. 60: 822-828.
97. Schouler, C., S. D. Ehrlich and M. C. Chopin (1994) Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome. Microbiology UK 140: 3061-3069.
98. Schouler, C., F. Clier, A. L. Lerayer, S. D. Ehrlich and M. C. Chopin (1998a) A type IC restriction-modification system in Lactococcus lactis. J. Bacteriol. 180: 407-411.
99. Schouler, C., M. Gautier, S. D. Ehrlich and M. C. Chopin (1998b) Combinational variation of restriction modification specificities in Lactococcus lactis. Mol. Microbiol. 28: 169-178.
100. Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M., Chandler, D.P. (2001) Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays. Appl. Environ. Microbiol., 4708-4716.
101. Snyder, L. (1995) Phage-exclusion enzymes:bonanza of biochemical and cell biology reagents? Mol. Microbiol. 15: 415-420.
102. Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner and T. Conway (1999) Functional genomics: expression analysis of Escherichia coli growing on minimal and rich media. J. Bacteriol. 181: 6425-6440.
103. Teuber, M., A. Geis and H. Neve (1993) The Genus Lactococcus, p. 1508-1534, in A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. H. Harder, and K. H. Schleifer, eds. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York.
104. Twomey, D. P., P. J. De Urraza, L. L. McKay and O. S. DJ (2000) Characterization of AbiR, a novel multicomponent abortive infection mechanism encoded by plasmid pKR223 of Lactococcus lactis subsp. lactis KR2. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2647-2651.
105. van Sinderen, D., H. Karsens, J. Kok, P. Terpstra, M. H. J. Ruiters, G. Venema und A. Nauta (1996) Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. Mol. Microbiol. 19: 1343-1355.
106. Weber, H. (1996) Starterkulturen in der milchverarbeitenden Industrie, p. 105-149, in H. Weber, ed. Mikrobiologie der Lebensmittel. B. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg.
107. Whitehead, H. R. und G. A. Cox (1935) The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 16: 316-320.
108. Wilson, M., J. De Risi, N. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown und G. K. Schoolnik (1999) Exploring drug-induced alternations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 12833-12838.
109. Yuan, R. (1981) Structure and mechanisms of multifunctional restriction endonucleases. Annu. Rev. Biochem. 80: 285-315.
110. Zickrick, K. (1996) Mikrobiologie der Käse, p. 255-352, in H. Weber, ed. Mikrobiologie der Lebensmittel. B. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg

<110> Universität Bremen

<120> Verfahren und Vorrichtung zur Qualitätssicherung in der Mil
chindustrie

<130> DE-5288

<160> 208

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 1
tgatagggtg cttgcgag
18

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 2
aacagctatg accatgatta c
21

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 3
tagggtgctt gcaagtgc
18

<210> 4
<211> 24
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 4
tcctgtgtga aattgttatc cgct
24

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 5
gctgcctccc gtaggagt
18

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 6
gctgcctccc gtaggag
17

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 7
ccgaagattc cctactgc
18

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> probe for DNA-array

<400> 8
ctataatgct taagtccacg
20

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 9
cggtcttgca gctctttg
18

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 10
caactagcac ttgttcttcc
20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 11
ttgagagcaa gctctcaatc
20

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 12

ccgctaactt cttgagagc
19

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 13
cagtcttatg ggcaggtt
18

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 14
gcagttcaaa atgttatccg
20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 15
gggtccatcc ataagtgaca
20

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 16
gaaccatgcg gttcaaaa
18

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 17
ctttggaaga gcaagctct
19

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 18
ccccaactta caggcag
17

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 19
cggagttatc cccaacttac
20

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 20
tagccgaaac catctttca
19

<210> 21
<211> 19

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 21
gagaagcaag cttctcgtc
19

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 22
gctaacatca gagaagcaag c
21

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 23
gcggttcaaa atattatctg g
21

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 24
atgtgcacag ttacttacac atatg
25

<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 25
cactgtctcg cgactcg
17

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 26
tagctaaaca tcactgtctc g
21

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 27
gagaacggtt ttaagagatt ag
22

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequenceprobe for DNA-array

<400> 28
tacaagtacc aaccttcagc
20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 29
tgcaagcacc aatcttcatc
20

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 30
gttagccgtc cctttctg
18

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 31
catgaatcac aaagtggtaa gc
22

<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequenceprobe for DNA-array

<400> 32
gcaaagagca agcttcttc
19

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 33
ctccatcagg cagtttcc
18

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 34
tggtcttgcg acgttatg
18

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequenceprobe for DNA-array

<400> 35
gcaaaggtat taactttact ccc
23

<210> 36
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 36
tcaatgagca aaggtat
17

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 37
attaaccaca acaccttcct c
21

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequenceprobe for DNA-array

<400> 38
tgctgcggtt attaaccac
19

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 39
gtgctgaggt attaaccaca a
21

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 40
aagctgcttc ctgttaccgt
20

<210> 41
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 41
ggacgttatc ccccactat
19

<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 42
cccactacca ggcagatt
18

<210> 43
<211> 19
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 43
tctccctcag gacgtatgc
19

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 44
cattcataaa gtaacctgtc
20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 45
gtattaccgt atatctcgac
20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 46
ttagacttga acgtgataat
20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> probe for DNA-array

<400> 47
ctttggaatg tacaagatat
20

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 48
taccgtatat ctcgacct
18

<210> 49
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 49
tcagtaattt ctccgtct
18

<210> 50
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 50
tccgtcatta ttagaacc
18

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 51

tgctcataaa tcagaact
18

<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 52
aattgaaccg actacata
18

<210> 53
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 53
gcattattct ttgacctt
18

<210> 54
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 54
tcctgattaa acttgctt
18

<210> 55
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 55
ctctgatatt tcttcgca
18

<210> 56
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 56
gctcaatgta accgtaat
18

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 57
ttgttacttc ttcttcaaac
20

<210> 58
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 58
gtcactttag caccttttat
19

<210> 59
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 59
gtcagaaatt gagcattc
18

<210> 60
<211> 21

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 60
tactattctt ctttatctcc t
21

<210> 61
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 61
tgtttcctca atcttttc
18

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 62
tcttctctta cttttgtcac
20

<210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 63
tttcatagca ccgtcata
18

<210> 64
<211> 15
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 64
ctgcgtcagt aatac
15

<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 65
cttttacatc gtgaccttt
19

<210> 66
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 66
taaaaatgct aaagtggtt
19

<210> 67
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 67
tggatagact tacagagga
19

<210> 68
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 68
cgtatcagtc tgcttcgc
18

<210> 69
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 69
cactcacaaa ccagcaag
18

<210> 70
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 70
ttcttgctta ggtttatca
19

<210> 71
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 71
ttggtttatt tatcgttat
19

<210> 72
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 72
cagtgtgctt ccgtaact
18

<210> 73
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 73
actctctcgg tcgctttg
18

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 74
cctgatatat tatttgattt t
21

<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 75
aaggagtact aagtcagata a
21

<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 76
caggacttag tactagaatg a
21

<210> 77

<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 77
acgaatttat tacttattta c
21

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 78
ataataatac gattttagtg a
21

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 79
cagattcctc tagagtagat c
21

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 80
ctatatattg atcgagaaat g
21

<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 81
aacgaattaa gaaaatatta c
21

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 82
atattaatac gatttatatg g
21

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 83
ttatatgacc atgagattat t
21

<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 84
atagaaaaac agctaaatat a
21

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 85
tattaaatac tttggaagaa c
21

<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 86
atttacgata taataagttt g
21

<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 87
gtatattttg atagtggtat g
21

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 88
tatacaatta cccaatatac t
21

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 89
ttataaataa aaaactaacc a

21

<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 90
aagatgtatc tctactagca a
21

<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 91
ctgtagaaaa tctagtaaac c
21

<210> 92
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 92
gtaaaacatg aactaataag a
21

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 93
taatcaagtt aagttcaagt c
21

<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 94
ataattttag tttggtatat g
21

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 95
ctattcatta gaacatccta c
21

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 96
atataacctg atgtaattag a
21

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 97
taagaaataa gctaaataat g
21

<210> 98
<211> 21
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 98
cttaggatat ctatggaata g
21

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 99
atcgaagata atagacacta a
21

<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 100
agtacggtaa taatattgag a
21

<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 101
aaagtagggt taataaagta a
21

<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> probe for DNA-array

<400> 102
tctataactc gaacaataaa c
21

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 103
gtatttcgtt agacagtcta t
21

<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 104
agtcatctac atatcgaact a
21

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 105
tatataactt ccgtcagata c
21

<210> 106
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 106

catttaatac atctctcgta t
21

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 107
agggtagtag ttttttaata a
21

<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 108
agttagtata ggagcaatta a
21

<210> 109
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 109
gtatacttaa tgtgttcatg a
21

<210> 110
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 110
tttctgaatt actatatatg c
21

<210> 111
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 111
ctatatatgc taaaatctaa a
21

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 112
taatgaaagt atttatttgt c
21

<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 113
ttctctttta tatgatcatt c
21

<210> 114
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 114
tacatatttc agtaattacc c
21

<210> 115
<211> 21

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 115
ataagctaat acttctatct g
21

<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 116
atcaccacta tatagatctt t
21

<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 117
ctgtataacc taactacgtt c
21

<210> 118
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 118
tatatatctc cactcatgtt c
21

<210> 119
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 119
tgattcttct catatactca a
21

<210> 120
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 120
gataaacatc ttccatagta t
21

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 121
cagtatcgaa tgtactatct t
21

<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 122
ttctcttagt taagtaatgg t
21

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 123
aatcttaact ttgtatagac c
21

<210> 124
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 124
tattaccgaa ctatatatgt g
21

<210> 125
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 125
atacacatag tataccatgg a
21

<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 126
cgtaaaacta tgactatctc t
21

<210> 127
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> artificial sequence

<400> 127
ttaccttctt ttaaattact c
21

<210> 128
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 128
tcttctactt ctgtgtattt c
21

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 129
ctttattatt ttgttctgat t
21

<210> 130
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 130
ctgttagtaa tttaactgtt c
21

<210> 131
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 131
gaagacctat ttatagattc a
21

<210> 132

<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 132
tataatttca acaatatcat c
21

<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 133
acatctgtat aaagctctaa a
21

<210> 134
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 134
ctagttacta ttcgacttct t
21

<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 135
agtctagtta ctattcgact t
21

<210> 136
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 136
agtatctttc ataatcatag g
21

<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 137
tctcagtatc tttcataatc a
21

<210> 138
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 138
tttatctctt actacttcgt t
21

<210> 139
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 139
taatagtcat accaatgtaa g
21

<210> 140
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 140
caagggtatt atattgaaa
19

<210> 141
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 141
ctaaagttcc aattccta
18

<210> 142
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 142
atttcaacag taccattatc
20

<210> 143
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 143
tctcatcttc ttcaactaat
20

<210> 144
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 144
taacaatagt ataagcggt

19

<210> 145
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 145
aaagttttca tcatcgtc
18

<210> 146
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 146
ctaataaatc aaaaaccc
18

<210> 147
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 147
tgaatatttt gttgctga
18

<210> 148
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 148
tcttcagtat tttcagtatc
20

<210> 149
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 149
aaatgagttt tctccttg
18

<210> 150
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 150
cggcattatt aactacaa
18

<210> 151
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 151
agcattagat ttggattt
18

<210> 152
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 152
ggttcattaa tttcatca
18

<210> 153
<211> 18
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 153
acgttcatca acagaaat
18

<210> 154
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 154
ttgattacta attttgcc
18

<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 155
cttcttgtgc ttttttac
18

<210> 156
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 156
acggatgact tcgatac
17

<210> 157
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> probe for DNA-array

<400> 157
catcaggata agacttgg
18

<210> 158
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 158
ccctcatcta acacattt
18

<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 159
ataccatctt taacagtttt
20

<210> 160
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 160
gttgattttt gttgaggt
18

<210> 161
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 161

tcaatcttta acttcacg
18

<210> 162
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 162
caaggtagta aaacacgt
18

<210> 163
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 163
gatataaaga cccaaaaa
18

<210> 164
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 164
agcttagaca aaattcct
18

<210> 165
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 165
tacgtgagat aagtccag
18

<210> 166
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 166
aaatgtagtg tcttgcagt
19

<210> 167
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 167
cagtcttcgt cagtgaa
17

<210> 168
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 168
caatgtcttc tttagtacg
19

<210> 169
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 169
ttcaaagata aaggttcc
18

<210> 170
<211> 18

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 170
agcagtatca agtggtgt
18

<210> 171
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 171
cagtcatagt caaccacc
18

<210> 172
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 172
tagcatcgat atatccag
18

<210> 173
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 173
tgttcagtaa atgttcca
18

<210> 174
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 174
tgttagcacg aactttag
18

<210> 175
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 175
acgttcagtt aattcttg
18

<210> 176
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 176
attctcaacg tgtttactt
19

<210> 177
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 177
gaagtcatgt tattcgtag
19

<210> 178
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 178
ttagttttat aaaattttag ag
22

<210> 179
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 179
gatttcacga aagagatat
19

<210> 180
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 180
attcagggta gtagttttt
19

<210> 181
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 181
ttaaggtcaa atgttagtaa t
21

<210> 182
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 182
tcggtattac tttatttc
18

<210> 183
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 183
ctaattttga tgtaacttta c
21

<210> 184
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 184
caaataatat atcagggtt
19

<210> 185
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 185
ataaaatcaa ataatatatc ag
22

<210> 186
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 186
tttactaact taggctct
18

<210> 187

<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 187
ttaattctac taacttaggc t
21

<210> 188
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 188
gagtgtcgtc ttataaatg
19

<210> 189
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 189
ctagtgtttt taatatagga g
21

<210> 190
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 190
gagaactagt gtttttaata tag
23

<210> 191
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 191
atagatatcc taagcaataa c
21

<210> 192
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 192
aattatcaaa gactgtttta g
21

<210> 193
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 193
tctaatatca aaaataatat ct
22

<210> 194
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 194
agaactagtg tttttaatat ag
22

<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 195
tctaagacct taatagagac a
21

<210> 196
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 196
cctctaagac cttaataga
19

<210> 197
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 197
ttaatttata agcattattt t
21

<210> 198
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 198
aaaatctcta cttctaagtt a
21

<210> 199
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 199
cactataaaa attaggagtt c

21

<210> 200
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 200
atctcgtcac tataaaaatt a
21

<210> 201
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 201
gtgggattaa agtaagtaat a
21

<210> 202
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 202
taaacttctt tttcataatc t
21

<210> 203
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 203
taaacatgac tttgataaac t
21

<210> 204
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 204
gttctcgata aacatgact
19

<210> 205
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 205
catataaatc gtattaatat at
22

<210> 206
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 206
tcaaaactag aaatatcaag t
21

<210> 207
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 207
ataatctcat ggtcatataa a
21

<210> 208
<211> 22
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> probe for DNA-array

<400> 208
gattctatat ctacgataat at
22

Patentansprüche

1. Verfahren zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie, bei dem eine Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Vielzahl von produktrelevanten Gensequenzen untersucht wird, und bei dem:
– die Probe aufbereitet wird,
– eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für eine bestimmte produktrelevante Gensequenz spezifisch ist,
– die Nukleotidsonden mit der aufbereiteten Probe unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden, und
– daraus resultierende Hybridisierungsprodukte detektiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe einer Milchveredelungskultur, einem Edukt, einem Zwischenprodukt oder einem Endprodukt in einem Milchveredelungsverfahren und/oder aus einer in einem Milchveredelungsverfahren verwendeten Apparatur entnommen wurde.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe Milchsäurebakterien, vorzugsweise Milchsäurebakterien einer der folgenden der Gattungen: Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Bifidobacterium und Leuconostoc, umfasst.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe Milchsäurebakterien aus einer Kultur
– aus einem einzigen Stamm,
– aus mehreren Stämmen der gleichen Bakterienspezies, oder
– aus mehreren verschiedenen Spezies
umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen umfassen, die spezifisch sind für Bakteriophagen und/oder pathogene oder nichtpathogene Bakterien.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen umfassen, die spezifisch sind für eine oder mehrere der folgenden Bakteriophagenspezies oder Phagen: 936, c2 und P335, P482, wobei die jeweiligen Nukleotidsonden vorzugsweise eine oder mehrere der folgenden Sequenzen aufweisen, die spezifisch sind für den Nachweis der/s

- Phagenspezies 936: CATTCATAAAGTAACCTGTC,
  GTATTACCGTATATCTCGAC,
  TTAGACTTGAACGTGATAAT,
  CTTTGGAATGTACAAGATAT,
  TACCGTATATCTCGACCT,
  TCAGTAATTTCTCCGTCT,
  TCCGTCATTATTAGAACC,
  TGCTCATAAATCAGAACT,
  AATTGAACCGACTACATA,
- Phagenspezies 335: GCATTATTCTTTGACCTT,

TCCTGATTAAACTTGCTT,
CTCTGATATTTCTTCGCA,
GCTCAATGTAACCGTAAT,
TTGTTACTTCTTCTTCAAAC,

- Phagenspezies c2: GTCACTTTAGCACCTTTAT,
GTCAGAAATTGAGCATTC,
TACTATTCTTCTTTATCTCCT,
TGTTTCCTCAATCTTTTC,
TCTTCTCTTACTTTTGTCAC,
TTTCATAGCACCGTCATA,
CAACTGCGTCAGTAATAC,

- Phagen P482: CTTTTACATCGTGACCTTT,
TAAAAATGCTAAAGTGGTT,
TGGATAGACTTACAGAGGA.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsonden Nukleotidsonden umfassen, die spezifisch sind für den Nachweis des Phagen P482 und mit einem Abschnitt oder mehreren Abschnitten aus folgenden Sequenzabschnitten des Phagen P482 Hybride bilden können:

>P482 - ORF 11

ATGAGTTTAGATAATTTTAGAAATAGAACGATTTTGTGGGACACAGTCAATAAAGACTTCCCTCAGCCAA
TACAAATAATGCAAGGCGATGTCAATGCTAGAACGTTATTAATTAAAATAGTTGATAACGGAACTGAAAT
TGATTTAACTGGTCATTCATTAAAACTTACATATCAATACACTAATAGTAGTAATTCTGGTTTTGTTATG
ATCCCTCCTAAGGACTTAGCTAAGGGAGAATTTATTTTGGCAATTCCTACCGAAATGACAGCGACAGGAG
TTATTGAAGCGAACTTAATACTTCTCAATAAAGACAAAGAGCAAGTTATTGTCAGTAAGAATCTTACATT
TATATCAGACAGTTCTACTGTTTCTGATTTAGCTCAAGAAATAAATAATAATATTGATGATTTTACGAAA
TTATTATTAGAAAAAATGCCACAAGTACTGCGTAGTGAGTTGAATGATTTACATGCTCAAACTGATTCAA
ACAAGAGCAATATTGAGCTTAAAGCAAATCTAGCTGATATGACTAGCTTACAAAGTGCAATGACAGAGCT
AAAAAATGAAGTAGAAGCATTTGGTATTAGTCCTGAAAATTTAGTTACTATAAAATCGCTATTAGACGCA
ATTGCAAGCAATGCAAGTGAATCGGAAGTTGTTGAACTAATAAATTCAGTAAAGATTTTAACAAGTAATA
TTTCTCTTATGAGTAACGGAGATTACTCCCCTAAAGCTAATCAAACAGATTTAGAAAGTTTACAGCATAC
TGTTAATAACCAATCGGCGACTATTTCAACAAAAGCCAATCAAACGGATTTAGACAACTTACAAGCTACT
GTTGATAAACAAGGTGTTGCAATTTCAACAAAAGCTGAACAATCAGAGTTATCAATAACAAATAAAAATG
TAACAACTGCTCAAGAAACAGCAAAACAAGCTGAAAGTGAAGCCAAAAATGCAATGGCAAAGGCTACCGA

AGCACAAGCGAACAGTTTACCACTTAATGGCAATGCGGTCAGTGCAAGCAAACTGGAAACAGCTAGAAAA
CTTGGAGTAAATCTCCAAGCCTCAGCGTTTCAAAACTTTGACGGGACTGCTGACGCAACTAATATTGGAG
TTTCAGGGGTGCTGCCTATTTCAAACGGTGGTACTTCAACAAGTGACGGAGTTATAAATACAATAGCTTA
TTCCAACAGCGCAGACGGCACTGACGGTTTCACAACTGTTTATCCTAATTTGAATCTATTAGACGGAACT
AAAGATTTTAGTGGGGATTGGATTAATGCACGTGCTTGGGACAAGAATGGTACTTATAAGGGTTTGACTG
TGGTGTCATACAATGGAGCTTATAACGCAGGTATAGCTAAAGGTTTTACTATCCCTTCCGACGGTATTTA
TTCATTTTCTATAATTGTTAAAGTAAAAACTGGTTATGTCGGTCAATTTATTGTTGAAACGTATAAACCA
ACAGGGGTACCTGCTGTTACAATAAATGTAACCGATACAGGTGGGAAATTTGTAATTCAGTCTTATACAG
GTAGTTTTAAAGCAGGTCAAGAGATTGCAATGTATTTTCGGTTTGATAGTGGAGCCACTATTAAAGGTGG
TTTAGAGGTCGCAGGGCATAAAATTGAACACGGAGAAACACCAACTCCATACATGCCATCAGCTAGCGAA
GTCACGGTTGCAGACTATYCGAAGTATGTAGGGTTTAGTAATATCATTAAACCTAATAAGAAAAGTTCTG
ATTACAAATGGTTACCAATGGGGTTAGTAGCAATTGATAGTGCTACTGGCTCACTCAAACCTGCGGTTAT
AGGTATAGATTACGCTCAAGCTCACCCAGTTGGCTCGGTAGTCACAAATAACTCAAATTTGTCATCAGGG
TATTCCACAGGAAAATGGGAAAATATCGGTTCAGCAGTAATTGGTTTAACAACAATATATTATTGGAAAC
GTACTGCATAA

>P482 - ORF 13

TTGTTAAAAGGAACTGATTTTAAGAATTACACACCAAAAGTACAAGAACAT
CTTAGTGCTACAGTAAAAACTGGGGGAGTGTTTAATAAACCTTACGTCAGCGCGTCATAC
AATAATCCAACTGTAAACAGTTGGACAGACGTTCTTGAATGGGATTTTGATAAAGAACAT
TTTAAGCCATCAACAACTTAATACTTTTAGTTTTTATGTAAAAGGAAAGGGAAAAATTAG
AACTCATATTTACCCTTCTCTAATTGATACAAGTGTTGATGTATTAGCTGATGGAAAAGC
AATAAAACCTGCTGCTGATGGTGCATATGATTGGAATCTTACTAATGAATGGGTTAGACA
TACATATACGTTTACTACTAAAAGTAGTATAACTGAAGGACAACATGTACTATTTAGACT
ATTCACAGGAAATAGTGCTGATATATGTTTACCTAAAATTGAAGAAGGCTCAACCGCTAC
TCCTTGGACGCCTTCATTTAGTGAACTAACAGCCGAAGATTATCCAAGTTATATTGGAAC
ATATACTGATAATAACTCTAACACACAAAGTACAGACCCAGAAAAATATACTTGGAAAAA
AATAGAATAA

>P482 - ORF 31

TTGATAGAATGTAATTATGAAAGAGGTGCAGAGATGACAATCACTGAAAAGCAATTCTATGACATGTTAA
ATGTTGATGAACACATGAATTTCACAAACAGAATTAAAGAGCTTGTTTTTGATAAAAAAGGACGTGAAGA
ATTTTACTCTAAAATATTAAATATCCACCATGACATGGGAGTTGATTTCTTTAGGGACTATTTTATGGCT
CATTCAGCTGTTTCAGCAAAAGGTCAGCATTATACACCAGATGAACTTGGTAAACTCACAGCGTTGCTTG
TAGGTGGTTCTGGAGGTGCTGATTTAACCGGAGCAGGAACAGGAACTCTAATTATTCAAAAGTGGCAAGA
CGACCGAATGAATACAGACTTTTTTGACTATTTGCCGAGTAACTACTGGTATCAGGCATTAGAATTATCA
GATGAAGCTATTTCATTCTTGATTCATGCCTTTGCAATTAGAGGAATGAATGGTGTAATTATTCACGGTG
ACGCATTGGAAATGGCTGTAAAACAAGTTTATTTCATTCAAAACAGCGATAACAACCCAATTGGCTTTTC
GGAAGTAAATGTTATACCACACAGCGAAGACGCAATGGAATTTTTAGGTATTAATGAATGGACGGAACAG
GCAATTGAACATATTGAAAGTAAATTTCCTGACTGGATTCCACTAACAGAAGAAAGCAAAGGATAG

>P482 - ORF 32

ATGCTTAAGTTAGACGAGAAGAAAATTAGAAAAGGTAAACCAATCGGACTACCATACCAAGGAAGTAAGA
AAAAGATAAGCAAGAAGATAATTGAAATTATCAAACAGAACTTTGGCACAGACAGGCCGATATACGACAT
CTTCGGAGGTGGAGGAGCAATTACAGCCGAATGTATTTTAAATGGTTTAGAAGTGTATTATAACGACTTA
GACAAGGATATAACCAACGCATTTGAACGAGTTATCTCTCAAGACCGCGAATGGATAAAAACCCTTATTG
TTTCACGTACAGAGTTTACCGAGATTAAGTCTAAAGAAAACAAGACAACAGATGACTTTTTGAAGTTGCT
GATTAACTCTTTTGGAAATAGCATGAAAGCCTATATGTTTTCTAAAGAAAAATCAGATTTGAAATATAAT
CTTGCTAAAAAAATTATTGAAAAGCATGACGTTTTTAGCGGTTATAAACAAACAGAAACATATAAGAAAG
TTACTTCTGGACTGGACTGGAATTGGTTTAACGCTAAGCCAGAAAAGAATAAAACTTTAGAACAACTTCA
ACACCTTCAACAACTTGAACGACTTCAACGACTTCAACAACTTGACGAAGTAAAAGCAACGAATAAAAGT
TATCACGATTTTGGCGAAGTTTCTGGAGCTATTCTATATCTTGACCCTCCTTATGAAGGAAGTCACCAAA
AAAGTTATATCAATTCATTTGATAGTCAAGAGTTTTATAACTGGGCATTTGAAATGGCTAAAACTAATAT
CGTGATAATTTCAAGTTATTCAATTTCAGATGAACGTTTTGAAGCTGTATATTCTTTTGATAAAGCACGT
AGTTGTTTGCAGGGTGGTACGAGCAATAAAAGGAAAAATGAGAAATTATTTATGGTTAAGGGGAGTTAA

>P482 - ORF 35

ATGGAAAACAAATTAATTAAAATCAACTCAATGGAAACTTTAGAAAATGGCTTCATCTCAGTTAATGCAG
ATTTTGAACTAGGACACTTAGAGTTTTGGACTAATCAATGTGAAATTGATAGACTGATCGCCGGCGGTAA
CATGGATAGACTTACAGAGGATAGATATGAATAA

>P482 - ORF 47

ATGGGATTTTTATTATATAGAATCAGAACCAATGGAGGTAACCTA
GTGACTAAATTGAGAAAATTTATAAAGTATAAAGAGAAGTATATGGTTAGTGATGACGGGGAAGTTTGGG
AAATACAGAAAAACAATTTAAAAAAGAAACCACTATCAAAAAACAATAGCGGTTATCTTTACACTTCTAT
AAACGGAAAACCTTTAGGGGTACATAGGATTGTTTTAGAAGCATTTACTGGTTATTCTAGTGAAGAAGTA
GCCATAAAGATAGAAATAAAGCTAATAACTGTTTGTCTAATCTTGAATATGTTTCTCATAAAGAAAATGT
ACGTAGATACAATTCAAAAAAAGTAA

>P482 - ORF 48

TTGTGGTGTAAGAAAAGGAAAAAAATGAAAATTTACTATGTGGCACTAACAACTAATAAAGACATAGTGG
CTAAAAATTATAGCGGAAAACGATTGTCTCTTTATACAAAAAAACACGAAGCTATTAAGACTTGTGTTTT
ATTAAATTATCAATGGGAGCTATTTTTCGGAAATGGAGTAAAAGAAGAAAAACCATTCAAAGTTTATTGC
GTAGAATCAGAGCCAATGGAGGTGACTAGTGACTAG

>P482 - ORF 50

ATGAGATATAAAAAAATAGATACTGTTATAGTATTAGAAAATGGAAAAGTTTATAGAGAGTTAAAAGATA
GATGTAGACTGATAAAAGGAACTTTAAGAAATAATGGATATTTACAATTAACGATTAAAAATAAAACTAT
AAAGGTACATAGATTAGTAATAGAGGCTTTTAAAGGTAAAAGTGATTTAACTGTTGACCATATAGACGGA
AATAAACTAAATAATTCATTAGATAATTTACAATATTTAACTAGAGAAGAAAATTTAATAAAGTCTATAG
CTATCCCAATTTATTATGACAATGTGAAATACAGAAGCACTAATGAGTTATCAAGAAAATTAAATGTTTC

AAAAAATACTATTAAGTATAATTTGAATAAATATGGTTCTTATAAGGGTAAAAAATTAAATTACTAA

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die produktrelevanten Gensequenzen Sequenzen von Bakterien umfassen, die als Schadflora in Milchprodukten vorkommen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die produktrelevanten Gensequenzen spezifisch sind für eine oder mehrere Organismen aus der folgenden Gruppe: Listerien, Salmonellen, Staphylokokken, Enterobactericeae, Bacillae, Campylobacter, Clostridien, Pseudomonadaceae, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, enterotoxisches Escherichia coli, Yerisinia enterocolitica, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, B. sphaericus, Mikrokokken, Bakteriophagen.

10. Verfahren zur Untersuchung von Kulturen, bei dem eine oder mehrere dieser Kulturen auf das gleichzeitige Vorliegen von Phagenresistenz vermittelnden Genen untersucht wird, bei dem:
– eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für ein bestimmtes oder zumindest für eine Gruppe bestimmter Phagenresistenz vermittelnder Gene spezifisch ist,
– die Nukleotidsonden mit einer entsprechend aufbereiteten Probe der zu untersuchenden Kultur unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden, und
– daraus resultierende Hybridisierungsprodukte nachgewiesen werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass dabei ein oder mehrere Phagenresistenz vermittelnde Gene nachgewiesen werden, bei denen es sich um Gene handelt, die wirken wie folgt:
– Phagenadsorption inhibierend,
– Injektion von Phagen-DNA blockierend,
– Restriktion von Phagen-DNA bewirkend, und/oder
– Phageninfektion abortierend.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Phagenresistenzgene ausgewählt sind aus einer oder mehreren der folgenden Gruppe von Genen:

Inhibition der Phagenadsorption:	ads
Blockade der DNA-Injektion:	pip
Restriktion der Phagen-DNA:	IId I, IIa 1403, scrF I, IIa I, IIa II, IIa BI, IIa BII, IIa CI, IIa DII, IIa KR2I, IIa FI,
Abort der Phageninfektion:	abiA, AbiB, abiC, abiD, abiDI, abiE, abiF, abiG, abiH, abiI, abiK abiL, abiM, abiN, abiO, abiP, abiQ, abiR, abiS, abiT, abiU

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis Phagenresistenz vermittelnder Gene eine oder mehrere Nukleotidsonden vorgesehen sind, die folgende Sequenzen aufweisen:

Nachgewiesenes Gen bewirkt	Sondename	Sequenz
Inhibition der Phagenadsorption	EpsC S1	CCT GAT ATA TTA TTT GAT TTT
	EpcC S2	AAG GAG TAC TAA GTC AGA TAA
	Inj-Pip S1	CAG GAC TTA GTA CTA GAA TGA
	Inj-Pip S2	ACG AAT TTA TTA CTT ATT TAC
Restriktions & Modifikationsystem I	LldI S1	ATA ATA ATA CGA TTT TAG TGA
	LldI S2	CAG ATT CCT CTA GAG TAG ATC
	LldI S3	CTA TAT ATT GAT CGA GAA ATG
	LldI S4	AAC GAA TTA AGA AAA TAT TAC
	Lla1403 S1	ATA TTA ATA CGA TTT ATA TGG
	Lla1403 S2	TTA TAT GAC CAT GAG ATT ATT
Restriktions & Modifikationsystem II	ScrFI M S1	ATA GAA AAA CAG CTA AAT ATA
	ScrFI M S2	TAT TAA ATA CTT TGG AAG AAC
	ScrFI R S1	ATT TAC GAT ATA ATA AGT TTG
	ScrFI R S2	GTA TAT TTT GAT AGT GGT ATG
	LlaI M S1	TAT ACA ATT ACC CAA TAT ACT
	LlaI R S1	TTA TAA ATA AAA AAC TAA CCA
	LlaII S1	AAG ATG TAT CTC TAC TAG CAA
	LlaII S2	CTG TAG AAA ATC TAG TAA ACC
	LlaBI S1	GTA AAA CAT GAA CTA ATA AGA
	LlaBI S2	TAA TCA AGT TAA GTT CAA GTC
	LlaBII S1	ATA ATT TTA GTT TGG TAT ATG
	LlaBII S2	CTA TTC ATT AGA ACA TCC TAC

	LlaCI S1	ATA TAA CCT GAT GTA ATT AGA
	LlaCI S2	TAA GAA ATA AGC TAA ATA ATG
	LlaDII S1	CTT AGG ATA TCT ATG GAA TAG
	LlaDII S2	ATC GAA GAT AAT AGA CAC TAA
	LlaKRII S1	AGT ACG GTA ATA ATA TTG AGA
	LlaKRII S2	AAA GTA GGG TTA ATA AAG TAA
Restriktions & Modifikationsystem III	LlaFI S1	TCT ATA ACT CGA ACA ATA AAC
	LlaFI S2	GTA TTT CGT TAG ACA GTC TAT
Abortive Phagen Gene	AbiA S1	AGT CAT CTA CAT ATC GAA CTA
	AbiA S2	TAT ATA ACT TCC GTC AGA TAC
	AbiB S1	CAT TTA ATA CAT CTC TCG TAT
	AbiB S2	AGG GTA GTA GTT TTT TAA TAA
	AbiC S1	AGT TAG TAT AGG AGC AAT TAA
	AbiC S2	GTA TAC TTA ATG TGT TCA TGA
	AbiD S1	TTT CTG AAT TAC TAT ATA TGC
	AbiD S2	CTA TAT ATG CTA AAA TCT AAA
	AbiDI S1	TAA TGA AAG TAT TTA TTT GTC
	AbiDI S2	TTC TCT TTT ATA TGA TCA TTC
	AbiEII S1	TAC ATA TTT CAG TAA TTA CCC
	AbiEII S2	ATA AGC TAA TAC TTC TAT CTG
	AbiF S1	ATC ACC ACT ATA TAG ATC TTT
	AbiF S2	CTG TAT AAC CTA ACT ACG TTC
	AbiGI S1	TAT ATA TCT CCA CTC ATG TTC
	AbiGI S2	TGA TTC TTC TCA TAT ACT CAA
	AbiH S1	GAT AAA CAT CTT CCA TAG TAT
	AbiH S2	CAG TAT CGA ATG TAC TAT CTT
	AbiI S1	TTC TCT TAG TTA AGT AAT GGT
	AbiI S2	AAT CTT AAC TTT GTA TAG ACC
	AbiK S1	TAT TAC CGA ACT ATA TAT GTG
	AbiK S2	ATACACATAGTATACCATGGA
	AbiL S1	CGT AAA ACT ATG ACT ATC TCT
	AbiL S2	TTA CCT TCT TTT AAA TTA CTC
	AbiM S1	TCT TCT ACT TCT GTG TAT TTC
	AbiM S2	CTT TAT TAT TTT GTT CTG ATT
	AbiN S1	CTG TTA GTA ATT TAA CTG TTC
	AbiN S2	GAA GAC CTA TTT ATA GAT TCA
	AbiP S1	TAT AAT TTC AAC AAT ATC ATC
	AbiP S2	ACA TCT GTA TAA AGC TCT AAA
	AbiQ S1	CTA GTT ACT ATT CGA CTT CTT
	AbiQ S2	AGT CTA GTT ACT ATT CGA CTT
	AbiT S1	AGT ATC TTT CAT AAT CAT AGG
	AbiT S2	TCT CAG TAT CTT TCA TAA TCA
	AbiU S1	TTT ATC TCT TAC TAC TTC GTT
	AbiU S2	TAA TAG TCA TAC CAA TGT AAG

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass dabei das folgende Phagenresistenz vermittelnde Gen nachgewiesen wird:

>abiP2

ATGGATATTTTATTTTTAGAAAAAGCATTGACCAATTCTGATTGGTTAGGTTTTTTGGGG
AATATTGTAAGTGGTATAATTGGGCTAATTGGAGCTGGATTAGGTGTTTATGGGGCATAC
TATGTGATGCAAAAGGAATTAAAAGCAGAGAATGAACAGTATAGAAAAGATAAAATTGAT
AATACTTTTTTCAATTTATTGGGTTTGTTTCAAAATATACGAGAGGAACTTGATAGTCCA
AATTTGTTAGTCGCTATCAATAGTTATAATAGTACTGAAGAAGAATATCAAAAAGATAAA
TATTATAAGGCACTTTTCGAGTCAAAAAAATCTGATTTCATAAAAGATATAGAGAAATTT
AAGGTAGAAACAGGGCAATTCGATGAAAAGAGCAATTCTTTGATAAATGCATTAGAACAA
TCAGATTATAGTTCTAATGTTTATATTCGTGGATTAAATAATTTAGAAAGAGTGGTAGAA
TCCGAAAATACCCATATTGAGTTATTCGAAGAATGTGCAAAAGATTTGAAGGAGTTTGTT
GATGATAAGAATGGTGGAATTTCCTTCAAATATGAAGTTGATGAAGAGTTTATAAAAGTA
TGCGTTGAAAACGGTTTTTTGAATAGTAAATATTACTCTGGGAATTATTTTAGAGCTTTA
TACAGATGCTTAAAATATATTATCGATTCTGATTTAAAAATGGAAGATAAAAAGTTTTAT
TCAGGAGTGCTTAGAGGGATTCTATCATCTAAGGAAATGTTAGTAGTGTTTTATAATTGC
ATGTATTTTGAAAAAGGTGAGAAATTCAAAGAACTACTTGAAAAAGAAGAAAAAGGTAAA
AGAATTGACTTTTTTGGTGATAAAGAGGATTTGAAAAACTTAAGTGAAGGATATGACCTA
CCTTTCTTTAGTAAAGAGGATTTATTATTTTCGAAAACCGATATGCAAAAATTAGAGGAA
CTTATAAAAGGAAACTAG

15. Verfahren zur Untersuchung von Kulturen, bei dem eine oder mehrere dieser Kulturen auf das Vorliegen von gewünschten Genen untersucht wird, wobei die gewünschten Gene einen oder mehrere der folgenden Faktoren in einem Milchveredelungsverfahren beeinflussen: Geschmack, Geruch, und Konsistenz des Endproduktes des Milchveredelungsverfahrens, bei dem:
– eine Vielzahl von Nukleotidsonden eingesetzt wird, von denen jede für ein bestimmtes oder zumindest für eine Gruppe gewünschter Gene spezifisch ist,
– die Nukleotidsonden mit einer entsprechend aufbereiteten Probe der zu untersuchenden Kultur unter Hybridisierungsbedingungen in Verbindung gebracht werden, und
– daraus resultierende Hybridisierungsprodukte nachgewiesen werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15 , dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis Geschmack, Geruch oder Konsistenz vermittelnder Gene eine oder mehrere Nukleotidsonden vorgesehen sind, die folgende Sequenz aufweisen:

Sonden-name	Sondensequenz in 5'-3'-Richtung
ald_B_Lc07	CAAGGGTATTATATTGAAA
ald_B_Lc06	CTAAAGTTCCAATTCCTA
ald_B_Lc03	ATTTCAACAGTACCATTATC
ald_C_Lc04	TCTCATCTTCTTCAACTAAT
ald_C_Lc16	TAACAATAGTATAAGCGGT
ald_C_Lc24	AAAGTTTTCATCATCGTC
als_lc03	CTAATAAATCAAAAACCC
als_lc06	TGAATATTTTGTTGCTGA
als_lc16	TCTTCAGTATTTTCAGTATC
but_A_lc03	AAATGAGTTTTCTCCTTG
but_A_lc04	CGGCATTATTAACTACAA
but_A_lc07	AGCATTAGATTTGGATTT
but_B_lc01	GGTTCATTAATTTCATCA
but_B_lc07	ACGTTCATCAACAGAAAT
but_B_lc14	TTGATTACTAATTTTGCC
but_B_lc10	CTTCTTGTGCTTTTTTAC
cit_E_lc02	ACGGATGACTTCGATAC
cit_E_lc05	CATCAGGATAAGACTTGG
cit_E_lc10	CCCTCATCTAACACATTT
cit_F_lc03	ATACCATCTTTAACAGTTTT
cit_F_lc10	GTTGATTTTTGTTGAGGT
cit_F_lc14	TCAATCTTTAACTTCACG
cit_P_lc+l08	CAAGGTAGTAAAACACGT
cit_P_lc+l12	GATATAAAGACCCAAAAA
cit_P_lc+l29	AGCTTAGACAAAATTCCT
cit_P_lc+l33	TACGTGAGATAAGTCCAG
pdh_A_lc01	AAATGTAGTGTCTTGCAGT
pdh_A_lc04	CAGTCTTCGTCAGTGAA
pdh_A_lc06	CAATGTCTTCTTTAGTACG
pdh_B_lc07	TTCAAAGATAAAGGTTCC
pdh_B_lc13	AGCAGTATCAAGTGGTGT
pdh_B_lc19	CAGTCATAGTCAACCACC
pfl_lc03	TAGCATCGATATATCCAG
pfl_lc11	TGTTCAGTAAATGTTCCA
pfl_lc23	TGTTAGCACGAACTTTAG
pfl_lc32	ACGTTCAGTTAATTCTTG

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15, 16 oder 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass dabei auch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 durchgeführt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass dabei zugleich Nukleotidsonden vorgesehen sind, die eine Aussage darüber ermöglichen, ob die jeweils nachgewiesenen oder untersuchten Organismen teilungsfähig/stoffwechselaktiv sind oder nicht

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die zugleich vorgesehenen Nukleotidsonden zum Nachweis von ISR-Regionen ausgebildet sind und vorzugsweise folgende Sequenzen umfassen:
– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von E.coli: CGTATCAGTCTGCTTCGC und/oder CACTCACAAACCAGCAAG,
– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von Lactococcus lactis: TTCTTGCTTAGGTTTATCA und/oder TTGGTTTATTTATCGTTAT, und/oder
– zum Nachweis der Stoffwechselaktivität von Lactobacillus delbrückii: CAGTGTGCTTCCGTAACT und/oder

ACTCTCTCGGTCGCTTTG.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsonden auf einem Mikroarray angeordnet sind.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsonden bestehen aus: synthetischen Oligonukleotiden, DNA, cDNA, RNA, LNA, PNA und/oder anderweitig modifizierten Nukleinsäuren.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsonden eine Länge von bis zu 1000 Basen, vorzugsweise aber unter 100 Basen aufweisen.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufbereitung der Probe umfasst:
– DNA-oder RNA Extraktion aus der Probe,
– Markierung mit Psoralen-Biotin.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufbereitung der Probe umfasst:
– DNA- oder RNA Extraktion aus der Probe,
– Fragmentierung der genomischen DNA in hybridisierbare Fragmente,
– Markierung mit Psoralen-Biotin, wobei zur Fragmentierung vorzugsweise eine chemische Nuklease eingesetzt wird, die Fragmente zwischen 500 und 1000 bp produziert.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufbereitung der Probe umfasst:
– PCR-Amplifikation.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass eine Markierung mittels Psoralen-Biotin erfolgt und das Psoralen-Biotin nach der Hybridisierung mit einem Streptavidin-Enzymkomplex, vorzugsweise Streptavidin-Peroxidase, gekoppelt wird, wobei das mit Psoralen-Biotin markierte Material aus genomischer DNA, mRNA, cDNA, rRNA, und/oder einem PCR-Produkt besteht, und wobei vorzugsweise im Anschluß an die Biotin-Streptavidin-Kopplung die Hybridisierungsprodukte mit einem Tyramid-Farbstoff-Komplex enthaltenden Amplifikationspuffer in Verbindung gebracht werden.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die aufbereitete Probe PCR-Produkte, cDNA, rRNA, mRNA und/oder genomische DNA aufweist.

28. Mikroarray zur Durchführung von Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27.

29. Mikroarray nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass er eine oder mehrere der folgenden Sonden umfasst: SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 208

30. Verfahren zur gezielten Auswahl einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen für die Durchführung von Milchveredelungsverfahren, das folgende Schritte aufweist:
a) Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 10 bis 17 mit Kulturen der gewünschten Art,
b) Bestimmen der in den jeweiligen Kulturen vorliegenden Phagenresistenz vermittelnden Gene und/oder weiterer produktrelevanter Gensequenzen anhand der in Schritt a) erhaltenen kulturspezifischen Hybridisierungsprodukte, und
c) Auswählen einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen, die gewünschte Phagenresistenz vermittelnde Gene und/oder andere gewünschte Gene aufweist.

31. Verfahren zur gezielten Auswahl einer Kultur oder einer Kombination von Kulturen für die Durchführung von Milchveredelungsverfahren, das folgende Schritte aufweist:
a) Durchführen eines Verfahrens nach einem der Schritte 1 bis 9, wobei die Probe einem Edukt oder einem Zwischenprodukt entnommen wurde,
b) Ermitteln von in der Probe enthaltenen Phagen anhand der in Schritt a) erhaltenen Hybridisierungsprodukte, und
c) Auswahl der Kultur oder der Kombination von Kulturen, die gegenüber in Schritt b) ermittelten Phagen Phagenresistenz vermittelnde Gene aufweist.

32. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt c) mittels eines Verfahrens nach Anspruch 31 durchgeführt wird.

33. Verfahren nach Anspruch 1-30, dadurch gekennzeichnet, dass die in diesen Ansprüchen beschriebene Analysen während der Milchfermentation, also produktiosintegriert erfolgt.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

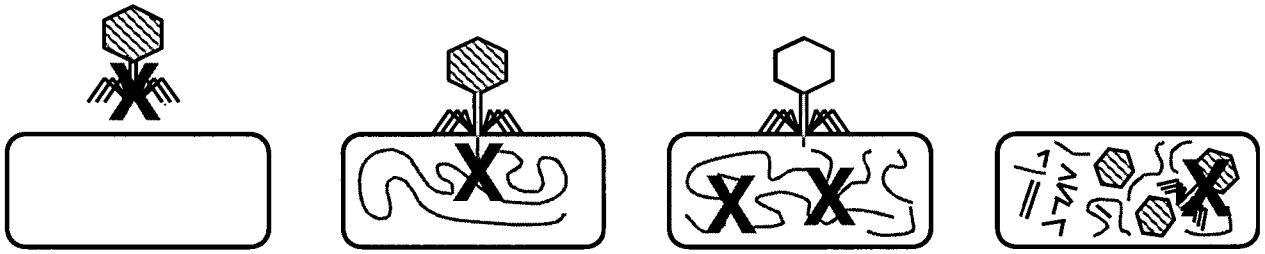


Fig. 1A Fig. 1B Fig. 1C Fig. 1D

A Verhinderung der Phagenadsorption
B Blockierung der DNA-Penetration
C Restriktion der Phagen-DNA
D Abortive Phageninfektion (Abi)

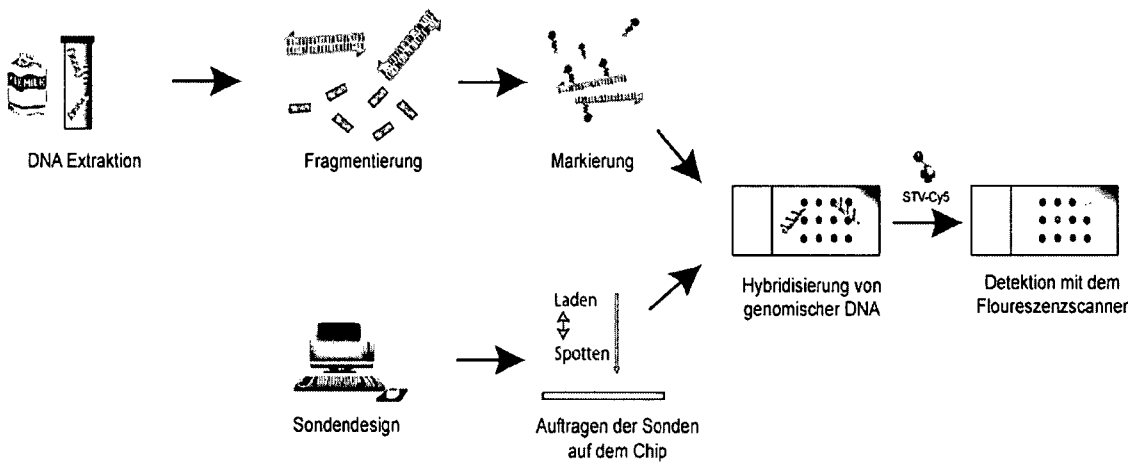


Fig. 2

Organismus	Sonde	Sequenz 5'--> 3'	Tm [°C]	Gen	Referenz Gen
Positivkontrolle	HCV (+)	TGATAGGGTGCTTGCGAG	49,2	*hcv*	Boldt 1999
	M13mp18-cB	AACAGCTATGACCATGATTAC		*artificial*	Niemeyer et al 1998
Negativkontrolle	HCV (-)	TAGGGTGCTTGCAAGTGC	49,3	*hcv*	Boldt 1999
	M13mp18-A	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT	56,6	*artificial*	Niemeyer et al 1998
Eubakterien	Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	64,3	*16S rRNA*	Amann et al 1990
	Eub 338 (verkürzt)	GCTGCCTCCCGTAGGAG	62,8	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Eubacteria aus der NCBI Datenbank
Low GC	LGCc 354	CCGAAGATTCCCTACTGC	59,6	*16S rRNA*	Meier 1996
	Lla 271	CTATAATGCTTAAGTCCACG	55,5	*23S rRNA*	Beimfohr 1993
Bakterien					
Bacillales					
Bacillus cereus	BCG1 1394	CGGTCTTGCAGCTCTTTG	61,6	*16S rRNA*	Bavykin et al 2001
	BCG2 483	CAACTAGCACTTGTTCTTCC	57	*16S rRNA*	Bavykin et al 2001
	Bcer 85	TTGAGAGCAAGCTCTCAATC	59,8	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
	Bcer 99	CCGCTAACTTCTTGAGAGC	59,8	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
	Bcer 160	CAGTCTTATGGGCAGGTT	57	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
	Bcer 204	GCAGTTCAAAATGTTATCCG	60,6	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
	Bac Gr. 1	GGGTCCATCCATAAGTGACA	62,1	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
	Bac Gr. 3	GAACCATGCGGTTCAAAA	61,6	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von B. cereus aus der NCBI Datenbank
Listeria monocytogenes	Lm 92	CTTTGGAAGAGCAAGCTCT	59,2	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von L. monocytogenes aus der NCBI Datenbank
	Lm 161	CCCCAACTTACAGGCAG	58	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von L. monocytogenes aus der NCBI Datenbank
	Lm 167	CGGAGTTATCCCCAACTTAC	61,3	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von L. monocytogenes aus der NCBI Datenbank

DE 10 2004 023 188 A1 2005.12.08

	Lm 237	TAGCCGAAACCATCTTTCA	61,1	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von L. monocytogenes aus der NCBI Datenbank
Staphylococcus aureus	STAURJ 85	GAGAAGCAAGCTTCTCGTC	59,2	*16S rRNA*	Jansen et al 2000
	Stau 96	GCTAACATCAGAGAAGCAAGC	62	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von St. aureus aus der NCBI Datenbank
	Stau 204	GCGGTTCAAAATATTATCTGG	62,2	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von St. aureus aus der NCBI Datenbank
	Stau 490	ATGTGCACAGTTACTTACACATATG	62,1	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von St. aureus aus der NCBI Datenbank
Lactobacillales					
Lactococcen-Gruppe	LI 1298	CACTGTCTCGCGACTCG	59,3	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Lactococcus aus der NCBI Datenbank
	LI 1304	TAGCTAAACATCACTGTCTCG	57,9	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Lactococcus aus der NCBI Datenbank
	LI 1321	GAGAACGGTTTTAAGAGATTAG	59,1	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Lactococcus aus der NCBI Datenbank
Lactococcus lactis ssp. lactis	LIa 68	TACAAGTACCAACCTTCAGC	57,4	*16S rRNA*	Beimfohr 1993
Lactococcus lactis ssp. cremoris	LIc 68	TGCAAGCACCAATCTTCATC	63,8	*16S rRNA*	Beimfohr 1993
Streptocokken	STREPJ 531	GTTAGCCGTCCCTTTCTG	59,8	*16S rRNA*	Jansen et al 2000
Enterobacteriales					
Enterobakterien	ENTBACJ 1509	CATGAATCACAAAGTGGTAAGC	62,4	*16S rRNA*	Jansen et al 2000
	Eb 87	GCAAAGAGCAAGCTTCTTC	59,9	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Enterobacteriales aus der NCBI Datenbank
	Eb 160	CTCCATCAGGCAGTTTCC	60	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Enterobacteriales aus der NCBI Datenbank
	Eb 207	TGGTCTTGCGACGTTATG	59,8	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Enterobacteriales aus der NCBI Datenbank
Escherichia coli	ECOLIJ 490	GCAAAGGTATTAACTTTACTCCC	62,3	*16S rRNA*	Jansen et al 2000
	ECOLIS 448	TCAATGAGCAAAGGTAT	49	*16S rRNA*	Small et al 2001

Salmonella spec.	Sal 485	ATTAACCACAACACCTTCCTC	61,4	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Salmonella aus der NCBI Datenbank
	Set 494	TGCTGCGGTTATTAACCAC	61,7	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Salmonella aus der NCBI Datenbank
	Stm 492	GTGCTGAGGTATTAACCACAA	60,1	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Salmonella aus der NCBI Datenbank
	Sal Gr. 1	AAGCTGCTTCCTGTTACCGT	64	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von Salmonella aus der NCBI Datenbank
Pseudomonadales Pseudomonas aeruginosa	PSEUDAER 163	GGACGTTATCCCCCACTAT	60,8	*16S rRNA*	Jansen et al 2000
	Psae 158	CCCACTACCAGGCAGATT	59,5	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von P. aeruginosa aus der NCBI Datenbank
	Psae 206	TCTCCCTCAGGACGTATGC	62,4	*16S rRNA*	Consensus aller 16S rRNA-GENE von P. aeruginosa aus der NCBI Datenbank
Phagen		<u>Sonden nach Anspruch 6</u>			
Phagen 936	G936 / 1(3413)	CATTCATAAAGTAACCTGTC	51,6		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	G936 / 2 (8606)	GTATTACCGTATATCTCGAC	51,3		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	G936 / 3 (26941)	TTAGACTTGAACGTGATAAT	51,8		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	G936 / 4 (23941)	CTTTGGAATGTACAAGATAT	51,4		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	936 / 5 (8604)	TACCGTATATCTCGACCT	51,2		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	936 / 6 (7873)	TCAGTAATTTCTCCGTCT	50,9		Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408

	936 / 7 (13931)	TCCGTCATTATTAGAACC	51,8	Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	936 / 8 (26723)	TGCTCATAAATCAGAACT	48,8	Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
	936 / 9 (26809)	AATTGAACCGACTACATA	49,1	Consensus aus NC_001835, AF009630, L35061, AF087814, AF090370, L35175, M37979, AF152407, AF152409, AF152408
Phagen P335	P335/1	GCATTATTCTTTGACCTT	51,4	Consensus aus U38906, AF323668, AF323669, AF323670, AF349457, AF304433, AF109874, AF489521, AF022773, AF242738, M90423
	P335/2	TCCTGATTAAACTTGCTT	51,9	Consensus aus U38906, AF323668, AF323669, AF323670, AF349457, AF304433, AF109874, AF489521, AF022773, AF242738, M90423
	P335/3	CTCTGATATTTCTTCGCA	52,7	Consensus aus U38906, AF323668, AF323669, AF323670, AF349457, AF304433, AF109874, AF489521, AF022773, AF242738, M90423
	P335/4	GCTCAATGTAACCGTAAT	52	Consensus aus U38906, AF323668, AF323669, AF323670, AF349457, AF304433, AF109874, AF489521, AF022773, AF242738, M90423
	P335/5	TTGTTACTTCTTCTTCAAAC	51,6	Consensus aus U38906, AF323668, AF323669, AF323670, AF349457, AF304433, AF109874, AF489521, AF022773, AF242738, M90423
Phagen c2	c2/1	GTCACTTTAGCACCTTTAT	51,2	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/2	GTCAGAAATTGAGCATTC	51,3	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/3	TACTATTCTTCTTTATCTCCT	50,2	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/4	TGTTTCCTCAATCTTTTC	51,4	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/5	TCTTCTCTTACTTTTGTCAC	50,9	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/6	TTTCATAGCACCGTCATA	53,8	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410
	c2/7	CAACTGCGTCAGTAATAC	49,8	Consensus aus L48605, L33769, X16178, AF152414, AF152411, AF152412, AF152410

Phage P482	P482/1	CTTTTACATCGTGACCTTT	54,5		Basierend auf Sequenzen von Anspruch 7
	P482/2	TAAAAATGCTAAAGTGGTT	52,8		Basierend auf Sequenzen von Anspruch 7
	P482/3	TGGATAGACTTACAGAGGA	51		Basierend auf Sequenzen von Anspruch 7
Intergenic Spacer		Sonden nach Anspruch 19			
E.coli	E.coli ISR 1	CGTATCAGTCTGCTTCGC	58,7	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus U55311, U55310, U55309, U55308, U55307, U55306, U55305, U55304, U55303, U55302, U55301, U55300, U55299, U55298, 55297, U55296
	E.coli ISR 2	CACTCACAAACCAGCAAG	55,9	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus U55311, U55310, U55309, U55308, U55307, U55306, U55305, U55304, U55303, U55302, U55301, U55300, U55299, U55298, 55297, U55296
Lactococcus lactis	L. lact ISR 1	TTCTTGCTTAGGTTTATCA	52,9	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus AY348313, AF284218, AJ271851, U32972 und X83762
	L. lact ISR 2	TTGGTTTATTTATCGTTAT	50,1	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus AY348313, AF284218, AJ271851, U32972 und X83762
Lactobacillus delbrückii	L. del ISR 1	CAGTGTGCTTCCGTAACT	55	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus AB035485, AB035484, AF113602, U32969, U32968, U32967, Z75476
	L- del ISR 2	ACTCTCTCGGTCGCTTTG	59,9	*ISR zwischen 16S und 23S rRNA*	Consensus aus AB035485, AB035484, AF113602, U32969, U32968, U32967, Z75476
Phagenresistenzgene		Sonden nach Anspruch 13			
Inhibition der Phagenadsorption	EpsC S1	CCT GAT ATA TTA TTT GAT TTT	51,9	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298
	EpcC S2	AAG GAG TAC TAA GTC AGA TAA	50,3	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298
	Inj-Pip S1	CAG GAC TTA GTA CTA GAA TGA	51,1	*pip*	L14679

	Inj-Pip S2	ACG AAT TTA TTA CTT ATT TAC	49,5	*pip*	L14679
Restriktions & Modifikationsystem I	LldI S1	ATA ATA ATA CGA TTT TAG TGA	49,9	*lldI*	U90222, AF034786
	LldI S2	CAG ATT CCT CTA GAG TAG ATC	51,9	*lldI*	U90222, AF034786
	LldI S3	CTA TAT ATT GAT CGA GAA ATG	52,3	*lldI*	U90222, AF034786
	LldI S4	AAC GAA TTA AGA AAA TAT TAC	51,8	*lldI*	U90222, AF034786
	Lla1403 S1	ATA TTA ATA CGA TTT ATA TGG	48,4	*lla1403*	AF013165
	Lla1403 S2	TTA TAT GAC CAT GAG ATT ATT	51,7	*lla1403*	AF013165
Restriktions & Modifikationsystem II	ScrFI M S1	ATA GAA AAA CAG CTA AAT ATA	49,9	*scrFI*	M87289, U89998
	ScrFI M S2	TAT TAA ATA CTT TGG AAG AAC	51,9	*scrFI*	M87289, U89998
	ScrFI R S1	ATT TAC GAT ATA ATA AGT TTG	50	*scrFI*	M87289, U89998
	ScrFI R S2	GTA TAT TTT GAT AGT GGT ATG	49,5	*scrFI*	M87289, U89998
	LlaI M S1	TAT ACA ATT ACC CAA TAT ACT	49,5	*llaI*	U17233
	LlaI R S1	TTA TAA ATA AAA AAC TAA CCA	51	*llaI*	U17233
	LlaII S1	AAG ATG TAT CTC TAC TAG CAA	51,1	*llaII*	U16027
	LlaII S2	CTG TAG AAA ATC TAG TAA ACC	51	*llaII*	U16027
	LlaBI S1	GTA AAA CAT GAA CTA ATA AGA	49,5	*llaBI*	X97263
	LlaBI S2	TAA TCA AGT TAA GTT CAA GTC	51,6	*llaBI*	X97263
	LlaBII S1	ATA ATT TTA GTT TGG TAT ATG	49,8	*llaBII*	Y12736
	LlaBII S2	CTA TTC ATT AGA ACA TCC TAC	51	*llaBII*	Y12736
	LlaCI S1	ATA TAA CCT GAT GTA ATT AGA	48,9	*llaCI*	AJ002064
	LlaCI S2	TAA GAA ATA AGC TAA ATA ATG	50,7	*llaCI*	AJ002064
	LlaDII S1	CTT AGG ATA TCT ATG GAA TAG	51	*llaDII*	Y12707
	LlaDII S2	ATC GAA GAT AAT AGA CAC TAA	51,2	*llaDII*	Y12707
	LlaKRII S1	AGT ACG GTA ATA ATA TTG AGA	51,7	*llaKRII*	AF051563
	LlaKRII S2	AAA GTA GGG TTA ATA AAG TAA	51,6	*llaKRII*	AF051563
Restriktions & Modifikationsystem III	LlaFI S1	TCT ATA ACT CGA ACA ATA AAC	52	*llaFI*	AF054600
	LlaFI S2	GTA TTT CGT TAG ACA GTC TAT	50,6	*llaFI*	AF054600
Abortiven Phagen Gene	AbiA S1	AGT CAT CTA CAT ATC GAA CTA	51	*abiA*	U17233, M63080
	AbiA S2	TAT ATA ACT TCC GTC AGA TAC	51,6	*abiA*	U17233, M63080
	AbiB S1	CAT TTA ATA CAT CTC TCG TAT	51,6	*abiB*	M77708
	AbiB S2	AGG GTA GTA GTT TTT TAA TAA	51,6	*abiB*	M77708
	AbiC S1	AGT TAG TAT AGG AGC AAT TAA	51,7	*abiC*	M95956
	AbiC S2	GTA TAC TTA ATG TGT TCA TGA	49,1	*abiC*	M95956

AbiD S1	TTT CTG AAT TAC TAT ATA TGC	49,9	*abiD*	U10992
AbiD S2	CTA TAT ATG CTA AAA TCT AAA	48,1	*abiD*	U10992
AbiDI S1	TAA TGA AAG TAT TTA TTT GTC	49,9	*abiDI*	AF116286
AbiDI S2	TTC TCT TTT ATA TGA TCA TTC	51,4	*abiDI*	AF116286
AbiEII S1	TAC ATA TTT CAG TAA TTA CCC	52	*abiEII*	U36837
AbiEII S2	ATA AGC TAA TAC TTC TAT CTG	48,6	*abiEII*	U36837
AbiF S1	ATC ACC ACT ATA TAG ATC TTT	50	*abiF*	U36837
AbiF S2	CTG TAT AAC CTA ACT ACG TTC	51,6	*abiF*	U36837
AbiGI S1	TAT ATA TCT CCA CTC ATG TTC	51,2	*abiGI*	U60336
AbiGI S2	TGA TTC TTC TCA TAT ACT CAA	51,8	*abiGI*	U60336
AbiH S1	GAT AAA CAT CTT CCA TAG TAT	50,5	*abiH*	X97651
AbiH S2	CAG TAT CGA ATG TAC TAT CTT	51,2	*abiH*	X97651
AbiI S1	TTC TCT TAG TTA AGT AAT GGT	51	*sbiI*	U38973
AbiI S2	AAT CTT AAC TTT GTA TAG ACC	50,5	*abiI*	U38973
AbiK S1	TAT TAC CGA ACT ATA TAT GTG	50,5	*abiK*	U35629
AbiK S2	ATACACATAGTATACCATGGA	51,7	*abiK*	U35629
AbiL S1	CGT AAA ACT ATG ACT ATC TCT	51	*abiL*	U94520
AbiL S2	TTA CCT TCT TTT AAA TTA CTC	51,6	*abiL*	U94520
AbiM S1	TCT TCT ACT TCT GTG TAT TTC	50,9	*abiM*	U41294
AbiM S2	CTT TAT TAT TTT GTT CTG ATT	51,9	*abiM*	U41294
AbiN S1	CTG TTA GTA ATT TAA CTG TTC	49,9	*abiN*	Y11901
AbiN S2	GAA GAC CTA TTT ATA GAT TCA	51	*abiN*	Y11901
AbiP S1	TAT AAT TTC AAC AAT ATC ATC	49,9	*abiP*	U90222
AbiP S2	ACA TCT GTA TAA AGC TCT AAA	51,7	*abiP*	U90222
AbiQ S1	CTA GTT ACT ATT CGA CTT CTT	50,7	*abiQ*	AF001314
AbiQ S2	AGT CTA GTT ACT ATT CGA CTT	49,8	*abiQ*	AF001314
AbiT S1	AGT ATC TTT CAT AAT CAT AGG	50,9	*abiT*	AF483000
AbiT S2	TCT CAG TAT CTT TCA TAA TCA	51,8	*abiT*	AF483000
AbiU S1	TTT ATC TCT TAC TAC TTC GTT	51,2	*abiU*	AF188839
AbiU S2	TAA TAG TCA TAC CAA TGT AAG	49,9	*abiU*	AF188839

Gene aus dem Citratstoffwechsel zur Bildung von Aromakomponenten

Sonden nach Anspruch 16

ald_B_Lc07	CAAGGGTATTATATTGAAA	50,1	*aldB*	Consensus aus AE006355, NC_002662, S82499, U92974, X82620
ald_B_Lc06	CTAAAGTTCCAATTCCTA	49	*aldB*	Consensus aus AE006355, NC_002662, S82499, U92974, X82620

ald_B_Lc03	ATTTCAACAGTACCATTATC	51,1	*aldB*	Consensus aus AE006355, NC_002662, S82499, U92974, X82620
ald_C_Lc04	TCTCATCTTCTTCAACTAAT	50,5	*aldC*	Consensus aus NC_002662, AE006343
ald_C_Lc16	TAACAATAGTATAAGCGGT	50	*aldC*	Consensus aus NC_002662, AE006343
ald_C_Lc24	AAAGTTTTCATCATCGTC	51,1	*aldC*	Consensus aus NC_002662, AE006343
als_lc03	CTAATAAATCAAAAACCC	49,3	*als*	Consensus aus AE006350, L16975, NC_002662
als_lc06	TGAATATTTTGTTGCTGA	51,1	*als*	Consensus aus AE006350, L16975, NC_002662
als_lc16	TCTTCAGTATTTTCAGTATC	48,4	*als*	Consensus aus AE006350, L16975, NC_002662
but_A_lc03	AAATGAGTTTTCTCCTTG	50,9	*butA*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_A_lc04	CGGCATTATTAACTACAA	51,3	*butA*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_A_lc07	AGCATTAGATTTGGATTT	51,2	*butA*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_B_lc01	GGTTCATTAATTTCATCA	49,4	*butB*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_B_lc07	ACGTTCATCAACAGAAAT	51,1	*butB*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_B_lc14	TTGATTACTAATTTTGCC	50,2	*butB*	Consensus aus AE006323, NC_002662
but_B_lc10	CTTCTTGTGCTTTTTTAC	49,6	*butB*	Consensus aus AE006323, NC_002662
cit_E_lc02	ACGGATGACTTCGATAC	50,7	*citE*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_E_lc05	CATCAGGATAAGACTTGG	49,5	*citE*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_E_lc10	CCCTCATCTAACACATTT	51	*citE*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_F_lc03	ATACCATCTTTAACAGTTTT	50,9	*citF*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_F_lc10	GTTGATTTTTGTTGAGGT	51,1	*citF*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_F_lc14	TCAATCTTTAACTTCACG	49,8	*citF*	Consensus aus AE006351, AY268077, NC_002662
cit_P_lc+l08	CAAGGTAGTAAAACACGT	49,1	*citP*	Consensus aus M58694, NC_003101, AJ132782, U28212, L29572
cit_P_lc+l12	GATATAAAGACCCAAAAA	49,1	*citP*	Consensus aus M58694, NC_003101, AJ132782, U28212, L29572
cit_P_lc+l29	AGCTTAGACAAAATTCCT	50,5	*citP*	Consensus aus M58694, NC_003101, AJ132782, U28212, L29572
cit_P_lc+l33	TACGTGAGATAAGTCCAG	48,8	*citP*	Consensus aus M58694, NC_003101, AJ132782, U28212, L29572
pdh_A_lc01	AAATGTAGTGTCTTGCAGT	51,2	*pdhA*	NC_002662
pdh_A_lc04	CAGTCTTCGTCAGTGAA	48,7	*pdhA*	NC_002662
pdh_A_lc06	CAATGTCTTCTTTAGTACG	49,6	*pdhA*	NC_002662
pdh_B_lc07	TTCAAAGATAAAGGTTCC	51,4	*pdhB*	Consensus aus NC_002662, AE006244
pdh_B_lc13	AGCAGTATCAAGTGGTGT	50,7	*pdhB*	Consensus aus NC_002662, AE006244
pdh_B_lc19	CAGTCATAGTCAACCACC	51,1	*pdhB*	Consensus aus NC_002662, AE006244
pfl_lc03	TAGCATCGATATATCCAG	49,9	*pfl*	Consensus aus AE006299, NC_002662, AJ000326, AJ000325
pfl_lc11	TGTTCAGTAAATGTTCCA	50	*pfl*	Consensus aus AE006299, NC_002662, AJ000326, AJ000325
pfl_lc23	TGTTAGCACGAACTTTAG	50,5	*pfl*	Consensus aus AE006299, NC_002662, AJ000326, AJ000325

pfl_lc32	ACGTTCAGTTAATTCTTG	49	*pfl*	Consensus aus AE006299, NC_002662, AJ000326, AJ000325

weitere Sonden zur Detektion von Phagenresistenzgenen

Sonde	Sondensequenz 5'-3'	Länge [bp]	Gen	Referenz	Tm °C
AbiB134	ATTCTCAACGTGTTTACTT	19	*abiB*	M77708	51,1
AbiB215	GAAGTCATGTTATTCGTAG	19	*abiB*	M77708	48,9
AbiB287	TTAGTTTTATAAAATTTTAGAG	22	*abiB*	M77708	50,4
AbiB386	GATTTCACGAAAGAGATAT	19	*abiB*	M77708	50,5
AbiB496	ATTCAGGGTAGTAGTTTTT	19	*abiB*	M77708	50,2
AbiB529	TTAAGGTCAAATGTTAGTAAT	21	*abiB*	M77708	50,2
AbiB571	TCGGTATTACTTTATTTC	19	*abiB*	M77708	49,7
AbiB677	CTAATTTTGATGTAACTTTAC	21	*abiB*	M77708	49,7

Sonde	Sondensequenz 5'-3'	Länge [bp]	Gen	Referenz	Tm °C
ADS48	CAAATAATATATCAGGGTT	19	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298	49
ADS52	ATAAAATCAAATAATATATCAG	22	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298	49,7
ADS437	TT TACTAACTTAGGCTCT	19	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298	47,9
ADS439	TTAATTCTACTAACTTAGGCT	21	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298	51,4
ADS775	GAGTGTCGTCTTATAAATG	19	*epsC*	AF03648, AF100297, AF100298	48,9

Sonde	Sondensequenz 5'-3'	Länge [bp]	Gen	Referenz	Tm °C
LlaDII90	CTAGTGTTTTTAATATAGGAG	21	*llaDII*	Y12707	49,3
LlaDII93	GAGAACTAGTGTTTTTAATATAG	23	*llaDII*	Y12707	51,3
LlaDII158	ATAGATATCCTAAGCAATAAC	21	*llaDII*	Y12707	51
LlaDII284	AATTATCAAAGACTGTTTTAG	21	*llaDII*	Y12707	51,5
LlaDII489	TCTAATATCAAAAATAATATCT	22	*llaDII*	Y12707	49,3
LlaDII93II	AGAACTAGTGTTTTTAATATAG	22	*llaDII*	Y12707	48,9

Sonde	Sondensequenz 5'-3'	Länge [bp]	Gen	Referenz	Tm °C
HsdR281	TCTAAGACCTTAATAGAGACA	21	*lla1403*	AF013165	51,1
HsdR285	CCTCTAAGACCTTAATAGA	19	*lla1403*	AF013165	48
HsdR2128	TTAATTTATAAGCATTATTTT	21	*lla1403*	AF013165	50,9

DE 10 2004 023 188 A1 2005.12.08

HsdR2288	AAAATCTCTACTTCTAAGTTA	21	*Ila1403*	AF013165	48,2
HsdR21262	CACTATAAAAATTAGGAGTTC	21	*Ila1403*	AF013165	51,4
HsdR21269	ATCTCGTCACTATAAAAATTA	21	*Ila1403*	AF013165	51,9
HsdR21401	GTGGGATTAAAGTAAGTAATA	21	*Ila1403*	AF013165	51,8
HsdR21461	TAAACTTCTTTTTCATAATCT	21	*Ila1403*	AF013165	51,5
HsdR21476	TAAACATGACTTTGATAAACT	21	*Ila1403*	AF013165	52
HsdR21486	GTTCTCGATAAAACATGACT	19	*Ila1403*	AF013165	50,6
HsdR21929	CATATAAATCGTATTAATATAT	22	*Ila1403*	AF013165	48
HsdR22424	TCAAAACTAGAAATATCAAGT	21	*Ila1403*	AF013165	51,4
HsdR22541	ATAATCTCATGGTCATATAAA	21	*Ila1403*	AF013165	51,7
HsdR22684	GATTCTATATCTACGATAATAT	22	*Ila1403*	AF013165	48,3

Seite 10 von Fig. 3

Primer	Zielgen/ Acc. Nr.	Sequenz (5'-3')	bp	T_m	Position	Prod. Länge
EpsC F1	ads-epsC	CCTGAGTGTAATAGCGGAATC	21	48,4	24-44	
EpsC R1	AF036485 AF100297 AF100298	CTAATCCCCCTAAAATATCAATCC	24	51,6	499-522	499
EpsC F2	ads-epsC	CCTATTTTGGTCCACCCTG	19	49,3	9-27	415
EpsC R2	AF100297	ATCCTTCCTCAAAACTTCCAT	22	50,5	402-423	
Inj-Pip F1	Inj-Pip	CGCATTGCCTAGTATCACGA	20	51,4	1041-1060	474
Inj-Pip R1	L14679	GTCAAGCTTGTTAAAACTGTTATCA	24	51,1	1491-1514	
Inj-Pip F2	Inj-Pip	ATGCCAGAAATCAAAGAAAAACT	23	51,0	673-695	465
Inj-Pip R2	L14679	TTGGTCAATAACAGCGAGAACT	22	48,1	1116-1137	

Fig. 4a. Primer zur Detektion der Gene für die Inhibition der Phagenadsorption und der Injektion der Phagen-DNA.

Primer	Zielgen/ Acc. Nr.	Sequenz (5'-3')	bp	T_m	Position	Prod. Länge
LldI F1	RM Typ I hsdR	TTGCCTCGGAATACCATACC	20	51,6	1007-1027	
LldI R1	U90222 AF034786	CTAACACAGCCCCATCATCC	20	51,7	1443-1462	456
LldI F2	U90222 AF034786	ACGGGGTGGCTCAAGTT	17	49,7	257-273	
LldI R2	U90222 AF034786	ATGGGCATCGGGTATCC	17	49,8	710-726	470
LldI F3	U90222 AF034786	GATTCTCCAGCGATTCTAACC	21	49,9	2062-2082	
LldI R3	U90222 AF034786	GGCAACTGCTCCACCACT	18	50,4	2469-2486	425
Lla1403 F1	RM Typ I hsdR	ACGGGCCTACATGATTGATA	20	49,5	1803-1822	404
Lla1403 R1	AF013165	GATGACTTTGGGGTTCTGC	19	49,1	2188-2206	
Lla1403 F2	RM Typ I hsdR	TGCGGGAGAAGATTTTAGTCA	21	51,7	2250-2270	
Lla1403 R2	AF013165	ATCTCTTGTTGGCTCATTTCATC	23	51,8	2656-2678	429

Fig. 4b. Primer für die Amplifikation der Restriktions & Modifikationssystem I-Gene.

Primer	Zielgen/ Acc. Nr.	Sequenz (5'-3')	bp	T_m	Position	Prod. Länge
ScrFI M F1	RM Typ II hsdM	AATGATTAAAGAAAAGCGACTACG	24	51,3	42-65	404
ScrFI M R1	M87289 U89998	AAGGAAATCCACCGACAAGA	20	51,1	426-445	
ScrFI M F2	RM Typ II hsdM	TCGGTGGATTTCCTTGTCA	19	50,9	431-449	421
ScrFI M R2	M87289 U89998	TGCCCATCCCAAAGTTTATC	20	51,6	832-851	
ScrFI R F1	RM Typ II hsdR	CGTTTCTCATGGTCTGGTTCT	21	50,8	343-363	409
ScrFI R R1	U89998	GGCGCTTGTTTCCTTCATAC	20	51,6	732-751	
LlaI M F1	RM Typ II hsdM	TTGATGGAATGCGACTTGATA	21	50,7	365-385	401
LlaI M R1	U17233	CTCCCGCTTAACTCTTCTGC	20	51,0	746-765	
LlaI R F1	hsdR	ATTGAGCTTTTTCCGACAGG	20	51,1	2719-2738	473
LlaI R R1	U17233	CTTGATTATGCATTTCTTCTACCC	24	51,2	3168-3191	
LlaII R F1	RM Typ II hsdR	TACGTTCTAAAATCCCCTCCAT	22	51,4	405-426	455
LlaII R R1	U16027	GGCAACACTTTCCGTAACTAATA	23	50,2	837-859	
LlaII R F2	RM Typ II hsdR	GAAGCGGTTGCCTGTGG	17	51,9	347-363	485
LlaII R R2	U16027	CCCGAATACTACGTGAACTGG	21	51,4	811-831	
LlaBI R F1	RM Typ II hsdR	AAATGGAGCAGAAGCAAAACA	21	51,8	108-128	448
LlaBI R R1	X97263	GTCGTCGTATTCATAAACTGGA	22	48,8	534-555	
LlaBI R F2	RM Typ II hsdR	TAATTGGATGGGGACCTATGA	21	51,0	329-349	404
LlaBI R R2	X97263	GACTTTGGCTTGATCTCCTCTAA	23	51,4	710-732	
LlaBII R F1	RM Typ II hsdR	AGCCGTAGTGCTACACAGGAA	21	51,7	298-318	460
LlaBII R R1	Y12736	GGAATTCGGGACGCTTTAT	19	50,9	739-757	
LlaBII R F2	RM Typ II hsdR	AGATGGCAGAGGAAGGCTATC	21	51,8	1085-1105	445
LlaBII R R2	Y12736	AAGCGTTCTTTATTTTTCATCTCA	24	51,5	1506-1529	
LlaCI R F1	RM Typ II hsdR	CTAAGCCGCCTAGTTTTTGTC	21	50,6	546-566	433

LlaCI R R1	*AJ002064*	*CTAGTGAATAGCGAATTTGAGAAA*	*24*	*49,9*	*955-978*	
LlaCI R F2	*RM Typ II*	*CAGATTTTTAAGCCTTCCCTCTA*	*23*	*51,1*	*217-239*	
	hsdR					*418*
LlaCI R R2	*AJ002064*	*ACAGGCTCCGAATGTAAAAGA*	*21*	*50,9*	*614-634*	
LlaDII R F1	*RM Typ II*	*TGCCAGAATAGATGCAACTTGT*	*22*	*51,7*	*39-60*	
	hsdR					*385*
LlaDII R R1	*Y12707*	*TGAGGACGCCTTCCAACA*	*18*	*51,9*	*426-423*	
LlaDII R F2	*RM Typ II*	*ATCCAGCAAATAAGACTCAAACTA*	*24*	*49,2*	*1129-1152*	
	hsdR					*467*
LlaDII R R2	*Y12707*	*TGCTAACATAATATCAAAATCTGG*	*24*	*48,3*	*1572-1595*	
LlaKRII F1	*RM Typ II*	*GATTACGATGATAGCGATTTACAA*	*24*	*50,3*	*19-42*	
	hsdR					*401*
LlaKRII R1	*AF051563*	*TTTGAACACTTTTGCCACAAG*	*21*	*50,6*	*399-419*	
LlaKRII F1	*RM Typ II*	*AACTGGCGACTAATGATGACTG*	*22*	*51,1*	*1049-1070*	
	hsdR					*439*
LlaKRII R1	*AF051563*	*TCCCATTTTCCTTCTAACACTTC*	*23*	*51,2*	*1565-1487*	

Fig. 4c. Primer für die Restriktions & Modifikationssystem II-Gene.

Primer	***Zielgen/ Acc. Nr.***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Position***	***Prod. Länge***
LlaFI F1	*RM Typ III*	*GGATGCTATTATGAACGGTTTAGA*	*24*	*51,6*	*2190-2213*	
	hsdR					*408*
LlaFI R1	*AF054600*	*AGTAATTGGCCATCATTGACTTT*	*23*	*51,5*	*2575-2597*	
LlaFI F1	*RM Typ III*	*GAAAACATGCTCAATAGTCAGTCT*	*24*	*49,2*	*346-369*	
	hsdR					*440*
LlaFI R1	*AF054600*	*TTCATAAATTCTCCAAGGTCATA*	*23*	*48,0*	*763-785*	

Fig. 4d. Primer für die Restriktions & Modifikationssystem III-Gene.

Primer	***Zielgen/ Acc. Nr.***	***Sequenz (5'-3')***	***bp***	***T_m***	***Position***	***Prod. Länge***
AbiA F1	*abiA*	*TTCCTTAAAAACGATAGTTGAAAT*	*24*	*48,8*	*666-689*	
AbiA R1	*U17233*	*TGTGACCACGTACTTTTATTGTAA*	*24*	*49,1*	*1086-1109*	*444*
	M63080					
AbiB F1	*abiB*	*GATAACATGCCAATTCCAACTG*	*22*	*51,4*	*85-106*	
AbiB R1	*M77708*	*ATCGGTATTACTTTTATTTCGTCT*	*24*	*48,0*	*567-590*	*506*

AbiC F1	abiC	CCTAGTTTTGGATTATGGTATGG	23	49,5	115-137	555
AbiC R1	M95956	AAATCTTTTGTTTAGGCTCTTCA	23	49,3	647-6669	
AbiD F1	abiD	GGAGAGCTACAAGTCGGTGAGT	22	51,8	385-406	424
AbiD R1	U10992	TAGGGGCATAAAAAGTTGGTG	21	51,3	788-808	
AbiDI F1	abiDI	ATAGTCCAGCATTTAAGCATCATA	24	49,9	545-568	487
AbiDI R1	AF116286	ACCCAATCCTCAGAAAAACC	20	49,7	1012-1031	
AbiEII F1	abiEII	GCACAGTCTATTGAACGGGTAAT	23	51,9	229-251	492
AbiEII R1	U36837	GAGCCAATCTTCAAACAGTTCTT	23	51,3	698-720	
AbiF F1	abiF	TTTATGTGCAGAATACCAAGAGTC	24	50,1	384-407	464
AbiF R1	U36837	AATAGGATTTTCGCAAGTTAGC	22	49,6	826-847	
AbiGI F1	abiGi	GCAGAGGGAAAAGCACAAA	19	50,3	136-154	455
AbiGI R1	U60336	ACACTAAAATTCAAAAGACCATTCT	25	49,8	566-590	
AbiH F1	abiH	GGAGCGATTTTGAAGAACAGAC	22	52,0	182-203	455
AbiH R1	X97651	TGGCGAATGAAATCCTAATACTAC	24	51,6	613-636	
AbiI F1	abiI	CAGACTATTATTGGGAAAAACACC	24	51,0	383-406	398
AbiI R1	U38973	ACAATCTCTAACCCACAATGACTT	24	50,7	780-803	
AbiK F1	abiK	TTGTTTATCAAAATGGCACATA	22	48,0	1099-1120	473
AbiK R1	U35629	AACCTCTATCAACAGACCCAGTAT	24	49,9	1548-1571	
AbiL F1	abiLII	AAGGAGGGTATTCAATCACAGTT	23	50,5	424-446	418
AbiL R1	U94520	CAAGACATTCATTATTCGTTTCAA	24	50,9	818-841	
AbiM F1	abiM	ATGCTAAACCGAAATACACAGAAG	24	51,7	194-217	441
AbiM R1	U41294	CATTTTTATCCCACCTATTGTCAG	24	51,7	611-634	
AbiN F1	abiN	TTTAATAAGGAGTTACAGATTGATG	25	49,5	61-85	466
AbiN R1	Y11901	CTCCTAGTTTGTTATTTACACTTTC	25	51,1	502-526	
AbiP F1	abiP	GACCCATACTCCATTTTTACATCA	24	51,8	289-312	425
AbiP R1	U90222	TCTAATTTTTGCATATCGGTTTTC	24	51,8	690-713	
AbiQ F1	abiQ	CAGCACTTATGTAGGGGTTGTT	22	50,4	126-147	341
AbiQ R1	AF001314	CTTTTTCATGAGCAGCTTTTCTAT	24	51,3	443-466	
AbiT F1	abiTII	ATGGTTGGATTCCTATGATTATGA	24	51,3	215-238	400
AbiT R1	AF483000	TGCTGTATTTGCGTTTCTCG	20	51,6	595-614	
AbiU F1	abiU	ATGGTGCCTAGAAACGAAGTAGTA	24	51,3	1090-1113	418
AbiU R1	AF188839	CTGTTTGTATTGCGATTGGATAA	23	51,6	1485-1507	

Fig. 4e. Primer für den Nachweis der Abortiven Phagen Gene.

Multiplex-PCR Nr.	Primerpaare			
1	*LlaDII X1 (385 bp)*	*EpsC X2 (415 bp)*	*LlaBII X2 (445 bp)*	*LlaI X1 (473 bp)*
2	*LlaI M X1 (401 bp)*	*LlaCI X2 (418 bp)*	*LlaBI X1 (448 bp)*	*Inj-Pip X1 (474 bp)*
3	*ScrFI R X1 (409 bp)*	*ScrFI M X2 (421 bp)*	*LlaII X1 (455 bp)*	*LldI X2 (470 bp)*
4	*Lla1403 X1 (404 bp)*	*LldI X3 (425 bp)*	*EpsC X1 (499 bp)*	*Inj-Pip X2 (465 bp)*
5	*ScrFI M X1 (404 bp)*	*LlaBII X1 (460 bp)*	*LlaII X2 (485 bp)*	*LlaKRII X1 (401 bp)*
6	*LlaDII X2 (467 bp)*	*LlaBI X2 (404 bp)*	*LlaCI X1 (433 bp)*	*LlaKRII X2 (439 bp)*
7	*ScrFI R X2 (409 bp)*	*LldI X1 (456 bp)*	*Lla1403 X2 (429 bp)*	*LlaFI X1 (440 bp)*

Fig. 4f. Kombinationen der Multiplex-PCR Primerpaare für die Phagenresistenzgene I-III.

Fig. 4

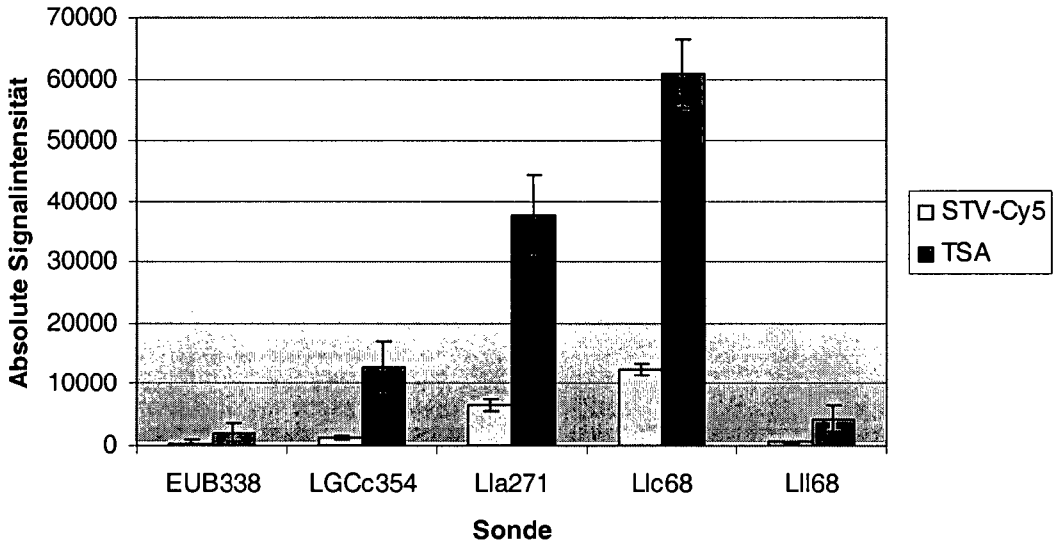


Fig. 5

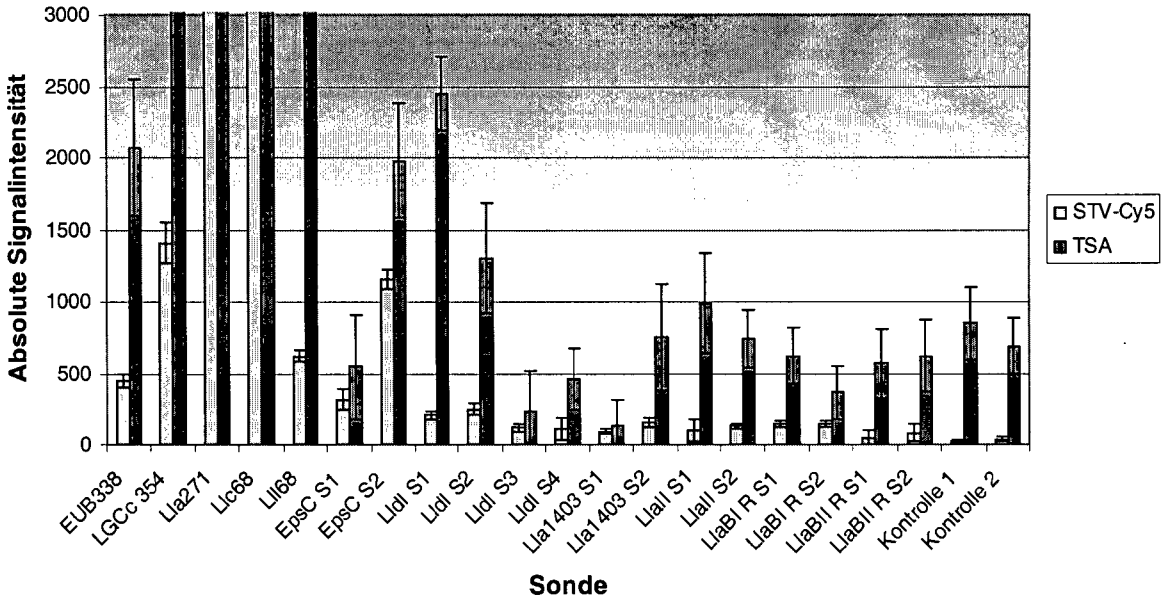

Absolute Signalintensität
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
STV-Cy5
TSA
EUB338
LGCc 354
Lla271
Llc68
Lll68
EpsC S1
EpsC S2
Lldl S1
Lldl S2
Lldl S3
Lldl S4
Lla1403 S1
Lla1403 S2
LlaII S1
LlaII S2
LlaBI R S1
LlaBI R S2
LlaBII R S1
LlaBII R S2
Kontrolle 1
Kontrolle 2
Sonde

Fig. 6

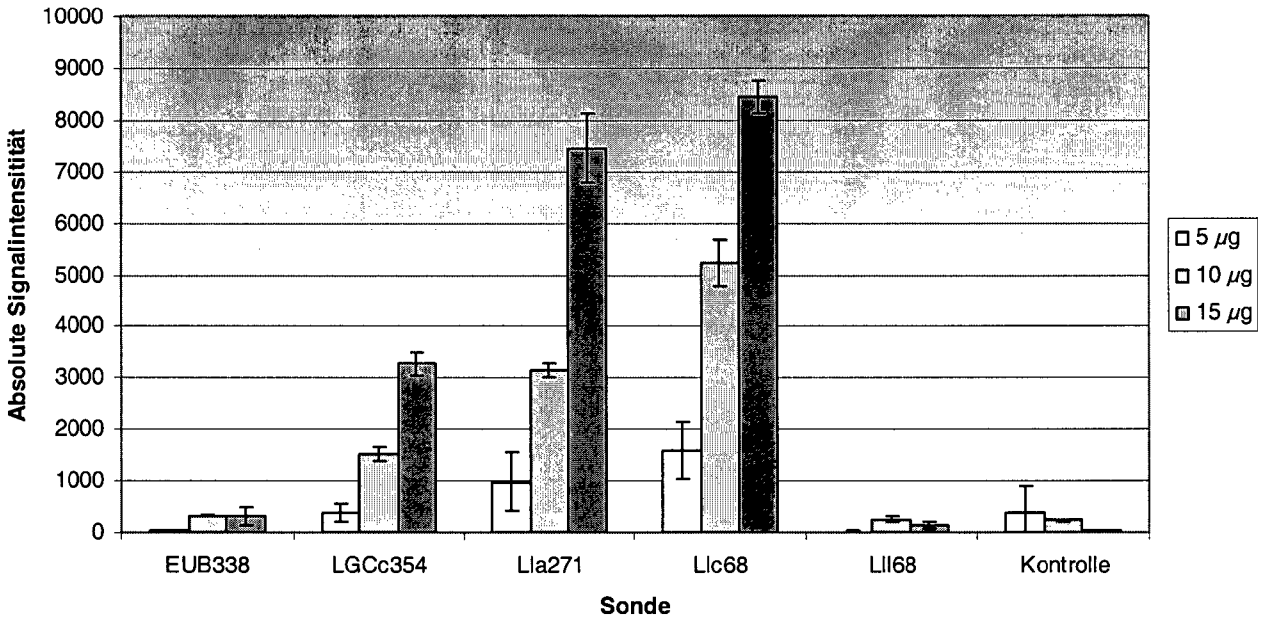

Absolute Signalintensitität
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5 µg
10 µg
15 µg
EUB338
LGCc354
Lla271
Llc68
Lll68
Kontrolle
Sonde

Fig. 7

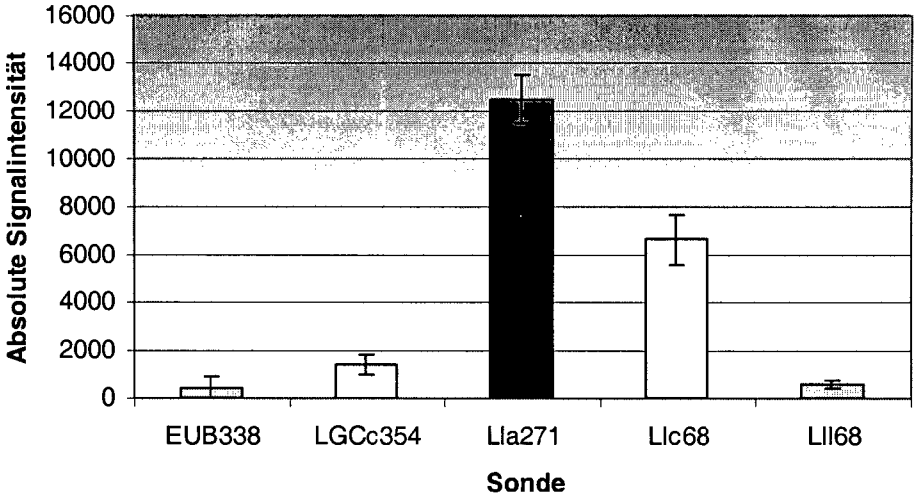
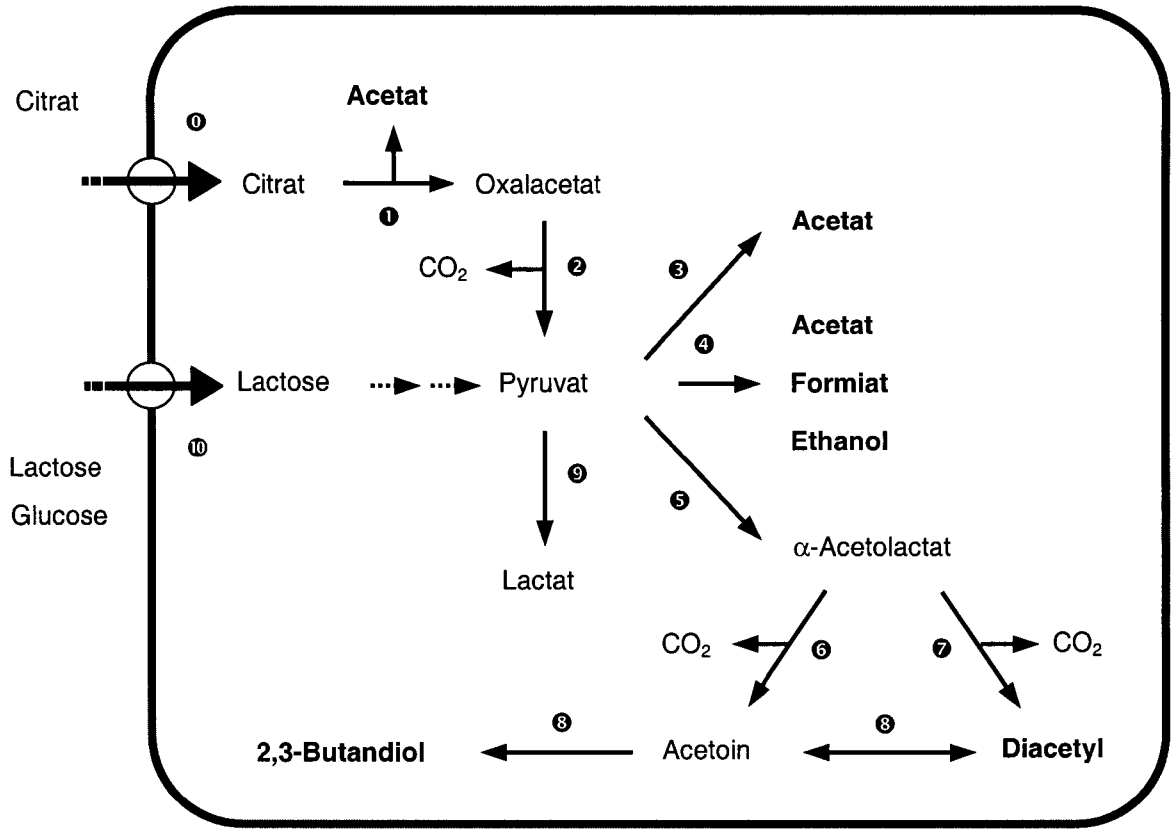

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Absolute Signalintensität
EUB338
LGCc354
Lla271
Llc68
Lll68
Sonde

Fig. 8



Citrat- und Lactose-Metabolismus in Milchsäurebakterien (Swindell et al., 1996). ⓪ Citrat-Permease, ❶ Citrat-Lyase, ❷ Oxalacetat-Decarboxylase, ❸ Pyruvat-Dehydrogenase, ❹ Pyruvat-Formiat-Lyase, ❺ α-Acetolactat-Synthase, ❻ α-Acetolactat-Decarboxylase, ❼ oxidative Decarboxylierung, ❽ Diacetyl-Acetoin-Reduktase, ❾ Lactat-Dehydrogenase, ❿ Lactose-Permease. (Schattierung bedeutet, dass die DNA-Sequenz des Enzyms aus *L. lactis* vorliegt).

Fig. 9

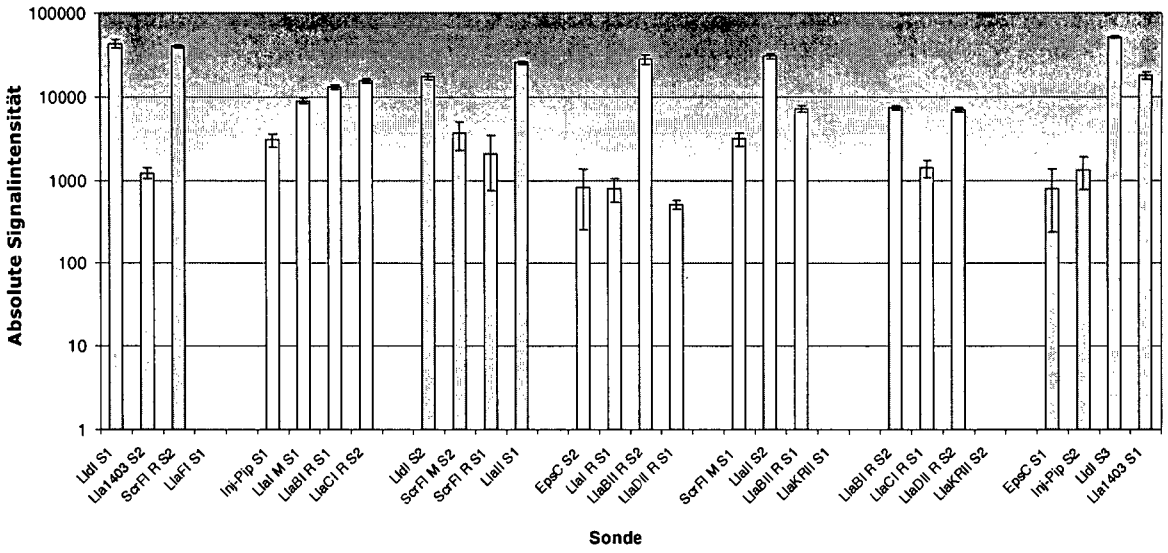

Absolute Signalintensität
100000
10000
1000
100
10
1
LldI S1
Lla1403 S2
ScrFI R S2
LlaFI S1
Inj-Pip S1
LlaI M S1
LlaBI R S1
LlaCI R S2
LldI S2
ScrFI M S2
ScrFI R S1
LlaII S1
EpsC S2
LlaI R S1
LlaBII R S2
LlaDII R S1
ScrFI M S1
LlaII S2
LlaBII R S1
LlaKRII S1
LlaBI R S2
LlaCI R S1
LlaDII R S2
LlaKRII S2
EpsC S1
Inj-Pip S2
LldI S3
Lla1403 S1
Sonde

Fig. 10

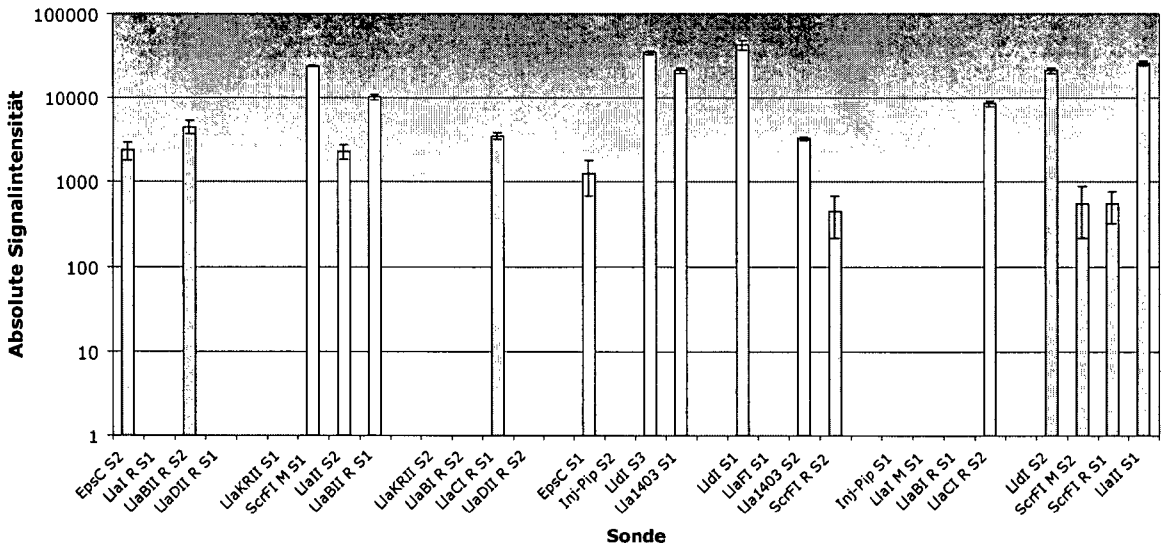

Absolute Signalintensität
100000
10000
1000
100
10
1
EpsC S2
LlaI R S1
LlaBII R S2
LlaDII R S1
LlaKRII S1
ScrFI M S1
LlaII S2
LlaBII R S1
LlaKRII S2
LlaBI R S2
LlaCI R S1
LlaDII R S2
EpsC S1
Inj-Pip S2
LldI S3
Lla1403 S1
LldI S1
LlaFI S1
Lla1403 S2
ScrFI R S2
Inj-Pip S1
LlaI M S1
LlaBI R S1
LlaCI R S2
LldI S2
ScrFI M S2
ScrFI R S1
LlaII S1
Sonde

Fig. 11