(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Februar 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/013052 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/008150

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2005 (27.07.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 037 081.8 30. Juli 2004 (30.07.2004) DE
10 2005 018 871.0 22. April 2005 (22.04.2005) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT BREMEN** [DE/DE]; Leobener Strasse, 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **ZHANG, Lei** [DE/DE]; Ramdohrstrasse 3, 28205 Bremen (DE). **REINHOLD-HUREK, Barbara** [DE/DE]; Am Barkhof 28, 28209 Bremen (DE). **HUREK, Thomas** [DE/DE]; Lothringer Strasse 17, 28211 Bremen (DE).

(74) Anwälte: **GANAHL, Bernhard** usw.; Hüber & Schüssler, Postfach 82 02 86, 81802 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2006/013052 A1

(54) **Title:** METHOD FOR ANALYSING SAMPLES BY MEANS OF HYBRIDISATION

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM ANALYSIEREN VON PROBEN MITTELS EINER HYBRIDISIERUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for analysing samples by means of a ligand bond, according to which duplexes or complexes are generated and analysed. The invention is characterised in that the target molecules comprise a detectable marking in the vicinity of a target sequence and/or a detectable marking is incorporated into said target sequence. It is thus possible to achieve significantly higher signal intensities than with conventional methods.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Analysieren von Proben mittels einer Ligandenbindung, bei dem Duplexe oder Komplexe erzeugt und analysiert werden. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, dass die Zielmoleküle eine detektierbare Markierung in räumlicher Nähe zu einer Zielsequenz aufweisen und/oder eine detektierbare Markierung in die Zielsequenz eingebaut ist. Hierdurch werden wesentlich höhere Signalintensitäten als bei herkömmlichen Verfahren erzielt.

Verfahren zum Analysieren von Proben mittels einer Hybridisierung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Analysieren von Proben mittels Ligandenbindungsverfahren, Zielmoleküle, die in solchen Verfahren einsetzbar sind, und Kits zur Bereitstellung solcher Zielmoleküle und/oder Durchführung der eingangs genannten Verfahren.

Hintergrund der Erfindung

Nukleinsäuren liegen normalerweise in Form doppelsträngiger Moleküle vor, die auch als Heteroduplexe bezeichnet werden und aus zwei Nukleinsäuremolekülen zusammengesetzt sind. Setzt man Duplexe einer Temperaturerhöhung aus, disoziieren sie in zwei einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle. Bei einer Erniedrigung der Temperatur können diese zu einem Heteroduplex reassozieren. Die Hinreaktion zu Duplexen bezeichnet man als Hybridisierung oder Rehybridisierung. Duplexe werden auch als Hybride bezeichnet.

Nukleinsäuren sind Polymere der Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, Inosin (a, c, g, t, u, i), künstlicher oder modifizierter Nukleotide, die in dem Polymer wie Perlen an einer Perlenkette aneinander gereiht sind. Die Abfolge der Nukleotide in einem Nukleinsäuremolekül ist für das jeweilige Nukleinsäuremolekül spezifisch. Die Bildung von Doppelsträngen erfolgt über Wasserstoff-Brückenbindungen, die zum Beispiel zwischen Einzelnukleotiden a und t, sowie c und g entstehen können, wenn auf einem Einzelstrang genügend Nukleotide aufeinander folgen, die auf ein jeweiliges Gegen-

nukleotid auf einem anderen Einzelstrang – und dort in der entsprechenden Reihenfolge – treffen. In der Natur kommen Nukleinsäuren in Form solcher zueinander komplementärer Einzelstränge als Doppelstrang vor.

Häufig steht man vor dem Problem, dass das Vorhandensein einer bestimmten Nukleinsäure in einem Reaktionsgemisch oder einer biologischen Probe (im Folgenden unter dem Begriff „Reaktionsgemisch" zusammengefasst) nachgewiesen werden soll. Dies geschieht in der Regel durch den Einsatz von Fängermolekülen, die einzelsträngige Nukleinsäuren aufweisen, die mit einem einzelsträngigen oder partiell einsträngigien Nukleinsäuremolekül, im Folgenden Zielmolekül genannt, zu Duplexen hybridiseren, und der Nachweis des Duplexes erlaubt eine Aussage über das Vorhandensein des Zielmoleküls. Da auf Nukleinsäuren bestimmte Sequenzen mehrmals vorkommen können bzw. mehrmals vorkommen, wird das Fängermolekül so ausgewählt, das es vorzugsweise mit einer Zielsequenz reagiert, die einen Abschnitt der Gesamtsequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure darstellt und für diese möglichst spezifisch ist. Dabei versucht man in der Regel eine größtmögliche Stringenz der Fänger-Zielsequenz-Hybride bzw. Duplexe und eine größtmögliche Spezifität bzw. Einzigartigkeit der Zielsequenz für die betreffende Nukleinsäure zu gewährleisten.

Das Nachweisen von Nukleinsäuren mittels Fänger-Zielsequenz-Hybriden ist seit langem bekannt. Es hat sich aus dem sogenannten Southern-Blot über viele Varianten bis hin zu Oligonukleotid-Chips oder DNA-Mikroarrays entwickelt, bei denen auf wenigen cm^2 Tausende von Oligonukleotidsequenzen als Spots räumlich separiert an einer festen Phase vorgesehen sind und als Fängermoleküle fungieren. Viele dieser Spots ermöglichen zeitlich parallel eine qualitative und im begrenzten Umfang quantitative Antwort auf An- oder Abwesenheit bestimmter Sequenzen in einem Reaktionsgemisch. Es gibt darüber hinaus eine Vielzahl von Variationen des Fängerzielsequenzhybridnachweisprinzips, die der Fachwelt allgemein bekannt sind.

Um einen Nachweis eines Fängerzielsequenzhybrides zu ermöglichen, braucht man hierfür eine hinreichende Menge nachweisbarer Hybride.

Häufig ist man mit geringen Probenmengen konfrontiert, die mittels einer PCR-Reaktion in mehreren Zyklen amplifiziert werden müssen. Jeder Zyklus einer PCR-Reaktion gleicht einem Kopiervorgang, wobei die Anzahl der Kopien mit jedem Schritt exponen-

tiell zunimmt. Jeder Schritt kostet Zeit und Material und je weiter der Kopiervorgang fortgeschritten ist, desto fehlerhafter können die Kopien ausfallen.

Je weniger Zyklen erforderlich sind, um eine nachweisbare Probenmenge zu erzeugen, desto günstiger und verlässlicher wird darum das mit einer so aufbereiteten Probe durchgeführte Hybridisierungsexperiment.

Bei der Quantifizierung von Hybriden gibt es erhebliche Unwägbarkeiten. Die maximale Zahl von Hybriden in einem Sondenpunkt oder Spot eines Mikroarrays kann höchstens der Zahl der Fängermoleküle in dem Spot entsprechen. Diese ist im allgemeinen bekannt. Darüber, wieviele der Fängermoleküle eines Spots in einem Experiment Fänger-Zielsequenz-Moleküle ausbilden, kann man aber kaum verlässliche Aussagen treffen. Etliche Faktoren, die die Hybridisierungseffizienz beeinflussen, sind bereits bekannt (Southern *et al.,* 1999), wie z.B. der Abstand der zum Zielmolekül komplementären Sequenz des Fängeroligonukleotids von der Glasoberfläche. Als sterischer Effekt wurde auch eine Verschlechterung der Effizienz beschrieben, wenn der Duplex zu einem langen Überhang des Zielmoleküls in Richtung Glasoberfläche führt (Peplies *et al.* 2003). Die Intensität der Detektionssignale, anhand derer man das Vorliegen von Hybriden nachweist, scheint zwar in etwa proportional zu der Zahl der in einem Sondenpunkt vorliegenden Hybride zu sein, aber der Proportionalitätsfaktor ist von Sondenpunkt zu Sondenpunkt anscheinend schon nicht identisch, wenn in unterschiedlichen Sondenpunkten verschiedene Hybride vorliegen.

Die EP 0721016 A2 beschreibt ein Verfahren zur Diskriminierung von perfekt komplementären Hybriden gegenüber solchen, die sich in einer oder in mehreren Basen unterscheiden. Durch enzymatischen Abbau einzelsträniger Polynukleotide nach der Hybridisierungsreaktion wird zwischen perfekt komplementären Hybriden und solchen mit Fehlpaarungen diskriminiert. Nur perfekt komplementäre und doppelsträngige Hybride sind nach dem Abbau noch vorhanden und anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung detektierbar. Markierte RNA Zielmoleküle können durch Standard PCR oder *in vitro* Transkription erzeugt werden, wobei zufällig ca. 10% der Us der Zielsequenz Fluorescein markiert wird. Ein zweites Verfahren betrifft die Detektion perfekter Hybride durch Ligation von markierten Oligonukleotiden nachdem eine Hybridisierung mit dem Zielmolekül stattgefunden hat. Das Zielmolekül wird nach der Ligation wieder vom Fänger-

molekül getrennt und abgewaschen. Danach erfolgt die Detektion an den restlichen Einzelsträngen.

In WO 98/23776 wird ein ähnliches Verfahren beschrieben. Hier sollen Zielmoleküle mit unterschiedlicher Zahl von Wiederholungen mit Fängermolekülen bekannter Länge hybridisiert werden. Nach einem Verdau mit Exonuklease bleiben nur perfekte Hybride über, so dass die Anzahl der Wiederholungen bestimmt werden kann. Wiederum ist nur der perfekt komplementäre Doppelstrang anhand seiner Markierung detektierbar. Das Zielmolekül wird markiert. Diese Markierung kann während der PCR mit markiertem Primer oder markierten Nukleotiden oder durch sonstige Methoden eingefügt werden. Die Markierung wird an beliebiger Position und vorzugsweise am 5`oder 3`Ende angebracht.

Die WO 98/53103 beschreibt DNA-Arrays mit unterschiedlichen Polynukleotiden innerhalb einzelner Spots und Kits mit solchen DNA-Arrays, sowie deren Herstellung und Benutzung. Die Spots auf fester Unterlage gehören jeweils zu einem bestimmten Gentyp (z.B. stark regulierte Gene oder Gene, die mit einem bestimmten Krankheitsstadium assoziiert sind). Die zu hybridisierenden Zielmoleküle können mit allen bekannten Methoden hergestellt werden, wobei der Gebrauch von Primern, die für die zu untersuchenden Gene spezifisch sind, vorgeschlagen wird. Die Zielmoleküle werden markiert, wobei die Markierung sich entweder im genspezifischen Primer oder in den dNTPs befinden kann. Die Länge der Fängermoleküle im Array beträgt hier typischerweise 120-800 Basen, wobei dies nur einen Teil der Gesamtlänge der zu untersuchenden cDNA (Zielmoleküle) darstellt.

Die WO 01/23600 A2 hingegen beschäftigt sich mit einem Verfahren zur Quantifizierung von relativer Spezifitäten der Hybridisierungsreaktion anhand von Dissoziationskurven. Mindestens ein Teil der detektierbar markierten Zielmoleküle ist dabei zumindest teilweise komplementär zu den Proben. Die Dissoziationskurve einer perfekt komplementären Sequenz kann z.B. als Referenz herangezogen werden. Die Differenz im Integral der zu untersuchenden Dissoziationskurve zur Referenzkurve ist eine Funktion der Spezifität und wird als Maß verwendet. Detektierbar markierte Zielmoleküle werden dabei an die Proben hybridisiert und anschließend schrittweise abgewaschen, wobei sich aus der Signalstärke die Dissoziationskurve ergibt. Die Methode kann mit allen Arten von markierten Polynukleotiden durchgeführt werden.

Die Veröffentlichung Peplies et al., Applied and Environmental Microbiology (69), 3, p.1397-1407, 2003 beschreibt eine Studie, die systematisch die Anwendbarkeit von Arrays für die Fragestellungen mikrobiologischer Ökologie untersucht. Um zu entscheiden, welche Faktoren die spezifische Erkennung von Abschnitten des 16SrRNA Gens beeinflussen und zu falsch positiven wie falsch negativen Ergebnissen führen, verwenden die Autoren zwanzig verschiedene Fängermoleküle von 15-20 Basen Länge, von denen bekannt ist, dass sich das 16SrRNA Gen verschiedener Spezies in ihnen unterscheidet. Die Zielmoleküle werden hergestellt, indem das 16SrRNA Gen von sechs exemplarischen Bakterienstämmen mit Hilfe markierter genspezifischer Primer amplifiziert wird. Die Hybridisierung zwischen den Zielmolekülen und den korrespondierenden Fängermolekülen findet dann in verschiedenen Bereichen der am 5´ Ende markierten Zielmoleküle statt. Die Markierung weist somit stark variierende Abstände bezüglich des Fängermoleküls in den unterschiedlichen Spots auf dem Array auf. Sie soll sich außerhalb der Hybridisierungsbereiche (5´ Ende Base 8: vgl. *Materials and Methods-preparation of fluorescently labeled target single stranded DNA: „5´-indocarbocyanine-labeled forward primer 8f"* und Tabelle 1: *„16S rRNA binding site and length"*) befinden.

Die US 5,871,928 A beschreibt Methoden zur Sequenzierung, *fingerprinting* und Kartierung biologischer Makromoleküle. Indem die Position und Sequenz einer Sonde auf einem Array bekannt ist, können Sequenzierungen von markierten Zielmolekülen durchgeführt werden. Dabei werden z. B. überlappende Sondennukleotide von fünf Basen Länge verwendet. Das markierte Zielmolekül bindet an unterschiedliche Sonden und durch Überlappung der Sondensequenz kann die Sequenz des Zielmoleküls bestimmt werden. Die Markierung des Signalmoleküls wird durch Standardmethoden erreicht. Das markierte Zielmolekül kann fragmentiert werden, um das Signal zu verbessern. Der Signalverbesserungseffekt resultiert aus einer höheren Konzentration von markierten hybridisierenden Fragmenten pro Sondensequenz. Ein relativ langes Zielmolekül ist auch mit einer relativ kleinen Anzahl von Markierungen pro Länge detektierbar, da aufgrund der Länge viele Markierungen vorhanden sind.

Die US 6,027,889 A betrifft eine Methode zur Detektion von Nukleinsäuresequenzen durch Kopplung von Ligase mit PCR Reaktionen. Zwei Zielsequenzen, die nebeneinander an einer zu untersuchenden Sequenz binden und zusätzlich einen Überhang enthalten, werden ligiert. Nach der Ligation werden die Überhänge zur Hybridisierung eines

markierten *ZIP code primers* in einer PCR Reaktion verwendet. Die amplifizierte DNA kann durch verschiedene Methoden analysiert werden (Gelfiltration, Arrays etc.). Die Markierung wird mittels PCR eingebracht, wobei ein Primer die Markierung trägt und der andere Primer mit der hybridisierbaren Sequenz verknüpft ist, so dass Hybridisierung und Markierung räumlich voneinander getrennt sind. Ligationsreaktion und PCR Reaktion können für unterschiedliche Anwendungen auf verschiedene Weise kombiniert werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zum Analysieren von Proben mittels einer Hybridisierung zur Verfügung zu stellen, mit dem auch sehr geringe Probenmengen sicherer und deutlicher detektiert werden können als bisher, und bei dem die detektierten Signale besser in Korrelation zueinander gesetzt werden können als bei bekannten Verfahren.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Analysieren von Proben mittels eines Ligandenbindungsverfahrens, bei dem durch Bindung von Zielsequenzen von Zielmolekülen mit Fängersequenzen von Sonden Duplexe oder Komplexe erzeugt und/oder bei dem so erzeugte Duplexe oder Komplexe analysiert werden, wobei die Zielsequenz eine Teilsequenz des Zielmoleküls ist und die Duplexe oder Komplexe in räumlicher Nähe zu und/oder innerhalb der Zielsequenz eine detektierbare Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen aufweisen.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Verwendung von Fängersequenzen, die komplementär zu Zielsequenzen der Zielmoleküle sind, die in räumlicher Nähe hierzu und/oder innerhalb der Zielsequenz eine detektierbare Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen aufweisen, in erfindungsgemäßen Verfahren zu Signalintensitäten führen, die gegenüber Signalintensitäten, wie sie in vergleichbaren Verfahren unter Verwendung von nicht erfindungsgemäß ausgewählten Fängersequenzen erzielt werden, so dass sich die Markierung nicht in räumlicher Nähe zur Zielsequenz befindet, erheblich höher sind.

Vorzugsweise ist die detektierbare Markierung oder die Anhäufung von Markierungen ausschließlich in räumlicher Nähe zu und/oder innerhalb der Zielsequenz angeordnet.

Zielmoleküle können mit einer einzigen Markierung markiert sein. Grundsätzlich ist es jedoch auch üblich, Zielmolküle mit mehreren Markierungen zu versehen. Hier ist die Anhäufung von Markierungen in räumlicher Nähe zu und/oder innerhalb der Zielsequenz vorzusehen.

Als Anhäufung von Markierungen im Sinne der vorliegenden Erfindung wird die vorzugsweise größte Anhäufung von Markierungen auf dem Zielmolekül verstanden, die sich innerhalb eines Bereiches befindet, der nicht länger als die Zielsequenz ist, und eine spezifische Duplexbildung erlaubt. Grundsätzlich ist es möglich, dass am Zielmolekül weitere Markierungen bzw. Anhäufungen von Markierungen vorgesehen sind, die jedoch nicht immer in Bereichen liegen, die für das Zielmolekül spezifisch sind und daher nicht als Zielsequenz geeignet sind.

Dadurch, dass die Zielsequenz auf für das Zielmolekül spezifische Bereiche beschränkt ist, ist sie oftmals nicht frei variierbar, weshalb gemäß der Erfindung sowohl zumindest eine Markierung in der Nähe zu oder innerhalb eines für das Zielmolekül spezifischen Bereichs vorzusehen ist und die Fängersequenz komplementär zu diesem Bereich zu bestimmen ist, der dann die Zielsequenz darstellt.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren werden mehrere Proben gleichzeitig mittels Ligandenbindung analysiert, wobei alle Zielmoleküle zumindest eine detektierbare Markierung in räumlicher Nähe zu der oder in der jeweiligen Zielsequenz aufweisen.

Nach einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren weisen alle Zielmoleküle die gleiche Anzahl von Markierungen auf.

In erfindungsgemäßen Verfahren werden zumindest zehn Proben, vorzugsweise zumindest hundert Proben beziehungsweise zumindest tausend Proben gleichzeitig analysiert.

In erfindungsgemäßen Verfahren kann die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung sein.

In erfindungsgemäßen Verfahren wird die Fluoreszenzmarkierung mittels eines oder mehrerer der folgenden Markierungsmittel erzielt: Cy3, Cy5, Fluorescein, Texas-Red,

Alexa-Fluor-Farbstoffe und/oder andere Fluoreszenzfarbstoffe.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von Zielmolekülen, die in räumlicher Nähe zur jeweiligen Zielsequenz oder innerhalb der jeweiligen Zielsequenz zumindest eine Markierung aufweisen, wobei die Zielsequenzen Abschnitte bzw. Teilsequenzen der Zielmoleküle darstellen.

Bei der Erfindung werden Zielmoleküle verwendet, welche Zielsequenzen und eine Markierung in räumlicher Nähe zur oder innerhalb der jeweiligen Zielsequenz umfassen bzw. aufweisen.

Diese Zielmoleküle sind einsetzbar in den zuvor dargestellten erfindungsgemäßen Verfahren und führen zu Fänger-Zielsequenz-Hybriden, die eine höhere Signalintensität aufweisen, als eben solche Hybride, die unter zu Hilfenahme von Zielmolekülen erzeugt werden, welche Zielsequenzen und eine Markierung zur jeweiligen Zielsequenz aufweisen, die sich nicht in räumlicher Nähe zu dieser befindet.

Die Markierung der Zielmoleküle kann mittels enzymatischer Endmarkierung, reverser Transkription, indirekter Markierung und/oder „Sandwich"-Methoden erfolgen.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur Erzeugung von Zielmolekülen mittels eines PCR-Verfahrens, bei dem zumindest ein mit einem Markierungsmittel versehener Primer eingesetzt wird.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann zumindest ein weiterer mit einem identischen oder einem weiteren Markierungsmittel versehener Primer eingesetzt werden. Auf diese Weise lassen sich unterschiedliche Signalarten vorsehen, um Ergebnisse in erfindungsgemäßen Verfahren zu verifizieren, aber auch um die Intensität von unterschiedlichen Spots, in denen unterschiedlich viele Hybride vorliegen, aneinander an zu gleichen, so dass die Intensitäten im selben Größenordnungsbereich liegen. Der Spot, in dem mehr Hybride vorliegen kann beispielsweise das Markierungsmittel mit der geringeren Signalintensität aufweisen. Da sich die Signale aufgrund unterschiedlicher Markierungsmittel voneinander unterscheiden lassen und der Faktor, um den sich ihre Signalintensitäten voneinander unterscheiden, bekannt ist, ermöglicht ein solches Verfahren eine Quantifizierung und einen besseren Vergleich der Intensitäten in beiden

Spots. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Verwendung eines eine höhere Signalintensität aufweisenden Markierungsmittels zu einem Sättigungswert bei der Detektionsvorrichtung, etwa einem Photomultiplier, führen würde. Dann wäre nämliche eine Quantifizierung aufgrund apparativer Gegebenheiten nicht möglich oder zumindest erschwert.

Setzt man bei einem PCR-Verfahren Primer ein, die markiert sind, und dNTPs, die über keine Markierung verfügen, so ist das PCR-Produkt an dem Ende, das durch den Primer gebildet wird, markiert, und an den übrigen Stellen nicht markiert. Wählt man die Primer so, dass die Zielsequenz des PCR-Produktes sich in räumlicher Nähe zum Primer befindet, so stellt das PCR-Produkt ein Zielmolekül dar, das ausschließlich in räumlicher Nähe zur Zielsequenz eine Markierung gemäß der Erfindung aufweist. Es ist dies ein denkbar einfaches und unkompliziertes Verfahren, um zu erfindungsgemäßen Zielmolekülen zu gelangen. Dadurch, dass man definierte Primer mit einer bestimmten Länge einsetzt, lässt sich eine genauere Aussage darüber machen, wieviel Markierungsagens in jeweils ein Zielmolekül eingebaut wurde, als wenn eine Mischung aus markierten und nicht markierten dNTPs zum Erzeugen eines markierten PCR-Produktes verwendet wird; denn wenn einzelne dNTPs markiert sind, so ist darum nicht immer klar, wie viele markierte dNTPs in einem PCR-Produkt eingebaut werden, und wie viele nicht markierte darin eingebaut werden, bzw. die PCR-Produkte unterscheiden sich hinsichtlich der Zahl der darin eingebauten markierten Nukleotide. Es ist dies außerdem von der jeweils amplifizierten Sequenz abhängig. Üblicherweise ist eine der vier einzubauenden Basen markiert. Taucht diese in einem Amplifikationsprodukt weniger häufig auf, so enthält das Amplifikationsprodukt weniger Markierungsmittel als andere Amplifikationsprodukte. Dieser Umstand erschwert in erheblichem Maße das Treffen quantitativer Aussagen anhand eines Mikroarray-Experimentes. Durch eine entsprechende Primerauswahl lässt sich sicherstellen, dass die in einem Experiment verwendeten Primer jeweils in etwa die gleiche Menge Markierungsmittel aufweisen. Diese Mengen variieren nicht mehr in Abhängigkeit von einer zu amplifizierenden Zielsequenz, sondern hängen einzig und allein vom Aufbau und der Gestaltung des jeweils verwendeten Primers ab. Abgesehen von den erhöhten Signalintensitäten, die die Empfindlichkeit von Mikroarrayexperimenten erheblich verbessern, stellen erfindungsgemäße Verfahren aus den genannten Gründen auch wesentlich genauere Verfahren als bisher nach dem Stand der Technik bekannte Verfahren dar.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Zielmolekülen, werden Zielmoleküle mittels eines PCR-Verfahrens erzeugt, und es wird dabei zumindest eine Art dNTPs eingesetzt, die mit einem Markierungsmittel versehen sind, wobei die markierten dNTPs in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz und/oder in die Zielsequenz selbst eingebaut werden.

Im Unterschied zum Stand der Technik ist bei einem solchen erfindungsgemäßen Verfahren sichergestellt, dass Markierungsagens in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz tatsächlich vorkommt. Die Zielsequenz stellt hierbei nur einen Abschnitt bzw. eine Teilsequenz des Zielmoleküls dar. Das Zielmolekül weist in der Regel eine Länge auf, die deutlich länger ist als die der Zielsequenz und insbesondere, da 2-, 3-, 4- oder 5-fache der Zielsequenz beträgt. Bei derart langen Zielmolekülen führt eine zufällige Verteilung der Markierungen zu wesentlich schlechteren Signalintensitäten, als wenn die erfindungsgemäße Positionierung der Markierungen vorgesehen wird. Dies zeigen die unten erläuterten Beispiele sehr eindrucksvoll. In unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz bedeutet in diesem Zusammenhang, dass Markierungsagens an in die Zielsequenz eingebauten Nukleotiden oder an direkt neben der Zielsequenz eingebauten Nukleotiden gebunden ist. In unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz im Sinne der Erfindung bedeutet, dass die Markierung bzw. dass das Markierungsagens nicht weiter als 100 bzw. 60, vorzugsweise nicht weiter als 0 - 20 Basen von der Zielsequenz entfernt ist. Signifikante positive Effekte (Faktoren 2-146) können noch in einem Abstand von 100 Basen detektiert werden. Vorzugsweise ist die Markierungsagens ausschließlich in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz angeordnet.

Weitere erfindungsgemäße Verfahren umfassen die Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) mittels anderer Methoden, z.B. durch enzymatische Endmarkierung (wie z.B. durch terminale Transferase, Polynukleotidkinase, Poly(a)-Polymerase oder andere Enzyme) oder durch reverse Transkription mit fluoreszenzmarkierten Primern, oder durch indirekte Markierungsverfahren.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Zielmoleküle, ist ein Verfahren, bei dem Zielmoleküle mittels eines PCR-Verfahrens erzeugt werden, bei dem zumindest eine Art dNTPs eingesetzt werden, die mit einem Markierungsmittel versehen sind, bei dem die markierten dNTPs bzw. eine Anhäufung davon in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz und/oder in die Zielsequenz selbst eingebaut

werden, und bei dem ein oder mehrere Primer eingesetzt wird oder eingesetzt werden, der oder die mit dem gleichen oder weiteren Markierungsmitteln versehen ist oder sind.

Weitere erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Zielmoleküle sind Verfahren, in denen Markierungsmittel in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz und/oder in die Zielsequenz selbst eingebaut werden.
Hier sind viele Verfahren möglich, z.B. Einbau markierter dNTPs in cDNA durch reverse Transkription, oder Post-labeling-Protokolle, die den Einbau von Aminoallyl-nNTP in cDNA nutzen und dann eine chemische Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen, oder direkte nicht-enzymatische Markierung der RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen.

Ein solches Verfahren führt zu erfindungsgemäßen Zielmolekülen, die auch bei sehr geringen Konzentrationen gebildeter Hybride noch gut nachweisbar sind, da durch den Einbau von Markierungsmittel in die Zielsequenz vergleichsweise viel Markierungsmittel eingebaut werden kann. Zumindest bei in normalen Konzentrationen vorliegenden Zielmolekülen kann anhand des weiteren Markierungsmittels im verwendeten Primer das Ergebnis in einem Spot außerdem verifiziert werden.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Zielmoleküle zum Einsatz in erfindungsgemäßen Verfahren, die eine Markierung bzw. eine Anhäufung von Markierungen in räumlicher Nähe zur oder innerhalb der jeweiligen Zielsequenz aufweisen, wobei die Zielsequenz einen Abschnitt bzw. eine Teilsequenz des Zielmoleküls bildet.

Bevorzugt sind nach erfindungsgemäßen Verfahren bereitgestellte erfindungsgemäße Zielmoleküle.

Die Aufgabe wird schließlich durch ein erfindungsgemäßes Verfahren gelöst, bei dem erfindungsgemäße Zielmoleküle zum Einsatz kommen, die auch nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung solcher Moleküle hergestellt worden sein können.

Ein erfindungsgemäßer Satz Fängermoleküle für die Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren umfasst:
- eine vorbestimmte Anzahl unterschiedlicher Fängermoleküle umfassend jeweils unterschiedliche Fängersequenzen, die jeweils zum Ausbilden von Ligandenbindungen mit

Zielsequenzen von erfindungsgemäßen Zielmolekülen derart ausgebildet sind, dass sie komplementär zu den jeweiligen Abschnitten der Zielsequenzen sind, die sich in räumlicher Nähe zu einer Markierung bzw. einer Anhäufung von Markierungen befinden.

Ein erfindungsgemäßer Satz Fängermoleküle weist zumindest 10, 30, 50, 100, 1.000 beziehungsweise 5.000 unterschiedliche Fängersequenzen auf. Vorzugsweise sind alle Fängermoleküle des Satzes Fängermoleküle derart ausgebildet, dass sie komplementär zu den jeweiligen Abschnitten der Zielsequenzen sind, die sich in räumlicher Nähe zu einer Markierung bzw. einer Anhäufung von Markierungen befinden.

Bei einem erfindungsgemäßen Satz sind die Fängersequenzen Bestandteile der Sonden eines DNA-Arrays.

Nach einem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Fängermoleküle derart bestimmt bzw. berechnet, dass sie komplementär zu den jeweiligen Abschnitten der Zielsequenz sind, die sich in räumlicher Nähe zu einer Markierung bzw. zu einer Anhäufung von Markierungen befinden. Als Zielsequenz wird hierbei ein Bereich des Zielmoleküls bestimmt, der für das Zielmolekül spezifisch ist.

In einer Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von N_2-fixierenden Organismen mittels Sequenzanalyses verwendet werden. N_2-fixierenden Organismen enthalten Nitrogenasen zur Reduktion von Luftstickstoff N_2 zu Ammonium, deren kodierende Gene sich zur phylogenetischen Sequenzanalyse eignen. Hierzu können nun diagnostische Arrays eingesetzt werden, die erfindungsgemäße Fängermoleküle enthalten, die an Regionen der Nitrogenasegene binden, die spezifisch für bestimmte Nitrogenasegruppen sind. Dabei kann die Spezifität eines Fängeroligonukleotids größere phylogenetische oder sonstige Gruppen umfassen, kleinere Gruppen wie z.B. Gattungen, Arten oder einzelne Stämme.

Zu einer solchen phylogenetischen Sequenzanalyse eignet sich, beispielsweise das Enzym Nitrogenase, insbesondere die Untereinheit, die durch das Gen *nifH* kodiert wird (Hurek et al., 1997; Hurek et al., 2002). Durch Sequenzanalysen von *nifH* – inklusive Gene für alternative Nitrogenase *anfH* und *vnfH* - ist es möglich, Stickstoff-fixierende

Prokaryonten ohne Kultivierung in Umweltproben in DNA-Präparationen nachzuweisen und zu identifizieren. Die Untereinheit *nifH,* beispielsweise, ist wegen des relativ hohen Konservierungsgrades und den sehr gut ausgereiften Primersystemen zur gleichzeitigen Amplifikation aller phylogenetisch verschiedenen *nifH*-Varianten mittels PCR (Tan, Hurek, Reinhold-Hurek 2003) bestens geeignet. Es lassen sich sogar die am aktivsten N_2-fixierenden Bakterien nachweisen, wenn die Analysen auf mRNA-Ebene vorgenommen werden (Hurek et al., 2002). Die Analyse der Diversität von Nitrogenasegenen läßt sich im Vergleich zu Sequenzierungen wesentlich verkürzen, wenn diagnostische Mikroarrays eingesetzt werden. Somit umfasst die Erfindung auch den Einsatz eines diagnostischen Mikroarrays, wobei die Fängermoleküle an Regionen von *nifH/anfH/vnfH*-Genen binden, die spezifisch für bestimmte Nitrogenasegengruppen sind.

Geeignete Fängermoleküle für diese erfindungsgemäße Sequenzanalyse kann man erhalten, indem zunächst für bekannte Gene die *nifH-*, *anfH-* oder *vnfH*-Genbereiche, die durch die verwendeten PCR-Primer amplifiziert werden, angeordnet werden (Alignment), wobei die Proteinsequenz berücksichtigt wird, d.h. die Basen liegen in einer Position, die jeweils die entsprechende Aminosäure kodieren. Mithilfe dieses Alignments und nach Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums daraus können die Sequenzen als Zielsequenzen selektiert werden, die in einer Zielgen-Gruppe identisch sind und sich von allen anderen bekannten Sequenzen abgrenzen lassen, wobei die Abgrenzung durch das Vorliegen von Mismatch-Positionen erfolgt.

Bevorzugt werden die Zielsequenzen so ausgewählt, dass mindestens zwei Mismatch-Positionen vorliegen, wobei eine davon zentral in der Zielsequenz liegen kann, die die Zielgruppe von Nitrogenasegenen von anderen Nitrogenasegenen abgrenzt, und zumindest eine weitere Mismatch-Position zu einer nicht-Zielsequenz vorliegt.

Ferner ist es vorteilhaft, wenn die Zielsequenzen einen möglichst ähnlichen Tm-Wert, bevorzugt 60-70°C, besonders bevorzugt 62-69°C, zu den anderen Zielsequenzen aufweisen.

Die hierzu revers komplementären Sequenzen werden dann als Fängersequenzen für die Fängermoleküle ausgewählt.

Um einen spezifischen Nachweis mit hoher phylogenetischer Auflösung, insbesondere auf Gattungs- oder Artebene, zu erzielen, können Fängermoleküle von bis zu 35mer, bevorzugt bis zu 30mer, besonders bevorzugt 17-25mer, verwendet werden. Durch die kurzen Fängermoleküle wird die Stringenz der Hybridisierung erhöht, wodurch geringe Sequenzunterschiede, wie sie unter verschiedenen Arten und/oder Gattungen auftreten, detektierbar sind.

Beispiele für geeignete Fängermoleküle (SEQ ID NO: 1-189) für das oben angeführte Verfahren zur Sequenzanalyse sind in Tabelle 1 angeführt. Die Spezifitäten der Fängermoleküle (SEQ ID NO:1-189) aus der Tabelle 1 sind den Figuren 13 bis 18 zu entnehmen. Die Fängermoleküle der SEQ ID NO:1-189 wurden so ausgewählt, dass sie möglichst nah am markierten Ende des Zielmoleküls binden und dabei die gewünschte Spezifität (Figuren 13 bis 18) aufweisen. Neben den in Tabelle 1 angeführten Oligonukleotiden (SEQ ID NO:1-189) sind erfindungsgemäß auch Oligonukleotide als Fängermoleküle geeignet, die sich in ihrer Länge um ein oder mehrere Nukleotide gegenüber den Oligonukleotiden der SEQ ID NO:1-189 unterscheiden oder die hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz an ein oder mehreren Positionen gegenüber den entsprechenden Oligonukleotiden der SEQ ID NO:1-189 unterschiedlich sind, sofern sie die selbe Spezifität wie die entsprechenden Oligonukleotide der SEQ ID NO:1-189 aufweisen, d.h. an die jeweilige, selbe, in den Figuren 13 bis 18 angeführte, Nitrogenasegen-Region binden wie das entsprechende Oligonukleotid aus der Tabelle 1.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Arrays zur Sequenzanalyse werden Nitrogenasegen-spezifische Fängermoleküle auf einer Matrix (Objekträger) immobilisiert.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren und einiger Ausführungsbeispiele näher erläutert. Die Figuren zeigen in:

Figur 1a schematisch eine 362bp-langes Zielsmolekül gemäß einem der Ausführungsbeispiele,

Figur 1b eine Tabelle, in der Oligonukleotide aufgelistet sind, wie sie in den Ausführungsbeispielen zum Einsatz kommen,

Figur 1c eine Tabelle, in der Oligonukleotide aufgelistet sind, wie sie als Primer für die Amplifikation mittels PCR in den Ausführungsbeispielen zum Einsatz kommen,

Figur 1d schematisch das Modellsystem,

Figur 2a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy5-markierten Antisense-Stranges mit Sense-Oligonukleotiden,

Figur 2b eine schematische Darstellung der Hybridmoleküle,

Figur 2c eine grafische Darstellung von ermittelten Signalitensitäten,

Figur 3a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy5-markierten Sense-Stranges mit Antisense-Oligonukleotiden,

Figur 3b eine schematische Darstellung der zu Figur 3a gehörenden Hybridmoleküle,

Figur 3c eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 3a,

Figur 4a Fluoreszenzsignale einer Hybridisierung eines Cy3-markierten Sense-Stranges mit Antisense-Nukleotiden,

Figur 4b eine schematische Darstellung der Hybridmoleküle aus Figur 4a,

Figur 4c eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 4a,

Figur 5a Fluoreszenzsignale einer Hybridisierung eines Cy3-markierten Antisense-Stranges mit Sense-Oligonukleotiden,

Figur 5b eine schematische Darstellung der Hybridmoleküle, die zu den Fluoreszenzsignalen in Figur 5a führen,

Figur 5c eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 5a,

Figur 6a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy3-markierten Sense-Stranges mit Antisense-Oligonukleotiden,

Figur 6b eine schematische Darstellung der Hybridmoleküle, die zu Fluoreszenzsignalen nach Figur 6a führen,

Figur 6c eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 6a,

Figur 7a eine schematische Darstellung von 50mer Oligonukleotiden nach den Ausführungsbeispielen,

Figur 7b eine Tabelle der 50mer Oligonukleotide aus Figur 7a,

Figur 8a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy3-markierten Sense-Stranges mit 50mer Antisense-Oligonukleotiden,

Figur 8b eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 8a,

Figur 9a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy3-markierten Antisense-Stranges mit 50mer Sense-Oligonukleotiden,

Figur 9b eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 9a,

Figur 10a Fluoreszenzsignale einer Hybridisierung von mit Fluorescein-12-dUTP markiertem Sense-Strang mit kurzen Antisense-Oligonukleotiden, wobei die Stränge nicht endmarkiert sind, sondern durch Einbau von Fluorescein-12-dUTP intern gleichmäßig markiert sind,

Figur 10b grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 10a,

Figur 11a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy5-endmarkierten Sense-Stranges mit kurzen Antisense-Oligonukleotiden wie in Fig. 3,

Figur 11b eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 11a,

Figur 12a Fluoreszenzsignale der Hybridisierung eines Cy5-endmarkierten, am 5'-Ende verkürzten Sense-Stranges mit kurzen Antisense-Oligonukleotiden wie in Fig. 11, und

Figur 12b eine grafische Darstellung der Signalintensitäten der Fluoreszenzsignale aus Figur 12a.

Figur 13 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen aus Bakterien der alpha- und beta-Untergruppe der Proteobakterien clustern. Die Namen der Fängermoleküle sind neben den Strichen gezeigt, die die Sequenzabdeckung verdeutlichen. Die genaue Sequenzabdeckung ist durch Symbole unterschiedlicher Formen gezeigt. Die

Nitrogenasegene (*nifH, anfH, vnfH*) aus Datenbanken sind durch ihre Hinterlegungsnummer gekennzeichnet.

Figur 14 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen aus Bakterien der beta- und gamma-Untergruppe der Proteobakterien clustern. Die Namen der Fängermoleküle und die Sequenzabdeckung sind wie in Figur 13 dargestellt.

Figur 15 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen aus Bakterien der omega-Untergruppe der Proteobakterien clustern. Die Namen der Fängermoleküle und die Sequenzabdeckung sind wie in Figur 13 dargestellt.

Figur 16 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen aus Frankia, Cyanobakterien und ähnlichen Bakterien clustern. Die Namen der Fängermoleküle und die Sequenzabdeckung sind wie in Figur 13 dargestellt.

Figur 17 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen der Cluster II und IV clustern. Die Namen der Fängermoleküle und die Sequenzabdeckung sind wie in Figur 13 dargestellt.

Figur 18 zeigt die Spezifitäten der Fängermoleküle aus Tabelle 1, die mit Nitrogenasengenen des Cluster III clustern. Die Namen der Fängermoleküle und die Sequenzabdeckung sind wie in Figur 13 dargestellt.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die Signalausbeute bei fluoreszenzmarkierten Zielmolekülen, die in einem Teilabschnitt mit Fängersequenzen Hybride bzw. Duplexe bilden, höher sind, wenn die Fluoreszenzmarkierung in der Nähe des gebildeten Hybrides liegt. Unerwarteterweise ist dieser Effekt strang– und damit sequenzunabhängig.

Überraschenderweise ist der beobachtete Effekt auch unabhängig von der chemischen Natur der Fluoreszenzmarkierung. Der Effekt tritt sowohl bei Verwendung langer (z. B. 50mere), als auch kurzer Fängeroligonukleotide (z. B. 16- 17 mere) auf. Überraschenderweise ist dieser Effekt außerdem unabhängig von der verwendeten Glasmikroarrayoberflächen bzw. –beschichtung zur Immobilisierung von Fängeroligonukleotiden.

Anhand der nun folgenden Ausführungsbeispiele lässt sich die Erfindung besser erläutern. Die Ausführungsbeispiele machen deutlich, dass die Erfindung zu einer dramatischen Verbesserung der Signalausbeute in und der Aussagekraft von Mikroarray-Hybridisierungsexperimenten führt.

Figur 1D zeigt schematisch den Aufbau eines mittels eines erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugten Duplexes oder Hybridkomplexes A: An die Oberfläche B eines DNA-Arrays, beispielsweise eine Glasoberfläche, ist über einen Spacer C, beispielsweise ein Poly-Adenin-Abschnitt eines Oligonukleotides, eine Fängersequenz bzw. ein Fängeroligonukleotid D gebunden. Daran komplexiert über eine Zielsequenz E ist ein Zielmolekül F. Wie man es der Figur 1D entnehmen kann, ist die Zielsequenz E lediglich ein Abschnitt bzw. eine Teilsequenz des Zielmoleküls F. Bei derartigen Zielmolekülen mit einem am Duplex ausgebildeten Überhang, können die Markierungen grundsätzlich an beliebiger Stelle angeordnet sein und auch vom Duplex entfernt positioniert sein. Nur bei derartigen Duplexen tritt das der Erfindung zugrunde liegende Problem auf, dass die gemessenen Signalintensitäten, insbesondere bei geringen Probenmengen, derart instabil sind, dass sie quantitativ keine Aussage erlauben.

Eine Position 1 des Hybridkomplexes ist in Figur 1D mit G bezeichnet Es ist dies die erste Base des Hybridkomplexes A aus Fängersequenz D und Zielsequenz E. An dieser befindet sich eine Fluoreszenzmarkierung H. Der schematisch dargestellte Hybridkomplex stellt also eine Ausführungsform der Erfindung dar, bei der die Markierung H innerhalb der Zielsequenz F des Zielmoleküls E eingebaut ist.

Die Erfindung lässt sich anhand der folgenden Ausführungsbeispiele besser erläutern.

Die nun folgenden Ausführungsbeispiele zeigen, dass die Erfindung die Signalintensität bei Mikroarrayexperimenten erheblich verbessert. Gezeigt wird dies anhand bestimmter Fluoreszenzmarkierungen. Die Ausführungsbeispiele demonstrieren, dass es im Wesentlichen auf die Position des Markierungsagens in Bezug auf das nachzuweisende Hybrid ankommt. Es ist hierbei vollkommen egal, um was für ein Markierungsagens es sich im Einzelnen handelt. Es kommt einzig und allein auf die Position des Markierungsagens in Bezug auf das nachzuweisende Hybrid bzw. Duplex an, wobei natürlich Mischeffekte mit anderen Faktoren, die die Hybridisierungeeffizienz beeinflussen können (z.B. Länge des Oligonukleotidspacers, sterische Effekte, Effekte der Sekundär-

struktur), auftreten. Die folgenden Ausführungsbeispiele sind darum lediglich als Erläuterungsbeispiele zu verstehen. Insbesondere schränken die folgenden Ausführungsbeispiele und das eben erläuterte Experiment die Lehre der Erfindung nicht ein im Hinblick auf nachzuweisende Sequenzen, zu verwendende Markierungen oder dergleichen.

Ausführungsbeispiele:

Die Ausführungsbeispiele sind Bestandteile eines Beispielexperimentes, das wie folgt angelegt war:

Das Zielmolekül in dem Beispiel-Experiment ist eine 5'-endmarkierte oder durch random labeling mit Fluorescein-12-dUTP markierte einzelsträngige DNA, und zwar im Fragment des Nitrogenasegens *nifH* (Hurek *et al.*, 1995) aus dem Bakterium *Azoarcus* sp. Stamm BH72. Das Fragment wurde mittels PCR mit den Primern Zehr-nifH aus chromosomaler DNA des Stammes BH72 amplifiziert (Hurek et al., 2002), wobei einer der Primer mit Cy3/Cy5 markiert war, der andere mit Biotin. Fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA konnte so aus dem PCR-Produkt isoliert werden. Beim Gebrauch von mit Fluorescein-12-dUTP für random labeling wurde lediglich biotinylierter Primer eingesetzt. Die Primer hatten für alle Experimente die in Figur 1C aufgelisteten Sequenzen, Primer Z-nifH-f und Z-nifH-r (Zehr and McReynolds, 1989), bis auf Experimente im Zusammenhang mit Figur 11 (Primer Z-nifH-f-BH72-Cy5 und Z307-nifH-r-BH72-Biotin) und Figur 12 (Primer Z114-nifH-f-BH72-Cy5 und Z307-nifH-r-BH72-Biotin) folgende Sequenzen (Zehr and McReynolds, 1989):

Biotin markierte Stränge wurden mittels Streptavidin-beschichteter paramagnetischer Kugeln (Fa. Roche) abgetrennt (Niemeyer et al, 1999). Die Konzentration der verbleibenden Einzelstrang-DNA wurde spektralfotometrisch bestimmt. Vor der jeweiligen Hybridisierung wurde die Einzelstrang-DNA 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann mindestens drei Minuten auf Eis inkubiert.

Die in diesem Experiment verwendeten und als Fängermoleküle fungierenden Oligonukleotide binden alle an das oben genannte *nifH*-Genfragement des Stammes BH72. Die entsprechenden Sequenzen und ihre Charakteristika ergeben sich aus den Tabellen 1 in Figur 1b und 2 in Figur 7b. Eine schematische Darstellung eines möglichen Duplexes nach Hybridisierung gibt Figur 1D. Oligonukleotide, die entweder 5' Amino-

modifikationen (amino link c6) oder 3' Modifikationen tragen, die zum Teil Poly-A-Spacer von 6 – 12 Nukleotiden tragen, wurden durch die Firma Thermoelectron, (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

Zur Durchführung der Hybrisierungsexperimente wurden DNA-Mikroarrays auf standardmikroskopischen Glasobjektträgern der Firma Menzel, Braunschweig, Deutschland, hergestellt. Chemikalien und Lösungsmittel stammten von der Firma Fluka (Neu-Ulm, Deutschland). Zur Herstellung der Mikroarrays wurden die Glassubstrate gereinigt, silyliert, und aktiviert, wie von Bentas et al (2002) beschrieben. Die aktivierten Oberflächen wurden direkt zur Immobilisierung von entweder 5'- oder 3'-Amino-modifizierten Fänger-Oligonukleotiden mittels kovalenter Bindung eingesetzt.

Die Auftragung der Sonden auf die so aktivierten Objektträgeroberflächen erfolgte mittels eines Piezo-getriebenen Spotter Robodrop (BIAS, Bremen, Deutschland) oder mittels eines MicroGrid II Compact 400 der Firma BioRobotics, Vereinigtes Königreich. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug etwa 10 µM pro ml Wasser. Das verwendete Wasser enthielt 1 % Glyzerin. In jeden Spot des Mikroarrays wurden ca. 250 pl aufgetragen, was einen Spotdurchmesser von etwa 200 µm entspricht.

Die Objektträger wurden über Nacht bei Zimmertemperatur in Wasser gesättigter Atmosphäre inkubiert, um die kovalente Bindung zu bewerkstelligen. Eine Blockierung der Mikroarrays erfolgt mittels 6-Amino-1-Hexanol (50mM) und Diisopropylethylamin (150mM) in Dimethylformit nach Beier et al (1999). Anschließend wurden die Objektträger mit deionisiertem, partikelfreiem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und bei 4 °C unter N_2 gelagert.

Das Hybridisieren der Zielmoleküle an die Sonden des Mikroarrays und Waschen erfolgte in einem Personal Hyb Ofen der Firma Stratagene, Vereinigte Staaten von Amerika. Die Dauer der Hybridisierung betrug von 1 – 16 Stunden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Hybridisierung bei Zimmertemperatur mit 50 % Formamid, bei 46 °C mit 50 % Formamid, und es wurde dabei 10 nM einzelsträngige DNA eingesetzt. Der verwendete Hybridisierungspuffer enthielt 4 x SET, 10 x Denhardt's. Während der Hybridisierung wurde der Objektträger mit einem Deckglas bedeckt. Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte eine Waschung mit 2 x SET (0,1 % SDS) für 5 min und 1 x SET (0,1 %SDS) für 10 min bei Zimmertemperatur, oder mit 1 x (0,1 % SDS) für 5 min

und 0,1 x SET (0,1 % SDS) für 10 min bei 46 °C. Die getrockneten Mikroarrays wurden bei einer Auflösung von 10 µm mit einem GenePix 4000 Microarray Scanner der Firma Axon, Union City, Kalifornien bei gleichbleibender Stärke des Lasers und bei gleichbleibender Empfindlichkeit des Photomultipliers ausgewertet. Aus diesem Grund lassen sich die in den jeweiligen Ausführungsbeispielen ermittelten Signalintensitäten vergleichen.

Ausführungsbeispiel 1:

Der revers komplementäre Strang bzw. der Antisense-Strang des oben bereits erwähnten *nifH*-Genfragementes vom Stamm BH72 wurde mit den Sense-Oligonukleotiden (Fängermolekülen) S307 (6A), S114(6A) und S20 (6A) hybridisiert. Der Antisense-Strang ist in Figur 1A schematisch dargestellt. Die Cy5-Markierung wurde in den Strang eingeführt, in dem ein Cy5-markierter Primer verwendet wurde, um den Strang zu generieren. In Figur 1A sind schematisch die Bindungsstellen der Sense-Oligonukleotide an dem Antisense-Strang dargestellt, wobei die jeweilige Entfernung dieser Bindungsstellen vom 3' bzw. 5'-Ende des Antisense-Stranges dargestellt sind. Der Antisense-Strang stellt das Zielmolekül dar, und die Sense-Oligonukleotide stellen die Fänger-Oligonukleotide bzw. die Fängersequenzen dar, die in Form von Sonden auf einem Mikroarray aufgebracht wurden. Die Hybridisierung dieser Sonden mit dem Zielmolekül führt in den jeweiligen Spots auf dem Mikroarray zu unterschiedlichen Signalintensitäten, wie sie in Fig. 2A dargestellt sind. Von links nach rechts enthalten diese Spots paarweise jeweils Fänger-Oligonukleotide, aufweisend die Sequenz S307(6A), S114(6A), und S20(6A). Das Antisense-Strangzielmolekül ist lediglich am 5'-Ende markiert. Räumlich am nächsten zum 5'-Ende befindet sich die Bindungsstelle bzw. Zielsequenz S307(6A). An dieser Stelle gebildete Hybride werden in den ersten beiden in Figur 2A dargestellten Spots nachgewiesen. Die Signalintensität ist dort am höchsten. Weiter entfernt von der Markierung ist der Sequenzabschnitt S114(6A), der in den nächsten beiden Spots in Figur 2A nachgewiesen wird. Das Signal ist dort deutlich schwächer. Etwas stärker, aber immer noch schwach ist das Signal, das Hybride von sich geben, in die die Bindungsstelle S20(6A) eingeht.

In Figur 2B sind schematisch dargestellt die Fänger-Oligonukleotide 1, 2 und 3 sowie das Zielmolekül 4 in Form von Hybridmolekülen bestehend aus 1 und 4, 2 und 4, und 3 und 4 und die jeweils daraus resultierende Position der Markierung 5 am Zielmolekül 4

im jeweiligen Hybrid. Das Fänger-Oligonukleotid 1 entspricht dabei S307(6A), das Fängermolekül 2 S114(6A), und das Fängermolekül 3 S20(6A).

In Figur 2C sind die entsprechenden Signalintensitäten grafisch wiedergegeben. Deutlich erkennbar ist, dass die Verwendung des Fänger-Oligonukleotides S307(6A) bzw. 1 zu Hybriden führt, bei denen die Markierung in unmittelbarer Nähe zum Hybrid ist, und dass damit eine gegenüber den anderen dargestellten Hybride etwa 3 bis 7-fach höhere Signalintensität erzielt wird. Erkennbar ist auch, dass eine besonders starke Erniedrigung der Signalausbeuten dann vorliegt, wenn das zu hybridisierende Fragment weit entfernt von dem markierten Primer an die Fänger-Nukleinsäure gebunden wird (S114 (6A)).

Ausführungsbeispiel 2:

Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass der im Ausführungsbeispiel 1 beschriebene Effekt strang- und damit sequenzunabhängig ist. Es wurden Cy5-markierte Gegenstränge (Sense-Strang) mit den entsprechenden Antisense-Oligonukleotiden hybridisiert. Es wurde der gleiche Effekt beobachtet wie in Beispiel 1 (vgl. Figur 3A – 3C). In Figur 3A sind dargestellt von links nach rechts jeweils vier Spots mit identischen Fänger-Oligonukleotiden, wobei von links nach rechts Spots mit den Fänger-Oligonukleotiden A20(12A), A20(6A), A20(6A)3', A307, A307(12A), A307(6A), A307(6A)3', und A114(6A) dargestellt sind. In Figur 3B ist schematisch in derselben Reihenfolge dargestellt, wie das Zielmolekül 7, das eine Markierung 8 an seinem einen Ende aufweist, an das jeweilige Oligonukleotid bindet, und die daraus resultierende Anordnung der Markierung in Bezug auf das gebildete Hybrid 9 ist in Figur 3B erkennbar.

Wie anhand der grafischen Darstellung der Signalintensitäten in Figur 3C, aber auch anhand der Helligkeiten der Spots in Figur 3A erkennbar ist, sind die Signalintensitäten immer dann am höchsten, wenn sich die Markierung in räumlicher Nähe zu dem jeweils gebildeten Hybrid befindet, und zwar im Vergleich zu den anderen Hybriden um das Doppelte bis etwas 4 ½-fache, im Extremfall sogar weit darüber hinaus (vgl. die Werte für A307(6A)3' in Figur 3C). Die Bezeichnung 6A bzw. 12A (der Fänger-Oligonukleotide) bezeichnet die Länge des jeweiligen Spacers. Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass der Unterschied der Länge des Spacers, d.h. des Abstandhalters zwischen der Glasoberfläche eines Mikroarrays und dem bindenden Bereich des Fänger-Oligonukleotides

eine vergleichsweise geringe Auswirkung auf die Signalintensität hat. So ist der Unterschied zwischen A20(6A) und A20(12A) nicht besonders ausgeprägt, und zwischen A307(12A) und A307(6A) besteht so gut wie gar kein Unterschied. Eine leichte Erniedrigung des Signals bei A20(6A)3' im Vergleich zu A20(6A) könnte durch Quenching-Effekte durch die große räumliche Nähe des Fluoreszenzfarbstoffes zur Glasoberfläche hervorgerufen werden.

Es wird in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass bei Mikroarrayhybridisierungsexperimenten falsch negative Resultate dadurch entstehen können, dass eine Markierung sich in einer ungünstigen Position befindet, die zu einer niedrigen Signalintensität führt, wie zum Beispiel im Fall des Fänger-Oligonukleotides A307(6A)3'; ähnliche sterische Effekte der Hybridisierung wurden von Peplies *et al.* (2003) beschrieben. Dieses Oligonukleotid liefert eine 48-fach niedrigere Signalintensität als A20(6A). Die ungünstigste Position ist weit entfernt von der Zielsequenz.

Ausführungsbeispiel 3:

Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass der in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen beobachtete Effekt sich durch größere Nähe der Markierung zur Zielsequenz noch verstärken läßt. Dafür wurde ein Antisense-Fängeroligonukleotid verwendet, A1 (6A) in Figur 11, das komplementär zu dem Primeroligonukleotid ist, mit dem mittels PCR die endmarkierte Sonde generiert wurde. Das hat zur Folge, dass die Fluoreszenzmarkierung bereits am ersten Nukleotid des Heteroduplex positioniert ist, der bei der Hybridisierung entsteht. In diesem Ausführungsbeispiel ist das Fluoreszenzsignal gegenüber einem um 20 Nukleotide verschobenen Fängeroligonukleotid, A20 (6A), um den Faktor 2.3 erhöht. Wie aus Figur 11 A und 11 B ersichtlich, sind für dazwischen liegende Positionen (A4 (6A) – A14 (6A)) die Signalstärken absteigend schwächer als für A1 (6A). Im Vergleich zu der ungünstigsten Position aus Ausführungsbeispiel 2, A114 (6A), ist nun sogar ein 146-fach stärkeres Signal bei der günstigsten Position A1 (6A) zu beobachten. Eine noch weiter entfernte, aber immer noch relativ mittige Position A188 (6A) führt zu einer noch niedrigen Signalintensität (Faktor 357). Das Ausführungsbeispiel belegt, daß relativ hohe Signalausbeuten zu erhalten sind, wenn die Markierung weniger als 64 Nukleotide von der Zielsequenz entfernt sind, die den Heteroduplex bildet, hier kommt es in diesem Ausführungsbeispiel bereits zu einem 15-fach schwächeren Signal.

Der positive Positionseffekt wird auch in Figur 12 verdeutlicht. Wird eine verkürzte markierte Sonde eingesetzt (hier um 113 Nukleotide, so dass der für die PCR eingesetzte Primer zum Fängernukleotid A114 komplementär ist), zeigt sich ein ähnlicher Positionseffekt für andere Fänger-Oligonukleotide. Oligonukleotid A114 (6A), das in Figur 11 bei mittiger Position nur geringe Signalstärken lieferte (130 rel. Intensität), zeigt in Figur 12 als endständiges Fänger-Oligonukleotid hohe Signalstärke (11 800 rel. Intensität). Auch in diesem Beispiel ist wieder ein starker Abfall der Signalintensität (Faktor 5,2) zu beobachten, wenn sich die Markierung in größerer Entfernung (z.B. 74 Nukleotide für A188 (A6), Figur 12 A, B) zum gebildeten Hybrid befindet.

Ausführungsbeispiel 4:

Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass der in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen beobachtete Effekt unabhängig von der chemischen Natur der Markierung ist. Die gleichen Experimente wie im Ausführungsbeispiel 2 wurden mit einem Cy3-markiertem Sense-Strang anstelle eines Cy5-markierten Sense-Stranges durchgeführt und lieferten im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 2 beschrieben. Diese Ergebnisse sind in den Figuren 4A – 4C dargestellt, wobei die Markierungen in Fig. 4B mit dem Bezugszeichen 10, und das so markierte Zielmolekül mit dem Bezugszeichen 11 versehen ist. In Figur 4A sind jeweils vier Spots von links nach rechts dargestellt, in denen sich Fänger-Oligonukleotide wie im Ausführungsbeispiel 2 beschrieben befinden. In Figur 4B ist von links nach rechts jeweils schematisch dargestellt, wie das jeweilige Fänger-Oligonukleotid mit dem Zielmolekül hybridisiert, und in welcher Position sich die Markierung in Bezug auf das gebildete Hybrid jeweils befindet. Figur 4C zeigt die Signalintensitäten der in Figur 4A gezeigten Spots in der gleichen Reihenfolge.

Wie bereits angedeutet, entsprechen die Ergebnisse im Wesentlichen den im Ausführungsbeispiel 2 diskutierten Ergebnissen. Dass eine andere Markierung zu im wesentlichen gleichen Ergebnissen führt, belegt, dass es keine Rolle spielt, welche Art der Fluoreszenz-Markierung gewählt wird, um die Erfindung auszuführen.

Ausführungsbeispiel 5:

Das in Ausführungsbeispiel 1 beschriebene Experiment wurde wiederholt mit Cy3-markiertem Sense-Strang und Cy3-markiertem Antisense-Strang. Die Ergebnisse im Fall des Cy3-markierten Sense-Stranges sind in den Figuren 5A – 5C abgebildet, die Ergebnisse des mit dem Cy3-markierten Antisense-Strang durchgeführten Experimentes sind in den Figuren 6A – 6C abgebildet. Die Signalintensität ist jeweils dort am höchsten, wo sich die Markierung 8 in unmittelbarer Nähe zum jeweils gebildeten Hybrid 9 befindet. Bei Verwendung des Cy3-markierten Sense-Stranges als Zielmolekül ist dies im Spot mit der Fängersequenz für S307(6A) der Fall, und beim Cy3-markierten Antisense-Strang im Spot mit der Fängersequenz für A20(6A) (vgl. Figuren 5A – 5C, Figuren 6A- 6C).

Diese mit dem Ausführungsbeispiel 1 vergleichbaren Experimente belegen, dass sowohl Cy3-markierter Sense-Strang als auch Cy3-markierter Antisense-Strang dann mit hohen Signalausbeuten nachweisbar sind, wenn die mit Fängersequenzen gebildeten Hybride die Markierung in unmittelbarer räumlicher Nähe aufweisen. Bei der Sonde A20(6A) oder S307(6A) ist die Signalintensität gegenüber anderen Hybriden bis zu einem Faktor 22 erhöht.

Ausführungsbeispiel 6:

Dieses Ausführungsbeispiel belegt, dass die Erfindung auch bei Verwendung längerer Oligonukleotide als Fängermoleküle funktioniert. Es wurden in diesem Fall 50mer Oligonukleotide eingesetzt, die jeweils an den äußeren Enden des Zielmoleküls binden. Cy3-markierter Sense-Strang zeigt das stärkere Signal, wenn die Markierung nahe dem Duplex liegen (A19-68). Die Signalintensität war in diesem Fall gegenüber den übrigen Signalen um den Faktor 2 erhöht.

Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten 50mer Oligonukleotid-Fänger bzw. Zielsequenzen lassen sich der Tabelle 2 in Figur 7B entnehmen, die Position der entsprechenden Bindungsstellen auf dem Sense- bzw. Antisense-Strang des 362 bp langen *nifH*-Genfragmentes aus dem Stamm BH72 sind schematisch in der Figur 7A dargestellt.

In Figur 8A sind die Spots eines entsprechenden Mikroarrays dargestellt, wobei sich in einer Reihe jeweils sechs identische Spots befinden. Die in den jeweiligen Spots nachweisbaren Zielsequenzen bzw. befindlichen Fängersequenzen sind in der Darstellung der Figur 8A auf der rechten Seite der dargestellten Mikroarrayoberfläche bezeichnet. In Figur 8B finden sich die entsprechend ermittelten Signalintensitäten in Form einer grafischen Darstellung.

Dasselbe Experiment wurde mit Cy3-markiertem Antisense-Strang durchgeführt. Auch in diesem Fall zeigte sich das stärkste Signal, wenn die Markierung nahe dem Duplex lag (S289-338), vgl. die Figuren 9A, 9B. Auch hier war die Signalintensität bei Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber den übrigen Signalintensitäten etwa um den Faktor 2 erhöht, jedenfalls deutlich verbessert, wie aus Figur 9B für die Sequenz S289-338 hervorgeht.

Ausführungsbeispiel 7:

Dieses Ausführungsbeispiel belegt, dass auch andere Markierungsstrategien zur Erzeugung von Zielmolekülen eingesetzt werden können. Unter Verwendung unmarkierter PCR-Primer und dem zufälligen Einbau von Fluorescein-12-dUTP („random labeling") wurde ein entsprechend markierter Sense-Strang erzeugt, der mit kurzen Antisense-Oligonukleotiden hybridisiert wurde. In Figur 10A sind links in einem aus Reihen und Kolonnen bestehenden Raster jeweils vier Sondenpunkte bzw. Spots dargestellt. Die Reihen sind von I bis IV durchnumeriert und die Spalten mit a – e bezeichnet. Rechts daneben befindet sich eine schematische Wiedergabe desselben Rasters, wobei in den entsprechenden Rasterflächen die Bezeichnung der in den jeweiligen Spots befindlichen Fänger-Oligonukleotide eingetragen ist. So befinden sich in dem Feld IIa Spots mit den Fänger-Oligonukleotiden A307(6A) usw. In Figur 10E sind die zu den jeweiligen Spots ermittelten Signalintensitäten grafisch dargestellt. Am höchsten sind die Signalintensitäten in dem Spot A20(6A)3' gefolgt von dem Spot A20(6A) und A20(12A).

Aus Tabelle I in Figur 1B geht hervor, dass das Fänger-Oligonukleotid A20(6A)3' an vier Positionen an T bzw. an U bindet, während das Fänger-Oligonukleotid 307 an 0 Positionen an T bzw. U bindet, so dass eine höhere Einbaurate von Fluoreszenz markierten Nukleotiden bei der A20-Zielsequenz vorliegt. Durch Fluoreszenzmarkierung an diesen Basen liegt folglich eine höhere Fluoreszenzintensität in Duplex bei A20 vor als bei

A307, was sich in einer erkennbar höheren Signalintensität (vgl. Figur 10B) niederschlägt.

Zusätzlich zu dem wie oben beschriebenen Glasobjektträgern wurden kommerzielle Träger für Mikroarrays verwendet, wie zum Beispiel Aldehyde Slides und Amin Slides, Aldehyd plus Slides der Firma Genetics, QMT® Aldehyde Slides von Peqlab, Pan® Amine Slides von MWG-Biotech. Bei diesen Mikroarrays wurden dieselben Ergebnisse gefunden wie eben anhand der Ausführungsbeispiele 1 – 7 erläutert.

Dies belegt, dass die vorliegende Erfindung im Zusammenhang mit beliebigen Mikroarrays verwendbar ist.

Vorstehend wurde anhand erfindungsgemäß markierter Zielsequenzen, die in Lösung auf DNA-Arrays aufgetragen werden, aufgezeigt, dass die Erfindung strang- und somit sequenzunabhängig ist.

Im Rahmen der Erfindung ist dies Vorgehensweise ohne weiteres umkehrbar, d.h. es lassen sich zu untersuchende Zielmoleküle auf einem Array vorsehen, die mit erfindungsgemäß markierten, in Lösung befindlichen Fängermolekülen versetzt werden, so dass Duplexe bzw. Komplexe mit hohen Signalintensitäten entstehen. Mit anderen Worten: der Begriff „Zielmolekül" ist so zu lesen, dass er austauschbar ist mit dem Begriff „Fängermolekül" und umgekehrt. Zugleich ist dann der Begriff „Zielsequenz" so zu lesen, dass er auszutauschen ist gegen den Begriff „Fängersequenz" und umgekehrt.

Auch lässt sich im Rahmen der Erfindung die gesamte Ligandenbindungsreaktion grundsätzlich in Lösung bewerkstelligen.

Tabelle 1 **Sequenzen der Fängeroligonukleotide zur Nitrogenasegendetektion. Die Nähe zum Hybrid ist aus der Tabelle (Spalte „Position") ersichtlich.**

Probe[a]	SEQ ID NO	Sequenz (5'-3')[b]	Tm[c]	Länge(nt)	GC%	Position[d]
Proteo-1	1	GACAAGATGGTGTCCTGAG	67	19	52	29-47
Proteo-2	2	GACAGGATGGTGTCCTG	66	17	58	31-47
Proteo-3	3	GGCTCAGGATGGTGTCC	68	17	64	33-49
Proteo-4	4	AGGACGGTGTCCTGGG	68	16	68	29-44
Proteo-5	5	TTCCGCGGCAAGGGAGA	68	17	64	44-60

Proteo-6	6	GTGTCCTGCAGCTTGGT	66	17	58	22-38
Proteo-7	7	AGCCGATCTTGAGAACGTC	67	19	52	91-109
Proteo-8	8	AGCCGATCTGCAGCACGT	69	18	61	92-109
Proteo-9	9	CAGTTCCATCACGGAGTTC	67	19	52	33-51
Proteo-10	10	TGCATGACGCTGGTTTGC	67	18	55	30-47
Proteo-11	11	TACCCGATGGCCAGCACAT	69	19	57	92-110
Proteo-12	12	ATGACGGTGTTCTGCATCTT	66	20	45	25-44
Proteo-13	13	CACGGTCGTTTGCGCCTT	69	18	61	25-42
Proteo-14	14	TCTGAGCCTTTGAGTGCAG	67	19	52	16-34
Proteo-15	15	TTGATGTCGCCGTAGCCG	69	18	61	105-122
Proteo-16	16	TTTAATGCCGCTGTAACCAGT	66	21	42	103-123
Proteo-17	17	CCAGTCAGTAGTACATCTTCTA	66	22	40	86-107
Proteo-18	18	TTTTGCGCTTTCGCATGCAG	68	20	50	16-35
Proteo-19	19	CTTGCTGTGGAGGATCAG	67	18	55	10-27
Proteo-20	20	CTCCATTATTGTGTTTTGCGC	66	21	42	28-48
Proteo-21	21	GTGTTTTGCGCTTTAGAGTG	66	20	45	19-38
Proteo-22	22	GGAAGTTAATCGCTGTGATAAC	66	20	40	175-196
Proteo-23	23	ATGGTCTCCTGGGCCTT	66	17	58	25-41
Proteo-24	24	CACTTGACGTCGCCGTA	66	17	58	109-125
Proteo-25	25	TTCCAAATCTTCAACGCTACC	66	21	42	64-84
Proteo-26	26	GTGACAGCACCGACGTC	67	18	64	33-49
Proteo-27	27	ACGGTCTGCTGGGCTTT	66	17	58	25-41
Proteo-28	28	ATGCAGGACCGTGTCCTG	69	18	61	31-48
Proteo-29	29	AGATGCAGAACCGTGTCCT	67	19	52	32-50
Proteo-30	30	GAACCTTCGGTTGCCGC	68	17	64	52-68
Proteo-31	31	GCGGCGAGATGCAGAAC	68	17	64	40-56
Proteo-32	32	ATCCAGGACGGTATCCTG	67	18	55	31-48
Proteo-33	33	GATGTCCTGATAGCCGAC	67	18	55	103-120
Proteo-34	34	TTGATGTCCTTGAAGCCGA	65	19	47	104-122
Proteo-35	35	GCCTGATTCAACACAACGAAC	68	21	47	118-138
Proteo-36	36	CCAGCGAAAGGACGGTG	68	17	64	36-52
Proteo-37	37	AATATCTTTAAAACCGGCTTTCAG	66	24	33	97-120
Proteo-38	38	GTGTCCTGCATCTTGGTG	67	18	55	21-38
Proteo-39	39	GGTGTTTTGCATTTTAGTGTG	64	21	38	19-39
Proteo-40	40	CCAGCGAGAGGATGGTG	68	17	64	36-52
Proteo-41	41	CTTGGCATGCAGCATCAG	67	18	55	10-27
Proteo-42	42	ATGCAGAATCAGTCGAGTAGA	66	21	42	1-21
Proteo-43	43	GTGTTCTGTGCTTTAGAGTGAAG	69	23	43	16-38
Proteo-44	44	GTGCATTACAGTAGTCTG	62	18	44	31-48
Proteo-45	45	GTAGCCAGCCTTCAGCAC	69	18	61	94-111
Proteo-46	46	AGGCTGAGGATCGTGTCC	69	18	61	33-50
Proteo-47	47	CAGCAGCAAGGTGCAGC	68	17	64	42-58
Proteo-48	48	GCCATCTCCATAATGGTGT	65	19	47	35-53
Proteo-49	49	CCTTGCAGCCGAGGATC	68	17	64	12-28
Proteo-50	50	AGGCTGAGGATGGTGTC	66	17	58	34-50

Proteo-51	51	CTCGAGGTCTTCGACGCT	69	18	61	67-84
Proteo-52	52	CTCGCGGCAAGACTCAAA	67	18	55	42-59
Proteo-53	53	CTCGCTGCAAGGCTCAAA	67	18	55	42-59
Proteo-54	54	CGTGTAGGATCAGCCGTGT	69	19	57	4-22
Proteo-55	55	AGACTAAGCACGGTGTCTTG	68	20	50	31-50
Omega-1	56	TGTCTGAGCCTTGGCATGA	67	19	52	18-36
Omega-2	57	CTTCATAACGTCCTTCAGTTC	66	21	42	79-99
Omega-3	58	GGTCCATAACCGTTGACTG	67	19	52	31-49
Omega-4	59	CCATTACCGTGTTCTGTGC	67	19	52	28-46
Omega-5	60	GGTGTCGCCATAGCCGA	68	17	64	104-120
Omega-6	61	CAACCTTCATCACGGATTCG	68	20	50	87-106
Omega-7	62	CGGATGAGGTCCATCAC	66	17	58	40-56
Omega-8	63	GAACCTTGTCCATAACCGT	64	19	47	37-55
Omega-9	64	CTCGCGGATCAGGTCCAT	69	18	61	43-60
Omega-10	65	GACCTTCATGACATCTTCCAG	68	21	47	85-105
Omega-11	66	ACGTCCGAGAGCTCCAGA	69	18	61	78-95
Cyano-1	67	CAGTGGTTTGTGCTTTACA	63	19	42	22-40
Cyano-2	68	AGTGAAGAACTGTTACCTGTGC	68	22	45	28-49
Cyano-3	69	GTTTGAGCTTTAGCGTTTAAGATTA	66	25	32	11-35
Cyano-4	70	AAACCGGTCAACATTACTTCGTG	69	23	43	88-110
Cyano-5	71	GCACCTGGTTTACATACATC	66	20	45	91-110
Cyano-6	72	GCTTAGTACGGTTGTTTGTG	66	20	45	29-48
Cyano-7	73	TCTACACATCGGATACCTTTGTA	67	23	39	109-131
Cyano-8	74	CTGCACCTTTTTCAGCAGC	67	19	52	52-70
Cyano-9	75	TACAGTGGAGCATTAAGCGAG	68	21	47	5-25
Cyano-10	76	CAGCCAAGTGAAGAACGGT	67	19	52	37-55
Cyano-11	77	CACTTAACGCCGCGATAGC	69	19	57	107-125
Cyano-12	78	ATTACTTCTTCGAGTTCAATATCTT	65	25	28	74-98
Cyano-13	79	ACGAACGTTACGGAAACC	64	18	50	106-123
Cyano-14	80	CTAAGTGGAGAATGGTAGTTTG	66	22	40	31-52
Cyano-15	81	GGTGAAGAATCGTGGTTTG	65	19	47	31-49
Cyano-16	82	GGTGTAGAATTGTGGTTTGG	66	20	45	30-49
Cyano-17	83	AGCTAGGTGCAGAACTGTG	67	19	52	36-54
Cyano-18	84	GCAGCCAAGGAAAGAACG	67	18	55	39-56
Cyano-19	85	CTTCACACCACGGAAGCC	69	18	61	106-123
Cyano-20	86	CGAGCAATACTTCCGAGAGT	68	20	50	84-103
Cyano-21	87	ACGTTGTTATAGCCAGTGAGTA	66	22	40	98-119
Cyano-22	88	GTGCAGAATGGTGGTTTG	64	18	50	31-48
Cyano-23	89	CAGCAGCCAATTGGAGAAC	67	19	52	40-58
Cyano-24	90	CTTTTCTGCTGCCAGGTG	67	18	55	46-63
Cyano-25	91	AGCTTTACAGTGAAGAATCAAGC	67	23	39	8-30
Cyano-26	92	GAGCTTCATCAAGTTCCAC	65	19	47	79-97
Cyano-27	93	CTGGATGCCAGCGTAGC	68	17	64	107-123
Frankia-1	94	ATGCCCCACTGGCCCTC	71	17	70	103-119
Frankia-2	95	GCCTTCTCGATGACGGTG	69	18	61	36-53

ClusterII-1	96	CCCAGAATCATGCGGGTA	67	18	55	3-20
ClusterII-2	97	GTTCATTCCGCCTAAAATCATAC	67	23	39	8-30
ClusterII-3	98	GTTTTGATGACCTTCTCGTTG	66	21	42	81-101
ClusterII-4	99	ACATCCATCAGGGTTTCCTG	68	20	50	31-50
ClusterII-5	100	TTGATTCATCCCTCCCAAAA	64	20	40	14-33
ClusterII-6	101	TATCCATCAATGTTTCTTGCGG	66	22	40	28-49
ClusterII-7	102	CCATCATGGTGGTCTGCA	67	18	55	29-46
ClusterII-8	103	GCATTTTACCTCTAAGAATCATAC	66	24	33	8-31
ClusterII-9	104	GTTTTCCGTGGAGAATCATTC	66	21	42	8-28
ClusterII-10	105	CCGTGCAAGATTAACCTTG	65	19	47	5-23
ClusterII-11	106	GTTGTCTGCATTTTACCGC	65	19	47	20-38
ClusterII-12	107	GGTCTCCTCAGGTTTGC	66	17	58	23-39
ClusterII-13	108	ATCACCGTCTGCTGCGG	68	17	64	28-44
ClusterII-14	109	CCAGGATCAGCCGATTTGA	67	19	52	1-19
ClusterII-15	110	CACCAAGGATAAGACGAGTT	66	20	45	3-22
ClusterII-16	111	CGAGCACAAGACGAGTACA	67	19	52	1-19
ClusterIII-1	112	CCTTCTTCGCGGAGCGT	68	17	64	49-65
ClusterIII-2	113	ACTCGGTGCACCGGCAA	68	17	64	111-127
ClusterIII-3	114	CCTTCCTCGCGGAGTGT	68	17	64	49-65
ClusterIII-4	115	GAAGTGATTATTCCTCTTCC	64	20	40	160-179
ClusterIII-5'	116	CGCCTAAGAGAAGACGAGT	67	19	52	4-22
ClusterIII-6	117	TCGTCGCGAAGGGTATCCA	69	19	57	44-62
ClusterIII-7	118	CCGCCTTTACGGATATC	63	17	52	85-101
ClusterIII-8	119	CCGCAAGGTCCACGTC	68	16	68	70-85
ClusterIII-9'	120	CTTCCCGGCGGATGTC	68	16	68	85-100
ClusterIII-10	121	GCAGCGTATCCAATACGGT	67	19	52	37-55
ClusterIII-11	122	GTCTTCCCCTTCCGACC	68	17	64	56-72
ClusterIII-12	123	TCTTCCAGATCCACGTCTTC	68	20	50	67-86
ClusterIII-13'	124	CTTTTCTGCGCAAGACCAC	67	19	52	20-38
ClusterIII-14	125	ACCCTGTCCGGCGGATA	68	17	64	87-103
ClusterIII-15	126	GGGTATCCAGAACGGACTT	67	19	52	34-52
ClusterIII-16	127	ACGGTCCGTTGACTCAAAC	67	19	52	23-41
ClusterIII-17	128	GAGCCAAGCCATGCAACA	67	18	55	14-31
ClusterIII-18	129	GTATCTAACACACTCTTTTGGT	65	22	36	29-50
ClusterIII-19	130	GTTCTGAGTGTATCCAACAC	66	20	45	40-59
ClusterIII-20	131	CCAAGGAGAAGACGGGTG	69	18	61	3-20
ClusterIII-21	132	GTCCAAGACGGTGCTTTG	67	18	55	31-48
ClusterIII-22	133	TCGAGAAGATTGATGGAGG	65	19	47	176-194
ClusterIII-23	134	TATCCAGGACAGTGCGCT	67	18	55	32-49
ClusterIII-24	135	TCCAAAACGGTCCGCTG	66	17	58	31-47
ClusterIII-25	136	CCGAAGCCCTGTTTGCG	68	17	64	91-107
ClusterIII-26	137	AACCGGGTTTACGGATATC	65	19	47	85-103
ClusterIII-27	138	AAAGCCGGGCGACACGA	68	17	64	89-105
ClusterIII-28	139	CACCTAAAAGTAGACGTGTTGA	66	22	40	1-22
ClusterIII-29	140	CCAACAACAATCGGGTTGA	65	15	47	1-19

ClusterIII-30	141	CACAGCGAACACCTTTAAAAC	66	21	42	101-121
ClusterIII-31	142	CGGTTTTCTGCTGAAGACC	67	19	52	22-40
ClusterIII-32	143	GTCTTTTGTGCTAAACCACC	66	20	45	19-38
ClusterIII-33	144	CACCTTCCGCGAGTGTAT	67	18	55	47-64
ClusterIII-34	145	AGTACGGTTTTCTGGGCTAA	66	20	45	25-44
ClusterIII-35	146	CTCCCAATAAGAGACGGG	67	18	55	5-22
ClusterIII-36	147	GTATCCTACCTTCAGAACCG	68	20	50	86-105
ClusterIII-37	148	TCAATGTCATCGCCTTCTTC	66	20	45	58-77
ClusterIII-38	149	ATGCCGGAAAAGCCGGG	68	17	64	97-113
ClusterIII-39	150	CCAGCTCTATGTCGTCGC	69	18	61	65-82
ClusterIII-40	151	GTCTTCTGGTTCAGGCC	66	17	58	22-38
ClusterIII-41	152	CGTATCAAGCACCGTTTTC	65	19	47	33-51
ClusterIII-42	153	CAAAATGGCATCCAATTCAATTTC	66	24	33	70-93
ClusterIII-43	154	CATGATACGGTCGAGTTCAAC	68	21	47	73-93
ClusterIII-44	155	CTGAGCTAATCCTCCTAAAAG	66	21	42	13-33
ClusterIII-45	156	GGTGAAGACCACCAAGAAG	67	19	52	13-31
ClusterIII-46	157	TGCTGGAGTCCTCCCAAC	69	18	61	15-32
ClusterIII-47	158	CAAGTTTTCGCACATCATCCAG	68	22	45	79-99
ClusterIII-48	159	GCCGAGCTTGATGATGTC	67	18	55	85-102
ClusterIII-49	160	CGACTTTTCTAACGTCTTCAAG	66	22	40	79-100
ClusterIII-50	161	GTACGGTCTTTTGGCTCAAAC	68	21	47	23-43
ClusterIII-51	162	CGGTTCGCAATGTATCCAG	67	19	52	43-61
ClusterIII-52	163	CAGGCCGTTCAGCAAAAG	67	18	55	10-27
ClusterIII-53	164	GCCTCCCAGAAGCAAAC	66	17	58	8-24
ClusterIV-1	165	CCCTGATGGCGTCAAGC	68	17	64	42-58
ClusterIV-2	166	AGTACCGTTTCCTGGTGCA	67	19	52	26-44
ClusterIV-3	167	CGGTTCGGTTTTGCCGTC	69	18	61	58-75
ClusterIV-4	168	CCTCTGAGAAGGGTTAT	61	17	47	7-23
ClusterIV-5	169	GATGCCTTTGTAGCCGGT	67	18	55	109-126
ClusterIV-6	170	CTGCGTGTTGTCCCGTAT	67	18	55	52-69
ClusterIV-7	171	TTCTGCAAGGATCCGCGT	67	18	55	4-21
ClusterIV-8	172	CACCGCGGTGATGATCC	68	17	64	164-180
ClusterIV-9	173	TCATGGGCATTGACCG	63	16	56	68-83
ClusterIV-10	174	CCGTCCCTCATGCTGTC	68	17	64	46-62
ClusterIV-11	175	TTGCCGCCTGTCAGGTT	66	17	58	10-26
ClusterIV-12	176	CCTCCGCTTTCAACACAT	64	18	50	114-131
ClusterIV-13	177	GCCTCTCACCATAGAGTG	67	18	55	14-31
ClusterIV-14	178	CAATATCAAGGATAGTAGGCAATC	67	24	37	29-52
ClusterIV-15	179	CTTTCCGTGCATTAATGTCC	66	20	45	8-27
ClusterIV-16	180	AATCCTACGTCCAGCGAG	67	18	55	13-30
ClusterIV-17	181	CTGTATTTTGTGTCCGCATAC	66	21	42	13-33
ClusterIV-18	182	ACCGTGGGGATCTTCCTC	69	18	61	24-41
ClusterIV-19	183	ACTGTGGGAATGTCAGCC	67	18	55	24-41
ClusterIV-20	184	TAATATCCTGACCCTTTTGC	64	20	40	57-76
ClusterIV-21	185	AGGTAATCCAGTACCGT	61	17	47	37-53

ClusterIV-22	186	CCGTGCAACAACAGTTTC	64	18	50	6-23
ClusterIV-23	187	GCCAAGGCTTTCCAGCAT	67	18	55	187-204
ClusterIV-24	188	TGACCTCCTGGACGTTATC	67	19	52	58-76
ClusterIV-25	189	CCGCCCCTTAAATTTGAAG	65	19	47	5-23

[a] Fängeroligonukleotide wurden anhand der Verteilung in den Clustern benannt. Die Zahl der Fängeroligonukleotide in den Clustern repräsentiert nicht deren Bedeutung.

[b] Gezeigte Oligonukleotidesequenzen sind revers komplementär zu den jeweiligen Sequenzen des *sense nifH/anfH/vnfH* Strangs. Alle Oligonukleotide werden mit dem 5'-Ende an den Mikroarray gebunden.

[c] T_m-Werte wurden kalkuliert mit dem Programm MELT 1.1.0 (Jo P. Sanders) kalkuliert.

[d] Position der Oligonukleotide repräsentiert die Position, an der die Zielsequenz gebunden wird [Die Region des PCR-Primers (18 nt) wurde hier anders als in den anderen Abbildungen nicht mitgezählt)].

Literaturliste

Beier, M., and D. Hoheisel Jörg. 1999. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. Nucleic Acids Res. 27:1970–1977.

Benters, R., C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, and D. Wöhrle. 2002. DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. Nucleic Acids Res. 30: e10.

Hurek, T., Van Montagu, M., Kellenberger, E., and Reinhold-Hurek, B. (1995) Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp. BH72. *Mol Microbiol* **18**: 225-236.

Hurek, T., Handley, L., Reinhold-Hurek , B., and Piché, Y. (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant-Microb Interact* **15**: 233-242.

Niemeyer, C., Boldt, L., Ceyhan, B. and Blohm, D. 1999. Evaluation of single-stranded nucleic acids as carriers in the DNA-directed assembly of macromolecules. J. Biomol. Struct. Dyn., 17, 527-538.

Peplies, J., Glöckner, F.O., and Amann, R. 2003. Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1397-1407.

Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M. 1999. Molecular interactions on microarrays. Nature Genet. Suppl. 21: 5-9.

Zehr, J.P., and McReynolds, L.A. (1989) Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2522-2526.

Galloway, J.N., Schlesinger, W.H., Levy, H.I., Michaels, A.F., and Schnoor, J.L. (1995) Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochem. Cycles* **9**: 235-252.

Hurek, T., Egener, T., and Reinhold-Hurek, B. (1997) Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., *Proteobacteria* of the ß-subclass. *J. Bacteriol.* **179**: 4172-4178.

Hurek, T., Handley, L., Reinhold-Hurek , B., and Piché, Y. (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe In.* **15**: 233-242.

Karl, D., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F. et al. (2002) Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogechem.* **57/58**.

Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B. (2003) Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol.* 5(10):1009-15

Patentansprüche

1. Verfahren zum Analysieren von Proben mittels eines Ligandenbindungsverfahrens, bei dem durch Bindung von Zielsequenzen von Zielmolekülen mit Fängersequenzen von Sonden Duplexe oder Komplexe erzeugt und/oder bei dem so erzeugte Duplexe oder Komplexe analysiert werden, wobei die Zielsequenzen Teilsequenzen des jeweiligen Zielmoleküls sind,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Duplexe oder Komplexe in räumlicher Nähe zu und/oder innerhalb der Zielsequenz zumindest eine detektierbare Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Duplexe oder Komplexe ausschließlich in räumlicher Nähe zu und/oder innerhalb der Zielsequenz zumindest eine detektierbare Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Fängersequenz verwendet wird, die zu einer Zielsequenz komplementär ist, in deren räumlicher Nähe und/oder innerhalb dieser Zielsequenz sich zumindest eine detektierbare Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen befindet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass mehrere Proben gleichzeitig mittels Ligandenbindung analysiert werden, wobei alle Zielmoleküle entweder zumindest eine detektierbare Markierung oder

eine Anhäufung von Markierungen in räumlicher Nähe zu der jeweiligen Zielsequenz aufweisen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass alle Zielmoleküle die gleiche Anzahl von Markierungen aufweisen.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest zehn Proben, vorzugsweise zumindest hundert Proben beziehungsweise zumindest tausend Proben gleichzeitig analysiert werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Fluoreszenzmarkierung mittels eines oder mehrerer der folgenden Markierungsmittel erzielt wird:
Cy3, Cy5, Fluorescein, Texas-Red, Alexa-Fluor-Farbstoffe und anderer Fluoreszenzfarbstoffe.

9. Verfahren zur Herstellung von Zielmolekülen, die ausschließlich in räumlicher Nähe zur jeweiligen Zielsequenz oder innerhalb der jeweiligen Zielsequenz zumindest eine Markierung aufweisen, wobei die Zielsequenzen Teilsequenzen des jeweiligen Zielmoleküls sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung der Zielmoleküle mittels enzymatischer Endmarkierung, reverser Transkription, indirekter Markierung und/oder „Sandwich"-Methoden erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass dabei Zielmoleküle mittels eines PCR-Verfahrens erzeugt werden, bei dem zumindest ein mit einem Markierungsmittel versehener Primer eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein weiterer mit einem identischen oder einem weiteren Markierungsmittel versehener Primer dabei eingesetzt wird.

13. Verfahren zur Herstellung von Zielmolekülen, die eine Markierung in räumlicher Nähe zur Zielsequenz aufweisen, bei dem Zielmoleküle mittels eines PCR-Verfahrens erzeugt werden, und bei dem zumindest eine Art dNTPs eingesetzt werden, die mit einem Markierungsmittel versehen sind, und bei dem die markierten dNTPs in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz und/oder in die Zielsequenz selbst in dem Zielmolekül eingebaut werden, wobei die Zielsequenzen Teilsequenzen des jeweiligen Zielmoleküls sind.

14. Verfahren zur Herstellung von Zielmolekülen, die eine Markierung in räumlicher Nähe zur oder innerhalb einer Zielsequenz aufweisen, die eine Teilsequenz des jeweiligen Zielmoleküls ist, bei dem Zielmoleküle mittels eines PCR-Verfahrens erzeugt werden, bei dem zumindest eine Art dNTPs eingesetzt werden, die mit einem Markierungsmittel versehen sind, bei dem die markierten dNTPs in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz und/oder in die Zielsequenz selbst eingebaut werden, und bei dem ein oder mehrere Primer eingesetzt wird oder eingesetzt werden, der oder die mit dem gleichen oder weiteren Markierungsmitteln versehen ist oder sind.

15. Zielmoleküle zum Einsatz in einem Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, die eine Markierung oder eine Anhäufung von Markierungen in räumlicher Nähe zur oder innerhalb der jeweiligen Zielsequenz aufweisen.

16. Zielmoleküle nach Anspruch 15 hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin Zielmoleküle nach Anspruch 15 oder 16 zum Einsatz kommen.

18. Kit zur Bereitstellung von Zielmolekülen für die Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend:
- Primer zur Generierung von Zielmolekülen, die ausschließlich in Nachbarschaft zur oder innerhalb der Zielsequenz eine Markierung aufweisen, und
- gegebenenfalls Puffer und anderer Hilfssubstanzen.

19. Satz von Fängermolekülen, zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend:
- eine vorbestimmte Anzahl unterschiedlicher Fängermoleküle umfassend jeweils unterschiedliche Fängersequenzen, die jeweils zum Ausbilden von Ligandenbindungen mit Zielsequenzen von Zielmolekülen derart ausgebildet sind, dass sie komplementär zu den jeweiligen Abschnitten der Zielsequenzen sind, die sich in räumlicher Nähe zu einer Markierung bzw. einer Anhäufung von Markierungen befinden.

20. Satz nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Markierung bzw. Anhäufung von Markierungen weniger als 100 Basen, vorzugsweise weniger als 50 bzw. 30 Basen von der Zielsequenz beabstandet sind oder sich innerhalb der Zielsequenz befinden.

21. Satz nach Anspruch 19 oder 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Fängermoleküle Oligonukleotide sind.

22. Satz nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass er zumindest 10, 30, 50, 100, 1.000 beziehungsweise 5.000 unterschiedliche Fängersequenzen aufweist.

23. Satz nach einem der Ansprüche 19 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,

dass die Fängersequenzen Bestandteile der Sonden eines DNA-Arrays sind.

24. Verfahren zum Bestimmen von Fängersequenzen die jeweils zum Ausbilden von Ligandenbindungen mit Zielsequenzen, die jeweils eine Teilsequenz eines längeren Zielmoleküls bilden, derart ermittelt werden, dass sie komplementär zu den jeweiligen Abschnitten der Zielsequenzen sind, die sich in räumlicher Nähe zu einer Markierung bzw. einer Anhäufung von Markierungen befinden.

25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Fängersequenzen derart bestimmt werden, dass die Markierung bzw. Anhäufung von Markierungen weniger als 100 Basen, vorzugsweise weniger als 60, 50, 30 bzw. 20 Basen von der Zielsequenz beabstandet sind oder sich innerhalb der Zielsequenz befinden.

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Fängersequenzen mittels eines Computerprogramms berechnet werden.

27. Satz von Fängermolekülen, wobei die Fängermoleküle die Spezifität jener Fängermoleküle aufweisen, die jeweils eine Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO:1-189, umfassen.

28. Vorrichtung zur Analyse von Nukleinsäuren N_2-fixierender Organismen umfassend einen Objektträger, auf dem Fängermoleküle immobilisiert sind, die die jeweils die Spezifität jener Fängermoleküle aufweisen, die eine Sequenz umfassen, die aus den SEQ ID NO:1-189 ausgewählt ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Fängermoleküle zumindest teilweise Fängermolküle sind, die jeweils die Spezifität eines Fängermoleküls aufweisen, die eine Sequenz ausgwählt aus SEQ ID NO:1-189 umfassen.

Fig. 1A

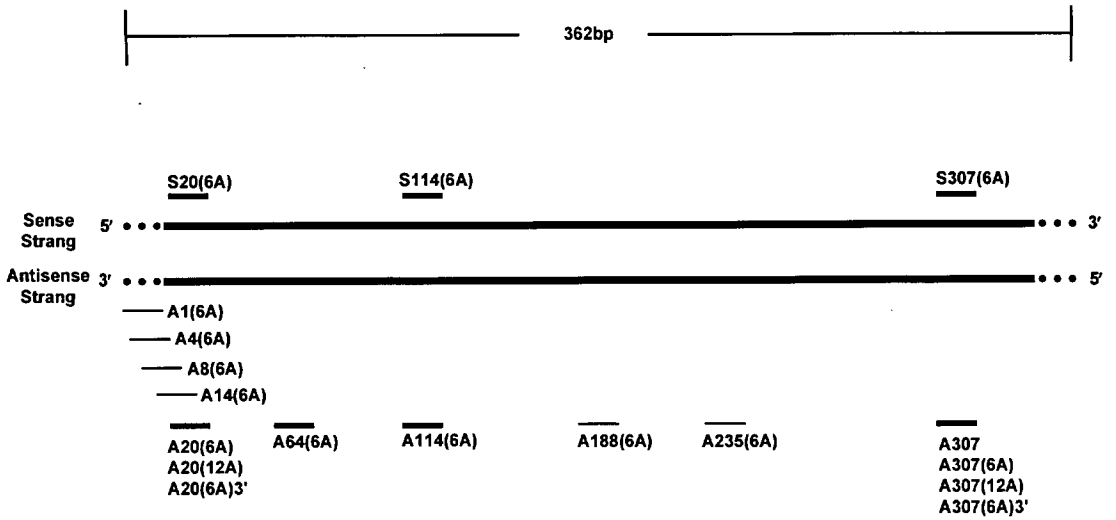


Fig. 1B

Modifikation	Fängerol.	Sequenz (5'-3')	Tm(°C)	Länge(nt)	Position
5'Aminolink (kein Spacer)	A289	GGGCCTTGTTTTCGCG	65	16	207-322
5'Aminolink (6A Spacer)	A1(6A)	AAAAAA TGCGACCCGAAGGCTGA	68	17	1-17
	A4(6A)	AAAAAA GAGTCAGCCTTCGGGTC	68	17	4-20
	A8(6A)	AAAAAA GGTGGAGTCAGCCTTCG	68	17	8-24
	A14(6A)	AAAAAA CAGACGGGTGGAGTCAG	68	17	14-30
	A20(6A)	AAAAAA GAGGATCAGACGGGTGG	68	17	20-36
	A64(6A)	AAAAAA CTTCAGCGGCCAGGTG	68	16	64-79
	A114(6A)	AAAAAA GAAGCCGACCGACAGG	68	16	114-129
	A188(6A)	AAAAAA GGCGGTGATAACGCCAC	67	18	235-252
	A235(6A)	AAAAAA GAAGTCGAGTTCGTCGTC	65	16	307-322
	A307(6A)	AAAAAA GGGCCTTGTTTTCGCG	65	16	207-322
	S20(6A)	AAAAAA CCACCCGTCTGATCCTC	68	17	*327-343*
	S114(6A)	AAAAAA CCTGTCGGTCGGCTTC	68	16	*234-249*
	S307(6A)	AAAAAA CGCGAAAACAAGGCCC	65	16	*41-56*
5'Aminolink (12A Spacer)	A20(12A)	AAAAAAAAAAAA GAGGATCAGACGGGTGG	68	17	20-36
	A307(12A)	AAAAAAAAAAAA GGGCCTTGTTTTCGCG	65	16	207-322
3'Aminolink (6A Spacer)	A20(6A)3'	GAGGATCAGACGGGTGG AAAAAA	68	17	20-36
	A307(6A)3'	GGGCCTTGTTTTCGCG AAAAAA	65	16	207-322

Fig. 1C: Primer für die Amplifikation durch PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm(°C)	Länge	Beschreibung	Referenz
Z-nifH-f	TGYGAYCCNAARGCNGA		17	nifH PCR forward primer	Zehr and McReynolds, 1989
Z-nifH-r	ADNGCCATCATYTCNCC		17	nifH PCR reverse primer	Zehr and McReynolds, 1989
Z-nifH-f-BH72-Cy5	TGCGACCCGAAGGCTGA	68	17	nifH PCR forward primer specific for *Azoarcus sp.* BH72	Diese Untersuchung
Z114-nifH-f-BH72-Cy5	CCTGTCGGTCGGCTTC	68	16	nifH PCR forward primer specific for *Azoarcus sp.* BH72	Diese Untersuchung
Z307-nifH-r-BH72-Biotin	GGGCCTTGTTTTCGCG	65	16	nifH PCR reverse primer specific for *Azoarcus sp.* BH72	Diese Untersuchung

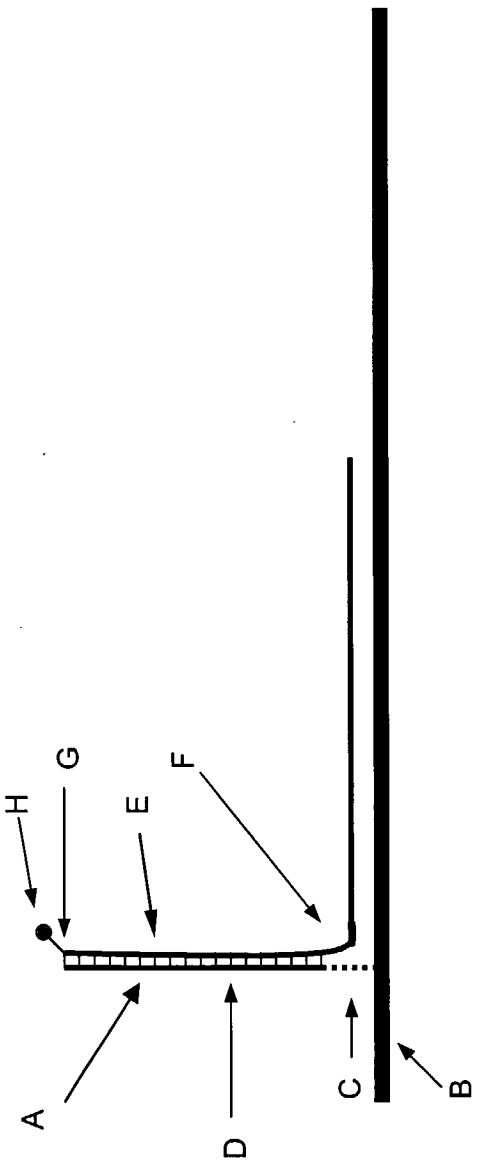


Fig. 1D

Fig. 2A

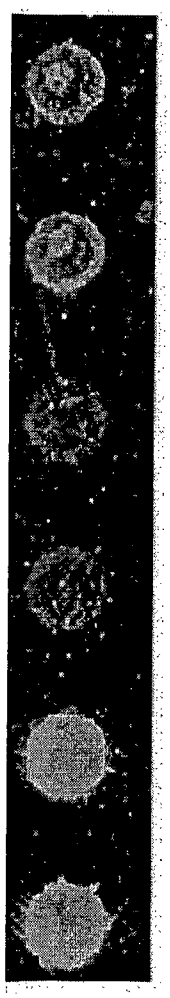


Fig. 2B

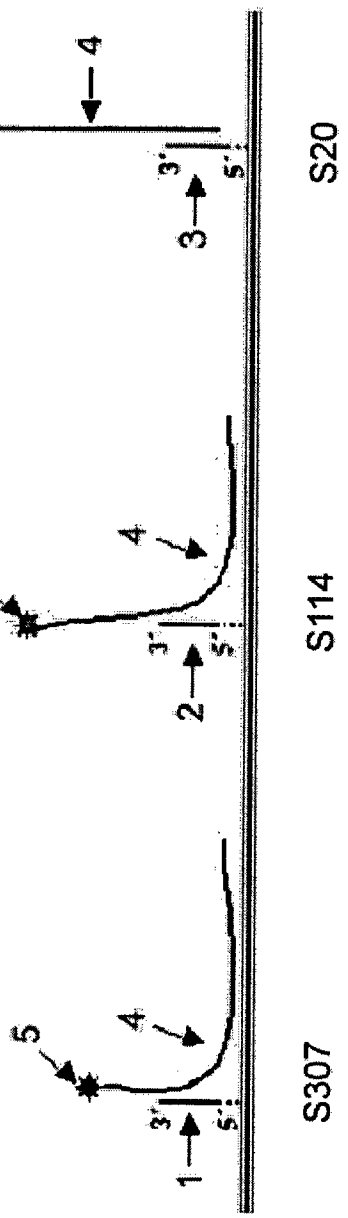


Fig. 2C

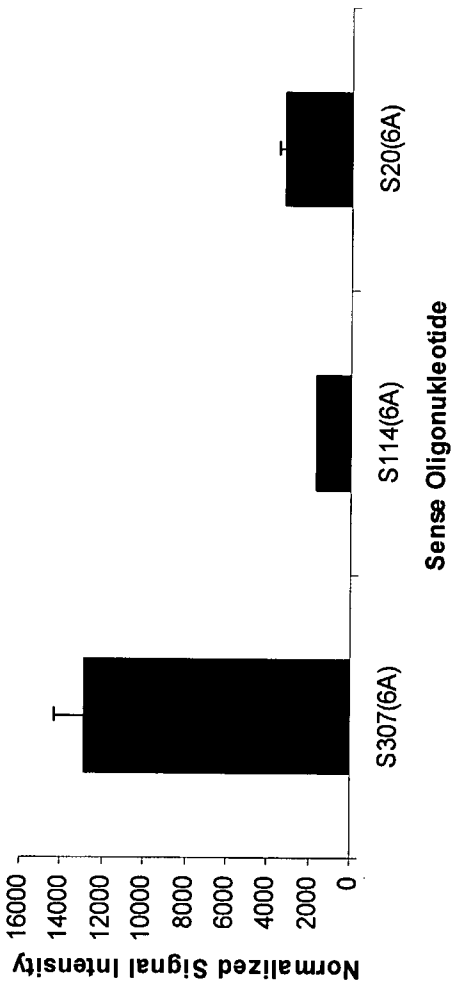


Fig. 3A

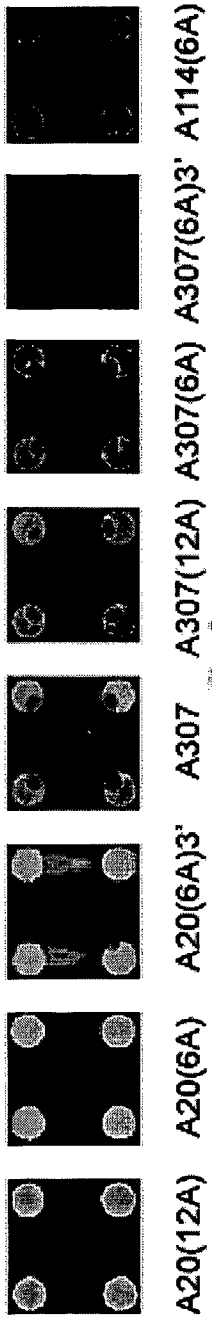


Fig. 3B

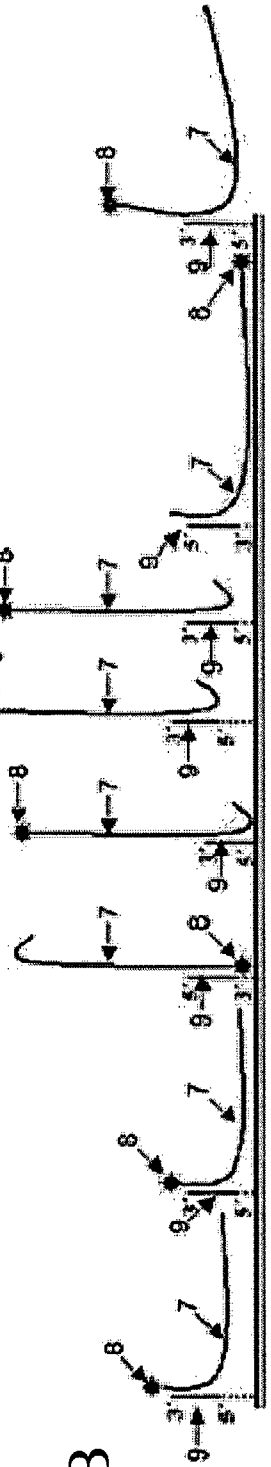


Fig. 3C

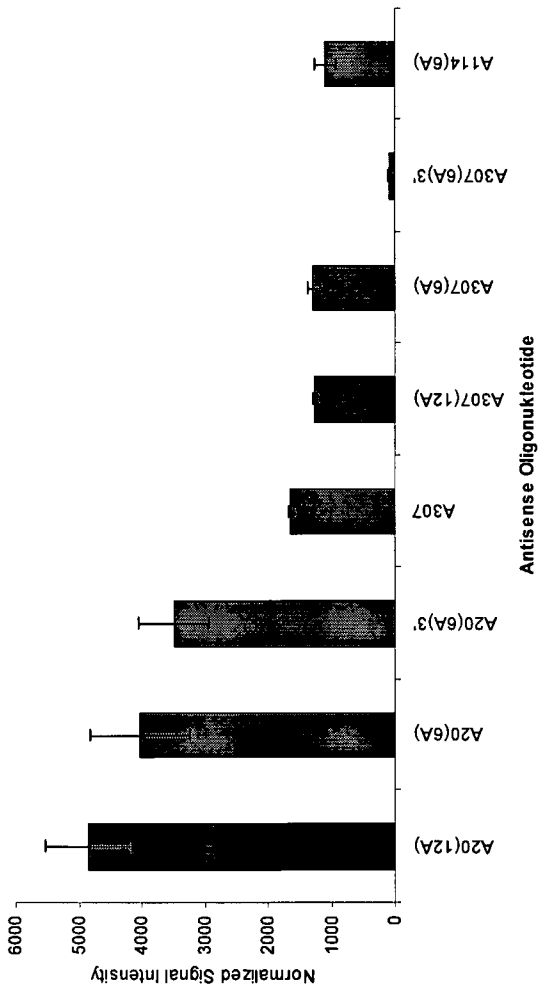


Fig. 4A

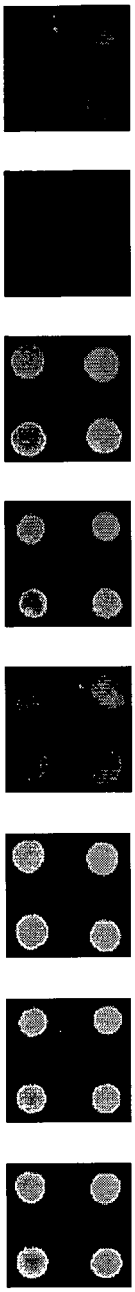


Fig. 4B

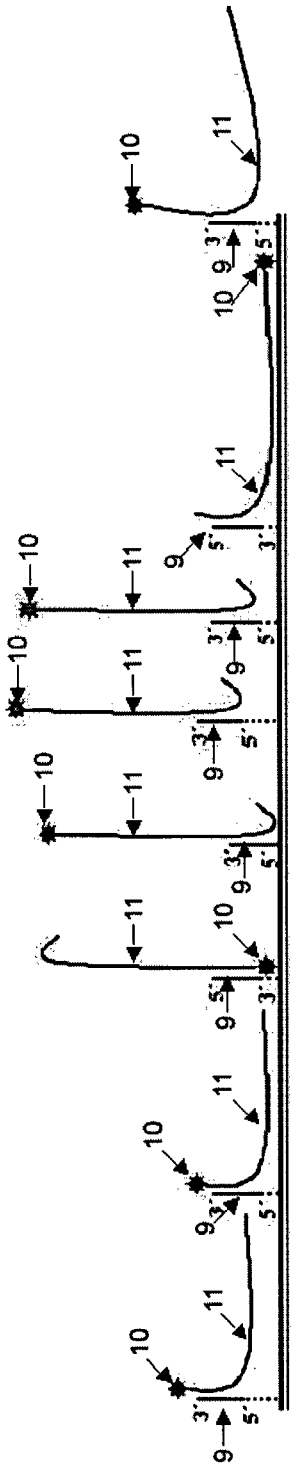


Fig. 4C

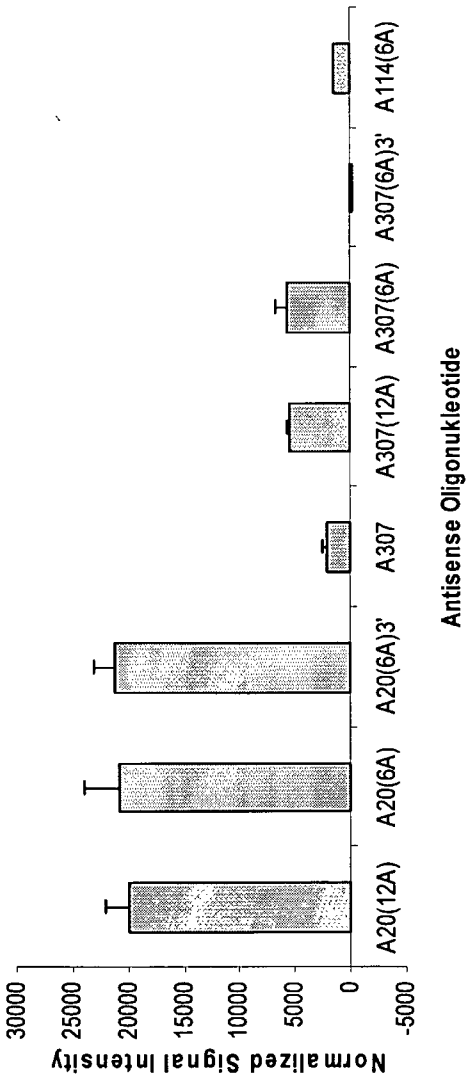


Fig. 6A

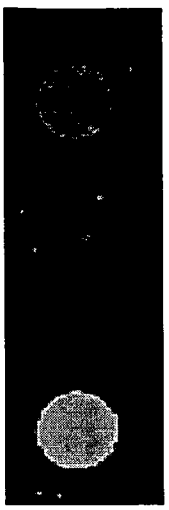


Fig. 5A

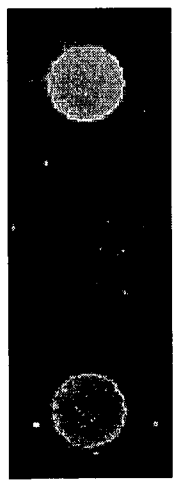


Fig. 6B

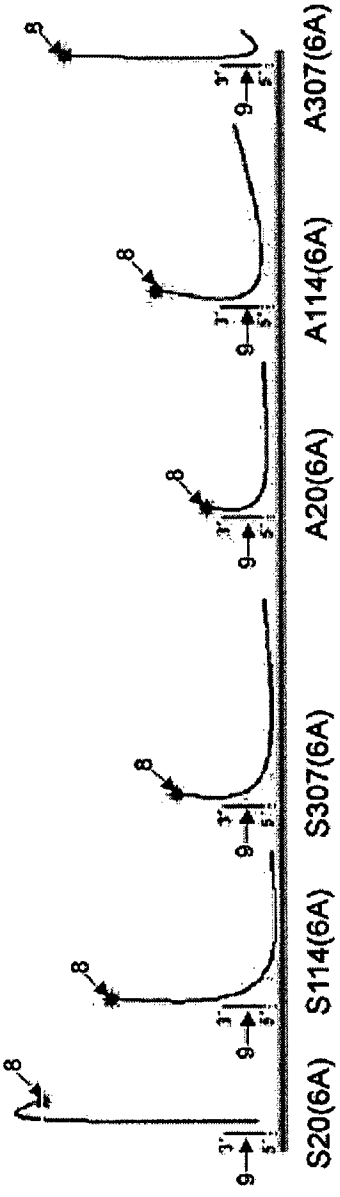


Fig. 5B

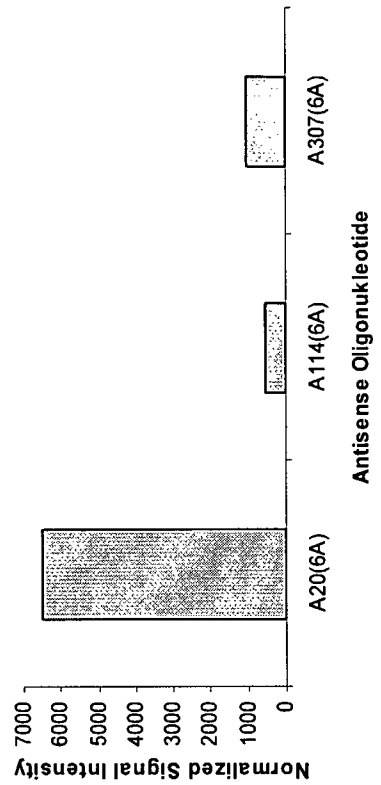


Fig. 6C

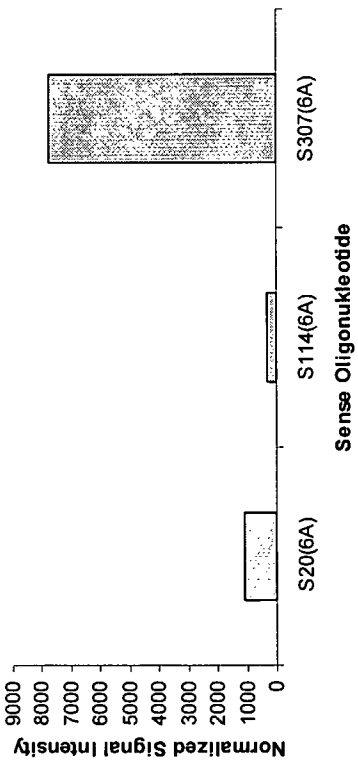


Fig. 5C

Fig. 7A

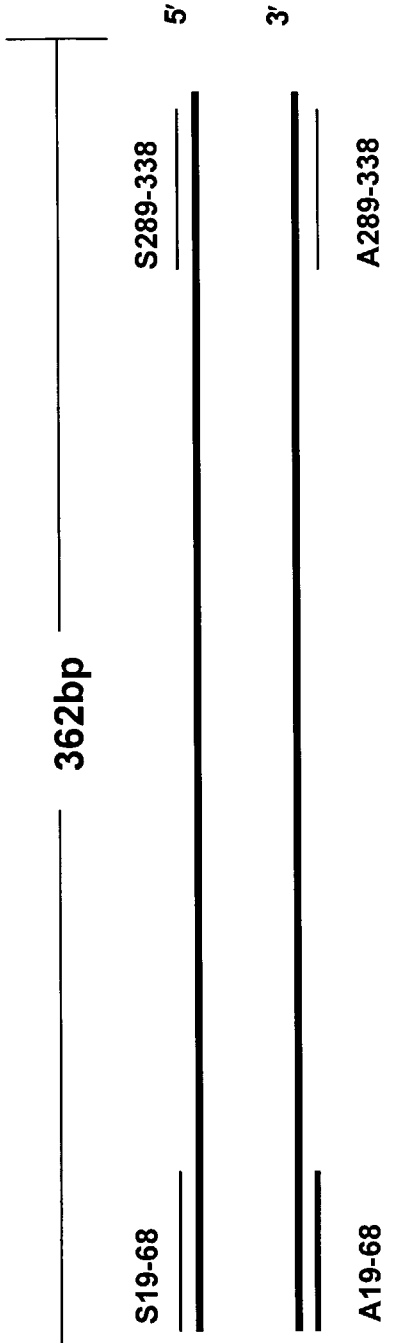


Fig. 7B

Modifikation	Fängerol.	Sequenz (5'-3')	Tm(°C)*	Länge (bp)
5'Aminolink (kein+A1spacer)	A19-68	AGGTGCATCACGGTGGTCTGGGCCTTGCTGTGGAGGATCAGACGGTGGA	91	50
	A289-338	ACGATGTAGATTTCCTGGGCCTTGTTTTCGCGAATCGGCATCGCGAAGCC	87	50
	S19-68	TCCACCCGTCTGATCCTCCACAGCAAGGCCCAGACCACCGTGATGCACCT	91	50
	S289-338	GGCTTCGCGATGCCGATTCGCGAAAACAAGGCCCAGGAAATCTACATCGT	87	50

Fig. 8A

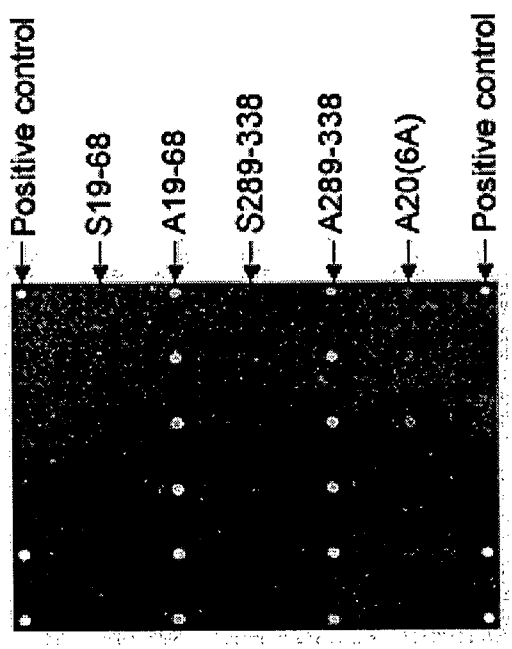


Fig. 9A

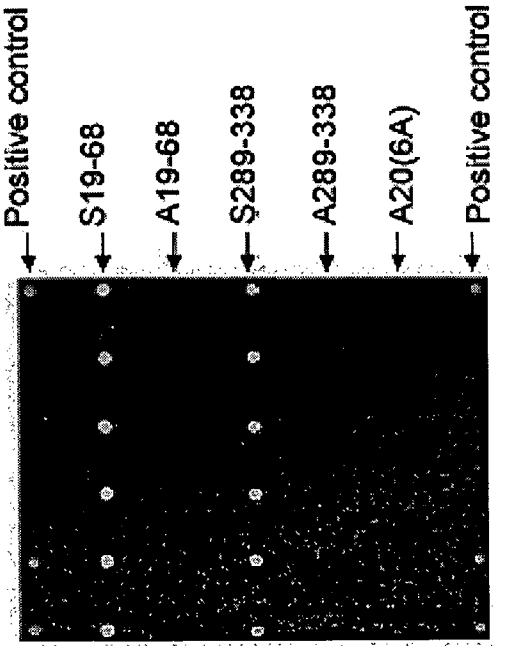


Fig. 8B

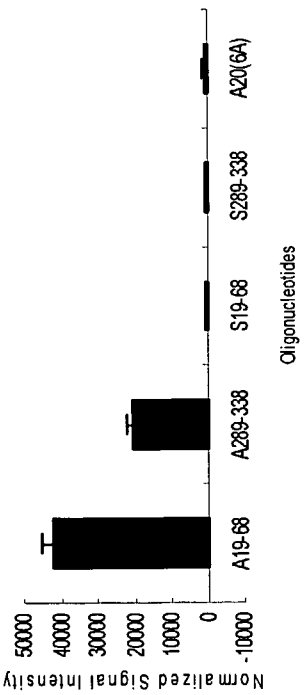
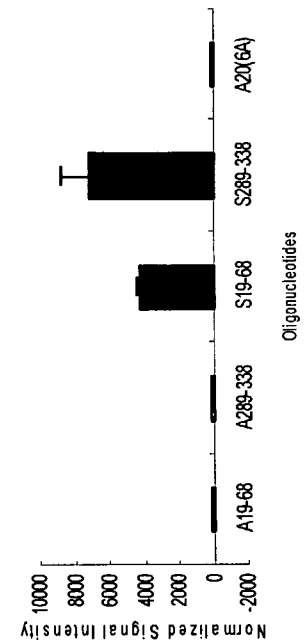


Fig. 9B



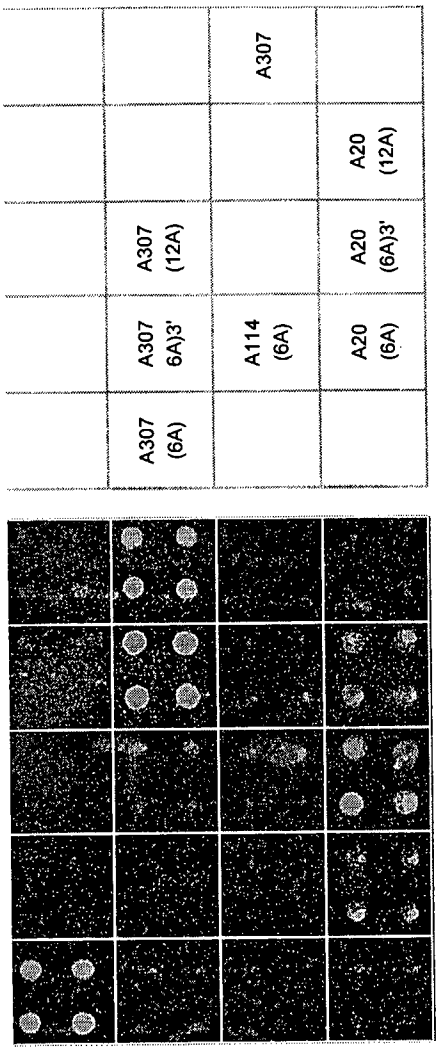


Fig. 10A

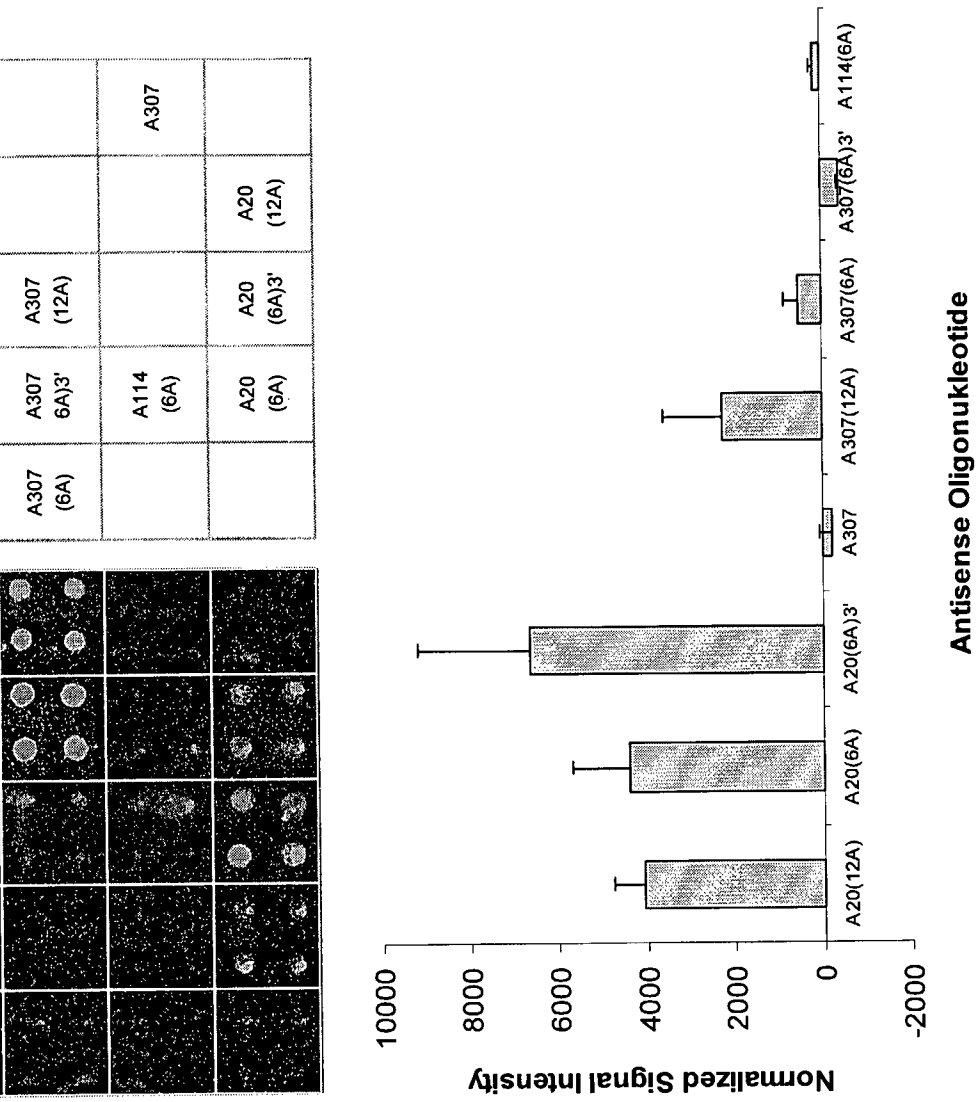


Fig. 10B

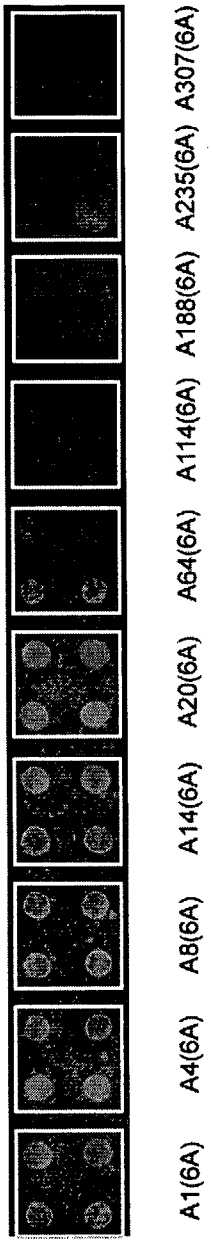


Fig. 11A

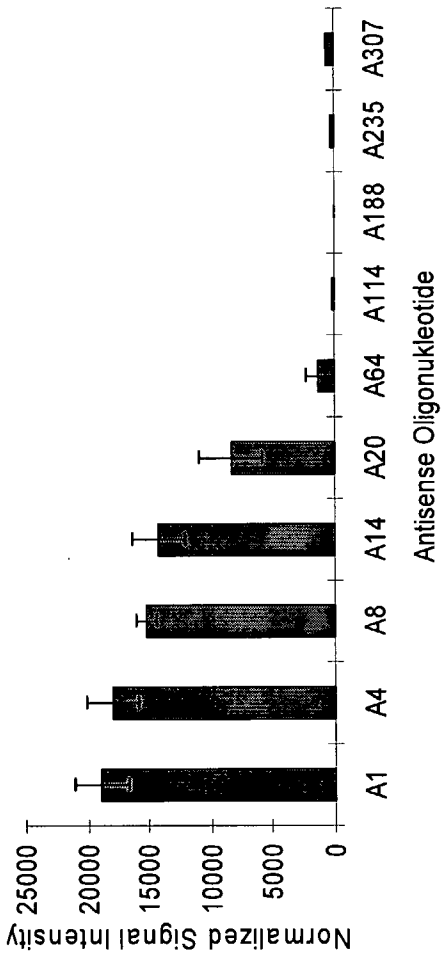
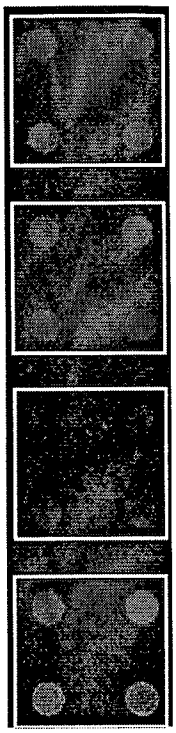


Fig. 11A



A114(6A) A188(6A) A235(6A) A307(6A)

Fig. 12A

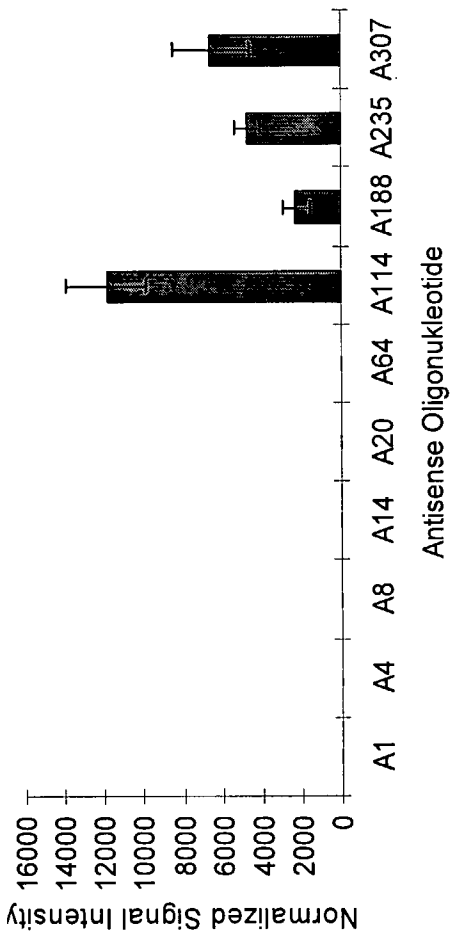
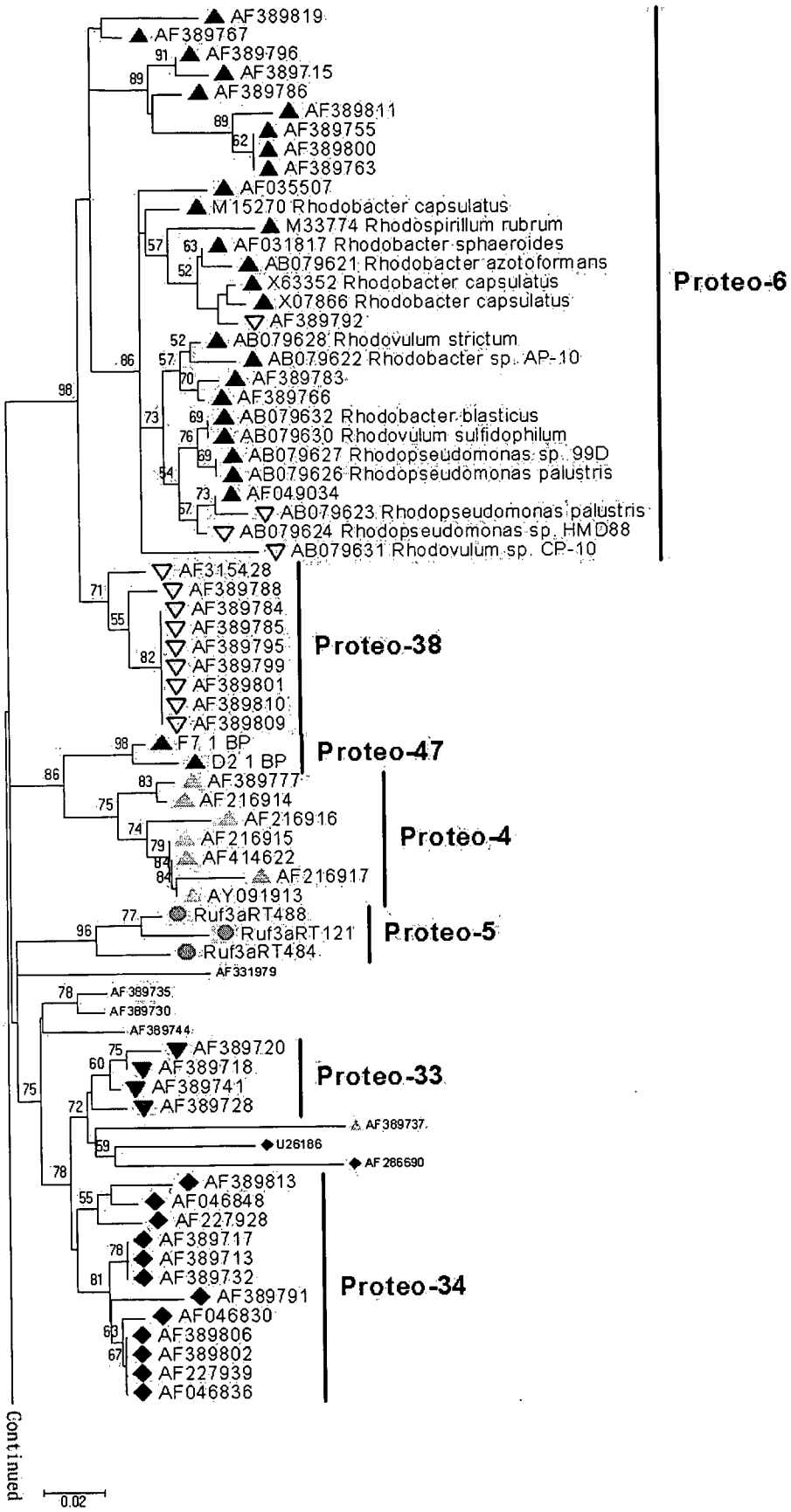


Fig. 12B

Fig. 13 (Seite 1)



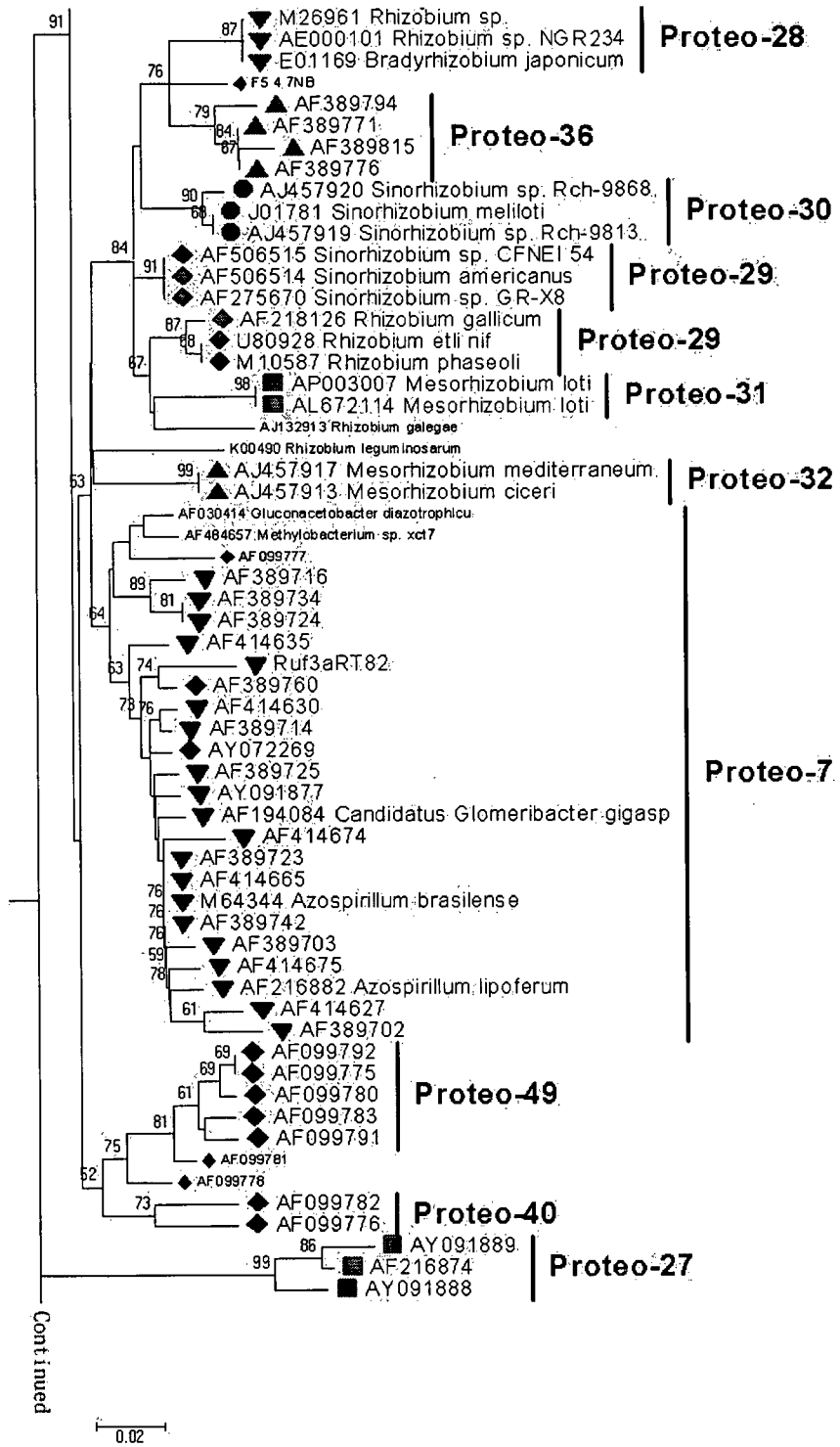


Fig. 13 (Seite 2)

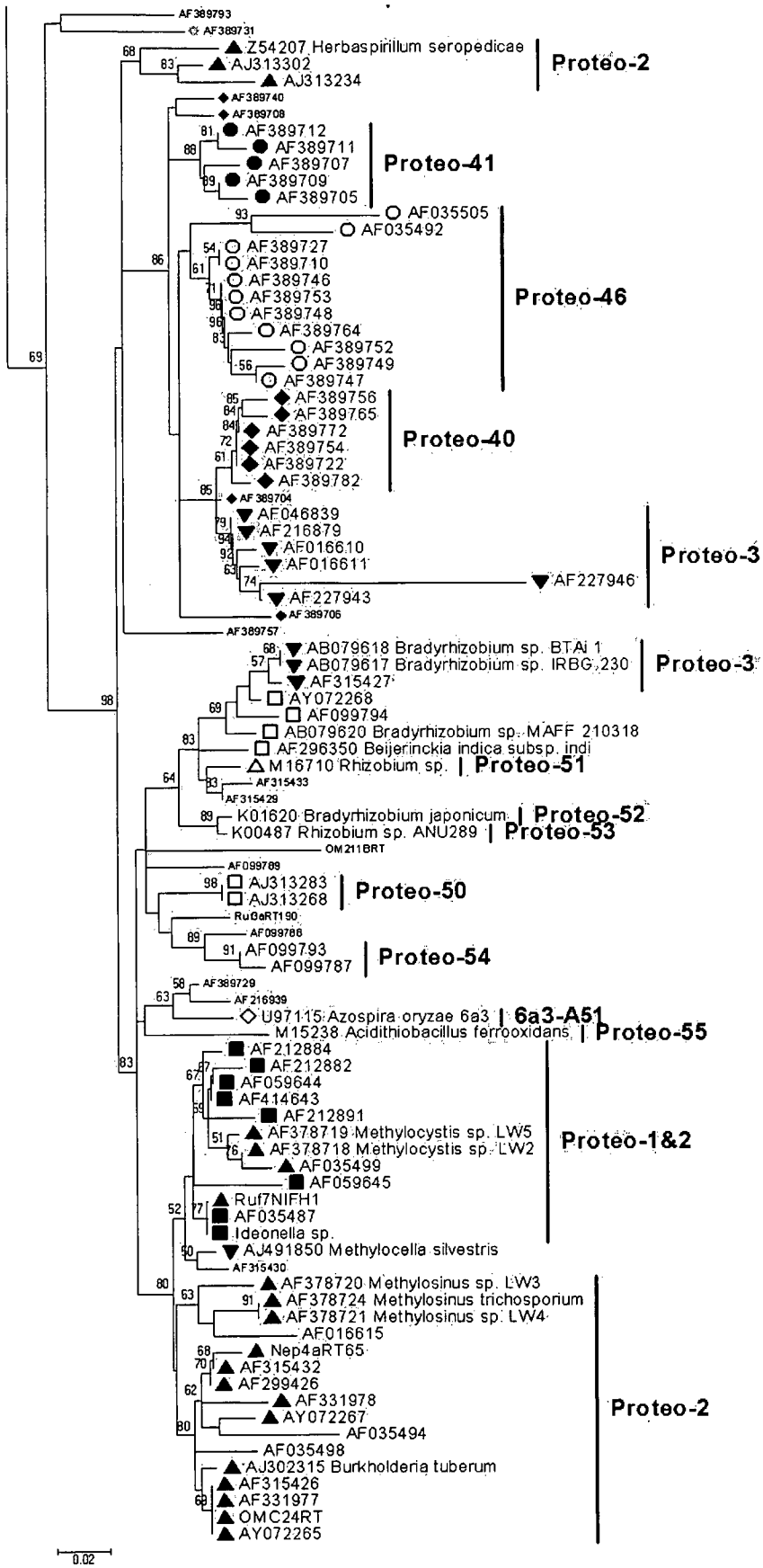


Fig. 14 (Seite 1)

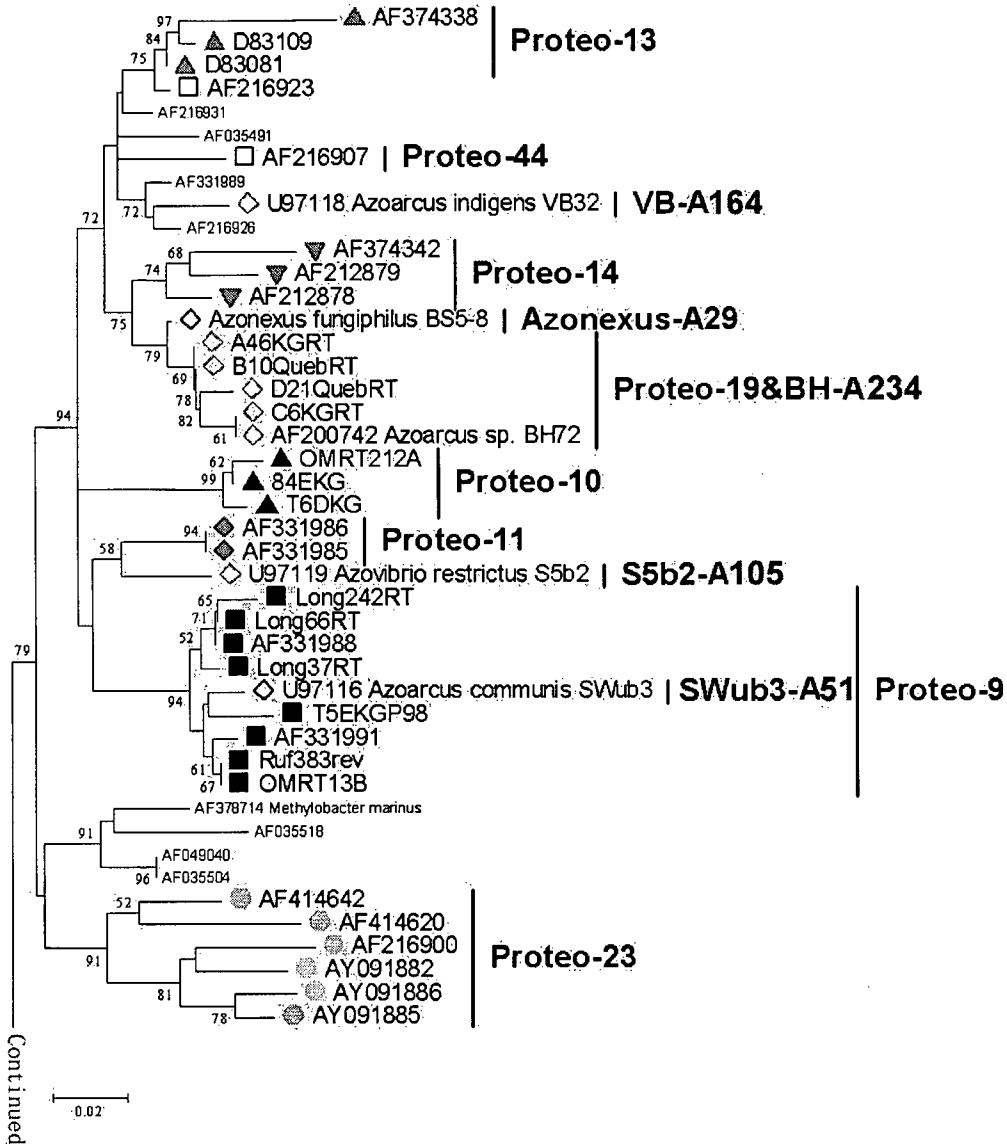


Fig. 14 (Seite 2)

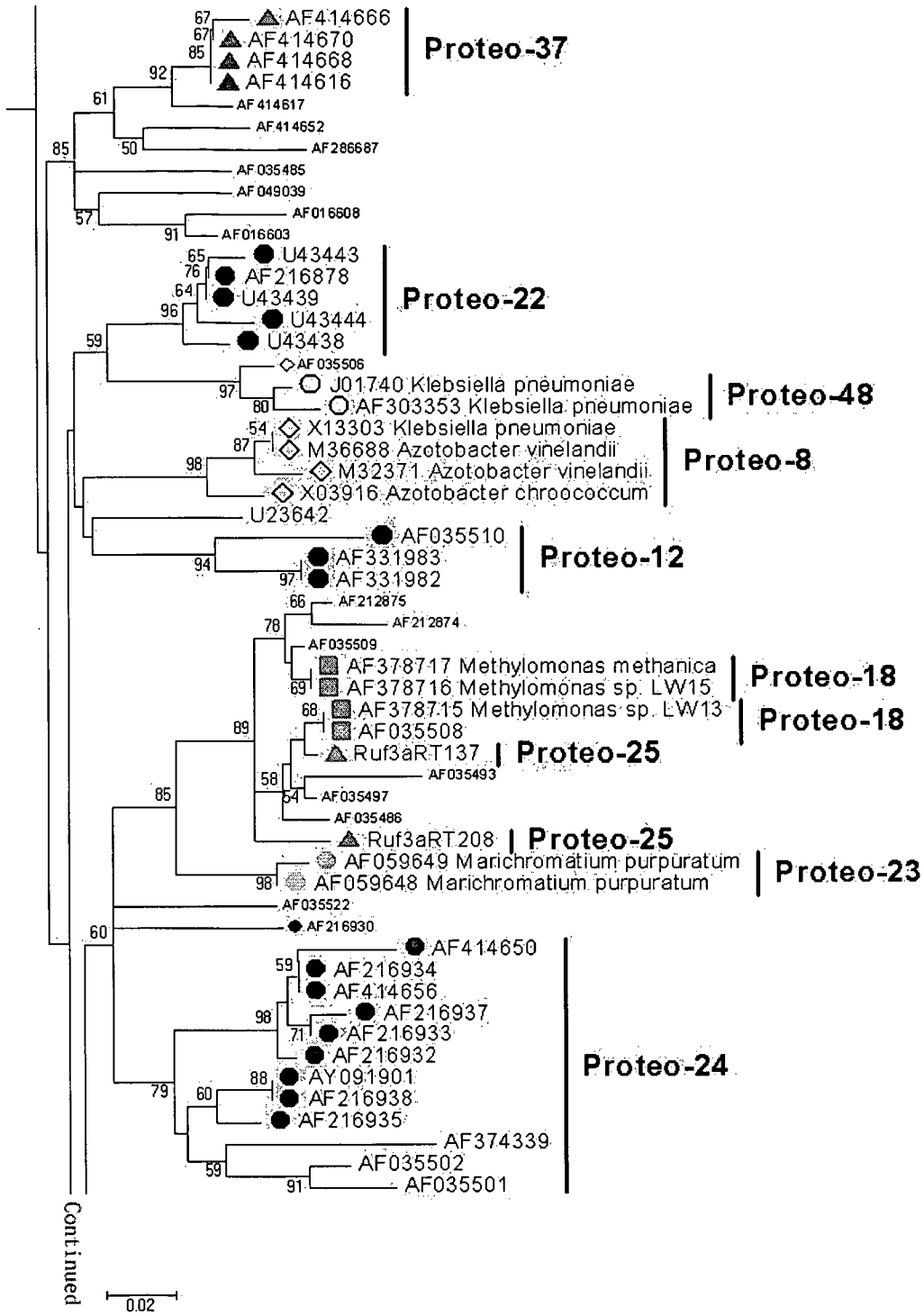


Fig. 15 (Seite 1)

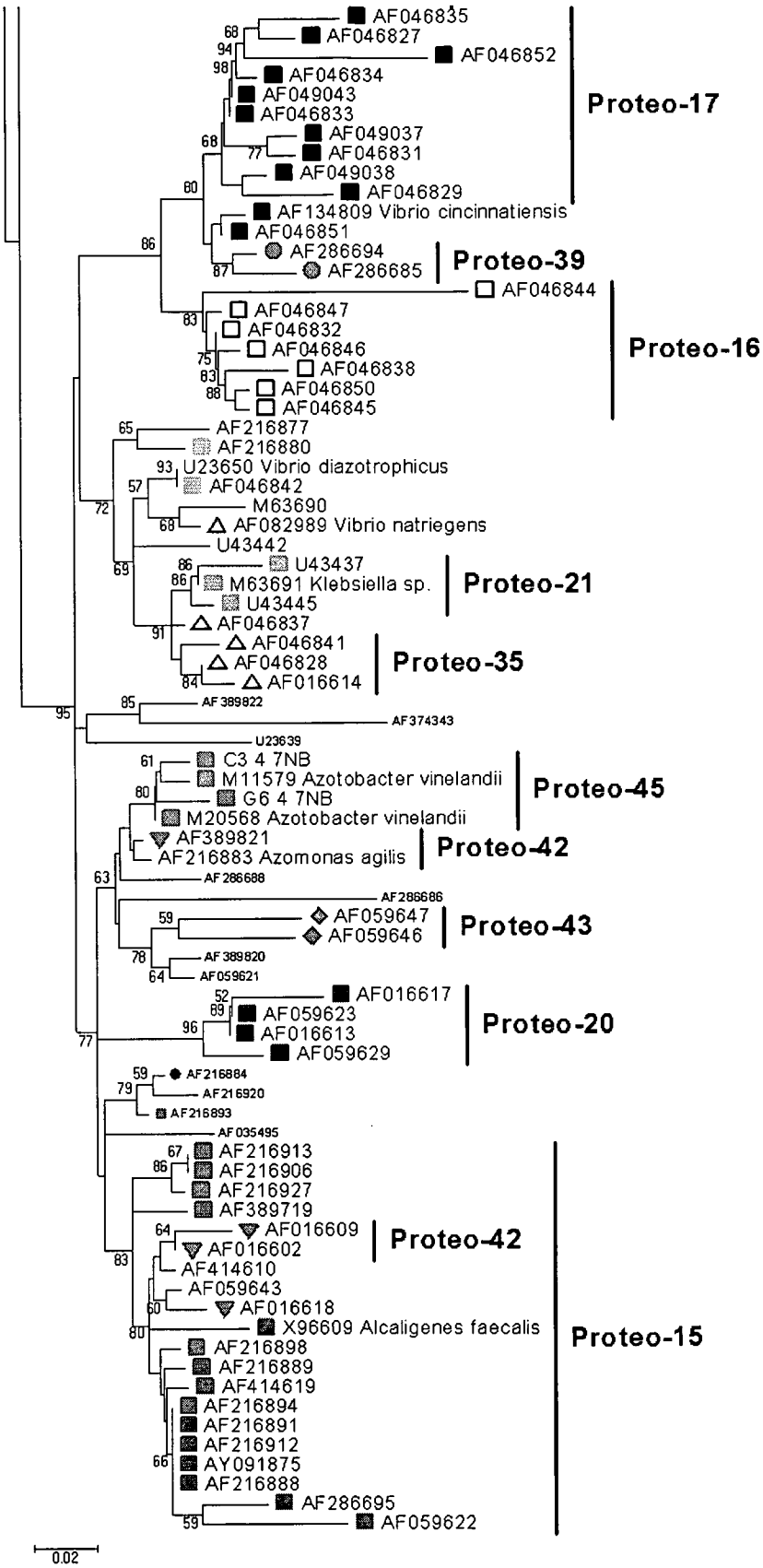


Fig. 15 (Seite 2)

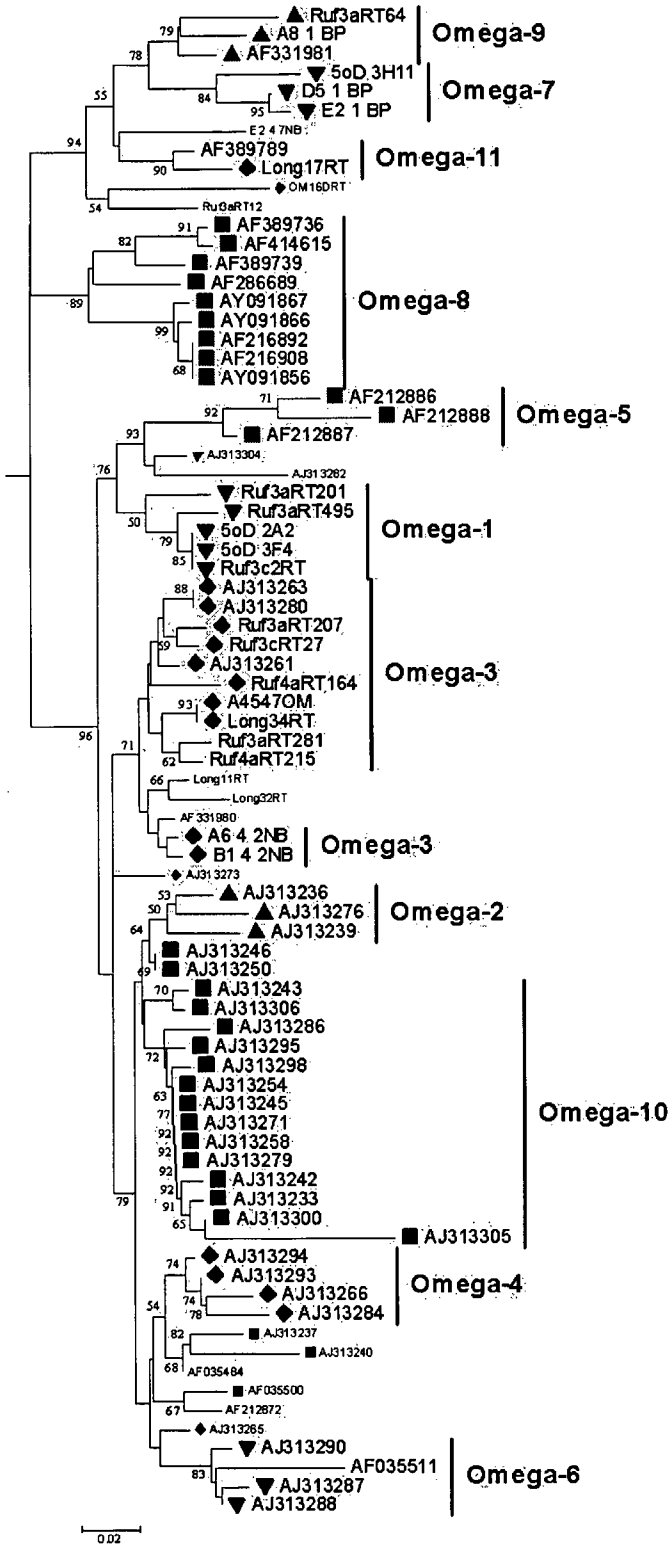


Fig. 15 (Seite 3)

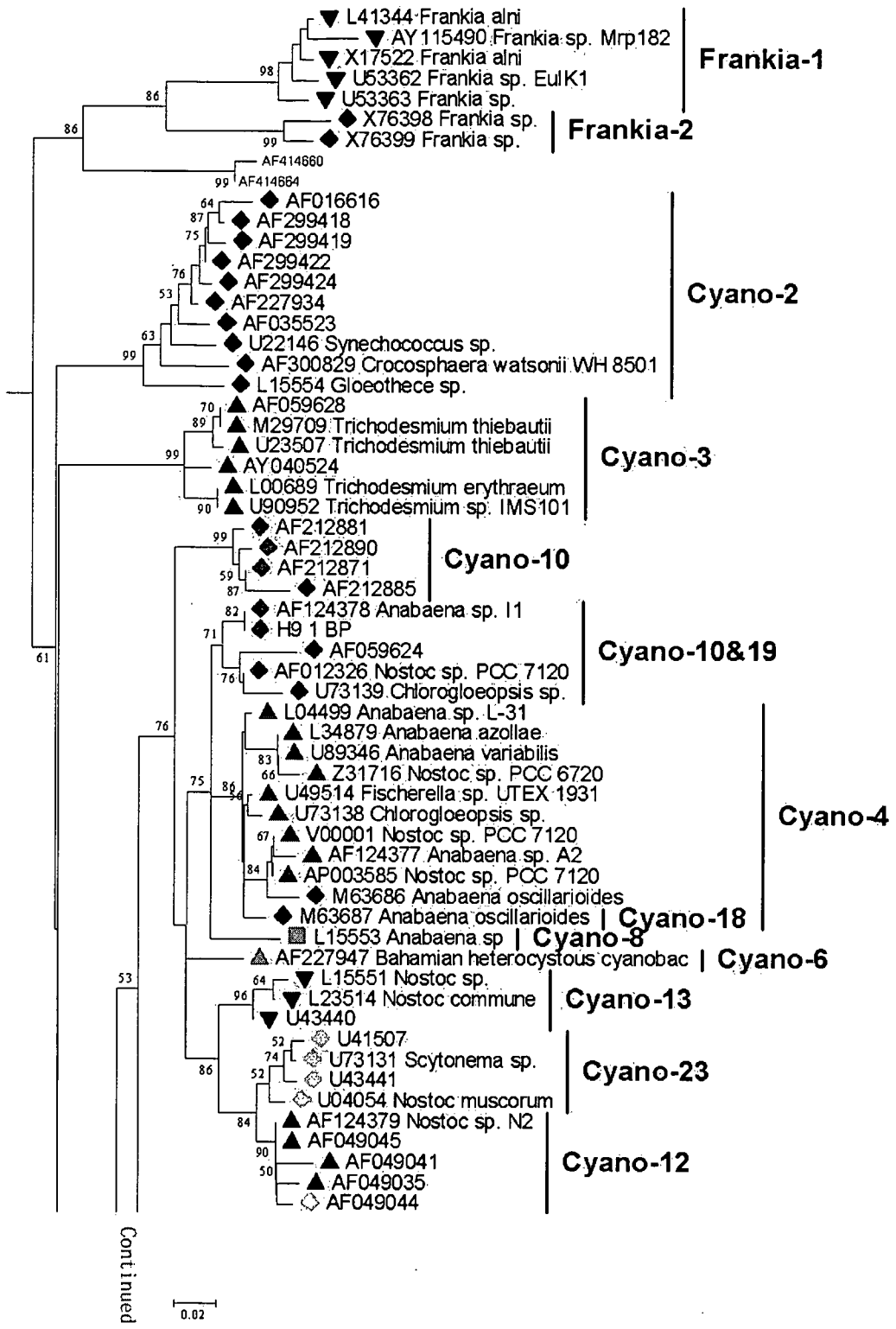


Fig. 16 (Seite 1)

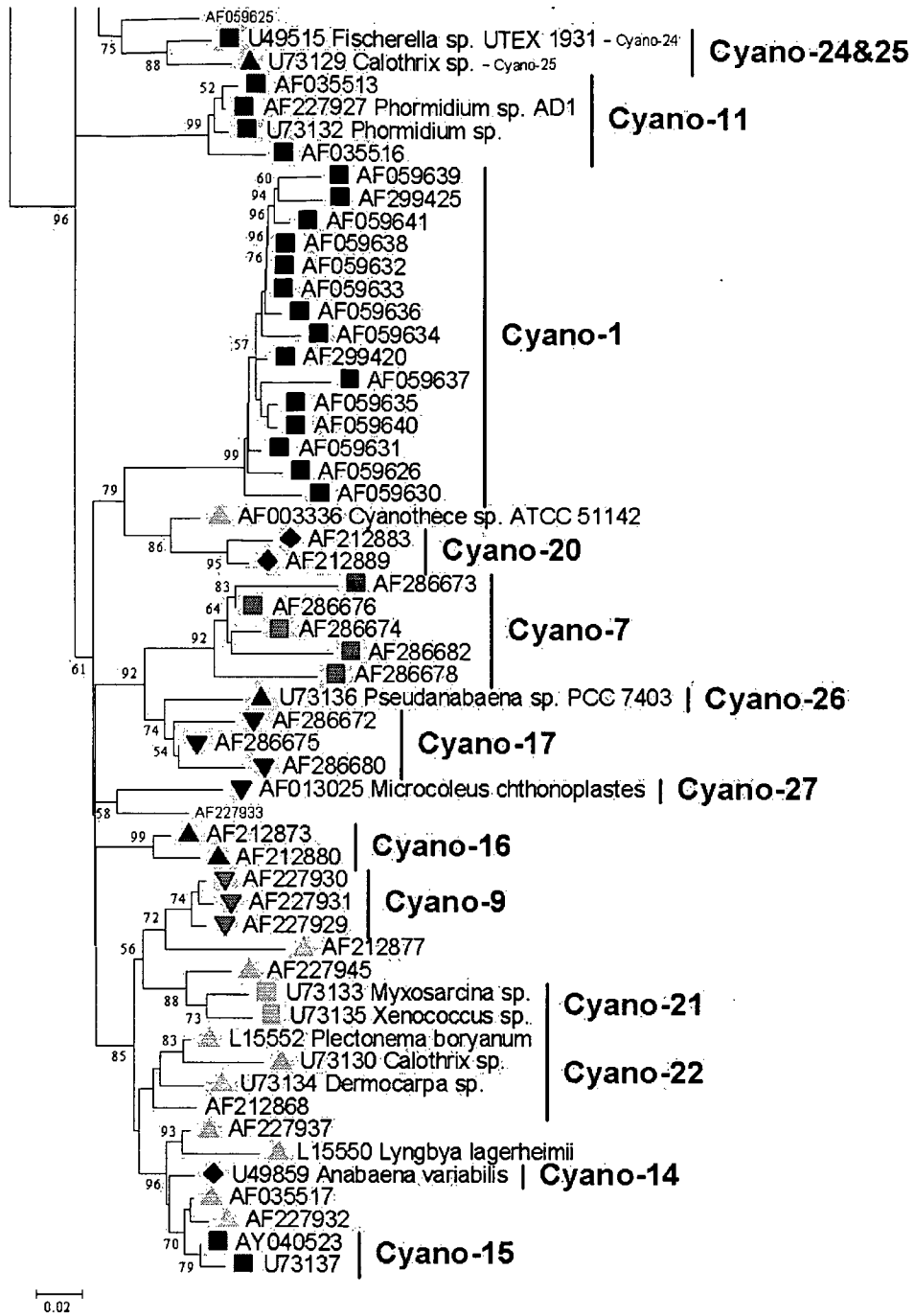


Fig. 16 (Seite 2)

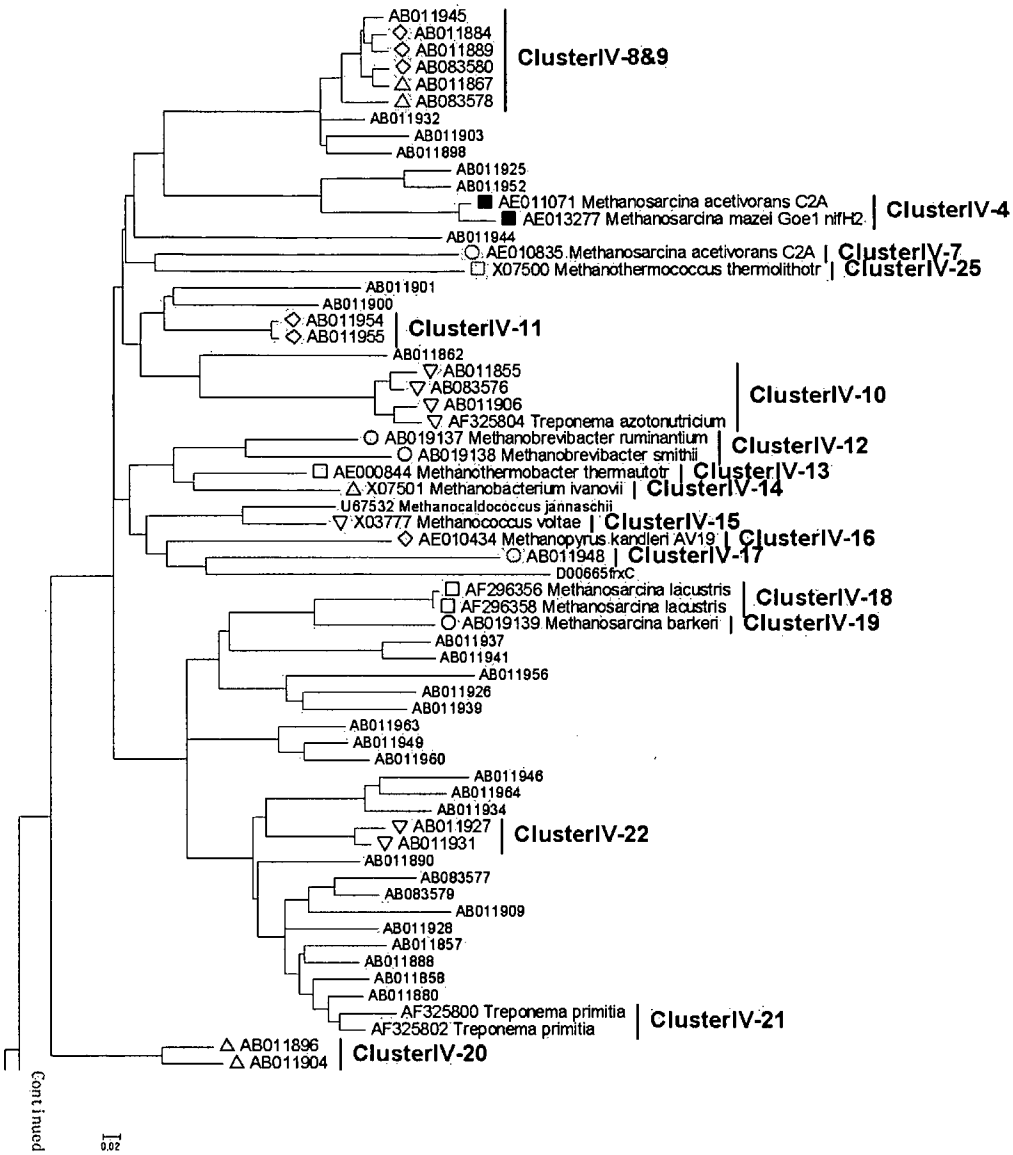


Fig. 17 (Seite 1)

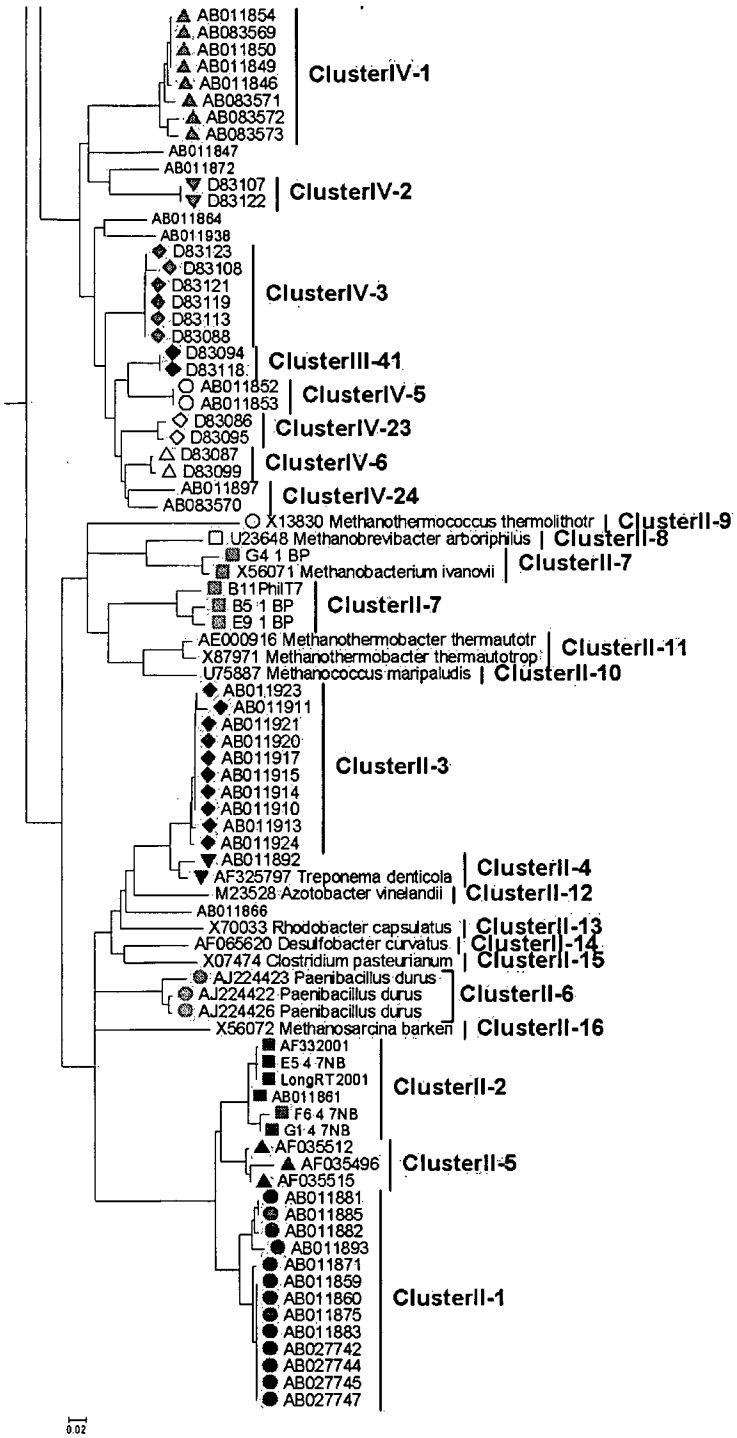


Fig. 17 (Seite 2)

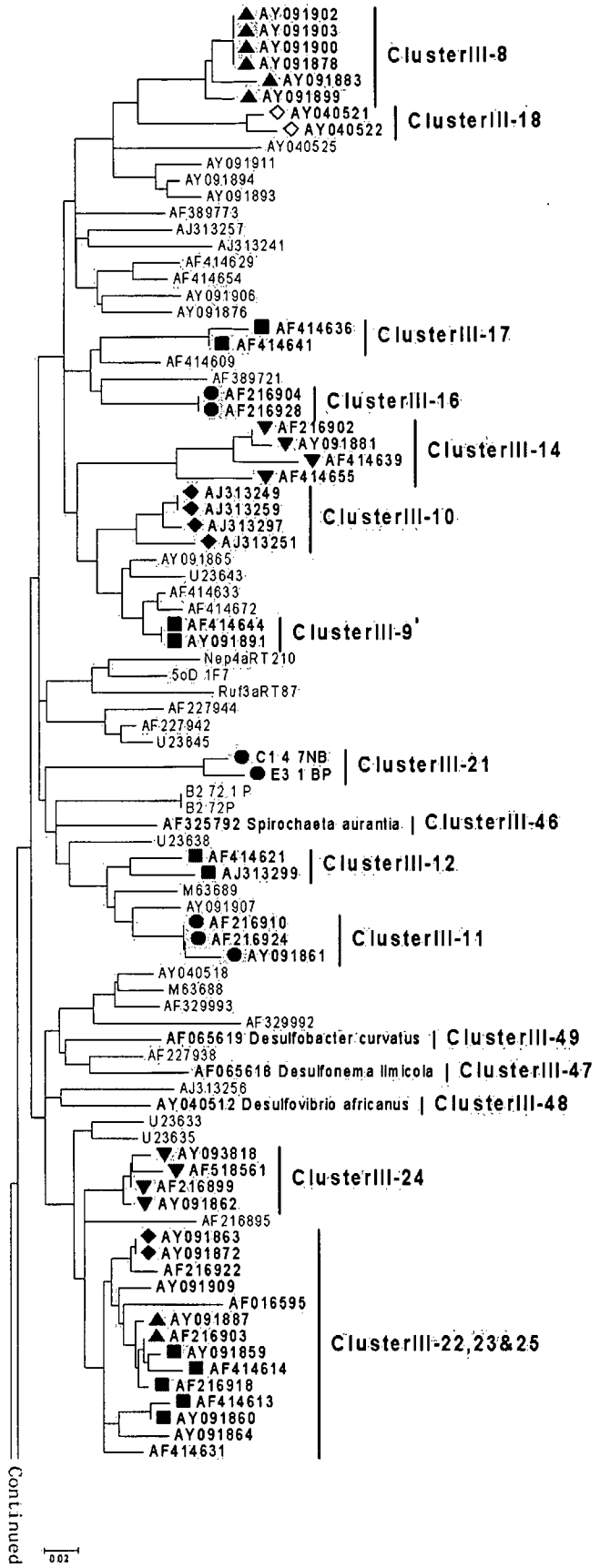


Fig. 18 (Seite 1)

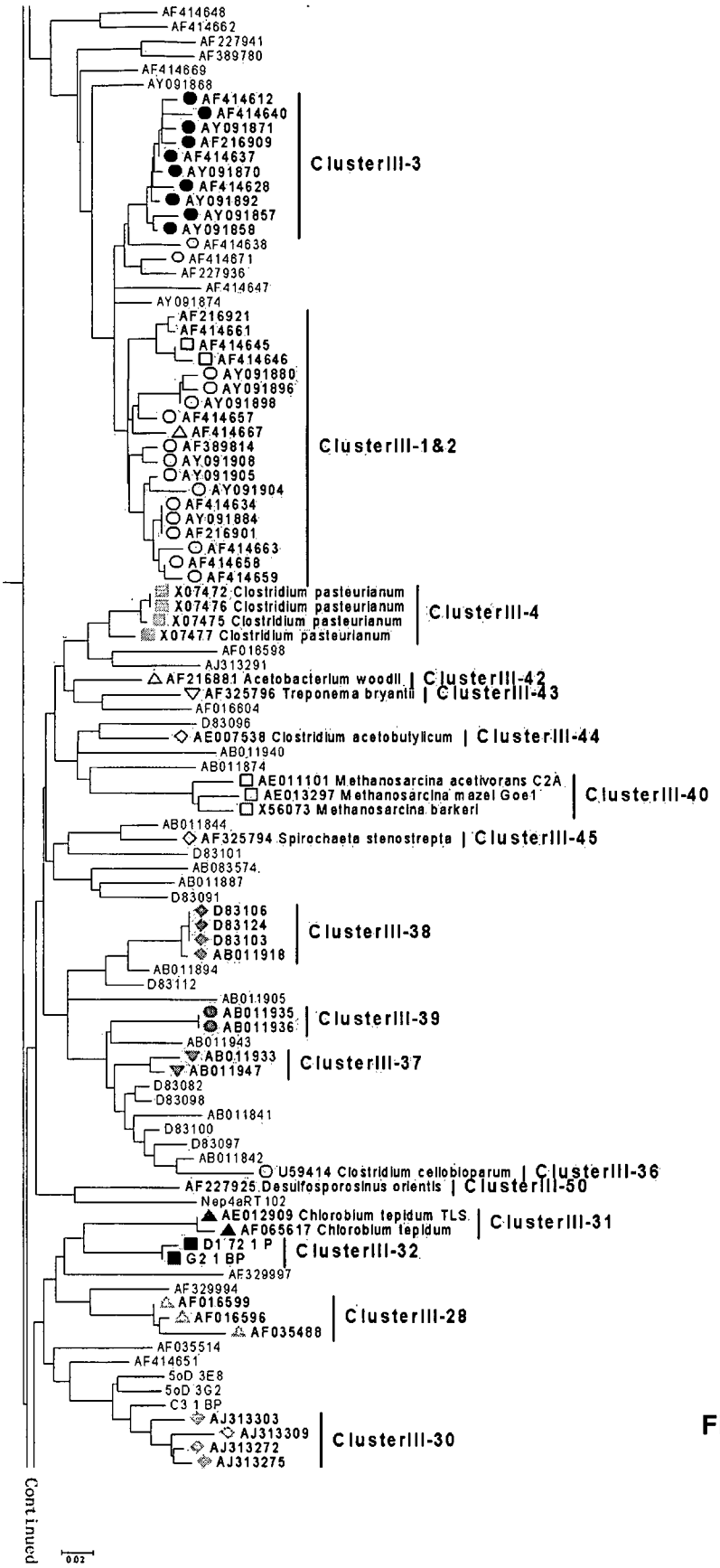


Fig. 18 (Seite 2)

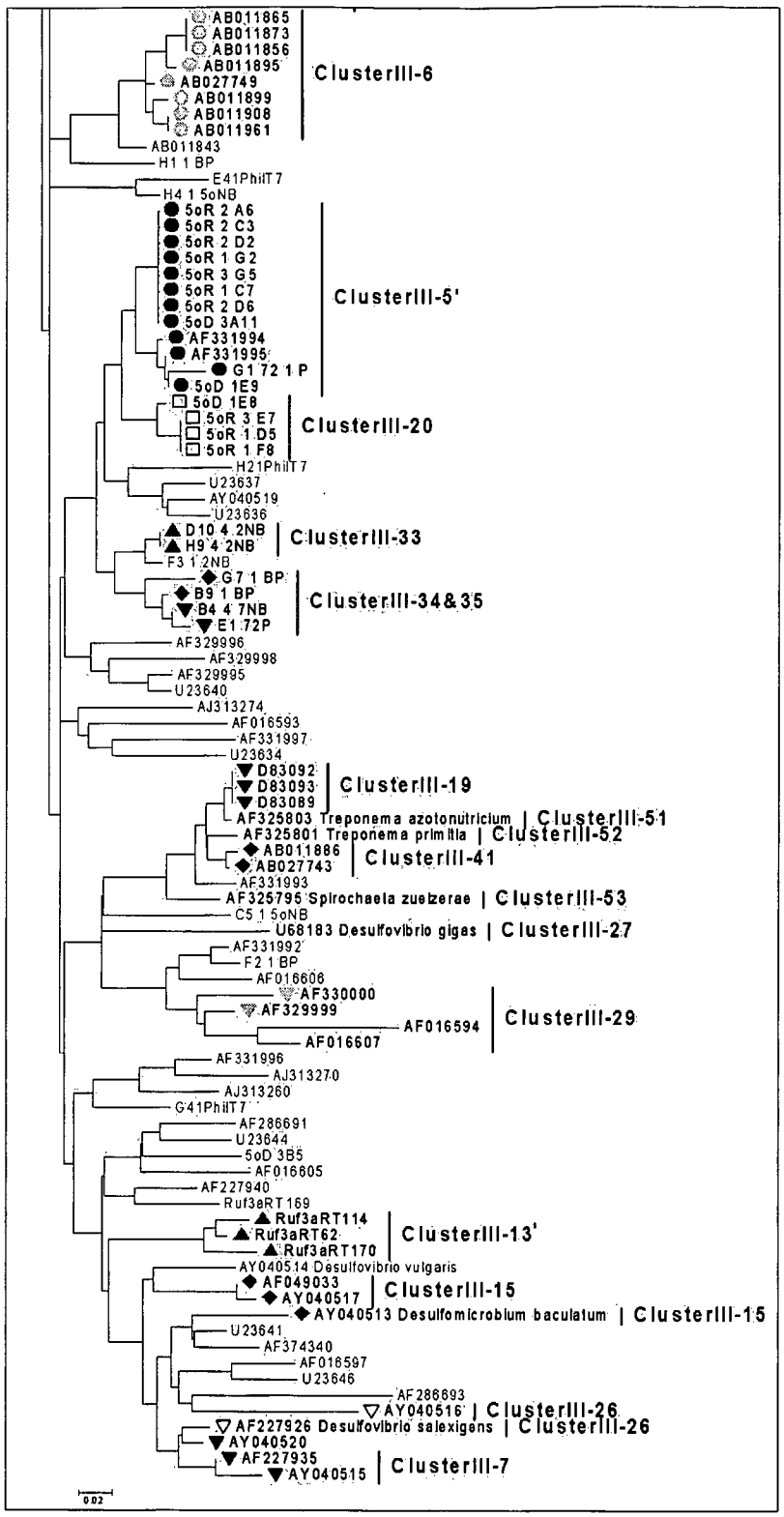


Fig. 18 (Seite 3)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/008150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEWARD GRIEG F ET AL: "Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 70, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 1455-1465, XP002352142 ISSN: 0099-2240 the whole document	1-6,9, 15-17, 19-29
X	COLEBATCH GILLIAN ET AL: "Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 15, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 411-420, XP002352143 ISSN: 0894-0282 the whole document	1-6,9, 10, 13-17, 19,20, 22-25

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 November 2005	10/11/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Cornelis, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/008150

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 102 46 824 A1 (AXARON BIOSCIENCE AG) 22 April 2004 (2004-04-22) the whole document	1-18, 24-26
X	WO 99/51772 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC) 14 October 1999 (1999-10-14) the whole document	1-20, 22-26
X	JENKINS BETHANY D ET AL: "Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 70, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 1767-1776, XP002352172 ISSN: 0099-2240 the whole document	1
X	WO 00/11223 A (AFFYMETRIX, INC; GENTALEN, ERIK; CHEE, MARK) 2 March 2000 (2000-03-02) the whole document	1
X	WO 03/087774 A (CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI; HUANG, TIM, HUI-MING; SHI, HUI) 23 October 2003 (2003-10-23) the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/008150

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10246824 A1	22-04-2004	AU 2003273960 A1	04-05-2004
		WO 2004033721 A2	22-04-2004
WO 9951772 A	14-10-1999	CA 2335447 A1	14-10-1999
		EP 1075542 A1	14-02-2001
		US 6004755 A	21-12-1999
WO 0011223 A	02-03-2000	AT 269416 T	15-07-2004
		AU 5577899 A	14-03-2000
		CA 2341483 A1	02-03-2000
		DE 69918130 D1	22-07-2004
		DE 69918130 T2	07-07-2005
		EP 1108062 A1	20-06-2001
		JP 2002523064 T	30-07-2002
		US 6306643 B1	23-10-2001
		US 2002106663 A1	08-08-2002
WO 03087774 A	23-10-2003	AU 2003224978 A1	27-10-2003
		EP 1497447 A2	19-01-2005
		JP 2005522224 T	28-07-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/008150

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STEWARD GRIEG F ET AL: "Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 70, Nr. 3, März 2004 (2004-03), Seiten 1455-1465, XP002352142 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1-6,9, 15-17, 19-29
X	COLEBATCH GILLIAN ET AL: "Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, Bd. 15, Nr. 5, Mai 2002 (2002-05), Seiten 411-420, XP002352143 ISSN: 0894-0282 das ganze Dokument	1-6,9, 10, 13-17, 19,20, 22-25

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
2. November 2005	10/11/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Cornelis, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 102 46 824 A1 (AXARON BIOSCIENCE AG) 22. April 2004 (2004-04-22) das ganze Dokument	1-18, 24-26
X	WO 99/51772 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC) 14. Oktober 1999 (1999-10-14) das ganze Dokument	1-20, 22-26
X	JENKINS BETHANY D ET AL: "Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 70, Nr. 3, März 2004 (2004-03), Seiten 1767-1776, XP002352172 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1
X	WO 00/11223 A (AFFYMETRIX, INC; GENTALEN, ERIK; CHEE, MARK) 2. März 2000 (2000-03-02) das ganze Dokument	1
X	WO 03/087774 A (CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI; HUANG, TIM, HUI-MING; SHI, HUI) 23. Oktober 2003 (2003-10-23) das ganze Dokument	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/008150

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10246824 A1	22-04-2004	AU 2003273960 A1	04-05-2004
		WO 2004033721 A2	22-04-2004
WO 9951772 A	14-10-1999	CA 2335447 A1	14-10-1999
		EP 1075542 A1	14-02-2001
		US 6004755 A	21-12-1999
WO 0011223 A	02-03-2000	AT 269416 T	15-07-2004
		AU 5577899 A	14-03-2000
		CA 2341483 A1	02-03-2000
		DE 69918130 D1	22-07-2004
		DE 69918130 T2	07-07-2005
		EP 1108062 A1	20-06-2001
		JP 2002523064 T	30-07-2002
		US 6306643 B1	23-10-2001
		US 2002106663 A1	08-08-2002
WO 03087774 A	23-10-2003	AU 2003224978 A1	27-10-2003
		EP 1497447 A2	19-01-2005
		JP 2005522224 T	28-07-2005