



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 33 755 T2** 2007.09.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 049 809 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 33 755.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/00323**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 907 386.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/037804**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.01.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.07.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.09.2007**

(30) Unionspriorität:
98200184 **23.01.1998** **EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
bioMérieux B.V., Boxtel, NL

(72) Erfinder:
**OUDSHOORN, Pieter, NL-5271 JH St.
Michielsgestel, NL; KLATSER, Paul, NL-1011 ED
Amsterdam, NL**

(74) Vertreter:
**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(54) Bezeichnung: **EF-TU MRNA ALS MARKER FÜR LEBENSFÄHIGE BAKTERIEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Detektion von Bakterien, wie Mycobakterien, in menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Sputum und Urin. Die vorliegende Erfindung sieht ein Verfahren zur Überprüfung der Lebensfähigkeit von Bakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis*, ohne die Notwendigkeit für eine Vermehrung der Bakterien vor.

[0002] Tuberkulose (TB), welche vom *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird, ist zum Beispiel ein haupttragiges öffentliches Gesundheitsproblem in vielen Ländern weltweit, mit besonderer Bedeutung in Entwicklungsländern. Tuberkulose-Bekämpfungsprogramme stehen einer gesteigerten Belastung mit Fällen, einer Verschiebung zu diagnostisch schwierigeren Kategorien von Patienten, wie extrapulmonären und schmier-negativen Fällen, und dem Aufkommen von Mehrfach-Arzneimittel-resistenten Stämmen von *M. tuberculosis* gegenüber. Eine verbesserte Diagnose wäre ein wertvoller Beitrag im Kampf, diesen globalen Notstand für die öffentliche Gesundheit zu beheben.

[0003] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung beschäftigt sich mit der Amplifikation bzw. Verstärkung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen.

[0004] Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen sind vielversprechend, um die Zeit für die Diagnose von Wochen auf Stunden zu reduzieren, während die Empfindlichkeit und Spezifität der klassischen Verfahren über-troffen wird. Neben ihrem potenziellen Wert bei der Diagnose bieten Amplifikationsreaktionen die Möglichkeit einer raschen Identifikation und Arzneimittel Anfälligkeits-Bestimmung. Die Amplifikation von DNA-Zielmolekü-len zu einem detektierbaren Spiegel durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist das am besten analysierte System zum Nachweisen von Mycobakterien.

[0005] Die "Polymerase-Kettenreaktion" (PCR) wird in den Europäischen Patentanmeldungen EP 200362 und EP 201148 beschrieben. PCR ist ein zyklisches Verfahren, welches doppelsträngige DNA als Ziel hat. Je-der Zyklus im PCR-Verfahren beginnt mit der Trennung eines doppelsträngigen DNA-Ziels in seine zwei kom-plementären Stränge. An jeden Strang wird sich ein Primer anlagern, und vorhandene DNA-Polymerasen wer-den die Primer entlang des DNA-Strangs verlängern, an welchen er sich angelagert hat, wodurch zwei neue DNA-Doppelstränge gebildet werden. Wenn die Reaktionsmischung erwärmt wird, werden die Stränge der DNA-Doppelstränge bzw. -Duplexe erneut getrennt, und ein neuer PCR-Zyklus kann beginnen. Somit erzeugt das PCR-Verfahren mehrere DNA-Kopien eines DNA-Ziels. Eine Amplifikation unter Verwendung von PCR kann auch auf einer RNA-Matrize basieren. Zum Beispiel offenbart die WO 98/18958 mit einem Einreichungs-datum vor der vorliegenden Anmeldung, wobei sie jedoch danach veröffentlicht wurde, weshalb sie nur für die Neuheit und nicht für den erfinderischen Schritt der vorliegenden Anmeldung relevant ist, die Verwendung von PCR für die Amplifikation von mRNA, welche einen Elongationsfaktor codiert. Der eigentlichen PCR muss ein reverser Transkriptionsschritt vorausgehen, um die RNA in DNA zu kopieren (RT-PCR). Wenn allerdings RT-PCR für den Nachweis von Transkripten angewandt wird, ist eine Differenzierung von mRNA- und DNA-ab-geleiteten PCR-Produkten notwendig. Eine DNase-Behandlung vor der RT-PCR kann angewandt werden (Bitsch, A., et al., *J. Infect. Dis.* 167, 740-743, 1993; Meyer, T., et al., *Mol. Cell Probes*, 8, 261-271, 1994), ver-sagt aber manchmal darin, kontaminierende DNA ausreichend zu entfernen [Bitsch, A. et al., 1993].

[0006] Noch kürzlicher wurde eine andere Klasse von Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, nämlich die "Transkriptions-basierenden Amplifikationstechniken" entwickelt. Die Techniken beinhalten die Transkription von mehreren RNA-Kopien von einer Matrize aus, umfassend einen Promotor, der von einer RNA-Polymerase erkannt wird. Die Kopien werden als Eintrag für eine weitere Amplifikation verwendet. Derartige Verfahren sind beschrieben worden von Gingeras et al. in WO 88/10315 und Burg et al. in WO 89/1050. Isothermale Trans-kriptionsbasierende Amplifikationstechniken sind beschrieben worden von Davey et al. in EP 323822 (unter Bezug auf das NASBA-Verfahren), von Gingeras et al., in EP 373960, und von Kacian et al. in EP 408295 (das TMA-Verfahren). Transkriptions-basierende Amplifikationsreaktionen können auch mit thermostabilen Enzy-men durchgeführt werden. Ein derartiges thermostabiles Verfahren wird in der EP 682121 beschrieben, einge-reicht im Namen von Toyo Boseki KK.

[0007] Die isothermalen Transkriptions-basierenden Nukleinsäure-Amplifikationstechniken sind angewandt worden, um Mycobakterien nachzuweisen, wie etwa das NASBA-Verfahren [Vliet, G.M.E van der, Schukkink, R.A.F., Gemen, B. van, Schepers, P. und Klatser, P.R. (1993), *Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria*, *J. Gen. Microbiol.* 139, 2423-2429] und ein anderer Transkrip-tions-vermittelter RNA-Amplifikationstest (TMA) [Jonas, V., Alden, M.J., Curry, J.I., Kamisango, K., Knott, C.A., Lankford, R., Wolfe, J. und Moore, D.F. (1993), *Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis di-*

rectly from sputum sediments by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 31, 241], welche beide auf ribosomale 16S-RNA abzielten.

[0008] Auf die 16S-rRNA oder das dafür codierende Gen abzielende Amplifikationsreaktionen sind üblicherweise auf eine konservierte Region gerichtet, welche speziesspezifische variable Sequenzen umfasst [Vliet, G.M.E. van der, Schukkink, R.A.F., Gemen, B. van, Schepers, P. und Klatser, P.R. (1993) Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 139, 2423-2429, Jonas, V., Alden, M.J., Curry, J.I., Kamisango, K., Knott, C.A., Lankford, R., Wolfe, J. und Moore, D.F. (1993), Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of rRNA, J. Clin. Microbiol. 31, 241]. Sie besitzen den Vorteil, dass eine einzelne Amplifikationsreaktion die mycobakterielle Spezies identifizieren kann. Ein zusätzlicher Vorteil der Transkriptions-vermittelten RNA-Amplifikations-Assays, welche auf 16S-rRNA abzielten, besteht in der hohen Anzahl von Zielmolekülen pro Zelle – \pm 2000; dadurch wird die Empfindlichkeit begünstigt.

[0009] Da RNA, speziell mRNA, eine im Allgemeinen viel kürzere Halbwertszeit als DNA aufweist, kann ihre Detektion nützlich für die Einschätzung der Lebensfähigkeit von Mycobakterien sein [Moore, D.F., Curry, J.I., Knott, C.A. und Jonas, V. (1996), Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy. J. Clin. Microbiol. 34, 1745-1749., Vliet, G.M.E., van der, Schepers, P., Schukkink, R.A.F., Gemen, B. van und Klatser, P.R. (1994), Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1959-1965], welche relevant für die Probleme der Resistenz gegen Arzneimittel und der Ansteckungsgefahr durch den Patienten ist.

[0010] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Detektion von mRNA, welche den Elongationsfaktor EF-Tu codiert.

[0011] Der Elongationsfaktor EF-Tu ist essenziell in der (myco)bakteriellen Translation. Elongationsfaktoren spielen eine unterstützende Rolle im Elongationsschritt der Translation und sind somit ein Indikator der metabolischen Aktivität der Zelle. Für jede Translation wird EF-Tu erfordert. Die Menge an EF-Tu-Protein kann so hoch wie 50% ihres Gesamtproteingehalts in aktiven proliferierenden Zellen sein.

[0012] EF-Tu codierende Gensequenzen (DNA) sind als ein Marker verwendet worden, um die Gegenwart von bakteriellen Zellen zu detektieren.

[0013] In der EP 133288 wird ein Verfahren für den Nachweis von bakterieller DNA mit einer Sonde offenbart, umfassend eine Basensequenz von wenigstens einem Bereich von einem der Stränge eines tuf- oder fus-Gens. Southern-Blot-Hybridisierung der verdauten mycoplasmalen DNAs mit dem Elongationsfaktor (EF-Tu)-Gen tuf von E. coli wurde als Grundlage für den Nachweis von Polymorphismus in Mycoplasma-Stämmen verwendet [Yogev et al., FEMS Microbiol. Lett., 50(2-3), 145-9, 1988].

[0014] PCR-basierende Assays für die Detektion von Mycoplasma tuberculosis und Mycoplasma fermentans unter Verwendung des Gens, welches den Elongationsfaktor Tu codiert (tuf), als der Zielsequenz, sind ebenfalls beschrieben worden [Berg et al., Mol.Cell.Probes, 10(1), 7-14, 1996, und Luneberg et al., J.Clin.Microbiol., 31(5), 1088-94, 1993].

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft jedoch die Detektion von EF-Tu-mRNA als einem Marker für bakterielle Lebensfähigkeit.

[0016] Die vorliegende Erfindung sieht daher ein Verfahren für die Überprüfung der bakteriellen Lebensfähigkeit vor, wobei mRNA, codierend für den Elongationsfaktor EF-Tu, als ein Ziel in einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion verwendet wird, und die Gegenwart und/oder Menge der mRNA bestimmt wird.

[0017] Die vermutlich kurzlebige mRNA, codierend den EF-Tu, ist am wahrscheinlichsten in starkem Maße häufig in der (myco)bakteriellen Zelle, und eine Verringerung davon wird ein Absinken der metabolischen Aktivität anzeigen. Wegen der essentiellen Rolle von EF-Tu ist es darüber hinaus plausibel, anzunehmen, dass es in allen mycobakteriellen Spezies vorhanden ist, was die Entwicklung eines allgemeinen Amplifikationssystems mit speziesspezifischen Primern und/oder Sonden, analog zum 16S-rRNA-NASBA-Design [Vliet, G.M.E. van der, Schukkink, R.A.F., Gemen, B. van, Schepers, P. und Klatser, P.R. (1993), Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria, J. Gen. Microbiol. 139, 2423-2429] gestattet.

[0018] Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wird eine Transkriptions-basierende Amplifikationstechnik, wie NASBA, für die Amplifikation der bakteriellen EF-Tu-mRNA verwendet. Im Gegensatz zu RT-PCR benötigt NASBA, welche auf RNA-Transkription durch T7-RNA-Polymerase basiert (Kievits et al., 1991; Comp-ton, 1991), keine Differenzierung zwischen RNA- und DNA-abgeleiteten Amplifikationsprodukten, da sie RNA als ihr Hauptziel verwendet.

[0019] Die amplifizierten Produkte können unter Verwendung einer komplementären markierten Sonde detektiert werden.

[0020] Zahlreiche Protokolle sind für die Detektion von amplifizierten Produkten beschrieben worden [Klatser, PR. (1995), Amplification reactions in mycobacteriology. J. Microbiol. Meth. 23, 75-87.]. Vorzugsweise werden homogene Assays verwendet, weil sie gestatten werden, dass die Amplifikationsreaktion verschlossen werden kann, bevor die Amplifikation initiiert wird. Ein derartiges System, Elektrochemolumineszenz (ECL), ist bereits erfolgreich angewandt worden, um amplifizierte Produkte in NASBA zu detektieren [Gemen, B. van, Beuningen, R. van, Nabbe, A., Strijp, D. van, Jurriaans, S., Lens, P., Kievits, T. (1994), A one-tube quantitative HIV-I RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. J. Virol. Methods, 49, 157-167.].

[0021] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist besonders nützlich zur Überprüfung der Lebensfähigkeit von Mycobacteria-Spezien, wie *M. tuberculosis* oder *M. leprae*.

[0022] Mit der vorliegenden Erfindung werden auch Oligonukleotide bereitgestellt, welche als Primer und Sonden für die Amplifikation von bakterieller EF-Tu-mRNA verwendet werden können.

[0023] Die Verwendung der Oligonukleotide gemäß der Erfindung ist nicht auf irgendeine besondere Amplifikationstechnik oder irgendeine besondere Modifikation davon eingeschränkt. Es ist offensichtlich, dass die Oligonukleotide gemäß der Erfindung ihre Anwendung in vielen verschiedenen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken und verschiedenen Verfahren zum Detektieren des Vorhandenseins von (amplifizierter) bakterieller EF-Tu-mRNA finden. Die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können gleichermaßen in quantitativen Amplifikationsverfahren verwendet werden. Ein Beispiel eines solchen quantitativen Verfahrens wird in EP 525882 beschrieben.

[0024] Der Begriff "Oligonukleotid", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Molekül, welches aus zwei oder mehr Desoxyribonukleotiden oder Ribonukleotiden aufgebaut ist. Derartige Oligonukleotide können als Primer und Sonden verwendet werden.

[0025] Selbstverständlich, basierend auf den Sequenzen der Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung, können Analoge von Oligonukleotiden ebenfalls hergestellt werden. Derartige Analoge können alternative Strukturen bilden, wie "PNA" (Moleküle mit einem peptid-ähnlichen Grundgerüst anstatt des Phosphatzuckergrundgerüsts von normaler Nukleinsäure) oder dergleichen. Es ist offensichtlich, dass diese alternativen Strukturen, welche die Sequenzen der vorliegenden Erfindung repräsentieren, gleichermaßen Teil der vorliegenden Erfindung sind.

[0026] Der Begriff "Primer", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches entweder natürlich vorkommt (z. B. als ein Restriktionsfragment) oder synthetisch hergestellt ist, welches fähig ist, als ein Initiationspunkt der Synthese eines Primerverlängerungsprodukts zu wirken, welches komplementär zu einem Nukleinsäurestrang (Matrizen- oder Zielsequenz) ist, bei Einbringung unter geeigneten Bedingungen (z. B. Puffer, Salz, Temperatur und pH) in Gegenwart von Nukleotiden und einem Agens zur Nukleinsäure-Polymerisation, wie DNA-abhängiger oder RNA-abhängiger Polymerase. Ein Primer muss ausreichend lang sein, um die Synthese von Verlängerungsprodukten in Gegenwart eines Agens zur Polymerisation zu primen. Ein typischer Primer enthält eine mindestens etwa 10 Nukleotide lange Sequenz, welche im Wesentlichen komplementär oder homolog zu der Zielsequenz ist, aber etwas längere Primer werden bevorzugt. Üblicherweise enthalten Primer etwa 15-26 Nukleotide, aber längere Primer können ebenfalls verwendet werden, speziell wenn die Primer zusätzliche Sequenzen enthalten, wie eine Promotorsequenz für eine besondere Polymerase.

[0027] Normalerweise wird ein Satz von Primern aus mindestens zwei Primern bestehen, einem "Stromaufwärts"- und "Stromabwärts"-Primer, welche zusammen das "Amplifikat" definieren (die Sequenz, welche unter Verwendung der Primer amplifiziert werden wird).

[0028] Vorwiegend für die Verwendung in Transkriptions-basierenden Amplifikationstechniken können die

Oligonukleotide gemäß der Erfindung auch an eine Promotorsequenz verknüpft sein. Der Begriff "Promotorsequenz" definiert eine Region einer Nukleinsäuresequenz, welche spezifisch von einer RNA-Polymerase erkannt wird, welche an eine erkannte Sequenz bindet und den Vorgang der Transkription initiiert, durch welchen ein RNA-Transkript hergestellt wird. Im Prinzip kann jedwede Promotorsequenz verwendet werden, für welche es eine bekannte und verfügbare Polymerase gibt, die in der Lage zur Erkennung der Initiationssequenz ist. Bekannte und nützliche Promotoren sind diejenigen, welche von gewissen Bakteriophagen-RNA-Polymerasen erkannt werden, wie Bakteriophage T3, T7 oder SP6. Oligonukleotide, welche an eine Promotorsequenz verknüpft sind, werden üblicherweise als "Promotor-Primer" bezeichnet.

[0029] Oligonukleotide gemäß der Erfindung sind im Wesentlichen komplementär zu einer Sequenz einer bakteriellen EF-Tu-mRNA-Sequenz, wobei das Oligonukleotid 10-50 Nukleotide lang ist und mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide von einer der Sequenzen umfasst, abgebildet in SEQ. ID. 1-8, oder die komplementäre Sequenz davon.

[0030] Oligonukleotide, umfassend (einen Teil von) SEQ. ID's 1 und 2 sind gezeigtermaßen geeignet für die Amplifikation von EF-Tu-mRNA-Sequenzen von *M. tuberculosis*. In dem Fall, dass die Amplifikation mit einer Transkriptions-basierenden Amplifikationstechnik ausgeführt wird, kann eines der Oligonukleotide ebenfalls eine Promotorsequenz umfassen. Selbstverständlich stellen derartige "Promotor-Oligonukleotide" gleichermaßen das Gebiet der Erfindung dar. In der Sequenz, wie abgebildet in SEQ. ID. 9, ist der T7-Promotor an die Sequenz verknüpft worden, wie abgebildet in SEQ. ID. 1. Im experimentellen Teil dieser Anmeldung sind diese Sequenzen angegeben als TUF15 (SEQ. ID. 9) und TUF 18 (SEQ. ID. 2).

[0031] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Paar von Oligonukleotiden für die Amplifikation von aus *M. leprae* abgeleiteten EF-Tu-Sequenzen bereit. Dieses Paar besteht aus einem Oligonukleotid, umfassend mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide der Sequenz, wie abgebildet in SEQ. ID. 3, bzw. ein Oligonukleotid, umfassend mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide der Sequenz, wie abgebildet in SEQ. ID. 4.

[0032] Erneut kann, zur Verwendung in Transkription-basierenden Verfahren, eines der Oligonukleotide an eine Promotorsequenz verknüpft sein, und ein Oligonukleotid, welches mit der T7-Promotorsequenz ausgestattet ist, ist in der SEQ. ID. 10 abgebildet. Im experimentellen Teil der Anmeldung wird auf ein derartiges Paar Bezug genommen als TUF 20 (SEQ. ID. 10) und TUF 22 (SEQ. ID. 4).

[0033] Die vorliegende Erfindung sieht ferner ein Paar von Oligonukleotiden vor, welche geeignet für die Amplifikation von aus *E. coli* abgeleiteten EF-Tu-Sequenzen sind.

[0034] Dieses Paar besteht aus einem Oligonukleotid, umfassend mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide der Sequenz, wie dargestellt in SEQ. ID. 5, bzw. einem Oligonukleotid, umfassend mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide der Sequenz, wie abgebildet in SEQ. ID. 6.

[0035] Erneut kann, zur Verwendung in Transkriptions-basierenden Verfahren, eines der Oligonukleotide an eine Promotorsequenz verknüpft sein, und ein Oligonukleotid, welches mit der T7-Promotor-Sequenz ausgestattet ist, ist in SEQ. ID. 11 abgebildet. Im experimentellen Teil der Anmeldung wird auf ein derartiges Paar Bezug genommen als TUF 27 (SEQ. ID. 11) und TUF 28 (SEQ. ID. 6).

[0036] Diese Oligonukleotide sind daher speziell nützlich bei der Überprüfung der Lebensfähigkeit von *M. tuberculosis*, *M. leprae* oder *E. coli*.

[0037] Es versteht sich, dass Oligonukleotide, bestehend aus den Sequenzen der vorliegenden Erfindung, kleinere Deletionen, Additionen und/oder Substitutionen von Nukleinsäurebasen enthalten können, in dem Ausmaß, dass derartige Änderungen den Ertrag oder das erhaltene Produkt nicht in einem signifikanten Ausmaß beeinflussen. Falls Oligonukleotide gemäß der vorliegenden Erfindung als Sonden verwendet werden, sollten die Änderungen nicht zu einer Senkung der Hybridisierungseffizienz der Sonde führen.

[0038] Im Falle von Transkriptions-basierenden Amplifikationstechniken zum Beispiel, worin einer oder mehrere der Primer mit einer Promotorsequenz ausgestattet sein können, kann die Einführung einer purinreichen (= G oder A) hybridisierenden Sequenz, direkt nach der Promotorsequenz, positive Auswirkungen auf die Transkription haben (wenn es zum Auftreten einer durch C's und T's abbrechenden Transkription kommen kann). Wenn keine derartige Sequenz in der Ziel-Nukleinsäure verfügbar ist, kann eine purinreiche Sequenz in das Oligonukleotid inseriert werden, direkt nachfolgend auf die letzten drei G-Reste der Promotorsequenz.

[0039] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung werden als DNA-Sequenzen wiedergegeben. Die RNA-Äquivalente dieser Sequenzen sind gleichermaßen Teil der vorliegenden Erfindung.

[0040] Ein Teil der Oligonukleotide gemäß der Erfindung sind besonders geeignet zur Verwendung als eine Sonde im Nachweis von Nukleinsäure, amplifiziert mit einem Paar von Oligonukleotiden gemäß der Erfindung. Bei der Verwendung als eine Sonde, können die Oligonukleotide mit einer nachweisbaren Markierung ausgestattet sein. Verschiedene Markierungs-Einheiten sind im Fachgebiet bekannt. Die Einheit kann beispielsweise entweder eine radioaktive Verbindung, ein nachweisbares Enzym (z. B. Meerrettichperoxidase (HRP)), ein Hapten, wie Biotin, oder jedwede andere Einheit sein, die zur Erzeugung eines nachweisbaren Signals, wie eines kolorimetrischen, fluoreszierenden, chemolumineszenten oder elektrochemolumineszenten Signals, in der Lage ist.

[0041] Hybride zwischen Oligonukleotiden gemäß der Erfindung und (amplifizierter) Zielnukleinsäure können ebenfalls durch andere dem Fachmann auf dem Gebiet bekannte Verfahren detektiert werden. Oligonukleotide gemäß der Erfindung, welche speziell geeignet als eine Sonde für die Detektion von mycobakteriellen EF-Tu-Sequenzen sind, bestehen im Wesentlichen aus den Sequenzen, wie abgebildet in SEQ. ID. 7 und 8 (Im experimentellen Teil sind die Sequenzen als TUF 25 bzw. TUF 26 abgebildet.).

[0042] Zusammen können diese Sonden in einem Sandwich-Hybridisierungs-Assay verwendet werden, wobei eine als eine Einfangssonde verwendet werden kann, und die andere mit einer nachweisbaren Markierung markiert sein kann.

[0043] Ein Test-Kit für den Nachweis von mycobakterieller EF-Tu-mRNA in einer Probe ist gleichermaßen Teil der vorliegenden Erfindung. Ein derartiger Kit kann Folgendes umfassen: ein Paar von Oligonukleotiden gemäß der Erfindung und mindestens ein Oligonukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, welche im wesentlichen komplementär zu mindestens einem Teil der amplifizierten Nukleinsäuresequenz ist, ausgestattet mit einer nachweisbaren Markierung, sowie geeignete Amplifikations-Reagenzien.

[0044] Diese Reagenzien sind zum Beispiel die geeigneten Enzyme zum Ausführen der Amplifikationsreaktion. Ein Kit, angepasst zur Verwendung mit NASBA kann zum Beispiel geeignete Mengen an reverser Transkriptase, RNase H und T7-RqNA-Polymerase enthalten. Die Enzyme können in dem Kit in einer gepufferten Lösung vorhanden sein, können aber gleichermaßen als eine lyophilisierte Zusammensetzung bereitgestellt werden, zum Beispiel ein lyophilisiertes sphärisches Teilchen. Derartige lyophilisierten Teilchen sind in der PCT-Anmeldung Nr. WO 95/27721 offenbart worden. Der Kit kann ferner mit Pufferzusammensetzungen ausgestattet sein, die geeignet zur Durchführung einer Amplifikationsreaktion sind. Die Puffer können für die jeweilige Amplifikationstechnik optimiert sein, für welche der Kit beabsichtigt ist, sowie für die Verwendung mit den besonderen Oligonukleotiden, welche mit dem Kit geliefert werden. In Transkriptions-basierenden Amplifikationstechniken, wie NASBA, können die Puffer beispielsweise DMSO enthalten, welches die Amplifikationsreaktion verstärkt (wie offenbart in der PCT-Anmeldung Nr. WO 91/02818).

[0045] Darüber hinaus kann der Kit mit einer internen Kontrolle als eine Überprüfung hinsichtlich des Amplifikationsvorgehens und zur Vermeidung des Auftretens von falschen negativen Testergebnissen, auf Grund von Fehlschlägen in der Amplifikations-Vorgehensweise ausgestattet sein. Die Verwendung von internen Kontrollen in Transkriptions-basierenden Amplifikationstechniken wird beschrieben in der PCT-Anmeldung Nr. WO 94/04706. Eine optimale Kontrollsequenz wird in einer derartigen Weise ausgewählt, dass sie nicht mit der Zielnukleinsäure in der Amplifikationsreaktion kompetieren wird. Kits können des Weiteren Reagenzien für die Isolierung von Nukleinsäure aus einer biologischen Probe, vor der Amplifikation, enthalten. Ein geeignetes Verfahren für die Isolierung von Nukleinsäure wird in EP 389063 offenbart.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN:

[0046] [Fig. 1a](#): Die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von in vitro hergestellter mycobakterieller EF-Tu-RNA.

[0047] [Fig. 1b](#): Die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von in vitro hergestellter mycobakterieller EF-Tu-RNA.

[0048] [Fig. 2](#): Spezifität der M. tuberculosis-NASBA.

[0049] [Fig. 3](#): Spezifität der *M. leprae*-NASBA.

[0050] [Fig. 4](#): NASBA hinsichtlich Lebensfähigkeits-Überprüfung.

BEISPIELE:

Beispiel 1:

Auswahl von Primern und Sonden für die Amplifikation von EF-Tu-mRNA von *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *E. coli*:

[0051] Quellen von RNA. Die Tabelle 1 zeigt die Quellen von RNAs, welche in den Experimenten verwendet wurden, die in diesem und den folgenden Beispielen beschrieben werden. Die kultivierbaren Mycobakterien wurden auf Löwenstein-Jensen-Schräg-Medien 2-3 Wochen lang wachsen gelassen. *M. leprae* wurde aus Milzgewebe eines experimentell infizierten Gürteltiers (*Dasyus novemcinctus* Linn.) isoliert, wie empfohlen von der World Health Organization bzw. Weltgesundheitsorganisation [WHO Expert Committee on Leprosy. (1988) Sixth Report Tech. Rep. Ser. 8. 768. World Health Organization, Genf]. Andere Bakterien, welche in humanen und/oder tierischen Proben gefunden werden könnten oder welche nah verwandt sind zu Mycobakterien (siehe Tabelle 1), wurden als Kontrollen verwendet. Für *Actinomyces israelii* wurden lyophilisierte Bakterien verwendet. Die für die Herstellung von in-vitro-RNA verwendeten Stämme werden nachstehend beschrieben.

Tabelle 1. Quellen von RNA und Spezifität von NASBA

	Spezies	Stamm/ Quelle	Ursprung	ECL-Signal M. tuberculosis- Primer		ECL-Signal M. leprae- Primer	
1.	<i>Mycobacterium africanum</i>	myc 5544	RIVM	20810	+	2065	-
2.	<i>Mycobacterium avium</i>	3875 (Serovar 2)	RIVM	1523 1344	-	1031 1217	-
3.	<i>Mycobacterium bovis</i>	8316	RIVM	1E+08 2109782	+	970 1006	-
4.	<i>Mycobacterium bovis</i>	ATCC 19210	RIVM	36497 246050	+	1864	-
5.	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	ATCC 35733	SSI	117186 472834	+	1089 1069	-
6.	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	WGMT3 (Serovar 4)	RIVM	1322 1310	-	920 1052	-
7.	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1012	RIVM	1418 1341	-	1080 1135	-
8.	<i>Mycobacterium leprae</i>	Armadillo-Isolat	KIT	1001 3592	-	1543836 1E+08	+
9.	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	138601-24	CDI	1146 1125	-	851 1019	-

	Spezies	Stamm/ Quelle	Ursprung	ECL-Signal M. tuberculosis- Primer		ECL-Signal M. leprae- Primer	
10.	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	3442	RIVM	1143 1167	-	870 1097	-
11.	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 14468	RIVM	1385 1289	-	954 1058	-
12.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4514	RIVM	401796 24398	+	902 1914	-
13.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37RV	RIVM	144983	+	2051	-
14.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M. tub 193	KIT	1417077	+	501	-
15.	<i>Actinomyces israelii</i>	103.62	CBS	886 1104	-	972 1974	-
16.	<i>Corynebacterium belfanti</i>	klinisches Isolat	AMC	1048 1029	-	966 1818	-
17.	<i>Corynebacterium J.K.</i>	klinisches Isolat	AMC	1108 1113	-	966 2082	-
18.	<i>Escherichia coli</i>	klinisches Isolat	AMC	1129 1062	-	884 2219	-
18a.	<i>Escherichia coli</i>	INVaF	Invitrogen (K2000-01)	NT		NT	

	Spezies	Stamm/ Quelle	Ursprung	ECL-Signal M. tuberculosis- Primer		ECL-Signal M. leprae- Primer	
19.	<i>Haemophilus influenza</i>	klinisches Isolat	AMC	1097 1113	-	1042 2085	-
20.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinisches Isolat	AMC	1137 1117	-	1022 1957	-
21.	<i>Legionella pneumophila</i>	klinisches Isolat	AMC	1017 954	-	989 1914	-
22.	<i>Nocardia asteroides</i>	klinisches Isolat	AMC	970 1037	-	1239 2079	-
23.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	klinisches Isolat	AMC	981 937	-	955 1757	-
24.	<i>Staphylococcus aureus</i>	klinisches Isolat	AMC	932 1006	-	967 2214	-
25.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	klinisches Isolat	AMC	909 985	-	977 2081	-
26.	<i>Homo sapiens</i>	Placenta	AMC	1041	-	2073	-
27.	<i>Homo sapiens</i>	Placenta Charge Nr. BD 41091901	Pharmacia	991	-	1986	-

	Spezies	Stamm/ Quelle	Ursprung	ECL-Signal M. tuberculosis- Primer		ECL-Signal M. leprae- Primer	
28.	In Vitro RNA 1054 Mycobacterium tuberculosis H37RV	764 bp in PCR-II- Vektor pTHT 1054 (Plasmid) S1418 (Stamm INVaF')	KIT	409019 1E+08	+	2088 809	-
29.	In Vitro RNA 1055 Mycobacterium leprae Amadillo-Isolat	764 bp in PCR-II- Vektor pTHT 1055 (Plasmid) S1419 (Stamm INVaF')	KIT	992 764	-	1431525 624966	+
30.	In Vitro RNA 1057 Escherichia coli klinisches Isolat	764 bp in PCR-II- Vektor pTHT 1057 (Plasmid) S1420 (Stamm INVaF')	KIT	986 984	-	1896 776	-
31.	Wasser, gereinigt gemäß Boom et al. 1991 [9]		Baker	1194 960	-	1136 2062	-
32.	Wasser		Baker	995 678	-	2256 612	-

AMC = Academic Medical Centre, Amsterdam, Niederlande; CBS = Netherlands Culture Collections of Micro-Organisms, Baarn, Niederlande; CDI = Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande; KIT = Royal Tropical Institute, Amsterdam, Niederlande; RIVM = National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Niederlande; SSI = Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark; ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, USA.

[0052] Nukleinsäure (NA)-Isolierung. Um die beschriebenen Experimente durchzuführen, wurden in allen Beispielen Nukleinsäuren isoliert, wie wir es früher beschrieben haben [Vliet, G.M.E. van der, Schepers, P., Schukink, R.A.F., Gemen, B. van, und Klatser, P.R. (1994), Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1959-1965.]. Zusammengefasst wurden alle Bakterienstämme auf das Trübungs-Äquivalent von Nr. 4 gemäß des McFarland'schen Bariumsulfat-Nephelometer-Standard eingestellt, wie früher beschrieben [Verstijnen, C. P. H. J., H. M. Ly, K. Polman, C. Richter, S. P. Smits, S. Y. Maselle, P. Peerbooms, D. Rienhong, N. Montrewasuwat, S. Koanjanart, D. D. Trach, S. Kuijper, und A. H. J. Kolk (1991), Enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies for identification of mycobacteria from early cultures. J. Clin. Microbiol. 29, 1372-1375]. Fünfzig µl der verdünnten Proben enthielten ungefähr 10^5 lebensfähige Mycobakterien, wie es bestimmt wurde durch Zählen der Anzahl von kolonie-bildenden Einheiten (nicht ausgeführt für M. leprae). Dieses Volumen wurde für Lysis und NA-Isolation gemäß des "Protokoll Y/SC", beschrieben von Boom et al. (1990) [Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen und J. Van der Noordaa (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.] verwendet. Die NA bzw. Nukleinsäuren wurden von dem Siliciumdioxid mit 50 µl oder 100 µl RNAse-freiem H₂O eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

[0053] Humane plazentale NA wurden in einer ähnlichen Weise isoliert (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. H. Smits, Abteilung für Virologie, Academic Medical Hospital, Amsterdam, Niederlande). Zwei µl, enthaltend 270 ng NA, wurden getestet. Diese Menge entspricht ungefähr 4×10^5 diploiden humanen Zellen. Eine andere Charge von humanen NA wurde kommerziell von Pharmacia (Uppsala, Schweden) erhalten.

Beispiel 2:

Empfindlichkeit und Spezifität von NASBA bei der Amplifikation von EF-Tu-mRNA von M. tuberculosis, M. leprae und E. coli:

[0054] Auswahl von Primern und Sonden. Die in dieser Untersuchung verwendeten Primer und Sonden sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Primer und Sonden

Primer/ Sonde	Ursprung	Position	Sequenz (5'-3')
TUF 4	MTTUF	1302-1284	GTR CGG AAG TAG AAC TGC G
TUF 7	MTTUF	539-560	GAC IIC CCI GGI CAC GCC GAC T
TUF 3F	MTTUF	917-936	Fluorescein-GAC AAG CCG TTC CTG MTG CC
TUF 4F	MTTUF	1302-1284	Fluorescein-GTR CGG AAG TAG AAC TGC G
TUF 8F	MTTUF	936-917	Fluorescein-GGC AKC AGG AAC GGC TTG TC
TUF 15	MTTUF	1057-1039	aat tct aat acg act cac tat agg gAG AGC TTG GTG GTC GAT GGG CGA
TUF 18	MTTUF	855-875	CCT CTG TCG AGG AAC TGA TGA
TUF 20	MLTUF	977-958	aat tct aat acg act cac tal agg gAG AGG GTC GTC TGA CGA ATG CCG A
TUF 22	MLTUF	781-801	AGT CTG TCA CAC AGT TGA TGG
TUF 24	MLTUF MTTUF	862-843 936-917	Digoxigenin-GGC ATC AGG AAC GGC TTG TC
TUF 25	MLTUF MTTUF	920-937 994-1011	Biotin-GCG CGG CGT <u>GGT</u> CAA CGT [®]
TUF 26	MLTUF MTTUF	940-957 1014-1031	Ruthenium-ACG AGG AAG TTG AGA TCG
TUF 27	ECTUF	756-737	aat tct aat acg act cac tat agg gAG AGC TGA GTC TCT TTG ATA CCA A
TUF 28	ECTUF	560-580	CGA AAA TCC TGG AAC TGG CTG
TUF 29	ECTUF	899-716	Biotin-ACG CGG TAT CAT CAA AGT
TUF 30	ECTUF	719-736	Ruthenium-GTG AAG AAG TTG AAA TCG

Abkürzungen:

ECTUF = E. coli EF-Tu-Gensequenz (GenBank-Zugangsnummer J01717)

MTTUF = M. tuberculosis EF-Tu-Gensequenz (GenBank-Zugangsnummer X63539)

MLTUF = M. leprae-EF-Tu-Gensequenz (GenBank-Zugangsnummer D13869)

I = Inosin, M = [A,C], K = [G,T], R = [A,G]

[®] Die gezeigte Sequenz ist homolog zu MLTUF und nicht zu MTTUF (worin das unterstrichene G ein A ist)

TUF 15, 20 und 27 schließen die T7-Promotor-Sequenz ein, welche in klein gedruckten Buchstaben gezeigt ist. Der Promotor-Sequenz folgt eine purinreiche Region (AGAG), welche im Kursivdruck dargestellt ist.

[0055] Die veröffentlichten Nukleotidsequenzen der EF-Tu-Gene von M. tuberculosis (GenBank-Zugangsnummer X63539), M. leprae (GenBank-Zugangsnummer D13869), E. coli (GenBank-Zugangsnummer J01717), Micrococcus luteus (GenBank-Zugangsnummer M17788) und Streptomyces coelicolor (GenBank-Zugangsnummer X77039) wurden unter Verwendung des Software-Programms GCG (National Institute of Health, USA), welches auf der entsprechenden Hardware installiert war, aligniert. Degenerative Primer TUF4 und TUF7 (Tabelle 2) wurden ausgewählt, um ein 764 bp großes DNA-Fragment der EF-Tu-Gene mittels PCR aus allen Organismen, welche in der Tabelle 1 aufgelistet sind, zu amplifizieren. PCR wurde durchgeführt unter Verwendung von 75 mM Tris-HCl, pH 9,0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20, 4 mM MgCl₂, 0,2 mM jedes dNTP, 125 ng jedes Primers und 1 U/Reaktion von Goldstar-DNA-Polymerase (Eurogentec, Belgien). Die PCR wurde durch Inkubation bei 94°C während 3 Minuten initiiert, gefolgt von 35 Zyklen von 1,15 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 2 min bei 72°C. Die erzeugten PCR-Fragmente der DNA der in Tabelle 1 aufgelisteten Organismen, außer C.belfanti, H.influenza, S.aureus, S.pneumoniae und H. sapiens, wurden gereinigt unter Verwendung einer MicroSpin™ Sephacryl™ 300-HR-Säule (Pharmacia), um einen Überschuss an Primern zu entfernen. Die gereinigten Fragmente wurden direkt unter Verwendung der Primer TUF 3F, 4F und 8F sequenziert, durch Anwendung des "Autocycle Sequencing Kit" (Pharmacia) und des automatischen A.L.F.-DNA-Sequenzierers (Pharmacia). Sequenzen wurden unter Verwendung des DNASIS™-Software-Programms (Pharmacia) editiert, und Cluster-Alignierungen wurden dann unter Verwendung des Software-Programms PCGene erstellt.

[0056] Auswahl von Primern und Sonden. Die Tabelle 3 zeigt die sieben variablen Regionen der EF-Tu-Sequenzen, welche basierend auf den Cluster-Alignierungen definiert wurden. Aus diesen variablen Regionen ist es möglich, Primer und Sonden auszuwählen, welche den speziesspezifischen Nachweis von EF-Tu-mRNA von unterschiedlichen Organismen ermöglichen (Tabelle 4).

[0057] Tabelle 5 zeigt die Cluster-Alignierungen von zwei (Region IV und VI) der sieben variablen Regionen der EF-Tu-Sequenz, auf deren Grundlage die Primer und Sonden für die spezifische Amplifikation von EF-Tu-mRNA von *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *E. coli* mittels NASBA ausgewählt wurden. Die Kriterien, um diese zwei Areale auszuwählen waren die Folgenden: die Verfügbarkeit von speziesspezifischen Primern, einer gattungsspezifischen Sonde und eine Länge von ± 200 Nukleotiden des zu amplifizierenden Fragments.

Tabelle 3. Sieben variable Regionen auf den EF-Tu-Sequenzen

Variable Region	Position auf der EF-Tu-Sequenz (in bp) von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> AC X63539
I.	673-703
II.	774-793
III.	820-823
IV.	852-871
V.	955-970
VI.	1039-1051
VII.	1123-1142

Tabelle 4.

[0058] Teile der variablen Sequenzen von EF-Tu-mRNA, welche für die Auswahl von Primern und/oder Sonden verwendet werden können, unter Ermöglichung eines speziesspezifischen Nachweises von EF-Tu-mRNA aus unterschiedlichen Organismen.

Region	Sequenz	Spezifisch für
I.	AGTGGGTGTGCCCTACATCCTGGTAGCGCTG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex
	GGTGGGTGTACCTTACATCCTGGTCGCACTT	<i>Mycobacterium leprae</i>
	GGTCGGTGTGCCCTACATCCTGGTCGCGCTG	<i>Mycobacterium avium</i> und <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
	GGTCGGCGTGCCGGCCCTGCTCGTGCCCTG	<i>Micrococcus luteus</i>
	GGTCGGCGTTCCTTACATCGTGGTCGCCCTG	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	GGTTGGCGTTCCTTACATCCTCGTTGCTCTT	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	GGTTGGCGTTCCTTACATCCTGGTTGCACTG	<i>Corynebacterium J.K.</i>
	GGTAGGCGTTCCTTACATCCTCGTTGCTCTG	<i>Escherichia coli</i> , <i>Nocardia asteroides</i> und <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	GGTAGGCGTTCCTTACATCCTCGTTGCTCTG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
II.	CTGCCAGGAATTCGACGAG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex und <i>Mycobacterium leprae</i>
	CCGCCAGGAGTTCGACGAG	<i>Mycobacterium avium</i> und <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>

Region	Sequenz	Spezifisch für
	CCGCCAGGAGTTC	Mycobacterium intracellulare
	TCTCAGTACGACTTCCCAGGC	Escherichia coli
	TCTCAGTACGATTCCCAGGC	Nocardia asteroides und Klebsiella pneumoniae
	CCTCCAGGAGCTTCGACGTC	Micrococcus luteus
	CTCCGAGTACGAGTCCCAGGC	Streptomyces coelicolor
	CTGAGCAGGACTACGAC	Corynebacterium glutamicum
	AACACCTACGACTCCCAGGC	Pseudomonas aeruginosa
III.	GCTC	Mycobacterium tuberculosis-Komplex, Mycobacterium avium, Mycobacterium paratuberculosis und Mycobacterium intracellulare
	ATTG	Mycobacterium leprae
	TCTG	Micrococcus luteus, Streptomyces coelicolor, Corynebacterium glutamicum, Escherichia coli, Nocardia asteroides, Klebsiella pneumoniae und Actinomyces israelii
	GCTG	Pseudomonas aeruginosa
IV.	TTGCTCTGTCGAGGAACTGATGA	Mycobacterium tuberculosis -Komplex
	TTGCCTCTGTCGAGGAACTGATGA	Mycobacterium tuberculosis (AC X63539)
	TCGAGTCTGTACACAGTTGATGG	Mycobacterium leprae
	TCAAGTCCGTCGAGGACCTCATGG	Micrococcus luteus

Region	Sequenz	Spezifisch für
	GCAACTCGGCTCAGCTCATGA	Streptomyces coelicolor
	GCAAGCAGATCCTTGAGCTCATGC	Corynebacterium glutamicum
	TGGAGTCCGTCGAGCAG	Mycobacterium avium und Mycobacterium paratuberculosis
	AAGCGAAAATCCTGGAAGTGGCTGGC	Escherichia coli
	AAGCGAAAATC	Nocardia asteroides und Klebsiella pneumoniae
V.	CATTACCGGCCGCGGA	Mycobacterium tuberculosis
	TATCACCGGTCGTGGC	Mycobacterium leprae
VI.	TCGGCATTGCCCATCGACCACCAAG	Mycobacterium tuberculosis-Komplex
	TCGGCATTGTCAGACGACCACCAAG	Mycobacterium leprae
	TCGGCATCCGCCGACCAGCACCACCAAG	Mycobacterium intracellulare
	TCGGCATCCGCCGTCAGCACCACCAAG	Mycobacterium avium und Mycobacterium paratuberculosis
	TCGGCATCCGCCGAGACCACCAAG	Mycobacterium smegmatis
	TTGGTATCAAAGAGACTCAGAAGT	Escherichia coli
	TTGGTATCAAAGAGACCGCGAAA	Klebsiella pneumoniae
	TCGGCATCAAGGCGACCACCAAGA	Pseudomonas aeruginosa
	CATTAAGCGCCAGCACCACCAAGA	Mycobacterium scrofulaceum
	TCGGCATCCGTCGACACCACCAAGA	Mycobacterium kansasii
VII.	TGGTTTGCTGCTGCGGGGCG	Mycobacterium tuberculosis-Komplex
	TGGTCTGTTGTTGCGTGGCA	Mycobacterium leprae
	CGGTCTGCTGCTGCGTGGTA	Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium avium und

Region	Sequenz	Spezifisch für
		Mycobacterium paratuberculosis
	TGGTAACCTGCTGCGCTGGCA	Pseudomonas aeruginosa
	CGGTCTGTTGCTCCGTGGCA	Mycobacterium scrofulaceum
	CGGGTCTGTTGCTGCGTGGTG	Mycobacterium kansasii
	AGGTGTTCTGCTGCGCGGTA	Escherichia coli
	AGGTGTTCTGCTGCGTGGTA	Klebsiella pneumoniae

Tabelle 5.

Zwei Cluster-Alignierungen (Region IV und VI) der variablen Regionen der EF-Tu-Sequenz

Spezies	Nummer AC oder Tabelle 1	Sequenz (Region IV)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	X63539	TTGCCTCTGTC-GAGGAA-CT-GATGA
<i>Mycobacterium leprae</i>	D13869	TCGAGTCTGTC-ACACAG-TT-GATGG
<i>Micrococcus luteus</i>	M17788	TCAA---GTCCGTCGAGGACCT-CATGG
<i>Streptomyces coelicolor</i>	X77039	GCAACTCGGTCC-TCGAG-CT-CATGA
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	X77034	GCAAG-CAGATC-CTTGAGC-T-CATGC
<i>Mycobacterium leprae</i>	8	TCGAGTCTGTCA-AC
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	13	TTG-C-TCTGTGTCGAGGAACT-GAT
<i>Mycobacterium bovis</i>	3,4	TTG-C-TCTGTGTCGAGGAACT-GAT
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	5	TTG-C-TCTGTGTCGAGGAACT-GAT
<i>Mycobacterium avium</i>	2	TGG-A-GTCCGTCGAGCAGCT-GAT
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	9	TGG-A-GTCCGTCGAGCAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12	TTG-C-TCTGTGTCGAGG
<i>Escherichia coli</i>	J01717	AAGCGAAAATC-CTGGAAGTGGCTGGC
<i>Escherichia coli</i>	18	AAGCGAAAATC-CTGGAAGT
<i>Nocardia asteroides</i>	22	AAGCGAAAATC

<i>Mycobacterium leprae</i>	D13869	TCGGCATTGTCAGA-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	X63539	TCGGCATTGCCCAT-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium bovis</i>	4	TCGGCATTGCCCAT-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium leprae</i>	8	TCGGCATTGTCAGA-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	6	TCGGCATCCGCCGA-CCAGCACCAAG
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	5	TCGGCATTGCCCAT-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12	TCGGCATTGCCCAT-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	13	TCGGCATTGCCCAT-CGACCACCAAG
<i>Mycobacterium avium</i>	2	TCGGCATCCGCCGT-CCAGCACCAAG
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	9	TCGGCATCCGCCGT-CCAGCACCAAG
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	11	TCGGCATCCGCCGA-GACCACCAAG
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	10	TCAGCATTAAAGCCGC-CCAGCACCAAG
<i>Mycobacterium kansasii</i>	7	TCGGCATCCGTCCGA-CACCACC-AAG
<i>Escherichia coli</i>	18	TTGGTAT-CAAAGAGA-CTCAGAAGT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	TTGGTAT-CAAAGAGA-CCGCGAAAA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	TCGGCAT-CAAGGCGA-CCACCAAGA

[0059] Basierend auf diesen Alignierungen wurden spezies-spezifische Primer für die Verwendung in NASBA für *M. tuberculosis* (TUF 15 und 18), für *M. leprae* (TUF 20 und 22) und für *E. coli* (TUF 27 und 28) ausgewählt. Eine genetische Einfangsonde TUF 25 und Detektionssonde TUF 26 wurden für den Nachweis der mycobakteriellen RNA-Amplikons durch Elektrochemolumineszenz (ECL) ausgewählt. Die Sonde TUF 25 ist homolog zu der EF-Tu-Sequenz von *M. leprae* und nicht zu derjenigen von *M. tuberculosis*; beim Unterschied handelt es sich um ein Nukleotid (G → A; siehe Tabelle 2). Allerdings beeinflusste dieser Unterschied nicht den Nachweis von Amplikons, welche aus RNA erzeugt wurden, die von *M. tuberculosis* stammte. Für den Nachweis von *E. coli*-RNA-Amplikons verwendeten wir die spezifischen Einfang- und Nachweissonden TUF 29 bzw. TUF 30.

[0060] In der Region IV wurde ein Ein-Nukleotid-Unterschied zu der veröffentlichten Sequenz von EF-Tu von *M. tuberculosis* [GenBank-Zugangsnummer X63539] gefunden: in keinem der Stämme, welche dem *M. tuberculosis*-Komplex angehören, wurde ein C an der Position 855 gefunden. Allerdings wurde die Primerposition auf eine solche Weise ausgewählt, dass diese Diskrepanz nicht die Amplifikationsreaktion beeinflussen wird.

Beispiel 3:

Spezifitäts- und Empfindlichkeits-Testen von *E. coli* mittels Amplifikation von EF-Tu-mRNA.

Isolierung von In-vitro-RNA.

[0061] Ein 764 bp großes Fragment des EF-Tu-Gens von *M. tuberculosis* H37Rv, *M. leprae* und *E. coli* (Tabelle 1) wurde mittels PCR unter Verwendung des Primer-Satzes TUF 4 und TUF 7 (Tabelle 2) amplifiziert, wie oben beschrieben. Das amplifizierte Produkt wurde in den pCR II-Vektor unter Verwendung des TA-Klonierungs-Kits (Invitrogen) unter Befolgung der Anweisungen des Herstellers kloniert. Eine Selektion des passenden Klons mit dem Insert in der korrekten Orientierung, Größe und Spezifität, wurden mittels Restriktionsenzymanalyse und PCR bestimmt.

[0062] Nach der Linearisierung des Plasmids mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III wurde das klonierte Insert innerhalb der Polylinker-Region von der T7-Promotorstelle aus unter Verwendung des SP6/T7-Transkriptions-Kits (Boehringer, Mannheim) transkribiert. Die DNA-Matrize wurde entfernt durch Verdau mit RQI-DNAse (Promega), und die RNA wurde gereinigt mittels des RNeasy-Kit von Qiagen gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Reinheit wurde überprüft durch Agarose-Gelelektrophorese und Northern-Blotting mit der Digoxigenin-markierten Sonde TUF 24 gemäß Standardvorgehensweisen. Die In-vitro-RNA wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm quantifiziert.

RNA-Amplifikation.

[0063] Ein 203, 197 und 198 Nukleotid großes Fragment der EF-Tu-mRNA von *M. tuberculosis*, *M. leprae* bzw. *E. coli* wurde durch die NASBA-Technik amplifiziert, im Wesentlichen wie zuvor beschrieben [Vliet, G.M.E. van der, Schepers, P., Schukkink, R.A.F., Gemen, B. van und Klatser, P.R. (1994) Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1959-1965.]. Die 20- μ l-Reaktionsmischung war zusammengesetzt aus 40 mM Tris-HCl, pH 8,5, 12 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 5 mM DTT, 1,5 M Sorbitol, 2,1 mg BSA, 1 mM jedes dNTP, 2 mM ATP, CTP, UTP, 1,5 mM GTP und 0,5 mM ITP, 15% (v/v) DMSO, 0,2 mM Primer 1 und Primer 2, 0,08 U RNase H, 32 U T7-RNA-Polymerase, 6,4 U AMV-RT-Polymerase und dem RNA-Ziel. Isothermale Amplifikation des RNA-Ziels wurde durchgeführt durch Inkubation dieser Proben während 2,0 Stunden bei 41 °C.

[0064] Der Nachweis der amplifizierten RNA erfolgte mittels In-Lösungs-Hybridisierung im ECL-Detektions-Assay, wie früher beschrieben [Gemen, B. van, Beuningen, R. van, Nabbe, A., Strijp, D. van, Jurriaans, S., Lens, P., Kievits, T. (1994) A one-tube quantitative HIV-I RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J. Virol. Methods*, 49, 1] mit geringfügigen Modifikationen: 5 μ l NASBA-amplifizierte RNA wurde entweder 20-fach in RNase-freiem Wasser verdünnt oder unverdünnt verwendet. Eine 5'-biotinylierte Sonde wurde verwendet, um das NASBA-Produkt einzufangen. Die verwendete Nachweissonde war mit einem Tris[2,2-bipyridin]-Ruthenium [III]-Komplex markiert. Diese Markierung emittiert Licht als ein Ergebnis von chemischen Reaktionen, welche an der Oberfläche einer Elektrode stattfinden. Der Cutoff- bzw. Ausschlusswert wurde bei 3000 gesetzt. Der ECL-Detektions-Assay wurde auf einer Skala von 0 bis 10⁸ gemessen.

Kontrollen für die Amplifikation.

[0065] Negativkontrollen (lediglich Wasser) wurden in jedem Experiment eingeschlossen, um hinsichtlich Übertrags-Kontamination während NA-Extraktion und -Amplifikation zu prüfen. Diese Kontrollproben wurden extrahiert und mittels NASBA amplifiziert, und zwar in der gleichen Weise, wie oben beschrieben.

Empfindlichkeit und Spezifität der Mycobakterien-NASBA.

[0066] Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der NASBA wurde *M. tuberculosis* ATCC 35801 in flüssigem TweenTM/Albumin-Medium bei 37°C herangezuchtet. Die Konzentration am Beginn der Kultur belief sich auf 8.10⁶ Bakterien/ml. Das Wachstum der Bakterien wurde überwacht durch Messen der Extinktion bei 420 nm.

Nach 13 Tagen Kultur wurde eine Probe entnommen und in Lysis-Puffer verdünnt [Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen und J. Van der Noordaa (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.]. Serielle Verdünnungen wurden in Lysis-Puffer vorgenommen, die RNA wurde gereinigt [Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen und J. Van der Noordaa (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495-503], und jede Verdünnung wurde in einem NASBA getestet, um die höchste Verdünnung zu ermitteln, welche noch ein positives NASBA-Signal ergab. Zusätzlich dazu wurde die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von seriellen Verdünnungen von In-vitro-RNA (siehe oben) bestimmt. Die Spezifität von NASBA wurde bestimmt unter Verwendung der gereinigten RNA aus unterschiedlichen Organismen (Tabelle 1, siehe oben).

Empfindlichkeit und Spezifität des E. coli-NASBA

[0067] E. coli wurde in "Luria Broth"(LB)-Flüssigmedium bei 37°C während 18 Stunden wachsen gelassen. Die so erhaltene Suspension wurde in frischem Medium (1:200)(OD 600 nm = 0,015) inokuliert und bei 37°C inkubiert in einem Rotationsschüttler während 3 Stunden und 15 Minuten (OD 600 nm = 0,430). Eine serielle Verdünnung wurde angefertigt, und mRNA wurde gereinigt, wie oben beschrieben. Darüber hinaus wurden dieselben Verdünnungen auf LB-Agar-Platten ausplattiert, welche 18 Stunden lang bei 37°C inkubiert wurden, wonach die Kolonien ausgezählt wurden.

[0068] Die analytische Empfindlichkeit von NASBA wurde unter Verwendung von seriellen Verdünnungen von In-vitro-RNA bestimmt (siehe oben).

Ergebnisse:

[0069] Empfindlichkeit von NASBA. Die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von in vitro erzeugter EF-Tu-RNA ist in der [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) veranschaulicht. Sowohl der M. tuberculosis-NASBA als auch der M. leprae-NASBA wiesen eine Detektion von 50 Molekülen RNA auf ([Fig. 1a](#)). Die Nachweisgrenze des M. tuberculosis-NASBA bei Verwendung von Bakterien als Ausgangsmaterial für die Detektion belief sich auf 12 000 (Ergebnis nicht gezeigt).

[0070] Die analytische Empfindlichkeit des E. coli-NASBA belief sich gezeigtermaßen auf 100 Moleküle ([Fig. 1b](#)). Die Nachweisgrenze des E. coli-NASBA bei Verwendung von Bakterien als Ausgangsmaterial für den Nachweis belief sich auf 0,4 (Ergebnisse nicht gezeigt).

[0071] Spezifität von NASBA. Die Spezifität des M. tuberculosis-NASBA und des M. leprae-NASBA wird in den [Fig. 2](#) bzw. [Fig. 3](#) veranschaulicht.

[0072] Der M. tuberculosis-NASBA zeigte Spezifität lediglich für die RNA, welche aus Bakterien gereinigt wurde, die dem M. tuberculosis-Komplex angehören. Darüber hinaus, wie veranschaulicht in [Fig. 2](#), zeigte der M. tuberculosis-NASBA eine positive Reaktion, wenn eine homologe, in vitro hergestellte EF-Tu-RNA als Ziel verwendet wurde.

[0073] Der M. leprae-NASBA zeigte lediglich Spezifität für M. leprae-RNA und ihre homologe, in vitro hergestellte RNA.

Beispiel 4:

Testen der Lebensfähigkeit von E. coli.

[0074] E. coli wurde in LB-Flüssigmedium 18 Stunden lang bei 37°C wachsen gelassen. Die so erhaltene Suspension wurde in frischem Medium (1:1000) (OD 600 nm = 0,001) inokuliert und bei 37°C in einem Rotationsschüttler 4 Stunden lang inkubiert. Die Suspension wurde dann in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Zu einem Teil wurde ein Antibiotika-Cocktail zugesetzt, um die Bakterien zu töten: Ampicillin, Rifampicin und Kanamycin (jeweils 50 µg/ml); der andere Teil wurde unberührt bzw. unverändert belassen. Beide wurden weitere 3 Stunden und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Alle 30 Minuten wurde die OD bei 600 nm überwacht, und eine Probe aus jeder Kultur wurde entnommen und zu Lysis-Puffer zugegeben; mRNA wurde gereinigt, wie oben beschrieben. Zusätzlich dazu wurde die Lebensfähigkeit der E. coli-Bakterien durch Übersichten einer Probe auf LB-Agar-Platten überwacht. Kolonien wurden nach 18 Stunden langer Inkubation bei 37°C ausgezählt.

[0075] Die NASBA-Signale nahmen zu und erreichten ihren Maximalwert, als E. coli unbeeinflusst wachsen gelassen wurde ([Fig. 4](#)). Als jedoch Antibiotika zu der exponentiell wachsenden E. coli-Kultur zugegeben wurden, sank das NASBA-Signal 1 Stunde nach der Zugabe der Antibiotika. Dieser Abfall hinsichtlich der mRNA-Konzentration, wie gemessen durch NASBA, stand in Übereinstimmung mit einer Verringerung in der Anzahl der Lebensfähigkeits-Zählungen ([Fig. 4](#)).

SEQUENZAUF LISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Akzo Nobel N.V.
- (B) STRASSE: Velperweg 76
- (C) STADT: Arnhem
- (E) LAND: Niederlande
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 6824 BM
- (G) TELEFON: (0412) 666-379
- (H) TELEFAX: (0412) 650-592

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: EF-TU mRNA als Marker für lebensfähige Bakterien

(iii) ANZAHL VON SEQUENZEN: 95

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) MEDIUM-TYP: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Ausgabe der Patentinhaberin # 1.0, Version # 1.30 (EPO)

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGC TTGGTGGTCG ATGGGCGA

48

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 2:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2:

CCTCTGTCGA GGAAGTATG A

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 3:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 49 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGG GTCGTCTGAC GAATGCCGA

49

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 4:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

AGTCTGTCAC ACAGTTGATG G

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 5:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGC TGAGTCTCTT TGATACCAA

49

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 6:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6:

CGAAAATCCT GGAAGTGGCT G

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 7:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 7:

GCGCGGCGTG GTCAACGT

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 8:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 8:

ACGAGGAAGT TGAGATCG

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 9:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 9:

CTTGGTGGTC GATGGCGA

19

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 10:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 10:

GGTCGTCTGA CGAATGCCGA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 11:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 11:

CTGAGTCTCT TTGATACCAA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 12:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 12:

ACGCGGTATC ATCAAAGT

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 13:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 13:

GTGAAGAAGT TGAAATCG

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 14:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 14:

GTCGGAAGTA GAACTGCG

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 15:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 15:

GACCCCGGCA CGCCGACT

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 16:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 16:

GACAAGCCGT TCCTGTGCC

19

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 17:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 17:

GTCGGAAGTA GAACTGCG

18

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 18:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 18:

GGCACAGGAA CGGCTTGTC

19

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 19:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 19:

GGCATCAGGA ACGGCTTGTC

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 20:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 20:

AGTGGGTTGTG CCCTACATCC TGGTAGCGCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 21:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 21:

GGTGGGTGTA CCTTACATCC TGGTCGCACT T

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 22:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 22:

GGTCGGTGTG CCCTACATCC TGGTCGCGCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 23:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 23:

GGTCGGCGTG CCGGCCCTGC TCGTGGCCCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 24:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 24:

GGTCGGCGTT CCGTACATCG TGGTCGCCCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 25:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 25:

GGTTGGCGTT CCTTACATCC TCGTTGCTCT T

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 26:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 26:

GGTTGGCGTT CCTTACATCC TGGTTGCACT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 27:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 27:

GGTAGGCGTT CCCTACATCA TCGTGTCCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 28:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 28:

GGTAGGCGTT CCCTACATCG TCGTGTCCT G

31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 29:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 29:

CTGCCCAGGA ATTCGACGAG

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 30:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 30:

CCGCCCAGGA GTTCGACGAG

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 31:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 31:

CCGCCCAGGA GTTC

14

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 32:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 32:

TCTCAGTACG ACTTCCCGGG C **21**

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 33:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 33:

TCTCAGTACG ATTTCCCGGG C **21**

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 34:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 34:

CCTCCAGGAG CTTCGACGTC

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 35:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 35:

CTCCGAGTAC GAGTTCCCGG GCGAC

25

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 36:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 36:

CTGAGCAGGA CTACGAC

17

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 37:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 37:

AACACCTACG ACTTCCCGGG C

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 38:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 4 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 38:

GCTC

4

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 39:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 39:

ATTG

4

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 40:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 40:

TCTG

4

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 41:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 41:

GCTG

4

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 42:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 42:

TTGCTCTGTC GAGGAACTGA TGA

23

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 43:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 43:

TTGCCTCTGT CGAGGAACTG ATGA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 44:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 44:

TCGAGTCTGT CACACAGTTG ATGG

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 45:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 45:

TCAAGTCCGT CGAGGACCTC ATGG

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 46:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 46:

GCAACTCGGT CCTCGAGCTC ATGA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 47:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 47:

GCAAGCAGAT CCTTGAGCTC ATGC

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 48:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 48:

TGGAGTCCGT CGAGCAG

17

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 49:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 49:

AAGCGAAAAT CCTGGAAGT GCTGGC

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 50:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 11 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 50:

AAGCGAAAAT C 11

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 51:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 51:

CATTACCGGC CGCGGA 16

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 52:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 52:

TATCACCGGT CGTGCC 16

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 53:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 53:

TCGGCATTTCG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 54:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 54:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 55:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 55:

TCGGCÁTCCG CCCGACCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 56:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 56

TCGGCATCCG CCCGTCCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 57:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 57

TCGGCATCCG CCCGGAGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 58:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 58:

TTGGTATCAA AGAGACTCAG AAGT

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 59:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 59:

TTGGTATCAA AGAGACCGCG AAAA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 60:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 60:

TCGGCATCAA GCGACCACC AAGA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 61:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 61:

CATTAAGCCG CCCAGCACCA AGA

23

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 62:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 62:

TCGGCATCCG TCGGACACCA CCAAGA

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 63:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 63:

TGGTTTGCTG CTGCGGGGCG

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 64:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 64:

TGGTCTGTTG TTGCGTGGCA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 65:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 65:

CGGTCTGCTG CTGCGTGGTA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 66:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 66:

TGGTAACCTG CTGCGCTGGC A

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 67:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 67:

CGGTCTGTTG CTCCGTGGCA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 68:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 68:

CGGGTCTGTT TGCTGCGTGG TG

22

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 69:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 69:

AGGTGTTCTG CTGCGCGGTA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 70:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 70:

AGGTGTTCTG CTGCGTGGTA

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 71:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 71:

TTGCCTCTGT CGAGGAACTG ATGA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 72:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 72:

TCGAGTCTGT CACACAGTTG ATGG

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 73:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 73:

TCAAGTCCGT CGAGGACCTC ATGG

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 74:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 74:

GCAACTCGGT CCTCGAGCTC ATGA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 75:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 75:

GCAAGCAGAT CCTTGAGCTC ATGC

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 76:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 76:

TCGAGTCTGT CAAC

14

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 77:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 77:

TTGCTCTGTC GAGGAAGTGA T

21

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 78:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 78:

TGGAGTCCGT CGAGCAGCTG AT

22

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 79:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 79:

TGGAGTCCGT CGAGCAG

17

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 80:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 80:

TTGCTCTGTC GAGG

14

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 81:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 81:

AAGCGAAAAT CCTGGAAGCTG GCTGGC

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 82:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 82:

AAGCGAAAAT CCTGGAAGCTG

20

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 83:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 11 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 83:

AAGCGAAAAT C

11

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 84:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 84:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 85:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 85:

TCGGCATTTCG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 86:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 86:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 87:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 87:

TCGGCATCCG CCCGACCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 88:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 88:

TCGGCATTTCG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 89:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 89:

TCGGCATCCG CCCGTCCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 90:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 90:

TCGGCATCCG CCCGGAGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 91:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 91:

TCAGCATTAA GCCGCCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 92:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 92:

TCGGCATCCG TCCGACACCA CCAAG

25

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 93:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 93:

TTGGTATCAA AGAGACTCAG AAGT

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 94:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 94:

TTGGTATCAA AGAGACCGCG AAAA

24

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 95:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 95:

TCGGCATCAA GGCGACCACC AAGA

24

SEQUENZAUF LISTUNG

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> EF-TU mRNA als Marker für lebensfähige Bakterien

<130> 98349

<140>

<141>

<160> 95

<170> Patentinhaber in Version 2.1

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 1

aattctaata cgactcacta tagggagagc ttgtgtgtcg atgggcga 48

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 2

cctctgtcga ggaactgatg a 21

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 3

aattctaata cgactcacta tagggagagg gtcgictgac gaatgccga 49

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 4

agtcgtgtcac acagttgatg g 21

<210> 5

<211> 49

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 5

aattctaata cgactcacta tagggagagc tgagictctt tgataccaa 49

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 6

cgaaaatcct ggaactggct g . 21

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 7

gcgcggcgtg gtcaacgt 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 8

acgaggaagt tgagatcg 18

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 9

cttggtggtc gatgggcga 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 10

gglogtctga cgaatgocga 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 11

ctgagtcct ttgataocaa 20

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 12

acgcggtatc atcaaagt 18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 13

gtgaagaagt tgaaatcg

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 14

gtcgggaagta gaactgcg

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 15

gacccccgca cgccgact

18

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 16

gacaagccgt tctgtgcc

19

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 17

gtcgggaagta gaactgcg

16

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 18

ggcacaggaa cggctgtc

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 19

ggcatcagga acggctgtc

20

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 20

agtggtgtg cctacatcc tggtagcct g 31

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 21

ggtgggtga cctacatcc tggtagcct t 31

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 22

ggtgggtga cctacatcc tggtagcct g 31

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 23

ggtgggtga cggccctgc tggtagcct g 31

<210> 24

<211> 31

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 24

ggtcggcggtt ccgtacatcg tggtcgccct g 31

<210> 25
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 25

ggttggcggtt octtacatcc tggttgctct t 31

<210> 26
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 26

ggttggcggtt ccttacatcc tggttgcact g 31

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 27

ggtaggcgtt ccgtacatca tcgtgtcct g 31

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 28

ggtaggcgtt ccctacatcg tcgtgtcct g 31

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 29

ctgcccagga attcgacgag 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 30

ccgcccagga gttcgacgag 20

<210> 31

<211> 14

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 31

ccgcccagga gttc 14

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 32

tctcagtagc atttcccggg c 21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 33

tctcagtagc atttcccggg c 21

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 34

cctccaggag ctctgacgtc

20

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 35

ctccgagtac gagttccogg gcgac

25

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 36

ctgagcagga ctactgac

17

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 37

aacacctaag acttccoggg c

21

<210> 38

<211> 4

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 38

gctc 4

<210> 39
<211> 4
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 39

attg 4

<210> 40
<211> 4
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 40

tctg 4

<210> 41
<211> 4

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 41

gctg

4

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 42

ttgctctgtc gaggaactga tga

23

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 43

ttgcctctgt cgaggaactg atga

24

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 44

tggagctctgt cacacagttg atgg

24

<210> 45

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

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

<400> 45

tcaagtcogt cgaggacctc atgg 24

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 46

gcaactcggg cctcgagctc atga 24

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 47

gcaagcagat ccttgagctc atgc 24

<210> 48
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 48

tgagtcogt cgagcag

17

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 49

aagcgaaaat cctggaactg gctggc

26

<210> 50

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 50

aagcgaaaat c

11

<210> 51

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 51

cattaccggc cgcgga

16

<210> 52

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

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

<400> 52

tatcacggg cgtggc 16

<210> 53
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 53

tcggcattcg cccatcgacc accaag 26

<210> 54
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 54

tcggcattcg tcagacgacc accaag 26

<210> 55
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 55

tcggcatccg ccgaccagc accaag 26

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 56

tcggcatccg ccgctcagc accaag 26

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 57

tcggcatccg ccggagacc accaag 26

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 58

ttggtatcaa agagactcag aagt 24

<210> 59

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

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

<400> 59

ttggatcaa agagaccgcg aaaa 24

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 60

tggcatcaa ggcgaccacc aaga 24

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 61

cattaagcog cccagcacca aga 23

<210> 62
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 62

tcggcatccg tccgacacca ccaaga

26

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 63

tggtttgctg ctgcggggcg

20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 64

tggtctgttg ttgcgtggca

20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 65

cggtctgctg ctgcgtgta

20

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 66

tggtaacctg ctgcgctggc a 21

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 67

cggctgttg ctccgtggca 20

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 68

cgggtctgtt tgctgcgtgg tg 22

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 69

agggtttctg ctgcgcgga 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 70

agggtttctg ctgcgtggta 20

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 71

tggcctctgt cgaggaactg atga 24

<210> 72

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 72

tcgagctctgt cacacagttg atgg 24

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 73

tcaagtcogt cgaggacctc atgg **24**

<210> 74
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 74

gcaactcoggt cctcgagctc atga **24**

<210> 75
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 75

gcaagcagat ccttgagctc atgc **24**

<210> 76
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 76

tcgagctcgt caac

14

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 77

ttgctctgtc gaggaactga t

21

<210> 78

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 78

tggagtcctg cgagcagctg at

22

<210> 79

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 79

tggagtcctg cgagcag

17

<210> 80
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 80

ttgctctgtc gagg **14**

<210> 81
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 81

aagcgaaaat cctggaactg gctggc **26**

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 82

aagcgaaaat cctggaactg **20**

<210> 83
<211> 11
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 83

aagcgaaaal c

11

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 84

tcggcattcg tcagacgacc accaag

26

<210> 85

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 85

tcggcattcg cccatcgacc accaag

26

<210> 86

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 86

tcggcattcg tcagacgacc accaag

26

<210> 87
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 87

tggcatccg ccgaccagc accaag 26

<210> 88
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 88

tggcattcg cccatcgacc accaag 26

<210> 89
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 89

tggcatccg ccgctccagc accaag 26

<210> 90
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 90

tcggcatccg cccggagacc accaag

26

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 91

tcagcattaa gccgccagc accaag

26

<210> 92

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 92

tcggcatccg tcgacacca ccaag

25

<210> 93

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Oligonukleotid

<400> 93

ttggtatcaa agagactcag aagt

24

<210> 94
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 94

ttggatcaa agagaccgcg aaaa 24

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 95

tcggcatcaa ggcgaccacc aaga 24

Patentansprüche

1. Verfahren zur Feststellung der bakteriellen Lebensfähigkeit, wobei mRNA, die für den Elongationsfaktor EF-Tu codiert, als ein Target in einer transkriptions-basierten Verstärkungs-Reaktion eingesetzt wird und das Vorhandensein und/oder die Menge der besagten mRNA bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das transkriptionsbasierte Verstärkungs-Verfahren NASBA ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die verstärkte mRNA mit einer komplementär markierten Sonde erfasst wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Sonde mit einem elektro-chemolumineszenten Marker versehen ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Bakterien Mykobakterien sind.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem die Mykobakterien-Art *M. tuberculosis* oder *M. leprae* ist.

7. Oligonukleotid komplementär zu oder enthaltend mindestens eine Änderung, die nicht die Hybridisierungsfähigkeit dieses Oligonukleotids für eine Sequenz einer bakteriellen EF-Tu mRNA Sequenz vermindert, wobei das besagte Oligonukleotid eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide von einer der Sequenzen umfasst, die unter den SEQ ID Nrn. 1-6 oder 8, oder einer komplementären Sequenz davon, dargestellt sind.

8. Oligonukleotid, welches komplementär zu oder enthaltend mindestens eine Änderung umfasst, die nicht die Hybridisierungsfähigkeit dieses Oligonukleotids für eine Sequenz einer bakteriellen Ef-Tu mRNA Sequenz vermindert, wobei das besagte Oligonukleotid höchstens eine Länge von 50 Nukleotiden aufweist und die Se-

quenz, die in der SEQ ID Nr. 7 dargestellt ist, oder die komplementäre Sequenz dazu umfasst.

9. Paar von Oligonukleotiden für die Verstärkung einer Sequenz in dem EF-Tu Gen von *M. tuberculosis*, wobei das besagte Paar aus einem Oligonukleotid, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 9 dargestellt ist, und einem Oligonukleotid besteht, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 2 dargestellt ist.

10. Paar von Oligonukleotiden für die Verstärkung einer Sequenz in dem EF-Tu Gen von *M. leprae*, wobei das besagte Paar aus einem ersten Oligonukleotid, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 10 dargestellt ist, und einem zweiten Oligonukleotid besteht, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist.

11. Paar von Oligonukleotiden für die Verstärkung einer Sequenz in dem EF-Tu Gen von *M. coli*, wobei das besagte Paar aus einem ersten Oligonukleotid, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 11 dargestellt ist, und einem zweiten Oligonukleotid besteht, welches eine Länge von 10-50 Nukleotiden aufweist und mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 6 dargestellt ist.

12. Paar von Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei das erste Oligonukleotid weiterhin die Sequenz eines Promoters umfasst, der durch eine RNS-Polymerase erkennbar ist.

13. Paar von Oligonukleotiden gemäss Anspruch 12, bei dem die Sequenz des Promoters die Sequenz des Promoters ist, welcher durch T7 RNS-Polymerase erkannt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 1 für die Feststellung der Lebensfähigkeit von *M. tuberculosis*, *M. leprae* oder *E. coli*, wobei ein Paar von Oligonukleotiden gemäss den Ansprüchen 9, 10 oder 11 jeweils für die Verstärkung von EF-Tu mRNA eingesetzt wird und die Gegenwart und/oder die Menge der verstärkten Nukleinsäure festgestellt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Lebensfähigkeit von *M. tuberculosis* oder *M. leprae* festgestellt wird und die Erfassung der verstärkten Nukleinsäure durchgeführt wird unter Einsatz eines Sandwich-Hybridisierungs-Assays mit einer Fangsonde mit mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden einer Sequenz, die in der SEQ ID Nr. 7 dargestellt ist, und mit einer markierten Erfassungssonde mit mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Sequenz, die in SEQ ID Nr. 8 dargestellt ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Lebensfähigkeit von *E. coli* festgestellt wird und die Erfassung der verstärkten Nukleinsäure durchgeführt wird unter Einsatz eines Sandwich-Hybridisierungs-Assays mit einer Fangsonde mit mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden einer Sequenz, die in der SEQ ID Nr. 12 dargestellt ist, und mit einer markierten Erfassungssonde mit mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden der Sequenz, die in SEQ ID Nr. 13 dargestellt ist.

17. Test-Kit für die Erfassung von mykobakterieller EF-Tu mRNA in einer Probe, umfassend:

- ein Paar von Oligonukleotiden nach Anspruch 9 oder 10,
- mindestens ein Oligonukleotid umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die im wesentlichen komplementär zu mindestens einem Teil der verstärkten Nukleinsäuresequenz ist, geliefert mit einem erfassbaren Marker,
- geeignete Verstärkungs-Reagenzien.

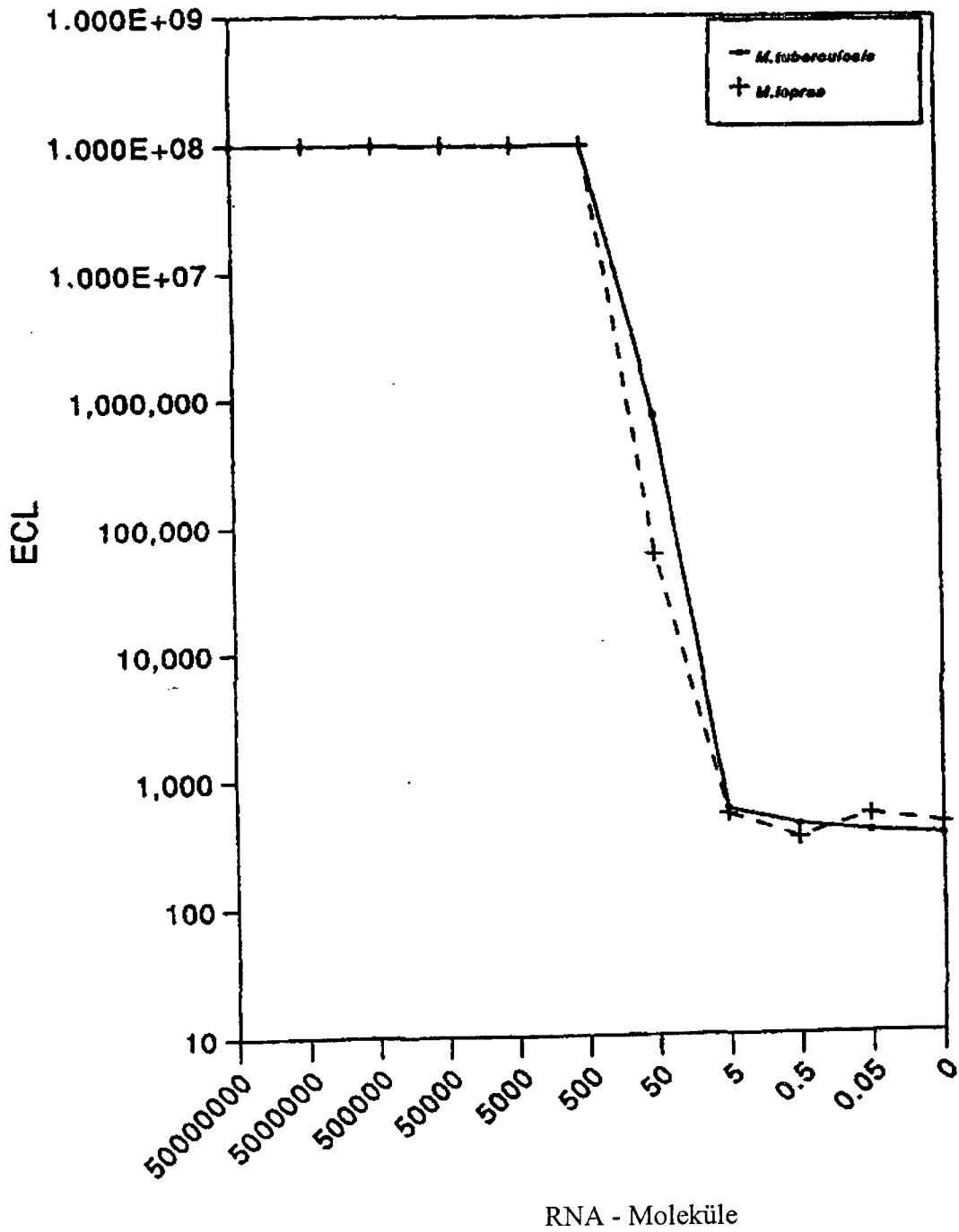
18. Test-Kit für die Erfassung von *E. coli* bakterieller EF-Tu mRNA in einer Probe, umfassend:

- ein Paar von Oligonukleotiden nach Anspruch 11,
- mindestens ein Oligonukleotid umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die im wesentlichen komplementär zu mindestens einem Teil der verstärkten Nukleinsäuresequenz ist, geliefert mit einem erfassbaren Marker, geeignete Verstärkungs-Reagenzien.

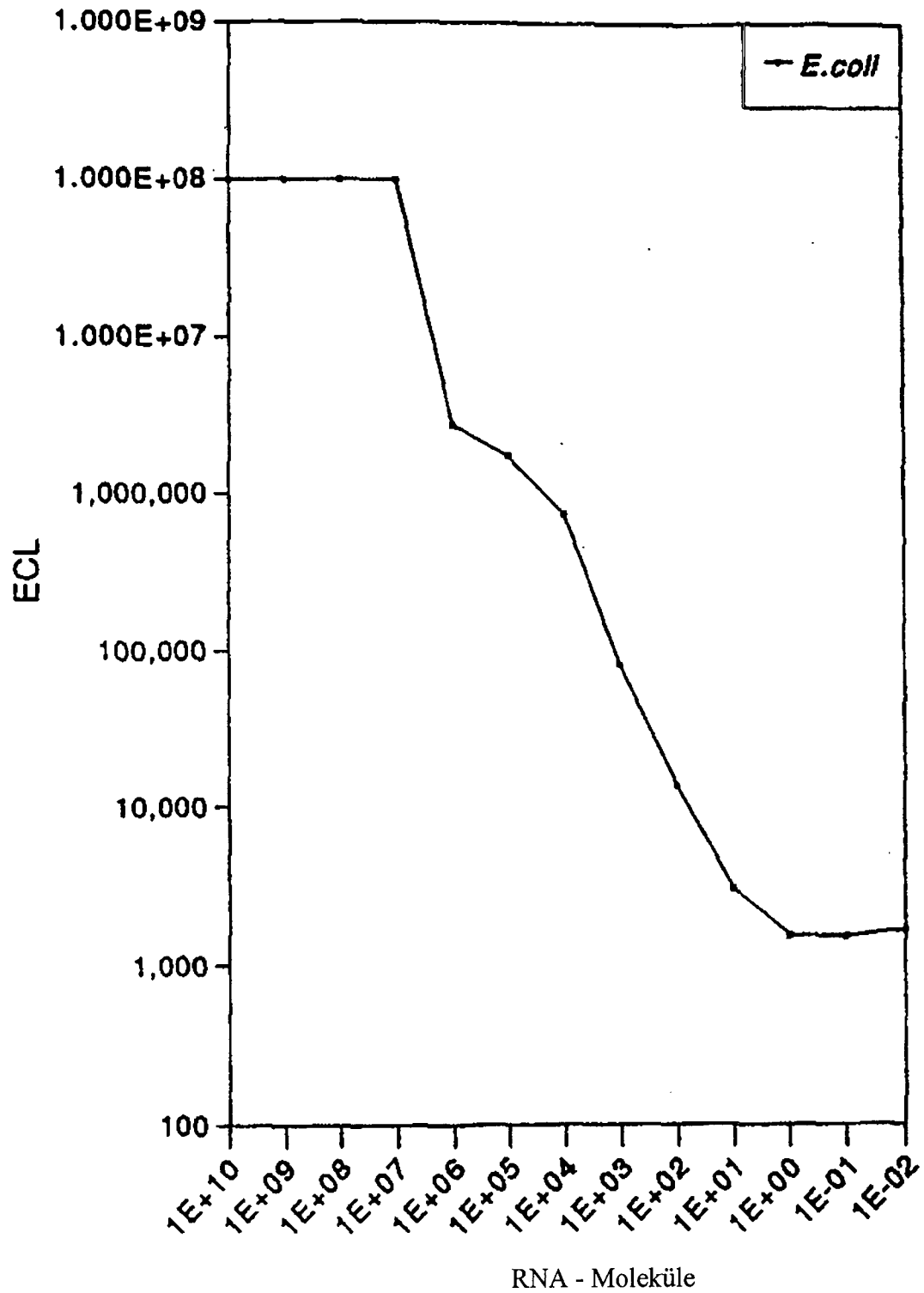
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

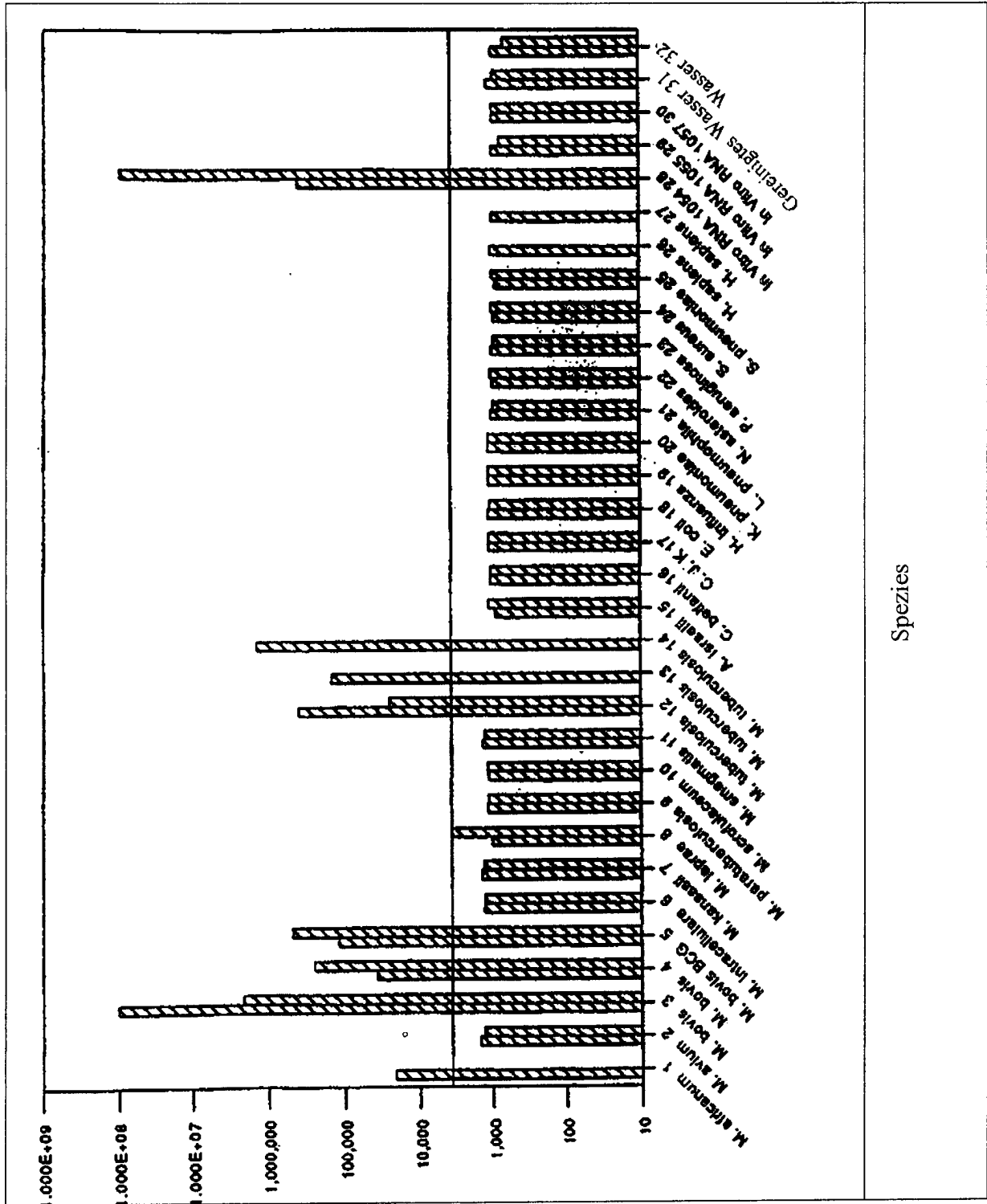
Figur 1a: Die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von in vitro hergestellter mykobakterieller EF-Tu RNA



Figur 1b: Die analytische Empfindlichkeit von NASBA unter Verwendung von in vitro hergestellter *E. coli* - EF-Tu RNA



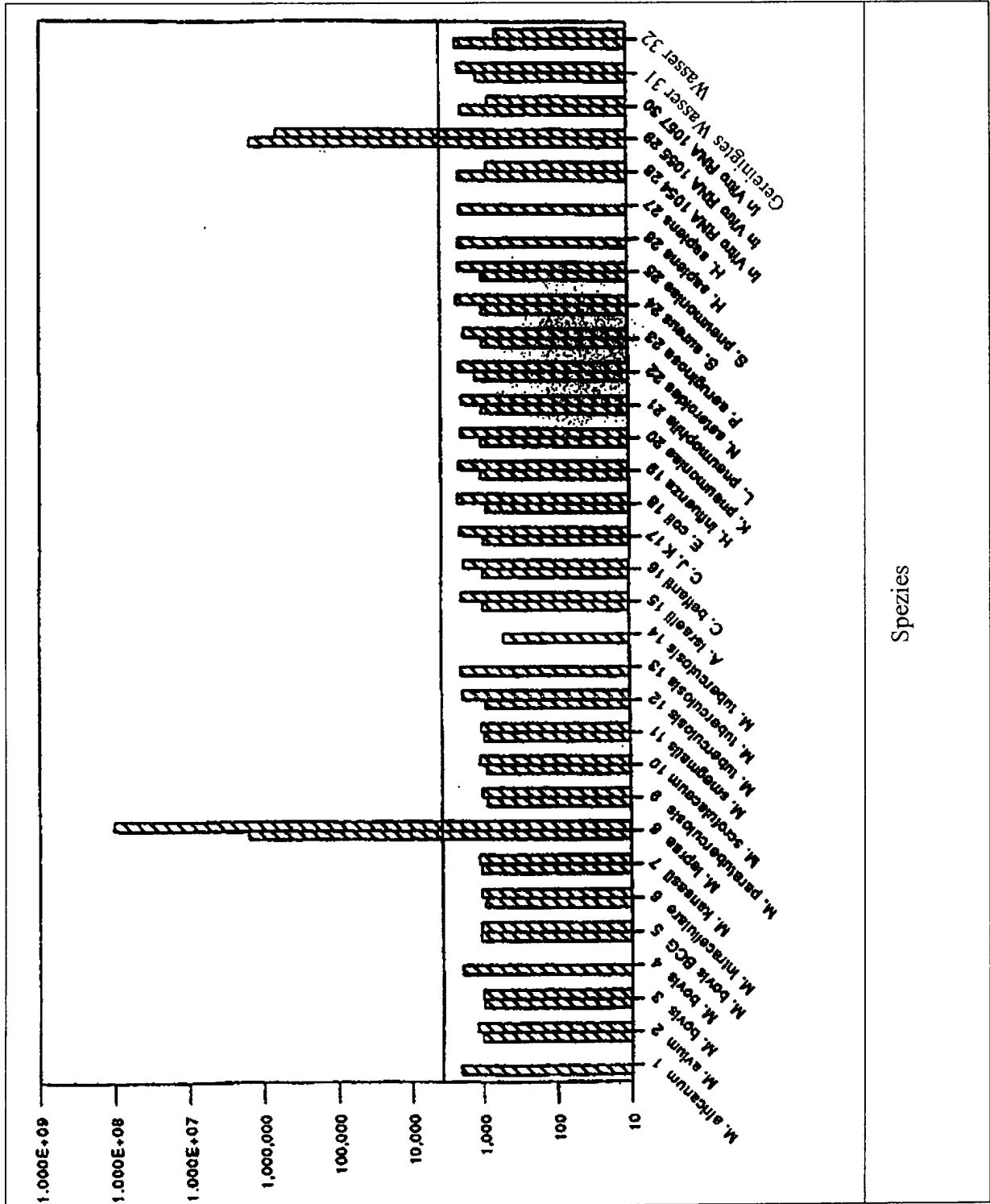
Figur 2: Spezifität der M. tuberculosis NASBA



ECL - Signal

Spezies

Figur 3: Spezifität der M. leprae NASBA



ECL – Signal

Figur 4: NASBA für die Bestimmung der Lebensfähigkeit

