

# **Optimierung von DNA-Arrays zur Analyse von Milch und Milchprodukten**

**Aktenzeichen 13053/26**



## **Projektlaufzeit:**

September 2001 bis Oktober 2004

## **Projektpartner:**

Milchhof Magdeburg GmbH, Magdeburg; Herr Helge Prott

PicoRapid Technologie GmbH, Bremen; Geschäftsführer Dr. M. Wolf

Vermicon AG, München; Geschäftsführer Dr. J. Snaidr

Universität Bremen, Biotechnologie und Molekulare Genetik;

Prof. Dr. D. Blohm (Koordinator)

**Bremen, Oktober 2004**

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az **13053/26** Referat **32/0**

**Antragstitel** **Förderschwerpunkt Biotechnologie: Verbund Biotechnologie in der Lebensmittelwirtschaft - Innovative Problemlösungen in Kooperation zwischen Hochschulen und mittelständischen Industrieunternehmen: Optimierung von DNA-Arrays zur Analyse von Milch und Milchprodukten**

**Stichworte** Analytik , Schwerpunkt-Biotechnologie , Umweltchemikalien  
Lebensmittel , Mikrobiologie , Verfahren , Wasser

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>3 Jahre</b>	<b>01.09.2001</b>	<b>15.10.2004</b>	<b>3</b>

Zwischenberichte	01.09.2002 01.09.2003	01.04.2004
------------------	--------------------------	------------

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Universität Bremen	Tel	0421/218-4780
	Zentrum für Umweltforschung und Technologie	Fax	0421/218-7578
	Abt. Biotechnologie und Molekulare Genetik	Projektleitung	Herr Prof. Dr. Dietmar Blohm
	Leobener Straße	Bearbeiter	Frau Dr. Christiane Glöckner
	28359 Bremen		

**Kooperationspartner**

- Milchhof Magdeburg GmbH, Magdeburg
- PicoRapid Technologie GmbH, Bremen
- VERMICON AG, München

### **Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens**

Das deutsche Lebensmittelrecht schreibt für Milch und Milchprodukte zahlreiche Qualitätskontrollen vor. Ziel der z.T. mehrtägigen, erst nach Ablauf des Produktionsprozesses durchgeführten Tests ist es, den Verbraucher vor Krankheitserregern wie z.B. coliformen Bakterien zu schützen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Seiten des Verbraucherschutzes und nicht in dem Bemühen, potentielle Fehlproduktionen und die damit verbundenen Umweltbelastungen zu verhindern, die bei der Entsorgung der Fehlchargen und der Reinigung der Fermenter entstehen.

Kernpunkt des vorliegenden Projekts war es, potentielle Fehlchargen bei der Herstellung von Milchprodukten bereits im Vorfeld der Milchverarbeitung zu erkennen und zu vermeiden, indem mit Hilfe der Mikroarray-basierten Gen-Analyse alle wichtigen biologischen Parameter simultan erfasst werden, die Auskunft über den Zustand der zu verarbeitenden Milch bzw. über die Aktivität der Starterkulturen während der Milchfermentation geben. Auf Basis der neuen Methode der DNA-Chip-Technologie soll dafür ein schnelles und kostengünstiges Analysesystem aufgebaut werden.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Die neue Technologie der DNA-Chip-Hybridisierung bietet die Chance, ein Monitoring-System zu entwickeln, das in einem Arbeitsgang die erforderlichen Informationen über die mikrobiologische Zusammensetzung und das genetische Potential der an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen liefert und damit eine Prognose über den Fermentationsverlauf erlaubt. Die Aufgaben des Projektes sind folgende:

1. Festlegung der für die Beurteilung der Milch und deren Verarbeitung erforderlichen Gen-Analysen.
2. Optimierung der Gen- und Organismus-spezifischen Oligonukleotidsequenzen im Hinblick auf maximale Hybridisierungseffizienz und minimale unspezifische Bindungsreaktionen der Sonden auf dem DNA-Mikroarray.
3. Optimierung der Funktionalität derartiger DNA-Chips und Erprobung ihrer Einsetzbarkeit für die frühzeitige Erkennung von Milch-Fehlfermentationen unter Praxisbedingungen.

## **Ergebnisse**

### *Reproduzierbarkeit der Chipqualität und erweiterte Qualitätskontrolle*

Basierend auf den optimierten Produktionsparametern wurde ein standardisiertes, auf kontaktfreiem Spotten basierendes Verfahren für die Produktion der Mikroarrays eingeführt, das es erlaubt, die „Milch-Chips“ in sehr hoher und reproduzierbarer Qualität herzustellen, zu lagern und an den Kunden zu versenden. Zusätzlich wurden neue Qualitätskontrollverfahren in die Produktion der Milch-Chips integriert und eine Markierungstechnologie entwickelt, die es erlaubt, die Arrays mit einem weitestgehend fälschungssicheren Barcode auszustatten.

### *Design und Spezifität der Sonden für den Nachweis von Bakterien, Phagen, Hefen, Schimmelpilzen und produktspezifischen Genen*

Als Grundlage der praxisorientierten Entwicklung eines Chip-basierten Analysesystems für die Milchindustrie wurden mehr als 100 Gen-Sonden zur spezifischen Identifikation von Bakterien, Phagen und produktspezifischen Genen ausgewählt und getestet. Dieser für den Milch-Chip vorgesehene SONDENSATZ wurde um diverse Sonden für den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen, wie z.B. *Zygosaccharomyces bailii*, *S. cerevisiae*, *Pichia*-, *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten erweitert und auf Spezifität und Eignung zur Organismusedentifizierung hin optimiert.

### *Markierung und Hybridisierung genomischer DNA aus Milchprodukten*

Für den erforderlichen Nachweis von genomischer DNA auf dem DNA-Mikroarray wurden zunächst die Extraktion sowie die Fragmentierung der DNA in der Fenton-Reaktion etabliert. Nachdem in der Eingangsphase des Projektes festgestellt worden war, dass die im Antrag dargestellten, in der medizinischen Diagnostik üblichen Methoden für den Routine-Einsatz in der Milchindustrie zu teuer sind, wurde ein kostengünstiges, chemisches Markierungsverfahren entwickelt, das auf der kovalenten Anbindung von Psoralen-PEO-Biotin und Streptavidin-Cy5-Zugabe beruht. Ein umfangreiches Optimierungsprogramm führte schließlich dazu, dass mit diesem Verfahren Starterkultur- und Molkeproben hinsichtlich ihrer Organismenzusammensetzung und der Anwesenheit von Phagenresistenzgenen untersucht werden können.

### *Marktanalyse, Marketing und Patentstrategie*

Die bei den Anwendern durchgeführte Marktanalyse, die das derzeitige Analysespektrum und dessen Kosten, das gewünschte Marker-Spektrum und die wirtschaftlichen, ökologischen und technologischen Parameter umfasste, sowie die Prüfung, ob die hier etablierte Analytik die Schutzrechte Dritter berührt und ob entsprechende Abhängigkeiten bestehen, zeigte zunächst, dass bei Erfüllung der Projektziele sehr gute Vorzeichen für eine kommerzielle Verwertung bestehen. Die im Projektzeitraum deutlich veränderten wirtschaftlichen Rahmenbedingungen führten bei erneuter Abschätzung zum Projektende zu dem Ergebnis, dass, obwohl alle wesentlichen Projektziele erreicht wurden, der Milch-Chip innerhalb der nächsten drei Jahre kein ausreichendes Marktpotenzial für eine Markteinführung besitzt.

## **Öffentlichkeitsarbeit und ausgewählte Präsentationen**

Glöckner, C.B. and Blohm, D. (2003) Vortrag bei der COST action 853 "Agricultural biomarkers for array technology" der Europäischen Union, Working group 4: Applying microarray technology in milk industry, 24.-26. September, Bremen.

Glöckner, C.B. und Blohm, D. (2003) Vortrag "Stand und Perspektiven der Einsatzmöglichkeit von DNA-Mikroarrays im Milchverarbeitungsprozess" Lebensmitteltechnologie 2003, 25.-27. September, Stuttgart.

Glöckner, C.B., Schmidt, M.P., Weiß, S., Würdemann, C., Wagner-Prigge, K. and Blohm, D.H. (2004) Analysis of milk products as an example for the applicability of the microarray technology in the food industry. Posterpräsentation auf dem Statusseminar Chiptechnologien, 24.-25. Januar, Frankfurt

## **Fazit**

Trotz erfolgreicher Ausarbeitung eines Verfahrens, das erstmals die Simultan-Analyse von diversen Mikroorganismen und deren genetischen Eigenschaften in Starterkulturen und Milchprodukten mit Hilfe der DNA-Mikroarray Technologie erlaubt, wird die Milchindustrie dieses Verfahren angesichts des enormen Kostendruckes und des derzeitigen Preisverfalls bei den bisherigen Analyseverfahren innerhalb der nächsten 5 Jahre vermutlich noch nicht einsetzen, insbesondere da das neue, Milch-Chip basierte Verfahren noch nicht als gesetzlich vorgeschriebenes und/oder nach §35 LMBG zugelassenes Analyseverfahren eingeführt ist.

## Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung .....	9
2. Anlass und Zielsetzung des Projekts .....	11
3. Verwendete Methoden und Ergebnisse .....	11
3.1. Optimierung der Mikroarray-Plattform für die Keimanalytik in der Milchindustrie .....	11
3.1.1. Optimierung der Produktionsparameter .....	13
3.1.2. Lagerung und Versand .....	15
3.1.3. Herstellung Routine-tauglicher Mikroarrays .....	15
3.1.4. Gesamtzahl hergestellter DNA-Chips .....	16
3.2. Chipkonfigurierung und Sondendesign.....	17
3.2.1. Auswahl fermentationsrelevanter Mikroorganismen, Anlegen einer Referenzsammlung und Identifikation produktspezifischer Gensequenzen .....	17
3.2.2. Optimierung der aus der FISH-Hybridisierung abgeleiteten Sonden auf die für den Chip gewählten Hybridisierungsbedingungen .....	18
3.2.3. Sondendesign für den Bakterien-, Phagen- und Gen-Nachweis .....	19
3.2.4. Aufbau einer phylogenetischen Datenbank für Hefen und Schimmelpilze sowie Sondendesign für relevante Organismen.....	20
3.2.5. Testen der Sondenfunktion.....	22
3.3. Etablierung der Methodik für die Probenaufbereitung und die DNA-Chip Hybridisierung.....	23
3.3.1. Extraktion der DNA aus Starterkulturen, Milch und Milchprodukten.....	23
3.3.2. Fragmentierung genomischer DNA aus Starterkulturen oder Milcherzeugnissen.	24
3.3.3. Markierung genomischer DNA .....	25
3.3.4. Direkter Vergleich der Signalintensitäten von endmarkierter und Psoralen-PEO- Biotin markierter DNA .....	26
3.3.5. Optimierung der Psoralen-PEO-Biotin Markierung für den direkten Nachweis von genomischer DNA aus Milchprodukten.....	27
3.3.6. Hintergrundreduktion durch Optimierung des Hybridisierungs- und Waschprotokolls.....	28
3.3.7. Einfluss der Fragmentlänge auf die Hybridisierung genomischer DNA .....	28

3.4.	Anwendbarkeit der Hybridisierung genomischer DNA unter Praxisbedingungen .....	29
3.4.1.	Nachweisgrenze von Psoralen-PEO-Biotin-markierter DNA.....	30
3.4.2.	Nachweisgrenze der rDNA-Gene bei der Hybridisierung von genomischer DNA.....	32
3.4.3.	Nachweis von <i>Listeria innocua</i> und <i>Salmonella choleraesuis</i> durch DNA-Chip-Hybridisierung.....	33
3.4.4.	Sondenspezifität und Kreuzreaktivität .....	33
3.4.5.	Praxisbeispiel: Nachweis von Phagen-DNA in Molkeproben .....	35
3.4.6.	Praxisbeispiel: Vergleichende Analyse zweier Starterkulturen für die Quarkherstellung .....	37
3.5.	Vorbereitungen für den Einsatz der Chip-Technologie in der industriellen Laborroutine .....	40
3.5.1.	Geräte für die industrielle Applikation.....	40
3.5.2.	Patentrecherche und Strategie zum Schutz der erzielten Ergebnisse.....	41
3.5.3.	Quantitative Darstellung der Umweltrelevanz.....	42
3.5.4.	Abschätzung des wirtschaftlichen Potenzials .....	43
3.5.5.	Marktanalyse zur Keimdifferenzierung in der Milchindustrie.....	44
3.5.6.	Bepreisung des Milch-Chips .....	46
3.5.7.	Marketing- und Vertriebsstrategie .....	47
3.6.	Aktuelle Marktchancen eines Milch-Chip-Systems für die mikrobielle Routinediagnostik in der Milchindustrie.....	49
3.6.1.	Milch-Chip – Technische Parameter und Anwendung .....	49
3.6.2.	Mikrobiologische Diagnostik in der Milchindustrie .....	52
3.6.3.	Gegenüberstellung Marktanforderungen – Milch-Chip Eigenschaften .....	55
4.	Diskussion .....	57
5.	Öffentlichkeitsarbeit.....	60
6.	Fazit und Ausblick.....	62
7.	Anlagen.....	64

## Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1. Produktionsanlage.....	12
Abb. 2. Vergrößerung von vier parallelen Spots aus einem Array nach erfolgter Hybridisierung .	13
Abb. 3. Kontrolle des Array-Produktionsprozesses .....	14
Abb. 4. Ergebnisse der „In-Prozess-“ und Produkt-Endkontrolle .....	15
Abb. 5. Markiertes PicoSlide.....	16
Abb. 6. Phylogenetischer Baum milchrelevanter Schimmelpilze und Hefen. ....	21
Abb. 7. Hybridisierungssignale der Sonden für die Phagenresistenzgene der Adsorptionsresistenz, der Inhibition der DNA-Injektion und der Restriktion von Fremd-DNA.....	22
Abb. 8. Hybridisierungssignale der Sonden der Phagenresistenzgruppe "Abortive Infection of Phages". ....	23
Abb. 9. Abhängigkeit der Fragmentgröße von der DNA-Konzentration. ....	25
Abb. 10. Schema zur Steigerung der Signalintensität durch Mehrfachmarkierung der DNA durch einen Psoralen-Biotin-Streptavidin-Cy5-Komplex.....	26
Abb. 11. Direkter Vergleich der Hybridisierungssignale bei der Endmarkierung (A) und der Psoralen-PEO-Biotin Markierung (B) von PCR-Produkten.....	27
Abb. 12. Optimierung der Markierungsreaktion. ....	27
Abb. 13. Einfluss der Fragmentlänge auf die Hybridisierung der genomischen DNA aus Starterkulturen dargestellt am Beispiel ausgewählter Organismen-spezifischer Sonden....	29
Abb. 14. Chip-Analyse einer Starterkultur zur Herstellung von Speisequark.....	30
Abb. 15. Nachweisgrenze für Psoralen-PEO-Biotin markierte PCR-Produkte.....	31
Abb. 16. Vergleich der Nachweisgrenze für endmarkierte (A) und Psoralen-PEO-Biotin markierte DNA (B) am Beispiel der Hybridisierung des 821 bp langen PCR-Produktes. ....	31
Abb. 17. ..Nachweisgrenze für den direkten Nachweis von genomischer DNA aus <i>L.l. ssp. cremoris</i> auf dem DNA-Mikroarray. ....	32
Abb. 18. Gleichzeitiger Nachweis von <i>Listeria innocua</i> DSMZ 20649 (Sonden Lm1 und Lm2) und <i>Salmonella choleraesuis</i> 4883 (Sonden Sal1 und Sal2). ....	33
Abb. 19. Überprüfung der Spezifität für die Hybridisierung von genomischer DNA. ....	34
Abb. 20. Hybridisierung pathogener Bakterien: <i>Bacillus cereus</i> (A), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (B), <i>Enterobacter aerogenes</i> (C) und <i>Proteus mirabilis</i> (D). ....	35
Abb. 21. Chip Hybridisierung mit DNA des Phagen P008 zur Überprüfung der SONDENSPEZIFITÄT..	36

Abb. 22. Nachweis des zur 936 Spezies gehörenden Phagen P482 in einer kontaminierten Molkeprobe des Milchhofs Magdeburg.....	36
Abb. 23. Analyse des Keimspektrums der Starterkultur Probat 8/0.....	38
Abb. 24. Organismenidentifikation in der Starterkultur Probat 505. ....	38
Abb. 25. Verifizierung der DNA-Chip-Hybridisierung mit einer Nested PCR zur Identifikation von <i>Lactobacillus delbrückii</i> . ....	39
Abb. 26. Auszug aus dem Jahresbericht 2002 >> 2003, S. 4 der Bundesvereinigung der Deutschen Ernährungsindustrie. ....	52
Abb. 27. Geschäftsbericht 2002/2003, S. 25 des Milchindustrie-Verband e. V.....	52
Abb. 28. Klassischer Nachweis von Salmonellen. ....	54
Abb. 29. Vergleich des Soll- und Ist-Zustands.....	59

## **Tabellenverzeichnis:**

Tab. 1. Referenzstämme für die Testung der Organismen-Sonden.....	18
Tab. 2. Sondendesign für den Milch-Chip.....	20

## Abkürzungsverzeichnis:

BAfM	Bundesanstalt für Milchforschung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-( $\gamma$ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolo-carbocyanin-N-hydroxysuccimidester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
p.a.	per annum
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STK	Starterkultur
STV	Streptavidin

## **1. Zusammenfassung**

Ergebnis des Projektes ist der experimentelle Nachweis, dass die DNA-Chip-Technologie geeignet ist, im Sinne eines produktionsintegrierten Umweltschutzes in der Milchindustrie das gleichzeitige Monitoring vieler fermentationsrelevanter Organismen und Parameter und damit die frühzeitige Erkennung und Vermeidung von umweltbelastenden Fehlfermentationen durchzuführen. Gegenstand des Projekts ist die Entwicklung eines entsprechenden DNA-Mikroarray basierten Analysesystems für die Qualitätskontrolle von Milch, Starterkulturen und ausgewählten Milchprodukten. Für die Etablierung dieser Technologie wurden die im Folgenden dargestellten Arbeiten zur technischen Entwicklung der DNA-Milch-Chips, zur Sondenoptimierung, zur Markierungs- und Hybridisierungsreaktion sowie zur Marketing-, Vertriebs- und Patentstrategie durchgeführt.

### *Reproduzierbarkeit der Chipqualität und erweiterte Qualitätskontrolle*

Aufbauend auf den gängigen Produktionsparametern wurde ein standardisiertes, auf kontaktfreiem Spotten basierendes Produktionsverfahren für die Herstellung der Mikroarray-Substrate (PicoSlides) und zur Arrayherstellung (PicoArrays) eingeführt, das es erlaubt, die „Milch-Chips“ in sehr hoher und reproduzierbarer Qualität herzustellen, zu lagern und an den Kunden zu versenden. Innerhalb des Projekts wurden so über 700 Chips mit guter Reproduzierbarkeit verwendet. Zusätzlich wurden neue, zerstörungsfreie Qualitätskontrollverfahren in die Serienproduktion der Milch-Chips integriert. Um den Anforderungen im Routinebetrieb gerecht zu werden, wurde eine Markierungstechnologie entwickelt, die es erlaubt, die Arrays auf Wunsch mit einem weitestgehend fälschungssicheren Barcode auszustatten.

### *Design und Spezifität der Sonden für den Nachweis von Bakterien, Phagen, Hefen, Schimmelpilzen und produktspezifischen Genen*

Für die praxisorientierte Entwicklung eines Chip-basierten Analysesystems für die Milchindustrie stehen derzeit mehr als 100 Sonden für die spezifische Identifikation von Bakterien, Phagen und produktspezifischen Genen zur Verfügung. Die Spezifität bisher entwickelter Sonden zur Organismenidentifizierung wurde optimiert. Außerdem wurde der SONDENSATZ auf dem Milch-Chip um Sonden für den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen, wie z.B. *Zygosaccharomyces bailii*, *S. cerevisiae*, *Pichia*-, *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten erweitert.

### *Markierung und Hybridisierung genomischer DNA aus Milchprodukten*

Für den direkten Nachweis von genomischer DNA auf dem DNA-Mikroarray wurden zunächst die Extraktion und die Fragmentierung der DNA in Form der Fenton-Reaktion aus verschiedenen Probenmaterialien etabliert. Nachdem in der Eingangsphase des Projekts festgestellt worden war, dass die im Antrag dargestellten, in der medizinischen Diagnostik üblichen Methoden für den Einsatz in der Routineanalytik der Milchindustrie zu teuer sind, wurde im Rahmen des Projektes ein kostengünstiges, chemisches Markierungsverfahren entwickelt, das auf der kovalenten Anbindung von Psoralen-PEO-Biotin an die DNA und eine anschließende Farbentwicklung durch Zugabe von Streptavidin-Cy5 beruht. Nach einer umfangreichen Optimierung der einzelnen Schritte des Markierungs- und Detektionsprotokolls und durch Variationen in der Pufferzusammensetzung bei den (Prä-) Hybridisierungs- und Waschschrritten konnte das Signal/Hintergrundverhältnis um den Faktor 5 verbessert werden. Beispielhaft wurden Starterkultur- und Molkeproben hinsichtlich ihrer Organismenzusammensetzung und der Anwesenheit von Phagenresistenzgenen untersucht.

### *Marktanalyse, Marketing und Patentstrategie*

Die Direktbefragung der Anwender, die Teil der Marktanalyse war, umfasste das derzeitige Analysespektrum, die verursachten Kosten, das von der Industrie gewünschte Marker-Spektrum sowie ökologisch, wirtschaftlich und technologisch realisierbare Parameter. Parallel dazu wurde überprüft, ob und in wie weit die hier etablierte Analytik die Schutzrechte Dritter berührt und daher im Rahmen der angestrebten kommerziellen Verwertung Abhängigkeiten bestehen. Trotz der anfänglich guten Vorzeichen bestehen nach einer weiteren umfangreichen Abschätzung des derzeitigen Marktpotenzials aufgrund der veränderten wirtschaftlichen Rahmenbedingungen keine tatsächlichen Chancen für die Einführung eines Milchchips innerhalb der nächsten drei Jahre.

### Fazit

Es wurde ein Verfahren erarbeitet, das auf Basis der DNA-Markierung mit Psoralen-Biotin die Analyse von Starterkulturen und Milchprodukten mit Hilfe der Mikroarray-Technologie ermöglicht und dabei in einem Analysengang diverse Mikroorganismen und deren genetische Eigenschaften zu untersuchen erlaubt. Der enorme Kostendruck und der Preisverfall bei den bisherigen Analyseverfahren lässt die Milchindustrie jedoch vor den zusätzlichen Kosten für die (noch) nicht gesetzlich vorgeschriebene und/oder nach §35 LMBG zugelassene DNA-Analytik zurückschrecken. Innerhalb der nächsten fünf Jahre gibt es daher nur geringe Chancen für eine gewinnbringende Vermarktung des im Rahmen dieses Projektes entwickelten Milch-Chip basierten Verfahrens.

## **2. Anlass und Zielsetzung des Projekts**

Das deutsche Lebensmittelrecht schreibt für Milch und Milchprodukte zahlreiche Qualitätskontrollen vor. Das Ziel der z.T. mehrtägigen Tests ist es, den Verbraucher vor Krankheitserregern wie z.B. coliformen Bakterien oder unerwünschten Substanzen zu schützen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Seiten der Schadensbegrenzung und nicht in dem Bemühen, potenzielle Fehlproduktionen frühzeitig zu erkennen und zu vermeiden. Entspricht ein Produkt nämlich nicht den Anforderungen und darf nicht in den Handel gelangen, entstehen bedeutende Umweltbelastungen, weil zumindest Anteile der unbrauchbaren Milchprodukte direkt (BSB<sub>5</sub> ca. 70.000 mg/l) oder über das Abwasser (BSB<sub>5</sub> ca. 1.500 mg/l) entsorgt werden müssen. Schon allein die Fermenter-Reinigung nach einem fehlerfermentierten Produktionsansatz erfordert 1.200 l Frischwasser, dem Säure, Lauge, Jod und Chlor zugesetzt werden müssen.

Gegenstand des Projekts ist deshalb die Entwicklung eines DNA-Mikroarray basierten Analysesystems für die Qualitätskontrolle von Milch, Starterkulturen und ausgewählten Milchprodukten. Die DNA-Chip-Technologie erlaubt im Sinne eines produktionsintegrierten Umweltschutzes das gleichzeitige Monitoring vieler fermentationsrelevanter Organismen und Parameter und damit die frühzeitige Erkennung und Vermeidung von umweltbelastenden Fehlfermentationen.

Die Optimierung der DNA-Chip-Technologie für die Analyse von Lebensmitteln erfordert einerseits die Entwicklung des Milch-Chips, einschließlich geeigneter Pipettier-Parameter für seine Herstellung, Daten über seine Lagerungsfähigkeit, und über die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsergebnisse sowie andererseits die Auswahl fermentationsrelevanter Parameter und Organismen für das anschließende Sondendesign. Außerdem gehören eine umfassende Probenvorbereitung von der DNA-Extraktion über die Fragmentierung und Markierung bis hin zur Optimierung der Hybridisierungsreaktion und die abschließende Signalauswertung dazu.

## **3. Verwendete Methoden und Ergebnisse**

### **3.1. Optimierung der Mikroarray-Plattform für die Keimanalytik in der Milchindustrie**

Für die Keimanalytik in der Milchindustrie galt es zunächst eine Mikroarray-Plattform zu entwickeln, die höchsten Anforderungen in den folgenden Bereichen gerecht wird:

### 1. Sensitivität:

Dies bedeutet die Minimierung des Hintergrundsignals sowie eine Maximierung der Hybridisierungssignale, um so ein möglichst hohes Signal- zu Rauschverhältnis zu erzielen. Hierzu galt es, die Eigenfluoreszenz der Slides durch Auswahl geeigneter Glassubstrate zu minimieren sowie durch die Optimierung der Beschichtungs- und Anbindungsbedingungen eine hohe Bindungskapazität für die Fänger-Oligonukleotide zu erreichen.

### 2. Ergebnissicherheit und Reproduzierbarkeit:

Hierfür galt es, Substrate von hoher Oberflächenhomogenität bzgl. der chemischen und physikalischen Eigenschaften herzustellen sowie die Pipettierparameter, die Spotting-Pufferlösungen und die Oligokonzentrationen dergestalt zu optimieren, dass bezüglich Größe und Signalverteilung gleichförmige Spots entstehen. Weiterhin mussten die Produktionsbedingungen der Substratbeschichtung sowie der Arrayherstellung innerhalb einer Charge so standardisiert werden, dass alle Arrays identische Eigenschaften zeigen.

### 3. Routinetauglichkeit:

Hierfür war es erforderlich, standardisierte Produktionsverfahren sowie Qualitätskontrollverfahren einzuführen, die eine gleichförmige Arrayqualität über Chargengrenzen hinaus gewährleisten. Weiterhin mussten Lagerbedingungen und Lagerfähigkeit der Mikroarrays getestet und ggf. optimiert werden. Zusätzlich wurde ein Verfahren zur Slidemarkierung eingeführt, das die automatische Identifizierung der Arrays ermöglicht und so hilft, Verwechslungen in der Routineanalytik zu vermeiden.

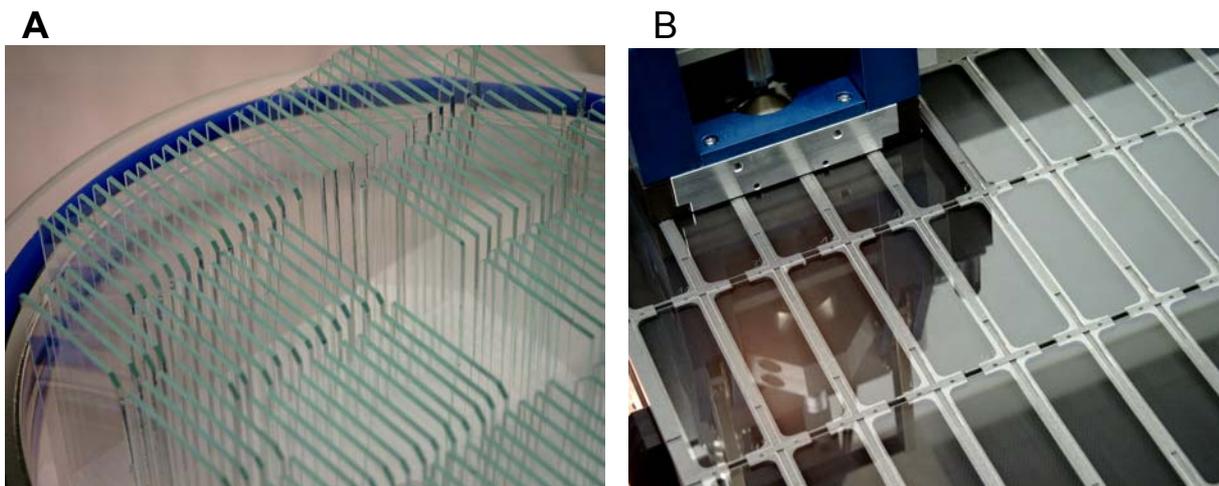


Abb. 1. Produktionsanlage

A: Slide-Reaktor für die chemische Beschichtung von 120 Glassubstraten

B: Top-Spot Pipettierroboter für die Herstellung von Mikroarrays

### 3.1.1. Optimierung der Produktionsparameter

Die oben genannten Anforderungen wurden mit den im Rahmen des Projektes entwickelten Verfahren in vollem Umfang erfüllt. Basierend auf dem Produktionsreaktor für die Oberflächenbeschichtung der Glassubstrate sowie der auf Top-Spot-Technologie basierenden Mikroarray-Produktionsanlage (Abb. 1), die beide unter Reinraumbedingungen der Klasse 100 betrieben werden, wurden standardisierte Protokolle für die Arrayherstellung implementiert. Abb. 2 illustriert die äußerst homogenen Spots, die mit dem eingeführten kontaktfreien Spottingverfahren erzeugt werden können.

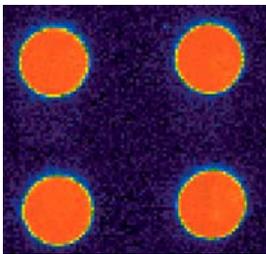


Abb. 2. Vergrößerung von vier parallelen Spots aus einem Array nach erfolgter Hybridisierung. Die jeweilige Signalintensität ist von dunkelblau (geringste Signalintensität) bis gelb (stärkste Signalintensität) mit Falschfarben dargestellt. Die gleichmäßige hellrote Färbung im Spot zeigt die sehr gute Spothomogenität an.

Diese einzigartige Spotqualität ist Voraussetzung der in Abb. 3 dargestellten hohen Array-Qualitäten, die mit dem eingeführten Prozess jetzt in der Routineproduktion erreicht werden können. Beispielhaft dargestellt sind in Abb. 3 die Ergebnisse der Qualitätskontrolle für vier Slide-Produktionschargen. Jede Charge wurde, wie in Abb. 3A beschrieben, anhand eines Hybridisierungsexperimentes getestet und damit unter den tatsächlichen späteren Anwendungsbedingungen geprüft. Abb. 3B zeigt, dass die Spot-zu-Spot-Abweichungen innerhalb eines Arrays eine Standardabweichung von lediglich etwa 5% der mittleren Signalintensität zeigen. Ebenfalls ist gezeigt, dass sowohl die Abweichungen zwischen verschiedenen Arrays einer Charge als auch zwischen den Arrays unterschiedlicher Chargen außerordentlich klein sind. So lagen bei vier unterschiedlichen Chargen, aus denen jeweils drei Stichproben analysiert wurden, die Unterschiede bei den Absolutwerten der mittleren Signalintensitäten in einem Bereich von nur etwa +/- 10%. Das Signal- zu Rauschverhältnis für jede dieser Chargen zeigt darüber hinaus, dass für jedes Array ein großer dynamischer Messbereich von über 1000 vorhanden ist.

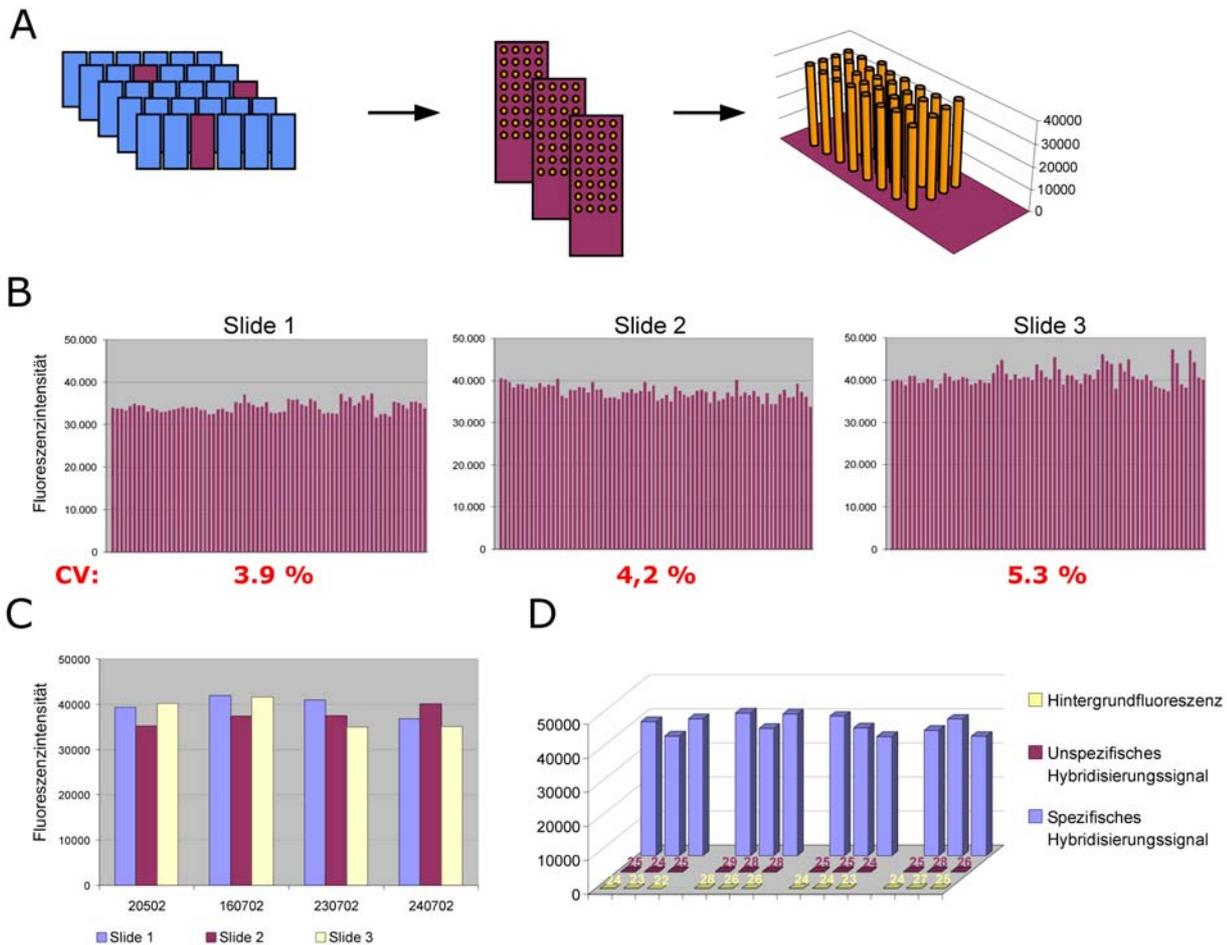


Abb. 3. Kontrolle des Array-Produktionsprozesses

A: Schematische Darstellung des Array-Qualitätskontrollverfahrens. Auf Stichproben einer jeden Slidecharge wird ein Fänger-Oligonukleotid jeweils 72 mal gespottet. Nach der Hybridisierung mit einem komplementären, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid werden die Signalintensitäten mit einem Scanner (Axon / GenePix4000) ausgelesen.

B: Signalintensitäten für je 72 Spots aus drei Stichproben einer Substratcharge

C: Mittlere Signalintensitäten von 3 Stichproben aus 4 verschiedenen Slidechargen

D: Hybridisierungs- und Hintergrundsignale für drei Stichproben aus 4 verschiedenen Slidechargen

### 3.1.2. Lagerung und Versand

Die Lagerung sowohl der beschichteten Slides als auch der fertig bespotteten Arrays wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet. Als optimal erwies sich die Lagerung bei -20 C. So ist eine Aufbewahrung über 6 Monate ohne Qualitätsverlust möglich. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Slides bzw. Arrays unter Schutzgasatmosphäre gelagert werden. Ein entsprechendes Verpackungsgerät sowie gasdichte Folien wurden dafür angeschafft. Der Versand der Arrays erfolgt unter Kühlung in speziell dafür ausgewählten Styroporboxen.

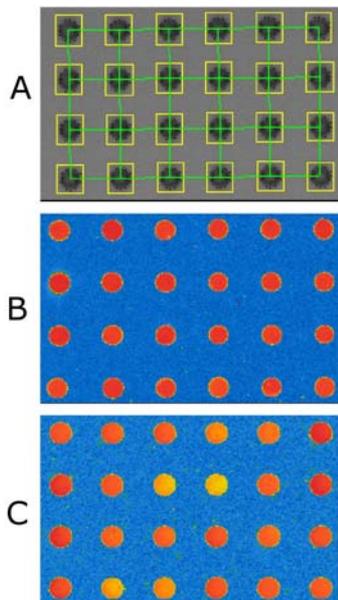


Abb. 4. Ergebnisse der „In-Prozess-“ und Produkt-Endkontrolle

A: „Online“ während der Produktion aufgenommenes Tropfenarray inkl. Hilfslinien zur Auswertung der Spotpositionen und Spotmorphologie.

B: Oligonukleotid-Array nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der die Anwesenheit von DNA in jedem Spot belegt.

C: Ergebnis der Hybridisierung eines Arrays mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden zufälliger Sequenz. Die Signale belegen die Zugänglichkeit der immobilisierten DNA für die Hybridisierungsreaktion. Trotz gleicher immobilisierter DNA-Mengen sind die Signalintensitäten nicht identisch, da die Effizienz der Hybridisierung mit Zufallssequenzen von der Sequenz des Oligonukleotids abhängig ist.

### 3.1.3. Herstellung Routine-tauglicher Mikroarrays

Um die Routinetauglichkeit der Arrays zu gewährleisten, wurde in die „Milch-Chip“-Produktion ein Verfahren zur Online-Tropfenkontrolle integriert, das es gestattet, für jedes Array die Anwesenheit und die Qualität aller Spots zu dokumentieren (Abb. 4A). Dieses Verfahren ermöglicht die Selektion und ggf. das Aussortieren unvollständiger oder fehlerhafter Arrays schon im Rahmen der Produktion. Indem es für jedes Array die Anwesenheit und Qualität eines jeden Spots dokumentiert, können die Hybridisierungssignale in der späteren Analyse den entsprechenden Parametern sicher zugeordnet und das Ergebnis zweifelsfrei interpretiert werden. Die für diese Technik bisher typischen Unsicherheiten bei der Arrayherstellung wurden somit beseitigt. Damit wird dem Bedarf nach höchster Ergebnissicherheit Rechnung getragen. Weitere Kontrollverfahren stellen anhand von Stichproben die Anwesenheit der DNA in jedem Spot sowie die Zugänglichkeit der immobilisierten

DNA für die Nukleinsäurehybridisierung sicher (Abb. 4 B/C). Mit diesem umfangreichen Qualitätssicherungssystem wurden die Grundlagen für die Produktion standardisierter Mikroarrays gelegt, die dem Projektziel entsprechend über Forschungsanwendungen hinaus auch für anspruchsvolle Analysen in der Routine zum Einsatz kommen sollen.

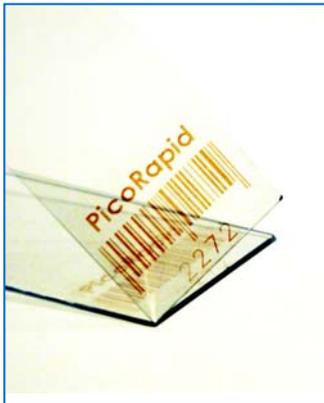


Abb. 5. Markiertes PicoSlide

Der Schriftzug sowie der Barcode und die fortlaufende Nummer wurden mit einem Laser in das Innere des Glassubstrates geschrieben.

Der Code lässt sich dadurch nur schwer modifizieren und gewährleistet so ein hohes Maß an Fälschungssicherheit.

Gemeinsam mit einem in der Glasmarkierung tätigen Unternehmen wurde weiterhin eine Markierungstechnik eingeführt, die es gestattet, in das Glas hinein einen maschinenlesbaren Barcode sowie einen Zahlencode zu schreiben (Abb. 5). So kann bei entsprechendem Bedarf in den Analyselabors der Milchindustrie jedes Mikroarrays bereits vor Produktionsbeginn eindeutig und fälschungssicher markiert werden. Dies ermöglicht nicht nur eine lückenlose Rückverfolgung jedes Arrays bis hin zur Substratbeschichtung, sondern sollte auch die Verwechslungsgefahr im Rahmen der Analyse in den Routinelabors minimieren.

#### **3.1.4. Gesamtzahl hergestellter DNA-Chips**

Für die Milchchip-spezifischen Optimierungsarbeiten am CAG wurden insgesamt über 30 unterschiedliche Mikroarray-Chargen produziert. Insgesamt wurden den Projektpartnern im Laufe der gemeinsamen Arbeit aus Projektmitteln über 700 Mikroarrays zur Verfügung gestellt.

### **3.2. Chipkonfigurierung und Sondendesign**

#### **3.2.1. Auswahl fermentationsrelevanter Mikroorganismen, Anlegen einer Referenzsammlung und Identifikation produktspezifischer Gensequenzen**

Die relevanten Zielgruppenorganismen für die Entwicklung eines spezifischen Nachweissystems auf dem Milch-Chip wurden vor allem mit dem Milchhof Magdeburg abgestimmt. Als wichtigste Vertreter sind neben den fermentationsrelevanten Bakterien der Gattung *Lactococcus* auch folgende humanpathogene Organismen für die Chip-Detektion vorgesehen: *Salmonella*, *E. coli*, „Coliforme“, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Listeria monocytogenes*.

Für die Entwicklung der auf DNA-Sonden basierenden Nachweismethoden ist das Arbeiten mit entsprechenden Referenzorganismen erforderlich. Diese wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen oder aus eigenen Isolaten zusammengestellt (Tab. 1). Nach Austestung verschiedener Template-Präparationsmethoden erwies sich für den notwendigen Austausch der Referenzmaterialien zwischen den am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen die Isolierung der DNA am sichersten.

Nr.	Artname	DSM-Nr.	Nr.	Artname	DSM-Nr.
1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	20481	19	<i>Serratia ficaria</i>	4569
2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	20069	20	<i>Serratia plymuthica</i>	49
3	<i>Rhanella aquatilis</i>	4594	21	<i>Citrobacter gillenii</i>	13694
4	<i>Hafnia alvei</i>	30163	22	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	13771
5	<i>Serratia fonticola</i>	4576	23	<i>Listeria monocytogenes</i>	12464 / 20600
6	<i>Serratia liquefaciens</i>	4487	24	<i>Listeria innocua</i>	20649
7	<i>Serratia proteamaculans</i>	4543	25	<i>Bacillus cereus</i>	345
8	<i>Shigella sonnei</i>	5570	26	<i>Bacillus subtilis</i>	Uni HB
9	<i>Enterobacter agglomerans</i>	3493	27	<i>Bacillus megaterium</i>	Uni HB
10	<i>Citrobacter freundii</i>	30039	28	<i>Staphylococcus aureus</i>	346
11	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	4883	29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50071
12	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	9145	30	<i>Pseudomonas fluoreszenz</i>	Uni HB
13	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	9379	31	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Uni HB

14	<i>Kluyvera cochleae</i>	9406	32	<i>Campylobacter jejuni</i>	4688
15	<i>Escherichia coli</i>	TUM	33	<i>Campylobacter coli</i>	4689
16	<i>Escherichia coli</i>	1103 / 426	34	<i>Campylobacter lari</i>	11375
17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50090	35	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	5365
18	<i>Raoultella planticola</i>	3069			

Tab. 1. Referenzstämme für die Testung der Organismen-Sonden.

Neben der Detektion von fermentationsrelevanten Bakterien soll der Milch-Chip auch den simultanen Nachweis produktbestimmender Gene ermöglichen. Auf diese Weise können genotypische Eigenschaften einer Starterkultur bereits im Vorfeld der Fermentation untersucht werden. Das Vorhandensein unterschiedlicher Gene für die Phagenabwehr reduziert so das Risiko von Fehlfermentationen durch Säuerungsausfall. Die derzeit 47 Literatur-bekanntem Phagenresistenzgene unterteilen sich in vier Gruppen: (1) Verhinderung der Phagenadsorption - 1 Gen, (2) Inhibition der Phagen-DNA Injektion - 1 Gen, (3) Restriktions- und Modifikationsmechanismen zur Erkennung von Fremd-DNA - 11 Gene und (4) Abort der Phageninfektion - 33 Gene. Die genetische Voraussetzung für die Fähigkeit Citrat zu Geschmacksgebenden Komponenten wie Diacetyl, Acetoin oder Acetat umzusetzen, vermindert die Gefahr einer Fehlproduktion aufgrund von unangenehmen Geschmacksfehlern. Da in den Datenbanken noch nicht alle Gene des Citratstoffwechselwegs enthalten sind, konnten nur für 5 der 9 Gene Sonden generiert werden.

Zusätzlich zur Identifikation von fermentationsrelevanten Bakterien und produktspezifischen Genen soll der Milch-Chip auch für die Erkennung von Phagen im Produktionsbereich eingesetzt werden. Hier stellen vor allem die *Lactococcus*-Phagen der Spezies 936, P335 und C2 eine Bedrohung dar. Für jede dieser Spezies lagen mindestens 2 Kompletengenome und zahlreiche Teilsequenzen vor. Nach der Identifikation von konservierten Genregionen durch Anfertigen eines Alignments konnten Gruppensonden für die Phagenidentifikation abgeleitet werden.

### **3.2.2. Optimierung der aus der FISH-Hybridisierung abgeleiteten Sonden auf die für den Chip gewählten Hybridisierungsbedingungen**

Alle auf den Chip aufzubringenden Sonden müssen weitgehend gleiche Schmelzpunkte aufweisen, da die Hybridisierungsbedingungen für alle auf einem Chip befindlichen Sonden identisch sind. Die bereits für die FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) existierenden Sonden für *E. coli*,

*Coliforme*, *Salmonella* und *Listeria* erfordern aber unterschiedliche Temperaturen und Salzkonzentrationen. Durch Verändern der Basenzusammensetzung bzw. durch Verlängern oder Verkürzen der Sonden wurden diese Hybridisierungsbedingungen entsprechend vereinheitlicht. Die Stringenz wurde dann mittels FISH erneut auf Signalstärke und Diskriminierung gegenüber verwandten Spezies getestet. Für die Organismen *E. coli*, *Coliforme* und *Salmonella* war es dadurch möglich, Sonden mit gut angepassten Hybridisierungsbedingungen für die DNA-Chip-Technologie zur Verfügung zu stellen. Die Sonde für *Listeria monocytogenes* musste in Bezug auf die Diskriminierung weitergehend verändert werden. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass es nicht gelungen ist, die bisher ausgewählten, spezifischen Sonden für *Listeria monocytogenes* durch Veränderung der Basenzusammensetzung auf die bestehenden Hybridisierungsbedingungen einzustellen. Erst durch eine Neuentwicklung mit anschließender Spezifitätsprüfung konnte letztendlich eine spezifische Sonde für *Listeria monocytogenes* an die Versuchsparameter der Chip-Hybridisierung angepasst werden. Des Weiteren wurde eine Sonde für thermophile *Campylobacter* Arten (thermophile *Campylobacter* = *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*) entwickelt. Die Entscheidung zur Entwicklung dieser Sonde wurde hinsichtlich des Aspekts getroffen, dass der Stand der Forschung bis dato davon ausgeht, dass nur von den thermophilen *Campylobacter*-Arten ein potenzielles Krankheitsrisiko für den Menschen ausgeht. Alle anderen Arten dieser Gattung sind nicht humanpathogen. Auch diese Sonde konnte auf die bestehenden Hybridisierungsbedingungen eingestellt werden.

Analysen mit den bisher verwendeten Sonden für *Pseudomonas aeruginosa* erbrachten das Ergebnis, dass diese noch keine zufrieden stellende Spezifität aufweisen, um auf dem Chip integriert zu werden.

### **3.2.3. Sondendesign für den Bakterien-, Phagen- und Gen-Nachweis**

Neben den oben genannten Organismen wurden in enger Kooperation mit dem Milchhof Magdeburg weitere genetische Parameter ausgewählt, die den Verlauf einer Fermentation nachhaltig beeinflussen. Da Starterkultur-lyisierende Phagen bzw. mangelnde Phagenabwehr der Starterbakterien als Hauptursache für Fehlfermentationen anzusehen sind, wurden Gruppensonden für die 3 wichtigsten Phagenspezies und 62 Sonden für Phagenresistenzgene entwickelt. Für den Nachweis der Gene, die den enzymatischen Umsatz von Citrat und Lactat zu geschmacksgebenden Komponenten wie Diacetyl, Acetoin, Acetat und 2, 3-Butandiol bzw. CO<sub>2</sub> bestimmen, das bei

unvollständigem Abbau der Ausgangsprodukte zur Bombage und damit zur Unverkäuflichkeit des Produkts führt, stehen derzeit weitere 33 Sonden zur Verfügung.

<i>Zielsequenz</i>	<i>Anzahl der generierten Sonden</i>	<i>Zielsequenz</i>	<i>Anzahl der generierten Sonden</i>
<b>Bakterienidentifizierung:</b>		<b>Phagennachweis:</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	936-Spezies	3
<i>Salmonella spec.</i>	4	c2-Spezies	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	P335-Spezies	5
<i>Enterobacteriaceae</i>	3	P482	3
<i>Escherichia coli</i>	3	<b>Phagenresistenz-Gene:</b>	
<i>Coliforme</i>	1	Adsorption an die STK-Zelle	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	Blockade der DNA-Injektion	2
<i>Bacillus cereus</i>	4	Abbau der Phagen-DNA	22
<i>Lactococcus spec.</i>	3	„Abortive Infection of Phages“	36
<i>Lactococcus ssp.</i>	2	<b>Diacetyl-Metabolismus:</b>	33
		<i>Gesamt</i>	<i>139</i>

Tab. 2. Sondendesign für den Milch-Chip.

### **3.2.4. Aufbau einer phylogenetischen Datenbank für Hefen und Schimmelpilze sowie Sondendesign für relevante Organismen**

Für die praxisorientierte Entwicklung eines Chip-basierten Analysesystems für die Milchindustrie stehen derzeit mehr als 130 Sonden für die spezifische Identifikation von Bakterien, Phagen und produktspezifischen Genen zur Verfügung. Die Spezifität bisher entwickelter Sonden zur Organismenidentifizierung wurde zusätzlich verfeinert, indem unter Verwendung des Softwareprogramms ARB ein Vergleich der 16S rDNA Sequenzen von weiteren Zielorganismen (Typstämme und Isolate aus Realproben) und Nichtzielorganismen (typische Begleitflora in der Milch) durchgeführt wurde.

Aufgrund eines Vorschlags des Projektpartners Milchhof Magdeburg wurde der SONDENSATZ auf dem Milch-Chip um Sonden für den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen erweitert. Diese Organismen können durch hohe Verkeimungen im Produktionsumfeld, unzureichende Pasteurisierung oder durch den Zusatz von Früchten oder Kräutern in Milchlischerzeugnissen

auftreten. Vor allem die osmophilen Hefen *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* und *Z. bisporus*, aber auch andere fermentative Arten wie *S. cerevisiae* und *Pichia* wurden als Hauptverursacher von Beanstandungen (Bombagen, Geruchs – und Geschmacksfehler) identifiziert. Die Auswahl an Produkt-schädigenden Organismen wurde in der letzten Phase des Projektes noch um einige vor allem in fermentierten Milchprodukten auftretende Vertreter der Gattung *Candida* erweitert. Es handelte sich dabei um folgende Arten: *Debaryomyces hansenii* (= *Candida famata*), *Issatchenkia orientalis* (= *Candida krusei*), und *Candida parapsilosis*.

Bei den Schimmelpilzen ist das Hauptaugenmerk auf die hitzeresistenten Sporenbildner *Byssoschlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* und *Talaromyces flavus* sowie auf die toxinbildenden *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten zu legen.

Voraussetzend für die Entwicklung der Sonden war der vollständige Neuaufbau einer 18S rRNA und 26S rRNA Sequenzdatenbank basierend auf öffentlich zugänglichen Sequenzen und eigenen Sequenzierungen. Basierend auf der phylogenetischen Sequenzanalyse dieser Organismen konnten spezifische Sonden für die oben genannten Organismen entwickelt werden (Abb. 6). Bereits während der Entwicklung der Sonden wurden Parameter (Länge des Oligonukleotids, GC- Gehalt, Position des diskriminierenden mismatches etc.) festgelegt, die einen parallelen Einsatz der Sonden auf dem finalen Milch-Chip erlauben. Die Spezifität der Sonden wurden mittels *in situ* Analyse an den entsprechenden Ziel- und Nichtzielorganismen verifiziert. Dabei wurden die Experimente bei identischen Hybridisierungsbedingungen durchgeführt, so dass die Anwendung auf dem Chip möglich wurde.

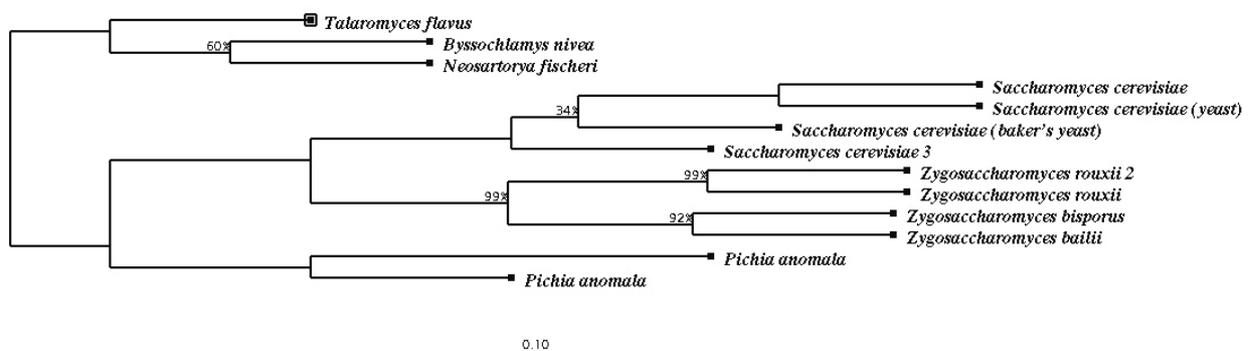


Abb. 6. Phylogenetischer Baum milchrelevanter Schimmelpilze und Hefen. Dieser Stammbaum erleichterte die Auswahl von DNA-Sonden unter dem Aspekt der Verwandtschaft der Stämme.

### 3.2.5. Testen der Sondenfunktion

Zur primären Kontrolle der Sondenfunktion und des Vorgehens bei der Sondauswahl wurden PCR-Produkte hybridisiert. Die PCR-Produkte des jeweiligen Gens wurden mit Psoralen-PEO-Biotin markiert und zur Überprüfung der Sondenfunktion und Kreuzreaktivität, einzeln auf dem DNA-Mikroarray hybridisiert. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Doppelbestimmungen statistisch abgesichert. Jede Sonde befand sich bis zu zehnmal auf dem Array.

Wie aus Abb. 7 zu entnehmen ist, variiert die Stärke der Hybridisierungssignale für die einzelnen PCR-Produkte der Phagenresistenzgene für die Adsorptionsresistenz, die Inhibition der Injektion und der Restriktionsbasierten Gene von 1000 bis 18000 absoluten Signalintensitäten. Für die Sonden Lla1403 S2, ScrFI R S1 und LlaDII S1 konnten nur schwache bzw. im Falle der Sonde Inj-Pip S2 keine Hybridisierungssignale mit dem korrespondierenden PCR-Produkt detektiert werden.

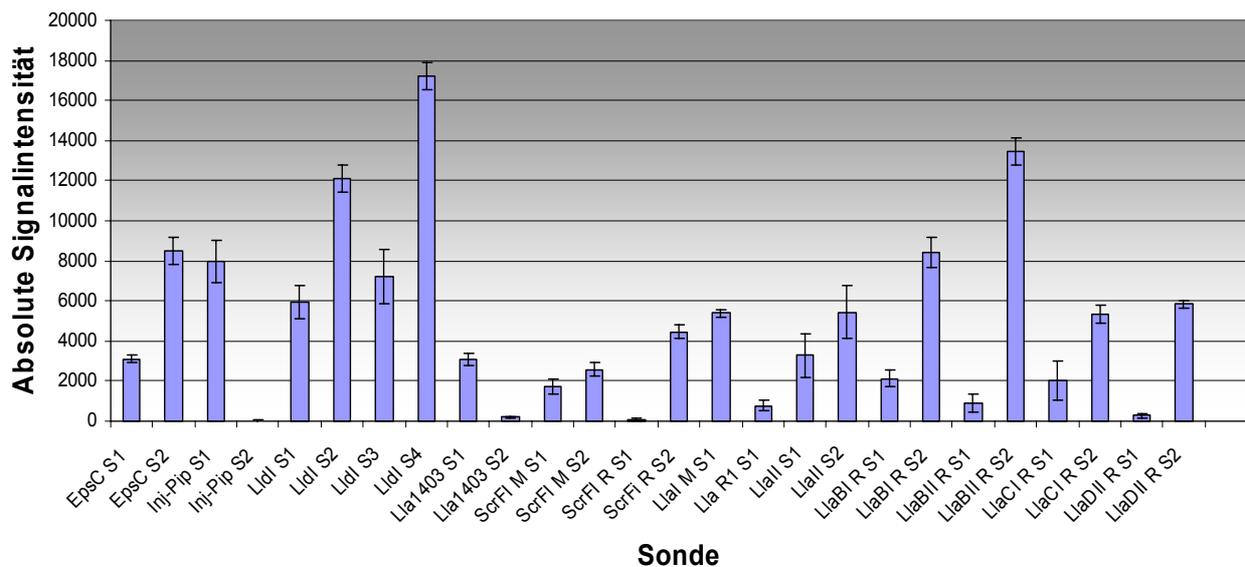


Abb. 7. Hybridisierungssignale der Sonden für die Phagenresistenzgene der Adsorptionsresistenz, der Inhibition der DNA-Injektion und der Restriktion von Fremd-DNA.

In Abb. 8 sind die Hybridisierungsergebnisse der PCR für die Phagenresistenzgene der abortiven Phageninfektion dargestellt. Für alle Sonden konnten spezifische Hybridisierungssignale mit den markierten PCR-Produkten gemessen werden. Wie aus beiden Abbildungen deutlich wird, ist die Stärke der Hybridisierungssignale sehr heterogen. Sie schwankt zwischen 671 bis 25326 absoluten Signalintensitäten.

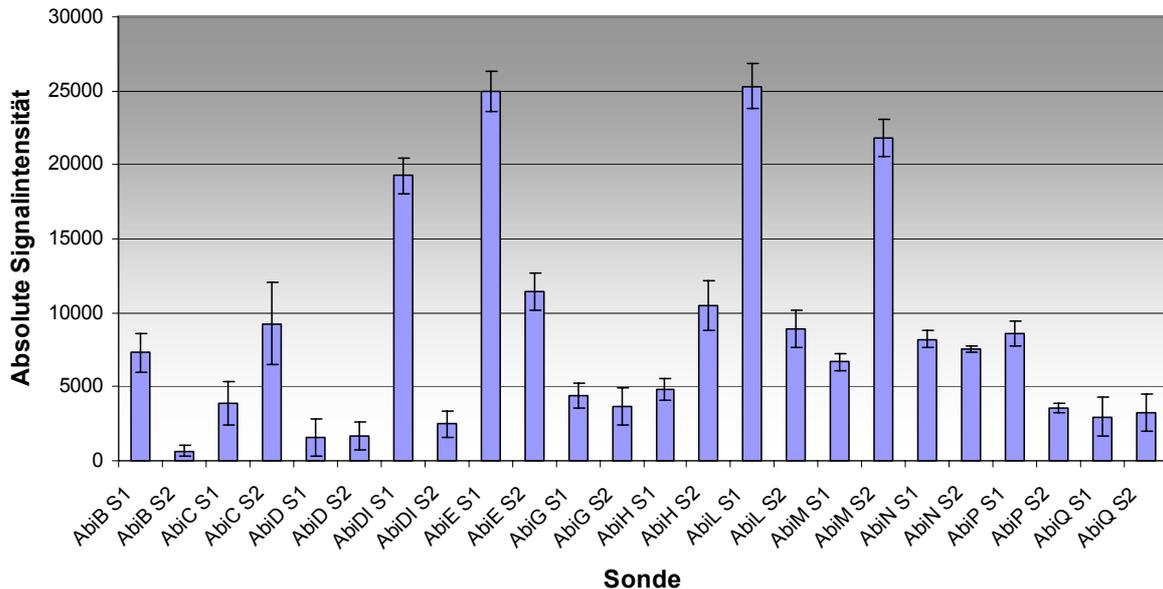


Abb. 8. Hybridisierungssignale der Sonden der Phagenresistenzgruppe "Abortive Infection of Phages".

Insgesamt gesehen konnten alle PCR-Produkte der Phagenresistenzgene spezifisch nachgewiesen werden, es traten keine falsch-positiven Hybridisierungssignale auf. Für eine Anwendung der Technologie in der industriellen Praxis bedeuten die starken Schwankungen in der Signalintensität jedoch, dass die Primärsignale nach der Hybridisierung normalisiert werden müssen. Dafür werden während des gesamten Analysengangs Referenzsonden mitgeführt, die anschließend zur mathematischen Bewertung der Signifikanz des Hybridisierungssignals herangezogen werden.

### **3.3. Etablierung der Methodik für die Probenaufbereitung und die DNA-Chip Hybridisierung**

#### **3.3.1. Extraktion der DNA aus Starterkulturen, Milch und Milchprodukten**

Vor der Analyse auf dem Chip muss die DNA aus der Milch bzw. den Milchprodukten extrahiert, in hybridisierbare Fragmente geschnitten und für den Hybridisierungsnachweis im Mikroarray-Scanner mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Im Hinblick auf DNA-Ausbeute, Zeitaufwand, Fehleranfälligkeit, industrielle Einsetzbarkeit und Automatisierung wurden folgende kommerziell erhältliche Kits für die DNA-Extraktion verglichen: (1) Genomic Tips, Qiagen, (2) DNeasy Kit, Qiagen, (3) InViSorb Food Kit, Invitex, (4) AGOWA<sup>®</sup> mag Maxi DNA Isolation Kit, AGOWA, (5) Wizard<sup>®</sup> Magnetic DNA Purification System for food, Promega, (6) GL Universal

DNA, GL Biotech. Das beste Ergebnis lieferte dabei das AGOWA-Kit mit einer DNA-Ausbeute von ca. 40 µg DNA aus 1 ml Probenmaterial bei einem Zeitaufwand von weniger als 1 Stunde. Das auf magnetischen Partikeln beruhende Extraktionsprinzip dürfte für eine spätere Automatisierung in der industriellen Routineanalytik gut geeignet sein.

Um die Effektivität der DNA-Extraktion aus verschiedenen Matrices zu testen, wurde je 1 ml einer Starterkultur, eines Säureweckers und verschiedener Milchprodukte, wie Joghurt, Milch, Quark, Sahne und Buttermilch mit  $10^8$  Salmonellen versetzt. Eine gegen die 16S rDNA gerichtete, Salmonellen-spezifische PCR mit Verdünnungsreihen der DNA-Extrakte zeigte, dass die Wiederfindungsrate nahezu 100% beträgt. Lediglich bei der DNA-Extraktion aus Quark und Sahne konnte nur DNA von  $10^7$  der  $10^8$  Zellen zurückgewonnen werden.

### **3.3.2. Fragmentierung genomischer DNA aus Starterkulturen oder Milcherzeugnissen**

Zur Fragmentierung der genomischen DNA wurden chemische und mechanische Verfahren verglichen, wie z.B. die Degradierung der DNA durch Ultraschall oder durch die Fenton-Reaktion. Letztere ermöglicht eine sequenzunabhängige Zerkleinerung der DNA durch Hydroxylradikale. Da keine zusätzlichen Geräte beschafft werden müssen, erwies sich die Methode unter dem Aspekt der Einsatzfähigkeit in der industriellen Laborroutine am leistungsfähigsten. Im Modellsystem konnte das höchste Hybridisierungssignal mit einer Fragmentlänge von 1000 bp gemessen werden (vgl. Abb. 11B). Daher wurde die Spaltung der genomischen DNA durch Variation der Inkubationszeit, der Temperatur und der Konzentration der Reagenzien für diese Größe optimiert.

Beispielhaft für die Optimierung ist hier die Abhängigkeit der Reaktion von der Menge an eingesetzter DNA gezeigt. Bei gleichbleibender Konzentrationen der Fenton-Reagenzien wurde die Fragmentierung von DNA-Mengen zwischen 2 und 20 µg genomischer DNA untersucht. Die unterschiedlichen DNA-Mengen wurden für 30 Minuten mit den Fenton-Reagenzien inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Fenton-Reaktion sofort nach der Zugabe der Reagenzien mit einem Stopp-Puffer unterbrochen wurde.

Wie aus Abb. 9 zu entnehmen ist, wurde die genomische DNA unterschiedlich stark fragmentiert. Die unfragmentierte gDNA der Negativ-Kontrolle wurde auf Grund ihrer Größe nicht komplett im 1 % Agarosegel aufgetrennt. Höher molekulare DNA ist noch in der Geltasche sichtbar. Durch die Extraktion der DNA wurde ein Teil der gDNA durch Scherkräfte degradiert und ist in Form einer Bande bei ca. 50 kb und einem diffusen Bandenschmier zu erkennen. Die anderen Spuren zeigen

unterschiedliche DNA-Mengen nach der Fragmentierung. Die Spur mit 2 µg DNA zeigt deutlich die erfolgreiche Fragmentierung in DNA-Größen unter 750 bp. Mengen von 5 µg bis 20 µg konnten ebenfalls fragmentiert werden, dabei ist die Abhängigkeit der Fragmentgröße von der DNA-Konzentration zu erkennen. Eine Menge von 5 µg DNA weist Fragmentgrößen unterhalb von 1000 bp, 10 µg hingegen unter 1500 bp auf. Bei einer DNA-Menge von 15 µg bzw. 20 µg DNA wird die gDNA in Fragmente kleiner als 4 kb bzw. 8 kb gespalten.

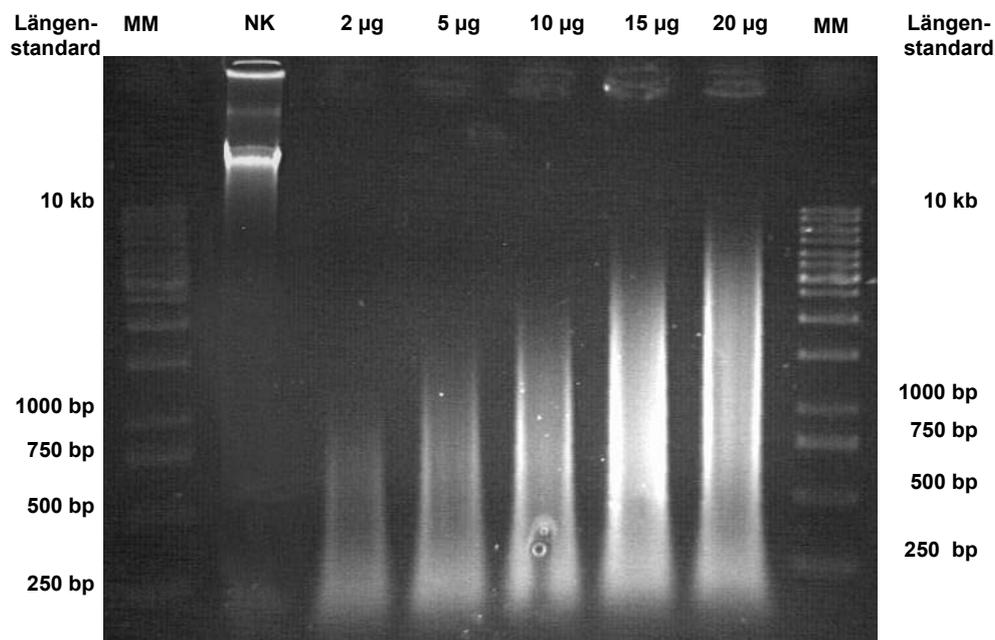


Abb. 9. Abhängigkeit der Fragmentgröße von der DNA-Konzentration.

Durch die Variation von Zeit, Konzentration und Temperatur konnte die Fragmentierung von genomischer DNA für Fragmentgrößen unterhalb von 1000 Basenpaaren weiter optimiert und ein reproduzierbares und schnelles Protokoll für die Fragmentierung von gDNA entwickelt werden.

### 3.3.3. **Markierung genomischer DNA**

Zur Erhöhung der Signalintensität und im Hinblick auf ihren Einsatz in der Chip-Hybridisierung wurden verschiedene DNA-Markierungsmethoden verglichen, die eine Mehrfachmarkierung der DNA erlauben. Mit dem „random primed labelling“, dem Einbau von Fluorophoren durch Nick-Translation oder durch Markierung von genomischer DNA mit Konjugaten aus Psoralen-Biotin und Streptavidin-Cy5 (Abb. 10) können derzeit Einbauraten von 1 Fluorophor pro 20 bis 40 Basen erreicht. Da die beiden ersten Methoden für die Routineanwendung in der Chip-Hybridisierung aus

wirtschaftlichen Gründen zu teuer sind, wurde für die letztgenannte Methode die Psoralen-Biotin-Konzentration, die Inkubationszeit und das Volumen der Crosslinking-Reaktion bzw. die Streptavidin-Cy5-Konzentration und deren Inkubationszeit für den Einsatz der Markierungsmethode in der DNA-Chip-Hybridisierung optimiert. Durch Einführung eines zusätzlichen Blockierungsschrittes konnte das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis weiter verbessert werden.

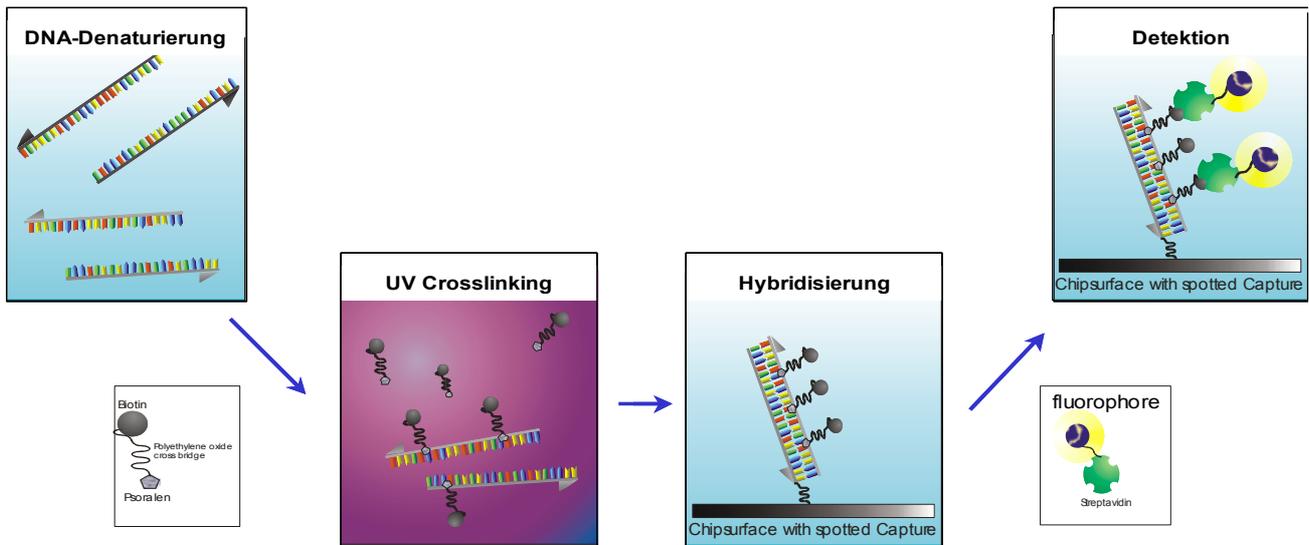


Abb. 10. Schema zur Steigerung der Signalintensität durch Mehrfachmarkierung der DNA durch einen Psoralen-Biotin-Streptavidin-Cy5-Komplex.

### 3.3.4. **Direkter Vergleich der Signalintensitäten von endmarkierter und Psoralen-PEO-Biotin markierter DNA**

Zur Verdeutlichung der Vorteile einer Mehrfachmarkierung wurde die Psoralen-PEO-Biotin-Markierung mit der Endmarkierung von PCR-Produkten verglichen (Abb. 11). Die Signalintensität nahm bei der Endmarkierung mit der Länge der PCR-Produkte deutlich ab (siehe Abb. 11 A), während die Signalintensität bei der Psoralen-PEO-Biotin Markierung bis zu einer Länge von 1077 Basenpaaren zunahm (siehe Abb. 11 B). Beim längsten Psoralen-PEO-Biotin markierten PCR-Produkt konnte im Vergleich zum (nur) endmarkierten PCR-Produkt eine Steigerung der Signalintensitäten um den Faktor 30 gemessen werden. Die Hybridisierung von Psoralen-PEO-Biotin-markierter DNA führt also zu einer erheblichen Steigerung der Sensitivität der bisher üblichen Mikroarray-Verfahren.

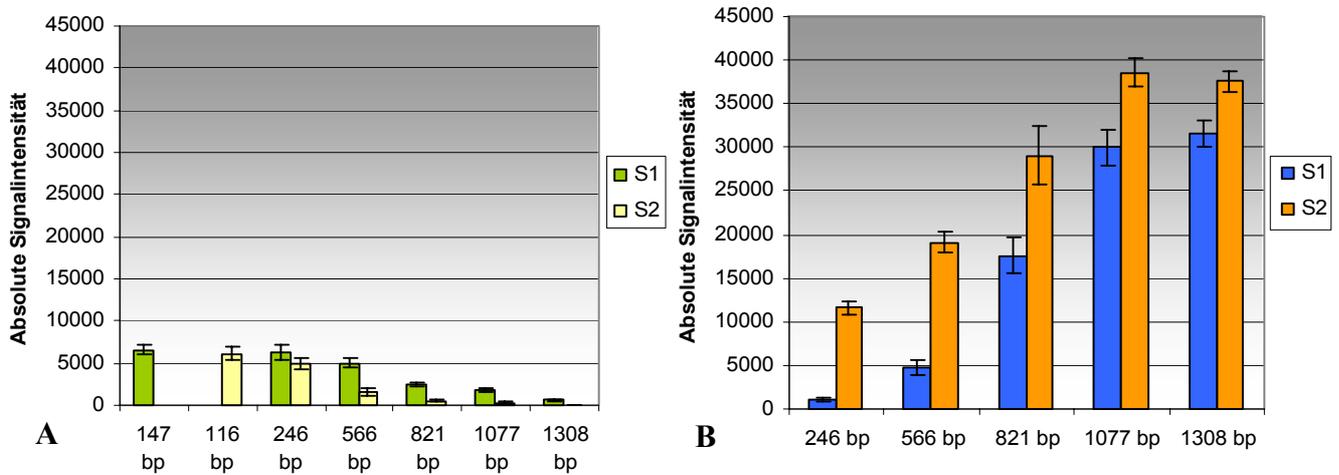


Abb. 11. Direkter Vergleich der Hybridisierungssignale bei der Endmarkierung (A) und der Psoralen-PEO-Biotin Markierung (B) von PCR-Produkten.

### 3.3.5. Optimierung der Psoralen-PEO-Biotin Markierung für den direkten Nachweis von genomischer DNA aus Milchprodukten

Für den direkten Nachweis von genomischer DNA auf dem DNA-Mikroarray wurden die einzelnen Schritte des Markierungs- und Detektionsprotokolls optimiert. Im Folgenden sind beispielhaft die Optimierung der Psoralen-PEO-Biotin-Konzentration und der Streptavidin-Cy5-Zugabe dargestellt.

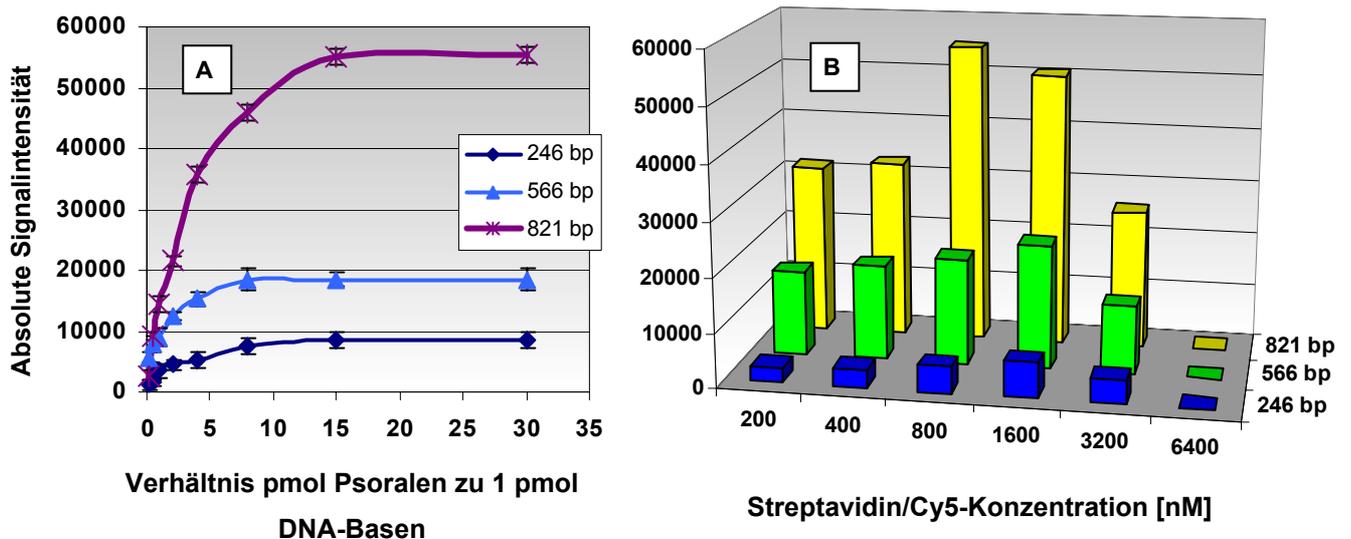


Abb. 12. Optimierung der Markierungsreaktion.

A: Intensität des Hybridisierungssignals bei steigender Psoralen-Konzentration in Abhängigkeit von der Länge des PCR-Produktes

B: Optimierung des Farbreaktionsschritts: Steigende Streptavidin-Cy5-Konzentration

In Abb. 12 A ist die Signalintensität in Abhängigkeit vom steigenden Verhältnis der Konzentrationen des Psoralen-PEO-Biotin Reagenzes zu der Anzahl an DNA-Basen aufgetragen. Ab einem Markierungsverhältnis von 15:1 (Psoralen-PEO-Biotin zu DNA Base) ist die Sättigung der Signalintensität zu erkennen.

Der Nachweis der spezifischen Hybridisierung findet über die Bindung von Streptavidin-Cy5 an die biotinylierte DNA statt. Wie aus Abb. 12 B hervorgeht, nimmt die absolute Signalintensität bis zu einer Konzentration von 1000 nM zu und sinkt ab einer Konzentration von 1600 nM wieder. Bei dieser Konzentration erhöht sich das durch unspezifische Bindung des Streptavidin-Cy5 an die Chip-Oberfläche hervorgerufene Hintergrundsignal stark. Dies schlägt sich in der absoluten Signalintensität, die sich aus der Differenz aus Signal und Hintergrund ergibt, negativ nieder.

### **3.3.6. *Hintergrundreduktion durch Optimierung des Hybridisierungs- und Waschprotokolls***

Bei der Hybridisierung von PCR-Produkten werden 100 ng eingesetzt, während bei komplexen Hybridisierungen mit genomischer DNA von Milchprodukten bis zu 20 µg verwendet werden müssen. Die Menge an biotinylierter DNA, die unspezifisch an die Chip-Oberfläche binden kann, ist hierbei stark erhöht und verstärkt das unspezifische Hintergrundrauschen. Durch Optimierung der chemischen Zusammensetzung der Puffer sowie der Inkubationszeit des Prähybridisierungs-, Hybridisierungs-, Wasch- und Farbdetektionsschrittes konnte letztlich durch Kombination von BSA, Heringssperma und Milchpulver eine Hintergrundreduktion mit einem um den Faktor 5 verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden.

### **3.3.7. *Einfluss der Fragmentlänge auf die Hybridisierung genomischer DNA***

Wie aus Abb. 11 B hervorgeht, beeinflusst die Fragmentlänge der Target-DNA die Signalintensität der Hybridisierungsreaktion. Zur Optimierung des Fragmentierungsschrittes wurden 10 µg Starterkultur-DNA für 5, 7.5, 10, 12.5 und 15 min fragmentiert, um unterschiedliche Längen für die Markierung und Hybridisierung von genomischer DNA zu erhalten. Beim Vergleich der Hybridisierungssignale zeigt die Starterkultur-DNA mit Fragmentgrößen unter 1000 bp die höchsten Signalintensitäten (Abb. 13). Längere Fragmente weisen schlechtere Signalintensitäten

auf, vermutlich aufgrund ihrer sterischen Hinderung. Kürzere Fragmente können nur weniger Farbstoffe pro DNA Molekül aufnehmen und weisen deshalb geringere Signalintensitäten auf.

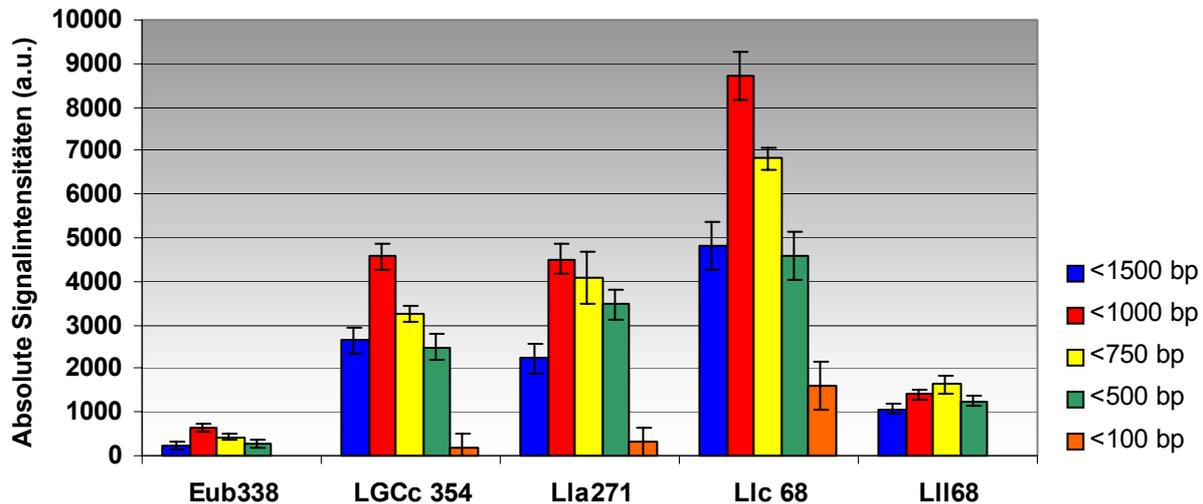


Abb. 13. Einfluss der Fragmentlänge auf die Hybridisierung der genomischen DNA aus Starterkulturen dargestellt am Beispiel ausgewählter Organismen-spezifischer Sonden.

### **3.4. Anwendbarkeit der Hybridisierung genomischer DNA unter Praxisbedingungen**

Um die industrielle Einsetzbarkeit der im Rahmen des Projekts etablierten Methodik zu überprüfen, wurde die DNA aus handelsüblichen Milchprodukten wie Milch, Sahne, Quark, Joghurt und Buttermilch extrahiert. Im Folgenden ist beispielhaft die Analyse einer Starterkultur dargestellt, die für die Herstellung von Speisequark verwendet wird. Die in Abb. 14 gezeigten Sonden sind einerseits spezifisch für die Starterkulturorganismen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Llc 68) oder ssp. *lactis* (Lli 68), andererseits kommen aber auch übergeordnete Gruppensonden für den allgemeinen Nachweis von Eubakterien (Eub 338), LowGC Gram-Positiven-Organismen (LGC 354) oder für die Gattung *Lactococcus* (Lla 271) zum Einsatz. Die Zuverlässigkeit der Hybridisierungsergebnisse für die Phagenresistenzgene *EpcC*, *LldI*, *Lla1403*, *LlaII*, *LlaBI* und *LlaBII* wurde mit Hilfe eines spezifischen PCR-Nachweises überprüft.

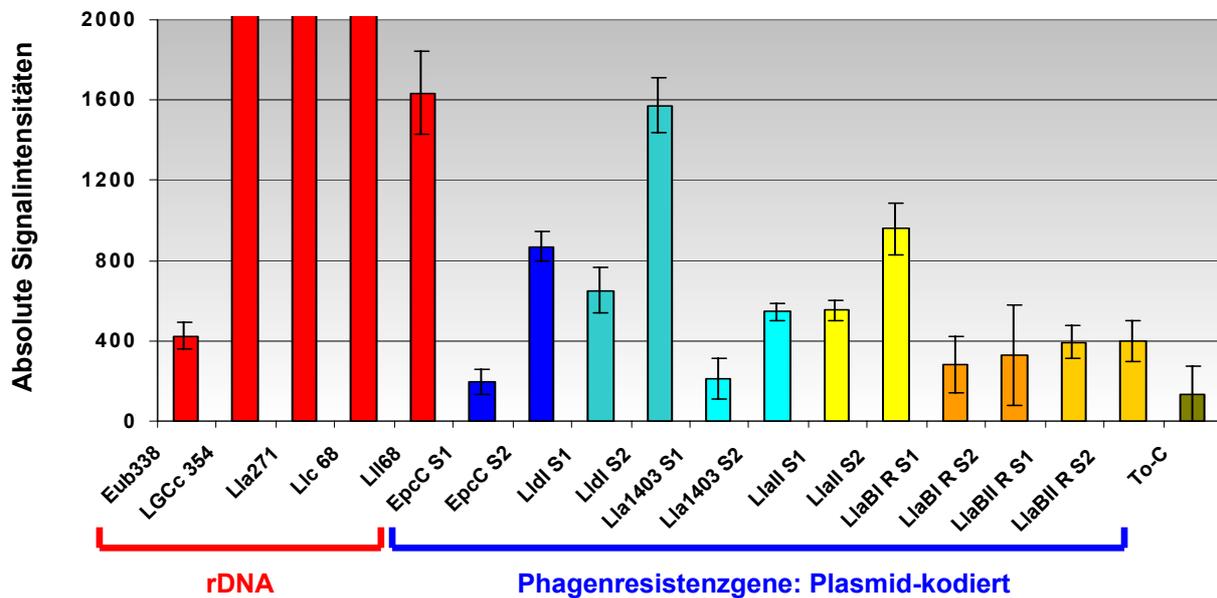


Abb. 14. Chip-Analyse einer Starterkultur zur Herstellung von Speisequark

### 3.4.1. Nachweisgrenze von *Psoralen-PEO-Biotin*-markierter DNA

Die Nachweisgrenze von endmarkierten und Psoralen-PEO-Biotin markierten PCR-Produkten wurde anhand eines Modellsystems mit unterschiedlich langen PCR-Produkten getestet. Die markierten PCR-Produkte mit einer Länge von 246 bp, 566 bp und 821 bp wurden einzeln auf dem DNA-Mikroarray in den Konzentrationen 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM hybridisiert. Die Hybridisierung der Psoralen-PEO-Biotin markierten PCR-Produkte wurden mit 800 nM Streptavidin-Cy5 auf dem DNA-Mikroarray nachgewiesen. Die endmarkierten PCR-Produkte konnten bis zu einer Konzentration von 1 nM (100 fmol/100 µl) identifiziert werden. Konzentrationen unter 1 nM waren mit der Cy5-Endmarkierung nicht mehr detektierbar (Daten nicht dargestellt).

Im Gegensatz dazu, konnten PCR-Produkte, die mit Psoralen-PEO-Biotin markiert worden waren, in viel geringeren Mengen detektiert werden. Wie aus Abb. 15 zu entnehmen ist, wurden noch Fragmente bis zu einer Konzentration von 10 pM nachgewiesen. Das entspricht bei einem Hybridisierungsvolumen von 100 µl einer DNA-Menge von 1 fmol.

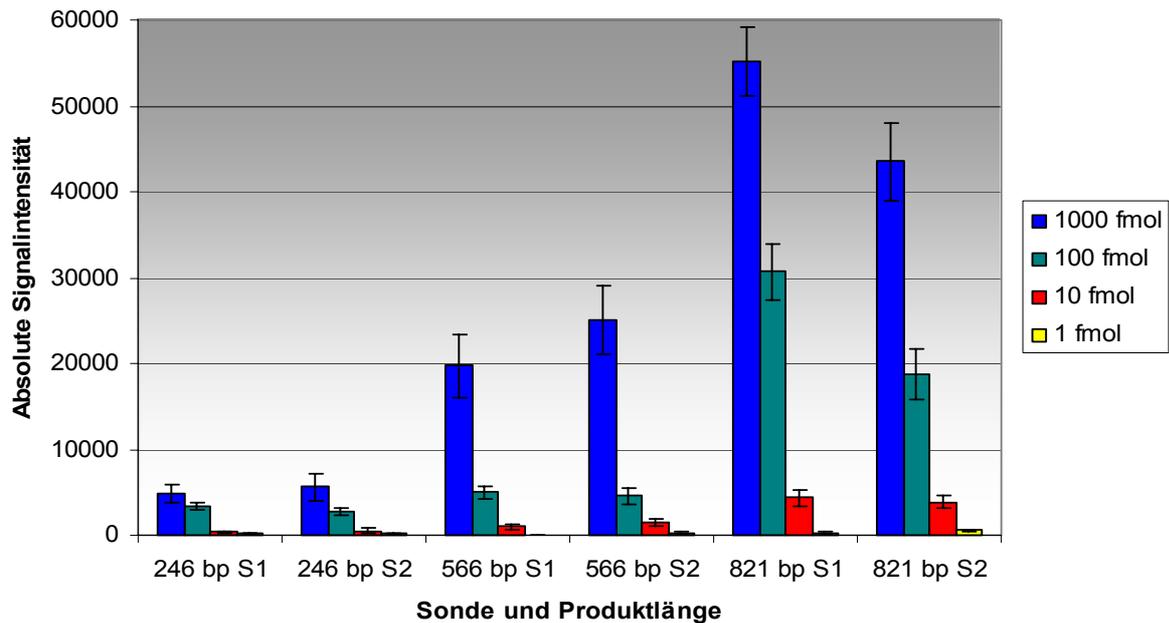


Abb. 15. Nachweisgrenze für Psoralen-PEO-Biotin markierte PCR-Produkte.

Für den direkten Vergleich der Nachweisgrenzen beider Markierungen wurden die Hybridisierungsergebnisse des PCR-Produktes 821 bp für die Sonde S1 von 1000 fmol bis 1 fmol end- und Psoralen-PEO-Biotin-markierter DNA logarithmisch dargestellt (Abb. 16). Während die Nachweisgrenze bei der Endmarkierung bei 100 fmol lag, konnten bis zu 1 fmol Psoralen-PEO-Biotin markierter DNA nachgewiesen werden. Die Sensitivität konnte somit durch die Psoralen-PEO-Biotin Markierung im Vergleich zur Endmarkierung um den Faktor 100 gesteigert werden.

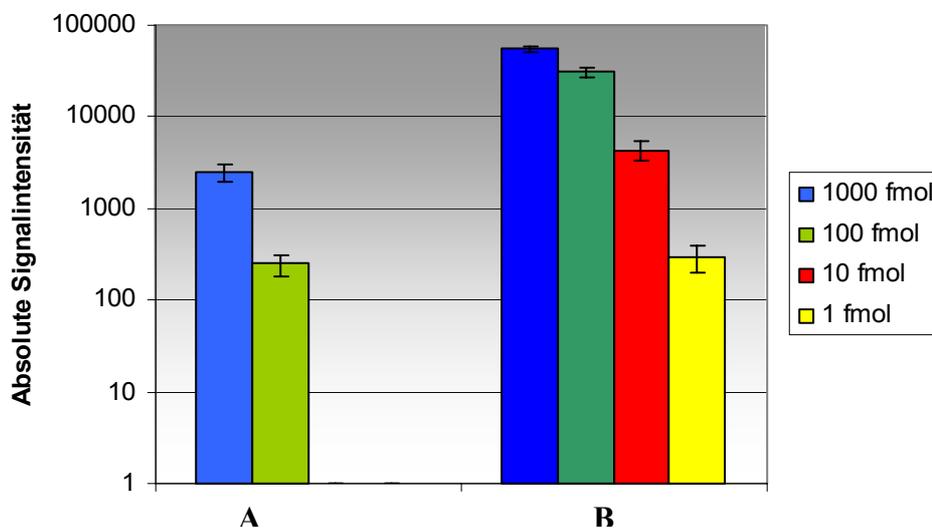


Abb. 16. Vergleich der Nachweisgrenze für endmarkierte (A) und Psoralen-PEO-Biotin markierte DNA (B) am Beispiel der Hybridisierung des 821 bp langen PCR-Produktes.

### 3.4.2. Nachweisgrenze der rDNA-Gene bei der Hybridisierung von genomischer DNA

Die Nachweisgrenze der rDNA-Gene bei der direkten Hybridisierung von genomischer DNA wurde durch die Hybridisierung von unterschiedlichen Mengen genomischer DNA aus *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bestimmt. Der DNA-Gehalt wurde nach dem Fragmentieren gemessen. Es wurden 5, 10 bzw. 15 µg genomische DNA mit Psoralen-PEO-Biotin markiert und hybridisiert.

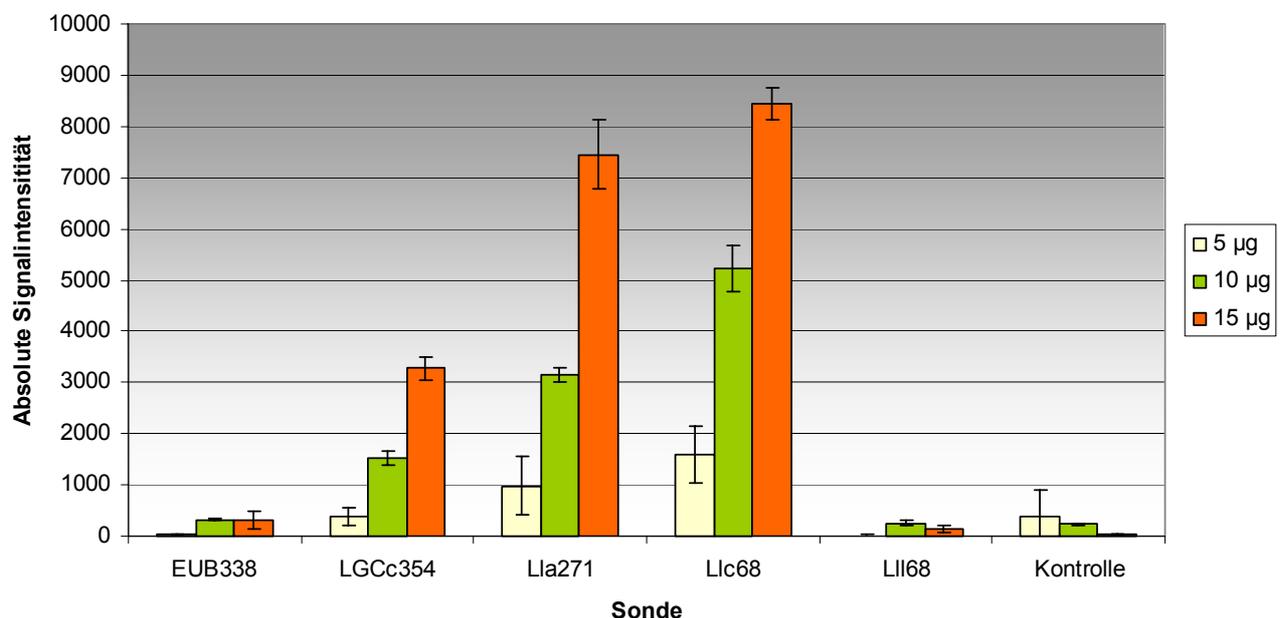


Abb. 17. Nachweisgrenze für den direkten Nachweis von genomischer DNA aus *L.l.* ssp. *cremoris* auf dem DNA-Mikroarray.

Wie aus der Abb. 17 zu erkennen ist, zeigten die eingesetzten Mengen von 10 und 15 µg gDNA bei allen Sonden Hybridisierungssignale. Bei der Hybridisierung von 5 µg genomischer DNA, konnte für die Sonde EUB338 kein Hybridisierungssignal mehr detektiert werden. Die restlichen Sonden wiesen bei dieser Menge noch schwache Signale auf. Die Nachweisgrenze für die Detektion der rDNA-Gene liegt somit bei ca. 5 µg genomischer DNA. Für die Detektion von Bakterien sollte demnach mindestens 5 µg genomische DNA eingesetzt werden, um noch Hybridisierungssignale messen zu können.

### 3.4.3. Nachweis von *Listeria innocua* und *Salmonella choleraesuis* durch DNA-Chip-Hybridisierung

Beispielhaft für eine DNA-Chip-Hybridisierung ist hier der Nachweis der humanpathogenen Organismen *Salmonella choleraesuis* 4883 und *Listeria innocua* DSMZ 20649 nach der Optimierung des Hybridisierungsprotokolls dargestellt. Ihre DNA bindet an die Sonden Lm1 und Lm2 bzw. Sal1 und Sal2. Die Sonden Eub338, Eubv338 und LGC354 stellen Gruppensonden dar, die mit allen Eubakterien bzw. mit der Gruppe der LowGC Gram-positiven ein Hybridisierungssignal zeigen. Bei der hier verwendeten Gesamtsonde für *Bacillus cereus* BCG2 tritt ein falsch positives Signal auf. Sie wurde für weitere Hybridisierungen nicht mehr herangezogen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in diesem Teilprojekt erarbeiteten Verfahren zur Extraktion, Fragmentierung und Markierung der genomischen DNA für die Detektion ausgewählter Organismen mittels DNA-Chip-Hybridisierung mit bestem Erfolg einsetzbar sind.

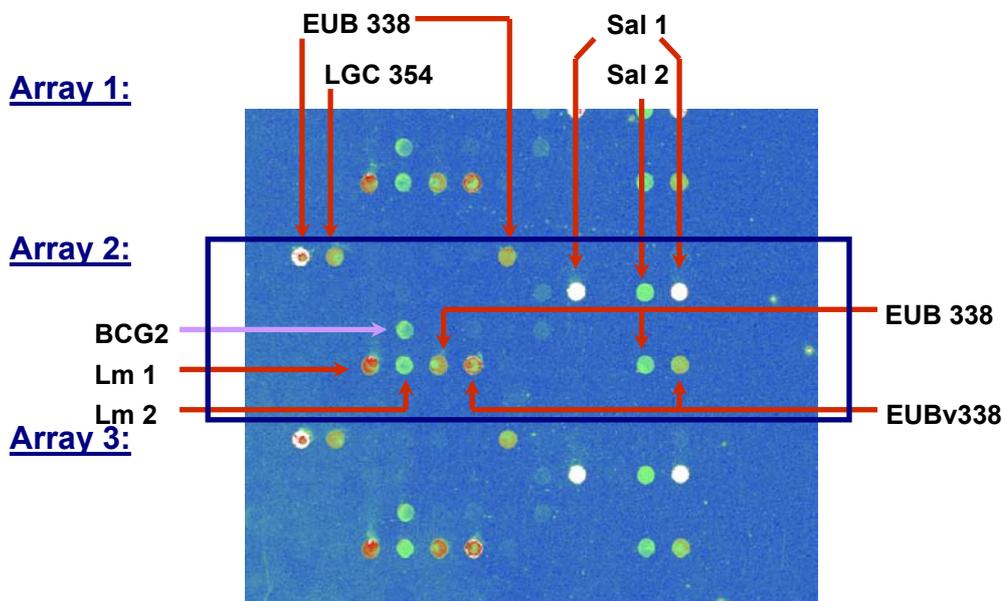


Abb. 18. Gleichzeitiger Nachweis von *Listeria innocua* DSMZ 20649 (Sonden Lm1 und Lm2) und *Salmonella choleraesuis* 4883 (Sonden Sal1 und Sal2).

### 3.4.4. Sondenspezifität und Kreuzreaktivität

Die Spezifität der Sonden wurde durch die Hybridisierung von genomischer DNA aus Reinkulturen überprüft. Beispielhaft ist hier die Unterscheidung der beiden Subspezies des

Starterkulturorganismus *Lactococcus lactis* dargestellt. Die Hybridisierung von genomischer DNA aus *L.l. ssp. lactis* auf dem DNA Mikroarray führte zu Hybridisierungssignalen für die Sonde EUB338, LGCc354, Lla271 und Lll68. Die Sonde Llc68, für den Nachweis von *L.l. ssp. cremoris*, zeigte keine Signalintensitäten (siehe Abb. 19). Im Gegensatz dazu führt die Hybridisierung von genomischer DNA aus *L.l. ssp. cremoris* zu Signalintensitäten der Sonde EUB338, LGCc354, Lla271 und Llc68. Es konnten keine Signalintensität für die Sonde Lll68 nachgewiesen werden, die *L.l. ssp. lactis* detektiert (Abb. 19). Die Hybridisierung von genomischer DNA führte lediglich bei den dargestellten Sonden zu Hybridisierungssignalen. Die über 100 weiteren Sonden, die sich auf dem Chip befanden, zeigten das richtige Ergebnis, also keine Fluoreszenzsignale. Aufgrund der umfangreichen Datenmenge wurde auf eine detailliertere Darstellung verzichtet.

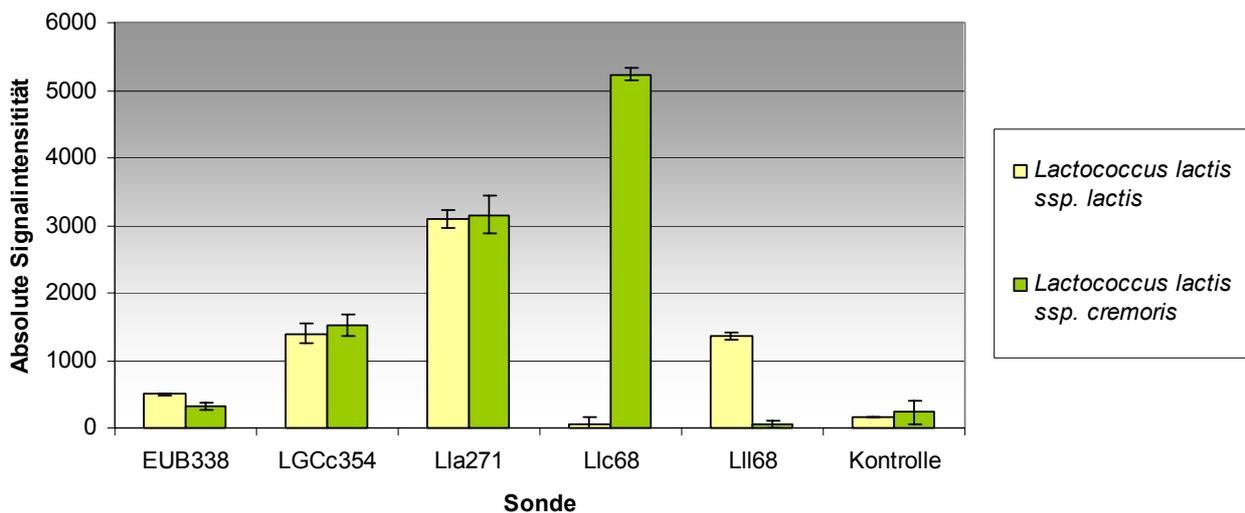


Abb. 19. Überprüfung der Spezifität für die Hybridisierung von genomischer DNA.

Im weiteren Verlauf der Kreuzreaktivitätstests wurden neben den für Quarkfermentationen typischen Bakterien auch andere, z.T. pathogene Bakterien wie z.B. *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spec.*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, und *Staphylococcus aureus* in die Tests miteinbezogen. Wie Abb. 20 zeigt, treten bei der Hybridisierung von *Bacillus cereus* (A), *Pseudomonas fluorescens* (B), *Enterobacter aerogenes* (C) und *Proteus mirabilis* (D) sehr unterschiedliche, bereits mit dem Auge unterscheidbare Hybridisierungsmuster auf. Neben dem regelmäßigen Muster der Positivkontrollen lassen sich bei allen Hybridisierungen die Signale der Eubakterien-Sonde EUB338 erkennen. Zusätzlich leuchten jeweils einige wenige klassen-, gattungs-, familien- oder art-spezifische Sonden, während die meisten Sonden, wie z.B. die Sonden

für die Phagenidentifikation oder für die Phagenresistenzgene ein negatives Signal und somit keine Kreuzreaktivität zeigen. Obwohl sich die einzelnen Bakterien bereits jetzt anhand ihres Musters eindeutig identifizieren lassen, besteht nach wie vor die Notwendigkeit einige Sonden weiter zu optimieren, um für jeden Organismus bzw. jede genetisch manifestierte Eigenschaft bis zu drei Sonden zur Verfügung zu haben, die keinerlei Kreuzreaktivität aufweisen.

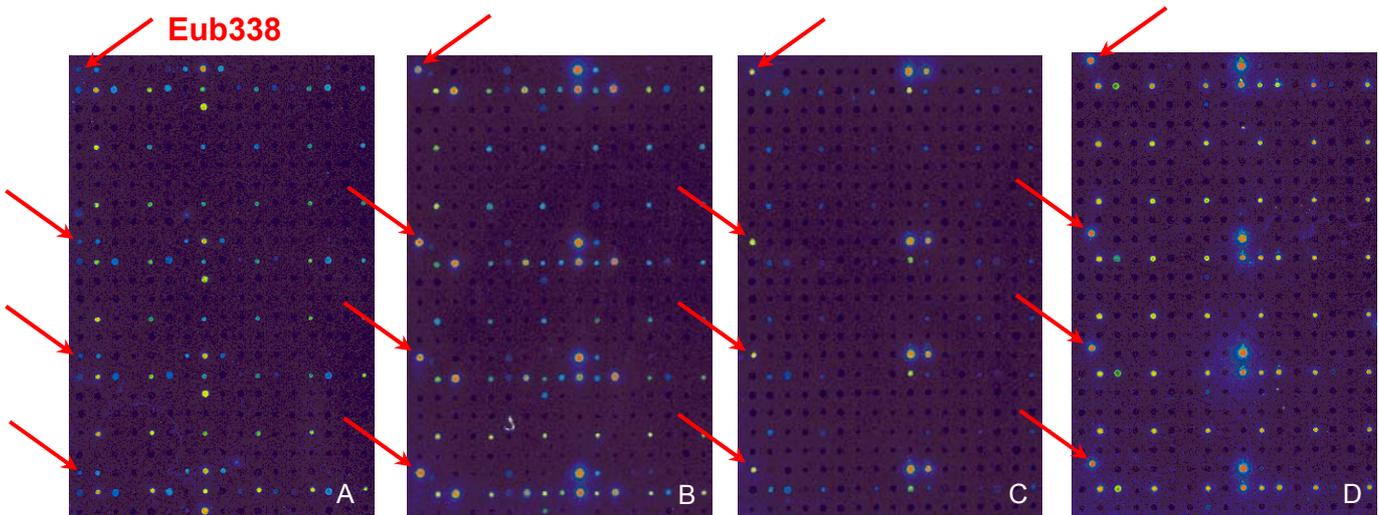


Abb. 20. Hybridisierung pathogener Bakterien: *Bacillus cereus* (A), *Pseudomonas fluorescens* (B), *Enterobacter aerogenes* (C) und *Proteus mirabilis* (D).

### 3.4.5. Praxisbeispiel: Nachweis von Phagen-DNA in Molkeproben

Für den Nachweis der drei wichtigsten Phagenspezies wurden Gruppensonden entwickelt, die eine Differenzierung zwischen den Spezies 936, c2 und P335 erlauben. Um dies zu überprüfen wurden die Typphagen der einzelnen Spezies angezogen und anschließend die DNA extrahiert, fragmentiert, markiert und hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung mit der DNA des Phagen P008, dem Typphagen der 936 Spezies, ist exemplarisch in Abb. 21 dargestellt. Die 936-Sonden binden die Target-DNA und führen zu einem starken Signal. Es kommt zu keinen nennenswerten Kreuzhybridisierungen mit Sonden anderer Phagenspezies. Lediglich die speziell für den Nachweis von P482, einem neuen Phagen der 936 Spezies, entwickelten Sonden, zeigen schwache Signale. Die Spezieszugehörigkeit erlaubt kein Sondendesign für P482 bei dem nicht eine gewisse Restähnlichkeit zur Sequenz der 936 Phagen besteht. Diese verbleibende Sequenzähnlichkeit führt zu einer geringen Bindung der Target-DNA an die P482 Sonden.

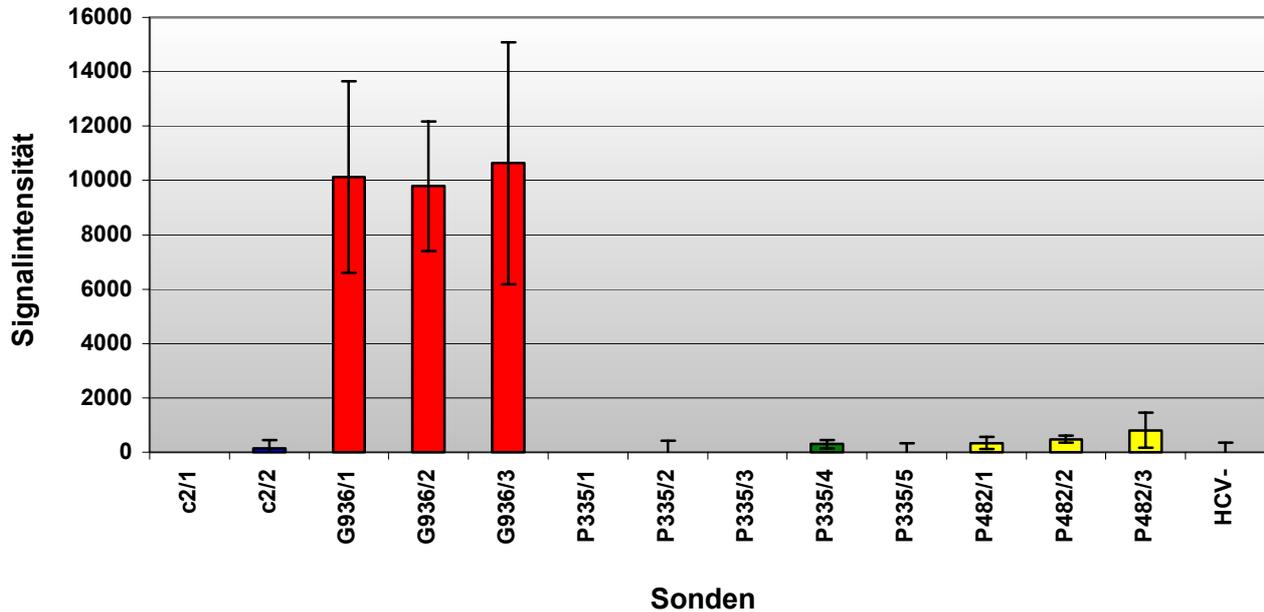


Abb. 21. Chip Hybridisierung mit DNA des Phagen P008 zur Überprüfung der SONDENSPEZIFITÄT

Im Gegensatz dazu ist in Abb. 22 eine Hybridisierung mit der DNA des Phagen P482 dargestellt, die aus einer Molkeprobe extrahiert wurde. Die P482-spezifischen Sonden zeigen hier sehr starke Signale. Das Muster dieser Hybridisierung weist deutliche Unterschiede zu einer Hybridisierung mit P008 Phagen-DNA auf. Zusätzlich zu den Signalen der P482-Sonden sind auch Signale der 936-Sonden erkennbar. Eine Unterscheidung zwischen Phagen der Spezies 936 und dem extrem virulenten Phagen P482 ist somit möglich.

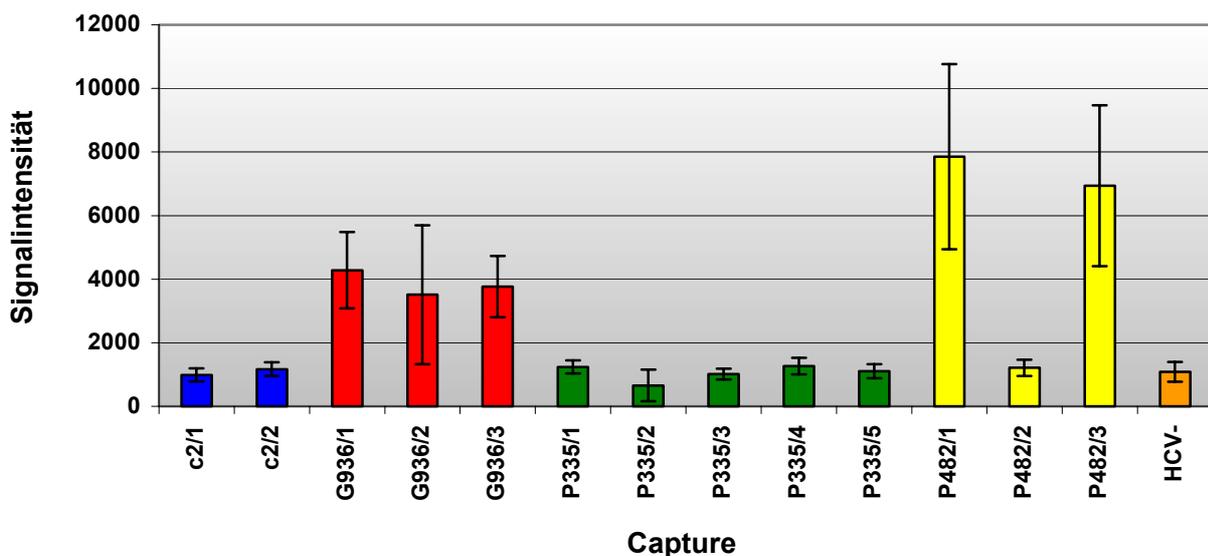


Abb. 22. Nachweis des zur 936 Spezies gehörenden Phagen P482 in einer kontaminierten Molkeprobe des Milchhofs Magdeburg.

### **3.4.6. Praxisbeispiel: Vergleichende Analyse zweier Starterkulturen für die Quarkherstellung**

Für die DNA-Chip Analyse von Starterkulturen, Milch und Milchprodukten stehen inzwischen über 130 projektspezifische Sonden zur Verfügung, die die Detektion von ca. 50 genetisch manifestierten Charakteristika zulassen. Im Folgenden wurden zwei Starterkulturen, die bei der Herstellung von Speisequark verwendet werden, untersucht. Wie die in Abb. 23 und Abb. 24 dargestellte Hybridisierung der Sonden Eub338, LGCc354, Str531, Lla271, Lla1298 und Lla1304 zeigt, bestehen beide Kulturen typischerweise aus Bakterien der Spezies *Lactococcus lactis*. Während in Probat 505 die beiden Subspezies nachgewiesen werden konnten, traten bei der Chip-Hybridisierung mit Probat 8/0 nur Signale bei der für die Subspezies *L. lactis* ssp. *cremoris* spezifischen Sonde Llc68 auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführten Analysen (vgl. Doktorarbeit C. Glöckner).

Neben der Analyse der Starterkulturbakterien erlaubt der DNA-Chip auch die Identifikation der wichtigsten, in der Milchindustrie auftretenden Keime. Bacillen werden beispielsweise durch die drei unabhängigen Sonden BCG483, BCG1394 und Bcer204 nachgewiesen, Listerien können durch die Sonden Lm161, Lm167 und Lm237 detektiert werden. Darüber hinaus stehen Sonden für den Nachweis von *Staphylococcus aureus* (Stau85 und Stau204), *Enterobacteriaceae* (Eb160, Eb207 und Eb1509) und *Salmonella* (Sal Gr.1 und Sal485) zur Verfügung.

Keine dieser Sonden zeigt bei der Hybridisierung mit Starterkultur-DNA ein Signal. Die Kulturen sind folglich im Rahmen der Sensitivität des Mikroarray-Nachweises frei von diesen Keimen.

### Probat 8/0 (100 ng)

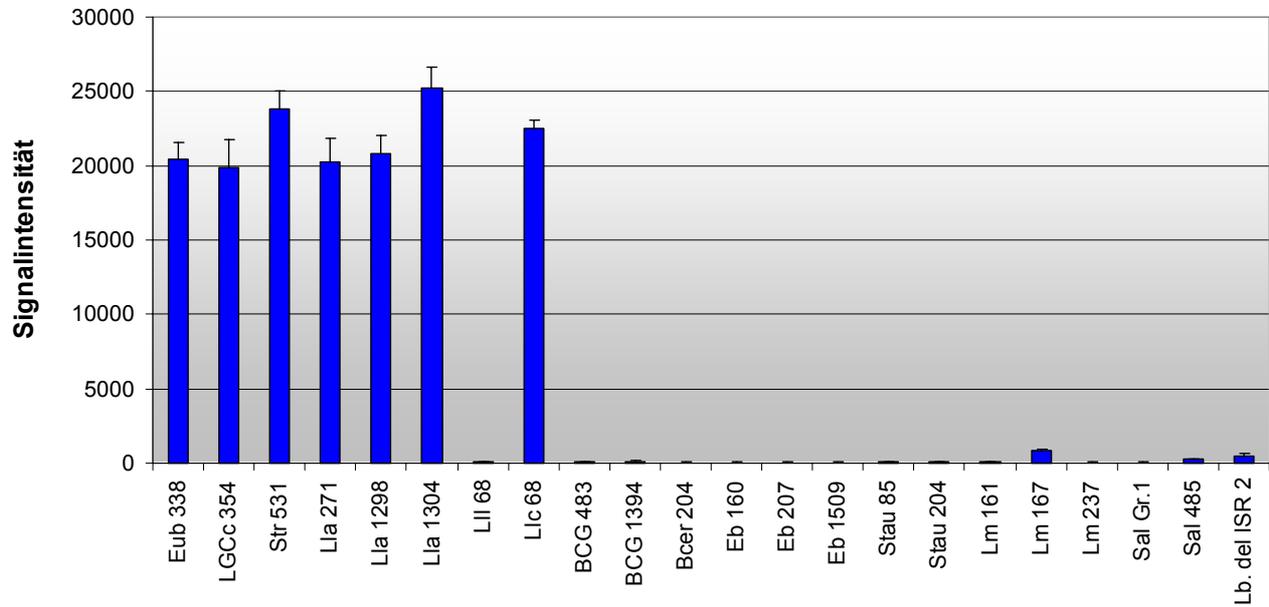


Abb. 23. Analyse des Keimspektrums der Starterkultur Probat 8/0.

### Probat 505 (100 ng)

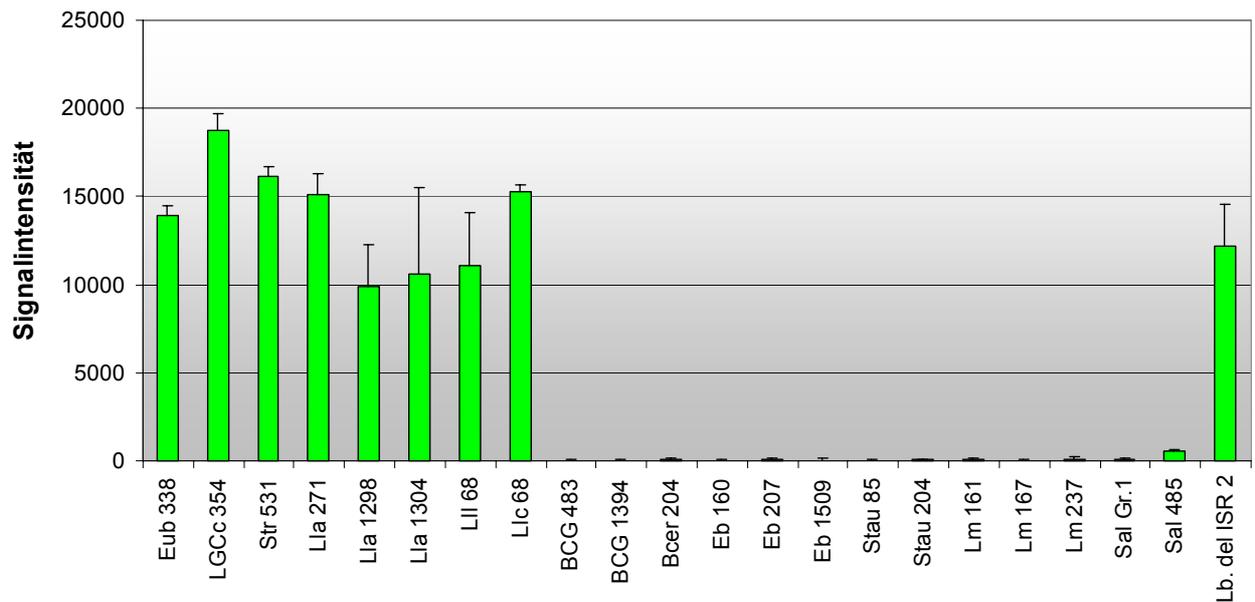


Abb. 24. Organismenidentifikation in der Starterkultur Probat 505.

Während keine der Sonden zum Nachweis von pathogenen Keimen ein Hybridisierungssignal zeigte, trat bei der DNA-Chip Analyse der Starterkultur Probat 505 eine positive Reaktion bei der *Lactobacillus delbrueckii* spezifischen Sonde Lb. del ISR 2 auf (Abb. 24). Bei *Lactobacillus delbrueckii* handelt es sich um ein Milchsäurebakterium, das typischer Weise bei der Herstellung von Joghurt und nicht bei der Herstellung von Speisequark zum Einsatz kommt.

Zur Absicherung des Ergebnisses aus der DNA-Chip Hybridisierung wurde die Starterkultur mit einer *Lactobacillus delbrueckii* spezifischen Nested PCR untersucht. Wie aus Abb. 25 hervorgeht, zeigen die Kontroll-PCRs mit Reinkulturen verschiedener *Lactobacillus*-Spezies keine PCR-Banden. Lediglich die PCR mit *Lactobacillus delbrueckii* weist Banden auf (Abb. 25, Spur 6). Die Nested PCR stellt also einen hochspezifischen Nachweis für diese Spezies dar. Analog zur DNA-Chip Hybridisierung konnte *Lactobacillus delbrueckii* in der Starterkultur Probat 505 nachgewiesen werden. In Probat 8/0 konnte dieser Organismus auch mit der Nested PCR-Methode nicht detektiert werden.

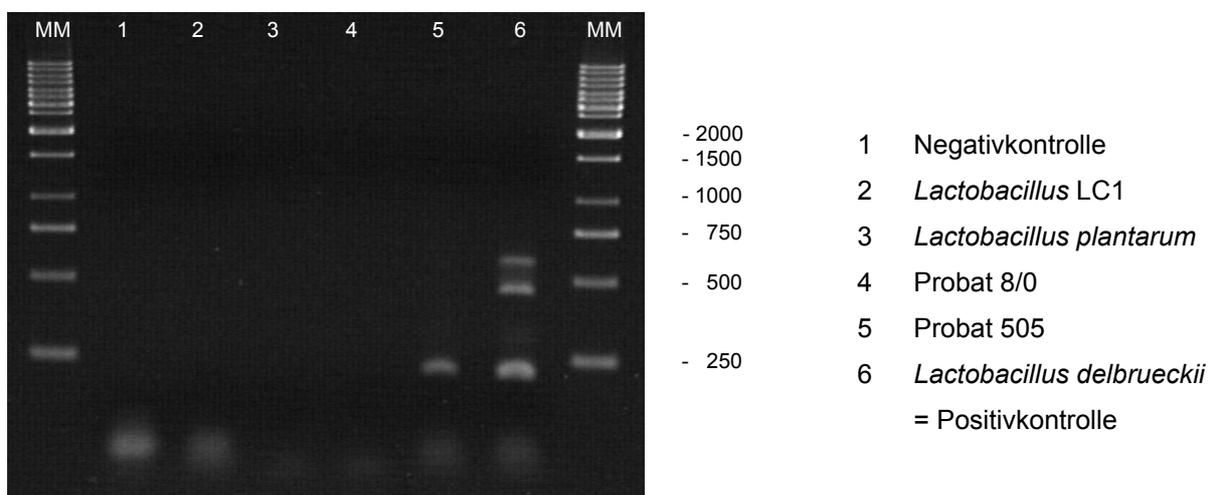


Abb. 25. Verifizierung der DNA-Chip-Hybridisierung mit einer Nested PCR zur Identifikation von *Lactobacillus delbrueckii*.

Neben weiteren vergleichenden Untersuchungen zur genetischen Zusammensetzung von Starterkulturen kommt die DNA-Chip Hybridisierung derzeit auch bei der Ursachenforschung für Phagenkontaminationen und bei der Analyse von Milchpulver zum Einsatz.

### **3.5. Vorbereitungen für den Einsatz der Chip-Technologie in der industriellen Laborroutine**

#### **3.5.1. Geräte für die industrielle Applikation**

Für eine Automatisierung der Mikroarray-Technologie, die eine Einführung dieser Technik in die industrielle Laborroutine stark beschleunigen würde, wurden verschiedene neu auf dem Markt befindliche Hybridisierungs- und Auslesegeräte hinsichtlich Größe, Spezifikation, Handhabung, Schnelligkeit, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Preis verglichen.

Folgende Hybridisierungsgeräte wurden getestet und mit der im Rahmen des Projekts etablierten Methodik verglichen: (1) HyPro<sub>20</sub> von Thermo-Hybaid, (2) PIQOR Hybcham von Biozym, sowie (3) Array Booster von Advalytix. Die integrierten feuchten Kammern der beiden erstgenannten Geräte von Thermo-Hybaid und Biozym wiesen noch erhebliche technische Mängel auf, die zum Austrocknen der Slides und damit zu einem negativen Hybridisierungsergebnis führten. Im Gegensatz dazu konnten die Signalintensitäten mit dem Array Booster etwa um den Faktor 2-3 (bei gleichbleibenden Hintergrundsignal) erhöht werden. Die geringen Vorteile in der Sensitivität bzw. Verkürzung der Analysezeit rechtfertigen derzeit die relativ hohen Investitionskosten von etwa 30.000 € sicher nicht, zumal der Gerätehersteller bald eine verbesserte Version anbieten wird.

Zusätzlich wurde eine vergleichende Analyse der zur Zeit auf dem Markt befindlichen Auslesegeräte für Chips bezüglich Größe, Spezifikation, Handhabung und Preis durchgeführt. Hierzu wurden zahlreiche Gespräche mit den Herstellern geführt, um möglicherweise erforderliche Anpassungen und denkbare Kooperationen beim Vertrieb abklären zu können. Danach wurden die folgenden zwei Geräte für die in house Experimente ausgewählt:

- 1) Das Gerät der Fa. TECAN verfügt über eine große Flexibilität bezüglich der Formate, die ausgelesen werden können (von der Microtiterplatte bis zum Chip). Es kann wahlweise mit 2 bis 4 Lasern (Gaslaser) geliefert und mit bis zu 32 Filtern ausgestattet werden. Des Weiteren lässt sich das Auslesen mehrerer Chips automatisieren („SlideStapler“ und automatischer Einzug). Auflösung (4 µm) sowie Qualität der ermittelten Bilder („Signal zu Hintergrund Verhältnis“) erfüllen die gesetzten Erwartungen vollständig, wie an hand von Experimenten mit Testchips ermittelt wurde.
- 2) Die Firma BIORAD hingegen bietet ein kleines, handliches Gerät (passt auf eine DIN A4 Seite), das mit Diodenlasern ausgestattet ist und eine noch feinere Auflösung (3 µm)

aufweist. Das Auslesen der Chips erfolgt hier in 2 Kanälen (Cy3/Cy5) gleichzeitig und kreiert ebenso zeitgleich ein Überlagerungsbild aus beiden Kanälen. Die Handhabung des Gerätes sowie der Software ist einfach und die erhaltenen Bilder stehen in der Qualität dem TECAN Gerätes in nichts nach. Da der BIORAD Scanner auch preislich wesentlich günstiger liegt, wird dieses Gerät, nicht zuletzt wegen der Anwenderfreundlichkeit, favorisiert.

Von den derzeit neu auf dem Markt befindlichen Auslesegeräten für Chips bietet der Scanner der Firma BIORAD eine kostengünstige Alternative. Dennoch wird das im Zusammenhang für ein späteres Produkt an den Kunden zu empfehlende Gerät in großem Maße durch den vermutlichen Probendurchsatz des Milch-verarbeitenden Betriebes bestimmt, so dass zu einem späteren Zeitpunkt, sofern der Milch-Chip in die Routinekontrolle integriert wird, dem TECAN-Gerät aufgrund seiner Automatisierbarkeit der Vorzug zu geben ist.

### **3.5.2. Patentrecherche und Strategie zum Schutz der erzielten Ergebnisse**

Im Bereich der Mikroarray-Technologie existieren bereits etwa 2.500 Patente. Die Strategie der am Projekt beteiligten Firmen besteht darin, die erarbeitete Technik als Kit anzubieten. Im Rahmen einer Patentrecherche wurde geprüft, in wie weit die hier etablierte Analytik die Schutzrechte Dritter berührt und daher im Rahmen der angestrebten kommerziellen Verwertung Abhängigkeiten bestehen. Ein grundsätzliches Patent, das Mikroarrays als solches unter Schutz stellt, ist das Patent EP 373 203 von Oxford Gene Technologies (OGT). PicoRapid hat als eines der wenigen Unternehmen weltweit bereits jetzt eine Lizenz von OGT und ist damit in der Lage, Mikroarrays herzustellen und kommerziell zu vertreiben sowie analytische Dienstleistungen unter Verwendung von Mikroarrays anzubieten. Weiterhin ergab die Recherche, dass für die im Rahmen des Projektes eingeführte Markierungstechnologie auf Basis von Psoralen / Streptavidin / Biotin mehrere Patente zu berücksichtigen sind, wie z.B. WO19850002628 - Psoralen-Markierung für genomische DNA, WO08705805 - Biotinyliertes Psoralen, WO02093504 - Verfahren zur Identifizierung von an Festphasen gekoppelten chemischen Substanzen durch Biotin / Streptavidin, WO0216635 - Verfahren zur Markierung chemischer Substanzen über Biotin / Streptavidin, EP0235726B1 - Kovalente Bindung von Psoralen durch UV-Licht an die DNA. Viele dieser Patente stammen jedoch bereits aus den 80iger Jahren und laufen demnächst aus.

In enger Zusammenarbeit mit der Patentanwaltskanzlei Söllner und Partner in München wurde die Patentfähigkeit der erzielten Ergebnisse überprüft. Die Erfindungshöhe der einzelnen Ergebnisse, die in der Regel Optimierungsexperimente waren, aber keine grundlegend neuen Erfindungen, und die Tatsache, dass die Neuartigkeit der hier erarbeiteten Verfahren in der Regel (nur) durch die Neukombination an sich bekannter Methoden entstanden ist, hatte zunächst zu der Ansicht geführt, dass eine Patentierung kaum in Frage käme. Erst das am Ende des Projektes vorliegende Gesamtverfahren und deren Kombination mit, im Wesentlichen unveröffentlichten, aus anderen Projekten der Arbeitsgruppe Biotechnologie und Molekulare Genetik stammenden Ergebnissen, wie z.B. der Sequenzierung des Phagen P482, führte zur Patentierbarkeit. Als hinderlich erwies sich zudem, dass einige Teilergebnisse, die für sich allein kein Patentierungspotential hatten, durch die Vorstellung auf Messen, in Vorträgen und halböffentlichen Seminaren bereits zum Stand von Wissenschaft und Technik zählten. Schließlich kam es im Mai 2004 zu einer Anmeldung beim Deutschen Patentamt (Titel: Verfahren und Vorrichtung zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie, Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2004 023 188.5-41). Während der Wert der Anmeldung außer Zweifel steht, kann ihre Beständigkeit erst nach Abschluss des Prüfverfahrens und nach dem Offenlegungsdatum beurteilt werden.

### **3.5.3. Quantitative Darstellung der Umweltrelevanz**

Heutzutage werden fermentierte Milchprodukte in aller Regel mit Hilfe von Starterkulturen nach Separierung, Pasteurisierung, Homogenisierung und Hoherhitzung der Milch hergestellt. Nach der Analyse der Stoff- und Energieströme erfolgte auf Basis der ermittelten Daten die Bewertung der Umweltrelevanz der Mikroarray-Technologie. Als maßgebende umweltrelevante Einflussgrößen wurden dabei Energie und Abwasser identifiziert. Für das etwa 8-stündige Produktionsverfahren von 10.200 kg eines Milchproduktes wie z.B. Quark, werden beispielsweise 612 kWh Strom, 11.773 m<sup>3</sup> Frischwasser sowie 6,8 kg Natronlauge, 3,4 kg Salpetersäure und 3,2 kg weitere Reinigungsmittel benötigt, die letztlich zu 2.900 L Lauwasser und 12.081 L Abwasser führen.

Im Vergleich zu derzeit gängigen Analysemethoden, wie z.B. mikrobiologische Verfahren, die je nach Erfordernis zwischen 2 und 6 Tagen dauern, werden durch die mit der Mikroarray-Methodik mögliche frühzeitige Erkennung von Fehlchargen innerhalb eines Tages die Lager- und Quarantänezeiten stark verkürzt. Allein durch die Reduzierung der Kühlzeit zwischen der Fertigstellung des Produkts und der Freigabe für die Auslieferung kann der benötigte Energiebedarf für eine Produktionslinie um mehr als 80% gesenkt werden. Eine Lagerzeit von zwei Tagen

entspricht einer Zeitspanne, in der sechs weitere Produktchargen fertig gestellt und entsprechend kontaminationsgefährdet wären. Könnte eine Kontamination mit fremden, möglicherweise pathogenen Keimen innerhalb von 6-8 Stunden erkannt werden, würde in dieser Zeit nur eine einzige weitere Fehlproduktion anfallen. Außerdem könnte der Energiebedarf und das anfallende Reinigungs- und Abwasser von fünf Produktionschargen vermieden werden.

Zur Ermittlung des Eutrophierungspotenzials durch Freisetzung von Nitrat, Phosphat und organischen Säuren mit dem entstandenen Abwasser wurden Phosphatäquivalente mit dem Wert 1 für Phosphat, 0,1 für Nitrat und 0,022 für den CSB herangezogen. Für eine Produktionscharge mit den ermittelten Kennwerten von CSB 32, Nitrat 1,8 und Phosphat 0,72 ergibt sich ein aquatisches Eutrophierungspotenzial von 1,6 kg Phosphatäquivalenten. Bei der Vermeidung von 5 Fehlchargen durch die Früherkennung mittels DNA-Mikroarray-Technologie könnten also 8 kg Phosphatäquivalente eingespart werden.

#### **3.5.4. Abschätzung des wirtschaftlichen Potenzials**

Zur Abschätzung des wirtschaftlichen Potenzial einer Einführung der Mikroarray-Technologie werden Kosten von derzeit gängigen Kits zur Identifizierung von Mikroorganismen herangezogen. Hierfür kommen beispielsweise biochemische Differenzierungssysteme wie das API<sup>®</sup>-System von BioMerieux (€ 8-10 pro Organismus), ELISA-Tests wie die Transia-Kits von Diffchamb (€ 7-17 pro Rkt.), die Food ELISA-Kits von Biotline (€ 3-5 pro Rkt.) oder das VIDAS-Testsystem (BioMerieux) in Frage. Darüber hinaus sind verschiedene DNA-basierte Identifizierungskits auf dem Markt. Sanofi Diagnostics Pasteur bietet unter dem Begriff Probelia<sup>®</sup>-PCR Nachweissysteme für verschiedene Pathogene aus Nahrungsmitteln an (€ 12-16 pro Rkt.). Ebenso gibt es das BAX<sup>®</sup>-System von DuPont Qualicon, die GENE-TRAK Assays von Neogen bzw. TaqMan PCR-Kits bspw. von PE Biosystems oder Artus GmbH. Alle diese Systeme erlauben lediglich die Aussage, ob der verwendete Test positiv oder negativ ist. Um eine der Chip-Technologie vergleichbare Aussage zu erhalten, müssen verschiedene Test-Kits zur Analyse des Keimspektrums gleichzeitig zum Einsatz kommen. Die Preise für eine Einzelanalyse vervielfältigen sich also.

Wird die Keimdifferenzierung extern als Auftragsanalytik (z.B. SGS NATEC Institut GmbH, Hamburg) vergeben, kostet die Differenzierung eines einzigen Keims je nach Differenzierungsgrad 30 - 50 Euro und mehr. Diese Tests dauern wiederum mehrere Tage und sind deshalb für die Früherkennung von Fehlchargen, die Grundlage für die Vermeidung der Umweltbelastung ist, nicht zu verwenden. Tests für Phagen und Phagenresistenzgene (PRG), wie sie in diesem Projekt für

Mikroarrays bereits vorbereitet werden, sind kommerziell noch gar nicht erhältlich. In Forschungslaboratorien könnte diese Analyse derzeit theoretisch in 31 einzelnen PCRs für die Phagenresistenzgene und 3 PCRs für die Phagendetektion durchgeführt werden. Diese Analytik ist aber nur mit hohem Zeit- und Geldaufwand als Einzelanalyse möglich. Für eine Routineanalytik kommt das PCR-Verfahren als Simultananalytik für die erforderliche Probenanzahl aufgrund der entstehenden Material- und Personalkosten in keinem Fall in Betracht.

Aus einer Vorab-Befragung von Herrn Dr. Hahne (Nordmilch eG) und Herrn Dr. Hammer von der Bundesanstalt für Milchforschung sowie aus Daten des Milchindustrieverbands (<http://www.milchmarkt.de/milch/index.html>) ergab sich ein potentieller Markt in der Größenordnung von mehreren hunderttausend Proben, die in der deutschen Milch-verarbeitenden Industrie pro Jahr auf Keime hin analysiert werden. Exemplarisch sei hier der geschätzte Bedarf für Salmonellenbestimmungen (ca. 150.000 p.a.), Listerienbestimmungen (ca. 75.000 p.a.) sowie Hefe- und Schimmel-Nachweise (ca. 1.000.000 p.a.) genannt. Für mehrere tausend bis zehntausend dieser Proben gilt, dass nicht nur ein Keim, sondern mehrere (bis ca. 10) Keime gleichzeitig differenziert werden müssen. Speziell für diese Proben kann die Chiptechnologie besonders vorteilhaft eingesetzt werden, da sie es gestattet, viele Keime simultan zu differenzieren.

### **3.5.5. Marktanalyse zur Keimdifferenzierung in der Milchindustrie**

Zusätzlich zu den Erhebungen über das mögliche Absatzpotenzial eines Kits zur Analyse von Milch und Milchprodukten wurde die Marktanalyse durch eine Befragung potentieller Anwender ergänzt. Der dafür entworfene Fragebogen wurde an ca. 50 Firmen verschickt, die zu den Marktführern im Bereich der Milch-verarbeitenden Industrie zählen. Hierzu gehören Danone GmbH, München, Hansano, Upahl, Hochland AG, Heimenkirch, Humana Milchunion eG, Everswinkel, Kraft Jacobs Suchard, Bremen, Molkerei Alois Müller GmbH, Fischach-Aretsried, Nestle, Frankfurt, Dr. Oetker, Bielefeld, Uelzena eG, Uelzen und Unilever Bestfoods Deutschland GmbH, Hamburg (Liste der angeschriebenen Unternehmen siehe Anlage 2).

Wie aus dem Fragebogen (Anlage 1) hervorgeht, werden gezielt Angaben über das in der Praxis relevante Keimspektrum, die momentan verwendeten Analysetechniken und die Anzahl der anfallenden Analysen abgefragt. Darüber hinaus zielen Fragen zum wünschenswerten Keimspektrum und nach dem größten Bedarf für Verbesserungen der derzeitigen Analytik darauf ab, die genauen Anforderungen des Marktes abschätzen zu können. Parameter wie die Verkürzung der Analysezeit, die Reduktion der Material- bzw. Personalkosten, eine Verbesserung der Lebend-

Tot-Unterscheidung, die Erhöhung der Sensitivität oder die Erweiterung des Analysespektrums um bestimmte Keimgruppen sollen in dem Fragebogen gewichtet werden.

Von den 50 angeschriebenen Unternehmen haben zwar nur sieben einen ausgefüllten Fragebogen zurückgeschickt. Ein Unternehmen antwortete in Textform ohne den Fragebogenbogen zu verwenden. Eine Responstrate von 14% ist für eine derart umfangreiche Befragung ein durchaus zufrieden stellendes Ergebnis.

Die Auswertung der Antworten ergab, dass der Schwerpunkt des Analysebedarfs im Bereich pathogener Bakterien (5 Unternehmen) und Starterkulturbakterien (4 Unternehmen) liegt, wobei die Analyse der pathogenen Bakterien i.d.R. extern erfolgt. Daher ist es möglicherweise lohnend, neben dem „Gesamt-Chip“, der alle Keime umfasst, auch zwei Teilchips anzubieten. Einer könnte die spezifisch von der Milch-verarbeitenden Industrie selbst analysierten Starterkulturbakterien umfassen, der andere könnte die für externe Auftragslabors interessanten pathogenen Keime detektieren.

Die derzeit in den Betrieben eingesetzten Analysetechniken beschränken sich hauptsächlich auf mikrobiologische Verfahren und ATP-Messungen. Lediglich ein Unternehmen gab an, auch moderne PCR-Verfahren einzusetzen. Das zeigt, dass in der Milchindustrie derzeit noch eher „konservative“ Analytik zum Einsatz kommt und unterstreicht den großen Bedarf und das Potenzial, moderne und damit schnellere und kostengünstigere molekularbiologische Analysemethoden in der Milchanalytik zu etablieren. Dieser Bedarf wird auch durch die Antworten zu Frage 5 untermauert, in denen die Mehrzahl der Unternehmen die Reduktion der Material- und Personalkosten als zumindest „wichtig“ einstuft. Die Verkürzung der Analysezeit wird von den meisten Unternehmen sogar als „sehr wichtig“ angesehen.

Der Analysenumfang variiert in den Unternehmen zwischen etwa 10 und 2000 pro Tag, wobei 3 Unternehmen über 100 Proben täglich bearbeiten und weitere 3 unter 100 Proben analysieren. Im Mittel werden bei jeder dieser Analysen 4 Keimgruppen erfasst (derzeit minimal 2, maximal 5). Das zeigt, dass es sich bei den Untersuchungen schon jetzt um eine multiparametrische Analyse handelt. Weiterhin wurden unter Punkt 4 zehn der im Fragebogen aufgeführten Keime in mindestens 50% der Unternehmen als „sehr wichtig“ und von weiteren als mindestens „wichtig“ eingestuft. Daraus folgt, dass bei den Firmen ein konkreter Bedarf für ein paralleles Analyseverfahren vorliegt, welches die Chiptechnologie bieten kann. Ein DNA-Chip, der die wichtigsten 10 Keime umfasst, stellt demnach tatsächlich eine auch für die Unternehmen attraktive Einstiegslösung dar.

Den größten Bedarf für die Verbesserungen der derzeitigen Analytik sehen die Unternehmen bei der Verkürzung der Analysezeiten, gefolgt von der Erhöhung der Sensitivität. Gemessen an den derzeit verbreiteten mikrobiologischen Methoden kann die Chiptechnologie hier in der Tat eine konkrete Verbesserung bewirken, da die zeitaufwendige Kultur der Organismen zumindest teilweise entfallen kann. Die akzeptablen Zeiträume für eine Chipanalyse betragen lt. Antworten zur Frage 7 zwischen 1 und 24 Stunden, wobei die Mehrzahl der Unternehmen der Analyse mehr als 8 Stunden Zeit einräumt. Dieser Zeitrahmen kann mit dem im Rahmen des Projektes eingeführten Verfahren bereits jetzt eingehalten werden.

Die Kosten pro Keim und Probe dürfen den Antworten entsprechend etwa 5 bis 20 € betragen. Dabei ist davon auszugehen, dass die Unternehmen eher eine Angabe im unteren Bereich gemacht haben, um die Preise nicht unnötig in die Höhe zu schrauben. Dies wird auch durch die Recherche des CAGs bei externen Auftragslabors belegt, die zeigt, dass derzeit etwa 30 bis 50 € für eine Keimdifferenzierung veranschlagt werden müssen. Für eine Chip-Analyse, die 10 Keime umfasst, ist damit ein Preis im Bereich von 150 € hoch attraktiv. Allerdings gehen in diese Betrachtung Parameter wie die Bereitschaft, diese neue Technologie einzusetzen, der immer noch erforderliche große methodische Aufwand und die Tatsache negativ ein, dass es sich noch nicht um eine behördlich vorgeschriebene bzw. zugelassene Methodik handelt.

### **3.5.6. Bepreisung des Milch-Chips**

Die Erstellungskosten für die Produktion eines Milch-Chip-Kits für 20 Analysen werden derzeit mit etwa € 1.400 veranschlagt. Dieser Betrag beinhaltet die Kosten für alle Materialien, die für die Herstellung von 20 DNA-Mikroarrays sowie für die Zusammenstellung der Reagenzien in einem Kit benötigt werden. Dazu gehören im Einzelnen:

- Material für *PicoArrays*<sup>TM</sup> mit bis zu 96 verschiedenen Spots (Oligonukleotide, Mikroarray-Substrate (Slides), Probenpuffer, Array-Post-Spotting Prozessierungslösungen)
- Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die DNA-Extraktion, die DNA-Fragmentierung sowie Aufreinigung (Microcon-30)
- Chemikalien für die kovalente Anbindung von Psoralen-Biotin zur Markierung der Proben-DNA und erneute Aufreinigung
- Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Array-Hybridisierung inkl. der Kosten für die Anbindung des Fluoreszenz-Farbstoffs über das Kopplungsreagenz Streptavidin
- Material für die Kit-Erstellung (Probenröhrchen und Pipettenspitzen)

- Verpackungsmaterial und Etiketten
- Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die Qualitätskontrolle

Weiterhin sind in dieser Aufstellung die Kosten für Personal enthalten, das für die Arrayherstellung, die Zusammenstellung des Kits sowie die Durchführung der Produkt-Endkontrolle benötigt wird. Dabei wurde eine Chargengröße von 50 Kits und zunächst eine Produktion von 250 Kits, also insgesamt ein Umfang von 5.000 Chip-Analysen zugrunde gelegt.

Auf Basis der Ergebnisse der Kundenbefragung sowie der Vorab-Auskünfte von Herrn Dr. Hahne von der Nordmilch wird für den Verkauf mittelfristig ein Preis von etwa € 3000,00 pro 20iger Kit veranschlagt, also etwa € 150,00 pro Array und Analyse. Dies stellt nach der Erhebung einen für die Kunden attraktiven Preis dar, da er trotz Erhöhung der Anzahl der analysierten Keime gegenüber den bisherigen Verfahren einen etwa gleichbleibenden Kostenaufwand bedeutet. Unter Bezug auf die Produktionskosten (s.o.) sowie die zu leistenden Lizenzgebühren sollte es bei diesem, am Markt möglicherweise zu erzielenden Preis gerade noch möglich sein, im Rahmen der Markteinführungsphase Rabatte zu gewähren, um so die Verbreitung der Chiptechnologie in der Milchanalytik zu fördern.

Um die relativ hohen Investitionen für den Chip-Scanner für potentielle Kunden zu minimieren, sind hier Möglichkeiten für Leasingverträge oder die Bereitstellung von Geräten zur Miete vorgesehen. Mit dieser Preisgestaltung sollte es den Unternehmen möglich sein, die neue Chip-Analytik parallel zu den etablierten Verfahren einzuführen und sie auf diese Weise im jeweiligen Unternehmen zu validieren.

Auch für die Hersteller eröffnet sich mit einem kalkulierten Umsatz von ca. 750.000 Euro und einem Deckungsbeitrag von 50% ein kleines aber attraktives Marktsegment.

### **3.5.7. Marketing- und Vertriebsstrategie**

Anhand der ausgewerteten Informationen würde der in diesem Projekt entwickelte Milch-Chip bei einer Markteinführung auf den Zielkunden hin optimiert werden können. Ein zügiges „product placement“ würde durch Demonstrationen der Technologie beim Kunden vor Ort und aufgrund der Möglichkeit, das Produkt selbst zu testen, erreicht werden können. Als begleitende Maßnahmen würden Werbeschaltungen in gängigen Fachzeitschriften sowie die Präsentation auf Ausstellungen z.B. bei den entsprechenden Leitmessen nach Art der Anuga Food in Frage kommen.

Neben der Möglichkeit, die im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse durch den Vertrieb eines Milch-Chip-Kits zu verwerten, haben sich die Projektpartner auch dahin gehend verständigt, dass die beiden beteiligten KMUs diese Analytik unabhängig von einander als Dienstleistung für die Industrie anbieten können. So könnten sich größere Kunden der Technologie kostengünstig nähern und Investitionsentscheidungen dem eigenen Bedarf entsprechend anpassen. Für kleinere Unternehmen wird, wie auch in vielen anderen Bereichen, die umfassende Analyse als Fremddienstleistung die kostengünstigere Alternative sein, ohne ein geringeres Leistungsspektrum als die Mitbewerber in Kauf nehmen zu müssen.

### **3.6. Aktuelle Marktchancen eines Milch-Chip-Systems für die mikrobielle Routinediagnostik in der Milchindustrie**

Um die Marktchancen eines Milch-Chips besser abschätzen zu können, wurde am Ende des Projektes eine aktuelle Bestandsaufnahme des Marktes für mikrobielle Diagnostika in der Milchindustrie durchgeführt und mit den aktuellen Eigenschaften des Milch-Chip-Systems abgeglichen.

Zurückgegriffen wurde hierbei auf die Datenbanken und den Kundenkreis der vermicon AG und auf aktuelle Interviews des vermicon Vertriebs mit potenziellen Milch-Chip Abnehmern.

Dabei ergab sich klar, dass trotz der allgemein anerkannten Vorteile der DNA-Mikroarray Analytik unter den derzeitigen wirtschaftlichen Bedingungen keine Möglichkeit besteht, den erforderlichen Innovations-Schub zu finanzieren, weil die Preise für die derzeit üblichen und behördlich vorgeschriebenen Analyse-Verfahren unter dem allgemeinen Kostendruck in den letzten drei Jahren stark nachgegeben haben und die Mikroarray-basierten Verfahren diesen behördlichen Status nach § 35 LMG noch nicht haben.

#### **3.6.1. Milch-Chip – Technische Parameter und Anwendung**

##### Zusammensetzung eines Chip-Kits

Die Arbeitsschritte für die mikrobiologische Untersuchung auf Basis des Milch-Chips gliedern sich in die „Probenvorbereitung und Extraktion der DNA“, die „DNA-Fragmentierung über die Fenton-Reaktion“, die „kovalente Anbindung von Psoralen-Biotin mit anschließender Reinigung“, sowie in die „Hybridisierung auf dem Chip mit anschließender Markierung und Detektion“. Diesen Hauptschritten entsprechend besteht ein Kit aus folgenden Grundkomponenten, mit denen dem Kunden alle erforderlichen Komponenten für die Analysen zur Verfügung gestellt werden:

- *Probenvorbereitung / DNA Extraktion:* Komponenten und Lösungen für die DNA Extraktion basierend auf dem käuflichen Kit „AGOWA mag Maxi DNA Isolation“. Hier sind Vereinbarungen mit den Hersteller des Kits zu treffen, die einen Weiterverkauf der Bestandteile oder des Kits selbst ermöglichen.
- *DNA Fragmentierung:* Lösungen für die DNA Fragmentierung durch die Fenton-Reaktion bestehend aus Spaltungs- und Stoppreagenz. Hier ist insbesondere die Haltbarkeit des auf Wasserstoffperoxid beruhenden Spaltungsreagenz zu beachten.

- *DNA Reinigung*: Zwischen den einzelnen Schritten sind Reinigungsschritte der DNA notwendig, die zum Teil auf der klassischen Ethanol-fällung basieren, aber auch über Reinigungssysteme von Drittherstellern erfolgen. Hierbei sind die zugehörigen Säulen (Microcon-30) und Reagenzien im Kit enthalten.
- *Markierungsreaktion Psoralen-PEO-Biotin*: Lösungen und Reagenzien zur kovalenten Markierung der DNA
- *PicoArrays™* mit bis zu 96 verschiedenen Spots inklusive Verpackung unter Schutzgas sowie Lagerung bei -20°C: Die Gestaltung der Arrays gliedert sich den Einsatzbedingungen entsprechend in zwei unterschiedliche Produktformen: Solche mit festem Sondensatz zur Identifikation definierter Organismen, und so genannte „customized chips“ mit speziell auf die Anforderungen des Kunden zusammengestellten Sonden.
- *Hybridisierung / Fluoreszenzmarkierung*: Reagenzien und Lösungen zur Hybridisierung und zur „on-chip“ Markierung, wobei eine spezielle Hybridisierungskammer in Form des VIT-Reaktors mitgeliefert wird oder bei Hochdurchsatz auch ein Hybridisierungsgerät, welches allerdings vom interessierten Kunden selbst beschafft werden müsste.

#### Anwendung des Milch-Chips

Die Anwendung beim Kunden erfolgt der Idee eines Kits folgend gemäß eines beigelegten ausführlichen Handbuchs, in dem alle Schritte sowie mögliche Fehler und deren Vermeidung dargestellt sind. Nach Durchführung der Arbeitsschritte wird die Auswertung und Analyse an einem Chipscanner durchgeführt, dessen Auswertesoftware spezifisch auf die vorliegende Applikation angepasst ist, sodass für den Kunden ein positives oder negatives Ergebnis einfach und zuverlässig abgelesen werden kann.

Die im Kit vorgesehenen Arbeitsschritte basieren auf klassischen, in der Wissenschaft verbreiteten Methoden, weshalb ein erhebliches Maß an molekularbiologischen Kenntnissen und Fähigkeiten beim Kunden vorausgesetzt werden muss. Daher kann beim Kunden für die Durchführung ausschließlich gut ausgebildetes Personal eingesetzt werden, um ein zuverlässiges, von Handlingfehlern unabhängiges Ergebnis erhalten zu können.

#### Investitionskosten auf der Seite des Kunden

Voraussetzung für die Integration dieser Analyse-methode beim Kunden ist zudem eine weitestgehend moderne und vollständige Laborausstattung für molekularbiologische Arbeiten. In

den Labors des Kunden müssen Geräte wie Zentrifugen, Tiefkühlschränke, Kühlräume, Pipetten usw. zwingend vorhanden sein, um mit der notwendigen Präzision und Reinheit die Arbeitsschritte der Chipanalyse durchführen zu können. Da keine Anzucht von pathogenen Bakterien erforderlich ist, werden jedoch keine speziellen aus Sicht der biologischen Sicherheit zugelassenen Räume benötigt.

Daneben werden für den Milchchip speziell anzuschaffende Geräte benötigt. Hier sind in erster Linie der Chipscanner zu nennen, da hier eine relativ hohe Investition von ca. € 50.000 vom Kunden erforderlich ist. Insbesondere für die Markteinführung stellt dies eine erhebliche Markteintrittshürde da, die zu Anfang durch die Möglichkeit von Leasingverträgen oder die Bereitstellung von Geräten zur Miete abgefangen werden muss.

Des Weiteren wird ein potentieller Kunde Investitionen für eventuell fehlende Laborkleingeräte in Kauf nehmen müssen, da insbesondere eine genügend starke UV-Quelle für die kovalente Kopplungsreaktion nicht in jedem Laborbetrieb eines Milchproduzenten vorausgesetzt werden kann.

#### Problemstellung und Besonderheiten

Zur Beurteilung des Marktpotentials sind neben der preislichen Konkurrenzfähigkeit des Produktes auch etwaige Sekundärkosten und Investitionskosten auf der Seite des Kunden mit einzubeziehen. Eine Analyse des aktuellen Ablaufs der notwendigen Arbeitsschritte beim mikrobiologischen Nachweis auf der Basis des Milchchips zeigt, dass die Ausstattung des Labors aber auch die Notwendigkeit von gut geschultem Personal als hinderlich anzusehen sind. Beispielfhaft muss hier die kovalente Kopplungsreaktion des Psoralen-PEO-Biotin genannt werden. Hier sind besondere technische Ausstattungen notwendig, die beim Kunden entweder bereits vorhanden sind oder kostenverursachend angeschafft werden müssen.

### 3.6.2. Mikrobiologische Diagnostik in der Milchindustrie

Die Milchindustrie ist mit einem Umsatzanteil von 16% der zweitgrößte Industriezweig in der Lebensmittelindustrie.

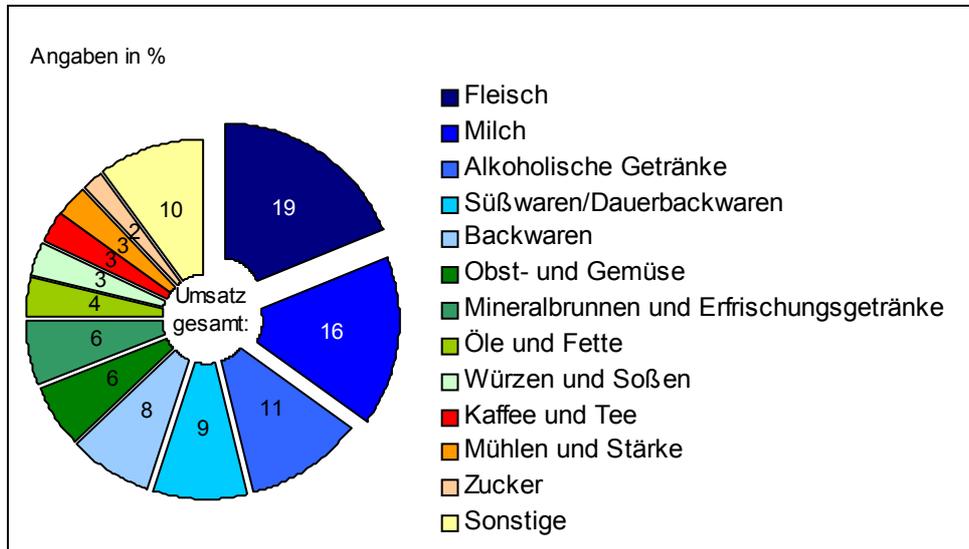


Abb. 26. Auszug aus dem Jahresbericht 2002 >> 2003, S. 4 der Bundesvereinigung der Deutschen Ernährungsindustrie.

Die Konsummilch hat den größten Anteil an den Produkten der Milchindustrie.

Erzeugnisse	2001	2002	Veränderung in %
Konsummilch	5 485	5 524	+0,7
Buttermilch	210	214	+1,9
Milchfrischprodukte	2 691	2 769	+2,9
davon Joghurt	1 510	1 535	+1,7
davon Sauermilch- und Milchmischgetränke	385	372	-3,4
Sahne und Sahneerzeugnisse	572	544	-4,9
Butter	420	435	+3,6
Käse	1 941	1 941	+0,0
davon Hart-, Schnitt- und Weichkäse	971	967	-0,4
davon Speisequark und Frischkäse	764	767	+0,4
davon Schmelzkäse	175	177	+1,1
Dauermilcherzeugnisse	1 326	1 269	-4,3

Abb. 27. Geschäftsbericht 2002/2003, S. 25 des Milchindustrie-Verband e. V.

In der Milchindustrie sind folgende Bakterien und Bakteriengruppen für einen Hersteller von Kits für die mikrobielle Diagnostik wirtschaftlich relevant: *Salmonella*, *Listeria* (und hier die Art *L. monocytogenes*), *Escherichia coli*, Coliforme Keime, *Staphylococcus aureus*. Alle weiteren in der Milch- und Milchprodukten vorkommende Keime wie *Brucella*, *Campylobacter*, Mycobakterien u.a. sind bezogen auf die Anzahl der untersuchten Proben, die ein wesentliches Maß dafür ist, ob ein Nachweiskit wirtschaftliche Relevanz erlangen kann, zu vernachlässigen. Diese Keime werden in so geringen Mengen untersucht, dass die Etablierung eines modernen Nachweissystems wirtschaftlich nicht sinnvoll ist. Von den relevanten Keimen entfallen die meisten Proben auf *Salmonella* und *E.coli*/Coliforme. *Listeria* und *L. monocytogenes* werden wesentlich weniger getestet, *S. aureus* nur in geringen Mengen. Die Anzahl der untersuchten Proben variiert stark: So werden in großen Milchindustriebetrieb ca. 10.000 Proben jährlich auf Salmonellen untersucht, davon ist aber nur ein Bruchteil wirklich zeitkritisch. Bei durchschnittlichen mittelständischen Betrieben beträgt das jährliche Probenvolumen für Salmonellen 1.000 – 2.000 Analysen pro Jahr. Bei Listerien und Staphylokokken genügt eine reine Ja/Nein-Aussage nicht. Bei dem Nachweis dieser Keime ist neben einer bloßen Identifizierung auch eine Quantifizierung notwendig.

Die oben aufgeführten Bakterien werden größtenteils mit klassischen, nach § 35 LMBG zugelassenen Methoden nachgewiesen. Im Folgenden ist exemplarisch der Nachweis von *Salmonella* dargestellt:

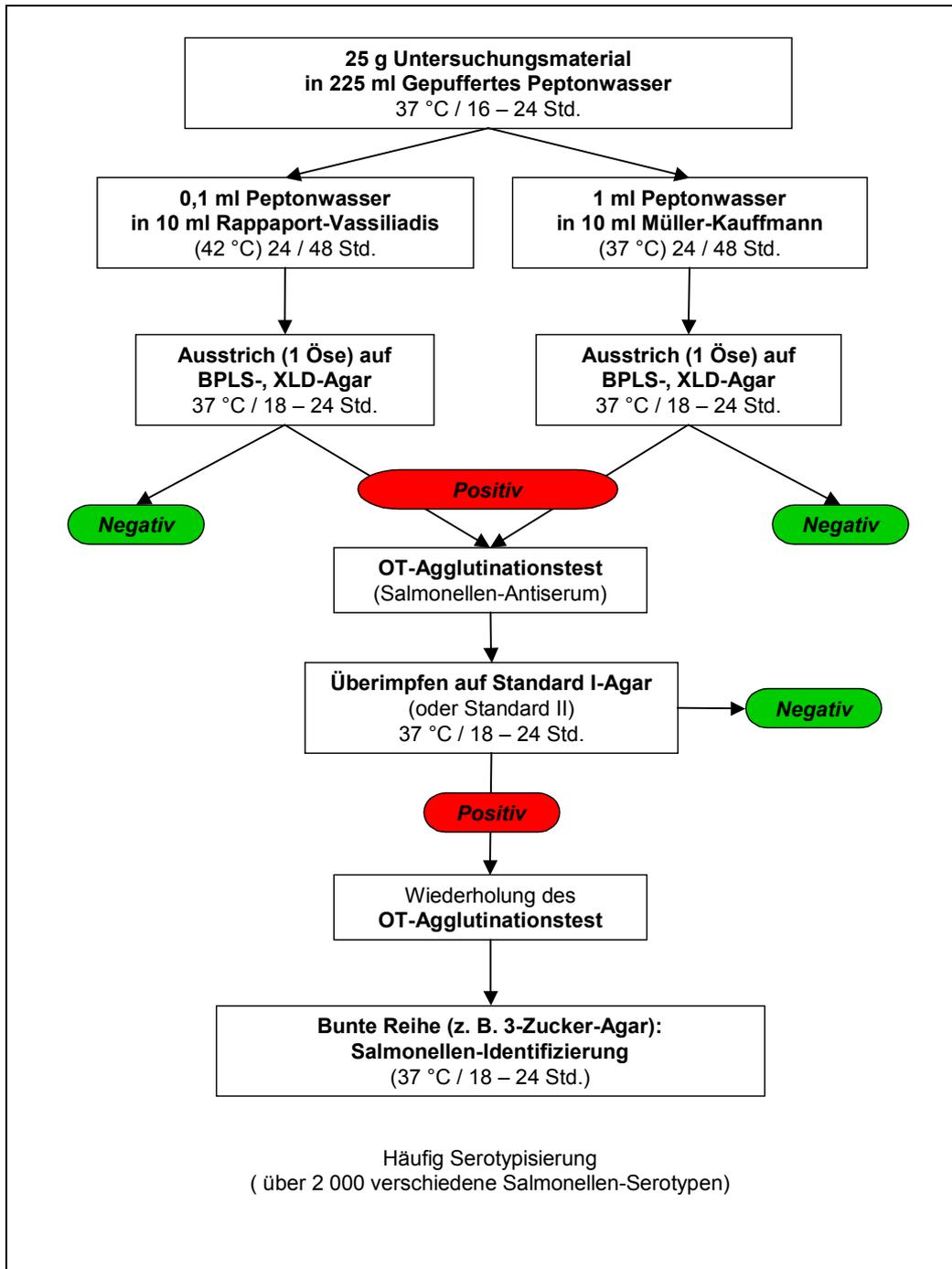


Abb. 28. Klassischer Nachweis von Salmonellen.

Bei der klassischen Analytik werden 25 g Untersuchungsmaterial in Peptonwasser vorangereicht, um das Wachstum eventuell vorhandener Salmonellen zu fördern. Als selektives Anreicherungsmedium wird vorwiegend Rappaport-Vassiliadis-Medium verwendet. Anschließend erfolgt ein Ausstrich auf festen Selektivnährböden (BPLS-, XLD-Agar). Wachsen verdächtige

Kolonien auf den Nährböden, wird weiter getestet. Die klassische Analytik ist zuverlässig in der Ergebnisfindung. Das Ergebnis erhält man allerdings erst nach 5 bis 6 Tagen. Die Materialkosten für einen konventionellen Test, der in Abb. 4-6 dargestellt ist, belaufen sich auf unter € 3,- pro Test. Schätzungsweise 10 % der Analysen in der mikrobiellen Diagnostik im Lebensmittelbereich werden heutzutage bereits mit Hilfe von modernen Schnellverfahren durchgeführt. Hierzu zählen Nachweissysteme die u.a. auf folgenden Technologien basieren:

- VIT-Gensondentechnologie: Ganzzellennachweis von Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden
- PCR: Nachweis der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion
- Immunoassays: Nachweis von spezifischen Antigenen mittels markierter Antikörper
- Impedanzverfahren: Nachweis der Bakterien durch Änderung des elektrischen Widerstandes

Es ist davon auszugehen, dass sich der Anteil dieser Schnellverfahren in Zukunft vergrößern wird. Voraussetzung hierzu ist jedoch eine weitere und starke Reduzierung der Preise für diese Verfahren.

### 3.6.3. Gegenüberstellung Marktanforderungen – Milch-Chip Eigenschaften

Im Folgenden werden die wesentlichen Marktanforderungen an ein modernes mikrobiologisches Schnellverfahren mit den Eigenschaften der Milch-Chip basierten Analytik verglichen:

	<b>Marktanforderung an Schnellnachweissystem</b>	<b>Milch-Chip</b>
Keime	Im wesentlichen: <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> (und hier die Art <i>L. monocytogenes</i> ), <i>Escherichia coli</i> , Coliforme Keime, <i>Staphylococcus aureus</i>	Prinzipiell möglich: <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> (und hier die Art <i>L. monocytogenes</i> ), <i>Escherichia coli</i> , Coliforme Keime, <i>Staphylococcus aureus</i> Zusätzlich: Noch 5 weitere Keime (=10 Keime pro Chip)
Sensitivität	1 Keim in 25 g	10 <sup>5</sup> Keime pro Probenvolumen
Voranreicherung	Nein	Ja, falls weniger als 10 <sup>5</sup> Keime im Probenvolumen vorkommen

Automatisierbarkeit	Pflicht für Routine; Gewünscht für Sonderanwendungen	nur teilweise möglich
Arbeitsschritte	Minimale Anzahl: Weniger als 10	Hohe Anzahl: Mehr als 20
Preis Auswertegerät	Max. € 15.000	€ 50.000
Preis pro Analyse	€ 3- 5 für Routine, € 10 für Einzelanwendungen	15 € (immer 10 Analysen auf einem Chip = 150 €)

Bei den Anforderungen ist folgendes anzumerken:

- Die vom Markt geforderte Sensitivität und einen Verzicht auf die Voranreicherung erreicht heutzutage kein einziges auf dem Markt befindliches System. Um trotzdem in die Qualitätskontrolle aufgenommen zu werden, muss Automatisierbarkeit möglich und der Preis niedrig sein.
- Die meisten der auf dem Markt befindlichen Auswertegeräte sind teurer als € 15.000. Hier wird aber durch die Zusammenarbeit mit großen Partnern eine kostenlose Nutzung des Gerätes dem Kunden bei einer gleichzeitig hohen Abnahmemenge der Schnelltests ermöglicht.
- Ohne eine Automatisierung ist heutzutage eine Routineanwendung nicht mehr denkbar

## **4. Diskussion**

Wie aus den dargestellten Ergebnissen hervorgeht, wurden alle Arbeitspakete und Meilensteine erfolgreich bearbeitet und das Projektziel erreicht. Die technische Herstellung des eigentlichen Chips wurde abgeschlossen. Über 700 Chips wurden innerhalb des Projektes mit guter Reproduzierbarkeit verwendet. Pipettierparameter und Spothomogenität wurden optimiert. Entsprechend den Arbeitspaketen wurde ein standardisiertes, auf kontaktfreiem Spotten basierendes Produktionsverfahren eingeführt, das es erlaubt, die „Milch-Chips“ in sehr guter und reproduzierbarer Qualität herzustellen, zu lagern und an den Kunden zu versenden. Zusätzlich wurden neue, zerstörungsfreie Qualitätskontrollverfahren in die Serienproduktion der Milch-Chips integriert. Um den Anforderungen im Routinebetrieb gerecht zu werden, wurde eine Markierungstechnologie entwickelt, die es erlaubt, die Arrays auf Wunsch mit einem weitgehend fälschungssicheren Barcode auszustatten.

Die wichtigsten fermentationsrelevanten Organismen und Gene wurden in enger Abstimmung zwischen den Projektpartnern ausgewählt und sind durch über 130 Sonden auf dem Chip spezifisch erfassbar. Vorhandene Sonden wurden dabei weitestgehend auf identische Hybridisierungsbedingungen optimiert, zusätzliche neue Sonden wurden mit hoher Spezifität entwickelt. Auf Empfehlung des Milchhofs Magdeburg wurden neben den bisher ausgewählten Organismen auch Hefen und Schimmelpilze in die Arbeit mit einbezogen. Die Entwicklung der zu ihrer Detektion erforderlichen Sonden wurde begonnen. Nach dem Aufbau der hierfür notwendigen 26S rRNA Datenbank konnten Sonden für einige wichtige Organismen entwickelt werden.

Zur Aufarbeitung des Probenmaterials aus der Milchindustrie stehen als Ergebnis dieses Projektes Methoden für die Extraktion und Fragmentierung der DNA zur Verfügung. Da sich während der Startphase des Projekts herausgestellt hatte, dass die ursprünglich für die Markierung der genomischen DNA vorgesehenen Methoden der Nick-Translation oder des "Random primed labelling" für den Einsatz in der industriellen Routineanalytik der Lebensmittelindustrie zu kostenintensiv sind, fiel die Wahl der Markierungsmethodik auf Psoralen-Biotin mit anschließender Detektion über Streptavidin-Cy5. Mit Hilfe dieser Methodik ist es nun möglich, Starterkulturen, Fermentationsproben und Milchprodukte auf fermentationsrelevante Organismen und produktspezifische Gene hin zu analysieren. Als Resultat dieser Arbeiten können jetzt mittels Chip-Analyse Starterkulturorganismen, unerwünschte Keime, Phagen sowie Gene für Phagenresistenz oder Citratstoffwechsel erfaßt werden.

Mit Hilfe eines Fragebogens, der gemeinsam mit allen Projektpartnern entwickelt wurde, entstand eine Marktanalyse über die wesentlichen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Vermarktung des angestrebten Produktes. Die umfangreiche Befragung hat zwar das große Interesse an der multiparametrischen Keimanalytik mit Hilfe der DNA-Mikroarray Analyse in der Milchindustrie bestätigt, aber auch Hürden für die schnelle Markterschließung aufgezeigt.

In der folgenden Graphik, die einen Vergleich des Soll- und Ist-Zustand des Projekts zeigt, sind diese Projektergebnisse noch einmal zusammengefasst. Es wird deutlich, dass alle Ressourcen zielführend eingesetzt wurden, um das Projekt zum geplanten Abschluss zu bringen. Speziell in der Endphase des Projekts wurden von den einzelnen Projektpartnern zum Teil erheblich mehr Eigenleistungen erbracht, als ursprünglich vorgesehen. Insbesondere hervorzuheben ist der Mehraufwand bei der Auswahl, der Sequenzanalyse und dem Sondendesign für Hefen und Schimmelpilze sowie für die zeitlichen Verzögerungen durch die zusätzliche Etablierung der Markierungsreaktion mit Psoralen-Biotin und Streptavidin-Cy5.

Die Praxistauglichkeit des neuen Verfahrens wurde anhand der Kriterien der Marktanalyse demonstriert, die sofortige Vermarktbarkeit hingegen ist, anders als zunächst erwartet, für die nächsten 3-5 Jahre noch nicht abzusehen. Ursache dafür sind zum einen die aktuelle Wirtschaftslage und die mit ihr gesunkenen Preise für die herkömmliche Analytik und zum anderen die noch fehlende Anerkennung des neuen Verfahrens durch Gesetzgeber und Behörden.



## **5. Öffentlichkeitsarbeit**

Neben der Beteiligung an den, von den BIOL-Koordinatoren organisierten Messeauftritten auf der Anuga Food 2003 und der Achema 2003 wurde unter der Redaktion der Deutschen Bundesstiftung Umwelt ein Flyer zur Kurzdarstellung des Projekts ausgearbeitet. Die Diplomarbeiten von Herrn Chris Würdemann und Frau Wagner-Prigge, sowie die Doktorarbeit von Herrn Michael Schmidt enthalten in großen Teilen Ergebnisse, die im Rahmen dieses Projekts erzielt worden sind. Die Arbeiten sind über die Bibliothek der Universität Bremen öffentlich zugänglich. Publikationen in Fachzeitschriften werden nach dem endgültigen Abschluss der Forschungsarbeiten erfolgen.

**Schmidt, M.P.** (2004) Untersuchung zur Einsetzbarkeit der Psoraln-PEO-Biotin Markierung in der DNA-Mikroarray Technologie für die Analyse von Starterkulturbakterien und ihren Phagenresistenzgenen. Doktorarbeit an der Universität Bremen, Fertigstellung Juni 2004.

**Würdemann, C.A.** (2002) Die Psoralen-PEO-Biotin Markierung für den Einsatz in der DNA-Mikroarray Technologie, untersucht am Beispiel der Phagenresistenzgene in Milchsäurekulturen. Diplomarbeit an der Universität Bremen, Fertigstellung Juli 2002.

**Wagner-Prigge, K.** (2002) Untersuchungen zur Verwendbarkeit ausgewählter Oligonukleotide als Fängermoleküle auf DNA-Mikroarrays für den Nachweis von milchrelevanten Bakterien. Diplomarbeit an der Universität Bremen, Fertigstellung September 2002.

Außerdem wurden die Ergebnisse in Vorträgen und Posterpräsentationen auf folgenden Fachtagungen präsentiert:

**Glöckner, C.B. und Blohm, D.H.** (2002) Vortrag über das Projekt beim Nordmilch-Workshop „Mikrobiologie“, Hamburg, 25.06.2002.

**Blohm, D.H. und Glöckner, C.B** (2002) Einsatzmöglichkeiten der DNA-Chip Technologie im Milchverarbeitungsprozeß. Vortrag auf der "Ideenbörse Forschung - Technologien für die Zukunft" des Milchindustrieverbandes, 5./6. November 2002, Fulda.

**Glöckner, C.B. and Blohm, D.H.** (2003) Vortrag beim der COST action 853 "Agricultural biomarkers for array technology" der Europäischen Union, Working group 4: Applying microarray technology in milk industry, 24.-26. September, Bremen.

**Glöckner, C.B. und Blohm, D.H.** (2003) Vortrag "Stand und Perspektiven der Einsatzmöglichkeit von DNA-Mikroarrays im Milchverarbeitungsprozess", Lebensmitteltechnologie 2003, 25.-27. September, Stuttgart.

**Glöckner, C.B., Schmidt, M.P., Weiß, S., Würdemann, C., Wagner-Prigge, K. and Blohm, D.H.** (2004) Analysis of milk products as an example for the applicability of the microarray technology in the food industry. Posterpräsentation auf dem DECHEMA-Statusseminar Chiptechnologien, 24.-25. Januar, Frankfurt.

## **6. Fazit und Ausblick**

Die Milchindustrie hat im Vergleich zu anderen Lebensmittelindustriezweigen mit die höchste Anzahl an Analysenproben zu bewältigen. Insofern ist verständlich, dass ein großes Interesse an Simultan-Verfahren wie z.B. der Mikroarray Methodik besteht. Der extrem starke Kostendruck auf die Unternehmen führt jedoch zu dem Phänomen, dass dieses hoch innovative Verfahren auf dem Markt zunächst noch nicht akzeptiert wird, solange die „bewährte“ Technologie, bedingt durch die derzeitige innovationsfeindliche Wirtschaftslage preiswerter ist und solange sie vom Gesetzgeber nicht verlangt wird. Unter dieser Situation leiden derzeit alle, in der Lebensmittelindustrie engagierten Chip-Diagnostik Unternehmen (siehe Insolvenzen von GeneScan, FrizBiochem, PicoRapid, Memorec, Febit u.a.): Ein Chip ist hervorragend dafür geeignet sehr viele Mikroorganismen parallel und zeitgleich deren genetisch manifestierte Eigenschaften zu identifizieren. Für die Lebensmittelindustrie sind jedoch nur sehr wenige Keime wirklich relevant. Beim Nachweis einzelner Keime sind die Kosten der Chip-basierten DNA-Analytik kaum zu rechtfertigen. Allerdings gibt es durchaus auch in der Lebensmittelindustrie eine hinreichende Anzahl von erforderlichen Keim-Nachweisen, die den Aufwand der hochparallelen Mikroarray Technologie lohnt. Als Folge des enormen Kostendruckes in dieser Branche wird derzeit aber gezögert, diese Investitionen zu tätigen. Da sich die Lebensmittelindustrie i.d.R. strikt an solche Nachweis-Verfahren hält, die von behördlicher Seite benannt sind, ist gerade in der Milchindustrie aufgrund des immensen Kostendruckes der Einsatz von teuren Schnellmethoden besonders gering geblieben (< 10 %). Bei derzeitigen Preisen von etwa € 15 pro Analyse kann der Milch-Chips in seiner gegenwärtigen technischen Entwicklungsphase nicht konkurrenzfähig sein. Der Vorteil, diverse Analysen simultan durchführen zu können, hat sich im Lauf des Projektes aus wirtschaftlicher Sicht z.T. in sein Gegenteil verkehrt, da die Analysen der verschiedenen Mikroorganismen in der Praxis keineswegs immer zeitgleich benötigt werden. Auch die hohe erforderliche Investition in Zusatzgeräte, wie z.B. einen Chip-Scanner, sowie die weiterhin erforderliche komplexe Geräteausstattung, die hohe Anzahl an Arbeitsschritten und die noch nicht erreichte Automatisierbarkeit setzen die Marktchancen des Milch-Chips herab.

Ein Milch-Chip wäre aus heutiger Sicht wohl nur dann wirtschaftlich einzusetzen, wenn die Kosten bei der Routineanwendung für einen Chip nicht höher als etwa € 10 lägen. Für Einzelanwendungen könnten im Ausnahmefall bis zu € 30 gezahlt werden, aber wohl nur, wenn die Durchführung vollständig automatisierbar wäre, und die Anzahl der Arbeitsschritte auf ein Minimum gesenkt

werden könnte (< 10 Arbeitsschritte). Ein weiteres Kaufargument für die Mikroarray-Technologie bestünde dann, wenn Dutzende weiterer Keime gleichzeitig ohne zusätzlichen Personal- und Kostenaufwand erfassbar wären.

Nach den, in den letzten Monaten dieses Projektes aktualisierten Marktanalysen ist das derzeit größte Hemmnis für eine Markteinführung des Chip-basierten DNA-analytischen Verfahrens in die produktionsintegrierte Routine-Analytik der Milchindustrie eine, durch den momentanen enormen Preisdruck verursachte mangelnde Innovationsbereitschaft der Unternehmen.

## **7. Anlagen**

<b>Anlage 1:</b>	<b>Fragebogen zur Marktanalyse .....</b>	<b>65</b>
<b>Anlage 2:</b>	<b>Adressliste für die Marktanalyse .....</b>	<b>71</b>
<b>Anlage 3:</b>	<b>Titel und Zusammenfassung der Doktorarbeit von Herrn M. P. Schmidt .....</b>	<b>75</b>
<b>Anlage 4:</b>	<b>Titel und Zusammenfassung der Diplomarbeit von Herrn C. Würdemann .....</b>	<b>78</b>
<b>Anlage 5:</b>	<b>Titel und Zusammenfassung der Diplomarbeit von Frau K. Wagner-Prigge .....</b>	<b>82</b>
<b>Anlage 6:</b>	<b>Poster für das DECHEMA-Statusseminar Chiptechnologien 2004 .....</b>	<b>85</b>
<b>Anlage 7:</b>	<b>Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2004 023 188.5-41 Titel: Verfahren und Vorrichtung zur Qualitätssicherung in der Milchindustrie .....</b>	<b>86</b>

**Anlage 1: Fragebogen zur Marktanalyse**

**1. Auf welche Keime wird in Ihrem Unternehmen derzeit geprüft?**

	ja	nein	falls ja erfolgt die Analyse extern?	falls nein, wäre eine eine Analyse wünschenswert?
Pathogene Bakterien	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Pathogene Pilze	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Starterkulturbakterien / Pilze	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Bakteriophagen	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]

Weitere: \_\_\_\_\_

**2. Mit welchen Techniken / Verfahren wird derzeit auf das Vorhandensein dieser Keime geprüft?**

**2.1. Technik**

ELISA	[ ]
API	[ ]
PCR	[ ]
Impedanzmessung	[ ]
Fluoreszenzmessung im Durchfluß	[ ]
NIR	[ ]

Andere: \_\_\_\_\_

**2.2. Welche Anreicherungsmedien kommen dabei zum Einsatz?**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**2.3. Wie viele Proben werden durchschnittlich pro Tag auf Keime hin analysiert?**

1 – 10 [ ]      10 – 20 [ ]      20– 50 [ ]      50– 100 [ ]      100– 500 [ ]

**2.4. Zwischen wie vielen Keimgruppen werden bei jeder dieser Analysen im Mittel unterschieden?**

ca.

**3. Welches Material wird zurzeit routinemäßig auf die Anwesenheit von Keimen hin analysiert?**

**3.1. Rohstoffe**

	ja	nein	falls ja, welche Keime?
Starterkulturen	[ ]	[ ]	_____
Milch	[ ]	[ ]	_____
Fruchtzubereitung	[ ]	[ ]	_____
Wasser (Prozess + Reinigung)	[ ]	[ ]	_____
Kräuter	[ ]	[ ]	_____

Weitere: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**3.2. Zwischenprodukte**

welche Keime?

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

- \_\_\_\_\_

**3.3. Endprodukte**

welche Keime?

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**4. Welche Keime sollten von einem universellen Analyse-Chip (für Rohstoffe, Zwischenprodukte und Endprodukte) erfasst werden?**

	sehr wichtig	wichtig	weniger wichtig
Staphylococcus aureus	[ ]	[ ]	[ ]
Salmonella spec.	[ ]	[ ]	[ ]
Listeria monocytogenes	[ ]	[ ]	[ ]
Enterobacteriaceae	[ ]	[ ]	[ ]
Escherichia coli	[ ]	[ ]	[ ]

Coliforme	[ ]	[ ]	[ ]
Pseudomonas aeruginosa	[ ]	[ ]	[ ]
Mycobacterium paratuberculosis	[ ]	[ ]	[ ]
Campylobacter	[ ]	[ ]	[ ]
Bacillus cereus	[ ]	[ ]	[ ]
Lactococcus spec./ssp.	[ ]	[ ]	[ ]
Lactobacillus spec	[ ]	[ ]	[ ]
Streptococcus thermophilus	[ ]	[ ]	[ ]
Leuconostoc mesenteroides	[ ]	[ ]	[ ]
probiotische Bakterien	[ ]	[ ]	[ ]

Weitere: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**5. Wo sehen Sie den größten Bedarf für Verbesserungen Ihrer derzeitigen Analytik?**

	sehr wichtig	wichtig	weniger wichtig
Verkürzung der Analysezeit	[ ]	[ ]	[ ]
Reduktion der Materialkosten	[ ]	[ ]	[ ]
Reduktion der Personalkosten	[ ]	[ ]	[ ]
Verbesserung der Quantifizierbarkeit		[ ]	[ ] [ ]
Erhöhung der Sensitivität	[ ]	[ ]	[ ]
Lebend/Tot-Unterscheidung	[ ]	[ ]	[ ]
Erweiterung des Analysespektrums um (weitere)			
pathogene Bakterien	[ ]	[ ]	[ ]
Starterkulturbakterien	[ ]	[ ]	[ ]

Bakteriophagen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schimmelpilze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hefen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Phagenresistenzgene	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antibiotikaresistenzgene	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fermentationsrelevante Gene/Enzyme		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Weitere: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**6. Was wäre ein akzeptabler Preis für eine Keimdifferenzierung per Chip-Technologie? (Kosten pro Keim und pro Probe)**

1 – 5 €     5 – 10 €     10– 20 €     20 – 50 €     50 – 100 €   
 100 – 250 €     250 – 500 €

**7. Wie lange darf eine Keimdifferenzierung per DNA-Chip maximal dauern?**

< 1h     1 – 4h     5 – 8h   
 8 – 24h     1 – 2 Tage     2 - 5 Tage   
 > 5 Tage

**8. Möchten Sie die Ergebnisse der Befragung nach Abschluss der Auswertung erhalten?**

ja                      nein

**Per Post**

---

**An:**

PicoRapid Technologie GmbH  
z.Hd. Dr. Ulf Steller  
Fahrenheitstr. 1  
D - 28359 Bremen

**Oder als:**

FAX – Antwort

FAX-Nr.: 0421 2208 333

Seiten: 5

Datum: \_\_\_\_\_

**Absender:**

Firma / Institut: \_\_\_\_\_

Abteilung / Arbeitsgruppe.: \_\_\_\_\_

Zusatz: \_\_\_\_\_

Name; Vorname: \_\_\_\_\_

Straße, Haus-Nr.: \_\_\_\_\_

PLZ, Ort: \_\_\_\_\_

Land: \_\_\_\_\_

## **Anlage 2: Adressliste für die Marktanalyse**

<b>Firma</b>	<b>Adresse1</b>	<b>Adresse2</b>	<b>Postleitzahl</b>	<b>Ort</b>
Macromedia Inc.	600 Townsend Street			San Francisco, CA 94103
Gläserne Meierei GmbH	Neubrandenburger Str. 33		18055	Rostock
Milchwerke Ingolstadt-Thalmässing eG	Münchener Str. 125		85051	Ingolstadt
Hansa-Milch Mecklenburg-Holstein eG	Industriegebiet		23936	Upahl
Heideblume-Molkerei	Elsdorf-Rotenburg eG	Molkereistr. 6	27404	Elsdorf
Hochland AG	Kemptener Str. 17		88178	Heimenkirch
Hochwald	Nahrungsmittel-Werke GmbH	Bahnhofstr. 37-43	54424	Thalfang
Humana GmbH	Bielefelder Str. 66		32051	Herford
Jermi Käsewerk GmbH	Ritter-Heinrich-Str. 2-4		88471	Laupheim-Baustetten
Käserei Champignon	Hofmeister GmbH & Co. KG	Kemptener Str. 17-24	87493	Lauben/Allgäu
Molkerei Meggle Wasserburg	GmbH & Co. KG	Megglestr. 6-12	83512	Wasserburg
Milchwerke Mainfranken eG	Louis-Pasteur-Str. 1		97076	Würzburg
Molkerei	Oldenburger		26215	Wiefelstede

<b>Firma</b>	<b>Adresse1</b>	<b>Adresse2</b>	<b>Postleitzahl</b>	<b>Ort</b>
Ammerland eG	Landstr. 1a			
Molkerei Alois Müller			86850	Fischach-Aretsried
Milch-Union Hocheifel eG	Im Scheid 1		54597	Pronsfeld
Nestlé Deutschland AG	Lyoner Str. 23		60523	Frankfurt/Main
Dr. August Oetker	Nahrungsmittel AG	Lutterstr. 14	33617	Bielefeld
Omira Oberland-Milchverwertung GmbH	Ravensburg	Jahnstr. 10	88214	Ravensburg
Onken GmbH	Dr. Berns-Str. 23		47439	Moers
Rücker GmbH	Egelder Str. 111		26605	Aurich
Schwälbchen Molkerei	Jakob Berz AG	Bahnhofstr. 38	65307	Bad Schwalbach
Schwarzwaldmilch GmbH	Bunsenstr. 2		77652	Offenburg
Starmilch eG	Brauhausstr. 7		36043	Fulda
Dr. Otto Suwelack Nachf.	GmbH & Co. KG		48727	Billerbeck
Tetra Pak GmbH	Frankfurter Str. 79-81		65239	Hochheim/Main
Turm-Sahne GmbH	Westerender Weg 24a		26125	Oldenburg
Uelzena AG	Im Neuen Felde 87		29525	Uelzen

<b>Firma</b>	<b>Adresse1</b>	<b>Adresse2</b>	<b>Postleitzahl</b>	<b>Ort</b>
Unilever PLC	Unilever House	Blackfriars		London EC4P 4BQ
Unilever NV	Weena 455		3013 AL	Rotterdam
Milchwerke Schwaben eG	Postfach 3120		89021	Ulm
Yakult Deutschland GmbH	Forumstr. 2		41468	Neuss
Andechser Molkerei	Scheitz GmbH	Molkereistr. 5	82346	Andechs Obb.
Bayernland eG	Bergader Privatkäserei GmbH	Weixlerstr. 16	83329	Waging a. See
J. Bauer GmbH & Co. KG.	Milchverarbeitung	Postfach 1160	83501	Wasserburg / Inn
Berglandmilch reg. Gen. mbH	Schärdinger Str. 1		A-4066	Pasching
Biolac GmbH	Arla Foods Ingredients	Deutschland GmbH	31097	Harbansen
Breisgaumilch GmbH	Haslacher Str. 12		79115	Freiburg
Bayerische Milchindustrie eG	Klötzlmüllerstr. 140		84036	Landshut
Campina GmbH & Co. KG	Wimpfener Str. 125		74078	Heilbronn
Danone GmbH	Postfach 830354		81703	München
Domspitzmilch eG	Donaustauer Str.		93059	Regensburg

<b>Firma</b>	<b>Adresse1</b>	<b>Adresse2</b>	<b>Postleitzahl</b>	<b>Ort</b>
	87			
DrinkFit GmbH	Bahnhofstr. 22		36381	Schlüchtern
Ehrmann AG	Berliner Str. 54		71229	Leonberg
frischli Milchwerke GmbH	Bahndamm 4		31547	Rehburg - Loccum
Goldsteig Käsereien Bayernwald GmbH	Siechen 11		93413	Cham
Hohenloher Molkerei eG	Raiffeisenstr. 4		74523	Schwäbisch Hall
Karwendel-Werke	Huber GmbH & Co. KG	Karwendelstr. 6-16	86807	Buchloe
Kraft Foods Deutschland GmbH	Langemarckstr. 4- 20		28199	Bremen
Milei GmbH	Kemptener Str. 91		88299	Leutkirch- Adrazhofen
Hansano GmbH	Milchstr. 10		30916	Isernhagen
Unilever Bestfoods GmbH	Hauptverwaltung	Dammtorwall 15	20355	Hamburg
Unilever Foods Devision	Foods Research Center	Knorrstr. 1	74074	Heilbronn

**Untersuchung zur Einsetzbarkeit  
der Psoralen-PEO-Biotin Markierung  
in der DNA-Microarray Technologie  
für die Analyse von Starterkulturbakterien  
und ihren Phagenresistenzgenen**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades eines**

**Doktors der Naturwissenschaften**

**- Dr. rer. nat. -**

**dem Fachbereich Biologie / Chemie**

**der**

**Universität Bremen**

**vorgelegt von**

**Michael Patrick Schmidt**

**Bremen 2004**

## **Zusammenfassung:**

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung zur Einsetzbarkeit der Psoralen-PEO-Biotin Markierung in der DNA-Microarray Technologie für den direkten Nachweis von Organismen- und Phagenresistenzgenen in der Milch-Analytik, da es bei der biotechnischen Umsetzung von Milch zu Milchprodukten zu Fehlfermentationen kommen kann, die hauptsächlich durch Phagen verursacht werden.

Um die Einsetzbarkeit des DNA-Microarrays in der Industrie, der bisher durch verschiedene methodische Defizite eingeschränkt war, untersuchen zu können, wurden verschiedene molekularbiologische Methoden miteinander verflochten, zu denen die DNA-Extraktion, die Fragmentierung und Markierung von genomischer DNA und deren Nachweis gehören. Die kostengünstige Psoralen-PEO-Biotin Methode wurde für die Markierung von genomischer DNA optimiert, da herkömmliche Markierungsverfahren für den Routine-Einsatz in der Industrie zu kostenintensiv waren. Die Markierungsmethode wurde anhand eines Modellsystems mit unterschiedlich langen PCR-Produkten optimiert und deren Signalintensitäten mit denen von endmarkierten PCR-Produkten verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fragmentlänge bei PCR-Produkten einen großen Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz hat und die Hybridisierungssignale bei der Endmarkierung dementsprechend mit der Länge abnehmen. Hingegen kommt es bei der Psoralen-PEO-Biotin Markierung zu einer Konkurrenzsituation zwischen der sterischen Hinderung und der Mehrfachmarkierung, so dass die Signalintensitäten bis zu einer Länge von ca. 1 kb zunahmten und ein Plateau erreicht wurde. Die Sensitivität konnte im Vergleich zur Endmarkierung durch Optimierung der Parameter um den Faktor 100 gesteigert werden.

Die Ergebnisse des Modellsystems wurden an genomischer DNA validiert, indem genomische DNA mit einer optimierten chemischen Fragmentierungsmethode, der Fenton-Reaktion, in unterschiedliche Fragmentgrößen sequenzunabhängig fragmentiert wurde. Die Ergebnisse des Modellsystems konnte mit genomischer DNA bestätigt werden. Für genomische DNA stellt sich bei der Psoralen-PEO-Biotin Markierung ein Equilibrium zwischen der Signalintensität und der Hybridisierungseffizienz ebenfalls bei einer Fragmentlänge von ca. 1 kb ein.

Für den spezifischen Nachweis der 34 Phagenresistenzgene, die in *Lactococcus lactis* beschrieben sind, wurden für jedes Gen zwei Sonden mit bioinformatischen Softwarepaketen ausgewählt, so dass ein SONDENSATZ von 68 Sonden vorlag. Die Funktionalität der generierten Sonden wurde experimentell über Psoralen-PEO-Biotin markierte PCR-Produkte auf dem DNA-Microarray

bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle generierten Sonden spezifisch für die PCR-Produkte waren und Kreuzhybridisierungen ausblieben. Der Nachweis der Phagenresistenzgene durch Hybridisierung von PCR-Produkten auf DNA-Microarrays war somit erfolgreich. Eine Korrelation zwischen der Lage der Sonde auf dem PCR-Produkt und der Signalintensität konnte nicht hergestellt werden. So konnten sowohl für mittelständige als auch für endständige Sonden starke Hybridisierungssignale gemessen werden. Insgesamt weisen die vorliegenden Daten auf eine komplexe Interaktion unterschiedlicher Parameter hin, die es weiter zu untersuchen gilt.

Nach erfolgreicher Sondentestung und Optimierung der Teilschritte des Protokolls, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DNA-Microarrays, die auf der Anwendung von gerichteten Oligonukleotidsonden basieren, für den spezifischen Nachweis von Organismen- und Phagenresistenzgenen in Starterkulturen eingesetzt werden können. Das entwickelte kostengünstige Protokoll erlaubte erstmalig eine Organismenanalyse von Starterkulturen aufgrund der direkten Hybridisierung von genomischer DNA. Der Nachweis von Phagenresistenzgenen ohne deren Amplifikation, gelang nur bei den Genen, die in mehr als 40 % der untersuchten Starterkulturisolate vorkamen.

Aus diesem Grund wurde das Protokoll um zwei verschiedene Signalamplifikations- Strategien erweitert, um funktionelle Gene, die nur in geringen Mengen in der Probe vorkommen, eindeutig zu detektieren. 1.) Durch den Einsatz der Multiplex-PCR konnten alle Phagenresistenzgene der Gruppe I-III der Starterkulturen Probat 8/0 und Probat 505 spezifisch mit dem erstellten SONDENSATZ auf dem DNA-Microarray nachgewiesen werden. 2.) Der Einsatz der Signalamplifikation mit TSA auf dem DNA-Microarray führte zu einer 10fachen Verstärkung der Signale für die rDNA-Sonden. Der eindeutige Nachweis der Phagenresistenzgene gelang aber nicht, da unspezifische Signalamplifikationen nicht vermieden werden konnten. Durch die Optimierung der TSA-Methode kann der spezifische Nachweis sicherlich verbessert werden, so dass es zukünftig möglich sein wird, alle Phagenresistenzgene ohne Amplifikation über die Hybridisierung von genomischer DNA nachzuweisen.

Betrachtet man die erzielten Fortschritte bei der Anpassung der Microarray-Technologie an den komplexen Nachweis von genomischer DNA aus Starterkulturen, zeigt sich, dass dieses Hybridisierungsformat in den nächsten Jahren für entsprechende Untersuchungen verfügbar sein wird. Durch den in der vorliegenden Arbeit ausgearbeiteten „Milch-Chips“ wird es zukünftig der Milchindustrie möglich sein, Starterkulturen aufgrund ihrer Organismenzusammensetzung und ihres Phagenresistenzgen-Spektrums so auszuwählen, dass sie zu einer stabileren Fermentation beitragen können.

UNIVERSITÄT BREMEN  
FACHBEREICH 2  
STUDIENGANG BIOLOGIE

Die Psoralen-PEO-Biotin Markierung für den Einsatz in der  
DNA-Mikroarray Technologie, untersucht am Beispiel der  
Phagenresistenzgene in Milchsäurekulturen.

Diplomarbeit

vorgelegt von: Chris André Würdemann

Gutachter: Prof. Dr. D. Blohm

PD Dr. habil. B. Kazmierczack

Bremen, im Juli 2002

## **Zusammenfassung**

Gegenstand dieser Diplomarbeit ist neben der Entwicklung von Sonden für den Nachweis von Phagenresistenzgenen auf einem DNA-Chip, die Adaptierung und Optimierung einer chemischen Markierungsmethode für Chip-Technologie. Weiterhin wurde ein neues Konzept zum Einsatz von DNA-Dendrimern der Firma Genisphere in Verbindung mit der Psoralen-PEO-Biotin Markierung und dem Einsatz von STV-DNA Hybriden entwickelt und in Ansätzen getestet.

Zur Entwicklung eines Testsystems für die Adaptierung und Optimierung der Psoralen-PEO-Biotin Methode wurden Sonden für den Nachweis der häufigsten Phagenresistenzgene in Milchsäurestarterkulturen entwickelt. Nach der Ermittlung der jeweiligen kodierenden Sequenzen durch eine Datenbankrecherche in der NCBI-Datenbank wurden die Sekundärstrukturen der CDS bei 50°C unter Anwendung des MFOLD-Faltungsalgorithmus bestimmt und sekundärstrukturfreie Bereiche determiniert. In diesen Bereichen wurden anschließend Sonden mit einem einheitlichen  $T_m$ -Wert zwischen 48-52°C ermittelt. Mit diesem Vorgehen war es möglich 5 Sonden für den Nachweis des Phagenresistenzgens ADS, 6 Sonden zur Detektion von LlaDII, 14 Sonden für HsdR2 und 8 Sonden für den Nachweis von AbiB zu positionieren.

Zur Evaluation des entwickelten Sondenauswahlverfahrens und zur Erstellung eines Sonden-Target Testsystems für die weiteren Vorhaben wurden 4 der 8 AbiB Sonden auf ihre Funktion hin auf einem DNA-Chip getestet. Dazu wurden PCR-Produkte mit einer maximalen Länge von 250 bp entwickelt und die Position der zu testenden Sonden in dem PCR-Produkt mit MFOLD erneut überprüft.

Nach der Auswahl eines Hybridisierungspuffers und eines Hybridisierungsprotokolls mit anschließender Modifizierung durch einen Prähybridisierungsschritt zeigten alle 4 ausgewählten Sonden AbiB134, AbiB386, AbiB571 und AbiB287 bei der Hybridisierung mit Cy5 endmarkierten PCR-Produkten ein positives Signal.

In Bezug auf die Adaptierung der Psoralen-PEO-Biotin Markierungsmethode wurde durch den Einsatz eines Gelshiftassays und eines Mikrotiterplattenassays die Funktion dieser Methode sichergestellt. In den nachfolgenden Versuchen gelang es, diese Methode unter Verwendung des Sonden-Target-Testsystems AbiB386 und AbiB287 für die in der Arbeitsgruppe etablierte Chip-Technologie zu adaptieren.

Durch die anschließenden experimentellen Schritte wie Untersuchungen zur Hintergrundreduktion, Test verschiedener Markierungsvolumina, Ermittlung der optimalen UV-Einwirkzeit und Variation der zur Markierung eingesetzten Psoralen-PEO-Biotin Konzentration konnte die Markierungsmethode für die Anwendung in der etablierten Chip-Technologie optimiert werden.

Neben der Markierungsmethode wurde auch der Detektionsschritt durch STV-Cy5 Konjugate nach Integration in das durch einen Milchpulverblockingschritt modifizierte Hybridisierungsprotokoll optimiert. Die Optimierung bezog sich dabei auf die Ermittlung der effektivsten STV-Cy5 Konzentration und die Testung verschiedener Inkubationszeiten zur Anbindung der Konjugate.

Durch die Kombination der variierten Parameter konnte bei der Hybridisierung eines 250 bp langen PCR-Produktes eine Hybridisierungssignalsteigerung von ca. 100% im Vergleich zum nicht optimierten Vorgehen erreicht werden.

In einem Vergleich der Psoralen-PEO-Biotin Markierungsmethode mit der Markierung über Cy5-markierte Primer konnte keine eindeutige Signalsteigerung ermittelt werden. Je nach Testsystem wurde entweder wie im Fall der Sonden AbiB134 und AbiB386 eine Erhöhung des Hybridisierungssignals um ca. 200% verzeichnet, während andere Systeme nur ca. 20% der Vergleichswerte erreichten. Auf diese Ergebnisse aufbauend wurde eine Hypothese aufgestellt, die davon ausgeht, dass die Position der Sonde im Target verbunden mit der Menge an zugänglichen Biotinmolekülen für die STV-Cy5 Konjugate und damit sterische Hinderungen bei der Detektion zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen führten. In Experimenten, in denen die unterschiedlich markierten PCR-Produkte gegen einen Sondengradienten hybridisiert wurden, konnte gezeigt werden, dass im Fall der Psoralen-PEO-Biotin Methode trotz zunehmender Sondenkonzentration und damit hybridisiertem Target ab einer Konzentration von ca. 1 nM keine weiteren Hybridisierungssignalzunahmen messbar waren. Diese Beobachtung könnte für sterische Effekte sprechen, die die Psoralen-PEO-Biotin Markierungsmethode bzw. die Detektion durch STV-Cy5 Konjugate bei bestimmten Sonden-Target Positionen in ihrer Effizienz beeinträchtigen könnten.

Durch die Kombination der adaptierten und optimierten Psoralen-PEO-Biotin Methode mit dem modifizierten Hybridisierungsprotokoll, dem Detektionsschritt und der bereits etablierten Fenton-Reaktion zur Fragmentierung von genomischer DNA, konnte die Funktion einer PCR-freien Analyse von Milchsäurestarterkultureigenschaften im Sinne eines „Proof of Principle“ aufgezeigt werden.

In einem weiteren Abschnitt der Diplomarbeit wurde ein neu entwickeltes Konzept zum Einsatz der Psoralen-PEO-Biotin Methode in Kombination mit der DNA-Dendrimer-Technologie und der Verwendung eines STV-DNA-Hybrids in seinen Ansätzen getestet. Die Spezifität und damit die Funktion eines neu konstruierten Linker-Oligonukleotides konnte sowohl für das Hybrid als auch für die DNA-Dendrimere ermittelt werden. Weiterhin war es möglich, das neue Konzept auf der Basis des Target-Sonden Testsystems AbiB287 und AbiB386 im Einsatz in der DNA-Chip Technologie zu testen. Im Vergleich mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten Markierungsmethoden (Cy5-endlabel, Psoralen-PEO-Biotin, DNA-Dendrimer-Hybrid Methode) wurde mit der DNA-Dendrimer-Hybrid-Methode die höchsten Hybridisierungssignale erreicht.

**Untersuchungen zur Verwendbarkeit ausgewählter  
Oligonukleotide als Fänger-Moleküle auf DNA-Mikroarrays für  
den Nachweis von milchrelevanten Bakterien**

**Diplomarbeit**

Vorgelegt von:

**Katrin Wagner-Prigge**

Matrikelnummer 1234778

**1. Gutachter: Prof. Dr. D. Blohm**

**2. Gutachter: Prof. Dr. K. Heller (BAfM, Kiel)**

**14. September 2002**

**Institut für Umweltforschung und Umwelttechnologie (UFT)**

Abteilung für Molekulargenetik und Biotechnologie (Prof. Dr. D. Blohm)

Universität Bremen, Fachbereich 2

## **Zusammenfassung**

In dieser Arbeit kamen zum spezifischen Nachweis von Mikroorganismen-DNA Oligonukleotid-Sonden (17 - 25 bp) zum Einsatz, die eine Komplementarität zu bestimmten Bereichen der 16S- bzw. 23S- rDNA aufwiesen. Das Ziel war, mittels dieser Sonden Mikroorganismen spezifisch nachzuweisen.

Die Entwicklung der Primer zum Markieren der PCR-Fragmente und Sonden zum Nachweis von Mikroorganismen wurden unter zu Hilfenahme der bioinformatischen Software Entrez, ClustalW, BLAST, FastA und DNA-folding entwickelt. Ein wichtiges Entscheidungskriterium bei der Auswahl der Oligonukleotide für die Sondenherstellung waren die Positionen in der 16S- rDNA, die Sekundärstrukturen, ihre  $T_m$ -Werte und ihre freie Energie.

Die durch PCR amplifizierte und markierten Fragmente wurden nach der PCR gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin überprüft. Danach wurden einige bereits veröffentlichte Sonden, sowie Neuentwicklungen der Fa. Vermicon und selbst-entwickelte Sonden zusammen auf einem DNA-Chip gespottet und mit Cy5-markierten PCR-Produkten der DNA von ausgewählten Mikroorganismen hybridisiert. In einem weiteren Experiment wurde zusätzlich von einigen Mikroorganismen genomische DNA nach der Methode von Fenton fragmentiert. Diese DNA-Fragmente wurden Psoralen-PEO-Biotin markiert und nach der Hybridisierung mit den Sonden auf dem Chip mittels Streptavidin-Cy5 nachgewiesen. Die Auswertung der Mikroarrays erfolgte mit Hilfe eines Axon Laser-Scanners. Dabei wurden von je sechs Arrays pro Chip die Mittelwerte berechnet und für die statistische Auswertung von jeweils drei bis sechs Hybridisierungen pro Mikroorganismus herangezogen und graphisch dargestellt.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war es, die Hybridisierungsparameter so auf die Sonden zu optimieren, dass der genetische Nachweis von verschiedenen Mikroorganismen auf einem Chip gleichzeitig möglich war. Für einige Sonden wurden gegen Ende der Diplomarbeit noch Veränderungen vorgenommen, um die Signalintensitäten zu erhöhen bzw. noch zusätzliche Sonden entwickelt, wenn sich bestimmte Bereiche der 16S-rDNA nach einigen Hybridisierungen als besonders gut zugänglich erwiesen hatten. Bei diesen Sonden konnten z. T. nur noch die Mikroorganismen getestet werden, für die diese Sonden entwickelt worden waren. Auf etwaige Kreuzhybridisierungen mit anderen Mikroorganismen konnten diese Sonden nicht mehr geprüft werden.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Die Region unter 100 bp auf der 16S-rDNA ist mit PCR-Produkten nur schwer zugänglich. Gute Hybridisierungsergebnisse wurden für diese Region bei Laktokokken durch die Hybridisierung von fragmentierter, genomischer DNA erhalten. Die Detektion von Enterobacteriaceen mit den gespotteten Sonden ist möglich. Für den Nachweis von *E. coli*, speziell für die 16S-rDNA sind noch weitere Arbeiten notwendig. Bei Laktokokken, Listerien, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Salmonellen, *Ps. aeruginosa* konnten gute Signalintensitäten für speziesspezifische Sonden durch die Hybridisierung mit Cy5-markierten PCR-Produkten erhalten werden. Es scheinen sich jedoch auch für diese Mikroorganismen durch das Fragmentieren nach Fenton zusätzliche Möglichkeiten für speziesspezifische Sonden zu öffnen, wie am Beispiel der Salmonellen dargestellt wurde. Bei dem Einsatz von definierten Mengen an markierten PCR-Fragmenten der Mikroorganismen-DNA kann man über Hybridisierungsmuster aller auf den Chip aufgetragenen Sonden die zu detektierende Bakterienspezies bestimmen. Ebenso lassen sich die typischen SONDENSIGNALE der Mikroorganismen auch bei einem Einsatz von zwei gleichzeitig hybridisierten DNA-Fragmentmischungen gut erkennen. In den anschließenden Arbeiten sollten weitere Optimierungen der Sonden bezüglich der Signalintensitäten erfolgen und v. a. weitere Sonden für *E. coli* entwickelt werden.