

Inhaltsverzeichnis

1	Ergebnisse	1
1.1	Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza B Virus	1
1.1.1	Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus	1
1.1.2	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA	1
1.1.3	Ermittlung der Seditivität der Influenza B PCR	2
1.1.4	Etablierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Apmlifikations-Assays	2
1.1.5	Optimierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation	4
1.1.6	Ermittlung der Sensitivit der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation . . .	5
1.1.7	Ermittlung der Spezifität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation . .	6

1 Ergebnisse

1.1 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza B Virus

kleiner Einleitungstext....

1.1.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus

Für das Influenza B Virus konnten nach der beschriebenen Methode (siehe ??) insgesamt 10 verschiedene Primer-Sonden-Kombinationen gefunden werden. Davon befanden sich 2 Kombinationen im Bereich zwischen 625-756 Basenpaare und 8 im Bereich von 443-615 Basenpaare. Diese wurden in einer Dreifachbestimmung (n=3) nach Methode ?? getestet. Dabei zeigte das Primer-Sonden-Paar, welches in Tabelle ?? beschrieben ist, die besten Ergebnisse. Dieses Primer-Sonden-Set wurde für alle weiteren Rekombinase Polymerase Amplifikationen innerhalb dieses Abschnitts verwendet. Der Amplifikationsbereich liegt dabei zwischen 625 bp und 749 bp.

1.1.2 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

Um verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren durchführen zu können, war es nötig standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration her zu stellen. Dabei diente ein DNA-Plasmid mit der entsprechenden Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur gewünschten Virus-RNA transkribiert.

Da für das Influenza B Virus innerhalb der Arbeitsgruppe schon eine transformierte Bakterienkolonie vorhanden war, konnte direkt eine Kultivierung (siehe Kapitel ??) mit anschließender Plasmid-Extraktion nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) erfolgen. Dabei konnten 30 µl Plasmid-DNA-Lösung mit einer Konzentration von ~1616 ng/µl mit einem 260nm/280nm Verhältnis von 1,90 gewonnen werden. Durch die Sequenzierung (siehe ??) konnte die richtige Orientierung der DNA festgestellt und mögliche Sequenzfehler ausgeschlossen werden.

Der anschließende Restriktionsverdau (siehe Kapitel ??) diente dazu, das Plasmid zu linearisieren und somit für die in vitro Transkription vorzubereiten. Das Kontrollgel, durchgeführt nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) ist in Abbildung 1 gezeigt. Die darin enthaltenen DNA-Banden zeigen unterschiedliche Größen,

wobei das verdaute Plasmid deutlich unter dem unverdauten Kontrollplasmid liegt. Um mit der verdauten DNA weiterzuarbeiten mussten Puffer und Enzymrückstände vom Restriktionsverdau entfernt werden. Dazu wurde der Restriktionsansatz nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) gereinigt. Es konnten dabei 10 µl einer ~146,6 ng/µl DNA-Lösung mit einem 260nm/280nm Verhältnis von 1,89 gewonnen werden.

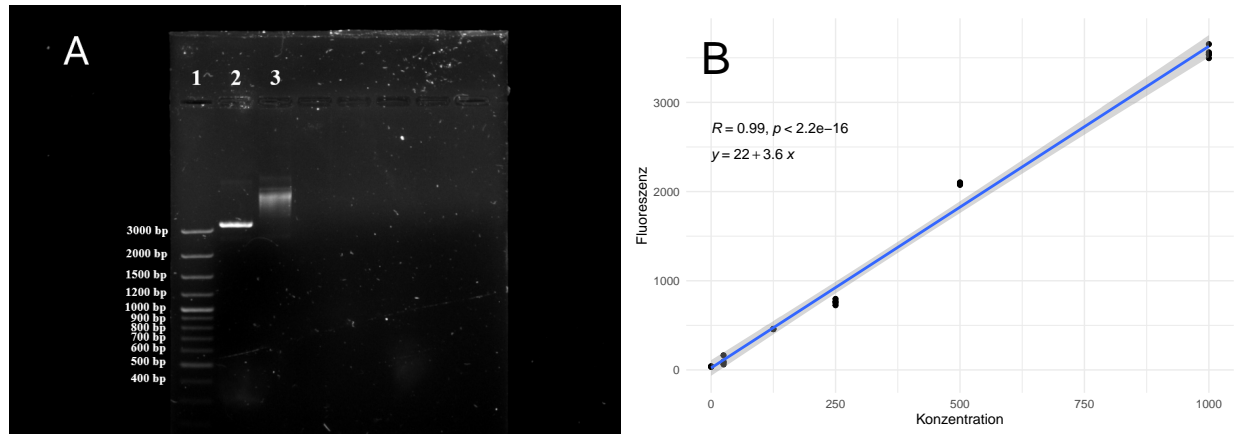


Abbildung 1: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdaulichem Plasmid (2), unverdaulichem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3300 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenen Kontrollplasmid. Das Kontrollplasmid zeigt keine klare Bande. Bild ist digital bearbeitet. **B:** Kalibrationsgerade des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=4 durchgeführt.

Die Herstellung der RNA wurde wie in Kapitel ?? beschrieben durchgeführt und im Anschluss mit dem Ribogreen-Assay nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibrationsgerade des Assays ist in Abbildung 1 gezeigt. Die Kalibrierung ergab eine Geradengleichung von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Korrelationskoeffizient $R = 0,99$. Anhand dieser Geradengleichung konnte die Hergestellte RNA in einer Fünffachbestimmung (n=5) quantifiziert werden. Der Influenza B Virus RNA-Standard besitzt eine Konzentration von $476,0 \pm 7,8$ ng/ml und eine Kopienzahl von $2,17 \cdot 10^8$ Kopien/µl.

1.1.3 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B PCR

Zur Überprüfung der Sensitivität und um ein etabliertes Amplifikationsystem zum Vergleich heranziehen zu können, wurde das in Kapitel ?? gezeigte PCR-System auf die Sensitivität getestet. Dazu wurde der in ?? hergestellte Standard auf $2 \cdot 10^7$ Kopien/µl verdünnt und in **dekadischen Verdünnungsstufen** bis zu $2 \cdot 10^0$ in jeweils einer Mehrfachbestimmung (n=7) auf eine Amplifikation nach beschriebener Methode ?? getestet. Die Amplifikationsgraphen sowie der lineare Zusammenhang der Ct-Werte (ermittelt nach der in ?? beschriebenen Methode) sind in Abbildung 2A und B gezeigt. Für die Ermittlung der Sensitivität wurden die Amplifikationsergebnisse in das in Kapitel ?? beschriebene R-Skript eingefügt. Die berechnete Sensitivitätsgrenze bei einer 95 %-igen Wahrscheinlichkeit liegt bei 11,3 Kopien (siehe Abbildung 2C).

1.1.4 Etablierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikations-Assays

Um das in Kapitel 1.1.1 getestete Primer-sonden-Set zu Etablieren wurde eine RPA im Original-Volumen (50 µl) nach der beschriebenen Methode (siehe Kapitel ??) und eine RPA im 8tel-Ansatz (Methode siehe

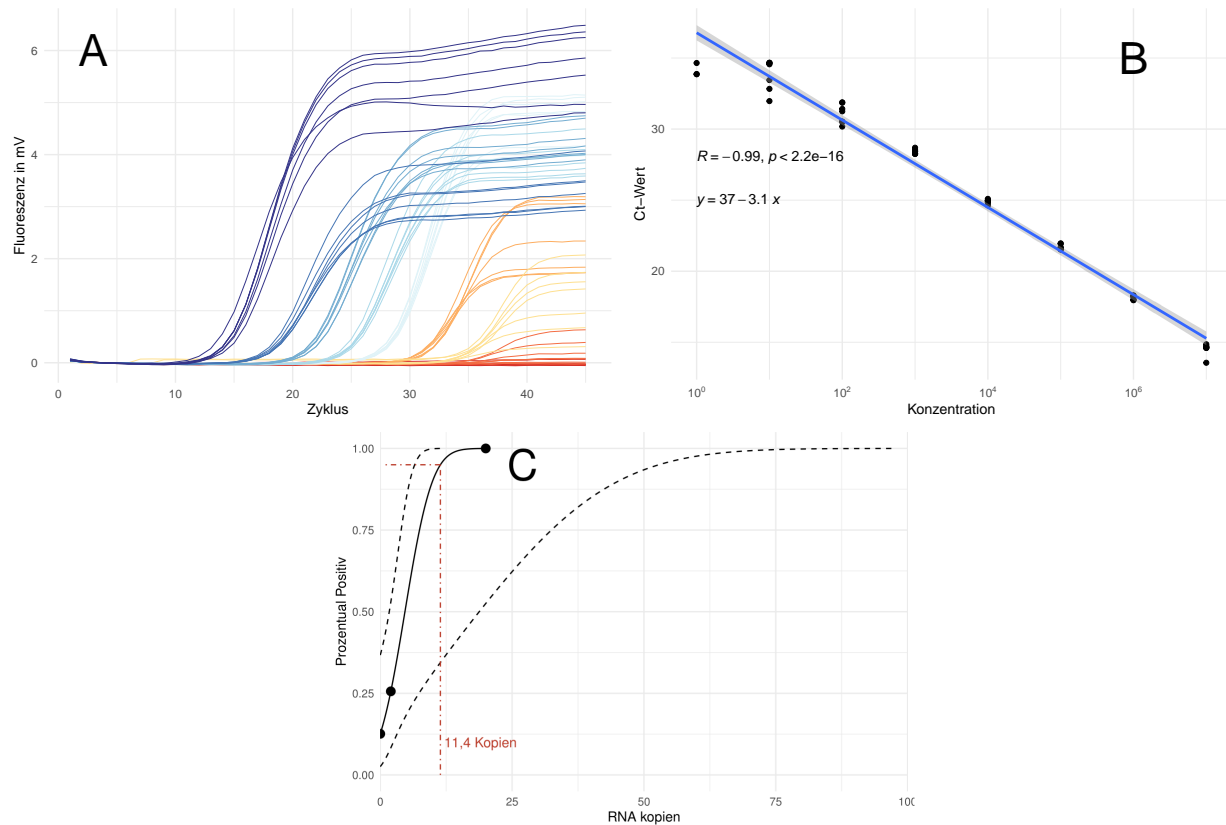


Abbildung 2: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B PCR:** **A:** Amplifikationsgraphen der Influenza B PCR bei verschiedenen Konzentrationen (n=7). **B:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Gezeigt sind nur Ct-Werte, welche einer positiven Amplifikation zugehörig sind. **C:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der PCR. Die schwarzen gestrichelten Linien beschreiben das obere und untere 95 %-ige Konfidenzintervall der Probit-Regression. Die rot gestrichelte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

Kapitel ??) mit jeweils 10^6 Virus RNA Kopien/ μ l durchgeführt. Die Amplifikation wurde bei 40°C durchgeführt. Eine Unterbrechung der Messung durch einen Mischschritt fand nicht statt. Die normalisierten Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die 8tel RPA im Vergleich zu der 50 μ l RPA im Verlauf der Reaktion an maximaler Intensität verliert. Der Mittelwert der TT-Werte der beiden RPA-Reaktionstypen liegt bei jeweils $3,36 \pm 0,01$ (50 μ l RPA) und $3,47 \pm 0,14$ (8tel RPA). Es konnte durch einen unabhängigen student's T-Test (siehe Methode unter ??) kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten festgestellt werden.

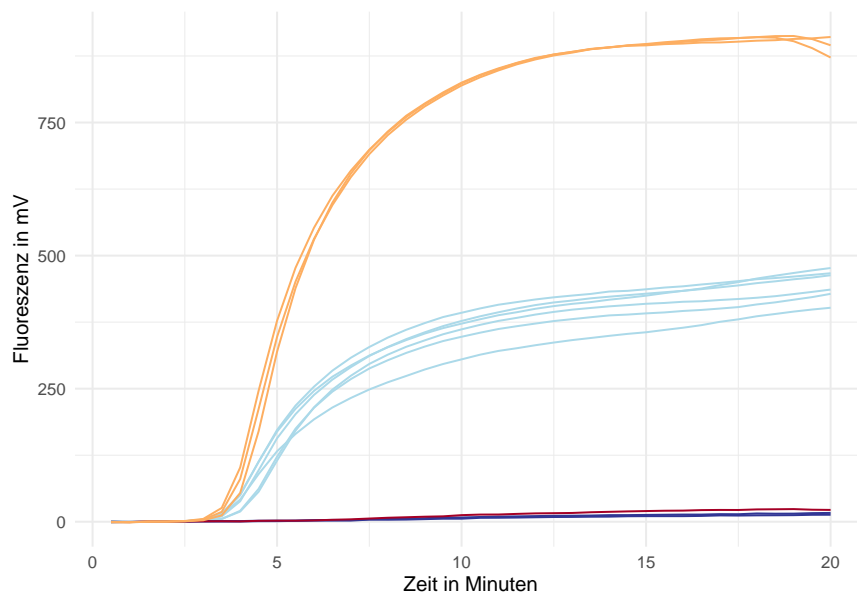


Abbildung 3: **Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz:** Normalisierte Amplifikationsgraphen der 50 μ l RPA (n=3) und der 8tel RPA (n=6). Messung bei 40 °C ohne unterbrechung durch einen Mischschritt. Messung mit jeweils 10^6 Virus-RNA-Molekülen/ μ l als Template

1.1.5 Optimierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation

Um die Influenza B RPA weiter zu optimieren, wurden die Reaktionsparameter Mischzeit und Reaktionstemperatur untersucht. Zusätzlich wurde in Kapitel ?? gezeigt, dass eine erhöhte Reverseprimerkonzentration bessere Amplifikation zur Folge hat. Aus diesem Grund wurde die Primerkonzentration als weiterer Optimierungsparameter untersucht. Wie in Abbildung 4A zu sehen, weist die Reaktion bei 38 °C einen späteren Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit signifikant höhere TT-Werte auf als bei 40 °C oder 42 °C auf (siehe Tabelle ?? im Anhang). Des Weiteren zeigt die RPA bei dieser Reaktionstemperatur eine niedrigere Fluoreszenzintensität im späteren Verlauf der Reaktion. Bei 40°C und 42°C konnten keine signifikanten Unterschiede bei den TT-Werten festgestellt werden (siehe Tabelle ?? im Anhang). Die Reaktion bei 42 °C zeigt eine niedrigere Fluoreszenzintensität mit einem Abnahme an Fluoreszenzsignal nach ~ 13 Minuten in der Messung. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität lässt sich auch bei 40 °C Reaktionstemperatur beobachten, jedoch erst ab ~ 15 Minuten und nur bei 4 von 6 Reaktionen. Alle Reaktionen wurden nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) ohne eine Unterbrechung der Messung durch einen Mischschritt durchgeführt. Bei der Optimierung der Mischzeit (Fluoreszenzdaten in Abbildung ?? im Anhang) konnte beobachtet werden, dass bei Konzentrationen von 10^3 und 10^2 Amplifikaten/ μ l als Ausgangsmaterial ein zusätzlicher Mischschritt nach 3,4 oder 5 Minuten keine signifikante Veränderung in den TT-Werten zur

Folge hat (siehe Tab ?? im Anhang). Ebenfalls konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Bei 10^1 Amplifikaten/ μl zeigte ein Mischschritt nach 5 Minuten eine Verbesserung der Amplifikation (siehe Abbildung ??C und D) erreicht werden. Bei der Auswertung der Fluoreszenzdaten nach der beschriebenen Methode (siehe Kapitel ??) konnte die Anzahl der positiven Amplifikationen von 3/7 (ohne Mischschritt) auf 7/7 (zusätzlicher Mischschritt nach 5 min) erhöht werden. Die Fluoreszenzdaten der Optimierung der Primerkonzentration sind in Abbildung 4B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Reverseprimer-Konzentration auf 1,5X mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität einhergeht. Bei einer weiteren Erhöhung auf eine doppelte Reversprimer-Konzentration ist ein Abfall der Fluoreszenz bei ~ 12 Minuten bei 4 von 6 Reaktionen zu beobachten. Es konnte keine signifikante Veränderung des TT-Wertes bei den untersuchten Primerkonzentration festgestellt werden. Alle Messung wurden nach beschriebener Methode (siehe Kapitel ??) bei 40°C und ohne zusätzlichen Mischschritt durchgeführt.

Somit konnten als Parameter für die folgenden Messungen ein Temperaturoptimum von 40°C , ein zusätzlicher Mischschritt bei 5 Minuten und eine 1,5X erhöhte Reverseprimer-Konzentration als Optimal herausgefunden werden.

`## Warning: Removed 120 rows containing missing values (`geom_line()`).`

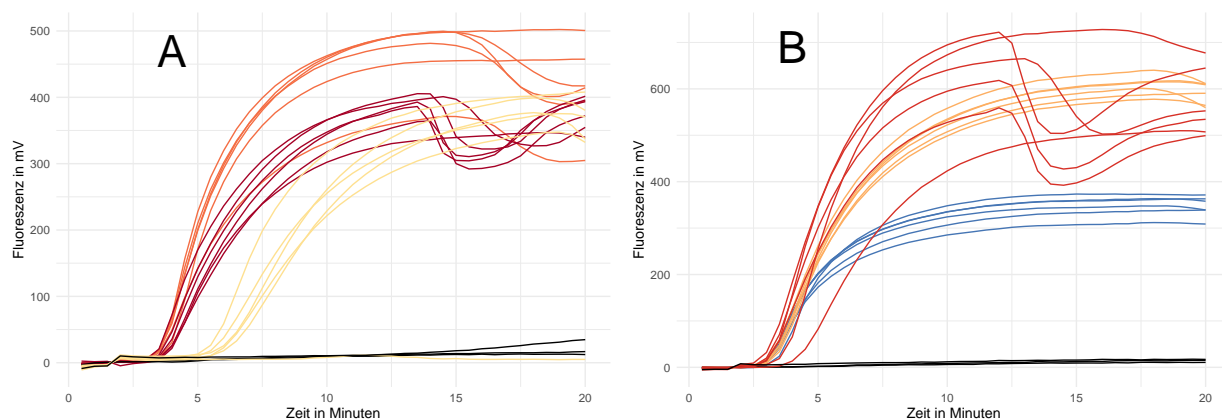


Abbildung 4: **Optimierung der Reaktionsparameter für die Influenza B RPA:** A: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RPA bei 3 verschiedenen Temperaturen in $n=6$ mit jeweils 10^6 Amplifikaten/ μl als Template. Assay im 8tel-Ansatz durchgeführt. Messung ohne zusätzlichen Mischschritt durchgeführt. B: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RPA bei verschiedenen Reverseprimer Konzentrationen in $n=6$ mit jeweils 10^6 Amplifikaten/ μl als Template. RPA im 8tel-Ansatz durchgeführt. Messung bei 40°C und ohne zusätzlichen Mischschritt. Als Referenz (Blau) wurde die RPA mit unveränderter Primerkonzentration mitgeführt.

1.1.6 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation

Zur Ermittlung der Sensitivität der Influenza B RPA wurde der in ?? hergestellte Standard auf $2 \cdot 10^7$ Kopien/ μl verdünnt und in **dekadischen Verdünnungsstufen** bis zu $2 \cdot 10^0$ in jeweils einer Mehrfachbestimmung von $n=7$ auf eine Amplifikation getestet. Dabei wurde jeweils die Verdünnungsreihe innerhalb der $50 \mu\text{l}$ RPA (Methode siehe Kapitel ??) und der 8tel RPA (Methode siehe Kapitel ??) gemessen. Die beiden Systeme wurden dabei mit den in Kapitel 1.1.5 angegebenen optimalen Reaktionsparametern durchgeführt. Eine Unterbrechung der Messung durch den Mischschritt nach 5 Minuten..... Die Fluoreszenzdaten der Amplifikationen sind in Abbildung ?? gezeigt.

1.1.7 Ermittlung der Spezifität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation