

**Bachelorarbeit**

# **Titel der Arbeit**

Julius Rublack

Matrikel Nr.: 3801533

10 Oktober, 2022

Erstbetreuer: Dr. rer.nat. Gregory Dame

Zweitbetreuer: Dr. rer. nat. Barbara Hansen

Arbeitsgruppe Virologie

Institut für Mikrobiologie und Virologie

Medizinische Hochschule Brandenburg - Theodor Fontane

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>1</b>
2.1	Bioinformatische Methoden . . . . .	1
2.1.1	Primerdesign für die RPA . . . . .	1
2.1.2	Statistische Auswertung der Amplifikationen . . . . .	1
2.1.3	Probit-Analyse . . . . .	3
2.2	Herstellen der RNA-Standards . . . . .	3
2.2.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA . . . . .	3
2.2.2	Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation . . . . .	4
2.2.3	Kultivierung von Bakterien . . . . .	4
2.2.4	Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernackturen . . . . .	4
2.2.5	Sequenzierung der isolierten Plasmide . . . . .	5
2.2.6	Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden . . . . .	5
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Restriktionsverdaus . . . . .	5
2.2.8	DNA-Aufreinigung des Restriktionsverdaus . . . . .	5
2.2.9	In Vitro Transkription zur Herstellung von RNA . . . . .	6
2.2.10	RNA-Aufreinigung . . . . .	6
2.2.11	Ribogreen Assay zur quantifizierung von RNA . . . . .	6
2.3	Nukleinsäure Amplifikation . . . . .	6
2.3.1	Polymerase Kettenreaktion . . . . .	6
2.3.2	Recombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>10</b>
3.1	Entwicklung einer RPA-Nachweissystems für Influenza B . . . . .	10
3.1.1	RPA-Primerdesing für das Influenza B Virus . . . . .	10
3.1.2	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA . . . . .	10
3.1.3	Ermittlung der Seditivität der Influenza B PCR . . . . .	11
	<b>Literaturverzeichniss</b>	<b>13</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung . . . . .	11
2	Sensitivitätsanalyse der Influenza B PCR . . . . .	12

## Tabellenverzeichnis

1	Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm . . . . .	1
2	Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR . . . . .	4
3	Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes . . . . .	7
4	Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes . . . . .	7
5	Temperaturprotokoll für die Influenza PCR . . . . .	7
6	Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes . . . . .	8
7	Entwickelte Primer und Sonden für die Recombinase Polymerase Amplifikation . . . . .	8
8	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes . . . . .	8
9	Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz . . . . .	9
10	Zusammenstzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz . . . . .	9

# 1 Abkürzungsverzeichnis

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bioinformatische Methoden

#### 2.1.1 Primerdesign für die RPA

Für die Erstellung der Primer für das Influenza B Virus wurde das von Higgins et al. (2018) entwickelte Programm *PrimedRPA* verwendet. Die Parameter für die Primersuche sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm

Parameter	Wert
Länge der Primer	30-34 bp
Länge der Sonde	50 bp
Sondentyp	Exonuclease Sonde
Nukleotid wiederholungs Grenzwert	5 bp
GC-Gehalt für Primer und Sonde	40-60%
Hintergrund Kreuzreaktivitäts-Grenzwert	65%
Prozentuale Primer-Sonde Dimersierungstoleranz	40%

Als DNA-Sequenz-Vorlage diente die Sequenz des Influenza B Virus Segmentes 8 (GenBank Nr.: MT637911). Die entstandenen Primerpaare wurden mit dem Online-Programm *PrimerDimer*<sup>1</sup> von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung untersucht. Die Primer-Sonden-Paare wurden im Anschluss mit DNA-Sequenzen des gleichen Virussegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen durch die Einführung von degenerierten Primern vermieden. Für den Sequenzvergleich wurde das Online-Programm *Clustal Omega*<sup>2</sup> beschrieben durch Sievers and Higgins (2017) verwendet. Für das Influenza A Virus waren innerhalb der Arbeitsgruppe schon RPA Primer-Sonden-Paare entwickelt.

#### 2.1.2 Statistische Auswertung der Amplifikationen

Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015). Als Werkzeug für die Auswertung wurde die “Open Source” Programmiersprache R verwendet, da hier viele Erweiterungen sogenannte “Packages” für spezifische Anwendungen zur Verfügung stehen (Pabinger et al. 2014).

##### Normalisierung der Daten:

Für die Normalisierung der Daten wurde wie durch Ritz and Spiess (2008) beschrieben, der Mittelwert der ersten 5 Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet. Die berechneten Mittelwerte wurden von den jeweiligen Datensätzen subtrahiert.

##### Ermittlung signifikanter Amplifikationen:

Die Überprüfung, ob es sich bei einem gemessenen Datensatz um eine positive Amplifikation handelt, wurde mit dem *chipPCR* Paket von Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack (2015) durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Tests durchgeführt.

*Shapiro-Wilk Test:* Negative Amplifikationen unterliegen einem gleichmäßigen starken Rauschen, weswegen eine Normalverteilung der Daten gegeben ist. Bei positiven Amplifikationen hingegen sind die Daten durch

<sup>1</sup><http://www.primer-dimer.com/>

<sup>2</sup><https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

den linearen Anstieg in der exponentiellen Phase der Amplifikation nicht mehr normalverteilt. Anhand dieser Gesetzmäßigkeit lassen sich durch einen Test auf Normalverteilung positive von negativen Amplifikationen unterscheiden (Rödiger et al. 2022). Mithilfe des Shapiro-Wilk Tests für Normalität wird der Datensatz auf Normalverteilung getestet. Bei errechneten P-Werten von  $\geq 5 * 10^{-4}$  liegt keine Normalverteilung mehr vor und der Datensatz wurde als negative Amplifikation gewertet.

*Residuen Wachstums Test:* Bei diesem Test wird die Stabilität der Residuen in der linearen Phase des Anstiegs untersucht. Bei negativen Amplifikationen weichen die Fluoreszenzwerte von dem linearen Modell ab. Dadurch korrelieren die Residuen im Gegensatz zu positiven Amplifikationen stark mit den Fluoreszenzwerten. Anhand eines Schwellenwertes von 0.5 wurde diese Korrelation untersucht und der Datensatz als positive/negative Amplifikation eingestuft.

*Vergleichs Test:* Innerhalb dieses Tests wird untersucht, ob die ersten 20 % des Datensatzes sich signifikant von den letzten 15 % unterscheiden. Dazu wurden die beiden Datengruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, beschrieben durch Mann and Whitney (1947), verglichen. Besteht ein signifikanter Unterschied, handelt es sich um eine positive Amplifikation.

*Signal Level Test:* Dieser Test vergleicht zwei aus dem Datensatz berechnete Werte. Der Erste berechnet sich aus der Formel (1). Dabei steht MAD<sup>3</sup> (engl. *Mean-absolute deviation*) für die absolute Standardabweichung, siehe R-Dokumentation. Der zweite Wert ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR), berechnet mit der Formel (2). Bei einem um 25 % erhöhtem Wert des SNR im Vergleich zum ersten Wert wurde die Amplifikation als positiv gewertet.

$$Median + 2 * MAD \quad \text{mit} \quad MAD = n^{-1} \sum_{i=1}^n |O_i - \overline{O}| \quad (1)$$

$$SNR = \frac{\text{Mittelwert der Fluoreszenzwerte}}{\text{Standardabweichung der Fluoreszenzwerte}} \quad (2)$$

*Polygon Test:* Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg pro Zeitintervall mit der Formel (3) aufsummiert. Bei positiven Amplifikationen erreicht die Summe höhere Werte als bei negativen Amplifikationen, da hier das stärkere Rauschen der Daten die Endsumme niedrig hält. Als Schwellenwert für eine positive Amplifikation wurde hier empirisch ein Wert von 10 als passend festgestellt (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

$$((x_2 - x_1)) * ((y_2 + y_1)) \hat{=} (\Delta t) * ((y_2 + y_1)) \quad (3)$$

*Schwellenwert Test:* Bei DNA-Amplifikationsmethoden ist es üblich, eine Amplifikation als negativ einzustufen, sollte ein gewisser Schwellenwert nicht überschritten werden (Aranha et al. 2021). Für die Berechnung des Schwellenwertes wurde die von Frey, Canzio, and Zurakowski (1998) beschriebene Methode verwendet. Diese beruht auf dem Median der gesamten Daten, zu welchem ein Faktor addiert wird. Der Faktor bildet sich dabei aus der Standardabweichung (SD) der Daten multipliziert mit einem Term bestehend aus der Probenanzahl (n) und den Werten einer einseitigen students t-Verteilung (siehe Formel (4)). Für die Schwellenwertberechnung wurden mindestens 8 Negativkontrollen als Datensatz verwendet. Das Konfidenzintervall für die t-Verteilung wurde als 0.99 (99 %) festgelegt.

<sup>3</sup><https://search.r-project.org/CRAN/refmans/ie2misc/html/madstat.html>

$$\text{Schwellenwert} = \bar{X} + SD * t \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad \text{mit} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

Um eine Amplifikation als positiv einzustufen, mussten alle aufgeführten Tests ein positives Testergebnis aufweisen. Sobald ein oder mehrere Tests ein negatives Testergebnis zeigten, wurde die Amplifikation als negativ eingestuft.

### Ermittlung der Anstiegszeit (engl. threshold time, TT-Wert)

Die Anstiegszeit, in der Literatur bei PCR-System nach den MIQE Richtlinien auch als C<sub>q</sub>-Wert angegeben (siehe Bustin et al. (2009)), ist der Zeitpunkt bei, die dem Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant von dem Grundrauschen unterscheiden. Für die Ermittlung der Anstiegszeit wurde der im *chipPCR*-Paket vorhandene Befehl “th.cyc” verwendet. Dieser gleicht die Amplifikationskurve im Bereich des vorher festgelegten Schwellenwertes mit einer Polynomfunktion zweiten Grades an und gibt den Schnittpunkt mit dem Schwellenwert als Anstiegszeit aus. Als Schwellenwert wurde der im *Schwellenwert Test* beschriebene Wert verwendet (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

#### 2.1.3 Probit-Analyse

Die Probit-Analyse ist ein statistisches Modell, welches binäre Fälle (0 und 1) mit einer fortlaufenden Variablen in Verbindung bringt. Dabei wird die Gaußsche Normalverteilungsfunktion  $\phi$ , welche durch die Formel  $p = \phi(\alpha + \beta x)$  beschrieben wird, auf die Regression angewendet (Bingham and Fry 2010). Die von Bliss (1934) entwickelte Methode wurde ursprünglich für toxikologische Experimente genutzt, um die tödliche Dosis mathematisch zu bestimmen (Bliss 1934). Aufgrund der gleichen Datenlage lässt sich jedoch dieses mathematische Modell auch verwenden, um das Detektionslimit anhand einer Konzentrationsreihe für ein Nukleinsäure-Amplifikationssystem zu ermitteln. Die Probit-Analyse anhand von Amplifikationsdaten erfolgte mittels einer R-skripts, entwickelt durch Ole Bährmann, beschrieben in Behrmann et al. (2020). Skript modifiziert und an die Daten angepasst durch mich.

## 2.2 Herstellen der RNA-Standards

Die Herstellung des RNA-Standards für das Influenza A Virus wurde wie beschrieben durchgeführt. Für das Influenza B Virus war in der Arbeitsgruppe schon eine transformierte *E. coli* Kultur vorhanden. Mit dieser wurden die alle entsprechenden Schritte wie beschrieben durchgeführt.

### 2.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation erfolgte mit dem NEB<sup>®</sup> 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) Kit (New England BioLabs<sup>®</sup> GmbH). Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Vektor dienten dabei synthetisierte Plasmide von der Firma Invitrogen (Plasmidkarten siehe Anhang unter ...). Anschließend wurden jeweils 25 µl des Transformationsansatzes auf zwei mit Ampicillin versetzte LB-Platten pipettiert und mit einem sterilen Spatel verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C für eine Nacht inkubiert.

### 2.2.2 Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation

Bei der PCR wird in drei wiederkehrenden Schritten (Denaturierung, Annealing, Elongation) ein DNA-Fragment amplifiziert (Mülhardt 2009). Eine modifizierte Form der PCR ist die Kolonie-PCR. Hierbei dient nicht reine DNA, sondern transformierte Bakterien als Ausgangsmaterial. Durch die Wahl spezifischer Primer, welche das gewünschte Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren, kann überprüft werden, ob die Transformation innerhalb der Kultur erfolgreich war (Bergkessel and Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs® GmbH) verwendet. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Eine halbe Kolonie von den in Kapitel 2.2.1 inkubierten Platten wurde in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Hersteller) suspendiert. Von dieser Suspension wurden 2 µl mit 18 µl Mastermix gemischt und die PCR durchgeführt. Weitere 5 µl der Suspension wurden auf eine mit Ampicillin versetzte LB-Platte übertragen, ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Temperaturprogramm der PCR ist in Tabelle 2 angegeben

Tabelle 2: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Zellyse</b>		
95 °C	60s	1x
<b>Amplifikation</b>		
95 °C	10s	45x*
60 °C	30s	
<b>Kühlen</b>		
40 °C	30s	1x

\* Messung der Fluoreszenz

### 2.2.3 Kultivierung von Bakterien

Zum Erstellen der Übernachtskulturen wurden die transformierten Bakterien für  $16 \pm 2$  h bei 37 °C und 200 RPM in 25 ml Lennox LB-Medium (Fertigmischung, Carl Roth GmbH) kultiviert.

### 2.2.4 Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen™ Plasmid midi Kit. Das Qiagen-Prinzip der DNA-Aufreinigung beruht auf einer speziellen alkalischen Lyse der Bakterien kombiniert mit dem Ionen Austausch Prinzip (QIAGEN 2021). Hierbei wird die negativ geladene DNA an ein positiv geladenes Säulenmaterial wie Diethylaminoethyl (DEAE) Zellulose gebunden (Gautam 2022). Durch in Salzkonzentrationen variierende Puffer kann anschließend die gebundene DNA von Unreinheiten befreit und eluiert werden (Prazeres, Schluep, and Cooney 1998). Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung diente eine Submerskultur (siehe Kapitel 2.2.3). Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Hersteller) durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Abschätzung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific)



### 2.2.5 Sequenzierung der isolierten Plasmide

Um die DNA-Sequenz des transformierten Plasmids zu überprüfen, wurde die isolierte Plasmid-DNA mittels Sequenzierung untersucht. Dabei wird der Plasmidabschnitt mit der Virussequenz über eine PCR amplifiziert und mittels der von Sanger, Nicklen, and Coulson (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden sequenziert (Mülhardt 2009). Als Primer für die aus Kapitel 2.2.4 extrahierte Plasmid-DNA wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH.

### 2.2.6 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden

In Vorbereitung für eine in vitro Transkription zum Erstellen viraler RNA wurde die aus Kapitel 2.2.4 extrahierte Plasmid-DNA linearisiert. Dafür wurden Restriktions Endonucleasen benutzt, welche innerhalb von spezifischen Erkennungssequenzen die DNA schneiden und somit einen Doppelstrangbruch induzieren (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (siehe...) wurde das Enzym SacI (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 30  $\mu$ l einfach konzentriertem Fast Digest Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 6  $\mu$ l Enzym und 3  $\mu$ g Plasmid-DNA versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 65 °C für 5 min ThermoStat C (Eppendorf®) inaktiviert. Für die Influenza A Plasmide (siehe...) wurde das Enzym BoxI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 40  $\mu$ l einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3  $\mu$ g Plasmid-DNA und 1,5 U/ $\mu$ l Enzym versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min im ThermoStat C (Eppendorf®) inaktiviert.

### 2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Restriktionsverdaus

Die Agarose Gelelektrophorese ist eine simple, aber effektive Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die negativ geladene DNA wandert durch das Anlegen einer Spannung durch ein gitterartiges Trägermaterial (Agarose-Gel) Richtung Pluspol. Dabei wandern kürzere DNA-Moleküle schneller durch das Trägermaterial als längere, wodurch DNA-Moleküle anhand ihrer Sequenzlänge aufgetrennt werden. Auch verschiedene Plasmidformen wie zirkuläre oder supercoilde Plasmide lassen sich so unterscheiden, da die unterschiedlichen formen für geringere oder stärkere sterische Beeinträchtigung in der Gittermatrix sorgen. Zur Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert und so ausgewertet (Mülhardt 2009; Schmidt et al. 1999). Als Trägermaterial diente ein Agarosegel mit 1 % (w/v) Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer versetzt mit 1,5  $\mu$ l Green Gel DNA Stain. Pro Geltasche wurden 100 ng DNA-Material analysiert. Diese wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher Scientific) auf 5  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 1  $\mu$ l 6x orange loading DYE (Thermo Fisher Scientific) vermischt. Als Referenz wurden jeweils 3  $\mu$ l einer 100bp plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific) und einer 1 kb DNA-Leiter Thermo Fisher Scientific mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V für 60 min. Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mithilfe des Geldokumentationssytemes BioDocAnalyze (Biometra) ausgewertet.

### 2.2.8 DNA-Aufreinigung des Restriktionsverdaus

Um Puffer- und Enzymbestandteile aus dem fertigen Restriktionsansatz zu entfernen, wurde der Ansatz mithilfe des DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution

im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10  $\mu$ l DNA Elutionspuffer. Anschließend fand eine Abschätzung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 8000 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific) statt.

### 2.2.9 In Vitro Transkription zur Herstellung von RNA

Die In Vitro Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs® GmbH) nach Herstellerangaben. Pro Reaktion wurde 1  $\mu$ g verdaut und gereinigte DNA aus 2.2.6 eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 h bei 37 °C im peqSTAR Thermocycler (Avantor) inkubiert. Um die Anfangs-DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen wurde anschließend nach der erfolgten Inkubation die Reaktion mit 70  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O ( [Thermo Fisher Scientific](#)) verdünnt und 10  $\mu$ l 10x DNase-Puffer ( [Thermo Fisher Scientific](#)) dazugegeben. Die neu entstandene Reaktionslösung wurde mit 2  $\mu$ l DNase [Hersteller](#) versetzt und abermals bei 37 °C für 15 minuten im peqSTAR Thermocycler (Avantor) inkubiert.

### 2.2.10 RNA-Aufreinigung

Um Puffer- und Enzymbestandteile aus der fertigen RNA-Lösung aus 2.2.9 zu entfernen, wurde der in vitro Transkriptionsansatz mit dem EchoCLEAN RNA CleanUp Kit (BioEcho Life Sciences GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip der RNA-Aufreinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet ([BioEcho 2022](#)). Die RNA-Konzentration des entstandenen Eluats am Ende der Aufreinigung wurde mithilfe des NanoDrop 8000 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific) abgeschätzt.

### 2.2.11 Ribogreen Assay zur quantifizierung von RNA

Zur präzisen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip des Ribogreen Kits basiert dabei auf der Bindung eines gleichnamigen Fluoreszenzfarbstoffes an die RNA. Durch die Bindung erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um das 1000-Fache wodurch eine sensitive Detektion von bis zu 1  $ng/ml$  RNA möglich wird ([Jones et al. 1998](#)). Vor jeder RNA-Konzentrationsbestimmung wurde eine Kalibriergerade im “High-Range” Bereich mit dem im Kit enthaltenen RNA-Standards nach Herstellerangaben hergestellt. Jede Messlösung der Kalibriergerade sowie zu bestimmende RNA-Lösung wurde 1:1 mit einer Farblösung (Ribogreen 1:200 mit 1x TE-Puffer verdünnt) gemischt. Diese wurde kurz gevortext, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend abermals gevortext. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 bei **234 nm**.

## 2.3 Nukleinsäure Amplifikation

### 2.3.1 Polymerase Kettenreaktion

#### 2.3.1.1 Influenza B PCR

Die Amplifikation von Influenza B Virus Nukleinsäuren mittels PCR wurde mit dem Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Im ersten Schritt wurden pro Reaktion 19  $\mu$ l Reaktionsmix mit DEPC-H<sub>2</sub>O ([Hersteller](#)) siehe Tabelle 3 hergestellt. Für den in Tabelle 3 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurde der in Tabelle 4 beschriebene Influenza B PSM verwendet. Die Primersequenzen wurden durch das nationale Zentrum für Immunisierung und Atemwegserkrankungen (U.S.) beschrieben ([Immunization and \(U.S.\) 2021](#)).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

Bestandteil	Konzentration
2x Luna <sup>®</sup> Universal Probe One-Step Reaction Mix	1,05x
20x Luna <sup>®</sup> WarmStart <sup>®</sup> RT Enzyme Mix	1,05x
40x PSM	1,05x

Tabelle 4: Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG	16 µM	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 µM	/
InfB-P	CCAATTTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 µM	Markiert mit Cy5 Fluorophor

Zu dem Reaktionsmix wurde 1 µl Influenza B Virus RNA oder DEPC-H<sub>2</sub>O (**Hersteller**) bei Negativkontrollen dazugegeben und die 20 µl Gesamtmix wurden nach dem in Tabelle 5 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche Holding) im Cy5-Messkanal gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den in 2.1.2 beschriebenen statistischen Verfahren.

[!h]

Tabelle 5: Temperaturprotokoll für die Influenza PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Reverse Transkription</b>		
55 C	10 min	1x
95 C	60 s	
<b>Amplifikation</b>		
95 C	10 s	45x*
60 C	30 s	
<b>Kühlen</b>		
40 C	30 s	1x

\* Messung der Fluoreszenz

### 2.3.1.2 Influenza A PCR

Die Amplifikation von Influenza B Virus Nukleinsäuren mittels PCR wurde mit dem Luna<sup>®</sup> Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Im ersten Schritt wurden pro Reaktion 19 µl Reaktionsmix mit DEPC-H<sub>2</sub>O (**Hersteller**) nach dem gleichen Muster wie der Influenza B Reaktionsmix (siehe Tab. 3) hergestellt. Für den in Tabelle 3 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurde der in Tabelle 6 beschriebene Influenza A PSM verwendet. Die Primersequenzen wurden durch das nationale Zentrum für Immunisierung und Atemwegserkrankungen (U.S.) beschrieben (**Immunization and (U.S.) 2021**).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	Modifikation
InfA For1	CAAGACCAATCYTGTCACCTCTGAC	16 $\mu$ M	/
InfA For2	CAAGACCAATYCTGTCACCTYTGAC	16 $\mu$ M	/
InfA Rev1	GCATTTYTGGACAAAVCGTCTACG	16 $\mu$ M	/
InfA Rev2	GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG	16 $\mu$ M	/
InfA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	8 $\mu$ M	Markiert mit HEX Fluorophor

Zu dem Reaktionsmix wurde 1  $\mu$ l Influenza A Virus RNA oder DEPC-H<sub>2</sub>O (**Hersteller**) bei Negativkontrollen dazugegeben und die 20  $\mu$ l Gesamtmix wurden nach dem in Tabelle 5 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche Holding) im HEX-Messkanal gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den in 2.1.2 beschriebenen statistischen Verfahren.

### 2.3.2 Recombinase Polymerase Amplifikation

#### 2.3.2.1 normal

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RPA wurde das TwistAmp<sup>®</sup> exo Kit (TwistDX<sup>™</sup>) verwendet. Die für die RPA verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 angegeben

Tabelle 7: Entwickelte Primer und Sonden für die Recombinase Polymerase Amplifikation

Name	Sequenz (5'->3')	Modifikation
<b>Influenza B</b>		
InfB Forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAAGGCTT	/
InfB Reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGAATTG	/
InfB Sonde 1.1	GCTAAACTTGTTGCTACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATGG	Modifiziert*
InfB Sonde 1.1 rev-Strang	CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCATCAGTAGCAACAAGTTTAGC	Modifiziert*
<b>Influenza A</b>		
InfA Forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAAGGCTT	/
InfA Reverse 1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGAATTG	/
InfA Sonde 1	GCTAAACTTGTTGCTACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATGG	Modifiziert*

\* Sonden modifiziert wie in Behrmann et al. (2020) beschrieben. Also Fluorophor wurde FAM verwendet.

Tabelle 8: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Konzentration	Modifikation
Forward Primer	0,45 $\mu$ M	biomers.net GmbH
Reverse Primer	0,45 $\mu$ M	biomers.net GmbH
Sonde	0,13 $\mu$ M	biomers.net GmbH
RevertAid Reverse Transkriptase	10,75 U/ $\mu$ l	Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor, Murine	1,08 U/ $\mu$ l	New England Biolabs

Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) mit 29.5 µl Rehydrationspuffer und DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Der Rehydrationsmix wurde auf eine lyophilisiert RPA-Reaktion übertragen. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit einer **Tischzentrifuge** kurz zentrifugiert und leicht gevortext. Von der rehydrierten RPA-Reaktion wurden 46,5 µl in eine Kavität eines 8-ter **Messsstreifens** übertragen und dieser mittels einer Tischzentrifuge abermals kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 µl zu amplifizierende RNA bzw. 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei der Negativkontrolle dazugegeben. Als Letztes wurden 2,5 µl Magnesium Acetat (280 mM) in den Deckel der Kavität pipettiert. Zum Start der Messung wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert, gevortext und abermals Zentrifugiert. Die Messung erfolgte im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Vortexen mit anschließender Zentrifugation unterbrochen.

### 2.3.2.2 8tel Ansatz

kurze Einleitung, dass die RPA auch im 8tel Ansatz geht.

Für 8 Reaktionen wurde insgesamt 40,8 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 9) mit 29.5 µl Rehydrationspuffer und DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Zusammensetzung des in Tabelle 9 aufgeführte PSM's ist in Tabelle 10 gezeigt. Auf eine lyophilisiert RPA-Reaktion wurden 38,5 µl des Rehydrationsmixes übertragen. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit einer **Tischzentrifuge** kurz zentrifugiert und leicht gevortext. Von der rehydrierten RPA-Reaktion wurden jeweils 4,6 µl pro Kavität in einen 8-ter **Messsstreifens** übertragen und dieser mittels einer Tischzentrifuge abermals kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1 µl zu amplifizierende RNA bzw. 1µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei der Negativkontrolle dazugegeben. Darauf folgend wurden 15 µl Mineralöl **Hersteller**, welches Flüssigkeitsverlust während der Messung durch Verdunstung verhindert, in den Deckel jeder Kavität pipettiert. Als Letztes wurden 0,64 µl Magnesium Acetat (140mM) an die Innenseite der Kavität pipettiert. Zum Start der Messung wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert, gevortext und abermals zentrifugiert. Die Messung erfolgte im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Vortexen mit anschließender Zentrifugation unterbrochen.

Tabelle 9: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
50x PSM	1,35x	/
RNase Inhibitor, Murine	1,37 U/µl	Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	13,73 U/µl	New England Biolabs

Tabelle 10: Zusammenstzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 µM	Biomers
Rückwärtsprimer	21 µM	Biomers
Sonde	6 µM	Biomers

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung einer RPA-Nachweissystems für Influenza B

kleiner Einleitungstext....

#### 3.1.1 RPA-Primerdesing für das Influenza B Virus

Für das Influenza B Virus konnten nach der beschriebenen Methode (siehe 2.1.1) 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 2.3.2.1 getestet. Dabei zeigte das Primer-Sonden-Paar, welches in Tabelle 7 beschrieben ist, die besten Ergebnisse. Dieses Primer-Sonden-Paar wurde für alle weiteren Rekombinase Polymerase Amplifikationen innerhalb dieses Abschnitts verwendet. Der Amplifikationsbereich liegt dabei zwischen 625 bp und 749 bp.

#### 3.1.2 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 2.2.3) mit anschließender Plasmid-Extraktion nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 2.2.4) 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 2.2.5) konnte die richtige Orientierung der DNA festgestellt und mögliche Sequenzfehler ausgeschlossen werden.

Der anschließende Restriktionsverdau (siehe Kapitel (2.2.6) diente dazu, das Plasmid zu linearisieren und somit für die in vitro Transkription vorzubereiten. Das Kontrollgel, durchgeführt nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 2.2.7) 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 2.2.8) gereinigt. Es konnten dabei 10 µl einer ~146,6 ng/µl DNA-Lösung mit einem 260nm/280nm Verhältnis von 1,89 gewonnen werden.

Die Herstellung der RNA wurde wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben durchgeführt und im Anschluss mit dem Ribogreen-Assay nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 2.2.11) 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.

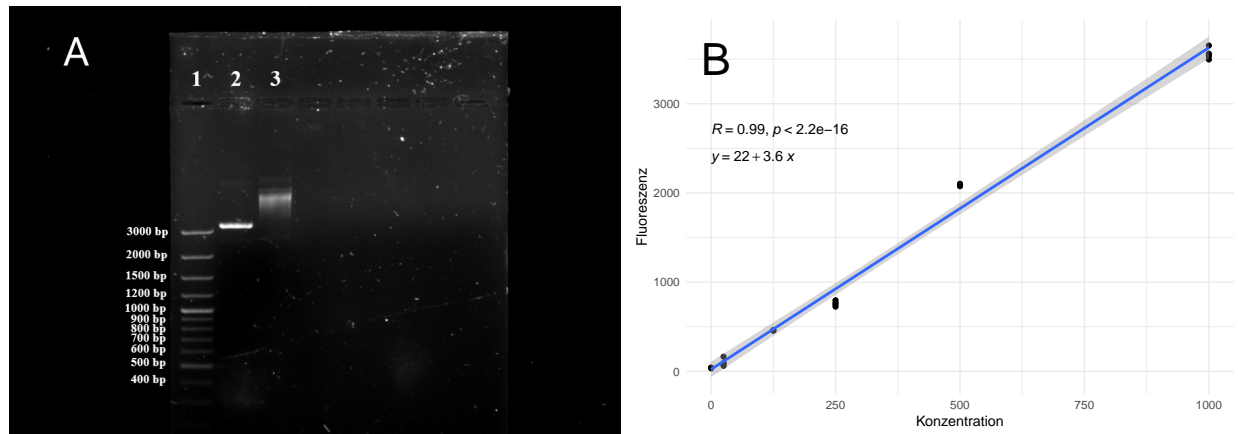


Abbildung 1: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdaulichem Plasmid (2), unverdaulichem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3300 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenem 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.

### 3.1.3 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 2.3.1.1 gezeigte PCR-System auf die Sensitivität getestet. Dazu wurde der in 3.1.2 hergestellte Standard auf  $2 \times 10^7$  Kopien/ $\mu\text{l}$  verdünnt und in **dekadischen Verdünnungsstufen** bis zu  $2 \times 10^0$  in jeweils einer Mehrfachbestimmung ( $n=7$ ) auf eine Amplifikation nach beschriebener Methode 2.3.1.1 getestet. Die Amplifikationsgraphen sowie der lineare Zusammenhang der Ct-Werte (ermittelt nach der in 2.1.2 beschriebenen Methode) sind in Abbildung @ref() gezeigt.

```
## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'
```

Zur Ermittlung der Sensitivität

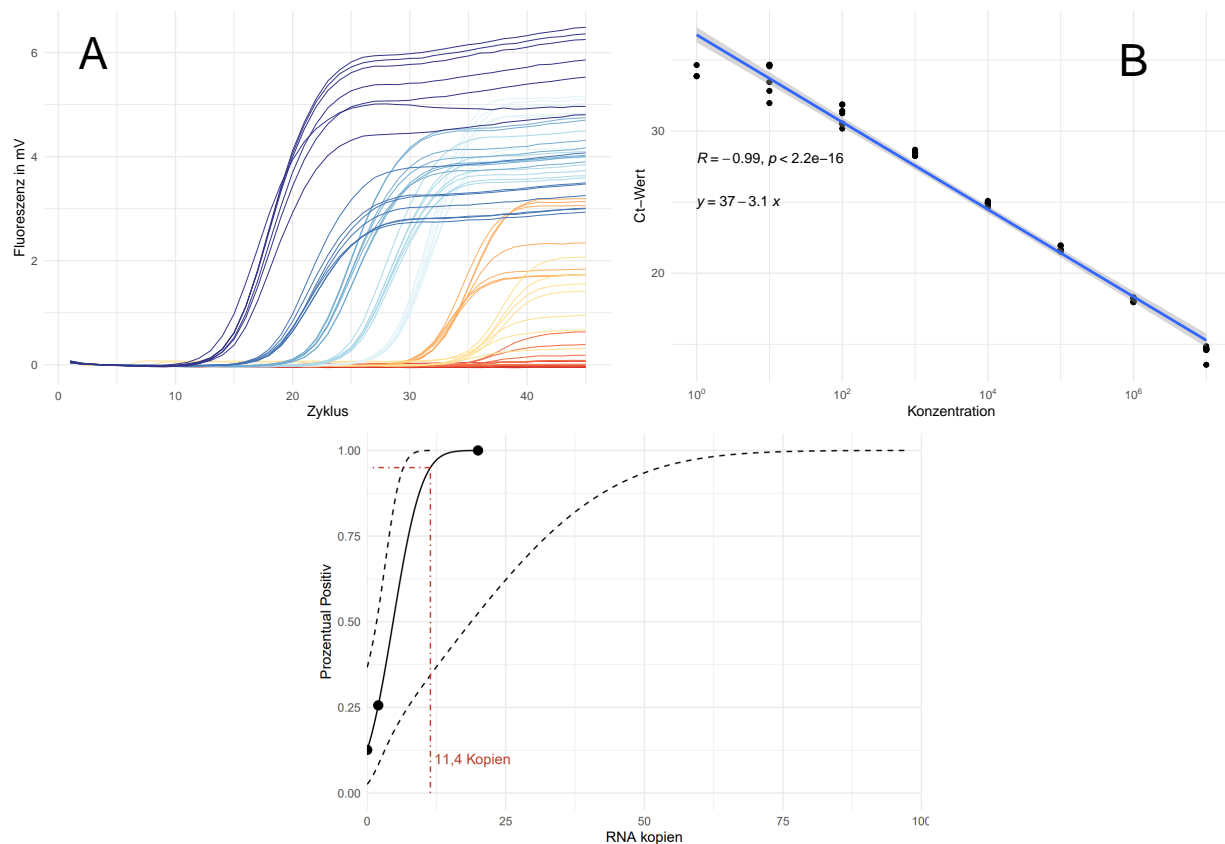


Abbildung 2: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B PCR:** **A:** Amplifikationsgraphen der Influenza B PCR bei verschiedenen Konzentrationen (n=7). **B:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Gezeigt sind nur Ct-Werte, welche einer positiven Amplifikation zugehörig sind. **C:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten. Die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind, liegt bei 11,3 Molekülen.



## Literaturverzeichnis

- Aranha, Clara, Vainav Patel, Vikrant Bhor, and Dimpu Gogoi. 2021. "Cycle Threshold Values in RT-PCR to Determine Dynamics of SARS-CoV-2 Viral Load: An Approach to Reduce the Isolation Period for COVID-19 Patients." *Journal of Medical Virology* 93 (12): 6794–97. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>.
- Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Martin Spiegel, Marina Schramm, Ahmed Abd El Wahed, Gerhard Dobler, Gregory Dame, and Frank T Hufert. 2020. "Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Low Volume Real-Time Single Tube Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Using an Exo Probe with an Internally Linked Quencher (Exo-IQ)." *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–54. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116>.
- Bergkessel, Megan, and Christine Guthrie. 2013. "Colony PCR." In *Methods in Enzymology*, 299–309. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00025-2>.
- Bingham, N. H., and John M. Fry. 2010. *Regression*. Springer London. <https://doi.org/10.1007/978-1-84882-969-5>.
- BioEcho. 2022. "EchoCLEAN DNA & RNA Cleanup Kits Produkt Brochüre." *Online Verfügbar Unter*. [https://doi.org/https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/d0/9e/c1/1655465490/Cleanup-Brochure\\_ENG.pdf](https://doi.org/https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/d0/9e/c1/1655465490/Cleanup-Brochure_ENG.pdf).
- Bliss, C. I. 1934. "The Method of Probits." *Science* 79 (2037): 38–39. <https://doi.org/10.1126/science.79.2037.38>.
- Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Frey, Andreas, James Di Canzio, and David Zurakowski. 1998. "A Statistically Defined Endpoint Titer Determination Method for Immunoassays." *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7).
- Gautam, Akash. 2022. *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4>.
- Higgins, Matthew, Matt Ravenhall, Daniel Ward, Jody Phelan, Amy Ibrahim, Matthew S Forrest, Taane G Clark, and Susana Campino. 2018. "PrimedRPA: Primer Design for Recombinase Polymerase Amplification Assays." Edited by John Hancock. *Bioinformatics* 35 (4): 682–84. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>.
- Immunization, National Center for, and Respiratory Diseases (U.S.). 2021. "Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes." July 2021. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944>.
- Johnston, Andrew D., Jennifer Lu, Ke-lin Ru, Darren Korbie, and Matt Trau. 2019. "PrimerROC: Accurate Condition-Independent Dimer Prediction Using ROC Analysis." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9>.
- Jones, Laurie J., Stephen T. Yue, Ching-Ying Cheung, and Victoria L. Singer. 1998. "RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization." *Analytical Biochemistry* 265 (2): 368–74. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>.
- Mann, H. B., and D. R. Whitney. 1947. "On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other." *The Annals of Mathematical Statistics* 18 (1): 50–60. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>.
- Mülhardt, Cornel. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.

<https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>.

- Pabinger, Stephan, Stefan Rödiger, Albert Kriegner, Klemens Vierlinger, and Andreas Weinhäusel. 2014. “A Survey of Tools for the Analysis of Quantitative PCR (qPCR) Data.” *Biomolecular Detection and Quantification* 1 (1): 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>.
- Prazeres, Duarte Miguel F, Thomas Schlupe, and Charles Cooney. 1998. “Preparative Purification of Supercoiled Plasmid DNA Using Anion-Exchange Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 806 (1): 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01254-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01254-5).
- QIAGEN. 2021. “QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.” *QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits. For Purification of Ultrapure, Transfection-Grade Plasmid DNA Online Verfügbar Unter: <https://www.qiagen.com/Us/Resources/Download.aspx?id=0bd0c5fb-C271-43e7-Af43-32d539374fa9&lang=en>*.
- Ritz, C., and A.-N. Spiess. 2008. “qpcR: An r Package for Sigmoidal Model Selection in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis.” *Bioinformatics* 24 (13): 1549–51. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn227>.
- Rödiger, Stefan, Michał Burdukiewicz, and Peter Schierack. 2015. “chipPCR: An r Package to Pre-Process Raw Data of Amplification Curves: Fig. 1.” *Bioinformatics* 31 (17): 2900–2902. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv205>.
- Rödiger, Stefan, Michał Burdukiewicz, Andrej-Nikolai Spiess, and Konstantin Blagodatskikh. 2022. “PC-Redux204 Package - an Overview [Vignette].” *Comprehensive R Archive Network*, 1–104. <https://cran.r-project.org/web/packages/PCRedux/vignettes/PCRedux.pdf>.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Schmidt, Torsten, Karl Friehs, Martin Schleef, Carsten Voss, and Erwin Flaschel. 1999. “Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis.” *Analytical Biochemistry* 274 (2): 235–40. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4291>.
- Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. 2017. “Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences.” *Protein Science* 27 (1): 135–45. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- Smith, Duncan R. n.d. “Restriction Endonuclease Digestion of DNA.” In *Transgenesis Techniques*, 427–32. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:427>.