

Inhaltsverzeichnis

1	Material und Methoden	2
1.1	Bioinformatische Methoden	2
1.1.1	Primerdesign für die RPA	2
1.1.2	Statistische Auswertung der Amplifikationen	2
1.1.3	Probit-Analyse	4
1.2	Herstellen der RNA-Standards	4
1.2.1	Transformation mit <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	4
1.2.2	Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation	4
1.2.3	Kultivierung von Bakterien	4
1.2.4	Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernackturen	4
1.2.5	Sequenzierung der isolierten Plasmide	5
1.2.6	Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden	5
1.2.7	Gel	6
1.2.8	Cleaning	6
1.2.9	in vitro transkription	6
1.2.10	ribogreen assay	6
1.3	Nukleinsäure Amplifikation	6
1.3.1	Polymerase Kettenreaktion	6
1.3.2	Recombinase Polymerase Amplifikation	7
	Literaturverzeichnis	9

1 Material und Methoden

1.1 Bioinformatische Methoden

1.1.1 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*¹ 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*² beschrieben durch Sievers and Higgins (2017) verwendet. Für das Influenza A Virus waren innerhalb der Arbeitsgruppe schon RPA Primer-Sonden-Paare entwickelt.

1.1.2 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: Mithilfe des Shapiro-Wilk Tests für Normalität wird der Datensatz auf Normalverteilung getestet. Bei errechneten P-Werten von $\geq 5 \cdot 10^{-4}$ liegt keine Normalverteilung mehr vor und der Datensatz

¹<http://www.primer-dimer.com/>

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

wurde als negative Amplifikation gewertet.

Residuen Wachstums Test: Bei diesen 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 MAD³ (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 eine 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 Schwellenwert-berechnung wurden mindestens 8 Negativkontrollen als Datensatz verwendet. Das Konfidenzintervall für die t-Verteilung wurde als 0.99 (99 %) festgelegt.

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

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

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

negativ eingestuft.

1.1.3 Probit-Analyse

Die Probit-Analyse ist ein statistisches Modell, um binäre Werte

bis hier hin Kontrolliert :D der andere Teil ist noch in Bearbeitung haha.

1.2 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.

1.2.1 Transformation mit *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation erfolgte mit dem NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) Kit (New England BioLabs[®] GmbH). Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. 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.

1.2.2 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 der 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 1.2.1 inkubierten Platten wurde in 20 µl DEPC-H₂O (asdad) 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

1.2.3 Kultivierung von Bakterien

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

1.2.4 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 variierte Puffer kann anschließend die gebundene DNA von Unreinheiten befreit werden und eluiert werden (Prazeres, Schluep, and Cooney 1998). Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung diente eine Submerskultur (siehe

Tabelle 2: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

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

* Messung der Fluoreszenz

Kapitel 1.2.3). Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Resuspension der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl DEPC-H₂O durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Abschätzung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific)

1.2.5 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 1.2.4 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.

1.2.6 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden

In Vorbereitung für eine In vitro Transkription zum Erstellen viraler RNA wurde die aus Kapitel 1.2.4 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 in Tab. gezeigte Restriktionsansatz wurde für 30 min im Wasserbad bei 37 °C 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 in Tab. gezeigte Restriktionsansatz wurde für 2h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min im ThermoStat C (Eppendorf®) inaktiviert.

1.2.7 Gel

1.2.8 Cleaning

1.2.9 in vitro transkription

1.2.10 ribogreen assay

1.3 Nukleinsäure Amplifikation

1.3.1 Polymerase Kettenreaktion

1.3.1.1 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 µl Reaktionsmix mit DEPC-H₂O ([Thermo Fisher Scientific](#)) siehe Tabelle 3 hergestellt. Für den in Tabelle 3 angegebene 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 [®] Universal Probe One-Step Reaction Mix	1,05x
20x Luna [®] WarmStart [®] 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 M	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 M	/
InfB-P	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 M	Markiert mit Cy5 Fluorophor

Zu dem Reaktionsmix wurde 1 µl Influenza B Virus RNA dazugegeben und die 20 µl Gesamtmix wurden nach dem in Tabelle 5 angegeben Temperaturprotokoll im LightCycler[®] 480 (Roche Holding) im Cy5-Messkanal gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den in 1.1.2 beschrieben statistischen Verfahren.

1.3.1.2 Influenza A 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 µl Reaktionsmix mit DEPC-H₂O ([Thermo Fisher Scientific](#)) nach dem gleichen Muster wie der Influenza B Reaktionsmix (siehe Tab. 3) hergestellt. Für den in Tabelle 3 angegebene Primer-Sonden-Mix (PSM) wurde der in Tabelle 4 beschriebene Influenza A PSM verwendet. Die Primersequenzen wurden durch das nationale Zentrum für Immunisierung and Atemwegserkrankungen (U.S.) beschrieben ([Immunization and \(U.S.\) 2021](#)).

[!h]

Tabelle 5: Temperaturprotokoll für die Influenza PCR

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

* Messung der Fluoreszenz

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

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

Zu dem Reaktionsmix wurde 1 µl Influenza A Virus RNA dazugegeben und die 20 µl Gesamtmix wurden nach dem in Tabelle 5 angegeben Temperaturprotokoll im LightCycler[®] 480 (Roche Holding) im HEX-Messkanal gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den in 1.1.2 beschriebenen statistischen Verfahren

1.3.2 Recombinase Polymerase Amplifikation

1.3.2.1 normal

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RPA wurde das TwistAmp[®] exo Kit (TwistDX[™]) 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
Influenza B		
InfB Forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAGGCTT	/
InfB Reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGAATTG	/
InfB Sonde 1.1	GCTAAACTTGTTGCTACTGATGATCTTACAGTGGAGGATGAAGAAGATGG	Modifiziert*
InfB Sonde 1.1 rev-Strang	CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCATCAGTAGCAACAAGTTAGC	Modifiziert*
Influenza A		
InfA Forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAGGCTT	/
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: Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm

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

Pro Reaktion wurde 46,5 μ l Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) mit 29.5 μ l Rehydrationspuffer und DEPC-H₂O 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 μ l in eine Kavität eines 8-ter **Messsstreifens** übertragen und dieser mittels einer Tischzentrifuge abermals kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 μ l zu aplifizierende RNA bzw. 1 μ l DEPC-H₂O bei der Negativkontrolle dazugegeben. Als letztes wurden 2,5 μ l Magnesium Acetat (280mM) 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.

1.3.2.2 8tel Ansatz

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

Für 8 Reaktionen wurde insgesamt 38.5 μ l Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. @ref) mit 29.5 μ l Rehydrationspuffer und DEPC-H₂O hergestellt. Die Zusammensetzung des in Tabelle @ref aufgeführte PSM's ist in Tabelle gezeigt. 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 jeweils 4,6 μ l pro Kavität in einen 8-ter **Messsstreifens** übertragen und dieser mittels einer Tischzentrifuge abermals kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1 μ l zu aplifizierende RNA bzw. 1 μ l DEPC-H₂O bei der Negativkontrolle dazugegeben. Daruffolgend wurden 15 μ l Mineralöl **Hersteller**, welches Flüssigkeitsverlust während der Messung durch verdunstung verhindert, in den Deckel jeder Kavität pipettiert. Als letztes wurden 0,64 μ l 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.

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>.
- 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>.
- 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 Schluep, 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>.
- 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>.
- 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>.