

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	3
1.2	Herstellen der RNA-Standards	3
1.2.1	Transformation mit <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	3
1.2.2	Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation	3
1.2.3	Kultivierung von Bakterien	4
1.2.4	Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernackturen	4
1.2.5	Sequenzierung der isolierten Plasmide	4
1.2.6	Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden	4
1.2.7	Gel	5
1.2.8	Cleaning	5
1.2.9	in vitro transkription	5
1.2.10	ribogreen assay	5
1.2.11	RPA	5
	Literaturverzeichnis	6

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 gleiches Virussegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Mismatches durch die Einführung von degenerierten Primer 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 wird als negative Amplifikation gewertet.

¹<http://www.primer-dimer.com/>

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

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 Correlation als positive/negative Amplifikation eingestuft.

Schwellenwert Test: Innerhalb dieses Tests wird untersucht, ob die Fluoreszenzwerte einen Schwellenwert überschreiten und somit die Amplifikation positiv ist. Zur Ermittlung des Schwellenwertes wurden, wie in der Literatur üblich, die 10-fache Standardabweichung der Fluoreszenzwerte von Negativkontrollen verwendet ([zweitequelle?](#)). Dabei wurden mindestens acht Negativkontrollen betrachtet. Der finale Schwellenwert ergab sich aus dem Median der einzeln berechneten Schwellenwerte.

Signal Level Test: Bei diesem Test wird *Polygon Test:* Hier wird untersucht, ob die Datenpunkte innerhalb des Datensatzes sich im "Uhrzeigersinn" befinden. Dabei wird mit der Formel $((x_2 - x_1)(y_2 + y_1))$ die Summe über den Kanten bestimmt. Bei positiven Amplifikationen erreicht die Summe höhere Werte als bei negativen Amplifikationen. Als Schwellenwert wurde hier empirisch ein Wert von 100 als passender Schwellenwert festgestellt ([Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015](#)).

1.1.3 Probit-Analyse

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 erfolge 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 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
Zellyse		
95 °C	60s	1x
Amplifikation		
95 °C	10s	45x*
60 °C	30s	
Kühlen		
40 °C	30s	1x

* Messung der Fluoreszenz

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 Quiagen-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 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 Restriktionsendonucleasen 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.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes für den SacI Restriktionsansatz
Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermixes für den BoxI Restriktionsansatz

Bestandteil	Volumen	Hersteller	Bestandteil	Volumen	Hersteller
Fast Digest Puffer (10x)	3 µl	Thermo Fisher Scientific	Fast Digest Puffer (10x)	3 µl	Thermo Fisher Scientific
SacI-Enzym	6 µl	Thermo Fisher Scientific	SacI-Enzym	6 µl	Thermo Fisher Scientific
Plasmid-DNA	2 µl	/	Plasmid-DNA	2 µl	/
DEPC-H2O	18 µl	Carl Roth GmbH	DEPC-H2O	18 µl	Carl Roth GmbH

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

1.2.11 RPA

Literaturverzeichnis

- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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® PlasmidPurification 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>.