**Material und Methoden**

**Bioinformatische Methoden**

**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.

Ein Bild, das Text enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

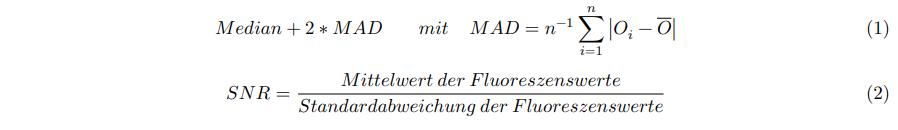
Als DNA-Sequenz-Vorlage diente die Sequenz des Influenza B Virus Segmentes 8 (GenBank Nr.: MT637911). Die entstandenen Primerpaare wurden mit dem Online-Programm PrimerDimer1 von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung untersucht. Die Primer-Sonden-Paare wurden im Anschluss mit 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 Omega2 beschrieben durch Sievers and Higgins (2017) verwendet. Für das Influenza A Virus waren innerhalb der Arbeitsgruppe schon RPA Primer-Sonden-Paare entwickelt.

**Statistische Auswertung der Amplifikationen**

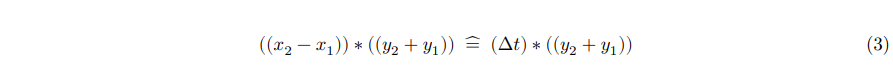
Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015). Als Werkzeug für die Auswertung wurde die “Open Source” Programmiersprache R verwendet, da hier viele Erweiterungen sogenannte “Packages”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

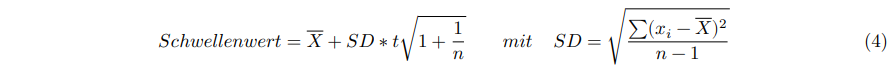
**Normalisierung der Daten:**Für die Normalisierung der Daten wurde wie durch Ritz and Spiess (2008) beschrieben, der Mittelwert der ersten 5 Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet. Die berechneten Mittelwerte wurden von den jeweiligen Datensätzen subtrahiert.

**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 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 ≥ 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 MAD3 (engl. Mean-absolut 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. 

*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).



*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. 

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 Cq -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 beschrieben Wert verwendet (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

**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 𝜙, welche durch die Formel 𝑝 = 𝜙(𝛼 + 𝛽𝑥) 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-skrips, entwickelt durch Ole Bährmann, beschrieben in Behrmann et al. (2020). Skriptmodifiziert und an die Daten angepasst durch mich.

**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.

**Transformation von *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.

**Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation**

Bei der PCR wird in drei wiederkehrenden Schritten (Denaturierung, Annealing, Elongation) ein DNAFragment 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 1.2.1 inkubierten Platten wurde in 20 µl DEPC-H2O (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

Ein Bild, das Text enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

**Kultivierung von Bakterien**

Zum Erstellen der Übernachtkulturen 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.

**Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernactkulturen**

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

**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.

**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 Endonukleasen benutzt, welche innerhalb von spezifischen Erkennungssequenzen die DNA schneiden (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (siehe ...) wurde das Enzym SacI (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 30 𝜇𝑙 einfach konzentriertem Fast Digest Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 6 𝜇𝑙 Enzym und 3 𝜇𝑔 Plasmid-DNA versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 65 °C für 5 min inaktiviert. Für die Influenza A Plasmide (siehe...) wurde das Enzym BoxI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 40 𝜇𝑙 einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3 𝜇𝑔 Plasmid-DNA und 1,5 𝑈 /𝜇𝑙 Enzym versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min inaktiviert. … hier würde sich bestimmt auch eine Tabelle zu den Restriktionsansätzen gut machen?!

Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Sie dient der 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 supercoiled Plasmide lassen sich so unterscheiden (Quelle!). Zur visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen interkalierenden Farbstoff markiert (Mülhardt 2009; Schmidt et al. 1999). Als Trägermaterial dient ein Agarosegel mit 1 % (w/v) Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer versetzt mit 1,5 𝜇𝑙 Green Gel DNA Stain. Pro Geltasche wurden 100 𝑛𝑔 DNA-Material mit 1 𝜇𝑙 6x orange loading DYE (Thermo Fisher Scientific) in einem finalen Volumen von 6 µl analysiert. Als Referenz wurden jeweils 3 𝜇𝑙 einer 100 bp 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 … Bio-Rad?!) ausgewertet.

**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 𝜇𝑙 DNA Elutionspuffer. Anschließend fand eine Abschätzung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 8000 spectrometer (Thermo FisherScientific)statt.

***In vitro* Transktription zur Herstellung von viralen RNA Standards**

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribeTM T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs© GmbH) nach Herstellerangaben. Pro Reaktion wurde 1 𝜇𝑔 verdaute und gereingte DNA aus 2.2.6 eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die DNA aus der DNA-RNA-Lösung zu entfernen wurde anschließend ein DNAse Verdau durchgeführt. Dazu wurde der Mix mit 70 𝜇𝑙 H2O verdünnt und 10 𝜇𝑙 10x DNAse-Puffer (Thermo Fisher Scientific) dazugegeben. Die neu entstandene Reaktionslösung wurde mit 2 𝜇𝑙 DNAse Hersteller versetzt und abermals bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert.

**RNA-Aufreinigung**

Um sich der Puffer- und Enzymbestandteile aus vorherigen Arbeitsschritten zu entledigen und eine reine RNA-Lösung zu erhalten, wurde das EchoCLEAN RNA CleanUp Kit (BioEcho Life Sciences GmbH) nach Herstellerangaben verwendet .Das Prinzip der RNA-Aufreinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet (BioEcho 2022).

**Ribogreen Assay zur quantifizierung von RNA**

Zur präzisen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip des 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 der RNA-Konzentrationsbestimmung wird 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 homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend abermals gemischt. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 bei 234 nm.

**Nukleinsäure Amplifikation**

**Real-time Polymerase Kettenreaktion**

Die Amplifikation von Influenza B Virus Nukleinsäuren mittels. Die PCR wurde mit dem Luna© Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro PCR-Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix mit hergestellt (siehe Tabelle 3). Für den in Tabelle 3 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 6) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 4) beschriebenen Primer und Sonden verwendet (Quelle:Immunization and (U.S.) 2021).

Ein Bild, das Text enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

Zu dem Reaktionsmix wurde jeweils 1 µl Influenza B bzw. -A Virus RNA oder H2O bei Negativkontrollen (non-template control) dazugegeben. Die finalen 20 µl Reaktionsmix wurden nach dem in Tabelle 5 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler© 480 II (Roche) im Cy5- (Influenza B) bzw. HEX- (Influenza A) Messkanal gemessen. Die statistische Auswertung der Daten ist in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

Ein Bild, das Text enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

Ein Bild, das Text, Tisch enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

**Rekombinase Polymerase Amplifikation**

**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.Ein Bild, das Text, Tisch enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) mit 29.5 µl Rehydrationspuffer und DEPC-H2O hergestellt. Der Rehydrationsmix dann genutzt um das lyophilisierte RPA-Enzympellet zu resuspendieren . Die resuspendierte Lösung wird für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Der rehydrierte RPA-Reaktionmix (46,5 µl) wird dann in eine neue Kavität eines 8-ter Messsstreifens (Firma) übertragen und kurz zentrifugiert. Nachfolgend wird 1 µl zu amplifizierende RNA bzw. 1 µl H2O ( Negativkontrolle) zum Reaktionsmix dazugegeben sowie 2,5 µl Magnesium Acetat (280 mM) in den Deckel der Kavität. Zum Start der Messung wird der Messstreifen kurz zentrifugiert, gevortext und abermals zentrifugiert … Warum? … . Die Messung von xyz … erfolgte im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38 - 42 °C. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Mischen unterbrochen, warum? … und wenn mischen, wann?.

**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-H2O hergestellt. Die Zusammensetzung des in Tabelle 9 aufgeführten 50X PSM ist in Tabelle 10 aufgelistet. 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. 1 µl H2O bei der Negativkontrolle dazugegeben. In den Deckel jeder Kavität wurden 15 µl Mineralöl ( Carl Roth), welches xyz verhindern soll. Als Letztes wurden 0,64 µl Magnesium Acetat (140 mM) 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.

Ein Bild, das Tisch enthält.

Automatisch generierte Beschreibung