

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |          |
|----------|--|----------|
| <b>1</b> | <b>Material und Methoden</b>   | <b>2</b> |
| 1.1      | Bioinformatische Methoden . . . . .  | 2        |
| 1.1.1    | Primer- und Sondendesign für die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .            | 2        |
| 1.1.2    | Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen . . . . .                                       | 2        |
| 1.1.3    | Statistische Auswertung der Amplifikationen . . . . .                                      | 3        |
| 1.1.4    | Vergleich von Anstiegszeiten . . . . .   | 5        |
| 1.1.5    | Probit-Analyse . . . . .   | 6        |
| 1.2      | Herstellung synthetischer RNA-Standards . . . . .  | 6        |
| 1.2.1    | Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA . . . . .                                | 6        |
| 1.2.2    | Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen . . . . .                                | 7        |
| 1.2.3    | Sequenzierung der extrahierten Plasmide . . . . .  | 7        |
| 1.2.4    | Restriktionsverdau zur Plasmidlinearisierung . . . . .                                     | 8        |
| 1.2.5    | DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus . . . . .  | 8        |
| 1.2.6    | <i>In Vitro</i> Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards . . . . .          | 8        |
| 1.2.7    | RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA . . . . .                                      | 9        |
| 1.3      | Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem RNA-Hintergrund . . . . .                    | 9        |
| 1.4      | Nukleinsäure Amplifikation . . . . .   | 10       |
| 1.4.1    | Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) . . . . .              | 10       |
| 1.4.2    | Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz . . . . .       | 10       |
| 1.4.3    | Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz . . . . .  | 12       |
| 1.4.4    | Primerscreening für die RT-RPA . . . . .   | 13       |
| 1.4.5    | Optimierung der Reaktionstemperatur für die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . . | 13       |
| 1.4.6    | Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .        | 13       |
| 1.4.7    | Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .        | 13       |
| 1.4.8    | Einfluss der Primerassymetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . . .       | 13       |
| 1.4.9    | Ermittlung der Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA . . . . .                                | 14       |

# 1 Material und Methoden

## 1.1 Bioinformatische Methoden

Das folgende Kapitel umfasst die mithilfe der Bioinformatik durchgeführten Methoden wie Primerdesign sowie die Modifikation von Primern und Sonden. Des Weiteren wird die Auswertung der Messdaten und deren Vergleich erläutert.

### 1.1.1 Primer- und Sondendesign für die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Für die Erstellung der RPA Primer und Sonden zur Detektion des Influenza A und B Virus wurde das von Higgins et al. (2018) entwickelte Programm *PrimedRPA* verwendet. Die Parameter für die Ausführung des Programms 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-Sonden Dimersierungstoleranz | 40 %              |

Als Referenzsequenz für das Influenza A Virus dienten die Sequenzen des Virusgenomsegmentes 7 der Subtypen H1N1 (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 (GenBank Nr.: MT244214). Die Primer und Sonden wurden so gewählt, dass sie 3 oder weniger Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Subtypen aufweisen. Für das Influenza B Virus diente das Virusgenomsegment 8 (GenBank Nr.: MT637911) als Referenzsequenz. Alle konstruierten Primer/Sonden Sets wurden mit dem Online-Programm *PrimerDimer*<sup>1</sup> von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung mit den anderen Konstrukten untersucht. Im Anschluss wurden die Primer-Sonden-Sets mit DNA-Sequenzen des gleichen Virusgenomsegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen durch die Einführung von degenerierten Primern vermieden. Für das Alignment wurde das Online-Programm *Clustal Omega*<sup>2</sup> verwendet (Sievers and Higgins 2017). Für die Influenza A Primer-Sonden-Sets wurden zusätzlich degenerierte Basen eingeführt, um ein optimales Alignment an die Sequenzen der beiden Subtypen zu gewährleisten. Bei den Influenza B Primer/Sonden Sets war dies nicht notwendig, da die Sequenzen im gewählten Bereich vollständig Homolog sind.

### 1.1.2 Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen

Der Mechanismus der Signalgenerierung von Fluoreszenzsonden ist bei PCR und RPA gleich. Es beruht auf wie bereits erwähnt (siehe ??) dem FRET-Prinzip, welches während der Reaktion durch die räumliche Trennung des Reporterfluorophors und des Quenchers außer Kraft gesetzt wird.

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

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

## PCR-Sonden

Alle verwendeten PCR-Sonden wurden am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Zusätzlich wurde an der 9. Basenposition ein zweiter Quencher eingebaut um unspezifische Signale zu verringern (Biomers 2023b).

## RPA-Sonden

Das Design der RPA-Sonden erfolgte wie in Behrmann et al. (2020) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde die erste Thymin-Base nach ca. 30 bp mit dem Reporterfluorophor markiert, gefolgt von einer a-basischen Seite. Diese besteht aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat ohne Nucleobase. Nachfolgend wurde über interne "linker" an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrades der nächsten zwei Nukleotide ein entsprechender Quencher gekoppelt (siehe Abbildung 1). Am 3'-Ende wurde die Sonde mit einem dreikettigen Kohlenstoff-Rest versehen, um eine Kettenverlängerung der Sonde zu unterbinden (Behrmann et al. 2020; Biomers 2023a). Zusätzlich wurde für das Influenza A Virus eine zweite Sonde mit der gleichen Sequenz, wie beschrieben Modifiziert. Die Kopplung des Quenchers erfolgte jedoch an das nachfolgende dT-Nukleotid (siehe Abbildung 1B).

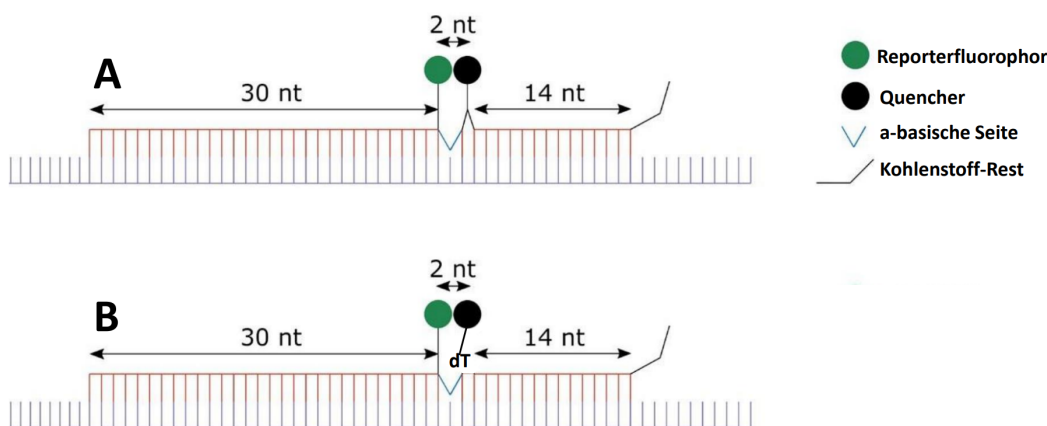


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau der RPA-Sonden:** Modell der RPA sonden mit Reporterfluorophor, Quencher, a-basischer Seite und Kohlenstoffrest gebunden an die Ziel-DNA. **A:** Sonde mit intern gebundenem Quencher (*internally quenched*). **B:** Sonde mit dT-gekoppeltem Quencher (*dT-quenched*).

### 1.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen

Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015). Als Werkzeug einer digitalen Analyse wurde die "open source" Programmiersprache R verwendet, welche für spezifische Anwendungen durch die Verwendung sogenannter "packages" beliebig erweiterbar ist (Pabinger et al. 2014).

#### Normalisierung der Fluoreszenz-Daten:

Für die Normalisierung der Daten wurde der Mittelwert der ersten fünf Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet, wie bei Ritz and Spiess (2008) beschrieben und von diesem Datensatz subtrahiert.

#### Ermittlung signifikanter Amplifikationen:

Die Überprüfung, ob es sich bei den gemessenen Fluoreszenz-Datensatz um eine positive Amplifikation handelt, wurde mit dem *chipPCR* Paket, von Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack (2015) entwickelt, durchge-

führt. Für die Auswertung wurden folgende Tests aus diesem package vorgenommen.

*Shapiro-Wilk Test:* Negative Amplifikationen unterliegen einem gleichmäßig 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 (beschrieben durch SHA-PIRO and WILK (1965)) 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 wird als positive Amplifikation gewertet.

*Residuen Wachstums Test:* Bei diesem Test wird die Stabilität der Residuen in der linearen Phase des Anstiegs untersucht. Residuen lassen sich bei einer linearen Regression als Abweichung der einzelnen Messwerte zu der vorhergesagten Gerade verstehen. Dabei wird der horizontale Abstand der einzelnen Messpunkte zu der berechneten geraden verwendet (Fahrmeir et al. 2016). 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 wird diese Korrelation untersucht und der Datensatz als positive bzw. negative Amplifikation eingestuft (Rödiger et al. 2022).

*Vergleichs Test:* Innerhalb dieses Tests wird untersucht, ob die ersten 20 % des Datensatzes sich signifikant von den letzten 15 % unterscheiden. Dazu werden die beiden Datengruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, beschrieben durch Mann and Whitney (1947), verglichen. Dieser Test erlaubt eine Aussage, ob zwei unabhängige Datengruppen sich signifikant voneinander unterscheiden (Mann and Whitney 1947). Bei einem p-Wert  $< 0,05$  besteht ein solcher Unterschied und es handelt sich um eine positive Amplifikation.

*Signal Level Test:* Dieser Test vergleicht zwei aus dem Datensatz berechnete Werte. Ersterer berechnet sich aus Formel (1), wobei  $MAD^3$  (engl. *mean-absolute deviation*) für die absolute Standardabweichung steht (siehe R-Dokumentation). Der zweite Wert ist das Signal-Rausch-Verhältnis<sup>4</sup> (SNR, engl. *signal noise ratio*), berechnet mit Formel (2) (siehe R-Dokumentation). Bei einem um 25 % erhöhtem Wert des SNR im Vergleich zum ersten Wert wird die Amplifikation als positiv gewertet (Rödiger et al. 2022).

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

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

*Polygon Test:* Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg pro Zeitintervall mit 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 festgelegt. (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

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

Des Weiteren wird oft bei Analysen von Echtzeit-Amplifikationsmethoden mit einen Schwellenwert gearbeitet. Sollte dieser während der Messung nicht überschritten werden, wird die Amplifikation als negativ eingestuft

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

<sup>4</sup><https://search.r-project.org/CRAN/refmans/warbleR/html/sig2noise.html>

(Aranha et al. 2021). Um dies zu berücksichtigen wurde ein weiterer Test, der *Schwellenwert Test*, eingeführt. 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  $n_I$  und den Werten einer einseitigen Student's t-Verteilung (siehe Formel (4)) (Frey, Canzio, and Zurakowski 1998). Die Student's t-Verteilung ist dabei eine Art der Wahrscheinlichkeitsverteilung, welche es erlaubt möglichst genaue Berechnungen für kleine Stichproben durchzuführen (Fisher 1992). Für die Schwellenwertberechnung wurden mindestens sechs Negativkontrollen als Datensatz verwendet. Das Konfidenzintervall für die t-Verteilung wurde bei 0,99 (99 %) festgelegt.

$$\text{Schwellenwert} = \bar{X} + SD * t \sqrt{1 + \frac{1}{n_1}} \quad \text{mit} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n_2 - 1}} \quad (4)$$

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

### Ermittlung der Anstiegszeit

Die Anstiegszeit, in der Literatur bei PCR-System nach den MIQE Richtlinien auch als  $C_q$ -Wert (engl. *quantification cycle*) angegeben, ist der Zeitpunkt bei, die dem Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant von dem Grundrauschen unterscheiden (Bustin et al. 2009). Dies lässt sich auch auf die RPA als TT-Wert (engl. *threshold time*) übertragen (Diagne et al. 2020). 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. Hierzu wurde der im Schwellenwert Test beschriebene Wert (siehe Kapitel 1.1.3) verwendet (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

#### 1.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten

Der Vergleich von Datensätzen ist ein Standardverfahren in der deskriptiven Statistik und wird bei zwei Gruppen mit dem Student's T-Test und bei drei oder mehr Gruppen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt (Kuckartz et al. 2010). Um diese Verfahren durchführen zu können, müssen als Voraussetzungen die Daten Normalverteilt sein und gleiche Varianzen besitzen. Zusätzlich können Daten auf Ausreißer überprüft werden, um fehlerhafte Aussagen zu vermeiden (Gehrau, Maubach, and Fujarski 2022). Der Test auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalität durchgeführt (González-Estrada, Villaseñor, and Acosta-Pech 2022). Anschließend wurden die Daten mit der Boxplot-Methode auf Ausreißer untersucht (Gehrau, Maubach, and Fujarski 2022). Datenpunkte, welche als Ausreißer identifiziert werden konnten wurden für die folgenden Tests ignoriert. Der nachfolgende Test auf Varianzhomogenität mit den bereinigten Daten wurde mithilfe des Levene-Tests durchgeführt (Gastwirth, Gel, and Miao 2009). Bei zwei zu untersuchenden Gruppen mit festgestellter Varianzhomogenität wurde der Student's T-Test durchgeführt. Bei unterschiedlichen Varianzen wird die Voraussetzung für den Student's T-Test nicht mehr erfüllt und es wurde der alternative Welch T-Test durchgeführt (WELCH 1947). Bei einem Vergleich von drei oder mehr Gruppen mit gleichen Varianzen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, welche bei einem

p-Wert von unter 0,05 mit einem nachfolgendem Tukey HSD Test kombiniert wurde, um die Verhältnisse zwischen den Gruppen zu untersuchen (Rasch et al. 2014). Bei unterschiedlichen Varianzen wurde eine Welch’s Varianzanalyse durchgeführt. Konnten innerhalb der Welch’s Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, wurde ein Games Howell Test nachfolgend durchgeführt, um die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zu untersuchen (Lee and Lee 2018).

### 1.1.5 Probit-Analyse

Die Probit-Analyse ist eine Form der Regressionsanalyse, welche binäre Fälle (0 und 1) mit einer fortlaufenden Variablen in Verbindung bringt. Dabei wird berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit  $y$  den Wert 1 an der Stelle  $x$  annimmt. Vereinfacht wird dazu die Normalverteilungsfunktion  $\phi$  auf ein parametrischen Regressionsmodell (siehe Formel (5)) übertragen (Bingham and Fry 2010). Es wird also eine Regression von  $\phi^{-1}(p_x)$  auf  $x$  durchgeführt. Die neue Regressionsgleichung ist in Formel (6) gezeigt (Stahel 1999).

$$p_x = f(\vec{\alpha}, x) + \epsilon_x, \quad (5)$$

$$\hat{q}_i = \phi^{-1}(\hat{p}) = \hat{a}x_i + \hat{b}, i = 1, \dots, k, \quad (6)$$

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 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 Behrmann, beschrieben in Behrmann et al. (2020).

## 1.2 Herstellung synthetischer RNA-Standards

Zur Etablierung und Optimierung der RPA-Protokolle ist es notwendig, eine definierte Menge amplifizierbarer RNA-Moleküle einzusetzen, damit eine Vergleichbarkeit der Protokolle ermöglicht wird. Dafür wurden *in vitro* molekularbiologisch definierte Virus-RNA Standards der zu amplifizierenden Nukleinsäuren hergestellt. Die RNA-Standards für das Influenza A Virus wurden wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben hergestellt. Da für das Influenza B Virus bereits eine transformierte *E. coli* Kultur in der Arbeitsgruppe vorhanden war, wurde mit dieser erst ab Kapitel 1.2.2 weitergearbeitet .

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

Die chemische Transformation von NEB<sup>®</sup> 5-alpha kompetenten *E. coli* Zellen (High Efficiency, New England BioLabs<sup>®</sup> GmbH) erfolgte nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll<sup>5</sup> online verfügbar). Als Vektor dienten artifiziell synthetisierte Plasmide der Firma Invitrogen, die einerseits eine Antibiotikaselektivkassette sowie andererseits die virale RNA-Sequenz als DNA-Gegenstück beinhalten (Plasmidkarten siehe Abbildung ?? - ?? im Anhang). Die entsprechenden Genebank Nr. der enthaltenen Virus-RNA-Sequenzen sind in Kapitel 1.1.1 erwähnt. Von diesen Plasmiden wurden jeweils 200 ng in die Transformation eingesetzt. Im Anschluss wurden jeweils 25 µl des Transformationsansatzes auf mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml, Roche diagnostics) versetzte LB-Platten (Carl Roth, Fertigmischung, 1,5 % Agar zugesetzt) ausplattiert und bei 37

<sup>5</sup><https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>

°C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Kolonie-PCR, eine modifizierte Form der PCR, durchgeführt. Hierbei dient nicht die bloße DNA, sondern die transformierten Bakterien als Ausgangsmaterial. Durch die Wahl spezifischer Primer, welche das gewünschte Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren können, wird geprüft, ob die Transformation mit dem Plasmid inklusive des gewünschten Inserts innerhalb der Kolonie erfolgreich war (Bergkessel and Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) eingesetzt. Eine Kolonie der transformierten *E. coli* wurde in 20 µl PCR-reinem Wasser (Nuklease- und Nukleinsäure-frei, DEPC behandelt, Carl Roth) suspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Mix gemischt und eine PCR im Light Cycler 480 II (Roche) durchgeführt. Das Temperaturprogramm der 2-stufigen PCR ist in Tabelle 2 angegeben. Weitere 5 µl der Suspension wurden auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert, um eine Folgekultur der überprüften *E. coli* zu erhalten.

Tabelle 2: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

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

\* Messung der Fluoreszenz

### 1.2.2 Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen

Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C und 200 RPM über Nacht in 25 ml Lennox LB-Medium kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Protokoll<sup>6</sup> online verfügbar). Das Prinzip der Qiagen DNA-Reinigung beruht dabei auf einer speziellen alkalischen Lyse der Bakterien kombiniert mit einem Ionen Austausch (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). Die Elution der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl PCR-reinem Wasser durchgeführt. Eine anschließende Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

### 1.2.3 Sequenzierung der extrahierten Plasmide

Zur Prüfung der DNA-Sequenz, wurde die extrahierte 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 Dideoxynucleotiden amplifiziert. (Mülhardt 2009). Als Primer für die aus Kapitel 1.2.2 extrahierte Plasmid-DNA wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r

<sup>6</sup><https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0bd0c5fb-c271-43e7-af43-32d539374fa9&lang=en>



(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH.

#### 1.2.4 Restriktionsverdau zur Plasmidlinearisierung

In Vorbereitung für eine *in vitro* Transkription zum Erstellen viraler RNA wurde die aus Kapitel 1.2.2 extrahierte Plasmid-DNA linearisiert. Dafür wurden Restriktions-Endonukleasen benutzt, welche innerhalb der spezifischen Erkennungssequenzen den DNA-Doppelstrang schneiden (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (siehe Abbildung ?? im Anhang) 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 Abbildung ?? - ?? im Anhang) wurde das Enzym PshAI (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. 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 Trägermaterial (Agarose-Gel) Richtung Anode. Dabei wandern kürzere DNA-Moleküle schneller durch das Trägermaterial als längere, wodurch DNA-Moleküle anhand ihrer Sequenzlänge aufgetrennt werden. Ungeschnittene 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 visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert (Mülhardt 2009; Schmidt et al. 1999). Als Trägermaterial diente ein Agarosegel mit 1 % (w/v) Agarose in 1X TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Roti®fair, Carl Roth) versetzt mit 1,5 µl Green Gel DNA/RNA Stain (Bio & Sell). 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 100bp plus DNA-Leiter (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific) und einer 1 kb DNA-Leiter (PeqGOLD, Thermo Fisher Scientific) mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V für 60 min. Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel bei UV-Licht mithilfe des Geldokumentationsgeräts Biorad universal Hood II (Bio-Rad) ausgewertet.

#### 1.2.5 DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus

Zur Entfernung von Puffer- und Enzymbestandteile des fertigen Restriktionsansatz zu, wurde das DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. (Protokoll<sup>7</sup> online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,5; 0,1 mM EDTA; bereitgestellt von Kit). Anschließend wurde die Quantität und Reinheit der DNA mittels NanoDrop 8000 Spektrophotometer bestimmt.

#### 1.2.6 In Vitro Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards

Damit realitätsnahe Bedingungen in Bezug auf die Nukelinsäure-Standards erreicht werden, mussten die DNA-Fragmente in RNA transkribiert werden, da dieses das genomische Material der zu untersuchenden

<sup>7</sup>[https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4003t\\_d4003\\_d4004\\_d4013\\_d4014\\_dna\\_clean\\_concentrator\\_-5.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf)



Influenza Viren ist. Für diesen Zweck wurde eine Promotor-Region von der viralen Sequenz genutzt (siehe Plasmidkarten ?? - ?? im Anhang).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll<sup>8</sup> online verfügbar). Pro Reaktion wurde 1 µg linearisierte und gereinigte DNA aus Kapitel 1.2.4 eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. zur Entfernung residualer Anfangs-DNA aus der RNA-Lösung wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde der Mix mit 70 µl PCR-reinem Wasser verdünnt und 10 µl 10X DNase-Puffer (New England Biolabs) dazugegeben. Die neu entstandene Reaktionslösung wurde mit 4 U DNase I (New England Biolabs) versetzt und abermals bei 37 °C für 15 min inkubiert. Um Puffer- und Enzymbestandteile aus den vorherigen Arbeitsschritten zu entfernen und eine reine RNA-Lösung zu erhalten, wurde das EchoCLEAN RNA CleanUp Kit (BioEcho Life Sciences GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll<sup>9</sup> online verfügbar). Das Prinzip der RNA-Aufreinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet (BioEcho 2022).

### 1.2.7 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 einzelsträngige RNA. Durch die Bindung erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um den Faktor 1000, so dass eine sensitive Detektion von bis zu 1 ng/ml RNA ermöglicht wird (Jones et al. 1998). Vor der RNA-Konzentrationsbestimmung wurde/wird eine Kalibriergerade im “High-Range” Bereich erstellt. Dazu wurden mit dem im Kit enthaltenen RNA-Standard 5 Kalibrierlösungen im Bereich zwischen 2000 ng/ml und 50 ng/ml mit 1X TE-Puffer (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Die zu messende RNA-Probe wurde vor der Messung mit 1X TE-Puffer auf eine in der Kalibriergerade liegende Konzentration verdünnt. 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 homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend abermals gemischt. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 Fluoreszenzspektrometer bei 525 nm.

## 1.3 Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem RNA-Hintergrund

Damit überprüft werden kann, ob die Detektion von RNA mittel RT-RPA in einem humanen Probenhintergrund beeinflusst wird, wurden Kontrollproben erstellt. Dazu wurden von gesunden Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Nasopharyngeal-Abstriche mithilfe der 1ml UTM REGULAR FLOQ SWAB (305c, UTM™) entnommen und die RNA mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online<sup>10</sup> Verfügbar). In die erhaltenen RNA-Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis die entsprechende virale Standard-RNA zugegeben und die Kontrollprobe homogenisiert.

<sup>8</sup><https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/standard-rna-synthesis-e2040>

<sup>9</sup>[https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol\\_EchoCLEANRNACleanupcolumn\\_001\\_EN.pdf](https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf)

<sup>10</sup><https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

## 1.4 Nukleinsäure Amplifikation

In diesem Kapitel werden durchgeführten NAAT beschrieben. Darunter fallen die RT-qPCR, die RPA sowie die verschiedenen Optimierung letzterer für die Influenza A und B Viren.

### 1.4.1 Reverse Transkription Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die Amplifikation von viraler Standard RNA mittels RT-qPCR wurde mit dem Luna<sup>®</sup> Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 3) mit 1 µl Virus-RNA-Standard versetzt. Für den in Tabelle 3 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 4) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 5) Primer und Sonden beschrieben durch das Nationale Center für Immunisierung und Respiratorische Krankheiten (NCIRD) verwendet (NCIRD 2021). Dabei sind jeweils die Oligonukleotid-Sequenz, die verwendeten Fluorophore und Quencher sowie die 3'-Position auf der entsprechenden Virus-Genomsequenz (siehe 1.1.1) dargestellt. Die finalen 20 µl Reaktionsmix wurden nach dem in Tabelle 6 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche) gemessen. Für das Hexachlorofluorescein (HEX) Fluorophor wurde im Wellenlängenbereich von ..... gemessen. Die Erfassung des Cyanine 5 (Cy5) Fluorophors erfolgte im Wellenlängenbereich von .... Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

| Bestandteil  | Konzentration | Volumen           |
|--|---------------|-------------------|
| 2X Luna <sup>®</sup> Universal Probe One-Step Reaction Mix | 1X            |                   |
| 20X Luna <sup>®</sup> WarmStart <sup>®</sup> RT Enzyme Mix | 1X            |                   |
| 40X PSM  | 1X            |                   |
| Virus RNA*   |               | 1 µl              |
| PCR-reines Wasser  |               | x µl $\sum$ 20 µl |

\* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

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

| Name      | Sequenz (5'->3')           | Konzentration | 3'-Position | Modifikation                             |
|-----------|----------------------------|---------------|-------------|--|
| InfA For1 | CAAGACCAATCYTGTCACCTCTGAC* | 16 µM         | 156 bp      | /  |
| InfA For2 | CAAGACCAATYCTGTCACCTYTGAC* | 16 µM         | 156 bp      | /  |
| InfA Rev1 | GCATTYTTGGACAAAVCGTCTACG*  | 16 µM         | 261 bp      | /  |
| InfA Rev2 | GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG    | 16 µM         | 261 bp      | /  |
| InfA-P    | TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG   | 8 µM          | 214 bp      | Fluorophor: HEX;<br>Quencher: BMN-Q535** |

\* Y=C oder T; V=A, C oder T \*\* Modifiziert wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

### 1.4.2 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz

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 für Influenza B in Tabelle ?? und für Influenza A in Tabelle @ref(tab:....) angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 7) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzympellet zur Resuspendierung übertragen. Die Lösung

Tabelle 5: Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes

| Name     | Sequenz (5'->3')           | Konzentration | 3'-Position | Modifikation                             |
|----------|----------------------------|---------------|-------------|--|
| InfB For | TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG*    | 16 $\mu$ M    | 716 bp      | /  |
| InfB Rev | CGGTGCTCTTGACCAAATTGG      | 16 $\mu$ M    | 818 bp      | /  |
| InfB-P   | CCAATTCGAGCAGCTGAACTGCGGTG | 8 $\mu$ M     | 761 bp      | Fluorophor: Cy5,<br>Quencher: BMN-Q620** |

\* Y=C oder T; V=A, C oder T \*\* Modifiziert wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

Tabelle 6: 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

wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion (46,5  $\mu$ l) wurden in eine Kavität eines 8-ter Messstreifens (Carl Roth) übertragen und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1  $\mu$ l zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1  $\mu$ l PCR reines H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben, sowie 2,5  $\mu$ l Magnesium Acetat (280 mM) in den Deckel der Kavität pipettiert. Zum Start der Reaktion wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert, um das Magnesium-acetat in den Reaktionsmix einzubringen und somit den benötigten CO-Faktor der Polymerase bereitzustellen (Kück 2005). Die Messung erfolgte nach einer ein minütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Für das Fluorophor Carboxyfluorescein (FAM) wurde die Fluoreszenz in dem Wellenlängen .... bis .... und für das Fluorophor ATTO565 in den Wellenlängen ..... bis .... detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für einen zusätzlichen Misch-Schritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Tabelle 7: Zusammenstellung des Rehydrationsmixes

| Bestandteil                     | Konzentration    | Volumen                       | 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      |
| Rehydrations Puffer             |                  | 29,5 $\mu$ l                  | TwistDX                  |
| PCR reines Wasser               |                  | x $\mu$ l $\sum$ 46,5 $\mu$ l |                          |

\* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

### 1.4.3 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz

Wie bereits durch Behrmann et al. (2020) und Lillis et al. (2016) gezeigt werden konnte, kann das Reaktionsvolumen der RPA verringert werden, welches Vorteile wie eine Unabhängigkeit eines zusätzlichen Mischschrittes mit sich bringt und die RPA zugänglich für mikrofluidische Anwendungen macht (Lillis et al. 2016; Behrmann et al. 2020). Um die Vorteile der “low volume” Applikation für die Influenza A und B Systeme zu übertragen, wurde eine Verringerung des Reaktionsvolumens untersucht.

Dazu wurde eine RPA-Reaktion mit 50 µl Gesamtvolumen auf 8 Reaktionen aufgeteilt und so ein neues Reaktionsvolumen von 6,5 µl erhalten. Für 8 Reaktionen wurde dabei insgesamt 40,8 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzymellet zur Resuspendierung übertragen. Die Zusammensetzung des in Tabelle 8 aufgeführten 50X PSM’s ist in Tabelle 9 gezeigt. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion wurden auf einen 8-ter Messstreifens aufgeteilt (4,8 µl pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauffolgend wurden 15 µl Mineralöl (Carl Roth), welches die Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung 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 und homogenisiert, um das Magnesium und das Mineralöl in den Reaktionsmix einzubringen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, um die Öl-Phase von der wässrigen Phase zu trennen. Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Fluorophor wurde die Fluoreszenz in den Wellenlängen .... bis .... (FAM) und ..... bis .... (ATTO565) detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 eingestellt. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Mischen unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

| Bestandteil                     | Konzentration | Volumen             | 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      |
| Rehydrations Puffer             |               | 29,5 µl             | TwistDX                  |
| PCR reines Wasser               |               | x µl $\sum$ 40,8 µl | Thermo Fisher Scientific |

Tabelle 9: Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz

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

#### 1.4.4 Primerscreening für die RT-RPA

Für die Entwicklung der RT-RPA wurden die in Kapitel 1.1.1 designten Primer/Sonden Sets auf eine positive Amplifikation getestet. Dabei wurden die für designten Primer im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 40 °C getestet. Als Template-RNA wurden bei Influenza B  $10^6$  Kopien/µl des RNA-Standards eingesetzt. Bei Influenza A wurden  $10^7$  Kopien/µl (H1N1 Subtyp) des RNA-Standards verwendet.

#### 1.4.5 Optimierung der Reaktionstemperatur für die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Optimierung der Temperatur erfolgte im Temperaturintervall zwischen 38 - 42 °C. Dabei wurde das Intervall auf 3 Messungen (38 °C, 40 °C, 42 °C) aufgeteilt. Für Influenza B erfolgte die Temperaturoptimierung im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3), mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $10^6$  Kopien/µl. Das Temperaturoptimum bei Influenza A wurde im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/µl (H1N1 Subtyp) und einer 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration bestimmt.

#### 1.4.6 Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Einführung und Optimierung eines zusätzlichen Mischzeitpunktes während der Reaktion erfolgte bei Influenza B im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3) bei 40 °C. Als Mischzeitpunkte wurde 5 min, 4 min und 3 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/µl gewählt. Zusätzlich wurde der Mischzeitpunkt von 5 Minuten bei RNA-Konzentrationen von  $10^2$  und  $10^1$  und einer 1,5X erhöhten Reverse Primer untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzliches Mischen mitgeführt.

Für Influenza A erfolgte die Optimierung des Mischzeitpunktes im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 42 °C und einer 1,5X erhöhten reverse Primer-Konzentration. Es wurden die Mischzeitpunkte 7 min, 5 min, 3min, 2 min, und 1,5 min nach Messbeginn bei einer RNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien/µl (H1N1 Subtyp) untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzliches Mischen mitgeführt

#### 1.4.7 Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Für die Optimierung der Primerassymetrie wurden sowohl für Influenza B als auch Influenza A die verschiedenen Reverse Primer-Konzentrationen 1-Fach, 1,5-Fach und 2-Fach untersucht. Die Messung für Influenza A erfolgte im 50 µl Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 42 °C mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/µl (H1N1 Subtyp). Es wurde für die jeweiligen Messungen die Reverseprimer-Konzentration im hergestellten Reaktionsmix von 0,45 µM auf 0,675 µM und 0,9 µM erhöht. Alle anderen Konzentrationen blieben unverändert.

Bei Influenza B erfolgte die Messung im 8tel-Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3) bei 40 °C und einer RNA-Konzentration von  $10^6$  Kopien/µl. Hierbei wurden die Reverseprimer-Konzentrationen im Primer-Sonden-Mix von 21 µM auf 31,5 µM und 42 µM angepasst.

#### 1.4.8 Einfluss der Primerassymetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Primerassymetrie, sprich die ungleiche Verteilung der benötigten Primer ist für die PCR bereits in der Literatur bekannt. Die ungleichmäßige Verteilung der Primer führt in der PCR dazu, dass spezifisch der + oder - Strang öfter Amplifiziert wird und somit einzelsträngige DNA entsteht (Chen, Ruff, and Halsey 2010). Dieses Phänomen kann dazu verwendet werden um spezifisch Punktmutationen zu detektieren (Lázaro,

[Tortajada-Genaro, and Maquieira 2021](#)) aber auch auf die qPCR angewandt werden ([Chen, Ruff, and Halsey 2010](#)).

Um den Einfluss einer generellen erhöhten Primer-Konzentration innerhalb der Influenza B RPA zu untersuchen wurden die Primer-Konzentrationen verdoppelt. Die Messung erfolgte bei 40 °C im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel [1.4.3](#)) mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l. Anschließend wurde eine neue Sonde, welche an gleicher Position auf an dem entgegengesetzten forward-Strang hybridisiert eingeführt (Sequenz: CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCA 12 A 3 GTAGCAACAAGTTTAGC, mit 1=FAM-Fluorophor, 2=a-basische Seite und 3=BMQ-535). Als Fluorophor wurde Mit dieser Sonde wurden jeweils Forward oder Reverse Primer in doppelter Konzentration sowie eine Messung mit normalen Primer-Konzentrationen als Referenz durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 40 °C im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel [1.4.3](#)) mit einer RNA-Konzentration von  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l. Die Erhöhung der Primer-Konzentrationen für Forward oder Reverse Primer erfolgte im Primer-Sonden-Mix.

#### **1.4.9 Ermittlung der Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA**

Die Ermittlung der Sensitivität erfolgte in dekadischen Verdünnungsstufen von  $2 * 10^7$  RNA-Kopien/ $\mu$ l bis  $2 * 10^0$  RNA-Kopien/ $\mu$ L. Die Amplifikationen wurden anschließend mit der in Kapitel [1.1.3](#) beschriebenen Methode ausgewertet. Das Detektionslimit wurde mit der in Kapitel [1.1.5](#) beschriebenen Probit-Analyse berechnet. Alle RT-PCR's wurden dabei nach der in Kapitel [1.4.1](#) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Influenza B RT-RPA wurde jeweils im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe Kapitel [1.4.2](#)) und im 8tel-Ansatz (siehe Kapitel [1.4.3](#)) bei 40 °C, 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min gemessen.

Bei der Influenza A RT-RPA wurden die Sensitivität für den H1N1-Subtyp und den H3N2-Subtyp im 50  $\mu$ l Ansatz (siehe Kapitel [1.4.2](#)) bei 42 °C, 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min ermittelt.

- 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).
- Biomers. 2023a. "PCR-Blocker." *Biomers.net the Biopolymer Factory*. [https://www.biomers.net/de/Produkte/DNA/Real-time\\_PCR/PCR\\_Blocker.html](https://www.biomers.net/de/Produkte/DNA/Real-time_PCR/PCR_Blocker.html).
- . 2023b. "REAL-TIME PCR PROBES." *Biomers.net the Biopolymer Factory*. [https://www.biomers.net/de/Produkte/Real\\_Time\\_PCR\\_Probes.html](https://www.biomers.net/de/Produkte/Real_Time_PCR_Probes.html).
- 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>.
- Chen, Caifu, David Ruff, and Jason Halsey. 2010. "Asynchronous PCR." In *Methods in Molecular Biology*, 231–43. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4_16).
- Diagne, Cheikh Tidiane, Martin Faye, Benjamin Lopez-Jimena, Ahmed Abd El Wahed, Cheikh Loucoubar, Cheikh Fall, Giulia Mencatelli, et al. 2020. "Comparative Analysis of Zika Virus Detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and RT-RPA." In *Methods in Molecular Biology*, 165–79. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3_14).
- Fahrmeir, Ludwig, Christian Heumann, Rita Künstler, Iris Pigeot, and Gerhard Tutz. 2016. *Statistik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50372-0>.
- Fisher, R. A. 1992. "Statistical Methods for Research Workers." In *Springer Series in Statistics*, 66–70. Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_6).
- 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).
- Gastwirth, Joseph L., Yulia R. Gel, and Weiwen Miao. 2009. "The Impact of Levene's Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice." *Statistical Science* 24 (3). <https://doi.org/10.1214/09-sts301>.
- Gautam, Akash. 2022. *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4>.



- Gehrau, Volker, Katharina Maubach, and Sam Fujarski. 2022. "Mittelwertvergleiche." In *Einfache Datenauswertung Mit r*, 319–83. Springer Fachmedien Wiesbaden. [https://doi.org/10.1007/978-3-658-34285-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-658-34285-2_12).
- González-Estrada, Elizabeth, José A. Villaseñor, and Rocío Acosta-Pech. 2022. "Shapiro-Wilk Test for Multivariate Skew-Normality." *Computational Statistics* 37 (4): 1985–2001. <https://doi.org/10.1007/s00180-021-01188-y>.
- 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>.
- 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>.
- Kück, Ulrich. 2005. "PCR-Analytik." In *Praktikum Der Molekulargenetik*, 221–45. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8_4).
- Kuckartz, Udo, Stefan Rädiker, Thomas Ebert, and Julia Schehl. 2010. "T-Test: Zwei Mittelwerte Vergleichen." In *Statistik*, 147–66. VS Verlag für Sozialwissenschaften. [https://doi.org/10.1007/978-3-531-92033-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-531-92033-7_7).
- Lázaro, Ana, Luis A. Tortajada-Genaro, and Ángel Maquieira. 2021. "Enhanced Asymmetric Blocked qPCR Method for Affordable Detection of Point Mutations in KRAS Oncogene." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (11): 2961–69. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03229-3>.
- Lee, Sangseok, and Dong Kyu Lee. 2018. "What Is the Proper Way to Apply the Multiple Comparison Test?" *Korean Journal of Anesthesiology* 71 (5): 353–60. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>.
- Lillis, Lorraine, Joshua Siverson, Arthur Lee, Jason Cantera, Mathew Parker, Olaf Piepenburg, Dara A. Lehman, and David S. Boyle. 2016. "Factors Influencing Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Assay Outcomes at Point of Care." *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>.
- 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>.
- NCIRD. 2021. "National Center for Immunization and Respiratory Diseases (u.s.)." *Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes*, July. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944>.
- 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, Ma-*

- xi, 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>.*
- Rasch, Björn, Malte Frieze, Wilhelm Hofmann, and Ewald Naumann. 2014. "Einfaktorielle Varianzanalyse." In *Springer-Lehrbuch*, 1–34. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43548-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43548-9_1).
- 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 Friebs, 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>.
- SHAPIRO, S. S., and M. B. WILK. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." *Biometrika* 52 (3-4): 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- 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>.
- Stahel, Werner A. 1999. "Multivariate Statistik." In *Statistische Datenanalyse*, 304–21. Vieweg+Teubner Verlag. [https://doi.org/10.1007/978-3-663-11500-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-663-11500-7_15).
- WELCH, B. L. 1947. "THE GENERALIZATION OF 'STUDENT'S' PROBLEM WHEN SEVERAL DIFFERENT POPULATION VARIANCES ARE INVOLVED." *Biometrika* 34 (1-2): 28–35. <https://doi.org/10.1093/biomet/34.1-2.28>.