

Inhaltsverzeichnis

1	Material und Methoden	2
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	8
1.2.4	Restriktionsverdau zur linearisierung des Plasmids	8
1.2.5	DNA-Reinigung des Restriktionsverdaus	9
1.2.6	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung von viralen RNA-Standards	9
1.2.7	RiboGreen Assay zur Quantifizierung von RNA	9
1.3	Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem Nukleinsäure-Hintergrund	10
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	11
1.4.3	Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz	12
1.4.4	Primer- und Sondenauswahl für die RT-RPA	13
1.4.5	Adaption des Reaktionsvolumens der RT-RPA	13
1.4.6	Optimierung der Reaktionstemperatur für die RT-RPA	13
1.4.7	Testung asymmetrische Primerkonzentrationen zur Optimierung der RT-RPA	14
1.4.8	Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation	14
1.4.9	Optimierung der Primerasymmetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation	14
1.4.10	Einfluss der Primerasymmetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation	15
1.4.11	Ermittlung der analytischen Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA	15
1.4.12	Untersuchung des Einflusses der Sondenmodifikation auf die RT-RPA	16
1.4.13	Ermittlung der Spezifität der RT-RPA	16

1 Material und Methoden

1.1 Bioinformatische Methoden

Das folgende Kapitel umfasst die Bioinformatisch durchgeführten Methoden wie das RPA Primerdesign sowie die Modifikation der Primern und Sonden. Des Weiteren wird die Auswertung der Messdaten und deren Analysemethoden 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: Übersicht der Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA

Parameter	Wert
Länge der Primer	30 - 34 bp
Länge der Sonde	50 bp
Sondentyp	Exonuklease 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 B Virus diente das Virusgenomsegment 8 (GenBank Nr.: MT637911). Für das Influenza A Virus dienten die Sequenzen des Virusgenomsegmentes 7 der Subtypen H1N1 (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 (GenBank Nr.: MT244214) als Referenzsequenzen. Von beiden Subtypen wurde eine Konsensus-Sequenz erstellt und mithilfe dieser die Primer und Sonden designt. Die Primer und Sonden wurden so gewählt, dass sie 4 oder weniger Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Subtypen aufweisen. Alle konstruierten Primer-Sonden-Kombinationen wurden mit dem Online-Programm *PrimerDimer*¹ von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung mit den anderen Konstrukten untersucht. Im Anschluss wurden die Primer-Sonden-Kombinationen mit DNA-Sequenzen des gleichen Virusgenomsegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen am durch die Einführung von degenerierten Primern vermieden. Für das Alignment wurde das Online-Programm *Clustal Omega*² verwendet (Sievers and Higgins 2017). Für die Influenza A Primer-Sonden-Kombinationen wurden zusätzlich die Basen so angepasst, dass jeweils beide Subtypen ähnlich viele Fehlpaarungen aufweisen, um so ein optimales Alignment an die Sequenzen zu gewährleisten. Bei den Influenza B Primer-Sonden-Kombinationen war dies nicht notwendig, da die Sequenzen im gewählten Bereich vollständig homolog sind.

1.1.2 Fluoreszenzsonden und deren Modifikationen

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

¹<http://www.primer-dimer.com/>

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

PCR-Sonden

Alle verwendeten PCR-Sonden (siehe Tabelle 4 und 5) 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, indem die erste Thymin-Base nach 30 bp mit dem Reporterfluorophor markiert wurde. Das nachfolgende Nukleotid wurde mit einer a-basischen Seite substituiert (siehe Abbildung 1). Diese besteht aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat ohne Nukleobase. Nachfolgend wurde über interne "linker" an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrades der nächsten zwei Nukleotide ein entsprechender Quencher gekoppelt (siehe Abbildung 1A). 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). Für eine Sondenvergleichs-Studie wurde zusätzlich für das Influenza A Virus eine zweite *dT-quenched* Sonde mit der gleichen Sequenz modifiziert. Die Kopplung des Quenchers erfolgte hierbei an das nachfolgende dT-Nukleotid (siehe Abbildung 1B).

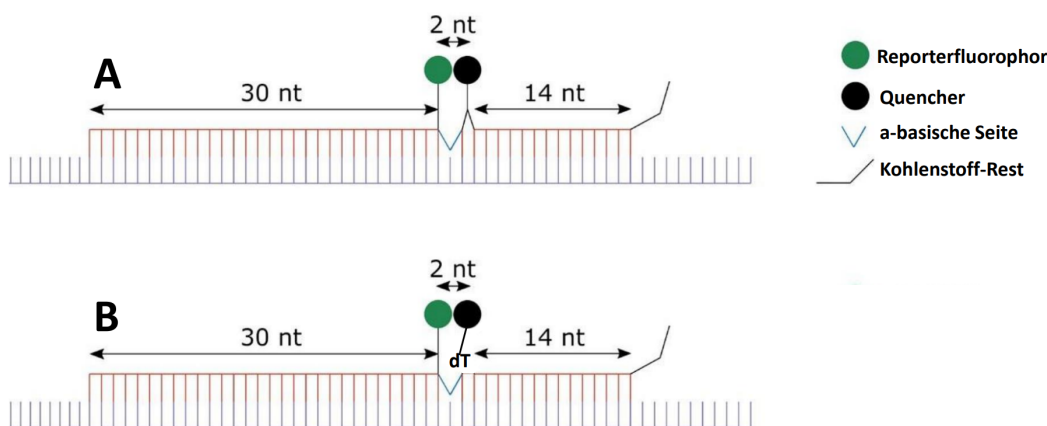


Abbildung 1: **Schematischer Aufbau der RPA-Sonden:** Vergleichende Gegenüberstellung RPA Sonden mit Reporterfluorophor (grün), Quencher (schwarz), a-basischer Seite und Kohlenstoffrest gebunden an die Ziel-DNA. **A:** Sonde mit intern gebundenem Quencher (*internally quenched*, iQ). **B:** Sonde mit dT-gekoppeltem Quencher (*dT-quenched*). Bild modifiziert nach Behrmann et al. (2020)

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). Es wurde die R-Version 4.2.2 für die Auswertung der Daten verwendet. **Normalisierung der Fluoreszenz-Daten:**

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

Ermittlung signifikanter Amplifikationen:

Die Überprüfung, ob es sich bei den gemessenen Fluoreszenz-Datensatz um eine positive Amplifikation han-

delt, wurde mit dem *chipPCR* Paket, von Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack (2015) durchgeführt. 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 (SHAPIRO and WILK 1965) 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 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-Verhältnis⁴ (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).

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

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

Polygon Test:

Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg (Δy) pro Zeitintervall (Δt) 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).

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

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

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

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 (Aranha et al. 2021). Um dies zu berücksichtigen wurde der *Schwellenwert Test*, eingeführt.

Schwellenwert Test:

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 dem die Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant vom Grundrauschen unterscheiden (Bustin et al. 2009). Für die RPA wird dies als TT-Wert (engl. *threshold time*) definiert (Diagne et al. 2020). Zur 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

In der deskriptiven Statistik ist der Vergleich von Datensätzen ein Standardverfahren. Bei zwei Gruppen wird dies 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, die 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 nachfolgend ein Games Howell Test 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 die Normalverteilungsfunktion ϕ auf ein parametrisches Regressionsmodell (siehe Formel (5)) übertragen, d.h. es wird eine Regression von $\phi^{-1}(p_x)$ auf x durchgeführt (Bingham and Fry 2010). Die sich daraus ergebende 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 von Toxinen auf Lebewesen mathematisch zu bestimmen (Bliss 1934). Aufgrund der gleichen Datenlage lässt sich dieses Modell jedoch auch verwenden, um das untere Detektionslimit mittels einer Konzentrationsreihe für ein Nukleinsäure-Amplifikationssystem zu ermitteln. Die Probit-Analyse anhand von Amplifikationsdaten erfolgte mittels einer R-skripts beschrieben in Behrmann et al. (2020).

1.2 Herstellung synthetischer RNA-Standards

Zur Etablierung und Optimierung der RPA-Protokolle wurde eine definierte Menge amplifizierbarer RNA-Moleküle eingesetzt, um damit die Vergleichbarkeit der Protokolle zu ermöglichen. 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, sind die Arbeiten dazu erst ab Kapitel 1.2.2 beschrieben.

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

Die chemische Transformation von NEB[®] 5-alpha kompetenten *E. coli* Zellen (High Efficiency, New England BioLabs[®] GmbH) erfolgte nach Herstellerangaben (Protokoll⁵ online verfügbar). Als Vektor dienten artifiziell

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

synthetisierte Plasmide (Invitrogen), die eine Antibiotikaselektivkassette, die virale RNA-Sequenz als DNA-Gegenstück, sowie eine Promotorsequenz der T7 DN-abhängigen RNA-Polymerase beinhalten (Plasmidkarten siehe Abbildung ?? - ?? im Anhang). Die entsprechenden GeneBank Referenznummern der Virus-RNA-Sequenzen wurden bereits beschrieben (Kapitel 1.1.1). Für die Transformation wurden jeweils 200 ng der Plasmide eingesetzt. Jeweils 25 µl des Transformationsansatzes wurde auf ein Selektivmedium mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml, Roche diagnostics) versetzte Lennox-LB-Platten (Carl Roth, Fertigmischung; 1,5 % Agar, AppliChem) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurde eine modifizierte Form der PCR, die Kolonie-PCR, durchgeführt. Hierbei dienen die transformierten Bakterien als Ausgangsmaterial. Mittels spezifischen PCR-Primern (siehe Tabelle 4), die das Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren können, wird geprüft, ob die Transformation inklusive des gewünschten Inserts erfolgreich war (Bergkessel and Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs® GmbH) eingesetzt. Eine Kolonie der transformierten *E. coli* wurde in 20 µl PCR-reinem Wasser (Nuklease- und Nukleinsäure-frei, DEPC behandelt, Carl Roth, H₂O_{DEPC}) resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Mix gemischt und eine PCR im Light Cycler 480 II (Roche diagnostics) 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 Transformante zu erhalten.

Tabelle 2: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen Anzahl
Zellaufschluss		
95 °C	60 s	1 x
Amplifikation		
95 °C	10 s	45 x*
60 °C	30 s	
Kühlung		
40 °C	30 s	1 x

* Messung der Fluoreszenz

1.2.2 Extraktion der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen

Die transformierten Bakterien wurden submers bei 37 °C und 200 RPM über Nacht in 25 ml Lennox LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Protokoll⁶ 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 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 H₂O_{DEPC} durchgeführt. Eine anschließende Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

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

1.2.3 Sequenzierung der extrahierten Plasmide

Zur Prüfung der Vollständigkeit der inserierten DNA-Zielsequenz, 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 Didesoxynukleotiden amplifiziert. (Mülhardt 2009). Als Primer für die extrahierte Plasmid-DNA (1.2.2) wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab.

1.2.4 Restriktionsverdau zur linearisierung des Plasmids

In Vorbereitung für eine *in vitro* Transkription zum Erstellen viraler RNA-Standards wurde die extrahierte Plasmid-DNA (1.2.2) linearisiert. Dafür wurden Restriktions-Endonukleasen benutzt, welche innerhalb der spezifischen Erkennungssequenzen den DNA-Doppelstrang schneiden (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (Abbildung ??, 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), der 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 mit einer Enzymkonzentration von 1,5 U/µl in 40 µl einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3 µg Plasmid-DNA 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, welche der Auftrennung von DNA-Fragmenten dient. 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. Plasmide laufen je nach Konformation bei gleichen Sequenzlängen unterschiedlich schnell. So zeigen ungeschnittene Plasmide eine stark verdrillte (*“supercoil”*) Form, welche eine schwächere sterische Beeinträchtigung der Gittermatrix erfährt als die linearisierte Plasmid-DNA. Des Weiteren wandern durch einen einzelstrangbruch entdrillten zirkuläre Plasmide (*“nicked circular”*) langsamer durch die Gittermatrix. Somit lassen sie die unterschiedlichen Plasmidformen (linear, *supercoil*, *nicked circular*) im Gel unterscheiden (Ali 2012; Schmidt et al. 1999). Zur visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert (Mülhardt 2009). 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 Enzymbestandteilen des inaktivierten Restriktionsansatzes, wurde das DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. (Protokoll⁷ online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,5; bereitgestellt im 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

Da RNA das genomische Material der Influenza Viren ist, wurden die DNA-Fragmente in RNA transkribiert. Für diesen Zweck wurde die T7 Promotor-Region vor der viralen Sequenz verwendet (Plasmidkarten ?? - ?? im Anhang).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll⁸ 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, da diese bei späteren Amplifikationen ebenfalls als Ausgangsmaterial verwendet werden würde und so die Messergebnisse verfälscht. Dazu wurde der Mix mit 70 µl H₂O_{DEPC} verdünnt und 10 µl 10X DNase-Puffer (New England Biolabs) dazugegeben. Die 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) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll⁹ 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 Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip basiert auf der Bindung eines gleichnamigen Fluoreszenzfarbstoffes an eine 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 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 ebenfalls mit 1X TE-Puffer auf eine innerhalb der Kalibriergerade liegende Konzentration verdünnt. Jede Messlösung der Kalibriergerade sowie zu bestimmende RNA-Lösung wurde 1:1 mit einer Farblösung (RiboGreen 1:200 in 1X TE-Puffer) gemischt. Diese wurde homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend nochmal gemischt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 Fluoreszenzspektrometer bei 525 nm.

⁷https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf

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

⁹https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf

1.3 Erstellung von RNA-Kontrollproben mit humanem Nukleinsäure-Hintergrund

Zur Überprüfung, ob die Detektion von RNA mittels RT-RPA von einem humanen Probenhintergrund beeinflusst wird, wurden Referenzproben erstellt. Dazu wurden von gesunden Mitarbeitern nasopharyngeale Abstriche mithilfe der Mini UTM Kit 1 ml Swabs (360c, Copan) entnommen und die humane Gesamtnukleinsäure mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online¹⁰ Verfügbar). Die Elution erfolgte in 60 µl AVE-Puffer (Bereitgestellt vom Kit). In die erhaltenen RNA-Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis die entsprechende virale Standard-RNA zugegeben und die Kontrollprobe homogenisiert.

1.4 Nukleinsäure Amplifikation

In diesem Kapitel werden die durchgeführten NAATs beschrieben. Darunter fallen die RT-qPCR, die RT-RPA sowie die verschiedenen Optimierungen der isothermen Amplifikations- bzw. Detektionssysteme des Influenza A und B Virus.

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

Die Amplifikation viraler Standard RNA mit der RT-qPCR Methode wurde mit dem Luna[®] Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 3) mit 1 µl des jeweiligen Virus-RNA-Standards 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) angegebenen Primer und Sonden verwendet. Die verwendeten Primer und Sonden sind durch das Nationale Center für Immunisierung und Respiratorische Krankheiten (NCIRD) beschrieben (NCIRD 2021). Dabei sind jeweils die Oligonukleotid-Sequenz und die verwendeten Fluorophore und Quencher (siehe 1.1.1) dargestellt. Der finale 20 µl Reaktionsmix wurde nach dem in Tabelle 6 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler[®] 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 [®] Universal Probe One-Step Reaction Mix	1X	
20X Luna [®] WarmStart [®] RT Enzyme Mix	1X	
40X PSM	1X	
Virus RNA*		1 µl
H ₂ O _{DEPC}		x µl \sum 20 µl

* bei Wasserkontrollen wurde die Virus RNA mit H₂O_{DEPC} substituiert

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

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	CAAGACCAATYCTGTACCTYTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA Rev1	GCATTYTTGGACAAVCGTCTACG*	16 µM	261 bp	/
InfA Rev2	GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG	16 µM	261 bp	/
InfA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	8 µM	214 bp	Fluorophor: HEX; Quencher: BMN-Q535**

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

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

Name	Sequenz (5'->3')	Konzentration	3'-Position	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG*	16 µM	716 bp	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 µM	818 bp	/
InfB-P	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 µM	761 bp	Fluorophor: Cy5, 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
Reverse Transkription		
55 °C	10 min	1x
95 °C	60 s	
Amplifikation		
95 °C	10 s	45x*
60 °C	30 s	
Kühlung		
40 °C	30 s	1x

* Messung der Fluoreszenz

1.4.2 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im 50 µl Ansatz

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RPA wurde das TwistAmp[®] exo Kit (TwistDXTM) verwendet. Die für die RPA verwendeten Oligonukleotide sind für Influenza B in Tabelle ?? und für Influenza A in Tabelle ?? angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 7) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzymellet zur Resuspension übertragen. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion (46,5 µl) wurde in eine Kavität eines 8-ter Streifens (Carl Roth) übertragen und kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H₂O (Wasserkontrolle ohne Ziel-RNA) zum Reaktionsmix gegeben, sowie 2,5 µl 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 *Sau* DNA-Polymerase bereitzustellen (Kück 2005). Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Für das Fluorophor Carboxyfluorescein (FAM) erfolgte die Anregung bei 470 nm und die

Messung der Fluoreszenz bei 520 nm. Die Anregung des Fluorophors ATTO565 erfolgte bei 560 nm und die Messung der Fluoreszenz wurde bei 625 nm detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 (Qiagen) eingestellt. Je nach Versuch (Kapitel ?? - ??) wurde die Messung für einen zusätzlichen Misch-Schritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie bereits Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Hersteller
Forward Primer	0,45 μM		biomers.net GmbH
Reverse Primer	0,45 μM		biomers.net GmbH
Sonde	0,13 μM		biomers.net GmbH
RevertAid Reverse Transkriptase	10,75 U/ μl		Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor, Murine	1,08 U/ μl		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 μl	TwistDX
H ₂ O _{DEPC}		x μl \sum 46,5 μl	

* bei Wasserkontrollen wurde die Virus RNA mit H₂O_{DEPC} substituiert

1.4.3 Reverse Transkription Rekombinase Polymerase Amplifikation im low-volume Ansatz

Wie bereits in Behrmann et al. (2020) und Lillis et al. (2016) beschrieben, kann das Reaktionsvolumen der RPA deutlich verringert werden. Die Vorteile sind hier nicht nur eine Kosteneinsparung der weniger Materialverbrauch, sondern auch die Möglichkeit, den Mischschritt während der Reaktion zu vernachlässigen (Lillis et al. 2016). Des Weiteren wird durch das geringere Volumen die RPA für mikrofluidische Anwendungen zugänglich (Behrmann et al. 2020). Für den low-Volume Ansatz wurde die standard RPA-Reaktion mit 50 μl Gesamtvolumen ein neues Reaktionsvolumen von 6,5 μl reduziert. Für 8 Reaktionen wurde dabei insgesamt 40,8 μl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) hergestellt und auf das lyophilisierte RPA-Enzymellet zur Resuspension 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 Streifen aufgeteilt (4,8 μl pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Jeweils pro Kavität wurde 1 μl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 μl PCR reines H₂O (Wasserkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauffolgend wurden 15 μl Mineralöl (Carl Roth) in den Gefäß-Deckel pipettiert, zur Verhinderung einer möglichen Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung. Als Letztes wurden je 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 in den Reaktionsmix einzubringen und ihn mit Mineralöl zu überschichten. Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Für das FAM-Fluorophor erfolgte die Anregung bei 470 nm und die Messung der Fluoreszenz bei 520 nm. Die Anregung des Fluorophors ATTO565 erfolgte bei 560 nm und die Messung der Fluoreszenz wurde bei 625 nm detektiert. Dabei wurden die Parameter des Geräts mit dem vom Hersteller vorgegebenem Programm TS2 Studio v1.17.1.1 (Qiagen) eingestellt. Je nach Versuch (Kapitel ?? - ??) wurde die Messung für einen zusätzlichen Misch-Schritt unterbrochen. Die Auswertung der Daten erfolgte, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben.

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

Bestandteil	Konzentration	Volumen	Hersteller
50X PSM	1,35X		/
RNase Inhibitor, Murine	1,37 U/ μ l		Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	13,73 U/ μ l		New England Biolabs
Rehydrations Puffer		29,5 μ l	TwistDX
H ₂ O _{DEPC}		x μ l \sum 40,8 μ l	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 9: Zusammensetzung des Primer-Sonden-Mixes für den low-Volume Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 μ M	Biomers
Rückwärtsprimer	21 μ M	Biomers
Sonde	6 μ M	Biomers

1.4.4 Primer- und Sondenauswahl für die RT-RPA

Für die Entwicklung der RT-RPA wurden die in Kapitel 1.1.1 designten Sonden mit ihren jeweiligen forward und reverse Primern auf eine positive Amplifikation getestet. Dabei wurden Anstiegszeit, maximale Fluoreszenzauslenkung und Ausprägung des Anstiegs als Kriterien für die Auswahl festgelegt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Wasserkontrollen keine Amplifikation aufweisen. Die RT-RPA für die Primer- und Sondenauswahl erfolgte im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 40 °C. Als Template-RNA wurden bei Influenza B 10⁶ Kopien/ μ l des RNA-Standards eingesetzt. Bei Influenza A wurden 10⁷ Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp) des RNA-Standards verwendet.

1.4.5 Adaption des Reaktionsvolumens der RT-RPA

Die Reduzierung des Reaktionsvolumens der RPA bringt einige Vorteile mit sich (Kapitel 1.4.3). Um eine Adaption des Low-Volume Ansatzes der ausgewählten Primer-Sonden-Kombination für Einsatz im Koffelabor zu erreichen, wurden ein Vergleich der beiden Reaktionsvolumina (50 μ l Ansatz (Kapitel 1.4.2) und low-Volume Ansatz (Kapitel 1.4.3)) durchgeführt. Die Influenza B RT-RPA wurde bei 40 °C, ohne zusätzlichen Mischschritt und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10⁶ Molekülen/ μ l gemessen. Die Influenza A RT-RPA wurde bei 42 °C, ohne zusätzlichen Mischschritt und einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10⁸ Kopien/ μ l (H1N1-Subtyp) durchgeführt.

1.4.6 Optimierung der Reaktionstemperatur für die RT-RPA

Die klassische RPA ist in für einen Temperaturbereich von 37 °C - 42 °C ausgelegt (TwistDx 2018), wobei verschiedene RPA-Systeme unterschiedliche Temperaturoptima aufweisen (Li, Macdonald, and Stetten 2019). Dementprechend wurden die Temperaturoptima der ausgewählten Primer-Sonden-Kombination untersucht. Die Optimierung erfolgte im Temperaturintervall zwischen 38 - 42 °C. Es wurden je die Temperaturen 38 °C, 40 °C, 42 °C für die RT-RPA getestet. Für Influenza B erfolgte die Temperaturoptimierung im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3), mit einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10⁶ Kopien/ μ l. Das Temperaturoptimum bei Influenza A wurde im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei einer RNA-Konzentration von 10⁷ Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp) bestimmt.

1.4.7 Testung asymmetrische Primerkonzentrationen zur Optimierung der RT-RPA

Die Primerasymmetrie, 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 sense- oder antisense-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, um das Fluoreszenzsignal zu erhöhen (Chen, Ruff, and Halsey 2010; Poddar 2000).

Einführung einer Primerasymmetrie

Zur möglichen Erhöhung des Fluoreszenzsignals und die damit verbundene Erhöhung Sensitivität wurde untersucht, ob die Primerasymmetrie auf die RT-RPA anwendbar ist. Dazu wurden

1.4.8 Optimierung des Mischzeitpunktes der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Einführung und Optimierung eines zusätzlichen Mischzeitpunktes während der Reaktion ist notwendig, um entstehende lokale Reagenzienknappheit durch eine erneute Homogenisierung der Reaktionslösung auszugleichen (Kapitel ??). Der zusätzliche Mischschritt ist vorallem bei niedrigen RNA-Konzentration ausschlaggebend, da hier die lokale Reagenzienknappheit den größten Einfluss hat. Die Untersuchung verschiedener Mischzeitpunkte in der RT-RPA erfolgte bei Influenza B im 8-tel Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3) bei 40 °C. Der Zeitpunkt des Mischens nach 5 min, 4 min bzw. 3 min nach Messbeginn wurde bei einer RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l getestet. Zusätzlich wurde der Mischzeitpunkt von 5 Minuten bei geringeren RNA-Konzentrationen von 10^2 und 10^1 RNA-Kopien/ μ l und einer zusätzlich 1.5X erhöhten reversen Primer-Konzentration untersucht. Als Referenz wurde bei jeder Messung eine Reaktion ohne zusätzlichen Mischschritt mitgeführt.

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

1.4.9 Optimierung der Primerassymetrie der Rekombinase Polymerase Amplifikation

Für die Optimierung der Primerasymmetrie 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 μ l Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 42 °C mit einer RNA-Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l (H1N1 Subtyp). Es wurde für die jeweiligen Messungen die Reverseprimer-Konzentration im hergestellten Reaktionsmix von 0,45 μ M auf 0,675 μ M und 0,9 μ M 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/ μ l. Hierbei wurden die Reverseprimer-Konzentrationen im Primer-Sonden-Mix von 21 μ M auf 31,5 μ M und 42 μ M angepasst.

1.4.10 Einfluss der Primerasymmetrie auf die Rekombinase Polymerase Amplifikation

Die Primerasymmetrie, 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 sense- oder antisense-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/ μ 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/ μ l. Die Erhöhung der Primer-Konzentrationen für Forward oder Reverse Primer erfolgte im Primer-Sonden-Mix.

1.4.11 Ermittlung der analytischen Sensitivität von RT-PCR und RT-RPA

Die analytischen Sensitivität gibt Auskunft über die geringste detektierbare Molekülanzahl und gibt Zusammen mit der Spezifität die Grenzen des entwickelten Systems an (Saah 1997). Des Weiteren erlaubt sie einen Vergleich mit anderen Detektionssystemen um so gezielte Aussagen treffen zu können. Es wurden die analytischen Sensitivitäten der entwickelten RT-RPAs sowie der RT-PCRs für die Influenza A und B Viren, jeweils unter optimalen Reaktionsparametern ermittelt und verglichen. Die Ermittlung der analytischen Sensitivität erfolgte in dekadischen Verdünnungsstufen von $2 \cdot 10^7$ RNA-Kopien/ μ l bis $2 \cdot 10^0$ RNA-Kopien/ μ 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 μ 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 μ 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. Zusätzlich wurde die Sensitivität der RT-RPA Systeme mit Kontrollproben (Kapitel 1.3) ermittelt um eine eventuelle Veränderung der Sensitivität in einem humanen Probenhintergrund zu untersuchen. Dafür wurden die Konzentrationen von $2 \cdot 10^5$ RNA-Kopien/ μ l bis $2 \cdot 10^0$ RNA-Kopien/ μ L in dekadischen Verdünnungsstufen mit den gleichen Reaktionsparametern durchgeführt. 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.

1.4.12 Untersuchung des Einflusses der Sondenmodifikation auf die RT-RPA

Die verwendeten Sonden lassen sich als *iQ*-Sonden oder *dT-quenched*-Sonden modifizieren (Kapitel 1.1.2). Damit untersucht werden kann, ob die unterschiedlichen Sondenmodifikationen einen Einfluss auf die RT-RPA ausüben wurde die Amplifikation beider Sonden innerhalb der Influenza A RT-RPA untersucht. Die RT-RPA erfolgte bei 42 °C mit einer 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min bei einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l (H1N1-Subtyp). Zusätzlich wurde die Sensitivität nach Kapitel 1.4.11 mit der *dT-quenched* für diese Influenza Subtypen (H1N1, H3N2) ermittelt.

1.4.13 Ermittlung der Spezifität der RT-RPA

Die Spezifität ist ein wichtiger Faktor in der Diagnostik, da eine geringe Spezifität zu falsch positiven Ergebnissen führt und so falsche Behandlungsansätze gewählt werden (Saah 1997). Zur Überprüfung der Spezifität wurde folgendes Virus-Material mittels RT-RPA in einer Doppelbestimmung auf eine Amplifikation getestet: Influenza B Virus (Yamagata-, Victoria-Linie), Rhinovirus B, Rhinovirus C, Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus Typ A, Humanes Metapneumovirus Typ A1 und Adenovirus Typ 34. Bei jeder durchgeführten Messung wurde eine Wasserkontrolle und eine Positivkontrolle (1 μ l 10^7 RNA-Kopien/ μ l) mitgeführt. Die jeweiligen Viren wurden aus Zellkultur-Überständen mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert (Protokoll online¹¹ Verfügbar). Die Elution erfolgte in 60 μ l AVE-Puffer (Bereitgestellt vom Kit). Von den erhaltenen Extrakten wurde je 1 μ l in die entsprechende RT-RPA eingesetzt. Die Spezifitätstestung für die Influenza B RT-RPA erfolgte im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) Stel-Ansatz (siehe Kapitel 1.4.3) bei 40 °C, einer 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und mit einem zusätzlichen Mischschritt nach 5 min. Die Testung der Spezifität für die Influenza A RT-RPA erfolgte im 50 μ l Ansatz (siehe Kapitel 1.4.2) bei 42 °C, einer 1,5-fach erhöhten Reverse Primer-Konzentration und einem zusätzlichen Mischschritt nach 2 min.

¹¹<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

- Ali, Syed Shahid. 2012. *Bacterial Strain Improvement by Mutagenesis*. Lambert Academic publishers. <https://doi.org/10.13140/2.1.1194.6240>.
- 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.
- Biomers. 2023a. "PCR-Blocker." *Biomers.net the Biopolymer Factory*. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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>.
- Li, Jia, Joanne Macdonald, and Felix von Stetten. 2019. "Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification." *The Analyst* 144 (1): 31–67. <https://doi.org/10.1039/c8an01621f>.
- 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, Cornelia. 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>.
- Poddar, SK. 2000. “Symmetric Vs Asymmetric PCR and Molecular Beacon Probe in the Detection of a Target Gene of Adenovirus.” *Molecular and Cellular Probes* 14 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0278>.
- Prazeres, Duarte Miguel F, Thomas Schlupe, and Charles Cooney. 1998. “Preparative Purification of Supercoiled Plasmid DNA Using Anion-Exchange Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 806 (1): 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01254-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01254-5).
- QIAGEN. 2021. “QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.” *QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits. For Purification of Ultrapure, Transfection-Grade Plasmid DNA Online Verfügbar Unter: <https://www.qiagen.com/Us/Resources/Download.aspx?id=0bd0c5fb-C271-43e7-Af43-32d539374fa9&lang=en>*.
- 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.
- 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>.
- Saah, Alfred J. 1997. ““Sensitivity” and “Specificity” Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings.” *Annals of Internal Medicine* 126 (1): 91. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-1-199701010-00026>.
- 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 Friehe, Martin Schlee, 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.
- TwistDx. 2018. “TwistAmp Assay Design Manual.” *Online Verfügbar Unter: <https://www.twistdx.co.uk/Support/Manuals-and-Software/Twistamp/Twistamp-Assay-Design-Manual-V2-5/>*.
- 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>.

g/10.1093/biomet/34.1-2.28.