

- Institut für Biochemie und Biologie -

Isothermale Amplifikationsmethoden für den DNA- und Pyrophosphat-abhängigen Pathogennachweis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie
eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Jens Fischbach

Eingereicht am 28.03.2017

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:

Namensnennung 4.0 International

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Tag der Disputation: 21.11.2017

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Prof. Dr. Katja Hanack (Vorsitzende)
2. Prof. Dr. Frank F. Bier (1. Gutachter)
3. Prof. Dr. Marcus Frohme (2. Gutachter)
4. Prof. Dr. Frank T. Hufert (3. Gutachter)
5. Prof. Dr. Katja Arndt
6. Prof. Dr. Michael Lenhard

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-406072

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-406072>

*"Ist man in kleinen Dingen nicht geduldig,
bringt man die großen Vorhaben zum Scheitern."*

Konfuzius
(Chinesischer Philosoph, 551 v. Chr. - 479 v. Chr.)

Danksagung

Diese Arbeit entstand in Kooperation der Technischen Hochschule Wildau und der Universität Potsdam. An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Marcus Frohme (Technische Hochschule Wildau) für die Möglichkeit bedanken, die wissenschaftlichen Grundlagen für diese Arbeit im Labor für „Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik“ erarbeiten zu können sowie für die unterstützende und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank Bier (Universität Potsdam) für sein Interesse, die Unterstützung der Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät sowie die wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit.

Ich danke weiterhin Dr. Jörn Glökler für seinen Rat und seine Geduld in den zahlreichen konstruktiven Gesprächen, die maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für das kollegiale, entspannte und humorvolle Arbeitsklima sowie für die Zusammenarbeit und Unterstützung, auch in den anstrengenden und ergebnislosen Phasen.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, meiner Schwester sowie allen Freunden aus nah und fern für das aufgebrachte Verständnis sowie die Unterstützung in sämtlichen Höhen und Tiefen der Promotionszeit.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Lebensgefährtin für die Mithilfe bei der Korrektur des Schriftstücks sowie dem emotionalen Rückhalt in den letzten Jahren.

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Etablierte Protein- und Nukleinsäure-basierte Methoden für den spezifischen Pathogennachweis sind nur unter standardisierten Laborbedingungen von geschultem Personal durchführbar und daher mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. In der Nukleinsäure-basierten Diagnostik kann durch die Einführung der isothermalen Amplifikation eine schnelle und kostengünstige Alternative zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet werden. Die Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) bietet aufgrund der hohen Amplifikationseffizienz vielfältige Detektionsmöglichkeiten, die sowohl für Schnelltest- als auch für Monitoring-Anwendungen geeignet sind.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Anwendbarkeit der LAMP und die Entwicklung einer neuen Methode für den einfachen, schnellen und günstigen Nachweis von Pathogenen mittels alternativer DNA- oder Pyrophosphat-abhängiger Detektionsverfahren. Hier wurden zunächst direkte und indirekte Detektionsmethoden untersucht und darauf aufbauend ein Verfahren entwickelt, mit dem neue Metallionen-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe für die selektive Detektion von Pyrophosphat in der LAMP und anderen enzymatischen Reaktionen identifiziert werden können. Als Alternative für die DNA-basierte Detektion in der digitalen LAMP sollten die zuvor etablierten Farbstoffe für den Pyrophosphatnachweis in einer Emulsion getestet werden. Abschließend wurde ein neuer Reaktionsmechanismus für die effiziente Generierung hochmolekularer DNA unter isothermalen Bedingungen als Alternative zur LAMP entwickelt.

Ergebnisse: Für den Nachweis RNA- und DNA-basierter Phythopathogene konnte die Echtzeit- und Endpunktdetektion mit verschiedenen Farbstoffen in einem geschlossenen System etabliert werden. Hier wurde Berberin als DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff mit vergleichbarer Sensitivität zu SYBR Green und EvaGreen erfolgreich in der LAMP mit Echtzeitdetektion eingesetzt. Ein Vorteil von Berberin gegenüber den anderen Farbstoffen ist die Toleranz der DNA-Polymerase auch bei hohen Farbstoffkonzentrationen. Berberin kann daher auch in der geschlossenen LAMP-Reaktion ohne zusätzliche Anpassung der Reaktionsbedingungen für die Endpunktdetektion verwendet werden. Darüber hinaus konnte Hydroxynaphtholblau (HNB), das für den kolorimetrischen Endpunktnachweis bekannt ist, erstmals auch für die fluorimetrische Detektion der LAMP in Echtzeit eingesetzt werden. Zusätzlich konnten in der Arbeit weitere Metallionen-abhängige Farbstoffe zur indirekten Detektion der LAMP über das Pyrophosphat identifiziert werden. Dafür wurde eine iterative Methode entwickelt, mit der potenzielle Farbstoffe hinsichtlich ihrer Enzymkompatibilität und ihrer spektralen Eigenschaften bei An- oder Abwesenheit von Manganionen selektiert werden können. Mithilfe eines kombinatorischen Screenings im Mi-

krotiterplattenformat konnte die komplexe Konzentrationsabhängigkeit zwischen den einzelnen Komponenten für einen fluorimetrischen Verdrängungsnachweis untersucht werden. Durch die Visualisierung des Signal-Rausch-Verhältnis' als Intensitätsmatrix (*heatmap*) konnten zunächst Alizarinrot S und Tetrazyklin unter simulierten Reaktionsbedingungen selektiert werden. In der anschließenden enzymatischen LAMP-Reaktion konnte insbesondere Alizarinrot S als günstiger, nicht-toxischer und robuster Fluoreszenzfarbstoff identifiziert werden und zeigte eine Pyrophosphat-abhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die zuvor etablierten Farbstoffe (HNB, Calcein und Alizarinrot S) konnten anschließend erfolgreich für die indirekte, fluorimetrische Detektion von Pyrophosphat in einer LAMP-optimierten Emulsion eingesetzt werden. Die Stabilität und Homogenität der generierten Emulsion wurde durch den Zusatz des Emulgators Poloxamer 188 verbessert. Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Emulsion war eine eindeutige Diskriminierung der positiven und negativen Tröpfchen vor allem bei Einsatz von Calcein und Alizarinrot S möglich. Aufgrund des komplexen Primer-Designs und der hohen Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikation in der LAMP wurde eine neue *Bst* DNA-Polymerase-abhängige isothermale Amplifikationsreaktion entwickelt. Durch die Integration einer spezifischen Linkerstruktur (abasische Stelle oder Hexaethylenglykol) zwischen zwei Primersequenzen konnte ein bifunktionaler Primer die effiziente Regenerierung der Primerbindungsstellen gewährleisten. Der neue Primer induziert nach der spezifischen Hybridisierung auf dem Templat die Rückfaltung zu einer Haarnadelstruktur und blockiert gleichzeitig die Polymeraseaktivität am Gegenstrang, wodurch eine autozyklische Amplifikation trotz konstanter Reaktionstemperatur möglich ist. Die Effizienz der „Hinge-initiated Primer dependent Amplification“ (HIP) konnte abschließend durch die Verkürzung der Distanz zwischen einem modifizierten Hinge-Primer und einem PCR-ähnlichen Primer verbessert werden.

Schlussfolgerung: Die LAMP hat sich aufgrund der hohen Robustheit und Effizienz zu einer leistungsfähigen Alternative für die klassische PCR in der molekularbiologischen Diagnostik entwickelt. Unterschiedliche Detektionsverfahren verbessern die Leistungsfähigkeit der qualitativen und quantitativen LAMP für die Feldanwendungen und für die Diagnostik, da die neuen DNA- und Pyrophosphat-abhängigen Nachweismethoden in einer geschlossenen Reaktion eingesetzt werden können und so eine einfache Pathogendiagnostik ermöglichen. Die gezeigten Methoden können darüber hinaus zu einer Kostensenkung und Zeitersparnis gegenüber den herkömmlichen Methoden beitragen. Ein attraktives Ziel stellt die Weiterentwicklung der HIP für den Pathogennachweis als Alternative zur LAMP dar. Hierbei können die neuen LAMP-Detektionsverfahren ebenfalls Anwendung finden. Die Verwendung von *Bst* DNA-Polymerase-abhängigen Reaktionen ermöglicht darüber hinaus die Integration einer robusten isothermalen Amplifikation in mikrofluidische Systeme. Durch die Kombination der Probenvorbereitung, Amplifikation und Detektion sind zukünftige Anwendungen mit kurzer Analysezeit und geringem apparativen Aufwand insbesondere in der Pathogendiagnostik möglich.

2 Abstract

Background: Established protein- and nucleic acid-based methods for the specific pathogen detection are usually performed under standardized laboratory conditions by trained staff and are associated with long processing time and high costs. In nucleic acid-based pathogen diagnostics, the isothermal amplification can be used as a rapid and cost-effective alternative to the polymerase chain reaction (PCR). Among all isothermal techniques, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) offers a wide range of applications for the rapid endpoint and real-time detection.

A major goal of this work, was to improve the applicability of LAMP and the development of a new method to get a simple, fast and cost-effective diagnostic tool that is based on the detection of DNA and pyrophosphate. For this purpose, direct and indirect detection methods were investigated as well as additional metal ion-dependent fluorescent dyes for the selective detection of pyrophosphate in LAMP or other enzymatic reactions identified. As an alternative to the DNA-based digital LAMP, the previously established dyes were tested for the detection of pyrophosphate in emulsion. Finally, a new reaction mechanism was developed that allows the efficient generation of high molecular weight DNA under isothermal reaction conditions.

Results: The detection of RNA- and DNA-based phytopathogens in closed reactions was established successfully with different dyes for real-time and endpoint detection. Berberine as DNA-intercalating fluorescent dye was used in the real-time detection of LAMP with comparable sensitivity to SYBR Green and EvaGreen for the first time. Additionally, the results revealed adequate tolerance of the *Bst* DNA polymerase to higher concentrations of the dye. Thus, it could be used directly in a closed LAMP reaction without any optimization. Furthermore, the magnesium indicator hydroxynaphthol blue (HNB) was used for fluorometric real-time detection in LAMP for the first time. To extend the number of indirect detection methods for the accumulating pyrophosphate in LAMP and other enzymatic reactions, new metal-ion-dependent dyes were identified. The developed platform could support the iterative process of finding new fluorescent dyes with regard to enzyme compatibility and their spectral properties in the presence or absence of manganese ions. To obtain a selective fluorometric displacement assay, the complex concentration dependence between all components was investigated successfully by the establishment of a combinatorial screening in a microtiter plate. The visualization of the calculated signal-to-noise ratio was then used to identify alizarin red S and tetracycline as promising candidates under simulated reaction conditions. By testing both dyes in the enzymatic assay, alizarin red S was confirmed as low-cost, non-toxic and robust dye for the pyrophosphate

dependent increase of the fluorescence intensity. The previously established dyes (HNB, calcein and alizarin red S) were applied successfully for the indirect and fluorometric detection of pyrophosphate in a LAMP-optimized emulsion. The stability and homogeneity of the generated emulsion was increased by adding the surfactant poloxamer 188. The fluorescence microscopic analysis showed a distinct discrimination between positive and negative droplets, in particular by using calcein, HNB and alizarin red S. Additionally, a new amplification reaction that is also based on the *Bst* DNA polymerase was developed to prevent the complicated primer design and likelihood of unspecific amplification in LAMP. The efficient regeneration of the single stranded priming site was achieved by the integration of a specific linker (abasic site or hexaethylglycol) between two priming sites to create a bifunctional hinge-primer. After the hybridization on the template sequence, the hinge-primer was used to induce the refolding to a hairpin structure and for blocking the polymerase activity on the reverse strand. Thus, an autocyclic amplification can be achieved at isothermal reaction conditions. Finally, the efficiency of the hinge-initiated primer dependent amplification (HIP) was improved by decreasing the distance between the modified hinge-primer and the corresponding PCR-like primer.

Conclusion: Due to its robustness and efficiency, LAMP has been developed to a powerful alternative for the standardized PCR-based diagnostics in molecular biology in the past years. Different detection methods improve the performance of the qualitative and quantitative LAMP in field applications as well as in diagnostics. The new DNA and pyrophosphate based assays can be used in closed reactions and contribute to a simple pathogen detection. Furthermore, the advancements can lead to a considerable reduction of costs and time compared to conventional methods.

An attractive achievement is the further optimization of the HIP as sensitive pathogen assay by using LAMP-based detection methods. The use of *Bst* DNA polymerase-dependent reactions will allow a robust integration of the isothermal amplification in microfluidic systems. By combining sample preparation, amplification and detection in one device, powerful applications with short analysis time and low instrumental requirements are a future perspective in pathogen diagnostics.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

1	Zusammenfassung	i
2	Abstract	iii
3	Abkürzungsverzeichnis	vii
4	Vorwort	1
5	Stand der Wissenschaft	2
5.1	Serologischer und molekularbiologischer Pathogennachweis	2
5.1.1	Modellpathogene	2
5.1.2	Serologische Nachweismethoden	4
5.1.3	Molekularbiologische Nachweismethoden	5
5.2	Nachweis durch Isothermale Amplifikation	6
5.2.1	Nukleinsäure-basierte Detektion als Schnelltest	6
5.2.2	Isothermale Amplifikationsreaktionen	7
5.2.3	Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	9
5.3	Absolute Quantifizierung der Amplifikationsreaktion	17
6	Zielstellung	19
7	Material und Methoden	21
7.1	Materialien	21
7.1.1	Pathogene	21
7.1.2	Chemikalien	21
7.1.3	Primer	22
7.1.4	Geräte	25
7.1.5	Software	25
7.2	Methoden	26
7.2.1	Nukleinsäureextraktion und Quantifizierung	26
7.2.2	Reverse Transkription der PSTVd-RNA	27
7.2.3	PCR- und LAMP-Reaktion	27
7.2.4	Nachweis der PCR- und LAMP-Reaktion	28
7.2.5	Weiterentwicklung der quantitativen und qualitativen LAMP-Detektion	29
7.2.6	Identifizierung neuer Farbstoffe für die Pyrophosphatdetektion	31
7.2.7	Detektion von Pyrophosphat in einer Emulsion	34
7.2.8	Etablierung der Hinge-Initiated Primer Based Amplification	36

8	Ergebnisse	38
8.1	Weiterentwicklung der quantitativen und qualitativen LAMP-Detektion . . .	38
8.1.1	Echtzeit- und Endpunktnachweis des PSTVd	38
8.1.2	Echtzeit- und Endpunktnachweis bakterieller Pathogene	41
8.1.3	Vergleich indirekter und direkter Detektionsmethoden	45
8.2	Identifizierung neuer Farbstoffe für die Pyrophosphatdetektion	47
8.2.1	Einfluss von Magnesium und Mangan auf die Fluoreszenzfarbstoffe . .	47
8.2.2	Selektive Detektion von Pyrophosphat	48
8.2.3	Einfluss von Magnesium und Mangan auf die Fluoreszenz ausgewählter Farbstoffe	49
8.2.4	Einfluss der Metallionen und Farbstoffe auf die DNA-Polymerase . . .	51
8.2.5	Screening-Methode für die Optimierung des Signal-Rausch Verhältnis’	52
8.3	Detektion von Pyrophosphat in einer Emulsion	57
8.3.1	Optimierung der Phasenzusammensetzung für Emulsion	57
8.3.2	DNA-basierte Detektion in Emulsion	60
8.3.3	Pyrophosphat-abhängige Detektion in Emulsion	60
8.4	Etablierung der Hinge-initiated Primer Based Amplification (HIP)	62
8.4.1	Charakterisierung des Reaktionsmechanismus	63
8.4.2	Einfluss der Linker-Struktur auf die Kinetik	66
8.4.3	Einfluss der Magnesium- und Primerkonzentration auf die Kinetik . .	68
8.4.4	Einfluss der Amplifikationsregion auf die Kinetik	69
8.4.5	Bestimmung der Sensitivität	70
9	Diskussion	71
9.1	Echtzeit- und Endpunktdetektion in einer geschlossenen Reaktion für den Pathogennachweis	71
9.2	Pyrophosphat-abhängiger Nachweis der LAMP durch neue Fluoreszenzfarbstoffe	80
9.3	Pyrophosphat-abhängige Detektion der LAMP in einer Emulsion	86
9.4	Einsatz von bifunktionellen Primern in der isothermalen Amplifikation . . .	90
10	Schlussfolgerung und Ausblick	98
	Literaturverzeichnis	101
	Veröffentlichungen	115
	Selbstständigkeitserklärung	116
	Abbildungsverzeichnis	117
	Tabellenverzeichnis	118
	Anhang	119

3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
Anr.	Anregungswellenlänge der Fluoreszenz	dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
AP	abasische DNA-Stelle (<i>apurinic or apyridimic site</i>)	DOX	Doxyzyklin
ARS	Alizarinrot S	dPCR	digitale PCR
ATP	Adenosintriphosphat	ddPCR	<i>Digital Droplet PCR</i>
B3	äußerer Rückwärtsprimer (<i>backward outer primer</i>)	dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
BIP	innerer Rückwärtsprimer (<i>backward inner primer</i>)	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	ELISA	Enzymatisches Immunoabsorptionsverfahren (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
bp	Basenpaar (<i>basepair</i>)	Em.	Emissionswellenlänge der Fluoreszenz
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	EPPO	Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (<i>European And Mediterranean Plant Protection Organization</i>)
Bsm	DNA-Polymerase von <i>Bacillus smithii</i>	F3	äußerer Vorwärtsprimer (<i>forward outer primer</i>)
Bst	DNA-Polymerase von <i>Bacillus stearothermophilus</i>	FAM	5-Carboxyfluorescein
C	Cytosin	FIP	innerer Vorwärtsprimer (<i>forward inner primer</i>)
CAB	Calceinblau	FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
CAL	Calcein	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosinmonophosphate</i>)	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)	G	Guanin
CFU	koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)	GEAR	Genome Exponential Amplification Reaction (<i>helicase-dependent amplification</i>)
CHEQ	verstärkte Fluoreszenzunterdrückung durch Chelatierung (<i>chelation enhanced fluorescence quenching</i>)	HDA	(<i>helicase-dependent amplification</i>)
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration, (<i>critical micelle concentration</i>)	HEG	Hexaethylenglykol
Cms	<i>Clavibacter michiganensis</i> subspecies <i>sepedonicus</i>	HIP	Scharnier-initiierte Primer-abhängige Amplifikation (<i>hinge-initiated primer dependent amplification</i>)
CPA	Cross Priming Amplification	HLB	hydrophiler und lipophiler Anteil (<i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
Ct	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i>)	HNB	Hydroxynaphtholblau

HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie <i>(high-performance liquid chromatography)</i>	R-PAGE	Return-Polyacrylamid Gelelektrophorese <i>(return polyacrylamid gel electrophoresis)</i>
HPSF	hohe Reinheit und salzfrei <i>(high purity salt free)</i>	RCA	<i>(rolling circle amplification)</i>
IF	Immunofluoreszenz	RFU	relative Fluoreszenzeinheit <i>(relative fluorescence unit)</i>
IGS	Trenn-DNA-Sequenzen <i>(intergenic spacer)</i>	RNA	Ribonukleinsäure <i>(ribonucleic acid)</i>
ISFET	ionensensitiver Feldeffekttransistor	ROX	6-Carboxy-X-rhodamine
LAMP	<i>(loop-mediated isothermal amplification)</i>	RPA	<i>(recombinase polymerase amplification)</i>
Lf	Vorwärts-Schleifenprimer <i>(forward loop primer)</i>	RQN	<i>RNA quality number</i>
LFD	lateraler Flusstest <i>(lateral flow device)</i>	RT	reverse Transkription
LFIA	<i>(lateral flow immunochromatographic assay)</i>	SD	<i>strand displacement DNA polymerase</i>
Lr	Rückwärts-Schleifenprimer <i>(loop reverse primer)</i>	SDA	<i>(strand displacement amplification)</i>
NALF	Nukleinsäure-basierter lateraler Flusstest <i>(nucleic acid lateral flow)</i>	SMAP	Smart Amplification Process
NASBA	<i>(nucleic acid sequence-based amplification)</i>	SNR	Signal-Rausch-Verhältnis <i>(signal-to-noise ratio)</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	ssDNA	einzelsträngige DNA <i>(single stranded DNA)</i>
OD	optische Dichte	ssp.	Subspezies
PCR	Polymerase-Kettenreaktion <i>(polymerase chain reaction)</i>	SYTO	Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen
PEG	Polyethylenglykol	T	Thymin
PEI	Polyethylenimin	TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- Acetat-EDTA-Puffer
PEO	Polyethylenoxid	TET	Tetrazyklin
POCT	patientennahe Labordiagnostik <i>(point-of-care testing)</i>	Tp	Beginn der exponentiellen Amplifikation <i>(time-to-positivity)</i>
PPi	Pyrophosphat	Tt	Schwellenwertzeit <i>(threshold time)</i>
PPO	Polypropylenoxid	UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
PSTVd	<i>Potato Spindle Tuber Viroid</i>	um	unmodifiziert
qPCR	quantitative PCR	UV	ultraviolettes Licht
pv.	Pathovar	Xhp	<i>Xanthomonas hortorum</i> pathovar <i>pelargonii</i>

4 Vorwort

In der Medizin, Umweltanalytik, Nahrungsmittelindustrie sowie der Landwirtschaft ist ein qualitativer und quantitativer Pathogennachweis für eine präzise Diagnose und Behandlung von Infektionskrankheiten zwingend erforderlich. Die verfügbaren Methoden zum Nachweis unterscheiden sich hinsichtlich des Kosten- und Zeitaufwands deutlich (Lazcka et al., 2007; Vincelli und Tisserat, 2008).

Die klassischen mikroskopischen und serologischen Methoden, darunter das bekannte Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), setzen einen hohen Arbeitsaufwand voraus und sind damit zeitintensiv (Engvall und Perlmann, 1971). Die Ergänzung durch die molekularbiologischen Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), konnte die Geschwindigkeit verbessern, aber die Kosten aufgrund des apparativen Aufwands nicht reduzieren (Mullis und Faloona, 1987). Neue diagnostische Verfahren für den Pathogennachweis müssen kostengünstig, schnell und ohne komplexe Technologie auch außerhalb des Labors durchführbar sein.

Für die molekularbiologischen Methoden konnte mit der isothermalen Amplifikation eine Alternative etabliert werden, die die zuvor genannten Kriterien erfüllen kann. Im Gegensatz zur PCR werden isothermale Reaktionen bei konstanter Reaktionstemperatur durchgeführt. Dadurch konnten seit 1991 gezielt schnellere und kostengünstige Verfahren für die Diagnostik entwickelt werden. Da die alternierende Temperaturregulierung entbehrlich wurde, reicht eine einfache Inkubation der Reaktionslösung aus.

Zu den bekanntesten isothermalen Methoden zählen die „Nucleic Acid Sequence Based Amplification“ (NASBA) (Compton, 1991), die „Strand Displacement Amplification“ (SDA) (Walker et al., 1992), die „Rolling Circle Amplification“ (RCA) (Lizardi et al., 1998), die „Loop-mediated Isothermal Amplification“ (LAMP) (Notomi et al., 2000) und die „Recombinase Polymerase Amplification“ (RPA) (Piepenburg et al., 2006). Sie unterscheiden sich hinsichtlich der notwendigen Enzyme und Primer sowie der daraus resultierenden Komplexität. In der Literatur ist die LAMP die am häufigsten publizierte isothermale Methode in der Pathogendiagnostik. Die Reaktion ist einfach durchzuführen, robust, effizient und bietet darüber hinaus eine Vielzahl unterschiedlicher Detektionsverfahren, mit denen qualitative Schnelltests und quantitative Monitoring-Anwendungen möglich sind. Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von Verfahren für die DNA- und Pyrophosphat-basierte Detektion am Beispiel der LAMP zum Nachweis von Phytopathogenen. Die hier vorgestellten Verfahren können zukünftig dazu beitragen, kostengünstige und weniger komplexe Applikationen für die schnelle Pathogendiagnostik zu etablieren.

5 Stand der Wissenschaft

5.1 Serologischer und molekularbiologischer Pathogennachweis

Um die Behandlung einer Infektion zu unterstützen und deren Ausbreitung zu verhindern, sind schnelle, kostengünstige und spezifische Nachweise erforderlich. Nicht nur im Bereich der Humanmedizin oder der Ernährungswissenschaft, sondern auch in der Agrarwirtschaft ist das Risiko einer epidemischen Ausbreitung von Pathogenen und der daraus resultierende wirtschaftliche Schaden hoch. Im Jahr 2012 wurden bspw. in der globalen Landwirtschaft 16% des Ernteverlustes auf Phytopathogen-induzierte Krankheiten zurückgeführt (Savary et al., 2012; Grube et al., 2015). Andere Ursachen für den Verlust sind Fraßschäden durch Tiere, Unkräuter, chemische Exposition und klimatische Schwankungen. Folglich sind präventive Maßnahmen für die Verbesserung des Pflanzenschutzes durch effektive Nachweisverfahren und strikte Kontrollen bei der Ein- und Ausfuhr erforderlich.

5.1.1 Modellpathogene

In dieser Arbeit werden das *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd), *Clavibacter michiganensis* subspezies *sepedonicus* (Cms) und *Xanthomonas hortorum* pathovar *pelargonii* (Xhp) als Modelle genutzt. Sie werden nachfolgend kurz charakterisiert und die gesetzlich vorgeschriebenen Nachweismethoden dargestellt.

Potato Spindle Tuber Viroid

Das PSTVd gehört zur Familie der *Pospiviroidae*. Es ist eine nicht selbst-replizierende und geschlossene RNA-Sequenz (360 bp) mit starker Sekundärstrukturausbildung ohne Proteinhülle. Es infiziert unter anderem die Kartoffel- und Tomatenpflanze sowie andere Vertreter der Nachtschattengewächse (*Solanacea*) (Ding, 2010). Auffällige Symptome sind ein reduziertes Wachstum der Früchte und die Verkümmern der gesamten Pflanze, wobei die Infektion innerhalb der Pflanze systemisch erfolgt. Durch die vegetative Vermehrung ist die Gefahr der Infektion und Ausbreitung von PSTVd besonders groß, so dass es durch die EPPO (Liste A2, Nr. 97¹) als Quarantäneschaderreger gelistet ist und damit der Meldepflicht und strikten Kontrollen unterliegt (Zhu et al., 2001). Zertifizierte Nachweismethoden sind Digoxigenin-markierte RNA-Sonden (Podleckis et al., 1993; Monger und Jeffries, 2015), Return-Polyacrylamid Gelelektrophorese (R-PAGE) (Herold et al., 1992), Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) (Shamloul et al., 1997; Weidemann und Buchta,

¹EPPO: PM9/13, 2011 Bulletin 41

1998; Shamloul und Hadidi, 1999) und die quantitative PCR (qPCR) (Mumford et al., 2000; Boonham et al., 2004). Darüber hinaus gibt es inzwischen LAMP-basierte Nachweise für PSTVd (Tsutsumi et al., 2010; Lenarčič et al., 2013).

Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus

Das bakterielle Phytopathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) infiziert die Kartoffelpflanze und ist ebenfalls als Quarantäneschaderreger in der EPPO gelistet (Liste A2 Nr. 51²). Cms ist Gram-positiv und verursacht bei der Kartoffel die bakterielle Ringfäule (De Boer und Slack, 1984). Die Infektion kann zum Welken der Pflanze, dem Abbau des vaskulären Gewebes und dem Faulen der Knollen führen (Safenkova et al., 2014). Die Verbreitung des bakteriellen Erregers kann über die Stecklinge, latent infizierte Knollen oder verseuchte Ausrüstung sowie Lagerräumlichkeiten erfolgen (Bentley et al., 2008; Steinmüller et al., 2013; Yasuhara-Bell und Alvarez, 2015). Zertifizierte Nachweismethoden sind die Immunofluoreszenz-Antikörperfärbung (IF) (De Boer und McNaughton, 1986; Baer und Gudmestad, 1993), ELISA (De Boer et al., 1992; Slack et al., 1996; Safenkova et al., 2014), Fluoreszenz *In situ* Hybridisierung (FISH) (Li et al., 1997) und die PCR (Xiang et al., 1995; Mills et al., 1997; Schaad et al., 1999; Pastrik, 2000; Baer et al., 2001; Smith et al., 2008; Gudmestad et al., 2009; Massart et al., 2014; Cho et al., 2015).

Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii

Xanthomonas hortorum pv. *pelargonii* (Xhp) ist ein Gram-negativer und wirtsspezifischer Erreger, der Vertreter der Pflanzengattung *Pelargonium* infiziert und die Braunfäule verursacht. Durch die systemische Infektion ist das vaskuläre Gewebe betroffen und ruft Symptome hervor, die mit der bakteriellen Welke (hervorgerufen durch *Ralstonia solanacearum*) und der Blattfleckenkrankheit vergleichbar sind. Die Infektion führt zur Stengelfäule und letztendlich zum Absterben der gesamten Pflanze (Nameth et al., 1999). Xhp ist nicht als Quarantäneschaderreger gelistet. Standardnachweise sind ELISA (Benedict et al., 1990) und die PCR (Manulis et al., 1994; Sulzinski et al., 1995, 1997; Chittaranjan und De Boer, 1997; Glick et al., 2002; Sulzinski, 2001; Farahani und Taghavi, 2016).

Für den schnellen, qualitativen Pathogennachweis steht die unmittelbare Auswertung des Tests direkt vor Ort im Vordergrund. Das kann nur gewährleistet werden, wenn die Untersuchung in Form eines günstigen Schnelltests ohne geschultes Personal und mit geringem apparativen Aufwand durchgeführt werden kann. Den gesetzlich vorgeschriebenen serologischen sowie molekularbiologischen Verfahren stehen inzwischen innovative und kostengünstigere Methoden gegenüber.

²EPPO: PM7/59, 2006 Bulletin 36

5.1.2 Serologische Nachweismethoden

Zu den konventionellen Nachweismethoden gehören neben der Mikroskopie und Kultivierung die serologischen oder auch immunologischen Verfahren. Bei allen immunologischen Verfahren wird eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung für den Nachweis genutzt. Hierbei können spezifische Oberflächenstrukturen der Pathogene, darunter Proteine, Lipopolysaccharide und extrazelluläre Polysaccharide durch monoklonale oder polyklonale Antikörper erkannt werden. Nachteil aller serologischen Methoden ist die Menge der exprimierten Antigene. Latente Infektionen werden eventuell nicht erkannt und die Ausbreitung des Erregers nicht rechtzeitig gestoppt. Nachfolgend sind die beiden am häufigsten eingesetzten Methoden kurz beschrieben.

Immunofluoreszenzmikroskopie: Bei der Immunofluoreszenzmikroskopie binden fluoreszenzmarkierte Antikörper direkt im Pflanzengewebe spezifisch an die Antigene der Pathogene. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können die Pathogene anschließend optisch detektiert werden. Das Verfahren ist sensitiv (10^3 CFU/ml), der Arbeits- und Zeitaufwand aber sehr hoch, da die Gewebeprobe zuvor auf einem Glasträger fixiert werden müssen. Ein weiterer Nachteil der Methode ist die Häufigkeit der falsch-negativen Ergebnisse, da der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund seiner niedrigen Lichtstabilität ausbleichen kann (*photobleaching*) (Alvarez, 2004; López et al., 2009; Fang und Ramasamy, 2015).

Enzymatisches Immunoabsorptionsverfahren Im ELISA-Test wird die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung in einem so genannten Sandwich-Assay durch eine enzymatisch induzierte Farbänderung eines Substrats nachgewiesen. Die Sensitivität liegt in Abhängigkeit des Verfahrens und der Probenzusammensetzung bei mikrobiellen Phytopathogenen bei 10^5 - 10^6 CFU/ml. Eine Aufkonzentrierung der Pathogene vor dem ELISA kann die Sensitivität verbessern. Die Analyse umfasst mehrere Inkubationsschritte und wird im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. ELISA-Systeme für den hohen Probendurchsatz erfordern 45 Minuten bis 2 Stunden (Alvarez, 2004; Mondal und Shanmugam, 2013; Fang und Ramasamy, 2015). Eine besondere Form des ELISA ist der laterale Immunoflusstest (LFIA), bei dem ein Teststreifen mit immobilisierten Antikörpern und Farbmarkierung direkt in die Probe gehalten wird und die spezifische Bindung durch eine Farbänderung sichtbar wird. Dieses System ermöglicht eine kostengünstige und einfache Pathogendetektion in Form eines Schnelltests (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

5.1.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

Die zu detektierende Nukleinsäure (RNA oder DNA) kann über spezifische Sonden direkt oder nach vorheriger spezifischer Amplifikation sowohl qualitativ als auch quantitativ detektiert werden. Im Gegensatz zu immunologischen Methoden muss für den Nachweis der Nukleinsäuren aufgrund der Amplifikation keine vorherige Kultivierung der Pathogene erfolgen, wodurch der Zeitaufwand deutlich reduziert wird. Des Weiteren sind Nukleinsäure-basierte Methoden im Vergleich zu serologischen Verfahren damit sensitiver und spezifischer. Nachfolgend sind die wichtigsten Verfahren beschrieben.

Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH): Die FISH kombiniert die Hybridisierung einer Fluoreszenzsonde an die DNA- oder RNA des Pathogens und dessen fluoreszenzmikroskopische Detektion. Da die Sonde spezifisch an jede Zielsequenz eines Pathogens binden kann, ist theoretisch eine Einzel-Zell-Analyse möglich. In der Praxis erhält man in den meisten Fällen eine Sensitivität von 10^3 CFU/ml. Die Präzision und Zuverlässigkeit des Verfahrens hängt von der Sonde ab, da die Ausbildung von doppelsträngigen Sekundärstrukturen in der Sonde die Hybridisierung verhindern kann. Weiterhin kann das Ausbleichen der Fluoreszenzsonde die Sensitivität zusätzlich verringern (Fang und Ramasamy, 2015).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die PCR ist die bekannteste und am häufigsten eingesetzte Methode zur *in vitro* Amplifikation und Detektion pathogener DNA oder RNA. Aufgrund der hohen Sensitivität (10^1 - 10^3 CFU/ml) und Spezifität kann sie auch für den Nachweis unterschiedlicher Pathogene in derselben Probe genutzt werden (Mullis und Faloona, 1987). Bei der PCR wird die DNA mit Hilfe von kurzen Oligonukleotiden (Primern) und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in alternierenden Schritten mit unterschiedlicher Temperatur zyklisch amplifiziert. Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die spezifische DNA-Sequenz anschließend nachgewiesen werden. Andere Methoden zur Detektion der PCR basieren auf Fluoreszenzfarbstoffen, die in die DNA-Helix interkalieren oder sequenzspezifisch als Fluoreszenzsonde hybridisieren. Der Nachteil der PCR liegt in der Anfälligkeit für Kontaminationen und den daraus resultierenden falsch-positiven Ergebnissen. Des Weiteren kann bei geringer Probenreinheit die Effizienz der Reaktion reduziert werden und damit falsch-negative Ergebnisse begünstigen. Daher ist eine vorherige Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäure aus der biologischen Probe im Labor erforderlich (Vincelli und Tisserat, 2008).

Die Nested-PCR (engl. für verschachtelt) ermöglicht die Erhöhung der Sensitivität durch zwei nacheinander folgende PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primer-Paaren. Die Methode eignet sich für den Nachweis sehr niedriger Pathogentiter, erhöht aber gleichzeitig die Anfälligkeit für Kontaminationen bzw. falsch-positive Ergebnisse. Zudem steigt der Zeit- und Arbeitsaufwand. Die RT-PCR dient zur Amplifikation von RNA, die durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase amplifiziert werden kann.

Die qPCR ermöglicht die relative und absolute Quantifizierung der Pathogen-DNA durch die kontinuierliche Detektion der Amplifikationsreaktion mit DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (SYBR Green und EvaGreen) oder einer Fluoreszenzsonde (TaqMan- oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte Sonde) (Morrison et al., 1998). Die Methode ist sehr sensitiv, erfordert für eine präzise Quantifizierung aber eine Optimierung der PCR-Effizienz. Durch den Einsatz der Sonden und spezieller Farbstoffe steigen allerdings die Kosten (Schaad und Frederick, 2002).

Eine Weiterentwicklung der qPCR ist die digitale PCR (dPCR), bei der die gesamte Reaktion in vielen Mikroreaktionsräumen durchgeführt wird. Im optimalen Fall befindet sich in jedem dieser Reaktionsräume neben den Bestandteilen einer PCR-Reaktion sowie eines Farbstoffs nur eine Kopie der Templat-DNA. Im Endpunkt der Amplifikation werden die Reaktionsräume mit erfolgter Amplifikation (positiv) und die ohne Amplifikation (negativ) klassifiziert. Dabei können entweder interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe oder Sonden für die fluorimetrische Detektion genutzt werden. Aus der Anzahl der gezählten positiven und negativen Reaktionen lässt sich anschließend über die Poisson-Verteilung die absolute Anzahl der Templat-Kopien in der Ausgangsprobe berechnen. Hierbei ist im Gegensatz zur qPCR kein Standard mit bekannter DNA-Menge erforderlich (Sanders et al., 2011; Hindson et al., 2011; Lievens et al., 2016; Dong et al., 2015; Zhang und Jiang, 2016). Die Kommerzialisierung der dPCR erfolgt entweder durch Chip-basierte Plattformen mit kleinen Kavitäten oder in Form von Emulsionen („digital droplet PCR“, ddPCR). Viele der genannten PCR-Methoden sind aufgrund der spezifischen Geräteanforderungen kostenintensiv und wegen der komplexen Arbeitsabläufe nicht als Schnelltest geeignet (Mazutis et al., 2009; López et al., 2009; Baker, 2012; Mondal und Shanmugam, 2013; Fang und Ramasamy, 2015; Fraiture et al., 2015).

5.2 Nachweis durch Isothermale Amplifikation

5.2.1 Nukleinsäure-basierte Detektion als Schnelltest

Für die Etablierung von Amplifikationsmethoden als Schnelltest müssen mehrere Bedingungen berücksichtigt werden (Abb. 1). Mögliches Ausgangsmaterial bei Amplifikationsreaktionen sind einzelsträngige und doppelsträngige DNA (ssDNA, dsDNA) sowie RNA. Bei herkömmlichen Verfahren muss für die Genauigkeit der Analyse die Reinheit der zu amplifizierenden DNA gewährleistet sein. Da die Sensitivität des Tests verringert werden kann, sind die Verfahren zum Nachweis von Pathogenen in Urin, Speichel, Blut, Wasser, Boden oder Nahrungsmitteln aufgrund Enzym-inhibierender Substanzen sehr komplex. Eine Alternative sind Inhibitor-tolerante Verfahren, die robustere Enzyme verwenden. Beim klassischen Nachweis wird die DNA oder RNA aus dem biologischen Material extrahiert, ggf. aufgereinigt und durch die PCR vervielfältigt. Anschließend erfolgt der Nachweis der amplifizierten DNA qualitativ oder quantitativ durch die Agarose-Gelelektrophorese. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine hohe Spezifität und Sensitivität, ist aufgrund der vielen Schritte jedoch zeitaufwändig. Eine Verkürzung der Testdauer kann erreicht wer-

den, wenn die Amplifikation und Detektion in einem Schritt kombiniert werden. Durch die Verwendung DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe können die DNA-Amplifikation und -Detektion gleichzeitig erfolgen. Eine weitere Verkürzung der Testdauer kann durch die direkte Detektion der Nukleinsäure in der Probe ohne Aufreinigung und Amplifikation erreicht werden. Diese Verfahren erfordern eine sehr hohe Sensitivität und können bisher nur in Kombination mit Biosensoren realisiert werden (Scheller et al., 1995).

Die Testdauer hängt bei allen Verfahren von ihrer Komplexität ab. Wenige Reaktionsschritte ohne aufwändige Isolation und Aufreinigung der Probe mit visueller Detektion unmittelbar nach der Amplifikation sind für den Einsatz als Schnelltest optimal. Zusätzlich kann eine hohe Flexibilität des Verfahrens die schnelle Etablierung für andere Pathogene gewährleisten (Craw und Balachandran, 2012).

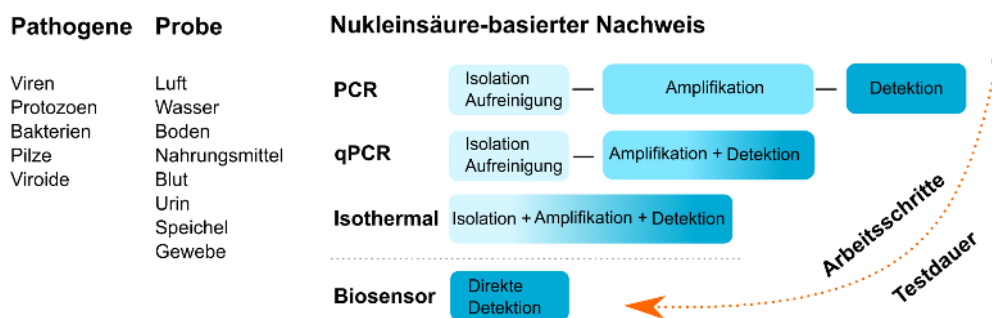


Abbildung 1: Grundlegende Prozessschritte eines diagnostischen Tests zum Nachweis von Pathogenen in komplexen biologischen Proben. Die Komplexität und die Testdauer der Verfahren nehmen durch die Kombination der einzelnen Schritte (Isolation, Amplifikation und Detektion) ab. Nukleinsäure-basierte Nachweise können mit oder ohne Amplifikation erfolgen.

5.2.2 Isothermale Amplifikationsreaktionen

Bei der PCR wird die DNA-Amplifikation durch zyklische Denaturierung, Anlagerung der Primer und deren Verlängerung bei unterschiedlichen Temperaturen gesteuert (55-95 °C). Eine Vereinfachung der Amplifikation kann durch die Beibehaltung einer konstanten Reaktionstemperatur und Verwendung spezieller Enzyme für die Doppelstrangaufftrennung oder funktioneller Primer erreicht werden (Fakruddin et al., 2013). Die Reaktionstemperatur spielt hier eine wesentliche Rolle, da sie die Spezifität und die Effizienz direkt beeinflussen kann. Isothermale Amplifikationsverfahren werden in Abhängigkeit vom Mechanismus in einem Bereich zwischen 30 °C und 65 °C durchgeführt. Eine sequenzspezifische Amplifikation bei diesen Temperaturen ist im Vergleich zur PCR aufgrund der veränderten Kinetik schwierig, da keine thermische Denaturierung des Doppelstrangs stattfindet. Für die wiederholende Hybridisierung der Primer sind einzelsträngige DNA-Bereiche zwingend erforderlich. Auch bei der isothermalen Amplifikation ist die kontinuierliche Regenerierung der Primerbindungsstellen essentiell (Craw und Balachandran, 2012).

Die isothermale Amplifikation ermöglicht eine schnellere und einfachere Durchführung des Pathogennachweis' ohne spezielle Geräte und technisch ausgebildetes Personal. Infolgedessen können der Arbeitsaufwand und die Kosten für einen Test stark reduziert werden. Darüber hinaus ist der Nachweis auch außerhalb des Labors in Form eines Schnelltests oder Feldtests (*on-site testing*) möglich. In der klinischen Diagnostik wird dafür der Begriff „patientennahe Labordiagnostik“ (POCT) genutzt. In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche isothermale Verfahren für die Nukleinsäuredetektion entwickelt (Zhao et al., 2015). Neben den häufig publizierten Methoden Nucleic acid sequence based Amplification (NASBA) (Compton, 1991), Strand displacement amplification (SDA) (Walker et al., 1992), Helicase dependent amplification (HDA) (Vincent et al., 2004), Recombinase polymerase amplification (RPA) (Piepenburg et al., 2006), Rolling circle amplification (RCA) (Piepenburg et al., 2006) und Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi et al., 2000) gibt es inzwischen eine Vielzahl weiterer Methoden, die bereits detailliert zusammengefasst wurden (Yan et al., 2014). Sie unterscheiden sich vorrangig im Reaktionsmechanismus, der Anzahl der benötigten Primer und Enzyme, der Reaktionstemperatur, der Sensitivität, der Spezifität sowie der Detektionsmöglichkeiten. Die charakteristischen Eigenschaften der zuvor genannten isothermalen Reaktionen sind im Vergleich zur PCR als Standardmethode in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung häufig verwendeter isothermaler Amplifikationsreaktionen im Vergleich zur PCR als Standardmethode

Methoden	PCR	NASBA	SDA	HDA	RPA	RCA	LAMP
Templat	DNA und RNA	RNA	DNA	DNA	DNA	zirk. DNA	DNA und RNA
Dauer	1,5 - 2 h	1,5 - 2 h	2 h	0,5 - 2 h	0,5 -1,5 h	1,5 h	0,5 -1 h
Temperaturbereich	55-95 °C	41 °C	37 °C	37-65 °C	37-42 °C	30-65 °C	60-65 °C
Anzahl Primer	2	2	2 /4	2	2	1	4 - 6
Primer-Design	einfach	einfach	komplex	einfach	einfach	einfach	komplex
Anzahl Enzyme	1 oder 2 (RNA)	2-3	2	2	2	2	1 oder 2 (RNA)
Toleranz gegenüber Inhibitoren	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja
Denaturierung erforderlich	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein
Produkt	dsDNA	RNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA	konkat.* ssDNA	konkat.* dsDNA

*konkatemere (repetitive DNA-Sequenzen)

Reaktionen mit vielen Primern (LAMP) sind anfällig für unspezifische Amplifikation durch Primerartefakte (Amplifizierung von Hetero- oder Homodimeren) und erfordern ein komplexes Primerdesign. Bei unspezifischer Amplifikation kommt es daher häufig zu falsch-positiven Ergebnissen. Andere Methoden (RPA, SDA, NASBA und HDA) benötigen neben der DNA- bzw. RNA-Polymerase zusätzliche Enzyme, wie das Nicking-Enzym, eine Rekombinase oder eine Helikase, die einzelsträngige Bereiche in der DNA generieren. In der Reaktion konkurrieren diese Enzyme miteinander und beeinflussen damit die Reaktionskinetik (Gill und Ghaemi, 2008; Kim und Easley, 2011; Asiello und Baeumner, 2011; Zanolini und Spoto, 2012; Sidoti et al., 2013; Yan et al., 2014; Zhao et al., 2015).

5.2.3 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Die LAMP ist eine sehr effiziente und robuste Methode zur isothermalen Amplifikation von RNA und DNA, mit der innerhalb von 60 Minuten $10^8 - 10^9$ Kopien des Ausgangstemplates als konkatemere DNA (repetitive DNA-Sequenzen) generiert werden können (Francois et al., 2011; Dugan et al., 2012; Yang et al., 2014; Yan et al., 2014). Die verwendete DNA-abhängige *Bst* DNA-Polymerase stammt vom thermophilen *Bacillus stearothermophilus* und hat neben der 5' - 3' Polymeraseaktivität zusätzlich eine Strangverdrängungsaktivität (Aliotta et al., 1996). Durch die Kombination der Polymerase mit speziellen Primern, die eine Templat-abhängige Sekundärstruktur mit einzelsträngigen DNA-Bereichen (Schleife) ausbilden, kann eine kontinuierliche und exponentielle Amplifikation auch ohne einen initialen Denaturierungsschritt realisiert werden. Das Produkt der Amplifikation ist konkatemere doppelsträngige DNA mit alternierender Intermediärsequenz (Hantelstruktur, *stem-loop*). Die Reaktion erfolgt in einem Temperaturbereich von 60 - 65 °C in einem Inkubator oder Wasserbad. Durch die hohe Amplifikationseffizienz der LAMP wird in Abhängigkeit der Primer- und Desoxyribonukleosidtriphosphate-Konzentration (dNTP) als Nebenprodukt viel anorganisches Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, welches anschließend mit dem freien Mg^{2+} in der Lösung komplexiert und als sichtbare Trübung präzipitiert (Mori et al., 2001). Darüber hinaus können die gängigen Detektionsverfahren für DNA auch in der LAMP verwendet werden. Die Nachteile der Methode sind das komplexe Primerdesign und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse aufgrund der unspezifischen Amplifikation. Dennoch erfüllt die LAMP wesentliche Anforderungen für die Verwendung als Nukleinsäurenachweis in Form eines Schnelltests. Die LAMP ist sensitiv, schnell, effektiv, robust, spezifisch, günstig, einfach durchzuführen und aufgrund der vielen Detektionsmöglichkeiten flexibel einsetzbar (Fu et al., 2011; Njiru, 2012; Abdullahi et al., 2015; Notomi et al., 2015).

Reaktionsmechanismus der LAMP

Der Reaktionsmechanismus der LAMP basiert auf der Generierung eines intermediären Produkts in Form einer Hantelstruktur und der daraus folgenden autozyklischen, exponentiellen Amplifikation. Demnach kann die LAMP in eine nichtzyklische (Abb. 2) und eine zyklische Phase (Abb. 3) unterteilt werden. Die Grundlage für die Regenerierung von

Primerbindungsstellen ist die Verwendung der *Bst* DNA-Polymerase sowie der Einsatz von zwei unterschiedlichen Arten von Primern. Die äußeren, kurzen Primer (F3 und B3) sind nur zu Beginn für die Strangverdrängung und Generierung des intermediären Produkts erforderlich (nichtzyklische Phase) (Abb. 2 A). Die inneren, langen Primer (FIP und BIP) bestehen jeweils aus zwei Primerbindungsstellen (F1c-F2 bzw. B1c-B2). Hierbei ist der F1c- bzw. B1c-Teil revers-komplementär zur Zielsequenz und hat eine bis zu 5 °C höhere Schmelztemperatur als der F2- bzw. B2-Teil. Beide Teile können durch eine vierfache Thymin-Basenfolge als Linker getrennt werden. Dies ermöglicht die Rückfaltung und Ausbildung der thermodynamisch stabilen Hantelstruktur, die der Startpunkt für die exponentielle Amplifikation (zyklische Phase, Abb. 3) ist. Im späteren Verlauf der Reaktion sind nur noch die inneren Primer essentiell. Für die Beschleunigung der Reaktion können zusätzliche Primer integriert werden. Sie hybridisieren in den einzelsträngigen Schleifenstrukturen und initiieren dort ebenfalls eine Amplifikation (Nagamine et al., 2002).

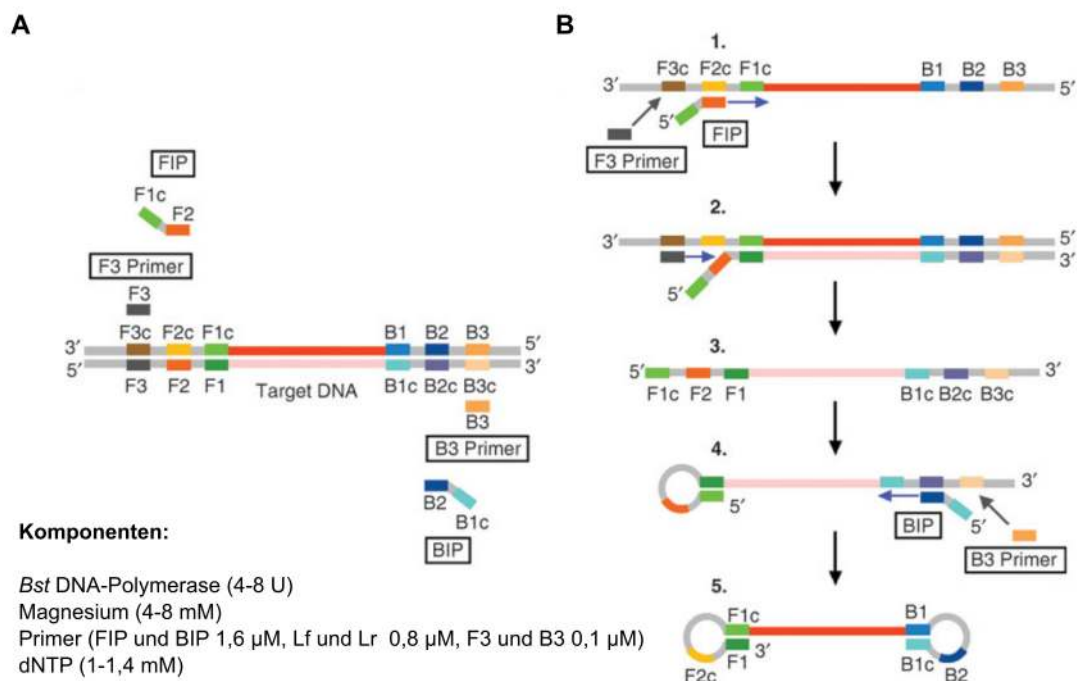


Abbildung 2: LAMP-Reaktionsmechanismus (nichtzyklisch): Ausbildung der Hantelstruktur (stem-loop) durch Hybridisierung der FIP- und BIP-Primer an die Ziel-DNA. Diese intermediäre DNA-Struktur ist Ausgangspunkt für die autozyklische Amplifikation (Tomita et al., 2008).

Die erste Phase der LAMP beginnt mit der Hybridisierung des FIP-Primers an die Bindungsstelle F2c auf der Ziel-DNA (Abb. 2 B). Ausgehend vom Primer wird der komplementäre Strang durch die *Bst* DNA-Polymerase synthetisiert. Gleichzeitig kann auch der F3-Primer hybridisieren und durch dessen Verlängerung den zuvor amplifizierten DNA-Strang verdrängen bzw. ablösen (Schritte 1 und 2). Der freigesetzte DNA-Strang kann durch die Rückfaltung des F1c-Teils an F1 an einem Ende eine Schleife ausbilden (Schritte 3 und 4). Die einzelsträngige DNA ist jetzt das Templat für den BIP-Primer. Dieser hybridisiert analog zum FIP-Primer und startet dort die Polymerisation. Durch die Hy-

bridisierung des B3-Primers wird der zuvor verlängerte Strang ebenfalls verdrängt. Jetzt kommt es an beiden Enden des Stranges zur Rückfaltung durch F1c und B1c bzw. zur Ausbildung der Hantelstruktur. Diese Hantelstruktur ist das Ausgangsprodukt für die zweite Phase (Abb. 3). Die autozyklische Amplifikation wird anschließend nur noch von den inneren Primern (FIP und BIP) vorangebracht. Hierbei bindet der FIP zunächst in den einzelsträngigen Bereichen der Schleifenstruktur und wird anschließend verlängert.

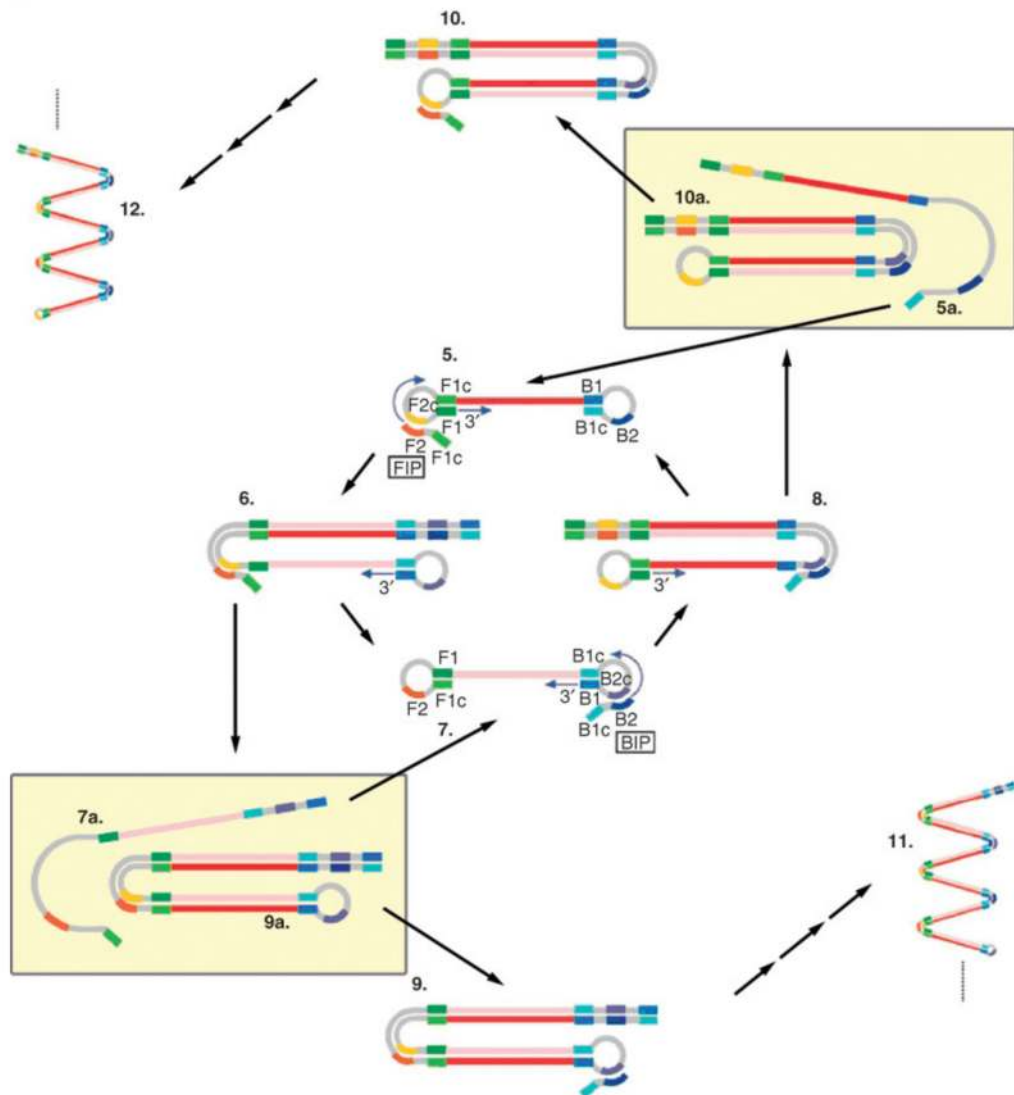


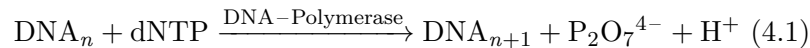
Abbildung 3: LAMP Reaktionsmechanismus (autozyklisch): Die kontinuierliche Amplifikation und autozyklische Regeneration der Hantelstruktur bildet konkatemere DNA-Strukturen unterschiedlicher Länge (Tomita et al., 2008).

Gleichzeitig beginnt auch beim F1-Teil die Verlängerung in 5' – 3' Richtung (Schritt 5). Es entsteht eine Struktur mit einem invertierten Doppelstrang der Hantelstruktur und ein einzelsträngiger Bereich mit einer Schleife am gegenüberliegenden Ende (Schritt 6). Die Verlängerung am Ende der Schleifenstruktur verdrängt den hybridisierten Strang, welcher als komplementäre Hantelstruktur freigesetzt wird (Schritt 7). An dieser Hantelstruktur

kann nun der BIP-Primer binden und in entgegengesetzter Richtung den gleichen Ablauf initiieren (Schritt 8). Diese Phase führt zum Recycling der Hantelstruktur. Die freigesetzten DNA-Stränge (Schritte 9a und 10a) werden anschließend durch die Hybridisierung der FIP- und BIP-Primer in den einzelsträngigen Bereichen kontinuierlich verlängert, wobei sich die Sequenz der Hantelstruktur als invertierter Bereich mehrfach wiederholt (Schritte 11 und 12). Auch in diesen Schritten wird die Hantelstruktur recycelt (Schritte 5a und 7a). Die kontinuierliche Verlängerung der einzelnen Strukturen wird so lange fortgesetzt bis die Primer oder dNTP verbraucht sind bzw. die Polymerase aufgrund der Pyrophosphat- und DNA-Akkumulation inaktiv wird.

Methoden zur Detektion der LAMP-Reaktion

Im Amplifikationsprozess der DNA entsteht neben der hochmolekularen DNA Pyrophosphat (PPi), das nach der Hybridisierung des Primers an die Ziel-DNA und den Einbau von dNTP von der DNA-Polymerase in 5'-3' Richtung, freigesetzt wird (Gleichung 4.1). Damit stehen für die Detektion der LAMP-Reaktion zwei Produkte zur Verfügung.



Die LAMP-Reaktion generiert in einem Reaktionsvolumen von 25 μl zwischen 10 und 20 μg dsDNA und 1 - 2 mM PPi in einer Stunde (Mori et al., 2001). In Abhängigkeit der gewünschten Detektion erfolgt der Nachweis der Reaktion direkt über die amplifizierte DNA oder indirekt über das Pyrophosphat (Dehghan et al., 2014). Nachfolgend werden die wichtigen Methoden beider Formen im Zusammenhang mit der LAMP kurz erläutert.

Direkte LAMP-Detektion

Die Komplexität der direkten DNA-Detektion in der LAMP unterscheidet sich hinsichtlich der Durchführung und der Signalgebung, wobei es inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren gibt (Abb. 4). Die amplifizierte dsDNA kann in der klassischen Form direkt in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden, um sie dann mit Ethidiumbromid oder anderen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen zu visualisieren (Abb. 4 A). Durch die konkatemere Struktur der dsDNA ist eine für die LAMP typische Leiterstruktur im Gel sichtbar. Dieses Muster kann von der PCR deutlich unterschieden werden. Da für die Elektrophorese das Reaktionsgefäß geöffnet werden muss, steigt das Risiko einer Kreuzkontamination anderer Proben durch das Amplifikationsprodukt stark an.

Eine weitere Methode zur Detektion der dsDNA erfolgt durch die Zugabe von DNA-interkalierenden Farbstoffen zur Reaktion. Nach Anregung des Farbstoffs mit einer bestimmten Wellenlänge wird Fluoreszenz emittiert (Abb. 4 B). Auch hier erfolgt die Zugabe erst nach der Reaktion, da eine hohe Konzentration des Farbstoffs die Enzymaktivität reduzieren kann. Auch hier besteht daher die Gefahr der Kreuzkontamination. Bei der Zugabe einer geringen Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs vor Beginn der Reaktion erfolgt die Detektion der LAMP in Echtzeit. Eingesetzt werden Farbstoffe, wie SYBR Green, SYBR Gold, Picogreen, EvaGreen oder SYTO-Farbstoffe. Hierbei wird das

Fluoreszenzsignal kontinuierlich detektiert. Die unmittelbare Kontaminationsgefahr wird dadurch reduziert, aber eine Auswertung ohne technische Hilfsmittel ist nicht möglich. Für die Detektion können qPCR-kompatible Geräte oder tragbare Fluorimeter verwendet werden. Die Methode eignet sich zur Quantifizierung der LAMP, da das detektierte Fluoreszenzsignal mit der Menge der amplifizierten DNA korreliert. Die Farbstoffe können dabei in dsDNA interkalieren oder an ssDNA binden. In beiden Fällen können falsch-positive Ergebnisse als Ursache unspezifischer Amplifikation oder Kontamination nicht ausgeschlossen werden. Eine Überprüfung des Amplifikationsprodukts kann anschließend durch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, die auch bei der qPCR üblich ist (Oscorbin et al., 2016).

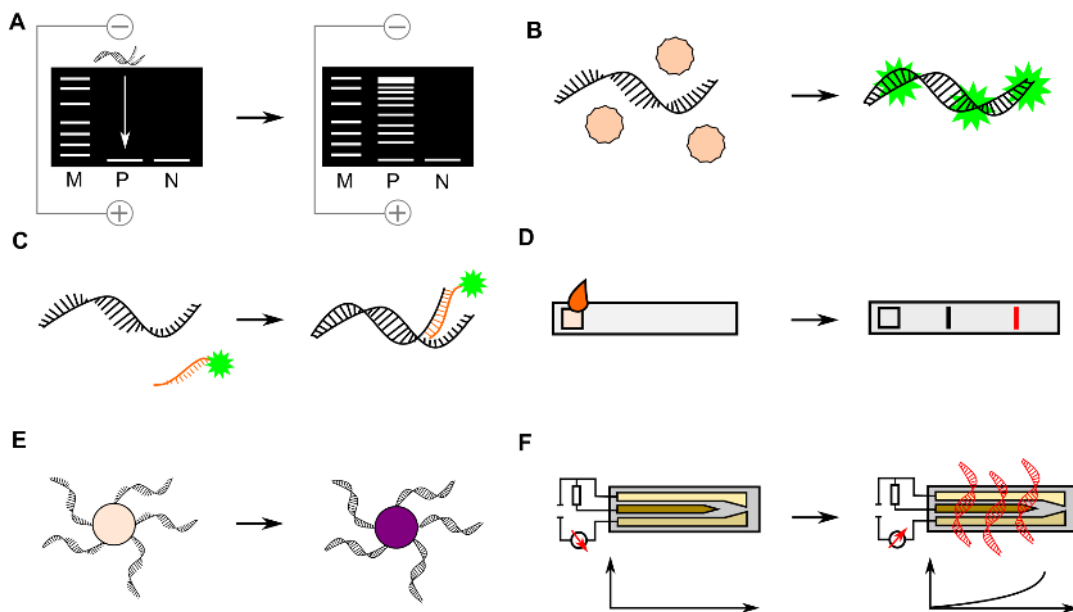


Abbildung 4: Unterschiedliche direkte Methoden für die Detektion der DNA in der LAMP. (A) Gel-elektrophorese, (B) dsDNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, (C) Fluoreszenzsonden, (D) Lateraler Flusstest, (E) Gold-Nanopartikel und (F) Elektrochemischer Nachweis

Die sequenzspezifische Detektion der DNA kann nur durch die Verwendung von Fluoreszenzsonden erfolgen (Abb. 4 C). Dafür wird ein fluoreszenzmarkierter Primer, der spezifisch an das Amplifikationsprodukt hybridisiert, aber selbst nicht amplifiziert werden kann, genutzt. Weiterhin kann auch die bei der qPCR genutzte FRET-Sonde eingesetzt werden. Hier wird durch Hybridisierung von zwei Primern mit jeweils einem Akzeptor- und Donor-Farbstoff eine Änderung der Emissionswellenlänge induziert (Kubota et al., 2011). Ein vergleichbarer Ansatz zu den in der qPCR eingesetzten „TaqMan“-Sonden wird mit einem Primer als Quencher und einem dazu komplementären Primer als Reporterfarbstoff durchgeführt. Bei der Amplifikation wird der Primer mit dem Quencher abgelöst und das Signal des Reporters steigt an. Die Verwendung der „TaqMan“-Sonde aus der qPCR ist nicht möglich, da die *Bst* DNA-Polymerase keine 5'-3' Exonuklease-Aktivität besitzt und die Sonde damit nicht abbauen kann. Der größte Nachteil bei der Detektion mit Sonden ist der hohe Kostenaufwand für die modifizierten Primer.

Im Gegensatz zur Amplifikation kann die Detektion der LAMP auch auf einer Oberfläche erfolgen. Möglichkeiten hierfür sind der „Lateral Flow Dipstick“ (LFD) oder das „Nucleic Acid Lateral Flow“ (NALF) System (Abb. 4 D). In beiden Formaten wird eine Membran in die Reaktionslösung eingetaucht, wobei die Flüssigkeit quer zur Oberfläche mittels Kapillarkräfte transportiert wird. Die markierten LAMP-Produkte laufen dabei über einen modifizierten Test- und Kontrollstreifen, die sich bei Anwesenheit der Produkte färben. In LFD-Systemen werden Biotin-markierte FIP- oder BIP-LAMP-Primer für die Konjugation des LAMP-Produkts an der Testlinie mit anti-Biotin-Antikörpern verwendet. Eine zusätzliche mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Sonde, die am Amplifikationsprodukt bindet, sorgt zusammen mit Gold-markierten anti-FITC Antikörpern für die Ausbildung der roten Farbe an der Testlinie. Die Kontrolllinie bindet wenige freie anti-FITC Antikörper, wobei die Farbe hier deutlich schwächer bleibt. Ist kein Biotin-markiertes LAMP-Produkt vorhanden, bleibt die Farbänderung aus. Das System ist sequenzspezifisch, erfordert aber spezielle Modifikationen der Primer und zwei Antikörper. Als Alternative zum LFD-System gibt es mit dem NALF ein Antikörper-freies System, bei dem die biotinylierten LAMP-Produkte durch Streptavidin an der Testlinie gebunden werden (Singleton et al., 2014). Die Farbentwicklung kann durch Gold-markierte Sonden erreicht werden. Beide Systeme eignen sich für die schnelle und einfache Analyse der LAMP, auch außerhalb des Labors, da die Teststreifen günstig in der Produktion sind. In beiden Systemen sind die Amplifikation und Detektion allerdings separate Schritte, in denen das Reaktionsgefäß geöffnet werden muss und damit das Risiko der Kreuzkontamination erhöht wird.

Die spezifische Bindung von LAMP-DNA an modifizierten Nanopartikeln kann über die Agglomeration der Partikel eine Farbänderung induzieren (Abb. 4 E)(Zhou et al., 2013). Diese Methode kann mit dem zuvor beschriebenen LFD-System kombiniert werden. Die Aggregation Fluoreszenz-markierter LAMP-Produkte kann auch durch kationische Polymere (Polyethylenimin, PEI) erreicht werden (Mori et al., 2006). Der unlösliche PEI-DNA-Komplex ist nach Lichtanregung als fluoreszenter Niederschlag sichtbar. Das Polymer muss nachträglich zugefügt werden, da es sonst die Amplifikationseffizienz verringert.

Die elektrochemische Detektion der amplifizierten DNA in der LAMP kann über die Hybridisierung der DNA auf einer modifizierter Elektrode und einem anschließenden potentiometrischen oder impedimetrischen Nachweis erfolgen (Abb. 4 F). Zusätzlich können DNA-interkalierende oder nicht-interkalierende redoxaktive Substanzen für die voltametrische Signalgenerierung verwendet werden (Ahmed et al., 2009; Patterson et al., 2013; Martin et al., 2016).

Indirekte LAMP-Detektion

Indirekte Nachweise beziehen sich auf die Detektion von Nebenprodukten der Amplifikationsreaktion (PPi) oder der Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Reaktionslösung (pH-Wert, freie Mg^{2+}), bei der meist eine Farbänderung erfolgt. Im Vergleich zur direkten Detektion der DNA sind diese Verfahren weniger komplex, da der Bedarf an speziellen Geräten niedrig ist und der Nachweis kostengünstiger durchgeführt werden kann. Eine sequenzspezifische Detektion der Amplifikation ist nicht möglich und muss in diagnostischen Anwendungen separat erfolgen (Abb. 5).

In der LAMP werden standardmäßig 6 - 8 mM Magnesiumchlorid eingesetzt. Die Bindungsaffinität zwischen dem PPi und dem freien Mg^{2+} ist hoch, wodurch sich unlösliche $PPi-Mg^{2+}$ -Komplexe bilden und als Trübung der Reaktionslösung sichtbar werden (Abb. 5, A). Mit einem Turbidimeter kann die LAMP auch in Echtzeit detektiert werden (Mori et al., 2001). Die Bestimmung der Trübung ist die einfachste Detektionsmethode der LAMP, da keine zusätzlichen Substanzen oder Geräte benötigt werden. Die Evaluierung des Resultats durch die Trübung ist allerdings subjektiv und hängt vom Kontrast ab (Wastling et al., 2010).

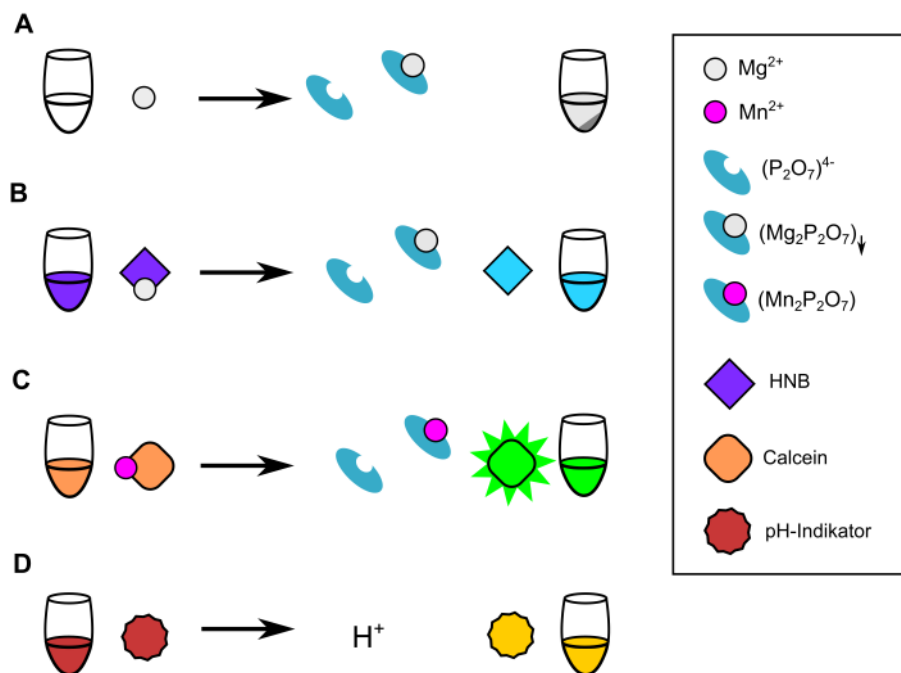


Abbildung 5: Unterschiedliche Methoden für die indirekte Detektion der LAMP-Reaktion von Pyrophosphat. (A) Trübung, (B) Magnesiumindikator HNB, (C) Verdrängung des Quencher-Ions (Mn^{2+}) vom Fluoreszenzfarbstoff Calcein.

In der LAMP kann die Konzentrationsänderung des freien Mg^{2+} durch einen Indikatorfarbstoff in der Reaktionslösung detektiert werden. Durch die Änderung der Mg^{2+} -Konzentration kann der Mg^{2+} -abhängige Farbstoff Hydroxynaphtholblau (HNB) eingesetzt werden (Abb. 5, B). Das HNB inhibiert die *Bst* DNA-Polymerase nicht und kann daher auch vor der Reaktion zugegeben werden. Zu Beginn der Reaktion bindet das HNB

das freie Mg^{2+} und erscheint violett. Die Abnahme des Mg^{2+} durch die Komplexbildung mit dem entstehenden PPI verringert die Anzahl der Mg^{2+} -HNB-Komplexe und ändert dadurch die Farbe der Reaktionslösung zu hellblau. Die Farbänderung kann auch spektrophotometrisch durch Absorptionsmessungen bei 650 nm gemessen werden (Goto et al., 2009).

Neben HNB wird auch der Metallionen-abhängige Fluoreszenzfarbstoff Calcein in der LAMP-Detektion verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff wird zunächst von Manganionen gequenchet. Da Mn^{2+} wie Mg^{2+} eine hohe Bindungsaffinität zu PPI hat, konkurrieren das Calcein und das PPI um das freie Mn^{2+} . Aufgrund der höheren Affinität von Mangan zu Pyrophosphat kommt es zur Freisetzung des Calceins (Abb. 5, C). Das Calcein kann im UV-Licht oder Tageslicht angeregt werden und emittiert hellgrünes Licht (Abs.: 494 nm / Em.: 520 nm). Die negative LAMP-Reaktion behält dagegen eine orangefarbene bzw. fluoresziert nicht. Diese Methode ist für die einfache Endpunktdetektion geeignet. Darüber hinaus kann durch die kontinuierliche Detektion des Calceins mit Fluorimetern eine Echtzeitapplikation etabliert werden (Tomita et al., 2008).

Neben der Fluoreszenz kann in der LAMP auch die Enzym-gekoppelte Lumineszenzdetektion genutzt werden. Hierbei wird das in der LAMP akkumulierende PPI durch die ATP-Sulphyrase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Das ATP wird anschließend von dem Luciferase-Enzym in Anwesenheit von Luciferin, ein lumineszenter Naturstoff, und Sauerstoff in Adenosinmonophosphat (AMP), Pyrophosphat, Kohlendioxid und Licht in Form von Lumineszenz umgewandelt (Kiddle et al., 2012). Das System ist als quantitativer Echtzeitnachweis gut geeignet, für einen Schnelltest aber unpraktisch, da mehrere Enzyme und zusätzliche Substrate benötigt werden.

Bei der Amplifikation der DNA wird durch den Einbau eines dNTP neben PPI auch ein Proton (H^+) freigesetzt. Die Detektion der Protonen kann über einen ionensensitiven Feldeffekttransistor (ISFET) erfolgen und wird in der Sequenziertechnologie eingesetzt (Merriman et al., 2012). Die Detektion der pH-Wert-Änderung wurde bereits in gering gepufferten PCR- oder LAMP-Reaktionen getestet (Toumazou et al., 2013). Darüber hinaus wurde die Änderung auch mit pH-Indikatoren optisch detektiert (Abb. 5, D). Für die Echtzeit- oder Endpunktdetektion in der LAMP wurden Phenolrot, Kresolrot, Neutralrot und m-Kresol verglichen (Tanner et al., 2015). Ein Nachteil der Methode ist die notwendige Anpassung der Pufferkapazität, da die in der LAMP auftretende pH-Änderung gering ist.

5.3 Absolute Quantifizierung der Amplifikationsreaktion

Mit den zuvor beschriebenen Methoden kann die Amplifikationsreaktion (PCR oder LAMP) auch quantitativ analysiert werden. Vor allem in der klinischen Mikrobiologie, der Ernährungswissenschaft und der Umweltanalytik ist die Bestimmung der Pathogentiter in der Probe neben der qualitativen Analyse eine wichtige Anwendung (Klein, 2002). Die absolute Quantifizierung von Amplifikationsmethoden wird klassischerweise durch den Vergleich mit mehreren DNA-Standards über eine bekannte Konzentration (Standardkurve) durchgeführt (Pfaffl, 2012) (Abb. 6 A). Bei thermisch-synchronisierten Reaktionen wie der PCR spielt die Effizienz der Reaktion für die Genauigkeit der Quantifizierung eine wichtige Rolle und muss daher optimiert werden. Jeder Zyklus in der PCR wird durch den Denaturierungsschritt bei 95 °C initialisiert. So wird gewährleistet, dass sich die Menge der DNA in jedem Zyklus bei einer Effizienz von 100% verdoppelt. Die Effizienz hängt in der PCR von den eingesetzten Primern, der DNA-Polymerase, der Amplifikationstemperatur und der Probenqualität ab. Die Quantifizierung erfolgt über die Bestimmung des Zyklus-Schwellenwertes (Ct) aus der Amplifikationskurve der Echtzeitdetektion.

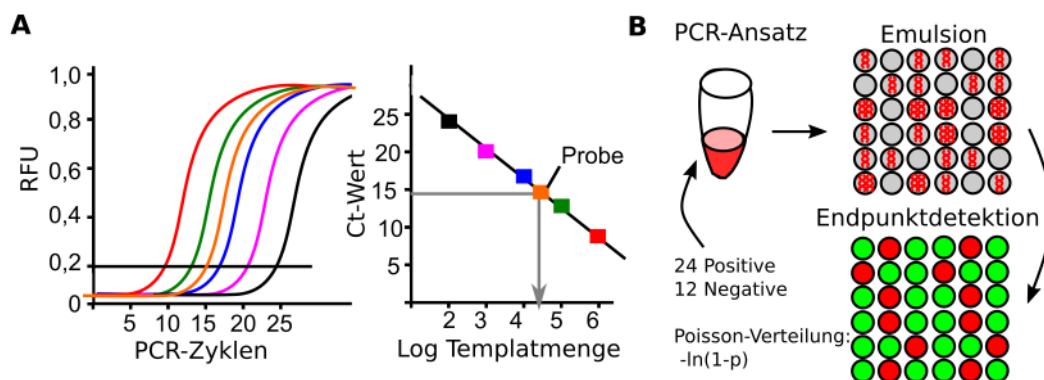


Abbildung 6: Methoden zur absoluten Quantifizierung mittels PCR. (A, links) qPCR mit verdünntem DNA-Standard und unbekannter Probe (orange). (A, rechts) Lineare Korrelation zwischen Ct-Wert und eingesetzter Templatmenge als Standardkurve. (B, oben) digitale PCR durch Verteilung der PCR-Probe in einzelne Tröpfchen (Emulsion). (B, unten) Detektion der PCR im Endpunkt über die Klassifizierung in positive (grün) und negative (rot) Tröpfchen mit statistischer Berechnung der Kopien pro Tröpfchen über die Fraktion der positiven Tröpfchen mittels Poisson-Verteilung (p)

Im Gegensatz zur PCR gibt es bei der isothermalen Amplifikation keine definierte Synchronisation der Reaktion über die Temperatur. Vielmehr bestimmt hier die Sekundärstruktur des Templates und die Verfügbarkeit der freien Primerbindungsstellen die Effizienz der Reaktion (Selck et al., 2013). Eine absolute Quantifizierung der LAMP wird durch das Standardkurvenverfahren durchgeführt. Hierbei ist die Bestimmung eines Parameters analog zum Ct-Wert erforderlich. Häufig wird dafür die Zeit bis zum Überschreiten eines festgelegten Fluoreszenzschwellenwertes (T_t) in der Echtzeitdetektion genutzt. Alternativ kann anhand der Amplifikationsrate der Zeitpunkt berechnet werden, bei dem die Reaktion positiv wird. Dieser wird „time-to-positivity“ genannt.

Aktuell gibt es aber noch keine einheitliche Regelung, da die komplexen Zusammenhänge in der isothermalen Amplifikation noch nicht vollständig untersucht wurden (Subramanian

und Gomez, 2014; Nixon et al., 2014; Khorosheva et al., 2015). Eine weitere Methode für die absolute Quantifizierung kann mit der digitalen Amplifikation erreicht werden (Abb. 6 B). Die Detektion der Reaktion erfolgt im Vergleich zu den vorher genannten Methoden im Endpunkt. Vorteil hierbei ist, dass die Effizienz einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Quantifizierung hat. Der größte Vorteil gegenüber der qPCR ist die höhere Präzision der Quantifizierung, da die Amplifikation in vielen einzelnen Reaktionen stattfindet. Hierbei ist eine Kompartimentierung des Reaktionsansatzes erforderlich. Die Nutzung von isothermalen Amplifikationsreaktionen für die digitale Quantifizierung kann sowohl Chipbasiert als auch in Emulsion erfolgen, wobei das Prinzip identisch ist (Rane et al., 2015; Selck et al., 2013; Zhu et al., 2012).

6 Zielstellung

Das Hauptziel dieser Dissertation ist die Etablierung neuer qualitativer und quantitativer Verfahren für die DNA- und Pyrophosphat-abhängige Detektion von LAMP-Produkten im Hinblick auf eine schnelle und kostengünstige Diagnostik. Zu diesem Zweck werden vier Schwerpunkte betrachtet, die (1) die Etablierung von neuen Detektionsmethoden, (2) die Identifizierung neuer Farbstoffe für die indirekte Detektion, (3) die Integration in die digitale Amplifizierung und (4) die Entwicklung einer weniger komplexen isothermalen Amplifikation zum Ziel haben (Abb. 7).

Der erste Teil der Arbeit soll sich mit der Etablierung von unterschiedlichen Nachweisverfahren für die Echtzeit- und Endpunktdetektion in der LAMP anhand ausgewählter Phytopathogene beschäftigen. Dafür sollen sowohl DNA-basierte (direkte) als auch Pyrophosphat-basierte (indirekte) Methoden für die Detektion untersucht werden. Weiterhin soll geprüft werden, ob der DNA-interkalierende Farbstoff Berberin zukünftig für den LAMP-Nachweis verwendet werden kann. Bei den Pyrophosphat-abhängigen Methoden soll untersucht werden, ob das in der LAMP für die qualitative Detektion etablierte Hydroxynaphtholblau auch für eine quantitative Detektion eingesetzt werden kann. Im Vordergrund steht hierbei die Echtzeit- und Endpunktdetektion der LAMP in einem geschlossenen Reaktionssystem, um die LAMP als Schnelltest attraktiver zu machen. Ein abschließender Vergleich der unterschiedlichen Detektionsmethoden soll helfen, den richtigen Farbstoff in Abhängigkeit von der gewünschten Applikation zu finden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein iteratives Verfahren etabliert werden, mit dem neue Farbstoffe für die indirekte Detektion des Pyrophosphats in der LAMP identifiziert werden können. Als Grundlage sollen Metallionen-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe für einen Verdrängungsassay selektiert werden, die bei Akkumulation von Pyrophosphat eine Fluoreszenzverstärkung bewirken. Die Methode soll die komplexe Konzentrationsabhängigkeit zwischen den Signal-gebenden Komponenten analysieren können. Dafür soll im hohen Durchsatz und mit schneller Visualisierung unter simulierten oder enzymatischen Bedingungen ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Abschließend soll geprüft werden, ob die identifizierten Farbstoffe für eine spezifische Detektion des Pyrophosphats unter konventionellen Amplifikationsbedingungen verwendet werden können.

Die selektierten Farbstoffe sollen anschließend im dritten Teil für die Detektion des Pyrophosphats in einer Emulsion adaptiert werden. Das Ziel ist eine günstige und einfache Methode für die indirekte Detektion der LAMP, die zur digitalen Quantifizierung genutzt werden kann. Dafür wird untersucht, ob sich die einzelnen Mikroreaktionsräume fluoreszenzmikroskopisch in einer für die LAMP angepassten Emulsion analysieren lassen. Im

Vordergrund steht die Entwicklung einer stabilen und homogenen Emulsion, mit der eine Pyrophosphat-abhängige Klassifizierung positiver und negativer Reaktionen möglich ist. Damit soll eine Grundlage für die absolute Quantifizierung mithilfe digitaler LAMP gebildet werden.

Im letzten Teil der Arbeit soll eine neue isothermale Amplifikation durch die Verwendung der *Bst* DNA-Polymerase mithilfe einer spezifischen Modifikation der Primer entwickelt werden. Es wird untersucht, ob der Reaktionsmechanismus als Alternative zur Primer-lastigen LAMP eingesetzt werden kann. Ziel ist es hier, die Komplexität der Primer-abhängigen Amplifikation durch funktionelle Primer zu verringern. Durch die Optimierung der Effizienz soll die Reaktion abschließend für den Nachweis von Pathogenen verwendet werden können.

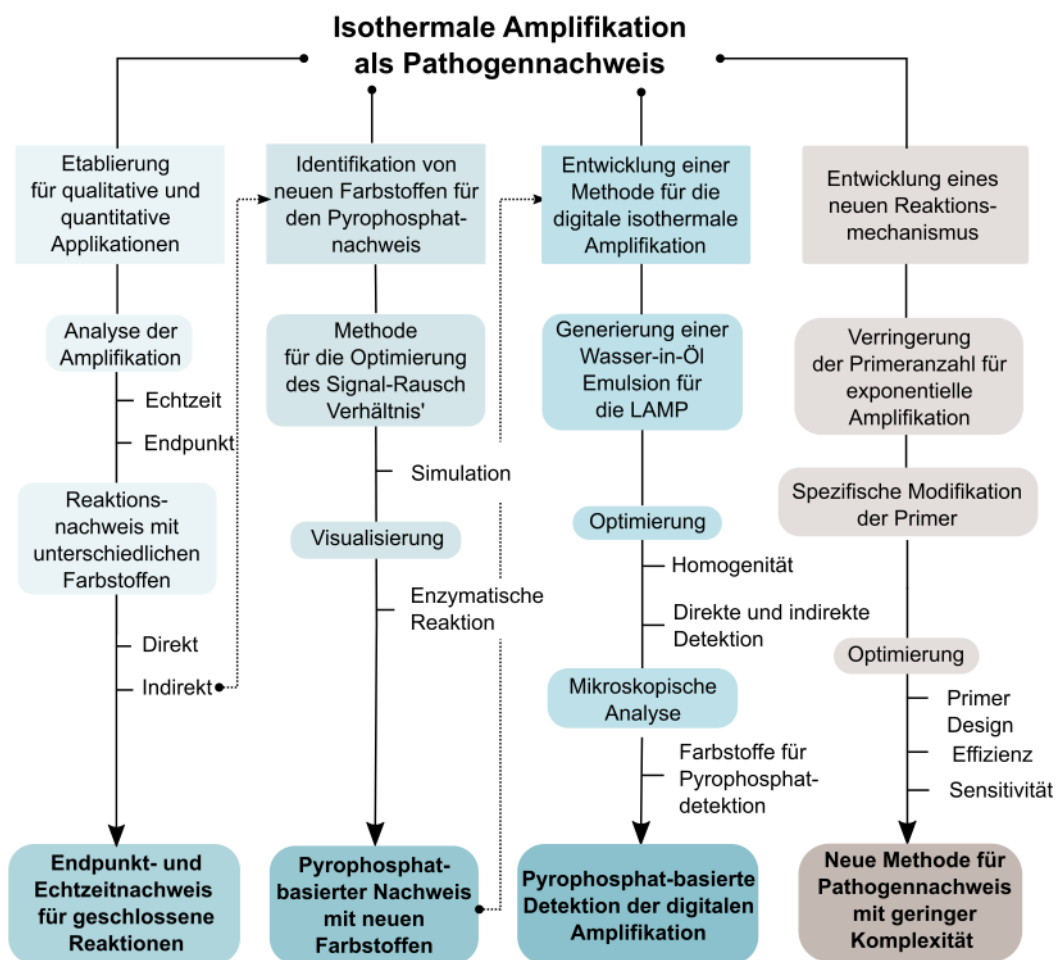


Abbildung 7: Das Fließschema beschreibt die vier Schwerpunkte der Dissertation mit der Vorgehensweise. Die Zielstellung ist die Erweiterung und Etablierung neuer Methoden für den Pathogennachweis mittels isothermale Amplifikation auf Basis der *Bst* DNA-Polymerase .

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Pathogene

Für die Etablierung der Methoden werden vier unterschiedliche Schadorganismen als Modellsysteme verwendet. Um die in der EPPO gelisteten Phytopathogene (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und *Potato Spindle Tuber Viroid*) für die Arbeit im Labor beziehen zu können, musste zuvor ein „Antrag auf Ermächtigung zur Einfuhr und/oder zum Verbringen von Schadorganismen, Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und anderen Gegenständen zu Versuchs-, Forschungs- und Züchtungszwecken“ (gemäß der Richtlinie 2008/61/EG) bei der zuständigen Pflanzenschutzbehörde eingereicht werden.

Verwendet wurde das *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd) als gefriergetrocknetes Positivmaterial (PV0064) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig (Deutschland), der Erreger *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms, NCPPB Nr. 2137 T) vom Julius Kühn-Institut in Kleinmachnow (Deutschland), der Erreger *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp, NCPPB Nr. 4032) vom DSMZ sowie *Escherichia coli* (*E. coli*, K12 Subtyp DH10B (+ Φ 80 Δ lacZM15, Katalog Nr.: C3020K) von New England Biolabs, Frankfurt am Main (Deutschland).

7.1.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, hatten alle eingesetzten Standardchemikalien den Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.A.) und werden hier nicht aufgelistet. Die Chemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Medien

Die Medien für die Bakterienkultivierung wurden gemäß der Angaben vom DSMZ angesetzt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Das Flüssigmedium für Cms bestand aus 10 g/l Trypton-Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Glukose +D und 5 g/l Kaliumchlorid (pH 7,2). Das Medium für Xhp wurde mit 5 g/l Pepton und 3 g/l Fleischextrakt (pH 7,0) angesetzt, für *E. coli* wurden 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Natriumchlorid (pH 7,5) verwendet. Für die Ausplattierung bzw. Vereinzelung auf Festmedien wurden zusätzlich 15 g/l Agar zugegeben.

Enzyme

Für die PCR wurde die DreamTaq DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Katalog Nr. EP0701) verwendet. Für die Reverse Transkription der PSTVd-RNA wurde die Maxima Reverse Transkriptase (M-MuLV RT) von Thermo Fisher Scientific (Katalog Nr. EP0742) genutzt. Die isothermale Amplifikation wurde mit der *Bst* DNA-Polymerase von New England Biolabs (Katalog Nr. M0538L) durchgeführt. Der für die Reverse Transkription erforderliche Ribonuklease-Inhibitor wurde von New England Biolabs (Katalog Nr. M0307S) bezogen.

Farbstoffe

In der Arbeit wurden die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Katalog Nr. S7563), EvaGreen (Biotium, Fremont, USA, Katalog Nr. 31000) und Berberinchlorid (Sigma-Aldrich, CAS Nr.: 633-65-8) sowie die Pyrophosphatbasierten Farbstoffe Hydroxynaphtholblau (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 165660-27-5), Calcein (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 154071-48-4), Calceinblau (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 54375-47-2), Alizarinrot S (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 130-22-3), Tetrazyklin (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 60-54-8), Doxyzyklin (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 10592-13-9) und Folsäure (Sigma Aldrich, CAS Nr.: 59-30-3) verwendet.

7.1.3 Primer

Alle in der Arbeit verwendeten PCR- und LAMP-Primer wurden in aufgereinigter Form (High Purity Salt Free, HPSF oder High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) von Eurofins Genomics in Ebersberg (Deutschland) bezogen. Sie wurden als 100 μ M Stammlösung in TE-Puffer (1 mM TRIS und 0,1 mM EDTA, pH 8 bei 25 °C) gelöst. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden 10 μ M Aliquots der Stammlösungen angefertigt und bei -20 °C gelagert.

PCR-Primer

Für den PCR-Nachweis wurden pathogenspezifische Primer genutzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Spezifische PCR Primer für PSTVd, Cms, Xhp und *E. coli*

Pathogen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Literatur
PSTVd	WeiBuch-F	CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG	(Weidemann und Buchta, 1998)
	WeiBuch-R	ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C	
Cms	Cms50-F	GAG CGC GAT AGA AGA GGA ACT C	(Mills et al., 1997)
	Cms50-R	CCT GAG CAA CGA CAA GAA AAA TAT G	
Xhp	Xcp1-F	ACG CGC TACC AAA AGG CAA AGA G	(Sulzinski et al., 1996)
	Xcp1-R	GAT CTG CGG TTG TCC TGA AGA TTG G	
<i>E. coli</i>	LZL-389	ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC	(Bej et al., 1991)
	LZR-653	GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA	

LAMP-Primer

Die LAMP-Primer für den Nachweis von PSTVd sind publiziert (Lenarčič et al., 2013) und in Tabelle 3 gelistet. Die LAMP-Primer für den Nachweis von Cms und Xhp wurden mit Hilfe der Software Primer Explorer V4.0 erstellt. Der FIP-Primer besteht aus dem F1c- und F2 Teil sowie der BIP-Primer aus dem B1c- und B2 Teil.

Tabelle 3: LAMP-Primer für den Nachweis von PSTVd, Cms und Xhp

Pathogen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
PSTVd	Nib-F3	AAA AAG GAC GGT GGG GAG
	Nib-B3	CCC CGA AGC AAG TAA GAT AG
	Nib-FIP	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG - GCC GAC AGG AGT AAT TCC
	Nib-BIP	GCT GTC GCT TCG GCT ACT AC - AGA AAA AGC GGT TCT CGG
	Nib-LF	GGT GAA AAC CCT GTT TCG G
	Nib-LR	CGG TGG AAA CAA CTG AAG C
Cms	Cms-JF-F3	CGT CCC TTG AGT GGA TGG T
	Cms-JF-B3	TTC GGC TCC AGA TGC CAA
	Cms-JF-FIP	TTG TGA TCC ACC GGG TAA ACC G - ACC GCC CGT ATA TTG AGA AC
	Cms-JF-BIP	TTC TGT CTC CTC TAG GGG AGG C - CAT CCA CCG TTT GCT CTT
	Cms-JF-LF	AAG ATG CTC GCG TCC AC
	Cms-JF-LR	ACG ATT CAA TCT CAT GTG ATT TCA A
	Xhp	Xhp-JF-F3
Xhp-JF-B3		AGC GAC GCG TAT CCG G
Xhp-JF-FIP		TTC CAG CAA CCA GGC GTG CG - AGA TCG TGC GTG GCA ACA A
Xhp-JF-BIP		GAG GCC AAG AAG GGT CGC CA - ACC GTG GTT TCC CAC AGC
Xhp-JF-LF		ATC CGA TCA CCA GCT TTG C
Xhp-JF-LR		CTG GGC GAA ATG AAC GCC GAG

Für Cms wurde als Zielsequenz die 16S-23S Intergenic Spacer Region (IGS) auf der chromosomalen DNA (NCBI Genbank Nr.: AM849034.1) für den spezifischen Nachweis ausgewählt, für Xhp wurde die Gyrase-Untereinheit B (NCBI Genbank Nr. EU498995.1) verwendet. Die von der Software generierten Primersequenzen wurden anschließend mit dem OligoAnalyzer 3.1 auf Hairpin- und Dimerbildung (Hetero- und Homodimer) untersucht. Die Spezifität wurde in der Arbeit mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information) gegen die „Nucleotide collection (nr/nt)“ Datenbank getestet (Tab. 12 und 13 im Anhang).

Hinge-Primer

Die neue isothermale Amplifikationsmethode (*Hinge Initiated Primer Dependent Amplification*, HIP) wurde zunächst mit PSTVd getestet und später mit *E. coli* (β -Galactosidase, lacZ Gen) als Templat optimiert. Die Hinge-Primer wurden in aufgereinigter Form (HPSF oder HPLC) von Purimex in Grebenstein (Deutschland) bezogen. Für die Hinge-Primer wurden verschiedene Modifikationen (*linker*) innerhalb der Sequenz integriert und deren Amplifikationseffizienz bestimmt (Tab. 4). Als Modifikation wurden entweder eine „abasische Stelle“ (AP, *abasic site*) oder „Hexaethylenglykol“ (HEG) verwendet und mit unmodifizierten Primern (um) verglichen. Für *E. coli* wurden zudem unterschiedliche Kombinationen mit Standard-Primern untersucht.

Tabelle 4: Hinge Primer für den Nachweis von PSTVd und *E. coli* mittels HIP. Die entsprechende Modifikation ist entweder eine abasic-Site (AP) als abasisches Furan bzw. dSpacer oder ein Hexaethylenglykol (HEG) als Spacer C12. Als Kontrolle wurden Primer ohne Modifikation (um) benutzt. HF bezeichnet den Hinge-Primer für die Vorwärts- und HR den Hinge-Primer für die Rückwärts-Orientierung in der Amplifikation.

Locus	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	
PSTVd	PSTVd-AP-HF	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG [<i>dSpacer</i>] CCG AAA CAG GGT TTT CAC C	
	PSTVd-AP-HR	GCT GTC GCT TCG GCT AC [<i>dSpacer</i>] TTC AGT TGT TTC CAC CG	
	PSTVd-HEG-HF	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG [<i>Spacer C12</i>] CCG AAA CAG GGT TTT CAC C	
	PSTVd-HEG-HR	GCT GTC GCT TCG GCT AC [<i>Spacer C12</i>] TTC AGT TGT TTC CAC CG	
	PSTVd-um-HF	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG CCG AAA CAG GGT TTT CAC C	
	PSTVd-um-HR	GCT GTC GCT TCG GCT AC TTC AGT TGT TTC CAC CG	
	<i>E. coli</i>	LZ-HF	CCA GCG CCC GTT G [<i>dSpacer</i>] CTC GGC GTT TCA TCT GTG
		LZ-HR	CGG TGA TGG TGC TGC [<i>dSpacer</i>] AGA TAA CTG CCG TCA CTC C
		LZL-389	ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC
		LZR-653	GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA
LZF-2		CTC GGC GTT TCA TCT GTG	
LZR-2		AGA TAA CTG CCG TCA CTC C	
LZF-0		TCG GTT ACG GCC AGG C	
LZR-0		AGG CGG TTT TCT CCG G	

Die generierten Primersequenzen wurden anschließend mit dem OligoAnalyzer 3.1 auf Hairpin- und Dimerbildung (Hetero- und Homodimer) untersucht. Die Spezifität wurde in der Arbeit mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information) gegen die „Nucleotide collection (nr/nt)“ Datenbank getestet.

7.1.4 Geräte

Alle in der Arbeit verwendeten Geräte, die nicht der Standardlaborausstattung entsprechen, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte mit Herstellerangabe

Applikation	Exakte Bezeichnung	Hersteller
Analyse der Gelelektrophorese	Fusion-FX7 Spectra Imager	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Fluorimeter	ESEQuant Tube Scanner (FAM/ROX)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fluorimeter	Qubit 2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop	Keyence BZ9000 (GFP, DAPI und TEXAS Red Filter)	Keyence, Osaka, Japan
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Kapillarelektrophorese	FragmentAnalyzer TM	Advanced Analytical, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplattenreader	iControl Infinite 200Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Real-time PCR	LighCycler® 480 Instrument II	Roche, Penzberg, Deutschland
Spektrophotometer	Nanodrop ND1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Thermocycler	PCR Thermocycler Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

7.1.5 Software

Für die Generierung und Analyse der Primer-Sequenzen, der Strukturvorhersage sowie der grafischen Ausgabe der Messergebnisse wurden nachfolgenden Programme verwendet:

- **PerlPrimer:** PCR-Primerdesign (<http://perlprimer.sourceforge.net>)
- **OligoAnalyzer 3.1:** Primeranalyse (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)
- **PrimerExplorer V4.0:** LAMP-Primerdesign (<http://primerexplorer.jp/e>)
- **mFOLD:** Strukturvorhersage von Nukleinsäuren (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>)
- **R Project:** Statistik und Erstellung von Abbildungen (<https://www.r-project.org/>)
- **BLAST:** Sequenzanalyse (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- **ImageJ:** Bildverarbeitung (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

7.2 Methoden

7.2.1 Nukleinsäureextraktion und Quantifizierung

Kultivierung

Die Bakterien wurden in den entsprechenden Flüssigmedien (s. Abschnitt 7.1.2) in einem Inkubator bei 24 °C für Cms, 26 °C für Xhp und 37 °C für *E. coli* in einem Erlenmeyerkolben bis zu einer optischen Dichte ($OD_{750\text{ nm}}$) von 0,2 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde anschließend bis zu einer Stufe von 10^{-6} seriell verdünnt und auf dem entsprechenden Festmedium ausplattiert. Nach ein bis fünf Tagen wurden die Kulturen gezählt und auf Kontamination überprüft. Von jeweils einer Kolonie wurde anschließend erneut eine Flüssigkultur angesetzt, die dann für die DNA-Extraktion genutzt wurde.

RNA-Extraktion

Das PSTVd wurde als gefriergetrocknetes Blattmaterial geliefert und direkt für die RNA-Extraktion verwendet. Die Extraktion und Aufreinigung der PSTVd-RNA wurde entsprechend der Anleitung des Fertigsystems „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die isolierte RNA wurde qualitativ durch Absorptionsmessungen und durch die Kapillarelektrophorese überprüft. Anschließend erfolgte eine spektrophotometrische Quantifizierung mit dem Nanodrop ND1000. Die RNA wurde umgehend weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

DNA-Extraktion und Aufreinigung

Die Extraktion und Aufreinigung der genomischen DNA aus einer Bakteriensuspension wurde entsprechend der Anleitung des Fertigsystems „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) durchgeführt. Die Qualität der isolierten DNA wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND1000 bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte fluorometrisch mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer.

Qualitative und Quantitative Analyse

Die Überprüfung der RNA-Integrität wurde kapillarelektrophoretisch mit dem Fragment-Analyzer TM und dem Fertigsystem „High Sensitivity RNA Analysis Kit“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Auftrennung der isolierten RNA wird der *RNA Quality Number*-Wert (RQN) als Maß für die RNA-Qualität bestimmt. Dieser liegt zwischen eins und zehn, wobei für vollständig degradierte und zehn für komplett intakte RNA steht. Die qualitative Analyse der RNA und DNA erfolgte spektrophotometrisch mit dem Nanodrop durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm.

Die Quantifizierung der RNA und DNA wurde mit den Fertigsystemen „Qubit® dsDNA HS Assay“ und „Qubit® RNA BR Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anleitung durchgeführt. Die Kopienzahl (Genom-Äquivalente) wurde anhand der

bekanntem Genomgrößen und der Gleichung 7.1 berechnet. Die dafür benutzten Genomgrößen wurden aus der NCBI „Nucleotide Database“ entnommen. Für Cms (AM849034.1) wurden daher 3,26 Mbp, für Xhp (geschätzt von ATCC 33913 NC_003902) 5,08 Mbp, für *E. coli* (CP000948.1) 4,67 Mbp und für PSTVd (AY937179.1) 361 bp verwendet.

$$\text{Anzahl der Kopien} = \frac{\text{DNA Menge [g]} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} [\text{mol}^{-1}]}{\text{Genomgröße [bp]} \cdot 650 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1}]} \quad (7.1)$$

Demnach entsprechen 1 ng genomische DNA etwa $2,8 \cdot 10^5$ Genom-Äquivalenten bei Cms, $1,8 \cdot 10^5$ bei Xhp, $2 \cdot 10^5$ bei *E. coli* und $2,6 \cdot 10^9$ bei PSTVd.

7.2.2 Reverse Transkription der PSTVd-RNA

Reverse Transkription

Die PSTVd-RNA musste für die nachfolgenden Untersuchungen in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde die MMuLV Reverse Transkriptase und ein PSTVd-spezifischer Primer verwendet. Die reverse Transkription (RT) wurde in einem Volumen von 20 μl mit 0,5 μg PSTVd-RNA in einfachen RT-Puffer mit 5 U Reverser Transkriptase, 0,5 mM dNTP, 8 U RNase Inhibitor und 5 μM des WeiBuch-R Primers (s. Tab. 2) angesetzt. Da die PSTVd-RNA eine sehr stabile Sekundärstruktur aufweist, wurde die RNA zuvor bei 70 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend umgehend bei 4 °C gelagert. Der gesamte RT-Ansatz wurde dann bei 50 °C für eine Stunde inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms wurde bei 80 °C für 5 Minuten durchgeführt. Die cDNA wurde anschließend aufgereinigt oder direkt in der PCR oder LAMP verwendet.

7.2.3 PCR- und LAMP-Reaktion

Aufreinigung von cDNA- und PCR-Produkten

Für einige Versuche wurde die cDNA des PSTVD als Templat für die nachfolgenden Reaktionen genutzt. Dazu wurde die cDNA zunächst aufgereinigt, indem die Primer, dNTP, Enzyme und Puffer über ein Säulen-basiertes Fertigsystem entfernt wurden. Verwendet wurde hierfür das „MSB® Spin PCRapace Clean Up Kit“ (Strattec, Birkenfeld, Deutschland).

Durchführung einer PCR-Reaktion

Für die standardisierte Durchführung einer PCR-Reaktion (25 μl) mit einem bestimmten Templat (PSTVd, Cms, Xhp oder *E. coli*) und den entsprechenden Primern aus Tabelle 2 setzte sich der Mastermix wie folgt zusammen: 0,5 mM der beiden PCR-Primer, 0,5 mM dNTP, 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase und einfachen *Taq*-Puffer mit Wasser gemischt. Die Positivreaktion wurde mit 2 μl Templat-DNA und die Negativreaktion mit 2 μl Wasser angesetzt.

Das Programm für die PCR wurde an die optimalen Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer angepasst. Die PCR wurde mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C gestartet, gefolgt von 25-32 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 Minute, Primer-Annealing bei der entsprechenden Temperatur (PSTVd: 62 °C, Cms: 61 °C, Xhp: 72 °C und *E. coli*: 60 °C) und Verlängerung bei 72 °C. Abschließend wurde die PCR bei 72 °C für 5 Minuten beendet. Die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im Thermocycler durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese oder der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Durchführung einer LAMP

Die LAMP-Reaktion kann in Volumina zwischen 10 und 25 µl durchgeführt werden. Die Reaktion wurde in einfachen ThermoPol Puffer (New England Biolabs) mit 1,4 mM dNTP, 0,8 M Betain, 8 U *Bst* DNA-Polymerase, 1,6 µM FIP- und BIP-Primer, 0,8 µM LF- und LR-Primer, 0,1 µM F3- und B3-Primer (Tab. 3), 6 mM Magnesiumchlorid und Templat-DNA für die Positivreaktion oder Wasser für die Negativreaktion angesetzt. In Abhängigkeit der gewählten Detektion wurden 0,5 mM Manganchlorid mit 25 µM Calcein, 120 µM Hydroxynaphtholblau, 180 µM Berberin, 0,5-fach SYBR Green oder 0,5-fach EvaGreen dazugegeben. Die LAMP-Reaktionen wurden in einem 0,2 ml PCR-Streifen mit acht Reaktionsgefäßen angesetzt und zusätzlich mit 15 µl Mineralöl abgedeckt, um die Evaporation während der Reaktion im ESEQuant Tube Scanner zu verhindern. Alle Reaktionen wurden bei 60-67 °C inkubiert. Die Detektion der Reaktion erfolgte durch die visuelle Analyse im Tages- oder UV-Licht als Endpunktmessung oder in Echtzeit durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz von Calcein, SYBR Green, EvaGreen oder Berberin im FAM-Kanal (Anr.: 470 / Em: 520 nm). Hydroxynaphtholblau wurde im ROX-Kanal (Anr.: 565 / Em: 625 nm) detektiert.

7.2.4 Nachweis der PCR- und LAMP-Reaktion

Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA nach der PCR oder der LAMP erfolgte in einem 2,5% Agarosegel bei 70-85 mV für 35-50 Minuten. Für die Detektion der DNA in einem 25 ml Gel wurden 0,5 µl DNA Stain Clear G (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) nach dem Aufkochen der Agarose in einfachem TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) zugegeben. Der eingesetzte Größenstandard ist der pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker (Thermo Fisher Scientific). Der Nachweis der Banden erfolgte unter UV-Licht im Fusion-FX7 Spectra Imager.

Qualitative Analyse der LAMP

Die Endpunktdetektion wurde mit Hilfe von Fotoaufnahmen der Reaktionsgefäße nach der Reaktion durchgeführt. In Abhängigkeit des Farbstoffs wurden die Reaktionsgefäße auf einem UV-Tisch platziert und ein Foto gemacht.

Quantitative Analyse der LAMP

Die Echtzeitdetektion mit den entsprechenden Farbstoffen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert und für die Quantifizierung herangezogen (Abb. 8). Die einfachste Methode ist die Festlegung eines Schwellenwertes (*threshold time*, T_t) der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Zeit bei Erreichen dieses Schwellenwertes wird dann für den Vergleich mit anderen Proben genutzt oder kann zur Darstellung der Korrelation zur eingesetzten Templatmenge eingesetzt werden.

Ein weiterer Ansatz stellt die mathematische Methode dar, bei der der Schwellenwert („Time-to-Positivity“, T_p) anhand des Grundsignals und des Signalanstiegs berechnet wird (Subramanian und Gomez, 2014). Die Analyse der erhaltenen Daten konnte mithilfe eines R-Skriptes für die automatisierte Analyse und grafische Ausgabe umgesetzt werden. Für die Bestimmung des Detektionsbereichs wurden die T_t - bzw. T_p -Werte gegen die Templat-Menge aufgetragen.

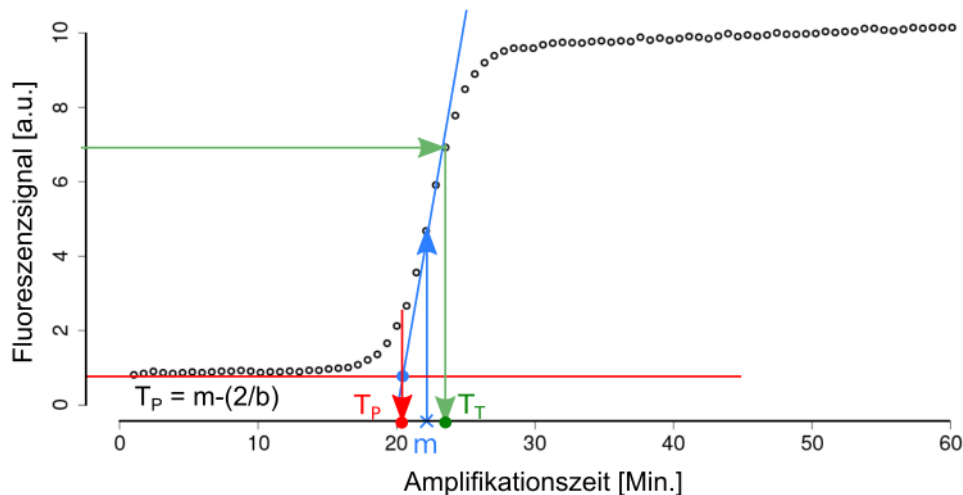


Abbildung 8: Die Auswertung der Echtzeit-LAMP kann über die Festlegung eines konstanten Wertes für das Erreichen einer Fluoreszenz für alle Messungen erfolgen (grüne Pfeile). Hierbei wird die Schwellenwertzeit (T_t) bestimmt. Alternativ kann mit Hilfe einer mathematische Modellierung der T_p -Wert ermittelt werden. Dafür wird der Schnittpunkt der Geraden im maximale Anstieg b ($\Delta FU/\Delta t$) mit der Basislinie (rot) zum Zeitpunkt m (blau) bestimmt.

7.2.5 Weiterentwicklung der quantitativen und qualitativen LAMP-Detektion

Einfluss von Berberin auf die *Bst* DNA-Polymerase-Aktivität

Da bei der Etablierung von Endpunkt- und Echtzeitnachweisen für die Pathogene Berberin als DNA-interkalierender Farbstoff etabliert werden sollte, musste vorab geprüft werden, ob der Farbstoff die Aktivität der *Bst* DNA-Polymerase beeinflusst. Dafür wurden mehrere LAMP-Reaktionen zum Nachweis von PSTVd mit 40 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM , 120 μM , 140 μM , 160 μM , 180 μM Berberin im ESEQuant Tube Scanner (FAM-Filter,

Anr.: 470 nm / Em.: 520 nm) für 60 Minuten bei 65 °C durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch die Bestimmung der Amplifikationsrate (Signalanstieg/Zeitintervall). Die Fotoaufnahmen der Reaktionsgefäße hielten die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht (312 nm) nach 60 min fest.

Etablierung der LAMP für Cms und Xhp

Da für den Nachweis der beiden Bakterien keine LAMP-Primer in der Literatur zu finden waren, musste die LAMP Reaktion mit den selbst entworfenen Primern zunächst optimiert werden. Dafür wurde eine typische LAMP-Reaktion mit SYBR Green zur Detektion angesetzt und durch Anpassung der Temperatur oder der Mg^{2+} -Konzentration das Auftreten unspezifischer Amplifikation aufgrund von Primer-Artefakten minimiert. Anschließend wurden die Nachweise mit Berberin und HNB zur Bestimmung der Nachweisgrenzen in der Echtzeit- und Endpunktdetektion durchgeführt.

Fluorimetrische Messungen mit Hydroxynaphtholblau (HNB)

Für die Detektion der LAMP mittels HNB in Echtzeit wurden Absorptions- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Abhängigkeit der Hydroxynaphtholblau-Fluoreszenz von der Konzentration des Mg^{2+} sowie des Pyrophosphats wurde untersucht. Dazu wurden zunächst Absorptionsspektren von 120 μ M HNB mit 2 mM Magnesiumchlorid und zusätzlich mit 2 mM Natriumpyrophosphat bei pH 8,8 im Mikrotiterplattenreader zwischen 400 und 700 nm aufgenommen. Mit den gleichen Proben wurde nach Anregung bei 560 nm die Fluoreszenzintensität bei 625 nm gemessen. In anschließenden Experimenten wurde durch die Variation von Mg^{2+} (4-10 mM) die Fluoreszenz im ESEQuant Tube Scanner (ROX Kanal, Anr.: 560 nm / Em.: 625 nm) detektiert.

7.2.6 Identifizierung neuer Farbstoffe für die Pyrophosphatdetektion

Detektion von Pyrophosphat durch Metallionen-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Identifizierung neuer Fluoreszenzfarbstoffe zum Nachweis von Pyrophosphat (PPi) wurde ein iteratives Screening-Verfahren entwickelt. Hierbei wurden zunächst Farbstoffe selektiert, die eine Affinität zu bivalenten Metallionen aufweisen und damit auch eine Voraussetzung für die LAMP-Reaktion erfüllen. Anschließend wurde der Effekt von Mn^{2+} und Mg^{2+} auf die Fluoreszenz der selektierten Farbstoffe untersucht. Mögliche Kandidaten wurden in der LAMP und PCR auf eine inhibitorische Wirkung geprüft. Farbstoffe, die ein Fluoreszenzquenching bei Mn^{2+} zeigten und die Polymerasen nicht hemmten, wurden anschließend in einem Mikrotiterplattenscreening mit Simulation der Reaktionsbedingungen hinsichtlich des Signal-Rauschverhältnis' (SNR) in Anwesenheit von PPi optimiert. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der optimierten Konzentrationen in der enzymatischen Reaktion. Schließlich wurde der detektierbare Konzentrationsbereich von PPi mit den selektierten Farbstoffen bestimmt.

1. **Selektivität von Mn^{2+} gegenüber anorganischem PPi und dNTP:** Zur Untersuchung der Selektivität wurden 25 μ M Calcein und 0,5 mM Manganchlorid bei ansteigender dNTP- und PPi-Konzentration (0, 0,6 und 1,0 mM) sowie der Kombination aus beidem verwendet. Um den Einfluss von Mg^{2+} zu analysieren, wurden die Fluoreszenzintensitäten aller Proben mit bzw. ohne 6 mM Magnesiumchlorid gemessen. Die Fluoreszenz wurde nach einer Equilibrierungszeit von 20 Minuten bei 25 °C im ESEQuant Tube Scanner (FAM Kanal: Anr.: 470 / Em.: 520 nm) in einem 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) detektiert.
2. **Metallionen-abhängige Fluoreszenz ausgewählter Farbstoffe:** Das Screeningverfahren für Mn^{2+} -abhängige Fluoreszenzfarbstoffe zum Nachweis von PPi in der Amplifikationsreaktion wurde vorab mit einer größeren Auswahl an Farbstoffen durchgeführt. Dafür wurde der Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf das Fluoreszenzverhalten untersucht.

Die Farbstoffe Calcein, Calceinblau und Folsäure wurden dafür in 0,1 M Natronlauge gelöst und anschließend eine Lösung von 2 mM in Wasser auf den pH 8,8 eingestellt. Die Farbstoffe Tetrazyklin, Doxzyzyklin und Alizarinrot S wurden direkt in Wasser gelöst und auf den pH 8,8 eingestellt. Die Farbstofflösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Manganchlorid, Magnesiumchlorid und Natriumpyrophosphat wurden in einer Konzentration von 10 mM in Wasser angesetzt.

Die Fluoreszenzintensität aller Farbstoffe wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Corning® 96 Well Platten, transparenter Boden, Sigma Aldrich) im Mikrotiterplattenreader gemessen. Für die LAMP-Reaktionsbedingungen wurden 25 μ M Farbstoff ohne Metallionen in 100 μ l einfachem Thermopol-Puffer als Referenzprobe genutzt. Die zweite Probe enthielt neben dem Farbstoff zusätzlich 5 mM Magnesiumchlorid,

die dritte Probe 0,5 mM Manganchlorid. Die vierte Probe wurde mit einer Mischung beider Metallionen angesetzt. Für die PCR-Reaktionsbedingungen wurden 2 mM Magnesiumchlorid und 0,1 mM Manganchlorid verwendet.

Um das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) zu bestimmen wurde eine fünfte Probe mit zusätzlich 1,4 mM Natriumpyrophosphat bei der LAMP bzw. 0,5 mM bei der PCR angesetzt. Anschließend wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Messungen für Tetrazyklin, Doxyzyklin (Anr.: 370 nm / Em.: 520 nm), Alizarinrot S (Anr.: 535 nm / Em.: 645 nm), Calcein (Anr.: 488 nm / Em.: 525 nm), Calceinblau (Anr.: 322 nm / Em.: 435 nm) und Folsäure (Anr.: 365 nm / Em.: 450 nm) wurden im Mikrotiterplattenreader durchgeführt. Das SNR wurde anschließend aus den Fluoreszenzsignalen zwischen der Probe mit und ohne Natriumpyrophosphat ermittelt.

- 3. Untersuchung zur Inhibition der *Taq* und *Bst* DNA-Polymerase:** Die Farbstoffe mit dem höchsten SNR wurden ausgewählt und zusammen mit Manganchlorid in der enzymatischen Reaktion auf Inhibition untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen von Alizarinrot S und Tetrazyklin (0 / 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,25 und 0,5 mM) sowie Manganchlorid (0 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 0,75 und 1 mM) in LAMP- und PCR-Reaktionen zum Nachweis von 0,1 ng PSTVd-cDNA eingesetzt. Die amplifizierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.
- 4. Screening zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnis':** Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Calcein (Referenzfarbstoff), Tetrazyklin und Alizarinrot S wurden bei pH 8,8 in einem Bereich von 300 bis 850 nm im Mikrotiterplattenreader aufgenommen. Für die Fluoreszenzspektren wurden die Absorptionsmaxima des jeweiligen Farbstoffs für die Anregung verwendet. Das kombinatorische Screening für die Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Mg^{2+} , Mn^{2+} und Farbstoff in den simulierten LAMP- und PCR-Reaktionen wurde in jeweils einer 96-Well Mikrotiterplatte und dem Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer durchgeführt. Jede Kavität der Mikrotiterplatte enthielt eine bestimmte Kombination der Komponenten. Die untersuchten Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der im Screening untersuchten Farbstoffkonzentrationen und Wellenlängen sowie der eingesetzten Konzentrationen von Manganchlorid und Magnesiumchlorid für die LAMP und die PCR

Komponente	Konzentrationen [μM]	Anregung [nm]	Emission [nm]
Calcein	10, 25 und 50	495	525
Tetrazyklin	100, 250 und 500	370	520
Folsäure	25, 50 und 75	365	450
Calceinblau	10, 25 und 50	322	435
Doxyzyklin	100, 250 und 500	370	520
Alizarinrot S	50, 100 und 250	535	645
$MnCl_2$ (LAMP)	0, 250, 500, 750 und 1000		
$MnCl_2$ (PCR)	0, 100, 150, 200 und 250		
$MgCl_2$ (LAMP)	4000, 6000, 8000		
$MgCl_2$ (PCR)	0, 1000, 2000		

Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität der Proben mit und ohne Natriumpyrophosphat (LAMP: 1,0 mM / PCR: 0,5 mM). Das SNR wurde anschließend durch Intensitätsplots (Heatmaps) visualisiert, wobei die Farbkodierung von weiß (niedriger Wert) bis schwarz (höchster Wert) reicht (Abb. 9). Die grafische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwarepakets R umgesetzt.

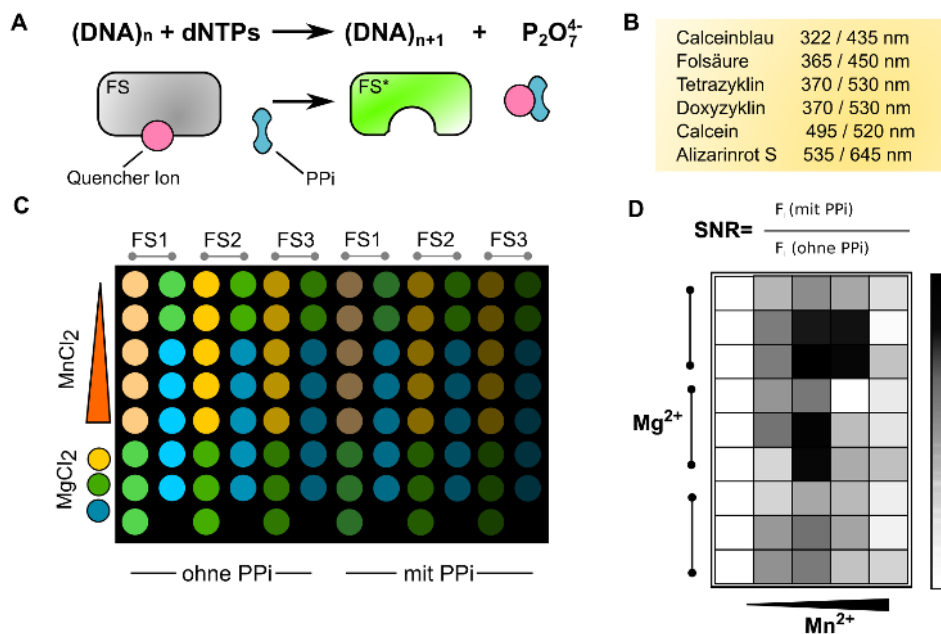


Abbildung 9: (A) Prinzip der Verdrängungsreaktion zwischen dem Pyrophosphat (PPi) und dem Quencherion mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FS). (B) Selektierte Farbstoffe mit Anregungs- und Emissionsmaxima. (C) Probenverteilung in der Mikrotiterplatte für das Screening mit drei Farbstoffkonzentrationen (FS), drei Mg^{2+} - und fünf Mn^{2+} -Konzentrationen. Jede Kavität repräsentiert eine Kombination aus allen Komponenten mit und ohne PPi für die Simulation der Endpunktsituation der LAMP und PCR. (D) Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität aus positiver (mit PPi) und negativer (kein PPi) Reaktion wird als SNR durch eine Heatmap visualisiert.

Nach dem Screening wurden die Kombinationen mit den höchsten SNR unter enzymatischen Bedingungen überprüft. Dafür wurden für jede Kombination jeweils eine LAMP- bzw. PCR-Reaktion mit und ohne Templat-DNA (PSTVd-cDNA) durchgeführt und die Fluoreszenz des entsprechenden Farbstoffs im Endpunkt gemessen. Das resultierende SNR wurde anschließend mit den Werten aus dem Screening verglichen.

5. Pyrophosphat-abhängige Detektion mit Tetracyclin und Alizarinrot S:

Nachdem die optimale Konzentration der beteiligten Komponenten gefunden worden war, konnten PPI-abhängige Fluoreszenzmessungen mit einem kompetitiven Farbstoff durchgeführt werden. Dafür wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Natriumpyrophosphats (0 bis 2 mM für die LAMP, 0 bis 0,5 mM für die PCR) mit Tetracyclin (Anr.: 350 / Em.: 525 nm), Alizarinrot S (Anr.: 530 / Em.: 645 nm) bzw. Calcein (Anr.: 490 / Em.: 525 nm) in einem Volumen von 50 μ l/Kavität in der Mikrotiterplatte gemessen.

7.2.7 Detektion von Pyrophosphat in einer Emulsion

Generierung der Emulsion mit angepasster disperser Phase

Für den Nachweis von PPI in einer Wasser-Öl-Emulsion wurde zunächst die Stabilität und Homogenität der generierten Emulsion optimiert. Die Emulsion bestand aus einer dispersen Phase mit allen Reaktionskomponenten für die LAMP sowie der kontinuierlichen Phase mit dem kommerziell erhältlichen Öl von Biorad (Abb. 10 A).

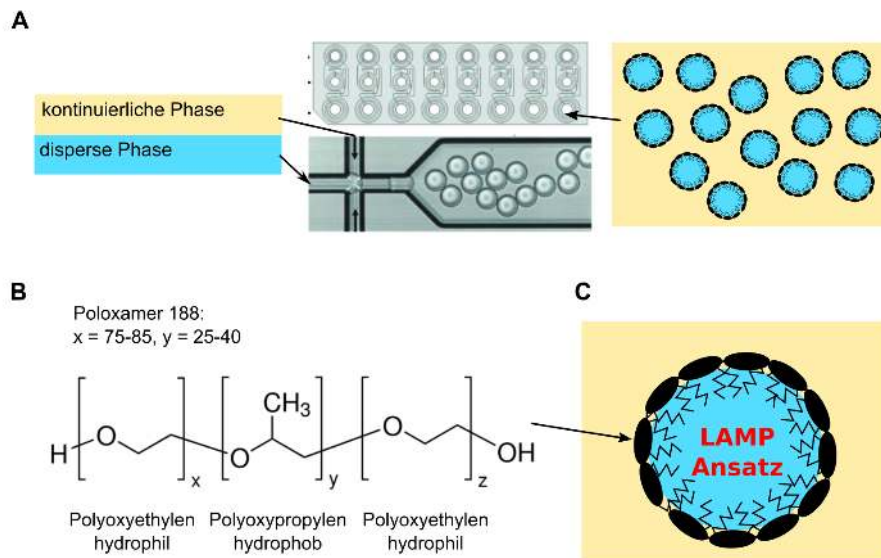


Abbildung 10: (A) Generierung einer Emulsion durch Vermischen der dispersen und kontinuierlichen Phase in einem Chip (Quelle: DG8™ Cartridge, www.Biorad.com) mithilfe eines Emulgators zur Stabilisierung der Grenzfläche. (B) Struktur des Emulgators Poloxamer 188 (Triblockcopolymer) und (C) Reaktionsraum mit schematischer Darstellung der Grenzfläche und dem integrierten Triblockcopolymer.

Als kontinuierliche Phase wurde das „QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen“ (HFE-7500) genutzt. Die Generierung der Emulsion erfolgte in einer Kartusche (DG8™ Cartridges for QX200™/QX100™ Droplet Generator) im QX200™ Droplet Generator (Biorad). Anschließend wurde die generierte Emulsion mikroskopisch analysiert. Dafür wurden 4 μl der Emulsion auf einen Glasobjektträger mit Vertiefung überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Bestimmung der Homogenität wurden die Tröpfchendurchmesser mit Hilfe der Software „ImageJ“ über die Bestimmung der Fläche kalkuliert. Die Tröpfchen am Rand der Aufnahmen wurden dabei nicht berücksichtigt. Mit den Tröpfchendurchmessern wurde anschließend eine Häufigkeitsverteilung erstellt.

- 1. Vergleich der LAMP-Emulsion und ddPCR-Emulsion:** Die Homogenität der für die LAMP angepassten Emulsion wurde mit der originalen Emulsion von BioRad verglichen. Für die fluorimetrische Untersuchung der LAMP-Emulsion wurde der dispersen Phase 100 ng dsDNA (*E. coli*) und SYBR Green zugefügt. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen erfolgten mit dem Keyence BZ 9100 Fluoreszenzmikroskop (GFP-Filter).
- 2. Optimierung der Emulsion für die LAMP:** Die Optimierung der dispersen Phase zur Stabilisierung der Emulsion wurde mit dem Poloxamer 188 (Pluronic F 68) durchgeführt (Abb. 10 B). Hierbei wurde der Anteil des Poloxamers von 0 bis 2% (v/v) variiert und die Homogenität der Emulsion über die Hellfeldaufnahmen mikroskopisch analysiert.
- 3. Nachweis von Pyrophosphat in der Emulsion:** Nach der Optimierung wurden die Farbstoffe für den Nachweis von Pyrophosphat unter LAMP-Bedingungen (einfachem Thermopolpuffer, 1,5% Poloxamer 188 und 0,8 M Betain) in der Emulsion eingesetzt. Verwendet wurden 0,05 mM Calcein mit 0,5 mM Mn^{2+} , 0,1 mM Tetrazyklin und 0,75 mM Mn^{2+} , 0,05 mM Alizarinrot S und 0,75 mM Mn^{2+} sowie 0,12 mM HNB. Für die Simulation der LAMP-Reaktion wurden zu allen Reaktionen 6 mM Magnesiumchlorid und 2 mM Natriumpyrophosphat zugefügt. Die Kontrolle erfolgte ohne Pyrophosphat. Die Emulsionen für die positive und negative Reaktion wurden getrennt generiert und im Anschluss für die fluoreszenzmikroskopische Analyse auf den Glasobjektträger gemischt. Für die Charakterisierung der generierten Emulsion wurde die Homogenität und Morphologie der Tröpfchen zunächst anhand von Hellfeldaufnahmen mit dem Mikroskop (BZ-9000, Keyence) ausgewertet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden für Calcein mit dem GFP-Filter (Anr.: 472 nm und Em.: 520 nm), für Alizarinrot S und Hydroxynaphtholblau mit dem Texas Red-Filter (Anr.: 562 nm und Em.: 624 nm) sowie für Tetrazyklin mit dem DAPI-Filter (Anr.: 377 nm und Em.: 447 nm) angefertigt.

7.2.8 Etablierung der Hinge-Initiated Primer Based Amplification

Zunächst wurden Primer für den Nachweis von PSTVd und *E. coli* generiert (Tab. 4). Die Hinge-Primer PSTVd-HF und -HR wurden anhand der Sequenz (Genbank: AY937179.1) ausgewählt. Bei diesen Hinge-Primern wurde sowohl die abasische Stelle (AP, dSpacer) als auch die Hexaethylenglykol-Struktur (HEG, SpacerC12) als Linker integriert. Als Kontrolle wurden die Hinge-Primer ohne Linker (um) synthetisiert.

Die Hinge-Primer für den Nachweis von *E. coli* wurden anhand der DNA-Sequenz (Genbank: CP000948.1) nur mit der abasische Stelle als Linker synthetisiert. Der vordere Sequenzabschnitt des Hinge-Primers muss dabei revers komplementär zur Hybridisierungsregion auf der Zielsequenz sein. Der Sequenzabschnitt nach dem Linker ist komplementär zur Zielsequenz. Die einzelnen Primer-Abschnitte wurden analog zur PCR mit Hilfe der Software „Perl Primer“ und „OligoAnalyzer3.1“ für einen Temperaturbereich zwischen 60 und 65 °C generiert. Anschließend wurden die Primer auf Homo- und Heterodimerbildung geprüft.

Jede Reaktion wurde in einem Volumen von 12,5 μ l angesetzt und enthielt einfachen Thermopol Puffer, 6 mM Magnesiumchlorid, 0,8 M Betain, 1 mM dNTP, 8 U *Bst* 2.0 WarmStart DNA-Polymerase, 0,8-fach SYBR Green sowie die entsprechenden Hinge-Primer. Die Reaktion wurde in Abhängigkeit des jeweiligen Experiments für 60 bis 120 Minuten im LightCycler 480 oder dem ESEQuant Tube Scanner bei 65 °C inkubiert und die Fluoreszenz im FAM-Kanal kontinuierlich detektiert. Für die unterschiedlichen Versuchsteile wurden folgende Primerkonzentrationen eingesetzt:

1. **Vergleich PSTVd-HIP und -LAMP:** HIP: 1,0 μ M PSTVd-AP-HF und PSTVd-AP-HR (Tab. 4). LAMP: 0,1 μ M Nib-F3/B3, 0,8 μ M Nib-Lf/Lr sowie 1,6 μ M Nib-FIP/BIP (Tab. 3). Der Versuch wurde mit 5 ng PSTVd-cDNA für die Positivkontrolle oder Wasser für die Negativkontrolle angesetzt. Die amplifizierte DNA wurde durch die kapillarelektrophoretische Auftrennung im Fragment Analyzer mithilfe des „DNF-915 dsDNA 915 Reagent Kits“ (Advanced Analytical) analysiert.
2. **Vergleich der Linker-Modifikationen:** Untersucht wurden jeweils 1,0 μ M der Hinge-Primer mit dSpacer (PSTVd-AP-HF/HR), HEG-Linker (PSTVd-HEG-HF/HR) und ohne Modifikation (PSTVd-um-HF/HR) in Kombination mit 1,0 μ M der korrespondierenden Vorwärts- oder Rückwärtsprimer der gleichen Modifikation, der Nib-FIP und Nib-BIP LAMP-Primer sowie 0,2 μ M der äußeren LAMP-Primer (Nib-F3 and Nib-B3). Der Versuch wurde mit 5 ng PSTVd-cDNA für die Positivkontrolle oder Wasser für die Negativkontrolle angesetzt. Die Analyse erfolgte durch die Bestimmung des Tp-Werts und dessen grafische Darstellung als Heatmap.
3. **Analyse der Reaktionskinetik in unterschiedlichen Kombinationen:** Das Experiment wurde mit sechs positiven (5 ng *E. coli*-DNA) und negativen (ohne Template) Proben durchgeführt. Eingesetzt wurden 1,0 μ M LZ-HF und -HR sowie 0,2 μ M

LZL-389 und LZR-653 Primer in unterschiedlichen Kombinationen (Tab. 7). Die Reaktion wurde im LightCycler 480 im FAM-Kanal detektiert. Die HIP-Reaktionen wurden hinsichtlich der Echtzeitdaten und den resultierenden Schmelzkurven ausgewertet. Dafür wurden die Proben zunächst bei 97 °C für eine Minute inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten bei 4,8 °C je Sekunde auf 55 °C heruntergekühlt, um sie dann mit 0,05° C je Sekunde auf 97 °C zu erhitzen. Das detektierte Fluoreszenzsignal wurde als Schmelzkurve dargestellt.

Tabelle 7: Verwendete Kombinationen für die Variation der Hinge-Primer für die Analyse der Kinetik.

Kombination	verwendete Primer
	Symmetrische HIP
1	LZ-HF + LZ-HR + LZL-389 + LZR-653
2	LZ-HF + LZ-HR
	Asymmetrische HIP
3	LZ-HF + LZL-389 + LZR-653
4	LZ-HR + LZL-389 + LZR-653
5	LZ-HF + LZR-653
6	LZ-HR + LZR-389
7	LZL-389 + LZR-653

4. **Variation von Magnesium:** Magnesiumchlorid wurde zwischen 4 und 10 mM eingesetzt. Die getesteten Primerkombinationen bestanden aus 1 μ M LZ-HF und -HR, 1 μ M LZ-HF mit 0,2 μ M LZL-389 und LZR-653 sowie 1 μ M LZ-HR mit 0,2 μ M LZL-389 und LZR-653. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung des T_p -Werts.
5. **Variation der Primerkonzentration:** Die Konzentration der LZ-HF und -R Primer wurde zwischen 0,8 und 1,4 μ M variiert. Das Experiment wurde mit denselben Primerkombinationen wie zuvor durchgeführt (Punkt: 4). Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung des T_p -Werts.
6. **Einfluss der Amplifikationslänge:** Der Versuch wurde mit vier Kombinationen, bestehend aus 1,2 μ M der zwei LZ-HF und -HR Primer mit 0,2 μ M der Primer LZL-389 und LZR-653, LZF-2 und LZR-2 sowie LZF-0 und LZR-0 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung des T_p -Werts.
7. **DNA-abhängige Reaktion:** Die Menge von *E. coli* dsDNA wurde seriell von 10^{10} auf 10^4 Genomäquivalente/ μ l verdünnt und eine HIP-Reaktion für jede Verdünnung angesetzt. Die Primerkonzentrationen waren 1,0 μ M des LZ-HR, 0,2 μ M des LZF-0 Primers und 0,2 μ M des LZR-653 Primers. Die Mg^{2+} -Konzentration betrug insgesamt 4 mM. Die Ansätze wurden für 65 °C im LightCycler 480 für 60 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der Sensitivität erfolgte durch die Bestimmung des T_p -Werts, welcher gegen die eingesetzte Templatmenge aufgetragen wurde.

8 Ergebnisse

8.1 Weiterentwicklung der quantitativen und qualitativen LAMP-Detektion

Um die Anwendbarkeit verschiedener Methoden für die quantitative und qualitative Analyse als Feldtest etablieren und vergleichen zu können, wurden verschiedene Echtzeit- und Endpunktverfahren für die Detektion von PSTVd, Cms und Xhp in einer geschlossenen Reaktion etabliert. Für die Untersuchungen wurde zunächst der PSTVd-LAMP Assay als Grundlage verwendet.

8.1.1 Echtzeit- und Endpunktnachweis des PSTVd

DNA-abhängige Echtzeitdetektion

Neben den bekannten interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen SYBR Green und EvaGreen wurde auch Berberin als neuer interkalierender Farbstoff für den direkten Nachweis der amplifizierten DNA getestet. Da der Farbstoff die enzymatische Reaktion nicht inhibieren soll, wurde zunächst der Effekt einer ansteigenden Berberinkonzentration (40-180 μM) auf die Aktivität der *Bst* DNA-Polymerase in der LAMP untersucht (Abb. 11). Alle Amplifikationskurven führten zu einer exponentiellen Zunahme des Fluoreszenzsignals nach 10 Minuten. Hierbei korrelierte die Fluoreszenzintensität im Endpunkt (60 Minuten) mit der eingesetzten Farbstoffkonzentration (Abb. 11 A).

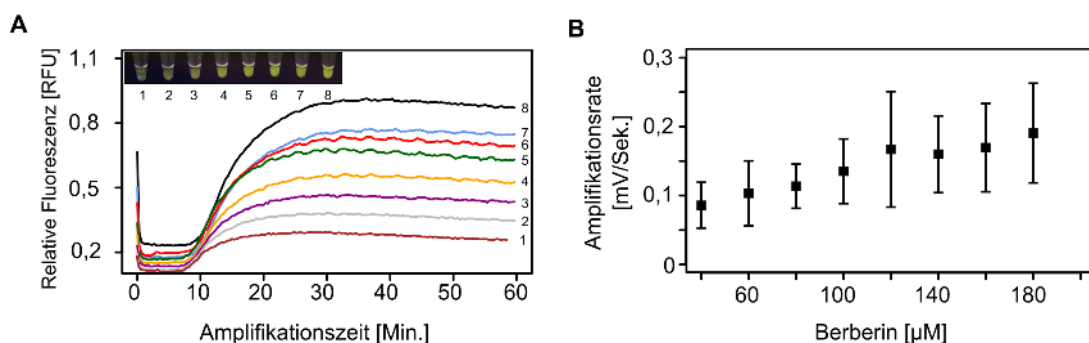


Abbildung 11: (A) Amplifikationskurven des PSTVd-Assays mit (1) 40 μM , (2) 60 μM , (3) 80 μM , (4) 100 μM , (5) 120 μM , (6) 140 μM , (7) 160 μM und (8) 180 μM Berberin. Die Fotos der Reaktionsgefäße zeigen die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht (312 nm). (B) Mittelwerte der Amplifikationsrate als Signaländerung über die Zeit in Abhängigkeit der eingesetzten Berberinkonzentration. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Verändert aus: Fischbach et al. (2015).

Die Fotoaufnahmen der Reaktionsgefäße nach 60 Minuten wiesen eine Abnahme der Intensität bei geringer Berberinkonzentration nach Anregung bei 312 nm auf. Die Effektivität der Reaktion wurde durch den maximalen Signalanstieg (Amplifikationsrate) in der exponentiellen Phase der Reaktion analysiert. Hierbei nahm die Rate in Abhängigkeit zur steigenden Farbstoffkonzentration von 0,09 bis 0,16 mV/s leicht zu (Abb. 11 B).

Nachdem mit allen Konzentrationen eine Echtzeitdetektion der PSTVd-LAMP-Reaktion möglich war, wurden für die quantitative Analyse des PSTVd neben Berberin auch SYBR Green und EvaGreen eingesetzt. Dafür wurde die PSTVd-cDNA seriell verdünnt ($1,5 \times 10^{10}$ bis 1,5 Kopien) und mit den drei Farbstoffen in Echtzeit detektiert. Die Abbildung 12 zeigt die Amplifikationskurven (links) und die Sensitivität in Abhängigkeit der eingesetzten Templat-Menge als Tt-Wert bei einem Schwellenwert von 0,2 RFU (rechts).

Bei allen Farbstoffen konnten der typische exponentielle Signalverlauf der LAMP bis $1,5 \times 10^4$ Kopien des PSTVd-Templats beobachtet werden. Geringere PSTVd-Mengen sowie die Negativkontrollen führten zu keinem Signalanstieg im untersuchten Zeitraum. Die Zeit beim Überschreiten des gesetzten Schwellenwerts (0,2 FU) lag bei den ersten vier Verdünnungsstufen für alle Farbstoffe zwischen 10 und 30 Minuten. Im Gegensatz zu SYBR Green (Abb. 12 A) und EvaGreen (Abb. 12 B) fielen die Abstände zwischen den einzelnen Amplifikationskurven der Verdünnungsstufen bei Berberin gleichmäßiger aus (Abb. 12 C). Zudem blieb das Fluoreszenzsignal bei Berberin über den gesamten Inkubationszeitraum auf gleicher Höhe, wobei das Signal bei SYBR Green am stärksten abfiel.

DNA- und Pyrophosphat-abhängige Endpunktdetektion

Für die schnelle und qualitative Analyse der LAMP-Reaktion soll die Endpunktdetektion im Tageslicht und/oder UV-Licht verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene LAMP-Reaktionen zum Nachweis von PSTVd als Trübung bzw. mit den Farbstoffen Calcein, Hydroxynaphtholblau (HNB) und Berberin in Abhängigkeit der eingesetzten Templatmenge ($1,5$ bis $1,5 \times 10^{10}$ Kopien) durchgeführt und nach 60 Minuten Inkubation bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ analysiert. Als Vergleich zur LAMP-Reaktion wurde eine klassische PCR mit PSTVd-spezifischen Primern durchgeführt. Die Abbildung 13 A zeigt die Fotoaufnahmen der Reaktionsgefäße. Die Sichtbarkeit der Trübung in Form eines Pellets wurde durch Zentrifugation vereinfacht. Das weiße Pellet war bei den Reaktionen mit $1,5 \times 10^{10}$ bis $1,5 \times 10^4$ gut sichtbar. Die Proben mit $1,5 \times 10^3$ bis $1,5 \times 10^2$ Kopien zeigten hingegen kein Pellet. Die Verwendung von HNB in den Proben mit $1,5 \times 10^{10}$ bis $1,5 \times 10^4$ Kopien resultierte in eine deutlich sichtbare hellblaue Färbung gegenüber den anderen Proben, welche eine violette Färbung aufwiesen. Das Calcein zeigte bei Tageslicht für die ersten vier Proben eine klare grüne Farbe und eine orange Färbung für die niedrigen Verdünnungsstufen bzw. die Negativkontrollen.

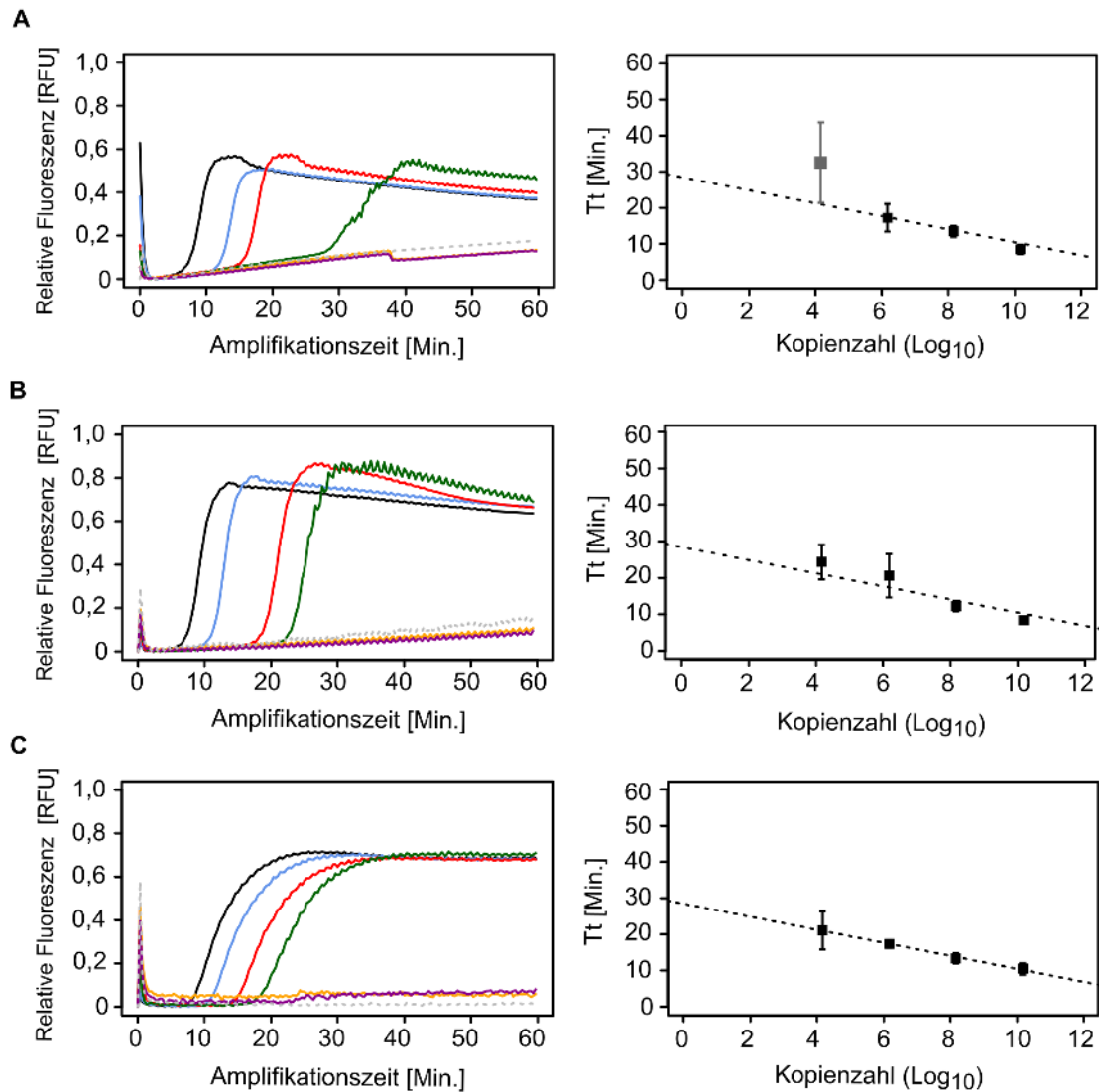


Abbildung 12: Amplifikationskurven der Echtzeit-Detektion der LAMP zum Nachweis von PSTVd. (A) SYBR Green, (B) EvaGreen und (C) Berberin (n=3). Alle Reaktionen wurden im ESEQuant Tube Scanner mit dem FAM-Filter (Anr.: 470 nm / Em.: 520 nm) detektiert (links). Die eingesetzte PSTVd-Kopienzahl beträgt $1,5 \times 10^{10}$ (schwarz), $1,5 \times 10^8$ (blau), $1,5 \times 10^6$ (rot), $1,5 \times 10^4$ (grün), $1,5 \times 10^2$ (orange), $1,5 \times 10^0$ (magenta). Die Negativkontrollen (grau) zeigen keinen Fluoreszenzanstieg über die Zeit. Die Sensitivität wurde für jeden Farbstoff mithilfe der Schwellenwertzeiten jeder Verdünnungsstufe, die durch das Überschreiten des Fluoreszenzwertes von 0,2 RFU festgelegt wurde, bestimmt und gegenüber der Log-Kopienzahl aufgetragen (rechts). Verändert aus: Fischbach et al. (2015).

Nach Anregung im UV-Licht war eine intensives grünes Licht von Calcein zu erkennen, die anderen Proben blieben dunkel. Bei Berberin sind im Tageslicht bei keiner Probe signifikante Farbunterschiede im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Nach der Anregung des Berberins mit UV-Licht, wiesen die ersten vier Proben mit $1,5 \times 10^{10}$ bis $1,5 \times 10^4$ Kopien eine grün-gelbe Farbe auf, wobei die niedrigen DNA-Verdünnungen eine deutlich schwächere Intensität hatten. Der Nachweis mit der PCR zeigt die spezifische Produktbande bei 200 bp im Agarosegel mit abnehmender Intensität bis zu einer Anzahl von einer Kopie, wobei diese Bande sehr schwach ausfiel.

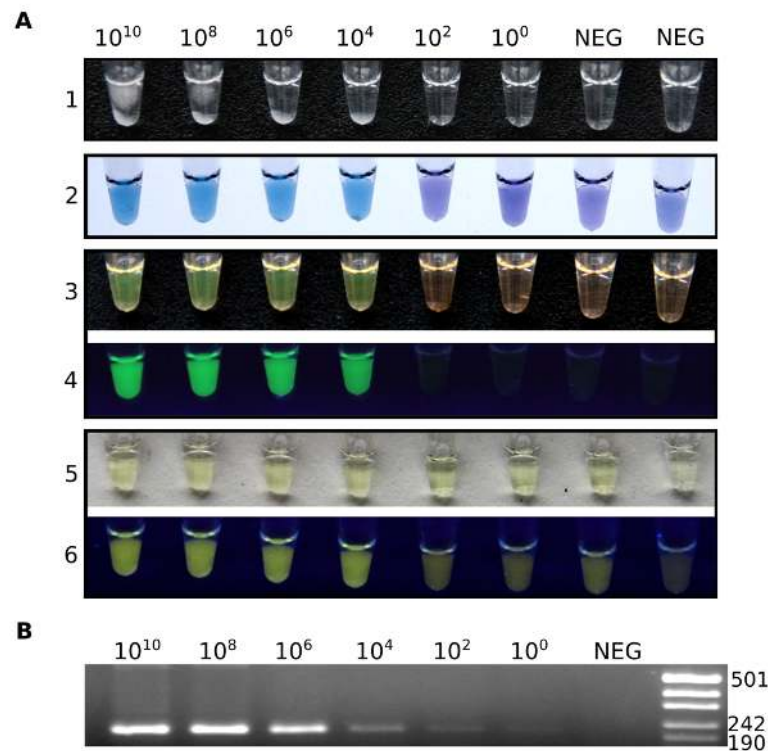


Abbildung 13: (A) Fotos der PSTVd-LAMP-Reaktionen nach der Inkubation bei 65 °C für 60 Minuten mit unterschiedlichen Endpunktnachweisen. Trübung (1) and HNB bei Tageslicht (2), Calcein/Mangan bei Tageslicht (3) und UV-Licht bei 312 nm (4), Berberin bei Tageslicht (5) und UV-Licht bei 312 nm (6). Die initiale PSTVd-Kopienzahl pro Reaktion betrug $1,5 \times 10^{10}$ und wurde seriell bis $1,5 \times 10^0$ verdünnt. Die Verdünnungsstufen sind oberhalb der Abbildung aufgeführt. Die Negativkontrollen (NEG) wurden mit Wasser statt cDNA angesetzt. Alle Reaktionen wurden mit $10 \mu\text{l}$ Mineralöl überzogen. (B) Dieselben Proben wurden mittels PCR als Referenz gelelektrophoretisch analysiert. Der eingesetzte Größenstandard war der pUC19-Marker. Verändert aus: Fischbach et al. (2015).

8.1.2 Echtzeit- und Endpunktnachweis bakterieller Pathogene

Die Entwicklung der LAMP-Reaktion für das Gram-positive Bakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und das Gram-negative *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* erfolgte nach der Optimierung durch die Anpassung der Temperatur oder Mg^{2+} -Konzentration (Daten nicht gezeigt) mit Berberin für die direkte und mit HNB für die indirekte Detektion. Beide Farbnachweise wurden für die Nutzung als Echtzeit- und Endpunktnachweis etabliert.

Fluorimetrische Echtzeitdetektion mit Hydroxynaphtholblau

Die Nutzung von HNB zur Detektion in der LAMP-Reaktion basiert auf dem Farbwechsel von violett zu blau sofern eine Amplifikation erfolgt ist. Das konnte zuvor beim Nachweis von PSTVd gezeigt werden. Durch die Detektion der PSTVd-LAMP mit HNB im ESEQuant Tube Scanner (ROX-Kanal) konnte festgestellt werden, dass das HNB ein Fluoreszenzsignal zeigt. Daher wurden mit HNB zusätzliche Versuche zur Charakteri-

sierung des Farbstoffs für die Etablierung des Echtzeit-LAMP-Nachweis' zunächst mit variierender Mg^{2+} -Konzentration ohne Amplifikation durchgeführt (Abb. 14). Bei 2 mM Mg^{2+} lag das Absorptionsmaximum bei 560 nm und 650 nm (Abb. 14 A). Durch die Zugabe von 2 mM Natriumpyrophosphat verschob sich das Maximum von 560 zu 600 bis 650 nm. Die Absorption bei 650 nm stieg stark an, wobei die Absorption bei 560 nm leicht abnahm. Die entsprechende Fluoreszenzintensität bei 625 nm fiel nach Anregung bei 560 nm bei der Probe ohne Pyrophosphat (PPi) zehnmal höher aus (Abb. 14 B).

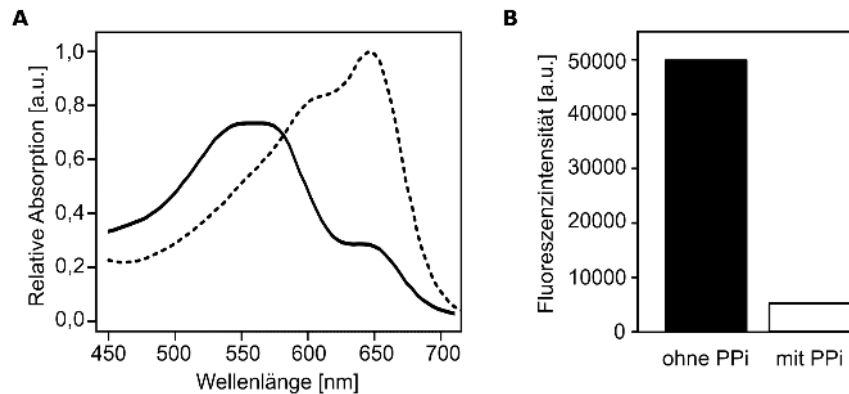


Abbildung 14: Charakterisierung von HNB für die Verwendung zur Echtzeitdetektion in der LAMP. (A) Absorptionsspektrum von HNB mit 2 mM Mg^{2+} (durchgezogene Linie) und HNB mit 2 mM Mg^{2+} und 2 mM Natriumpyrophosphat (gestrichelte Linie). (B) Fluoreszenzintensität von HNB mit 2 mM Mg^{2+} (schwarz) und HNB mit 2 mM Mg^{2+} und 2 mM Natriumpyrophosphat (weiß) bei 625 nm nach Anregung bei 565 nm.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Fluoreszenz bei 625 nm mit steigender Mg^{2+} -Konzentration (2 bis 10 mM) verändert (Abb. 15 A).

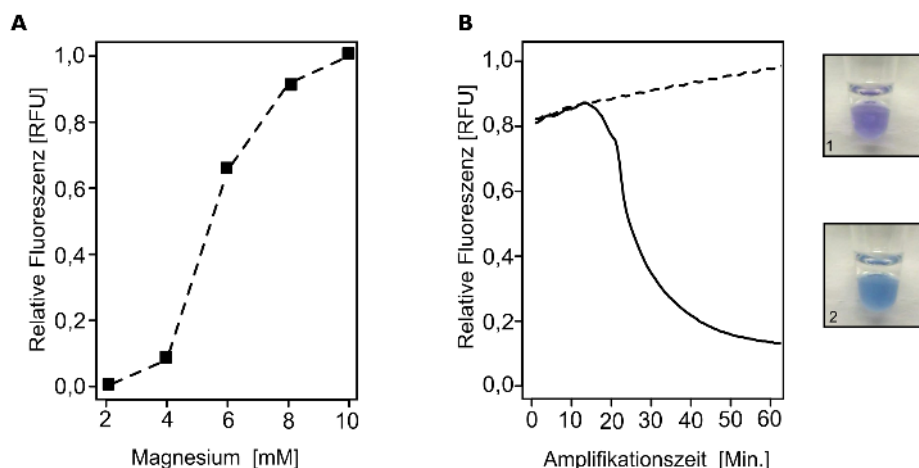


Abbildung 15: (A) Korrelation zwischen der Fluoreszenz von HNB und der ansteigenden Mg^{2+} -Konzentration bei 625 nm (Anr.: 560 nm). (B) Echtzeit-LAMP-Reaktion mit 140 μ M HNB, 8 mM Mg^{2+} und 10 ng genomischer Cms-DNA bei 65 °C für 60 Minuten (durchgezogene Linie) und Negativreaktion (gestrichelte Linie). Die Fotos zeigen den Endpunkt der LAMP mit der Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (2).

Bei einer Mg^{2+} -Konzentration unter 4 mM war die Fluoreszenzintensität sehr gering und stieg in einem Bereich zwischen 4 und 10 mM stark an. Anschließend wurde die Echtzeit-HNB-LAMP mit Cms als Templat für die Positivkontrolle und ohne für die Negativkontrolle getestet. Hierbei wurde die Fluoreszenzintensität bei 625 nm nach Anregung bei 560 nm mit 140 μ M HNB kontinuierlich im ROX-Kanal des ESEQuant Tube Scanners detektiert (Abb. 15 B). Das Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle (schwarz) stieg während der Amplifikation leicht an (Abb. 15 B). Die Intensität der Positivkontrolle nahm hingegen nach 20 Minuten stark ab. Die Reaktionslösung zeigte hier auch die typische Farbänderung von violett zu blau (Abb. 15 B, Bild 1 und 2).

Echtzeitnachweis mikrobieller, genomischer DNA

Mit den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass neben Berberin auch HNB für die Echtzeitdetektion in der LAMP genutzt werden kann. Daher wurden beide Farbstoffe genutzt, um die Nachweisgrenzen für beide bakteriellen Pathogene mit dem tragbaren Fluorometer ESEQuant Tube Scanner zu bestimmen. Dabei wurde die Fluoreszenz von Berberin im FAM-Kanal und die Fluoreszenz von HNB im ROX-Kanal detektiert. Als Templat wurde seriell verdünnte genomische DNA von Cms (1,1 ng bis 11 fg) und Xhp (29 ng bis 290 fg) genutzt. Die Abbildung 16 zeigt die Amplifikationskurven des LAMP-Assays mit Berberin (A) und HNB (B) von Cms nach 60 Minuten Inkubationszeit. Nach 15 Minuten steigt das Fluoreszenzsignal von Berberin an, bei Verwendung von HNB ist erst nach 20 Minuten eine Abnahme festzustellen. Die Korrelation zwischen der Schwellenwertzeit (T_t) und der eingesetzten Templatmenge hat von $6,26 \times 10^2$ bis $6,26 \times 10^6$ Kopien eine gute Linearität für beide Farbstoffe (Abb. 16 unten). Das Detektionslimit lag demnach bei $6,26 \times 10^2$ Kopien, was 1,1 pg genomischer DNA entspricht.

Bei der Echtzeitdetektion von Xhp mit Berberin steigt das Fluoreszenzsignal der Proben in einem Bereich von 10 bis 20 Minuten exponentiell an (Abb. 17 A). Bei HNB ist der charakteristische Abfall der Fluoreszenz erst nach etwa 18 bis 35 Minuten für die meisten Proben sichtbar (Abb. 17 B). Für beide Farbstoffe lag die Nachweisgrenze bei $5,29 \times 10^2$ Kopien (2,9 pg genomische DNA). Die Korrelation zwischen den berechneten Kopien und der Schwellenwertzeit (T_t) wies eine gute Linearität im detektierten Bereich auf (Abb. 17 unten). In den Kontrollreaktionen ohne DNA in der LAMP wurde für beide Pathogene und Farbstoffe keine Signalveränderung detektiert.

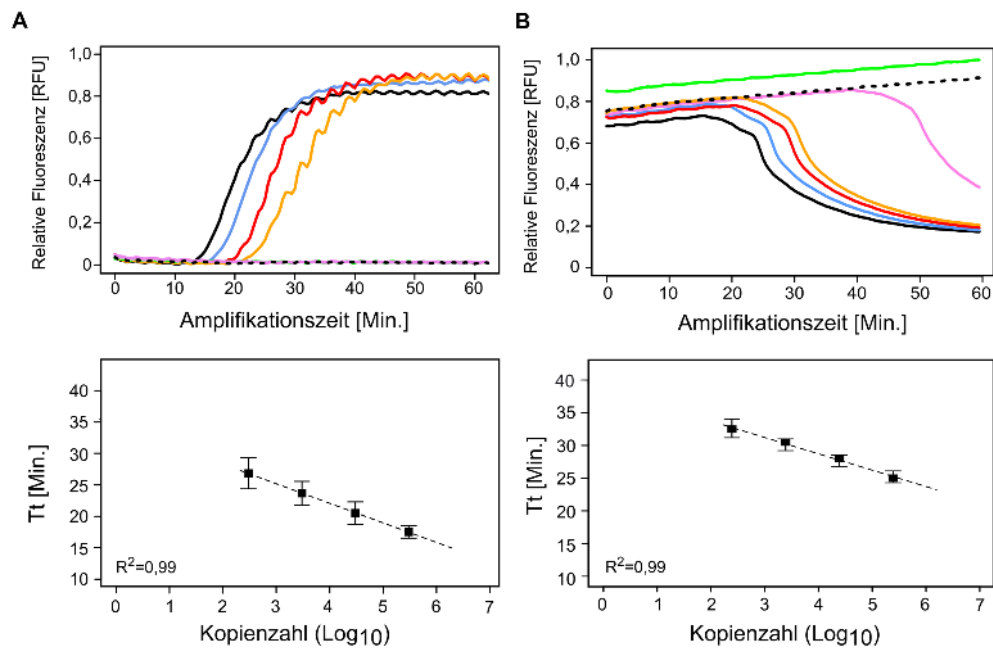


Abbildung 16: LAMP-Reaktion mit Echtzeit-Detektion für Cms mit Berberin (A) und HNB (B). Normalisierte Amplifikationskurven für Cms mit $6,26 \times 10^5$ (schwarz), $6,26 \times 10^4$ (blau), $6,26 \times 10^3$ (rot), $6,26 \times 10^2$ (orange), $6,26 \times 10^1$ (rosa) und $6,26 \times 10^0$ Kopien (grün) sowie die Negativkontrolle ohne Templat (gestrichelte Linie) in Echtzeit (oben). Korrelation der Schwellenwertzeit Tt gegen die Kopienzahl (unten). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei $n = 3$.

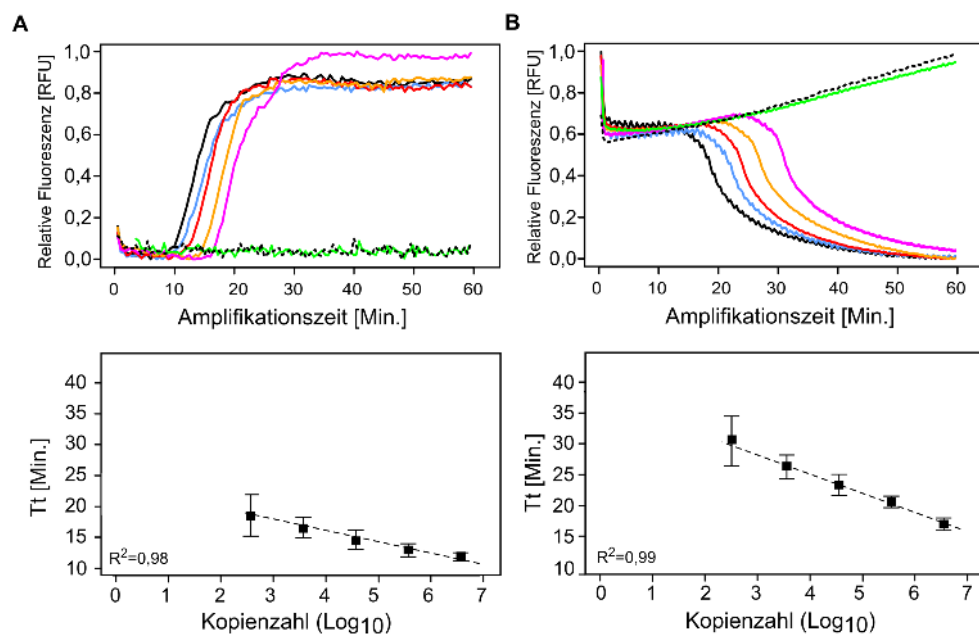


Abbildung 17: LAMP-Reaktion mit Echtzeit-Detektion für Xhp mit Berberin (A) und HNB (B). Normalisierte Amplifikationskurven für Xhp mit $5,29 \times 10^6$ (schwarz), $5,29 \times 10^5$ (blau), $5,29 \times 10^4$ (rot), $5,29 \times 10^3$ (orange), $5,29 \times 10^2$ (pink) und $5,29 \times 10^1$ Kopien (grün) der genomischen DNA sowie die Negativkontrolle ohne Templat (gestrichelte Linie) in Echtzeit (oben). Korrelation der Schwellenwertzeit Tt gegen die Kopienzahl (unten). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei $n = 3$.

Endpunktnachweis mikrobieller, genomischer DNA

Nachdem die Echtzeit-Detektion mit Berberin und HNB für beide Pathogene etabliert wurde, sollte auch der visuelle Nachweis im Endpunkt untersucht werden. Hierfür wurden die gleichen Verdünnungen der bakteriellen DNA in einer neuen Reaktion verwendet. Die Inkubation der Reaktionen erfolgte in einem Wasserbad bei 65 °C für 60 Minuten. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße im Tageslicht bei Verwendung von HNB sowie unter UV-Licht bei Verwendung von Berberin fotografiert (Abb. 18).

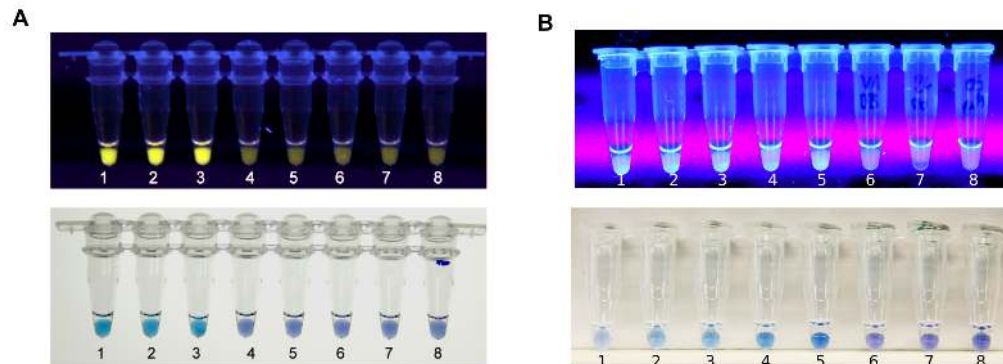


Abbildung 18: Endpunkt-LAMP-Nachweis von Cms (A) und Xhp (B) mit 180 μM Berberin im UV-Licht (oben) und 140 μM HNB im Tageslicht (unten). Die Proben enthielten (A) $6,26 \times 10^5$ (1), $6,26 \times 10^4$ (2), $6,26 \times 10^3$ (3), $6,26 \times 10^2$ (4), $6,26 \times 10^1$ (5) und $6,26 \times 10^0$ Kopien (6) von Cms sowie (B) $5,29 \times 10^6$ (1), $5,29 \times 10^5$ (2), $5,29 \times 10^4$ (3), $5,29 \times 10^3$ (4), $5,29 \times 10^2$ (5) und $5,29 \times 10^1$ Kopien (6) von Xhp. Proben 7 und 8 sind Negativkontrollen ohne Template.

Beim Nachweis von Cms mit Berberin war nach Anregung im UV-Licht im Vergleich zu den restlichen Proben in den ersten drei Proben eine intensive gelbe Farbe erkennbar. Der Nachweis mit HNB ergab ein vergleichbares Resultat. Die Nachweisgrenze liegt demnach bei $6,26 \times 10^3$ Kopien, was 11 pg genomischer DNA entspricht. Durch den Nachweis von Xhp mit Berberin und HNB konnten bei den ersten fünf Proben die blaue Farbe beobachtet werden (18 B). Die Nachweisgrenze liegt für Xhp bei $5,29 \times 10^2$ Kopien, was umgerechnet 2,9 pg genomischer DNA entspricht. Als Vergleich wurde eine spezifische PCR durchgeführt. Hier liegt die Nachweisgrenze bei $6,26 \times 10^2$ Kopien (1,1 pg DNA) für Cms und $5,29 \times 10^2$ Kopien (2,9 pg DNA) für Xhp (Abb. 41 im Anhang).

8.1.3 Vergleich indirekter und direkter Detektionsmethoden

Um die LAMP-Methoden für den Pathogennachweis in geschlossenen Reaktionen zu vergleichen, wurden die Eigenschaften und Anwendungen der verschiedenen Detektionsverfahren analysiert und gegenübergestellt (Tab. 8). Für die Echtzeitdetektion sind alle Methoden geeignet, sofern der apparative Aufwand nicht zwingend berücksichtigt werden muss. Die bessere Sensitivität bei der Detektion haben allerdings die Methoden mit Fluoreszenzdetektion von SYBR Green, EvaGreen und Berberin. Im Gegensatz zu den ersten beiden Farbstoffen ist Berberin allerdings auch feldtauglich und in der geschlossenen Reaktion für die Endpunktdetektion einsetzbar. Für die kostengünstige Vor-Ort-Analytik

sind besonders Calcein und HNB hervorzuheben, da hier keine zusätzlichen Geräte für die Detektion benötigt werden. Von den untersuchten Methoden können vor allem HNB und Berberin sowohl für die qualitative als auch quantitative Bestimmung eingesetzt werden.

Tabelle 8: Vergleich aller indirekten und direkten Detektionsmethoden für die LAMP hinsichtlich ihrer Eignung als Endpunkt- oder Echtzeit-Nachweis in geschlossenen Reaktionen. Die Anzahl der “+“ beschreibt, wie gut die Anforderung erfüllt werden kann. Verändert aus: Fischbach et al. (2015).

Eigenschaft	Trübung (klassisch)	HNB	Calcein	SYBR Green	EvaGreen®	Berberin
Substanz	Magnesium-pyrophosphat (Mg-PPi)	Hydroxy-naphtholblau	Calcein	SYBR Green	EvaGreen	Berberin
Herkunft	Nebenprodukt	synthetisch	synthetisch	synthetisch	synthetisch	natürlich
Toxizität	keine	kann Augenreizung auslösen	kann für die Augen und Haut schädlich sein	kann Mutationen induzieren	nicht karzinogen	keine
Detektionsmechanismus	unlöslicher Komplex, Präzipitation	Abnahme Mg^{2+}	Abnahme Mn^{2+}	dsDNA Interkalator	dsDNA Interkalator	dsDNA Interkalator
Wellenlänge	Trübung Abs.: 400 nm	Absorption Abs.: 650 nm Fluoreszenz Anr.: 560 nm Em.: 650 nm	Fluoreszenz Anr.: 495 nm Em.: 515 nm	Fluoreszenz Anr.: 495 nm Em.: 521 nm	Fluoreszenz Anr.: 500 nm Em.: 530 nm	Fluoreszenz Anr.: 450 nm Em.: 530 nm
Effekt auf Amplifikation	nein	nein	kein Effekt bei $< 0,5$ mM Mn^{2+}	nicht inhibierend wenn $< 1x$ konzentriert	nicht inhibierend wenn $< 1x$ konzentriert	bis $180 \mu M$ nicht inhibierend
Echtzeit möglich	+	+++	+++	++++	++++	++++
Geräte für Echtzeit	Turbidimeter	Fluorimeter mit ROX-Filter	Fluorimeter mit FAM-Filter	Fluorimeter mit FAM-Filter	Fluorimeter mit FAM-Filter	Fluorimeter mit FAM-Filter
Endpunkt möglich	+++	++++	++++	-	-	+++ (mit UV-Lampe bei 312 nm)
Geräte für Endpunkt	keine (kabellose Zentrifuge)	keine	UV-Lampe (optional)	nicht anwendbar	nicht anwendbar	UV-Lampe
Bewertung	+ trüb - klar	+ hellblau - violett	+ grün - orange	+ Signal - kein Signal	+ Signal - kein Signal	+ Signal - kein Signal
Relative Sensitivität*	+	++	+++	++++	++++	++++
Feld-Tauglichkeit**	++	++++	++++	-	-	+++

* Die analytische Sensitivität hängt von der Optimierung der LAMP-Reaktion ab.
** Die Feldtauglichkeit ist abhängig von der Visualisierung mit oder ohne Hilfsmittel.

8.2 Identifizierung neuer Farbstoffe für die Pyrophosphatdetektion

Neben den Farbstoffen Calcein und Hydroxynaphtholblau (HNB) können weitere Farbstoffe mit einer Affinität zu mehrwertigen Metallionen für den indirekten Nachweis des in der Amplifikationsreaktion freigesetzten Pyrophosphats (PPi) genutzt werden. Es gibt eine Vielzahl von synthetisierten oder natürlichen Farbstoffen, die in der Komplexometrie oder Histologie eingesetzt werden. Bisher wurden sie nicht für den Pyrophosphatnachweis in enzymatischen Reaktionen verwendet. In diesem Teil der Arbeit sollten daher herkömmliche und leicht zugängliche Farbstoffe als Alternative zu Calcein oder HNB für die selektive Pyrophosphatdetektion in enzymatischen Reaktionen identifiziert werden.

8.2.1 Einfluss von Magnesium und Mangan auf die Fluoreszenzfarbstoffe

Das Prinzip des hier untersuchten Pyrophosphatnachweis' basiert auf der selektiven Verdrängung eines Metallions vom Farbstoff durch Komplexbildung mit dem in der Reaktion akkumulierenden PPi. Damit ein Nachweis erfolgen kann, muss die An- und Abwesenheit der Metallionen die spektrophotometrischen Eigenschaften des Farbstoffs beeinflussen. Für eine selektive und sensitive Detektion muss die zugrunde liegende Abhängigkeit zwischen dem PPi, Metallion und dem Farbstoff zunächst analysiert und deren optimale Konzentration bestimmt werden (Abb. 19).

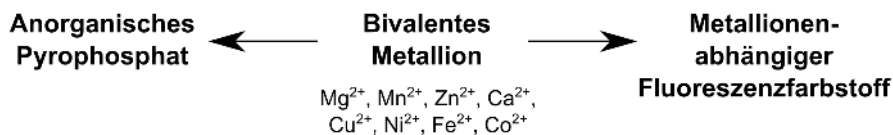


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Metallionen, Fluoreszenzfarbstoff und PPi. Für den Verdrängungsassay muss die Affinität des Metallions zum Pyrophosphat höher als zum Farbstoff sein. Gleichzeitig beeinflusst das Metallion die Fluoreszenz des Farbstoffs durch Unterdrückung (Quenching) oder Verstärkung der Emission.

Für die Untersuchungen wurden Calcein, Calceinblau, Tetrazyklin, Doxyzyklin, Alizarinrot S und Folsäure ausgewählt. Von den Metallionen, die sich auf diese Fluoreszenzfarbstoffe auswirken, hat Mn^{2+} die höchste Affinität zum PPi und kann die Fluoreszenz verstärken oder unterdrücken. Andere bivalente Ionen wie Ca^{2+} oder Zn^{2+} haben eine geringere Affinität zu PPi oder den Farbstoffen und können für eine spezifische Pyrophosphatdetektion nicht eingesetzt werden.

8.2.2 Selektive Detektion von Pyrophosphat

Zuerst musste die Selektivität von Mn^{2+} gegenüber dem PPI mit anderen konkurrierenden Komponenten in der LAMP-Reaktion wie den dNTP und Mg^{2+} sichergestellt sein. Zur Untersuchung der Selektivität wurde Calcein, dessen Fluoreszenzemission effektiv durch Mn^{2+} unterdrückt wird, als Referenzsystem ausgewählt. Gemessen wurde die resultierende Fluoreszenz von Calcein bei ansteigender Konzentration von PPI, dNTP und deren Mischung (Abb. 20). Die Fluoreszenzmessungen ergaben in Abwesenheit von Mg^{2+} keine signifikanten Signalunterschiede bei allen untersuchten dNTP- und PPI-Konzentrationen.

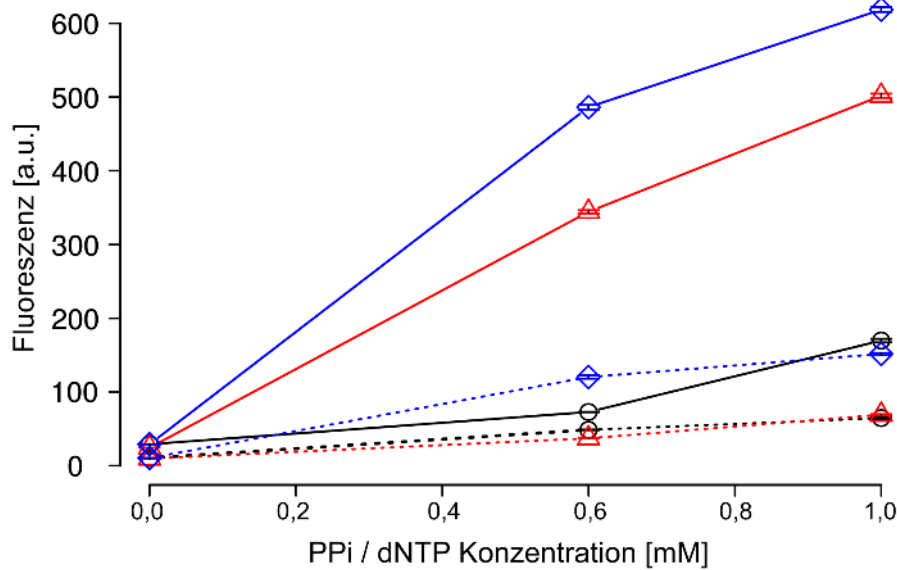


Abbildung 20: Selektivität der Komplexbildung von Mn^{2+} mit unterschiedlichen Konzentrationen von PPI und dNTP in Anwesenheit des Referenzfarbstoffs Calcein. Fluoreszenzmessungen wurden mit 25 μ M Calcein und 0,5 mM Mn^{2+} in Anwesenheit (durchgezogene Linien) und Abwesenheit (gestrichelte Linien) von 6 mM Mg^{2+} in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) durchgeführt ($n=3$). Das Fluoreszenzsignal ist gegenüber der steigenden Konzentrationen von PPI (rot), dNTP (schwarz) und einer Kombination aus beiden (blau) aufgetragen. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

In Anwesenheit von Mg^{2+} war das Fluoreszenzsignal bei der höchsten PPI-Konzentration (1 mM) gegenüber derselben Probe ohne Mg^{2+} um das Zehnfache erhöht. Bei der korrespondierenden dNTP-Konzentration wurde das Signal nur um das Dreifache gesteigert. Bei der Mischung aus PPI und dNTP wurde ein mittlerer fünffacher Signalanstieg beobachtet. Die Fluoreszenzsignale fielen im Vergleich zu dNTP bei PPI höher aus. In Anwesenheit von Mg^{2+} war die Selektivität von Mn^{2+} gegenüber dem PPI höher, so dass nur mit PPI eine deutliche Fluoreszenzsteigerung gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden konnte.

8.2.3 Einfluss von Magnesium und Mangan auf die Fluoreszenz ausgewählter Farbstoffe

Der Einfluss der beiden bivalenten Metallionen (Mg^{2+} und Mn^{2+}) auf die Fluoreszenz der sechs zuvor selektierten Farbstoffe wurde nachfolgend untersucht. Die Resultate für die LAMP- und PCR-Reaktionsbedingungen sind als normierte Fluoreszenzintensitäten in den Abbildungen 21 und 22 zusammengefasst. Die Normierung erfolgte hierbei auf die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ohne Mg^{2+} und Mn^{2+} .

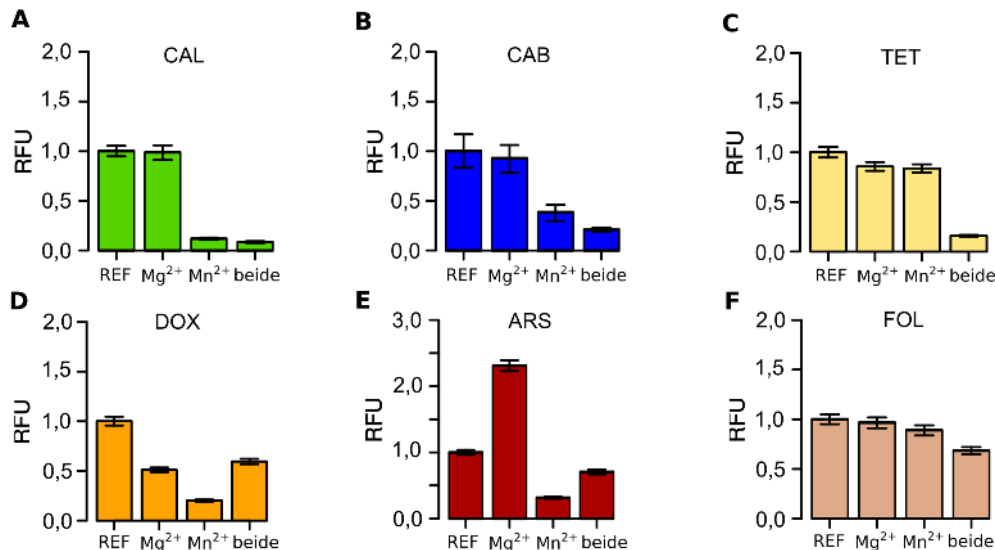


Abbildung 21: Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Farbstoffe unter LAMP-Bedingungen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität von (A) 25 μ M Calcein (CAL), (B) Calceinblau (CAB), (C) Tetrazyklin (TET), (D) Doxyzyklin (DOX), (E) Alizarinrot S (ARS) und (F) Folsäure (FOL) in Abhängigkeit der Mg^{2+} - (7mM) und Mn^{2+} -Konzentration (0,5 mM) sowie die Referenzprobe (REF) nur mit dem jeweiligen Farbstoff in Tris/HCl-Puffer (pH 8,8). Die Fluoreszenzwerte sind auf die Referenzprobe normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei $n = 3$. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

Unter LAMP-Reaktionsbedingungen (7 mM Mg^{2+}) zeigte das Calcein den zuvor beschriebenen Effekt (Abb. 21 A). Mg^{2+} beeinflusste die Fluoreszenz nicht, dafür war bei der Anwesenheit von Mn^{2+} eine deutliche Fluoreszenzabnahme messbar. Wenn beide Ionen als Mischung in der Probe vorhanden waren, war die resultierende Fluoreszenzintensität ebenfalls deutlich reduziert. Bei Calceinblau war dieser Effekt ähnlich, aber nicht so stark ausgeprägt (Abb. 21 B). Der Effekt wurde durch die Mischung beider Ionen verstärkt. Mg^{2+} und Mn^{2+} hatten einzeln nur einen geringen Effekt auf die Fluoreszenz von Tetrazyklin. Als Mischung resultierten sie in einer deutlich verringerten Fluoreszenzintensität (Abb. 21 C). Bei Doxyzyklin reduzierten sowohl Mg^{2+} als auch Mn^{2+} die Fluoreszenz. Der Effekt mit beiden Ionen zusammen war schwächer (Abb. 21 D). Die Fluoreszenzintensität von Alizarinrot S wurde durch Mg^{2+} verstärkt und durch Mn^{2+} verringert. Der Effekt bei Anwesenheit beider Ionen war nicht so stark ausgeprägt (Abb. 21 E). Folsäure wurde durch beide Ionen kaum beeinflusst (Abb. 21 F).

Die gleichen Untersuchungen wurden auch unter PCR-Reaktionsbedingungen (2 mM Mg^{2+}) mit allen Farbstoffen durchgeführt. Es konnten ähnlich Effekte bei Calcein, Calceinblau und Alizarinrot S beobachtet werden (Abb. 22 A, B und E). Bei Tetrazyklin hatten Mg^{2+} und Mn^{2+} einen stärkeren Einfluss unter diesen Bedingungen. Mg^{2+} verstärkte und Mn^{2+} verringerte die Fluoreszenzintensität (Abb. 22 C). Ein vergleichbarer, aber schwächerer Effekt war auch bei Doxyzyklin messbar (Abb. 22 D). Zwei wesentliche Effekte auf die Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wurden durch die Metallionen induziert. Mg^{2+} konnte die Fluoreszenzintensität teilweise erhöhen, wohingegen Mn^{2+} eine Reduzierung induzierte. Für eine signifikante Signaländerung zwischen einer Probe mit und ohne PPI müssen die optimalen Konzentrationen der Metallionen und des Farbstoffs gefunden werden.

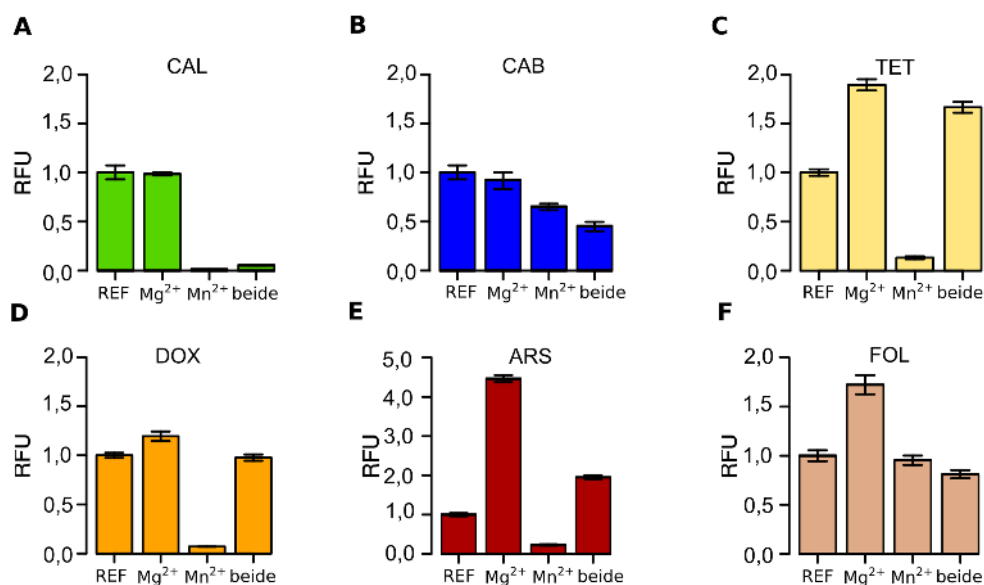


Abbildung 22: Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Farbstoffe unter PCR-Bedingungen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RFU) von (A) 25 μ M Calcein (CAL), (B) Calceinblau (CAB), (C) Tetrazyklin (TET), (D) Doxyzyklin (DOX), (E) Alizarinrot S (ARS) und (F) Folsäure (FOL) in Abhängigkeit der Mg^{2+} - (2mM) und Mn^{2+} -Konzentration (0,5 mM) sowie die Referenzprobe (REF) nur mit dem jeweiligen Farbstoff in Tris/HCl-Puffer (pH 8,8). Die Fluoreszenzwerte sind auf die Referenzprobe normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei $n = 3$. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

Um die Untersuchung evaluieren zu können, wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) als Kriterium genutzt. Dieses Verhältnis beschreibt den Quotienten aus der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Farbstoffs mit zugesetztem PPI und dem Wert ohne Zugabe von PPI. Für die zuvor untersuchten Farbstoffe wurde das SNR unter LAMP- und PCR-Bedingungen bestimmt. Da in den beiden Beispielreaktionen unterschiedliche Mengen anorganisches PPI freigesetzt werden, musste dies bei der Eingrenzung der Konzentrationsbereiche berücksichtigt werden. Für die Messungen unter LAMP-Bedingungen wurden daher 7 mM Mg^{2+} , 0,5 mM Mn^{2+} und 1,4 mM PPI sowie 2 mM Mg^{2+} , 0,5 mM Mn^{2+} und 0,5 mM PPI bei der PCR benutzt (Abb. 23).

Die Messungen unter LAMP-Bedingungen zeichneten sich durch höhere SNR-Werte aus, wobei die von Calcein (SNR = 8), Tetrazyklin (SNR = 5) und Alizarinrot S (SNR = 4) am höchsten ausfielen. Unter PCR-Bedingungen zeigten nur Calcein (SNR = 6) und Alizarinrot S (SNR = 1,5) eine Veränderung. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden weiterführend Tetrazyklin und Alizarinrot S als neue Farbstoffe sowie Calcein als Referenz untersucht.

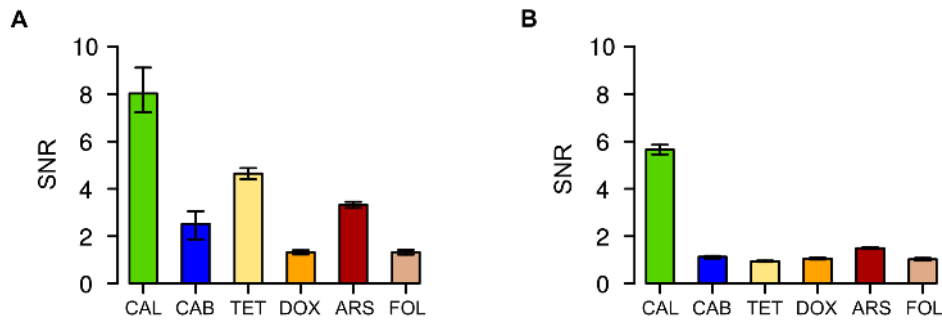


Abbildung 23: SNR der Farbstoffe Calcein (CAL), Calceinblau (CAB), Tetrazyklin (TET), Doxyzyklin (DOX), Alizarinrot S (ARS) und Folsäure (FOL) unter (A) LAMP- und (B) PCR-Bedingungen (jeweils 25 μ M) zwischen einer Probe mit 1,4 mM Natriumpyrophosphat und der Negativkontrolle. Alle LAMP-Proben enthalten 7 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM $MnCl_2$. Die Proben für die PCR enthalten 2 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM $MnCl_2$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bei $n = 3$. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

8.2.4 Einfluss der Metallionen und Farbstoffe auf die DNA-Polymerase

Keine der Reaktionskomponenten, welche die Signalgebung beeinflussen, dürfen die enzymatische Reaktion (LAMP und PCR) selbst inhibieren. Um einen möglichen konzentrationsabhängigen Effekt zu prüfen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Mn^{2+} , Tetrazyklin und Alizarinrot S in einer PCR-Reaktion mit der *Taq* DNA-Polymerase und in einer LAMP-Reaktion mit der *Bst* DNA-Polymerase getestet. Die Analyse beider Reaktionen erfolgte anschließend durch die Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 24).

Bei Mn^{2+} -Konzentrationen über 0,75 mM war kein PCR-Produkt vorhanden. Bei Tetrazyklin waren im untersuchten Bereich bis 0,5 mM Produktbanden mit abfallender Intensität nachweisbar (Abb. 24 A). Ab einer Konzentration von über 0,1 mM Alizarinrot S waren keine PCR-Produkte im Gel erkennbar. Im Gegensatz zur *Taq* DNA-Polymerase, war bei der Verwendung der *Bst* DNA-Polymerase mit allen untersuchten Komponenten das typische LAMP-Produkt im Gel sichtbar (Abb. 24 B). Nur bei Verwendung von Alizarinrot S konnte eine leichte Abnahme der Intensität beobachtet werden. Unter den gewählten Bedingungen wird die *Taq* DNA-Polymerase daher stärker als die *Bst* DNA-Polymerase inhibiert.

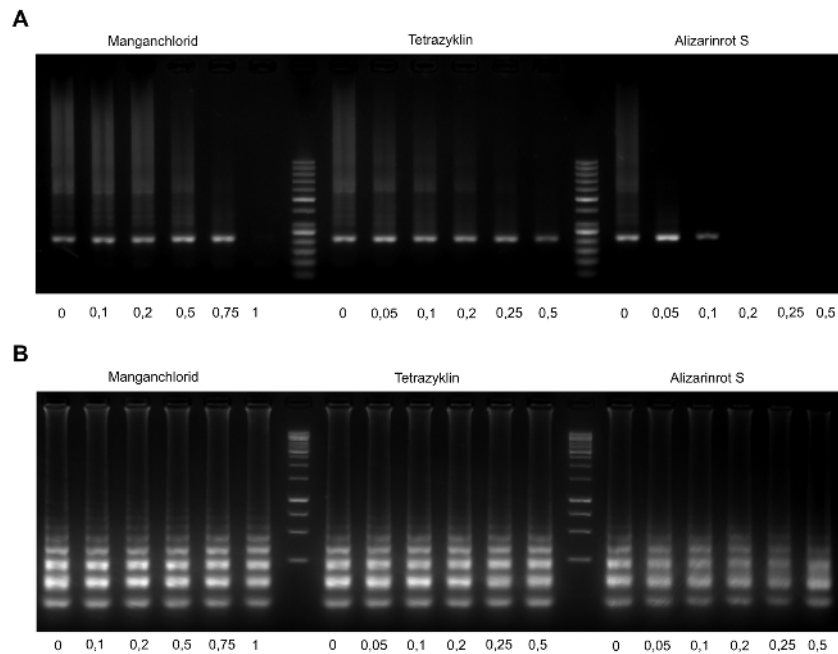


Abbildung 24: Einfluss von Mn^{2+} , Tetrazyklin und Alizarinrot S in ansteigenden Konzentrationen (mM) auf die (A) *Taq* DNA-Polymerase und (B) die *Bst* DNA-Polymerase unter enzymatischen Reaktionsbedingungen. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

8.2.5 Screening-Methode für die Optimierung des Signal-Rausch Verhältnis'

Für die nachfolgenden Untersuchungen sollte für die ausgewählten Farbstoffe zunächst die optimale Emissionswellenlänge gefunden werden. Daher wurden für Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S zwischen 350 und 800 nm Absorptionsspektren aufgenommen. Anhand der Absorptionsmaxima wurden dann die korrespondierenden Fluoreszenzspektren gemessen (Abb. 25).

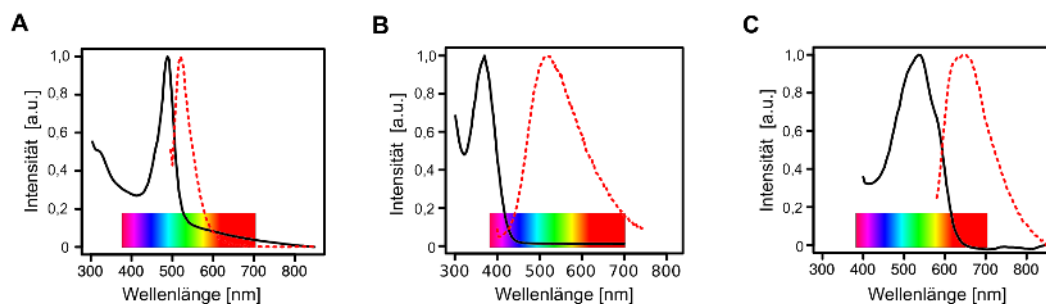


Abbildung 25: Anregungsspektrum (durchgezogene Linie) und Emissionsspektrum (gestrichelte Linie) von 0,1 mM (A) Calcein, (B) Tetrazyklin und (C) Alizarinrot S in Tris/HCl-Puffer (pH 8,8). Die Emissionsspektren wurden für jeden Farbstoff nach Anregung im Absorptionsmaximum gemessen. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

Calcein wies scharf definierte Absorptions- und Emissionsspektren auf, die ihre Maxima bei 495 nm bzw. 525 nm haben (Abb. 25 A). Tetrazyklin hatte ein Absorptionsmaximum bei 370 nm und Emissionsmaximum bei 530 nm. Das Emissionsspektrum umfasste mit 300 nm einen deutlich breiteren Wellenlängenbereich als das Absorptionsspektrum mit 100 nm (Abb. 25 B). Das Absorptionsmaximum von Alizarinrot S war bei 535 nm, die Emission war bei 645 nm am höchsten. Im Vergleich zu Calcein waren beide Spektren von Alizarinrot S sehr breit (200 nm) (Abb. 25 C). Allerdings zeigte sich im Vergleich zu Calcein mit 30 nm bei Alizarinrot S mit 110 nm der größte Abstand zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum. Für die nachfolgende SNR-Optimierung von Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S mit Mn^{2+} als Fluoreszenzquencher wurden Fluoreszenzmessungen mit unterschiedlichen Farbstoff-, Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen in Anwesenheit und Abwesenheit von PPI durchgeführt. Um die hohe Anzahl an Kombinationen ($n=90$) mit kleinstmöglichem Arbeitsaufwand und in kurzer Zeit untersuchen zu können, wurden eine 96-Well Mikrotiterplatte und ein Mikrotiterplattenreader für die hohe Anzahl der Fluoreszenzmessungen genutzt.

Um die unterschiedlichen Konzentrationen aller Komponenten festlegen zu können, wurden typische Konzentrationen aus LAMP- und PCR-Reaktionen simuliert. Für die LAMP wurde daher eine Mg^{2+} -Konzentration von 4, 6 und 8 mM und eine PPI-Konzentration von 1,4 mM untersucht. Bei der PCR-Reaktion waren die Konzentrationen von 0, 1 und 2 mM für Mg^{2+} und 0,5 mM für PPI wesentlich geringer. Für alle Farbstoffe wurde eine Mn^{2+} -Konzentration zwischen 0 und 1 mM bei der LAMP und 0 bis 0,25 mM bei der PCR untersucht. Neben den Metallionen wurden auch unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen genutzt (Tab. 9).

Tabelle 9: Konzentrationsbereiche aller relevanten Komponenten für das kombinatorische Screening der drei Farbstoffe Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S in der Mikrotiterplatte.

Farbstoff	Konzentration [μ M]	Anregung [nm]	Emission [nm]	Mn^{2+} (als $MnCl_2$) [mM]	Mg^{2+} (als $MgCl_2$) [mM]
Calcein	10, 25 und 50	495	525	0; 0,25; 0,5; 0,75 und	4, 6 and 8 (LAMP) / 0,1 and 2 (PCR)
Tetrazyklin	100, 250 und 500	370	520	1,0 (LAMP) / 0; 0,1; 0,15; 0,2 und 0,25	
Alizarinrot S	50, 100 und 250	535	645	(PCR)	

Für die Simulation einer positiven Amplifikationsreaktion wurden allen Proben die entsprechende Konzentration von PPI zugesetzt. Den Negativkontrollen wurde stattdessen das äquivalente Volumen an Wasser zugegeben. Nach einer Equilibrierungszeit von etwa 20 Minuten wurde die Fluoreszenz mit den spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen im Plattenreader gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte durch Visualisierung des SNR in Form von Heatmaps.

Kombinatorisches Screening unter LAMP und PCR-Bedingungen

Die Resultate des kombinatorischen Screenings sind in den Abbildungen 26 (LAMP) und 27 (PCR) für Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S als Heatmap zusammengefasst. Je höher das SNR der jeweiligen Kombination ist, desto dunkler ist die Färbung in der Heatmap. Da es sich hierbei um simulierte Reaktionen handelt, wurden die Kombinationen mit den besten SNR-Werten für jeden Farbstoff in einer enzymatischen Reaktion unter realen Bedingungen anschließend erneut durchgeführt. Der Vergleich der simulierten und realen Daten ist jeweils unterhalb der entsprechenden Heatmap zu finden (Abb. 26 unten).

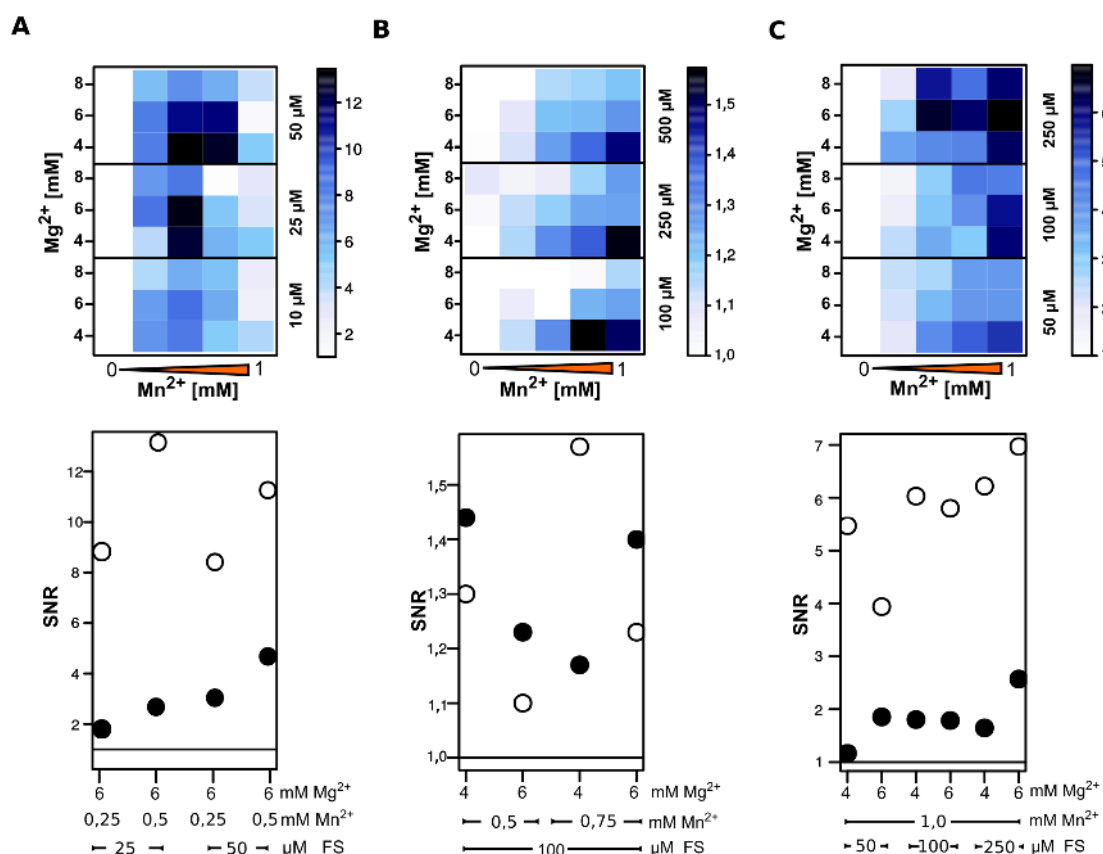


Abbildung 26: Oben: Kombinatorisches Mikrotiterplatten-Screening unter simulierten LAMP-Bedingungen mit Heatmap Analyse des SNR mit (A) Calcein, (B) Tetrazyklin und (C) Alizarinrot S. Die Konzentrationen von Mn^{2+} (0; 0,25; 0,5; 0,75 und 1,0 mM), Mg^{2+} (4; 6; und 8 mM) und der Farbstoffe (FS) (rechte Achse) sind an eine typische LAMP-Reaktion angepasst. Die SNR-Farbskalierung reicht von weiß über blau zu schwarz für jede Kombination. Unten: Der Vergleich zwischen ausgewählten Kombinationen (offene Kreise) und den entsprechenden SNR-Werten aus der enzymatischen Reaktion (gefüllte Kreise) ist für jeden Farbstoff dargestellt. Die schwarze Linie im Diagramm kennzeichnet ein SNR von 1,0 (keine Veränderung). Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

Bei Calcein wurde unter LAMP-Bedingungen das höchste SNR bei 25 μM und 50 μM Farbstoff mit 4 bis 6 mM Mg^{2+} und 0,5 und 0,75 mM Mn^{2+} gemessen (Abb. 26 A). Die SNR-Werte lagen zwischen 8 und 12. Die korrespondierenden SNR-Werte aus der enzymatischen Reaktion waren niedriger und befanden sich zwischen 2 und 5. Bei Tetrazyklin nahm das SNR zunächst unabhängig von der Farbstoff- und Mg^{2+} -Konzentration, aber

mit steigender Mn^{2+} -Konzentration zu (Abb. 26 B). Die höchsten SNR-Werte wurden mit einer Kombination aus 100 bis 250 μM Farbstoff, 4 bis 6 mM Mg^{2+} und 0,75 bis 1 mM Mn^{2+} erreicht. Insgesamt waren die SNR-Werte (zwischen 1,5 und 1,6) deutlich niedriger als bei Calcein. Der Vergleich mit den realen Daten zeigte für drei der vier Kombinationen höhere Werte zugunsten der nicht-simulierten Reaktion. Wie zuvor bei Tetrazyklin nahm auch bei Alizarinrot S das SNR mit steigender Mn^{2+} -Konzentration zu (Abb. 26 C). Unabhängig von der Farbstoffkonzentration wurden bei Mn^{2+} -Konzentrationen zwischen 0,5 und 1 mM Werte zwischen 3 und 7 erreicht. In den enzymatischen LAMP-Reaktionen lagen die SNR-Werte bei 2 und 3. Das Screening mit den drei Farbstoffen wurde auch unter simulierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Für die Untersuchung von Calcein konnte der höchste Wert mit 20 μM Farbstoffkonzentration, 2 mM Mg^{2+} und 0,25 mM Mn^{2+} erreicht werden (Abb. 27 A).

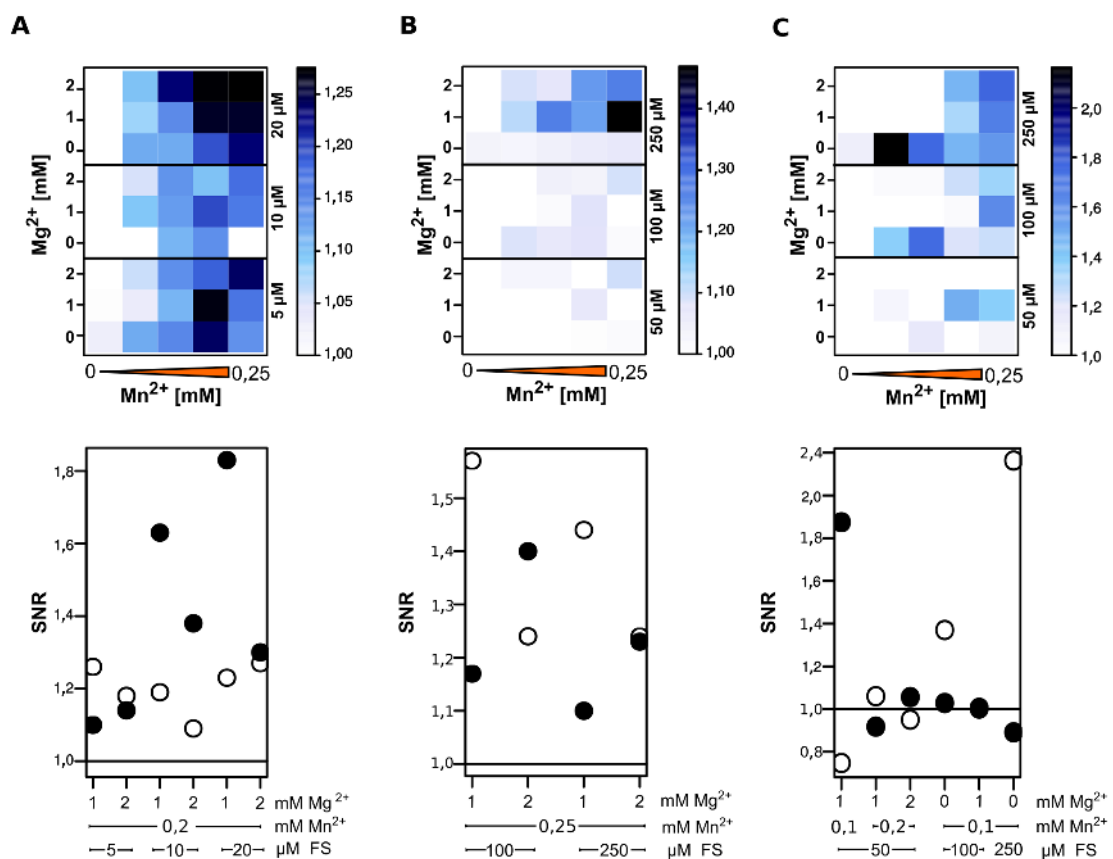


Abbildung 27: Oben: Kombinatorisches Mikrotiterplatten-Screening unter simulierten PCR-Bedingungen mit (A) Calcein, (B) Tetrazyklin und (C) Alizarinrot S. Die Konzentrationen von Mn^{2+} (0; 0,1; 0,15; 0,2 and 0,25 mM), Mg^{2+} (0; 1; 2 mM) und der Farbstoffe (FS) (rechte Achse) sind an eine typische PCR-Reaktion angepasst. Die SNR-Farbskalierung reicht von weiß über blau zu schwarz für jede Kombination. Unten: Der Vergleich zwischen ausgewählten Kombinationen (offene Kreise) und den entsprechenden SNR-Werten aus der enzymatischen Reaktion (gefüllte Kreise) ist für jeden Farbstoff dargestellt. Die schwarze Linie im Diagramm kennzeichnet ein SNR von 1,0 (keine Veränderung).
Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

Die SNR-Werte lagen hier zwischen 1,1 und 1,3. Die Werte der enzymatischen Reaktion waren mit 1,1 bis 1,8 teilweise höher als die der Simulation (Abb. 27 A). Tetrazyklin hatte in der höchsten Konzentration (250 μM) mit 1 mM Mg^{2+} und 0,25 mM Mn^{2+} den besten SNR-Wert (Abb. 27 B). Der Vergleich mit den Realdaten ergab nur für 2 mM Mg^{2+} , 0,25 mM Mn^{2+} und 100 μM Farbstoff einen höheren SNR-Wert als bei der Simulation. Alizarinrot S erreichte mit einer Konzentration von 250 μM die höchsten Werte bei 0,1 mM Mn^{2+} und ohne Mg^{2+} (Abb. 27 C). Bei der enzymatischen Reaktion konnte nur bei 50 μM Alizarinrot S, 1 mM Mn^{2+} und 1 mM Mg^{2+} ein Unterschied zwischen positiver und negativer Reaktion (SNR=1,8) ermittelt werden.

Im Vergleich zum Screening unter LAMP-Bedingungen konnten bei der Optimierung der PCR-Bedingungen für alle getesteten Farbstoffe nur kleine Bereiche für ein optimales SNR ermittelt werden. Die optimalen Kombinationen für alle Farbstoffe bei der LAMP und PCR sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Optimierte Farbstoff-, Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen für die PPI-abhängige Fluoreszenzdetektion nach Auswertung des Mikrotiterplattenscreenings.

	Calcein		Tetrazyklin		Alizarinrot S	
Reaktion	LAMP	PCR	LAMP	PCR	LAMP	PCR
Farbstoffkonz. [mM]	0,05	0,02	0,1	0,25	0,05	0,05
Mn^{2+} -Konz. [mM]	0,5	0,2	0,75	0,2	0,75	0,1
Mg^{2+} -Konz. [mM]	8	1	4	1	4	1

Nachweis von Pyrophosphat mit Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S

In den vorherigen Versuchen konnten die anfänglich gewählten Konzentrationen durch das Screening eingegrenzt und damit die Fluoreszenzdetektion der unterschiedlichen Farbstoffe für die LAMP- und PCR-Reaktion optimiert werden. Um die Sensitivität der identifizierten Farbstoffe zu untersuchen, wurden anschließend Fluoreszenzmessungen unter den optimierten und simulierten Bedingungen für jeden Farbstoff in Abhängigkeit der Pyrophosphatkonzentration durchgeführt (Abb. 28). Für alle drei Farbstoffe konnte im untersuchten Konzentrationsbereich ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Bei der LAMP war bei 1,4 mM PPI der maximale Wert erreicht, danach fiel das Signal für Alizarinrot S und Tetrazyklin ab (Abb. 28 A). Bei der PCR-Reaktion wurde ein kleinerer Konzentrationsbereich des PPI untersucht. Für alle Farbstoffe konnte ein Signalanstieg bis etwa 0,2 mM beobachtet werden (Abb. 28 B). Bei beiden Reaktionen war die Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen des Maximalwertes bei Tetrazyklin und bei Alizarinrot S höher als bei Calcein.

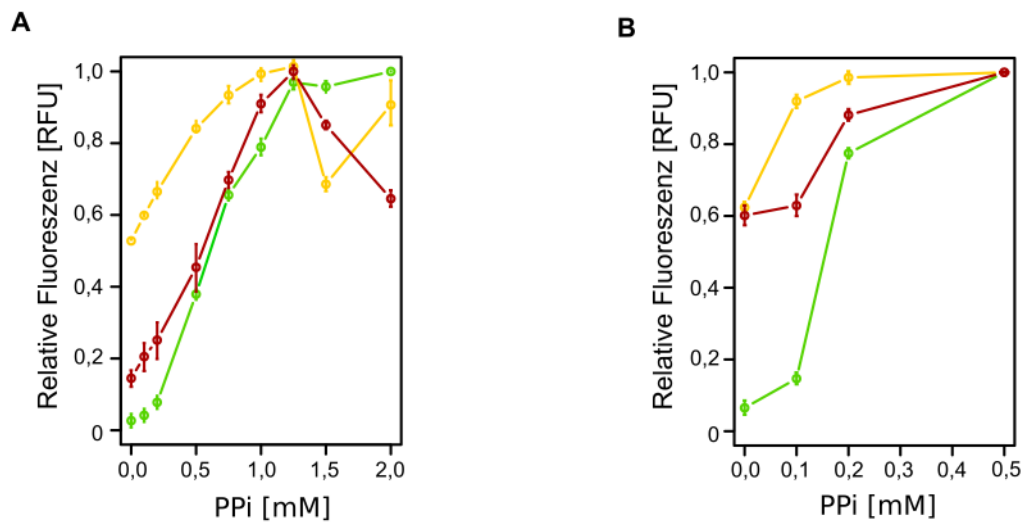


Abbildung 28: Relative Fluoreszenzintensität von Calcein (grün), Tetrazyklin (gelb) und Alizarinrot S (rot) in Abhängigkeit der zunehmenden Pyrophosphatkonzentration (PPi) unter optimierten Bedingungen für (A) die LAMP und (B) die PCR. Verändert aus: Fischbach et al. (2017)

8.3 Detektion von Pyrophosphat in einer Emulsion

Die Durchführung einer digitalen Amplifikation ermöglicht eine präzise und absolute Quantifizierung der Templat-DNA in einer Probe. Da die positiven und negativen Reaktionen im Endpunkt unterschieden werden können, kann eine direkte Auszählung von amplifizierten Templaten durchgeführt werden. Bisher basiert die digitale Amplifikation auf der direkten DNA-Detektion. In diesem Teil der Arbeit sollten die Detektionsmöglichkeiten auf Pyrophosphat-abhängige Farbstoffe für die isothermale Amplifikation ausgeweitet werden.

Zunächst sollte die disperse Phase mit den Reaktionskomponenten und Farbstoffen für die LAMP-Detektion angepasst werden. Die Generierung der Emulsion wurde hierbei Chip-basiert durchgeführt. Die kontinuierliche Phase (HFE-7500 Öl) wurde in diesen Versuchen nicht verändert. Zur Anpassung der dispersen Phase sollten neben der Stabilität und Homogenität der Tröpfchen verschiedene Farbstoffe für die Detektion untersucht werden. Als Alternative zu den in der digitalen PCR eingesetzten interkalierenden Farbstoffen EvaGreen und SYBR Green wurden die zuvor etablierten Farbstoffe (HNB, Calcein, Alizarinrot S und Tetrazyklin) für die indirekte LAMP-Detektion in der Emulsion getestet.

8.3.1 Optimierung der Phasenzusammensetzung für Emulsion

Um den Einfluss der Phasenzusammensetzung auf die Stabilität der Emulsion untersuchen zu können, wurde für die disperse Phase eine LAMP-basierte Zusammensetzung der Reaktion ohne Farbstoff getestet. Zum Vergleich wurde eine vollständig kommerzielle Emulsion für die digitale droplet PCR (ddPCR) nach Herstellerangaben im Droplet-Generator erzeugt. Die generierten Tröpfchen wurden im Anschluss auf einen Glasobjektträger überführt und durch Mikroskopie charakterisiert.

Um die Homogenität der Emulsion zu beurteilen, wurde in der Analyse die Häufigkeitsverteilung der Tröpfchendurchmesser genutzt (Abb. 29).

Es zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen der kommerziell erhältlichen und der angepassten, aber nicht optimierten Emulsion. In der etablierten Emulsion waren alle Tröpfchen gleich groß (Abb. 29 A oben). Die Häufigkeitsverteilung (Abb. 29 B) verdeutlicht diese Beobachtung. Über 80% der 86 ausgewerteten Tröpfchen hatten einen Durchmesser von 110 μm . Die Emulsion mit dem LAMP-Reaktionsansatz (Abb. 29 A unten) zeigte im Gegensatz zur Originalemulsion eine höhere Heterogenität mit unterschiedlich großen Tröpfchen, die Durchmesser zwischen 110 und 200 μm aufwiesen. Bei der entsprechenden Häufigkeitsverteilung (Abb. 29 C) war eine breitere Verteilung der Tröpfchendurchmesser zwischen 110 und 200 μm sichtbar. Von den ausgezählten 83 Tröpfchen hatten nur 55% den korrekten Durchmesser von 110 μm .

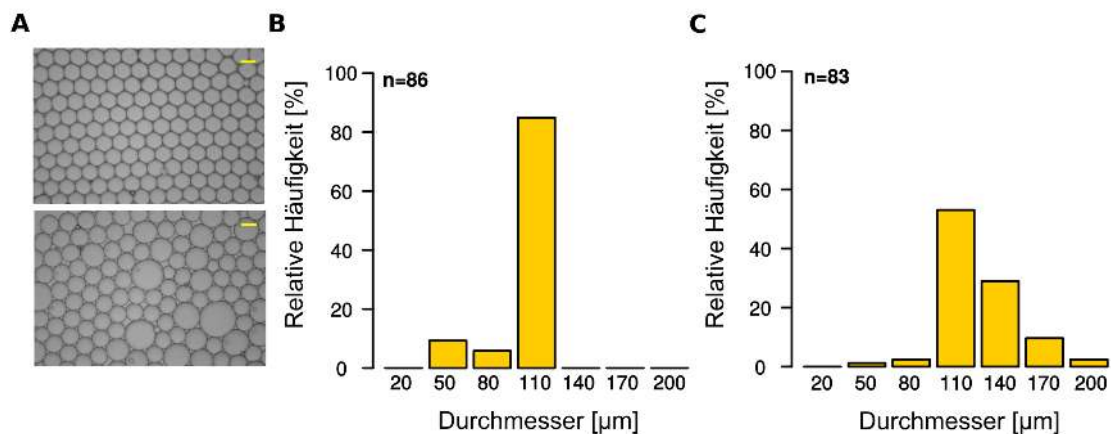


Abbildung 29: (A) Hellfeldaufnahmen (10x) einer Emulsion mit dem „ddPCR Supermix“ (oben) und dem LAMP-Puffer (unten). Der Maßstabsbalken (gelb) entspricht einer Länge von 100 μm . (B) Die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen der Tröpfchendurchmesser zeigen für die ddPCR-Emulsion eine deutlich höhere Homogenität im Vergleich zum LAMP-Reaktionsansatz (C).

Die Homogenität und Stabilität einer Emulsion kann durch den Einsatz Grenzflächenaktiver Substanzen (Emulgatoren, *surfactants*) selektiv gesteuert werden. Für die Stabilisierung der LAMP-Emulsion wurde in der Arbeit das Triblockcopolymer Poloxamer 188 der dispersen Phase mit unterschiedlichen Konzentrationen (0; 1; 1,5 und 2% v/v) zugesetzt (Abb. 30). Die mikroskopische Auswertung zeigte eine Zunahme der Homogenität bis zu einem Poloxamer 188-Anteil von 1,5% (Abb. 30 A). Es war eine gleichmäßige Verteilung gleichgroßer Tröpfchen erkennbar. Bei geringerer oder höherer Emulgatorkonzentration waren größere und kleinere Tröpfchen sichtbar, wobei die Homogenität ohne Emulgator am geringsten war. Dies konnte auch in der Häufigkeitsverteilung im Bereich von 50 bis 200 μm beobachtet werden (Abb. 30 B). Der Anteil der Tröpfchen mit einem Durchmesser von 110 μm war mit 55% gering und entsprach dem Wert aus dem vorherigen Versuch.

Bei einem Volumen-Anteil von 1% sind mit 90% aller gezählten Tröpfchen zu hohe Durchmesser bestimmt worden (Abb. C). Ein Anteil von 1,5% führte zu einer homogenen Emulsion, wobei über 90% der Tröpfchen einen Durchmesser von 110 μm haben (Abb. 30 D).

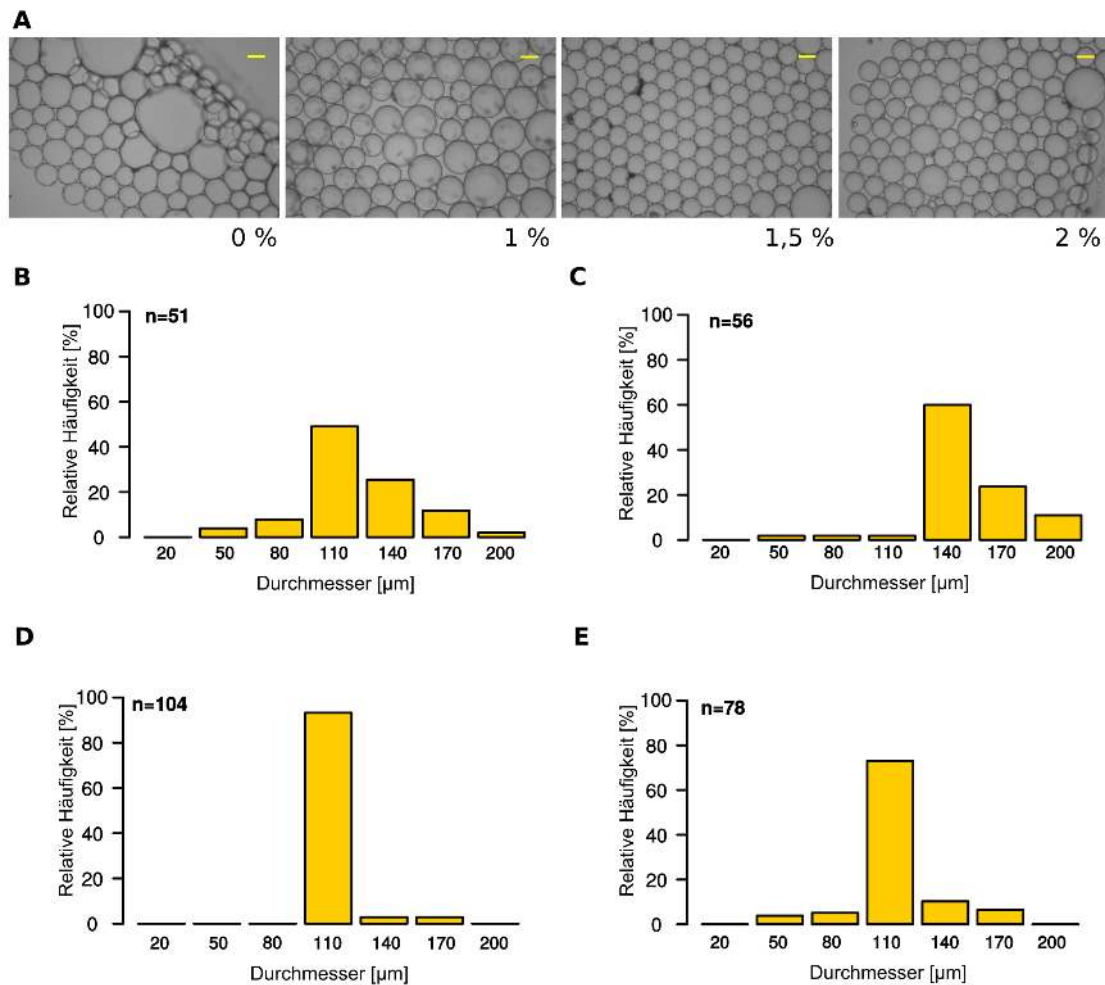


Abbildung 30: (A) Hellfeldaufnahmen (10x) der Emulsion mit dem LAMP-Reaktionsansatz und unterschiedlichen Konzentrationen von Poloxamer 188 als Stabilisator (von links nach rechts: 0%, 1%, 1,5% und 2%). Der Maßstabsbalken (gelb) entspricht 100 μm . Die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen ergaben folgende mittlere Tröpfchendurchmesser: (B) 0%: 109 μm , (C) 1%: 130 μm (D) 1,5%: 103 μm und (E) 2%: 106 μm .

Eine weitere Erhöhung des Anteils resultierte in einer Zunahme der Heterogenität. Der Anteil der Tröpfchen mit 110 μm ist mit 70% weiterhin hoch, aber es konnten auch Tröpfchen mit kleineren und größeren Durchmessern beobachtet werden. Die mittleren Durchmesser aller untersuchten Tröpfchen lagen mit 0% Poloxamer 188 bei 109 μm (± 23 μm), mit 1% bei 130 μm (± 24 μm), mit 1,5% bei 103 μm (± 5 μm) und mit 2% bei 106 μm (± 15 μm).

8.3.2 DNA-basierte Detektion in Emulsion

Nachdem die Homogenität der Emulsion durch die Verwendung des Poloxamers 188 verbessert werden konnte, sollte die Detektion von DNA ohne Amplifikation in der Emulsion untersucht werden. Neben dem im Biorad-System genutzten Farbstoff EvaGreen kann auch SYBR Green für die Detektion von dsDNA verwendet werden. Beide Fluoreszenzfarbstoffe sollten daher in der optimierten LAMP-Emulsion untersucht werden. Die Positivkontrolle wurde durch den Zusatz von genomischer DNA (*Escherichia coli*) simuliert. Die Auswertung der generierten Emulsion erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 31). Die Emulsion mit EvaGreen (Abb. 31 A) wies eine intensive grüne Farbe innerhalb der Tröpfchen auf, wohingegen die Emulsion mit SYBR Green (Abb. 31 B) eine gleichmäßige leichte grüne Färbung innerhalb und außerhalb der Tröpfchen zeigte. Dieses hohe Hintergrundsignal verhinderte die Unterscheidung von positiven und negativen Tröpfchen im Gegensatz zu EvaGreen.

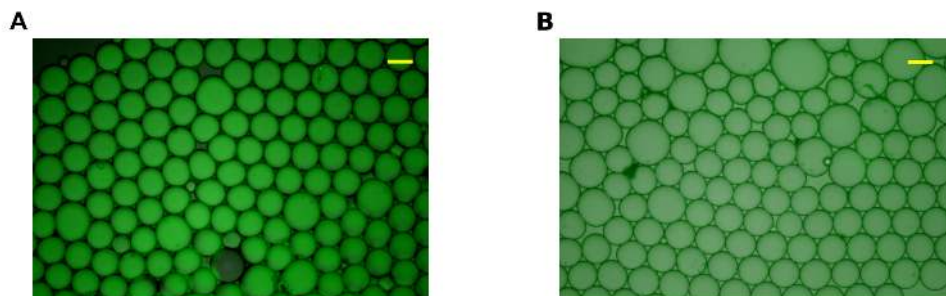


Abbildung 31: Vergleich einer optimierten LAMP-Emulsion mit 1,5% Poloxamer 188 sowie (A) EvaGreen und (B) SYBR Green für den Nachweis der genomischen *E. coli*-DNA. Der Maßstabsbalken (gelb) entspricht 100 μm .

8.3.3 Pyrophosphat-abhängige Detektion in Emulsion

Anschließend wurde untersucht, ob auch die indirekte Detektion über das akkumulierende PPI in der Emulsion genutzt werden kann. Dafür wurden dem LAMP-Reaktionsansatz verschiedene Farbstoffe mit Mn^{2+} als Quencher zugesetzt. Die optimalen Konzentrationen im LAMP-Ansatz basierten auf den Ergebnissen aus dem Abschnitt 8.2. Getestet wurden Calcein, Tetrazyklin, Alizarinrot S (Mn^{2+} -abhängig) und HNB (Mg^{2+} -abhängig). Für eine positive Probe wurde Natriumpyrophosphat zugesetzt. Die Emulsion wurde anschließend im Droplet-Generator erzeugt und nach Mischung mit den negativen Tröpfchen für die mikroskopische Analyse auf einen Glasträger überführt. Die Abbildung 32 zeigt die Hellfeldaufnahmen der Emulsion und die Fluoreszenzaufnahmen der positiven Tröpfchen sowie einer Mischung aus positiven und negativen Tröpfchen.

Die Tröpfchen hatten unabhängig vom untersuchten Farbstoff einen Durchmesser von 110 μm . Die Fluoreszenzaufnahmen der positiven Tröpfchen lieferte für alle Farbstoffe ein spezifisches Fluoreszenzsignal im entsprechenden Filter. Die Mischung der positiven und negativen Tröpfchen wies bei allen Farbstoffen einen sichtbaren Signalunterschied auf. Bei Calcein (Abb. 32 A), HNB (Abb. 32 C) und Alizarinrot S (Abb. 32 D) waren die

Unterschiede zwischen positiven und negativen Tröpfchen am deutlichsten sichtbar. Die positiven LAMP-Reaktionsansätze mit Tetrazyklin (Abb. 32 B) unterschieden sich kaum von den negativen Tröpfchen. Bei HNB (Abb. 32 C) war ein umgekehrter Effekt zwischen hoher und niedriger Fluoreszenz zu sehen. Hier hatten die negativen Tröpfchen ein hohes und die positiven Tröpfchen ein niedriges Fluoreszenzsignal. Demnach konnten sowohl Calcein, HNB als auch das zuvor etablierte Alizarinrot S für die Pyrophosphatdetektion in einer Emulsion genutzt werden.

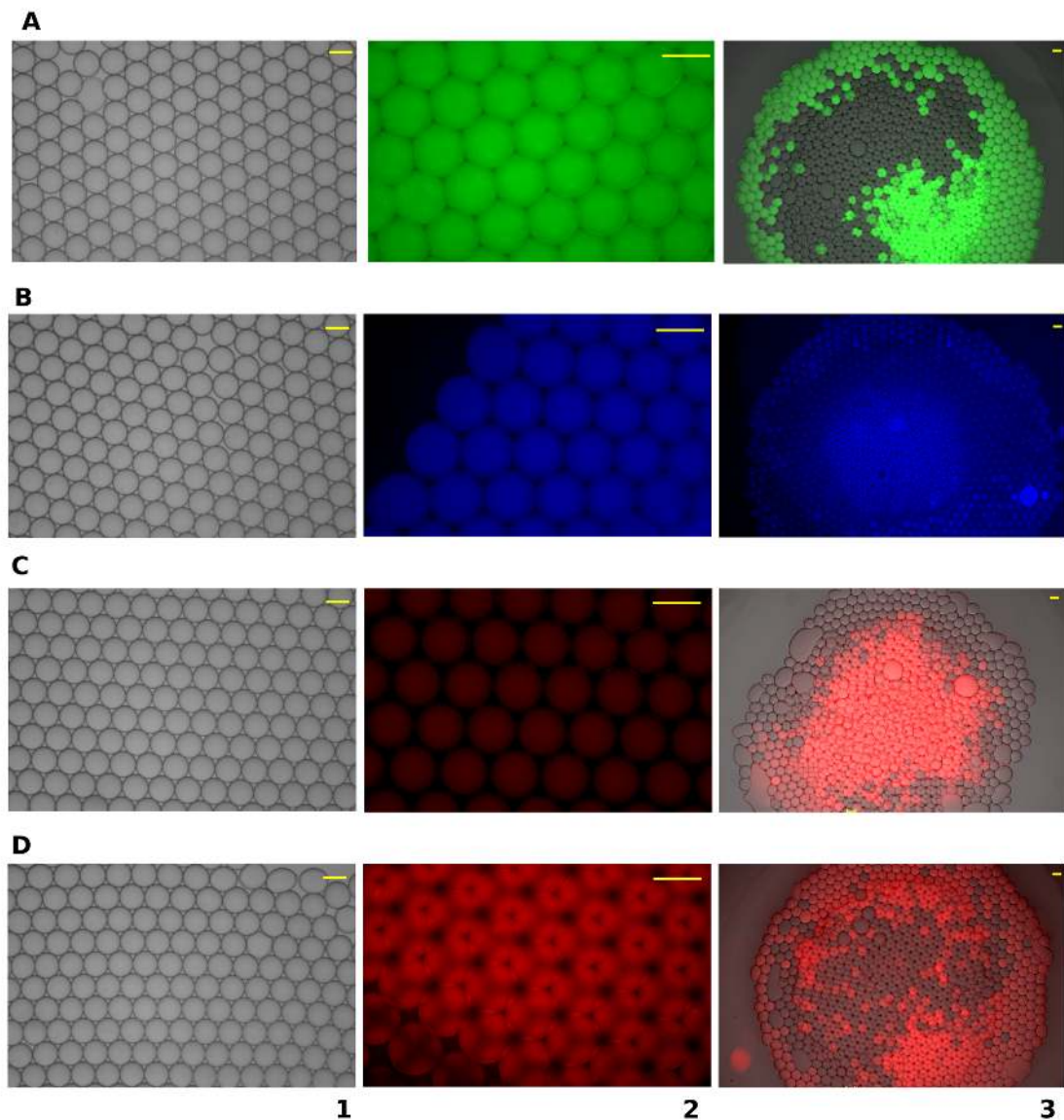


Abbildung 32: Detektion von Pyrophosphat in der optimierten Emulsion mit 1,5% Poloxamer 188 und LAMP-Reaktionsansatz. (A) Calcein, (B) Tetrazyklin, (C) HNB und (D) Alizarinrot S als 10x Hellfeldaufnahme (1), 20x Fluoreszenzaufnahme (2) der positiven Tröpfchen sowie als 4x Fluoreszenzaufnahme der Mischung aus positiven und negativen Tröpfchen (3). Die Farbdarstellung der Fluoreszenzaufnahmen basiert auf Falschfarben der Filter GFP (grün) für Calcein, DAPI (blau) für Tetrazyklin und Texas Red (rot) für Alizarinrot S und HNB. Der Maßstabsbalken (gelb) entspricht einer Länge von 100 μm .

8.4 Etablierung der Hinge-initiated Primer Based Amplification (HIP)

Die bisher verwendete LAMP ist eine effiziente und sensitive isothermale Reaktion, die hochmolekulare DNA generiert. Die Sensitivität macht die LAMP jedoch anfällig für unspezifische Amplifikationen (Kreuzkontaminationen oder Primerartefakte). Zudem ist das Primerdesign kompliziert und muss Software-unterstützt erfolgen, um die Effizienz der Reaktion zu gewährleisten. Die Reduzierung der Komplexität von isothermalen Reaktionen kann durch eine gezielte Modifizierung der für die Reaktion notwendigen Primer erreicht werden. Um die Anzahl der benötigten Primer zu reduzieren und trotzdem eine effiziente Regeneration der Primerbindungsstelle zu gewährleisten, sollte als Grundlage ein bifunktionelles Verbindungselement (*linker*) zwischen zwei Primerregionen (sequenzspezifische Bindungsstelle und Rückfaltsequenz) integriert werden und einen so genannten Hinge-Primer bilden (Abb. 33). Der neue Hinge-Primer sollte die kontinuierliche Regenerierung der initialen Primer-Bindungsstelle und damit die Strangverdrängung im Amplifikationsprozess unter isothermalen Reaktionsbedingungen verbessern.

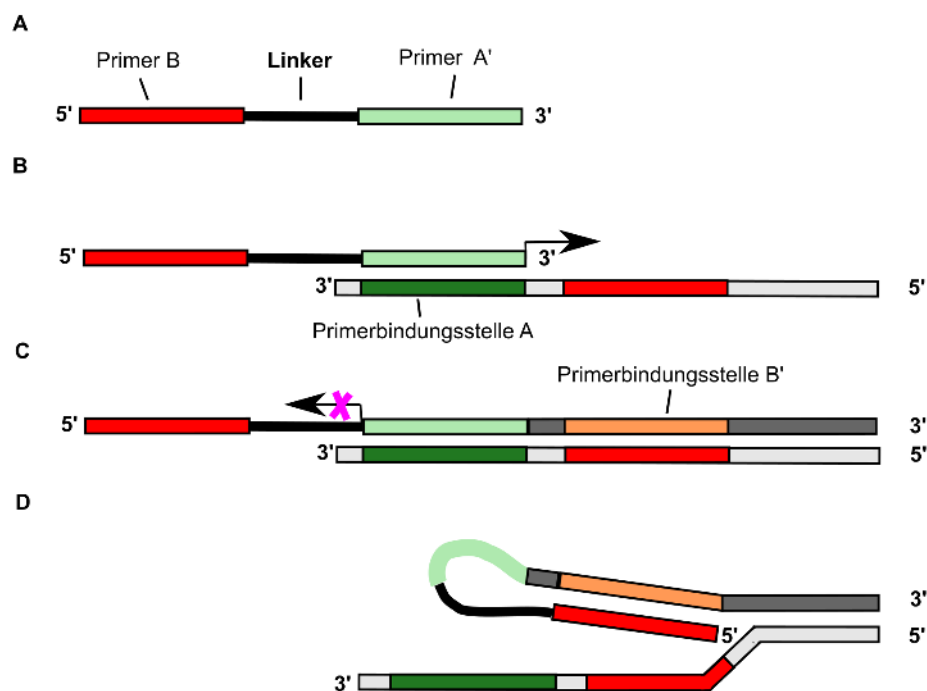


Abbildung 33: (A) Die Struktur des bifunktionellen Hinge-Primers, der aus einem Primer A' und B besteht. Beide werden durch einen Linker (schwarze Linie) miteinander verbunden. (B) Der Primer A' bindet spezifisch an die Bindungssequenz A der Zielsequenz. (C) Die DNA-Polymerase verlängert den Primer und bildet dadurch die Primerbindungsstelle B'. Der Linker verhindert die Polymeraseaktivität (Kreuz) in die Gegenrichtung, wodurch der Primer B immer einzelsträngig bleibt. (D) Nach der thermodynamisch bedingten Rückfaltung zu der stabileren Haarnadelstruktur durch die Bindung des Primers B und die Region B' wird die ursprüngliche Primerbindungsstelle A wieder freigesetzt bzw. liegt einzelsträngig vor.

8.4.1 Charakterisierung des Reaktionsmechanismus

Die symmetrische HIP-Reaktion basiert analog zur LAMP auf zwei langen Primern (Vorwärts-Hinge und Rückwärts-Hinge) mit entgegengesetzter Orientierung. Im Unterschied zur LAMP ist ein bifunktionaler Linker integriert. Der erwartete Mechanismus setzt sich aus wiederholenden Schritten mit Primerhybridisierung, Verlängerung, Rückfaltung und Regenerierung der Bindungsstelle zusammen (Abb. 34). Die Reaktion beginnt mit der Hybridisierung des sequenzspezifischen Primers (Vorwärts-Hinge, BA'), welcher sich aus der primären Bindungssequenz (A') und einer sekundären Umklappsequenz (B) zusammensetzt (Abb. 34, 1). Die nachfolgende Verlängerung des DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase (5' zu 3') führt zur Bildung des komplementären DNA-Strangs. Die sekundäre Bindungsstelle B kann durch Umklappen an die zuvor synthetisierte komplementäre Bindungssequenz B' hybridisieren und eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden. Diese Struktur hat eine höhere Schmelztemperatur als das Doppelstrangende allein (Abb. 34, 2). Durch den für die DNA-Polymerase nicht lesbaren Linker in der Haarnadelstruktur wird sichergestellt, dass die ursprüngliche primäre Bindungssequenz (A') frei bleibt und für die erneute Hybridisierung eines neuen Hinge-Primers genutzt werden kann (Abb. 34, 3). Bei der erneuten Strangverlängerung wird der vorher synthetisierte Strang durch die Polymerase verdrängt (Abb. 34, 4).

Der freigesetzte DNA-Strang steht jetzt für die Bindung des zweiten Hinge-Primers (Rückwärts-Hinge) mit gleicher Funktionalität in entgegengesetzter Orientierung zur Verfügung (Abb. 34, 5). Durch die Verlängerung mit der DNA-Polymerase können nachfolgend an beiden Enden des jeweilig amplifizierten Doppelstranges die Haarnadelstrukturen ausgebildet werden (Abb. 34, 6). Somit sind die Enden für beide Hinge-Primer erneut zugänglich (Abb. 34, 7). Die einzelnen Reaktionsschritte wiederholen sich bis die Primer und Nukleotide verbraucht sind oder die Reaktion durch die Produktakkumulation intrinsisch gehemmt wird.

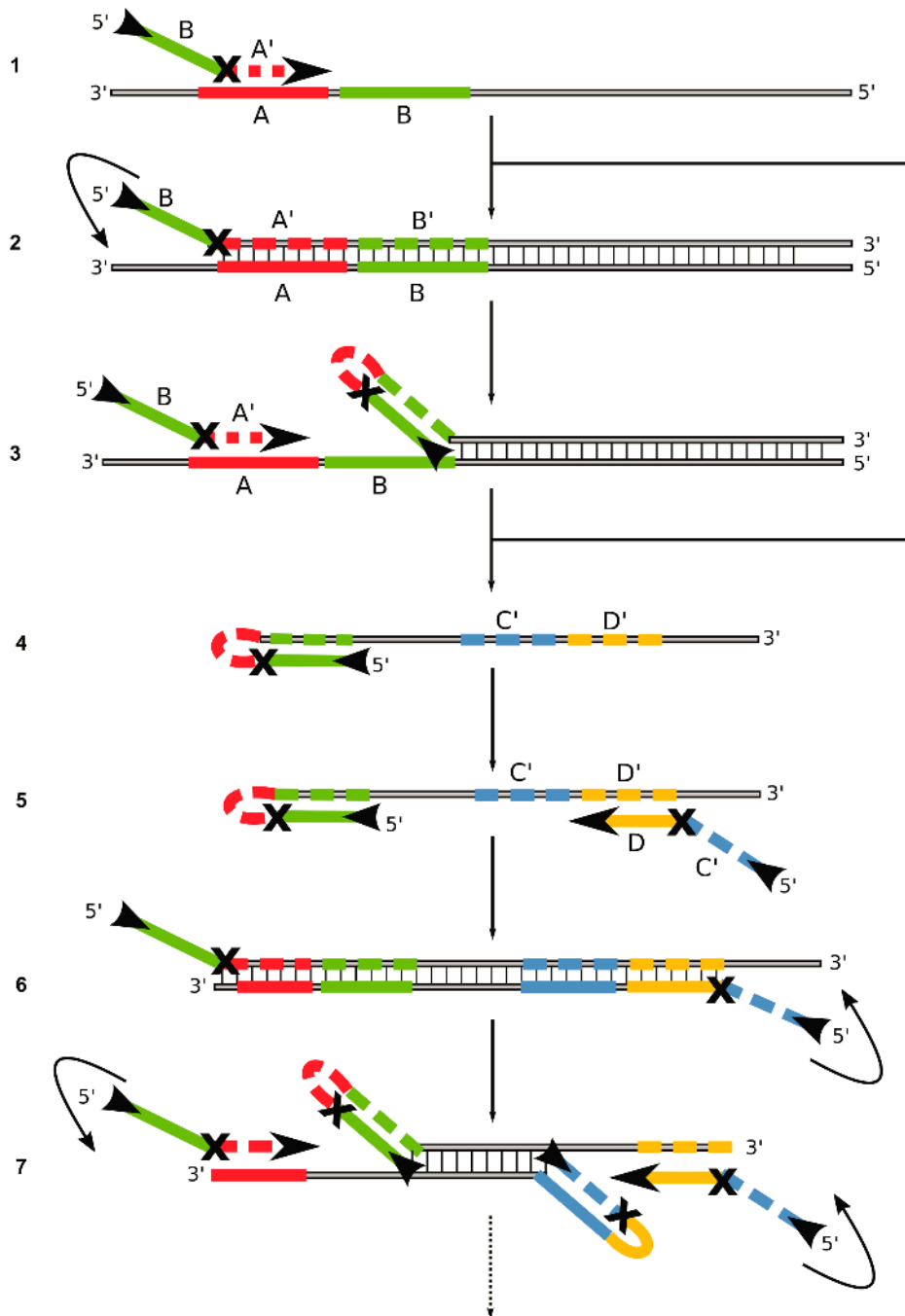


Abbildung 34: Mechanismus der symmetrischen Hinge-initiated Primer Based Amplification (HIP) mit zwei Hinge-Primern. (1) Hybridisierung des Vorwärtsprimers (BA'), gefolgt von der Verlängerung des Primers durch die *Bst* DNA-Polymerase. (2) Faltung des DNA-Strangs zu der thermodynamisch stabileren Haarnadelstruktur, wodurch die ursprüngliche Primer-Bindungsstelle wieder frei ist. (3 und 4) Durch die erneute Hybridisierung des Vorwärtsprimers wird der vorher gebildete Doppelstrang aufgetrennt. (5 und 6) An dem abgelösten DNA-Strang kann durch die Hybridisierung des Rückwärtsprimers (DC') der Gegenstrang durch die Polymerase vervollständigt werden. (7) Durch die Rückfaltung der Enden zu den Haarnadelstrukturen werden beide Primer-Bindungsstellen freigesetzt. Die Wiederverwertung der Bindungsstellen für die Hinge-Primer führt zur kontinuierlichen Verlängerung der DNA. Das **X** in den beiden Hinge-Primern repräsentiert die Modifikation, welche die Aktivität der *Bst* DNA-Polymerase an dieser Stelle blockieren soll. Beispiele sind die abasische Stelle (abasiches Furan) und der C12-Spacer (Hexaethylenglykol). Zur Beschleunigung der Reaktion kann zusätzlich ein äußerer Primer eingesetzt werden. Dieser unterstützt die initiale Generierung des Templats durch eine zusätzliche Strangverdrängung.

Die Effizienz der HIP-Amplifikation hängt von der Modifikation der Primer ab. Die integrierte Struktur muss die Verlängerung des DNA-Strangs in 5'-3'-Richtung über die sekundäre Bindungsstelle hinaus verhindern. Eine Hexaethylenglykol-Modifikation (HEG) kann die Polymerase effizient blockieren. Modifikationen ohne Purine oder Pyrimidine (*abasic site*) in der DNA verhindern ebenfalls die weitere Amplifikation durch verschiedene Polymerasen. Um die Effizienz der Amplifikation ohne Optimierung mit zwei Hinge-Primern unter isothermalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen, wurde zunächst eine abasische Stelle als Modifikation genutzt. Zuvor publizierte LAMP-Primer für den Nachweis von PSTVd wurden zum Vergleich der Reaktionseffizienz herangezogen. Beide Reaktionen (LAMP und HIP) wurden bei gleichen Bedingungen mit 0,2 ng cDNA des PSTVd bei 65 °C durchgeführt (Abb. 35 A). Eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA wurde zum Vergleich der Größenverteilung der generierten Produkte herangezogen (Abb. 35 B).

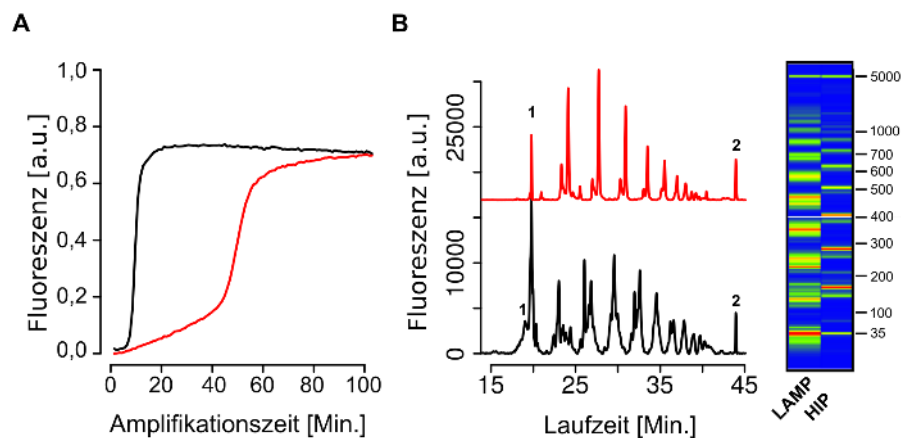


Abbildung 35: Vergleich der LAMP- und HIP-Reaktion für den Nachweis von PSTVd. (A) Die Echtzeit-Amplifikationskurven für die LAMP (schwarz) und HIP (rot) wurden bei 65 °C aufgenommen. (B) Elektropherogramm der Kapillarelektrophorese der LAMP- (schwarz) und HIP-Probe (rot), wobei die Fluoreszenzintensität gegen die Laufzeit aufgetragen ist. Peak 1 und 2 sind die internen Größenstandards (35 und 5000 bp). Das virtuelle Gelbild zeigt die Größenverteilung und die Produktmengen (rot: hoch, grün: gering) der DNA aus beiden Reaktionen. Als Templat für die LAMP und HIP wurden 0,2 ng der PSTVd-cDNA genutzt.

Im Vergleich zur LAMP war bei der HIP zunächst eine längere Phase mit linearem Signalanstieg in der Amplifikationskurve sichtbar (0 bis 40 Minuten). Die Amplifikation mit exponentiellem Signalanstieg begann später als in der LAMP. Hier war nach etwa 12 Minuten ein exponentieller Fluoreszenzanstieg detektierbar. Die HIP hingegen zeigte erst nach 40 Minuten einen exponentiellen Signalanstieg (Abb. 35 A). Die amplifizierte DNA wurde anschließend in der Kapillarelektrophorese aufgetrennt, wobei für beide Reaktionen eine Leiter-ähnliche Bandenstruktur beobachtet wurde (Abb. 35 B). Im Vergleich zur LAMP waren die Peaks im Elektropherogramm der HIP über die gesamte Laufzeit schärfer. Die beiden Methoden unterschieden sich auch in den Bandenintensitäten, die bei der HIP deutlich geringer waren. Die Produktgrößen befanden sich bei beiden Metho-

den zwischen 100 und 1.000 bp. In der Agarose-Gelelektrophorese konnte die generierte DNA in Form von diffusen Fragmenten (Schmier) auch mit größerem Molekulargewicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl die LAMP als auch die neue HIP generierten demnach hochmolekulare DNA. Die ersten Ergebnisse der HIP-Reaktion zeigten eine Amplifikation mit geringerer Effizienz als die LAMP. Daher sollte nachfolgend die Reaktionskinetik der HIP optimiert werden. Dafür wurden unterschiedliche Modifikationen (abasische Stelle und C12-Spacer) als Linkerstruktur in den Hinge-Primern untersucht.

8.4.2 Einfluss der Linker-Struktur auf die Kinetik

Für eine höhere Flexibilität des Hinge-Primers wurde neben der zuvor eingesetzten abasischen Stelle als Modifikation auch eine längere Linkerstruktur mit Hexaethylenglykol (C12-Spacer) in der HIP-Reaktion untersucht. Als Kontrolle wurden unmodifizierte Hinge-Primer (ohne Linker) genutzt. Zusätzlich wurde die Effizienz der Hinge-Primer in Kombination mit den in der LAMP eingesetzten Schleifen-bildenden Primern (FIP, BIP) verglichen, da die hierbei gebildeten einzelsträngigen Bereiche mit 40 Basenpaaren sehr lang sind und die Reaktion zusätzlich beeinflussen können. Außerdem wurde getestet, ob als korrespondierender Primer auch ein kurzer PCR-ähnlicher Primer (hier der F3- bzw. B3-Primer der LAMP) verwendet werden kann. Für jede der Hinge-Modifikationen wurden alle möglichen Kombinationen, bestehend aus dem jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer in einer einzelnen Reaktion mit dem PSTVd als Templat getestet. Die Effizienz wurde über die Zeit bis zum exponentiellen Signalanstieg als Time-to-Positivity (Tp) analysiert und die Ergebnisse als Heatmap dargestellt (Abb. 36).

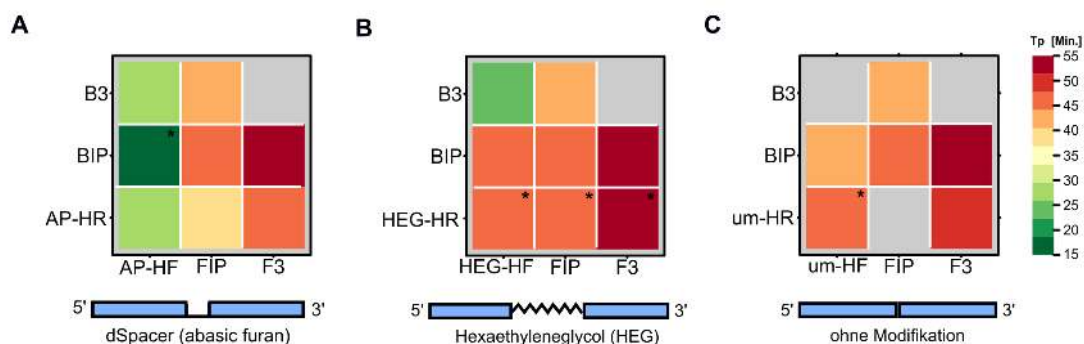


Abbildung 36: Variation der Hinge-Primer mit unterschiedlichen Modifikationen in der Amplifikation von PSTVd mit Analyse der Reaktionskinetik. Die Farbskalierung repräsentiert die kalkulierten Tp-Werte jeder Reaktion. In den Heatmaps sind die Hinge-Primer-Reaktionen mit der dSpacer-Modifikation (A), mit der C12-Spacer-Modifikation (B) und ohne Modifikation (C) dargestellt. Die Primer AP-HR/HF sind die Hinge-Primer mit dSpacer, HEG-HR/HF die Hinge-Primer mit C12-Spacer und um-HR/HF die Hinge-Primer ohne Modifikation. Die Primer FIP, BIP, F3 und B3 sind die Primer aus der LAMP-Reaktion. Die Y-Achse der Heatmap zeigt die Rückwärtsprimer und die X-Achse die Vorwärtsprimer. Der Stern (*) repräsentiert die Kontrollreaktionen ohne Templat-DNA, die nach 45 Minuten Inkubationszeit ein positives Signal zeigten. Graue Felder sind Reaktionen, bei denen kein Tp-Wert ermittelt werden konnte.

Die erste Gruppe (Abb. 36 A) bestand aus den Hinge-Primern mit abasischer Stelle in Kombination mit den LAMP-Primern (Nib-FIP und Nib-BIP) sowie den linearen Primern (Nib-F3 und Nib-B3). Der kleinste Tp-Wert (15-20 Minuten) wurde mit der Kombination aus dem Hinge-Primer (PSTVd-AP-HF) und dem LAMP-Primer (BIP) erreicht. Die Kombinationen bestehend aus PSTVd-AP-HF und PSTVd-AP-HR sowie PSTVd-AP-HF und Nib-B3 ergaben leicht höhere Tp-Werte (25-30 Minuten). Alle anderen Kombinationen resultierten in Tp-Werte zwischen 40 und 45 Minuten. Die beste Kombination (PSTVd-AP-HF / Nib-BIP) erzeugte in der Negativkontrolle allerdings ein falsch-positives Ergebnis.

Die zweite Gruppe umfasste die Versuche mit Hexaethylglykol als Modifikation in den Hinge-Primern (Abb. 36 B). Hier wurde der niedrigste Tp-Wert mit der Kombination HEG-HF und Nib-B3 mit 25 Minuten erreicht. Andere Kombinationen ergaben Tp-Werte zwischen 35 bis 55 Minuten. Alle Kombination mit dem PSTVd-HEG-HR resultierten in falsch-positive Reaktionen in den Kontrollreaktionen.

Die Kontrollgruppe ohne Modifikation ergab für alle Kombinationen Tp-Werte zwischen 40 und 55 Minuten (Abb. 36 C). Bei drei der getesteten Kombinationen konnte keine Amplifikation beobachtet werden. Demnach hatte die Modifikation mit der abasischen Stelle im Vorwärts-Hinge-Primer (PSTVd-AP-HF) als Kombination mit dem Schleifenbildenden Primer Nib-BIP der LAMP die besten Resultate erzielt. Auch die Kombination mit einem linearen Primer (Nib-B3) für die entgegengesetzte Richtung ist möglich.

Aufgrund der aufgetretenen falsch-positiven Ergebnisse in den Kontrollreaktionen wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen die weitere Optimierung der HIP-Effizienz mit neuen Primern für den Nachweis von *E. coli* als Templat mit der abasischen Stelle als Modifikation auch in Kombination mit linearen Primern durchgeführt (Abb. 37 A). Getestet wurden unterschiedliche Kombinationen der Vorwärts- und Rückwärts-Hinge-Primer (LZ-HF und -HR) mit den linearen Primern (LZL-389 und LZR-653) (s. Tab. 4). Die untersuchten Kombinationen sind in Abbildung 37 A aufgeführt. Die Analyse erfolgte durch den Vergleich der Amplifikationskurven (Abb. 37 C) und der Schmelzkurvenanalyse (Abb. 37 C). Die Amplifikationskurven unterschieden sich bei allen Kombinationen hinsichtlich der Signalintensität im Endpunkt und der Reaktionskinetik, welche nachfolgend auch über die Tp-Werte analysiert wurde. Die schnellste Reaktion (kleinster Tp-Wert mit 22 Minuten) wurde mit den beiden Hinge-Primern (LZ-HF/R) als symmetrische Reaktion erzielt. Nur wenige Minuten später wurde die Probe mit der vorherigen Kombination und mit den zusätzlichen Primern LZL-389 und LZR-653 positiv. Die erste Kombination wies aber eine steilere Signalzunahme auf. Bei der Untersuchung mit nur jeweils einem der beiden Hinge-Primer als asymmetrische Reaktion in Kombination mit dem gegenläufigen linearen Primer (LZL-389 oder LZR-653) hat die Reaktion mit dem Rückwärts-Hinge-Primer (LZ-HR) mit 39 Minuten einen kleineren Tp-Wert als die Reaktion mit dem Vorwärts-Hinge-Primer (LZ-HF) mit 47 Minuten. Die Verwendung der einzelnen Hinge-Primer hatte mit 50 bis 60 Minuten die größten Tp-Werte. Alle Kontrollreaktionen (ohne Templat) zeigten keinen Signalanstieg in der Amplifikationszeit. Die Schmelzkurvenanalyse (Abb. 37 B) ergab nur

geringe Temperaturunterschiede zwischen den jeweiligen Kombinationen. Bis auf die Probe mit dem Vorwärts-Hinge-Primer als Kombination mit dem linearen und einem äußeren Primer lagen die Werte zwischen 94 °C und 95 °C.

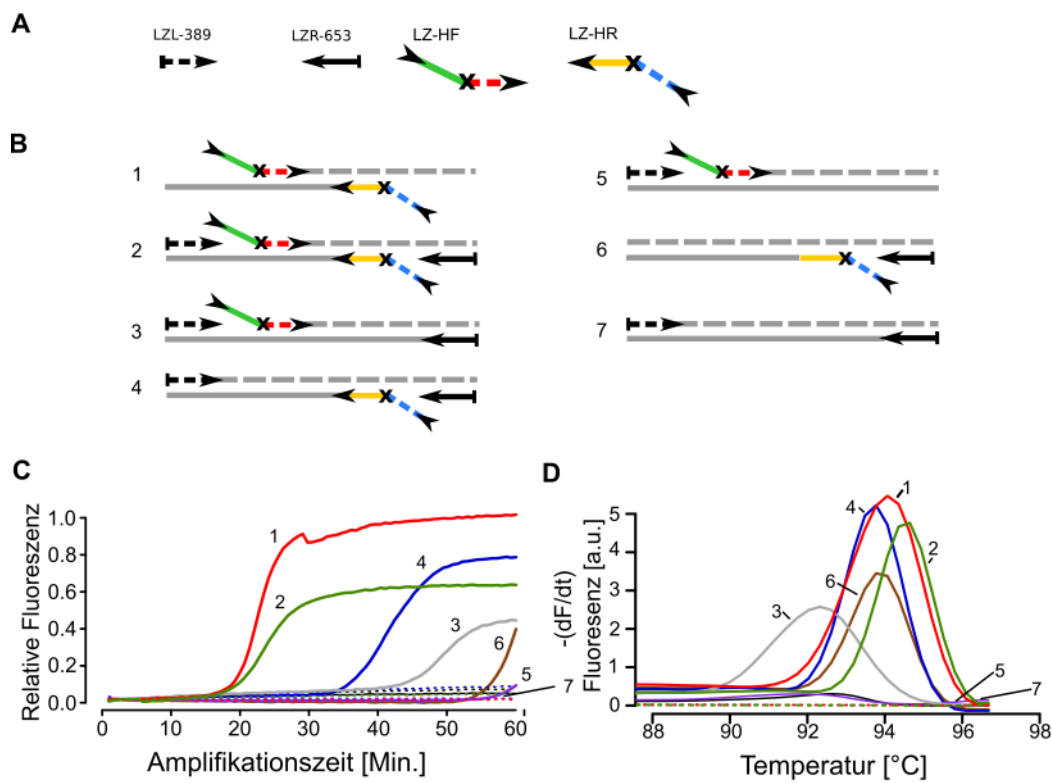


Abbildung 37: Reaktionskinetik unterschiedlicher Kombinationen aus den Hinge-Primern mit abasischer Stelle als Modifikation und korrespondierenden linearen Primern. (A) Übersicht der verwendeten Primer. (B) Schematische Darstellung der getesteten Primer-Kombinationen (1-7). Kombination 1 und 2 beschreiben die symmetrische HIP. Die Kombinationen 3-6 die asymmetrische HIP. Kombination 7 ist eine Kontrolle ohne Hinge-Primer. (C) Amplifikationskurven für jede Kombination (1-7) mit dem entsprechenden Schmelzkurvenanalyse (B). Die Positivreaktionen wurden mit 5 ng *E. coli*-DNA (durchgezogene Linie) und die Negativkontrollen ohne Templat (gestrichelte Linie) durchgeführt.

8.4.3 Einfluss der Magnesium- und Primerkonzentration auf die Kinetik

Die Reaktionskinetik wird durch die Primer-Modifikation, aber auch durch die Primer- und Salzkonzentration in der Reaktion bestimmt. Darüber hinaus kann Mg^{2+} als Kofaktor der *Bst* DNA-Polymerase die Enzymaktivität beeinflussen. Um diesen Effekt in der HIP zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mg^{2+} -Konzentrationen (4-10 mM) in der symmetrischen und asymmetrischen HIP getestet und die T_p -Werte verglichen (Tab. 11). Für die symmetrische Reaktion (beide Hinge-Primer) konnten T_p -Werte zwischen 17 und 30 Minuten bestimmt werden, wobei der niedrigste Wert mit 6 mM Mg^{2+} erreicht wurde. Wurde nur ein Hinge-Primer verwendet (asymmetrische HIP), ergaben sich Werte zwischen 30 und 56 Minuten. Bei beiden Formen der asymmetrischen HIP wurden die niedrigsten T_p -Werte wie zuvor bei der symmetrischen HIP bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 6 mM erreicht. Im Gegensatz zur asymmetrischen HIP resultierte die symmetrische Reaktion bei allen Mg^{2+} -Konzentrationen in falsch-positiven Ergebnissen.

Tabelle 11: Variation der Mg^{2+} -Konzentration zwischen 4 und 10 mM in der symmetrischen und asymmetrischen HIP. Aufgelistet sind die T_p -Werte in Minuten mit Standardabweichung ($n=3$). NA bedeutet keine Amplifikation.

Primerkombination	Templat	Magnesiumkonzentration [mM]			
		4	6	8	10
LZ-HF und LZ-HR	+	30 ± 1	17 ± 2	25 ± 1	29 ± 1
	-	NA	46 ± 1	58 ± 1	46 ± 1
LZ-HF und LZR-653	+	56 ± 2	34 ± 1	38 ± 1	45 ± 2
	-	NA	NA	NA	NA
LZL-389 und LZ-HR	+	51 ± 1	39 ± 2	46 ± 1	46 ± 1
	-	NA	NA	NA	NA

Verschiedene Primer-Konzentrationen (0,8 bis 1,4 mM) konnten bei keiner der untersuchten Kombinationen eine signifikante Veränderung der T_p -Werte zeigen (s. Tab. 14 im Anhang).

8.4.4 Einfluss der Amplifikationsregion auf die Kinetik

Eine weitere Möglichkeit, die Effizienz ohne Beeinflussung der Spezifität zu verbessern, besteht in der Verkürzung der zu amplifizierenden Region auf der Templat-DNA. Um den Effekt zu untersuchen, wurden verschiedene Distanzen zwischen der Primerbindungsstelle A des Hinge-Primers und dem korrespondierenden linearen Primer für die Gegenrichtung untersucht. Getestet wurden drei verschiedene Distanzen zwischen 80 und 190 bp und die entsprechenden T_p -Werte für den Vorwärts- und Rückwärts-Hinge-Primer dargestellt (Abb. 38 A). Die T_p -Werte lagen zwischen 20 und 45 Minuten, wobei für beide Hinge-Primer eine Verringerung der Zeit mit kürzerer Amplifikationsregion erreicht werden konnte (Abb. 38 B).

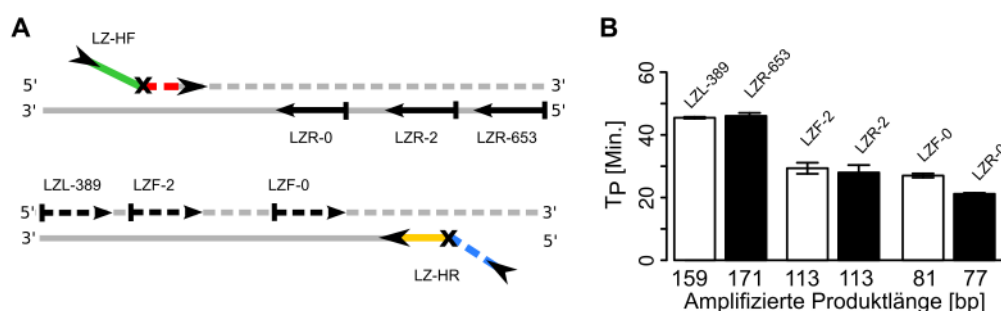


Abbildung 38: Analyse der Reaktionskinetik der asymmetrischen HIP in Abhängigkeit der Produktlänge mit kleiner werdender Distanz zwischen dem Hinge- und dem äußeren linearen Primer. (A) Darstellung der Bindungsstellen auf der DNA. (B) T_p -Werte in Abhängigkeit zur Primer-Distanz (Länge des amplifizierten Produkts). Beide Richtungen des Vorwärts-Hinge- (weiße Balken) und Rückwärts-Hinge-Primers (schwarze Balken) sind getestet worden ($n=3$).

8.4.5 Bestimmung der Sensitivität

Aus den vorherigen Versuchen ergab sich eine für die asymmetrische Reaktion optimierte Kombination bestehend aus dem LZ-HR-Primer mit abasischer Stelle als Modifikation, LZF-0 als gegenläufiger Primer und dem LZR-653-Primer für die unterstützende Strangverdrängung. Die Sensitivität der Reaktion wurde abschließend mit seriell verdünnter genomischer DNA von *E. coli* bestimmt. In Abbildung 39 ist die Korrelation der T_p -Werte in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge dargestellt.

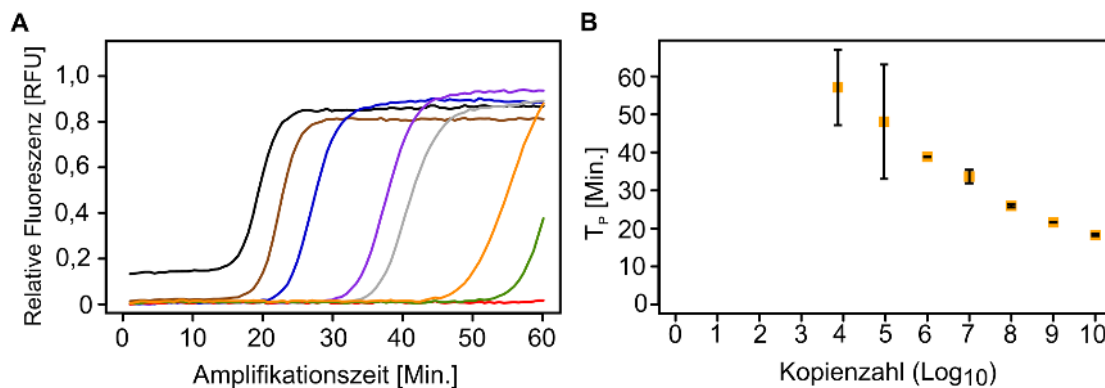


Abbildung 39: Sensitivität der Hinge-Amplifikation mit dem LZ-HR-Primer, und korrespondierenden LZF-0-Primer und LZR-653-Primer für den Nachweis von genomischer *E. coli*-DNA bei 65 °C für 60 Minuten. (A) Amplifikationskurven mit 10^{10} (schwarz), 10^9 (braun), 10^8 (blau), 10^7 (violett), 10^6 (grau), 10^4 (orange) und 10^3 (grün) Genomkopien sowie die Negativkontrolle (rot) ohne Templat. (B) Korrelation der T_p -Werte mit der eingesetzten Menge Genomkopien. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Proben 10^6 und 10^{10} beträgt 0,98 ($n=3$). Die Proben 10^4 und 10^5 wurden aufgrund des hohen Fehlers in der linearen Regression ausgeschlossen.

Der beobachtete Signalverlauf entsprach dem typischen Verlauf der exponentiellen Amplifikation, wobei mit der Abnahme der eingesetzten DNA-Menge die Zeitpunkte bis zum Erreichen der exponentiellen Phase verlängert wurden (Abb. 39 A). In einem Bereich von 10^6 bis 10^{10} Kopien konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Kopienzahl und T_p -Wert festgestellt werden (Abb. 39 B). Geringere Verdünnungsstufen ergaben eine hohe Standardabweichung, so dass sie aus der Korrelation ausgeschlossen wurden. Die Nachweisgrenze der HIP für genomische DNA von *E. coli* konnte demnach bei 10^6 Kopien festgelegt werden.

9 Diskussion

9.1 Echtzeit- und Endpunktdetektion in einer geschlossenen Reaktion für den Pathogennachweis

Der LAMP-Nachweis als geschlossene Reaktion kann sowohl direkt über die Akkumulation der DNA als auch indirekt über das in der Amplifikation gebildete Pyrophosphat (PPi) erfolgen. Beide Verfahren können für eine qualitative und quantitative Analyse eingesetzt werden. Die Anwendbarkeit als Schnelltest, Feldtest, POCT oder Screening-Applikation wird allerdings durch unterschiedliche Stärken und Schwächen beeinflusst.

Die Endpunktdetektion gibt eine qualitative Auskunft über die An- oder Abwesenheit des Pathogens in der zu untersuchenden Probe und sollte daher als Schnelltest ohne kostenintensive Laborausstattung „vor-Ort“ angewendet werden können. Die Echtzeitdetektion durch eine kontinuierliche Messung des Fluoreszenzsignals mithilfe von tragbaren Fluorimetern ermöglicht zusätzlich eine quantitative Bestimmung des Pathogens in der Probe. Für beide Verfahren wurden verschiedene Beispiele für den Phytopathogennachweis (PSTVd, Cms und Xhp) in einer geschlossenen Reaktion untersucht.

Kreuzkontamination als Ursache falsch-positiver Ergebnisse

Die Vereinfachung des Nachweis' durch die Kombination von Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen Reaktionsraum sollte die Handhabung verbessern sowie das Auftreten unspezifischer Amplifikation aufgrund von Kreuzkontaminationen reduzieren. In der LAMP wird im Vergleich zur PCR bis zu 100-mal mehr DNA amplifiziert (Mori et al., 2001). Durch das Öffnen der Reaktionsgefäße nach der LAMP-Reaktion ist das Risiko der Kreuzkontamination neuer Reaktionen sehr hoch. Eine Kontamination in der LAMP führt aufgrund der hohen Prozessivität der *Bst* DNA-Polymerase schnell zu unspezifischer Amplifikation und ist damit die Hauptursache falsch-positiver Ergebnisse (Senarath et al., 2014). Um dies zu vermeiden, können geschlossenen Reaktionen eine effektive Alternative darstellen (Parida et al., 2008; Njiru, 2012). Beispielsweise kann ein inhibierender Farbstoff während der Reaktion in eine Agarose-Kapsel im Reaktionsgefäß eingeschlossen werden. Die Kapsel wird am Ende der Amplifikation durch die Erhöhung der Temperatur aufgeschmolzen und der Farbstoff freigegeben (Karthik et al., 2014). Eine andere Möglichkeit Kreuzkontamination zu vermeiden, besteht in der Verwendung von Uracilnukleotiden als Ersatz für die Thyminnukleotide in der Amplifikation. Die eingebauten Uracil-Basen werden vor einer nachfolgenden Reaktion durch die Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) bei Raumtemperatur oder 37 °C enzymatisch abgebaut (Hsieh et al., 2014). Das

zuvor amplifizierte Produkt kann dadurch in einer neuen Reaktion keine Kontamination mehr darstellen, da es als Templat für die Primer nicht verfügbar ist. Die UDG wird in der anschließenden Reaktion inaktiviert.

Beide Methoden können das Problem mit der Kreuzkontamination effektiv lösen, sind in der Form aber nicht für die einfache Anwendung geeignet, da zusätzliche Schritte, Enzyme oder unterschiedliche Temperaturen erforderlich sind. Daher wurde in der Arbeit ein anderer Ansatz verfolgt.

Farbstoffe für die direkte LAMP-Detektion

Die interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe SYBR Green (Ponchel et al., 2003) und EvaGreen (Mao et al., 2007) sind in den PCR-basierten Reaktionen (z.B. qPCR und ddPCR) sowie den isothermalen Amplifikationsreaktionen (z.B. LAMP) für die quantitative Analyse etabliert und werden hauptsächlich für die Echtzeitdetektion verwendet. Die kationischen Farbstoffe binden in der DNA-Helix meist durch elektrostatische Wechselwirkungen, wobei sich SYBR Green (Monomer) und EvaGreen (Dimer) in der Struktur unterscheiden. Beide Farbstoffe können in hohen Konzentrationen DNA-Polymerasen inhibieren (Gudnason et al., 2007; Mao et al., 2007; Eischeid, 2011).

In der LAMP sind beide Farbstoffe in geringer Konzentration für die Echtzeitdetektion der amplifizierten DNA geeignet (Eischeid, 2011). Für die Endpunktdetektion bei Tages- oder UV-Licht sind in Abhängigkeit des verwendeten Farbstoffes allerdings höhere Konzentrationen erforderlich und er sollte daher erst am Ende der Reaktion zugegeben werden (Ahmed et al., 2015).

Alternative Farbstoffe, die in einem größeren Konzentrationsbereich sowohl für die Echtzeit- als auch für die Endpunktdetektion ohne Inhibierung der *Bst* DNA-Polymerase in geschlossenen Reaktionen geeignet sind, können eine einfache und kontaminationsfreie Analyse ermöglichen. Als Alternative zur SYBR Green und EvaGreen wurde Berberin in der Arbeit untersucht, da es direkt mit Nukleinsäuren interagiert.

Berberin ist ein Isochinolinalkaloid aus der Berberize (*Berberis vulgaris*), der Kanadischen Orangenwurzel (*Hydrastis canadensis*) oder dem Chinesischer Goldfaden (*Coptis chinensis*) und wird im klinischen Anwendungsbereich auch aufgrund des antimikrobiellen Effekts verwendet (Tillhon et al., 2012). Als DNA-Farbstoff-Komplex emittiert Berberin nach Anregung im UV-Licht (355 nm) oder bei 450 nm Licht mit einer Wellenlänge von 500 bzw. 600 nm (Yamagishi, 1962; Kumar et al., 1993; Gong et al., 1999; Li et al., 2012). Für die Detektion in der LAMP konnte damit analog zu SYBR Green und EvaGreen das tragbare Fluorimeter „ESEQuant Tube Scanner“ mit dem FAM-Filter (470/525 nm) genutzt werden.

Zunächst wurde der Effekt von unterschiedlichen Berberinkonzentrationen auf die *Bst* DNA-Polymerase-Aktivität untersucht. In allen Proben konnte unabhängig von der Konzentration ein Signalanstieg mit vergleichbarer Amplifikationsrate detektiert werden. Die eingesetzte Berberinkonzentration korrelierte mit der gemessenen Fluoreszenzintensität im Endpunkt (s. Abb. 11). Bei der höchsten Berberinkonzentration wurde keine Sättigung

bei gleichbleibender DNA-Menge erreicht, was bedeutet, dass eine weitere Erhöhung der Berberinkonzentration möglich ist. Berberin induzierte im untersuchten Bereich keine Inhibierung der DNA-Polymerase und beeinflusst die Reaktionskinetik somit nicht. Die Korrelation zwischen Signalanstieg und DNA-Menge kann daher analog zu SYBR Green und EvaGreen für die quantitative Analyse der LAMP-Reaktion in Echtzeit mit gleicher Sensitivität und ohne Inhibition genutzt werden (s. Abb. 12).

Vergleich der DNA-interkalierenden Farbstoffe

SYBR Green und EvaGreen haben gleiche Anregungs- und Emissionseigenschaften (Anr.: 495 nm / Em.: 520 nm), allerdings weist EvaGreen eine geringere Affinität zu einzelsträngiger DNA als SYBR Green auf (Mao et al., 2007). Im Gegensatz zu SYBR Green und EvaGreen konnte bei Berberin kein Signalabfall nach Erreichen des Fluoreszenzmaximums beobachtet werden (s. Abb. 12). Die Phase ohne Amplifikation wird durch eine niedrige Amplifikationsrate charakterisiert. In dieser Phase minimieren die Produktakkumulation (DNA, PPi) sowie der Verbrauch der Primer und dNTP die Effizienz der Reaktion. Das Fluoreszenzsignal steigt demnach nicht mehr weiter an.

Die Ursache für den beobachteten Signalverlust bei SYBR Green und EvaGreen kann eine Folge der geringen Photostabilität sein. Ein kontinuierliche Abfall der Fluoreszenz wird bei Fluoreszenzfarbstoffen als Fotobleichung (*photobleaching*) bezeichnet. Er tritt bei SYBR Green stärker auf als bei EvaGreen (Mao et al., 2007). Bei den Messungen im ESEQuant Tube Scanner betrug das Zeitintervall für die Messung der Fluoreszenz 20 Sekunden. Bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten wurde jeder Farbstoff insgesamt drei Minuten bei 470 nm angeregt. Die lange Belichtung kann folglich den Effekt der Fotobleichung bei SYBR Green und EvaGreen ausgelöst haben. Im Gegensatz dazu wurde dieser Effekt bei Berberin nicht beobachtet, sodass von einer höheren Fotostabilität ausgegangen werden kann. Eine Signalabnahme aufgrund einer Temperatur-abhängigen Dissoziation des Farbstoff-DNA-Komplex', die in der Schmelzkurvenanalyse bei der qPCR genutzt wird, kann bei der LAMP ausgeschlossen werden. Die Schmelztemperatur der LAMP-Produkte liegt aufgrund der hochmolekularen DNA bei über 90 °C. Diese Temperatur wird bei der LAMP nicht erreicht.

In der LAMP wurden bereits andere DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe mit besseren Eigenschaften als SYBR Green und EvaGreen verwendet. Dabei zeigte vor allem der Fluoreszenzfarbstoff SYTO-82 in der Echtzeitdetektion der LAMP eine gute Sensitivität und ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) (Watts et al., 2014; Seyrig et al., 2015; Ocorbin et al., 2016). Allerdings wurden in diesen Untersuchungen nur Konzentrationsbereiche zwischen 0,25 bis 8 μM untersucht. Bei Verwendung des SYTO-82 Farbstoffs in der Endpunktdetektion wurde eine höhere Konzentration (15 μM) eingesetzt, wobei allerdings eine leichte Inhibierung der DNA-Polymerase beobachtet wurde (Watts et al., 2014).

Vergleich von Berberin mit bekannten Methoden in der Endpunkt-Detektion

Zuvor wurde festgestellt, dass Berberin auch in höheren Konzentrationen ($180 \mu\text{M}$) die *Bst* DNA-Polymerase nicht inhibiert. Daher wurde es für die Detektion der LAMP zusätzlich im Endpunkt nach Anregung mit UV-Licht (350 nm) untersucht. Zum Vergleich wurden auch die etablierten Verfahren, wie die Trübung und die Farbstoffe Hydroxynaphtholblau (HNB) und Calcein, für den Nachweis von PSTVd getestet.

Mit allen Detektionsmethoden wurde eine Nachweisgrenze von 10^4 PSTVd-Kopien bestimmt. Die Trübung der Reaktionslösung erfolgt durch die Präzipitation des in der Reaktion gebildeten Magnesiumpyrophosphat-Komplex'. Die Analyse des weißen Niederschlags ist allerdings nicht immer eindeutig, da der Kontrast zwischen dem ausgefallenen Magnesiumpyrophosphat und dem Hintergrund niedrig ist und eine Optimierung der Visualisierung erforderlich ist. Die Beurteilung der Trübung in der LAMP ist daher auch von der Erfahrung des Anwenders abhängig. Die Pelletierung des Niederschlags durch eine Zentrifuge kann die Beurteilung zwischen einer positiven und negativen Reaktion verbessern, erfordert in einem Feldtest aber eine kabellose Zentrifuge. Die Analyse der Trübung kann auch mit einem Turbidimeter erfolgen (Mori et al., 2001), was allerdings den apparativen Aufwand erhöht.

Der kolorimetrische Nachweis mit HNB verbessert hingegen die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Probe maßgeblich. Das HNB ist ein synthetischer, aber günstiger Farbstoff, der bei niedrigen Konzentrationen ($120 - 140 \mu\text{M}$) eine visuelle Beurteilung der LAMP-Reaktion im Endpunkt ermöglicht. Durch die Akkumulation des Magnesiumpyrophosphats in der Amplifikation verringert sich die Menge der freien Mg^{2+} in der Reaktion und es kommt zu einer Änderung des Absorptionsspektrums. Positive Proben sind im Endpunkt der Reaktion blau oder hellblau und negative violett gefärbt (s. Abb. 13). Die Quantifizierung der Reaktion kann über Absorptionmessungen bei 650 nm erfolgen (Goto et al., 2009). Der Nachteil der Methode ist der Einfluss anderer Reaktionskomponenten, die die Sensitivität des HNB gegenüber den Mg^{2+} reduzieren können. Die Konzentration des freien Mg^{2+} im Reaktionsansatz wird durch die dNTP, der Primer- und DNA-Konzentration bestimmt, da sie als Anionen die positiv-geladenen Mg^{2+} binden. Dadurch kann der Farbunterschied vom Ausgangs- zum Endzustand verringert werden und die Beurteilung erschwert werden. Daher ist es bei HNB zwingend erforderlich, dessen Konzentration individuell für jeden LAMP-Test zu optimieren.

Calcein ist ein synthetisches Fluorescein-Derivat, das bei 495 nm angeregt wird und Licht bei 520 nm emittiert. Calcein wird vorrangig für die Bestimmung der Calciumkonzentration in der Komplexometrie genutzt (Kepner und Hercules, 1963), kann aber in Kombination mit Mn^{2+} für den indirekten Nachweis in der LAMP-Reaktion verwendet werden (Tomita et al., 2008). Die Fluoreszenz des Calcein wird durch Mn^{2+} stark unterdrückt (gequencht). Das bei der Amplifikation entstehende Pyrophosphat kann aufgrund der hohen Affinität das Mn^{2+} binden. Das freie Calcein emittiert im Gegensatz zum Calcein- Mn^{2+} -Komplex grünes Licht nach Anregung im UV-Licht (320 bis 360 nm)

oder im sichtbaren Bereich (470 bis 500 nm). Negative LAMP-Proben bleiben hingegen orange bzw. emittieren kein Licht nach UV-Anregung.

Im Gegensatz zu den anderen Farbstoffen konnten mit Berberin die positiven und negativen Proben im Tageslicht nicht unterschieden werden. Das Tageslicht (Sonnenspektrum) deckt einen Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm ab. Da der Berberin-DNA-Komplex ein Absorptionsmaximum bei 355 nm sowie ein geringes Optimum bei 450 nm aufweist, ist für das Auge keine Emission wahrnehmbar (Li et al., 2012). Allerdings wurde bei Anregung im UV-Licht eine gelb-grüne Farbe in den positiven Proben beobachtet. Die gelbe Färbung der Negativproben ist auf die Hintergrundfluoreszenz des Berberins zurückzuführen. Die Ursache hierfür ist die Affinität des Berberins zu einzelsträngiger DNA (bspw. Primer) (Gong et al., 1999). Der Hintergrund konnte in den Experimenten nicht verringert werden. Für ein höheres SNR kann die Farbstoffkonzentration optimiert werden. Allerdings sollte dann die Aktivität der *Bst* DNA-Polymerase erneut überprüft werden.

Sensitivität der Echtzeit- und Endpunktdetektion für den Nachweis von PSTVd

Die PCR als molekularbiologische Kontrollreaktion ergab mit 10 Kopien im Vergleich zur LAMP mit 10.000 Kopien eine 1000-fach geringere Nachweisgrenze. Andere Nachweisreaktionen für das PSTVd, darunter die RT-PCR und die RT-LAMP erreichten 1.000-10.000 Kopien, mit der RT-qLAMP 100-1.000 Kopien und mit der RT-qPCR 1-10 Kopien (Lenarčič et al., 2013).

Die schlechtere Sensitivität kann auf die Art der Detektion zurückgeführt werden. Bei den indirekten Detektionsverfahren (z.B. HNB, Calcein und Trübung) muss eine ausreichende Menge an Pyrophosphat freigesetzt werden, damit der Farbumschlag oder die Prä-zipitation für das Auge wahrzunehmen ist. Die in der gleichen Zeit amplifizierte DNA kann durch die interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe unmittelbar durch einen sensitiveren Detektor nachgewiesen werden. Da die fluorimetrische Echtzeitamplifikation mit Berberin, SYBR Green und EvaGreen die gleiche Sensitivität ergab (10.000 Kopien), kann nicht ausgeschlossen werden, dass intrinsische Faktoren die LAMP-Reaktion bei geringer Kopienzahl beeinflusst haben. Hierbei ist vor allem die Effizienz der Reaktion ein entscheidender Faktor, da Primer, Reaktionsbedingungen und die Sekundärstruktur des PSTVd aufgrund der isothermalen Bedingungen einen stärkeren Effekt auf die Kinetik ausüben und somit die Sensitivität reduzieren können. Bei der PCR ist die Effizienz und die Sensitivität aufgrund der thermischen Synchronisation in Zyklen und der hohen Temperatur zur Denaturierung der dsDNA für den Nachweis des PSTVd höher.

Fluorimetrischer Echtzeitnachweis mit HNB und Berberin

Das HNB, welches in der LAMP bisher nur für die Endpunktdetektion benutzt wurde, sollte auch für die indirekte, fluorimetrische Echtzeitdetektion etabliert werden. Im Vergleich mit Berberin als direkter Nachweis sollte anschließend eine LAMP-Reaktion für die bakteriellen Phytopathogene etabliert werden, wobei beide Farbstoffe in der Echtzeit- und

Endpunktdetektion getestet wurden. Die beiden Phytopathogene *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) und das *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp) sind aufgrund der Infektion von Nutz- bzw. Zierpflanzen ökonomisch relevante Schadorganismen und unterliegen strikten Kontrollen (s. 5.1.1). Für diese Phytopathogene besteht daher ein großes Interesse an einem schnellen und einfachen Nachweis in infizierten Pflanzen oder zur Detektion latenter Infektionen.

Fluorimetrische Detektion des HNB

Das HNB kann für den visuellen Endpunktnachweis der LAMP-Reaktion benutzt werden, da die Verringerung des freien Mg^{2+} in der Lösung zu einem sichtbaren Farbumschlag von violett zu blau führt. Hierbei kommt es in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Konzentration zu einer Änderung des Absorptionsspektrums bei 560 und 650 nm.

Für die Etablierung der fluorimetrischen Messung wurden daher zunächst Emissionsspektren nach Anregung bei den beiden Absorptionsmaxima aufgenommen. Bei den Messungen wurden Emissionsmaxima bei 625 nm nach Anregung bei 565 nm und bei 700 nm nach Anregung bei 650 nm festgestellt. Da in der Arbeit hauptsächlich mit dem Fluorimeter ESEQuant Tube Scanner gearbeitet wurde, konnte neben dem FAM- auch der ROX-Kanal (Anr.: 565 nm / Em.: 625 nm) für die Detektion verwendet werden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die nach Anregung bei 565 nm detektierte Fluoreszenz von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig war (s. Abb. 15). Die Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration in der LAMP korrelierte dabei mit der Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Zusammenhang zwischen Komplexbildung und Fluoreszenzemission des HNB

HNB gehört zu den sulphonierten Azo-Farbstoffen und wird als metallochromer Indikator hauptsächlich für Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet (Itoh und Ueno, 1970). Eine Ursache für die gemessene Fluoreszenz des HNB kann möglicherweise auf die Struktur des Farbstoffs und dessen Komplexbildung von Magnesiumionen sein. Aufgrund der tautomeren bzw. geometrischen Isomerie des Farbstoffs kann die beobachtete Änderung der Absorption und Emission des freien HNB und des Magnesium-HNB-Komplex' auf unterschiedliche Strukturen zurückgeführt werden. Als Azo-Farbstoff kann das HNB im chemischen Gleichgewicht die Azo- und Hydrazoform annehmen (Azo/Hydrazo-Tautomerie) (Waring und Hallas, 2013). Die beiden Formen bestimmen zusammen mit den beiden am Naphthalin (bicyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff) substituierten Hydroxylgruppen als chromophore Gruppe die Lichtabsorption und dementsprechend die zu beobachtende Farbe. Im Gegensatz zu komplexierten Azo-Verbindungen sind freie Azo-Farbstoffe nicht fluoreszierend. Konjugierte Doppelbindungen in aromatischen Gruppen, wie sie in der HNB-Struktur vorhanden sind, können allerdings eine Fluoreszenzemission induzieren.

Neben den beiden tautomeren Formen kann der Azo-Farbstoff auch in zwei geometrischen Isomeren auftreten. Die als Cis-Trans-Isomerie bekannte Strukturänderung kann bei

Azo-Farbstoffen durch die pH-Wert-Änderung (Dunn et al., 2009) oder photochemisch durch Lichtanregung mit einer definierten Wellenlänge induziert werden (Merino und Ribagorda, 2012). Neben der Cis-Trans-Isomerie spielt hier auch die Planarität der chromophoren Gruppen eine wichtige Rolle (Puchtler et al., 1967).

Wie aus den Versuchen in der LAMP hervorgegangen ist, hat das HNB zu Beginn der LAMP eine violette Farbe (A_{max} : 560-580 nm), welche im Laufe der DNA-Amplifikation durch das ausfallende Magnesiumpyrophosphat zur blauen Farbe (cyan) umschlägt (A_{max} : 580-595 nm und 650 nm). Im Absorptionsspektrum verschiebt sich dabei das Maximum in den roten Wellenlängenbereich zu 580-650 nm (Goto et al., 2009). Bei der Komplexierung von Metallionen mit Dihydroxyazo-Verbindungen, wie das HNB, wird das Cis-Isomer bevorzugt (Christie, 2014). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Cis-Form von HNB bei der Komplexierung mit Mg^{2+} vorliegt. Die Cis-Form induziert die Koplanarität bzw. die Elektronendichte in dem Molekül und es stehen mehr delokalisierte Elektronen für das Erreichen des angeregten Energiezustands und der daraus folgenden Emission von Licht zur Verfügung (s. Abb. 42 im Anhang). Demnach wird in der LAMP-Reaktion das zunächst mit HNB komplexierte Mg^{2+} zunehmend durch das entstehende Pyrophosphat gebunden. Dadurch nimmt die Konzentration der freien Mg^{2+} während der Amplifikation ab, so dass vermehrt die Trans-Form des HNB vorliegt und die Fluoreszenzemission schwächer wird.

Ein Zusammenhang zwischen der Komplexierung von Metallionen mit einem Azofarbstoff und der Cis-Trans-Isomerisierung wurde erstmals 2010 beschrieben (You et al., 2010). Demnach wurde nach der Komplexierung mit Ni^{2+} - und Cu^{2+} eine Konformationsänderung zwischen der Azo- oder Hydrazo- sowie der Cis- oder Trans-Form festgestellt.

Fluorimetrischer Echtzeit- und Endpunktnachweis mit Berberin und HNB

Mit Berberin und HNB konnten in der Echtzeitdetektion von Cms $6,26 \times 10^2$ Kopien (1,1 pg genomische DNA) und in der Endpunktdetektion $6,26 \times 10^3$ Kopien (11 pg genomische DNA) nachgewiesen werden (s. Abb. 16 und 18). Bei Xhp war die Nachweisgrenze bei beiden Farbstoffen und Detektionsmethoden mit $5,29 \times 10^2$ Kopien (2,9 pg genomische DNA) gleich. Die Kontrolle mit der PCR ergab für Cms eine Nachweisgrenze von $6,26 \times 10^2$ Kopien (1,1 pg genomische DNA) und für Xhp $5,29 \times 10^2$ Kopien (2,9 pg genomische DNA) (s. Abb. 17 und 18). Die direkte Detektion durch das Berberin erfolgt im Gegensatz zur PCR unmittelbar, da sie mit der Akkumulation der amplifizierten DNA korreliert. Die Schwellenwertzeiten (T_t) waren sowohl beim Nachweis von Cms als auch von Xhp bei der Verwendung von HNB größer, d.h. der Zeitraum von Beginn der Reaktion bis zur exponentiellen Signaländerung fiel im Vergleich zu Berberin länger aus. Die Unterschiede in den ermittelten Schwellenwertzeiten in der Echtzeitdetektion zwischen Berberin und HNB können auf die Mechanismen der Detektion zurückgeführt werden. Der indirek-

te Nachweis durch HNB benötigt eine bestimmte Menge des freien Pyrophosphats, damit eine detektierbare Fluoreszenzänderung induziert wird.

Für einen qualitativen Schnelltest steht die Unterscheidung zwischen einer Positiv- und einer Negativprobe am Ende der Inkubationszeit im Vordergrund. Demnach sind sowohl Berberin als auch HNB für den Cms- und Xhp-Nachweis geeignet. Beide Verfahren sind günstige und schnelle Alternativen zu den serologischen Methoden (IF und ELISA) sowie der PCR und können für den qualitativen als auch quantitativen Nachweis eingesetzt werden. Die Robustheit der LAMP mit Pflanzenproben wurde nicht ausreichend untersucht. Daher sollte für die Validierung der Methode die Extraktion der DNA in der Feldanwendung berücksichtigt werden, da inhibitorische Substanzen, wie Pektin, Polyphenole und Polysaccharide, die DNA-Polymerasen hemmen können (Schrader et al., 2012). Die Spezifität der verwendeten Primersequenzen wurde nur *in silico* mittels BLAST untersucht und muss zusätzlich mit unterschiedlichen Bakterien subspezies sowohl für *Clavibacter* als auch für *Xanthomonas* gezeigt werden. Die *in silico*-Analyse (s. Tabelle 40 im Anhang) konnte die Spezifität für beide Pathogene nicht garantieren, da die Primer-Sequenzen eine Homologie mit anderen Subspezies zeigten. Daher sind die hier benutzten Primersequenzen nur für den Nachweis aller Bakterien der Spezies *Clavibacter michiganensis* bzw. *Xanthomonas hortorum* geeignet.

Vergleich der Detektionsmethoden hinsichtlich der Verwendung als Endpunkt- und Echtzeitnachweis in einer geschlossenen Reaktion

Neben den bekannten Farbstoffen (Calcein, HNB, SYBR Green und EvaGreen) kann das DNA-interkalierende Berberin sowohl für die fluorimetrische Echtzeit- als auch die Endpunktdetektion in der LAMP verwendet werden. Da die LAMP mit Berberin ohne Inhibierung der Polymerase durchgeführt werden kann, sind LAMP-Reaktionen in einem geschlossenen System möglich. Damit kann das Risiko der Kontamination und gleichzeitig der Kosten- und Zeitaufwand reduziert werden. Die Sensitivität der LAMP-Reaktion mit Berberin ist mit den bekannten Farbstoffen Calcein, HNB, SYBR Green und EvaGreen vergleichbar. Es ist als natürlicher Farbstoff nicht toxisch und kostengünstig. Berberin kann entweder im UV-Licht oder alternativ bei 450 nm in einem Fluorimeter bzw. durch eine kompatible LED angeregt werden. Für die Echtzeitmessung können gängige Fluorimeter, darunter der tragbare ESEQuant Tube Scanner mit Berberin-kompatiblen Filtern eingesetzt werden. Für die Endpunktdetektion ist im Gegensatz zu Calcein oder HNB eine UV-Lampe oder LED notwendig. HNB kann zukünftig auch für die fluorimetrische Echtzeitdetektion verwendet werden, da es eine Mg^{2+} -abhängige Fluoreszenz in der LAMP zeigt. Hierfür kann ebenfalls der ESEQuant Tube Scanner mit dem ROX-Filter genutzt werden. Die anderen etablierten Farbstoffe SYBR Green und EvaGreen können in geschlossenen LAMP-Reaktionen nur für die Echtzeitdetektion eingesetzt werden. In Abhängigkeit der geforderten Applikation kann ein passender Farbstoff aus der Tabelle 8 für die Endpunkt- und Echtzeitdetektion in der LAMP ausgewählt werden.

Der größte Nachteil aller Methoden ist die sequenzunspezifische Detektion der LAMP.

Unspezifische Amplifikation durch Kontamination oder Primerartefakte kann in der Echtzeit- und Endpunktdetektion mit den zuvor beschriebenen Methoden nicht differenziert werden.

Ein weiteres Problem ist die Anzahl der notwendigen Primer, da viele Primer die Wahrscheinlichkeit für eine Hetero- oder Homodimerbildung erhöht. Daher muss bei der Auswahl der Primer für die LAMP die Spezifität gegenüber anderen Organismen sowie die Dimerbildung zwingend überprüft werden. Die Spezifität der LAMP kann nach der Reaktion analog zur qPCR auch durch den Einsatz einer Sonde gezeigt werden.

Durch die Erweiterung der Detektionsmethoden bzw. Etablierung alternativer Farbstoffe kann aufgrund der einfachen qualitativen und quantitativen Analyse im Bereich der molekularen Phytopathogendiagnostik mit der LAMP eine leistungsfähige Alternative zur klassischen PCR etabliert werden (Abdullahi et al., 2015; Zhao et al., 2015). Durch die Kombination von isothermaler Amplifikation und visueller Detektion sind in Zukunft leistungsfähige und kostengünstige Applikationen auch mit einfacher Smartphone-Analyse ohne Spezialgeräte für den Vor-Ort-Einsatz möglich (Stedtfeld et al., 2012; Mauk et al., 2015; Damhorst et al., 2015; Balsam et al., 2015; Rodriguez-Manzano et al., 2016; Liao et al., 2016; McCracken und Yoon, 2016; Priye et al., 2016).

9.2 Pyrophosphat-abhängiger Nachweis der LAMP durch neue Fluoreszenzfarbstoffe

Etablierte *in vitro* Nachweise von anorganischem Pyrophosphat in enzymatischen Reaktionen basieren auf dessen Akkumulation infolge der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) (Kamerlin und Warshel, 2009), der Generierung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) (Kamenetsky et al., 2006), der Acetyl-Coenzym A katalysierten Aktivierung von Fettsäuren (James et al., 2016), der RNA-Transkription sowie der Replikation der DNA (Echols und Goodman, 1991; Ronaghi et al., 1996, 1998). Etablierte enzymatische Nachweismethoden sind sehr sensitiv und werden in der klinischen Diagnostik oder Forschung als Routineanwendung verwendet, obwohl sie eine lange Testdauer haben und hohe Kosten verursachen (Upson et al., 1996). Enzym-freie Anwendungen mit Chemosensoren, die chemische in optische Signale umwandeln, sind aufgrund der hohen Selektivität gegenüber dem Pyrophosphat sehr sensitiv. Allerdings sind es zumeist komplexe synthetische Strukturen, die für Routineanwendungen nicht zur Verfügung stehen (Kim et al., 2008; Datta et al., 2013; Xu et al., 2015; Lee et al., 2015). Sowohl bei den enzymatischen als auch den nicht-enzymatischen Verfahren erfolgt die Detektion über die Messung von UV/Vis-Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz (Jansson und Jansson, 2003).

Als Alternative zu den herkömmlichen Verfahren können für den Nachweis von Pyrophosphat in der Komplexometrie verwendete Farbstoffe mit einer Affinität zu Metallionen genutzt werden. Diese Farbstoffe sind leicht erhältlich und teilweise kostengünstiger. Daher wurde in der Arbeit eine Methode entwickelt, die eine Selektion von Metallionen-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen mit SNR-Optimierung zum selektiven Nachweis von Pyrophosphat als Hochdurchsatzscreening ermöglicht.

Die Voraussetzung für die Verwendung solcher Farbstoffe ist eine hohe Affinität des Pyrophosphats zu bivalenten Kationen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} . Einige dieser Kationen komplexieren gleichzeitig auch mit Farbstoffen, wobei die Absorption bzw. Emission selektiv unterdrückt oder verstärkt werden kann (Tan et al., 2011). Der in der Arbeit untersuchte Mechanismus für die Detektion des Pyrophosphats in der Amplifikationsreaktion beruht auf einer Verdrängung des am Farbstoff gebundenen Metallions durch das in der Amplifikationsreaktion akkumulierende Pyrophosphat. Die Verdrängung soll dabei eine Signaländerung des Farbstoffs induzieren.

Die Detektion des gequenchten und nicht-gequenchten Fluoreszenzfarbstoffs ist sehr effektiv, wenn der Signalunterschied zwischen beiden Zuständen sehr hoch ist (Demertzis, 1988). Die Signaländerung muss dabei mit der Pyrophosphatmenge korrelieren. Ein Beispiel für die Pyrophosphat-abhängige Detektion in der LAMP wurde bereits mit dem Calcein als Fluoreszenzfarbstoff und Mn^{2+} als Quencherion gezeigt (Tomita et al., 2008). Um die Anzahl der konventionellen und günstigen Farbstoffe für diese Art des Nachweis' zu erhöhen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Affinität zu multivalenten Kationen selektiert. Alle paramagnetischen Metallionen, darunter Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} , können eine Fluoreszenzunterdrückung induzieren. Das Mn^{2+} als bekannter Fluoreszenzquencher hat von den zuvor genannten Ionen eine sehr

hohe Bindungsaffinität zu Pyrophosphat und ist damit als Quencherion in dem Verdrängungsassay geeignet (Ryan und Weber, 1982; Rurack, 2001; You et al., 2010; Tan et al., 2011; Lou et al., 2012).

Selektive Detektion von Pyrophosphat

Für eine spezifische Signaländerung des gewählten Fluoreszenzfarbstoffs muss das Quencher-Metallion durch das Pyrophosphat in der Amplifikationsreaktion selektiv verdrängt werden. Dieser Verdrängungseffekt sollte durch die anderen an der Reaktion beteiligten Komponenten, wie die dNTP oder des Farbstoffes selbst, nicht im gleichen Maße induziert werden. Zudem beeinflussen andere Ionen, darunter Mg^{2+} , diesen Effekt zusätzlich.

In Abwesenheit von Mg^{2+} war das Fluoreszenzsignal in den Proben mit der identischen Menge von dNTP und Pyrophosphat gleichermaßen niedrig (s. Abb. 20). Demnach ist die Selektivität der Mn^{2+} für dNTP und Pyrophosphat unter diesen Bedingungen gleich. Das bivalente Mn^{2+} wird aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung von beiden Anionen (PPi und dNTP) gleichermaßen gebunden, wobei das Calcein durch die noch vorhandenen Mn^{2+} effektiv gequencht bleibt. In Anwesenheit von Mg^{2+} im Überschuss und der gleichen Menge an Pyrophosphat und dNTP konnte bei PPi ein höheres Fluoreszenzsignal detektiert werden. Folglich wird unter diesen Bedingungen das Mn^{2+} aufgrund der hohen Affinität vom Pyrophosphat gebunden, wobei die hohe Mg^{2+} -Konzentration die Selektivität zusätzlich unterstützt, da die dNTP vornehmlich die Mg^{2+} in der Lösung binden. Die Selektivität der Mn^{2+} für das Pyrophosphat ist dabei vom Farbstoff unabhängig, da er selbst anionisch ist und nicht mit Pyrophosphat oder den dNTP Komplexe bilden kann. Andere multivalente Kationen sind unter den LAMP-Bedingungen nicht ausreichend selektiv gegenüber Pyrophosphat und setzen andere Reaktionsbedingungen, wie einen niedrigen pH-Wert, voraus. Allerdings sind diese Bedingungen für die hier verwendeten Polymerasen nicht kompatibel. Aufgrund der ausreichenden Selektivität der Mn^{2+} gegenüber dem Pyrophosphat konnte in den nachfolgenden Versuchen auf die dNTP in den simulierten Reaktionen verzichtet werden.

Einfluss von Magnesium und Mangan auf ausgewählte Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Untersuchungen wurden das Calceinblau, die Folsäure, Tetrazyklin, Doxyzyklin, Alizarinrot S und Calcein als potenzielle Farbstoffe ausgewählt. Calcein und Calceinblau werden standardmäßig für die Bestimmung der Zellviabilität (Bratosin et al., 2005; Murray und Ewen, 1992; Mueller et al., 2004), in der Histochemie (Goto et al., 2003) sowie der fluorimetrischen Titration von Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Fe^{3+} genutzt (Kepner und Hercules, 1963). Folsäure, auch als Vitamin B9 bekannt, bildet Komplexe mit bivalenten Metallionen, u.a. mit Mn^{2+} und Zn^{2+} (El-Wahed et al., 2008; Tyagi und Penzkofer, 2010). Tetrazyklin ist ein natürlicher Farbstoff, der von Bakterien der Gattung *Streptomyces* gebildet wird (McCormick, 1965). Es wird wie das synthetische Derivat Doxyzyklin und das

Alizarinrot S zur Anfärbung von Knochen verwendet (Pautke et al., 2010; Sánchez et al., 2004; Vilmann, 1969; Yamakawa et al., 2003; Bensimon-Brito et al., 2016).

Die selektierten Farbstoffe zeigten unter den anfänglich gewählten Reaktionsbedingungen der LAMP und PCR eine Kationen-abhängige Verstärkung oder Verringerung der Fluoreszenzintensität. Waren an der Komplexbildung nur Mg^{2+} und der Farbstoff beteiligt, konnte eine Verringerung des Fluoreszenzsignals nur bei der Verwendung von Doxyzyklin unter LAMP-Bedingungen beobachtet werden. Für Alizarinrot S konnte unter LAMP-Bedingungen eine Fluoreszenzzunahme in Anwesenheit von Mg^{2+} detektiert werden (s. Abb. 21). Die Komplexbildung aus Metallionen und dem Farbstoff ist ein reversibles Gleichgewicht und hängt von den Reaktionsbedingungen wie der Temperatur und dem pH-Wert ab. In Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen ist die Komplexstabilität zwischen dem Farbstoff und dem Metallion unterschiedlich (Walser, 1960). Aufgrund der in der LAMP bzw. PCR vorliegenden Reaktionsbedingungen war die Affinität von Mg^{2+} zu Alizarinrot S sehr hoch. Bei den anderen getesteten Farbstoffen ist dementsprechend entweder die Bindungsaffinität zu Mg^{2+} gering oder die Komplexbildung induziert keine Fluoreszenzänderung. Bei Mn^{2+} wurde im Gegensatz zu Mg^{2+} eine Verringerung der Fluoreszenzintensität bei Calcein, Calceinblau, Doxyzyklin, Alizarinrot S und minimal bei Tetrazyklin und Folsäure erreicht.

Das Mn^{2+} kann als paramagnetisches Metallion die Lichtemission von Farbstoffen effizient unterdrücken. Dies wird auch als „Chelatierung-induziertes Fluoreszenz-Quenching“ (CHEQ) bezeichnet, wobei die ungepaarten d-Elektronen des Mangans die Emission der Farbstoffe unterdrücken (Liang und Canary, 2010). Die Stärke dieses Effekts hängt dabei von der Struktur des Farbstoffs sowie dessen Affinität zum Quencherion ab. Da die in den untersuchten Reaktionen verwendeten DNA-Polymerasen (*Bst* und *Taq* DNA-Polymerase) Mg^{2+} als Kofaktor benötigen, wurde der additive Effekt von Mn^{2+} und Mg^{2+} auf die Farbstoffe ebenfalls untersucht. Es zeigte sich eine Aufhebung des zuvor gemessenen Quenching-Effekts, vor allem bei Tetrazyklin, Doxyzyklin und Alizarinrot S unter PCR-Bedingungen. Allein bei Calcein und Calceinblau wurde der Quenching-Effekt nur leicht kompensiert. Die Kompensation des Effekts von Mn^{2+} durch Mg^{2+} war dabei konzentrationsabhängig. Die beiden Kationen haben demnach eine unterschiedliche Affinität für den jeweiligen Farbstoff. Alizarinrot S und Tetrazyklin haben in Abhängigkeit der Konzentration eine hohe Selektivität für Mg^{2+} und Mn^{2+} , wohingegen Calcein und Calceinblau eine höhere Selektivität für Mn^{2+} zeigen. Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S hatten die höchsten SNR-Werte unter LAMP-Bedingungen, sodass diese in weiterführenden Experimenten verwendet wurden (s. Abb. 23). Durch die Anwesenheit von Pyrophosphat konnte eine effiziente Verdrängung des Mn^{2+} erreicht werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse unter LAMP- und PCR-Bedingungen zeigen weiterhin, dass das Fluoreszenzquenching in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen durch die Kombination aus Farbstoff, Mn^{2+} und Mg^{2+} optimiert werden muss. Durch die Anpassung der jeweiligen Konzentrationen kann das SNR und damit die Sensitivität des Pyrophosphatnachweis' wesentlich verbessert werden.

Einfluss der Metallionen und der Farbstoffe auf die Polymeraseaktivität

Die beiden Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} beeinflussen nicht nur die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe, sondern auch die Aktivität der DNA-Polymerasen und damit die Effizienz der Amplifikation (Vashishtha et al., 2016; Hillebrand und Beattie, 1984). DNA-Polymerasen benötigen bivalente Metallionen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor für die Stabilisierung des Enzyms und als aktives Zentrum für die katalytische Aktivität. Mg^{2+} ist sowohl im LAMP- als auch PCR-Puffer vorhanden und demnach für die Aktivität der *Bst* und *Taq* DNA-Polymerase essentiell. Daher wurde der Einfluss von Mg^{2+} auf die Aktivität der beiden Polymerasen nicht untersucht. Um die Polymeraseaktivität für den Verdrängungsassay sicherzustellen, wurden Mangan, Tetrazyklin und Alizarinrot S getestet.

Es stellte sich heraus, dass Tetrazyklin selbst in hohen Konzentrationen ($>0,5$ mM) in der LAMP sowie der PCR kaum inhibitorisch wirkte (s. Abb. 24). Alizarinrot S hingegen führte zur Inhibierung der *Taq* DNA-Polymerase bei Konzentrationen über 0,1 mM. Ursache hierfür ist die erhöhte Komplexierung von Mg^{2+} durch Alizarinrot S, sodass die Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase in der PCR abnimmt und weniger Produkt gebildet wird. Die Prozessivität der *Bst* DNA-Polymerase wird bei gleicher oder höherer Konzentration von Alizarinrot S nicht beeinflusst, da durch die höhere Mg^{2+} -Konzentration im LAMP-Puffer die Komplexierung durch den Farbstoff kompensiert wird. Es bleibt weiterhin ausreichend freies Mg^{2+} in der Lösung.

Eine Mn^{2+} -Konzentration über 0,75 mM führte bei der *Taq* DNA-Polymerase zur vollständigen Inhibierung der Reaktion. Die *Bst* DNA-Polymerase zeigte im gesamten Konzentrationsbereich keine Inhibierung. Neben der Effizienz (Prozessivität) nimmt auch die Genauigkeit (Präzision) der DNA-Polymerasen bei steigender Mn^{2+} -Konzentration ab bzw. die Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide zu (El-Deiry et al., 1984; Tabor und Richardson, 1989). Daher muss für jede enzymatische Anwendung der tolerierbare Konzentrationsbereich genau untersucht werden.

Screening-Methode für die Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnis'

Die Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der drei Farbstoffe Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S ergaben für Tetrazyklin und Alizarinrot S im Gegensatz zu Calcein breite Fluoreszenzspektren. Der Abstand zwischen dem Anregungs- und Emissionsmaximum ist bei Tetrazyklin und Alizarinrot S signifikant größer als bei Calcein. Bei Alizarinrot S liegen die Anregungs- und Emissionswellenlängen wie bei Calcein im sichtbaren Lichtspektrum. Breitere Emissionsspektren, wie sie bei Alizarinrot S und Tetrazyklin aufgenommen worden sind, haben den Vorteil, dass in Abhängigkeit der verfügbaren Filter die Fluoreszenz bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden kann. Die Fluoreszenz von Calcein ist nur in einem definierten Wellenlängenbereich messbar. Die breiten Spektren ermöglichen vor allem für Alizarinrot S eine flexible Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen. So kann das SNR auch über die Variation der Anregungs- und Emissionswellenlänge erhöht werden, in dem nicht zwingend in den beiden Maxima gemessen wird, sondern der

Abstand variiert wird und Bereiche gewählt werden können, in denen sich die beiden Spektren nicht überlagern.

Um die optimale Anregungs- und Emissionswellenlänge für jeden Farbstoff zu finden, kann für eine festgelegte Anregungswellenlänge ein spezifisches Fluoreszenzspektrum aufgenommen werden (Emissionsscan bei fester Anregung). Darüber hinaus kann bei Variation der Anregungswellenlänge die Fluoreszenzintensität bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden (Anregungsscan bei fester Emission). Das resultierende Anregungsspektrum kann genutzt werden, um die optimale Anregungswellenlänge für die höchste Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Daher kann bei einer von dem Absorptionsmaximum abweichenden Wellenlänge für die Anregung eventuell ein besseres SNR erreicht werden. In der Arbeit wurde allerdings nur im Anregungs- und Emissionsmaximum des jeweiligen Farbstoffs gemessen. Durch die Anpassung der Fluoreszenzdetektion kann das SNR und damit die Sensitivität der Messung zusätzlich erhöht werden.

Die SNR-Optimierung für die Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte durch ein kombinatorisches Screening in einer Mikrotiterplatte als Hochdurchsatzapplikation. Um die Anpassung der Konzentrationen von Mn^{2+} , Mg^{2+} und Farbstoff zu vereinfachen, wurde ein Screening mit simulierter Reaktion gewählt. Dieses Verfahren erlaubt die parallele Testung aller Kombinationen in kurzer Zeit. Um den Verbrauch von Enzymen, Primern und dNTP gering zu halten, wurde das Screening nur mit den Komponenten durchgeführt, die unmittelbar an der Signalgebung beteiligt sind. Sofern die Kosten für einen enzymbasierten Test nicht limitierend sind, kann das Screening auch direkt mit allen Komponenten durchgeführt werden. Zur schnellen Analyse der gemessenen Fluoreszenzwerte wurde die grafische Darstellung der SNR-Werte als Heatmap gewählt (s. Abb. 26 und Abb. 27). Alle drei Farbstoffe zeigten eine Zunahme der SNR-Werte mit steigender Mn^{2+} -Konzentration. Durch die zunehmende Konzentration der Quencherionen sinkt die Anzahl der freien Farbstoffmoleküle in der Lösung, sodass die Fluoreszenz stärker unterdrückt wird. Dabei darf die Mn^{2+} -Konzentration die mögliche Pyrophosphatkonzentration nicht übersteigen, da sonst keine Verdrängung mehr stattfinden kann. Gleichzeitig variierten die SNR-Werte in Abhängigkeit der Mg^{2+} - und der Farbstoffkonzentration stark. So hatten Calcein und Alizarinrot S unter LAMP-Bedingungen sehr hohe SNR-Werte (3-13), wohingegen das größte SNR von Tetrazyklin bei 1,5 lag. Unter PCR-Bedingungen waren die SNR-Werte signifikant niedriger. Die niedrigen Werte bei der PCR können auf die geringere Pyrophosphatkonzentration zurückgeführt werden. Bei den gewählten Mn^{2+} -Konzentrationen ist aufgrund der geringen Pyrophosphatmenge keine effektive Verdrängung möglich. Um dies zu umgehen, könnte man sowohl die Farbstoff- als auch die Mn^{2+} -Konzentration unter den PCR-Bedingungen für das Screening verringern.

Durch die Visualisierung des SNR durch eine Heatmap konnten die besten Kombinationen unmittelbar herausgefiltert und in der enzymatischen Reaktion validiert werden. Hierbei waren die SNR-Werte bei Calcein und Alizarinrot S im Vergleich zur Simulation um den Faktor 2 bis 3 schlechter. Die im Screening verwendeten Reaktionsansätze enthielten nur die signalgebenden Komponenten (Mn^{2+} , Farbstoff, Mg^{2+}), wohingegen die enzymatischen Reaktionen zusätzlich die negativ geladenen Primer, dNTP, die Templat-DNA sowie

die Enzyme beinhalteten. Sie beeinflussen durch die Bindung der Kationen den Verdrängungseffekt und reduzieren so das SNR der jeweiligen Reaktion. Des Weiteren kann in Abhängigkeit der eingesetzten dNTP-Menge und der Reaktionseffizienz die Menge an freigesetztem Pyrophosphat stark variieren. Der Verdrängungseffekt bzw. die Signalzunahme korrelieren mit dem akkumulierenden Pyrophosphat. Die resultierende Pyrophosphatmenge hängt hierbei nicht von der Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts ab, da sowohl die LAMP als auch die PCR im Endpunkt gemessen wurden und der Amplifikationsprozess intrinsisch durch das akkumulierende Pyrophosphat, die ansteigende DNA-Menge und die abnehmende Primerkonzentration gehemmt wird.

Mit der optimierten Reaktionszusammensetzung wurden abschließend die Fluoreszenzintensitäten des jeweiligen Verdrängungsassays unter verschiedenen Pyrophosphatkonzentrationen für die LAMP und PCR betrachtet. In beiden Fällen konnte der erwartete Konzentrationsbereich des Pyrophosphats abgedeckt werden. Im Unterschied zu Tetrazyklin, bei dem das Hintergrundsignal trotz Optimierung sehr hoch war, konnten Calcein und Alizarinrot S in beiden Reaktionen für die Pyrophosphatdetektion genutzt werden. Für Alizarinrot S war die Signalzunahme mit Calcein vergleichbar. Für die Erhöhung der Sensitivität durch Verbesserung des SNR bei geringen Pyrophosphatkonzentrationen können die Farbstoff- und Mn^{2+} -Konzentration reduziert werden. Für die PCR-Bedingungen konnte in der Arbeit keine ausreichende Sensitivität erreicht werden. Das entwickelte, selektive und iterative Screening stellt ein einfaches Verfahren für die Ermittlung einer optimalen Reaktionszusammensetzung als Verdrängungsassay dar. Mit Hilfe des Screenings im Mikrotiterplattenformat konnte der Konzentrationsbereich der signalgebenden Komponenten hinsichtlich eines hohen SNR unter simulierten Reaktionsbedingungen eingeschränkt und optimiert werden.

Das entwickelte Screening-Verfahren kann auch für andere Pyrophosphat-abhängige Reaktionen mit unterschiedlichen Metallionen und Farbstoffen adaptiert werden. Ein Nachteil des Screenings mit simulierten Bedingungen liegt in den komplexen Zusammenhängen enzymatischer Reaktionen begründet. Sie beeinflussen die Signalgebung und können so nicht komplett abgebildet werden. Um die Selektion weiterer, günstiger und leicht erhältlicher Farbstoffe für die Pyrophosphatdetektion zu vereinfachen und zu beschleunigen, kann der in Abbildung 43 (im Anhang) gezeigte Arbeitsablauf als Vorlage genutzt werden. Darüber hinaus lassen sich die hier etablierten Methoden für Hochdurchsatzanwendungen einfach automatisieren, um in kurzer Zeit viele Parameter bedienen zu können.

9.3 Pyrophosphat-abhängige Detektion der LAMP in einer Emulsion

Die Entwicklung der digitalen PCR in Kavitäten oder einer Emulsion konnte die Präzision der absoluten Quantifizierung in der PCR deutlich verbessern. Die Integration der digitalen PCR in die Diagnostik ist aufgrund der höheren Kosten im Vergleich zur qPCR allerdings schwierig (Baker, 2012). Alternativ können die isothermalen Amplifikationsreaktionen aufgrund der geringeren Kosten und der leichten Umsetzung die Einführung der digitalen Quantifizierung in der Diagnostik voranbringen. Die LAMP bietet wie zuvor beschrieben unterschiedliche Methoden zur Detektion der Amplifikation. Wie bei der qPCR sind die direkten Nachweisverfahren durch interkalierende Farbstoffe sehr sensitiv. Ergänzend kann bei der LAMP die Amplifikation allerdings auch indirekt über das Pyrophosphat mittels Mn^{2+} -abhängiger Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden.

Für die digitale Quantifizierung der ddPCR in der Emulsion ist die korrekte Klassifizierung der positiven und negativen Reaktionen essentiell. Die standardmäßig in der qPCR eingesetzten interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe (EvaGreen oder SYBR Green) können bei unspezifischer Amplifikation oder Primer-Dimeren aufgrund des geringen SNR zwischen der positiven und negativen Reaktion die Klassifizierung erschweren. Eine kostengünstige Alternative sollte durch die Detektion des Pyrophosphats in der LAMP etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden für die LAMP Tetrazyklin, Alizarinrot S, Calcein und HNB zur digitalen Detektion in der Emulsion untersucht. Emulsionen sind in Abhängigkeit des Verfahrens schnell und kostengünstig herzustellen. Um die Anwendbarkeit der digitalen LAMP mit indirekter Detektion zu zeigen, wurde die disperse Phase mit den LAMP-Reaktionskomponenten angepasst und in ein bestehendes ddPCR System (QX200 Biorad) integriert.

Optimierung der Phasenzusammensetzung für die Emulsion

Die LAMP-angepasste Emulsion resultierte im Vergleich zur originalen Emulsion ohne Optimierung in eine Polydispersität bzw. starken Heterogenität mit unterschiedlich großen Tröpfchendurchmessern (s. Abb. 29). Die Generierung der Emulsion erfolgte dabei in einem Chip (Kobayashi et al., 2009; Thorsen et al., 2001; Seemann et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit eine Emulsion mit einfachen Mitteln zu generieren, kann durch starkes Schütteln beider Phasen erreicht werden (Schütze et al., 2011). Die Homogenität ist hier aber wesentlich geringer als bei der Emulsion, die in einem Chip generiert wird (Sidore et al., 2016). Die beobachtete Heterogenität in der LAMP-Emulsion kann bei der Chip-basierten Generierung durch Destabilisierungseffekte verursacht worden sein. Hierbei kommt es meist zu einer diffusionsgesteuerten Vergrößerung der Tröpfchen (Ostwald-Reifung) und einer nachfolgenden Vereinigung der Tröpfchen durch direkten Kontakt (Koaleszenz) (Bibette et al., 1999).

Eine Emulsion ist, thermodynamisch betrachtet, ein instabiles System, in dem neben der Zusammensetzung der jeweiligen Phase auch die Temperatur, der Salzgehalt und der pH-

Wert Einfluss auf die Stabilität haben (Capek, 2004). Um einen Amplifikationsbias aufgrund unterschiedlicher Templat-Mengen in den Reaktionsräumen zu verhindern und eine präzise Quantifizierung zu gewährleisten, ist eine hohe Homogenität und Stabilität der Tröpfchen in der Emulsion erforderlich. Um die Homogenität der dispersen Phase zu verbessern, wurde der Zusatz eines Emulgators (Poloxamer 188) untersucht. Der Emulgator sollte die Dispergierung durch die Stabilisierung der Emulsion verbessern, indem er die Oberflächenspannung zwischen den beiden Phasen verringert (Gruner et al., 2016). Der Emulgator hat amphiphile Eigenschaften, da er sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen aufweist. Er erschwert damit die Phasentrennung und gewährleistet durch die höhere Stabilität der Emulsion, dass unabhängige und gleichgroße Reaktionsräume (Tröpfchen) gebildet werden können. Der eingesetzte Emulgator Poloxamer 188 ist ein nicht-ionisches Tri-Blockcopolymer, bestehend aus einer zentralen, hydrophoben Poly-Oxypropylen-Struktur (PPO) und zwei außenstehenden, hydrophilen Poly-Oxyethylen-Strukturen (PEO) (Urbán-Morlán et al., 2008) (s. Abb 10 B).

Durch die amphiphilen Eigenschaften des Poloxamer 188 befinden sich die beiden hydrophilen Kopfgruppen in der wässrigen Phase und die zentrale Gruppe außerhalb der Tröpfchen in der kontinuierlichen Phase (Alexandridis, 1996). Die beste Homogenität wurde mit einem mittleren Tröpfchendurchmesser von $110 \mu\text{m}$ bei 1,5% (v/v) erreicht und ist damit mit der ddPCR-optimierten Emulsion vergleichbar (s. Abb. 30). Der eingesetzte Emulgator (Poloxamer 188) soll in der Emulsion die Dispergierung der zwei Phasen durch die Mizellbildung erleichtern. In Abhängigkeit des gewählten Emulgators kann der Anteil an hydrophilen oder lipophilen Strukturen variieren. Das Verhältnis der hydrophilen zu den lipophilen Gruppen wird als HLB-Wert (*hydrophilic-lipophilic-balance*) bezeichnet. Da der HLB-Wert von Poloxamer 188 mit 29 sehr hoch ist, ist es ein hydrophiler Emulgator (Alexandridis, 1996). Die Konzentration des Emulgators, bei der eine Mizellbildung erfolgt wird als kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet. Eine stabile Emulsion wird demnach bei einer Konzentration des Emulgators über der CMC erreicht. Der Emulgatoranteil bestimmt neben der Stabilität auch die Größe der Tröpfchen. Zunächst nimmt mit steigendem Anteil die Stabilität zu und die Tröpfchengröße gleichzeitig ab. Bei einer weiteren Erhöhung des Anteils werden Tröpfchen instabiler und größer (Tadros, 2013). Dieser Effekt konnte für die Optimierung der LAMP-Emulsion bei 2% (v/v) beobachtet werden. Durch die Integration des Emulgators in die disperse Phase konnte eine stabile Emulsion mit ausreichender Homogenität für die LAMP generiert werden.

DNA-basierte Detektion in Emulsion

Klassischerweise wird für den Nachweis der amplifizierten DNA ein dsDNA-interkalierender Farbstoff wie EvaGreen oder SYBR Green verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab für die LAMP-Emulsion mit EvaGreen klar definierte Tröpfchen mit grüner Färbung (s. Abb. 31). Bei SYBR Green konnte auch außerhalb der Tröpfchen Fluoreszenz detektiert werden. Da keine Destabilisierung der Emulsion durch Koaleszenzeffekte beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das SYBR Green

aus der wässrigen Phase ausgetreten ist (*dye leaching*). SYBR Green ist ein kationischer asymmetrischer Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff (Dragan et al., 2012) und hat ein Molekulargewicht von etwa 510 g/mol. Im Gegensatz dazu ist die patentgeschützte Struktur von EvaGreen nicht komplett bekannt (Mao und Leung, 2010), aber aufgrund des eingebauten Linkers wesentlich größer als SYBR Green. Der Farbstoff hat eine inaktive und aktive Form, die sich in der Fluoreszenzintensität unterscheiden. Die Anwesenheit von dsDNA induziert eine Fluoreszenzzunahme, da sich die beiden Enden des Farbstoffes nicht mehr in räumlicher Nähe befinden (*Release-On-Demand-Mechanismus*). Durch die Vergrößerung der molekularen Struktur und Ladung kann der Farbstoff wahrscheinlich nicht so leicht aus den Tröpfchen der Emulsion migrieren wie SYBR Green (Lowe et al., 2014).

Das bei SYBR Green beobachtete Austreten aus den Tröpfchen hängt vom Massetransport innerhalb der Emulsion ab. Der Massetransport von Molekülen innerhalb der Emulsion wird u.a. durch die Unterschiede im chemischen Potential innerhalb der dispersen Phase induziert. Dieses Potential beschreibt die Triebkraft, ein Gleichgewicht einzustellen und hängt unter anderem auch von der Tröpfchengröße ab. Daher gibt es in einer heterogenen Emulsion stärkere Unterschiede im chemischen Potential, das auch durch Diffusion ausgeglichen werden kann, wobei kleinere Tröpfchen auf Kosten der größeren schrumpfen (Ostwald-Reifung) (Gruner et al., 2015).

Die Austrittsgeschwindigkeit von Stoffen von der dispersen in die kontinuierliche Phase wird dabei durch die Eigenschaften und Zusammensetzung der Grenzfläche bestimmt (Gruner et al., 2016). Die Phasengrenze in einer Emulsion ist keine physikalische Barriere und ermöglicht den Austausch von Stoffen durch Mizell-unterstützten Transport oder Diffusion durch die Phasengrenze (Gruner et al., 2016). Hierbei spielt die Struktur des Emulgators eine wichtige Rolle, da dessen hydrophilen und lipophilen Bestandteile die Stabilität der Grenzfläche bestimmen. Daher ist die Permeabilität der Phasengrenze für den Austritt von Stoffen entscheidend. Verhindert werden kann der Austritt bspw. durch den Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA), welches sich an der Phasengrenze anlagert und eine kinetische Barriere bildet (Courtois et al., 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Zugabe bestimmter Zucker der Effekt gemindert werden kann (Sandoz et al., 2014).

Darüber hinaus können fluorierte Emulgatoren bzw. Öle (perfluorierte Kohlenwasserstoffe) in der kontinuierlichen Phase die Freisetzung von Stoffen unterbinden, da sie aufgrund der unpolaren Eigenschaften nur sehr schwache Interaktionen mit Molekülen in der dispersen Phase eingehen und damit die Diffusion einschränken.

Im Gegensatz dazu nimmt die Löslichkeit von organischen Stoffen in fluorierten Flüssigkeiten (kontinuierliche Phase) mit Carboxylgruppen durch nicht-kovalenten Verbindungen oder Ionenpaarbindungen zu, da sie als Rezeptor dienen (Gruner et al., 2016). Dieser Effekt konnte bereits für Fluorescein in Emulsionen nachgewiesen werden (Gruner et al., 2015). Demnach liegen die Carboxylgruppen in der wässrigen Phase bei pH 8,8 deprotoniert vor und gehen mit dem kationischen Farbstoff eine Ionenpaarbindung ein. Der neutrale Komplex kann über die Phasengrenze hinaus in die kontinuierliche Phase migrieren. Diese Effekte können das Austreten von SYBR Green aus der Emulsion in den

Versuchen verursacht haben. Da die Optimierung der Detektion mit SYBR Green kein Ziel der Arbeit war, sondern nur als Vergleich dienen sollte, kann für die direkte Detektion der amplifizierten DNA in Emulsion EvaGreen genutzt werden. Untersuchungen mit dem im ersten Abschnitt etablierten Berberin wurden nicht durchgeführt. Aufgrund der geringen Molekülgröße und der positiven Ladung wird ein vergleichbarer Effekt wie bei SYBR Green erwartet.

Pyrophosphat-basierte Detektion in Emulsion

Der direkte Nachweis der digitalen, isothermalen Amplifikation in einer Emulsion mit EvaGreen und SYBR Green ermöglicht eine hohe Sensitivität der Detektion, kann aber nicht flexibel eingesetzt werden. Daher sollte erstmals die indirekte Detektion über das Pyrophosphat in der digitalen Amplifikation etabliert werden, wofür der Einsatz von Calcein, Tetrazyklin, HNB und Alizarinrot S untersucht wurde. Durch das zuvor etablierte Screening konnten für alle Farbstoffe außer bei HNB die optimalen Bedingungen für ein hohes SNR direkt für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden. Für HNB konnten hingegen die Parameter aus dem ersten Teil dieser Arbeit verwendet werden.

Durch die separate Zugabe von Pyrophosphat in den LAMP-Reaktionsansatz wurden positive Tröpfchen simuliert. Für die Analyse wurden die beiden Emulsionen (positiv und negativ) gemischt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (s. Abb. 32). Für alle getesteten Farbstoffe ergab sich ein sichtbarer Unterschied zwischen Tröpfchen mit und ohne Pyrophosphat. Der bei SYBR Green aufgetretene Farbstoffaustritt wurde bei keinem der Farbstoffe beobachtet. Die Farbstoffe und der Mangan-Pyrophosphat-Komplex bleiben somit in den Tröpfchen und alle Farbstoffe können für die Detektion von Pyrophosphat in der Emulsion verwendet werden. Tetrazyklin muss dabei im UV-Bereich angeregt werden. So könnte ein besseres SNR generiert werden, als es während der Analyse aufgrund nicht vorhandener Filter möglich war.

Das beste visuelle SNR wiesen Calcein, HNB und Alizarinrot S auf. Da beim HNB die Fluoreszenz Mg^{2+} -abhängig ist, konnte hier eine umgekehrte Signalgebung der positiven (niedriges Signal) und negativen Tröpfchen (hohes Signal) beobachtet werden. Für Calcein wurde die digitale LAMP im Vergleich zu EvaGreen bereits gezeigt (Rane et al., 2015). Hierbei wurde die Generierung der Emulsion, die Amplifikation und Detektion auf einem Chip kombiniert. In den Versuchen erreichte EvaGreen in der Emulsion ein maximales SNR zwischen den positiven und negativen Reaktionen von 2,0 und Calcein/ Mn^{2+} ein SNR von 6,5. Für eine korrekte Klassifizierung der beiden Fraktionen ist ein hohes SNR von Vorteil. Die indirekten Detektionsverfahren stellen somit eine leistungsfähige Alternative dar. Demnach können die Farbstoffe Calcein, HNB oder Alizarinrot S das Anwendungsspektrum der LAMP als digitale Methode für eine Quantifizierung erweitern. Da das indirekte Nachweisverfahren unspezifische Amplifizierung (Primerdimere oder Kontamination) von der korrekten nicht unterscheiden kann, kommt es ggf. bei der Detektion zu einer fehlerhaften Klassifizierung der Tröpfchen. Für eine hohe Spezifität ist daher eine Optimierung

der digitalen, Emulsions-basierten LAMP-Reaktion erforderlich. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und bieten unterschiedliche Möglichkeiten für den indirekten Nachweis der Amplifikation in Emulsion. Die Integration von isothermalen Amplifikationsreaktionen mit digitaler Detektion in mikrofluidische Systeme für einen einfachen Pathogennachweis ermöglicht eine schnelle und effektive qualitative und quantitative Analyse. Die Miniaturisierung der LAMP unterstützt die Entwicklung der POCT-Diagnostik durch die Reduzierung der Komplexität, was mit herkömmlichen Verfahren (PCR) noch nicht erreicht werden kann. Isothermale Amplifikation in Mikrosystemen ist billiger, die Volumina kleiner, die Analyse schneller und der gesamte Prozess automatisierbar. Inzwischen gibt es eine Vielzahl verfügbarer Mikrosysteme für isothermale Amplifikationsreaktionen im digitalen Format (Tröger et al., 2015; Mauk et al., 2015). Analog zur ddPCR kann die digitale isothermale Amplifikation in Chips oder in Emulsion durchgeführt werden (Baker, 2012), wobei Chip-basierte Systeme wie der „SlipChip“ (Shen et al., 2011) oder der „Self-Digitization-Chip(SD)“ (Gansen et al., 2012) bereits eingesetzt wurden.

9.4 Einsatz von bifunktionellen Primern in der isothermalen Amplifikation

Die LAMP und die vielen anderen isothermalen Amplifikationsmethoden, darunter die SDA, RPA, HDA und NASBA, sind sehr komplex, da sie entweder eine Vielzahl an Primern oder mehrere Enzyme benötigen (s. Tabelle 1). Reaktionen mit vielen Primern erhöhen die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikationen durch Homo- oder Heterodimerbildung. Um das zu verhindern, ist ein aufwändiges und stringentes Primerdesign mit einer speziellen Software zwingend erforderlich. Anschließend müssen die Primer in der Reaktion empirisch getestet werden. Andere Reaktionen benötigen neben der Polymerase zusätzlich eine Helikase, Rekombinase oder ein Nicking-Enzym, damit unter isothermalen Reaktionsbedingungen einzelsträngige DNA-Bereiche verfügbar sind. Zudem konkurrieren in diesen Reaktionen viele Primer und Enzyme miteinander und beeinflussen dadurch auch die Kinetik. Um mit einer geringen Primeranzahl eine schnelle Reaktionskinetik zu erreichen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das mit ein oder zwei modifizierten Primern und der *Bst* DNA-Polymerase eine isothermale Amplifikation ermöglicht. Die Reaktion mit dem Namen „*Hinge-initiated Primer Dependent Amplification*“ (HIP) basiert auf dem Umklappen eines Primers (Scharnier-adaptiert) zu einer Haarnadelstruktur, sodass die initiale Primerbindungsstelle erneut freigesetzt wird und eine autozyklische Amplifikation stattfinden kann (s. Abb. 33).

Charakterisierung des Reaktionsmechanismus

Bei allen isothermalen Amplifikationsreaktionen geht es um die kontinuierliche Freisetzung von einzelsträngigen Bindungsstellen für neue Primer, da nur so eine exponentielle Amplifikation bei konstanter Temperatur erfolgen kann. Der Reaktionsmechanismus der HIP wurde in Abbildung 34 detailliert erläutert. Die HIP funktioniert mit einem oder

zwei bifunktionellen Primern (Vorwärts- und Rückwärts-Hinge-Primer) mit der Fähigkeit, jeweils eine Haarnadelstruktur (*hairpin*) bilden zu können. Um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden, kann die DNA-Polymerase-Aktivität in der Haarnadelstruktur blockiert werden, wenn eine spezielle Modifikation integriert wird. Damit wird gewährleistet, dass die Haarnadelstruktur erhalten bleibt und damit die ursprüngliche Bindungsstelle auf der Templat-DNA weiterhin zugänglich ist. Bei der LAMP werden dafür mit der Schleifenstruktur lange einzelsträngige Bereiche (>40 bp) erzeugt. Diese werden für die Hybridisierung eines neuen FIP- oder BIP-Primers genutzt (s. Abb. 2).

Zunächst wurde die HIP mit einer abasischen Stelle im Hinge-Primer für den Nachweis von PSTVd-cDNA eingesetzt und mit der LAMP verglichen (s. Abb. 35). Mit der HIP konnte im Vergleich zur LAMP in der Kapillarelektrophorese und der Agarose-Gelelektrophorese ebenfalls hochmolekulare dsDNA nachgewiesen werden. Die Echtzeitdetektion der LAMP- und HIP-Reaktionen ergab allerdings eine geringere Effizienz in der HIP. Eine Ursache für die geringe Effizienz liegt wahrscheinlich in der Zusammensetzung und Länge der Linkerstruktur. Die Länge des Linkers sowie die Größe der Haarnadelstruktur bestimmen die thermodynamische und sterische Spannung bei der Ausbildung und Erhaltung der Struktur. Ein kurzer Linker kann dabei helfen, die Doppelstrangöffnung und Ausbildung der Haarnadelstruktur zu erzwingen. Allerdings kann ein kurzer Linker aufgrund der geringeren Flexibilität auch das Umklappen zur Haarnadelstruktur erschweren. Des Weiteren kann eine geringe Reaktionseffizienz auch auf die nicht erfolgte Blockierung der Polymerase in der Linkerstruktur zurückgeführt werden, da hierbei die Umklappsequenz des Hinge-Primers doppelsträngig vorliegen würde und damit keine Haarnadelstruktur ausgebildet werden kann. Die Reaktion würde folglich nicht mehr exponentiell verlaufen.

Einfluss der Linker-Struktur und der Primer-Kombinationen auf die Reaktionskinetik

Neben der Linkerstruktur (abasische Stelle und C12-Spacer) wurden auch unterschiedliche Primerkombinationen untersucht. So können analog zu den F3/B3-Primern in der LAMP zusätzliche PCR-Primer, die vor den Hinge-Primern auf der Zielsequenz binden, eingesetzt werden. Sie können die Generierung neuer Bindungsstellen zu Beginn der Reaktion beschleunigen, da sie die Verdrängung des zuvor synthetisierten Strangs unterstützen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Effizienz der Reaktion durch die Kombination der Hinge-Primer mit einem korrespondierenden schleifenbildenden Primer (FIP/BIP) von der LAMP verbessert werden kann.

Die höchste Effizienz wurde mit der Kombination aus einem Hinge-Primer (unabhängig von der Linkerstruktur) und einem gegenläufigen PCR- oder einem FIP- / BIP-Primer erzielt (s. Abb. 36). Die schlechte Effizienz bei der Verwendung beider Hinge-Primer kann auf die Bildung von Heterodimeren zurückgeführt werden. Die Verbesserung der Kinetik durch einen Loop-bildenden Primer aus der LAMP kann durch die gesteigerte Generierung von Primerbindungsstellen in den einzelsträngigen Sequenzbereichen der Schleifen erklärt werden. Für die Steigerung der Reaktionseffizienz kann demnach aber auch ein

modifizierter Hinge-Primer ausreichen, sofern ein gegenläufiger Primer vorhanden ist. Die in der HIP generierte Haarnadelstruktur besteht aus einem doppelsträngigen Sequenzbereich (Stamm bzw. *stem*) und einem einzelsträngigen Sequenzbereich. Die Haarnadelstruktur mit weniger als vier Basen ist aufgrund sterischer Hinderung bzw. der geringen räumlichen Ausdehnung nicht möglich. Ist der einzelsträngige Bereich allerdings zu lang, kann die Haarnadelstruktur aufgrund einer hohen Flexibilität instabil sein. Die Rate der Haarnadelstrukturausbildung nimmt daher mit steigender Sequenzlänge ab. Die Länge der einzelsträngigen Sequenz hängt dabei von der Lage der Primerbindungsstellen und dem Primer selbst ab. In der HIP liegt die Länge bei etwa 20 bp und ist im Vergleich zur Schleifen-Struktur der LAMP mit 40 bp wesentlich kürzer (Notomi et al., 2000). Darüber hinaus kann die Salzkonzentration die Stabilität der Struktur zusätzlich beeinflussen, da geringe Konzentrationen monovalenter oder bivalenter Ionen die Stabilität verringern, aber auch die Ausbildung der Haarnadelstruktur begünstigen können (Ernst, 1995; Bonnet et al., 1998; Yakovchuk et al., 2006; Tan und Chen, 2008; Vieregge und Meyers, 2011; Schreck et al., 2015).

Als kurzer Linker wurde eine abasische Stelle verwendet. Die abasische Stelle gehört zur Gruppe der spontanen Schädstellen in der DNA-Helix, bei der eine Purin- oder Pyrimidinbase fehlt (Boiteux und Guillet, 2004; Takeshita et al., 1987). Eine abasische Stelle kann während der Oligonukleotidsynthese in Form von Tetrahydrofuran (THF) eingebaut werden. Wird eine abasische Stelle in eine DNA-Sequenz eingebaut, können viele DNA-Polymerasen an dieser Stelle nicht weiterarbeiten und die Polymeraseaktivität wird gestoppt (Hogg et al., 2004). Sowohl für die A- als auch B-Familie der DNA-Polymerasen wurde die Blockierungsaktivität an der abasischen Stelle gezeigt (Cuniasse et al., 1990; Sabouri und Johansson, 2009). Die in der isothermalen Reaktion eingesetzte *Bst* DNA-Polymerase hat keine 5' – 3' Exonukleaseaktivität, was dazu führt, dass sie am 3'-Ende der abasischen Stelle inaktiviert werden kann. Polymerasen, die über die abasische Stelle hinaus aktiv sind, bauen als korrespondierende Base ein Adenin oder Thymin ein (Sikorsky et al., 2007; Heyn et al., 2010).

Alternativ können auch längere Linker aus Polyethylenglykol (PEG) genutzt werden. Sie können dabei in der Länge variiert werden (C3 bis C18). Untersucht wurde ein C12-Linker (Hexaethylenglykol). Sie werden meist benutzt, um nicht-nukleosidische Abschnitte zwischen zwei Basen zu ermöglichen und die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu begünstigen. Die DNA-Polymerasen können diese Struktur nicht überlesen und werden effektiv blockiert.

Die Variation der Linker-Strukturen ergab in den Negativkontrollen für die Hinge-Primer mit dem C12-Linker in den unterschiedlichen Kombinationen eine höhere Anzahl falsch-positiver Ergebnisse. Die Ursache liegt hier in der unspezifischen Amplifikation durch Homo- oder Heterodimerbildung der Primer begründet, was wiederum eine Folge der Länge und Flexibilität der Hinge-Primer mit dem C12-Linker ist. Demnach kann eine sehr hohe Flexibilität zu einer Fehlhybridisierung oder der Instabilität der Hairpinstruktur führen. Da es für die PEG-Spacer unterschiedliche Modifikationen gibt (C3, C6, C9, C12, C18), können Linker-Variationen mit kürzeren Abständen die Effizienz weiter verbessern. Die

Kontrollversuche mit den Hinge-Primern ohne Linker führten im Vergleich zu den anderen Modifikationen immer zu unspezifischer Amplifikation. Durch die fehlende Modifikation ist die Rückfaltung zur Haarnadelstruktur erschwert und die DNA-Polymerase wird an der Stelle nicht blockiert. Eine andere Ursache für die Häufigkeit der unspezifischen Amplifikation in den ersten Versuchen kann auch auf die Primer- bzw. Templatsequenz zurückzuführen sein. Die Templatsequenz von PSTVd hat eine Länge von 360 Basenpaaren und ist aufgrund der hohen Komplementarität in großen Bereichen doppelsträngig. Des Weiteren ist aufgrund des hohen GC-Gehaltes (>60%) bei der gewählten Reaktions-temperatur eventuell keine effektive Primerbindung möglich (Góra-Sochacka, 2004). Die Effizienz der HIP-Reaktion wurde folglich mit einem anderen Templat und neuen Hinge-Primern für die Amplifikation der Beta-Galaktosidase-Region (lacZ-Gen) auf dem *E. coli*-Genom mit einer abasischen Stelle als Modifikation optimiert.

Zunächst wurden auch hier unterschiedliche Kombinationen der Hinge-Primer untersucht. Die schnellste Reaktion konnte mit zwei Hinge-Primern (symmetrische HIP) erreicht werden (s. Abb. 37). Zusätzliche PCR-Primer zur Unterstützung der Strangverdrängung resultierten in einer leicht geringeren Reaktionseffizienz. Da hier zwei weitere Primer in die Amplifikation integriert wurden, kann die hohe Anzahl der erforderlichen Hybridisierungsereignisse die Reaktionskinetik verringert haben. Um diesen Effekt genauer analysieren zu können, muss die Konzentration der zusätzlichen Primer variiert werden. Anschließend wurden Kombinationen mit einem Hinge-Primer (asymmetrische HIP) und einem gegenläufigen PCR-Primer untersucht. Die schnellste Reaktion wurde hierbei mit dem Rückwärts-Hinge-Primer (LZ-HR), einem äußeren PCR-Primer (LZR-653) und dem gegenläufigen PCR-Primer (LZL-389) erzielt. Ein einzelner Hinge-Primer konnte keine effiziente Amplifikation initiieren. Demnach wird für eine exponentielle Amplifikation mindestens ein gegenläufiger Primer benötigt. Dieser kann ebenfalls ein Hinge-Primer oder ein einfacher PCR-Primer sein. Zusätzlich kann die Strangverdrängung durch einen weiteren PCR-Primer, der vor dem Hinge-Primer hybridisiert, beschleunigt werden.

Einfluss der Magnesium- und Primerkonzentration auf die Kinetik

Die Kinetik von DNA-Polymerase-abhängigen Reaktionen wird von unterschiedlichen Faktoren wie den Primern, dem Enzym, den dNTP, der Probenreinheit und der Pufferzusammensetzung bestimmt. Mg^{2+} bestimmt als Kofaktor der *Bst* DNA-Polymerase die Aktivität, die Hybridisierung der Primer an die Templat-DNA sowie die Kinetik der Haarnadelstrukturausbildung. Die DNA-Duplex-Stabilität hängt von der Konzentration der freien monovalenten und bivalenten Ionen ab (Ernst, 1995; Bonnet et al., 1998; Yakovchuk et al., 2006; Tan und Chen, 2008; Vieregge und Meyers, 2011; Schreck et al., 2015). So steigt mit zunehmender Konzentration einerseits die Schmelztemperatur der Duplex-Struktur und andererseits die Stringenz der Primerhybridisierung (Owczarzy et al., 2008). Folglich kann bei konstanter Reaktionstemperatur in der HIP die Hybridisierung der Primer und damit die Spezifität der Reaktion sowie die Reaktionskinetik über die Veränderung der Mg^{2+} -Konzentration reguliert werden. Die Ergebnisse durch die Variation der Mg^{2+} -

Konzentration ergaben sowohl bei der symmetrischen als auch der asymmetrischen HIP eine optimale Mg^{2+} -Konzentration von 6 mM (s. Tab. 11). Bei höheren Konzentrationen nahm die Effizienz hingegen ab. Eine geringe Konzentration kann zu unspezifischer Primerhybridisierung oder instabilen Haarnadelstrukturen führen. In diesem Fall würde die Primerbindungsstelle nicht freigesetzt werden und eine lineare, langsame Kinetik begünstigt werden. Da bei der symmetrischen HIP unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration falsch-positive Ergebnisse erzielt wurden, kann es zu einer Heterodimerbildung gekommen sein. Die Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration kann hierbei die Fehlhybridisierung zusätzlich stabilisieren. Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur kann dieser Effekt verhindert werden, da hier die Hybridisierung der Primer untereinander thermodynamisch vermindert wird (Wu et al., 1991).

Bei der HIP kommt es unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (Salzkonzentration und Temperatur) zu einem Gleichgewicht zwischen der Duplex- und der Haarnadelstruktur (s. Abb. 44 im Anhang). Die Stabilität beider Strukturen hängt von der Temperatur, der Salzkonzentration mono- und bivalenter Ionen (Na^+ , Mg^{2+}), dem pH-Wert oder additiven Substanzen wie Betain oder DMSO ab (Vieregg und Meyers, 2011). Bei Reaktionstemperaturen unter der Schmelztemperatur des DNA-Duplex wird die Rückfaltung bzw. die Doppelstrangbildung bevorzugt. Die Schmelztemperaturen beider Strukturen (Duplex: 76,4 °C und Haarnadel: 81,4 °C) liegen deutlich über der in der HIP verwendeten Temperatur von 65 °C (s. Abb. 44 im Anhang). Demnach kann es zu einem Übergang zwischen beiden Strukturen kommen, wobei die Haarnadelstruktur thermodynamisch stabiler ist. Des Weiteren ist die DNA aufgrund der chemischen Zusammensetzung mit dem Phosphatrückgrat ein Polyanion mit hoher Ladungsdichte, wobei es zu Abstoßungseffekten innerhalb der DNA kommen kann. Dadurch kann die Ausbildung der Haarnadelstruktur zusätzlich erschwert werden. Durch die in der Pufferlösung vorhandenen mono- und bivalenten Ionen kann die hohe Ladungsdichte in Abhängigkeit der Konzentration kompensiert werden. Der Ladungsausgleich am Phosphatrückgrat führt zu einer höheren Flexibilität der DNA und die Haarnadelstruktur kann gebildet werden. Hierbei hat die Variation von Mg^{2+} aufgrund der höheren Valenz einen größeren Effekt als die Variation monovalenter Ionen. Folglich konnte durch die Anpassung der Mg^{2+} -Konzentration neben der DNA-Polymeraseaktivität auch die Kinetik der Rückfaltung des Hinge-Primers zur Haarnadelstruktur verbessert werden.

Die Stabilität wird zusätzlich durch die Länge der einzel- und doppelsträngigen Sequenz in der Haarnadelstruktur beeinflusst. Sie ist höher, wenn der einzelsträngige Bereich kurz und der doppelsträngige Bereich lang ist, da ein langer doppelsträngiger Bereich eine höhere Schmelztemperatur aufweist. Die Basenzusammensetzung (G-C oder A-T) hat hierbei weniger Einfluss auf die Stabilität als die Basenstapelkraft innerhalb der DNA (*basestacking*) (Yakovchuk et al., 2006; Tan und Chen, 2008; Vieregg und Meyers, 2011). Demnach ist die Haarnadelstruktur in der HIP bei höherer Salzkonzentration und kürzerer Länge des einzelsträngigen Bereichs thermodynamisch stabil. Die Primerkonzentration kann die Effizienz der Amplifikation ebenfalls beeinflussen. Beispielsweise kann eine Limitierung der Primer in der PCR die Amplifikationsrate in den späteren Zyklen und die

Produktmenge vermindern. Eine hohe Konzentration kann allerdings unspezifische Hybridisierung (Dimerbildung oder falsche Produktbildung) begünstigen (Czerny, 1996). Die Variation der Primerkonzentration hatte bei der HIP-Reaktion im untersuchten Bereich (0,8 bis 1,4 mM) allerdings keinen Einfluss auf die Reaktion.

Einfluss der Amplifikationsregion auf die Kinetik und Bestimmung der Sensitivität

Durch die Verringerung der zu amplifizierenden Region von 170 auf 80 bp konnte die Zeit bis zum Start der exponentiellen Amplifikation von 45 auf 20 Minuten reduziert werden (s. Abb. 38). Die schnellere Freisetzung der Primerbindungsstelle erhöht die Effizienz, da die DNA-Polymerase weniger Zeit für die Amplifikation benötigt und die Primerbindungsstellen schneller regeneriert werden können. Demnach wurde die Effizienz der Reaktion durch die Verkürzung der zu amplifizierenden Sequenz wie erwartet erhöht. Eine zu geringe Distanz kann allerdings auch die Spezifität der Reaktion verringern. Durch die Verkürzung der Region ist es schwieriger, Sequenzen für einen spezifischen Nachweis zu finden. Um die Spezifität der Amplifikation trotz geringer Distanz zu gewährleisten, könnte ein zusätzlicher Primer mit Fluoreszenzmarkierung als Sonde im Bereich zwischen den Hinge-Primer und dem gegenläufigen PCR-Primer hybridisieren. Das dadurch erhaltene Fluoreszenzsignal ist dann spezifisch für die amplifizierte DNA und unabhängig von den eingesetzten Primern. Dieses System kann bei Verwendung unterschiedlicher Sonden auch für den Nachweis mehrerer Organismen in einer Probe eingesetzt werden (*multiplexing*) (Tanner et al., 2012).

Um die Leistungsfähigkeit der HIP zu zeigen, wurde die Sensitivität mit verdünnter genomischer DNA von *E. coli* bestimmt. Zwischen 10^6 und 10^{10} konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Kopienzahl und T_p -Wert gezeigt werden. In diesem Bereich kann mit der HIP eine Quantifizierung durchgeführt werden. Die geringste nachweisbare Kopienzahl lag bei 10^4 . Die erreichte Sensitivität ist daher zu optimieren, da mit der LAMP oder herkömmlichen Amplifikationsmethoden Nachweisgrenzen von 10^0 bis 10^3 Kopien erreicht werden können (Hill et al., 2008).

Vor- und Nachteile der HIP im Vergleich zu bestehenden Reaktionen

Im Vergleich zu den bekannten isothermalen Amplifikationsmethoden (s. Tabelle 1) generiert nur die LAMP neben der HIP hochmolekulare dsDNA. Die Vorteile der LAMP sind neben der hohen Sensitivität und Prozessivität vor allem die vielen unterschiedlichen Nachweismethoden der Amplifikation. Der größte Nachteil der LAMP ist das komplizierte Primer-Design und die Kontaminationsgefahr. Daher schließt die HIP die Lücke zwischen den Primer-lastigen und Enzym-lastigen isothermalen Amplifikationsmethoden.

Die RPA ist neben der LAMP die schnellste Amplifikationsmethode und funktioniert auch bei Temperaturen unter 60 °C. Der Nachteil der RPA ist die hohe Sensitivität gegenüber Kontaminationen in der Probe. Diese unspezifische Amplifikation führt aufgrund der hohen Reaktionseffizienz unmittelbar zu einem hohen Hintergrundsignal mit falsch-positivem

Ergebnis. Von den neueren isothermalen Amplifikationsreaktionen, darunter die „Genome Exponential Amplification Reaction“ (GEAR), (Prithiviraj et al., 2012), die „Cross Priming Amplification“ (CPA), (Xu et al., 2012) oder der „Smart Amplification Process“ (SMAP), (Mitani et al., 2007) wird nur die CPA mit der *Bst* DNA-Polymerase durchgeführt. Allerdings sind hier bis zu vier Primer notwendig.

Alle genannten Methoden nutzen eine spezielle Sekundärstruktur, die eine exponentielle Amplifikation ermöglicht, die mit der LAMP vergleichbar ist. Hierbei werden vor allem die gebildeten Schleifenstrukturen selbst als freie Primerbindungsstellen genutzt. Bei der HIP dient die Generierung der Haarnadelstruktur allein der Freisetzung der initialen Primerbindungsstelle ohne selbst an der Amplifikation beteiligt zu sein. Darüber hinaus ist die HIP flexibel anpassbar, da neben der *Bst* auch die *Bsm* oder andere DNA-Polymerasen mit Strangverdrängungsaktivität eingesetzt werden könnten. Mit der HIP konnte eine exponentielle und autozyklische isothermale Amplifikation von bakterieller DNA mit zwei oder drei Primern entwickelt werden. Auch wenn die LAMP als etablierte Methode eine sehr effiziente Reaktion ist, müssen die Optimierung der Reaktionsbedingungen und vor allem das komplizierte Primerdesign sowie die Generierung falsch-positiver Ergebnisse beachtet werden.

Bei der HIP können die Primersequenzen analog zur PCR ohne spezielle Software generiert werden. In Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur, die durch die Nutzung der *Bst* DNA-Polymerase zwischen 60 und 70 °C festgelegt ist, kann eine optimale Schmelztemperatur der Hinge-Primer durch die Primerlänge definiert werden. Damit ist eine dedizierte Software wie der „PrimerExplorer“ bei der LAMP nicht notwendig. Die Effizienz der HIP kann durch die Anpassung der Reaktionsbedingungen und der Linker-Strukturen, z.B. durch Variation der Länge oder der chemischen Zusammensetzung, weiter verbessert werden.

Bei einer anderen Untersuchung konnte die abasische Stelle mit der *Bst* DNA-Polymerase in 77% der Fälle überlesen werden (Heyn et al., 2010). Davon ausgehend, könnte die *Bst* DNA-Polymerase eine abasische Stelle effektiv überbrücken und in der Haarnadelstruktur der HIP eventuell nicht vollständig blockieren. Allerdings wurde im Vergleich zur LAMP oder der HIP eine dreifach höhere Enzymmenge eingesetzt, wobei die Wahrscheinlichkeit für die Häufigkeit des Überlesens dadurch erhöht wurde und nicht den Reaktionsbedingungen der HIP entsprach. Dennoch müssen in weiteren Untersuchungen auch andere Linkerstrukturen in der HIP getestet werden.

Da die Hinge-initiierte Amplifikation unter isothermalen Reaktionsbedingungen mit Hilfe der *Bst* DNA-Polymerase und einem bifunktionellen Primerdesign durchgeführt werden kann, ist ein kostengünstiger Pathogennachweis analog zur LAMP möglich. Der Vorteil der eingesetzten *Bst* DNA-Polymerase ist die hohe Toleranz gegenüber inhibierenden Reaktionsbedingungen, wie dem pH-Wert, der Temperatur, dem Salzgehalt oder hemmenden Substanzen aus der Probe. Daher könnte der Pathogennachweis auch in nicht-aufgereinigten Proben durchgeführt werden.

Die Detektion der HIP kann analog zur LAMP durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie SYBR Green, EvaGreen oder Berberin erfolgen. Der indirekte Nachweis über das

Pyrophosphat wurde in der Arbeit nicht untersucht. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der in der HIP gebildeten hochmolekularen DNA und der *Bst* DNA-Polymerase eine ausreichende Menge an Pyrophosphat freigesetzt wird. Sowohl die direkte als auch die indirekte Detektion der HIP müssen in Folgeexperimenten untersucht werden.

Die Entwicklung der HIP kann dazu beitragen, eine isothermale, aber weniger komplexe Amplifikation als Schnelltest für den Pathogennachweis zu etablieren. Die Verwendung der *Bst* DNA-Polymerase in der HIP hat gegenüber anderen isothermalen Methoden den Vorteil, dass die hohe Inhibitortoleranz Feldanwendungen als Schnelltest ohne komplexe Probenvorbereitung analog zur LAMP ermöglicht.

10 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA- und Pyrophosphat-abhängige Detektionsmethoden für die qualitative und quantitative Analyse von isothermalen Amplifikationsreaktionen entwickelt. Die neuen Methoden erlauben im Vergleich zu den herkömmlichen Nachweisverfahren, wie ELISA oder PCR, eine schnellere und kostengünstigere Pathogendiagnostik. Mit Hilfe einer *Bst* DNA-Polymerase abhängigen isothermalen Amplifikation wurden am Beispiel der LAMP verschiedene direkte und indirekte Detektionsverfahren für den Echtzeit- und Endpunktnachweis von RNA- und DNA-basierten Phytopathogenen in einer geschlossenen Reaktion entwickelt.

In der LAMP wurde Berberin, ein natürlich vorkommender DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, erstmals für die direkte Detektion eingesetzt. Bei der quantitativen Analyse zeigte sich, dass Berberin eine vergleichbare Sensitivität zu den etablierten Fluoreszenzfarbstoffen SYBR Green und EvaGreen aufwies und im Gegensatz zu diesen auch für den Endpunktnachweis eingesetzt werden kann, da es die *Bst* DNA-Polymerase in hohen Konzentrationen nicht inhibiert. Berberin kann folglich nach Anregung bei 350 nm oder 430 nm (bspw. durch eine LED) für den Nachweis der amplifizierten Pathogen-DNA in Form eines schnellen Feldtests oder für die Quantifizierung durch die kontinuierliche Fluoreszenzdetektion in einem portablen Fluorimeter wie dem ESEQuant Tube Scanner verwendet werden. Des Weiteren konnte die Pyrophosphat-abhängige Detektion der LAMP erstmals mit HNB fluorimetrisch in Echtzeit gezeigt werden. Dadurch konnte die Anwendbarkeit von HNB mit der quantitativen Analyse in der LAMP erweitert werden. Mit diesen Untersuchungen haben sich neue Ansätze ergeben, die sowohl neue als auch bekannte Farbstoffe für die Detektion in der isothermalen Amplifikation verwenden. Der in dieser Arbeit aufgezeigte Vergleich dieser Farbstoffe mit etablierten Methoden der LAMP kann dabei helfen, einen geeigneten Nachweis für spezifische LAMP-Anwendungen nach ökonomischen Kriterien zu finden. Zukünftige Entwicklungen in der Pathogendiagnostik vor allem in der Humanmedizin, der Umweltanalytik oder der Landwirtschaft, erfordern robuste und einfache Schnelltestverfahren für die Anwendung außerhalb des Labors, die auch von ungeschultem Personal eingesetzt und interpretiert werden können. Dies wird insbesondere auch möglich, wenn die isothermale Amplifikation und Detektion in einer geschlossenen Reaktion in einem einzelnen Prozessschritt kombiniert wird, da dadurch vor allem die Falsch-Positiv-Rate aufgrund der minimierten Kontaminationsgefahr reduziert wird und der Arbeitsaufwand verringert wird.

Da die LAMP im Vergleich zu anderen Amplifikationsmethoden wesentlich mehr Pyrophosphat generiert, können neue Farbstoffe für dessen Detektion zusätzliche Anwendungen

ermöglichen. Mit der Etablierung des kombinatorischen Mikrotiterplatten-Screenings für die Identifizierung von neuen Farbstoffen wurden weitere Möglichkeiten zum Nachweis von Pyrophosphat in enzymatischen Reaktionen aufgezeigt. Das Screening wurde erfolgreich genutzt, um für den Nachweis von Pyrophosphat in der LAMP oder PCR das Alizarinrot S als neuen Manganionen-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff zu identifizieren und hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnis' unter typischen Reaktionsbedingungen zu optimieren. Der Farbstoff kann aufgrund der hohen Stabilität, geringen Toxizität und zuverlässigen Verfügbarkeit zukünftig in der LAMP zur indirekten Detektion eingesetzt werden. Die Screening-Methode kann darüber hinaus als Vorlage für andere Applikationen mit Pyrophosphat-abhängigen Reaktionen genutzt werden. Mit Hilfe des Mikrotiterplattenformats und der Visualisierung durch eine Heatmap kann eine komplexe Konzentrationsabhängigkeit in kurzer Zeit und hohem Probanddurchsatz effektiv durchgeführt und dargestellt werden. Durch die zusätzliche Automatisierung kann das Verfahren zukünftig konventionelle, aber auch neue Farbstoffe für die selektive Pyrophosphatdetektion in der LAMP oder anderen enzymatischen Reaktionen identifizieren.

Für die Erweiterung der LAMP durch eine quantitative Analyse wurde die indirekte Detektion des Pyrophosphats in einer Emulsion mit den zuvor etablierten Farbstoffen gezeigt. Hierbei konnte eine homogene und stabile Emulsion durch die Integration des Emulgators Poloxamer 188 in die disperse Phase mit dem LAMP-Reaktionsgemisch generiert werden. Calcein, HNB und Alizarinrot S konnten anschließend für den digitalen Nachweis in der Emulsion verwendet werden, da die positiven und negativen Reaktionsräume aufgrund des hohen Signal-Rausch-Verhältnis' fluoreszenzmikroskopisch klassifiziert werden konnten. Folglich können auch die indirekten Verfahren als Alternative zu den herkömmlichen Verfahren mit DNA-basierter Detektion in einer digitalen LAMP eingesetzt werden. Durch die kostengünstigeren Pyrophosphat-abhängigen Farbstoffe kann die absolute Quantifizierung isothermaler Amplifikationsreaktionen zukünftig auch in Routineanwendungen (bspw. der Diagnostik) eingesetzt werden, wenn eine günstige Möglichkeit zur Emulsionsgenerierung und der digitalen Analyse (bspw. mobile Fluoreszenzmikroskopie mit automatischer Bilderkennung) geschaffen wird. Bei weiterer Optimierung können diese Farbstoffe eine Alternative zu den bisher etablierten ddPCR-Verfahren darstellen, da sie aufgrund der hohen Kosten bisher nicht standardmäßig in der Pathogendiagnostik eingesetzt werden. Durch die Kombination von Amplifikation und Detektion in der LAMP kann die digitale LAMP für den hohen Durchsatz in der Pathogendetektion automatisiert und reduziert damit gleichzeitig die Kosten und den Zeitaufwand.

Als Alternative für die Primer-lastige LAMP wurde in dieser Arbeit die Hinge-initiated Primer Dependent Amplification (HIP) unter Verwendung der *Bst* DNA-Polymerase entwickelt. Durch die Integration einer Modifikation in Form einer abasischen Stelle konnte mit dem bifunktionellen Hinge-Primer die Rückfaltung zu einer stabilen Hairpin-Struktur induziert werden. In Abhängigkeit der modifizierten Primer erfolgt die Amplifikation in der asymmetrischen und symmetrischen HIP autozyklisch und exponentiell, wobei hochmolekulare DNA und Pyrophosphat generiert werden. Damit lassen sich die zuvor etablierten Detektionsmethoden auch auf die HIP übertragen. Der Vorteil der neuen Methode gegen-

über den anderen Primer-lastigen isothermalen Reaktionen ist die geringere Komplexität hinsichtlich des Primer-Designs, der Primeranzahl und der geringeren unspezifischen Amplifikation. Die HIP kann durch zusätzliche Erhöhung der Sensitivität, bspw. durch Anpassung der Linker-Strukturen, zukünftig eine leistungsfähige Schnittstellen-Technologie zwischen den neuen und sehr komplexen Primer-lastigen Methoden (CPA und SMART) sowie der etablierten LAMP darstellen.

Die Integration der neuen Detektionsverfahren in die isothermale Amplifikation garantiert eine Reduzierung der Anwendungscomplexität, da die Amplifikation und Detektion in einer Reaktion kombiniert werden können. Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für die Etablierung der LAMP oder der HIP als Schnelltest. Werden alle Prozessschritte in einer mikrofluidischen Plattform integriert, sind schnelle und kostengünstige Nachweise als POCT-Diagnostik oder Feldanwendungen umsetzbar. Detektionsmethoden, die sowohl für eine qualitative als auch quantitative Analyse in einer geschlossenen Reaktion eingesetzt werden können, vereinfachen den Pathogennachweis und erweitern das zukünftige Anwendungsspektrum.

Die Resultate in der Arbeit zeigen deutlich, dass die LAMP und ihre vielfältigen Detektions-möglichkeiten eine leistungsfähige Alternative für konventionelle molekularbiologische oder serologische Verfahren ist. Zukünftige Entwicklungen, die auf der isothermalen Amplifikation aufbauen, werden vor allem in der POCT-Diagnostik oder auch der Sequenzierung zu finden sein. Die isothermale Amplifikation wird zukünftig nicht nur wegen der Portabilität durch kostengünstige, mikrofluidische Chipsysteme oder Papier-basierter Plattformen an Bedeutung gewinnen, sondern vielmehr wegen der geringen Komplexität, die die Grundlage für eine Labor-unabhängige Pathogendetektion mit Smartphone-basierter Analyse bildet.

Literaturverzeichnis

- Abdullahi, U. F., Naim R., Taib W. R. W., Saleh A., Muazu A., Aliyu S., und Baig A. A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), an innovation in gene amplification: Bridging the gap in molecular diagnostics; a review. *Indian Journal of Science and Technology* 8(17), 1.
- Ahmed, M. U., Saito M., Hossain M. M., Rao S. R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., und Tamiya E. (2009). Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst* 134(5), 966–972.
- Ahmed, S. A., van de Sande W. W., Desnos-Ollivier M., Fahal A. H., Mhmoud N. A., und de Hoog G. (2015). Application of Isothermal Amplification Techniques for Identification of *Madurella mycetomatis*, the Prevalent Agent of Human Mycetoma. *Journal of Clinical Microbiology* 53(10), 3280–3285.
- Alexandridis, P. (1996). Amphiphilic copolymers and their applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1(4), 490–501.
- Aliotta, J. M., Pelletier J. J., Ware J. L., Moran L. S., Benner J. S., und Kong H. (1996). Thermostable *Bst* DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 12(5-6), 185–195.
- Alvarez, A. M. (2004). Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 42, 339–366.
- Asiello, P. J. und Baeumner A. J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on a Chip* 11(8), 1420–1430.
- Baer, D. und Gudmestad N. C. (1993). Serological detection of nonmucoid strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. *Phytopathology* 83(2), 157–163.
- Baer, D., Mitzel E., Pasche J., und Gudmestad N. C. (2001). PCR detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-infected tuber samples in a plate capture assay. *American Journal of Potato Research* 78(4), 269–277.
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 9(6), 541.
- Balsam, J., Bruck H. A., und Rasooly A. (2015). Smartphone-based fluorescence detector for mHealth. *Mobile Health Technologies: Methods and Protocols* 1256, 231–245.
- Bej, A. K., Mahbubani M., Dicesare J., und Atlas R. (1991). Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology* 57(12), 3529–3534.
- Benedict, A. A., Alvarez A. M., und Pollard L. W. (1990). Pathovar-specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* detected with monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 56(2), 572–574.
- Bensimon-Brito, A., Cardeira J., Dionísio G., Huysseune A., Cancela M., und Witten P. (2016). Revisiting in vivo staining with alizarin red S-a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Developmental Biology* 16(1), 1.
- Bentley, S. D., Corton C., Brown S. E., Barron A., Clark L., Doggett J., Harris B., Ormond D., Quail M. A., May G., et al. (2008). Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *Journal of Bacteriology* 190(6), 2150–2160.

- Bibette, J., Calderon F. L., und Poulin P. (1999). Emulsions: basic principles. *Reports on Progress in Physics* 62(6), 969.
- Boiteux, S. und Guillet M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3(1), 1–12.
- Bonnet, G., Krichevsky O., und Libchaber A. (1998). Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(15), 8602–8606.
- Boonham, N., Pérez L. G., Mendez M., Peralta E. L., Blockley A., Walsh K., Barker I., und Mumford R. (2004). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods* 116(2), 139–146.
- Bratosin, D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., und Montreuil J. (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A* 66(1), 78–84.
- Capek, I. (2004). Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 107(2), 125–155.
- Chittaranjan, S. und De Boer S. (1997). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium and greenhouse nutrient solution by serological and PCR techniques. *European Journal of Plant Pathology* 103(6), 555–563.
- Cho, M. S., Park D. H., Namgung M., Ahn T.-Y., und Park D. S. (2015). Validation and application of a real-time PCR protocol for the specific detection and quantification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. *The Plant Pathology Journal* 31(2), 123–131.
- Christie, R. (2014). *Colour chemistry*. Royal Society of Chemistry.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350(6313), 91–92.
- Courtois, F., Olguin L. F., Whyte G., Theberge A. B., Huck W. T., Hollfelder F., und Abell C. (2009). Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays. *Analytical Chemistry* 81(8), 3008–3016.
- Craw, P. und Balachandran W. (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip* 12(14), 2469–2486.
- Cuniase, P., Fazakerley G., Guschlbauer W., Kaplan B., und Sowers L. (1990). The abasic site as a challenge to DNA polymerase: a nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site. *Journal of Molecular Biology* 213(2), 303–314.
- Czerny, T. (1996). High primer concentration improves PCR amplification from random pools. *Nucleic Acids Research* 24(5), 985–986.
- Damhorst, G. L., Duarte-Guevara C., Chen W., Ghonge T., Cunningham B. T., und Bashir R. (2015). Smartphone-imaged HIV-1 reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) on a chip from whole blood. *Engineering* 1(3), 324–335.
- Datta, B. K., Mukherjee S., Kar C., Ramesh A., und Das G. (2013). Zn²⁺ and pyrophosphate sensing: selective detection in physiological conditions and application in DNA-based estimation of bacterial cell numbers. *Analytical Chemistry* 85(17), 8369–8375.
- De Boer, S., Janse J., Stead D., Van Vaerenbergh J., und McKenzie A. (1992). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers grown from seed pieces with various levels of inoculum. *Potato research* 35(2), 207–216.
- De Boer, S. und McNaughton M. (1986). Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. *American Potato Journal* 63(10), 533–543.

- De Boer, S. H. und Slack S. A. (1984). Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. *Plant Disease* 68(10), 841–844.
- Dehghan, E. M., Bozorgmehr A., Motalebzadeh H., Bodaghabadi N., Farhangi B., Babashah S., und Sadeghizadeh M. (2014). Techniques for evaluation of LAMP amplicons and their applications in molecular biology. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 16(17), 7409–7414.
- Demertzis, M. A. (1988). Fluorimetric determination of calcium in serum with calcein: complexation of calcein with calcium and alkali metals. *Analytica Chimica Acta* 209, 303–308.
- Ding, B. (2010). Viroids: Self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1(3), 362–375.
- Dong, L., Meng Y., Sui Z., Wang J., Wu L., und Fu B. (2015). Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Scientific Reports* 5.
- Dragan, A., Pavlovic R., McGivney J., Casas-Finet J., Bishop E., Strouse R., Schenerman M., und Geddes C. (2012). SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence* 22(4), 1189–1199.
- Dugan, L., Bearinger J., Hinckley A., Strout C., und Souza B. (2012). Detection of *Bacillus anthracis* from spores and cells by loop-mediated isothermal amplification without sample preparation. *Journal of Microbiological Methods* 90(3), 280–284.
- Dunn, N. J., Humphries IV W. H., Offenbacher A. R., King T. L., und Gray J. A. (2009). pH-dependent cis→trans isomerization rates for azobenzene dyes in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry A* 113(47), 13144–13151.
- Echols, H. und Goodman M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annual Review of Biochemistry* 60(1), 477–511.
- Eischeid, A. C. (2011). SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes* 4(1), 1.
- El-Deiry, W. S., Downey K. M., und So A. G. (1984). Molecular mechanisms of manganese mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(23), 7378–7382.
- El-Wahed, M. A., Refat M., und El-Megharbel S. (2008). Synthesis, spectroscopic and thermal characterization of some transition metal complexes of folic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 70(4), 916–922.
- Engvall, E. und Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9), 871–874.
- Ernst, B. (1995). *Modern Synthetic Methods 1995*. John Wiley & Sons.
- Fakruddin, M., Mannan K. S. B., Chowdhury A., Mazumdar R. M., Hossain M. N., Islam S., Chowdhury M. A., et al. (2013). Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5(4), 245.
- Fang, Y. und Ramasamy R. P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 5(3), 537–561.
- Farahani, A. S. und Taghavi S. M. (2016). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas hor-torum* pv. *pelargonii* in geranium by real-time PCR. *Journal of Plant Protection Research* 56(3), 265–269.
- Fischbach, J., Loh Q., Bier F. F., Lim Soon T., Frohme M., und Glökler J. F. (2017). Alizarin Red S for online pyrophosphate detection identified by a rapid screening method. *Scientific Reports* 7(45085), doi: 10.1038/srep45085.

- Fischbach, J., Xander N. C., Frohme M., und Glökler J. F. (2015). Shining a light on LAMP assays - A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques* 58(4), 189–194.
- Fraiture, M.-A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D., und Roosens N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. *BioMed Research International* 2015, 1–22.
- Francois, P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.-J., Boehme C. C., Notomi T., Perkins M. D., und Schrenzel J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 62(1), 41–48.
- Fu, S., Qu G., Guo S., Ma L., Zhang N., Zhang S., Gao S., und Shen Z. (2011). Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163(7), 845–850.
- Gansen, A., Herrick A. M., Dimov I. K., Lee L. P., und Chiu D. T. (2012). Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip. *Lab on a Chip* 12(12), 2247–2254.
- Gill, P. und Ghaemi A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies—a review. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* 27(3), 224–243.
- Glick, D., Coffey C., und Sulzinski M. (2002). Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of geranium. *Journal of Phytopathology* 150(2), 54–59.
- Gong, G.-Q., Zong Z.-X., und Song Y.-M. (1999). Spectrofluorometric determination of DNA and RNA with berberine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 55(9), 1903–1907.
- Góra-Sochacka, A. (2004). Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica. (English Edition)* 51(3), 587–608.
- Goto, M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., und Hanaki K.-I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46(3), 167–172.
- Goto, T., Kajiwaru H., Yoshinari M., Fukuhara E., Kobayashi S., und Tanaka T. (2003). In vitro assay of mineralized-tissue formation on titanium using fluorescent staining with calcein blue. *Biomaterials* 24(22), 3885–3892.
- Grube, M., Schloter M., Smalla K., und Berg G. (2015). *The plant microbiome and its importance for plant and human health*. Frontiers E-books.
- Gruner, P., Riechers B., Orellana L. A. C., Brosseau Q., Maes F., Beneyton T., Pekin D., und Baret J.-C. (2015). Stabilisers for water-in-fluorinated-oil dispersions: Key properties for microfluidic applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 20(3), 183–191.
- Gruner, P., Riechers B., Semin B., Lim J., Johnston A., Short K., und Baret J.-C. (2016). Controlling molecular transport in minimal emulsions. *Nature Communications* 7, doi:10.1038/ncomms10392.
- Gudmestad, N. C., Mallik I., Pasche J. S., Anderson N. R., und Kinzer K. (2009). A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulase A gene sequence. *Plant Disease* 93(6), 649–659.
- Gudnason, H., Dufva M., Bang D. D., und Wolff A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research* 35(19), e127.
- Herold, T., Haas B., Singh R. P., Boucher A., und Sängner H. L. (1992). Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant molecular biology* 19(2), 329–333.

- Heyn, P., Stenzel U., Briggs A. W., Kircher M., Hofreiter M., und Meyer M. (2010). Road blocks on paleogenomes—polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA. *Nucleic acids research* 38(16), e161–e161.
- Hill, J., Beriwal S., Chandra I., Paul V. K., Kapil A., Singh T., Wadowsky R. M., Singh V., Goyal A., Jahnukainen T., et al. (2008). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8), 2800–2804.
- Hillebrand, G. G. und Beattie K. (1984). Template-dependent variation in the relative fidelity of DNA polymerase I of *Escherichia coli* in the presence of Mg²⁺ versus Mn²⁺. *Nucleic Acids Research* 12(7), 3173–3183.
- Hindson, B. J., Ness K. D., Masquelier D. A., Belgrader P., Heredia N. J., Makarewicz A. J., Bright I. J., Lucero M. Y., Hiddessen A. L., Legler T. C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry* 83(22), 8604–8610.
- Hogg, M., Wallace S. S., und Doublé S. (2004). Crystallographic snapshots of a replicative DNA polymerase encountering an abasic site. *The EMBO Journal* 23(7), 1483–1493.
- Hsieh, K., Mage P. L., Csordas A. T., Eisenstein M., und Soh H. T. (2014). Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications* 50(28), 3747–3749.
- Itoh, A. und Ueno K. (1970). Evaluation of 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulpho-1-naphthylazo)-3-naphthoic acid and hydroxynaphthol blue as metallochromic indicators in the EDTA titration of calcium. *Analyst* 95(1131), 583–589.
- James, K. L., Ríos-Hernández L. A., Wofford N. Q., Mouttaki H., Sieber J. R., Sheik C. S., Nguyen H. H., Yang Y., Xie Y., Erde J., et al. (2016). Pyrophosphate-dependent ATP formation from acetyl coenzyme A in *Syntrophus aciditrophicus*, a new twist on ATP formation. *mBio* 7(4), e01208–16.
- Jansson, V. und Jansson K. (2003, jun). A continuous fluorometric assay for inorganic pyrophosphate and for detecting single-base changes with polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 317(2), 268–270.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe S., Bank E. M., Levin L. R., Buck J., und Steegborn C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *Journal of Molecular Biology* 362(4), 623–639.
- Kamerlin, S. C. und Warshel A. (2009). On the energetics of ATP hydrolysis in solution. *The Journal of Physical Chemistry B* 113(47), 15692–15698.
- Karthik, K., Rathore R., Thomas P., Arun T., Viswas K., Dhama K., und Agarwal R. (2014). New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX* 1, 137–143.
- Kepner, B. L. und Hercules D. M. (1963). Fluorometric determination of calcium in blood serum. *Analytical Chemistry* 35(9), 1238–1240.
- Khorosheva, E. M., Karymov M. A., Selck D. A., und Ismagilov R. F. (2015). Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP. *Nucleic Acids Research* 44(2), gkv877.
- Kiddle, G., Hardinge P., Buttigieg N., Gandelman O., Pereira C., McElgunn C. J., Rizzoli M., Jackson R., Appleton N., Moore C., et al. (2012). GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology* 12(1), 15.

- Kim, J. und Easley C. J. (2011). Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis* 3(2), 227–239.
- Kim, S. K., Lee D. H., Hong J.-I., und Yoon J. (2008). Chemosensors for pyrophosphate. *Accounts of Chemical Research* 42(1), 23–31.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8(6), 257–260.
- Kobayashi, I., Murayama Y., Kuroiwa T., Uemura K., und Nakajima M. (2009). Production of monodisperse water-in-oil emulsions consisting of highly uniform droplets using asymmetric straight-through microchannel arrays. *Microfluidics and Nanofluidics* 7(1), 107–119.
- Kubota, R., Alvarez A., Su W., und Jenkins D. (2011). FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biological Engineering Transactions* 4(2), 81–100.
- Kumar, G. S., Debnath D., Sen A., und Maiti M. (1993). Thermodynamics of the interaction of berberine with DNA. *Biochemical Pharmacology* 46(9), 1665–1667.
- Lazcka, O., Del Campo F. J., und Munoz F. X. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 22(7), 1205–1217.
- Lee, S., Yuen K. K., Jolliffe K. A., und Yoon J. (2015). Fluorescent and colorimetric chemosensors for pyrophosphate. *Chemical Society Reviews* 44(7), 1749–1762.
- Lenarčič, R., Morisset D., Mehle N., und Ravnikar M. (2013). Fast real-time detection of Potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. *Plant Pathology* 62(5), 1147–1156.
- Li, X., De Boer S., und Ward L. (1997). Improved microscopic identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cells by combining in situ hybridization with immunofluorescence. *Letters in applied microbiology* 24(6), 431–434.
- Li, X.-L., Hu Y.-J., Wang H., Yu B.-Q., und Yue H.-L. (2012). Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *Biomacromolecules* 13(3), 873–880.
- Liang, J. und Canary J. W. (2010). Discrimination between hard metals with soft ligand donor atoms: An on-fluorescence probe for manganese (II). *Angewandte Chemie International Edition* 49(42), 7710–7713.
- Liao, S.-C., Peng J., Mauk M. G., Awasthi S., Song J., Friedman H., Bau H. H., und Liu C. (2016). Smart cup: A minimally-instrumented, smartphone-based point-of-care molecular diagnostic device. *Sensors and Actuators B: Chemical* 229, 232–238.
- Lievens, A., Jacchia S., Kagkli D., Savini C., und Querci M. (2016). Measuring digital PCR quality: performance parameters and their optimization. *PLoS One* 11(5), e0153317.
- Lizardi, P. M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D. C., und Ward D. C. (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature genetics* 19(3), 225–232.
- López, M. M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M., Bertolini E., et al. (2009). Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Current Issues in Molecular Biology* 11(1), 13.
- Lou, X., Ou D., Li Q., und Li Z. (2012). An indirect approach for anion detection: the displacement strategy and its application. *Chemical Communications* 48(68), 8462–8477.
- Lowe, A., McDermott G., Hindson C., Chia E., Hiddessen A., Hindson B., Han C., und Wang Y. (2014, March 7). Compositions, methods and systems for polymerase chain reaction assays. US Patent App. 14/201,752.

- Manulis, S., Valinsky L., Lichter A., und Gabriel D. W. (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11), 4094–4099.
- Mao, F. und Leung W. (2010, September 28). Methods of using dyes in association with nucleic acid staining or detection and associated technology. US Patent 7,803,943.
- Mao, F., Leung W.-Y., und Xin X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology* 7(1), 1.
- Martin, A., Bouffier L., Grant K. B., Limoges B., und Marchal D. (2016). Real-time electrochemical LAMP: a rational comparative study of different DNA intercalating and non-intercalating redox probes. *Analyst* 141(13), 4196–4203.
- Massart, S., Nagy C., und Jijakli M. H. (2014). Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *European Journal of Plant Pathology* 138(1), 29–37.
- Mauk, M. G., Liu C., Sadik M., und Bau H. H. (2015). Microfluidic devices for nucleic acid (NA) isolation, isothermal NA amplification, and real-time detection. *Mobile Health Technologies: Methods and Protocols* 1256, 15–40.
- Mauk, M. G., Liu C., Song J., und Bau H. H. (2015). Integrated microfluidic nucleic acid isolation, isothermal amplification, and amplicon quantification. *Microarrays* 4(4), 474–489.
- Mazutis, L., Araghi A. F., Miller O. J., Baret J.-C., Frenz L., Janoshazi A., Taly V., Miller B. J., Hutchison J. B., Link D., et al. (2009). Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis. *Analytical Chemistry* 81(12), 4813–4821.
- McCormick, J. (1965). Biosynthesis of the tetracyclines. *Biogenesis of Antibiotic Substances* 77(4), 73–91.
- McCracken, K. E. und Yoon J.-Y. (2016). Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review. *Analytical Methods* 8(36), 6591–6601.
- Merino, E. und Ribagorda M. (2012). Control over molecular motion using the cis–trans photoisomerization of the azo group. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8(1), 1071–1090.
- Merriman, B., Torrent I., Rothberg J. M., Team R., et al. (2012). Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 33(23), 3397–3417.
- Mills, D., Russell B. W., und Hanus J. W. (1997). Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology* 87(8), 853–861.
- Mitani, Y., Lezhava A., Kawai Y., Kikuchi T., Oguchi-Katayama A., Kogo Y., Itoh M., Miyagi T., Takakura H., Hoshi K., et al. (2007). Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nature Methods* 4(3), 257–262.
- Mondal, K. K. und Shanmugam V. (2013). Advancements in the diagnosis of bacterial plant pathogens: An overview. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 8(1), 1–11.
- Monger, W. A. und Jeffries C. (2015). Detection of potato spindle tuber viroid and other related viroids by a DIG labelled RNA probe. *Plant Pathology: Techniques and Protocols* 1302, 259–271.
- Mori, Y., Hirano T., und Notomi T. (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology* 6(1), 3.
- Mori, Y., Nagamine K., Tomita N., und Notomi T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289(1), 150–154.

- Morrison, T. B., Weis J. J., und Wittwer C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6), 954–8.
- Mueller, H., Kassack M. U., und Wiese M. (2004). Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening* 9(6), 506–515.
- Mullis, K. B. und Faloona F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335–350.
- Mumford, R., Walsh K., und Boonham N. (2000). A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *EPPO Bulletin* 30(3-4), 431–435.
- Murray, G. I. und Ewen S. (1992). A new fluorescence method for alkaline phosphatase histochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 40(12), 1971–1974.
- Nagamine, K., Hase T., und Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16(3), 223–229.
- Nameth, S., Daughtrey M., Moorman G., und Sulzinski M. (1999). Bacterial blight of geranium: a history of diagnostic challenges. *Plant Disease* 83(3), 204–212.
- Nixon, G. J., Svenstrup H. F., Donald C. E., Carder C., Stephenson J. M., Morris-Jones S., Huggett J. F., und Foy C. A. (2014). A novel approach for evaluating the performance of real time quantitative loop-mediated isothermal amplification-based methods. *Biomolecular Detection and Quantification* 2, 4–10.
- Njiru, Z. K. (2012). Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(6), e1572.
- Notomi, T., Mori Y., Tomita N., und Kanda H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* 53(1), 1–5.
- Notomi, T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., und Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12), e63–e63.
- Oscorbin, I. P., Belousova E. A., Zakabunin A. I., Boyarskikh U. A., und Filipenko M. L. (2016). Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques* 61(1), 20.
- Owczarzy, R., Moreira B. G., You Y., Behlke M. A., und Walder J. A. (2008). Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry* 47(19), 5336–5353.
- Parida, M., Sannarangaiah S., Dash P. K., Rao P., und Morita K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 18(6), 407–421.
- Pastrik, K.-H. (2000). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106(2), 155–165.
- Patterson, A. S., Hsieh K., Soh H. T., und Plaxco K. W. (2013). Electrochemical real-time nucleic acid amplification: towards point-of-care quantification of pathogens. *Trends in Biotechnology* 31(12), 704–712.
- Pautke, C., Vogt S., Kreutzer K., Haczek C., Wexel G., Kolk A., Imhoff A. B., Zitzelsberger H., Milz S., und Tischer T. (2010). Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *Journal of Anatomy* 217(1), 76–82.

- Pfaffl, M. W. (2012). *Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction*. Martin Filion, Hg., Quantitative real-time PCR in Applied Microbiology.
- Piepenburg, O., Williams C. H., Stemple D. L., und Armes N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology* 4(7), e204.
- Podleckis, E. V., Hammond R. W., Hurtt S. S., und Hadidi A. (1993). Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods* 43(2), 147–158.
- Ponchel, F., Toomes C., Bransfield K., Leong F. T., Douglas S. H., Field S. L., Bell S. M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A. J., et al. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3(1), 1.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf J., und van Amerongen A. (2009). Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(2), 569–582.
- Prithiviraj, J., Hill V., und Jothikumar N. (2012). Rapid detection of microbial DNA by a novel isothermal genome exponential amplification reaction (GEAR) assay. *Biochemical and biophysical research communications* 420(4), 738–742.
- Priye, A., Wong S., Bi Y., Carpio M., Chang J., Coen M., Cope D., Harris J., Johnson J., Keller A., et al. (2016). Lab-on-a-drone: toward pinpoint deployment of smartphone-enabled nucleic acid-based diagnostics for mobile health care. *Analytical chemistry* 88(9), 4651–4660.
- Puchtler, H., Sweat F., und Gropp S. (1967). An investigation into the relation between structure and fluorescence of azo dyes. *Journal of the Royal Microscopical Society* 87(3-4), 309–328.
- Rane, T. D., Chen L., Zec H. C., und Wang T.-H. (2015). Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Lab on a Chip* 15(3), 776–782.
- Rodriguez-Manzano, J., Karymov M. A., Begolo S., Selck D. A., Zhukov D. V., Jue E., und Ismailov R. F. (2016). Reading out single-molecule digital RNA and DNA isothermal amplification in nanoliter volumes with unmodified camera phones. *ACS Nano* 10(3), 3102–3113.
- Ronaghi, M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., und Nyrén P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 242(1), 84–89.
- Ronaghi, M., Uhlén M., und Nyren P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281(5375), 363.
- Rurack, K. (2001). Flipping the light switch ‘ON’—the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57(11), 2161–2195.
- Ryan, D. K. und Weber J. H. (1982). Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry* 54(6), 986–990.
- Sabouri, N. und Johansson E. (2009). Translesion synthesis of abasic sites by yeast DNA polymerase ϵ . *Journal of Biological Chemistry* 284(46), 31555–31563.
- Safenkova, I., Zaitsev I., Pankratova G., Varitsev Y. A., Zherdev A., und Dzantiev B. (2014). Lateral flow immunoassay for rapid detection of potato ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(6), 675–682.
- Sánchez, A. R., Rogers R. S., und Sheridan P. J. (2004). Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology* 43(10), 709–715.

- Sanders, R., Huggett J. F., Bushell C. A., Cowen S., Scott D. J., und Foy C. A. (2011). Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Analytical Chemistry* 83(17), 6474–6484.
- Sandoz, P. A., Chung A. J., Weaver W. M., und Di Carlo D. (2014). Sugar additives improve signal fidelity for implementing two-phase resorufin-based enzyme immunoassays. *Langmuir* 30(23), 6637–6643.
- Savary, S., Ficke A., Aubertot J.-N., und Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* 4(4), 519–537.
- Schaad, N., Berthier-Schaad Y., Sechler A., und Knorr D. (1999). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83(12), 1095–1100.
- Schaad, N. W. und Frederick R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24(3), 250–258.
- Scheller, F. W., Bier F. F., und Pfeiffer D. (1995, jan). *Biosensoren: Grundlagen und Anwendungen*, Volume 62. Walter de Gruyter GmbH.
- Schrader, C., Schielke A., Ellerbroek L., und John R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology* 113(5), 1014–1026.
- Schreck, J. S., Ouldrige T. E., Romano F., Šulc P., Shaw L. P., Louis A. A., und Doye J. P. (2015). DNA hairpins destabilize duplexes primarily by promoting melting rather than by inhibiting hybridization. *Nucleic acids research* 43(13), 6181–6190.
- Schütze, T., Rubelt F., Repkow J., Greiner N., Erdmann V. A., Lehrach H., Konthur Z., und Glökler J. (2011). A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical biochemistry* 410(1), 155–157.
- Seemann, R., Brinkmann M., Pfohl T., und Herminghaus S. (2011). Droplet based microfluidics. *Reports on Progress in Physics* 75(1), 016601.
- Selck, D. A., Karymov M. A., Sun B., und Ismagilov R. F. (2013). Increased robustness of single-molecule counting with microfluidics, digital isothermal amplification, and a mobile phone versus real-time kinetic measurements. *Analytical Chemistry* 85(22), 11129–11136.
- Senarath, K., Usgodaarachchi R., Navaratne V., Nagahawatte A., Wijayarathna C., Alvitigala J., Goonasekara C., et al. (2014). Non specific amplification with the LAMP technique in the diagnosis of tuberculosis in Sri Lankan settings. *Journal of Tuberculosis Research* 2(04), 168.
- Seyrig, G., Stedtfeld R. D., Tourlousse D. M., Ahmad F., Towery K., Cupples A. M., Tiedje J. M., und Hashsham S. A. (2015). Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *Journal of microbiological methods* 119, 223–227.
- Shamloul, A. und Hadidi A. (1999). Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of virological methods* 80(2), 145–155.
- Shamloul, A., Hadidi A., Zhu S., Singh R., und Sagredo B. (1997). Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19(1), 89–96.
- Shen, F., Davydova E. K., Du W., Kreutz J. E., Piepenburg O., und Ismagilov R. F. (2011). Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip. *Analytical chemistry* 83(9), 3533–3540.
- Sidore, A. M., Lan F., Lim S. W., und Abate A. R. (2016). Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification. *Nucleic acids research* 44(7), e66–e66.

- Sidoti, F., Bergallo M., Costa C., und Cavallo R. (2013). Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Molecular Biotechnology* 53(3), 352–362.
- Sikorsky, J. A., Primerano D. A., Fenger T. W., und Denvir J. (2007). DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochemical and biophysical research communications* 355(2), 431–437.
- Singleton, J., Osborn J. L., Lillis L., Hawkins K., Guelig D., Price W., Johns R., Ebels K., Boyle D., Weigl B., et al. (2014). Electricity-free amplification and detection for molecular point-of-care diagnosis of HIV-1. *PloS One* 9(11), e113693.
- Slack, S., Drennan J., Westra A., Gudmestad N., und Oleson A. (1996). Comparison of PCR, ELISA, and DNA hybridization for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. *Plant Disease* 80(5), 519–524.
- Smith, D. S., De Boer S. H., und Gourley J. (2008). An internal reaction control for routine detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using a real-time TaqMan PCR-based assay. *Plant Disease* 92(5), 684–693.
- Stedtfeld, R. D., Tourlousse D. M., Seyrig G., Stedtfeld T. M., Kronlein M., Price S., Ahmad F., Gulari E., Tiedje J. M., und Hashsham S. A. (2012). Gene-Z: a device for point of care genetic testing using a smartphone. *Lab on a chip* 12(8), 1454–1462.
- Steinmüller, S., Müller P., Bandte M., und Büttner C. (2013). Risk of dissemination of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* with potato waste. *European Journal of Plant Pathology* 137(3), 573–584.
- Subramanian, S. und Gomez R. D. (2014). An empirical approach for quantifying Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) using *Escherichia coli* as a model system. *PloS One* 9(6), e100596.
- Sulzinski, M. (2001). Differentiation of *Xanthomonas campestris* pvs. *pelargonii* and *hederae* by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 149(1), 45–49.
- Sulzinski, M., Moorman G., Schlaghaufer B., und Romaine C. (1995). Fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* and related pathovars using random-primed PCR. *Journal of Phytopathology* 143(7), 429–433.
- Sulzinski, M., Moorman G., Schlaghaufer B., und Romaine C. (1996). Characteristics of a PCR-Based assay for in planta detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. *Journal of Phytopathology* 144(7-8), 393–398.
- Sulzinski, M., Moorman G., Schlaghaufer B., und Romaine C. (1997). A simple DNA extraction method for PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in Geraniums. *Journal of Phytopathology* 145(5-6), 213–215.
- Tabor, S. und Richardson C. C. (1989). Effect of manganese ions on the incorporation of deoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(11), 4076–4080.
- Tadros, T. F. (2013). *Emulsion formation and stability*. John Wiley & Sons.
- Takeshita, M., Chang C.-N., Johnson F., Will S., und Grollman A. (1987). Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. Model substrates for DNA polymerases and apurinic/aprimidinic endonucleases. *Journal of Biological Chemistry* 262(21), 10171–10179.
- Tan, S. S., Kim S. J., und Kool E. T. (2011). Differentiating between fluorescence-quenching metal ions with polyfluorophore sensors built on a DNA backbone. *Journal of the American Chemical Society* 133(8), 2664–2671.
- Tan, Z.-J. und Chen S.-J. (2008). Salt dependence of nucleic acid hairpin stability. *Biophysical journal* 95(2), 738–752.

- Tanner, N. A., Zhang Y., und Evans Jr T. C. (2012). Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* 53(2), 81–9.
- Tanner, N. A., Zhang Y., und Evans Jr T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques* 5(6), 59–68.
- Thorsen, T., Roberts R. W., Arnold F. H., und Quake S. R. (2001). Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters* 86(18), 4163.
- Tillhon, M., Ortiz L. M. G., Lombardi P., und Scovassi A. I. (2012). Berberine: new perspectives for old remedies. *Biochemical pharmacology* 84(10), 1260–1267.
- Tomita, N., Mori Y., Kanda H., und Notomi T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3(5), 877–882.
- Toumazou, C., Shepherd L. M., Reed S. C., Chen G. I., Patel A., Garner D. M., Wang C.-J. A., Ou C.-P., Amin-Desai K., Athanasiou P., et al. (2013). Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nature Methods* 10(7), 641–646.
- Tröger, V., Niemann K., Gärtig C., und Kuhlmeier D. (2015). Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 2015(6), doi:10.4172/2157-7439.1000282.
- Tsutsumi, N., Yanagisawa H., Fujiwara Y., Ohara T., et al. (2010). Detection of Potato spindle tuber viroid by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan* 46, 61–67.
- Tyagi, A. und Penzkofer A. (2010). Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid. *Chemical Physics* 367(2), 83–92.
- Upton, R. H., Haugland R. P., Malekzadeh M. N., und Haugland R. P. (1996). A spectrophotometric method to measure enzymatic activity in reactions that generate inorganic pyrophosphate. *Analytical Biochemistry* 243(1), 41–45.
- Urbán-Morlán, Z., Castro-Ríos R., Chávez-Montes A., Melgoza-Contreras L., Pinon-Segundo E., Ganem-Quintanar A., und Quintanar-Guerrero D. (2008). Determination of poloxamer 188 and poloxamer 407 using high-performance thin-layer chromatography in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46(4), 799–803.
- Vashishtha, A. K., Wang J., und Konigsberg W. H. (2016). Different divalent cations alter the kinetics and fidelity of DNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry* 291(40), 20869–20875.
- Vieregg, J. R. und Meyers R. A. (2011). *Nucleic Acid Structural Energetics, Encyclopedia of analytical chemistry*. John Wiley & Sons.
- Vilmann, H. (1969). The in vivo staining of bone with alizarin red S. *Journal of Anatomy* 105(3), 533.
- Vincelli, P. und Tisserat N. (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease* 92(5), 660–669.
- Vincent, M., Xu Y., und Kong H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports* 5(8), 795–800.
- Walker, G. T., Fraiser M. S., Schram J. L., Little M. C., Nadeau J. G., und Malinowski D. P. (1992). Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic acids research* 20(7), 1691–1696.
- Walser, M. (1960). Determination of free magnesium ions in body fluids. Improved methods for free calcium ions, total calcium, and total magnesium. *Analytical Chemistry* 32(6), 711–717.

- Waring, D. R. und Hallas G. (2013). *The chemistry and application of dyes*. Springer Science & Business Media.
- Wastling, S. L., Picozzi K., Kakembo A. S., und Welburn S. C. (2010). LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(11), e865.
- Watts, M. R., James G., Sultana Y., Ginn A. N., Outhred A. C., Kong F., Verweij J. J., Iredell J. R., Chen S. C., und Lee R. (2014). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90(2), 306–311.
- Weidemann, H.-L. und Buchta U. (1998). A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research* 41(1), 1–8.
- Wu, D. Y., Ugozzoli L., Pal B. K., Qian J., und Wallace R. B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and cell biology* 10(3), 233–238.
- Xiang, L., De Boer S. H., et al. (1995). Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85(8), 837–842.
- Xu, G., Hu L., Zhong H., Wang H., Yusa S.-i., Weiss T. C., Romaniuk P. J., Pickerill S., und You Q. (2012). Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Scientific reports* 2, 246.
- Xu, H.-R., Li K., Jiao S.-Y., Pan S.-L., Zeng J.-R., und Yu X.-Q. (2015). Tetraphenylethene-pyridine salts as the first self-assembling chemosensor for pyrophosphate. *Analyst* 140(12), 4182–4188.
- Yakovchuk, P., Protozanova E., und Frank-Kamenetskii M. D. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic acids research* 34(2), 564–574.
- Yamagishi, H. (1962). Interaction between nucleic acids and berberine sulfate. *The Journal of Cell Biology* 15(3), 589–592.
- Yamakawa, K., Iwasaki H., Masuda I., Ohjimi Y., Honda I., Saeki K., Zhang J., Shono E., Naito M., und Kikuchi M. (2003). The utility of alizarin red s staining in calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *The Journal of Rheumatology* 30(5), 1032–1035.
- Yan, L., Zhou J., Zheng Y., Gamson A. S., Roembke B. T., Nakayama S., und Sintim H. O. (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Molecular Biosystems* 10(5), 970–1003.
- Yang, Q., Wang F., Prinyawiwatkul W., und Ge B. (2014). Robustness of Salmonella loop-mediated isothermal amplification assays for food applications. *Journal of Applied Microbiology* 116(1), 81–88.
- Yasuhara-Bell, J. und Alvarez A. M. (2015). Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(3), 811–826.
- You, W., Zhu H.-Y., Huang W., Hu B., Fan Y., und You X.-Z. (2010). The first observation of azo-hydrazone and cis-trans tautomerisms for disperse yellow dyes and their nickel (II) and copper (II) complexes. *Dalton Transactions* 39(34), 7876–7880.
- You, Y., Tomat E., Hwang K., Atanasijevic T., Nam W., Jasanoff A. P., und Lippard S. J. (2010). Manganese displacement from Zinpyr-1 allows zinc detection by fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging. *Chemical Communications* 46(23), 4139–4141.

- Zanoli, L. M. und Spoto G. (2012). Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors* 3(1), 18–43.
- Zhang, Y. und Jiang H.-R. (2016). A review on continuous-flow microfluidic PCR in droplets: Advances, challenges and future. *Analytica Chimica Acta* 914, 7–16.
- Zhao, Y., Chen F., Li Q., Wang L., und Fan C. (2015). Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical Reviews* 115(22), 12491–12545.
- Zhou, C., Mu Y., Yang M.-c., Wu Q.-q., Xu W., Zhang Y., Jin W., Song Q., Wu Z.-y., und Jin Q.-h. (2013). Gold nanoparticles based colorimetric detection of target DNA after loop-mediated isothermal amplification. *Chemical Research in Chinese Universities* 29(3), 424–428.
- Zhu, Q., Gao Y., Yu B., Ren H., Qiu L., Han S., Jin W., Jin Q., und Mu Y. (2012). Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care. *Lab on a Chip* 12(22), 4755–4763.
- Zhu, Y., Green L., Woo Y.-M., Owens R., und Ding B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279(1), 69–77.

Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge

1. **J. Fischbach**, N. C. Xander, M. Frohme, und J. Glökler (2015) “*Shining a light on LAMP assays - A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine*”, **BioTechniques**, vol. 58, no. 4
2. **J. Fischbach**, Q. Loh, F. F. Bier, T. S. Lim, M. Frohme, und J. Glökler (2017) “*Alizarin red S for online pyrophosphate detection identified by a rapid screening method*”, **Scientific Reports** 7, 45085, doi:10.1038/srep45085
3. **J. Fischbach**, M. Frohme, J. Glökler (2017) “*Hinge-initiated primer-dependent amplification of nucleic acids (HIP) – a new versatile isothermal amplification method*”, **Scientific Reports** 7, 7683, doi:10.1038/s41598-017-08067-x

Konferenzbeiträge

1. **J. Fischbach**, S. Lehmann, R. Zieger und M. Frohme “*Etablierung und Optimierung eines schnellen molekularbiologischen Nachweises (LAMP) zur Detektion von Phytopathogenen*”, Vortrag auf dem **Deutschen Biosensorsymposium (DBS)** in Wildau, 2013
2. **J. Fischbach**, M. Frohme “*Use of simple isothermal assays for real-time and endpoint detection of phytopathogenic microorganisms*”, Vortrag auf dem **PhD Symposium für Bioelektrochemie und Bioanalyse** in Luckenwalde, 2014
3. **J. Fischbach**, M. Frohme, J. Glökler “*Use of simple isothermal assays for real-time and endpoint detection of phytopathogenic microorganisms*”, Postervorstellung auf dem **International Plant Protection Congress (IPPC)** in Berlin, 2015
4. **J. Fischbach**, Q. Loh, T. S. Lim, M. Frohme, J. Glökler “*Screening of natural compounds as alternative dyes for detecting pyrophosphate in biochemical reactions*”, Postervorstellung und Vortrag auf dem 9th Meeting **Engineering of Functional Interfaces (ENFI)** in Wildau, 2016

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel

Isothermale Amplifikationsmethoden für den DNA- und Pyrophosphat-abhängigen Pathogennachweis

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Stellen der Arbeit, die ich daraus dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich erkläre zudem, dass ich bisher keinen Doktorgrad erworben habe oder versucht habe zu erwerben.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam.

Potsdam, den 28.03.2017

Jens Fischbach.

Abbildungsverzeichnis

1	Grundbestandteile eines typischen diagnostischen Tests	7
2	Mechanismus der LAMP Reaktion (nicht-zyklisch)	10
3	Mechanismus der LAMP-Reaktion (nichtzyklisch)	11
4	Direkte Methoden für die Detektion der DNA	13
5	Indirekte Methoden für die Detektion von Pyrophosphat und H^+	15
6	Quantifizierung von Amplifikationsreaktionen	17
7	Zielstellung als Flussdiagramm	20
8	Datenanalyse der Echtzeit- LAMP	29
9	Vorlage zum Screening Metallionen-abhängiger Farbstoffe	33
10	Zusammensetzung einer Emulsion	34
11	Einfluss von Berberin auf die <i>Bst</i> DNA-Polymerase	38
12	Direkter Nachweis von PSTVd-cDNA in der LAMP	40
13	Indirekter Nachweis von PSTVd-cDNA in der LAMP	41
14	Absorptionsspektren und Fluoreszenzmessung von HNB	42
15	Etablierung der Echtzeitdetektion mit HNB	42
16	Echtzeit-LAMP Nachweis für Cms mit Berberin und HNB	44
17	Echtzeit-LAMP Nachweis für Xhp mit Berberin und HNB	44
18	Endpunkt-LAMP-Nachweis von Cms und Xhp	45
19	Zusammenhang zwischen Metallion, Pyrophosphat und Fluoreszenzfarbstoff	47
20	Selektivität von Mn^{2+} in Gegenwart von PPi oder dNTP	48
21	Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Farbstoffe unter LAMP-Bedingungen	49
22	Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Farbstoffe unter PCR-Bedingungen	50
23	Signal-Rausch-Verhältnis der Farbstoffe	51
24	Effekt von Mangan, Tetrazyklin und Alizarinrot S auf die DNA-Polymerasen	52
25	Anregungs- und Emissionsspektren von Calcein, Tetrazyklin und Alizarinrot S	52
26	Kombinatorisches Mikrotiterplatten-Screening unter simulierten LAMP-Bedingungen	54
27	Kombinatorisches Mikrotiterplatten-Screening unter simulierten PCR-Bedingungen	55
28	PPi-abhängige Fluoreszenzdetektion mit der Farbstoffen	57
29	Hellfeld-Mikroskopaufnahmen der Emulsion	58
30	Hellfeld-Mikroskopaufnahmen der Emulsion mit Emulgator	59
31	Fluoreszenz-Mikroskopie der Emulsionen mit DNA-interkalierenden Farbstoffen	60
32	PPi-abhängige Detektion in Emulsion	61
33	Struktur und Funktion des Hinge-Primer	62
34	Reaktionsmechanismus der HIP Amplifikation	64
35	Vergleich der LAMP und HIP	65
36	Variation der Hinge-Primer mit unterschiedlichen Modifikationen	66
37	Reaktionskinetik in Abhängigkeit der Hinge-Primer Kombinationen	68
38	Reaktionskinetik der Asymmetrischen HIP in Abhängigkeit der Produktlänge	69
39	Sensitivität der HIP mit genomischer DNA	70

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht isothermaler Amplifikationsreaktionen	8
2	PCR-Primer für PSTVd, Cms, Xhp und <i>E. coli</i>	22
3	LAMP-Primer für PSTVd, Cms und Xhp	23
4	Hinge-Primer für PSTVd und <i>E. coli</i>	24
5	Geräteliste	25
6	Konzentrationsbereiche für das Kombinatorische-Screening	33
7	Primer-Kombinationen für die HIP	37
8	Vergleich aller indirekten und direkten Detektionsmethoden für die LAMP	46
9	Untersuchte Konzentrationen für das kombinatorische Screening	53
10	Selektierte optimale Bedingungen nach dem Screening	56
11	Variation der Mg^{2+} -Konzentration	69

Anhang

Spezifischer PCR-Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) und *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp)

Die Lage der LAMP-Primer (F3,F2,Lf,F1,B1,Lr,B2 und B3) für Cms und Xhp sind in der Abbildung 40 dargestellt.

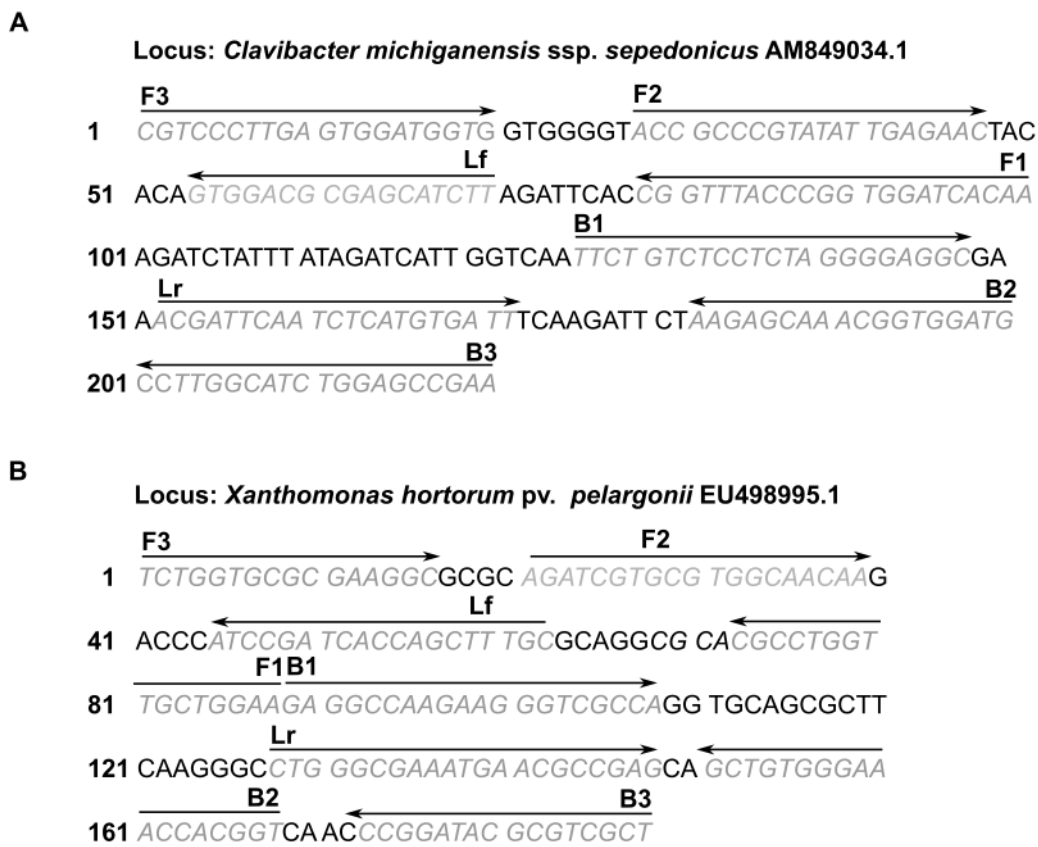


Abbildung 40: Loci für die LAMP-Primer von (A) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und (B) *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*

Die Spezifität der generierten LAMP-Primer wurde (Kapitel *in silico*) mit dem BLAST-Programm überprüft. Die Tabellen 12 und 13 zeigen die gefundenen Treffer (*hits*) für die Sequenzen der Hantel-Struktur (F2 bis B2) von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in der Datenbank als maximalen Score mit taxonomischer Auflistung. Diese Analyse kann die Untersuchung unter realen Amplifikationsbedingungen nicht ersetzen und dient nur als ergänzende Information. Die Spezifität der hier genutzten Primer-Sequenzen wurde in der Arbeit nicht weiter untersucht.

Tabelle 12: *In silico* Analyse der Spezifität der Loop-Struktur mit den LAMP-Primern (Tab. 3) für den Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* mittels BLAST gegen die nr-Datenbank. Die gefundenen Treffer sind als Taxonomie-Report dargestellt.

Organismus	BLAST Score
Bacteria	
..Microbacteriaceae	
...Clavibacter	
....Clavibacter michiganensis	
.....Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus	320
.....Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	313
.....Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis	307
.....Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus	307
.....Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis NCPPB 2581	307
.....Clavibacter michiganensis subsp. capsici	302
.....Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB 382	291
.....Clavibacter michiganensis subsp. tessellarius	135
...Clavibacter michiganensis	287
..Leifsonia aquatica	161
..Leifsonia poae	161
..Leifsonia naganoensis	161
..Leifsonia sp. 98AMF	152
..Leifsonia sp. 467MF	152
..Leifsonia sp. 21MFCrub1.1	152
..Leifsonia sp. 509MF	152
..Leifsonia sp. 157MF	152
..Leifsonia sp. 466MF	152
..Leifsonia sp. 197AMF	152
..Leifsonia xyli subsp. xyli	106
..Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07	106
..Leifsonia xyli	104
..Microbacterium sp. 1.5R	95.3
..Microbacterium sp. CGR1	95.3
..Aurantimicrobium minutum	91.6
..Microbacterium sp. R13	91.6
..Agrococcus carbonis	89.8
..Microbacterium sp. TPU 3598	84.2
..Microbacterium oxydans	84.2
..Rathayibacter tritici	82.4
..Leifsonia xyli subsp. cynodontis DSM 46306	80.5
..Leifsonia xyli subsp. cynodontis	80.5
..Leifsonia shinshuensis	80.5
..Microterricola viridarii	78.7
..Rathayibacter iranicus	76.8
..bacterium GI940	102

Tabelle 13: *In silico* Analyse der Spezifität der Loop-Struktur mit den LAMP-Primern (Tab. 3) für den Nachweis von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* mittels BLAST gegen die nr-Datenbank. Die gefundenen Treffer sind als Taxonomie-Report dargestellt.

Organismus	BLAST Score
Xanthomonas	
.Xanthomonas hortorum	
..Xanthomonas hortorum pv. pelargonii	274
...Xanthomonas hortorum pv. hederiae	252
..Xanthomonas hortorum pv. carotae	241
...Xanthomonas hortorum pv. vitians	241
..Xanthomonas hortorum pv. taraxaci	235
.Xanthomonas hortorum	252
.Xanthomonas gardneri	246
.Xanthomonas sp. 2009-274	246
.Xanthomonas cynarae	246
.Xanthomonas gardneri ATCC 19865	246
.Xanthomonas sp. Pam1A	244
.Xanthomonas sp. s8	241
.Xanthomonas sp. s3(2015)	241
.Xanthomonas sp. SUPP1529	241
.Xanthomonas sp. SUPP2985	241
.Xanthomonas sp.	235
.Xanthomonas sp. SUPP1030	235
.Xanthomonas fragariae	230
.Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	230
.Xanthomonas citri pv. anacardii	230
.Xanthomonas axonopodis pv. vignicola	230
.Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	230
.Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae	230
.Xanthomonas axonopodis pv. aurantifolii	230
.Xanthomonas axonopodis pv. vasculorum	230
.Xanthomonas sp. Pistachio PK2	230
.Xanthomonas sp. Pistachio PK3	230
.Xanthomonas bromi	230
.Xanthomonas vasicola	230
.Xanthomonas melonis	230
.Xanthomonas perforans	224
.Xanthomonas euvesicatoria	224
.Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10	224
.Xanthomonas campestris pv. raphani	224
.Xanthomonas axonopodis	224
.Xanthomonas campestris	224
.Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae LMG 695	224
.Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	224
.Xanthomonas oryzae pv. oryzicola BLS256	224
.Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A	224
.Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	224

Die Spezifität der in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurde sowohl für *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* als auch *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* mittels aus der Literatur bekannten spezifischen PCR-Primern überprüft. Gleichzeitig wurde damit auch die Sensitivität des PCR-Nachweis' bestimmt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und ergaben für Cms eine spezifische Bande bei 191 bp und für Xhp bei 197 bp. Die Abbildung 41 zeigt den Nachweis von Cms und Xhp mittels PCR als Kontrolle zu den LAMP-Reaktionen. Bei Cms wurde demnach eine Nachweisgrenze von $6,26 \times 10^2$ Kopien und bei Xhp von $5,29 \times 10^1$ Kopien bestimmt.

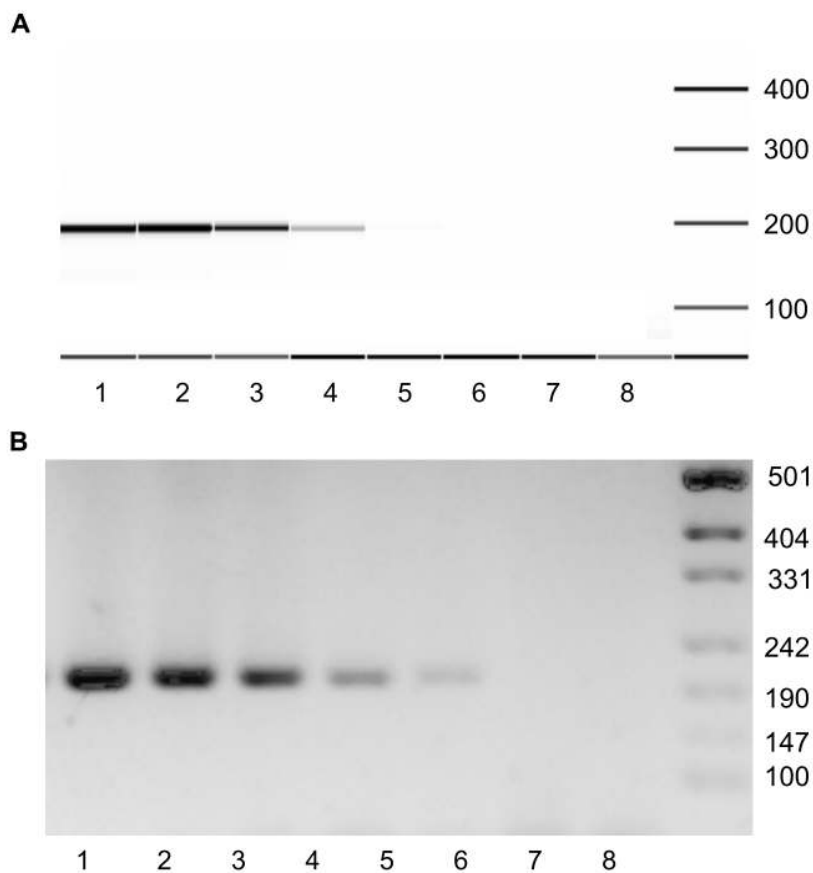


Abbildung 41: (A) PCR-Nachweis von Cms mit $6,26 \times 10^5$ (1), $6,26 \times 10^4$ (2), $6,26 \times 10^3$ (3), $6,26 \times 10^2$ (4), $6,26 \times 10^1$ (5) und $6,26 \times 10^0$ Kopien (6) sowie mit Wasser als Negativkontrollen (7 und 8). (B) PCR-Nachweis von Xhp mit $5,29 \times 10^6$ (1), $5,29 \times 10^5$ (2), $5,29 \times 10^4$ (3), $5,29 \times 10^3$ (4), $5,29 \times 10^2$ (5) und $5,29 \times 10^1$ Kopien (6) sowie Wasser als Negativkontrollen (7 und 8)

Echtzeitnachweis mit Hydroxynaphtholblau

Darstellung der möglichen Komplexierung von Magnesium mit Hydroxynaphtholblau und die daraus resultierende Cis-Trans-Änderung (Abb. 42). Die Komplexierung induziert möglicherweise die detektierte Fluoreszenz von HNB bei 625 nm nach Anregung bei 565 nm.

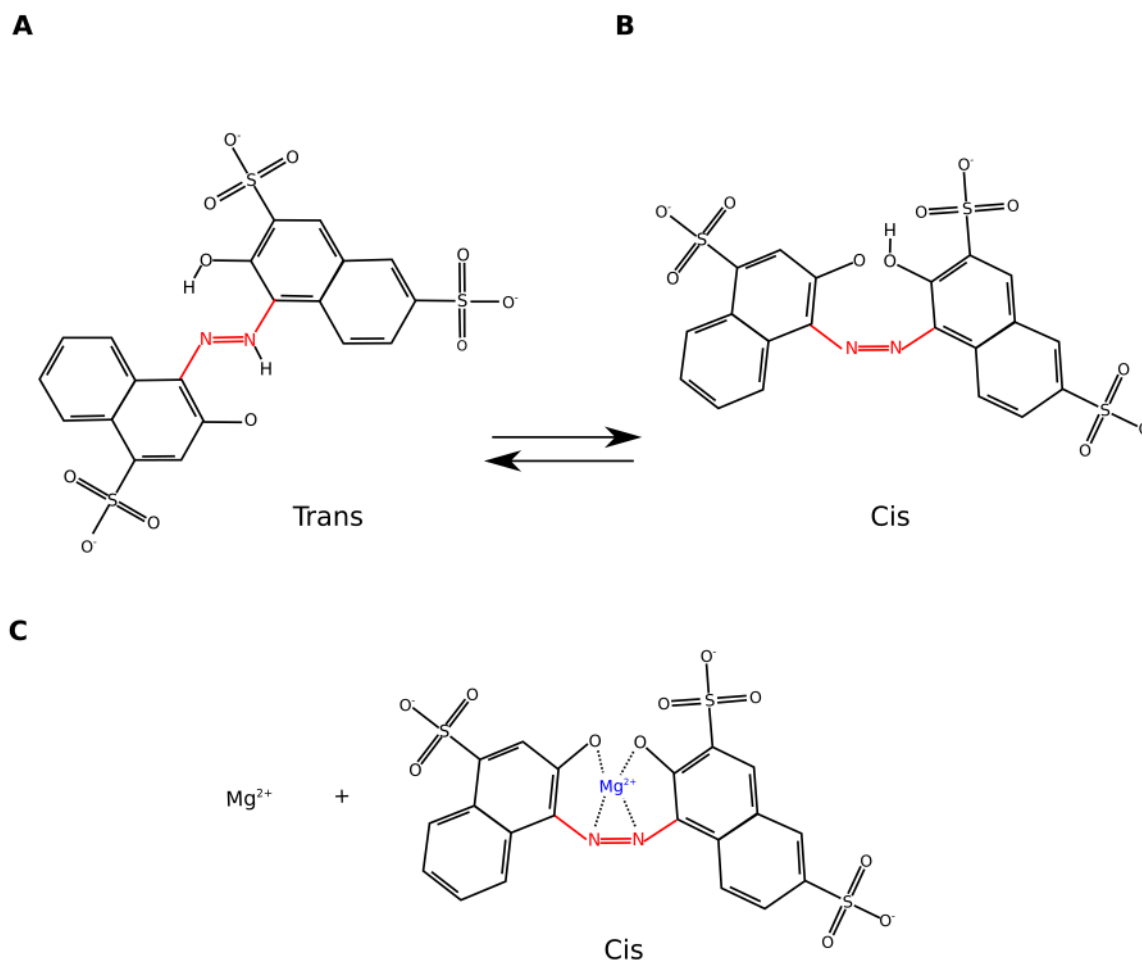


Abbildung 42: Strukturen des HNB als (A) Trans-Isomer und (B) Cis-Isomer . (C) Modell der Komplexierung von HNB mit Magnesium als Modell

Screening-Methode für die Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnis'

Das Flussdiagramm (Abb. 43) stellt die notwendigen Schritte für das Mikrotiterplatten-Screening zur Identifizierung von Metallionen-abhängigen Farbstoffen dar. Zu Beginn sollte die Anzahl der verfügbaren Farbstoffe reduziert werden, die in Abhängigkeit von divalenten Metallionen durch Komplexierung mit Pyrophosphat ihre spektralen Eigenschaften ändern könnten (1). Ein vorläufiges Screening mit den selektierten Farbstoffen unter reaktionsähnlichen Bedingungen kann die Zahl der Farbstoffe, die den gewünschten Effekt (Quenching oder Verstärkung) zeigen, zusätzlich einschränken (2). Die ausgewählten Komponenten sollten anschließend einzeln in unterschiedlichen Reaktionen auf inhibitorische Nebeneffekte untersucht werden (3). Um das Signal in Anwesenheit von Pyrophosphat zu verstärken, sollte mit den Komponenten ein kombinatorisches Screening im Mikrotiterplattenformat durchgeführt werden (4a und 5a). In Abhängigkeit des Probendurchsatz', des Volumens und der Kosten eines enzymatischen Tests, kann das Screening mit simulier-

ten oder direkt mit enzymatischen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden (4b und 5b). Das Screening mit enzymatischen Reaktionsbedingungen bedarf anschließend keiner weiteren Verifizierung. Die Messergebnisse können direkt als SNR mittels Heatmaps (Intensitätsplot) visualisiert werden. Wurde aus Kostengründen auf ein Screening unter enzymatischen Bedingungen verzichtet, müssen im Anschluss die besten Kombinationen der Simulation mit enzymatischen Reaktionen verifiziert werden (6).

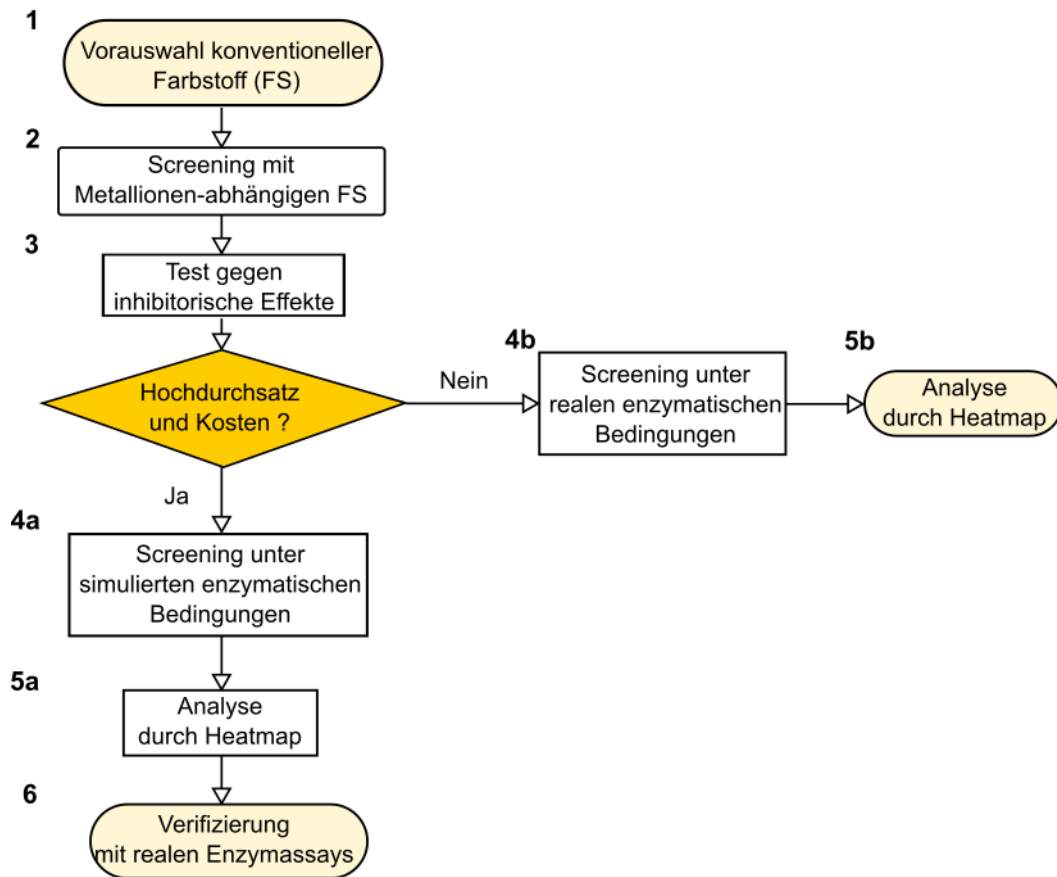


Abbildung 43: Ablaufplan zur Identifikation neuer Anwendungen für konventionelle Farbstoffe

Schmelztemperaturen der DNA-Duplex- und der Hairpin-Struktur mit dem LZ-HR-Hinge-Primer

Die thermodynamische Charakterisierung der Duplex- und Hairpin-Struktur in der HIP zeigen einen Unterschied von 5 °C in der Schmelztemperatur zwischen beiden Formen. Demnach ist die Hairpin-Struktur die stabilere DNA-Form und thermodynamisch unter den gegebenen Bedingungen bevorzugt.

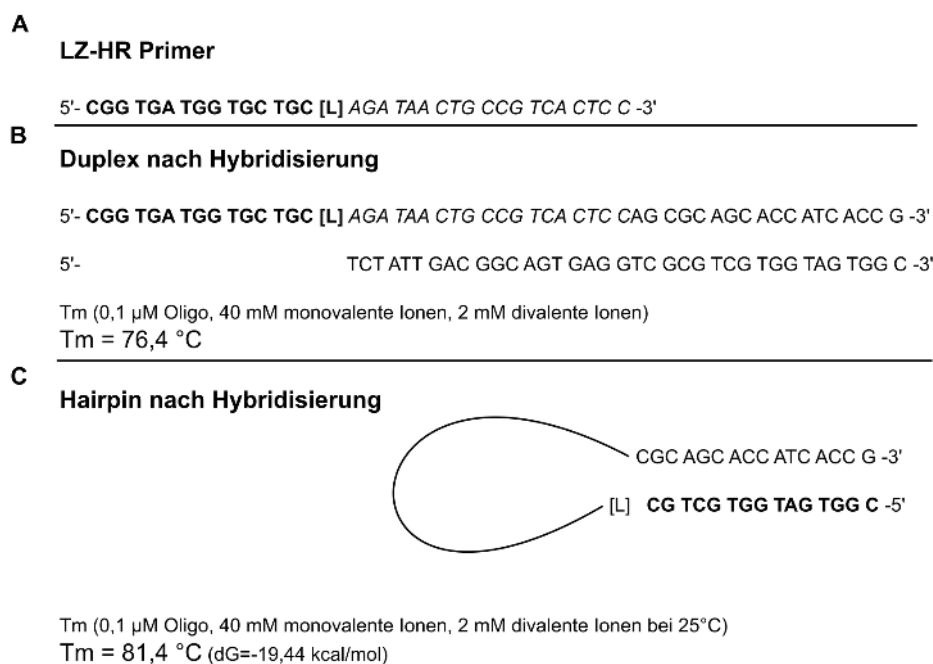


Abbildung 44: Thermodynamische Charakterisierung des Rückwärts Hinge-Primers für den Nachweis von *E. Coli* in der HIP. (A) Sequenz des Primers. (B) Duplex-Struktur nach der Hybridisierung des Hinge-Primers und Verlängerung durch die Polymerase. Die Schmelztemperatur beträgt hier 76,4 °C. (C) Hairpin-Struktur nach der Rückfaltung des Hinge-Primers. Die Schmelztemperatur beträgt hier 81,4 °C.

Einfluss der Primerkonzentration bei der HIP-Optimierung

Die Tabelle 14 zeigt die Daten aus der Analyse von unterschiedlichen Primerkonzentrationen auf die Reaktionskinetik der HIP.

Tabelle 14: Variation der Primerkonzentration in der HIP. Die Konzentration variiert zwischen 0,8 und 1,4 mM. Gezeigt sind die T_p-Werte in Minuten mit Standardabweichung (n=3). NA bedeutet keine Amplifikation.

Primer Kombination	Templa	Primerkonzentration [mM]			
		0,8	1,0	1,2	1,4
Hc-ecolLACz-F und Hc-ecolLACz-R	+	27 ± 3	25 ± 1	24 ± 1	23 ± 0
	-	47 ± 8	53 ± 5	45 ± 4	54 ± 2
Hc-ecolLACz-F und LZL-653 R	+	40 ± 1	41 ± 2	40 ± 2	37 ± 1
	-	NA	NA	NA	45 ± 12
LZL-389 F und Hc-ecolLACz-R	+	45 ± 1	40 ± 3	41 ± 1	38 ± 1
	-	NA	NA	NA	NA