

Methodensammlung der Bund/ Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Überprüfung der Spezies und Reinheit von Zelllinien mittels Multiplex PCR	AM027
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, Januar 2011	
Status: verabschiedet	

1 Zweck und Anwendungsbereich

Im Rahmen der Überwachung von gentechnischen Arbeiten und Anlagen gemäß GenTG ergibt sich die Fragestellung, ob die Angaben des Betreibers bezüglich der Spezies von Zelllinien zutreffend sind und ob die verwendeten Zellkulturen frei von kontaminierenden, artfremden Organismen sind.

Zur Identifikation der Spezies einer Zelllinie und zum Aufdecken von potenziellen Kreuzkontaminationen durch artfremde Linien wird ein nach Ono et al. [1] und Cooper et al. [2] modifiziertes Multiplex-PCR basiertes Nachweisverfahren eingesetzt.

Durch die beiden Multiplex-PCR-Ansätze ist es möglich, insgesamt acht verschiedene Organismenarten nachzuweisen. Im Einzelnen lassen sich durch die

- Multiplex-1-PCR Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen und Schwein und mit der
- Multiplex-2-PCR Afrikanische Grüne Meerkatze, syrischer Hamster und chinesischer Hamster

als Spezies der Zellkulturen identifizieren bzw. entsprechende Kreuzkontaminationen mit diesen Organismen feststellen.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren Band VI –Gentechnik aufgeführten Begriffe und Definitionen [3].

3 Kurzbeschreibung

Zur Identifikation der Spezies einer Zelllinie und zum Aufdecken von potenziellen Kreuzkontaminationen durch artfremde Linien wird ein modifiziertes Multiplex-PCR basiertes Nachweisverfahren nach Ono et al. [1] eingesetzt. Dabei werden speziesspezifische Fragmente der mitochondrialen DNA in einem zwischen dem Gen für das Cytochrom b und der Sequenz für die 16S ribosomale RNA gelegenen Bereich amplifiziert. Für die hier beschriebenen Methoden werden zusätzlich Primer aus der Veröffentlichung von Cooper et al. [2] genutzt. Diese sind die Primer für den Nachweis von Ratten-spezifischer DNA und die Primer für die Amplifikation der internen Kontrolle.

Die Multiplex-PCR-Analysen erfolgen grundsätzlich an Gesamt-DNA, die aus Zellpellets einer Zellkultur gewonnen wurden; eingeschränkt kann jedoch auch Gesamt-DNA aus dem Zellkulturüberstand verwendet werden.

3.1 Reagenzien

Es sind grundsätzlich für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien zu verwenden.

- H₂O (DNase frei)
- Multiplex PCR-Puffer (z.B. 5-fach Master Mix; New England Biolabs, NEB Best. Nr. M0284S)
- Oligonukleotide (siehe Tabelle 1)
- Chemikalien für die Gelelektrophorese (Agarose, Elektrophorese- Puffer, DNA-Marker etc.)

- PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,3 sterilfiltriert

Zusammensetzung 1x PBS:
 NaCl 138 mMol/l
 KCl 2,7 mMol/l
 Na₂HPO₄ 8 mMol/l
 KH₂PO₄ 1,5 mMol/l

Tabelle 1: Oligonukleotide

Multiplex-PCR	Name des Primers	Sequenz (5' - 3')
MP 1	Mito-HumanF	TATTGCAGCCCTAGCAGCACTCCA
	Mito-HumanR	AGAATGAGGAGGTCTGCGGC
	Mito-MausF	GCACTGAAAATGCTTAGATGGATAATTG
	Mito-MausR	CCTCTCATAAACGGATGTCTAG
	Ratte-F	CGGCCACCCAGAAGTGTACATC
	Ratte-R	GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG
	Mito-KaninchenF	CATGCAAGACTCCTCACGCCA
	Mito-KaninchenR	GGGCTTTCGTATATTCTGAAG
	Mito-PigF	CCTATATTCAATTACACAACCATGC
	Mito-PigR	GCGTGTGCGAGGAGAAAGGC
	Mito-IK-F	CGGGGAATYAGGGTTCGATTC
	Mito-IK-R	GCCTGCTGCCTTCCTTKGATG
MP2	Mito-AGM-F	CCAGAAGACCCACGATAACTCTCA
	Mito-AGM-R	TGTTAGCTCAAGGTAATCGAGTTGTAC
	Mito-syrHamsterF	GACCTCTTAGGTGTATTCCTAC
	Mito-syrHamsterR	GTATGAAGAAGGGGTAGAGCA
	Mito-chinHamsterF	CCGGCGTAAAACGTGTTATAGACT
	Mito-chinHamsterR	GTATTAGGTATAATATCGGCAGTC

Multiplex-PCR	Name des Primers	Sequenz (5' - 3')
	Mito-IK-F	CGGGGAATYAGGGTTCGATTC
	Mito-IK-R	GCCTGCTGCCTTCCTTKGATG

Für die beiden Multiplex-PCR-Ansätze werden gebrauchsfertige Primermischungen vorbereitet.

Primermischung für die Multiplex 1 PCR:

Gleiche Volumina der jeweiligen Arbeitslösung (20 µMol/l) der Primer:

- mito-HumanF
- mito-HumanR
- mito-MausF
- mito-MausR
- RatteF
- RatteR
- mito-KaninchenF
- mito-KaninchenR
- mito-PigF
- mito-PigR

und nur die 0,4-fache Menge der Arbeitslösung (20 µMol/l) der Primer für die interne Kontrolle

- mito-IK-F
- mitoIK-R

Primermischung für die Multiplex 2 PCR:

Gleiche Volumina der jeweiligen Arbeitslösung (20 µMol/l) der Primer:

- mito-AGM-F
- mito-AGM-R
- mito-syrHamsterF
- mito-syrHamsterR
- mito-chinHamF
- mito-chinHamR

und nur die 0,4-fache Menge der Arbeitslösung (20 µMol/l) der Primer für die interne Kontrolle

- mito-IK-F
- mitoIK-R

Positive Kontroll- DNA-Mischungen:

Die Positivkontrolle für jede Multiplex-PCR setzt sich aus einer Mischung gleicher Anteile von DNA Extrakten (jeweils 20 ngDNA/µl Arbeitslösung) der mit der jeweiligen Multiplex-PCR nachzuweisenden Spezies zusammen. Es dürfen ausschließlich DNA Extrakte aus vorher überprüften, reinen Referenzzelllinien verwendet werden.

3.2 Geräte und Hilfsmittel

- Mikroliter- Zentrifuge
- Mikroliter- Kolbenhubpipetten, verschiedene Volumina
- sterile aerosolgeschützte Einweg-Pipettenspitzen, verschiedene Volumina
- sterile Reaktionsgefäße: 1,5 ml sowie 0,2 ml PCR-Gefäße (DNase frei)
- Thermocycler (PCR-Gerät) mit Heizdeckel

- Gelelektrophorese und Geldokumentationssystem

4 Probenahme

Die Probenahme von Zelllinien in gentechnischen Anlagen soll eine für nachfolgende mikro- und molekularbiologische Untersuchungen geeignete Probe liefern, die der Überwachungsbehörde Aufschlüsse ermöglicht über die Nachvollziehbarkeit der Arbeiten und ihrer Sicherheitseinstufungen gegenüber den Angaben des Betreibers in den Aufzeichnungen.

Die zu beprobenden Zelllinien sollten in einer kleinen Zellkulturflasche (25cm²) ausgesät sein und am Tag der Probenahme möglichst zu ca. 60-80% konfluent gewachsen sein. Die Flasche sollte vor dem Transport vollständig mit Medium aufgefüllt und der Deckel mit Parafilm fest umwickelt werden.

Im Ausnahmefall können auch in Kryoröhrchen enthaltene Zelllinien als Proben genommen werden, der Transport erfolgt dann in Trockeneis.

Die Bezeichnung der Zelllinie, ggf. deren gentechnische Veränderungen und das verwendete Medium müssen dokumentiert werden.

5 Durchführung

5.1 Allgemeines

Bei Arbeiten mit Zellkulturen sind die besonders hohen Anforderungen an die Sterilität zu berücksichtigen. Alle Arbeiten werden, soweit dies möglich ist, unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Für die Durchführung der DNA-Extraktion und der PCR gelten die allgemeinen Hinweise und Anforderungen der amtlichen § 28b GenTG Methoden G 00.00-4 und G 00.00-5 [3].

5.2 Probenvorbereitung

Nach Probeneingang empfiehlt es sich, die Zelllinien zu mikroskopieren und möglichst fotografisch zu dokumentieren, da hierdurch teilweise bereits Kontaminationen, z.B. mit Hefen festgestellt werden können.

Soll die Zelllinie weiter kultiviert werden, so ist sie zu passagieren und neu auszusäen. Beim Passagieren wird nur ein Teil der abgelösten Zellen wieder ausgesät (1/5 bei 90% konfluenten Linien). Die aus der Passage übrig bleibenden Zellen werden als Zellpellet eingefroren.

Von den Zelllinien, die zum Zeitpunkt des Probeneingangs noch zu dünn gewachsen sind, wird das Medium bis auf 15 ml abgenommen und aufbewahrt (s.o.). Die Zellen werden bis zum Erreichen von 80- 90% Konfluenz inkubiert und dann weiter verarbeitet.

Ist keine weitere Kultivierung der Zelllinien vorgesehen, werden die 80- 90% konfluenten Zellen bei 200 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1,8 ml 1x PBS suspendiert, in ein beschriftetes Mikroliterreaktionsgefäß pipettiert und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 400 µl 1x PBS aufgenommen. Davon werden 200 µl für die DNA-Extraktion eingesetzt. Von Zelllinien, die in Suspension wachsen, werden bei entsprechender Dichte 3 ml abgenommen und in 10 ml Medium pipettiert. Die restliche Zellsuspension wird wie oben als Pellet für die DNA-Extraktion vorbereitet.

Bei Bedarf können die Zelllinien durch Einfrieren mit entsprechendem Medium und Lagerung über Flüssigstickstoff als Dauerkultur gelagert werden.

5.3 DNA- Extraktion

Zur Extraktion von genomischer DNA für die PCR- Analyse eignen sich beispielsweise kommerziell erhältliche DNA Extraktionssysteme (s. 6.3).

Für die PCR-Reaktionen werden die Konzentrationen der DNA Extrakte bestimmt und auf 20 ng DNA / μl eingestellt.

5.4 PCR

Das hier beschriebene Multiplex- Verfahren wurde mit dem NEB Multiplex PCR 5X Master Mix validiert. Alternativ können DNA-Polymerasen anderer Hersteller eingesetzt werden, wenn gezeigt wird, dass sie gleichwertig oder besser sind.

5.4.1 Reaktionsansatz

Für alle Ansätze eines Nachweises sollte vorab ein Mastermix hergestellt werden, der alle Reagenzien außer der Proben- und/oder Kontroll- DNA enthält.

Das Volumen der einzeln zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen und einem Überschuss von $\sim 5\%$. Bei mehr als drei PCR-Ansätzen wird generell zunächst ein Mastermix für alle Reaktionen (ohne die DNA-Proben) pipettiert, der dann auf die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße verteilt wird.

Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze beträgt 25 μl . Das Volumen des Reaktionsansatzes kann reduziert werden, wenn gezeigt wird, dass gleichwertige oder bessere Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Multiplex 1 PCR

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Proben- DNA oder Positivkontrolle	ca. 1 ng/ μl	1 μl
Multiplex PCR 5-fach Master Mix	1fach	5 μl
MP1 - Primer – Mix	0,4 $\mu\text{mol/l}$ je Primer bzw. 0,17 $\mu\text{mol/l}$ je IK Primer	5,4 μl
Reinstwasser	Ad 25 μl	13,6 μl

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Multiplex 2 PCR

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Proben- DNA oder Positivkontrolle (20 ng/ μl)	ca. 1 ng/ μl	1 μl
Multiplex PCR 5-fach Master Mix	1fach	5 μl
MP2 - Primer – Mix	0,4 μmol je Primer bzw. 0,17 μmol je IK Pri- mer	3,4 μl
Reinstwasser	Ad 25 μl	15,6 μl

Kurzbeschreibung der Vorgehensweise:

- Master-Mix pipettieren und gut mischen.
- Je 24 μl Master-Mix in die PCR-Reaktionsgefäße vorlegen.
- Je 1 μl der Proben- DNA bzw. der Kontrollen dazu geben.

5.4.2 Temperatur-Zeit-Programm

Für die hier beschriebenen Multiplex-PCR Verfahren hat sich das in Tabelle 4 angegebene Temperatur-Zeit-Programm bei Verwendung verschiedener Thermocycler (z.B. Biometra, Life Technologies - Applied Biosystems, Eppendorf) im Ringversuch bewährt.

Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm

Schritt	Parameter	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	95 °C		1
2				
3	Amplifikation	95 °C	20 s	35
4		63 °C	1 min	
5		68 °C	1 min	
6	Finale Elongation	68 °C	5 min	1
7	Lagerung	10 °C		1

Hinweis: Die Zykluszeiten für Denaturierung und Annealing im Amplifikationsschritt müssen ggf. angepasst, d.h. je nach Typ des Thermocyclers verändert werden.

5.4.3 Mitzuführende Kontrollen

In jeder Analysenreihe sind die in der amtlichen § 28b GenTG Methode G 00.00-5 [3] aufgeführten Kontrollen mitzuführen.

Für die Positivkontrollen eignen sich DNA Mischungen, die alle nachzuweisenden Spezies enthalten. Diese DNA Extrakte können beispielsweise aus vorher überprüften Referenzelllinien stammen.

5.4.4 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PCR-Amplifikate werden 10 µl jedes PCR- Ansatzes auf ein 2 %- iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der PCR- Fragmente wird mittels Anfärbung durch einen Fluoreszenzfarbstoff fotografisch dokumentiert.

Alternative Verfahren sind einsetzbar, wenn gezeigt wird dass die Ergebnisse gleichwertig oder besser sind.

5.5 Auswertung der Multiplex-PCR-Reaktionen

Durch einen Vergleich der Banden der mitgeführten Positivkontrollen mit denen der untersuchten Proben können die Spezies bestimmt bzw. artfremde Beimischungen festgestellt werden.

Tabelle 5: Übersicht über die erwarteten Fragmentgrößen

Primerpaar	Nachweis	Amplifikationsort	Fragmentgröße in bp	MP-PCR
mitoHumanF / mitoHumanR	Mensch	Cytochrom b	441	MP1
mitoMausF / mitoMausR	Maus	Phenylalanin Transfer RNA → 12S ribosomale RNA	948 (z.T. eine schwache 170 bp Bande)	MP1
RatteF / RatteR	Ratte	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1	196 (z.T. eine schwache zusätzli- che 300 bp Bande)	MP1
mitoKaninchenF / mitoKaninchenR	Kaninchen	12S ribosomale RNA	704	MP1
mitoPigF / mitoPigR	Schwein	12S ribosomale RNA → 16S ribosomale RNA	819	MP1
mitoAGM-F / mitoAGM-R	African green mon- key	12S ribosomale RNA → 16S ribosomale RNA	301	MP2
mitosyrHamsterF / mitosyrHamsterR	syrischer Hamster	Cytochrom b	245	MP2
mitochinHamF / mitochinHamR	chinesi- scher Hamster	12S ribosomale RNA → 16S ribosomale RNA	601	MP2
Mito-IK-F / Mito-IK-R	Interne Amplifikati- onkontrolle	18S rRNA	70	MP1 bzw. MP2

6 Leistungsmerkmale der Methode

6.1 Spezifität

Ono et al. zeigen, dass die Primerpaare zum Nachweis von Mensch, Maus, syrischem Hamster, chinesischem Hamster und Schwein speziesspezifisch nur mit DNA der jeweiligen Spezies reagieren.

Bei Proben der afrikanischen grünen Meerkatze wurde beobachtet (GAA Hildesheim), dass bei der Multiplex-PCR 1 durch die Primer RatteF/ RatteR (nach Cooper et al.) in Höhe der rattenspezifischen Bande teilweise Fragmente erzeugt wurden (falsch positiv). Deshalb dürfen bei Zelllinien der afrikanischen grünen Meerkatze diese Fragmente nicht ohne weitere Überprüfung durch zusätzliche rattenspezifische PCR-Reaktionen (z.B. nach [5]) als Kreuzkontamination interpretiert werden.

Im Rahmen der laborinternen Validierung und der Überwachung wurden über 300 Zelllinien der Spezies Mensch, Maus, Ratte, afrikanische grüne Meerkatze, syrischer Hamster, chinesischer Hamster, Kaninchen, Hund, Schwein, Rind, Wachtel und Ente erfolgreich mit den beiden Multiplex-PCR-Verfahren auf Identität bzw. auf Reinheit untersucht (GAA Hildesheim).

6.2 Nachweisgrenze der Multiplex PCR

Ono et al. berichten detailliert über die Nachweisgrenzen der verwendeten Primer. Danach sollten 10 pg DNA oder mehr für den singulären Nachweis mit einem Speziesspezifischen Primerpaar vorhanden

sein und 100 pg oder mehr für die Multiplex-Reaktion. Die Sensitivität der Multiplex-PCR ist etwa um den Faktor 10 geringer als der Einzel-PCR-Nachweis.

Detaillierte Nachweisgrenzen für Mischungen unterschiedlicher Spezies sind bei Ono et al. beschrieben, können aber wegen der eingeführten Modifikationen nicht ohne weiteres auf diese Methode übertragen werden.

In laborinternen Validierungsstudien (GAA Hildesheim) wurden die Nachweisempfindlichkeiten der Multiplex-PCR in DNA Mischungen verschiedener Spezies überprüft. In Maus:Mensch, Mensch:Maus, Maus:Ratte und Ratte:Maus Mischungen wurden jeweils beide speziesspezifischen Fragmente bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:400 deutlich erkennbar amplifiziert. In Ratte:Mensch Mischungen waren beide speziesspezifischen Fragmente sogar bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:1000 deutlich erkennbar.

Bei einer angenommenen Größe von ca. 3,3 Mrd Bp für ein haploides Säuger genom wurden im Ringversuch noch 60 Genomkopien in Mischungen nachgewiesen.

Erfahrungsgemäß reichen diese Nachweisgrenzen in der Praxis aus, um Vermischungen verschiedener Zellkulturspezies nachweisen zu können.

6.3 Ringversuch

Im Oktober 2009 wurde die Methode „Überprüfung der Spezies und der Reinheit von Zelllinien mittels Multiplex PCR“ in einem Ringversuch des Unterausschuss Methodenentwicklung der Bund/ Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik überprüft (Koordination: Niedersachsen; finanzielle Unterstützung: BVL). An dem Ringversuch nahmen neun bundesdeutsche Laboratorien (7 Labore aus der Überwachung, 2 Labore aus der Forschung) und ein Labor aus der Schweiz teil.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Proben wurden folgende Zelllinien verwendet: Mensch (HELA), Maus (NIH 3T3), Ratte (OLN 93), chinesischer Hamster (CHO), AGM (COS-7). Aus Zellpellets dieser Zelllinien wurde die genomische DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden # 51304) isoliert, photometrisch quantifiziert und auf 20 ng/µl eingestellt. Anschließend wurden Mischungen der DNA der entsprechenden Spezies hergestellt.

Jeder Teilnehmer erhielt 16 unbekannte DNA Proben (20 ng/ µl; je 20 µl), 2 Positivkontrollen und eine Negativkontrolle, sowie Multiplex PCR 5-fach Master Mix (NEB) und die gebrauchsfertigen Primermischungen für die durchzuführenden PCR-Reaktionen.

- Probe A: Mensch + Maus (100 : 1)
- Probe B: Mensch + Ratte (100 : 1)
- Probe C: Mensch + chin.Hamster (100 : 1)
- Probe D: Mensch + Maus (1 : 100)
- Probe E: Mensch + Ratte (100 : 1)
- Probe F: Mensch + Maus (100 : 1)
- Probe G: Mensch + chin. Hamster (100 : 1)
- Probe H: Mensch + Ratte (1 : 100)
- Probe I: Mensch + Ratte (1 : 100)
- Probe K: Mensch + Maus (1 : 100)
- Probe L: Mensch + chin. Hamster (1 : 100)
- Probe M: Mensch + chin. Hamster (100 : 1)
- Probe N: Mensch
- Probe O: chin. Hamster
- Probe P: Maus
- Probe Q: Ratte
- Probe R: MP1 Kontrolle (Mensch + Maus + Ratte + Kaninchen + Schwein)

Probe S: MP2 Kontrolle (African Green Monkey + syr. Hamster + chin. Hamster)

Probe T: NEK

Die Teilnehmer des Ringversuches führten mit allen Proben und Kontrollen insgesamt sechs verschiedene PCR-Reaktionen mit den verschickten Primermischungen durch, die nachfolgend im Einzelnen aufgeführt sind:

PCR 1 Multiplex 1 PCR mit Primern für alle Spezies der MP1

PCR 2 Multiplex 2 PCR mit Primern für alle Spezies der MP2

PCR 3 Einzel-PCR mit humanspezifischen Primern

PCR 4 Einzel-PCR mit mausspezifischen Primern

PCR 5 Einzel-PCR mit rattenspezifischen Primern

PCR 6 Einzel-PCR mit für chinesischen Hamster spezifischen Primern

Die Endkonzentration der speziesspezifischen Primer betrug jeweils 0,4 µmol/l je Primer. In allen Primermischungen waren zusätzlich die Primer für die interne Amplifikationskontrolle (0,17 µmol/l) enthalten.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der einzelnen PCR-Reaktionen zusammengefasst dargestellt:

Tabelle 6: Ringversuchsergebnisse der MP1 und MP2 PCR (PCR 1 und PCR2)

Ringversuchsergebnisse	MP1 PCR (PCR 1)	MP2 PCR (PCR 2)
Anzahl teilnehmender Laboratorien	10	10
Anzahl Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	9	9
Anzahl Laboratorien, deren Ergebnisse angenommen wurden	8*	8*
Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	128	128
Gesamtanzahl untersuchter Mischproben	96	96
Gesamtanzahl untersuchter Einzelproben	32	32
Gesamtanzahl falsch positiver Mischproben	0	0
Gesamtanzahl falsch negativer Mischproben	0	0
Gesamtanzahl falsch positiver Einzelproben	0	0
Gesamtanzahl falsch negativer Einzelproben	0	0

* Ein Labor wurde nicht in diese Auswertung der PCR 1 bis 6 einbezogen, da es technische Probleme bei der Durchführung der Versuche gab.

Tabelle 7: Ringversuchsergebnisse der spezifischen Einzel-PCRs (PCR 3 bis PCR 6)

Ringversuchsergebnisse	Human spezifische PCR (PCR 3)	Maus-spezifische PCR (PCR 4)	Ratten-spezifische PCR (PCR 5)	chinesische Hamster-spezifische PCR (PCR 6)
Anzahl teilnehmender Laboratorien	10	10	10	10
Anzahl Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	9	9	9	9

Ringversuchsergebnisse	Human spezifische PCR (PCR 3)	Maus-spezifische PCR (PCR 4)	Ratten-spezifische PCR (PCR 5)	chinesische Hamster-spezifische PCR (PCR 6)
Anzahl Laboratorien, deren Ergebnisse angenommen wurden	8*	8*	8*	8*
Gesamtzahl angenommener Ergebnisse	128	128	128	128
Gesamtanzahl untersuchter positiver Mischproben	96	32	32	32
Gesamtanzahl untersuchter positiver Einzelproben	8	8	8	8
Gesamtanzahl untersuchter negativer Einzelproben	24	24	24	24
Gesamtanzahl untersuchter negativer Mischproben	0	64	64	64
Gesamtanzahl falsch positiver Mischproben	0	0	0	0
Gesamtanzahl falsch negativer Mischproben	0	0	4 (2)	1
Gesamtanzahl falsch positiver Einzelproben	2	0	0	0
Gesamtanzahl falsch negativer Einzelproben	0	0	0	0

Die falsch negativen (PCR 5 und 6) bzw. falsch positiven (PCR 3) Ergebnisse wurden alle durch ein einziges Labor verursacht. In Klammern ist das Ergebnis der Wiederholung der Untersuchung durch das betreffende Labor angegeben.

6.4 Bewertung der im Ringversuch getesteten Nachweismethode

Im Ringversuch wurden alle Proben ohne Zumischung von allen acht Laboren mittels Multiplex-PCR und von sieben Laboren auch mittels Einzel-PCR richtig erkannt. Auch die Mischproben wurden von allen Laboren mittels Multiplex-PCR und Einzel-PCR richtig erkannt.

Ein Labor berichtete in einigen Einzel-PCR Nachweisen falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse: 2 falsch positive bei PCR 3 Human (Probe P, Q); 4 (2) falsch negative bei PCR 4 Ratte (Probe H, I) und 1 falsch negativ bei PCR 6 Hamster (Probe G).

Zusammenfassend wurden folgende Auffälligkeiten im Ringversuch festgestellt:

Bei Überschuss an Ratten-DNA tritt häufig in der MP1-PCR bei 300 bp eine zusätzliche Bande auf; dieser auch in der Literatur beschriebene Befund ist jedoch unproblematisch, da in diesem Bereich keine spezifische Bande zu erwarten ist.

Einige Labore konnten die interne Kontrolle in den Multiplex-PCR's nicht von den Primerdimeren abtrennen; dies kann durch laborinterne Optimierung der Laufbedingungen der Elektrophorese gelöst werden, ist aber unproblematisch, sofern noch eine zusätzliche PCR-Amplifikationskontrolle durchgeführt wird.

In einem Labor wurden mit der MP2-Kontrolle in einigen PCR-Reaktionen unspezifische Signale erhalten. Diese Beobachtung wurde vorab auch in der Routine hin und wieder festgestellt, sie scheint im Zusammenhang mit der DNA und den Primern der Afrikanischen Grünen Meerkatze zu stehen (s. auch Ono et al.).

Erfahrungsgemäß erzeugen einige Proben mit DNA der Afrikanischen Grünen Meerkatze auch ein PCR Artefakt beim MP1 Ansatz, der auf der Höhe der spezifischen Ratten-Bande lokalisiert ist, und so ggf. zu einer Falschinterpretation führen könnte.

Mittels Multiplex-PCR nachgewiesene Verunreinigungen müssen grundsätzlich nachfolgend durch andere Methoden, z.B. spezifische Einzel-PCRs bestätigt werden [z.B. nach [5]].
Es wird empfohlen spezifische Einzel-PCR Verfahren mit PCR-Standardverfahren durchzuführen, da bei Verwendung des Multiplex-Puffers unspezifische Banden in den Einzel-PCR's zunehmen können.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Ringversuch gezeigt hat, dass die Multiplex-PCR Methode für die routinemäßige Überprüfung von Zellkulturen auf Identität und Reinheit im Rahmen der Gentechniküberwachung ein gut geeignetes, spezifisches und ausreichend empfindliches Verfahren ist.

7 Schrifttum

[1] Ono, K., Satoh, M., Yoshida, T., Ozawa, Y., Kohara, A., Takeuchi, M.; Mizusawa, H., Sawada, H. (2007): Species identification of animal cells by nested PCR targeting to mitochondrial DNA. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* 43: 168-175

[2] Cooper et al. (2007): Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007 Nov-Dec;43(10):344-51

[3] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG G00.1 – G00.5

Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Gentechniküberwachung;
Allgemeine Hinweise und Anforderungen
Begriffe
Allgemeine Hinweise und Anforderungen an die Nukleinsäureextraktion
Allgemeine Hinweise und Anforderungen an Verfahren zum Nachweis von
Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Allgemeine Hinweise und Anforderungen an die Probenahme

[4] New England Biolabs: Produktbeschreibung des Multiplex PCR 5X Master Mixes

[5] Steube, K. G., Meyer, C. Uphoff, C. C., Drexler, H. G.(2003): A simple method using β -globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines – a progress report. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Animal* 39: 468-475