

Werkinstructie voor het bepalen van de reinheid en identiteit van genetisch gemodificeerde organismen en de hierbij gebruikte vectoren en inserties

Introductie

Het doel van deze instructie is vast te leggen wanneer en hoe de reinheid en identiteit van genetisch gemodificeerde organismen (ggo), o.a. *E. coli* K12 stammen, vastgesteld wordt. Daarnaast wordt aangegeven hoe de DNA constructen voor het maken van genetisch gemodificeerde organismen worden geïdentificeerd. De resultaten worden vastgelegd in het labjournaal van de onderzoeker.

Deze activiteiten zijn vereist op grond van hoofdstuk 2, artikel 9, lid 3d van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Immers de voor deze werkzaamheden verkregen vergunning/kennisgeving van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW), Bureau GGO, inclusief inschaling van het toe te passen fysische inperkingsniveau, is gebaseerd op de opgegeven host, vector, insert en origin insert.

Werkwijze

1. Identiteit van *E.coli* K12 stammen

1.1. Commercieel verkregen bacteriën

- Controleer het certificaat dat bij de cellen geleverd wordt
- Noteer het lotnummer van de batch in het labjournaal bij opslag van de cellen.
- Vries de cellen eventueel in porties in (bij herhaald ontdooien verliezen de cellen hun competentie; bij langdurig kweken bestaat er een grotere kans op mutaties).
- Noteer bij gebruik van de cellen het lotnummer in het labjournaal.

1.2. Zelf geïsoleerde of van collega's verkregen bacteriën

- Toets voorafgaand aan het invriezen in kleine porties de juistheid en reinheid van de cellen volgens de onderstaande methoden en gebruik iedere keer een nieuwe portie.
- *E. coli* stammen kunnen van andere gramnegatieve, staafvormige bacteriën onderscheiden worden d.m.v. een PCR test. Raadpleeg hiervoor de afdeling Medische Microbiologie Infectieziekten en Infectiepreventie, MUMC+.
- Onderscheid tussen *E. coli* K12 stammen en wildtype *E. coli* stammen (die potentiële pathogeen zijn voor de mens en dus onder ML-II condities behandeld zouden moeten worden) kan worden gemaakt d.m.v. een multiplex-PCR-test. Ook hier geldt: bij twijfel: neem contact op met de afdeling Medische Microbiologie Infectieziekten en Infectiepreventie, MUMC+.
- Bestel in geval van twijfel aan de reinheid van de cellen een nieuwe batch en herhaal bovenstaande.

2. Identiteit van cellen

- Beoordeel de groeikarakteristieken van de cellen onder de microscoop aan het begin van de experimenten en bij elke kweek
- Eukaryoten cellen zijn verder te onderscheiden door de morfologie, kleuringen m.b.v. antilichamen, FACS analyse en PCR.

3. Identiteit van genetisch gemodificeerde knaagdieren

- Bepaal de juistheid van de modificatie m.b.v. genotypering

4. Identiteit van vectoren en inserties

- Bepaal de identiteit en de integriteit van de vector en het insert d.m.v. sequencing, restrictie-analyse, gel-electroforese en PCR. De beste controle gebeurt d.m.v. sequencing.

Afkortingenlijst

BVF	Biologische veiligheidsfunctionaris
GGO	Genetisch Gemodificeerd Organisme
IenW	Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
ML-II	Microbiologisch Laboratorium klasse II
MUMC+	Maastricht Universitair Medisch Centrum+
PCR	Polymerase Chain Reaction

Referenties

- KNVM: Veilig werken met micro-organismen, ISBN number: 978-90-825105-0-8
- AP Bauer et al. Rapid identification of E. coli safety and laboratory strain lineages based on Multiplex-PCR. FEMS Microbiol Lett 269, 2007, 36-40.
- Bij de afdeling Medische Microbiologie Infectieziekten en Infectiepreventie, MUMC+, kan altijd om advies worden gevraagd wanneer je een sample hebt gekregen waarvan je de identiteit niet precies kent.
- Besluit en Regeling genetische gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, IenW april 2014.
- [Website HSB Maastricht](#)

Inlichtingen

Voor meer informatie kunt u terecht bij de [BVF](#).