

## **Mynox<sup>®</sup> Mykoplasmen-Eliminierungsreagenz: Anwendung im Detail**

Information der Biochrom AG

Mykoplasmen beeinträchtigen die Zellproliferation erheblich durch Nährstoffkonkurrenz und zelltoxische Ausscheidungen. Positiv getestete Kulturen müssen häufig verworfen werden, da Behandlungen mit Antibiotika meist zu aufwändig sind und der Erfolg unsicher ist. Zur Beseitigung solcher Kontaminationen eignet sich die Mynox<sup>®</sup> Eliminierungs-Reagenz. Mynox<sup>®</sup> wirkt biophysikalisch und tötet Mykoplasmen zuverlässig ab. Es beeinflusst nicht die Eigenschaften der Zellen.

Mynox<sup>®</sup> wirkt schnell und muss nur einmalig angewendet werden. Eine Behandlung dauert ca. eine Stunde. Danach wird Mynox<sup>®</sup> durch Mediumwechsel bzw. Verdünnung entfernt. Die Erfolgsrate für eine dauerhafte Mykoplasmen-Eliminierung liegt bei über 90 Prozent.

### **1 Anwendungsgebiet und Wirkungsprinzip**

Mit Mykoplasmen infizierte Zellen werden üblicherweise mit Standardantibiotika behandelt. Die Effizienz dieser Antibiotikabehandlungen ist meist unzureichend. Die eingesetzten Wirkstoffe hemmen nur das Wachstum von Mykoplasmen, zerstören die Parasiten jedoch nicht direkt und bewirken somit in der Regel keine vollständige und damit längerfristige Dekontamination der Zellkultur. Deshalb werden hohe Antibiotikakonzentrationen über einen längeren Zeitraum angewendet, die toxisch auf die Zellen wirken und die Entwicklung von resistenten Mykoplasmenstämmen fördern.

Mynox<sup>®</sup> (Kat. Nr. W 10-0200/0500/1000) ist ein Reagenz zur dauerhaften Eliminierung von Mykoplasmen und Acholeplasmen in Zellkulturen, Virussuspensionen und anderen biologischen Agenzien. Der aktive Wirkstoff ist ein in PBS gelöstes Biotensid, das direkt zur kontaminierten Zell- oder Viruskultur gegeben wird. Dieser Wirkstoff zeigt eine hohe Affinität zur Mykoplasmenmembran. Im Gegensatz zu anderen Prokaryonten besitzen Mykoplasmen keine Zellwand, sondern sind von einer Lipidmembran umgeben. Durch die Wechselwirkung von Mynox<sup>®</sup> mit dieser Lipidmembran werden Permeabilitätsveränderungen induziert. Die Mykoplasmenmembran platzt innerhalb von Minuten an einigen Stellen auf und durch Osmolyse kommt es zur vollständigen Zerstörung der Mykoplasmen. Die eukaryontische Zelle wird erst bei deutlich höheren Wirkstoffkonzentrationen beeinflusst.

Durch die dauerhafte Eliminierung der Mykoplasmen finden die behandelten eukaryontischen Zellen schnell zu ihrem natürlichen Metabolismus und zu normalen Proliferationsraten zurück. Bis jetzt konnte keine dauerhafte Veränderung des natürlichen Zellmetabolismus durch die Behandlung mit Mynox<sup>®</sup> gefunden werden.

## 2 Reagenzien und Materialien

### 2.1 Inhalt der Packung

Mynox<sup>®</sup> Reagenz:

- gebrauchsfertig
- steril
- in phosphatgepufferter Saline (pH 7,4)
- aliquotiert á 220 µl

### 2.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Mynox<sup>®</sup> kann bei Raumtemperatur versendet und bei +2 °C bis +8 °C ungeöffnet langfristig gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Box- und dem Tünetikett angegeben.

### 2.3 Zusätzlich benötigtes Material

- übliche Ausstattung eines Zellkulturlabors
- sterile Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen
- Zellkulturmedium, fötales Kälberserum (FBS), PBS, Trypsin
- kleine Kulturschalen (z.B. TPP-Zellkulturschalen Kat. Nr. P 93060, Durchmesser 6 cm)
- sensitiver Mykoplasmentest zur Überprüfung des Eliminierungserfolges (z.B. Venor<sup>®</sup> GeM Mycoplasma PCR Detektionskit, Kat. Nr. W 11-1025/1050/1100/1250)

## 3 Probenmaterial

### 3.1 Die Bedeutung der Serumkonzentration

Mynox<sup>®</sup> adsorbiert an Lipid- und Proteinbestandteilen des Serumzusatzes. Dadurch verringert sich mit steigender Serumkonzentration im Eliminierungsansatz die Anti-Mykoplasmenwirkung von Mynox<sup>®</sup>.

Die hier beschriebenen Behandlungsprotokolle gehen von einer Konzentration an fötalem Kälberserum von 5 % (v/v) im Ansatz aus. Die Art des verwendeten Zellkulturmediums (z.B. DMEM, RPMI 1640) hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg. Bei der Behandlung von Viren sollte auf die Verwendung von Serum als Zusatz zum Eliminierungsansatz verzichtet werden.

### 3.2 Grenzen von Mynox®

Grundsätzlich treten Mykoplasmen in Zellkulturen extrazellulär auf. In der Literatur wird *Mycoplasma penetrans* als zellinvasive Mykoplasma-Spezies beschrieben. Mynox® benötigt zur Wirkungsentfaltung den direkten Kontakt zum Mykoplasma-Partikel. Eine Behandlung von zellinvasiven Mykoplasmen mit Mynox® würde nicht erfolgreich sein. Bisher wurde *Mycoplasma penetrans* nicht als Kontaminante in Zellkulturen gefunden.

Mykoplasmen können nach einer Behandlung erneut aufkommen, wenn sie sich in den interzellulären Räumen oder in unzugänglichen Bereichen der Zellmembran der Einwirkung von Mynox® entziehen. Daher ist darauf zu achten, dass für die Behandlung Einzelzellen eingesetzt werden. In einigen der hier beschriebenen Eliminierungsansätze wird Trypsin zur Glättung und Trennung der miteinander adhärierenden Zellen angewandt.

Mit steigender Serumkonzentration wird die Aktivität von Mynox® abgepuffert. Die Behandlung von biologischen Agenzien mit hohen Protein- und Lipidkonzentrationen ist daher nicht möglich.

### 3.3 Zytotoxizität von Mynox®

Vergleichbar mit anderen Produkten zur Mykoplasmenbekämpfung ist auch Mynox® nicht frei von toxischen Einflüssen auf das zu behandelnde Zell- und Virusmaterial. Die Protokolle des Herstellers wurden an einer Vielzahl von Zelllinien und Viruskulturen getestet. In Abhängigkeit von der Sensitivität der einzelnen Zelllinie ergab sich ein Verlust an vitalem Zellmaterial von 10 bis 80 %. In allen Fällen verblieben nach der Behandlung ausreichend Zellen, um nach nur kurzer Kultivierung wieder hohe Dichten zu erreichen.

## 4 Behandlung

Die hier beschriebenen Anwendungen wurden an weit verbreiteten Zelllinien unter Verwendung von standardisierten Kulturmedien erprobt. Aufgrund der Vielzahl möglicher Anwendungen von Mynox® können in dieser Arbeitsanleitung nicht alle Anwendungsmöglichkeiten beschrieben werden. Eine individuelle Anpassung der Arbeitsanleitungen kann notwendig werden. Bei Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

### 4.1 Adhärenz Zellen

#### 4.1.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes

In einer sterilen Kulturschale mit 6 cm Durchmesser (keine Zellkulturflasche!):

1. 2,8 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FBS und 200 µl Mynox® (1 Röhrcheninhalt) mischen
2. 2 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FBS und  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  frisch trypsinierten Zellen hinzugeben, die Pipettenspitze dabei in den Eliminierungsansatz eintauchen.
3. Das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 5 ml.

(siehe Schema nächste Seite)



Es müssen Einzelzellen eingesetzt werden (am Mikroskop überprüfen!); ggf. muss die Dauer der Trypsineinwirkung verlängert oder Zellklumpen mechanisch, z.B. mittels einer Pipette durch wiederholte Aufnahme und Abgabe, gelöst werden.

Das Mynox<sup>®</sup>-Kulturmedium-Gemisch, der sog. Eliminierungsansatz, muss immer vorgelegt und das Zellmaterial direkt in den Eliminierungsansatz pipettiert werden (Pipettenspitze eintauchen!). Eine direkte Zugabe von Mynox<sup>®</sup> zu einer bereits angesetzten Kultur bewirkt keine erfolgreiche Mykoplasmeneliminierung.

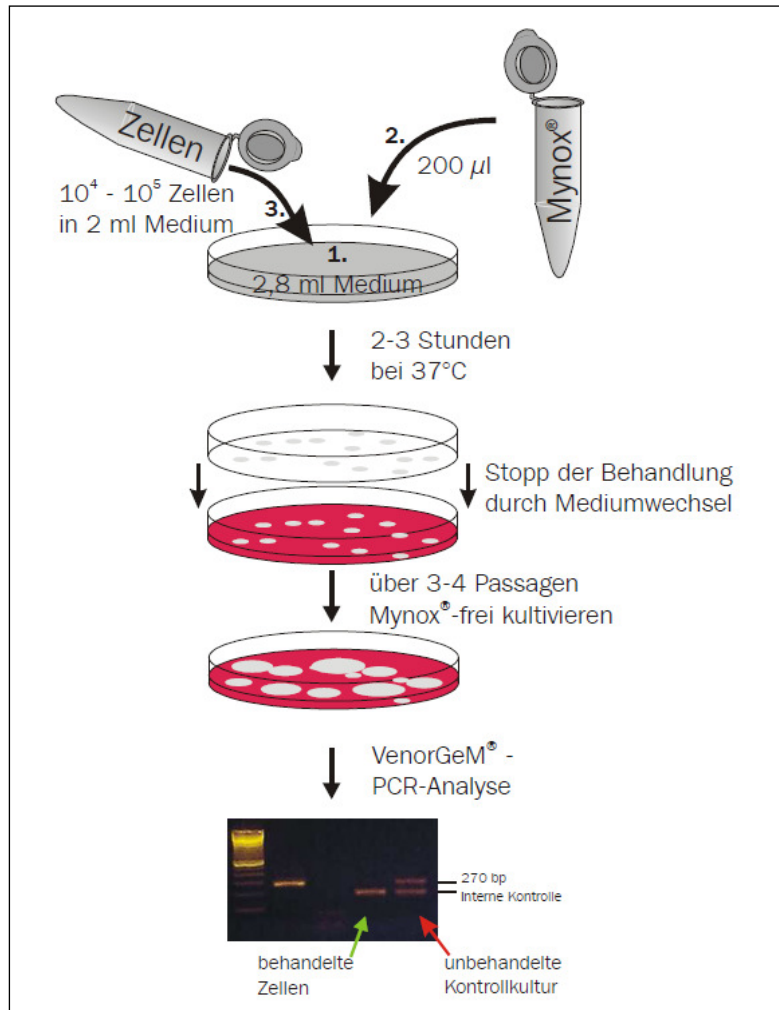


Abb. 1: Schema für die Behandlung adhärent wachsender Zellen

#### 4.1.2 Behandlungsdauer und Entfernung von Mynox<sup>®</sup>

Die Zellen werden im Eliminierungsansatz kultiviert (CO<sub>2</sub>-Inkubator), bis die meisten Zellen an der Kulturschale adhären sind (ca. 2-3 Stunden). Danach wird das Eliminierungsreagenz durch Mediumwechsel entfernt und die Zellen im üblicherweise verwendeten Kulturmedium aufgenommen.

**Alternativ** kann das Eliminierungsreagenz für die Dauer einer Passage von 3-5 Tagen in der Kultur verbleiben und wird beim nächsten Umsetzen der Zellen durch Mediumwechsel entfernt.



**Während der Einwirkzeit muss die Kultur regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und bei Beobachtung deutlicher zytopathogener Effekte die Behandlung durch Mediumwechsel oder durch Verdünnung (5fach) sofort beendet werden.**

## 4.2 Suspensionszellen

### 4.2.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes

In einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen:

1. 1,6 ml einer Trypsin:EDTA-Lösung (0,125 % Trypsin, 5 mM EDTA in PBS) mit 200 µl Mynox<sup>®</sup> (1 Röhrcheninhalt) mischen.
2. 1,6 ml Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) FBS und  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Suspensionszellen hinzugeben. Pipettenspitze dabei direkt in die vorgelegten Reagenzien tauchen. Röhrchen dicht verschließen.
3. das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 3,4 ml.



**Der Eliminierungsansatz muss die gesamte Innenseite des Röhrchens benetzen.**

**Für eine erfolgreiche Behandlung müssen Einzelzellen eingesetzt werden.**

Das Trypsin soll die Bildung von Zellklumpen während der Behandlung verhindern. Dieser Effekt kann auch mit anderen Reagenzien oder Methoden erreicht werden. Liegen die Zellen bereits einzeln vor, kann auf die Zugabe einer entsprechenden Reagenz verzichtet werden. In jedem Fall muss das Volumen des Eliminierungsansatzes 3,4 ml betragen und ist ggf. mit PBS aufzufüllen.

### 4.2.2 Behandlung und Entfernung von Mynox<sup>®</sup>

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln bei Zimmertemperatur für 30 min. inkubiert. Die Zellen werden schonend abzentrifugiert (600xg, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird im Standard-Zellkulturmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt.

**Alternativ** kann die Effizienz der Behandlung durch kurzzeitige Subkultivierung in Gegenwart von Mynox<sup>®</sup> erhöht werden: Die Zellen werden in 5 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FBS und 150 µl Mynox<sup>®</sup> aufgenommen. Die Zellen werden in eine neue Zellkulturflasche überführt und 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden dann schonend abzentrifugiert (600xg, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in Mynox<sup>®</sup>-freiem Standardkulturmedium kultiviert. Bei dieser zusätzlichen Behandlung kann es zu einer deutlichen Verringerung der Zellzahl kommen.



**Die Kultur sollte während der Einwirkzeit regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und bei Beobachtung deutlicher zytopathogener Effekte die Behandlung durch Mediumwechsel oder Verdünnung (5fach) sofort beendet werden.**

## 4.3 Unbehüllte Viren

### 4.3.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes

Die Virussuspension sollte frei von Zelltrümmern sein. Unbehüllte Viren sind gegenüber Mynox<sup>®</sup> stabil. Der Virustiter hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg.

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß:

1. 1 ml Zellkulturmedium ohne FBS mit 100 µl Mynox<sup>®</sup> mischen
2. 125 µl Virussuspension hinzugeben und das Gefäß dicht verschließen.
3. das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 1,225 ml.

### 4.3.2 Behandlung und Entfernung von Mynox<sup>®</sup>

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert.



**Der Eliminationsansatz muss die gesamte Innenseite des Gefäßes benetzen.**

Die Reaktion wird durch eine Verdünnung des Eliminierungsansatzes mit Kulturmedium im Verhältnis 1:10 gestoppt. Dieser Arbeitsschritt kann mit der Anzucht einer Mykoplasmenfreien Viruskultur verbunden werden. Dazu wird der Eliminierungsansatz direkt in eine subkonfluente Kultur der Wirtszelllinie gegeben. Das Kulturvolumen sollte dem Zehnfachen des eingebrachten Eliminierungsansatzes entsprechen.



**Die Wirtszelllinie sollte vor der Infektion mit dem behandelten Virusmaterial auf eine eventuelle Verunreinigung mit Mykoplasmen getestet werden.**

## 4.4 Umhüllte Viren

Die Lipidmembran umhüllter Viren ist vergleichbar mit der Plasmamembran von Mykoplasmen, dem Angriffsziel von Mynox<sup>®</sup>, aufgebaut. Umhüllte Viren können prinzipiell mit Mynox<sup>®</sup> bei längerer Einwirkzeit und höheren Wirkstoffkonzentrationen inaktiviert werden. Um nach der Behandlung einen für Subkultivierungen ausreichend hohen Titer zu erreichen, sollte der Ausgangstiter der zu behandelnden Suspension  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml überschreiten und die Behandlungsparameter genau eingehalten werden.

### 4.4.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes

Die eingesetzte Virussuspension sollte frei von Zelltrümmern sein. In einem sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen:

1. 4,4 ml Zellkulturmedium, ohne FBS mit 100 µl Mynox<sup>®</sup> mischen
2. 0,5 ml Virussuspension zugeben und das Gefäß dicht verschließen.
3. das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 5 ml.

#### 4.4.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert.



**Der Eliminationsansatz muss die gesamte Innenseite des Zentrifugenröhrchens benetzen.**

Die Reaktion wird durch eine Verdünnung des Eliminierungsansatzes mit Kulturmedium im Verhältnis 1:10 gestoppt. Dieser Arbeitsschritt kann mit der Anzucht einer Mykoplasmenfreien Viruskultur verbunden werden. Dazu wird der Eliminierungsansatz direkt in eine subkonfluente Kultur der Wirtszelllinie gegeben. Das Kulturvolumen sollte dem Zehnfachen des eingebrachten Eliminierungsansatzes entsprechen.



**Die Wirtszelllinie sollte vor der Infektion mit dem behandelten Virusmaterial auf eine eventuelle Verunreinigung mit Mykoplasmen getestet werden.**

### 5 Kontrolle des Behandlungserfolges

Um die dauerhafte Entfernung der Mykoplasmen sicher zu beurteilen, sollten behandelte Zell- und Viruskulturen für mindestens vier Passagen ohne Zugabe von Mykoplasma-wirksamen Antibiotika kultiviert und der Behandlungserfolg mit einer sensitiven Testmethode überprüft werden. Für eine zuverlässige Diagnostik empfehlen wir das Mykoplasmen-PCR-Diagnostikkit Venor® GeM (Kat. Nr. W 11-1025/1050/1100/1250). Der Nachweis mit DNA-amplifizierenden Methoden wie der PCR sollte frühestens nach 2 Passagen erfolgen. Durch die Lyse der Mykoplasmen wird die enthaltene DNA in das Kulturmedium freigesetzt und würde ein falsch-positives Ergebnis hervorrufen. Mediumwechsel und die degradierende Wirkung extrazellulärer DNAsen bewirken eine Abreicherung freier Mykoplasmen-DNA und ermöglichen ein aussagekräftiges Ergebnis.

### 6 Vorsichtsmaßnahmen

Die Handhabung der Reagenzien und des Probenmaterials erfolgt unter Beachtung geltender Laborregeln:

- zum Pipettieren sind geeignete Pipettierhilfen zu verwenden.
- im Arbeitsbereich sowie während des Umgangs mit den Reagenzien und dem Probenmaterial ist das Essen, Trinken oder Rauchen zu unterlassen.
- das Probenmaterial, Testansätze und Verbrauchsmaterialien sind nach der Durchführung sachgemäß zu inaktivieren und zu entsorgen. Mynox® kann bedenkenlos der Abfallentsorgung zugeführt werden.



**Mynox® ist nur für Forschungszwecke bestimmt.**

## 7 Details von Mynox<sup>®</sup>

Parameter	Mynox <sup>®</sup>		
Kat. Nr.	W 10-0200	W 10-0500	W 10-1000
Behandlungen	2	5	10
Lagerung	+2 - +8 °C		
Rohmaterial	Mynox <sup>®</sup> -Reagenz		
Anwendung	Mykoplasmeneliminierung		
Hinweis	Für die <i>in vitro</i> Anwendung, Forschungszwecke		

Alle Mykoplasmenreagenzien der Biochrom AG (Eliminierung und Nachweis) finden Sie hier:  
<http://www.biochrom.de/produkte/mykoplasmen-reagenzien/>