

Mykoplasmeneliminierung mit Mynox® *Gold*: 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® Eliminierungs-Reagenz. Mynox® wirkt biophysikalisch und tötet Mykoplasmen zuverlässig ab. Es beeinflusst nicht die Eigenschaften der Zellen.

Mynox® *Gold* ist eine Weiterentwicklung des klassischen Mynox® mit hoher Eliminierungseffizienz bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität. Mynox® *Gold* dient zur Reinigung von Stammzellkulturen. In Mynox® *Gold* ist eine biologisch aktive Reagenz gegen Mykoplasmen mit Standard-Antibiotika kombiniert. Bereits durch die Startbehandlung werden die meisten Mykoplasmen abgetötet, ohne die Zellen zu schädigen. In der nachfolgenden Hauptbehandlung werden die Mykoplasmen mit einer Effizienz von bis zu 100 Prozent entfernt. Mynox® *Gold* ist für Permanent-Zellkulturen geeignet. Eine Einheit besteht aus einer Starterlösung und drei Behandlungslösungen mit je 500 Mikroliter „ready-to-use“-Lösung.

1 Anwendungsgebiet und Wirkungsprinzip

Mit Mykoplasmen infizierte Zellen werden üblicherweise mit Standardantibiotika behandelt. Die Effizienz von 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® *Gold* (Kat. Nr. W 10-0201/0501/1001) ist eine Weiterentwicklung des klassischen Mynox®. Die hohe Wirksamkeit gegenüber Mykoplasmen konnte durch die Kombination mit selektiven Antibiotika nochmals verbessert werden. Die Konzentration an Mynox® und die Wirkkonzentration des antibiotischen Anteils konnte durch die Kombination deutlich unter die üblicherweise verwendeten Konzentrationen gesenkt werden. Dadurch ist nahezu keine Zytotoxizität mehr messbar.

Die Behandlung umfasst zwei Schritte: Das Starter Treatment führt zu einer massiven Reduzierung an vitalen Mykoplasmen. Der aktive Wirkstoff ist ein 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® *Gold* mit dieser Lipidmembran werden Permeabilitätsveränderungen induziert und die Wirksamkeit des antibiotischen Anteils erhöht. Die eukaryontische Zelle wird erst bei deutlich höheren Wirkstoffkonzentrationen beeinflusst. Durch Mediumwechsel werden die Reagenzien aus der Kultur entfernt und durch drei Behandlungen mit dem Main Treatment eventuell überlebende Mykoplasmen dauerhaft abgetötet.

2 Reagenzien und Materialien

2.1 Inhalt der Packung

Je Behandlung und Verpackungseinheit: 1 Röhrchen Starter Treatment und 3 Röhrchen Main Treatment (gebrauchsfertig, steril, aliquotiert á 520 µl je Röhrchen)

2.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Mynox[®] Gold kann bei Raumtemperatur versendet und bei +2 °C bis +8 °C ungeöffnet in der Originalverpackung langfristig gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Tütenetikett angegeben.

2.3 Zusätzlich benötigtes Material

- übliche Ausstattung eines Zellkulturlabors und Verbrauchsmaterialien
- sensitiver Mykoplasmentest zur Überprüfung des Eliminierungserfolges (z.B. Venor[®] GeM Mycoplasma PCR Detektionskit, Kat. Nr. W 11-1025/1050/1100/1250)

3 Probenmaterial

Grundsätzlich können alle Arten von Zellen mit Mynox[®] Gold von jeglichen Spezies des Klasse *Mollicutes* (d.h. *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, usw.) befreit werden. Für einen maximalen Behandlungserfolg sollte auf folgende Bedingungen geachtet werden:

1. Die eingesetzte Zellmenge sollte 10⁵ Zellen nicht überschreiten. Mit höheren Zellmengen erhöht sich auch die Anzahl an Mykoplasmen im Eliminierungsansatz und verringert damit die Erfolgsaussichten für eine dauerhafte Eliminierung.
2. Mynox[®] Gold adsorbiert an Lipid- und Proteinbestandteilen des Serumzusatzes. Dadurch verringert sich mit steigender Serumkonzentration im Eliminierungsansatz die Konzentration der wirksamen Reaktionskomponenten (Puffereffekt). Das hier beschriebene Behandlungsprotokoll geht von einer Konzentration an fötalem Kälberserum von 5 % (v/v) im Ansatz aus. Die Behandlung von biologischen Agenzien mit hohen Protein- und Lipidkonzentrationen ist daher nicht möglich.
3. Die Art des verwendeten Zellkulturmediums (z.B. DMEM, RPMI 1640) hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg. Antibiotika, vor allem als Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks, können im Eliminierungsansatz verbleiben. In Einzelfällen kann die Zytotoxizität auf die durch die Doppelbelastung ansteigen.
4. Viren sollten zusammen mit den infizierten Wirtszellen behandelt werden.
5. Grundsätzlich treten Mykoplasmen in Zellkulturen extrazellulär auf. In der Literatur wird *Mycoplasma penetrans* als zellinvasive Mycoplasma-Spezies beschrieben. Mynox[®] Gold benötigt zur Wirkungsentfaltung den direkten Kontakt zum Mykoplasmenpartikel. Eine Behandlung von zellinvasiven Mykoplasmenpezies mit Mynox[®] Gold würde nicht erfolgreich sein. Bisher wurde *Mycoplasma penetrans* nicht als Kontaminante in Zellkulturen gefunden.

6. Mykoplasmen können nach einer Behandlung erneut aufkommen, wenn sie sich in den interzellulären Räumen oder in unzugänglichen Bereichen der Zellmembran der Einwirkung von Mynox[®] Gold 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 angewendet.

4 Behandlung

Das hier beschriebene Protokoll wurde an weit verbreiteten Zelllinien unter Verwendung von standardisierten Kulturmedien erprobt. Es können aufgrund der Vielzahl möglicher Anwendungen von Mynox[®] Gold nicht alle Anwendungsmöglichkeiten in diesem Protokoll beschrieben werden. Eine individuelle Anpassung des Protokolls kann notwendig werden. Bei Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Das Protokoll kann für adhärent wachsende Zellen und für Suspensionszellen gleichermaßen verwendet werden.

1. 4,5 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FBS und 500 µl des Starter Treatment (Röhrchen mit orangefarbenem Deckel) werden in einer Zellkulturflasche oder Petrischale miteinander vermischt.
2. Maximal 10^5 der zu behandelnden Zellen werden in 5 ml Zellkulturmedium suspendiert und dem Eliminierungsansatz hinzugegeben.
3. Die Zellen werden im Eliminierungsansatz im CO₂-Inkubator kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht ist. Danach wird das Eliminierungsreagenz durch Mediumwechsel entfernt. Die Zellen werden wie gewohnt in 9,5 ml frischem Kulturmedium mit 500 µl des Main Treatment (Röhrchen mit transparentem Deckel) passagiert. Die Serumkonzentration muss nicht mehr auf 5 % (v/v) eingestellt werden.
4. Zum Abschluß der Prozedur wird Schritt 3 für zwei weitere Passagen wiederholt.



Die Serumkonzentration des endgültigen Reaktionsansatzes darf 5 % (v/v) nicht überschreiten.

Es müssen Einzelzellen eingesetzt werden (am Mikroskop überprüfen!). Ggf. müssen Zellverbände tryptisch oder mechanisch, z.B. mittels einer Pipette durch wiederholte Aufnahme und Abgabe, gelöst werden.

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

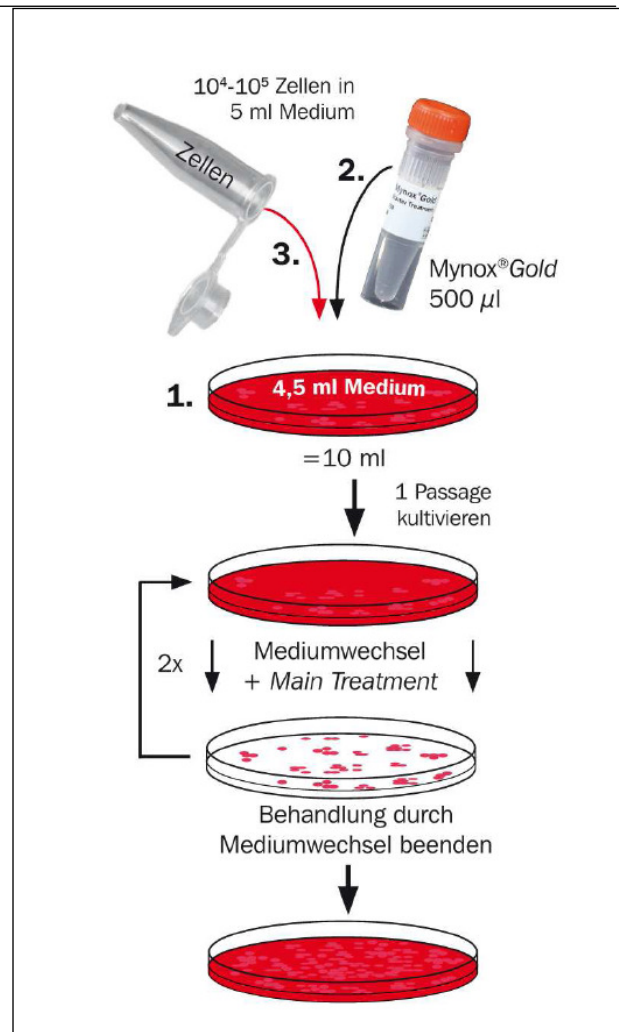


Abb. 1: Schema für die Behandlung adhärent wachsender Zellen
(für Suspensionszellen und adhärent wachsende Zellen anwendbar)

5 Kontrolle des Behandlungserfolges

Um die dauerhafte Entfernung der Mykoplasmen sicher zu beurteilen, sollten behandelte Zell- und Viruskulturen für vier Passagen ohne Zugabe von Mykoplasmen-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.



Mynox[®] Gold ist nur für Forschungszwecke bestimmt.

6 Details von Mynox[®] Gold

Parameter	Mynox [®] Gold		
Kat. Nr.	W 10-0201	W 10-0501	W 10-1001
Behandlungen	2	5	10
Lagerung	+2 - +8 °C		
Rohmaterial	Mynox [®] -Reagenz mit Standard-Antibiotika		
Anwendung	Mykoplasmeneliminierung		
Hinweis	Für die <i>in vitro</i> Anwendung, Forschungszwecke		

Alle Mykoplasmen-Produkte (Eliminierung und detektion) finden Sie hier:
<http://www.biochrom.de/produkte/mykoplasmen-reagenzien/>