

MycoSPY[®] Master Mix

mit Ladepuffer und Tracking-Farbstoff, lyophilisiert

PCR-Kit zum Nachweis von Mykoplasmen

Bestellinformationen und SDB unter www.biont.com

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgrößen
MycoSPY [®] Master Mix	M020-025	25 Assays
	M020-050	50 Assays (2 x 25)

Versand: Umgebungstemperatur

Lagerung: Lyophilisiert ≤ -15°C, Rehydratisiert ≤ -15°C

Stabilität: Haltbarkeit: siehe Label

Gebrauch: Nur für Forschungszwecke *in vitro*, nicht zur diagnostischen, therapeutischen oder anderen klinischen Anwendungen an Mensch oder Tier.

Beschreibung

Der MycoSPY[®] Master Mix ist für die Routineuntersuchung von Zellkulturen auf Mykoplasmen konzipiert. Eine aufwändige Isolierung der genomischen DNA ist nicht notwendig – eine Probe des Zellkulturüberstandes wird als Template für die PCR eingesetzt. Wenige Pipettierschritte für den PCR-Ansatz und die Analyse mittels Gelelektrophorese liefern schnell, einfach und sehr sensitiv ein Ergebnis.

Inhalt

1. Allgemeines	2
1.1 Spezifikationen des MycoSPY® Master Mix	3
1.2 Hinweise	3
2. Arbeitsanleitung	4
2.1 Arbeitsablauf	4
2.2 Probenvorbereitung	4
2.3 Set up der Reaktion	4
Vorbereiten des MycoSPY® Master Mixes	4
Vorbereiten der PCR	5
2.4 PCR Programm	5
2.5 Elektrophorese des PCR-Produkts	6
2.6 Auswertung	6
Beispiel eines Gels	6
3. Troubleshooting	7
4. Anhang	7
4.1 Liste der mit MycoSPY® Master Mix detektierbaren <i>Mollicute</i> -Stämme	7
Detektionsspektrum	8
5. Sonstiges	8
5.1 Wichtige Informationen	8
5.2 Gewährleistung	8

1. Allgemeines

Die Kontamination von Zellkulturen durch Mykoplasmen ist eines der Hauptprobleme in der zellbiologischen Forschung. Daher ist eine regelmäßige Untersuchung der Zellkulturen auf Mykoplasmen essentiell. Biontex stellt mit den Produkten der MycoSPY® Reihe für die Detektion und mit MycoRAZOR® für die Eliminierung entsprechende Produkte zur Verfügung.

Mit dem PCR-basierten Mykoplasmen Detektionskit MycoSPY® Master Mix lassen sich Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen zuverlässig, spezifisch und schnell nachweisen.

Die im Master Mix enthaltenen PCR Primer detektieren alle in der Zellkultur relevanten *Mollicute*-Stämme. Zusätzlich zu den Primern enthält der Master Mix die für eine PCR erforderlichen Komponenten (Puffer, Taq-Polymerase, dNTPs). Ein Ladepuffer und zwei Tracking-Farbstoffe im Master Mix ermöglichen das direkte Auftragen des PCR-Produktes auf ein Agarosegel. Mit Mykoplasmen kontaminierte Kulturen zeigen in Abhängigkeit vom Stamm ein einzelnes 500–520 bp PCR-Produkt, das auf dem Agarosegel einfach zu detektieren ist.

Die lyophilisierte Form des MycoSPY® Master Mix ist bei Raumtemperatur stabil und reduziert deshalb den Verpackungsaufwand für die Versendung des Produktes.

Der Kit beinhaltet eine interne Kontrolle, die es erlaubt, die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren und damit falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Zur Rehydratisierung des lyophilisierten Master Mixes ist PCR-geeignetes Wasser im Kit enthalten.

1.1 Spezifikationen des MycoSPY® Master Mix

Anwendung	PCR-Kit zum routinemäßigen Screening von Zellkulturen auf Mykoplasmen
Inhalt	• Lyophilisierter Master Mix: HotStart Taq-Polymerase, Primer Mix, Nukleotidtriphosphate (dNTPs), Puffer, MgCl₂, Stabilisatoren Ladepuffer mit Tracking-Farbstoff • Interne Kontrolle: Plasmid mit verkürzter 16S rRNA Konsensussequenz und entsprechenden Primeraufsprungstellen • PCR geeignetes Wasser
Assays	25 oder 50 Anwendungen
Empfindlichkeit	>100 Kopien des Mykoplasmen-genoms unter optimalen Bedingungen (hochreine M. fermentans DNA, ohne Interne Kontrolle)
Versand	Umgebungstemperatur
Lagerung	≤ 15°C

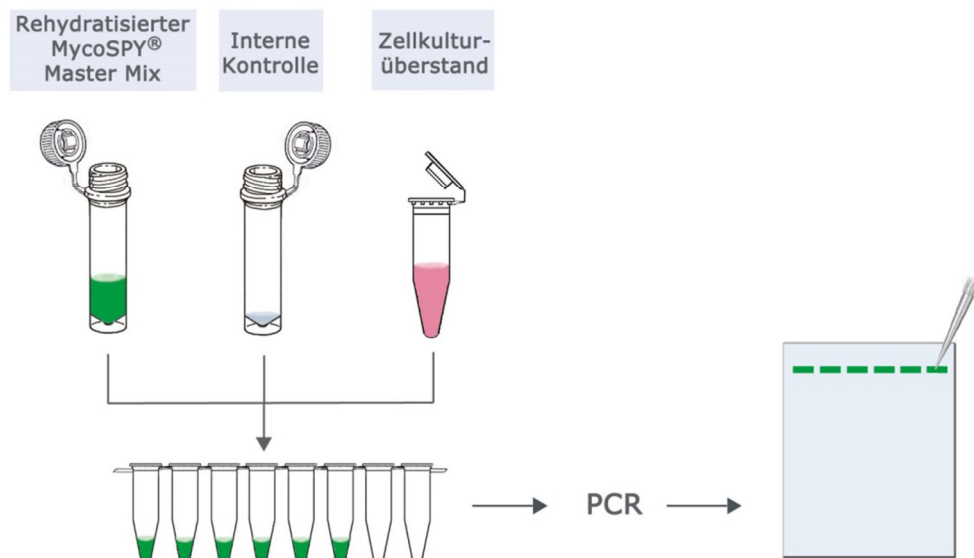
1.2 Hinweise

1. Überprüfen Sie zunächst, ob zwischen der letzten Anwendung eines Mykoplasmen-Entfernungs-Kits und dem aktuellen Test mit dem MycoSPY® Master Mix Kit mindestens zwei normale Passagen durchgeführt wurden. Wenn das nicht der Fall ist, könnten durch die sehr hohe Sensitivität des MycoSPY® Master Mix noch tote Mykoplasmen nachgewiesen werden.
2. Kreuzkontaminationen von anderen Zellkulturen sind häufig. Testen Sie daher stets alle in Kultur befindlichen Zellen und tauschen Sie möglicherweise kontaminiertes Zellkulturmaterial (Medium, FBS, Trypsin, Puffer) aus.
3. Eine Kontrolle auf vollständige Entfernung von Mykoplasmen nach jeder Anwendung eines Mykoplasmen-Entfernungs-Kits (wie z.B. MycoRAZOR®) ist wichtig, um dem Aufbau von Resistenzen vorzubeugen. Eine vollständige Entfernung der Mykoplasmen ist entscheidend, da, wie generell bei Antibiotika-Anwendungen, eine Resistenzbildung auftreten kann.
4. Eine Hauptkontaminationsquelle für Mykoplasmen sind tierische, in der Zellkultur eingesetzte Produkte. Setzen Sie daher nur fötales Kälberserum (FBS) und Trypsin ein, das garantiert frei von Mykoplasmen ist.
5. Da Mykoplasmen zur Klasse der *Mollicutes* gehören und damit keine Zellwand aufweisen, sind sie gegen viele Antibiotika, die sich gegen die Synthese von Bakterienzellwänden richten, resistent. Der Anwender ist eine potentielle Kontaminationsquelle bei standardmäßigem Einsatz solcher Antibiotika in der Zellkultur. Unsteriles Arbeiten und ein damit verbundener Eintrag von Mykoplasmen wird in diesem Fall nicht bemerkt, da das zugesetzte Antibiotikum das Wachstum der meisten Bakterien – und damit makroskopische Anzeichen – verhindert. Mykoplasmen können sich hier jedoch trotzdem vermehren.

2. Arbeitsanleitung

Tragen Sie Handschuhe während Sie die Template und die PCR vorbereiten, um falsch positive Resultate zu vermeiden. Um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben auszuschließen, empfehlen wir Filterspitzen zum Pipettieren zu verwenden.

2.1 Arbeitsablauf



2.2 Probenvorbereitung

1. Überführen Sie **100 µl Zellkulturüberstand** von der Zelllinie, die Sie untersuchen wollen, in ein PCR Tube.

Die Zellen sollten regulär subkultiviert worden sein (alle 2-3 Tage) und die Wachstumsoberfläche bei Entnahme des Zellkulturüberstands zu etwa 90% bedecken! Bei zu dicht gewachsenen Zellkulturen kann der Überstand zu einer Inhibition der PCR führen!

2. Inkubieren Sie den Zellkulturüberstand bei **94°C für 5 min.**
3. Zentrifugieren Sie die Probe für **1 min bei 13.000 x g**, um störende Zellbestandteile zu pelletieren.
4. Verwenden Sie 2 µl des Überstandes als Template in der PCR.

2.3 Set up der Reaktion

Vorbereiten des MycoSPY® Master Mixes

Vor dem ersten Gebrauch muss der lyophilisierte Master Mix rehydratisiert werden. Dazu werden 575µl Wasser (temperiert auf Raumtemperatur, Wasser im Kit enthalten) zum Lyophilisat pipettiert und durch mehrfaches Invertieren des Röhrchens vollständig in Lösung gebracht. Diese Menge reicht für 25 Reaktionen. Bei nicht vollständigem Verbrauch **muss der rehydratisierte Master Mix sofort nach Gebrauch bei ≤ -15°C gelagert werden**, da eine lange Standzeit in flüssigem Zustand bei Raumtemperatur die Sensitivität negativ beeinträchtigt. Mehrfaches Einfrieren und wieder Auftauen ist dagegen problemlos möglich.

Vorbereiten der PCR

Für optimale Verlässlichkeit empfehlen wir jeden PCR-Ansatz, in dem der Zellkulturüberstand getestet wird, mit der internen Kontrolle in einem Tube durchzuführen, auch wenn dadurch die Sensitivität des Nachweises leicht absinkt. Die Interne Kontrolle bestätigt die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren und schließt falsch-negative Ergebnisse aus.

Der Grund für die Absenkung der Sensitivität liegt darin, dass die Interne Kontrolle die gleichen Primer verbraucht, wie das Mykoplasmen genom. Normalerweise stellt dies kein Problem dar, da sich Mykoplasmen sehr schnell vermehren, so dass eine kontaminierte Zellkultur in kurzer Zeit eine hohe Konzentration an Mykoplasmen genom erreicht. Allerdings besteht der Nachteil, dass eine Kontamination im Frühstadium mit sehr geringer Mykoplasmenkonzentration nicht erkannt wird. Will man die volle Sensitivität erhalten, empfehlen wir die Probe in zwei einzelnen Tubes zu testen, eines mit und eines ohne Interne Kontrolle.

Planen Sie zusätzlich eine Reaktion ohne Template mit ein. Diese Kontrollreaktion stellt sicher, dass keine Kontaminationen der Reaktionskomponenten mit genetischem Material vorliegen.

Folgende Volumina werden in PCR-geeignete Reaktionsgefäße pipettiert:

Komponenten	Testprobe mit interner Kontrolle	Kontrollreaktion
Master Mix	22 µl	22 µl
Interne Kontrolle	1 µl	1 µl
Testprobe	2 µl	-
Wasser	-	2 µl
Endgültiges Volumen	25 µl	25 µl

2.4 PCR Programm

Das folgende Programm ergibt eine optimale Vervielfältigung der internen Kontrolle und der Genomkopien aus verschiedenen Mykoplasmen spezieis.

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Funktion	Anzahl der Zyklen
94	60	Initiale Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	1 Zyklus
94	30	Denaturierung	35 Zyklen
62	30	Primer-Annealing	
72	30	Elongation	
72	180	Finale Elongation	1 Zyklus
4	∞		

Zu erwartende Produkte:

~200bp interne Kontrolle

~500bp Amplifikat des Mykoplasmen genom

2.5 Elektrophorese des PCR-Produkts

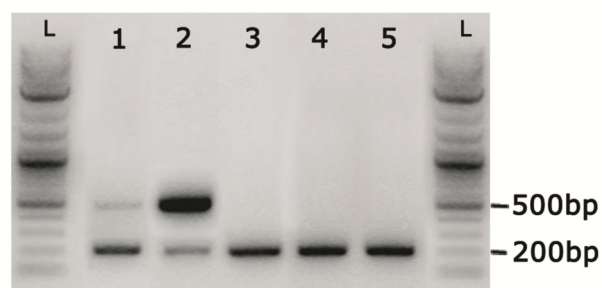
Zur optimalen Auftrennung empfehlen wir ein 2%iges Agarosegel mit TAE oder TBE Puffer für die Elektrophorese zu verwenden.

Da der MycoSPY® Master Mix bereits einen Ladepuffer enthält, können die Proben nach Beendigung des PCR-Programms direkt auf das Gel aufgetragen werden. Die ebenfalls enthaltenen Tracking-Farbstoffe erlauben die Visualisierung der Probe bei der Beladung des Gels und lassen den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen - der gelbe Farbstoff wandert mit der Lauffront.

2.6 Auswertung

PCR Template	PCR-Produkt	Ergebnis
Zellkulturüberstand mit interner Kontrolle	500 bp und 200 bp	Mykoplasmeninfektion
	nur 200 bp	Keine Infektion
	nur 500 bp	sehr starke Mykoplasmeninfektion (siehe Troubleshooting)
	keine Bande	PCR-Inhibitoren anwesend (siehe Troubleshooting)
Kontrollreaktion ohne Template	200bp	Reagenzien sind in Ordnung
	beliebige Bande	Kontamination der Reagenzien (siehe Troubleshooting)

Beispiel eines Gels



2% Agarosegel (TAE)

L: DNA ladder

Spur 1+2: Kontaminierte Zellen

Spur 3+4: keine Mykoplasmeninfektion

Spur 5: Kontrollreaktion ohne Template

3. Troubleshooting

1. Kein PCR-Produkt für die interne Kontrolle:

Dies zeigt an, dass die Probe PCR-Inhibitoren enthält:

- Verwenden Sie keinen Zellkulturüberstand von sehr dicht gewachsenen Zellen, da dieser PCR-Inhibitoren enthalten kann.
- Auch sollten in der Probe keine Zellen oder Zellbestandteile enthalten sein, da diese die PCR inhibieren können. Die Mykoplasmenkonzentration im Zellkulturüberstand reicht für den sensitiven PCR-Nachweis aus.
- Ist trotz dieser Maßnahmen keine Bande für die interne Kontrolle auf dem Gel sichtbar, empfiehlt sich die Isolierung der genomischen DNA mithilfe kommerziell erhältlicher Kits und diese gereinigte DNA als Template zu verwenden.
- Ist kein PCR Produkt für die interne Kontrolle zu detektieren, aber auf dem Gel ist eine starke 500bp Bande zu sehen, liegt eine sehr starke Kontamination von Mykoplasmen vor. Durch die hohe Konzentration besetzt das Mykoplasmengenom die Bindungsstelle am aktiven Zentrum der Polymerase beinahe vollständig, so dass die Interne Kontrolle nicht detektierbar amplifiziert werden kann.

2. Schwache Signale:

- Stellen Sie sicher, dass der Zellkulturüberstand von Kulturen verwendet wird, die die Wachstumsoberfläche zu etwa 90% bedecken.

3. Zusätzliche Banden in der Kontrollreaktion:

Zeigt die Kontrollreaktion neben der 200bp weitere Banden, die nicht auf Primer-Dimere („Wolke“ unter 100bp) zurückzuführen sind, liegt eine Kontamination von einer der Komponenten des Kits vor:

- Wiederholen Sie den PCR-Lauf mit neuem nukleasefreien Wasser. Sollten immer noch Banden detektiert werden, ist der Master Mix oder die interne Kontrolle kontaminiert und der Kit damit unbrauchbar.

4. Anhang

4.1 Liste der mit MycoSPY® Master Mix detektierbaren *Mollicute*-Stämme

Etwa ein Viertel aller tierischen Zellkulturen sind mit Mykoplasmen/*Mollicutes* kontaminiert. Die am häufigsten in Zellkulturen gefundenen Stämme mit einer Wahrscheinlichkeit von insgesamt 94% sind: *M. fermentans* (47%), *M. hyorhinis* (19%), *M. orale* (10%), *M. arginini* (9%), *A. laidlawii* (6%) und *M. hominis* (3%). Darüber hinaus wurden folgende Stämme mit geringerer Wahrscheinlichkeit gefunden: *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. synoviae* und *S. citri*. Alle diese *Mollicute*-Stämme werden neben einer Vielzahl anderer durch MycoSPY® Master Mix nachgewiesen. Die Verifikation der Primerspezifität wurde per BLAST Analyse durchgeführt.

Detektionsspektrum

Die Liste zeigt nur Mollicute-Stämme mit 100%igem Primermatch:

Mycoplasma				
M. agalactiae	M. citelli	M. genitalium	M. molare	M. pneumoniae
M. alligatoris	M. columborale	M. hominis	M. mucosicanis	M. pulmonis
M. alvi	M. conjunctivae	M. hyopneumoniae	M. muris	M. salivarium
M. amphoriforme	M. cricetuli	M. hyorhinis	M. mustelae	M. sualvi
M. arginini	M. crocodyli	M. hyosynoviae	M. mycoides	M. synoviae
M. bovinigenitalium	M. cynos	M. imitans	M. orale	M. testudineum
M. bovis	M. dispar	M. iowae	M. oxoniensis	M. testudinis
M. buccale	M. edwardii	M. lacerti	M. penetrans	M. verecundum
M. canadense	M. felis	M. lagogenitalium	M. phocidae	M. volis
M. canis	M. fermentans	M. microti	M. phocicerebrale	M. yeatsii
M. capricolum	M. gallisepticum	M. moatsii	M. pirum	M. zalophidermidis
Ureaplasma				
U. canigenitalium	U. diversum	U. gallorale	U. parvum	U. urealyticum
Mesoplasma				
M. chauliocola	M. florum	M. photuris	M. tabanidae	
M. entomophilum	M. grammopterae	M. syrphidae		
Spiroplasma				
S. cantharicola	S. citri	S. lineolae	S. platyhelix	S. taiwanense
Acholeplasma				
A. laidlawii				

5. Sonstiges

5.1 Wichtige Informationen

Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Forschung und für *in vitro* Anwendungen entwickelt und wird nur für diese Zwecke verkauft. Es darf nicht für therapeutische oder diagnostische Zwecke an Mensch oder Tier angewendet werden.

MycoSPY® ist eine eingetragene Handelsmarke der Biontex Laboratories GmbH.

5.2 Gewährleistung

Biontex gewährleistet nur dann für die beschriebenen Eigenschaften dieses Produktes bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum, wenn es gemäß der in diesem Manual angegebenen Informationen gelagert und angewendet wurde. Sollten Sie trotzdem mit diesem Produkt nicht zufrieden sein, kontaktieren Sie bitte Biontex Laboratories GmbH.

*Biontex Laboratories GmbH
Landsberger Straße 234
im MGH
80687 München/Laim
Germany*

*Tel.: +49 (0)89 3247995-0
Fax: +49 (0)89 3247995-2
E-Mail: contact@biontex.com
Internet: www.biontex.com*