

MycoSPY®

Mykoplasmen PCR Detektionskit

Bestellinformationen und SDB unter www.biont.com

Produkt	Bestell-Nr.	Packungsgröße
MycoSPY®	M030-050	50 Assays

Versand: Kühlpads

Lagerung: ≤ -15°C, vermeiden Sie vielfache Einfrier-/Auftauprozesse

Stabilität: Haltbarkeit: siehe Label

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

Beschreibung

Mit dem PCR-basierten Mykoplasmen Detektionskit MycoSPY® lassen sich Mykoplasmen-Kontaminationen zuverlässig in Zellkulturen detektieren. Die PCR Primer detektieren alle in der Zellkultur relevanten Stämme. Zusätzlich zu den Primern enthält das Set eine Hot-Start-Taq-Polymerase, eine optimierte Pufferlösung mit MgCl₂, Deoxynukleotide und eine interne Kontrollvorlage. Die Länge des PCR-Produkts dieser internen Kontrolle beträgt 700 bp und sie wird verwendet, um die polymerase-vermittelte Vervielfältigung in allen PCR-Proben zu bestätigen. Kontaminierte Kulturen zeigen in Abhängigkeit vom Stamm ein einzelnes 500 – 520 bp langes Vervielfältigungsprodukt.

Inhalt

1. Allgemeine Hinweise	3
1.1 Spezifikation	3
1.2 Erläuterung.....	3
1.3 Kontaminationen	3
1.4 Liste der mit MycoSPY® detektierten <i>Mollicute</i> -Stämme	4
Detektionsspektrum.....	4
2. Arbeitsanleitung	4
2.1 Probenvorbereitung	4
2.2 Ansetzen der PCR	5
Vorbereiten der MycoSPY® Reagenzien.....	5
Vorbereiten der PCR Mixtur.....	5
2.3 PCR Programm	6
2.4 Elektrophorese des PCR-Produkts	6
2.5 Auswertung	6
Beispiel eines Gels (alle Testproben mit interner Kontrolle).....	7
2.6 Zu beachtende Hinweise	7
3. Troubleshooting	8
4. Sonstiges.....	8
4.1 Wichtige Informationen	8
4.2 Gewährleistung	8

1. Allgemeine Hinweise

1.1 Spezifikation

Anwendung	PCR-Kit zur Detektion von Mykoplasmen in der Zellkultur
Inhalt	Taq-Polymerase, Primer Mix, Interne Kontrolle und Taq-Polymerase-Puffer mit Nukleotidtriphosphaten (dNTPs)
Assays	50 Anwendungen pro Kit
Empfindlichkeit	>100 Kopien des Mykoplasmen-genoms unter optimalen Bedingungen (hochreine M. fermentans DNA, ohne Interne Kontrolle)
Versand	Kühlpads
Lagerung	≤ 15°C

1.2 Erläuterung

Die Kontamination von Zellkulturen durch Mykoplasmen bleibt eines der Hauptprobleme in der biologischen Forschung. Meistens werden die Mykoplasmenkontaminationen durch die Verwendung von tierischen Produkten wie Seren oder durch das Trypsin verursacht. Eine weitere mögliche Kontaminationsquelle für die Zellkultur ist das Laborpersonal selbst.

Um Zellkulturen effektiv vor Mykoplasmenkontaminationen zu schützen, ist eine regelmäßige Untersuchung der Zellkulturen, sowie eine effiziente Entfernung der Mykoplasmen nötig. Mit den Produkten MycoSPY® (Detektion) und MycoRAZOR® (Entfernung) von Biontex sind Sie dafür bestens gerüstet.

1.3 Kontaminationen

Tragen Sie Handschuhe während Sie die Templates und die Mixturen für die PCR vorbereiten, um falsche positive Resultate zu vermeiden. Um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden, empfehlen wir durch das ganze Protokoll hinweg aerosolresistente (gestopfte) Pipettenspitzen zu benutzen. Trennen Sie weiterhin den Ort der Probenvorbereitung von dem Ort der Vorbereitung der Mixturen für die PCR.

1.4 Liste der mit MycoSPY® detektierten *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® nachgewiesen. Die Verifikation der Primerspezifität wurde per BLAST Analyse durchgeführt.

Detektionsspektrum

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

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

2. Arbeitsanleitung

2.1 Probenvorbereitung

- 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!

- Inkubieren Sie den Zellkulturüberstand bei 94°C für 5 min.

3. Zentrifugieren Sie die Probe für 1 min bei 13.000 × g, um störendes Zelldebris zu entfernen.
4. Verwenden Sie 2 µl des Überstandes als Templat in der PCR.

2.2 Ansetzen der PCR

Vorbereiten der MycoSPY® Reagenzien

Vor dem Gebrauch wird ein langsames Zentrifugieren der Produktröhrchen empfohlen, damit sichergestellt ist, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens befindet.

Vorbereiten der PCR Mixtur

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.

Die Negativkontrolle zeigt, dass keine Kontamination der Reagenzien mit genetischem Material erfolgt ist.

Komponenten	Testprobe mit interner Kontrolle	Testprobe ohne interne Kontrolle	Interne Kontrolle	Negativ-Kontrolle
Wasser	9.3 µl	10.3 µl	11.3 µl	12.3 µl
Taq Polymerase Puffer	2.7 µl	2.7 µl	2.7 µl	2.7 µl
Primer Mix	9.0 µl	9.0 µl	9.0 µl	9.0 µl
Interne Kontrolle	1.0 µl	–	1.0 µl	–
Taq Polymerase (1 U/µl)	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
Testprobe	2.0 µl	2.0 µl	–	–
Endgültiges Volumen	25.0 µl	25.0 µl	25.0 µl	25.0 µl

2.3 PCR Programm

Das folgende Programm ergibt eine optimale Vervielfältigung der 700 bp (interne Kontrolle) und der 500 bp PCR-Produkte aus verschiedenen Mykoplasmenspezies.

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Funktion	Anzahl der Zyklen
94	60	Vordenaturierung	1 Zyklus
94	30	Denaturierung	35 Zyklen
62	30	Primeranlagerung	
72	60	Polymerisation	
72	180	Endgültige Verlängerung	1 Zyklus

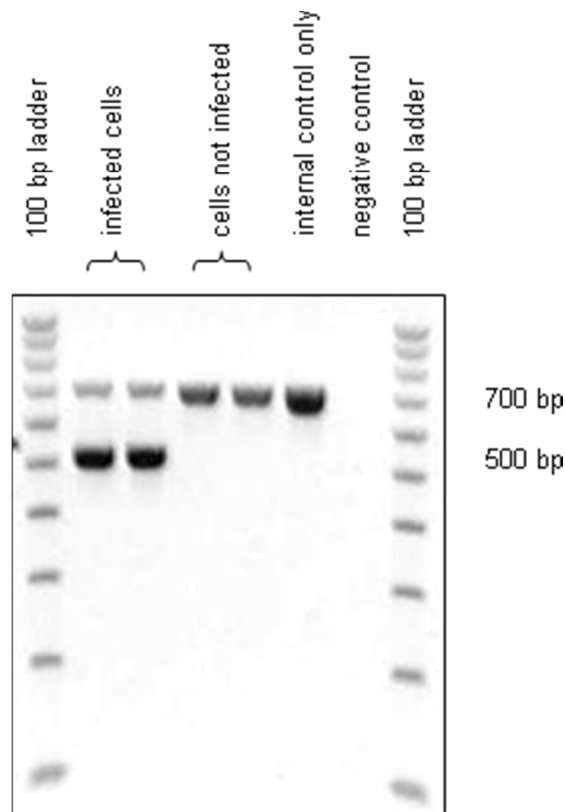
2.4 Elektrophorese des PCR-Produkts

Zur optimalen Auftrennung empfehlen wir ein 2% iges Agarosegel für die Elektrophorese zu verwenden.

2.5 Auswertung

PCR-Vorlage	PCR-Produkt	Ergebnis
Zellkulturüberstand mit interner Kontrolle	500 bp und 700 bp	Mykoplasmeninfektion
	nur 700 bp	Keine Infektion
	nur 500 bp	sehr starke Mykoplasmeninfektion
	keine Bande	PCR-Inhibitoren anwesend (siehe Troubleshooting)
Zellkulturüberstand	500 bp	Mykoplasmeninfektion
	keine Bande	Keine Infektion falls Probe „Interne Kontrolle“ erfolgreich
Interne Kontrolle	nur 700 bp	PCR erfolgreich
	500 bp und 700 bp	Kontamination der Reagenzien
	keine Bande	PCR-Inhibitoren anwesend (siehe Troubleshooting)
Negativkontrolle	kein Produkt	Reagenzien sind in Ordnung
	beliebige Bande	Kontamination der Reagenzien oder Pipettierfehler (siehe Troubleshooting)

Beispiel eines Gels (alle Testproben mit interner Kontrolle)



2.6 Zu beachtende Hinweise

1. 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.
2. Überprüfen Sie zunächst, ob zwischen der letzten Anwendung eines Mykoplasmen-Entfernungs-Kits und dem aktuellen Test mit MycoSPY® mindestens zwei normale Passagen durchgeführt wurden. Wenn das nicht der Fall war, könnten durch die sehr hohe Sensitivität von MycoSPY® noch tote Mykoplasmen nachgewiesen werden.
3. 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.
4. Da Mykoplasmen zur Klasse der *Mollicutes* gehören und damit keine Zellwand aufweisen, sind sie gegen viele Antibiotika, die sich gegen die Synthese der Zellwand richten, resistent. Daher ist der Anwender eine wichtige Kontaminationsquelle bei standardmäßigem Einsatz eines solchen Antibiotikums in der Zellkultur. Unsteriles Arbeiten 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.
5. Daneben ist auch die Kreuzkontamination von einer anderen Zellkultur möglich. Testen Sie daher stets alle in Kultur befindlichen Zellen und tauschen Sie möglicherweise kontaminiertes Zellkulturmaterial (Medium, FBS, Trypsin, Puffer) aus.

3. Troubleshooting

1. Der Ansatz mit interner Kontrolle sollte ein einzelnes, 700 bp langes Produkt erzeugen. **Zusätzliche Banden** weisen auf Kontamination der Edukte oder auf Pipettierfehler hin:
 - Tragen Sie Handschuhe während Sie die Mixturen für die PCR vorbereiten, um falsche positive Resultate zu vermeiden.
 - Um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden, empfehlen wir aerosolresistente (gestopfte) Pipettenspitzen zu benutzen.
2. **Kein PCR-Produkt für die interne Kontrolle** 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 enthalten sein, da diese die PCR inhibieren können. Die Mykoplasmenkonzentration im Zellkulturüberstand reicht für einen sensitiven Nachweis aus.
 - Wenden Sie ggf. ein handelsübliches DNA-Aufreinigungs-Kit an.
3. **Schwache Signale:**
 - Stellen Sie sicher, dass der Zellkulturüberstand von Kulturen verwendet wird, die die Wachstumsoberfläche zu 90% bedecken.

4. Sonstiges

4.1 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.

4.2 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*