

## Gute Laborpraxis

# Vereinfachung der routinemäßigen Mykoplasmen-Testung in der Zellkultur

JÜRGEN WEIDNER<sup>1</sup>, FRANZ-JOSEF WISCHMANN<sup>1</sup>, BURKHARD GREVE<sup>3</sup>,  
WOLFGANG GÖHDE<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> CYTECS GMBH, MÜNSTER

<sup>2</sup> MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄTSKLINIKUM MÜNSTER

<sup>3</sup> KLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE – RADIOONKOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM MÜNSTER

The contamination of cell cultures with *Mycoplasma* ssp. is unfortunately well known in the scientific community. A good laboratory management is needed to avoid these unwanted contaminations. To provide a reliable tool for routine testing of cell cultures, we would like to introduce a new freeze dried Mycoplasma PCR Detection Kit. Only a few working steps are needed to obtain the results within three hours.

© Springer-Verlag 2019

■ Mykoplasmen stellen eine wesentliche Kontaminationsquelle für etablierte Zellkulturen dar (**Abb. 1**). Die zellwandlosen Bakterien sind weitverbreitet und persistieren oft schon über einen langen Zeitraum

unentdeckt in der jeweiligen Kultur. Acht bis 31 Prozent aller Zellkulturen können mit Mykoplasmen kontaminiert sein [1]. Gerade der wissenschaftliche Austausch von Zellmaterial trägt zur Verbreitung und Ansteckung der eigenen Zellkulturen bei. Eine Untersuchung zur Authentizität von Leukämie-Lymphom-Zelllinien zeigt, dass heute noch 21 Prozent dieser Zelllinien, die als Material aus Sekundärquellen verbreitet wurden, positiv für Mykoplasmen sind [2]. Da Mykoplasmen Einfluss auf den Zellmetabolismus und die -proliferation haben, sind diese prokaryotischen Mikroorganismen hochgradig unerwünscht. Neue Zelllinien sollten daher immer erst in Quarantäne genommen werden. Ebenfalls sollte die Testung auf Mykoplasmen mit einer dreimonatigen Frequenz zur Routine in jedem Zellkulturlabor gehören. Eine Unterstützung der Etablierung dieser Routine kann der gefriergetrocknete Mycoplasma PCR Test Kit von Cytecs sein.

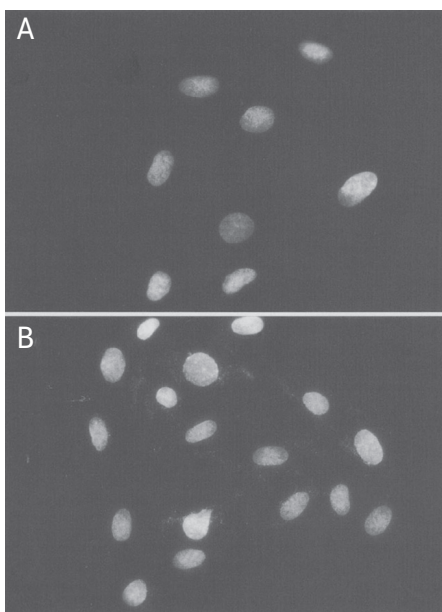
### Trockener ready-to-use-Mycoplasma-PCR-Test

Eine fehlende Umsetzung der Mykoplasmen-Routine im Labor könnte daran liegen, dass die Durchführung der Tests oft mit einem sehr hohen Aufwand verbunden sein kann. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wur-

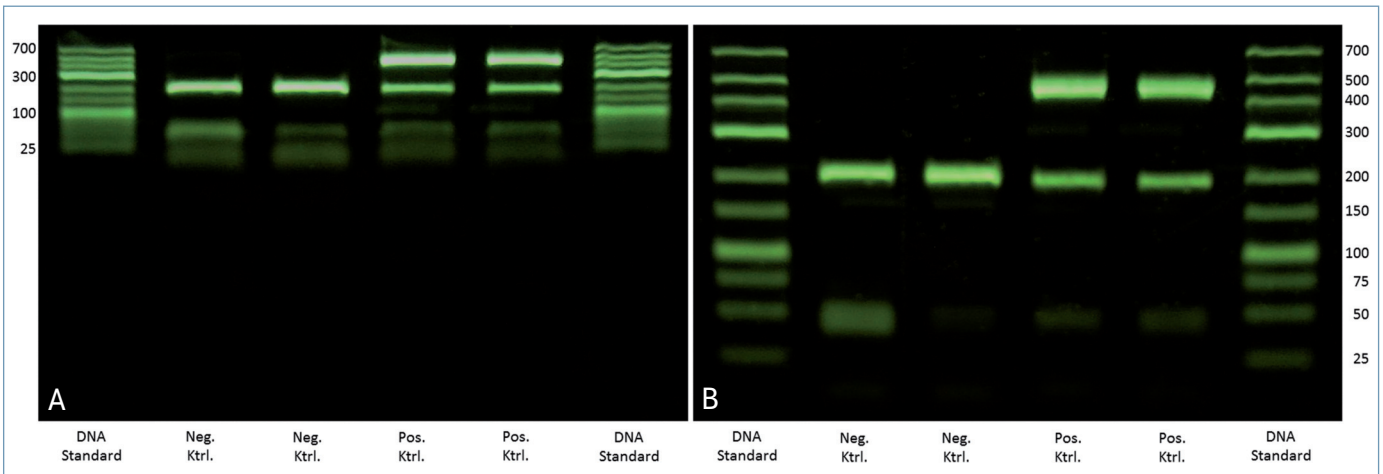
de ein ready-to-use-PCR-Test zum Nachweis von zwölf *Mycoplasma*-Arten (*M. orale*, *M. pulmonis*, *M. hyorhinitis*, *M. salivarium*, *M. arginini*, *M. hominis*, *M. arthritidis*, *M. fermentans*, *M. bovis*, *M. pneumoniae*, *M. pirum*, *M. capricolum*) sowie *Spiroplasma* und *Acholeplasma* entwickelt. Der fertige PCR-Ansatz enthält bereits Primer, Nukleotide, *Taq*-Polymerase sowie die interne Kontrolle. Das Ansetzen eines PCR-Master-Mixes, bei dem meist ein Ansatz für den Pipettierfehler verworfen wird, entfällt hierbei. Zum Schutz des PCR-Systems vor einer Kreuzkontamination mit PCR-Produkten vorangegangener Amplifikationen enthält der PCR-Ansatz zusätzlich dUTPs und Uracil-DNA-Glykosylase. Dieser PCR-Ansatz wird in einzelne PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert und anschließend gefriergetrocknet. Potenzielle Kontaminationen werden vor Beginn einer PCR an der Position eines Uracils durch die Endonuklease Uracil-DNA-Glykosylase verdaut. Um die jeweilige PCR nutzen zu können, muss der Anwender den Ansatz lediglich mit wenigen Mikrolitern PCR-Wasser rehydrieren, und der Test ist für die Zugabe des Templates bereit. Im Falle des Mycoplasma PCR Test Kits ist dies eine Probe aus dem Überstand der zu untersuchenden Zellkultur. Als Probenmaterial werden 500 Mikroliter Zellkulturmedium abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt, 1:1 mit Wasser gemischt und aufgeköcht. Der Debris wird pelletiert und der Überstand als Template in die PCR eingesetzt. Nach der Amplifikation werden die PCR-Produkte auf ein Agrosegel aufgetragen und die Ergebnisse durch Fragmentlängenanalyse ausgewertet. Das Fragment der internen Kontrolle hat eine Länge von 204 Basenpaaren, und das Zielfragment für den Nachweis der oben genannten *Mycoplasma*- bzw. *Spiroplasma*- und *Acholeplasma*-Arten hat eine Länge von 504 Basenpaaren (**Abb. 2B**).

### Auswertung mit der Dokumentationsplattform E-CUBE

Für eine weitere Zeitersparnis aller notwendigen Arbeitsabläufe sorgt die Durchführung der Gelelektrophorese auf der neuen Gel- und



▲ **Abb. 1:** Mit Hoechst 33258 gefärbte NRK-Indikatorzellen in einer Mykoplasma-freien (A) und in einer mit *Mycoplasma hyorhinitis* kontaminierten Probe (B). Abbildung aus [3].

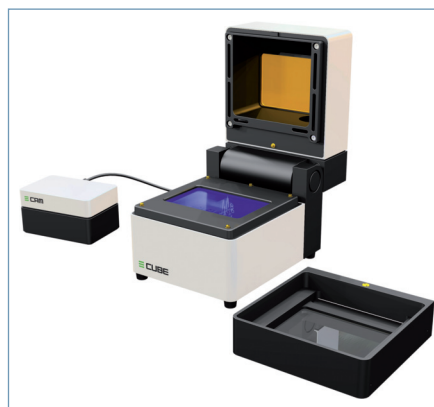


▲ **Abb. 2:** Die Gel- und Dokumentationsplattform E-CUBE erzeugt bereits nach 15 Minuten (A) eine derartige Trennschärfe, dass eine Auswertung dieser Ja/Nein-Diagnostik möglich ist. Nach 45 Minuten (B) zeigt sich das gewohnte Ergebnis. In allen Ansätzen ist das Fragment der internen Kontrolle (204 Basenpaare) deutlich zu erkennen. Das positive Fragment hat eine Länge von 504 Basenpaaren. Die Wolken bei der Lauflänge von 50–25 Basenpaaren sind Primerdimere.

Dokumentationsplattform E-CUBE von Cytecs (**Abb. 3**). Der E-CUBE vereint die Gelelektrophoresekammer, die Stromversorgung, den Illuminator ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) und die Dokumentationseinheit in einem Gerät. Durch die Benutzung des neuartigen Nukleinsäurefarbstoffs CUBE-GREEN werden DNA und RNA direkt, ohne Einsatz von Noxen wie UV-Licht oder Ethidiumbromid, nachgewiesen. Als Komplettlösung bietet Cytecs hier einen entsprechenden Gelkit mit vorgegossenen Agarosegelen, CUBE-GREEN, Ladepuffer, DNA-Standard und Wasser an. Der Live-view-Modus der Elektrophoreseeinheit ermöglicht dem Experimentator eine direkte Beobachtung der Elektrophorese. So können Gele bezüglich einer Ja/Nein-Fragestellung bereits nach 15 Minuten ausgewertet werden (**Abb. 2A**).

### Fazit

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mit dem neuen Test von Cytecs die Mykoplasmen-Routine deutlich komfortabler und zeitsparender geworden ist. Das Paket aus E-CUBE und Mykoplasmen-Testkit vereint



▲ **Abb. 3:** Das E-CUBE-Gelelektrophorese-system von Cytecs vereint alle Komponenten zur Durchführung einer Gelelektrophorese in einem Gerät. Der modulare Aufbau stellt sich wie folgt dar (v. l. n. r.): E-CAM-Kameramodul, Gerätebasis mit Illuminator, interner Rechner und Stromversorgung sowie die Elektrophoresekammer.

darüber hinaus eine hochsensitive und flexible Messplattform mit einer schnellen und kostengünstigen Detektionsmethode ohne toxische Substanzen. Wichtig bleibt jedoch,

grundsätzlich eine Mykoplasmen-Routine im eigenen Labor zu etablieren, um so fundierte Ergebnisse zu erzielen und nicht ungewollt den Einfluss von Mykoplasmen auf die jeweilige Zelllinie zu erforschen. ■

### Literatur

- [1] Corral-Vázquez C, Aguilar-Quesada R, Catalina P et al. (2017) Cell lines authentication and *Mycoplasma* detection as minimum quality control of cell lines in biobanking. *Cell Tissue Bank* 18:271–280
- [2] Drexler H, Dirks W, MacLeod R et al. (2017) False and *Mycoplasma*-contaminated leukemia-lymphoma cell lines: time for a reappraisal. *Int J Cancer* 17:1209–1214
- [3] Heenen M, Clynes M (1998) Screening for Mycoplasma Contamination in Animal Cell Cultures. In: *Animal Cell Culture Techniques*. Clynes M (Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, 38–53.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Franz-Josef Wischmann  
Cytecs GmbH  
Im Derdel 8  
D-48161 Münster  
Tel.: 02534-97736-13  
Fax: 02534-97736-29  
info@cytecs.com