

Mynox 去除黴漿菌試劑組

1. 試藥

1.1 內容物

A. 手冊

B. Mynox® 試劑: 已滅菌，每管適用於一次療程，有220 µl。

Cat. No. 10-0500 5 tubes

Cat. No. 10-1000 10 tubes

1.2 保存

Mynox® 可穩定保存在 +2 °C 到 +8 °C，直到有效期限，室溫運送即可。

1.3 其他需求

- 細胞培養
- 細胞培養液，小牛血清, phosphate-buffered saline (PBS), trypsin
- 培養皿，如. 6 cm petri dishes
- 黴漿菌偵測試劑，如 Minerva Biolabs's Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit

2. 應用

Mynox® 用于培養細胞或病毒時去除 Mycoplasma and Acholeplasma等污染。

3. 檢體

3.1 血清濃度

Mynox®中的活化物，mycoplasmacidal，會被血清中的脂質或蛋白質影響。這些與 mycoplasmacidal 形成競爭性反應而使得mycoplasmacidal 無法與黴漿菌細胞膜結合。故黴漿菌偵測試劑是針對標準的培養液來設計，如Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) 或 RPMI1640。且當處理細胞株時，血清濃度為5 % v/v (fetal calf serum)，若保存病毒時，建議不加血清。

3.2 Mynox®限制

Mynox® 不會進入細胞膜內，免只能殺細胞外的黴漿菌，而無法殺細胞內的黴漿菌。Mynox®的作用機制是結合黴漿菌細胞膜，故需與黴漿菌直接接觸。建議適度用trypsin 將細胞打散，而不互相沾黏可增加效果。

3.3 Mynox® 毒性

Mynox® 濃度在10%到80%時，對某些細胞株有毒。故處理後的細胞數應足夠繼代培養。

4. 流程

操作流程乃針對一般常用的細胞株，Minerva Biolabs 無法胞證任何細胞株均適用。對個別情形可能需修改操作流程。

4.1 Adherent Cell Lines 的處理

4.1.1 準備細胞株與試劑

在一個滅菌的6 cm petri dish (勿用flasks)中進行混合Mynox®：

1. 2.8 ml 標準培養液含5 % v/v FCS。
2. 加入 200 µl Mynox® (1管)。
3. 轉2 ml 1×10^4 to 1×10^5 新鮮已用trypsin打散的細胞(培養液含5% (v/v) FCS)。此時混合液共5毫升。**于鏡檢下確認為單細胞狀態**。請加入細胞前先加入Mynox®，細胞直接加入Mynox® 中，避免蒸發。放入培養箱2-3小時。

4.1.2 移走Mynox®

放入培養箱2-3小時後，移走懸浮液，加入標準培養液。為達最佳效果，可在Mynox® 去除液中培養一個世代(約3-8天)，此時需隨時注意毒性，依但細胞毒性產生，更換培養液或1比5稀釋來終止反應。

4.2 Suspension Cell Lines的處理

4.2.1 準備細胞株與試劑

在離心管中混合Mynox®：

1. 1.6 ml 的 phosphate buffered saline (PBS)含0.125% trypsin 及5mM EDTA。
2. 加入 200 µl Mynox® (1管)
3. 轉1.6 ml 標準培養液含10 % v/v FCS 及 1×10^4 to 1×10^5 得懸浮細胞，此時混合液共3.4毫升。**于鏡檢下確認為單細胞狀態**。請加入細胞前先加入Mynox®，細胞直接加入Mynox® 中，避免蒸發。確認混合液完全包圍細胞，Trypsin 可避免細胞聚集，注意總反應體積務必為3.4 ml，不足用PBS補足。

4.2.2 移走Mynox®

1. 室溫下緩慢搖勻混合液共30 min。
2. 離心 600 x g, 5 min，去懸浮液。
3. 以無Mynox® 的標準培養液回沖細胞。
為達最佳效果，Mynox®可培養1世代：以5毫升含5 % v/v FCS and 150 µl Mynox®的細胞液回沖細胞，在flask及正常瓢件下培養3天，離心 600 x g, 5 min，去懸浮液。以無Mynox® 的標準培養液回沖細胞。此時需隨時注意毒性，依但細胞毒性產生，更換培養液或1比5稀釋來終止反應。

4.3 Nonenveloped Viruses(無被覆型病毒)的處理

4.3.1 準備細胞株與試劑

冷凍或新鮮細胞株及病毒懸浮液均可適用。病毒titer 不會影響處理結果。

在1.5 ml 離心管中混合Mynox®：

1. 1 ml 標準培養液不含FCS。
2. 加入 100 µl Mynox®
3. 轉125 µl 病毒液(含8 % FCS)， into the mixture. 此時混合液共1.225豪升。

4.3.2 移走Mynox®

1. 室溫下緩慢搖勻混合液共2小時。
2. 1比10稀釋來終止反應。在使用此病毒之前需檢測黴漿菌。

4.4 Enveloped Viruses(被覆型病毒)的處理

病毒外莢為脂質，似黴漿菌細胞膜，為Mynox®作用目標。故會中和Mynox®的效力。所以病毒titer 應高於 10^6 TCID₅₀。

4.4.1 準備細胞株與試劑

冷凍或新鮮細胞株及病毒懸浮液均可適用。

在15 ml 離心管中混合Mynox®：

1. 4.4 ml標準培養液不含FCS。
2. 加入 100 µl Mynox®
3. 轉500 µl 病毒液(含8 % FCS)到混合液。此時混合液共5豪升。

4.4.2 移走Mynox®

室溫下緩慢搖勻混合液共30 min。1比10稀釋來終止反應。在使用此病毒之前需檢測黴漿菌。

以上流程可重複到黴漿菌完成移除為止。

5. 檢測黴漿菌

在Mynox處理過後，可繼代在不含抗生素的培養液，然後再偵測黴漿菌是否再現。建議使用Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit (Cat.-No. 11-1025/1050/1100/1250) 來偵測黴漿菌。因Mynox® 破壞黴漿菌細胞後，黴漿菌DNA可能暴露於培養液中，因此被PCR偵測出，而成偽陽性。但再經敬1-2繼代後，黴漿菌DNA可很快減少。

流程圖解

Scheme of the treatment of adherent cell lines

