

# Mynox®

## Mycoplasmen-Eliminierungsreagenz

### Inhaltsverzeichnis

1. Reagenzien und Materialien	2
1.1 Inhalt der Packung	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Zusätzlich benötigtes Material	2
2. Anwendungsgebiet und Wirkungsprinzip	2
3. Probenmaterial	3
3.1 Die Bedeutung der Serumkonzentration	3
3.2 Grenzen von Mynox®	3
3.3 Zytotoxizität von Mynox®	3
4. Durchführung der Behandlung	3
4.1 Adhärenz Zellen	3
4.1.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes	3
4.1.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®	4
4.2 Suspensionszellen	4
4.2.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes	4
4.2.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®	4
4.3 Unbehüllte Viren	5
4.3.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes	5
4.3.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®	5
4.4 Umhüllte Viren	5
4.4.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes	5
4.4.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®	6
5. Kontrolle des Behandlungserfolges	6
6. Vorsichtsmaßnahmen	6
Anlage	14

### CONTENTS

1. Reagents and Materials	8
1.1 Kit Components	8
1.2 Stability and Storage	8
1.3 Supplemental Requirements	8
2. Application and Test Principle	8
3. Sample Material	8
3.1 Importance of Serum Concentration	8
3.2 Limits of Mynox®	9
3.3 Cytotoxicity of Mynox®	9
4. Protocol Guide	9
4.1 Treatment of Adherent Cell Lines	9
4.1.1 Preparation of cells and the elimination mix	9
4.1.2 Treatment and Mynox® removal	9
4.2 Treatment of Suspension Cell Lines	10
4.2.1 Preparation of cells and the elimination mix	10
4.2.2 Treatment and Mynox® removal	10
4.3 Treatment of Nonenveloped Viruses	10
4.3.1 Preparation of cells and the elimination mix	10
4.3.2 Treatment and Mynox® removal	11
4.4 Treatment of Enveloped Viruses	11
4.4.1 Preparation of cells and the elimination mix	11
4.4.2 Treatment and Mynox® removal	11
5. Testing for mycoplasma	12
Appendix	14

## 1. Reagenzien und Materialien

### 1.1 Inhalt der Packung

Arbeitsanleitung

Mynox® Reagenz

gebrauchsfertig, steril, in phosphatgepufferter Saline (pH 7.4), aliquotiert á 220 µl

Best.Nr. 10-0200	2 Behandlungen
Best.Nr. 10-0500	5 Behandlungen
Best.Nr. 10-1000	10 Behandlungen

### 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Mynox® kann bei Raumtemperatur versendet und bei 2 bis 8 °C ungeöffnet langfristig gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Box- und dem Tünetikett angegeben.

### 1.3 Zusätzlich benötigtes Material

- übliche Ausstattung eines Zellkulturlabors
- sterile Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen
- Zellkulturmedium, fötales Kälberserum, phosphatgepufferte Saline (PBS), Trypsin
- kleine Kulturschalen (z.B. Plastik-Petrischalen, 6 cm Durchmesser)
- sensitiver Mykoplasmentest zur Überprüfung des Eliminierungserfolges (z.B. Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection Kit von Minerva Biolabs)

## 2. Anwendungsgebiet und Wirkungsprinzip

Mit Mykoplasmen infizierte Zellen werden üblicherweise mit Standardantibiotika, wie Minocyclin und diversen Quinolinderivaten behandelt. Die Effizienz dieser 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® ist ein Reagenz zur dauerhaften Eliminierung von Mykoplasmen und Acholeplasmen in Zellkulturen, Virussuspensionen und anderen biologischen Agenzien. Der aktive Wirkstoff ist ein in PBS 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® mit dieser Lipidmembran werden Permeabilitätsveränderungen induziert. Die Mykoplasmenmembran platzt innerhalb von Minuten an einigen Stellen auf und durch Osmolyse kommt es zur vollständigen Zerstörung der Mykoplasmen. Die eukaryontische Zelle wird erst bei deutlich höheren Wirkstoffkonzentrationen beeinflusst.

Durch die dauerhafte Eliminierung der Mykoplasmen finden die behandelten eukaryontischen Zellen schnell zu ihrem natürlichen Metabolismus und zu normalen Proliferationsraten zurück. Bis jetzt konnte keine dauerhafte Veränderung des natürlichen Zellmetabolismus durch die Behandlung mit Mynox® gefunden werden.

**Mynox® ist nur für Forschungszwecke bestimmt.**

### 3. Probenmaterial

#### 3.1 Die Bedeutung der Serumkonzentration

Mynox® adsorbiert an Lipid- und Proteinbestandteilen des Serumzusatzes. Dadurch verringert sich mit steigender Serumkonzentration im Eliminierungsansatz die Anti-Mykoplasmenwirkung von Mynox®.

Die hier beschriebenen Behandlungsprotokolle gehen von einer Konzentration an fötalem Kälberserum von 5 % (v/v) im Ansatz aus. Die Art des verwendeten Zellkulturmediums (z.B. DMEM, RPMI1640) hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg. Bei der Behandlung von Viren sollte auf die Verwendung von Serum als Zusatz zum Eliminierungsansatz verzichtet werden.

#### 3.2 Grenzen von Mynox®

Grundsätzlich treten Mykoplasmen in Zellkulturen extrazellulär auf. In der Literatur wird *Mycoplasma penetrans* als zellinvasive *Mycoplasma*-Spezies beschrieben. Mynox® benötigt zur Wirkungsentfaltung den direkten Kontakt zum Mykoplasma-Partikel. Eine Behandlung von zellinvasiven Mykoplasmen mit Mynox® würde nicht erfolgreich sein. Bisher wurde *Mycoplasma penetrans* nicht als Kontaminante in Zellkulturen gefunden.

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

Mit steigender Serumkonzentration wird die Aktivität von Mynox® abgepuffert. Die Behandlung von biologischen Agenzien mit hohen Protein- und Lipidkonzentrationen ist daher nicht möglich.

#### 3.3 Zytotoxizität von Mynox®

Vergleichbar mit anderen Produkten zur Mykoplasmenbekämpfung ist auch Mynox® nicht frei von toxischen Einflüssen auf das zu kurierende Zell- und Virusmaterial. Unsere Protokolle wurden an einer Vielzahl von Zelllinien und Viruskulturen getestet. In Abhängigkeit von der Sensitivität der einzelnen Zelllinie ergab sich ein Verlust an vitalem Zellmaterial von 10 bis 80 %. In allen Fällen verblieben nach der Behandlung ausreichend Zellen, um nach nur kurzer Kultivierung wieder hohe Dichten zu erreichen.

### 4. Durchführung der Behandlung

Die hier beschriebenen Anwendungen wurden an weit verbreiteten Zelllinien unter Verwendung von standardisierten Kulturmedien erprobt. Minerva Biolabs kann aufgrund der Vielzahl möglicher Anwendungen von Mynox® nicht alle Anwendungsmöglichkeiten in dieser Arbeitsanleitung beschreiben. Eine individuelle Anpassung der Arbeitsanleitungen kann notwendig werden. Bei Fragen steht Ihnen der Technische Support der Minerva Biolabs gerne zur Verfügung.

#### 4.1 Adhärenz Zellen

##### 4.1.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes

In einer sterilen Kulturschale mit 6 cm Durchmesser (keine Zellkulturflasche!)

1. 2,8 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FKS und 200 µl Mynox® (1 Röhrcheninhalt) mischen
2. 2 ml Zellkulturmedium mit 5 % (v/v) FKS und  $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  frisch trypsinierten Zellen hinzugeben  
Die Pipettenspitze dabei in den Eliminierungsansatz eintauchen.
3. Das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 5 ml.



**Es müssen Einzelzellen eingesetzt werden (am Mikroskop überprüfen!). Ggf. muss die Dauer der Trypsineinwirkung verlängert oder Zellklumpen mechanisch, z.B. mittels einer Pipette durch wiederholte Aufnahme und Abgabe, gelöst werden.**



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

#### **4.1.2 Behandlungsdauer und Entfernung von Mynox®**

Die Zellen werden im Eliminierungsansatz kultiviert (CO<sub>2</sub>-Inkubator), bis die meisten Zellen an der Kulturschale adhärirt sind (ca. 2-3 Stunden). Danach wird das Eliminierungsreagenz durch Mediumwechsel entfernt und die Zellen im üblicherweise verwendeten Kulturmedium aufgenommen.

Alternativ kann das Eliminierungsreagenz für die Dauer einer Passage von 3-5 Tagen in der Kultur verbleiben und wird beim nächsten Umsetzen der Zellen durch Mediumwechsel entfernt.



**Während der Einwirkzeit muss die Kultur regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und bei Beobachtung deutlicher zytopathogener Effekte die Behandlung durch Mediumwechsel oder durch Verdünnung (5fach) sofort beendet werden.**

## **4.2 Suspensionszellen**

### **4.2.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes**

In einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen

1. 1,6 ml einer Trypsin:EDTA-Lösung (0,125 % Trypsin, 5 mM EDTA in PBS) mit 200 µl Mynox® (1 Röhrcheninhalt) mischen
2. 1,6 ml Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) FKS und 1x10<sup>4</sup> bis 1x10<sup>5</sup> Suspensionszellen hinzugeben. Pipettenspitze dabei direkt in die vorgelegten Reagenzien tauchen. Röhrchen dicht verschließen.

Das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 3,4 ml.



**Der Eliminierungsansatz muss die gesamte Innenseite des Röhrchens benetzen.**



**Für eine erfolgreiche Behandlung müssen Einzelzellen eingesetzt werden.**

Das Trypsin soll die Bildung von Zellklumpen während der Behandlung verhindern. Dieser Effekt kann auch mit anderen Reagenzien oder Methoden erreicht werden. Liegen die Zellen bereits einzeln vor, kann auf die Beigabe eines entsprechenden Reagenzes verzichtet werden. In jedem Fall muss das Volumen des Eliminierungsansatzes 3,4 ml betragen und ist ggf. mit PBS aufzufüllen.

### **4.2.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®**

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert. Die Zellen werden schonend abzentrifugiert (600 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird im Standard-Zellkulturmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt.

Alternativ kann die Effizienz der Behandlung durch kurzzeitige Subkultivierung in Gegenwart von Mynox® erhöht werden: Die Zellen werden in 5 ml Zellkulturmedium mit 5 % v/v FKS und 150 µl Mynox® aufgenommen. Die Zellen werden in eine neue Zellkulturflasche überführt und 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden dann schonend abzentrifugiert (600 x g, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in Mynox®-freiem Standardkulturmedium kultiviert. Bei dieser zusätzlichen Behandlung kann es zu einer deutlichen Verringerung der Zellzahl kommen.



**Die Kultur sollte während der Einwirkzeit regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und bei Beobachtung deutlicher zytopathogener Effekte die Behandlung durch Mediumwechsel oder Verdünnung (5fach) sofort beendet werden.**

### **4.3 Unbehüllte Viren**

#### **4.3.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes**

Die Virussuspension sollte frei von Zelltrümmern sein. Unbehüllte Viren sind gegenüber Mynox® stabil. Der Virustiter hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg.

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß

1. 1 ml Zellkulturmedium ohne FKS mit 100 µl Mynox® mischen
2. 125 µl Virussuspension hinzugeben und das Gefäß dicht verschließen.

Das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 1,225 ml.

#### **4.3.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®**

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert.



**Der Eliminationsansatz muss die gesamte Innenseite des Gefäßes benetzen.**

Die Reaktion wird durch eine Verdünnung des Eliminierungsansatzes mit Kulturmedium im Verhältnis 1:10 gestoppt. Dieser Arbeitsschritt kann mit der Anzucht einer Mykoplasmen-freien Viruskultur verbunden werden. Dazu wird der Eliminierungsansatz direkt in eine subkonfluente Kultur der Wirtszelllinie gegeben. Das Kulturvolumen sollte dem Zehnfachen des eingebrachten Eliminierungsansatzes entsprechen.



**Die Wirtszelllinie sollte vor der Infektion mit dem behandelten Virusmaterial auf eine eventuelle Verunreinigung mit Mykoplasmen getestet werden.**

### **4.4 Umhüllte Viren**

Die Lipidmembran umhüllter Viren ist vergleichbar mit der Plasmamembran von Mykoplasmen, dem Angriffsziel von Mynox®, aufgebaut. Umhüllte Viren können prinzipiell mit Mynox® bei längerer Einwirkzeit und höheren Wirkstoffkonzentrationen inaktiviert werden. Um nach der Behandlung einen für Subkultivierungen ausreichend hohen Titer zu erreichen, sollte der Ausgangstiter der zu behandelnden Suspension  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml überschreiten und die Behandlungsparameter genau eingehalten werden.

#### **4.4.1 Vorbereitung des Eliminierungsansatzes**

Die eingesetzte Virussuspension sollte frei von Zelltrümmern sein.

In einem sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen

1. 4,4 ml Zellkulturmedium, ohne FKS mit 100 µl Mynox® mischen
2. 0,5 ml Virussuspension zugeben und das Gefäß dicht verschließen.

Das Volumen des gesamten Behandlungsansatzes beträgt 5 ml.

#### 4.4.2 Behandlung und Entfernung von Mynox®

Die Mischung wird unter leichtem, gelegentlichem Schütteln im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert.



**Der Eliminationsansatz muss die gesamte Innenseite des Zentrifugenröhrchens benetzen.**

Die Reaktion wird durch eine Verdünnung des Eliminierungsansatzes mit Kulturmedium im Verhältnis 1:10 gestoppt. Dieser Arbeitsschritt kann mit der Anzucht einer Mykoplasmen-freien Viruskultur verbunden werden. Dazu wird der Eliminierungsansatz direkt in eine subkonfluente Kultur der Wirtszelllinie gegeben. Das Kulturvolumen sollte dem Zehnfachen des eingebrachten Eliminierungsansatzes entsprechen.



**Die Wirtszelllinie sollte vor der Infektion mit dem behandelten Virusmaterial auf eine eventuelle Verunreinigung mit Mykoplasmen getestet werden.**

### 5. Kontrolle des Behandlungserfolges

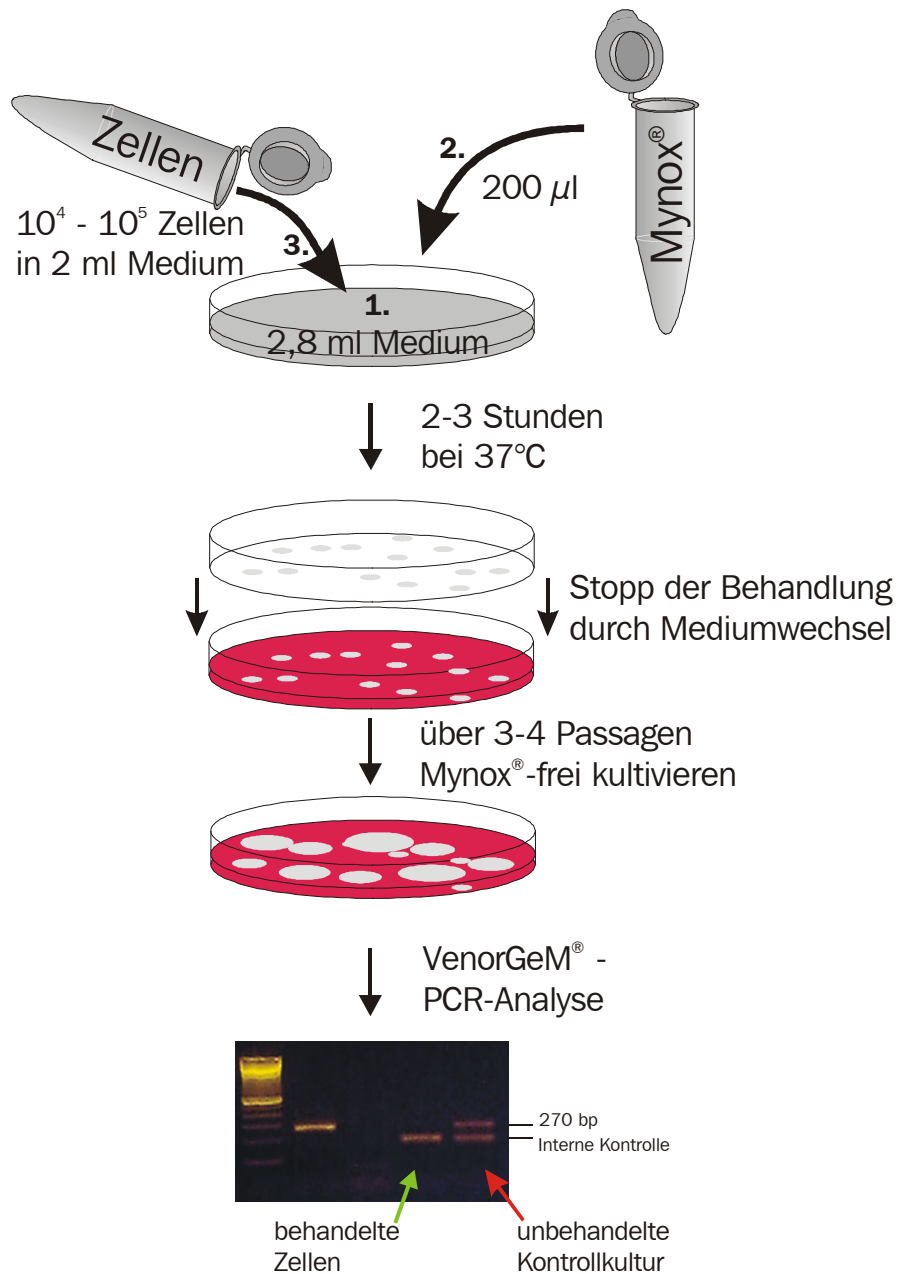
Um die dauerhafte Entfernung der Mykoplasmen sicher zu beurteilen, sollten behandelte Zell- und Viruskulturen für mindestens vier Passagen ohne Zugabe von Mykoplasma-wirksamen Antibiotika kultiviert und der Behandlungserfolg mit einer sensitiven Testmethode überprüft werden. Für eine zuverlässige Diagnostik empfehlen wir das Mykoplasmen-PCR-Diagnostikkit Venor®GeM (Bestellnr. 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.

### 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Handhabung der Reagenzien und des Probenmaterials erfolgt unter Beachtung geltender Laborregeln:

- Zum Pipettieren sind geeignete Pipettierhilfen zu verwenden.
- Im Arbeitsbereich sowie während des Umgangs mit den Reagenzien und dem Probenmaterial ist das Essen, Trinken oder Rauchen zu unterlassen.
- Das Probenmaterial, Testansätze und Verbrauchsmaterialien sind nach der Durchführung sachgemäß zu inaktivieren und zu entsorgen. Mynox® kann bedenkenlos der Abfallentsorgung zugeführt werden.

Schema für die Behandlung adhärent wachsender Zellen



## 1. Reagents and Materials

### 1.1 Kit Components

Instruction Manual

Mynox<sup>®</sup> Reagent: sterile, ready-to-use solution in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, aliquoted per tube for single applications, 220 µl/tube

Cat. No. 10-0200 2 tubes

Cat. No. 10-0500 5 tubes

Cat. No. 10-1000 10 tubes

### 1.2 Stability and Storage

Mynox<sup>®</sup> is stable until the expiry date given in the box or bag label if stored at +2 °C to +8 °C. Shipping at room temperature.

### 1.3 Supplemental Requirements

- Standard cell culture equipment
- Cell culture medium, fetal calf serum, phosphate-buffered saline (PBS), trypsin
- Sterile plastic ware, e.g. 6 cm petri dishes
- Mycoplasma detection system to verify the elimination success, e.g. Minerva Biolabs's Venor<sup>®</sup>GeM Mycoplasma PCR Detection Kit

## 2. Application and Test Principle

For both biological and economical reasons, it is important to eliminate mycoplasma from cell cultures being used for basic research, diagnostics, and biotechnological production. The most commonly used method for elimination, inactivation, or suppression of mycoplasma in cell cultures is treatment with antibiotics. In general, antibiotic therapies do not result in long-lasting, successful elimination. Also, the cytotoxic properties of antibiotics can cause undesirable side effects on eukaryotic cells and can facilitate the development of resistant mycoplasma strains.

Mynox<sup>®</sup> is the first biological reagent that actually eliminates mycoplasma by killing them. It has been shown to be effective with only one treatment. Mynox<sup>®</sup> activity is based on its biophysical properties, making the development of resistant strains highly unlikely and is easily removed after the treatment.

In comparison to mammalian cells, mycoplasma lack a cell wall but are encircled by a cytoplasmic membrane. Mynox<sup>®</sup> is a biological agent that integrates into the mycoplasma membrane and compromises its integrity. The result is an osmotic influx that leads to the complete disintegration of the mycoplasma membrane. With mycoplasma eradication, mammalian cells immediately return to their native morphology and normal proliferation rates. To date, Mynox<sup>®</sup> has not been shown to cause any changes in normal cell characteristics.

Mynox<sup>®</sup> is used for the elimination of *Mycoplasma* and *Acholeplasma* in cell and virus cultures, and other biologicals. **Mynox<sup>®</sup> is intended for research use only.**

## 3. Sample Material

### 3.1 Importance of Serum Concentration

The mycoplasmacidal activity of Mynox<sup>®</sup> is affected by the concentration of lipids and proteins in the reaction mixture, e.g. components in fetal calf serum supplement. These ingredients competitively bind Mynox<sup>®</sup> and prevent its binding to the mycoplasma membrane. Therefore, the protocol for mycoplasma elimination in cell cultures was designed for a specific standard cell culture medium, e.g. Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) or RPMI1640. For the treatment of cell lines, a protocol was designed that requires a supplement of 5 % v/v fetal calf serum. For virus stocks, it is highly recommended that the medium be almost free of supplemental serum during treatment.

### 3.2 Limits of Mynox®

Mynox® does not integrate into the cellular membrane. Therefore it cannot eliminate intracellular contamination. However, mycoplasma is an extracellular contaminate. *Mycoplasma penetrans* is the only species described intracellularly. Thus far, *M. penetrans* has not been reported as cell contaminant.

Also, due to the mitigating effect of serum, it is impossible to design a specific protocol that is applicable or the treatment of biologicals with high protein and lipid concentrations.

Since Mynox® works by biophysical means through association with the mycoplasma membrane, the reagent needs direct contact with the mycoplasma particle in order to be effective. Treatment of cell clusters should be avoided. Mycoplasma are protected in intercellular spaces as well as in pockets and clefts of the cell membrane, which can prevent contact with the drug. We suggest using trypsin to detach the cells from each other and to smoothen cell surfaces.

### 3.3 Cytotoxicity of Mynox®

Similar to all other products available for mycoplasma inactivation, Mynox® also shows a cytotoxic effect on adherent and nonadherent cell lines. Our protocols were tested on numerous cell lines and found to have a cytotoxicity between 10 and 80%, with enough viable cells recovered for further subcultivation. Generally, higher proliferation rates as a result of parasite removal will compensate for lost cell material.

## 4. Protocol Guide

These protocols have been designed for typical cell lines requiring standard media. Minerva Biolabs does not guarantee that these protocols will work in all laboratory situations. Modification of these protocols may be required per individual case.

### 4.1 Treatment of Adherent Cell Lines

#### 4.1.1 Preparation of cells and the elimination mix

Mix in a sterile 6 cm petri dish (do not use flasks)

1. 2.8 ml standard cell culture medium with 5 % v/v FCS
2. add 200  $\mu$ l Mynox® (1 tube)
3. transfer 2 ml of  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^5$  freshly trypsinized cells in cell culture medium with 5% (v/v) FCS into the mix.

The total volume of the treatment mixture is 5 ml.



**Ensure the treatment of single cells (check under microscope!). If necessary increase duration of trypsin treatment or detach the cells from each other by pipetting up and down.**



**Ensure that Mynox® is already present in the culture medium before adding cells. Add cells directly to the elimination mix to avoid evaporation (insert the pipett tip directly into the mix!).**

#### 4.1.2 Treatment and Mynox® removal

After 2 hours of incubation under normal growth conditions, remove the elimination mix by discarding the supernatant, then overlay the cells with standard cell culture medium.

For the most effective method, maintain the cells in the elimination mixture for one entire passage (approximately 3 to 8 days) under normal growth conditions. Then remove the medium containing Mynox® and subculture the cells in standard medium as normal.



**During treatment the cell culture should be checked frequently for cytotoxic effects and, if clearly noticeable, the reaction stopped immediately by medium change or 1:5 dilution of the mixture with medium.**

## **4.2 Treatment of Suspension Cell Lines**

### **4.2.1 Preparation of cells and the elimination mix**

Mix in a sterile centrifuge tube

1. 1.6 ml of 0.125% trypsin and 5mM EDTA in phosphate buffered saline (PBS)
2. add 200  $\mu$ l Mynox<sup>®</sup> (1 tube)
3. transfer 1.6 ml standard cell culture medium with 10 % v/v FCS and  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^5$  cells from a suspension cell line into the mixture

The total volume of the treatment mixture is 3.4 ml.



**Ensure the treatment of single cells only (check under microscope).**



**Ensure that Mynox<sup>®</sup> is already present in the culture medium before adding cells. Add cells directly to the elimination mix to avoid evaporation.**



**Ensure that the elimination mixture wets the complete inner surface of the centrifuge tube.**

Trypsin is needed to avoid cell aggregates. If cell separation can be achieved by other techniques replace the trypsin volume with cell culture medium before adding the cells to the elimination mix. In any case the total volume of the elimination mix has to be 3.4 ml, if necessary add PBS.

### **4.2.2 Treatment and Mynox<sup>®</sup> removal**

1. Shake the mixture gently at room temperature for 2 h.
2. Pellet the cells gently by centrifugation (600 x g, 5 min) and discard the supernatant.
3. Resuspend the cells in Mynox<sup>®</sup>-free standard cell culture medium.

For a more effective method, a subcultivation in the presence of Mynox<sup>®</sup> for 1 passage is possible: Resuspend the cells in 5 ml cell culture medium containing 5 % v/v FCS and 150  $\mu$ l Mynox<sup>®</sup>. Incubate the cells in this medium for 3 days in a culture flask under normal growth conditions followed by separating the cells from the elimination mixture by centrifugation, then subculture the cells in Mynox<sup>®</sup>-free growth medium.



**During treatment the cell culture should be checked frequently for cytotoxic effects and, if clearly noticeable, the reaction stopped immediately by medium change or 1:5 dilution of the mixture with medium.**

## **4.3 Treatment of Nonenveloped Viruses**

### **4.3.1 Preparation of the cells and the elimination mix**

Frozen or fresh aliquots of cell and cell debris-free virus suspensions can be treated. The virus titer does not influence the success of the treatment.

Mix in a sterile 1,5 ml reaction tube with safety-lock tops:

1. 1 ml cell culture medium containing no FCS
2. add 100  $\mu$ l Mynox<sup>®</sup>
3. transfer 125  $\mu$ l virus stock, containing up to 8 % FCS into the mixture.

The total volume of the treatment mixture is 1.225 ml.



**Ensure that the elimination mixture wets the complete inner surface of the reaction tube.**

#### **4.3.2 Treatment and Mynox® removal**

1. Incubate the elimination mixture at room temperature by gentle shaking for 2 hours.
2. The reaction is stopped by diluting Mynox® 1:10 in culture medium. This step can be accomplished by using the elimination mixture to infect a subconfluent, host cell culture for simultaneous propagation of the mycoplasma free virus culture. Final volume should be 10x that of the elimination mixture.



**Test the host cell line for mycoplasma contamination prior to infection.**

#### **4.4 Treatment of Enveloped Viruses**

The composition of the outer lipid membrane of enveloped viruses is comparable to the mycoplasma membrane, the target of Mynox®. These viruses are also vulnerable to Mynox® inactivation depending on the treatment time and concentration used. To achieve mycoplasma-free virus suspensions with an acceptable level for subcultivation, the initial virus titer should be higher than 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>.

##### **4.4.1 Preparation of cells and the elimination mix**

Frozen or fresh aliquots of cell and cell debris-free virus suspensions can be treated.

Mix in a sterile 15 ml screw cap reaction tube :

1. 4.4 ml cell culture medium containing no FCS
2. add 100 µl Mynox®
3. transfer 0.5 ml virus stock, containing up to 8 % FCS into mixture.

The total volume of the treatment mixture is 5 ml.



**Ensure that the elimination mixture wets the complete inner surface of the reaction tube.**

##### **4.4.2 Treatment and Mynox® removal**

Incubate the elimination mixture at room temperature by gentle shaking for 30 min.

The reaction is stopped by diluting Mynox® 1:10 in culture medium. This step can be accomplished by using the elimination mixture to infect a subconfluent culture of the host cell line for simultaneous propagation of the mycoplasma free virus culture. Final volume should be 10x that of the elimination mixture.

**Test the host cell line for mycoplasma contamination prior to infection.**



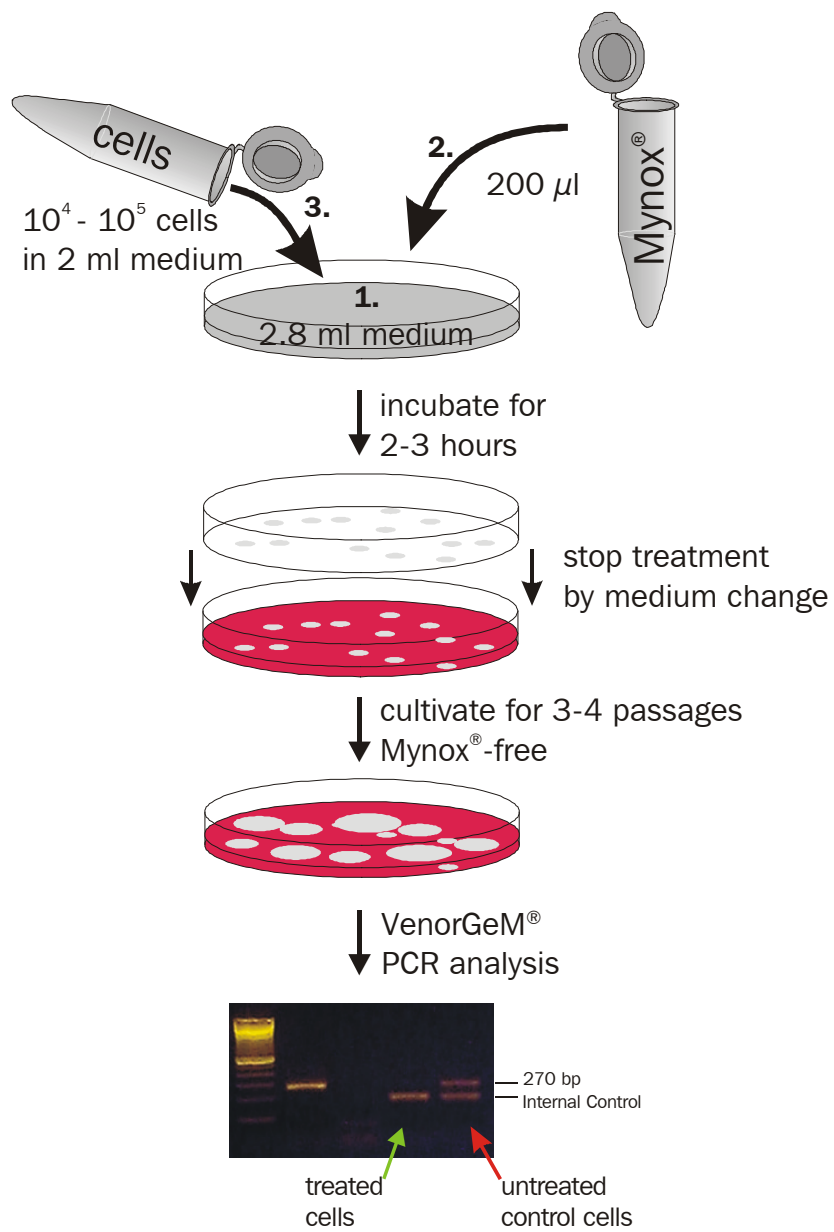
**These mycoplasma elimination procedures can be repeated with the viruses directly harvested from the host cell cultures to ensure that all mycoplasma have been removed.**



## 5. Testing for Mycoplasma

Mynox<sup>®</sup>-treated cell cultures and virus stocks should be subcultivated for four additional passages without mycoplasma-active antibiotics and then assayed for mycoplasma re-emergence to validate culture purity. For highly sensitive detection of mycoplasma contamination, we recommend Venor<sup>®</sup>GeM Mycoplasma Detection Kit that uses PCR technology (Cat.-No. 11-1025/1050/1100/1250). PCR detection methods should not be used instantly after treatment. Mynox<sup>®</sup> is lysing the mycoplasma particles and the mycoplasma DNA is released into the culture medium. This DNA would be detected by PCR giving false-positive results. Medium replacement and extracellular DNAses will reduce the level of free mycoplasma DNA within 1 to 2 passages.

Scheme of the treatment of adherent cell lines



## **Appendix**

### *Limited Product Warranty*

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

### *Notice to Purchaser: Limited License*

The purchase price of this product includes a limited, non-transferable license under German Patent 195 21 938 or its foreign counterpart, owned by Minerva Biolabs GmbH, to use only this amount of the product to practice the Mynox<sup>®</sup> technique. No right to perform or offer commercial services of any kind using Mynox<sup>®</sup> is hereby granted by implication or estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting Minerva Biolabs GmbH, Köpenicker Straße 325, 12555 Berlin, Germany.

### *Trademarks*

Mynox, Venor<sup>®</sup>GeM , Onar and Mycoplasma Off are registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH, Germany.

## Minerva Biolabs' International Distributors

### Argentina

Chemetron Latinoamericana S.A.  
Tel: +54 11 4393 9613  
Fax: +54 11 4953 8918  
Email: info@chemetron.com.ar  
Web: www.chemetron.com.ar

### Australia

Biocene Pty. Ltd.  
Tel: +61 2 9966 8166  
Fax: +61 2 9966 8300  
Email: jenny@biocene.com

### Austria

BioProducts  
Tel: +43 2268 61 65 11  
Fax: +43 2268 61 65 44  
Email: info@bioproducts.at  
Web: www.bioproducts.at

### Belgium, Luxembourg

Lucron Bioproducts bvba  
Tel: +32 92 82 05 31  
Fax: +32 92 82 05 32  
Email: info@lucronbioproducts.com  
Web: www.lucronbioproducts.com

### Canada + USA

Medicorp Inc.  
Tel: +1 514 7331 900  
Fax: +1 514 7331 212  
Email: mktg@medicorp.com  
Web: www.medicorp.com

### China

Vian-Saga Biological Technology Ltd.  
Tel: +86 10 8411 8493  
Fax: +86 10 8411 8494  
Email: Michael@vian-saga.com

### Czech Republic

BIO-Consult Laboratoriers spol. sro.  
Tel: +42 2 4447 1239  
Fax: +42 2 4447 1239  
Email: info@bioconsult.cz  
Web: www.bioconsult.cz

### Finland

Immuno Diagnostic Oy  
Tel: +358 3 615 370  
Fax: +358 3 682 2039  
Email: info@immunodiagnostic.fi  
Web: www.immunodiagnostic.fi

### France

Biovalley  
Tel: +33 1 6007 2020  
Fax: +33 1 6007 5051  
Email: biovalley@biovalley.fr  
Web: www.biovalley.fr

### Greece

Bioanalytica S.A.  
Tel: +30 210 6400 318  
Fax: +30 210 6462 748  
Email: bioanalyt@hol.gr  
Web: www.bioanalytica.gr

### Greece

Varelas S.A.  
Tel: +30 210 5281 901  
Fax: +30 210 5220 926  
Email: varelas@otenet.gr

### Great Britain

Cambio Ltd.  
Tel: +44 1954 210 200  
Fax: +44 1954 210 300  
Email: support@cambio.co.uk  
Web: www.cambio.co.uk

### India

Zelle Biotechnology Pvt. Ltd.  
Tel: +91 22 2685 87 41  
Fax: +91 22 2685 87 44  
Email: anurag@zellebiotech.com

### Ireland

Medical Supply Company  
Tel: +353 1 8224 222  
Fax: +323 1 8224 100  
Email: dmcjade@medical-supply.ie  
www.medical-supply.ie

### Israel

NBT New Biotechnology Ltd.  
Tel: +972 2 673 2001  
Fax: +972 2 673 1611  
Email: nbtsales@nbtid.com

### Italy

Biospa  
Tel: +39 2 891 391  
Fax: +39 2 891 20996  
Email: biospa@spaspa.it  
Web: www.spaspa.it/biospa.htm

### Japan

Funakoshi Co. Ltd.  
Tel: +81 3 5684 1615  
Fax: +81 3 5684 1775  
Email: info@funakoshi.co.jp  
Web: www.funakoshi.co.jp

### Korea

Bio and Information Corp  
Tel: +82 31 7139 439  
Fax: +82 31 7139 438  
Email: sales@bioninfo.com  
Web: www.bioninfo.com

### Lithuania

Interlux  
Tel: +370 5 27 86 850  
Fax: +370 5 27 96 728  
Email: marius@interlux.lt  
Web: www.interlux.lt

### Malaysia

Helix Biotech (M) Sdn Bhd  
Tel: +60 390 76 80 10  
Fax: +60 390 76 80 07  
Email: helixbio@tm.net.my  
Web: www.helixbiot.com

### Netherlands

Lucron Bioproducts B.V.  
Tel: +31 485 51 16 75  
Fax: +31 485 51 20 52  
Email: lucron@lucron.nl  
Web: www.lucron.nl

### New Zealand

Medical & Scientific Ltd.  
Tel: +64 96 34 10 36  
Fax: +64 96 34 51 46  
Email: nzms@nzms.co.nz  
Web: www.nzms.co.nz

### Norway

E. Pedersen & Son  
Tel: +47 22 95 59 59  
Fax: +47 22 95 59 40  
Email: eped@eped.com  
Web: www.eped.com

### Poland

STI  
Tel: +48 61 641 77 59  
Fax: +48 61 641 77 58  
Email: office@sti.biz.pl  
Web: www.sti.biz.pl

### Portugal

Quilaban Lda.  
Tel: +21 923 63 50  
Fax: +21 923 63 89  
Email: quilaban@quilaban.pt  
Web: www.quilaban.pt

### Slovenia

Kemomed d.o.o.  
Tel: +386 4 201 50 50  
Fax: +386 4 201 50 55  
Email: info@kemomed.si  
Web: www.kemomed.si

### Spain

LacClinics S.A.  
Tel: +34 3 446 47 00  
Fax: +34 3 348 10 39  
Email: info@labclinics.com  
Web: www.labclinics.com

### Sweden

ANL-Produkter AB  
Tel: +46 8 99 00 90  
Fax: +46 8 99 20 40  
Email: info@anl.se  
Web: www.anl.se

### Switzerland

Socochim SA  
Tel: +41 21 721 04 50  
Fax: +41 21 721 04 51  
Email: info@socochim.ch  
Web: www.socochim.ch

### Taiwan

Only Science Co. Ltd.  
Tel: +886 2 2758 5926  
Fax: +886 2 2758 6305  
Email: cychen@onlyscience.com.tw

### Thailand

Biomed Diagnostic Co. Ltd.  
Tel: +66 2 8796 026  
Fax: +66 2 8796 065  
Email: somboon@biomedthai.com  
Web: www.biomedthai.com

### Turkey

Genomed Saglik Hizmetleri A.S.  
Tel: +90 212 248 20 00  
Fax: +90 212 220 15 64  
Email: muratyzici@genomedtr.com  
Web: www.genomed-biotech.com

### USA

Sigma-Aldrich  
Tel: +1 314 771 57 50  
Fax: +1 314 771 57 57  
Email: sigma@sial.com  
Web: www.sigma-aldrich.com

## Related Products for Cell Culture Contamination Control

### Diagnostic Kits for conventional PCR

11-1025	Venor <sup>®</sup> GeM Mycoplasma Detection Kit	25	tests
11-1050	Venor <sup>®</sup> GeM Mycoplasma Detection Kit	50	tests
11-1100	Venor <sup>®</sup> GeM Mycoplasma Detection Kit	100	tests
11-1250	Venor <sup>®</sup> GeM Mycoplasma Detection Kit	250	tests

### Diagnostic Kits for real-time PCR

11-4025	Venor <sup>®</sup> GeM-qEP Mycoplasma ssp. Dedection Kit	25	tests
11-4250	Venor <sup>®</sup> GeM-qEP Mycoplasma ssp. Dedection Kit	250	tests
11-6025	Venor <sup>®</sup> GeM-qDual Mycoplasma Dedection Kit with external Inhibition control	25	tests
11-6025	Venor <sup>®</sup> GeM-qDual Mycoplasma Dedection Kit with external Inhibition control	100	tests
11-6025	Venor <sup>®</sup> GeM-qDual Mycoplasma Dedection Kit with external Inhibition control	250	tests

### Polymerases

53-0050	MB TAQ DNA Polymerase	50	units
53-0100	MB TAQ DNA Polymerase	100	units
53-0200	MB TAQ DNA Polymerase	200	units
53-0250	MB TAQ DNA Polymerase	250	units

### Genomic DNA Extracts 100 µl each

51-0101	<i>Legionella pneumophila</i> , ATCC 33152	+/-	10 ng / 100 µl
51-1514	<i>Legionella pneumophila subsp. fraseri</i> , DSMZ 7514	+/-	10 ng / 100 µl
51-1515	<i>Legionella pneumophila subsp. pascullei</i> , DSMZ 7515	+/-	10 ng / 100 µl
51-1368	<i>Legionella bozemanii</i> , NC 011368	+/-	10 ng / 100 µl
51-1370	<i>Legionella dumoffii</i> , NC 011370	+/-	10 ng / 100 µl
51-1723	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , NC 001723	+/-	10 ng / 100 µl
51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566	+/-	10 ng / 100 µl
51-0792	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , DSMZ 792	+/-	10 ng / 100 µl
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571	+/-	10 ng / 100 µl
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415	+/-	10 ng / 100 µl
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177	+/-	10 ng / 100 µl
51-0111	<i>M. hominis</i> , NC 010111	+/-	10 ng / 100 µl
51-0112	<i>M. orale</i> , NC 010112	+/-	10 ng / 100 µl
51-0113	<i>M. salivarium</i> , NC 010113	+/-	10 ng / 100 µl
51-0115	<i>M. gallisepticum</i> , NC 010115	+/-	10 ng / 100 µl
51-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> , NC010116	+/-	10 ng / 100 µl
51-0117	<i>M. fermentans</i> PG19, NC 010117	+/-	10 ng / 100 µl
51-0119	<i>M. pneumoniae</i> , NC010119	+/-	10 ng / 100 µl
51-0129	<i>M. arginini</i> , NC 010129	+/-	10 ng / 100 µl
51-0130	<i>M. hyorhinis</i> , NC 010130	+/-	10 ng / 100 µl
51-0162	<i>M. arthritidis</i> , NC 010162	+/-	10 ng / 100 µl
51-0195	<i>M. genitalium</i> , NC 010195	+/-	10 ng / 100 µl
51-1746	<i>M. penetrans</i> , NC 11746	+/-	10 ng / 100 µl

### Quantification Standards 100 µl each

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0112	<i>Mycoplasma orale</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl
52-0116	<i>Acholeplasma laidlawii</i> DNA Standard	1x10 <sup>6</sup>	genomes/µl

### Mycoplasma Off<sup>®</sup>

15-1000	Surface Disinfectant Spray	1000	ml
15-5000	Surface Disinfectant Spray, refill	5000	ml

### DNA Remover<sup>™</sup>

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250	ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottle	4x 500	ml