

- Zellen mit DAPI-Methanol bedecken und 15 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Anfärbelösung entfernen.
- Einmal mit Methanol waschen.
- Deckglas umgekehrt auf einen Objektträger (1 Tropfen Glycerin oder PBS dazwischen) legen und unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 340/380 nm Anregungsfilter und LP 430 nm Sperrfilter untersuchen (z. B. Leitz-Filter-Kombination: BP 340–380, RKB 400, LP 430; Zeiss-Filter-Kombination: BP 365/11, FT 395, LP 397 oder BP 340–380, RKP 400, LP 430). Eine 500fache (40 × 12,5) Vergrößerung ist normalerweise ausreichend, um hell fluoreszierende Mycoplasmen nachzuweisen. Die besten Ergebnisse erzielt man aber mit einem 100 × Ölmissions-Objektiv.

Anfärbung von Suspensionskulturen

- Zellen schonend abzentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- Einmal mit DAPI-Methanol waschen.
- Zellen in DAPI-Methanol (Arbeitslösung 1 µg/ml) suspendieren und 15 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Zellen schonend abzentrifugieren.
- Anfärbelösung absaugen.
- Zellen in wenig PBS resuspendieren.
- Einen Tropfen auf einen Objektträger geben, mit einem Deckglas abdecken und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachten.

Permanente Präparationen

- Anfärben wie oben.
- Anfärbelösung entfernen.
- Einmal mit Methanol waschen.
- Lufttrocknen.
- Präparat in ein geeignetes, das Ausbleichen verhandelndes Einbettmittel einbetten [z. B. Glycerin/PBS (1:10) mit 4-Phenylendiamin, 2–7 mmol/l, pH 8,5–9,0 (8)].

Beurteilung

Eine nicht-kontaminierte Zellkultur zeigt nur nukleäre Fluoreszenz gegen einen dunklen zytoplasmatischen Hintergrund. Mitochondriale DNA bindet ebenfalls das Fluorochrom, jedoch in so geringen Mengen, die in der Routine-Fluoreszenz-Mikroskopie nicht nachweisbar sind. Mycoplasmen dagegen, die eine ca. 10fach höhere DNA-Konzentration als Mitochondrien aufweisen, können leicht als kleine helle Punkte gegen einen dunklen Hintergrund erkannt werden. Es

entstehen feine Punkte im Zytoplasma und manchmal auch im interzellulären Raum (s. Abb. 1). Nicht alle Zellen sind notwendigerweise infiziert. Deshalb sollte das ganze Präparat sorgfältig geprüft werden, bevor man eine Kultur als nicht-kontaminiert deklariert.

Um die Analyse an vielen unterschiedlichen Zellen zu erleichtern, um sehr niedrige Kontaminationen in resistenten Zelllinien zu entdecken und um potentiell infizierte Seren zu screenen, ist es empfehlenswert, Indikatorzellen wie z. B. 3T6 Maus-Embryofibroblasten, Vero-Affenzellen oder Mv1Lu Nierz-Lungenzellen (9) zu verwenden. Die zu untersuchenden Proben werden der Indikator-Zellkultur zugesetzt und nach einer geeigneten Inkubationszeit wird die Indikator-Zelllinie auf Anwesenheit von Mycoplasmen untersucht.



Abb. 1

DNA-Färbung bei der Zelllinie L-929 mit DAPI.

a) Zellkultur mit einer Mycoplasmenkontamination.

b) Vollständige Abwesenheit von Mycoplasmen nach 3 Behandlungszyklen mit BM-Cyclin* (mit freundlicher Genehmigung von J. Schmidt, München).

Literatur

- 1 Barile, M. F., Hopps, H. E. & Grabowski, M. W. (1978) In: Mycoplasma Infection of Cell Cultures (McGarrity, G. J., Murphy, D. G. & Nichols, W. W., Hrsg.) Plenum Press, New York, S. 35–45.
- 2 McGarrity, G. J. (1982) In: Advances in Cell Culture, Vol. 2 (Maramorosch, K., Hrsg.) Academic Press, New York, S. 99–131.
- 3 McGarrity, G. J. & Kotani, H. (1985) In: The Mycoplasmas, Vol. IV (Razin, S. & Barile, M. F., Hrsg.) Academic Press, New York, S. 353–390.
- 4 McGarrity, G. J., Vanaman, V. & Sarama, J. (1984) In Vitro 20, 1–18.
- 5 Russel, W. C., Newman, C. & Williamson, D. H. (1975) Nature 253, 461–462.
- 6 Chen, T. R. (1977) Exp. Cell. Res. 104, 255–262.
- 7 Hessling, J. J., Miller, S. E. & Levy, N. L. (1980) J. Immunol. Methods 38, 315–324.
- 8 Krenik, K. D. et al. (1989) J. Immunol. Meth. 117, 91–97.
- 9 Darai, G. et al. (1983) In Vitro 19, 7–15.

* zu beziehen von Boehringer Mannheim GmbH