

# CELL CULTURE CONTAMINATION



## OVERVIEW OF MICROBIAL CONTAMINANTS

微生物は、気付かれないうまどまったり、急速に増殖したりすることによって、細胞の形態と機能に重大な影響を及ぼすことから、皆さんの研究にとって深刻な脅威となります。InvivoGen社は、微生物の検出ツールや除去試薬だけでなく、予防のためのヒントも提供しています。

- Protect your cells
- Mycoplasma contaminations
- Bacterial contaminations
- Endotoxin contaminations
- Fungal contaminations

# InvivoGen *infocus*

## A PRACTICAL GUIDE TO AVOID CELL CULTURE CONTAMINATION

4  
PAGE

### **YOUR CELLS ARE PRECIOUS, PROTECT THEM!**

Detection  
Prevention  
Elimination

5  
PAGE

### **MYCOPLASMA CONTAMINATIONS**

Mycoplasma features & dangers  
Detection of mycoplasma contamination  
Elimination of mycoplasma

10  
PAGE

### **BACTERIAL CONTAMINATIONS**

The usual suspects  
How to detect bacterial contamination?  
Elimination of bacteria

12  
PAGE

### **ENDOTOXIN CONTAMINATIONS**

What are endotoxin features?  
What are the risks for my experiments?  
Detection of endotoxins in biological reagents

14  
PAGE

### **FUNGAL CONTAMINATIONS**

How to detect fungal contamination in cell cultures?  
Elimination of fungi

15  
PAGE

### **SUMMARY TABLE OF INVIVOGEN'S ANTIMICROBIAL AGENTS**

### **REFERENCES**

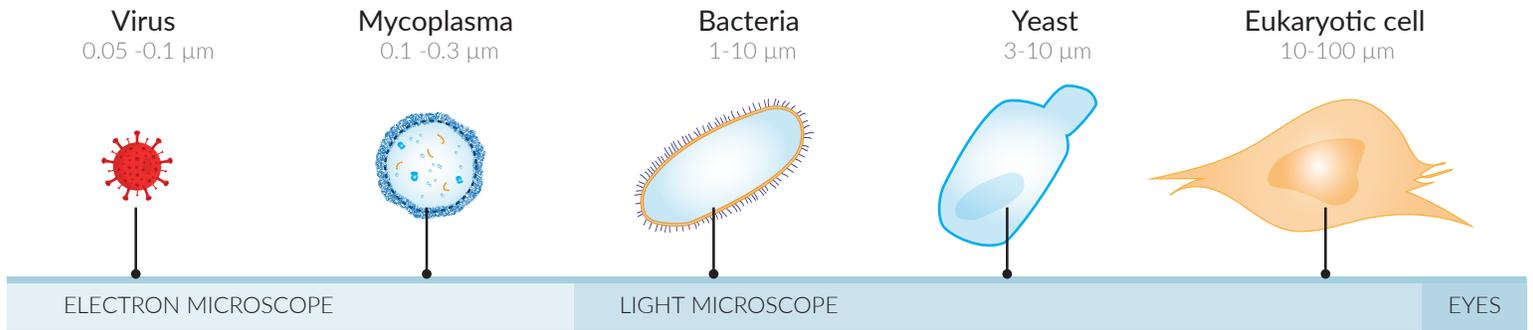
**細**胞培養における微生物汚染は、皆さんの研究にとって重大かつ執拗な脅威です。侵襲性のマイコプラズマ、バクテリア、および真菌は、培養細胞を殺傷したり劇的に変化させたりするため、悲惨な結果、時間の浪費、資源の無駄遣いにつながります。この冊子では、培養物に侵入する可能性が最も高い汚染物質を取り上げ、それらを回避するためのグッドプラクティス(優れた実践)や、それらを排除するための解決策をご紹介します。自然免疫と微生物学の専門家である InvivoGen 社は、こういった生物汚染が実験結果にどのような影響を及ぼし得るのかを十分に理解しています。細菌性および真菌性の汚染はいずれは肉眼で検知できますが、マイコプラズマやエンドトキシンは肉眼ではいつまでたっても見えません。汚染に気付かなければ、データの誤った解釈につながる可能性があります。これは深刻な問題であり、実際そのようなデータはこれまで多く発表されてきました。その結果、学術誌は現在、細胞培養中にマイコプラズマおよびエンドトキシンがないことを示すエビデンスを頻繁に求めるようになっています。さらに、将来の治療薬を開発する製薬会社は、汚染の発生により会社の研究と評判に傷がついてしまうため、決して汚染を見逃すことはできません。InvivoGen 社は卓越性を追求する企業であり、高品質の製品とマイコプラズマフリーの細胞株を世界中に提供しています。このガイドでは、微生物感染のあらゆる段階に対処する方法に加えて、細胞培養汚染の検出・排除・予防に適切な InvivoGen 社製品の選択についてアドバイスを提供します。

## ABBREVIATIONS

**CFU**: colony-forming unit  
**DNA**: deoxyribonucleic acid  
**IRF**: interferon regulatory factor  
**kDa**: kilodalton  
**LAL**: limulus amoebocyte lysate  
**LPS**: lipopolysaccharide

**NF-κB**: nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells  
**PCR**: polymerase chain reaction  
**PRR**: pattern recognition receptor  
**rRNA**: ribosomal ribonucleic acid  
**SEAP**: secreted embryonic alkaline phosphatase  
**TLRs**: toll-like receptors

# TINY ORGANISMS, BIG HEADACHES



**1956**

細胞培養物中にマイコプラズマが初めて検出・単離されました

**+180**

さまざまなマイコプラズマ種が同定されています

AT LEAST **20**

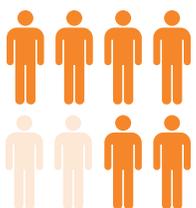
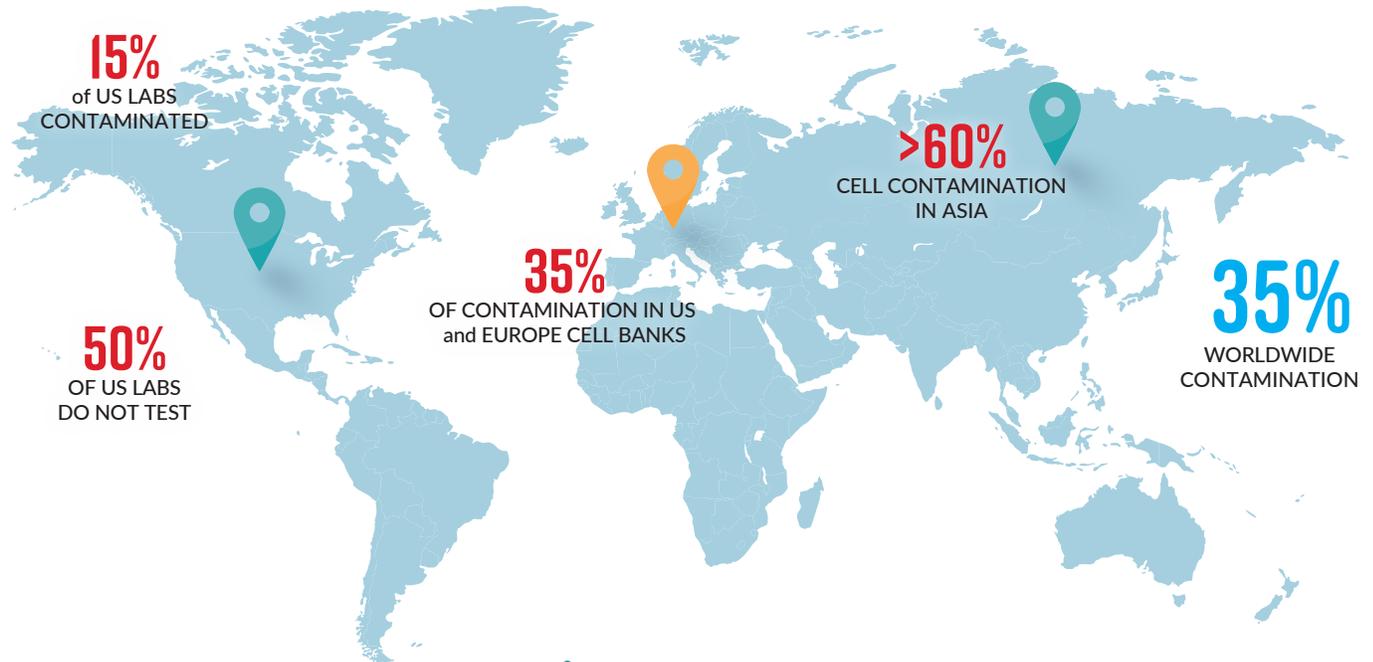
異なるマイコプラズマ種が汚染された細胞培養物から単離されています

**95%**

細胞培養汚染のうち、この割合が6種類のマイコプラズマ種に起因しています

- *M. orale*
- *M. fermentans*
- *M. hyorhinis*
- *M. hominis*
- *M. arginini*
- *A. laidlawii*

**MYCOPLASMA IN NUMBERS**



**80% OF**  
LAB OPERATORS  
CARRY MYCOPLASMA



**CONTAMINATION PREVENTION TIPS**

- 実験室に入るすべての新しい細胞培養物と動物製品を検査してください
- 油断せず常に優れた無菌操作を実践してください
- 細胞の上で話さないでください  
作業者の6%が会話によってマイコプラズマを拡散させています
- くしゃみをしないでください  
作業者の38%がくしゃみによってマイコプラズマを拡散させています
- 定期的に細胞を検査にかけてください
- マイコプラズマ汚染がないことを証明する証明書を製造元に求めてください

InvivoGen

**OFFERS**

**>14**

あなたの研究を成功に導くための、抗微生物性特異的試薬&アッセイ

マイコプラズマ汚染の検査状況も報告しなければなりません。

section. Editors reserve the right to demand that the data be removed from the paper if the justification is deemed unsatisfactory. In addition, authors must identify the source of cell lines (with catalog number) if they have been authenticated. InvivoGen authentication testing will be provided upon request. As of May 2015, there has been an increase in the issue of cell line misidentification. InvivoGen is strongly encouraged to comply with these reporting criteria. It is good practice to obtain cell lines from reputable repositories, to routinely authenticate cell line stocks and test them for mycoplasma contamination. Resources on cell line authentication follow.

評価の高いリポジトリから細胞株を取得し、定期的に細胞株ストックの状態を確認し、マイコプラズマ汚染の有無を検査することが優れた取り組みとなります。

# YOUR CELLS ARE PRECIOUS, PROTECT THEM!

## Detection

微生物汚染は**できるだけ早く**検出しなければなりません。検出方法は微生物の特性によって異なり、**生物学的アッセイ**、PCR、**蛍光**または**化学染色法**、**光学顕微鏡法**、**比濁法**、**pH 測定**、単純な**目視検査**などが使用されます。バクテリアおよび真菌は通常、光学顕微鏡法で同定できます。バクテリアと真菌は**増殖速度が速い**ため、48時間という短期間で(すなわち週末の間に)肉眼で検出でき、汚染された培地では濁りまたは斑点が認められます。続いて、検査キットを用いてこれらの微生物の種類を同定できます。細胞培養中のマイコプラズマは、視覚的には検出不能で、光学顕微鏡法でも検出できません。そのため、これらの微生物は長期間気付かれなままとなることがあり、同定には専用のアッセイが用いられます。

## Prevention

微生物汚染の原因を知ることは、**細胞培養物の汚染リスクを最小限に抑える**ために非常に重要です(下記参照)。完璧に予防することはできないものの、感染を防ぐためにさまざまな対策を講じることが可能です。まず、作業場が**無菌環境**であることと、適切な**無菌操作**を行っていることを確認しましょう。次に、汚染がないことを確認するまで、細胞培養物を**作業場に持ち込まない**ようにします。3つ目に、光学顕微鏡法と検出キットを用い、細胞培養が汚染されていないか定期的に**チェック**します。最後に、InvivoGen 社などが提供する**抗生物質カクテル**を使用します。同社のカクテルは、新しい培地(すなわち、初代細胞やクローニング)で検出が難しいような微生物に対して、予防的な対策を講じることができるよう特別に設計されています。

## Elimination

通常、細胞培養中に侵襲性微生物が検出された場合、その細胞および培地は廃棄することが推奨されます。しかし、なかには廃棄できない貴重な細胞培養物(すなわち、安定クローンのセレクション、外植組織由来の細胞株、初代細胞)や、他では入手できないもの(すなわち未凍結のもの)もあります。InvivoGen 社は、そのような状況において細胞を**損傷することなく**、**確実かつ迅速**に汚染を根絶させる抗生物質を提供しています。

### 1. 設備：

ドラフトチャンバー、換気装置、実験室備品は表面微生物の住みかになり、空中浮遊微生物を拡散させる原因になることがあります。毎日アルコールを用いて、月に1回は漂白剤を用いて、作業場を消毒しましょう。定期的にすべてのエアフィルターを交換し、少なくとも週1回はすべての培地トランプを空にしてください。

### 2. 作業者：

実験室スタッフは、自身の皮膚、衣服、体を介して微生物やほこりを運び、細胞培養物を汚染させることがあります。適切な安全作業衣を着用し、無菌操作を行いましょう。

### 3. ピペット、チップ、シリンジ、真空ポンプ：

汚染されたピペットを使用すると、複数の細胞培養物が使えなくなってしまうことがあります。無菌のピペット、チップ、シリンジを使用し、使い捨てのものは決して再利用しないでください。定期的に真空ポンプのリザーバーとチューブを空にして清掃しましょう。

### 4. 機材：

ガラス器具、インキュベータ、ウォーターバスは汚染が起こりやすい場所です。すべての機材を無菌状態に保ちましょう。また、ウォーターバスは真菌感染が極めて起こりやすい場所ですので、水を頻繁に交換しましょう。すべてのインキュベータを定期的に消毒してください。

### 5. 安全作業衣：

作業衣と手袋は必ず清潔なものを使用し、ラボ内のみで着用しましょう。使い捨ての作業衣を使用するのは一度のみとし、使用後は速やかに廃棄してください。

### 6. 培養培地、試薬、細胞：

培地、試薬、細胞は、使用前に無菌であることを確認しましょう。すべての容器を厳重に密閉してください。

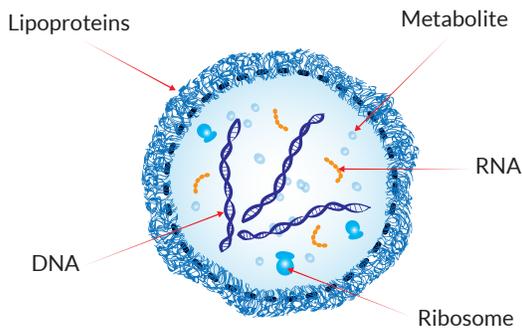
## 実験室の微生物汚染の一般的な原因



## MYCOPLASMA CONTAMINATIONS

マイコプラズマは最小かつ最も単純な自己複製生物です。マイコプラズマは、そのサイズが 100 nm と小さく、頑丈な細胞壁もないことから、目視検査では検出できず、標準的なる過法では通り抜け、さらに多数の抗生物質に耐性があります<sup>1</sup>。マイコプラズマ汚染は細胞培養における重大な問題であり、実験結果の妥当性や、細胞を使用したバイオ医薬品の品質および安全性に影響を及ぼします<sup>2</sup>。

### Mycoplasma features

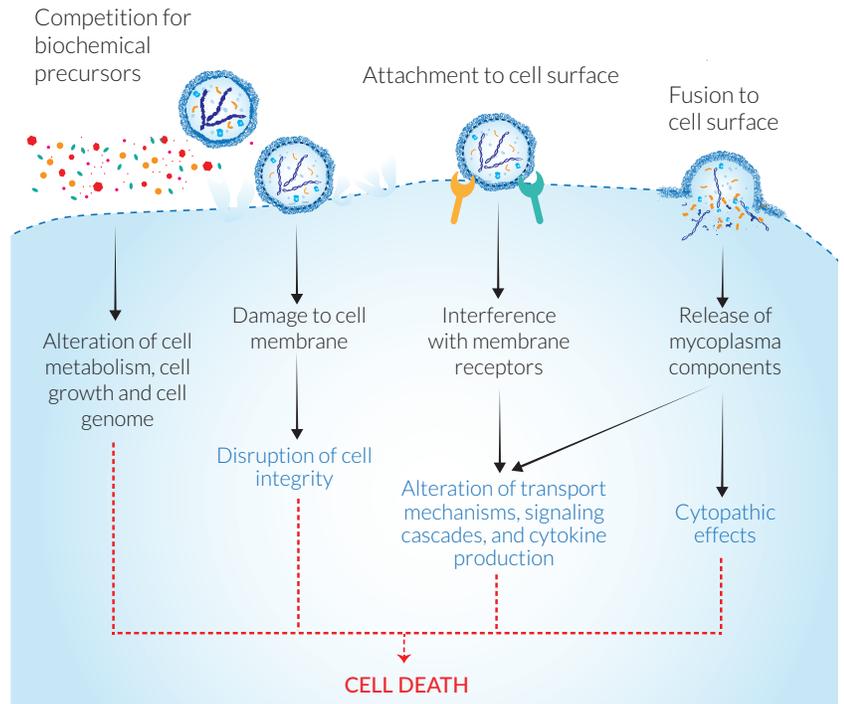


マイコプラズマは、細胞壁がないことと原形質様の形態を特徴とするモリクテス綱に属します。マイコプラズマは、初代細胞を含むすべてのタイプの真核細胞に対して**高い感染性**を持ちます。何百ものマイコプラズマが単一の細胞に付着して細胞膜と融合し、増殖して、最終的にその数は培養細胞数を 1000 倍上回ることもあります。マイコプラズマは**細胞培養を劇的に変化**させ、**研究結果を歪めかねない**物質です(下記参照)。マイコプラズマのリポタンパク質は免疫細胞の強力な活性化因子であり、それらを優先的に認識するパターン認識受容体 (PRR) である **Toll-like 受容体 2 (TLR2)** に感知されると免疫細胞が活性化します<sup>3</sup>。マイコプラズマには細胞壁が存在しないことから、ペニシリンやストレプトマイシンなどの汎用抗生物質に耐性があります。さらに、その**サイズが小さい(約 100 nm)**ことから、標準的な 0.2 μm ろ過操作によってこれらを除去することはできません。したがって、細胞培養汚染を防ぐためには大掛かりな予防策が必要となります。

InvivoGen 社製のすべての細胞株は、PlasmoTest™の結果に基づいてマイコプラズマフリーであることが保証されています。

### Major impacts of mycoplasma contamination on cell functions

マイコプラズマは、栄養素や生化学的前駆体を巡って宿主細胞と**競合**します。結果として、これらは**細胞代謝**や**細胞増殖**など、細胞機能の多くを変化させ、最終的に**細胞死**を引き起こします。汚染された培養ヒト細胞をマイクロアレイ分析した結果、マイコプラズマが、受容体、イオンチャンネル、成長因子、がん遺伝子をコードするものを含め、何百もの遺伝子の発現に深刻な影響を及ぼす可能性が明らかにされました<sup>4</sup>。マイコプラズマは、宿主細胞膜との接着または融合時に、**シグナル伝達カスケード**および**サイトカイン産生**を妨害することによって、細胞にさらなる損傷を引き起こす可能性があります<sup>5</sup>。このような有害な影響は、マクロファージなど TLR2 を発現する免疫細胞が関係する場合は特に、研究の科学的結果に大きな影響を与え、研究結果が妥当でなくなってしまうことがあります<sup>3,6</sup>。



#### TOP 5 REASONS TO TEST

- ➔ 貴重な細胞株の損失
- ➔ データの信頼性と再現性への深刻な影響
- ➔ ほとんどの学術誌は論文掲載の要件として検査を要求
- ➔ 細胞バンクを含めて世界中で最大 35% の汚染
- ➔ 時間と資金の浪費

# DETECTION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION



InvivoGen 社は、タイムリーな介入を可能にするマイコプラズマ検出キットを 2 種類提供しています。どちらのキットも、細胞培養の汚染で最もよく見られるマイコプラズマ種を迅速かつ正確に検出できます。MycoStrip™ は、イムノクロマトグラフィー試験紙を使用し、マイコプラズマのゲノム含有の有無を「即時」(約 1 時間)に検出します。PlasmoTest™ は、マイコプラズマのリポタンパク質の検出に基づいた比色細胞アッセイです。

「即時」および「ルーチン」検査によって、マイコプラズマの隙を突きましょう。

## Genomic detection strips

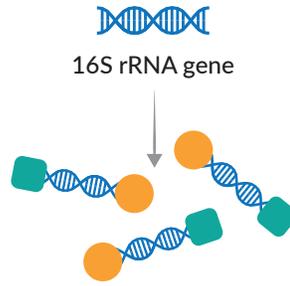


### MycoStrip™

- 即時検出におすすめ
- 簡便性：特別なラボ機材は不要
- 迅速性：実際の作業時間は 15 分以内。合計 1 時間。
- 明確：バンド 1 本 - マイコプラズマ陰性  
バンド 2 本 - マイコプラズマ陽性

MycoStrip™ を用いた汚染細胞培養中のマイコプラズマ検出は、**等温 PCR 法**に基づいています。細胞培養で最も一般的に見られるマイコプラズマ種の **16S rRNA 遺伝子** (汚染の 95% を占める) を標的として、InvivoGen 社独自の Reaction Mix を使用して増幅させます。結果は、5 分以内にイムノクロマトグラフィー試験紙上にバンドとして表示されます。

Mycoplasma & Acholeplasma



Isothermal PCR



Immunochromatographic strip

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
MycoStrip™	Mycoplasma contamination detection kit (strips)	10 tests	rep-mys-10
		20 tests	rep-mys-20
		50 tests	rep-mys-50

## FREQUENTLY ASKED QUESTIONS



**Q：MycoStrip™ と PlasmoTest™ は、生存しているマイコプラズマだけを検出するのですか？**

A：どちらのキットも、生存するマイコプラズマと死滅したマイコプラズマを検出します。MycoStrip™ はマイコプラズマの DNA の存在を、PlasmoTest™ はリポタンパク質の存在を検出します。

**Q：PlasmoTest™ は細胞培養中のマイコプラズマだけを検出するのですか？**

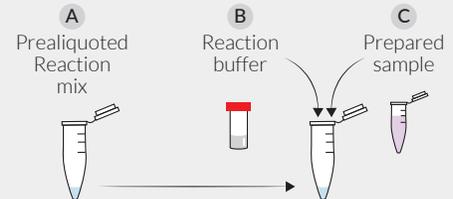
A：PlasmoTest™ は TLR2 の活性化に依存して検出します。したがって、マイコプラズマと細菌のどちらによる汚染も検出可能です。なお、マイコプラズマは肉眼で検知できませんが、細菌汚染は目視で確認でき、細菌増殖によって pH の低下 (培地の色が黄色に変化) と培地の濁化が起こります。

その他の FAQ はオンラインをご参照ください。

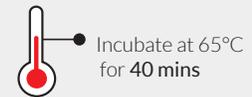
[www.invivogen/mycostrip](http://www.invivogen/mycostrip) & [www.invivogen/plasmotest](http://www.invivogen/plasmotest)

### MycoStrip™ procedure

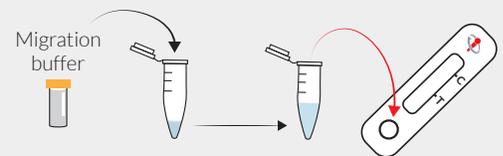
01 Combine: Reaction mix + Reaction buffer + Sample



02 Perform isothermal PCR



03 Add Migration buffer and transfer sample onto the cassette



04 Wait 2 to 5 minutes for results



## Colorimetric cellular assay

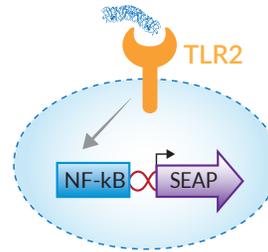
### PlasmoTest™

- ルーチン検査におすすめ
- 簡便性：細胞培養上清で比色的に検出
- 迅速性：実際の作業時間は 1 時間以内。  
オーバーナイトで結果を取得。
- 高感度：LOD は培養上清 1 ml あたり  $5.10^2 \sim 5.10^5$  CFU

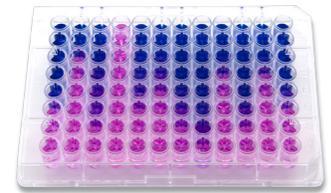
PlasmoTest™ は、**マイコプラズマ・リポタンパク質**の優先的なパターン認識受容体 (PRR) である Toll-like 受容体 2 (TLR2) に依存して検出します<sup>1</sup>。InvivoGen 社独自の **HEK-Blue™-2 細胞**は、ヒト TLR2 および NF-κB 誘導性 SEAP (分泌性胎盤アルカリホスファターゼ) レポーター遺伝子を安定に発現します。これらは HEK-Blue™ 検出培地で培養されているため、ルーチン検査に最適です。これらの細胞に**検査試料を添加するだけで**、発光ベースの生化学アッセイと同様の感度で**比色分析結果**を得ることができます。SEAP 活性は、分光光度計を使用して 620 ~ 655 nm で測定可能です。吸光度は汚染物質の存在量に正比例します。なお、HEK-Blue™-2 細胞には、マイコプラズマ、バクテリア、および真菌による細胞培養汚染を予防するための抗生物質カクテル Normocin™ (11 頁参照) が付属しています。

Mycoplasma & Acholeplasma

Lipoproteins



Reporter cell line



Purple/blue: Positive

Pink: Negative

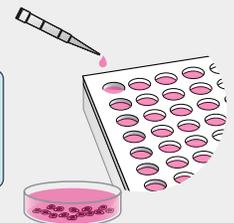
Colorimetric read-out

### PlasmoTest™ procedure

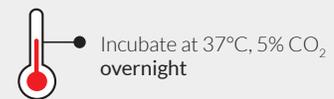
01 Inactivate endogenous alkaline phosphatase in the sample



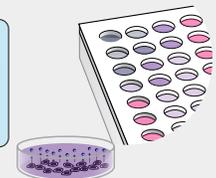
02 Add heated sample to HEK-Blue™-2 sensor cells cultured in HEK-Blue™ detection medium



03 Mycoplasma lipopeptide detection by HEK-Blue™-2 cells



04 SEAP reporter activity  
• Naked-eye: Purple/blue: Positive  
Pink: Negative  
• Measure OD 620-655nm (optional)



### MYCOPLASMA DETECTION METHODS



	MycoStrip™	PlasmoTest™
Target	16S rRNA gene	Lipoproteins
Method	Isothermal PCR	Reporter bioassay
Ease of use	++++	++
Specificity	At least the 8 most common species	
Sensitivity	$10 \cdot 10^2$ CFU/ml	$10^2 \cdot 10^5$ CFU/ml
Experiment duration	<1 hr	<1 hr (hands on) OVN (incubation)
Additional equipments/reagents	Heating bath/block	Incubator Spectrophotometer
Naked-eye data visualization	Yes	Yes
Cost	Reasonable	Cost-effective

### WHAT IF MY TEST IS POSITIVE ?

InvivoGen 社製抗マイコプラズマ試薬を用いて、培養物を簡単に処理できます。

Plasmocin™ または Plasmocure™ を使用して培養物を処理し、汚染を根絶させましょう。処理が完了したら(約 2 週間)、MycoStrip™ または PlasmoTest™ を使用して、処理した培養物と処理前のサンプルとを比較して再検査を行います。

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
PlasmoTest™	Mycoplasma contamination detection kit (cells)	1 kit (250 tests)	rep-pt1
PlasmoTest™ Controls	Controls for PlasmoTest™ detection kit	200 tests	pt-ctr2
PlasmoTest™ Refills	Reagents for PlasmoTest™ detection kit	500 samples	rep-ptrk

# ELIMINATION OF MYCOPLASMA



nvivoGen 社では、科学界向けの抗マイコプラズマ・ソリューションの開発において 40 年以上の経験を蓄積しています。Plasmocin™ および Plasmocure™ は、すぐに使用できる ready-to-use の製品単体に 2 つの異なる抗生物質セットを組み込んだ、ユニークな抗マイコプラズマ試薬です。これらの試薬は迅速に作用するうえ、細胞毒性がほとんどあるいは全くないため、貴重な細胞株およびデータを確実に保存することができます。

Plasmocin™ および Plasmocure™ は、汚染マイコプラズマを幅広くかつ迅速に除去できます。

## A preventive & removal treatment

### Plasmocin™

- 広範なマイコプラズマの除去におすすめ
- 迅速性：細胞培養を 2 週間で救済
- 安全性：哺乳動物細胞への毒性が無し～微小
- 2 つのフォーマット：予防薬と処置薬

Plasmocin™ は学術誌で頻繁に引用されるマイコプラズマ除去剤<sup>7-11</sup>であり、細胞外および細胞内の一般的なマイコプラズマ株すべてに対して有効です。効率を最大化するために、Plasmocin™ には、タンパク質合成を遮断する薬剤と、DNA 複製を停止させる薬剤の 2 つの抗生物質が含まれています。Plasmocin™ の成分は哺乳動物細胞内に能動輸送され、処置後に細胞培養物が再感染しないようにします。そのため、Plasmocin™ は、マイコプラズマを根絶して耐性株の発生を防ぐ点において、市販の他の試薬よりも効果的です<sup>7</sup>。

- Plasmocin™ 予防薬は、マイコプラズマ汚染の予防を目的として定期的

## An alternative removal treatment

### Plasmocure™

- Plasmocin™ 耐性株におすすめ
- 迅速性：細胞培養を 2 週間で救済
- 安全性：哺乳動物細胞への毒性が無し～微小
- 確実性：マイコプラズマ再増殖率が極めて低い

Plasmocure™ は、Plasmocin™ 耐性マイコプラズマを強力に根絶する第 2 選択抗マイコプラズマ試薬です<sup>12</sup>。この試薬は、Plasmocin™ とは異なるメカニズムで作用する 2 つの抗生物質を含有しています。1 つ目の抗生物質は、リボソームの 50S サブユニットに結合し、ペプチジルトランスフェラーゼの活性を遮断します。2 つ目の抗生物質は、イソロイシル-tRNA 合成酵素に結合し、マイコプラズマ・タンパク質へのイソロイシンの取り込みを停止させます。

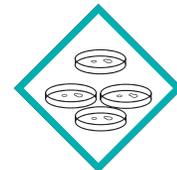
通常は Plasmocure™ で 2 週間処置を行えば、マイコプラズマを完全に除去できます。マイコプラズマ除去が 2 週間で完了しない場合、Plasmocure™ 処置をさらに 1 週間行うことが可能です。細胞増殖が緩やかに減速する場合がありますが、マイコプラズマが除去されれば、細胞株の完全な回復が期待されます。

## Tips for successful mycoplasma elimination



至適処理濃度

プロトコルに従って 3 つの異なる処理濃度 (無処理条件を含む) で検査することを推奨します。



予備細胞

次の目的のため、培養物の複製および/または凍結バイアルを無処理の状態

- ・ 処理効果を検証するため
- ・ 必要に応じて、新規の処理条件で最初からやり直しできるようにするため



代替処理

Plasmocin™ が有効でない場合は、Plasmocure™ を使用します (逆の場合も同様)。

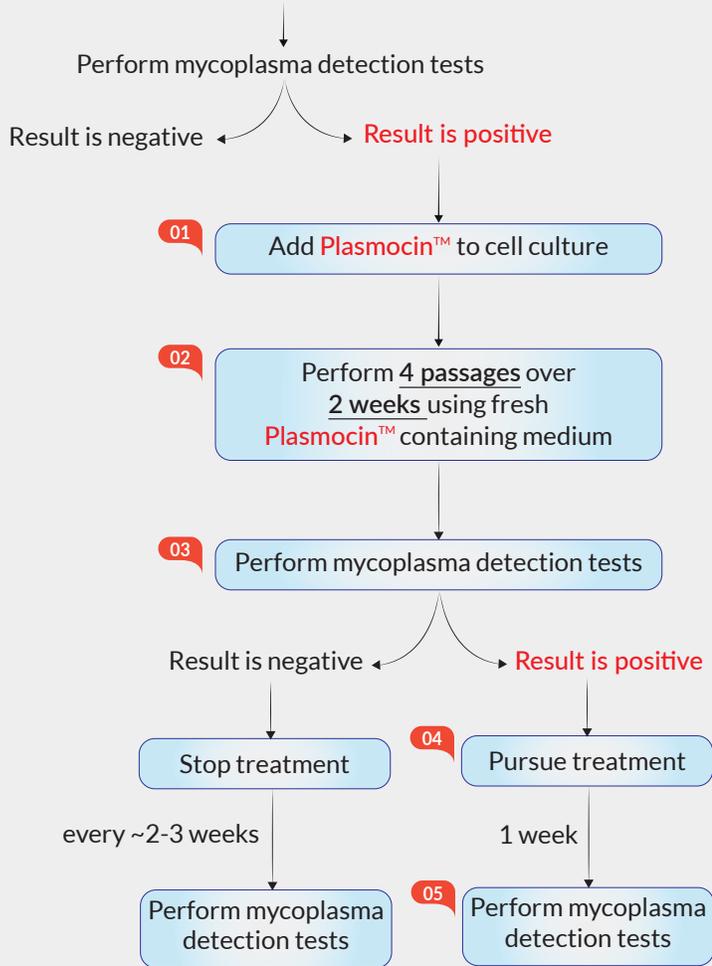


定期的な検査

MycroStrip™ または Plasmotest™ を使用して早期にマイコプラズマを検出することにより、タイムリーな介入が可能になります。約 2 ~ 3 週間ごとに細胞培養を検査することを推奨します。

## Mycoplasma surveillance and elimination

Upon reception of a new cell line or maintenance of cell cultures



Use Plasmocure™ for Plasmocin™-resistant mycoplasma contaminations

### DON'T STRESS

感染した細胞株の多くで Plasmocin™ 処理が成功しています

がん細胞株<sup>9</sup>、ウイルス産生細胞<sup>10</sup>、人工多能性幹細胞<sup>11</sup>、ヒト胚性幹細胞<sup>13</sup>を含む多くの細胞株において、永続的な変化は起きていません。

## MYCOPLASMA ELIMINATION REAGENTS



	Plasmocin™	Plasmocure™
Treatment duration	2 weeks	2 weeks
Ease of use	++++	++++
Efficacy	+++	++++
Cytotoxicity	+/-	+/-
Resistance <sup>11</sup>	-	--

## FREQUENTLY ASKED QUESTIONS



Q: Plasmocin™ は凍結保存試料作成前の培養初期段階で使用できますか？

A: はい、そうすることがむしろ推奨されます。ただし、MycStrip™ または Plasmotest™ を使って、細胞に汚染がないことを確認する必要があります。

Q: Plasmocin™ および Plasmocure™ は真核細胞に対してどのような毒性がありますか？

A: Plasmocin™ および Plasmocure™ の標的は真核細胞には存在しないため、細胞毒性は低いと言えます。

Q: 何をえばいいですか？ Plasmocin™ ですか、それとも Plasmocure™ ですか？

A: 細胞がマイコプラズマ陽性の場合、Plasmocin™ での処置から始めることをお勧めします。Plasmocin™ に耐性がある場合は、Plasmocure™ を使用してください。

その他の FAQ はオンラインをご参照ください。

[www.invivogen/plasmocin](http://www.invivogen/plasmocin) & [www.invivogen/plasmocure](http://www.invivogen/plasmocure)

## They trust InvivoGen

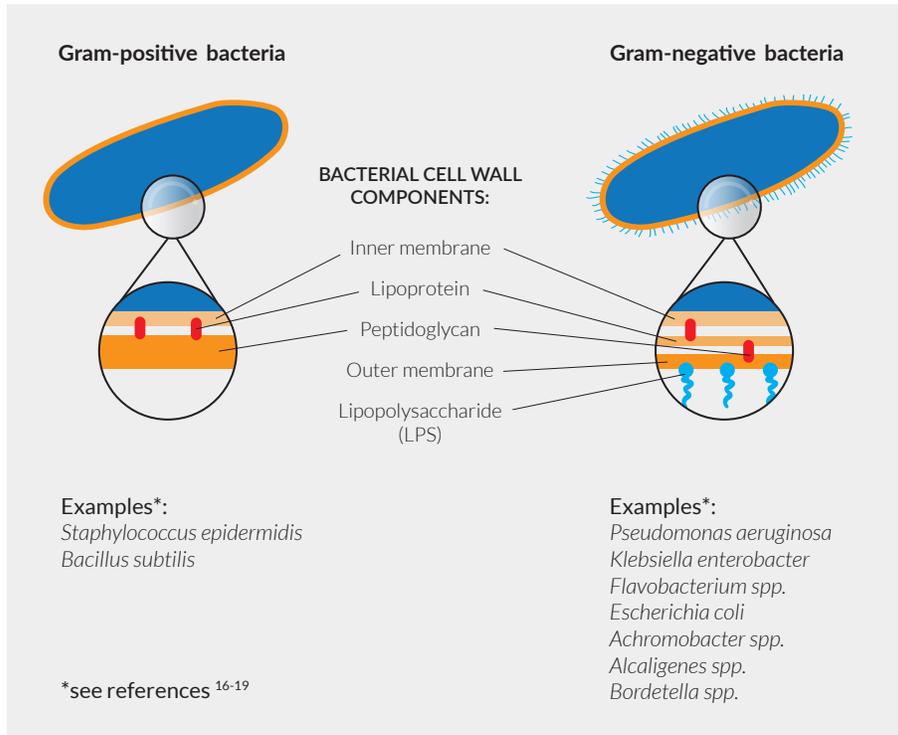
- Kapralov A. A. et al., 2020. *Nat Chem Biol*. Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. DOI: 10.1038/s41589-019-0462-8.
- Kazemiha V. M. et al., 2019. *Cell J*. Effectiveness of Plasmocure™ to eliminate mycoplasma species from contaminated cell cultures: A comparative study versus other antibiotics. DOI: 10.22074/cellj.2019.5996

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
Plasmocin™ prophylactic	Reagent for preventing mycoplasma contamination	25 mg (10 x 1 ml)	ant-mpp
Plasmocin™ treatment	Mycoplasma elimination reagent	25 mg (1 x 1 ml) 50 mg (2 x 1 ml)	ant-mpt-1 ant-mpt
Plasmocure™	Mycoplasma elimination reagent	100 mg (1 ml)	ant-pc

# BACTERIAL CONTAMINATIONS

バクテリアは単細胞微生物の大部分を占め、至る所に存在する生物群です。通常は直径が数マイクロメートルであり、形状は球状、棒状、らせん状など多種多様です。バクテリアは、細胞培養において最もよく遭遇する生物汚染源であり<sup>14,15</sup>、光学顕微鏡で検出可能であるにもかかわらず、特に汚染の初期段階においては細胞デブリに間違われやすくなっています。

## The usual bacterial suspects



バクテリアは、特に汚染の初期段階で細胞デブリに間違われやすくなっています。

## Sources of contamination



ラボ作業者

ブドウ球菌種による汚染の主要原因



汚れたウォーターバス、インキュベータ、ガラス器具など

シュドモナス種およびフラボバクテリウム種による汚染の主要原因



動物組織から単離された細胞  
常在細菌叢および / または不顕性感染からの汚染

## Detection of bacterial contamination



バクテリアは真核細胞(10~100 μm)よりもはるかに小さい(1~10 μm)ため、汚染の初期段階では細胞デブリに間違えられることがあります。したがって、位相差光学顕微鏡(100倍~400倍)を使用して細胞培養物を確認することが重要です。

顕微鏡を覗くと、小さな黒点、棒状体、らせんが、単独で、あるいは鎖状または塊状に異常に存在していますか?それらは運動していますか?もしそうなら、その培養物はおそらく汚染されています。



バクテリアは増殖速度が速いため、わずか48時間で培地に変化を引き起こし、10<sup>5</sup> CFU/mlから肉眼で汚染をはっきりと確認できるようになります。培地が濁って見え、フェノールレッドが添加されている場合は赤から黄へと色が急速に変化します。この色の変化は、バクテリア代謝の結果としてpHが低下したことを意味します。そのような培養環境は、もはや真核細胞の生存に適しておらず、最終的には細胞が死んでしまいます。

この場合、培地を廃棄するか、代用が効かない場合はInvivoGen社製の抗生物質カクテルで処理する必要があります(次頁参照)。

# ELIMINATION OF BACTERIA

## Contamination preventive reagent

### Normocin™

- **広域性**：マイコプラズマ、バクテリア、および真菌を殺傷
- **安全性**：哺乳動物細胞に対する毒性が無し～微小

Normocin™ は、**マイコプラズマ**、**バクテリア** (グラム陽性菌およびグラム陰性菌)、ならびに**真菌** (酵母を含む) に対して有効な 3 つの抗生物質を含有する革新的な製剤です。これは、汚染防止を目的とした細胞培地への「**日常的添加剤**」として広く使用され、学術誌にもよく引用されています。Normocin™ はペニシリン・ストレプトマイシン (Pen-Strep) 溶液と組み合わせて使用可能であり、それにより抗菌範囲を拡大させることができます。Normocin™ は、**最小限の細胞毒性**で微生物汚染からの最大限の保護を提供します。

#### · DID YOU KNOW? ·

InvivoGen 社製のすべての細胞株は、広域性抗菌剤 Normocin™ とともに提供され、細胞の安全確保をサポートしています。

## Anti-microbial agent for primary cells

### Primocin™

- **広域性**：マイコプラズマ、バクテリア、および真菌を殺傷
- **安全性**：哺乳動物細胞に対する毒性が無し～微小

Primocin™ には 4 つの化合物が含まれており、そのうち 3 つは、**グラム陽性菌**、**グラム陰性菌**、および**マイコプラズマ**の DNA およびタンパク質合成を遮断します。4 つ目の化合物は、細胞膜を介したイオン交換を妨害することによって、酵母を含む**真菌**を根絶します。Primocin™ は、マウスおよびヒトの腫瘍由来細胞株、胚細胞、人工多能性幹細胞など、数多くの**初代細胞**で使用され、良好な結果が得られています。

## Multidrug-resistant bacteria removal agent

### Normocure™

- **Ready-to-use**：培地のボトルやフラスコに直接添加
- **迅速性**：3 継代で細胞培養を救済
- **安全性**：哺乳動物細胞に対する毒性が無し～微小

Normocure™ は、**グラム陽性菌**や**グラム陰性菌**、特に Pen-Strep と Normocin™ に耐性のある**非発酵グラム陰性菌**から、貴重な細胞株を救済する最良の武器となります。Normocure™ は、異なる抗生物質ファミリーに属する 3 つの成分からなるカクテルです。一度の継代で 99% を超えるバクテリア汚染物質が除去されます。これらの抗生物質の標的は真核細胞には存在しないため、Normocure™ の細胞毒性は低いと言えます。

## FREQUENTLY ASKED QUESTIONS



**Q**：カタログに掲載された抗微生物剤は、選択的抗生物質に干渉しますか？  
**A**：いいえ。これらの薬剤は、G418、プラストサイジン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン B、Zeocin™ などの一般的な選択的抗生物質には干渉しません。

**Q**：バクテリア汚染が起こったのですが、培養物を汚染したバクテリア株を特定することができますか。バクテリアを確実に除去するための最良の選択肢は何ですか？

**A**：グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して非常に効果的な広域性抗微生物剤の Normocure™ の使用を強くお勧めします。ブドウ球菌種やアクロモバクター種など、環境由来のバクテリアによって汚染された細胞培養物は、Normocure™ 処理によって効率的に使用可能にすることができます。

その他の FAQ はオンラインをご参照ください

[www.invivogen/normocin](http://www.invivogen/normocin), [www.invivogen/normocure](http://www.invivogen/normocure), [www.invivogen/primocin](http://www.invivogen/primocin)

## They trust InvivoGen

- Magupalli V. G. et al., 2020. *Science*. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. DOI: 10.1126/science.aas8995.
- Polyzoos A. A. et al., 2019. *Cell Metab*. Metabolic Reprogramming in Astrocytes Distinguishes Region-Specific Neuronal Susceptibility in Huntington Mice. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.03.004.
- Ganesh K. et al., 2020. *Nat. Cancer*. L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. DOI: 10.1038/s43018-019-0006-x.

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
Normocin™	Reagent for preventing microbial contamination	500 mg (10 x 1 ml) 1 g (1 x 20 ml)	ant-nr-1 ant-nr-2
Normocure™	Microbial contamination elimination reagent	100 mg (2 x 1 ml)	ant-noc
Primocin™	Reagent for preventing microbial contamination in primary cells	500 mg (10 x 1 ml) 1 g (1 x 20 ml)	ant-pm-1 ant-pm-2

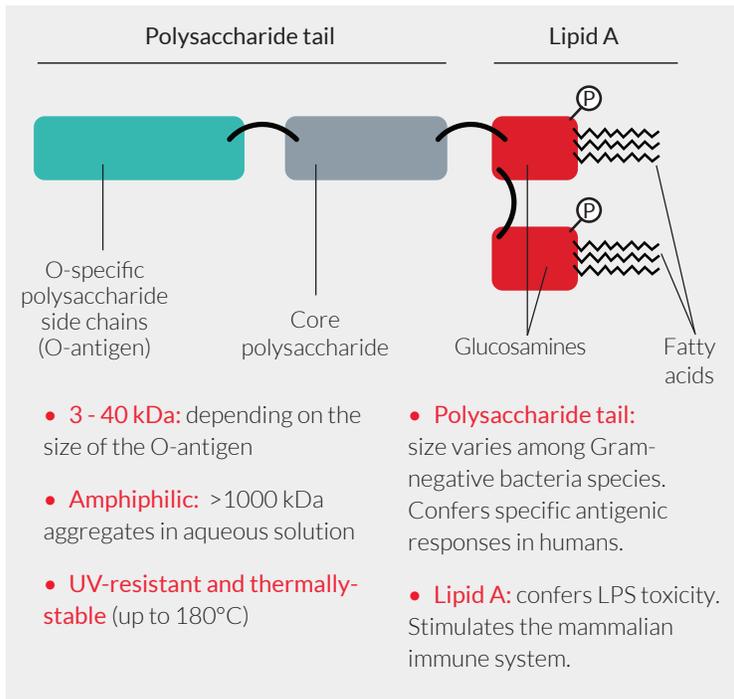
# ENDOTOXIN CONTAMINATIONS



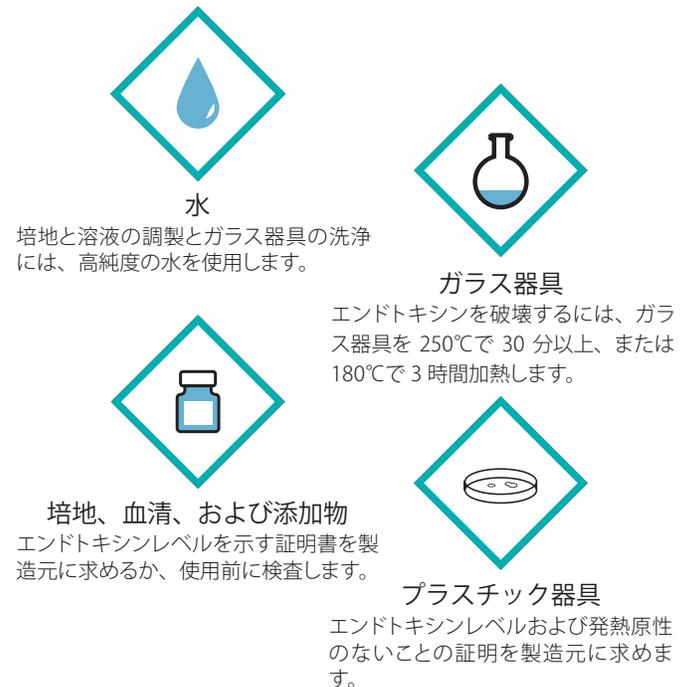
**I**ンドトキシンは、リポポリサッカライド(LPS)やリポグリカンとも呼ばれ、グラム陰性菌の細胞壁の主要成分です。エンドトキシンの供給源には、培地、血清、水、緩衝液のほか、トリプシンなどの細胞培養試薬などがあります。エンドトキシンは、*in vitro* および *in vivo* の両方において炎症反応の強力な誘発物質です。無菌の溶液や試薬を使うなどの特別な注意を払う必要がありますが、これらにもバクテリアの成分が含まれている可能性があるため、細胞培養試薬中のエンドトキシンの有無を監視することが極めて重要になります。

エンドトキシン汚染は、細胞培養および注射剤製造において重大な懸案事項です。

## Endotoxin features



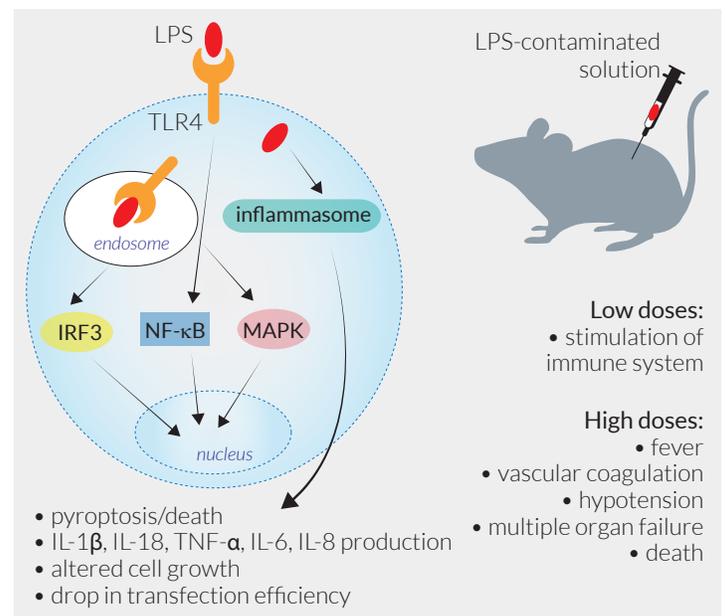
## Sources of contamination



## Risks for *in vitro* and *in vivo* experiments

リポポリサッカライド(LPS)のリピド A 部分は、細胞表面上またはエンドソーム内で **Toll-like 受容体 4 (TLR4)** を活性化し、次いで **MAP キナーゼ**、**NF-κB**、**IRF (インターフェロン制御因子)** 経路の活性化を誘導します<sup>20,21</sup>。エンドトキシンの影響は、濃度や細胞の種類によって異なりますが、これらの分子は**細胞の形態**、**増殖**、および**トランスフェクション効率**を変化させることが示されています<sup>22</sup>。さらに、リポポリサッカライド(LPS)は、TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-18などの**炎症性サイトカイン**の産生、ならびにカスパーゼ 4/5/11-NLRP3 の非標準的インフラマソームの活性化を誘発し、**パイロトーシスによる細胞死**を引き起こします<sup>20,23</sup>。

*in vivo* においては、エンドトキシンは低濃度では**免疫系**を刺激することがありますが、高濃度では**発熱**、**低血圧**、**多臓器不全**を引き起こし、**死亡**に至る場合もあります<sup>22</sup>。



# DETECTION OF ENDOTOXINS IN BIOLOGICAL REAGENTS

## Colorimetric cellular assay

### HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2

- **多用途**：ほぼすべての生物試薬中で検出可能
- **高感度**：わずか 0.01 EU/ml のレベルを検出
- **経済的**：1 キットで最大 500 回の検査が実施可能

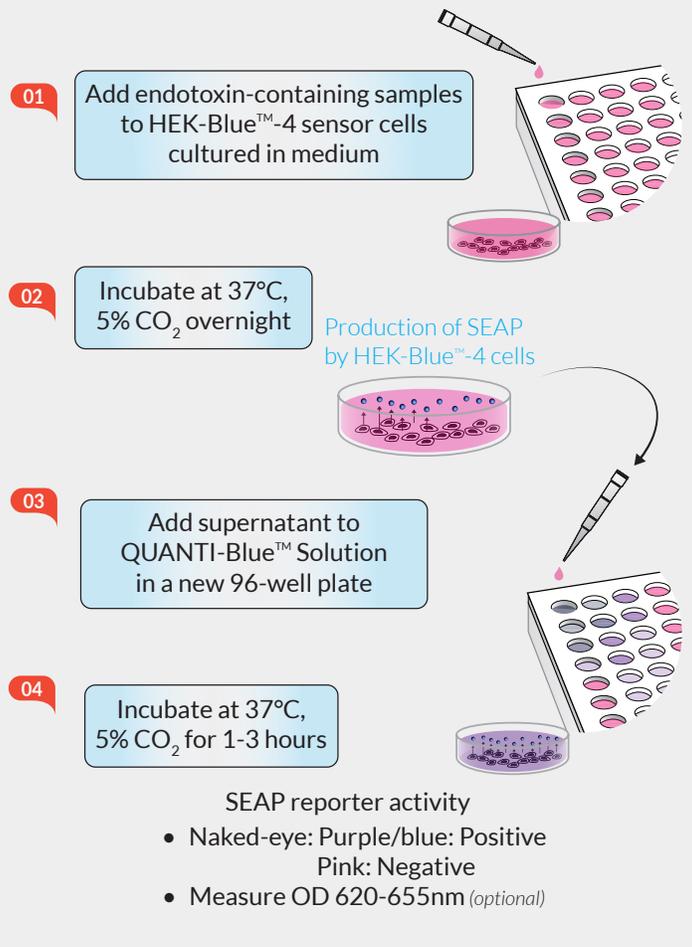
このキットは、ヒト TLR4 および NF- $\kappa$ B 誘導性分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を安定に発現する InvivoGen 社独自の HEK-Blue™-4 細胞に基づいて設計されています。実験手順が簡単なため、ルーチン検査に最適です。微量のリポポリサッカライド (LPS) が含まれる検査試料を HEK-Blue™-4 細胞と共に一晩インキュベーションすると、NF- $\kappa$ B が活性化され、SEAP レポーターの発現が起こります。培養上清中の SEAP 活性は、比色法 SEAP 検出培地である QUANTI-Blue™ Solution によって評価でき、分光光度計を用いて 620 ~ 655 nm で測定可能です。吸光度はエンドトキシンの存在量に正比例します。エンドトキシン濃度は、キットに含まれる HEK-Blue™ Endotoxin Standard を段階希釈して作成した標準曲線から算出可能です。

#### TOP 5 REASONS TO USE



- ➔ **高価で手間のかかるカプトガニアメボサイトライゼート (LAL) アッセイに代わる持続可能な方法です。** HEK-Blue™-4 細胞は凍結保存でき、その他の必要な製品は個別に再注文することができます。
- ➔ LAL アッセイとは異なり、HEK-Blue™-4 細胞ベースの LPS 検査は、試料に (1,3)- $\beta$ -D グルカンが含まれる場合でも **偽陽性になることはありません。**
- ➔ 培地、血清、化学製剤、ワクチンアジュバントを含む **すべての生物試料** に使用可能です。
- ➔ ピンクから紫 / 青への **培地色の変化によって、結果を目視で手軽に確認できます。**
- ➔ **実験手順、エンドトキシン濃度の計算方法を示した図解、およびトラブルシューティングを解説した冊子** が含まれます。

### Principle of LPS Detection Kit 2



#### They trust InvivoGen

- Gray M. A. *et al.*, 2020. *Nat Chem Biol*. Targeted glycan degradation potentiates the anticancer immune response in vivo. DOI: 10.1038/s41589-020-0622-x.
- Imbert P. R. C. *et al.*, 2021. *Curr Biol*. An Acquired and Endogenous Glycocalyx Forms a Bidirectional "Don't Eat" and "Don't Eat Me" Barrier to Phagocytosis. DOI: 10.1016/j.cub.2020.09.082.

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2	Assay for the detection and quantification of biologically active LPS	1 kit	rep-lps2
HEK-Blue™ Selection	Antibiotics for maintenance of HEK-Blue™ cells	10 x 1 ml	hb-sel
HEK-Blue™ Endotoxin Standard	Standardized <i>E. coli</i> 055:B5 LPS	10 x 50 EU	rep-hbes-10
QUANTI-Blue™ Solution	Alkaline phosphatase detection medium (liquid form, 100X)	5 ml 10 ml	rep-qbs rep-qbs2

# FUNGAL CONTAMINATIONS



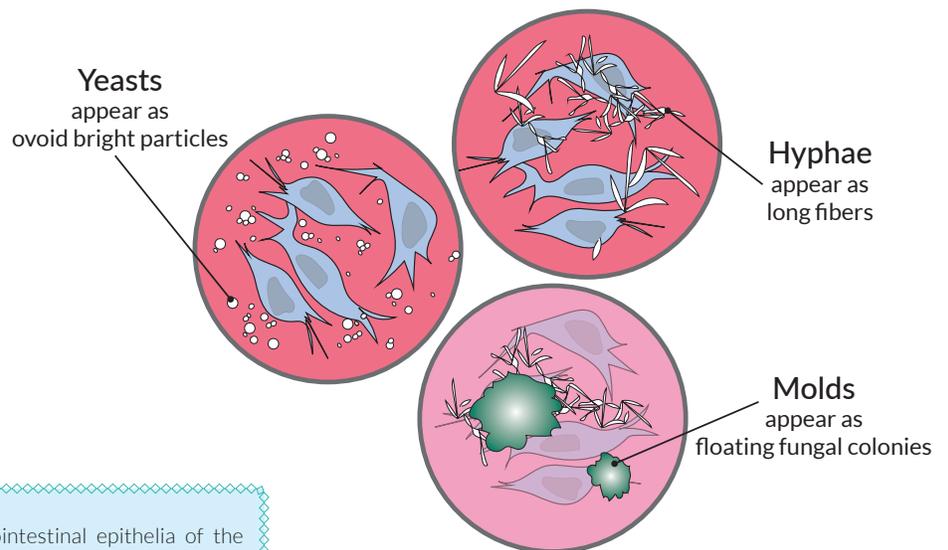
**真**菌は、マイコプラズマやバクテリアとは違って真核生物であり、鎖状あるいはクラスタ状に集合することがある円形または楕円形(酵母)、または長いフィラメント(菌糸)の形態をしています<sup>24</sup>。カビは、汚染が進行した段階では綿毛様のまだらのように見える菌糸群です<sup>24</sup>。真菌汚染は、細胞培養における重大な問題で、実験結果の妥当性に影響を及ぼします。さらに重要なことに、この種の汚染を根絶するのは非常に困難です。なぜなら、真菌は胞子が空気中を移動することによって拡散することができるからです。多くの真菌種の休眠胞子は、極端に過酷で生存に適さない環境でも生き残ることができ、適切な増殖条件に遭遇した場合にのみ活性化されます。

真菌汚染を早期に検出して Fungin™ 抗真菌剤で処理することで、大抵の場合、細胞培養物を救済することができます。

## How to detect fungal contamination in cell cultures?

真菌の中で酵母は最も小さく(3~10 μm)、光学顕微鏡を用いて観察可能です。菌糸は、大きさや成長段階に応じて肉眼または光学顕微鏡によって検出できます。

汚染がかなりの程度に及ぶ場合、表面にカビが浮かび上がった状態でコロニーを形成します。この場合、胞子の拡散を防ぐため、容器は開けずに培養物を廃棄しましょう。場合によっては、培地のpHが上昇し、結果としてフェノールレッド含有培地がピンク色に見えることがあります。



### They trust InvivoGen

- Busslinger G.A. et al., 2021. *Cell Rep.* Human gastrointestinal epithelia of the esophagus, stomach, and duodenum resolved at single-cell resolution. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108819
- Lebreton F. et al., 2019. *Nat Commun.* Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. DOI: 10.1038/s41467-019-12472-3.

## ELIMINATION OF FUNGI

### For preventive and removal treatments

#### Fungin™

- **効果的**：真菌(酵母、菌糸、カビ)を殺傷
- **迅速性**：細胞培養を5~10日で救済
- **安全性**：哺乳動物細胞に対する毒性が最小
- **確実性**：予防処置剤として使用可能

Fungin™ は、細胞膜を介したイオン交換を妨害することによって、さまざまな形態の真菌(酵母、菌糸、カビ)を殺傷する、可溶性抗真菌化合物です。この化合物は非常に安定であり、デオキシコール酸(細胞毒性物質)に溶解する必要はありません。したがって、アムホテリシンB 抗真菌剤の使用に代わる優れた代替品となります。Fungin™ は、日常的な予防措置には低濃度で、汚染除去には高濃度で使用することができます。本製剤は、カンジダ・アルビカンスやアスペルギルス属菌種など、細胞培養でよく見られる汚染真菌に対して最大限の保護を提供します。Fungin™ は、ペニシリン・ストレプトマイシン(Pen-Strep)などの汎用される抗菌剤を含む培地に添加することができます。Fungin™ は学術誌で頻繁に参照される抗真菌試薬です。

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
Fungin™	Reagent for preventing fungal contamination	75 mg (5 x 1.5 ml) 200 mg (1 x 20 ml)	ant-fn-1 ant-fn-2

# SUMMARY TABLE OF INVIVOGEN'S ANTIMICROBIAL AGENTS

CONTAMINANT	PRODUCT	DESCRIPTION	PAGE
Mycoplasma	MycoStrip™	Mycoplasma contamination detection kit	6
	PlasmoTest™	Mycoplasma contamination detection kit	7
	PlasmoTest™ Controls	Controls for PlasmoTest™ detection kit	7
	PlasmoTest™ Refills	Reagents for PlasmoTest™ detection kit	7
	Plasmocin™ prophylactic	Reagent for preventing mycoplasma contamination	8
	Plasmocin™ treatment	Mycoplasma elimination reagent	8
	Plasmocure™	Mycoplasma elimination reagent	8
Bacteria	Normocin™	Reagent for preventing microbial contamination	11
	Normocure™	Microbial contamination elimination reagent	11
	Primocin™	Reagent for preventing microbial contamination in primary cells	11
Endotoxins	HEK-Blue™ LPS Detection Kit 2	Assay for the detection and quantification of biologically active LPS	13
	HEK-Blue™ Selection	Antibiotics for maintenance of HEK-Blue™ cells	13
	HEK-Blue™ Endotoxin Standard	Standardized <i>E. coli</i> 055:B5 LPS	13
	QUANTI-Blue™ Solution	Alkaline phosphatase detection medium (liquid form)	13
Fungi	Fungin™	Reagent for preventing and eliminating fungal contamination	14

## REFERENCES

- Drexler H.G and Uphoff C.C, 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 39:75.
- Armstrong E.E. *et al.*, 2010. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*. 38(2):211-3.
- Takeuchi O. *et al.*, 2000. Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasma Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88- Dependent Signaling Pathway. *J. Immunol.* 164:554-557.
- Miller C.J. *et al.*, 2003. Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques*. 35(4):812-4
- Rottem S. 2003. Interaction of Mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 83:417.
- Zakharova E. *et al.*, 2010. Mycoplasma suppression of THP-1 Cell TLR responses is corrected with antibiotics. *PLoS One*. 5(3):e9900
- Molla Kazemiha V *et al.*, 2011. Efficiency of Plasmocin™ on various mammalian cell lines infected by mollicutes in comparison with commonly used antibiotics in cell culture: a local experience. *Cytotechnology*. Dec;63(6):609-20
- Uphoff CC *et al.*, 2012. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed Biotechnol.* 2012:26767.
- Rongvaux A *et al.*, 2014. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol.* 32(4):364-72.
- Baronti C. *et al.*, 2013. Mycoplasma removal: simple curative methods for viral supernatants. *J Virol Methods.* 187(2):234-7.
- Deng F. *et al.*, 2012. Generation of induced pluripotent stem cells from human Tenon's capsule fibroblasts. *Mol Vis.* 18:2871-81.
- Molla Kazemiha V. *et al.*, 2019. Effectiveness of Plasmocure in elimination of mycoplasma species from contaminated cell cultures: a comparative study versus other antibiotics. *Cell. J.* 21(2):143-149.
- Romorini L *et al.*, 2013. Effect of antibiotics against Mycoplasma sp. on human embryonic stem cells undifferentiated status, pluripotency, cell viability and growth. *Plos One.* Jul 30;8(7):e70267
- Ryan J., 2008. Understanding and managing cell culture contamination. Corning Life Sciences, technical literature.
- Lincoln C. & Gabridge M. 1998. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods in cell biology.* 57:49-65.
- Fogh J., 1973. Contamination in Tissue Culture, published by Academic Press Inc. 4. McGarrity G.J. & Coriell LL., 1971. Procedures to reduce contamination of cell cultures. *In Vitro.* 6(4):257-65.
- McGarrity, G. J. *et al.*, 1984. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. *In vitro.* 20(1):1-18.
- Gray JS. *et al.*, 2010. Got black swimming dots in your cell culture? Identification of *Achromobacter* as a novel cell culture contaminant. *Biologicals.* 38(2):273-7
- McGowan JE Jr., 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med.* 119(6 Suppl 1):S29-36; discussion S62-70.
- Gorbet MB. & Sefton MV., 2005. Endotoxin : the uninvited guest. *Biomaterials.* 26:6811-6817.
- Leider, R. *et al.*, 2013. Endotoxin - The invisible companion in biomaterial research. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 19(5):391-402.
- Nims, RW. & Price P.J. 2017. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 53(10):872-79.
- Rathinam VAK, *et al.*, 2019. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* 20(5): 527-533.
- Mather J. & Roberts E. 1998. Contamination: How to avoid it, recognize it, and get rid of it. In: *Introduction to cell and tissue culture: theory and technique.* Chapt 7. p99-9.

# Mycoplasma?



**NEW**



## MycoStrip™ Mycoplasma Detection Kit

*A new way to detect mycoplasma in your cell culture*

- ✓ **簡便性** - 特別な機材は不要
- ✓ **迅速性** - 1 時間で実施可能。実際に作業する時間は 15 分未満
- ✓ **明確** - バンドが 1 本ならマイコプラズマ陰性、  
バンドが 2 本ならマイコプラズマ陽性
- ✓ **特異的** - 真核生物や他のバクテリアの DNA との交差反応なし
- ✓ **高感度** -  $10 \sim 10^2$  CFU/ml まで検出可能



ナカライテスク株式会社 |  

URL

<https://www.nacalai.co.jp/>

価格・納期のご照会

試薬はここに  
0120-489-552

製品に関する技術的なご照会

<https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact>

※ 試験・研究用以外には使用しないでください。※ 掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

※ QR コードは株式会社デンソーウェーブの登録商標です。