

## BioMycoX<sup>®</sup> Mycoplasma PCR Detection Kit

Cat. No. D-25, D-50, D-100  
Storage Temperature -20°C

BioMycoX Mycoplasma Detection kit는 세포배양 및 세포배양을 이용하여 생산된 제품의 마이코플라즈마 오염을 진단할 수 있도록 구성되어있으며, 마이코플라즈마 유전자 중에 highly conserved coding region에서 유래된 primer mix은 효과적으로 세포배양 시 오염된 마이코플라즈마를 검출할 수 있다. 세포배양에서 주로 오염되는 마이코플라즈마 종류인 *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii* 뿐만 아니라 *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. genitalium*, *M. penetrans* and *Ureaplasma urealyticum*도 진단할 수 있다. 그리고 eukaryotic and bacterial DNA 에서는 전혀 검출되지 않는 마이코플라즈마 특이적 진단 키트이다.

### 1. 제품 특징

- 세포배양 시 오염되는 Mycoplasma 속 균주들을 정확하게 진단.
- Internal DNA 생성을 통해 PCR 반응 오류로 인한 잘못된 결과해석을 방지함.
- 하나의 primer mix 만으로 Internal DNA 생성이 가능함으로 사용이 편리함.

### 2. Kit 구성

Material Provided	Quantity		
	D-25	D-50	D-100
2xPCR Premix (Blue Cap)	250µl	500µl	1ml
Primer Mix (Red Cap)	50µl	100µl	200µl
Positive Control DNA (Yellow Cap)	13µl	25µl	50µl
DNase Free Water (White Cap)	150µl	300µl	600µl

### 3. 보관 및 유효기간

-20°C에 보관, 유효기간은 제품에 표시됨.

### 4. 마이코플라즈마 Detection 과정

#### A. Sample (Template) 준비

- 1) 실온에서 키트 구성물을 녹인 후 짧게 원심분리 하여 튜브 아래쪽에 모이도록 한다.
- 2) 마이코플라즈마 오염이 의심되는 배양 중인 세포(80% 이상 confluence 되어야 함.)의 배양액 1ml 을 새로운 1.5ml microcentrifuge tube 로 옮긴다.
- 3) 세포잔해를 침전시키기 위해 1,500rpm 으로 5 분간 원심분리 한 후 상층액 1ml 을 새로운 microcentrifuge tube 로 옮긴다.
- 4) 상층액을 12,000rpm 에서 10 분간 원심분리하여 마이코플라즈마를 침전시킨다. (육안으로 보이지 않을 수 있음.)
- 5) 상층액을 모두 제거하고 침전된 마이코플라즈마에 100µl 멸균수를 넣고 vortex 하여 혼합한다.
- 6) Micro centrifuge tube 를 98°C에서 10 분 처리 한 후, 12,000rpm 에서 5 분간 원심분리 한다. (주의! 98°C에서 10 분간 boiling 할 때 cap 이 열리지 않도록 함. Boiling 과정을 heating cover 가 있는 PCR 기기에서 수행하는 것을 추천 합니다.)
- 7) 상층액 약 90µl 을 새로운 micro centrifuge tube 로 옮긴 후 PCR template 로 3~5µl 을 사용한다.

### B. PCR 반응

- 8) 아래 표와 같은 조건으로 잘 혼합한다.  
(주의!! 심한 vortexing 은 하지마세요.)

Reaction components	Sample Reaction	Positive Reaction	Negative Reaction
2XPCR Premix	10µl	10µl	10µl
Primer mix	2µl	2µl	2µl
Sample	3~5µl	-	-
Positive control DNA	-	1µl	-
DNase Free Water	Up to 20µl		
Final Volume	20µl	20µl	20µl

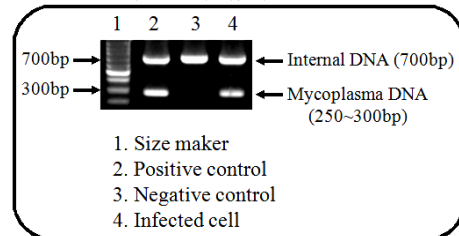
- 9) 아래와 같은 조건으로 PCR 반응을 수행한다.

Temperature	Time	Cycle
95°C	5min	1 cycle
95°C	30sec	35 cycles
55°C	30sec	
72°C	30sec	

- 10) PCR 반응 후, 1.5% agarose gel 에 5~10µl 를 전기영동한다.

### C. 결과

마이코플라즈마에 감염되었다면 약 250-300bp 의 Mycoplasma DNA band 를 확인할 수 있다. 또한 정상적인 PCR 반응이 수행되었다면, 약 700bp 의 Internal DNA band 을 확인할 수 있다.



**참조 1)** 정확한 해석을 위해 PCR 반응 시 template 를 첨가하지 않는 negative control 반응(DNase free water 첨가)과 mycoplasma control DNA 를 사용하는 positive control 반응을 동시에 진행하는 것을 추천합니다.

**참조 2)** 단백질 및 항체 생산용 CHO cell 및 Hybridoma cell 의 경우, 배지로 분리된 높은 농도의 단백질 과 항체가 PCR 반응을 억제할 수 있어, 준비된 template 를 최소(1µl) 사용하거나 희석하여 사용하여야 합니다.

**참조 3)** 높은 FBS 농도(20%이상) 또한 PCR 반응을 저해하므로 이런 경우에는 genomic DNA purification 방법으로 분리한 genomic DNA 를 sample(template)로 사용하는 것을 추천합니다.

### 5. 관련제품

- BioMycoX<sup>®</sup> Mycoplasma Elimination Kit  
Cat. No. E-01/02/03 (Light /Medium/Heavy contamination )
- BioMycoX<sup>®</sup> Mycoplasma Prevention Spray  
Cat. No. P-1000 (1L)
- CryoBanker<sup>®</sup> Cell Freezing Medium, Serum Free  
Cat. No. CB-50/100 (50ml/100ml)