

관련 제품



Products	
Mycoplasma Detection	Cat No.
<i>BioMycoX</i> ® Mycoplasma PCR Detection Kit	D-25
	D-50
	D-100
<i>BioMycoX</i> ® Mycoplasma qPCR Detection Kit	QDR-25
	QDR-50
	QDR-100
<i>Hisense</i> ™ Mycoplasma PCR Detection Kit	HD-50
	HD-100
<i>MycoQSearch</i> ™ Mycoplasma qPCR Detection Kit	QD-50
	QD-100
<i>MycoQSearch</i> ™ Plus Mycoplasma qPCR Detection Kit	QDP-50
	QDP-100
Thermolabile UDG (Uracil-DNA glycosylase)	UD-100(100 Unit)
Mycoplasma Elimination	
<i>BioMycoX</i> ® Mycoplasma Elimination Kit	E-01(Light contamination)
	E-02(Medium contamination)
	E-03(Heavy contamination)
Mycoplasma Prevention	
<i>BioMycoX</i> ® Mycoplasma Prevention Spray	P-100
	P-500
	P-1000
<i>CryoBanker</i> ™	CB-10
	CB-50
	CB-100

SafeDry™ Mycoplasma PCR Detection Kit

설명서

Cat. No. LD-8, LD-48, & LD-96

Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

SafeDry™ Mycoplasma PCR Detection Kit

마이코플라스마 오염

마이코플라스마는 세포벽이 없는 가장 작은 크기의 세균입니다. 관리를 잘 하는 세포 배양의 경우도 약 15% 이상의 오염율을 나타내는 가장 오염을 예방하기 어려운 세균입니다. 이는 마이코플라스마가 대부분의 항생제에 내성이 있으며, 세포를 다루는 연구자 및 세포 배양에 사용하는 배지, 혈청 등 다양한 경로로 오염되기 때문입니다. 오염된 세포는 연구자가 얻고자 하는 결과를 왜곡시키고 시간 및 경제적 자원을 낭비하게 하여 연구 결과의 불신과 비생산적 효과를 초래하기 때문에 주기적으로 관리하여 신속하게 대처하는 것이 최상의 방법입니다.

제품 일반

SafeDry™ Mycoplasma PCR Detection Kit는 세포 배양 및 세포 배양을 이용하여 생산된 생물의약품에서 마이코플라스마 오염을 가장 높은 민감도로 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응(PCR) 기술이 적용되어 있습니다. Primer는 마이코플라스마 유전자의 highly conserved 16S rRNA coding 부분에 특이적으로 반응하며, 세포 배양의 주된 오염원인 *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. hominis* 뿐만 아니라 *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. synoviae* 그리고 *Ureaplasma* 종을 포함하여 현재 보고된 209종의 마이코플라스마를 검출할 수 있습니다.

제품 특징

- 건조 스펀지 타입으로 용해도가 높고 보관이 용이합니다.
- 모든 반응물이 포함되어 있어 샘플만 첨가하면 되므로 사용이 편리합니다.
- 현재 보고된 209종의 마이코플라스마 모두 검출이 가능합니다.
- 내부대조군이 포함되어 위음성(false negative)을 방지할 수 있습니다.
- dUTP가 포함되어 있어 UDg(uracil-DNA glycosylase)를 사용하여 캐리-오버 오염(carry-over contamination)을 방지할 수 있습니다.
- 진핵 세포와 다른 박테리아 DNA는 증폭하지 않고 마이코플라스마에 매우 특이적입니다.

제품 구성

구 성	Cat. No. / 규격	
	LD-8	LD-48
	8 Rxn	48 Rxn
8 strip premix	8 strip x 1개	8 strip x 6개
Positive control	5 µl	25 µl
DNase free water	150 µl	1 ml

보관 조건

제품을 받는 즉시 냉동조건(-18°C~-20°C)에서 보관합니다.

캐리-오버(Carry-over) 오염 방지

PCR 반응을 반복적으로 수행할 경우 먼저 수행한 PCR 산물이 다음 PCR에 오염되는 현상이 흔히 발생하는 것으로 알려져 있습니다. 이를 방지하기 위해 본 제품에는 dTTP대신 dUTP가 들어 있어서 합성된 PCR 산물에는 dUTP가 포함되게 됩니다.

PCR 반응전에 UDg(uracil-DNA glycosylase, cat. No. UD100) 1 Unit을 20 µl 반응액에 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키면 이전에 dUTP가 포함되어 합성된 DNA가 오염되어도 오염된 DNA의 uracil 결합부위를 UDg가 분해하여 오염된 DNA가 제거되므로 위양성 반응(false positive)을 억제할 수 있습니다.

Protocol

1. 샘플(Template) 준비

- 1) 실온에서 키트 구성물을 녹인 후, 짧게 원심분리 하여 튜브 아래쪽에 모이도록 합니다.
- 2) 마이코플라스마 오염이 예상되는 세포 (confluence 80% 이상)의 배양액 1 ml를 새로운 1.5 ml 마이크로원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 3) 원심분리(1,500 rpm, 5 분)하여 세포를 침전시키고 상층액 1 ml를 새로운 마이크로원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 4) 상층액을 원심분리(12,000 rpm, 10 분)하여 마이코플라스마를 침전시킨 후, 상층액을 제거합니다(육안으로 보이지 않을 수 있습니다).
- 5) 배양액에 PCR 저해 물질이 있는 경우 TE 1 ml을 넣어 washing 1 회 하고 4)항목을 반복합니다.
- 6) 상층액을 모두 제거하고 침전된 마이코플라스마에 멸균수 100 µl를 넣고 vortexing 하여 혼합합니다.
- 7) 마이크로원심분리 튜브를 98°C에서 10 분 처리 한 후, 원심분리(12,000 rpm, 5 분) 합니다 (주의! 98°C에서 10 분간 boiling 할 때 뚜껑이 열리지 않도록 합니다. Boiling 과정을 heating cover 가 있는 PCR 기기에서 수행할 것을 추천합니다).
- 8) 상층액 약 90 µl를 새로운 마이크로원심분리 튜브로 옮긴 후, PCR template로 3~5 µl를 사용합니다.

- 10) 아래와 같은 조건으로 PCR 반응을 수행합니다.

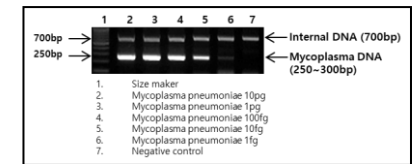
Temperature	Time	Cycle
(*Option) 25°C	10 min	1
위음성이 없을 시 수행		
95°C	5 min	1
95°C	30 sec	35
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	

* 위양성 반응이 반복적으로 나타날 경우 carry-over 오염 가능성이 높으므로 UDg(Cat. No. UD100)를 별도로 구매하여 반응전에 1 Unit을 20 µl 반응액에 넣고 25°C에서 10 분간 반응시키면 위양성 반응을 억제할 수 있습니다.

- 11) PCR 반응 후, 1.5~2% agarose gel에 5~10 µl를 전기영동 합니다.

결과

마이코플라스마에 감염되면 약 250~300 bp의 마이코플라스마 DNA 밴드를 확인할 수 있습니다. 또한 정상적으로 PCR반응이 수행되면, 약 700 bp의 Internal DNA 밴드를 확인할 수 있습니다.



참조 1) 정확한 해석을 위해 PCR 반응 시 template를 첨가하지 않는 negative control 반응(DNase free water 첨가)과 마이코플라스마 control DNA를 사용하는 positive control 반응을 동시에 진행하는 것을 추천합니다.

참조 2) 단백질 및 항체 생산용 CHO 세포 및 hybridoma 세포의 경우, 배지로 분비된 높은 농도의 단백질과 항체가 PCR반응을 억제할 수 있어, 준비된 template를 최소량(1 µl) 사용하거나 희석하여 사용하여야 합니다.

2. PCR 반응

- 9) 아래 표와 같은 조건으로 잘 혼합합니다.

반응 성분	Sample reaction	Positive reaction	Negative reaction
PCR premix	0	-	0
Positive control	-	1 µl	-
Sample	3~5 µl	-	-
UDG* (Option)	1 µl	0	1 µl
DNase free water	Up to 20 µl	20 µl	Up to 20 µl
Final volume	20 µl	20 µl	20 µl

* 위양성 반응이 반복적으로 나타날 경우에만 첨가