

간단 · 신속 · 고감도로 Mycoplasma 검출!!

# MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit

TaKaRa Code FL071 10회용  
 TaKaRa Code FL072 25회용  
 TaKaRa Code FL073 100회용  
 Cambrex사 제품이다.

- 20분 이내에 검출할 수 있다.
- Sample에 시약을 첨가하고, luminometer로 측정한다.
- 모든 mycoplasma속을 검출할 수 있다.

Mycoplasma는 배양세포 및 배지 등의 오염균으로 많이 알려져 있으며, 오염율이 15% 이상이라고 시사하는 연구도 있다.

Mycoplasma 오염은 세포의 증식속도를 저하시킴과 동시에 세포 기능에 심각한 변화를 가져온다. 예를 들면 세포의 유전자 발현에 큰 영향을 가져 온다고 알려져 있으며, 수백개의 유전자 발현 형태가 변화되었다는 보고<sup>1)</sup>도 있다. 이처럼 mycoplasma 감염은 실험 결과에 큰 영향을 미치기 때문에 그 감염 유무를 확인하는 것이 중요하다. 가장 작은 원핵생물인 mycoplasma는 대부분의 필터를 통과하며, 또한 대부분의 항생물질에 저항성이 있어 제거하는 것이 어렵다. 따라서 세포를 계대할 때마다 mycoplasma를 검사해 신속히 처리할 필요가 있다.

종래의 mycoplasma 검출법에서는 판정하는데 까지 몇 시간에서 며칠이 필요했지만, 본 제품에서는 20분 이내에 판정이 가능하다 (그림 1). 게다가 2종류의 시약을 사용하기 때문에 검출이 간단하며 감도가 높다 (표 1).

## 측정 원리

본 kit에서는 mycoplasma가 특이적으로 지닌 어떤 종류의 효소 활성을 측정함으로써, 살아있는 mycoplasma를 검출한다. 이 효소가 MycoAlert™ Substate에 작용하면 ADP가 ATP로 변환된다. 이렇게 생성된 ATP를 luciferin/luciferase 발광반응에 의해 검출한다. 형광검출은 luminometer를 이용하여 검출한다.

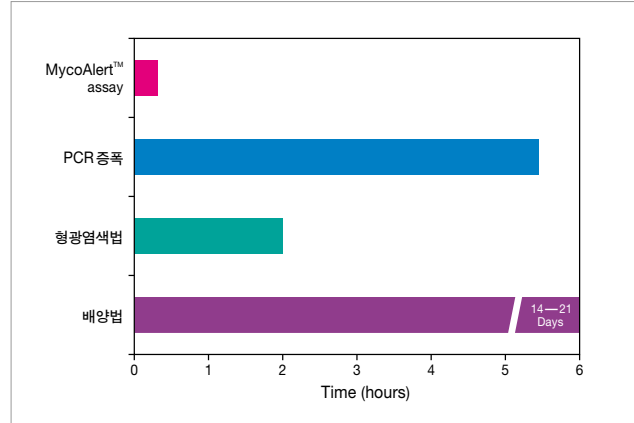
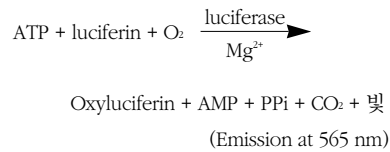


그림 1 여러 가지 검출법에서 필요한 검출시간 비교



실제로는 MycoAlert™ Reagent를 시료에 넣고 세포를 용해시킨 후, MycoAlert™ Substate를 첨가하기 전 (A)과 후 (B) 시료 중의 ATP level을 측정 (그림 2)하고, 그 비율(Reading B/Reading A)을 구한다. 시료 중에 mycoplasma가 존재하면 그 비율은 1.0을 크게 상회한다. 본 kit를 이용하여 측정하고, 그 비율을 산출한 예를 표 2에 나타내었다.

표 1 다양한 mycoplasma 검출법에 의한 검출감도 비교 (Cambrex사 data)

검체	cfu/ml	배양법	형광염색법	PCR <sup>2)</sup>	MycoAlert™
A. laidlawii	0	-	-	-	-
	20	+	+	-	+
	200	+	+	+	+
	20,000	+	+	+	+
	200,000	+	+	-	+
M. hyorhinitis	0	-	-	-	-
	20	-	-	-	+
	20,000	+	-	-	+
	200,000	+	+	+	+

\*1: 검체로서 A. laidlawii와 M. hyorhinitis가 감염된 HepG2 세포를 이용했다. 양성을 +, 음성을 -로 표시했다.

\*2: PCR은 35 cycle, 1 round로 실시했다 (A사 kit 사용). Nested PCR을 수행할 경우, 감도는 상승한다.

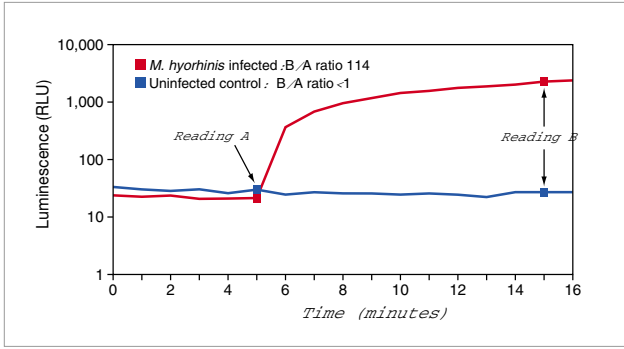


그림 2 Mycoplasma 감염세포와 비감염세포를 검체로 할 경우의 형광반응 kinetics  
Mycoplasma 감염세포의 경우에는 MycoAlert™ Substate를 첨가하면 형광이 증대되고, Reading B/Reading A 비율이 1을 크게 넘는다. 한편 비감염 세포의 경우에는 그 비율이 1을 크게 넘지는 않는다.

표 2 MycoAlert™ Assay에 의한 mycoplasma 감염세포와 비감염세포 판별 예

세포주	Reading B/ Reading A	비율판정
<b>감염세포</b>		
K562	123.26	양성
A549	4.10	양성
U937	8.26	양성
HepG2	1.27*	board line 24시간 후에 다시 테스트
<b>비감염세포</b>		
HL60	0.72	음성
COS-7	0.46	음성

\*: 비율이 1.0을 약간 넘었을 경우는 24 ~ 48 시간 후에 다시 테스트 하여 비율이 증가하는지 확인한다.

### 성능

- 감도 : PCR법, 형광색소법으로는 negative false가 되는 시료에서도 검출 가능
- 검출 한계 : 50 cfu/ml 이하
- 검출 가능한 균 : Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma 단, 효모와 대장균은 검출되지 않는다.

### Protocol

본 kit를 이용한 검출 protocol의 개요를 그림 3에 나타내었다.

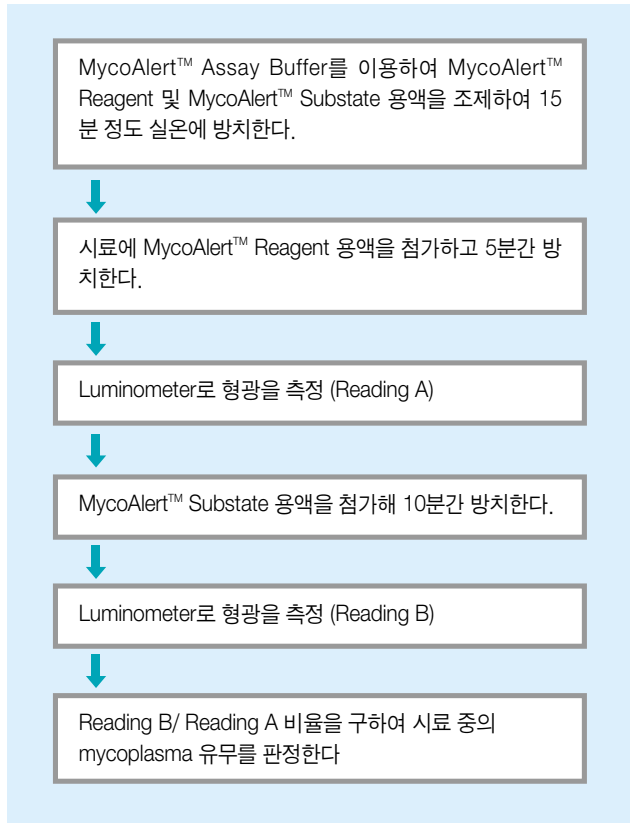


그림 3 본 kit를 이용한 mycoplasma 검출 protocol

### 참고문헌

- 1) Miller, C. J. et al.: Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. (2003) *BioTechniques* **35**, 812-814.