

MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit

20분 만에 Mycoplasma 검출 가능

- 모든 Mycoplasma 종을 신속히 검출할 수 있다
- 20분 이내에 Mycoplasma 오염을 판별할 수 있다
- 시약 첨가 후 Luminometer 측정으로 매우 간단하다

1. 개요

Mycoplasma는 가장 작고 간단한 원핵생물로, 제한적인 생합성 능력으로 인해 영양분을 호스트에 의존하여 생존하고 있다. Mycoplasma는 배양세포 및 배지 등의 오염균으로 잘 알려져 있으나, 일부 lab의 경우에는 오염 사실을 모르고 지속적으로 실험을 진행하여 잘못된 결과를 초래하는 경우가 종종 있다. Mycoplasma 오염은 세포의 증식속도를 저하시키고 동시에 세포 기능에 심각한 변화를 가져온다(그림 1). 예를 들면 세포의 유전자 발현에 큰 영향을 가져 온다고 알려져 있으며 수백개의 유전자 발현형태가 변화되었다는 보고도 있다. 이처럼 Mycoplasma 감염은 실험 및 결과에 큰 영향을 미치기 때문에 그 감염 유무를 확인하는 것은 매우 중요한 체크포인트이다. 가장 작은 원핵생물인 Mycoplasma는 대부분의 필터를 통과하며, 또한 대부분의 항생물질에 저항성이 있어 직접 제거하는 것도 어렵다. 따라서 세포를 계대할 때마다 Mycoplasma 검사를 수행하여, 신속히 처리할 필요가 있다.

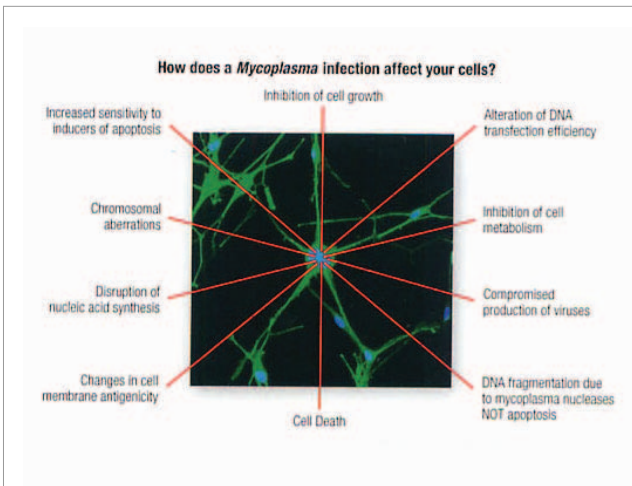


그림 1. Mycoplasma infection can affect every single process in the cell

종래의 Mycoplasma 검출에서는 오염여부를 판정하는데 몇 시간에서 며칠이 소요되었지만, MycoAlert Mycoplasma Detection Kit를 사용하면 20분 이내에 판정이 가능하다(그림 2). 게다가 2종류의 시약을 사용하기 때문에 검출이 간단하며 감도도 높다(표 1).

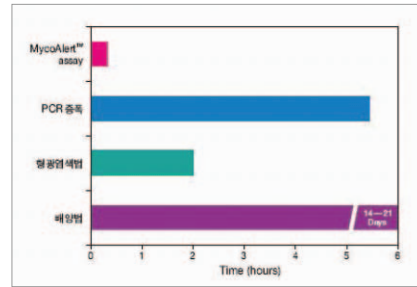


그림 2. Mycoplasma 검출방법에 따른 검출시간 비교

■ 표 1 다양한 mycoplasma 검출법에 의한 검출감도 비교 (LONZA사 data)

검체	cfu/ml	배양법	형광염색법	PCR ²	MycoAlert [®]
<i>A. laidlawii</i>	0	-	-	-	-
	20	+	+	-	+
	200	+	+	+	+
	20,000	+	+	+	+
	200,000	+	+	-	+
<i>M. hyorhinis</i>	0	-	-	-	-
	20	-	-	-	+
	20,000	+	-	-	+
	200,000	+	+	+	+

*1: 검체로서 *A. laidlawii*와 *M. hyorhinis*가 감염된 HepG2 세포를 이용했다.

양성을 +, 음성을 -로 표시했다.

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

*3: LONZA는 Cambrex의 새로운 이름입니다.

2. 측정원리

MycoAlert Mycoplasma Detection Kit는 Mycoplasma가 특이적으로 지닌 효소 활성을 측정함으로써, 살아있는 Mycoplasma를 검출한다. 이 효소가 MycoAlert 기질에 작용하면 ADP가 ATP로 변환되고, Luciferin/Luciferase 발광반응에 의해 Luminometer로 검출된다.

PCR법, 형광색소법으로는 false negative가 되는 시료에서도 검출이 가능하고 검출한계는 50 cfu/ml 이하이다. 단, 대장균은 검출되지 않는다.

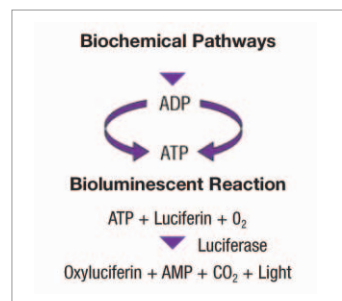


그림 3. The MycoAlert® Kit links the mycoplasma specific metabolic pathways to light generation via the luciferase enzyme.

3. 측정방법

MycoAlert Reagent를 시료에 넣고 세포를 용해시킨 후, 기질을 첨가하기 전(A)과 후(B) 시료 중의 ATP level을 측정(그림 4)하고, 그 비율(Reading B/Reading A)을 구한다. 시료 중에 Mycoplasma가 존재하면 그 비율은 1.0을 크게 상회한다. MycoAlert Mycoplasma Detection Kit를 이용하여 측정된 예를 표 2에 나타내었다

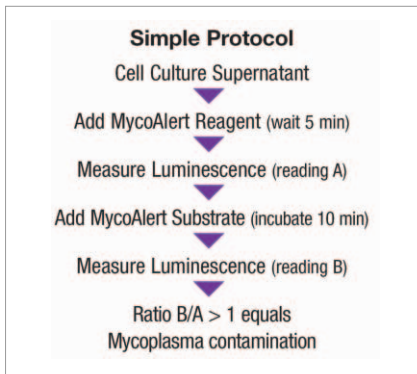


그림 4. MycoAlert™ Assay protocol.

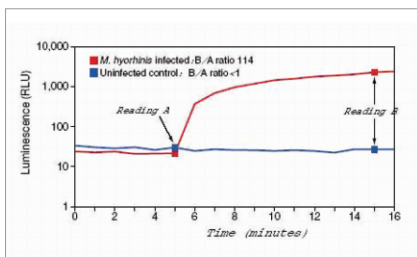


그림 5. Mycoplasma 감염세포와 비감염세포를 검체로 할 경우의 형광반응 kinetics
Mycoplasma 감염세포의 경우에는 MycoAlert® Substate를 첨가하면 형광이 증대되고, Reading B/Reading A 비율이 1.0을 크게 넘는다. 한편 비감염 세포의 경우에는 그 비율이 1.0을 크게 넘지는 않는다.

■ 표 2 MycoAlert® Assay에 의한 mycoplasma 감염세포와 비감염세포 판별 예

세포주	Reading B/Reading A	비율판정
감염세포		
K562	123.26	양성
A549	4.10	양성
U937	8.26	양성
		board line
HepG2	1.27*	24시간 후에 다시 테스트
비감염세포		
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.

4. 적용 예

MycoAlert Mycoplasma Detection Kit를 이용하여 Mycoplasma 종 뿐만 아니라 Acholeplasma, Mesoplasma, Spiroplasma 종도 검출이 가능한 것을 검증하였다(표 3).

■ 표 3. Mycoplasma tested using the MycoAlert® Detection Kit

Mycoplasma Species Tested	Origin
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Mammalian/Avian
<i>Acholeplasma modicum</i>	Bovine
<i>Acholeplasma morum</i>	Mammalian
<i>Mesoplasma entomophilum</i>	Insect
<i>Mesoplasma florum</i>	Plant/insect
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	Bovine
<i>Mycoplasma arginini</i>	Bovine/Porcine
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	Human
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Bovine
<i>Mycoplasma bovis</i>	Bovine
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	Bovine
<i>Mycoplasma buccale</i>	Human
<i>Mycoplasma californicum</i>	Bovine
<i>Mycoplasma canadense</i>	Bovine
<i>Mycoplasma cloacale</i>	Avian
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	Ovine & Caprine
<i>Mycoplasma equirhinis</i>	Equine
<i>Mycoplasma faucium</i>	Human
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Human
<i>Mycoplasma gallinaceum</i>	Mammalian/Avian
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Avian
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Human
<i>Mycoplasma hominis</i>	Human
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Human
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Porcine
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	Porcine
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	Human
<i>Mycoplasma muris</i>	Murine
<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	Murine
<i>Mycoplasma opalescens</i>	Canine
<i>Mycoplasma orale</i>	Human
<i>Mycoplasma pirum</i>	Mammalian
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Human
<i>Mycoplasma primum</i>	Mammalian
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Human
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Human
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Human
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Avian
<i>Spiroplasma citri</i>	Plant/insect

■ 관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
MycoAler® Mycoplasma Detection Kit	10 Tests	LT07-118
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	25 Tests	LT07-218
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	50 Tests	LT07-418
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	100 Tests	LT07-318
MycoAlert® Assay Control Set	10 Tests	LT07-518
TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set	50회	6601