

欧州経済領域のお客様向け情報：

本製品は SVHC（環境に対する内分泌攪乱特性がある高懸念物質）オクテル/ノニルフェノールエトキシレート含有しています。

監視や品質管理などの分析業務など REACH 規則第 56 条第(3)項および第 3 条第 23 号に従い管理された条件下でのみ使用してください。

---

# MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit

MycoTOOL マイコプラズマリアルタイム PCR キット

---

## 第 10 版（日本改訂版）

改訂：2021 年 8 月（2022 年 2 月）

細胞培養サンプルのマイコプラズマ否定試験用

REF 06 495 605 001

1 キット

PCR：160 回分  
反応容量：50 $\mu$ l

本キットは-15~-25°Cで保管してください。

# 目次

1. 製品の機能 .....	3
2. 本製品の使い方 .....	5
2.1 ご使用前に.....	5
2.2 サンプル調製.....	5
2.2.1 自動サンプル調製.....	5
2.2.2 用手サンプル調製.....	6
2.3 PCR 実験のセットアップ .....	7
2.3.1 プレートのセットアップと PCR 反応数.....	7
2.3.2 LightCycler® 480 Instrument II による PCR.....	9
3. 結果の解釈 .....	12
3.1 LightCycler® 480 Instrument II の測定結果.....	12
3.2 Applied Biosystems® 7500 リアルタイム PCR システムによる PCR .....	13
4. 制限事項 .....	16
5. トラブルシューティング.....	16
6. 補足資料 .....	17
6.1 原理.....	17
6.2 品質管理.....	17
6.3 保証.....	17
6.4 参考文献.....	17
7. 追記事項.....	18
7.1 凡例.....	18
7.2 改訂履歴.....	18
7.3 注文情報.....	18
7.4 商標.....	18
7.5 規制上の免責事項.....	18

## 1. 製品の機能

**試験数** MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit は 10 サンプル以上の細胞培養サンプルのマイコプラズマ否定試験キットです。本キットには反応容量 50 $\mu$ l で PCR を 160 回実施できる試薬が含まれています。

バイアル/ ボトル	キャップ	ラベル	機能/説明	数量
1	青	Recovery Control	プラスミド	1 本、 400 $\mu$ l
2	赤	PCR Master, 2 $\times$ conc.	リアルタイム DNA 検出アッセイの実施に必要な試薬をすべて含有（プライマーとテンプレートを除く）	5 本、 各 1ml
3	橙	UNG	デオキシウリジン三リン酸（dUTP）含有 DNA 消化酵素	1 本、 180 $\mu$ l
4	青緑色	PCR Enhancer	PCR 添加剤	1 本、 180 $\mu$ l
5	緑	Detection Mix, 25 $\times$ conc.	プライマー及び FAM 標識検出プローブ	1 本、 220 $\mu$ l
6	黄	Detection Mix Recovery Control, 25 $\times$ conc.	プライマー及び LightCycler <sup>®</sup> Yellow 555 標識検出プローブ	1 本、 140 $\mu$ l
7	紫	Positive Control	プラスミド	1 本、 800 $\mu$ l
8	白	Water, PCR grade		2 本、 各 1ml

**保存方法・安定性** ドライアイス同梱出荷製品です。  
-15 $\sim$ -25 $^{\circ}$ C で保存すると、製品ラベルに記載の有効期限まで安定です。  
△ 開封後は、バイアル 5 及び 6 は遮光して保存してください。  
△ バイアル 2 は繰り返し凍結解凍しないこと。バイアル 2 は解凍後、+2 $\sim$ +8 $^{\circ}$ C で 4 週間保存できます。

**検査所要時間** PCR セットアップの所要時間：約 1 時間。  
結果が出るまでの所要時間（サンプル調製を含まない）：約 4 時間。

**その他の必要器具・試薬**

- ピペット
- ヌクレアーゼフリー、DNA フリー、エアロゾル耐性のピペットチップ
- ヌクレアーゼフリー、DNA フリーのバイアル
- アルコールワイプ
- バイオセーフティーキャビネットクラス II
- サーマミキサー（2ml チューブ用）
- ベンチトップ遠心分離機（2ml チューブ用）
- ボルテックスミキサー

### 核酸分離

分析サンプル物質の調製法は以下のいずれかから選択します。

- MagNA Pure 96 Instrument\* と MagNA Pure 96DNA および Viral NA Large Volume Kit\* を用いる自動調製法
- または QC Sample Preparation Kit\* を用いる用手調製法

### PCR ワークフロー

- 層流フード
- 2 つ以上の検出チャンネル（FAM、VIC/HEX/Yellow555）を搭載したリアルタイム PCR 装置、付属品および使い捨て消耗品。LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II\*（96 ウェルタイプ）をお勧めします。
- マルチウェルプレート：LightCycler<sup>®</sup> 480 Multiwell Plate 96、白\*。
- マルチウェルプレート用ローターを備えた標準的なスイングバケット式遠心分離機および適切なアダプター。

**用途** MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit は、欧州薬局方第 2.6.7 章に記載されているマイ

コプラズマ核酸増幅検査（NAT）の特異度、感度/検出限界および頑健性に関するガイドラインに従って CHO 細胞培養物中のマイコプラズマ検出用に最適化された *in vitro* 核酸増幅検査です。

NS0 や SP2 などの他の細胞株を検査する場合は、ユーザー自身が本キットの性能基準を設ける必要があります。

本キットは、サンプル物質の供給者（European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care など）が提供しているコロニー形成単位（cfu）規格値に従って開発されています。

**特異度および感度**

MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit によるアッセイの特異度は、欧州薬局方に従い *Streptococcus bovis* (ATCC 9809)、*Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) および *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437) の妨害がないことで評価しています。本キットは、欧州薬局方第 2.6.7 章に記載の感度要件を満たすように開発されたものです。

## 2. 本製品の使い方

### 2.1 ご使用の前に

**安全情報** 欧州経済領域のみ：以下の SVHC を含有：監視や品質管理などの分析活動など、REACH 規則第 56 条(3)および第 3 条第 23 号に準拠して管理された条件下でのみ使用すること。

**注意事項** 本製品は、REACH 付属書 XIV 収載物質（SVHC、環境に対する内分泌攪乱特性がある高懸念物質）を 0.1%w/w 以上含有します。本製品は、管理条件下での科学的研究開発（分析活動、品質管理など）の認可免責条件下でのみ使用できます。訓練を受けた適格な担当者 のみが物質を取り扱うことができます。

汚染を避けるため、DNA フリーの条件下でワークフローのセットアップを行ってください。

そのためには以下が必要です：

- ヌクレアーゼフリー、DNA フリーの機器および消耗品を用いてすべての溶液の調製・ピペット操作を行うこと。
- ピペット操作の前に層流フードを UV 処理すること。
- 滅菌済みの使い捨て手袋と洗濯したての白衣を着用すること。
- ピペット操作後直ちにバイアルに蓋をすること。
- 一連のワークフローステップの空間的隔離。

実験室	ワークフローのステップ
サンプル調製室	Recovery Control サンプルの調製など、試験サンプルの抽出および精製。
マスターミックス調製室	マスターミックスの調製および PCR 陰性コントロールの NTC ウェルへのピペット操作。
セットアップおよび増幅実行用 PCR 室	サンプルおよび PCR Positive Control の希釈および Positive Control ウェルへのピペット操作。LightCycler® 480 Instrument II の操作。

**廃棄物処理** 製品：未使用製品や使用済み製品を排水溝、水路、土壌に廃棄しないこと。池、水路、排水溝を化学薬品や使用済みの容器で汚染しないこと。使用済み製品と未使用製品は分別収集し、認可を受けている廃棄物管理会社に送付して処分すること。汚染されたパッケージ：残っている内容物は取り出し、未使用品として廃棄してください。空の容器は包装ゴミと見なされます。承認を受けている廃棄物処理施設に持ち込んで処分する必要があります。空の容器を再利用しないでください。

### 2.2 サンプル調製

本キットと組み合わせる場合は、用手と自動の 2 つのサンプル調製オプションがあります。どちらの精製方法でも 50µl の PCR で 20µl の溶出液を用いて同一の感度が得られます。

△ サンプル中の細胞密度が  $5 \times 10^6$  細胞/ml を超えないようにしてください。細胞密度が高くなると、過負荷の精製マトリックスからのサンプル調製効率が落ちるため、偽陰性の結果が出る場合があります。

#### 2.2.1 自動サンプル調製

自動サンプル調製では、MagNA Pure 96 Instrument \* と MagNA Pure 96 DNA および Viral NA Large Volume Kit\* を使用します。本装置と試薬を最大活用できるよう、対応する使用説明書をお読みください。

この例では、MagNA Pure 96 Instrument を用い、MagNA Pure 96DNA および Viral NA Large Volume Kit と MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit を使用して、最大  $5 \times 10^6$  CHO 細胞/ml を精製します。なお、MagNA Pure 96 システムを MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit と組み合わせて用いる場合、ユーザーは他の細胞株の上限を経験的に決定する必要があります。

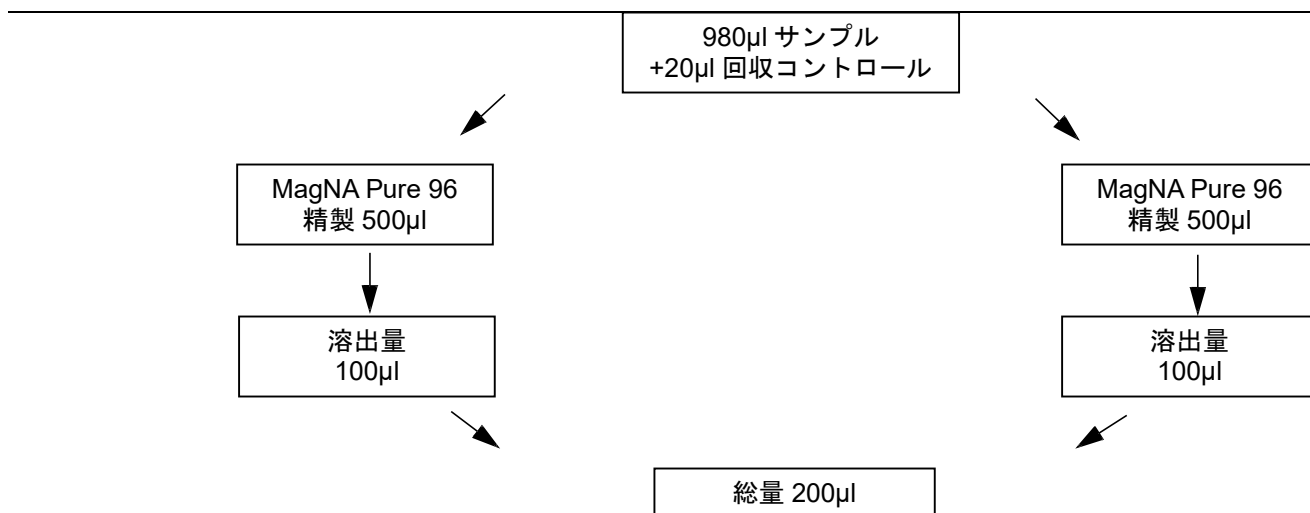


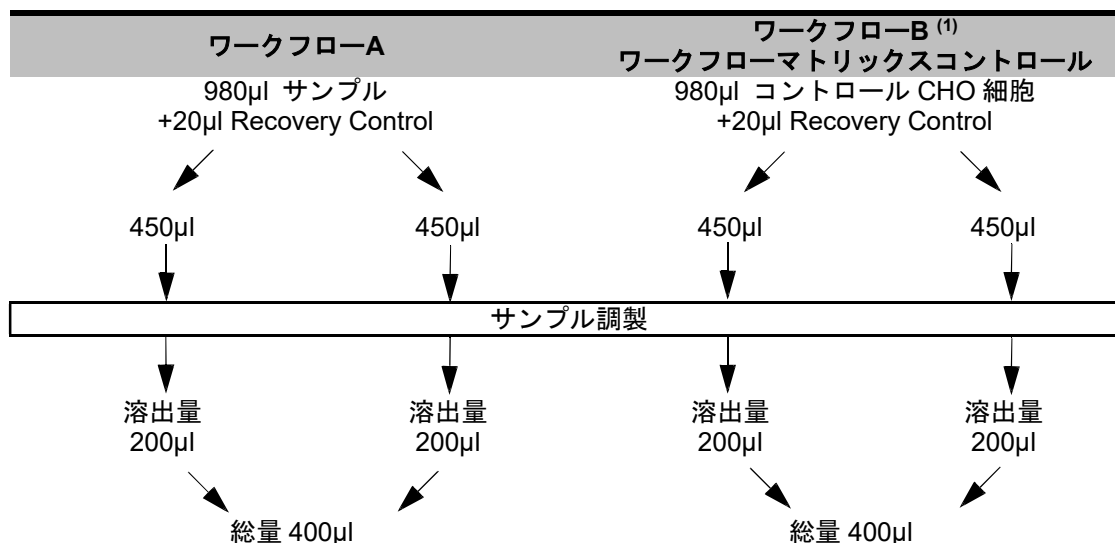
図 1a：自動サンプル調製の実験の概要。

それぞれの MagNA Pure 96 操作説明書に記載されているガイドラインのほかに、以下を行います (図 1a)。

- ① 操作説明書の指示に従って、MagNA Pure 96 装置の準備を整えます。
- ② 精製プロトコル“Viral NA Universal LV”を選択します。
- ③ サンプル量を入力します：500µl
- ④ 溶出量を入力します：100µl
- ⑤ 980µl のサンプルまたはワークフローマトリックスコントロール<sup>(1)</sup>を調製し、20µl の Recovery Control を添加します。
- ⑥ ピペットを用いて 2×500µl のアリコートに分割します。
- ⑦ MagNA Pure 96 DNA で精製を開始します。
- ⑧ DNA は 100µl の容量で 2 回溶出されます。これら 2 回分の溶出液をプールします。

<sup>(1)</sup> オプション：顧客要件に応じて Positive Control または陰性コントロール。

## 2.2.2 用手サンプル調製



<sup>(1)</sup> オプション：顧客要件に応じて Positive Control または陰性コントロール。

図 1b：用手サンプル調製の実験の概要。

次のプロトコルは、QC Sample Preparation Kit\*を用いた用手サンプル調製の説明です。\*印は QC Sample Preparation Kit のバイアルです。

- ① サーモミキサーの温度を+56°Cに平衡させます。
- ② ・それぞれ 30µl の Proteinase K (バイアル 1\*) を添加した適切な本数の空のバイアル (QC Sample Preparation Kit の試薬バイアル 8\*) を用意します。

	• それに応じて反応バイアルにラベルを付けます。
③	450 $\mu$ l のサンプルまたはワークフローマトリックスコントロールを各反応バイアルに添加します。
④	各反応バイアルに 450 $\mu$ l の Lysis Buffer (バイアル 2 <sup>#</sup> ) を添加します。
⑤	反応バイアルに蓋をし、5 秒間、3 回ボルテックスします。
⑥	サーモミキサーに入れ、+56 $^{\circ}$ C、600rpm で 15 分間インキュベートします。
⑦	• 反応バイアルを取り出します。 • サーモミキサーの温度を+80 $^{\circ}$ Cに平衡させます。
⑧	• 各反応バイアルに 630 $\mu$ l の Precipitation Reagent (バイアル 3 <sup>#</sup> ) を添加します。 • 反応バイアルに蓋をして 20 回転倒した後、5 秒間ボルテックスします。
⑨	• 16,000 $\times$ g で 3 分間遠心します。 • ペレットを取り出さずに上清をデカントします。
⑩	1ml の Washing Buffer (バイアル 4 <sup>#</sup> ) を添加します。
⑪	• 反応バイアルに蓋をして 5 回転倒します。 • 直ちに 16,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、すべての上清を静かに捨てます。
⑫	16,000 $\times$ g で 3 秒間さっと遠心し、残っている上清を静かに捨てます。
⑬	200 $\mu$ l の Dissolution Buffer (バイアル 5 <sup>#</sup> ) を添加します。
⑭	• 反応バイアルに蓋をし、サーモミキサー内でペレットを+80 $^{\circ}$ C、900rpm にて 10 分間溶解します。 ◎ サンプル物質によってはインキュベーション時間を最長 30 分まで延長できます。
⑮	ペレットが完全に溶解するまでボルテックスします。これら 2 回分の溶出液をプールします。
⑯	反応バイアルを PCR 室に移します。 ◎ 溶出した DNA は-15 $\sim$ -25 $^{\circ}$ Cで 3 日間安定です。

## 2.3 PCR 実験のセットアップ

### 2.3.1 プレートのセットアップと PCR 反応数

被験サンプルごとに、次の PCR 反応数の準備をします。

PCR 1 回につき 4 回反復測定を行います。Mycoplasma PCR と Recovery Control PCR を用いて、常に 2 つの PCR 陰性コントロール (NTC) の PCR を実行します。

PCR 陰性コントロール (NTC) を調製するには、テンプレート DNA を Water, PCR Grade (バイアル 8) に置き換えます。

下の図は、すべての標準物質とコントロールを含む、1 サンプルのみ (図 2a) と複数サンプル (図 2b) のプレートのセットアップの例です。

	サンプル PCR rxn <sup>(1)</sup>	Positive Control rxn	NTC (PCR 陰性コントロール) rxn	合計 rxn	マスターミックス調製物 <sup>(2)</sup>	マスターミックス $[\mu$ l] <sup>(2)</sup> 30 $\mu$ l/反応
Mycoplasma PCR	4	4	2	10	11	330
Recovery Control PCR	4	-	2	6	7	210

<sup>(1)</sup>rxn=反応

<sup>(2)</sup>ピペット操作ステップで起こる微量の液体損失を補うため、1 反応加算します。

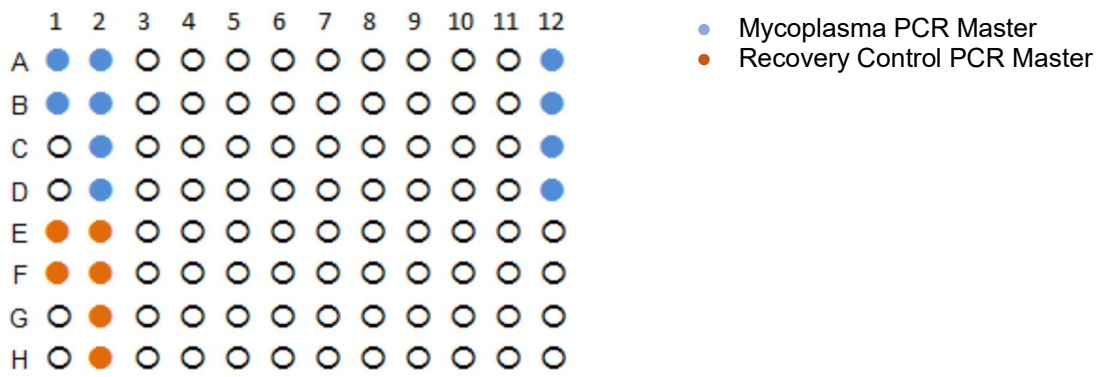


図 2a : 1 サンプル/プレートの場合の配置案。

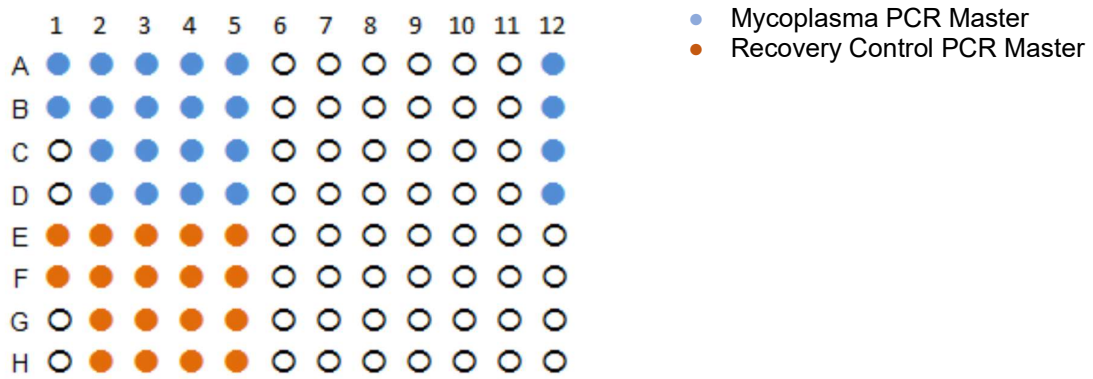


図 2b : 複数サンプル/プレートの場合の配置案 (4 サンプル/プレートの例)。



### 2.3.2 LightCycler® 480 Instrument II による PCR

**LightCycler® 480** 実験プロトコルのプログラミング方法の詳細は、最新の LightCycler® 480 Instrument II 操作マニュアルを参照してください。

**Instrument II による PCR のプロファイル** 反応ミックスを調製する前に、LightCycler® 480 Instrument II をプログラムしておきます。温度プロファイルには、UNG が dUTP 含有 DNA を消化できるよう +40°C における最初のインキュベーションステップが含まれています。最初の変性ステップで UNG を変性させポリメラーゼを活性化します。ゲノム DNA のバックグラウンドが高いので、タッチダウン PCR プロトコルが必要です。

以下のように PCR プロファイルをプログラムし、再利用できるようにテンプレートファイルとして保存します。

設定	反応量 [μl]	ブロックタイプ
	50	96
検出フォーマット	励起フィルター	発光フィルター
Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe		
FAM	465	510
VIC/Hex/Yellow 555	533	580
プログラム		
プログラム名	サイクル	分析モード
UNG	1	なし
Initial Denaturation	1	なし
Pre-Amplification	2	なし
Amplification	48	定量
Cooling	1	なし

目標温度						
目標値 [°C]	Acquisition モード	保持時間 [時:分:秒]	Ramp Rate [°C/秒]	Acquisition [°Cあたり]	二次目標値 [°C]	ステップサイズ [°C]
UNG						
40	なし	00:10:00	4.4	–	–	–
最初の変性						
95	なし	00:10:00	4.4	–	–	–
前増幅						
95	なし	00:00:15	4.4	–	–	–
70	なし	00:00:15	2.2	–	–	–
72	なし	00:00:20	4.4	–	–	–
増幅						
95	なし	00:00:15	4.4	–	–	–
69	なし	00:00:15	2.2	–	60	0.5
72	Single	00:00:20	4.4	–	–	–
冷却						
40	なし	00:00:30	2.2	–	–	–

#### マスターミックスの調製

リアルタイム PCR は極めて高感度な微量 DNA 検出法です。PCR マスターミックスの調製については適切なガイドラインに従ってください。

△ バイアル 5 と 6 は遮光して保存してください。取扱い中に LightCycler® 480 Multiwell Plate の表面に触れないでください。

- ① マスターミックス室で層流フードを洗浄します（漂白剤、次にエタノールまたはその他の消毒試薬を使用）。
- ② ピペット操作ツールを 10% の漂白剤で拭いた後、70% のエタノールまたはその他の消毒剤で拭きます。フードに入れる前に、他のすべての物品を 70% エタノールで拭きます。
- ③ 試薬（以下のステップ 6 を参照）を層流フード内に入れ、+15~+25°C で解凍します。
- ④ 開封する前に、ボルテックスでさっと回転させます。
- ⑤ 各ピペット操作ステップの後は、チップを交換してください。
- ⑥ プレートのセットアップ（図 2a）では、以下の表に従って 2 種類のマスターミックスを調製します。ヌクレアーゼフリー、DNA フリーのバイアルを使用してください。

バイアル	成分	Mycoplasma PCR Master [μl]		Recovery Control PCR Master [μl]	
		1×rxn	11×rxn <sup>(1)</sup>	1×rxn	7×rxn <sup>(1)</sup>
2	PCR Master, 2× conc.	25	275	25	175
3	UNG (2U/μl)	1	11	1	7
4	PCR Enhancer	0.9	9.9	0.9	6.3
5	Detection Mix, 25× conc.	2	22		
6	Detection Mix, Recovery Control, 25× conc.			2	14
8	Water, PCR Grade	1.1	12.1	1.1	7.7
	<b>総量</b>	<b>30</b>	<b>330</b>	<b>30</b>	<b>210</b>

⑦ 各マスターミックス 30μl を 96 ウェルプレートの各ウェルに分注します。

⑧ 96 ウェルプレートを PCR セットアップ室に移します。

<sup>(1)</sup>ピペット操作ステップで起こる微量の液体損失を補うため、1 回反応を足して計算します (例えば、10 反応+1 = 11 反応)。

**PCR プレートの作製および PCR の実行**

① PCR セットアップ室で層流フードを洗浄します (漂白剤、次にエタノールまたはその他の適切な消毒剤を使用)。

② ピペット操作ツールを 10%の漂白剤で拭いた後、70%のエタノールまたはその他の消毒剤で拭きます。

③ マスターミックスを予め充填した各ウェルに、必要なサンプル物質 (サンプル、Positive Control または NTC) を 20μl 添加します。以下の記載のとおり、各テンプレートの反復測定を行います。

④ 作製した 96 ウェルプレートを LightCycler® 480 Instrument II に装填し、操作を開始します。

	サンプル	Positive Control	NTC (PCR 陰性コントロール)	PCR 反応数
Mycoplasma PCR	4×20μl	4×20μl	2×20μl	10
Recovery Control PCR	4×20μl		2×20μl	6

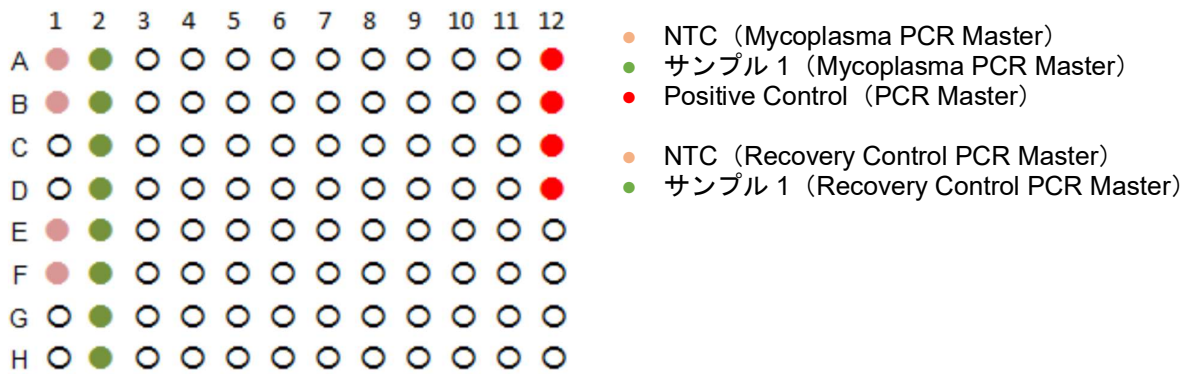


図 3a : プレート配置案、1 プレートにつき 1 サンプルの場合

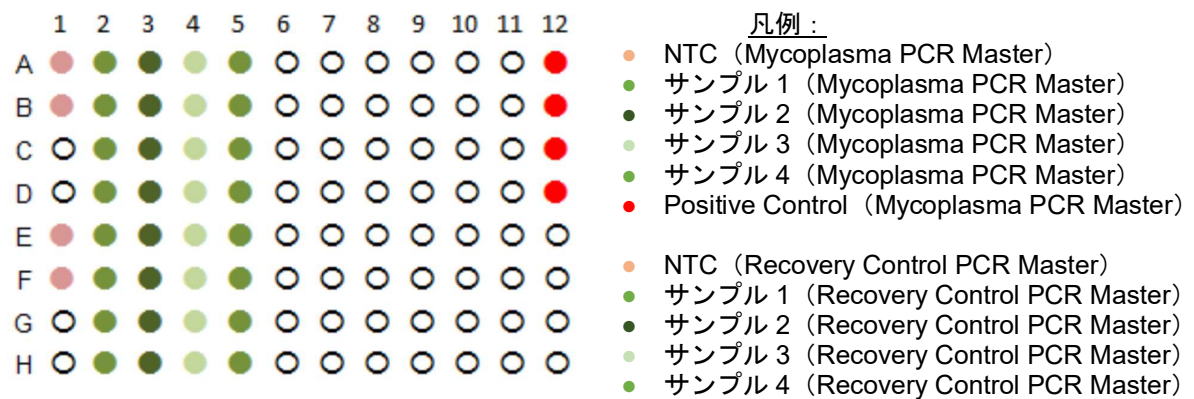


図 3b : 複数サンプルのプレート配置案 (4 サンプルの場合)

### データ解析

LightCycler® 480 Instrument II のデータ解析には、Abs Quant/2<sup>nd</sup> Derivative Max for All Samples をお勧めします。Filter Comb ボタンを用いて、分析する蛍光チャンネルを選択します。Mycoplasma Master mix Probes の場合はチャンネル FAM [465-510]、Recovery Control Master mix Probes の場合はチャンネル VIC/HEX/Yellow555 [533-580] です。サブセットの使用はオプションです。

詳細は、LightCycler® 480 Instrument II 操作マニュアルを参照してください。

### 3. 結果の解釈

#### 3.1 LightCycler® 480 Instrument II の測定結果

△ ワークフローのバリデーションとカットオフ値の設定はお客様の責任で行ってください。

以下の結果の解釈はほんの一例です。

分析モードでは、LightCycler® Instrument Software は、各ウェルを陽性（赤）、陰性（緑）、または不明（青）のどれかであると判定（コール）します。

ソフトウェアがウェルを不明と判定した場合、そのサンプルは再検査が必要です。

△ Abs Quant/2nd Derivative Max 法により、ソフトウェアが計算できる最新の Cp は 43.0 です。Cp 43 のサンプルは不確実性が高いため、慎重に評価する必要があります。

サンプルでマイコプラズマが検出されたことを示すために、サブセット 1 (Mycoplasma PCR) とサブセット 2 (Recovery Control PCR) の結果を組み合わせ、次のように解釈します。

**下記の基準を満たすサンプルは陰性です。**

サブセット 1:

1. NTC: すべての NTC (2/2) が陰性
2. Positive Control: すべてのサンプル (4/4) が陽性
3. サンプル: すべての NTC (4/4) が陰性

サブセット 2:

1. NTC: すべての NTC (2/2) が陰性
2. Recovery Control: すべてのサンプル (4/4) が陽性

サブセット 2 の Recovery Control サンプルに結果陰性が 1 つ以上ある場合は、その測定は無効です。その結果、測定全体を繰り返す必要があります。

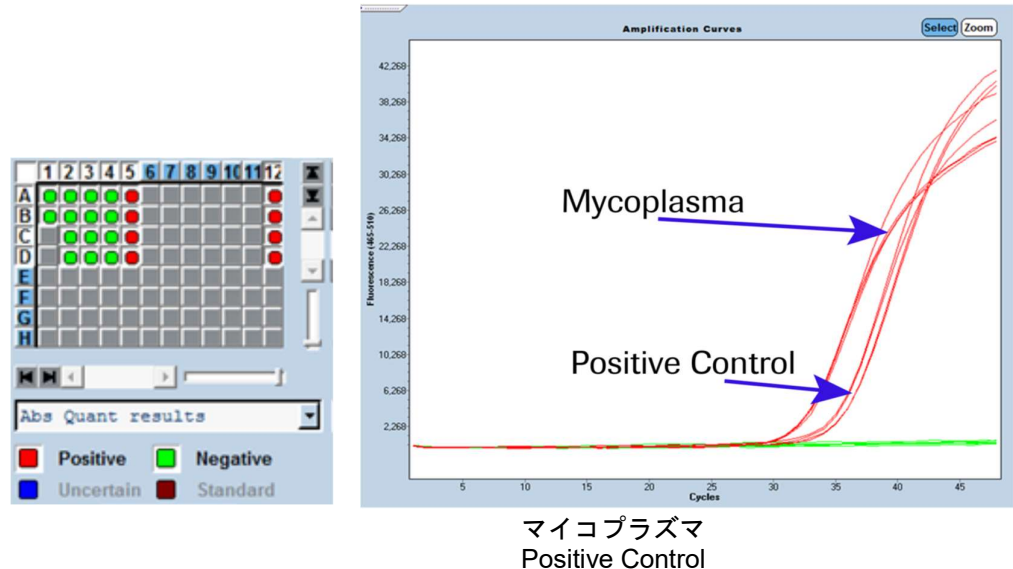


図 4a: 代表的な分析結果 (Mycoplasma PCR) (サブセット 1): 左側のプレートビューは、サンプルが陰性 (緑) か陽性 (赤) かを示しています。右側はサンプルとコントロールの増幅曲線です。

NTC 1-2 (A1+B1) = 陰性

サンプル 3 (A4-D4) = 陰性

サンプル 1 (A4-D4) = 陰性

サンプル 4 (A5-D5) = 4/4 陽性

サンプル 2 (A3-D3) = 陰性

Positive Control (A12-D12) = 4/4 陽性

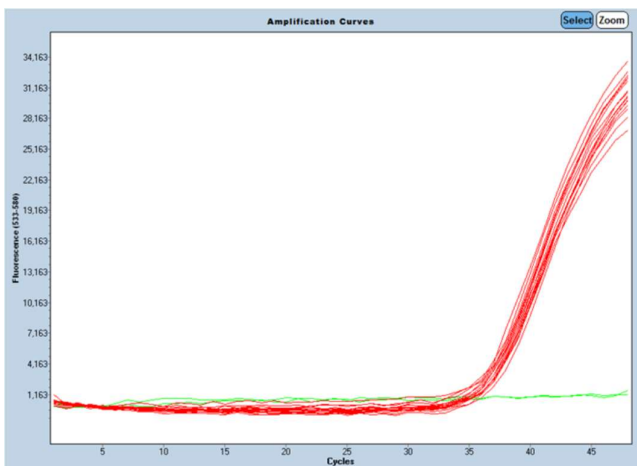
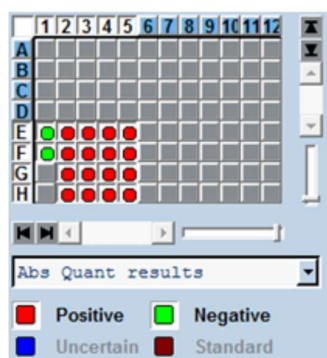


図 4b : 代表的な分析結果 (Recovery Control PCR) (サブセット 2) : 左側のプレートビューは、Recovery Control サンプルが陰性 (緑) か陽性 (赤) かを示しています。右側は Recovery Control サンプルの増幅曲線です。

- NTC 1-2 (E1+F1) = 陰性
- Recovery Control サンプル (E2-H2) = 陽性
- Recovery Control サンプル (E3-H3) = 陽性
- Recovery Control サンプル (E4-H4) = 陽性
- Recovery Control サンプル (E5-H5) = 陽性

上の例では、サブセット 1 とサブセット 2 の結果を組み合わせると、サンプル 1~3 が陰性であることがわかります。これは、図 4a のプレートビューに示されている Mycoplasma PCR が陰性 (緑) であり、図 4b のそれぞれの Recovery Control PCR が陽性 (赤) であるためです。図 4a に示されている Mycoplasma PCR、および図 4b に示されているそれぞれの Recovery Control PCR の Cp が 43 未満の場合、上記の判定は陽性になります。

### 3.2 Applied Biosystems® 7500 リアルタイム PCR システムによる PCR

MycotoOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit により、選択したモリクテス綱の細菌種について Applied Biosystems7500 リアルタイム PCR システムを用いて良好な結果が得られました。LightCycler® Instrument 以外の装置では、適切なカットオフ Ct 値を設定できない場合があります。したがって、LightCycler® 480 Instrument II 以外のリアルタイム PCR 装置の使用についてはユーザーが評価する必要があります。

#### PCR プロファイル

取扱説明書に従って装置を準備します。

以下に設定されているプロトコルを使用します。

色素 1 /クエンチャー FAM/なし

色素 2 /クエンチャー VIC/なし

サンプル量の設定 : 50 µl

操作モード : Standard 7500

以下のとおりにプロトコルをプログラムし、再利用できるようにテンプレートファイルとして保存します。

ステージ	ステップ	温度 (°C)	時間	サイクル
1	UNG インキュベーション	40	10 分 00 秒	1
2	最初の変性	95	10 分 00 秒	1
3	前増幅	95	15 秒	2
		72	20 秒	
4	増幅	95	15 秒	2
		69	35 秒	
5	増幅	95	15 秒	2
		68	35 秒	
6	増幅	95	15 秒	2
		67	35 秒	
7	増幅	95	15 秒	2

		66	35 秒	
8	増幅	95	15 秒	2
		65	35 秒	
9	増幅	95	15 秒	2
		64	35 秒	
10	増幅	95	15 秒	2
		63	35 秒	
11	増幅	95	15 秒	2
		62	35 秒	
12	増幅	95	15 秒	2
		61	35 秒	
13	増幅	95	15 秒	30
	データ収集	60	35 秒	

- ◎ データ収集ステージ 13、ステップ 2 (60.0 @ 0:35)
- ◎ タッチダウンステップなど、上記のプロトコルがプログラムされていることを確認してください。装置の既定のプロトコルで実行すると無効な結果が出ます。

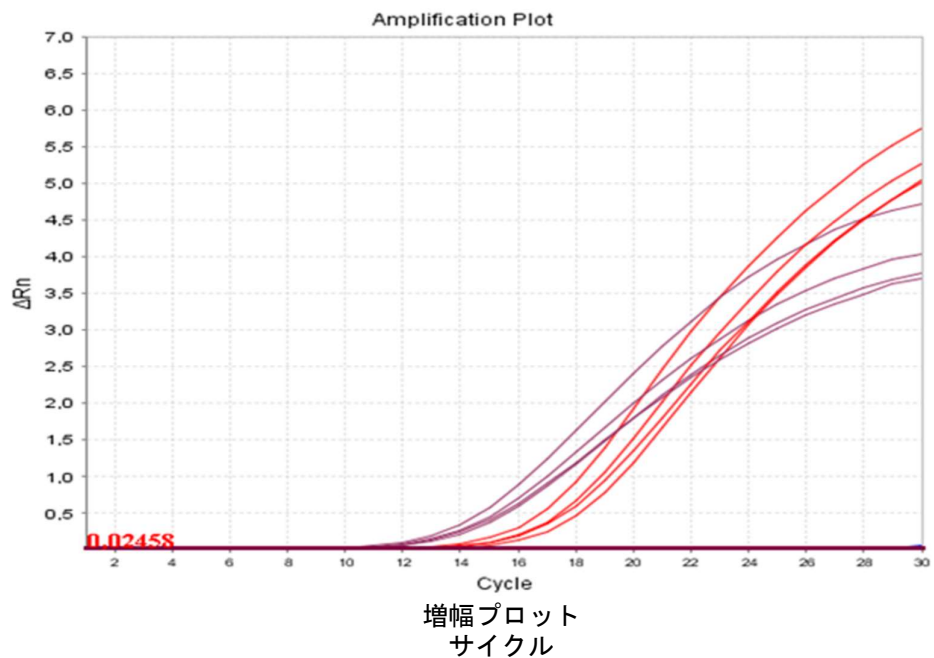
### データ解析

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System の操作説明書に従ってデータ解析を行います。自動ベースラインとマニュアル閾値を選択します。閾値はユーザーが決定する必要があります。下の図では閾値は 0.02 に設定されています。

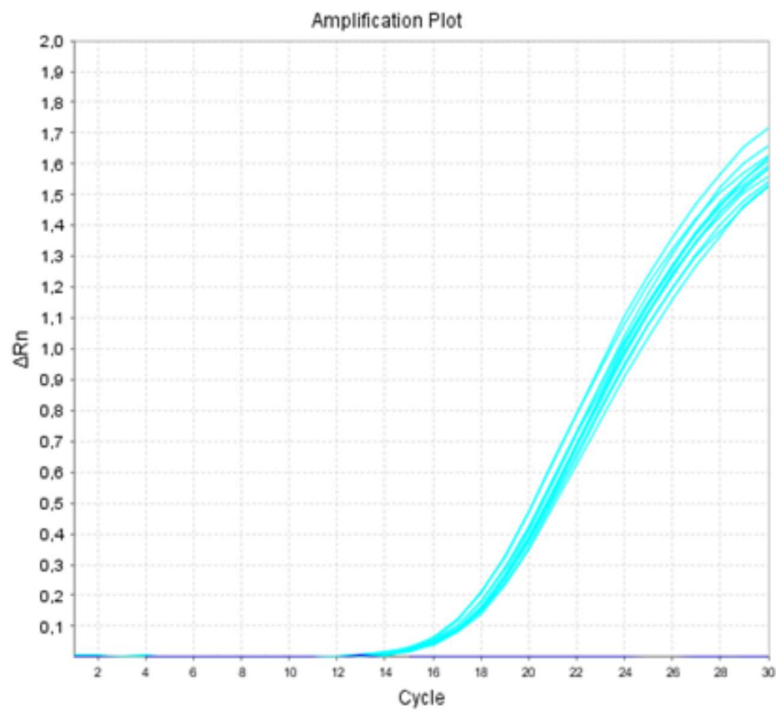
△ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System のソフトウェアは、18 回のタッチダウンサイクルを考慮しません。つまり、ABI Software はデータ解析中に 18 回のタッチダウンサイクルを追加しないため、Ct 値=16 が Cp 値=34 (LightCycler® Instrument) に対応するということです。

### 結果の解釈

リアルタイム PCR 増幅曲線では、ユーザーが決定した特異度の閾値を用いて陽性の結果を表示します。セクション 3.1 で説明した基準と同じ基準でサンプルが陰性か陽性かを判定します。



**図 5a** : FAM 蛍光チャンネルにおいて Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いた代表的な解析結果。赤色の増幅曲線は Positive Control に対応し、紫色の増幅曲線はマイクロプラズマ陽性のサンプル物質に対応します。Negative Control は増幅を示さないため、陰性です。



増幅プロット  
サイクル

**図 5b** : VIC 蛍光チャンネルにおいて Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いた代表的な解析結果。Recovery Control の青緑色の増幅曲線は陽性です。Negative Control サンプルは増幅を示さないため、陰性です。

#### 4. 制限事項

本キットの評価は LightCycler® 480 Instrument II を用いて行いました。得られた結果は、他のリアルタイム PCR 機器でも有効かもしれませんが、経験的に検証する必要があります。一般に、テンプレート濃度は 10µg DNA/50µl PCR を超えてはなりません。

精製に MagNA Pure Instrument を用いた MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit による検査感度は、最大  $5 \times 10^6$  細胞/ml の細胞密度での CHO 細胞培養用に最適化されています。それを超える細胞密度での操作には、本キットは推奨されません。

細胞密度が  $5 \times 10^6$  CHO 細胞/ml を上回るサンプルは、必ず用手法でのサンプル調製を行ってください。ただし、そのような高い細胞密度では、PCR が一部阻害されることがあります。

MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit は、ゲオバチルス属汚染も検出することがあります。

#### 5. トラブルシューティング

##### マイコプラズマ生菌株の取扱いガイドライン

- マイコプラズマ株の培養およびコロニー形成単位 (cfu) 定量は、欧州薬局方第 2.6.7 章に従うガイドラインを満たす必要があります。
- 細胞感染にマイコプラズマ株が使用された実験については、欧州薬局方第 2.6.7 章で推奨されている ATCC 物質を使用する必要があります。
- 各国の S2 実験室規制要件を順守する必要があります。



## 6. 補足資料

### 6.1 原理

マイコプラズマは、細胞培養物の重大な汚染物質です。細胞培養物のマイコプラズマ汚染の原因は個人や汚染した細胞培養培地成分です。マイコプラズマは、染色体異常、代謝や細胞増殖の変化などの細胞変化を引き起こします。重度のマイコプラズマ感染は細胞株を破壊することがあります。

本キットは、マイコプラズマ DNA 内の高度保存領域の特定の PCR を用いています。極めて特異度の高いプライマーとプローブが detection mix に含まれています。プローブは蛍光色素で標識されており、この色素がリアルタイム PCR 装置によって検出されます。プライマーは、*A. laidlawii*、*M. fermentans*、*M. hyorhinis*、*M. orale*、*M. pneumoniae*、*M. synoviae*、*M. arginini*、*M. hominis*、*M. salivarium*、*M. gallisepticum* など、150 種を超えるモリクテス綱の検出が主に可能な混合物です。

本キットは、調製不要のホットスタート反応ミックスを使用しており、加水分解プローブを用いて DNA ターゲットを検出します。化学修飾ポリメラーゼ酵素は最初の PCR セットアップ中は不活性であるため、低温で形成される非特異的プライマー・テンプレートの結合による伸長を回避できます。このポリメラーゼは、高温での最初の活性化ステップによって不可逆的に活性化されます。偽陰性の結果を排除するためにさまざまなコントロールが含まれています。試薬類の管理は陽性コントロールで行います（プラスミド DNA からなる Positive Control）。また、サンプル物質に添加する第 2 のコントロールプラスミド（Recovery Control）の増幅によってサンプル調製効率を管理し、偽陰性が出ないようにします。本キットは、付属のウラシル DNA グリコシラーゼ（UNG）を用いて PCR のキャリアオーバー汚染を防ぐ設計になっています。PCR 中にデオキシウリジン三リン酸（dUTP）の組み込みが起こり、dUTP を含むアンプリコンが生成します。生成したアンプリコンは、その後の PCR 混合物を UNG で前処理することによって分解されます。UNG は、N-グリコシル結合を切断して DNA 分子からウラシルを除去します。その結果生じる脱塩基部位は、最初の PCR 変性ステップの間に高温による加水分解を受けます。加水分解された DNA は PCR テンプレートとして機能できなくなります。UNG はこの最初の変性ステップ中に不活化されません。

天然 DNA はウラシルを含まないため、UNG による反応によって分解されません。

◎ 汚染 DNA にウリジン塩基が含まれている場合、UNG を用いてのみ PCR キャリーオーバー汚染の防止が可能です。dUTP を含むヌクレオチドミックスを用いると、ウリジン含有 DNA が PCR によって生成されます。

### 6.2 品質管理

本キットは、MagNA Pure 96 DNA および Viral NA Large Volume Kit と MagNA Pure 96 および LightCycler® 480 Instrument II を用い、 $5 \times 10^6$  細胞/ml の CHO 細胞培養物 1 ml 中の *A. laidlawii* を 3 cfu/ml および 10 cfu/ml 含む検体を用いて各ロットの機能を検査しています。マイコプラズマ否定試験も実施しています。

### 6.3 保証

ロシュ・ダイアグノスティックス社は、本文書に記載されている製造元の指示に従ってこれらの製品が取り扱われ保管された場合、製品パッケージに記載されている期間、製造元の規格に従って性能を発揮することを保証します。製品が規格を満たしていない場合、当社判断による代金の返金、修理または交換による対応を購入価格を上限として保証します。

ロシュ・ダイアグノスティックス社は、明示的、黙示的または法的であるかどうかにかかわらず、上記以外の保証を一切行いません。ロシュ・ダイアグノスティックス社は、偶発的、間接的、または結果的な損害に対して一切責任を負いません。

### 6.4 参考文献

- 1 Rottem S, Barile MF, Beware of Mycoplasmas, TIBTECH 1993; 143-151.
- 2 Razin S, Yogev D, Naot, Y; Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas; Microbiol. Mol. Biol. Reviews 1998, 1094-1156.
- 3 Razin S, *The Genus Mycoplasma and Related Genera* (Class Mollicutes). Procaryotes 2006; 4, 836-904.
- 4 Mc Garrity GJ, Kotaani H, Butler GH; Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Maniloff J, Mc Elhaney RH, Finch LR, Baseman JB, editors; Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis; Washington (DC): □ American Society for Microbiology 1992, 445-454.

## 7. 追記事項

### 7.1 凡例

#### 書式

本文書は、統一感と読みやすさを確保する書式を用いています。

書式	用法
付番のあるステージ ①、②などのラベル	通常、記載順におこるプロセスの段階。
付番のある指示 ①、②などのラベル	記載順に実行しなければならない手順のステップ。
アスタリスク *	ロシュ・ダイアグノスティックス社から購入可能な製品。

#### 記号

本文書は、重要情報を強調する記号を用いています。

記号	説明
◎	参考情報： 現在のトピックや手順に関する追加情報。
△	重要事項： うまく手順を実施したり製品を使用したりするのに不可欠な情報。

### 7.2 改訂履歴

- 規制上の免責事項を更新しました。
- REACH 付属書 XIV に関連する新情報を追加しました。
- 編集上の変更を行いました。

### 7.3 注文情報

製品	内容量	カタログ No.
QC サンプル調製キット	1 式	08 146 829001
LightCycler® 480 Instrument II	1 台 96 ウェル型	05 015 829001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	5×10 プレート、密封フイル付属	04 729 829001
MagNA Pure 96 Instrument IVD	1 台、コントロールユニットおよび付属品	06 541 829001
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	3×96 回単離/セット	06 374 829001

### 7.4 商標

MYCOTOOL、LIGHTCYCLER、MAGNA PURE はロシュ社の商標です。  
他の製品名および商標はすべて、それぞれの所有者に帰属します。

### 7.5 規制上の免責事項

欧州経済領域向け：本製品は以下の SVHC を含有しています：オクチル/ノニルフェノールベンゾレート。監視や品質管理などの分析活動など、REACH 規則第 56(3)条および第 3 条第 23 号に準拠して管理された条件下でのみ使用すること。

**発行者**

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim  
Germany

2020 Roche Diagnostics.

全著作権保有。

0664578000⑩820

**本製品の詳細、使用説明書、製品安全データシートなどの文書については、  
[custombiotech.roche.com](http://custombiotech.roche.com) をご覧ください。**

**ロシュ・カスタムバイオテクノロジー カスタマーサービス****欧州、中東、アフリカ****および南米**

Roche Diagnostics Deutschland GmbH  
Tel +49 621 759 8580  
Fax +49 621 759 8610  
[mannheim.custombiotech@roche.com](mailto:mannheim.custombiotech@roche.com)

**日本**

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社  
Phone +81 3 6634 1046  
Fax +81 3 5479 0585  
[japan.custombiotech@roche.com](mailto:japan.custombiotech@roche.com)

**米国**

Roche Diagnostics Corporation  
Tel +1 800 428 5433, ext. 14649  
(フリーダイヤル)  
Fax +1 317 521 4065  
[custombiotech.ussales@roche.com](mailto:custombiotech.ussales@roche.com)

**アジア太平洋地域**

Roche Diagnostics Asia Pacific Pte. Ltd.  
Tel +65 6371 6638  
Fax +65 6371 6601  
[apac.custombiotech@roche.com](mailto:apac.custombiotech@roche.com)

**カナダ**

Roche Diagnostics  
Tel +1 450 686 7050  
Fax +1 450 686 7012  
[custombiotech.can@roche.com](mailto:custombiotech.can@roche.com)