

MycotoOL Mycoplasma Detection Amplification Kit

細胞培養サンプルのマイコプラズマ否定試験用 増幅キット

Cat. No. 05 184 240 001 MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit

バージョン 03

改訂：2020年11月

-15~-25°Cで保存すること。

1. 製品の機能

試験数

本キットで試験できるサンプル数は以下のとおりです。

- 1mlにつき、細胞培養（ 5×10^6 cell/ml）サンプル 10 個。
- 1mlにつき、細胞培養（ 5×10^6 cell/ml~ 1×10^8 cell/ml）サンプル 5 個。

Workflow Negative Control を実施しない場合は、1 ml で試験できるサンプル数は、細胞培養サンプル（ 5×10^6 cell/ml）15 個および細胞培養サンプル（ 5×10^6 cell/ml~ 1×10^8 cell/ml）10 個に増えます。

- 「マイコプラズマ」という用語は *Mollicutes* 綱の複数の属に広く用いられています。本文書でもこの意味で用います。正確には、マイコプラズマは *Mollicutes* の一属です。

キット内容

バイアル	ラベル	キャップの色	容量
1a	RM1a	赤	5×45 µl
1b	RM1b	茶	5×570 µl
2	MgCl ₂ Solution	グレー	5×1 ml
3	Primer Mix, Mycoplasma	青	5×40 µl
4	Primer Mix, GAPDH	紫	5×30 µl
5	Detection Dye (store protected from light)	黄	5×120 µl
6	H ₂ O, PCR Grade	青緑色	5×1 ml
7	Dilution Buffer	白	5×1 ml
8	Negative Control	白	5×1 ml
9	Positive Control	緑	5×55 µl
10	DNA Molecular Weight Marker	橙	1×200 µl

保存方法・安定性

- -15~-25°Cで保存すれば、製品ラベルに記載の有効期限まで安定です。
- ドライアイス同梱出荷製品です。
- △ 開封後は、キットの成分はすべて-15~-25°Cで保存してください。バイアル5のDetection Dyeは遮光保存してください。

検査所要時間

用手作業の所要時間：約4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7~8時間

用途

マイコプラズマは、細胞培養時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は、人からの汚染や細胞培養培地中の汚染成分が原因で起こります。マイコプラズマは、感染した細胞の染色体異常、代謝や細胞増殖の変化などの細胞変化を引き起こすことがあります。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。

MycotoOL Mycoplasma Detection Amplification 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。

このキットを使用する際には、QC Sample Preparation Kit*を用いる用手サンプル調製をお勧めします。詳細は QC Sample Preparation Kit の使用説明書を参照してください。

以下に、細胞密度が 5×10^6 cell/ml 未満の細胞培養サンプルと高細胞密度サンプル（ 5×10^6 cell/ml~ 1×10^8 cell/ml、SP2 および CHO 由来）のそれぞれに対して QC Sample Preparation Kit*を使用したサンプル調製プロトコルを説明します。

本キットには、細胞溶解およびサンプル調製効率の内部コントロールとして、 5×10^6 cell/ml の細胞培養サンプルで用いる CHO 細胞 DNA の GAPDH ハウスキーピング遺伝子用プライマー対が含まれています。 5×10^6 cell/ml~ 1×10^8 cell/ml CHO の細胞培養サンプルについては、SP2 および CHO のハウスキーピング遺伝子を使用します。

PCR 増幅の前に、ウラシル-N-グリコシラーゼを用いることによってアンプリコン汚染のリスクが低減されます。ウラシル-N-グリコシラーゼはデオキシウリジンを含む DNA 鎖（アンプリコン）の破壊を認識して触媒しますが、デオキシチミジンを含む DNA（サンプル）は認識しません。

その他の必要器具・試薬

• 標準的な実験器具

- 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
- 使い捨てポジティブディスプレイメントチップ式ピペット
- PCR ミックス及び希釈液調製用ヌクレアーゼフリー・DNA フリーのバイアル

• DNA 調製用

- 層流ボックス
- サーモミキサー（2 ml チューブ用）
- ベンチトップ遠心分離機（2 ml チューブ用）

• PCR 反応用

- PCR ワークステーション
- サーマルブロックサイ클ラー（Applied Biosystems）

GeneAmp PCR System 9600 または 9700)

-ヌクレアーゼフリー・DNA フリーの薄壁 PCR チューブ

• PAGE およびシグナル検出用

-分離した検出室

-TBE 電気泳動緩衝液 (泳動緩衝液)

-TBE サンプル緩衝液 (ローディング緩衝液)

-6%TBE ポリアクリルアミドゲル、15 ウェル

-XCell Sure Lock チャンバー (または同等品)

-Power Ease 500 電源 (または同等品)

-トランスイルミネーター、320~380 nm (または同等品)

2. 本製品の使い方

2.1 ご使用前に

クロスコンタミネーションを避けるため、無菌・DNA フリー条件下で完全試験プロトコールを実施してください。この手順には特に、あらかじめ除染し UV 処理した層流ボックス内でヌクレアーゼフリー・DNA フリーの機器と使い捨て製品を用いてすべての溶液を調製・ピペット操作し、クリーニング済白衣と滅菌済みの使い捨て手袋を着用することが含まれています。ピペット操作ステップが終わったら直ちにすべての反応バイアルに蓋をします。

クロスコンタミネーションを避けるには、分離された作業場所各操作を実施することが不可欠です。

実験室	各操作
1. サンプル調製室	リカバリーコントロールサンプルの調製など、試験サンプルの抽出および精製スペース。
2. マスターミックス調製室	PCR のマスターミックスの調製およびピペット操作。
3. マスターミックス室	マスターミックスの調製および PCR Negative Control のミックスへのピペット操作。
4. テンプレート室	サンプルおよび PCR Positive Control の希釈およびミックスへのピペット操作。
5. PCR 室	増幅ステップ
6. PAGE 室	PCR 産物とサンプルの混合。

生きているマイコプラズマ株を扱う場合は、現地の S2 実験室規制要件を考慮する必要があります。

2.2 手順

原理

The MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit による試験は次の 3 プロセスで構成されています。

- 細胞溶解と DNA 精製を用いる検体調製。
- 標的 DNA と各種コントロールのエンドポイント PCR 増幅。
- ゲル電気泳動およびアンプリコン検出。

1 ml の細胞 ($5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$) の標準的な検査ワークフロー:

- $5 \times 10^6 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cell/ml}$ の高細胞密度のサンプルを処理する場合は、以下のステップ 3 を参照してください。

1 ml の検査サンプルからの DNA 調製手順

図 1 に CHO 細胞懸濁液からサンプル 1 ml とコントロールサンプル 1 ml からの DNA 調製プロトコールを示します (2 つの別個の調製物、各 450 μl)。

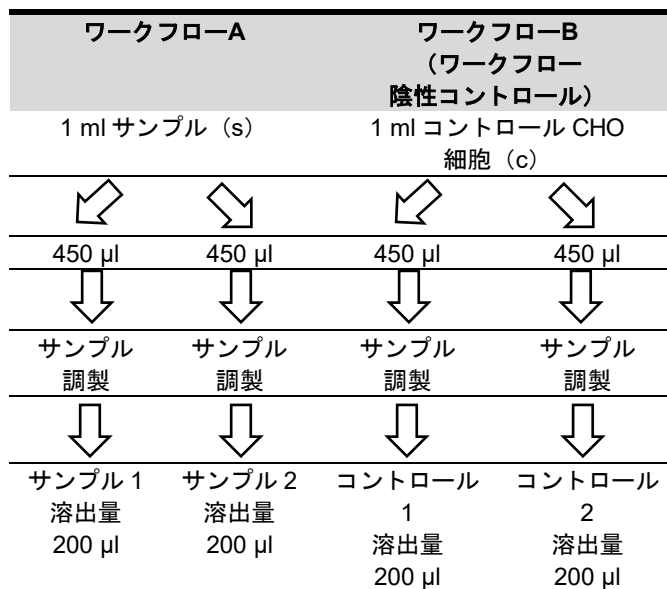


図 1: サンプル調製の実験手順の概要。

- 検査のバリデーションを行う場合は、サンプルを用いる代わりに、コントロール細胞培養物にさまざまなマイコプラズマ種をさまざまな量でスパイクします。

2.3 サンプル調製

以下に、QC Sample Preparation Kit*を用いたサンプル調製プロトコールについて説明します。*印は QC Sample Preparation Kit 中のバイアルを示しています。

- ① サーマミキサーの温度を +56°C にします。
- ② • それぞれ 30 μl の Proteinase K¹ (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 の反応バイアル 8*) を用意します。
• それに応じてバイアルにラベルを付けます。
- ③ 高密度細胞を扱う場合:
• 各サンプルに Water, DNA free (バイアル 6) を 1 ml 添加します。細胞密度が $5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ のサンプルは希釈不要です。
• サンプルまたはコントロールを 450 μl 、各反応バイアルに添加します。
- ④ 各反応バイアルに Lysis Buffer¹ (バイアル 2*) を 450 μl 添加します。
- ⑤ バイアルに蓋をし、5 秒間、3 回ボルテックスします。
- ⑥ サーマミキサーに入れ、+56°C、600 rpm で 15 分インキュベーションします。
- ⑦ • 反応バイアルを取り出します。
• サーマミキサーの温度を +80°C にします。
- ⑧ • 各反応バイアルに Precipitation Reagent¹ (バイアル 3*) を 630 μl 添加します。
• バイアルに蓋をして 20 回上下転倒した後、5 秒間ボルテックスします。
- ⑨ • 6000 $\times g$ 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テーションします。
- ⑩ Washing Buffer (バイアル 4*) を 1 ml 添加します。
- ⑪ • 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 Dissolution Buffer¹ (バイアル 5*) を 200 μl 添加します。
- ⑭ • バイアルに蓋をします。
• サーマミキサーに入れ、+80°C、900 rpm で 10 分間イ

ンキュベーションします。

- サンプルによっては、インキュベーション時間を30分まで延長できます。またはボルテックスすることができます。

⑮ ペレットが完全に溶解するまでボルテックスします。

⑯ バイアルをテンプレート室に移します。

- DNA 調製物は-15~-20°Cで3日間安定です。

¹ 細胞密度が高いサンプル(5×10⁶ cell/ml~1×10⁸ cell/ml)を処理する場合:

- ステップ2 Proteinase K (バイアル1*)を50 µl添加します。
- ステップ4 Lysis buffer (バイアル2*)を700 µl添加します。
- ステップ8 Precipitation Reagent (バイアル3*)を800 µl添加します。
- ステップ13 ペレットに添加する Dissolution Buffer (バイアル5*)は下表を参照してください。

CHO サンプル

総細胞数/ml	溶解量/サンプル調製
約2~4×10 ⁷	200 µl
約4~6×10 ⁷	300 µl
約6~8×10 ⁷	400 µl
約0.8~1×10 ⁸	500 µl
約1~1.2×10 ⁸	600 µl

SP2 サンプル

総細胞数/ml	溶解量/サンプル調製
約0.75~1.5×10 ⁷	200 µl
約1.5~3×10 ⁷	300 µl
約3~4.5×10 ⁷	400 µl
約4.5~6×10 ⁷	500 µl

2.4 マスターミックスの調製

- ① MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit, Cat. No. 05 184 240 001 (バイアル5-Detection Dyeは遮光保存)の成分を解凍しボルテックスします。
- ② 以下の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用い、各ピペット操作の後必ずチップを交換してください)。

バイアル	成分	Master Mix Mycoplasma-Specific PCR	
		1×	17×
1a	RM1a	0.7 µl	11.9 µl
1b	RM1b	10.0 µl	170.0 µl
2	MgCl ₂ (25 mM)	7.0 µl	119.0 µl
3	Primer Mix Mycoplasma	1.0 µl	17.0 µl
5	Detection Dye	2.0 µl	34.0 µl
6	H ₂ O, PCR Grade	9.3 µl	158.1 µl
総量		30 µl	510 µl

バイアル	成分	Master Mix GAPDH または Housekeeping Gene-Specific PCR	
		1×	11×
1a	RM1a	0.7 µl	11.9 µl
1b	RM1b	10.0 µl	170.0 µl
2	MgCl ₂ (25 mM)	7.0 µl	119.0 µl
3	Primer Mix Mycoplasma	1.0 µl	17.0 µl
5	Detection Dye	2.0 µl	34.0 µl
6	H ₂ O, PCR Grade	9.3 µl	158.1 µl
総量		30 µl	510 µl

1a	RM1a	0.7 µl	7.7 µl
1b	RM1b	10.0 µl	110.0 µl
2	MgCl ₂ (25 mM)	7.0 µl	77.0 µl
4	GAPDH または Housekeeping Gene Primer Mix	1.0 µl	11.0 µl
5	Detection Dye	2.0 µl	22.0 µl
6	H ₂ O, PCR Grade	9.3 µl	102.3 µl
総量		30 µl	330 µl

2.5 PCR 反応液の準備

以下のスキームに従って、それぞれ Master Mix を30 µl 入れたヌクレアーゼフリー・DNAフリーの薄壁PCRチューブを26本用意し、各サンプルを20 µl 添加して最終反応容量を50 µl にします(4ページのPCRサンプルの表を参照)。上下にピペットを動かして、溶液を静かに混合します。ボルテックスはしないでください。クロスコンタミネーションを避けるため、次の順序でPCR反応のピペット操作を行います。

マスターミックス室:

- 1) マスターミックス
- 2) NC (PCR) そのままバイアルに蓋をします。

テンプレート室:

- 3) NC (完全ワークフロー) そのままバイアルに蓋をします。
- 4) S そのままバイアルに蓋をします。
- 5) PC (サンプル調製) (未希釈、1:100 希釈及び 1:1000 希釈) そのままバイアルに蓋をします。
- 6) PC (PCR) そのままバイアルに蓋をします。

ハウスキーピング遺伝子を用いた希釈サンプルの調製 (テンプレート室内):

- 細胞密度が5×10⁶ cell/ml未満の細胞サンプルについては、CHOハウスキーピング遺伝子としてGAPDH(バイアル4)を用います。
- 高細胞密度の細胞サンプルについては、適切なハウスキーピング遺伝子を使用してください。

- ① 未希釈 DNA 溶液 (サンプルまたはコントロール) 3 µl を Dilution Buffer (バイアル7) 27 µl に添加して 1:10 希釈液を調製し、よく混合します。
- ② 調製した 1:10 希釈液 3 µl を Dilution Buffer (バイアル7) 27 µl に添加して 1:100 希釈液を調製し、よく混合します。
- ③ 調製した 1:100 希釈液 3 µl を Dilution Buffer (バイアル7) 27 µl に添加して 1:1000 希釈液を調製し、よく混合します。
- ④ - 5×10⁶ cell/mlの細胞サンプルには、PC1本につき: 100 溶液を 20 µl 使用します (サンプル調製)。
- 高細胞密度の細胞サンプルには、PC1本につき 1:1000 溶液を 20 µl 使用します (サンプル調製)。

サンプルのDNA溶液(s1およびs2)とワークフローコントロールのDNA(c1およびc2)の両方を同様に希釈します。

PC (PCR) コントロールプラスミドの調製 (テンプレート室内)。

- ① コントロールプラスミド(バイアル9)3 µl を Dilution Buffer (バイアル7) 27 µl に添加して 1:10 に希釈し、よく混合します。
- ② 調製した 1:10 希釈液 3 µl を Dilution Buffer (バイアル7) 27 µl に添加して 1:100 希釈液を調製し、よく混合します。

よく混合します。

③ 調製した 1 : 100 希釈液 5 µl を Dilution Buffer (バイアル 7) 95 µl に添加して 1 : 2000 希釈液を調製し、よく混合します。

④ この 1 : 2000 希釈液 20 µl を PC (PCR) として使用します。

S : サンプル
 PC : Positive Control
 NC : Negative Control
 MP : Mycoplasma Master Mix
 GAPDH : CHO Housekeeping Gene
 HG : Housekeeping Gene Master Mix

PCR 測定セットアップ

PCR チューブ	Master Mix (30 µl)	サンプル (20 µl)	
1-2	MP	サンプル 1 (s1)	S
3-4	MP	サンプル 2 (s2)	S
5-6	MP	コントロール 1 (c1)	NC (完全ワークフロー)
7-8	MP	コントロール 2 (c2)	NC (完全ワークフロー)
9-12	MP	Control Plasmid (10 cp)	PC (PCR)
13-16	MP	MP-NTC (バイアル 8)	NTC (PCR)
17	GAPDH または HG	サンプル 1 (s1)	PC (サンプル調製)
18	GAPDH または HG	サンプル 1 (s1) ¹	PC (サンプル調製)
19	GAPDH または HG	サンプル 2 (s2)	PC (サンプル調製)
20	GAPDH または HG	サンプル 2 (s2) ¹	PC (サンプル調製)
21	GAPDH または HG	コントロール 1 (c1)	PC (サンプル調製)
22	GAPDH または HG	コントロール 1 (c1) ¹	PC (サンプル調製)
23	GAPDH または HG	コントロール 2 (c2)	PC (サンプル調製)
24	GAPDH または HG	コントロール 2 (c2) ¹	PC (サンプル調製)
25-26	GAPDH または HG	GAPDH-NC または HG-NC (バイアル 8)	NC (PCR)

¹ GAPDH の 1 : 100 希釈液または HG の 1 : 1000 希釈液を用いる。

チューブを PCR 室に移します。

2.6 PCR

PCR サイクルプロトコール (ABI)

ステップ	プロセス	温度 (°C)	時間	サイクル数
①	Hold	40°C	5分	-

②	Hold	変性	94°C	10分	-
③	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	70°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
④	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	69°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑤	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	68°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑥	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	67°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑦	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	66°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑧	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	65°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑨	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	64°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑩	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	63°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑪	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	62°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑫	Cycle	変性	94°C	30秒	2
		アニーリング	61°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑬	Cycle	変性	94°C	30秒	25
		アニーリング	60°C	30秒	
		伸長	72°C	45秒	
⑭	Hold	伸長	72°C	4分	-
⑮	Hold	保持	4°C	8分	-

2.7 ゲル電気泳動 (PAGE 室)

- PCR 室から PAGE 室にバイアルを移します。
- 6%TBE ポリアクリルアミドゲルと TBE 電気泳動緩衝液を用います。
- PCR サンプルの希釈 :
ヌクレアーゼフリー・DNA フリーのバイアルに入れた TBE サンプル緩衝液 3 µl に PCR 産物を 12 µl 添加します。上下にピペットを動かして混合します。
- Molecular Weight Standard (MWS) の希釈 :
DNA MWS (バイアル 10) 16 µl を TBE 電気泳動緩衝液 24 µl + TBE サンプル緩衝液 8 µl + ¥検出色素 (バイアル 5) 1.6 µl に添加します。
- 1 スロットにつき希釈サンプルまたは MWS を 10 µl 充填します。
シーケンス :
• ゲル#1 : PCR チューブ 1~12、MWS
• ゲル#2 : PCR チューブ 13~26、MWS
- 200V で 30 分間、ゲル電気泳動を行います。
- Transilluminator、320~380 nm (または同等品) と各カメラを用いて信号を直接検出し報告します。

○ゲルの取扱いと廃棄は臭化エチジウム染色ゲルの場合と同様です。

2.8 結果の解釈

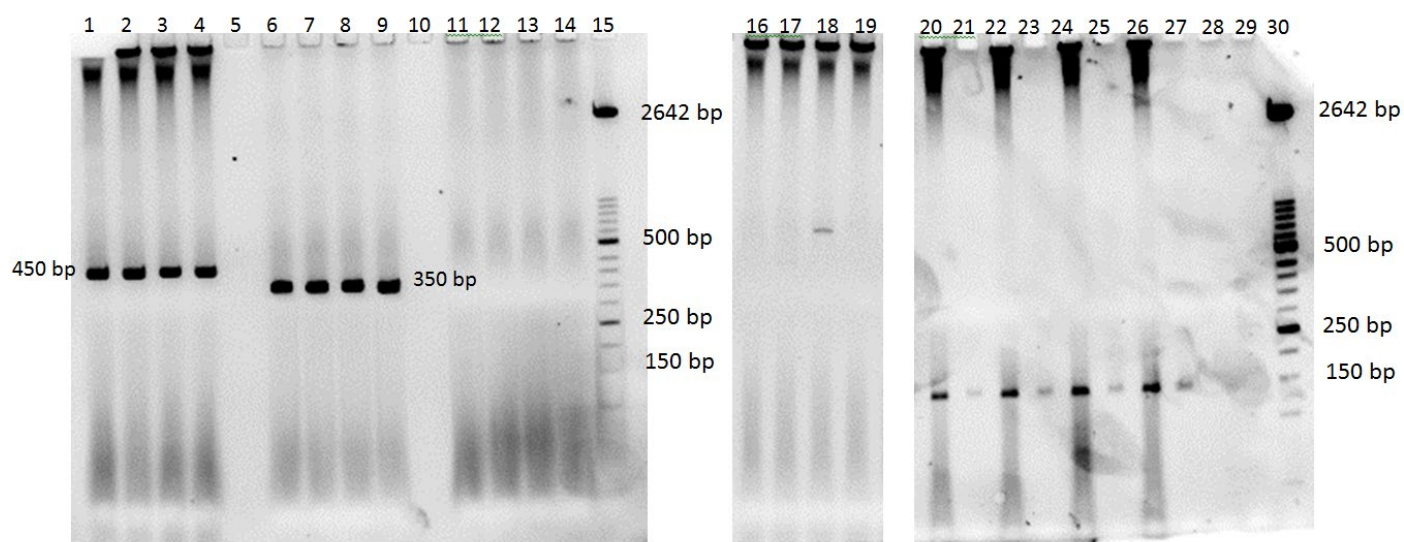
MP 試験の場合：

サンプル	期待される結果
MP サンプル (s1 および s2)	4 反応のうち 1 反応以上に 450 bp のバンドが出現したサンプルはマイコプラズマ陽性とみなします。
コントロール細胞 (c1 および c2) を用いた完全ワークフローの MP 陰性コントロール	全反応が陰性でなければなりません。
Control Plasmid の 1 : 2000 希釈液 (10 コピー/PCR) を用いた MP 陽性コントロール	4 反応のうち 2 反応が陽性でなければなりません (360 bp の PCR 産物)。
PCR 試薬の MP 陰性コントロール	すべての反応が陰性でなければなりません。

ハウスキーピング遺伝子試験の場合：

サンプル	期待される結果
サンプルの GAPDH または HG 陽性コントロール (溶解およびワークフロー効率)	すべての反応が陽性でなければなりません。
コントロール細胞の GAPDH または HG 陽性コントロール	すべての反応が陽性でなければなりません。
GAPDH または HG 陰性コントロール	全反応が陰性でなければなりません。

2.8.1. CHO 細胞懸濁液 (5×10^6 cell/ml) で得られた結果



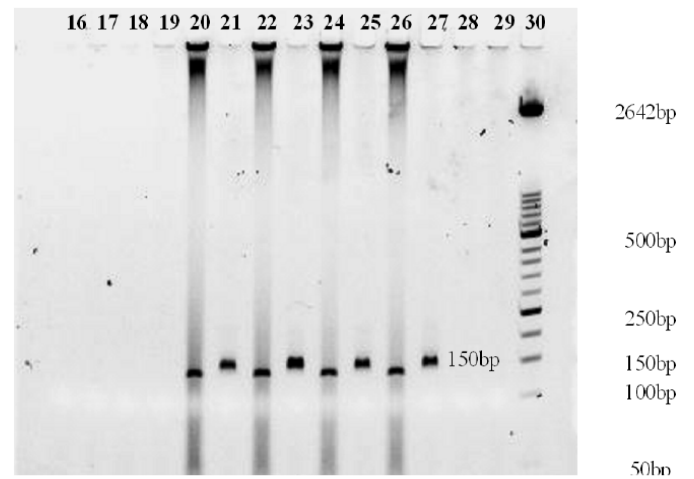
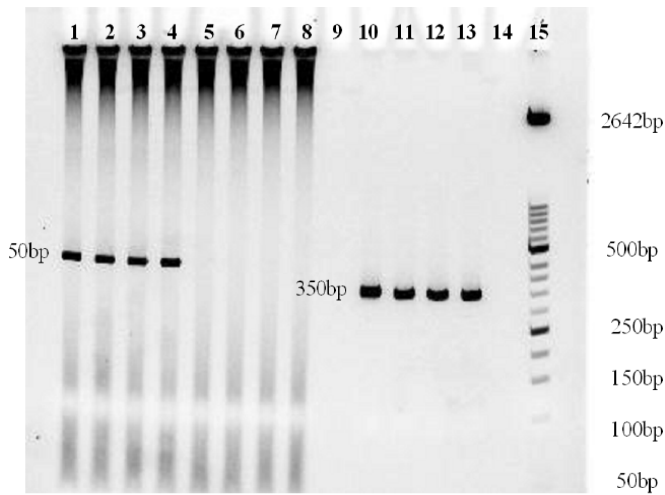
レーン	製品
1-2	MP、サンプル 1 ¹ (s1)
3-4	MP、サンプル 2 ¹ (s2)
5	-----
6-9	MP、Positive Control (バイアル 9、1 : 2000 希釈)
10	-----
11-14	MP、PCR Negative Control (バイアル 8)
15	MWS
16-17	MP、コントロール 1 (c1)
18-19	MP、コントロール 2 (c2)

¹ 10 cfu/ml の *A.laidlawii* をスパイクした CHO 細胞。

² GAPDH アンプリコンの測定特性は、サンプルの高 DNA 含量の影響を受けます。

レーン	製品
20	GAPDH、サンプル 1 ²
21	GAPDH、サンプル 1 (1 : 100 希釈)
22	GAPDH、サンプル 2 ²
23	GAPDH、サンプル 2 (1 : 100 希釈)
24	GAPDH、コントロール 1 ²
25	GAPDH、コントロール 1 (1 : 100 希釈)
26	GAPDH、コントロール 2 ²
27	GAPDH、コントロール 2 (1 : 100 希釈)
28-29	GAPDH、Negative Control (バイアル 8)
30	MWS

2.8.2. 高細胞密度サンプル、CHO 細胞懸濁液 (3.2×10^7 cell/ml) で得られた結果



レーン	製品
1-2	MP、サンプル 11 (s1)
3-4	MP、サンプル 21 (s2)
5-6	MP、コントロール 1 (c1)
7-8	MP、コントロール 2 (c2)
9	-----
10	MWS
11-14	MP 陽性コントロール (バイアル 9, 1 : 2000 希釈)
15	-----

¹ 5 cfu/ml の *A. laidlawii* をスパイクした CHO 細胞懸濁液 (3.2×10^7 cell/ml)。

² HG アンプリコンの測定特性は、サンプルの高 DNA 含量の影響を受けます。

レーン	製品
16-19	MP PCR 陰性コントロール (バイアル 8)
20	HG サンプル 1 ² (s1)
21	HG サンプル 1 ² (s1、1 : 1000 希釈)
22	HG サンプル 2 ² (s2)
23	HG サンプル 2 ² (s2、1 : 1000 希釈)
24	HG コントロール 1 ² (c1)
25	HG コントロール 1 ² (c1、1 : 1000 希釈)
26	HG コントロール 2 ² (c2)
27	HG コントロール 2 ² (c2、1 : 1000 希釈)
28-29	HG 陰性コントロール (バイアル 8)
30	MWS

3. 補足資料

3.1 品質管理

MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit : ロットごとに、1 ml CHO 細胞培養液 (5×10^6 cell /ml) に 3 cfu および 10 cfu の *A.laidlawii* を用いる CHO 細胞株中のマイコプラズマ検出機能試験が実施されています。

QC Sample Preparation Kit : ロットごとに、MycoTOOL Mycoplasma Real Time PCR Kit を用いるマイコプラズマ検出機能試験が実施されています。

両キットともマイコプラズマ由来 DNA 否定試験が実施されています。

3.2 検査方法の制限事項

- ハウスキーピング遺伝子の感度は、CHO 細胞培養物と細胞密度 (5×10^6 cell /ml 以上) に対して最適化されています。タイプの異なる細胞を試験する場合は、ハウスキーピング遺伝子の検出限界の適応と、場合によってはプライマー対配列の最適化が必要になることがあります。1 : 100 希釈または 1 : 1000 希釈の感度は CHO 細胞密度に依存します。
- 個々のマトリックスに応じて、ハウスキーピング遺伝子を用いるコントロール反応の希釈率 (既定値は 1 : 100 または 1 : 1000) を調整する必要があります。
- マイコプラズマ DNA の調製は、サンプル中の適切な量の培養細胞の存在に依存します。

3.3 生きているマイコプラズマ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) の定量は、欧州薬局方第 2.6.7 章に従う必要があります。
- マイコプラズマ株のスパイク実験については、欧州薬局方第 2.6.7 章の推奨 ATCC 物質を使用してください。スパイク実験の参照細胞として CHO 細胞を用いる場合は、CHO-K1 (ATCC CCL-61) 細胞株をお勧めします。細胞は、ATCC の推奨に従い、DMEM/F12 (10%FCS 含有) : RPMI (2 : 1) で培養する必要があります。トリプシン処理後、元の増殖地を用いて細胞を 5×10^6 /ml 濃度に希釈します。
- 現地の S2 実験室規制要件を考慮する必要があります。

4. 追記事項

4.1 凡例

書式

本文書は、統一感と理解しやすさを確保する書式を用いています。

書式	用法
①、②などの付番	通常、記載順に起こるプロセスの段階のあるステージ
❶、❷などの付番	記載順に実行しなければならない手順のある指示

記号

本文書では、重要情報を示す強調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。

4.2 改訂履歴

・ボトル 2 (MgCl₂ 溶液) の充填量を増量しました。

4.3 注文情報

製品	内容量	Cat. No.
QC サンプル調製キット	1 式	08 146 829001

4.4 商標

MYCOTOOL はロシュ社の商標です。ATCC の商標と商品名、およびすべての ATCC カタログ番号は、the American Type Culture Collection の商標です。第三者製品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。

4.5 規制上の免責事項

品質管理/製造プロセス専用

本製品の詳細、および使用説明書や製品安全データシートなどの文書については、custombiotech.roche.com をご覧ください。

© 2020 Roche Diagnostics GmbH. 全著作権保有。

詳細については、最寄りのロシュ代理店にお問い合わせください。

欧州、中東、アフリカ、南米 :	アジア太平洋地域 :	
Tel +49 621 759 8580	Tel +65 6371 6638	
Fax +49 621 759 6385	Fax +65 6371 6601	
日本 :	カナダ :	米国 :
Tel +81 3 6634 1046	Tel +1 450 686 7050	Tel +1 800 428 5433
Fax +81 3 5479 0585	Fax +1 450 686 7012	内線 14649 (フリーダイヤル)
		Fax +1 317 521 4065

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

