

# Dyne Mycoplasma Removal Reagent

(GBM-R500, 1 ml X 5 vials, Store at -20°C/4°C)

## 개요

Mycoplasma는 세포벽이 결여(cell wall-less)되어 있는 매우 작은 세균으로, 이러한 특징 때문에 세포 배양을 위한 시설 대다수에 감염되어 있고, 일반적인 항생제로는 치료되지 않습니다. 또한, 다른 감염 미생물(bacteria, fungi)과 달리 육안으로 확인될 만큼 세포 성장률에 영향을 미치지 않을 수도 있지만, 숙주 세포의 DNA, RNA, Protein 합성에 영향을 미쳐 세포의 염색체와 세포 원형질막의 항원을 변형시킵니다. 학계에 의하면 배양 세포주의 약 80 % 가량이 Mycoplasma에 감염되어 있다고 알려져 있으며, 제약회사, 연구시설, biological product plants 등 세포 배양 시설에서 Mycoplasma의 감염은 연구 결과와 제품 품질에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있습니다.

Dyne Mycoplasma Removal Reagent는 mycoplasma 감염 세포 치료에 특화된 효과적인 제품으로 mycoplasma를 제거하기 위한 항생물질의 복합제로써 각기 다른 작용기전을 통해 세포에 감염된 mycoplasma를 제거할 수 있습니다. 혼합된 항생물질은 protein synthesis 과정에서 ribosome 전사를 억제하고 DNA 복제과정을 억제합니다. 이 항생제들은 mycoplasma와 bacteria 중에만 영향을 주고, mammalian cell과 같은 eukaryotic cell에는 영향을 주지 않아 효과적으로 mycoplasma를 제거할 수 있습니다.

## 제품의 구성 및 보관 조건

Cat No.	Components	Size	Storage
GBM-R500	Dyne Mycoplasma Removal Reagent	1 ml X 5 vials	-20 °C/4°C

- ▶ -20 °C에 보관 시 약 1년간 안정합니다. 이 제품은 4 °C에서도 보관 가능하며, 약 6개월간 안정합니다.
- ▶ Concentration: 12.5 mg/ml
- ▶ Form : Yellow solution

## 실험 프로토콜

### 1) Dyne Mycoplasma Removal Reagent의 사용 농도 (제거용) : 250X~1000X까지 희석이 가능

항생제 투여 시, 세포의 상태를 확인하여 양을 조절하여 사용 하는 것이 좋습니다.

만약 세포가 심한 감염 상태에 있다면, 세포의 상태가 매우 좋지 않으므로 사용 농도를 낮추어 (500X에서 1000X 수준) 진행 하는 것을 권장합니다.

Concentration	T25 flask (5 ml)	T75 flask (15 ml)	500 ml Media bottle
1000X (12.5 µg/ml)	5 µl	15 µl	500 µl
500X (25 µg/ml)	10 µl	30 µl	1 ml
250X (37.5 µg/ml)	20 µl	45 µl	1.5 ml

### 2) Mycoplasma의 제거 (Dyne Mycoplasma Removal Reagent 25 µg/ml 처리)

- a. Dyne Mycoplasma Removal Reagent (12.5 mg/ml)를 1:500으로 사용할 Culture media에 희석하여 사용합니다.
- b. 약 2-3주동안 3-4일 간격으로 Dyne Mycoplasma Removal Reagent를 1:500으로 희석한 배지로 계대 배양합니다. (사용 시, 페니실린 및 스트렙토마이신과 혼용이 가능합니다)
- c. Dyne Mycoplasma Removal Reagent 처리 농도(25 µg/ml)가 cell에 독성이 높게 나타난다면 사용 농도를 줄여 사용합니다. (12.5 µg/ml)
- d. 2주간 Dyne Mycoplasma Removal Reagent를 cell culture에 사용 후, mycoplasma의 유무를 PCR 또는 cell base method를 이용하여 확인합니다.
- e. Mycoplasma detection assay 후에도 제거가 되지 않았다면 농도를 높여 (37.5 µg/ml) 1주간 더 처리합니다.

### 3) Mycoplasma의 예방 (Dyne Mycoplasma Removal Reagent 5 µg/ml 처리)

- a. Dyne Mycoplasma Removal Reagent (12.5 mg/ml)를 1:2500으로 사용할 Culture media에 희석하여 사용합니다. (사용 시, 페니실린 및 스트렙토마이신과 혼용이 가능합니다)
- b. 세포 계대 배양 할 때 Dyne Mycoplasma Removal Reagent를 희석한 배지를 사용합니다.
- c. Dyne Mycoplasma Removal Reagent를 예방용으로 사용 시, 2500X 희석을 권장하지만 세포의 상태에 따라 많게는 1250X나 적게는 5000X까지 희석하여 사용하실 수 있습니다.

**Note.** 처음 테스트 시에 현미경으로 매일 cell의 상태를 관찰하는 것을 권장합니다.(12.5 µg/ml)

Concentration	500 ml Media bottle
5000X (2.5 µg/ml)	100 µl
2500X (5 µg/ml)	200 µl
1250X (10 µg/ml)	400 µl

## Trouble-Shooting guide

### 1) 2주간 진행하여도 Mycoplasma가 사라지지 않는 경우

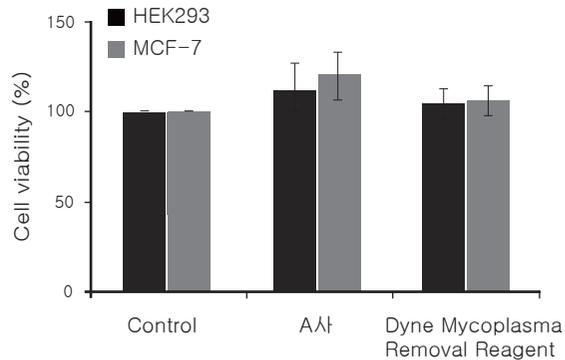
- 이미 너무 많은 Mycoplasma가 생긴 상태: 2주간 Dyne Mycoplasma Removal Reagent 농도를 높여 더 배양 합니다.
- 내성이 있는 Mycoplasma의 경우: Dyne Mycoplasma PLUS Removal Reagent (내성용 Mycoplasma 치료제)를 사용합니다.

### 2) Mycoplasma는 사라졌지만 세포의 상태가 좋지 않은 경우

- 항생제에 의해 나타나는 일반적 과정입니다.
- FBS의 양을 10% 증가하여 recovery 과정을 거칩니다. 이 때, Cell density를 평소보다 5~10% 늘려 배양하며, clump/cluster가 생기지 않도록 주의 합니다.

## 실험의 결과 예시

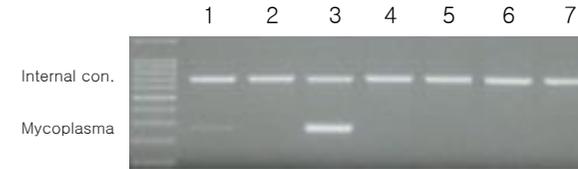
### 1. Cytotoxicity Test



**Figure 1.**  $1 \times 10^4$  cell/well로 seeding하여 24 hr 배양한 다음 48 hr 동안 mycoplasma eliminates 처리 후, Dyne WST-8 Cell Viability Assay Kit (Cat No. GBW-1000)를 이용한 Cell viability test 수행 결과.

☞ 타사와 비교하여 Dyne Mycoplasma Removal Reagent의 Cell toxicity는 보이지 않았습니다.

## 2. Mycoplasma detection – PCR method



- |                             |                                    |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1. PC: Mycoplasma DNA       | 5. Dyne Mycoplasma Removal Reagent |
| 2. NC: D.W                  | 6. A사                              |
| 3. Mycoplasma Infected Cell | 7. B사                              |
| 4. Non-infected Cell        |                                    |

**Figure 2.** 배양한 세포를 harvest하여 Genomic DNA extraction 후 확인  
☞ Intracellular mycoplasma가 제거됨을 확인하였습니다.

### Related Products

- GBM-D25 Dyne Mycoplasma Detection kit, 25 tests
- GBM-RP200 Dyne Mycoplasma PLUS Removal Reagent, 0.5 ml X 4 vials
- GBR-1000 Dyne Rnase-Free Solution, 500 ml X 2 ea
- GBS-500 Dyne Perfect Lab Sanitizer, 500 ml
- GBA-250 Dyne AquaClean Solution, 250 ml