

Mycoplasma detection FAQ

細胞治療是近年興起的一種醫療方式，主要是透過將特定細胞施打進入體，以達到對抗癌症、治療疾病、修復組織等目的。由於細胞治療產品的主成分是活細胞，對於人體的安全性便格外重要。不論是臨床試驗審查或產品查驗登記審查，對於細胞治療產品的原料、試劑，以及最終細胞產品本身都需要進行嚴格的安全性管控，包括無菌試驗、內毒素、黴漿菌、外來物質含量等檢測。

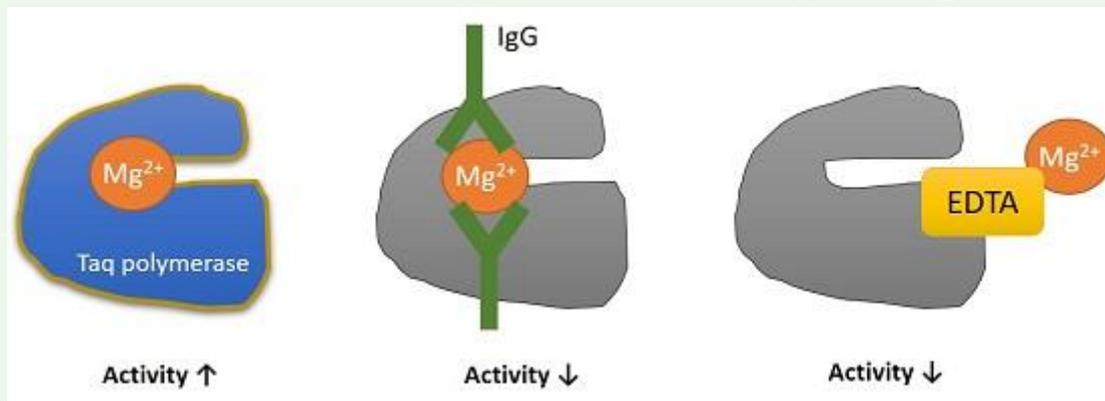
在上述各項安全性檢測中，黴漿菌檢測(Mycoplasma detection)對於細胞治療的研發階段及產程放大都相當重要，因為黴漿菌汙染是細胞實驗最常見的汙染之一。而一旦發生汙染，不論是細胞相關製品或最終細胞產品都可能檢測出黴漿菌的存在。若黴漿菌進入人體則很可能會致病，因此不論是日常監測或是細胞終產品，都應該定期進行黴漿菌監測，以確保細胞治療產品不會因黴漿菌存在而對人體造成病害。

根據生物藥品檢驗基準規定，黴漿菌檢測的主要方法有三種，包含：培養基培養法(culture)、指示細胞培養法(Indicator, Hoechst DNA stain)及聚合酶鏈鎖反應測試法(PCR NTA-base)。其中，最快速有效的檢測方法就是 PCR，除了省時、高效率，PCR 還具有特異性高、靈敏度高、檢測成本低等等優點，因此 PCR 也是實驗室最常使用的黴漿菌檢測方法。再者，不論歐盟藥典或美國藥典都已將 PCR 檢測法納入規範，因此現在是可以透過 PCR 檢測方式證明細胞產品是否存在黴漿菌汙染的。然而，PCR 會有偽陽性或偽陰性的問題產生，因此會需要搭配 positive, negative 及 internal control 一起進行。

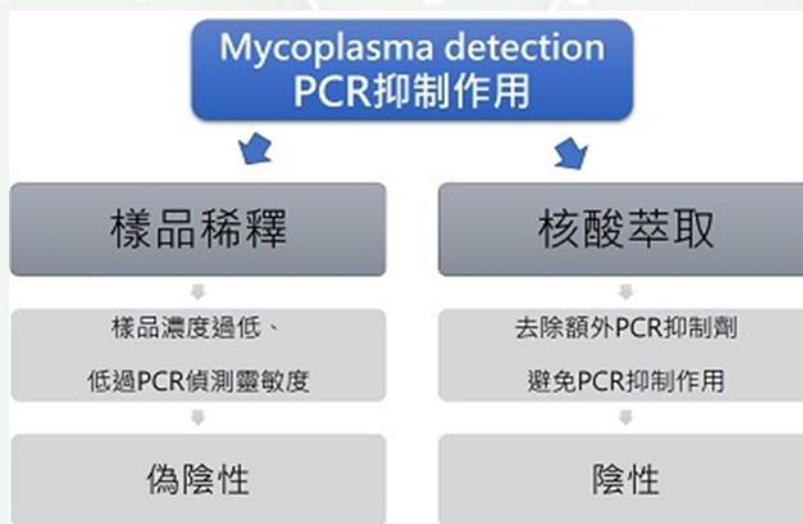
為求樣品製備快速，許多實驗室在黴漿菌偵測時，會使用細胞培養後的培養基作為樣品。然而在黴漿菌檢測 PCR 的結果判讀上，最容易被忽略的問題就是 PCR 抑制作用(PCR inhibition)造成的偽陰性結果。PCR 抑制是指樣品中因含有 PCR 抑制劑(PCR inhibitor)，造成 PCR 擴增 (amplification)被阻止並使 PCR 反應失敗的現象。PCR 抑制劑包括化學物質或物理障礙，常見的 PCR 抑制劑包含蛋白質、鹽類、離子、介面活性劑，以及用於 PCR 反應的樣品本身(如細胞培養基內含有的 FBS)、DNA 或緩衝溶液中的汙染物等。此外，樣品製備、DNA 萃取、DNA 純化時使用的化學物質(如 phenol/chloroform)，甚至實驗中使用到的塑膠、玻璃器皿都可能造成 PCR 抑制作用，種類繁多，不一而足。

PCR inhibitor
• 蛋白質：免疫球蛋白、蛋白酶、核酸酶、血紅素、黑色素
• 鹽類：磷酸鹽、氯化鉀
• 離子：Mg ²⁺ Ca ²⁺
• 單寧酸
• 甲醇、乙醇
• Detergent (SDS)
• phenol/chloroform
• 其他DNA

PCR 反應進行時，DNA polymerase 需要輔因子提升其活性。當 PCR 抑制發生時，PCR 抑制劑會干擾 DNA polymerase 與輔因子結合，進而降低酵素活性，造成 DNA 合成被抑制。例如 Taq polymerase 需要 Mg²⁺ 提升活性，但 reagent 中若含有 EDTA 則會螯合 Mg²⁺，使得 Taq polymerase 活性降低，進而造成 PCR 抑制作用。



要解決 PCR 抑制作用，需要設法降低或去除樣品中的 PCR 抑制劑。最常見的方法便是稀釋 PCR 樣品，透過降低樣品中 PCR 抑制劑的濃度與含量，來降低 DNA 聚合酶被干擾的可能性，使得 PCR 反應可以順利進行。然而此方法並不適用在黴漿菌偵測這種樣品中本身目標物含量就極低的 PCR 中，若是透過稀釋樣品試圖解決黴漿菌偵測的 PCR 抑制作用，反而可能會使樣品中即使存在黴漿菌，卻因為稀釋導致濃度過低、甚至低過 PCR 偵測靈敏度，因而人為造成偽陰性的結果發生。



另一個 PCR 抑制的解決方法則是將樣品做核酸萃取，透過萃取並純化出 DNA 的方式，去除樣品中其他可能的 PCR 抑制劑，並用高純度的 DNA 去進行 PCR 反應，以避免 PCR 抑制作用。核酸萃取也是 EP2.6.7 法規規範中黴漿菌偵測需進行的步驟，法規中建議使用 DNA extraction kit，透過收取培養細胞並萃取出 DNA，搭配 positive, negative 及 internal control 一起進行 PCR，就可以偵測出細胞中含有的黴漿菌，並避免 PCR 抑制的偽陰性結果。因此，使用符合 EP 法規規範的 Mycoplasma detection PCR 方式，包含使用符合法規的 PCR kit、DNA extraction kit 及實驗步驟偵測黴漿菌，才是真正經過確效、能確保細胞治療產品不含黴漿菌汙染，又符合法規規範的方法。那麼這樣的 kit 哪裏有呢？

岑祥公司提供您 CellSafe HiSense™ Mycoplasma PCR Detection Kit (HDEP-100)，符合歐盟藥典 EP2.6.7 規範的黴漿菌偵測 protocol，包含詳細的細胞樣品製備說明、核酸萃取步驟及黴漿菌偵測 PCR 步驟，Kit 中使用高度保留性(highly conserved)的黴漿菌 16S 核糖體序列 primer，可偵測多達 209 種的黴漿菌，PCR 靈敏度達到 1fg(10⁻¹⁵g)DNA，並具備內部效能監控 IAC (Internal Amplification Control)——提供 positive, negative 及 internal control DNA，更附有原廠確效電泳圖及判讀說明，一組 kit 就能完成樣品偵測與結果確效，使黴漿菌偵測一次到位。

CellSafe HiSense™ Mycoplasma PCR Detection Kit，適合偵測細胞治療產品及樣品需要符合 EP 法規的您！

詳情請見岑祥官網及相關產品~