

생물의약품 제조공정에서 마이코플라스마 정량 검출을 위한 TaqMan Probe Real-Time PCR

이재일, 김인섭*

TaqMan Probe Real-Time PCR for Quantitative Detection of Mycoplasma during Manufacture of Biologics

Lee Jae Il and In Seop Kim*

접수: 2014년 7월 10일 / 게재승인: 2014년 10월 16일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Mycoplasma is well recognized as one of the most prevalent and serious microbial contaminants of biologic manufacturing processes. Conventional methods for mycoplasma testing, direct culture method and indirect indicator cell culture method, are lengthy, costly and less sensitive to noncultivable species. In this report, we describe a new TaqMan probe-based real-time PCR method for rapid and quantitative detection of mycoplasma contamination during manufacture of biologics. Universal mycoplasma primers were used for mycoplasma PCR and mycoplasma DNA was quantified by use of a specific TaqMan probe. Specificity, sensitivity, and robustness of the real-time PCR method was validated according to the European Pharmacopoeia. The validation results met required criteria to justify its use as a replacement for the culture method. The established real-time PCR assay was successfully applied to the detection of mycoplasma from human keratinocyte and mesenchymal stem cell as well as Vero cell lines artificially infected with mycoplasma. The overall results indicated that this rapid, specific, sensitive, and robust assay can be reliably used for quantitative detection of mycoplasma contamination during manufacture of biologics.

Keywords: Mycoplasma detection, TaqMan probe, Real-time PCR, Validation, Biologics

1. INTRODUCTION

마이코플라스마 (Mycoplasma)는 0.3~0.8 μm 의 지름을 갖고 세포벽이 없는 가장 작고 간단한 원핵생물의 한 종류이다. 흔히 마이코플라스마는 몰리쿠티 (Mollicutes) 강 (class)에 포함되는 *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasm*, *Ureaplasma* 속 (genera) 등에 속하는 모든 종을 통칭한다. 마이코플라스마는 제한적인 생합성 기능을 가지고 있기 때문에 필요한 많은 영양분의 공급을 외부에 의존한다. 일반 세균 배지에서는 증식되지 않으며, 영양 요구성이 복잡하고, 특히 콜레스테롤을 요구하며, 말 혈청과 효모 추출액 등이 첨가된 배지에서 증식이 가능하다. 마이코플라스마는 비운동성이고, 호기성 또는 통성 혐기성으로 CO_2 가 5~10% 존재하는 상태에서 잘 증식한다 [1-4].

마이코플라스마는 지속적인 배양을 하는 세포 또는 세포주의 오염원으로 잘 알려져 있다 [5-7]. *Mycoplasma* 속과 *Acholeplasma* 속 20여종이 세포배양의 주요 오염원이며, 그중 6종의 마이코플라스마 (*M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhina*, *M. orale*, *A. laidlawii*)가 주요 오염원으로 보고되고 있다. 미국 FDA에 따르면 지난 30년간 조사된 20,000여 건의 세포배양 중 15%에 달하는 3,000여 건에서 마이코플라스마 오염이 확인되었다 [8]. 일본에서는 80%에 육박한다는 보고도 있다 [9]. 국내의 경우 수집된 82주의 배양세포를 직접배양법으로

한남대학교 생명·나노과학대학 생명시스템과학과
Department of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
Tel: +82-42-629-8754, Fax: +82-42-629-8751
e-mail: inskim@hnu.kr

마이코플라스마 오염 여부를 검사한 결과 39%에서 검출된 사례가 보고된 바 있다 [10].

항체를 포함하는 유전자재조합의약품, 백신, 세포치료제, 유전자치료제 등과 같은 생물의약품 생산을 위한 세포배양 시 마이코플라스마에 오염되면, 성장 속도 저하, 세포내 영양소 결핍, 대사산물 축적에 의한 pH 변화, 유전자 발현을 포함한 세포 내 여러 반응들이 변하게 되어 생산되는 제품의 양과 품질이 저하된다. 또한 제조 공정의 일관성을 유지하기 어려워 품질관리 문제를 일으킬 수 있고 임상적으로 적용되었을 때 환자에게 질병을 유발할 수 있다. 마이코플라스마에 오염된 MCF-7 세포주의 RNA 발현 양상의 변화를 조사해 본 선행연구의 결과에 의하면 22,000여 개의 조사 대상 유전자 중에서 200개 이상의 유전자 발현이 증가 또는 감소하는 것으로 밝혀졌다 [11]. 따라서 생물의약품을 생산하는 세포주 또는 세포치료제에 사용되는 세포의 정확한 특성 분석 및 관리를 위해서는 마이코플라스마의 오염 여부를 확인하여, 감염이 된 경우에는 적절한 조치를 취하는 것이 필요하다. 마이코플라스마는 세포를 이용한 생산 공정 중 제조에 사용되는 동물조직, 배양에 사용되는 혈청 및 트립신, 작업 환경 또는 작업자 등과 같은 다양한 경로를 통해 제조 공정에 유입될 수 있으며, 작업소 내 세포주의 교차오염으로 인해 다른 세포주로 오염이 확산될 수 있다 [2].

현재 마이코플라스마를 검출하기 위한 시험법으로 국내외의 각종 공정서에 수재된 배양시험법 (직접도말법, 증균배양법, 멤브레인 필터법)과 indicator cell culture 법이 사용되고 있으며 그 결과를 최종적으로 확인하는 데 28일이 소요된다 [12,13]. 따라서 공정서에 수재된 마이코플라스마 부정시험법은 유전자재조합의약품, 백신 등 대량 생산되는 제품의 완제 의약품 품질검사 시험법으로는 적당할 수 있지만, 유효 기간이 짧고, 개인 단위의 소량으로 생산되는 세포치료제에 적용하기에는 현실적으로 매우 어렵다. 또한 유전자재조합의약품과 백신의 안전한 생산을 위해 세포 배양, 분리 정제, 완제 의약품 생산 공정에서 실시간으로 마이코플라스마의 신속한 검출시험이 필요한데, 배양시험법과 indicator cell culture 법으로는 신속 검출이 불가능하다. 최근 각 국가의 규제기관은 마이코플라스마 부정시험법으로, 감염성 위해인자를 매우 짧은 시간에 높은 민감도를 가지고 특이적으로 검출할 수 있는 신속 검출법을 권고하고 있으며, 이 중 대표적으로 핵산증폭검사법이 제시되고 있다 [12].

다양한 마이코플라스마를 신속하게 검출하기 위한 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction: PCR) 방법들이 개발되어 왔지만, 대부분 일반 PCR 방법이거나 touchdown PCR 방법으로 민감도가 떨어지거나, PCR 산물을 전기 영동하는 과정 중에 실험실 오염으로 인한 위양성 발생의 문제점이 있어 마이코플라스마 부정시험법으로 사용하기에는 부적합하였다 [14-16]. 최근에는 일반 PCR에 비해 검출시간이 빠르고, 오염의 위험이 낮으며, 실시간 monitoring이 가능하고, 정량의 정확성이 매우 높은 SYBR Green I에 기반한 real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 신속검출법이 개발되어 왔다

[17-19]. SYBR Green I에 기반한 real-time PCR은 TaqMan probe를 이용한 real-time PCR에 비해 정량의 정확성과 특이도가 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서는 다양한 종류의 마이코플라스마를 신속하고, 특이적으로 검출할 수 있는 TaqMan probe를 이용한 real-time PCR 시험법을 확립하였다. 확립된 시험법을 European Pharmacopoeia section 2.6.7 [12]과 식품의약품안전청의 '핵산증폭검사법 검증 가이드라인' [20]에 따라 검증하여 신뢰성을 확보하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 마이코플라스마 균주와 동물 세포의 배양

European Pharmacopoeia section 2.6.7. MYCOPLASMAS 가이드라인에 따라 마이코플라스마 검출 시험법의 검증을 위해 Table 1에 기술한 7종의 마이코플라스마 균주를 사용하였다 [12]. 이러한 마이코플라스마 종들은 항생제 감수성, 배양의 난이도, 오염의 빈도, 병원성 등을 고려하여 선정된 표준 균주이다. 7종의 마이코플라스마 표준균주를 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하였으며, 배양을 위해 ATCC product sheet에 기재된 배지를 사용하였다. *A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*는 ATCC #243 media에서 배양하였으며, *M. pneumoniae*는 ATCC #988 media에서 배양하였으며, *M. synoviae*는 ATCC #486 media에서 배양하였다. Table 1에 기술한 조건으로 배양한 후 집락형성단위 (colony forming unit: CFU)로 계수하였다.

Real-time PCR 시험의 특이성 검증을 위해 사용한 CHO (Chinese hamster ovary)-K1 세포와 CHO DG44 세포는 5% 우혈청을 첨가한 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM: Gibco BRL, USA) 배지에 100X Hypoxanthine-Thymidine supplement (HT supplement; Gibco BRL, USA) 1%를 첨가하여 배양하였다. Human keratinocyte (사람 각질세포)는 Keratinocyte Growth Medium (Gibco BRL, USA)에 배양하였다. Human mesenchymal stem cell (사람 중간엽 줄기세포), A9 세포(ATCC CCL-1.4), C8166 세포(ATCC 71218), Vero 세포(ATCC CCL-81), MA104 세포(ATCC CRL-2378)는 10% 우혈청(Gibco BRL, USA)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM: Gibco BRL, USA) 배지에 배양하였다. 모든 동물 세포는 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. CHO-K, CHO DG44, A9, C8166, Vero, MA104 세포는 ATCC에서 구입하였으며, human keratinocyte와 human mesenchymal stem cell은 (주)메디컬그룹 베스티안 중앙연구소와 (주)본셀바이오텍에서 분양받아 사용하였다.

2.2. Primer와 TaqMan probe 선정

다양한 종류의 마이코플라스마를 동시에 검출하기 위한 primer는 유전자 변이가 거의 없는 것으로 알려진 16S rRNA 유전자를 기초로 하여 약 450 bp의 PCR 산물이 증폭되도록 고안된 universal *mycoplasma* primer A (forward primer, 5'

Table 1. Mycoplasma species used in this study and their culture conditions

Mycoplasma species	Source	Culture condition	Media
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 23206	Plates : 37°C, 5% CO ₂ , Broth : Aerobic	#243 media
<i>M. gallisepticum</i>	ATCC 19610	Plates : 37°C, 5% CO ₂ , Broth : Aerobic	#243 media
<i>M. fermentans</i>	ATCC 19989	Plates : 37°C, Anaerobic, Broth : 37°C, Anaerobic	#243 media
<i>M. hyorhinis</i>	ATCC 17981	Plates : 37°C, 5% CO ₂ , Broth : Aerobic	#243 media
<i>M. orale</i>	ATCC 23714	Plates : 37°C, Anaerobic, Broth : 37°C, Anaerobic	#243 media
<i>M. pneumoniae</i>	ATCC 15531	Plates : 37°C, 5% CO ₂ , Broth : Aerobic	#988 media
<i>M. synoviae</i>	ATCC 25204	Plates : 37°C, 5% CO ₂ , Broth : Aerobic	#486 media

Table 2. Nucleotide sequence alignment of TaqMan probe used in this study (5'-3') to mycoplasma DNA sequences from the NCBI (GenBank) database

GenBank Acc. No.	Species	FAM- Y G R C W A A C T A T G T G C C A G C A G Y C G C G -BHQ1
NC007294	<i>M. synoviae</i>	C G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
myc16srr	<i>M. penetrans</i>	C G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
aclrgnal	<i>A. laidlawii</i>	C G G C [A] A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
mycrgda	<i>M. gallisepticum</i>	C G [A] C T A A C T A T G T G C C A G C A G [T] C G C G
mycrnaf	<i>M. fermentans</i>	C G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
mycrnahyr	<i>M. hyorhinis</i>	C G G C [A] A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
mycrnaor	<i>M. orale</i>	[T] G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
mycrnapn	<i>M. pneumoniae</i>	C G [A] C T A A C T A T G T G C C A G C A G [T] C G C G
mycrnaar	<i>M. arginini</i>	[T] G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
af125583	<i>M. salivarium</i>	[T] G G C T A A C T A T G T G C C A G C A G C C G C G
mycrnapi	<i>M. pirium</i>	C G A C T A A C T A T G T G C C A G C A G [T] C G C G

Mismatches are shown in boxes

GGCGAATGGGTGAGTAACACG)와 primer B(reverse primer, 5' CGGATAACGCTTGCACCTATG)를 사용하였다 [21]. 마이코플라스마 DNA를 실시간으로 검출하기 위한 TaqMan probe는 마이코플라스마 16S rRNA 유전자 DNA 서열 alignment를 통해 상동성이 높은 부분을 선택하였으며, primer보다 Tm (melting 온도) 값이 8~10 정도 높게 디자인하였다. 또한 다양한 종류의 마이코플라스마를 검출하기 위해 mismatch를 가지는 부분을 모두 포함한 mixed base로 구성하였다 (Table 2). TaqMan probe sequence 5' 말단에는 fluorescent reporter dye인 6-carboxy-fluorescein (FAM)을 3' 말단에는 quencher인 Blak Hole Quencher 1 (BHQ-1)이 오도록 디자인하였다.

2.3. Real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 DNA 정량 최적화

StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 TaqMan probe real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 DNA 정량 시험법을 최적화하였다. 먼저 마이코플라스마 DNA 추출을 최적화하기 위해 서로 다른 5종류의 DNA 추출 kit에 대한 비교실험을 실시하였다. 비교실험을 위해 PrepSEQ™ nucleic acid extraction kit (Applied Biosystems, USA), Exgene™ blood SV mini kit (GeneALL, Korea), QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, German), Genomic DNA prep kit (Solgent, Korea), I-genomic BYF DNA extraction min kit (INtRON, Korea)를 사용하였다. Titer가 1×10⁵

CFU/mL인 *M. fermentans*를 대상으로 각 제조 회사의 메뉴얼에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 Realtime PCR master mix (TOYOBO, Japan)를 사용하여 TaqMan probe real-time PCR 시험을 수행한 후 crossing point 값을 비교하였다. Crossing point (Cp)는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다. PCR 반응을 위해 2× Realtime PCR master mix (TOYOBO, Japan) 10 µL, 10 pmol forward primer 1.5 µL, 10 pmol reverse primer 1.5 µL, 10 pmol specific probe 0.5 µL, template DNA 5 µL 혼합액에 MgCl₂ (25 mM) 0.8 µL, Nuclease-free water 0.7 µL를 첨가하여 최종부피를 20 µL가 되게 하였다. 핵산증폭은 pre-incubation은 94°C에서 90초, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 40초 (annealing 온도 최적화를 위해 50, 52, 54, 56, 58, 60°C에서 real-time PCR 수행), extension은 72°C에서 20초로 하여 45 cycle을 수행하였다. 최적 MgCl₂ 농도를 설정하기 위해 최적화된 annealing 온도 60°C에서 MgCl₂를 3 mM에서 6 mM까지 변화시켜 첨가해준 마이코플라스마 DNA 농도에 따른 crossing point 값을 비교하였다. 7종의 마이코플라스마 표준균주를 10배수로 연속적으로 희석한 후 real-time PCR을 수행하여 마이코플라스마 log titer (log₁₀ CFU/mL; x)에 대한 Cp 값 (y) 간의 표준 회귀식을 구하였다.

2.4. Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 마이코플라스마 real-time PCR 검출시험법의 신뢰성 (reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 특이성 (Speci-

ficity), 검출한계 (Limit of detection), 완건성 (Robustness)을 검증하였다. Real-time PCR 검증은 European Pharmacopoeia section 2.6.7 가이드라인과 식품의약품안전청의 '핵산증폭 검사법 검증 가이드라인'에 따라 실시하였다 [12,20].

2.4.1. 특이성 검증

핵산증폭검사법의 특이성은 시험 대상물에서 특정 핵산을 정확하게 검출할 수 있는 능력이다. 특이성 검증을 위해 생물학약품 생산을 위해 사용되는 CHO-K1 세포주와 CHO-DG44 세포주, human keratinocyte, human mesenchymal stem cell 및 C8166, Vero, MA104, A9과 같은 총 8종의 세포(주)를 대상으로 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 각 세포(주)의 농도는 10^6 cell/mL이었다. Real-time PCR 양성 대조군으로는 농도가 10^4 CFU/mL인 *M. fermentans*를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하였다.

2.4.2. 검출한계 검증

검출한계 값은 총 시험 건수 중 95%가 양성으로 검출될 수 있는 검체량 당 최소 목표 핵산의 양을 의미한다. 최소한 3개의 연속 희석한 패널을 독립적으로 준비하여 각 희석 배수당 24회 반복 검사를 실시한 후 결과를 분석하였다. 7종의 마이코플라스마를 각각 1×10^3 CFU/mL에서 1×10^{-1} CFU/mL까지 10배수로 연속적으로 희석하여 최적화된 real-time PCR 방법으로 검출 시험을 수행하였다.

2.4.3. 완건성 검증

완건성은 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 얼마나 영향을 받는지에 대한 척도를 나타내는 것으로 통상적으로 검사법의 신뢰도에 대한 지표이다. 마이코플라스마 음성 배양세포에 대하여 정해진 검출한계 값의 3배에 해당하는 농도가 되도록 해당 마이코플라스마 핵산을 첨가한 후 검사를 실시할 때 모두 양성으로 확인될 경우 검사법의 견고성을 입증할 수 있다. 이를 위해 마이코플라스마 음성 배양세포인 사람 각질세포에 각 마이코플라스마 균주 검출한계의 3배에 해당하는 농도를 첨가한 다음 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교하였다.

MgCl₂의 농도에 따른 real-time PCR 시험법의 견고성 검증을 검증하기 위해 *M. hyorhinis*를 1×10^3 CFU/mL부터 1×10^1 CFU/mL까지 연속적으로 희석한 후 MgCl₂의 농도를 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시켜서 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교하였다.

제조사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 견고성을 검증하기 위해 *M. hyorhinis* 균주를 1×10^3 CFU/mL부터 1×10^1 CFU/mL까지 연속 희석한 후 3곳의 primer 제조회사가 제조한 primer로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교하였다.

2.4.4. 마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율 결정

마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율은 real-time PCR 민감도와 배양법의 민감도 비교동등성을 결정하는데 매우 중요하다. 먼저 마이코플라스마 DNA copy 수 정량을 위한 plasmid standard를 제작하였다 이를 위해 *A. laidlawii* 16S rRNA 유전자를 기초로 하여 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR 증폭 유전자 부위를 포함하여 780 bp 산물이 증폭되도록 primer를 디자인하였다. Forward primer는 TGCATGT TGAACGGGATGTAGC, Reverse primer는 GCCAGTATCCA AAGCGGACTGA로 PCR 산물을 T-Blunt™ vector에 삽입하였다. *E. coli* DH5a에 plasmid standard를 transformation 시킨 후 배양하여 plasmid standard를 증폭한 다음 QIAfilter™ plasmid midi kit (Qiagen, USA)를 사용하여 plasmid standard를 추출하였다. 260 nm와 280 nm의 흡광도로 plasmid standard의 농도를 측정하여 copy 수로 환산하였다. Plasmid standard를 1×10^7 copies/ μ L 부터 1×10^1 copies/ μ L까지 10배수로 연속적으로 희석하여 TaqMan probe real-time PCR을 수행하고, copy 수에 따른 Cp 값을 환산하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 각 마이코플라스마의 CFU에 따른 Cp 값을 표준곡선에 대입하여 마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율을 결정하였다.

2.4.5. 피부세포 및 줄기세포를 이용한 배양법과 비교 동등성 시험

배양법과의 비교동등성을 시험하기 위하여 real-time PCR 시험법과 공정서 상의 마이코플라스마부정시험법의 검출한계 시험을 동시에 실시하는 방법을 따라 시험하였다. T-25 flask에 배양된 keratinocyte와 mesenchymal stem cell에 7종의 마이코플라스마를 10^3 CFU, 10^2 CFU, 10^1 CFU의 농도로 접종하여 오염시킨 후 2일간 배양하였다. 상등액을 제거한 후 세포 표면과 잔존 세포배양액에 남아 있을 수 있는 마이코플라스마를 완벽히 제거하기 위해 PBS로 3번 세척한 다음 새 배양액을 첨가하였다. 다시 하루를 배양한 후 세포를 모두 5 mL 부피로 부유시킨 후 세포와 배양액을 회수하여 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행하는 한편, 공정서에 따른 마이코플라스마부정시험을 수행하기 위하여 세포를 모두 부유시킨 후 세포와 배양액을 200 μ L씩 취하여 마이코플라스마 부정시험용 PPLO 고체배지 네 개에 접종한 후 두 개는 호기 상태로 다른 두 개는 혐기상태로 14일간 배양하여 마이코플라스마 집락 형성 유무를 관찰하였다.

2.5. Vero 세포주에서 real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 검출

확립된 real-time PCR을 생물학약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 rabies vaccine 생산 세포주인 Vero 세포주에 인위적으로 마이코플라스마를 오염시킨 후 마이코플라스마 검출 시험을 실시하였다. Vero 세포를 10% 우혈청을 첨가한 DMEM 배지 (Gibco BRL, USA)에 배양하였

다. T-25 flask에 배양된 Vero 세포주에 10⁴ CFU/mL 농도인 *M. fermentans*를 1 mL 접종한 후 2일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 표면과 잔존 세포배양액에 남아 있을 수 있는 마이코플라스마를 완벽히 제거하기 위해 PBS로 3번 세척한 다음 새 배양액을 첨가하였다. 다시 하루를 배양한 후 세포를 3회 계대배양하면서 각 계대 때마다 세포를 5 mL 부피로 회수하였다. 이 중 1 mL을 계대배양을 위해 사용하고, 나머지 4 mL로부터 확립된 real-time PCR 방법을 이용하여 마이코플라스마 존재 여부를 확인하였다. Real-time PCR 양성 대조군으로는 농도가 10⁴ CFU/mL인 *M. fermentans*를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 비감염된 Vero 세포주와 PBS를 사용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 마이코플라스마 DNA 정량을 위한 real-time PCR 최적화

마이코플라스마 DNA 정량을 위한 TaqMan probe real-time PCR의 민감도는 시료로부터 DNA를 추출하는 효율, 프라이머의 염기서열과 PCR 반응 조건 등에 의해 결정되는 마이코플라스마 DNA 증폭 효율, 증폭되는 핵산을 검출하기 위한 probe의 염기서열에 의해 결정된다. 먼저 마이코플라스마 DNA 추출시험방법을 최적화하기 위해 서로 다른 5종류의 DNA 추출 kit에 대한 비교실험을 실시하였다. 1×10⁵ CFU/mL인 *M. fermentans*를 대상으로 각 kit 제조 회사의 메뉴얼에 따라 DNA를 추출한 후 TaqMan probe real-time PCR 검출시험을 실시한 결과 PrepSEQ™ nucleic acid extraction kit를 사용하여 추출한 DNA에서 가장 먼저 증폭이 일어났다 (자료 미제시).

*M. fermentans*를 순차적으로 1×10⁴ CFU/mL, 1×10² CFU/mL, 1×10⁰ CFU/mL로 희석한 후 annealing temperature를 50, 52, 54, 56, 58, 60°C로 변화시켜서 real-time PCR을 수행하였을 때 온도에 따른 큰 차이가 없었지만 60°C에서 Cp 값이 가장 낮게 나타나 60°C가 최적 온도임을 알 수 있었다 (자료 미제시).

최적 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. *M. fermentans*를 순차적으로 1×10⁴ CFU/mL, 1×10² CFU/mL, 1×10⁰ CFU/mL로 희석한 후 MgCl₂ 농도를 3 mM, 4

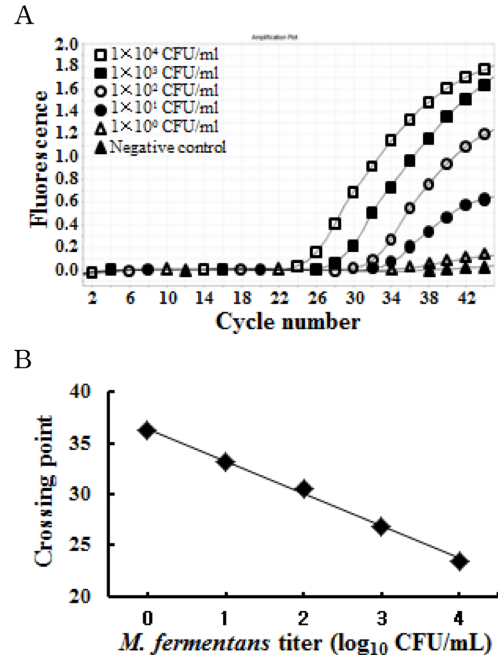


Fig. 1. Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of *M. fermentans* (A) and the standard curve obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial *M. fermentans* titer (B).

mM, 5 mM, 6 mM로 변화시켜서 real-time PCR을 수행하였을 때 4 mM에서 Cp 값이 가장 낮게 나타나 최적 MgCl₂ 농도는 4 mM임을 알 수 있었다 (자료 미제시).

최적화된 조건에서 Titer가 1×10⁴ CFU/mL인 *M. fermentans*를 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 real-time PCR cycle 수에 따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 1×10⁰ CFU/mL까지 *M. fermentans* DNA를 검출할 수 있었다 (Fig. 1). *M. fermentans* log titer (log₁₀ CFU/mL; x)에 대한 Cp 값 (y) 간의 표준 회귀식은 y = -3.374x+36.406 (결정계수 r²=0.999)로 *M. fermentans* log titer와 Cp 값 간의 회귀성이 매우 높았다. 다른 6종의 마이코플라스마에 대해서도 정량곡선을 작성하고 log titer (log₁₀ CFU/mL; x)에 대한 Cp 값 (y) 간의 표준 회귀식을 구한 결과 결정계수가 모두 0.99 이상으로 계산되었다 (Table 3). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR은 마이코플라스마 정량검출

Table 3. Linear regression analysis of amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of mycoplasma species

Mycoplasma species	CFU/ml							Regression curve Y = -aX + b	r ²
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹		
<i>A. laidlawii</i>			26.39	29.65	33.04	36.88	N/A	Y = -3.488X + 36.722	0.998
<i>M. gallisepticum</i>		22.94	26.28	29.58	33.32	35.72	N/A	Y = -3.259X + 36.085	0.996
<i>M. fermentans</i>		22.81	26.50	29.57	32.95	36.46	N/A	Y = -3.374X + 36.406	0.999
<i>M. hyorhina</i>	17.79	21.08	24.84	28.25	31.65	34.97	N/A	Y = -3.458X + 35.076	1.000
<i>M. orale</i>			25.46	29.12	32.82	35.50	N/A	Y = -3.382X + 35.798	0.995
<i>M. pneumoniae</i>			24.88	28.40	31.94	35.04	N/A	Y = -3.402X + 35.170	0.999
<i>M. synoviae</i>			26.36	29.67	32.87	36.45	N/A	Y = -3.346X + 39.702	0.999

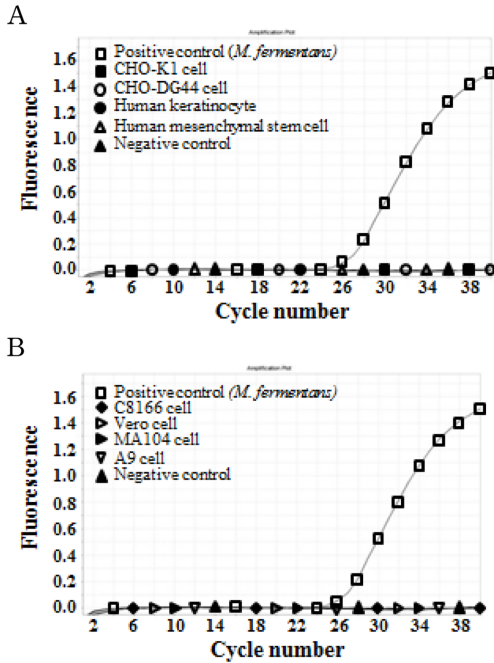


Fig. 2. Specificity of real-time PCR assay to human and animal cells. Specificity of the real-time PCR assay to human and animal cells such as human keratinocyte, human mesenchymal stem cell, CHO-K1 cell, CHO-DG44 cell (A), C8166 cell, Vero cell, MA104 cell, and A9 cell (B) was evaluated using real-time PCR.

시 log titer와 Cp 값 사이에 직선성이 매우 높음을 확인하였다. Real-time PCR의 효율을 표준 회귀식의 기울기 값으로 판단할 수 있다. 100% 증폭 효율을 나타내는 기울기 값은 -3.32이며, 일반적으로 -3.60에서 -3.10의 기울기 값을 나타내면 증폭 효율이 90~110%로 정량시험법으로 적합한 real-time PCR 시험방법으로 판단한다. 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR의 표준 회귀식에서 기울기 값은 -3.259에서 -3.488 값 사이에 존재하였다. 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR은 정량시험법으로 적합한 시험방법임을 확인하였다.

3.2. Real-time PCR의 신뢰성 검증

마이코플라스마 DNA 정량을 위한 real-time PCR 방법의 신뢰성을 보증하기 위해 확립된 실험법의 특이도, 검출한계, 완진성을 검증하였다.

3.2.1. 특이도 검증

생물의약품은 다양한 종류의 사람과 동물 세포주, 혈액, 조직, 기관 등을 이용해서 생산된다. 확립된 real-time PCR을 생물의약품 생산 공정에 적용하기 위해 항체치료제, 유전자 재조합 단백질 의약품 등 생산에 사용되는 세포주인 CHO-K1 세포주와 CHO-DG44 세포주, 사람 피부세포치료제 생산에 사용되는 human keratinocyte, 줄기세포치료제 생산에 사용되는 human mesenchymal stem cell을 대상으로 특이성을 시험한 결과 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었고, 양성대조구인 *M. fermentans*의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A). 또한 사람과 원숭이, 쥐 유래 세포주인 C8166 (Human T cell leukemia), Vero (*Cercopithecus aethiops* kidney cell), MA104 (*Cercopithecus aethiops* kidney cell), A9 (Mouse fibroblast cell) 세포주를 대상으로 특이성을 시험한 결과 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었고, 양성대조구인 *M. fermentans*의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B).

3.2.2. 검출한계 검증

검출한계 검증을 위해 각 마이코플라스마 당 3개의 연속 희석한 샘플을 준비하여 각 희석 배수 당 8회에 걸쳐 총 24회 검출 시험을 실시하였다. Table 4는 *M. fermentans*를 대상으로 수행한 검출한계 시험의 결과이다. 검출한계 값은 총 시험 건수 중 95%가 양성으로 검출될 수 있는 검체의 부피 당 마이코플라스마 CFU수를 의미하기 때문에 총 24회 시험 중 23회 이상 양성 값이 나온 농도인 10 CFU/mL을 검출한계로 결정하였다. 동일한 방법의 시험 결과 *A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*의 검출한계는 10 CFU/mL, *M. synoviae*의 검출한계는 1 CFU/mL로 나타났다

Table 4. Determination of LOD (Limit of Detection) of *M. fermentans*

Run	CFU/mL															LOD
	10 ³			10 ²			10 ¹			10 ⁰			10 ⁻¹			
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1 CFU/mL
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	10 CFU/mL
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	10 CFU/mL
Decision															10 CFU/mL	

Three independent 10-fold dilution series of *M. fermentans* were tested on different days with 8 replicates for each dilution. LOD for the individual run was determined as the lowest CFU/mL of detectable. “+” represented the positive signal while “-” represented the negative signal for each replicate.

Table 5. Summary of the validated LOD (Limit of Detection) for each *Mycoplasma* tested in the validation study

<i>Mycoplasma</i> species	Limit of detection
<i>A. laidlawii</i>	10 CFU/mL
<i>M. gallisepticum</i>	10 CFU/mL
<i>M. fermentans</i>	10 CFU/mL
<i>M. hyorhinis</i>	10 CFU/mL
<i>M. orale</i>	10 CFU/mL
<i>M. pneumoniae</i>	10 CFU/mL
<i>M. synoviae</i>	1 CFU/mL

LOD was determined as the lowest CFU/mL number of each *Mycoplasma* detectable at least 23 out of 24 replicates (more than 95%) in all 8 runs performed during validation study.

(Table 5). European Pharmacopea section 2.6.7 가이드라인에 따르면 핵산증폭검사항법이 배양시험법 (직접도말법, 증균배양법, 멤브레인 필터법)을 대신하기 위해서는 Table 1에 기술된 마이코플라스마 참조 패널 각각을 모두 10 CFU/mL 이상의 민감도로 검출하여야만 한다 [12]. 검출한계 검증시험 결과 확립된 TaqMan probe real-time PCR 시험법은 European Pharmacopea의 기준을 만족하였다.

3.2.3. 완전성 검증

확립된 real-time PCR 방법의 완전성을 검증하기 위해 마이코플라스마 음성으로 확인된 사람 각질세포를 회수하여 각 마이코플라스마 검출한계의 3배에 해당되는 농도가 되게 spiking한 후 검출시험을 실시하였다. 실험 결과 7종의 마이코플라스마가 모두 검출되었다 (Table 6).

MgCl₂ 농도 변화에 따른 완전성을 검증하기 위해 *M. hyorhinis*를 대상으로 MgCl₂ 농도를 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화

시켜 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교하였다 (Table 7). Cp값에 대한 CV %는 각 1.41, 0.79, 2.36으로 확인되었다. 실험조건의 농도에서 Cp값의 변화가 거의 없어 MgCl₂ 농도의 변화에 대한 완전성이 있음을 확인할 수 있었다.

제조회사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 완전성을 검증하기 위해 3곳의 primer 제조회사가 제조한 primer를 선정하였다. *M. hyorhinis* 균주를 1×10³ CFU/mL부터 1×10¹ CFU/mL까지 연속 희석한 후 primer 별로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Cp 값을 비교하였다. Cp 값에 대한 CV %는 1.12, 0.79, 0.70으로 확인되었다. 서로 다른 제조회사의 primer에서 Cp 값의 변화가 거의 없어 완전성이 있음을 확인하였다 (Table 8).

3.3. 마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율 결정

마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율은 real-time PCR 민감도와 배양법의 민감도 비교동등성을 결정하는데 매우 중요하다 [12,15]. 본 연구에 사용된 7가지 표준균주의 DNA copy 수 (DNA copy number/mL) 대 집락형성단위 (CFU/mL) 비율은 9~740까지 넓은 구간에 걸쳐 있었다 (Table 9). Touch down PCR 마이코플라스마 검출시험법을 검증한 최근 보고의 경우에도 마이코플라스마 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율은 5~5,511까지 넓은 구간에 걸쳐 있었다 [15]. 집락형성단위는 마이코플라스마 성장 단계에 따라 달라질 수 있다. 지수성장기에 회수한 마이코플라스마의 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율은 정체기에 회수한 마이코플라스마의 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율보다 작다 (미발표 자료). 또한 배양 환경과 방법에 따라 집락형성단위 수가 달

Table 6. Robustness of real-time PCR assay (Detection of *Mycoplasma* from human keratinocyte spiked with 3 times amount of LOD of each mycoplasma)

<i>Mycoplasma</i> species	Spiked concentration	Detection of <i>Mycoplasma</i> (Cp values)			Decision
<i>A. laidlawii</i>	30 CFU/ml	28.01	28.09	28.04	Positive
<i>M. gallisepticum</i>	30 CFU/ml	31.02	31.27	31.22	Positive
<i>M. fermentans</i>	30 CFU/ml	31.78	32.06	32.08	Positive
<i>M. hyorhinis</i>	30 CFU/ml	29.33	29.70	29.90	Positive
<i>M. orale</i>	30 CFU/ml	29.50	30.37	29.95	Positive
<i>M. pneumoniae</i>	30 CFU/ml	28.01	28.06	28.27	Positive
<i>M. synoviae</i>	3 CFU/ml	32.10	32.50	32.18	Positive

Table 7. Robustness of real-time PCR assay (Effect of different MgCl₂ concentrations)

<i>M. hyorhinis</i> (CFU/mL)	Cp values										CV(%)	
	Below optimal concentration (3 mM)			Optimal concentration (4 mM)			Above optimal concentration (3 mM)			Mean of Cp		SD of Cp
1×10 ³	22.47	22.24	22.37	22.41	21.76	22.08	21.88	21.65	21.80	22.07	0.31	1.41
1×10 ²	25.87	25.60	25.68	25.55	25.59	25.71	25.24	25.40	25.30	25.55	0.20	0.79
1×10 ¹	29.38	31.07	28.93	29.05	29.04	29.06	29.14	28.89	28.87	29.27	0.69	2.36
Negative control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-

Three independent 10-fold dilution series of *M. hyorhinis* were tested using different concentrations of MgCl₂ for real-time PCR. Mean and standard deviation (SD) of Cp were calculated.

CV(%): Coefficient of variance % = (SD of Cp/Mean of Cp) × 100

N/A, Not Applicable; real-time PCR signals were not detected.

Table 8. Robustness of real-time PCR assay (Effect of primer sets made by different vendors)

<i>M. hyorhinis</i> (CFU/mL)	Cp values										Mean of Cp	SD of Cp	CV(%)
	Vendor A			Vendor B			Vendor C						
1 x 10 ³	21.82	21.93	21.66	22.19	21.91	21.70	22.41	21.76	22.08	21.94	0.24	1.12	
1 x 10 ²	25.19	25.18	25.16	25.28	25.29	25.39	25.55	25.59	25.71	25.37	0.20	0.79	
1 x 10 ¹	28.73	28.91	28.46	29.06	28.93	29.02	29.05	29.04	29.06	28.92	0.20	0.70	
Negative control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	

Three independent 10-fold dilution series of *M. hyorhinis* were tested using different primer sets made by different vendors for real-time PCR. Mean and standard deviation (SD) of Cp were calculated.

CV(%): Coefficient of variance % = (SD of Cp/Mean of Cp) × 100

N/A, Not Applicable; real-time PCR signals were not detected.

Table 9. Average gene copy to CFU ratio for mycoplasma strains

Mycoplasma species	Average gene copy to CFU ratio
<i>A. laidlawii</i>	91
<i>M. gallisepticum</i>	740
<i>M. fermentans</i>	37
<i>M. hyorhinis</i>	132
<i>M. orale</i>	33
<i>M. pneumoniae</i>	9
<i>M. synoviae</i>	43

라질 수 있기 때문에 마이코플라스마의 DNA copy 수 대 집락형성단위 비율도 배양 환경과 방법에 따라 달라질 수 있다.

3.4. 사람 피부세포 및 줄기세포를 이용한 배양시험법과 비교 동등성 시험

마이코플라스마 검출을 위한 배양시험법과 확립된 real-time PCR 방법의 비교 동등성을 시험하기 T-25 flask에 배양된 keratinocyte와 mesenchymal stem cell에 7종의 마이코플라스마를 각각 10³ CFU, 10² CFU, 10¹ CFU의 농도로 접종한 후 각 시험법으로 검출시험을 실시하였다 (Table 10). Real-time PCR 방법은 keratinocyte와 mesenchymal stem cell 시료에서 7종 모두 10¹ CFU의 농도로 접종한 경우까지 검출하였다. 배양 시험법으로 마이코플라스마를 검출하였을 때 호기상태에서 배양한 경우 10³ CFU의 농도로 접종한 *A. laidlawii*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae*

Table 10. Comparability test between real-time PCR assay and culture method

Mycoplasma species	Detection methods	Spiked titer (CFU)		
		1×10 ³	1×10 ²	1×10 ¹
<i>A. laidlawii</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	ND	ND	ND
<i>M. gallisepticum</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	ND	ND	ND
<i>M. fermentans</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	ND	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	D	ND	ND
<i>M. hyorhinis</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	ND	ND	ND
<i>M. orale</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	D	ND	ND
<i>M. pneumoniae</i>	Real-time PCR	D	D	ND
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	ND	ND	ND
<i>M. synoviae</i>	Real-time PCR	D	D	D
	Culture method (Aerobic)	D	ND	ND
	Culture method (Anaerobic)	ND	ND	ND

Solutions of mycoplasma species were spiked into human keratinocyte and mesenchymal stem cells cultivated in T-25 flask. After 2 days culture, culture supernatant were removed and washed three times with PBS to completely remove mycoplasma which might be present in culture supernatant. Then each flask was fed with 5 mL of culture medium and incubated again. After 1 day culture, cells were harvested and mycoplasma were detected using real-time PCR assay and culture method, respectively.

D : Detected, ND : Not detected

의 경우에만 배양된 콜로니를 확인할 수 있었고, 10² CFU와 10¹ CFU의 농도로 접종한 경우에는 배양된 콜로니를 확인할 수 없었다. 혐기상태에서 배양한 경우 10³ CFU의 농도로 접종한 *M. fermentans*와 *M. orale*의 경우에서만 keratinocyte와 mesenchymal stem cell 시료에서 배양된 콜로니를 확인할 수 있었다. 10² CFU와 10¹ CFU의 농도로 접종한 경우에는 배양된 콜로니를 확인할 수 없었다. 이와 같은 결과에서 real-time PCR 방법이 배양시험법보다 훨씬 더 신속하고 민감하게 마이코플라스마를 검출할 수 있음을 확인하였다.

개인 단위의 소량으로 생산되는 세포치료제의 경우 투여 72시간 전에 마이코플라스마 오염 여부 검사를 공정서에 수재된 배양시험법 또는 indicator cell culture 법으로 실시하고 3일간의 시험결과를 확인한 후 임상에 적용하도록 하고 있다 [22]. 이러한 배양시험법 또는 indicator cell culture 법은 그 결과를 확인하는데 28일이 소요되기 때문에 환자에게 투여한 후 마이코플라스마 오염 여부 검사 결과가 나오게 되는 세포치료제에 적용하기에는 현재 어려움이 많다. 또한 배양시험법 또는 indicator cell culture 법의 경우 검출배지의 조성, 시료의 특성 및 배양조건 등 많은 요인에 의해 그 결과가 영향을 받을 수 있어 위음성 결과가 나올 가능성이 상존하고 있다. 따라서 세포치료제의 경우, 마이코플라스마 부정시험법으로 신속검사법의 적용이 절실하게 필요하다. 확립된 real-time PCR을 세포치료제 제조공정에 적용할 경우 배양시험법보다 훨씬 더 신속하고 민감하게 마이코플라스마를 검출할 수 있을 것으로 사료된다.

3.5. Vero 세포주에서 real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 검출

확립된 real-time PCR을 생물의약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 rabies vaccine 생산 세포주인 Vero 세포주에 인위적으로 *M. fermentans*를 오염시킨 후 마이코플라스마 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 Vero 세포에 *M. fermentans*를 10⁴ CFU의 농도로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 계대배양하면서 각 계대 때마다 세포를 5 mL 부피로 회수하였다. 확립된 real-time PCR 방법을 이용하여 회수한 세포배양액에 존재하는 마이코플라스마의 농도를 확인하였다 (Fig. 3). 1회 계대 배양 시료에서는 7.87×10³ CFU/mL 농도의 *M. fermentans*가 검출되었고, 2회 및 3회 계대 배양 시료에서는 각각 2.42×10⁶, 1.71×10⁶ CFU/mL 농도의 *M. fermentans*가 검출되었다. *M. fermentans*가 비감염된 Vero 세포주와 PBS 음성대조군에서는 마이코플라스마가 검출되지 않았다.

마이코플라스마는 세포벽이 있는 세균과는 달리 세포벽이 없어 형태가 쉽게 변하며, 직경이 0.3~0.8 μm로 작아 세포배양용 배지 여과에 사용되는 0.22~0.45 μm의 멤브레인 필터를 통과할 수 있기 때문에 세포배양용 배지를 통하여 오염될 수 있다. 또한, 세포주가 고농도의 마이코플라스마에 오염되어 있어도 배지의 혼탁도, pH의 변화, 그리고 세포변성효과 등의 가시적인 변화가 없기 때문에 오염사실이 간과되는 경향

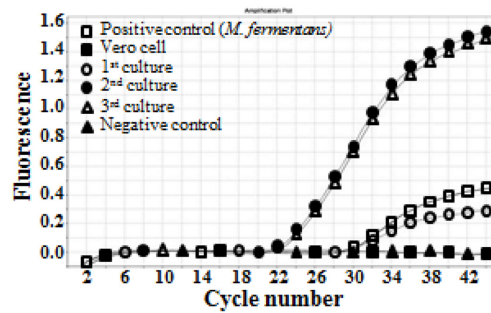


Fig. 3. Quantitative detection of *M. fermentans* in artificially contaminated Vero cells. *M. fermentans* solution of 10⁴ CFU was spiked into Vero cells and subcultured three times. *M. fermentans* was quantitatively detected from the artificially contaminated Vero cells using real-time PCR.

이 있다. 마이코플라스마는 이론적으로 세포배양을 위해 사용되는 동물과 식물유래 어떤 물질로부터도 오염될 수 있다. 또한 토양이나 물, 공기로부터도 오염될 수 있다. 특히 마이코플라스마가 오염된 세포의 배양 시 에어로졸 형태로 다른 세포주를 오염시킬 수 있다 [2,23]. 미국과 유럽, 일본, 한국의 규제기관에서는 세포배양 시스템에서 마이코플라스마 검출 시험을 필수적으로 수행하도록 하고 있다. 세포배양기로부터 unprocessed bulk를 회수하기 전에 세포배양액에서 마이코플라스마를 검출하도록 하고 있지만, 공정서에 수재된 배양시험법 (직접도말법, 증균배양법, 멤브레인 필터법)과 indicator cell culture 법을 사용하면 그 결과를 최종적으로 확인하는데 28일이 소요된다 [12,13]. 보통 unprocessed bulk는 48 시간 안에 downstream process를 통해 제품화가 진행되기 때문에 마이코플라스마 검출시험 결과가 나오기 전에 공정에 투입되게 되어 마이코플라스마가 오염된 unprocessed bulk의 경우 분리정제공정 시설과 장비를 오염시키게 된다. 따라서 마이코플라스마를 신속하게 검출할 수 있는 시험법의 적용이 필요하다. European Pharmacopoeia section 2.6.7은 마이코플라스마 검출을 위한 핵산증폭법을 생물의약품 공정에 적용할 수 있게 하기 위하여 분석법의 특이도와 검출한계, 완전성 검증을 위한 방법과 기준을 제시하였다 [12]. 본 연구에서는 생물의약품 제조공정에서 마이코플라스마를 신속하게 검출하기 위한 TaqMan probe real-time PCR 방법을 개발하였다. 또한 European Pharmacopoeia section 2.6.7과 식품의약품안전청의 ‘핵산증폭검사법 검증 가이드라인’에 따라 검증하여 신뢰성을 확보하였다. 확립된 시험법은 다양한 종류의 세포주와 사람 세포로부터 분리한 DNA에 대해 음성의 결과를 나타내었다. 또한 Table 1에 기술된 마이코플라스마 참조 패널 각각을 모두 10 CFU/mL 이상의 민감도로 검출하여 European Pharmacopoeia의 기준을 만족하였다. 확립된 시험법은 MgCl₂ 농도를 변화시키거나 서로 다른 제조사에서 제조한 primer를 사용할 경우에도 동일한 결과 값을 나타내었다. 또한 마이코플라스마 음성으로 확인된 human keratinocyte 배양세포를 회수하여 각 마이코플라스마 검출한계의 3배에 해당되는 농

도가 되게 spiking한 후 DNA를 추출한 후 검출시험을 실시한 결과 7종의 마이코플라스마가 모두 검출되어 완전성이 있음을 확인하였다.

세포배양공정에 직접 적용하기 위해 인위적으로 마이코플라스마를 keratinocyte와 mesenchymal stem cell에 오염시킨 후 3일 동안 배양한 다음 real-time PCR 시험법과 직접도말배양법으로 검출시험을 실시한 결과 real-time PCR 시험법이 훨씬 더 민감하게 검출할 수 있었다. 또한 Vero 세포주에 마이코플라스마를 오염시킨 후 확립된 real-time PCR 시험법으로 검출한 결과 회수한 세포주에서 마이코플라스마를 신속하게 검출할 수 있었다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 다양한 종류의 마이코플라스마를 신속하고, 특이적으로 검출할 수 있는 TaqMan probe를 이용한 real-time PCR 시험법을 확립하였다. 확립된 시험법을 European Pharmacopoeia section 2.6.7과 식품의약품안전청의 ‘핵산증폭검사법 검증 가이드라인’에 따라 검증하여 신뢰성을 확보하였다. 인위적으로 마이코플라스마를 사람 각질세포와 중간엽줄기세포, Vero 세포주에 오염시킨 후 확립된 real-time PCR 시험법으로 검출한 결과 회수한 세포주에서 마이코플라스마를 신속하게 검출할 수 있었다. 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR 시험법은 생물의약품 제조 공정 중 생산용 세포주, 원료물질, 공정 중간물질, 완제품에서 마이코플라스마 신속 검출을 위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발사업 (과제번호: 11172바약안371)과 산업통상자원부 및 한국산업기술평가관리원의 산업융합원천기술개발사업 (과제번호: 10040197, 항체바이오메터 개발을 위한 항체특성분석 기반기술 개발)의 일환으로 수행하였음. 본 내용의 일부는 세포치료제 시험정보집2 (Real-time PCR을 이용한 마이코플라스마 부정시험) 자료로 출간됨.

REFERENCES

- Razin, S., D. Yagev, and Y. Naot (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62: 1094-1156.
- Razin, S. and L. Hayflick (2010) Highlights of mycoplasma research-an historical perspective. *Biologicals* 38: 183-190.
- Roger, J. M. and R. A. Nicholas (1998) Introduction. pp. 1-6. In J. M. Roger and R. A. Nicholas (eds.). *Mycoplasma protocols*. Human Press, New Jersey, USA.
- Masover, G. and L. Hayflick (1981) The genera Mycoplasma, Ureaplasma and Acholeplasma and associated organisms (Thermoplasmas and Anaeroplasmata). pp. 2247-2270. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (eds.). *The prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, German.
- Hay, R. J., M. L. Macy, and T. R. Chen (1989) Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature* 339: 487-488.
- Stanbridge, E. (1971) Mycoplasmas and cell culture. *Bacteriol. Rev.* 35: 206-227.
- Mirjalilia, A., E. Parmoora, S. Moradi Bidhendib, and B. Sarkari (2005) Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals* 33: 81-85.
- Armstrong, S. E., J. A. Mariano, and D. J. Lundin (2010) The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals* 38: 211-213.
- Ogata, M. and K. Koshimizu (1967) Isolation of mycoplasmas from tissue cell lines and transplantable tumor cells. *Jpn. J. Microbiol.* 11: 289-303.
- Chang, M. W. and K. H. Kim (1993) Detection of contaminated mycoplasmas on the cultured cell lines. *J. Korean Soc. Microbiol.* 28: 209-221.
- Crispin, J. M., H. S. Kassem, S. D. Pepper, Y. Hey, T. H. Ward, and G. P. Margison (2003) Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *BioTechniques* 35: 812-814.
- European Pharmacopoeia. 6.1, section 2.6.7 Mycoplasmas.
- Lawrence, B., H. Bashiri, and H. Dehghani (2010) Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms. *Biologicals* 38: 218-223.
- Eldering, J. A., C. Felten, C. A. Veilleux, and B. J. Potts (2004) Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals* 32: 183-193.
- Zhi, Y., A. Mayhew, N. Seng, and G. B. Takle (2010) Validation of a PCR method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. *Biologicals* 38: 232-237.
- Bruchmiller, I., E. Pirkl, R. Herrmann, M. Stoermer, H. Eichler, H. Klier, and P. Bugert (2006) Introduction of a validation concept for a PCR-based Mycoplasma detection assay. *Cytotherapy* 8: 62-69.
- Ishikawa, Y., T. Kozakai, H. Morita, K. Saida, S. Oka, and Y. Masuo (2006) Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 42: 63-69.
- Harasawa, R., H. Mizusawa, M. Fujii, J. Yamamoto, H. Mukai, T. Uemori, K. Asada, and I. Kato (2005) Rapid detection and differentiation of the major mycoplasma contaminants in cell cultures using real-time PCR with SYBR Green I and melting curve analysis. *Microbiol. Immunol.* 49: 859-863.
- Stormer, M., T. Vollmer, B. Henrich, K. Kleesiek, and J. Dreier (2009) Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *Int. J. Med. Microbiol.* 299: 291-300.
- Korea Food and Drug Administration (2003) *Guidance on the validation of nucleic acid amplification tests*, Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea.
- Wong-Lee, J. G. and M. Lovett (1993) Rapid and sensitive PCR

- method for identification of mycoplasma species in tissue culture. pp. 257-260. In: D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (eds.). *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
22. Korea Food and Drug Administration (2008) Draft guidance on the mycoplasma test suitable for cell therapy products.
 23. Folmsbee, M., G. Howard, and M. McAlister (2010) Nutritional effects of culture media on mycoplasma cell size and removal by filtration. *Biologicals* 38: 214-217.