

폐구균에 대한 항체 기능 측정을 위한 multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) 시험방법

(Version D.05, 2013년 8월)

By Moon H. Nahm and Robert L. Burton
The Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory of the US NIH
WHO Reference Laboratory for Pneumococcal Serology
Departments of Pathology and Microbiology
University of Alabama at Birmingham
Birmingham AL 35294-2170
USA

감사의 글

이 글은 2014년 SK 화학의 김나형 선생이 번역하였으며 이화여자대학교 의학전문대학원 김경효, 김한울 선생과 고려대학교 의과대학 송준영 선생이 감수하였습니다

www.vaccine.uab.edu

시험방법

1. Bacteria Stocks

- A. Master Stock 유지
- B. Assay Stock 생산
- C. Assay Stock 특성 평가 (Characterization)
- D. Assay Stock의 허용기준

2. HL60 세포

- A. Master Cell Bank 생산
- B. Working Cell Culture 시작
- C. Working Cell Culture 증식
- D. HL60 세포 분화
- E. HL60 세포 표현형 결정
- F. HL60 세포의 허용기준

3. 검체 시험

- A. 검체 수집
- B. 검체의 보관

- C. 열불활성화 (Heat Inactivation)
 - D. 검체의 살균제(항생제) 유무 시험
 - E. QC 혈청 pool 생산
- 4. 보체 (Complement)**
- A. 보체의 working aliquots 준비
 - B. 보체 검사 1 (CH50 Assay)
 - C. 보체 검사 2 (MOPA)
 - D. 보체 제조단위(lot)의 허용기준
- 5. Fetal Bovine Serum (FBS)**
- A. 열불활성화 (Heat Inactivation) 및 assay aliquots 준비 (분주)
 - B. FBS 검사
 - C. FBS 제조단위(lot)의 허용기준
- 6. UAB-MOPA 시험방법**
- 7. 결과 분석**
- A. Data 전환
 - B. Assay 허용기준
 - C. 개별 검체 결과의 허용기준
- 8. Assay Notes**
- 9. 참고문헌**
- 10. 자재 및 시약**
- A. 자재
 - B. 용액 및 시약
 - C. 균 배양 배지
 - D. 화학물질 (Chemicals)
 - E. 기기 및 Software
 - F. 세포주
 - G. 균주
 - H. Flow Cytometry 시약
 - I. 용액 제조 방법
- 11. 세포 계수 (Cell Counting)**

서론

Opsonization assay는 폐구균 백신의 면역원성을 측정하는 중요한 방법이 되었다 (참고문헌 1). Opsonization assay가 더 널리 사용되도록 하기 위해서 4-fold multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA)의 자세한 시험방법을 작성하였다. 본 시험방법은 multiplexed assay에 대해서 기술하고 있지만, Note 9에 기재되어 있는 것과 같은 약간의 수정을 통해서 single serotype assay 방법으로도 사용할 수 있다. 또한, 본 시험방법에서 계열희석(serial dilution)배수 혹은 검체당 well의 개수를 약간 수정하여 시험을 진행할 수도 있다. 참고문헌 2와 3, 혹은 web

site (www.vaccine.uab.edu)에서 더 자세한 추가정보를 찾아볼 수 있다.

원활한 시험결과 분석을 위해 colony 개수를 "opsonization index"로 전환시켜주는 Excel®-based data processing program이 개발되었다. "Opsotiter3"라고 불리는 이 프로그램은 Rob Burton (Robburton@uab.edu)에게 이메일이나 서면으로 연락하면 reference lab에서 받을 수 있다.

우리는 US National Institute of Standards and Technology (NIST)와 공동으로 digital image (예를 들어 디지털 카메라 사진 혹은 scanned image)로 있는 colony의 숫자를 계수해주는 software를 개발하였다. "NICE" (NIST's Integrated Colony Emunerator)라 불리는 이 software는 무료로 받을 수 있다. nice@nist.gov로 이메일을 보내면 NICE에 대한 더 많은 정보를 받을 수 있다. NICE software와 설명서는 <ftp://ftp.nist.gov/pub/physics/mlclarke/NICE/>에서 다운로드 받을 수 있다.

학교의 연구자가 비영리적인 목적으로 MOPA 시험을 위한 혈청형의 균주를 필요로 할 경우, BEI Resources (www.beiresources.org)에서 공급받을 수 있다. 상업적 사용을 위해서는 University of Alabama at Birmingham의 Dr. Debbie Bidanset에게 연락해야한다. 균주를 받기 위해서는 BEI resources에 등록해야 한다.

BEI 연락처:

BEI Resources
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209
Email: contact@beiresources.org
Web site: www.beiresources.org
Telephone: 1-800-359-7370

위의 시험방법 목차에 나열되어 있는 항목들은 시험법을 확립하기 위해 필수적인 항목들이다. 시험법 확립 이후에는 UAB-MOPA 시험법이 주로 사용되는 시험방법이 될 것이고, 다른 시험방법 (bacteria working stock 준비/특성평가, 보체 제조단위 검사 등) 은 가끔씩 사용될 것이다.

이 시험방법은 Nahm lab에서 10년이 넘는 시간 동안 많은 연구자들의 연구를 바탕으로 개발되었다. Nahm lab의 연구자들 이외에도 연구에 도움이나 중요한 조언을 해준 많은 사람들, NIH와 WHO의 재정적 지원이 없이는 불가능한 연구였음을 기억하고 감사해야한다.

폐구균은 인체병원성균이다. 따라서 안전성에 대한 우려가 있으므로 폐구균을 다루기 위한 각 국가별 실험실 안전 규정을 확인해야 한다.

다른 추가적인 질문사항이 있으면 Dr. Moon H. Nahm (nahm@uab.edu) 혹은 Mr. Robert L. Burton (robburton@uab.edu)에게 연락하면 된다

약어: **OB**B, Obsonization Buffer B; **HI**, Heat-Inactivated, **THYA**, Todd-Hewitt Yeast Agar plates; **THYB**, Todd-Hewitt Yeast Broth; **NSK**, Non-Specific Killing; **TTC**, 2,3,5,-triphenyltetrasolium chloride; **OD**, Optical Density; **HBSS**, Hanks Balanced Salt Solution; **CFU**, Colony Forming Units; **QC**, Quality Control

시험방법

제목: Bacteria Stocks

개정: 2008.2.1; 2008.6.23; 2012.9.20

1. 균주 (Bacteria) Stocks

폐구균은 인체병원성균이다. 따라서 안전성에 대한 우려가 있으므로 폐구균을 적절히 취급하는 방법에 대한 각 국가별 실험실 안전 규정을 반드시 확인하여야 한다.

A. Master Stock 유지

폐구균 stock의 본래 상태를 유지하기 위해서는 **BEI Resources**로부터 받은 **master stock**을 절대로 녹여서는 안된다. 모든 master stock vial은 -80°C 에 보관해야 한다. Assay stock을 만들려면, 냉동고에서 master stock vial을 꺼내어, 빠르게 vial 표면의 얼음을 제거하고, blood agar plate에 streaking한다 (더 자세한 사항은 아래를 참조). 이후 즉시 냉동고에 master stock vial을 넣는다.

B. Assay Stock 제조

Master stock tube로부터 많은 assay stock aliquots을 만들어서 얼려놓을 수 있다. 분주된 assay stock은 녹여서 한번의 실험에서만 사용한다. 아래의 방법은 48개의 assay stock을 만드는 방법이다. 더 많은 assay stock tube를 만들려면 사용하는 50 mL tube의 개수를 늘리면 된다. 단, 하나의 tube에서 10 mL 이상의 배양액을 취하면 안된다.

1. 냉동고에서 master stock vial을 꺼내서 vial 표면의 얼음을 빠르게 제거하고 blood agar plate에 streaking한다. **Master stock vial은 즉시 냉동고에 다시 넣는다.**
2. Plate를 거꾸로 뒤집어서 candle jar안에 넣고 37°C 에서 overnight 배양한다 (Note 13). 폐구균의 alpha-hemolytic colony는 colony 주변으로 동글게 녹색이 나타나는 것으로 확인할 수 있다.
3. 약 20개의 colony를 50mL THY 배지를 넣은 50 mL tube에 옮긴다 (Note 14). 배양액 상층 150 μL 의 OD_{600} 의 값이 0.6~0.9가 될때까지 37°C water bath에서 3-8시간 동안 배양한다.
4. 상층 10 mL를 새 50 mL tube에 옮기고, 멸균한 80% glycerol 5 mL와 새 THY 액체 배지 10 mL를 넣는다.
5. 잘 섞은 후, 0.5 mL씩 멸균한 1.5 mL microcentrifuge tube에 분주한다 (약 48개 tube). 마지막으로 분주한 tube에 표시해둔다 (나중에 순도 측정을 위해 사용할것이다).

6. 분주한 tube중 하나(마지막에 분주한 tube는 제외)를 무작위로 선택하여 **얼리지 않고** 보관하여, 얼리기 전과 후의 밀도를 측정하는데에 사용한다 (아래를 참고). 나머지 분주한 tube들은 이름을 표기한 냉동보관용 상자에 넣고, 뚜껑은 덮지 않고 -70°C 냉동고에 얼린다. Stock이 완전히 얼은 후에 (overnight으로 얼리는 것이 좋음), 적절하게 이름을 표기한 상자의 뚜껑을 덮는다. 필요시까지 -70°C에서 얼린 상태로 18개월까지 보관하여 사용할 수 있다.

C. Assay Stocks의 특성 평가

Assay stocks을 사용하기 전에, 반드시 그 특성을 평가하여야 한다. Assay stock이 아래에 기술되어 있는 허용기준을 만족시키면, 사용 가능한 것으로 허용한다.

1. 표준혈청분석방법(Quellung, agglutination, latex bead-based, ELISA 등)을 사용하여 균주의 혈청형을 확인한다.
2. 마지막으로 분주한 tube를 녹여서 blood agar plate에 10 μ L를 streaking하여 다른 미생물의 오염이 있는지 확인한다. 37°C에서 overnight 배양한 후, alpha-hemolytic pneumococcal colony만 나타나야 한다.
3. 얼려놓은 assay stock의 항생제 민감성과 저항성을 확인한다.
 - a. OBB를 준비한다.
 - b. Overlay agar를 50% power를 사용하여 전자레인지에서 녹인다 (각 균주당 180 mL정도의 overlay agar 필요). Overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어서 모든 agar 덩어리가 녹았는지 확인한다. 전자레인지를 사용하여 overlay를 녹이는 대신, 실험하는 당일 고압증기멸균(autoclave)을 하여 overlay를 준비할 수도 있다. Agar가 녹은 후, 13개의 멸균된 tube에 각각 13 mL씩 넣고, 사용할 때 까지 50°C water bath에 보관한다 (Agar의 온도가 50°C가 될 때까지 사용하지 말 것)
 - c. 작은 THYA plate (10 cm x 10 cm)를 (각 균주를 실험하는데 13개 THYA plate필요) 뚜껑을 열고 laminar flow hood안에서 30-60분 동안 말린다 (Note 4를 참고). Plate가 건조 된 후, 너무 많이 건조되는 것을 막기 위해서 뚜껑을 덮고, 상온에서 사용할 때까지 보관한다. Plate에 균주의 이름과 항생제 농도를 기입한다 (아래를 참고).
 - d. 37°C water bath에서 부드럽고 지속적으로 흔들면서, 얼린 assay stock을 빠르게 녹인다.
 - e. 균주의 계열희석은 (3회 반복실험 (triplicate)) microtiter plate를 이용해서 편리하게 준비할 수 있다.
 - i. Microtiter plate의 A행의 1열에서 3열에 균주 30 μ L와 OBB 270 μ L를 넣어 균주를 10배 희석한다. B행에서 H행의 1열에서 3열까지에 OBB 240 μ L를 채운다.
 - ii. A행의 희석된 균의 60 μ L를 취해서 B행의 OBB 240 μ L와 섞어서 5배 희석한다. 그 다음 행으로 같은 방법으로 희석하여 5배씩 총 8회 계열희석한다 (10배에서 7.8 x 10⁵배까지)

- f. THYA plate에 3개 열의 각 희석된 균주를 10 μ L씩 spotting한다 (13개 plate 필요)
- g. Spotting한 액이 agar에 흡수될 때까지 상온에서 10-20분 정도 방치한다.
- h. Water bath에서 overlay tube를 꺼내서 TTC 13 μ L를 넣고, 13개 THYA plate 중 하나에 overlay 12 mL를 넣는다. (No antibiotic control)
- i. Overlay tube 3개를 water bath에서 꺼내어 TTC 13 μ L를 각각 넣는다. 3개의 tube 중 하나에 optochin 6.5 μ L를 넣고, 13개 THYA plate중 하나에 overlay 12 mL를 넣는다 (0.5X optochin plate). 두번째 tube에 optochin 13 μ L를 넣고 13개 THYA plate중 하나에 overlay 12 mL를 넣는다 (1X optochin plate). 세번째 tube에 optochin 26 μ L를 넣고 13개 THYA plate중 하나에 overlay 12 mL를 넣는다 (2X optochin plate).
- j. Overlay tube 3개를 water bath에서 꺼내서 thrimethoprim에 대해 위와 같이 반복한다.
- k. Overlay tube 3개를 water bath에서 꺼내서 streptomycin에 대해 위와 같이 반복한다.
- l. Overlay tube 3개를 water bath에서 꺼내서 spectinomycin에 대해 위와 같이 반복한다.
- m. Overlay를 모두 넣은 후, 13개 plate는 아래와 같다.

Plate #	Antibiotic
1	No antibiotic
2	optochin, 0.5X
3	optochin, 1X
4	optochin, 2X
5	spectinomycin, 0.5X
6	spectinomycin, 1X
7	spectinomycin, 2X

Plate #	Antibiotic
8	streptomycin, 0.5X
9	streptomycin, 1X
10	streptomycin, 2X
11	trimethoprim, 0.5X
12	trimethoprim, 1X
13	trimethoprim, 2X

- n. Overlay를 한 후, plate를 37°C candle jar에서 overnight 배양한다 (Note 13)
 - o. Colony 개수를 센다
 - p. 항생제를 넣지 않은 control plate (no antibiotic control)에서, 50-150 CFU/spot을 나타내는 균주희석배수에 대한 triplicate의 평균값을 계산한다. 항생제가 있을 때의 CFU/spot을 항생제가 없을 때의 CFU/spot과 비교하여 항생제 각 농도에 대한 균주의 민감성을 결정한다. 균주는 해당하는 항생제의 2X assay 농도에서 저항성이 있어야 하고 (항생제가 없는 plate에 비해서 CFU/spot이 20% 보다 적게 감소), 0.5X assay 농도 에서 다른 항생제에 대하여 민감성이 있어야 한다 (항생제가 없는 plate에 비해서 95% 보다 많이 감소).
4. Assay stock의 적절한 희석배수를 결정한다. UAB-MOPA assay에서 균주로 사용하기 이전에, THYA plate에서 약 120 CFU/spot을 나타내는 각 assay stock의 희석배수를 결정하기 위해 실험조건을 설정해야 한다.
- a. OBB를 준비한다.
 - b. Overlay agar를 전자레인지에서 50% power로 녹인다 (12개 균주에 대해 150mL면 충분함). Overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어서 모든 agar 덩어리가

녹았는지 확인하고, 50°C water bath에 사용할 때까지 보관한다 (50°C로 agar의 온도가 될 때까지 사용하지 않는다). Overlay는 전자레인지에서 녹이지 않고, 실험당일 고압증기멸균을 해서 준비할 수도 있다.

- c. 작은 THYA plate (10 cm x 10 cm)의 뚜껑을 열고 laminar flow hood안에서 30-60분간 건조시킨다 (각 균주 당 1개의 plate 필요) (Note 4 참고). 건조된 플레이트는 지나치게 건조 되는 것을 막기 위해, 뚜껑은 닫은 후 상온에 사용할 때까지 보관한다.
- d. 새 microtiter plate에 OBB 20 μ L를 16개 well(2개 열 전체)에 넣는다 (assay에 사용할 20 μ L의 test serum 대체). 이것이 assay plate이다.
- e. 분화된 HL60 세포를 준비한다.
 - i. DMF에 의해 분화된 HL60 세포(분화 5일 혹은 6일째)를 culture flask에서 50 mL centrifuge tube로 옮긴다 (12개 strain까지는 1개 flask면 충분함).
 - ii. HL60 세포를 350g (Sorvall RT7에서 RTH-250 rotor로 사용할때는 1200 rpm), 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - iii. 상등액을 버리고 cell pellet을 1X HBSS (**without** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL에 합한다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - iv. 상등액을 버리고 cell pellet을 1X HBSS (**with** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL에 합한다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - v. 상등액을 버리고 1x10⁷ cells/mL가 되도록 opsonization buffer B를 넣어 resuspend한다 (**사용할 때까지 상온에 세포를 보관한다**). 살아있는 세포를 계수하는 방법은 "세포계수" 방법을 참고한다.
 - vi. 세포를 셀 때, trypan blue를 사용하여 viability를 결정한다. 살아있는 세포의 숫자와 죽은 세포의 숫자를 기록한다. 실험에 사용될 수 있는 Cell viability의 허용기준은 90%이상이어야 한다.
- f. 얼려놓은 assay stock을 빠르게 녹이고 균을 세척한다.
 - i. Tube를 녹을때까지 37°C water bath에서 부드럽게 흔든다.
 - ii. Microcentrifuge에서 12,000g, 2분간 원심분리한다.
 - iii. 상등액을 조심스럽게 제거한다.
 - iv. OBB를 1 mL 넣고 섞는다
 - v. Microcentrifuge에서 12,000g, 2분간 원심분리한다.
 - vi. 상등액을 조심스럽게 제거한다.
 - vii. 균 pellet에 OBB를 원래 채워져 있던 부피만큼 (0.5 mL) 넣어서 suspension 한다.
- g. 여러 개의 균주의 희석은 아래와 같은 방법으로 새 microtiter plate에서 할 수 있다. (희석 plate)
 - i. Plate의 A1, A2 well에 OBB 135 μ L와 녹은 균주 15 μ L를 넣고 섞어서 균주를 10배 희석한다. B행에서 H행의 1,2열에 OBB 120 μ L씩 각 well에 넣는다.
 - ii. A행에서 30 μ L를 B행으로 옮겨서 섞는 방법으로 5배 희석한다. H행까지 같은 방법으로 8번 계열희석한다 (10배에서 7.8 x 10⁵배까지).

- h. 희석 plate의 1열에 있는 희석된 균주 10 μ L를 assay plate로 옮긴다. 2열에 대해서도 동일하게 반복한다.
- i. Plate를 상온에서 30분 동안 mini-orbital shaker에서 700 rpm으로 흔들면서 배양한다.
- j. 배양하는 동안, 냉동고에서 적당한 양 (각 균주당 0.3 mL 정도)의 보체를 꺼내서 상온에 두고 녹인다(보체가 완전히 녹은 후, **즉시** 얼음에 넣고 사용시까지 보관한다).
- k. 30분간 배양한 후, HL60세포 1 mL와 보체 0.25 mL를 섞은 HL60/보체 혼합액을 (각 균주를 시험하기 위한 양).
- l. Plate의 각 well에 HL60/균주 혼합액을 50 μ L씩 넣는다 (16 wells/균주)
- m. Plate를 mini-orbital shaker를 이용하여 5% CO₂ 가 있는 37°C에서 배양기에서 45분 동안 흔들면서 배양한다. 이 때, plate는 한 층으로만 한다 (plate를 여러층으로 쌓지 말 것). 배양하는 동안 CO₂ level을 유지시키기 위해서 배양기의 문을 열지 않는다.
- n. 배양이 끝난 후에, plate를 얼음 위에 20분간 두어 phagocytic process를 종료시킨다.
- o. Multi-channel pipette을 사용해서 각 well의 용액을 잘 섞어준 후, 8 well column에서 각각 10 μ L씩 취해서 THYA plate의 왼쪽 편에 8개의 10 μ L spot을 찍는다. **즉시**, plate를 기울여서 2-3 cm 정도 길이의 작은 줄 모양으로 흘러준다. 두번째 8 well column을 THYA plate의 중앙에 spotting한다. **함께 흘러가지 않도록 하기 위해서 spotting한 즉시 plate를 기울여 흘러주어야 한다.**
- p. THYA plate를 상온에서 10-20분 동안 용액이 agar로 흡수되도록 방치한다.
- q. Water bath에서 overlay를 꺼내서 TTC 150 μ L를 넣는다. 각 plate에 overlay를 12 mL씩 넣는다.
- r. Agar가 굳을 때까지 상온에서 20분정도 방치한다.
- s. Candle jar에 plate를 거꾸로 하여 37°C에서 overnight incubation한다(Note 13).
- t. Colony의 개수를 세고 2회반복실험(duplicate)의 평균값을 구한다.
- u. Spot당 적합한 colony개수를 나타내는 적절한 희석배수를 결정한다 (70-180 CFU/spot). 아래의 예에서는 적절한 희석배수는 약 3000배 이다 (1250배 희석은 colony 숫자가 너무 많고, 6250배 희석한 경우는 colony개수가 너무 적음)



5. 뒤에 기술한 UAB-MOPA protocol을 사용하여 assay stock의 performance를 결정한다. 위에서 결정된 적절한 희석배수를 사용하여, 각 assay stock은 적어도 2개의 QC 혈청으로 적어도 3회 시험해야 한다. QC 혈청은 이전에 검증된 assay stock으로 여러 번 반복해서 실험했던 것을 사용해야 한다(30회 이상의 독립적인 실험이 바람직함).

D. Bacteria Assay Stock의 허용기준

UAB-MOPA에 균주 assay stock으로 사용하기 위해서는 다음의 기준을 만족해야 한다.

1. 마지막으로 분주한 stock을 blood agar plate에 streaking해서 overnight 배양했을 때, 오염이 없어야 한다.
2. 혈청형은 quellung, multibead assay, ELISA 등으로 확인되어야 한다.
3. 해당하는 항생제에 대해서만 저항성이 있고, 다른 3개의 항생제에는 민감성을 가져야 한다. 적합한 항생제에 대해 2X assay 농도에서 저항성이 있어야 하고, 적합한 항생제에 대해 0.5X assay 농도에서 민감성이 있어야 한다.
4. Assay 희석배수는 1000 이상이어야 한다 (3번 혈청형에 대해서는 500 이상이면 된다).
5. 새로운 assay stock으로 시험했을 때, 적어도 2개의 QC 혈청(UAB-MOPA로 적어도 3회 시험)의 평균 opsonic index가 이전 assay stock으로 결정된 범위 ($\text{mean} \pm 2\text{SD}$)안에 들어야 한다.

제목: HL60 세포

개정: 2008. 2. 1; 2008. 5. 28.

2. HL60 세포

HL60 세포는 human cell line이므로 생물안전성을 고려해야 한다. Human cell line의 취급에 대한 각 국가별 실험실 안전 규정을 확인해야 한다. HL60 세포를 배양하기 이전과 배양 중에 주기적으로 배양기의 CO₂ level과 습도가 적절한지 확인한다 (Note 6). CO₂ level을 외부 reference (예, FYRITE® Gas Analyzer, Bacharach(Pittsburgh, PA)제조)를 사용해서 확인해야 한다. 물을 넣는 팬을 항상 가득 채워놓아 적절한 습도를 유지한다. 적절한 습도는 두 가지 이유에서 매우 중요하다. 첫째, 적절한 습도는 세포 배양액과 assay plate의 증발을 최소화하게 한다. 둘째, 어떤 배양기는 CO₂ sensor가 적합한 기능을 하기 위해서 적절한 습도가 필요하다.

A. Master Cell Bank 생산

ATCC에서 cell stock vial을 받으면, stock vial을 녹이고 키운후 얼려서, stock tube에서 직접 60개 tube정도의 master cell bank를 생산해야 한다. Master cell bank의 확장과 생산 동안, 세포의 질을 보장하기 위해서는 세포배양 조건을 적합하게 유지하는 것이 중요하다. 적합한 배양조건 유지는 CO₂ level의 확인 (Note 6), 5×10^5 cells/mL 이하로 세포의 밀도 유지, 적절한 습도유지를 포함한다 (Note 6). 세포를 얼리기 위해서는 controlled-rate freezer system (예, Cryomed system from Thermo-Forma)을 사용하는 것을 권고한다. 어떤 system을 사용하던지, 전체 동결과정 동안 샘플

의 온도는 1분당 약 1°C씩 내려가야 한다.

1. 15mL centrifuge tube에 CM3 10 mL를 넣는다.
2. 얼려있는 HL60 세포를 37°C water bath에서 빠르게 녹인 후 10 mL CM3가 들어있는 centrifuge tube에 넣는다.
3. 세포를 상온에서 350g로 5-10분간 원심분리한다. (Sorvall RT7, RTH-250 rotor사용시 1200 rpm). 상등액을 최대한 제거한다(Note 5).
4. CM3 (배지의 양은 ATCC에서 받은 lot-specific information에 나와있음)로 cell pellet을 suspend하여 필요한 수 만큼의 세포를 150 cm² flask로 옮긴다 (Flask당 70 mL 이하). Flask를 세포배양기에 눕혀서 넣는다 (37°C, 5% CO₂, Note 6 참고)
5. 3-4일 후에 새로운 CM3 50 mL정도를 flask에 넣는다. 하나의 150 cm² flask에 120 mL가 넘지 않도록 한다. 필요한 배지의 양이 120 mL가 넘을 때에는 여러 개의 flask를 사용한다.
6. 혈구계(hemocytometer)를 사용하여 세포의 밀도를 확인한다. 세포 밀도가 5 x 10⁵ cells/mL가 되면, 새로운 CM3를 넣어서 2 x 10⁵ cells/mL이 되도록 해준다. 하나의 150 cm² flask에 120 mL가 넘지 않도록 한다. 필요한 배지의 양이 120 mL가 넘을 때에는 여러 개의 flask를 사용한다.
7. 120 mL의 배지에 5 x 10⁵ cells/mL의 세포가 있는 flask가 10개 정도 되면(보통 ~3주), 세포를 얼린다.
 - a. Freezing medium을 준비한다.
 - i. 35 mL FBS (56°C에서 30분간 heat inactivation하여 사용)
 - ii. 7 mL DMSO
 - iii. 28 mL RPMI1640
 - b. 모든 flask안의 배지를 50 mL centrifuge tube로 나누어 옮긴다 (약 24개 tubes). 무균여부를 측정하기 위해 1-2 mL정도의 세포는 남겨놓는다
 - c. Tube를 350g에서 5분간 원심분리한다 (Sorvall RT7, RTH-250 rotor 사용시 1200 rpm).
 - d. 상등액을 최대한 제거하여 버린다.
 - e. 50 mL centrifuge tube에 각각 freezing medium 2.5 mL를 넣고 cell pellet을 부드럽게 resuspend한다. 모든 24개 tube의 세포를 하나의 150 cm² flask로 합한다 (총 부피는 약 60 mL).
 - f. Freezing medium에 들어있는 세포를 1 mL씩 각 vial에 분주한 후 (각 vial에 약 10⁷cell이 들어 있어야 한다), 얼음 위에 놓는다.
 - g. 한 개를 제외한 나머지 모든 cryovial을 controlled-rate freezer에 넣고 freezing program을 시작한다(한 개의 vial을 미생물 오염확인을 위해 사용). Sample의 온도는 분당 약 1°C정도로 떨어져야 한다.
 - h. Freezing이 끝나면, cryobiological storage system (liquid nitrogen storage system)으로 cryovial을 옮긴다.
8. 7b에서 남겨놓은 소량의 cell로는 standard tissue culture mycoplasma screening

techniques을 사용하여 mycoplasma 오염여부를 확인한다. Blood agar plates에 streaking해서 다른 미생물의 오염도 확인해야 한다.

B. Working cell culture의 시작

실제 사용할 effector cell의 완전성을 유지하기 위해서는 master cell bank에서 새로운 cell vial을 3-4개월 마다 녹여야 한다.

1. 15 mL centrifuge tube에 CM3 10 mL를 넣는다.
2. Master cell bank cryovial 한 개를 액체질소저장탱크에서 꺼낸다. 37°C water bath에서 부드럽게 흔들어서 빠르게 녹인다. 녹은 cell을 10 mL CM3가 들어있는 centrifuge tube에 넣는다.
3. 350g, 상온에서 5-10분간 원심분리한다(Sorvall RT7, RTH-250 rotor 사용시 1200 rpm). 상등액을 최대한 제거한다 (Note 5).
4. CM3 70mL 로 cell pellet을 suspend하여 150 cm² flask로 옮긴다. Flask를 세포배양기에 눕혀서 넣는다 (37°C, 5% CO₂, Note 6)
5. 3-4일 후에 CM3 50 mL를 넣어준다.
6. 매 3-4일마다, 50 mL의 세포를 꺼내서 버리고 새로운 CM3 50 mL를 넣어준다.
7. 2주정도 배양한 후에, 세포를 CM1으로 키우기 시작한다 (3-4일마다 50 mL의 세포를 버리고 새로운 CM1을 넣어준다)
8. 세포를 적어도 3-4주 키운 후, 아래의 일정과 같이 규칙적으로 계대/증식시킨다. 수요일이나 금요일에 시작하는 것이 좋다. 수요일에 하게 된다면, 세포를 세고, **이전** 세포배양액(old culture medium)에서 약 8x10⁵ cells/mL가 되도록 맞추고, T150 flask당 40 mL씩 세포를 분주한 후 새로운 CM1 80 mL를 넣어준다. 금요일에 하게 된다면, 세포를 세고, **이전** 세포배양액에서 약 8x10⁵ cells/mL가 되도록 맞추고, T150 flask당 20 mL씩 세포를 분주한 후 새로운 CM1 60 mL를 넣어준다.
9. 아래와 같은 일정으로 증식시킨다.

C. Working Cell Culture의 증식

이 방법은 일주일에 2번까지 세포를 분화시킬 수 있도록 고안되어 있다. 이 방법은 세포배양시 계대번호를 보존하는 것을 돕는다. 수요일에 분화시킨 세포는 다음주 월요일과 화요일 실험에 사용할 수 있다(분화 5일째와 6일째). 금요일에 분화된 세포는 다음주 수요일과 목요일 (각각 분화 5일째와 6일째)에 사용할 수 있다. 6일 이후에 세포는 버려야 한다.

월요일: CM1 40 mL를 150 cm² flask에 넣어 최종 120 mL가 되게 한다 (이전에 80 mL가 있는 상태여야 함). 세포농도는 약 3x10⁵ cells/mL이어야 한다.

수요일: flask를 흔들어서 세포가 잘 섞이게 한 후, 각 flask에서 80 mL를 꺼낸다 (40 mL를 남김). 꺼낸 세포들을 합해서 아래와 같이 분화시키는데 사용하고(아래 참조), 필요없는 세포는 버린다. Flask에 남아있는 세포에는 CM1 80 mL를 넣어 최종 120 mL정도가 되

게 한다. Flask를 다시 세포배양기에 넣어 계속 증식시킨다. 세포의 농도는 이제 약 3×10^5 cells/mL이어야 한다.

금요일: 세포가 잘 섞이도록 flask를 흔들어 준 후, 20 mL만 남기고 모두 꺼낸다 (flask당 약 100 mL정도 제거). 꺼낸 세포들을 모두 모아서 아래와 같이 분화시키는데 사용하고, 필요없으면 버린다. 각 flask에 남은 세포에 CM1 60 mL를 넣어 최종 80 mL/flask가 되게 하고, 다시 세포배양기에 넣어 계속 증식시킨다. 세포의 농도는 이제 약 2×10^5 cells/mL이어야 한다.

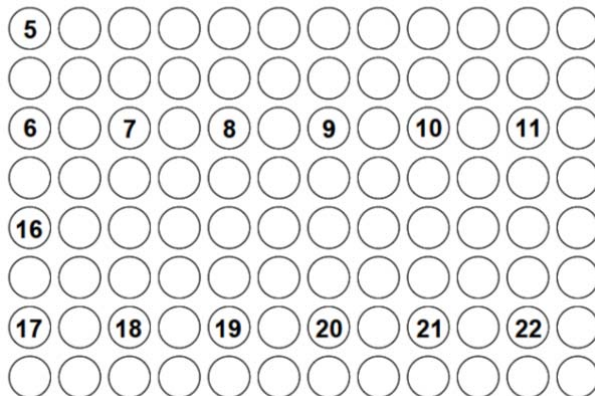
D. HL60 세포의 분화

1. HL60 세포를 350g로 상온에서 5분동안 원심분리한다(Sorvall RT7, RTH-250 rotor 사용시 1200 rpm). 상등액을 모두 제거한다(항생제는 완전히 제거해야 한다).
2. CM2(0.8% DMF함유)에 cell pellet을 부드럽게 re-suspend하고 세포의 개수를 세어 농도를 약 4×10^5 cells/mL로 맞춘다.
3. 150 cm² flask에 cell suspension 100mL씩 넣는다.
4. 세포배양기에 플라스크를 눕혀서 5-6일 동안 flask를 배양한다 (37°C, 5% CO₂, Note 6 참고). 이 기간 동안은 배지를 바꿔주지 않는다. 6일 이내에 사용하지 않은 세포는 버린다.
5. 4개 플라스크는 7개의 opsonization assay microtiter plate를 실험하는데 충분한 정도의 양이다 (HL60:bacteria=200:1)

E. HL60 세포의 표현형 결정

HL60 세포의 표현형을 2-4주에 한번씩, 만약 QC 혈청의 결과에 변화가 있다면 (낮은 titer, 불완전한 killing 등) 더 자주 시험할 것을 권장한다. 또한, 분화된 세포와 분화되지 않은 세포 둘 다 FACS로 분석할 것을 권장한다. 분화되지 않은 세포는 대조군으로 사용될 것이다.

1. 4개의 15 mL centrifuge tube에 각각 A, B, C, D라고 표기한다. 22개의 FACS tube에 1번부터 22번까지 번호를 매긴다. 또한 96 well V-bottom plate의 14개 well에 아래와 같이 표시한다 (well에 표시된 숫자는 세포를 plate에서 FACS tube로 옮길 때 FACS tube에 표기된 숫자와 동일하다)



- HL60 세포가 들어있는 플라스크를 흔들어 섞은 뒤, 세포의 숫자를 센다. 분화된 세포와 분화되지 않은 세포를 둘 다 시험하는 것을 권장한다.
- 아래와 같이 각 tube에 해당량의 세포를 옮겨 담는다 (분화된 세포는 3 mL정도, 분화되지 않은 세포는 4 mL 정도에 2×10^6 cells를 포함하고 있다).

Tube	Sample	Intended Use	# Cells Needed
A	Undifferentiated Cells	Surface Markers	2×10^6
B	Undifferentiated Cells	Viability by FACS	1×10^6
C	Differentiated Cells	Surface Markers	2×10^6
D	Differentiated Cells	Viability by FACS	1×10^6

- Tube B와 D는 상온에서 필요할 때까지 둔다.
- Tube A와 C를 350g, 4°C에서 5분간 원심분리 한다.
- 세포를 원심분리하는 동안, 항체의 희석을 준비한다. Note 15 참고 (희석한 항체를 빛을 차단하여 4°C에서 필요할 때까지 보관한다.)

	Volume (microliters)	
	Antibody	FACS buffer
CD11b PE	6	24
CD35 PE	3	27
CD71 PE	3	27
IgG1 Isotype PE (1/5)	6	24
IgG1 Isotype PE (1/80)	1	79
IgG2a Isotype PE	2	32

- Tube A와 C에서 상등액을 제거한다.
- Tube A와 C에 FACS buffer 10 mL를 넣고, 350g, 4°C에서 5분간 원심분리한다.
- Tube A와 C에서 상등액을 제거하고, cell pellet을 FACS buffer 1 mL로 suspend한다.
- Tube A의 cell suspension 을 50 μ L씩 위에서 준비한 96well plate의 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11번 well에 넣는다. Tube C의 cell suspension은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22번 well에 50 μ L씩 넣는다.
- 희석한 CD11bPE 10 μ L를 6번과 17번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 희석한 CD35PE 10 μ L를 7번과 18번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 희석한 CD71PE 10 μ L를 8번과 19번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 희석한 IgG1 PE Isotype (1/5 희석) 10 μ L를 9번과 20번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 희석한 IgG1 PE Isotype (1/80희석) 10 μ L를 10번과 21번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 희석한 IgG2a PE Isotype (1/80희석) 10 μ L를 11번과 22번 well에 넣고 부드럽게 섞는다(well과 well사이에는 tip을 바꿔준다).
- 5번과 16번 well에는 아무것도 넣지 않는다. 이 well들은 염색하지 않은 대조군 (unstained control well)이다.
- 빛을 차단하여 4°C에서 30분 동안 incubation한다.

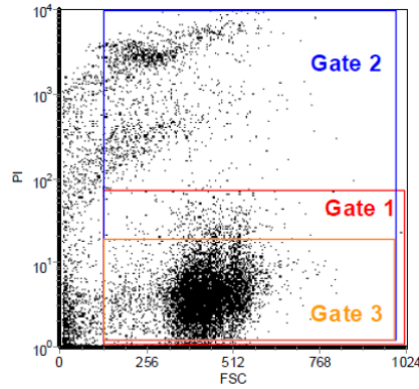
19. 각 well에 FACS buffer를 150 μ L씩 넣고 plate를 350g, 4°C에서 5분간 원심분리 한다.
20. 각 well에서 상등액을 제거한다. 이때 well간에 서로 섞이지 않도록 각 well을 서로 다른 tip을 사용한다.
21. Cell pellet을 FACS/PI buffer 250 μ L로 suspend한다.
22. Pipet tip을 각각 바꿔서 사용하여, 5번 well의 용액을 5번 FACS tube로, 6번 well의 용액을 6번 FACS tube로 옮겨서 모든 well의 모든 용액이 FACS tube로 옮겨지게 한다. 필요할 때까지 빛을 차단한 상태에서 FACS tube을 4°C에서 보관한다 (2시간 이내에 분석).
23. 차가운 1X PBS를 10 mL까지 넣어 tube B와 D의 과정을 시작한다.
24. Tube B와 D를 350g, 4°C에서 5분간 원심분리한다. 1X Annexin V binding buffer 57 μ L에 PI stock solution 3 μ L를 넣어서 50 μ g/mL의 PI solution을 준비한다. 빛을 차단한 상태로 필요할 때까지 상온에서 보관한다.
25. Tube B와 D의 상등액을 제거한다.
26. 차가운 1X PBS 10 mL를 tube B와 D에 넣고 350g, 4°C에서 5분간 원심분리한다.
27. Tube B와 D의 상등액을 제거하고, cell pellet을 1X Annexin V binding buffer 1 mL로 suspend한다.
28. Tube B의 cell suspension을 100 μ L씩 1, 2, 3, 4번 FACS tube에 넣는다. Tube D의 cell suspension을 12, 13, 14, 15번 FACS tube에 100 μ L씩 넣는다.
29. 2번과 13번 FACS tube에 Annexin V FITC를 5 μ L씩 넣는다.
30. 3번과 14번 FACS tube에 희석된 PI를 10 μ L씩 넣는다.
31. 4번과 15번 FACS tube에 Annexin V FITC 5 μ L와 희석된 PI 10 μ L를 넣는다.
32. 1번과 12번 FACS tube에는 아무것도 넣지 않는다. 이 둘은 unstained control이다.
33. 빛을 차단한 상태로 15분간 상온에서 incubation한다.
34. 1-4번, 12-15번 FACS tube에 1X Annexin V binding buffer 300 μ L를 넣는다. Flow cytometer로 샘플을 분석할때까지, 차광하여 FACS tube를 상온에서 보관한다 (1시간 이내에 분석).

Assay tube summary:

Cell Type	Description	Buffer	FACS Tube #
Undifferentiated	Unstained	AV Binding Buffer	1
	Annexin V FITC	AV Binding Buffer	2
	PI	AV Binding Buffer	3
	Annexin V FITC, PI	AV Binding Buffer	4
	Unstained	FACS/PI Buffer	5
	CD11b PE	FACS/PI Buffer	6
	CD35 PE	FACS/PI Buffer	7
	CD71 PE	FACS/PI Buffer	8
	IgG1 PE Isotype, 1/5 (isotype control for CD11b)	FACS/PI Buffer	9
	IgG1 PE Isotype, 1/80 (isotype control for CD35)	FACS/PI Buffer	10
	IgG2a PE Isotype, 1/17 (isotype control for CD71)	FACS/PI Buffer	11
Differentiated	Unstained	AV Binding Buffer	12
	Annexin V FITC	AV Binding Buffer	13
	PI	AV Binding Buffer	14
	Annexin V FITC, PI	AV Binding Buffer	15
	Unstained	FACS/PI Buffer	16
	CD11b PE	FACS/PI Buffer	17
	CD35 PE	FACS/PI Buffer	18
	CD71 PE	FACS/PI Buffer	19
	IgG1 PE Isotype, 1/5 (isotype control for CD11b)	FACS/PI Buffer	20
	IgG1 PE Isotype, 1/80 (isotype control for CD35)	FACS/PI Buffer	21
	IgG2a PE Isotype, 1/17 (isotype control for CD71)	FACS/PI Buffer	22

Data 분석

1. FSC 대 FL3(PI) dot plot에서 아래와 같이 3개의 Gate를 만든다. Gate 1은 분화되지 않은 세포의 surface marker 분석에, Gate 3은 분화된 세포의 surface marker 분석에 사용되고, Gate 2는 두가지 세포 모두의 viability 분석에 사용될 것이다.

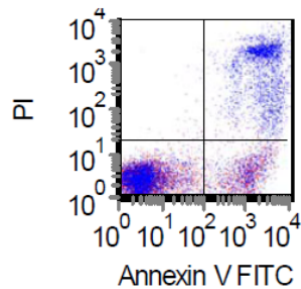


2. Surface marker 분석:

- a. 분화되지 않은 세포와 분화된 세포에 대해 7개의 FL2 histogram을 생성한다. (각각 unstained, CD11b, CD35, CD71, IgG1 Isotype 1/5, IgG1 Isotype 1/80, IgG2a Isotype)
- b. 각 histogram에 적합한 data file을 삽입하고, 분화되지 않은 세포에 대해서는 Gate 1을, 분화된 세포에 대해서는 Gate 3을 histogram에 gating한다.
- c. 적합한 isotype에 대해 positive한 세포가 약 1%가 되도록 marker(M1)을 생성한다.
- d. M1을 사용하여 각 surface marker에 대해 positive한 세포 (분화되지 않은 세포와 분화된 세포)의 퍼센트를 기록한다.

3. Viability 분석

- a. 분화되지 않은 세포와 분화된 세포에 대해서 각각 두 개의 FSC 대 FL2 dot plot을 만든다 (unstained와 AnnexinV/PI를 위해 각각 한개씩). Note: Annexin V로만 염색된 세포와 PI로만 염색된 세포가 있는 FACS tube는 data를 얻는 과정에서 compensation을 보정하는데에 사용될 것이고 분석을 위해서는 사용하지 않는다.
- b. 적합한 data file을 각각의 dot plot에 넣고, Gate 2로 dot plot을 gating한다.
- c. 아래와 같이 quadrant를 생성한다.



- d. 오른쪽 상단부분 (AnV+/PI- necrotic cells)과 오른쪽 하단부분 (AnV+/PI+ apoptotic cells)의 positive한 세포의 퍼센트를 기록한다 (unstained는 0%정도 이어야 한다). 왼쪽 상단의 퍼센트는 0%정도 이어야 한다.

F. HL60 세포의 허용기준

HL60 세포의 master cell bank는 아래의 기준을 만족해야 한다.

1. Mycoplasma를 포함하여 미생물의 오염이 검출되어서는 안된다.
2. 배양된 세포는 참고문헌 4 (R.Fleck, et al)에 기술되어있는 것과 같이 현미경상에서 보여야한다.
3. 제공된 곳으로부터 받은 문서가 적절하게 잘 유지되어야 한다.

분화된 HL60 세포는 아래의 기준을 만족시켜야 UAB-MOPA시험에 사용될 수 있다.

1. 배양된 세포는 참고문헌 4 (R.Fleck, et al)에 기술되어있는 것과 같이 현미경상에서 보여야한다.
2. Viability는 $\geq 90\%$ (trypan blue) 또는 $\geq 65\%$ (propidium iodide)이어야 한다.
3. CD35는 55%이상의 세포에서 발현되어 있어야 한다.
4. CD71은 20%이하의 세포에서 발현되어 있어야 한다.
5. Annexin V+/PI-로 나타나는 apoptotic cell은 25%이하여야 한다.

제목: 검체 시험

개정: 2008. 2. 1; 2008. 6. 23; 2013. 9. 20.

3. 검체 시험

UAB MOPA assay를 하기 이전에, 검체는 살균제 (대부분이 항생제)와 열불활성화 (내생 보체의 활성 파괴를 위한 heat-inactivation)에 대해 검사해야 한다.

A. 검체 수집

UAB-MOPA에는 혈청(혈장이 아님)을 사용한다. 인혈청을 취급하기 위한 각 국가별 실험실 안전 규정을 확인한다.

B. 검체의 보관

한달 미만의 단기간 보관은 4°C에서 한다. 그렇지 않으면 검체는 -80°C에서 보관해야 한다. 검체를 옮길때에는 검체기록대장에 이러한 정보를 반드시 기입하여야 한다.

C. 열불활성화 (Heat inactivation)

이 과정은 UAB-MOPA 시험을 하기 이전에 수행할 수 있다.

1. -80°C 냉동고에서 검체를 꺼내서 상온에 방치한다.
2. Water bath의 온도를 56°C로 맞춘다.
3. 검체가 완전히 녹은 후, 검체를 완전히 섞고 56°C water bath에서 30분 동안 incubation한다.

4. 검체를 water bath에서 꺼내서 상온이 되도록 식힌다.
5. 30일 이내로 검체를 보관할 때는 4°C에서, 장기간 보관시에는 -80°C에서 보관한다.

D. 살균제(항생제)에 대한 검체 시험

채혈하는 기간동안 항생제 치료를 받은 피험자가 있을 수 있기 때문에, 각 혈청은 항생제 유무를 검사해야 한다. 다른 방법으로, MOPA 시험이 다양한 혈청형을 포함하는 경우, 적어도 하나의 혈청형에서 titer가 측정되지 않는 검체에 대해서만 항생제 검사를 할 수 있다.

1. 위의 UAB-MOPA assay stock의 준비에서 설명한 방법대로 R36A 균주의 frozen stock을 준비한다. 이 과정은 미리 해놓을 수 있다.
2. 전자레인지에 overlay agar를 50% power로 녹인다 (12개 혈청에 13 mL이면 충분함). Overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어서 모든 agar 덩어리가 녹은 것을 확인하고, 50°C water bath에 필요할 때까지 둔다. 다른 방법으로, 전자레인지에 녹이는 것 대신, overlay는 실험하는 날 고압증기멸균(autoclave)해서 준비할 수도 있다.
3. Laminar flow hood안에서 THYA plate의 뚜껑을 열고 30-60분간 건조시킨다 (12개 혈청까지는 1개 THYA plate가 필요하다) (Note 4 참고). 플레이트를 건조시킨 후, 너무 많이 건조되지 않도록 뚜껑을 덮고 상온에서 필요할 때까지 둔다.
4. R36A stock vial을 37°C water bath에서 계속 흔들면서 녹인다.
5. Cotton-tipped applicator(면봉)의 끝을 균주액(bacteria suspension)에 담고 THYA plate 전체에 streaking한다 (Note 8참고). 플레이트 전체 표면에 streaking한 후, 플레이트를 45° 각도로 돌리고 플레이트 전체 표면을 streaking하고, 다시 플레이트를 45° 각도로 돌리고 플레이트 전체 표면을 streaking한다.
6. 5-10분 동안 흡수되도록 둔다.
7. THYA plate에 희석하지 않은 혈청 5 µL를 spotting한다. 각 spot사이는 2-3 cm정도 띄운다. 만약 혈청의 양이 부족하면, 2배 혹은 4배 희석한 혈청을 5 µL spotting한다. 적어도 2 cm의 간격으로 12개 혈청까지 각 THYA plate에 spotting할 수 있다.
8. 혈청이 완전히 흡수되도록 둔다.
9. TTC 25 µg/mL를 포함하는 overlay (50°C 정도) 12 mL를 넣는다.
10. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 overnight incubation한다.
11. 희석되지 않은 혈청을 사용했을 경우 혈청이 spotting된 곳 주변에 균의 성장이 저해된 것(일반적으로 inhibition zone은 1 cm 이상임)이 항생제가 존재한다는 표시이다. 항생제가 있는 검체는 항생제의 불활성화 혹은 제거 후에 분석되어야 한다.

E. QC Serum Pool의 생산

혈청형별로 opsonization index가 높은 것부터 낮은 것까지 여러 개의 QC 혈청을 각 assay마다 포함시키는 것이 바람직하다. Pool이 준비되면 어떤 방부제도 (sodium azide를 포함하여) 넣지 않아야 한다.

혈청 pool은 분주해서 얼려서 보관해야 한다. 분주한 한 개의 vial을 녹인 후에는 한달까지 4°C에

서 보관할 수 있지만, 다시 얼리면 안된다.

한명에게서 제공된 혈청 (single donor serum)이 아래의 조건을 만족하면 혈청 pool의 고려대상이 될 수 있다:

- 항생제를 포함하지 않아야 한다.
- 보고자 하는 혈청형에 대해 불규칙한 killing curve를 나타내지 않아야 한다.
- 가능하면 분석해야 하는 검체와 나이가 비슷해야 한다 (유아, 성인, 노인 등).
- 가능하면 분석해야 하는 검체와 사용한 백신이 비슷해야 한다 (polysaccharide, conjugate 등).
- 5명의 제공자(donor)로부터 준비된 한 개의 pool이 2-3년 동안 사용하기에 충분한 양이 되도록, single donor serum의 양이 충분해야 한다.
- Sodium azide 혹은 다른 방부제가 없어야 한다.
- 감염성 질환의 marker (HIV-1과 -2, HTLV-1과 -2, Hepatits B와 C, West Nile Virus, Chagas, Syphilis)에 대해 음성이어야 한다.

제목: 보체 (Complement)

개정: 2008.2.1; 2008.5.28; 2008.6.23; 2009.9.1; 2011.11.1

4. 보체

보체는 열에 매우 민감하다. 따라서 보체를 다루고, working aliquots을 준비할 때, 매우 주의를 기울여야 한다. 제조사로부터 stock bottle (100 mL)이 도착하면, stock bottle이 얼어있는 상태이고 운송된 상자 안에 dry ice가 여전히 남아있는지를 확인해야 한다 (만약 아닐 경우, 즉시 제조사에 연락해야 한다). 보체가 들어있는 병을 -80°C 냉동고로 빠르게 옮긴다.

일반적 조언:

- 보체는 얼음 위에서나 찬 물이 있는 water bath에서 녹인다. 절대로 따뜻하거나 뜨거운 물에서는 녹이지 않아야 한다.
- 보체는 -80°C 냉동고의 문에서 멀리 떨어진 안쪽에서 보관한다.
- Working aliquot을 녹인 후에는 다시 얼리지 않고 버린다.

보체의 효능과 non-specific killing은 보체의 제조단위(lot)마다 상당히 큰 차이를 나타낸다. 따라서 사용될 제조단위는 주의깊게 검사하는 것이 필요하다. CH50 assay를 사용해서 검사할 수 있지만, 궁극적으로는 시험대상이 되는 모든 혈청형에 대하여 UAB-MOPA 시험법으로 시험해야 한다 (적어도 3회). Non-specific killing (NSK) 만이 아니라 QC 혈청의 opsonization index를 계산해서 이전에 검증된 보체에서 얻어진 결과와 비교한다.

A. 보체의 working aliquot 준비

1. -80°C에서 100 mL stock bottle을 꺼낸다.
2. 차가운 물(약 20°C)에서 계속 흔들면서 녹인다.
3. 12개 tube(멸균된 15 mL centrifuge tube)에 “UAB-MOPA 용 보체, lot#, batch#, 날짜”를 기입한다. Tube를 얼음이 담긴 통에 둔다.
4. 보체가 완전히 녹은 후 즉시 얼음 위에 놓아둔다.
5. 미리 차갑게 해둔 tube에 8 mL씩 빠르게 분주하여 얼음 위에 둔다.
6. 마지막으로 분주한 tube에서 10 µL를 취해서 blood agar plate에 streaking하여 무균 상태를 확인한다. Plate를 37°C 에서 overnight incubation하여 미생물이 자라는지 확인한다. Plate에서 어떤 미생물도 자라지 않아야 한다.
7. UAB-MOPA의 control A로 사용하기 위해서 열불활성화한 (Heat-inactivated, HI) 보체가 필요할 것이다.
 - a. 보체 10 mL를 멸균된 15 mL centrifuge tube에 넣는다.
 - b. 56°C water bath에서 30분 동안 incubation한다.
 - c. 멸균된 1.5 mL microcentrifuge tube에 HI 보체를 약 0.2 mL씩 분주한다.
 - d. 필요할 때까지 -80°C에서 보관한다.

B. 보체 검사 1 (CH50)

CH50 assay는 혈청 검체에 있는 총 보체 활성을 측정하기 위한 시험이다. 각 검체는 unmodified sheep red blood cell, 혹은 antibody로 opsonize된 sheep red blood cell (hemolysin, rabbit anti-sera로 opsonize된 sheep RBC)과 같이 incubation된다. Hemolysin antibody는 보체 cascade를 활성화시켜 membrane attack complex를 형성하게 하여, RBC의 membrane에 구멍이 생겨 헤모글로빈을 방출하게 한다. 대조군 RBC는 의미 있는 수준으로 용해되는 것이 보여서는 안 된다. Incubation후에 반응액을 원심분리하여 상등액의 흡광도 (405 nm)를 측정하여 방출된 헤모글로빈을 측정한다. (Manual of Clinical Immunology, 5th edition, Noel R. Rose, et al, ASM publication, 1997을 참고, 응용한 시험방법임)

1. Working hemolysin stock 준비
 - a. 동결 건조된 hemolysin이 들어있는 vial에 2 mL의 물을 넣는다.
 - b. Vial을 부드럽게 흔들면서 hemolysin 전량을 다 녹인다.
 - c. Hemolysin을 56°C에서 30분 동안 heat inactivation한다.
 - d. Hemolysin 2 mL를 200 mL 병에 넣고 0.9% NaCl 198 mL를 넣는다.
 - e. 이름을 표기한 50 mL centrifuge tube에 희석된 hemolysin을 25 mL씩 분주한다.
 - f. 필요 시까지 -80°C에 보관한다.
2. Control sheep red blood cells (ctRBC)와 sensitized (opsonized) sheep red blood cells (sRBC) 준비:
 - a. 1X GVB를 준비해서 ice bath에 둔다. 실험의 마지막 부분에서 차가운 버퍼가 필요하기 때문에 실험을 하는 동안 사용하지 않은 버퍼는 ice bath에 계속 보관한다.
 - b. Sheep blood를 잘 섞고, 두 개의 50 mL centrifuge tube에 각각 10 mL씩 넣는다.

(각각 A, B라고 표기). 각 tube에 1X GVB를 40 mL씩 넣는다.

- c. 1300g, 2°C에서 5분간 원심분리한다 (Sorvall H1000B rotor를 사용할 경우 2500 rpm)
- d. 상등액을 aspiration하여 버린다.
- e. 1X GVB를 넣고 원심분리하여 (1300g, 2°C, 5분) 상등액이 깨끗하게 될 때까지 RBC를 계속 세척한다 (보통 첫번째 세척 후, 한번에서 두번 더 세척하면 충분함).
- f. 1X GVB 40 mL로 각 tube의 cell을 suspend하고 cell의 농도를 약 1×10^9 cells/mL로 맞춘다.
 - i. Cell suspension에서 150 μ L를 취하여 물 2.1 mL에 넣는다.
 - ii. 흡광광도계로 541 nm에서의 흡광도를 측정한다. 1×10^9 cells/mL를 포함하고 있는 cell suspension의 OD_{541} 은 약 0.7이어야 한다.
 - iii. Cell suspension의 부피를 조절한다:
최종 부피(mL) = $57.1 \times OD_{541}$
최종 부피는 약 50 mL정도, cell 농도는 약 1×10^9 cells/mL이어야 한다. 최종 부피가 40 mL보다 적은 경우, cell을 버리고 새로운 batch의 cell을 사용한다.
- g. Working hemolysin (25 mL) tube 한 개를 녹여서 1X GVB 25 mL를 넣는다.
- h. RBC가 들어있는 tube, 1X GVB 50 mL가 들어있는 tube, 희석된 hemolysin이 들어있는 tube를 37°C water bath에서 적어도 10분 동안 pre-warm시킨다.
 - i. Pre-warmed 1X GVB를 tube A의 cell에 cell 부피와 동량으로 넣는다 (이것이 control RBC, "ctRBC"임). Pre-warmed hemolysin을 tube B의 cell에 cell 부피와 동량으로 넣는다 (이것이 sensitized RBC, "sRBC"임). 동시에 한번 흔들어 준 후 (swirl), 37°C water bath에서 20분 동안 둔다. 이때 5-10분마다 tube를 부드럽게 거꾸로 하며 섞는다.
- j. 1300g, 2°C에서 5분 동안 원심분리한다.
- k. 상등액을 aspirate하여 버린다.
- l. Ice cold 1X GVB 100 mL를 각 tube에 넣어 cell을 suspend한다 (cell 농도는 약 5×10^8 cells/mL이어야 함). 2주까지 4°C에서 cell을 보관한다.

3. CH50 assay

이 시험방법은 6개 검체까지 시험하는 방법이다.

- a. 1X GVB를 준비해서 ice bath에 둔다. 실험의 마지막 부분에서 차가운 버퍼가 필요하기 때문에 실험을 하는 동안 사용하지 않은 버퍼는 ice bath에 계속 보관한다.
- b. Assay plate에 이름을 표기한다 (96well, round bottom tissue culture treated plates):

Plate 1: Assay Control Plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Replicate 1	Blank						
B	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2	Replicate 2							
C	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3	Replicate 3							
D	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4	Replicate 4							
E	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5	Replicate 5							
F	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6	Replicate 6							
G	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7	Replicate 7							
H	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8	Replicate 8							
	0% Lysis ctRBC	100% Lysis	0% Lysis	100% Lysis	Buffer Alone							

Plate 2: Serum Control Plate (No RBC)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1	Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		

Plate 3: ctRBC Plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1	Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		

Plate 4: sRBC Plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
C	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
D	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
E	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
F	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
G	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
H	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
	Sample 1	Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		

- c. 시험할 검체를 상온에서 녹인다. 검체가 녹은 후 즉시, 얼음에서 보관한다.
- d. 1X GVB 50 μ L를 plate 1의 1열, 3열, 5열의 A행에서 H행까지에 넣는다.
- e. 물 50 μ L를 plate 1의 2열과 4열의 A행에서 H행까지에 넣는다.
- f. 1X GVB 50 μ L를 plate 2, 3, 4의 1열에서 12열의 B행에서 H행까지에 넣는다.
- g. 검체는 희석하지 않고 사용하거나, 검체의 양이 부족한 경우는 1X GVB로 2배 혹은 4배 희석하여 사용할 수 있다.
- h. 검체 1 100 μ L를 Plate 2, 3, 4의 1열과 2열의 A행에 넣는다. 검체 2 100 μ L를 Plate 2, 3, 4의 3열과 4열의 A행에 넣는다. 필요하다면, 검체 6까지 이와 같이 한다.
- i. Plate 2, 3, 4의 A행을 잘 섞어서 50 μ L를 B행으로 옮기고, 잘 섞은 후 다시 C행으로 옮기는 것을 반복하여 계열희석을 한다. G행에서 H행으로 50 μ L를 옮겨서 H행에서 잘 섞은 후, 50 μ L를 취해서 버린다. 필요할 때까지 plate는 얼음에서 보관한다.
- j. 보관해놓은 병에서 ctRBC 5 mL를 취해서 이름을 표기한 15 mL centrifuge tube에 넣는다. 보관해놓은 병에서 sRBC 5 mL를 취해서 이름을 표기한 두번째 15 mL centrifuge tube에 넣는다. 각 tube에 차가운 1X GVB 10 mL을 각각 넣고 1300g (Sorvall H1000B rotor사용시 2500 rpm), 2°C에서 5분간 원심분리 한다.
- k. 각 tube에서 상등액을 제거한다. 각 tube에 차가운 1X GVB 15 mL을 넣고, 1300g, 2°C에서 5분간 원심분리 한다.

- I. 1X GVB 5 mL로 cell pellet을 suspend하고 cell 농도를 2×10^8 cells/mL 정도로 맞춘다:
 - i. Cell suspension에서 150 μ L를 취하여 물 2.1 mL에 넣는다.
 - ii. 흡광광도계로 541 nm에서의 흡광도를 측정한다.
 - iii. Cell suspension의 부피를 조절한다:

$$\text{최종 부피 (mL)} = 35.7 \times \text{OD}_{541}$$
 최종 부피는 12 mL 정도이어야 한다.
- m. Plate 1의 1열과 2열의 A행에서 H행까지, plate 3의 모든 well에 ctRBC을 50 μ L씩 넣는다.
- n. Plate 1의 3열과 4열의 A행에서 H행까지, plate 4의 모든 well에 sRBC을 50 μ L씩 넣는다.
- o. Plate 1의 5열의 A행에서 H행까지, plate 2의 모든 well에 1X GVB를 50 μ L씩 넣는다.
- p. Plate를 microtiter plate shaker에서 500 rpm으로 (Lab-Line Instrument, model 4625를 사용할 경우 speed 5) 60분 동안 shaking하며 37°C에서 incubation 한다.
- q. Plate를 꺼내고 **차가운** 1X GVB를 150 μ L씩 Plate 1의 2열과 4열의 A행에서 H행까지를 **제외한** 모든 well에 넣는다. Plate 1의 1의 2열과 4열의 A행에서 H행까지에는 150 μ L의 물을 넣는다.
- r. 1300g, 2°C에서 5분간 원심분리한다.
- s. 원심분리가 끝난 후 즉시, 상등액만 150 μ L를 취해서 (cell pellet에 닿지 않도록 주의) ELISA plate (flat-bottomed 96-well plate)에 옮긴다.
- t. 405 nm에서 흡광도를 측정한다.
- u. Data 분석:
 - i. "CH50 Analysis Template V.02.xls" 파일을 연다
 - ii. 표시된 well에 측정한 OD 값을 붙여넣는다.
 - iii. 시험정보 (시험자, 시험명, 검체명 등)를 표시된 well에 입력한다.
 - iv. 파일을 저장하고 요약 페이지와 raw data 페이지를 출력한다.

C. 보체 검사 2 (UAB-MOPA)

아래의 시험방법은 5개의 QC 혈청을 사용하여 4개 혈청형에 대해 보체 lot 한개를 시험하기 위해 사용할 수 있다.

1. OBB를 준비한다.
2. 큰 THYA plate (~12 cm x ~12 cm)를 laminar flow hood에서 뚜껑을 연상태로 30분에서 60분동안 건조시킨다 (Note 4 참고). 8개 plate가 필요할 것이다. 플레이트를 건조시킨 후, 지나치게 건조되는 것을 막기 위해서 뚜껑을 덮어서 필요할 때까지 상온에 둔다. 플레이트에 다음과 같은 정보를 기입한다: assay plate 이름, 행 번호, 균주명 (혹은 overlay에 들어간 항생제 이름).
3. 미리 하지 않았다면, "Control A"를 위한 heat-inactivated (HI) 보체를 준비한다. (혹은,

여러 개의 HI 보체를 미리 준비해서 -80°C에 보관해놓을 수 있다.)

- a. 분주해놓은 보체 한 개 vial을 꺼내어 완전히 녹도록 상온에 둔다.
 - b. 보체를 56°C water bath에서 30분 동안 incubation한다.
 - c. 열불활성화된 보체는 상온으로 온도가 내려간 후 사용한다.
4. 전자레인지에서 50% power로 overlay agar를 녹인다 (210 mL정도가 필요). 모든 agar 덩어리가 녹을 수 있도록 overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어서 준다. 다른 방법으로, 전자레인지를 사용하여 녹이는 대신, 실험하는 날 overlay를 준비해서 고압 증기멸균할 수 있다. 4개의 멸균된 병에 55 mL씩 분주하고, 필요할 때까지 50°C water bath에 둔다 (agar의 온도가 50°C가 될 때까지 사용하지 말 것)
5. 아래의 그림과 같이 microtiter plate를 준비한다.
- a. 1열과 2열의 A행에서 H행까지에 OBB 20 µL를 넣는다. 3열에서 12열까지는 A행에서 G행까지만 OBB 20 µL를 넣는다.
 - b. 3열과 4열의 H행에 heat-inactivated QC혈청 1을 30 µL 넣는다. 5열과 6열의 H행에 heat-inactivated QC혈청 2를 30 µL 넣는다. QC 혈청 5까지 이와 같이 한다.
 - c. 3열에서 12열까지 3배씩 계열희석을 한다: H행을 공기방울이 생기지 않도록 조심스럽게 잘 섞어서 10 µL를 G행으로 넘기고, 다시 잘 섞어서 G행에서 F행으로 넘기는 방식으로 한다. B행에서 A행으로 10 µL를 넘긴 후에 잘 섞어서 A행에서 10 µL를 취하여 버린다

Plate layout diagram:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
			QC Serum 1		QC Serum 2		QC Serum 3		QC Serum 4		QC Serum 5	

Control A	Contains bacteria + complement (HI) + HL60, t=75 minutes	Used to calculate non-specific killing.
Control B	Contains bacteria + complement + HL60, t=75 minutes	Used to calculate maximum CFU/spot in assay conditions. Used to calculate non-specific killing.

6. 분화된 HL-60세포의 준비
- a. DMF로 분화된 HL60 세포를 culture flask에서 50 mL centrifuge tube로 옮긴다. (flask 1개는 assay plate 2개에 충분한 양이다)
 - b. HL60 세포를 350g (Sorvall RT7, RTH-250 rotor를 사용할 경우 1200 rpm), 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - c. 상등액을 제거하고 모든 cell pellet을 1X HBSS (**without** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL로 합한다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - d. 상등액을 제거하고 1X HBSS (**with** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL를 넣는다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - e. 상등액을 제거하고, cell을 OBB에 1 x 10⁷ cells/mL가 되도록 suspend한다 (필요

할 때까지 cell은 상온에서 보관한다). 살아있는 세포만 세는 방법은 “세포 계수”를 참고한다.

- f. 세포를 셀 때, trypan blue를 사용하여 viability를 결정한다. 살아있는 세포와 죽은 세포의 개수를 기록한다. Cell viability가 90%이상이어야 시험에 사용할 수 있다.
7. 얼려있는 4개 균주의 working stock tube를 빠르게 녹이고 세척한다:
 - a. 37°C water bath에서 tube를 부드럽게 흔들어준다.
 - b. Microcentrifuge를 사용하여 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - c. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - d. 각 tube에 OBB 1 mL씩 넣고 섞어준다.
 - e. 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - f. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - g. 원래 채워져있던 OBB의 양만큼 (0.5 mL) 넣어 bacteria pellet을 suspend한다.
8. OBB 10 mL가 들어있는 tube에 4개의 균주 각각을 적절한 양만큼 넣어 균 혼합액을 준비한다 (각 균주에 대해 약 50,000 CFU/mL이어야 한다). Control well을 포함하여 모든 well에 균혼합액을 10 µL씩 넣는다.
9. Microtiter plate를 mini-orbital shaker위에서 상온에서 30분 동안 700 rpm으로 incubation한다.
10. 이 시간 동안, 냉동고에서 시험할 lot의 보체를 꺼낸다 (활성보체 1.3 mL, 열불활성화 보체 0.1 mL 가 필요함). 보체는 상온에서 녹인다 (보체가 완전히 녹은 후, 즉시 얼음 위에서 필요할 때까지 보관한다)
11. 30분의 incubation동안, 위에서 준비한 HL60 세포 4.8 mL를 멸균된 15 mL tube에 넣는다. 또한, HL60 세포 400 µL를 멸균된 깨끗한 1.5 mL tube에 넣는다. 필요할 때까지 상온에서 보관한다.
12. 30분 incubation 후에, HL60세포 400 µL에 불활성화 보체 100 µL를 넣고, 잘 섞은 후, 1열 A행에서 H행에 50 µL씩 넣는다.
13. HL60 세포 4.8mL에는 활성보체 1.2 mL를 넣고 잘 섞은 후, 2열에서 12열의 A행에서 H행까지에 50 µL씩 넣는다.
14. Microtiter plate를 mini-orbital shaker에 **단층**으로 놓고 (plate를 쌓지 않는다), 37°C, 5% CO₂에서 700 rpm으로 45분간 incubation한다. CO₂ percent를 지속적으로 유지시켜주기 위해서 incubation을 하는 동안 incubator의 문을 열지 않는다.
15. Incubation이 끝난 후에, microtiter plate를 얼음 위에서 20분간 방치한다 (Phagocytic process를 끝내기 위함)
16. 각 well의 반응액을 10 µL씩 **4개**의 THYA plate에 spotting한다. H행에서 시작하여 각 well을 잘 섞고, 12-well row의 각 well에서 10 µL씩 취해서 THYA plate의 첫번째(아래쪽) 줄에 10 µL씩 12개를 spotting한다. Plate를 **즉시** 기울여 spot이 2~3 cm 길이의 줄과 같은 모양이 되도록 한다. G, F, E행에 대해 이와 같은 과정을 반복한다 (plate 1개 당 48개 well). **Spot이 함께 흘러가지 않도록 하기 위해서 plate를 즉시 기울여야 한다.** D, C, B, A행은 두번째 세트의 plate 4개에 spotting한다.

17. Plate를 상온에서 20분정도 두어서 agar로 용액이 스며들도록 한다 (Note 7 참고)
18. Overlay 52 mL가 들어있는 병 한 개를 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 optochin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate중 첫번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
19. Overlay 52 mL가 들어있는 두번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 streptomycin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중 두번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
20. Overlay 52 mL가 들어있는 세번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 spectinomycin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate중 세번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
21. Overlay 52 mL가 들어있는 네번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 trimethoprim stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중 네번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
22. Plate를 상온에서 20분정도 둔다. Overlay가 굳은 후에, plate를 거꾸로 하여 candle jar안에 넣고, 16-18시간 동안 37°C에서 incubation한다. (Note 13). Optochin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 optochin에 저항성이 있는 혈청형 균주이고, streptomycin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 streptomycin에 저항성이 있는 혈청형 균주이다.
23. Colony를 직접 세거나, automated counter를 이용하여 개수를 센다 (colony의 개수를 세는 방법들에 관해서는 Note 11을 참고한다)
24. Opsonic index와 non-specific killing을 계산한다 (Note 18). Osonization index는 균의 지정된 killing percent (주로 50%)의 혈청희석배수를 linear interpolation하여 계산할 수 있다. 각 균주의 control B 값이 다를 가능성이 높기 때문에, 각 균주에 대하여 각각 계산해야 한다. 따라서 분석이 끝난 후, 4개의 다른 파일을 갖게 될 것이다 (혈청형당 1개 파일)
 - a. Analysis template "opsotiter 3"를 연다
 - b. Template 파일의 "raw data" worksheet를 선택한다.
 - c. Raw data와 assay 정보를 입력한다 (입력해야하는 칸은 노란색으로 표시되어있다)
 - i. Raw data (CFU/spot)를, control A와 control B의 위치를 확인하며, 해당하는 칸에 입력한다. 이것은 수동으로 직접 입력하거나, 다른 파일에서 복사해서 붙여넣을 수 있다. 만약 data가 컴퓨터의 다른 파일에서 입력되었다면, 그 형식이 표시된 형식과 동일한지 확인해야 한다.
 - ii. Assay 정보를 해당되는 칸에 입력한다.
 - iii. 필요하다면, 수정가능한 assay parameter들을 수정한다. 일반적으로 assay에서 assay간에 변화되는 것은 없다.

- iv. 검체 정보 (검체명, 희석배수)를 해당되는 칸에 입력한다.
 - d. 파일을 저장하고 "Raw Data"와 "Report" worksheet을 출력한다.
 - e. 다른 세트의 data를 분석하기 위해서, 파일은 닫고, template를 다시 연다. 즉, 이미 분석이 끝난 파일을 새로운 data set의 분석을 위한 template로는 사용하지 않는다.
25. 각 QC 혈청을 시험에 사용하고자 하는 보체 lot에 대해서 적어도 두번 실험한 후에, 각 혈청형에 대해 opsonization index의 평균값을 각각의 QC 혈청마다 계산한다. 또한 각 assay에서의 non-specific killing(NSK)도 계산한다.

D. 보체 Lot의 허용기준

보체 lot이 아래와 같은 기준을 만족한다면 사용할 수 있다:

1. 새로운 보체의 CH50 값은 중간 70th percentile에 들어야 한다. 즉, 하위 15th percentile이나 상위 15th percentile에 CH50 값이 있는 보체 lot은 사용할 수 없다.
2. Control (unsensitized) RBC에 대한 새로운 보체의 CH50 값은 4 미만이다. 우리의 경험으로 볼 때, baby rabbit complement (3-4주된 rabbit)의 대부분 lot은 control RBC에 대해 측정 가능한 CH50 값을 갖지 않는다.
3. 대부분의 혈청형에 대해 NSK는 30%이하이다. 어떤 혈청형에 대해서는 (예를 들어 6A, 6B, 7F) 높은 NSK가 나타날 수 있다. 이러한 혈청형에 대해서는 70% NSK까지 허용한다.
4. 각 QC 혈청에 대해서 새로운 보체로 실험한 평균 opsonic index (적어도 2회 측정)는 이전에 검증된 보체 lot으로 결정된 허용범위 안에 들어야한다 (mean ± 2SD)

제목: Fetal Bovine Serum

개정: 2008.2.1; 2008.5.28; 2008.6.23; 2022.11.1; 2012.9.20

5. Fetal Bovine Serum (FBS)

우리가 assay에 사용한 bovine serum때문에 대부분의 보체 lot에서 혈청형 14에 대해 높은 NSK를 보인다는 것을 최근에 알았다. 혈청형 14의 높은 NSK는 우리가 시험한 모든 lot의 FetalClone I에서 나타났다. 그러나, Hyclone과 Atlanta Biologicals의 다른 등급의 FBS를 사용했을 때, 혈청형 14의 NSK는 대부분의 보체 lot에서 매우 미미했다. 따라서, 우리는 assay에서 FetalClon I을 사용하지 않고 (HL60 배양에는 여전히 사용함), OBB에서 사용되는 FBS를 사용하기 시작했다. 다른 혈청형 (예를 들어 6B와 7F)의 NSK때문에, FBS의 lot은 검사해야 한다.

A. Heat inactivation과 assay aliquots의 준비

1. -20°C 냉동고에서 FBS가 들어있는 병을 꺼내서 37°C water bath에 둔다. 완전히 녹으면 water bath에서 꺼내어 상온이 되도록 식힌다.
2. 모양과 크기가 같은 병에 물 500 mL를 넣고 상온이 되도록 한다. 이 병은 병 안의

용액의 온도를 관찰하기 위해 사용될 것이다 (“온도 관찰용 병”) 오래된 빈 FBS 병을 이 용도로 사용하면 좋다.

3. 모든 병들을 56°C water bath에 넣고 관찰용 병에 온도계를 넣는다. Water bath의 물의 높이는 병 안의 용액 높이보다 1 cm정도 높고, 병의 상단보다는 아래여야 한다.
4. 온도 관찰용 병의 온도가 56°C가 될 때부터 시간을 측정하기 시작한다.
5. 30분 동안 56°C에 둔 후, FBS 병을 water bath에서 꺼낸다. 상온으로 온도가 내려가도록 둔다.
6. Heat-inactivated FBS를 멸균된 50 mL centrifuge tube에 45 mL씩 분주한다. 1개월 미만의 단기간 보관을 위해서는 4°C에서 보관할 수 있다. 장기 보관 시에는 -20°C이하에서 보관해야 한다.

B. FBS 검사

아래의 시험방법은 QC 혈청 5개까지 사용하여 4개의 혈청형에 대해 FBS 1개 lot을 검사하는데 사용할 수 있다.

1. 시험에 사용할 lot의 FBS를 사용하여 OBB를 준비한다.
2. 큰 THYA plate (~12 cm x ~12 cm)를 laminar flow hood에서 뚜껑을 연상태로 30분에서 60분동안 건조시킨다 (Note 4 참고). 8개 plate가 필요할 것이다. 플레이트를 건조시킨 후, 너무 많이 건조되는 것을 막기 위해서 뚜껑을 덮어서 필요할 때까지 상온에 둔다. 플레이트에 다음과 같은 정보를 기입한다: assay plate 이름, 행 번호, 균주명 (혹은 overlay에 들어간 항생제 이름).
3. 미리 하지 않았다면, “Control A”를 위한 heat-inactivated (HI) 보체를 준비한다. (혹은, 여러 개의 HI 보체를 미리 준비해서 -80°C에 보관해놓을 수 있다.)
 - a. 분주해놓은 보체 한 개 vial을 꺼내어 완전히 녹도록 상온에 둔다.
 - b. 보체를 56°C water bath에서 30분동안 incubation한다.
 - c. 열불활성화된 보체는 상온으로 온도가 내려간 후 사용한다.
4. 전자레인지에서 50% power로 overlay agar를 녹인다 (210 mL정도가 필요). 모든 agar 덩어리가 녹을 수 있도록 overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어준다. 다른 방법으로, 전자레인지를 사용하여 녹이는 대신, 실험하는 날 overlay를 준비해서 고압 증기멸균할 수 있다. 4개의 멸균된 병에 55 mL씩 분주하고, 필요할 때까지 50°C water bath에 둔다 (agar의 온도가 50°C가 될 때까지 사용하지 말 것)
5. 아래의 그림과 같이 microtiter plate를 준비한다.
 - a. 1열과 2열의 A행에서 H행까지에 OBB 20 µL를 넣는다. 3열에서 12열까지는 A행에서 G행까지만 OBB 20 µL를 넣는다.
 - b. 3열과 4열의 H행에 heat-inactivated QC혈청 1을 30 µL 넣는다. 5열과 6열의 H행에 heat-inactivated QC혈청 2를 30 µL 넣는다. QC 혈청 5까지 이와 같이 한다. 3열에서 12열까지 3배씩 계열희석을 한다: H행을 공기방울이 생기지 않도록 조심스럽게 잘 섞어서 10 µL를 G행으로 넘기고, 다시 잘 섞어서 G행에서 F행으로 넘기는 방식으로 한다. B행에서 A행으로 10 µL를 넘긴 후에 잘 섞어서 A행에서 10 µL를 취하여 버린다.

Plate layout diagram:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
			QC Serum 1	QC Serum 2	QC Serum 3	QC Serum 4	QC Serum 5					

Control A	Contains bacteria + complement (HI) + HL60, t=75 minutes	Used to calculate non-specific killing.
Control B	Contains bacteria + complement + HL60, t=75 minutes	Used to calculate maximum CFU/spot in assay conditions. Used to calculate non-specific killing.

6. 분화된 HL-60세포의 준비
 - a. DMF로 분화된 HL60 세포를 culture flask에서 50 mL centrifuge tube로 옮긴다. (flask 1개는 assay plate 2개에 충분한 양이다)
 - b. HL60 세포를 350g (Sorvall RT7, RTH-250 rotor를 사용할 경우 1200 rpm), 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - c. 상등액을 제거하고 모든 cell pellet을 1X HBSS (**without** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL로 합한다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - d. 상등액을 제거하고 1X HBSS (**with** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL를 넣는다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - e. 상등액을 제거하고, 세포를 OBB에 1 x 10⁷ cells/mL가 되도록 suspend한다 (필요할 때까지 세포는 상온에서 보관한다). 살아있는 세포만 세는 방법은 "세포계수"를 참고한다.
 - f. 세포를 셀 때, trypan blue를 사용하여 viability를 결정한다. 살아있는 세포와 죽은 세포의 개수를 기록한다. Cell viability가 90%이상이어야 시험에 사용할 수 있다.
7. 얼려있는 4개 혈청형 균주의 working stock tube를 빠르게 녹이고 세척한다:
 - a. 37°C water bath에서 tube를 부드럽게 흔들어준다.
 - b. Microcentrifuge를 사용하여 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - c. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - d. 각 tube에 OBB 1 mL씩 넣고 섞어준다.
 - e. 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - f. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - g. 원래 채워져있던 OBB의 양만큼 (0.5 mL) 넣어 bacteria pellet을 suspend한다.
8. OBB 10 mL가 들어있는 tube에 4개의 균주 각각을 적절한 양만큼 넣어 균혼합액을 준비한다 (각 균주에 대해 약 50,000 CFU/mL이어야 한다). Control well을 포함하여 모든 well에 균혼합액을 10 µL씩 넣는다.
9. Microtiter plate를 mini-orbital shaker위에서 상온에서 30분 동안 700 rpm으로 incubation한다.
10. 이 시간동안, 냉동고에서 시험할 lot의 보체를 꺼낸다 (활성보체 1.3 mL, 열불활성화 보체 0.1 mL 가 필요함). 보체는 상온에서 녹인다 (보체가 완전히 녹은 후, 즉시 얼음

위해서 필요할 때까지 보관한다)

11. 30분의 incubation 동안, 위에서 준비한 HL60 세포 4.8 mL를 멸균된 15 mL tube에 넣는다. 또한, HL60 세포 400 μ L를 멸균된 깨끗한 1.5 mL tube에 넣는다. 필요할 때까지 상온에서 보관한다.
12. 30분 incubation 후에, HL60세포 400 μ L에 불활성화 보체 100 μ L를 넣고, 잘 섞은 후, 1열 A행에서 H행에 50 μ L씩 넣는다.
13. HL60 세포 4.8 mL에는 활성보체 1.2 mL를 넣고 잘 섞은 후, 2열에서 12열의 A행에서 H행까지에 50 μ L씩 넣는다.
14. Microtiter plate를 mini-orbital shaker에 **단층**으로 놓고 (plate를 쌓지 않는다), 37°C, 5% CO₂에서 700 rpm으로 45분간 incubation한다. CO₂ percent를 지속적으로 유지시켜주기 위해서 incubation을 하는 동안 incubator의 문을 열지 않는다.
15. Incubation이 끝난 후에, microtiter plate를 얼음 위에서 20분간 방치한다 (Phagocytic process를 끝내기 위함)
16. 각 well의 반응액을 10 μ L씩 **4개**의 THYA plate에 spotting한다. H행에서 시작하여 각 well을 잘 섞고, 12-well row의 각 well에서 10 μ L씩 취해서 THYA plate의 첫번째(아래쪽) 줄에 10 μ L씩 12개를 spotting한다. Plate를 **즉시** 기울여 spot이 2~3 cm 길이의 줄과 같은 모양이 되도록 한다. G, F, E행에 대해 이와 같은 과정을 반복한다 (plate 1개 당 48개 well). **Spot이 함께 흘러가지 않도록 하기 위해서 plate를 즉시 기울여야 한다.** D, C, B, A행은 두번째 세트의 plate 4개에 spotting한다.
17. Plate를 상온에서 20분정도 두어서 agar로 용액이 스며들도록 한다 (Note 7참고).
18. Overlay 52 mL가 들어있는 병 한 개를 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 optochin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate중 첫번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
19. Overlay 52 mL가 들어있는 두번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 streptomycin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중 두번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
20. Overlay 52 mL가 들어있는 세번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 spectinomycin stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate중 세번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
21. Overlay 52 mL가 들어있는 네번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 52 μ L와 trimethoprim stock 52 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중 네번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 2개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
22. Plate를 상온에서 20분정도 둔다. Overlay가 굳은 후에, plate를 거꾸로 하여 candle jar안에 넣고, 16-18시간동안 37°C에서 incubation한다. (Note 13). Optochin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 optochin에 저항성이 있는 혈청형 균주 이고, sterptomycin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 sterptomycin에 저항성

이 있는 혈청형 균주 이다.

23. Colony를 직접 세거나, automated counter를 이용하여 개수를 센다 (colony의 개수를 세는 방법들에 관련해서는 Note 11을 참고한다)
24. Opsonic index와 non-specific killing을 계산한다 (Note 18). Osonization index는 균의 지정된 killing percent (주로 50%)의 혈청희석배수를 linear interpolation하여 계산할 수 있다. 각 균주의 control B 값이 다를 가능성이 높기 때문에, 각 균주에 대하여 각각 계산해야 한다. 따라서 분석이 끝난후, 4개의 다른 파일을 갖게 될 것이다 (혈청형 당 1개 파일)
 - a. Analysis template "opsotiter 3.XX.xls"를 연다 ("XX"는 시간에 따라 바뀔 수 있는 version번호 이다)
 - b. Template 파일의 "raw data" worksheet를 선택한다.
 - c. Raw data와 assay 정보를 입력한다 (입력해야 하는 칸은 노란색으로 표시 되어 있다)
 - i. Raw data (CFU/spot)를, control A와 control B의 위치를 확인하며, 해당하는 칸에 입력한다. 이것은 수동으로 직접 입력하거나, 다른 파일에서 복사해서 붙여 넣을 수 있다. 만약 data가 컴퓨터의 다른 파일에서 입력되었다면, 그 형식이 표시된 형식과 동일한지 확인해야 한다.
 - ii. Assay 정보를 해당되는 칸에 입력한다.
 - iii. 필요하다면, 수정 가능한 assay parameter들을 수정한다. 일반적으로 assay 에서 assay간에 변화되는 것은 없다.
 - iv. 검체 정보 (검체명, 희석배수)를 해당되는 칸에 입력한다.
 - d. 파일을 저장하고 "Raw Data"와 "Report" worksheet을 풀력한다.
 - e. 다른 세트의 data를 분석하기 위해서, 파일은 닫고, template를 다시 연다. 즉, 이미 분석이 끝난 파일을 새로운 data set의 분석을 위한 template로는 사용하지 않는다.
25. 각 QC 혈청을 시험에 사용하고자 하는 FBS lot에 대해서 적어도 두번 실험한 후에, 각 혈청형에 대해 opsonization index의 평균값을 각각의 QC 혈청마다 계산한다. 또한 각 assay에서의 non-specific killing(NSK)도 계산한다.

C. FBS Lot의 허용기준

FBS lot은 다음과 같은 기준을 만족한다면 허용된다:

1. 각 QC혈청에 대해서, 새로운 FBS를 사용했을 때 평균 opsonic index가 ($n \geq 2$) 이전의 검증된 FBS lot을 사용해서 결정된 허용범위 안에 들어야 한다 ($\text{mean} \pm 2SD$).
2. 대부분의 혈청형에 대해 NSK는 30%이하이다. 어떤 혈청형에 대해서는 (예를 들어 6A, 6B, 7F) 높은 NSK가 나타날 수 있다. 이러한 혈청형에 대해서는 70% NSK까지 허용한다.

제목: UAB-MOPA 방법

개정: 2008.2.1; 2013.8.1

6. UAB-MOPA 방법

아래의 시험방법은 7개의 microtiter plate로 실험하는 한번의 연속된 시험 ("run")에 사용된다. 41 개 이상의 검체를 시험하는 경우는 여러 번의 시험을 수행해야 한다. (즉, 처음 7개 microtiter plate가 완전히 끝난 뒤에 그 다음 7개 microtiter plate를 시작한다). 검체는 UAB-MOPA를 하기 이전에, 앞에서 설명한 것처럼 heat-inactivation되어야 한다.

시험할 혈청형은 아래의 표와 같이 그룹으로 묶는다.

	Strain 1	Strain 2	Strain 3	Strain 4
Assay Group A	OREP4	SPEC6B	STREP14	EMC23F
Assay Group B	OREP18C	SPEC19F	EMC9V	TREP6A
Assay Group C	OREP7F	SPEC1	STREP5	TREP19A
Assay Group D	OREP3	SPEC6C	STREP33F	TREP22F
Assay Group E	OREP10A	SPEC6D	STREP8	TREP12F
Assay Group F	OREP17F	SPEC9N	STREP2	TREP11A
Assay Group G	empty*	SPEC20B	empty*	TREP15B

*E:T ratio를 유지하기 위해서는 적합한 항생제 저항성을 가지고 있는 서로 관련이 없는 혈청형 두 개가 포함되어야 한다. 예를 들어, OREP3과 STREP8이 함께 포함될 수 있다.

1. OBB를 준비한다 (100 mL면 충분하다)
2. 큰 THYA plate (~12 cm x ~12 cm)를 laminar flow hood에서 뚜껑을 연상태로 30분에서 60분동안 건조시킨다 (Note 4 참고). 56개 plate가 필요할 것이다. 플레이트를 건조시킨 후, 너무 많이 건조되는 것을 막기 위해서 뚜껑을 덮어서 필요할 때까지 상온에 둔다. 플레이트에 다음과 같은 정보를 기입한다: assay plate 이름, 행 번호, 균주명 (혹은 overlay에 들어간 항생제 이름). 예를 들어, "C, H-E, OP"라고 표기한 plate는 optochin에 저항성이 있는 혈청형을 포함하는 microtiter plate C의 H, G, F, E행을 나타낸다.
3. 전자레인지에서 50% power로 overlay agar를 녹인다 (Microtiter plate 7개에는 1500mL정도가 필요). 모든 agar 덩어리가 녹을 수 있도록 overlay agar를 부드럽고 조심스럽게 흔들어준다. 다른 방법으로, 전자레인지를 사용하여 녹이는 대신, 실험하는 날 overlay를 준비해서 고압증기멸균 할 수 있다. 4개의 멸균된 병에 370 mL씩 분주하고, 필요할 때까지 50°C water bath에 둔다 (agar의 온도가 50°C가 될 때까지 사용하지 말 것).
4. 미리 하지 않았다면, "Control A"를 위한 heat-inactivated (HI) 보체를 준비한다. (혹은, 여러 개의 HI 보체를 미리 준비해서 -80°C에 보관해놓을 수 있다.)
 - a. 분주해놓은 보체 한 개 vial을 꺼내어 완전히 녹도록 상온에 둔다.
 - b. 보체를 56°C water bath에서 30분동안 incubation한다.
 - c. 열불활성화된 보체는 상온으로 온도가 내려간 후 사용한다.

5. 아래의 그림과 같이 microtiter plate를 준비한다. 아래에 기술한 방법은 4배 희석에서 시작하여 3배씩 8번 계열희석하는 방법이다. 다른 방법을 Note 12를 참고한다.
 - a. Plate A의 1,2열의 A행에서 H행까지에 OBB 20 μ L를 넣는다.
 - b. Plate A의 3열에서 12열까지는 A행에서 G행까지만 OBB 20 μ L를 넣는다. Plate B, C, D, E, F, G의 1열에서 12열까지의 A행에서 G행에 OBB 20 μ L를 넣는다.
 - c. Plate A의 3열과 4열의 H행에 검체 1을 30 μ L넣는다. Plate A의 5, 6열의 H행에 검체 2를 30 μ L 넣는다. 다른 검체도 아래의 template대로 넣는다.
 - d. Plate A의 3열에서 12열까지, plate B에서 E까지는 모든 열을, 3배씩 계열희석 한다: H행을 공기방울이 생기지 않도록 조심스럽게 잘 섞어서 10 μ L를 G행으로 넘기고, 다시 공기방울이 생기지 않도록 잘 섞어서 G행에서 F행으로 넘기는 방식으로 한다. B행에서 A행으로 10 μ L를 넘긴 후에 잘 섞어서 A행에서 10 μ L를 취하여 버린다

Plate A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control A	Control B	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Control A	Control B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Control A	Control B	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Control A	Control B	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Control A	Control B	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Control A	Control B	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Control A	Control B	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Control A	Control B	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
			Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	

Plates B, C, D, E, F, and G

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8	Dilution 8
B	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7	Dilution 7
C	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6	Dilution 6
D	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 5
E	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4	Dilution 4
F	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3	Dilution 3
G	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 2
H	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1	Dilution 1
	Sample 6, 12, 18, etc		Sample 7, 13, 19, etc		Sample 8, 14, 20, etc		Sample 9, 15, 21, etc		Sample 10, 16, 22, etc		Sample 11, 17, 23, etc	

Control A	Contains bacteria + complement (HI) + HL60, t=75 minutes	Used to calculate non-specific killing.
Control B	Contains bacteria + complement + HL60, t=75 minutes	Used to calculate maximum CFU/spot in assay conditions. Used to calculate non-specific killing.

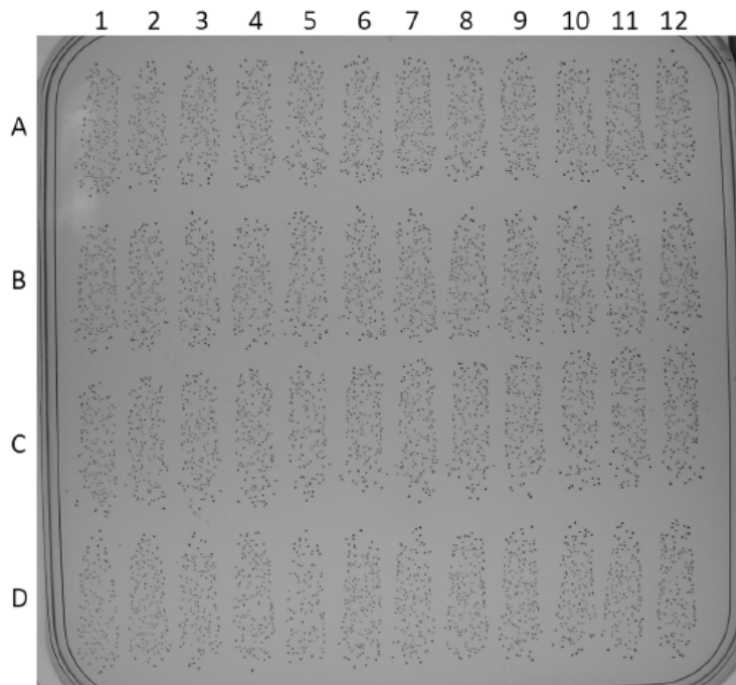
6. 분화된 HL-60세포의 준비
 - a. DMF로 분화된 HL60 세포를 culture flask에서 50 mL centrifuge tube로 옮긴다. (flask 5개는 assay plate 7개에 충분한 양이다)
 - b. HL60 세포를 350g (Sorvall RT7, RTH-250 rotor를 사용할 경우 1200 rpm), 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - c. 상등액을 제거하고 모든 cell pellet을 1X HBSS (**without** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL로 합한다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - d. 상등액을 제거하고 1X HBSS (**with** Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) 50 mL를 넣는다. 350g, 상온에서 5분간 원심분리한다.
 - e. 상등액을 제거하고, cell을 OBB에 1 x 10⁷ cells/mL가 되도록 suspend한다 (필요할 때까지 cell은 상온에서 보관한다). 살아있는 세포만 세는 방법은 "세포계수"

를 참고한다. 32 mL정도의 cell이 필요할 것이다.

- f. 세포를 셀 때, trypan blue를 사용하여 viability를 결정한다. 살아있는 세포와 죽은 세포의 개수를 기록한다. Cell viability가 90%이상이어야 시험에 사용할 수 있다.
7. 얼려있는 4개 혈청형 균주의 working stock tube를 빠르게 녹이고 세척한다:
 - a. 37°C water bath에서 tube를 부드럽게 흔들어준다.
 - b. Microcentrifuge를 사용하여 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - c. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - d. 각 tube에 OBB 1 mL씩 넣고 섞어준다.
 - e. 12,000g에서 2분동안 원심분리한다.
 - f. 상등액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
 - g. 원래 채워져있던 OBB의 양만큼 (0.5 mL) 넣어 bacteria pellet을 suspend한다.
8. OBB 10 mL가 들어있는 tube에 4개의 균주 각각을 적절한 양만큼 넣어 균혼합액을 준비한다 (각 균주에 대해 약 50,000 CFU/mL이어야 한다). Control well을 포함하여 모든 well에 균혼합액을 10 µL씩 넣는다.
9. Microtiter plate를 mini-orbital shaker위에서 상온에서 30분동안 700 rpm으로 incubation한다.
10. 이 시간 동안, 냉동고에서 시험할 lot의 보체를 꺼낸다 (활성보체 8 mL, 열불활성화 보체 0.2 mL 가 필요함). 보체는 상온에서 녹인다 (보체가 완전히 녹은 후, **즉시** 필요할때까지 보관한다)
11. 30분 incubation 후에, HL60세포 0.4 mL에 불활성화 보체 0.1 mL를 넣고 섞어서 HL60/보체(HI) 혼합액을 준비한다. Plate A의 column 1의 각 well에 50 µL씩 넣는다.
12. HL60세포 30.4 mL에 활성 보체 7.6 mL를 넣고 섞어서 HL60/보체(활성) 혼합액을 준비한다. Plate A의 column 1을 제외한 모든 well에 50 µL씩 넣는다.
13. Microtiter plate를 mini-orbital shaker에 **단층**으로 놓고 (plate를 쌓지 않는다), 37°C, 5% CO₂에서 700 rpm으로 45분간 incubation한다. CO₂ percent를 지속적으로 유지시켜주기 위해서 incubation을 하는 동안 incubator의 문을 열지 않는다.
14. Incubation이 끝난 후에, microtiter plate를 얼음 위에서 20분간 방치한다 (Phagocytic process를 끝내기 위함)
15. 각 well의 반응액을 10 µL씩 4개의 THYA plate에 spotting한다. H행에서 시작하여 각 well을 잘 섞고, 12-well row의 각 well에서 10 µL씩 취해서 THYA plate의 첫번째(아래쪽) 줄에 10 µL씩 12개를 spotting한다. Plate를 **즉시** 기울여 spot이 2~3 cm 길이의 줄과 같은 모양이 되도록 한다. Row G, F, E에 대해 이와 같은 과정을 반복한다 (plate 1개 당 총 48개 well). **Spot이 함께 흘러가지 않도록 하기 위해서 plate를 즉시 기울여야 한다.** D, C, B, A행은 두번째 세트의 plate 4개에 spotting한다.
16. Plate를 상온에서 20분정도 두어서 agar로 용액이 스며들도록 한다 (Note 7참고)
17. Overlay 350 mL가 들어있는 병 한 개를 water bath에서 꺼내서 TTC stock 350 µL와 optochin stock 350 µL를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중에서 첫번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 14개의 THYA plate에 이 overlay를 넣

게 된다.

18. Overlay 350 mL가 들어있는 두번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 350 μ L와 streptomycin stock 350 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중에서 두번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 14개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
19. Overlay 350 mL가 들어있는 세번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 350 μ L와 spectinomycin stock 350 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중에서 세번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 14개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
20. Overlay 350 mL가 들어있는 네번째 병을 water bath에서 꺼내서 TTC stock 350 μ L와 trimethoprim stock 350 μ L를 넣는다. 잘 섞어서 위에서 동일하게 spotting한 4개 plate 중에서 네번째 plate에 각각 25 mL씩 넣는다. 14개의 THYA plate에 이 overlay를 넣게 된다.
21. Plate를 상온에서 20분정도 둔다. Overlay가 굳은 후에, plate를 거꾸로 하여 candle jar안에 넣고, 16-18시간동안 37°C에서 incubation한다. (Note 13). Optochin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 optochin에 저항성이 있는 혈청형 균주 이고, sterptomycin overlay를 넣은 THYA plate에서 자라는 colony는 sterptomycin에 저항성이 있는 혈청형 균주 이다.
22. Overnight incubation후의 plate는 아래와 같다.



23. Colony를 직접 세거나, automated counter를 이용하여 개수를 센다 (colony의 개수를 세는 방법들에 관련해서는 Note 11을 참고한다)

24. Data를 분석한 후, THYA plate는 멸균해서 버려야한다 (Note 10).

제목: 결과

개정:2008.2.1; 2011.11.1

7. 결과 분석

A. Data 전환

Osonization index는 균의 지정된 killing percent (주로 50%)의 혈청희석배수를 linear interpolation 하여 계산할 수 있다. 각 균주의 control B 값이 다를 가능성이 높기 때문에, 각 균주에 대하여 각각 계산해야 한다. 따라서 분석이 끝난후, 4개의 다른 파일을 갖게 될 것이다 (혈청형당 1개 파일).

1. Analysis template "opsotiter 3"를 연다
2. Template 파일의 "raw data" worksheet를 선택한다.
3. Raw data와 assay 정보를 입력한다 (입력해야하는 칸은 노란색으로 표시되어있다)
4. Raw data (CFU/spot)를, control A와 control B의 위치를 확인하며, 해당하는 칸에 입력한다. 이것은 수동으로 직접 입력하거나, 다른 파일에서 복사해서 붙여넣을 수 있다. 만약 data가 컴퓨터의 다른 파일에서 입력되었다면, 그 형식이 표시된 형식과 동일한지 확인해야한다.
5. Assay 정보를 해당되는 칸에 입력한다.
6. 필요하다면, 수정가능한 assay parameter들을 수정한다. 일반적으로 assay에서 assay 간에 변화되는 것은 없다.
7. 검체 정보 (검체명, 희석배수)를 해당되는 칸에 입력한다.
8. 파일을 저장하고 "Raw Data"와 "Report" worksheet을 출력한다. 모든 분석결과는 안전하고 backed-up이 되는 장소에 저장되어야 한다.
9. 다른 세트의 data를 분석하기 위해서, 파일은 닫고, template를 다시 연다. 즉, 이미 분석이 끝난 파일을 새로운 data set의 분석을 위한 template로는 사용하지 않는다.
10. 재분석을 해야하는 검체가 있는지 결정하기 위해 실험실 감독자에게 결과를 제출한다.

B. Assay 허용기준

아래의 기준을 모두 만족하면 하나의 시험에서 나온 결과는 받아들여질 수 있다. (각 검체의 결과는 받아들여지지 않을 수 있다. 이에 대해서는 아래를 참고할 것):

1. Micro-colony가 없어야 한다. Micro-colony는 일반적인 colony보다 5배에서 10배 정도 작은 bacteria colony다. Micro-colony는 대개 불완전한 항생제 민감성을 나타낸다.
2. 최대 CFU/spot은 70개 이상, 180개 이하이다.
3. 모든 혈청형에 대해 NSK는 70%이하이다.
4. QC 혈청의 titer는 허용범위 안에 들어야 한다 ($\text{mean} \pm 2\text{SD}$). 만약 3개의 QC 혈청을 사용한다면, 3개중 2개가 허용범위 안에 들면 그 결과는 받아들여질 것이다.

C. 개별 검체 결과의 허용기준

개별검체의 OI는 위의 기준을 모두 만족하면서, 아래의 기준을 만족한다면 받아들여 질 것이다:

1. 어떠한 살균제(항생제)도 검출되지 않아야 한다.
2. 반복실험(replicate)의 정밀성이 실험실 감독자에 의해 결정된 기준에 맞아야 한다.
3. 검체의 killing curve는 불규칙적이지 않아야 한다. 우리는 현재 규칙적, 불규칙적 curve의 정의에 대한 기준을 수립하고 있는 중이다. 잠정적인 허용범위의 계획에 대해서는 Note 16을 참고한다.

제목: Assay Notes

개정: 2008.2.1; 2011.11.1; 2012.9.20

8. Assay Notes

Note 1: Baby rabbit complement와 HL60 cell은 살아있는 균 수에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, OPKA에 사용할 각 혈청형의 균 희석배수를 결정할 때 보체와 HL60 세포가 있는 상태로 해야 한다.

Note 2: UAB-MOPA방법의 간단한 설명:

혈청	20 μ L	원액 혹은 희석해서 사용
균	10 μ L	총 2,000 CFU/well (혈청형 당 500 CFU/well x 4개 혈청형)
HL60 세포/보체 (4:1 혼합)	50 μ L	400,000 HL60/well; 보체의 최종 농도는 12.5%
총 volume	80 μ L	

Note 3: TTC는 열을 가하면 빨간색으로 변하므로 고압증기멸균하기 이전이나 전자레인지에서 가열하기 전에 넣으면 안된다. Agar가 50°C정도로 식은 후에 TTC를 넣는다.

Note 4: THYA plate를 정확한 시간동안 건조시키는 것이 매우 중요하다. 건조시간은 온도와 습도에 따라 달라질 수 있지만 (우리 실험실은 보통 온도는 21°C정도, 상대습도는 70%정도이다), 대체로 30-60분이면 충분하다. Plate가 덜 건조되면, spot의 가장자리에 많은 수의 colony가 나타난다. 이것은 colony를 셀 때 영향을 줄 수 있다. 너무 많이 건조된 plate는 plate를 기울였을 때 spot이 합해져서 흘러가는 원인이 될 수 있다.

Note 5: DMSO는 HL60 세포의 분화에 영향을 줄 수 있으므로, DMSO가 들어있는 freezing

medium은 최대한 제거하는 것이 중요하다.

Note 6: HL60 세포는 CO₂ %의 작은 변화에도 민감하기 때문에 CO₂ 농도를 유지시키는 것이 중요하다. 외부의 reference (예, Bacharach (Pittsburgh, PA)에서 제공하는 FYRITE® Gas Analyzer)를 사용해서 정기적으로 CO₂ %를 확인할 것을 권장한다. 또한 적절한 습도도 중요하다. Incubator안의 물의 높이가 제조사에서 지정된 정도로 유지되는 것을 확인해야 한다.

Note 7: 보통, spotting한 용액의 흡수를 위해 plate를 실험대 위에서 방치할 수 있다. 그러나 오염이 많이 나타나는 경우 (예를 들어 실내 공기의 질이 좋지 않아서), plate는 laminar flow hood 안에서 방치할 필요가 있을 것이다. 이 경우, 흡수되는 시간을 줄일 필요가 있을 수도 있다.

Note 8: Blood agar plate도 또한 사용될 수 있다. 만약 blood agar plate가 사용된다면, overlay를 넣지 않는다.

Note 9: 다음과 같이 수정하면, 이 시험방법은 single serotype assay에도 사용될 수 있다.

- a. Assay를 위해, 균은 100,000 CFU/mL 정도로 희석되어야 한다 (UAB-MOPA를 위해서는 50,000 CFU/mL로 희석). 희석된 균 10 µL를 각 well에 넣으면 effector:target ratio는 400:1이 된다 (UAB-MOPA는 200:1).
- b. Assay가 끝난 후에, 최종 반응액의 5 µL를 한 개의 THYA plate에 spotting한다 (UAB-MOPA에서는 10 µL를 4개의 THYA plate에 spotting).
- c. 한 개 혈청형만 각 well에 넣기 때문에 항생제는 필요 없으므로 overlay에 항생제를 넣지 않는다 (TTC는 overlay에 넣어야 한다).

Note 10: 폐구균은 인간 병원체이므로 biosafety level BSL2의 조건에서 다루어야만 한다. 균과 접촉하는 모든 물품은 생물학적 유해물질로 간주되므로 각 국가별 실험실 안전 규정에 맞게 폐기해야 한다.

Note 11: THYA plate를 디지털 카메라나 스캐너로 사진을 찍어서 colony counting software를 가지고 있는 사람에게 이메일로 보낼 수 있다 (참고문헌 6 참고). 우리는 US National Institute of Standards and Technology와 협력해서, 디지털 이미지에 있는 colony를 셀 수 있는 software를 개발했다. 이 software는 "NICE"이다. 이 software를 받아서 사용하는 자세한 방법은 nice@nist.gov로 이메일을 보내면 알 수 있다.

Note 12: 다른 assay format으로는 혈청을 11번 희석하는 경우, 다른 희석배수를 사용하는 경우 (3배 대신 2배), 8배 sensitivity를 사용하는 경우가 있다.

Note 13: 우리는 candle jar로 10 gallon glass fish tank를 사용한다. Tank에 plate를 넣은 후, 촛불을 켜고, tank의 위는 알루미늄 호일로 덮은 후, 테이프로 호일 가장자리를 단단히 붙인다. 일관되고 적당하게 균이 자라게 하기 위해서, tank는 50%이상 채우지 않아야 한다.

Note 14: 우리는 autoclave한 THY broth에서 일관되지 않은 결과를 얻었다. 따라서 우리는 filter 로 멸균하는 것은 권장한다.

Note 15: 다른 antibody clone과 같은 clone의 다른 lot은 다른 결과를 나타낼 수도 있기 때문에, 적절한 antibody의 농도는 개별 사용자에게 의해 결정되어야 한다. 제공되는 농도는 clone과 lot에 따라 다르다.

Note 16: 개별 검체에 대한 잠정적인 허용기준은 다음과 같다.

Good curves

현재, good curve에 대한 최선의 정의는 일반적인 S자 모양의 killing 곡선을 나타내고 아래의 항목들에 해당하지 않는 것이다.

U curves

최대 killing이 40%이상 70%이하를 나타내는 U자 모양의 killing curve를 갖는 검체는 재검해야 한다. 만약 두번째 시험 결과가 첫번째 시험 결과와 같으면, 첫번째 시험 결과를 받아들인다. 만약 두번째 시험결과가 첫번째 시험결과와 3배보다 크게 차이하면, 그 검체는 세번째 시험을 한다. 만약 세번째 시험결과가 첫번째 혹은 두번째 시험결과와 같으면 (3배 이하의 차이), 첫번째 혹은 두번째 결과를 사용한다 (세번째 결과와 같은 결과 사용). 만약 세번째 결과가 앞의 두개의 시험결과 중 어떤 것과도 일치하지 않으면, OI는 "TND"로 표시한다.

N curves

가장 오른쪽 titer 지점의 최대 killing이 40%에서 70%사이인 N자 모양의 killing 곡선을 나타내는 검체는 재검해야 한다. 만약 두번째 시험 결과가 첫번째 시험 결과와 같으면, 첫번째 시험 결과를 받아들인다. 만약 두번째 시험결과가 첫번째 시험결과와 3배보다 크게 차이하면, 그 검체는 세번째 시험을 한다. 만약 세번째 시험결과가 첫번째 혹은 두번째 시험결과와 같으면 (3배 이하의 차이), 첫번째 혹은 두번째 결과를 사용한다 (세번째 결과와 같은 결과 사용). 만약 세번째 결과가 앞의 두개의 시험결과중 어떤 것과도 일치하지 않으면, OI는 "TND"로 표시한다.

Extraneous data

UAB-MOPA시험에서, 한 개의 검체에서 한 개의 혈청형에 대해서만 반복시험이 필요할 때가 종종 있다. 때때로, 우리는 재시험이 필요한 혈청형을 재시험 하기 위해서 그룹의 구성을 섞을 수 있다. 그러나 대부분의 경우, 우리는 반복할 필요가 없었던 혈청형들에 대해서 관련없는 반복 결과들을 얻는다. 이러한 상황에서는 위의 반복시험에 관한 규칙 (첫번째 시험, 두번째 시험, 세번째 시험 등)을 따른다.

Note 17: Barbital은 schedule IV로 관리되는 물질이므로 처방이 필요하다. Barbital은 상온에서 안전한 장소에 보관되어야 한다.

Note 18: Opsotiter3는 opsonophagocytic killing assay (특히 UAB MOPA format에 따른 시험)에서 얻은 결과를 분석하기 위해 개발한 Excel®에 기초한 프로그램이다. Colony 개수를 센 data를 프로그램에 붙인 후, opsotiter3는 linear interpolation algorithm을 사용해서 50%의 균을 killing하는 혈청의 희석배수를 결정하는 것으로 각 검체의 opsonic index를 측정한다. Opsotiter3는 모든 검체의 opsonic index를 표로 나타내고, 그 외에 시험자가 입력한 정보와 assay 정보를 간결한 report sheet에 넣어서, 시험과 관련된 정보를 관리하는 것을 도와준다. Opsotiter3는 또한 각 검체에 대한 point-to-point dose response curve를 만들어 준다.

Note 19: 우리는 optochin의 활성이 제조단위(lot)마다 다르다는 것을 발견하였다. 따라서, 새로운 batch는 충분한 효능이 있는지 검사해야 하고, 농도도 그에 따라 적절하게 조절해야 한다. 시험에 사용되는 농도의 1/2에서 민감한 혈청형을 죽이고, 2배의 농도에서 저항성있는 혈청형에 어떤 영향도 미치지 않는 농도를 선택해야 한다. 우리의 경험에 따르면, 시험에 사용되는 농도는 2 mg/mL에서 8 mg/mL로 다양하다. Optochin은 물에 8 mg/mL 녹을 수 있고, 1000X 용액으로 준비할 수 있다.

제목: 참고문헌

개정: 2008.2.1; 2013.8.1

9. 참고문헌

- 1) Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, and Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. Clin. Vacc. Immuno. 2006 Feb; 13(2):165-169.
- 2) Kim KH, Yu J, Nahm MH. Efficiency of a pneumococcal opsonophagocytic killing assay improved by multiplexing and by coloring colonies. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 Jul;10(4):616-21.
- 3) Burton RL and Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (UAB-MOPA) for pneumococcal antibodies. Clin. Vacc. Immuno. 2006 Sep; 13(9):1001-1009.
- 4) Fleck RA, Romero-Steiner S, and Nahm MH. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2005 Jan; 12(1):19-27.
- 5) Romero-Steiner S, et al. Multilaboratory evaluation of a viability assay for measurement of

opsonophagocytic antibodies specific to the capsular polysaccharides of streptococcus pneumoniae. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 Nov ; 10(6) :1019-1024.

6) Putman M, Burton RL, and Nahm MH. Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit. J. Immunol. Meth. 2005 July ; 302(1-2):99-102.

7) Burton RL, and Nahm MH. Development of a fourfold multiplexed opsonophagocytosis assay for pneumococcal antibodies against additional serotypes and discovery of serological subtypes in *Streptococcus pneumoniae* serotype 20. Clin Vaccine Immunol 2012;19:835-41.

제목: 자재 및 시약
 개정: 2008.2.1; 2012.9.20; 2013.8.1

10. 자재, 시약, 용액 및 기기

아래에 나열된 항목들은 UAB에서 사용하는 제조사와 catalog number이다. 다른 제조사의 해당하는 제품을 사용해도 괜찮을 것으로 생각되나, 다른 제품은 UAB에서 시험해 보지는 않았다.

A. 자재

항목	제조사	Catalog Number
Tissue culture flask, vent cap (T150, 150 cm ²)	Falcon	355000
Microtiter plate (round bottom, tissue culture treated, for UAB-MOPA protocol)	CoStar	3799
Microtiter plate (ELISA plate, flat bottom, for CH50 assay)	CoStar	9017
Small square Petri dish (10 cm x 10cm x 1.5 cm)	Nunc	4021
Large square Petri dish (12 cm x 12 cm x 1.5 cm)	VWR (Greiner Bio-One #688102)	82051-066
Sterile reagent reservoir*	CoStar	4870
Cryovial (2 mL, self standing)	VWR	66008-284
Microcentrifuge tubes (1.5 mL)	Fisher	05-406-16
Centrifuge tubes (50 mL)	Fisher	05-539-6
Centrifuge tubes (15 mL)	Corning	430790
Pipets (50 mL)	Falcon	357550
Pipets (25 mL)	Falcon	357535
Pipets (10 mL)	Falcon	357551

Pipets (5 mL)	Falcon	357543
Filter, 0.22 micrometer, syringe top	Millipore	SLGP033RS
Assorted pipet tips	Any	Any
Cotton-tipped applicators	General Medical Corp	24-806-25
Inoculation loops, disposable	Nunc	254437
Filter, 0.2 micrometer, bottle top	Millipore	SCGPT05RE
Glass bottles (1L, 500 mL, 250 mL, 100 mL)	Any	Any
Fiberboard boxes for freezing (2 inch)	Fisher	11-678-24A

B. 용액 및 시약

항목	제조사	Catalog Number
Penicillin/Streptomycin stock (100X)	Invitrogen	15140-148
GlutaMax-1 (100X)	Invitrogen	35050-061
RPMI 1640	CellGro	MT 10-040-CM
Bovine Serum (Fetalclone I, for HL60 cells)	HyClone	SH30080.03
Fetal Bovine Serum (defined FBS or premium FBS, for OBB)	HyClone or Atlanta Biologicals	SH30070.03 or 11150
10X HBSS (without Ca, Mg, phenol red)	Invitrogen	14185-052
10X HBSS (with Ca and Mg, without phenol red)	Invitrogen	14065-056
Baby Rabbit Complement (3-4 week, see complement section for lot acceptance criteria)	Pel-freez Biologicals (Rogers, AR, USA)	31061
Sheep blood (in alsevers solution)	Colorado Serum Company	CS1113

C. 균배양배지

항목	제조사	Catalog Number
Todd Hewitt Broth	Becton-Dickinson	249240
Yeast Extract	Becton-Dickinson	212750
Bacto Agar	Becton-Dickinson	214010
Blood Agar Plates	Remel	1202

D. 화학물질 (Chemicals)

항목	제조사	Catalog Number
Gelatin	Sigma	G-9391
Glycerol	Sigma	G-7893
N,N-dimethylformamide (DMF)	Fisher	D131-1
2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride (TTC)	Sigma	T-8877
Streptomycin sulfate	Sigma	S-6501
Optochin (Ethylhydrocupreine HCl)	Sigma	E-9876
Spectinomycin	Sigma	S-9007
Trimethoprim	Sigma	T-7883
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma	D-2650
Sodium azide	Sigma	S-2002
Calcium chloride	Sigma	C-4901
Magnesium chloride, 1M solution	Fluka	63020
Sodium chloride	Fisher	S271
Barbital sodium C-IV (see Note 17)	Sigma	B-0500
Hemolysin	Sigma	S-1389
Hydrochloric acid	Fisher	A144
Trypan blue solution (0.4%)	Sigma	T-8154

E. 기기 및 software

항목	제조사	Catalog Number
Assorted pipettors	Any	Any
Mini-orbital shaker (with rpmdisplay, you will need two; one at room temperature and one at 37 °C with 5% CO2)	Bellco Biotechnology	7644-20115
CO2 incubator, 37°C, 5% CO2, humidified	Thermo-Fisher	13-255-25
Water bath (56°C)	Any	Any
Water bath (50°C)	Any	Any
Water bath (37°C)	Any	Any
Microwave oven (1.65 kW)	General Electric	Model JES1358WJ01
Controlled-rate freezer	Thermo Forma	Cryomed Systems
Cryobiological storage system	Thermo Forma (or equivalent)	8031 (or equivalent)
Microcentrifuge	Kendro (or equivalent)	Biofuge fresco (or equivalent)

Water purification system	Millipore	Synergy 185
Laminar flow hood (biological safety cabinet)	Any	Any
Colony counting software	Synbiosis or NIST (See Note 11)	ProtoCOL or NICE (See Note 11)
Calculation programs	www.vaccine.uab.edu	www.vaccine.uab.edu
Autoclave	Any	Any
Computer (PC) with MS Excel®	Any	Any
Microplate reader (with 405 nm filter)	Bio-Tek Instruments	ELx808
Spectrophotometer (with 541 nm filter)	Bio-Rad	Smart Spec 3000
Centrifuge (with 15-ml and 50-ml tube adaptors and microplate carriers)	Kendro	RT7 Plus
Flow cytometer (with Cell Quest)	Becton Dickinson	FACS Caliber
Flow cytometry analysis software	DeNovo Software	FCS Express

F. 세포주

항목	제조사	Catalog Number
HL60 cell line	ATCC	CCL-240

G. 균주

항목	제조사	Catalog Number
R36A (항생제 시험에 사용)	ATCC	27336

UAB-MOPA에 사용되는 주요 혈청형의 균주는 BEI Resources로부터 이용할 수 있다

(www.beiresources.org):

BEI Catalog #	균주명	설명	참고문헌
NR-13388	SPEC1	Spectinomycin resistant variant of L82006 (serotype 1)	2
NR-31700	STREP2	Streptomycin resistant variant of DBL2 (serotype 2)	7
NR-13389	OREP3	Optochin resistant variant of Wu2 (serotype 3)	2
NR-13390	OREP4	Optochin resistant variant of DS2382-94 (serotype 4)	2
NR-13391	STREP5	Streptomycin resistant variant of DBL5 (serotype 5)	2
NR-13392	TREP6A	Trimethoprim resistant variant of EF6796 (serotype 6A)	2

NR-13393	SPEC6B	Spectinomycin resistant variant of BG25-9 (serotype 6B)	2
NR-20805	SPEC6C	Spectinomycin resistant variant of BGO-2197 (serotype 6C)	7
NR-20806	SPEC6D	Spectinomycin resistant variant of MNZ920 (serotype 6D)	7
NR-13394	OREP7F	Optochin resistant variant of DS2617-97 (serotype 7F)	2
NR-31701	STREP8	Streptomycin resistant variant of DS5675-06 (serotype 8)	7
NR-31702	SPEC9N	Spectinomycin resistant variant of DS1398-00 (serotype 9N)	7
NR-13395	EMC9V	Streptomycin resistant variant of 1081748 (serotype 9V)	2
NR-31703	OREP10A	Optochin resistant variant of DS3032-06 (serotype 10A)	7
NR-31705	TREP11A	Trimethoprim resistant variant of DS3160-06 (serotype 11A)	7
NR-31704	TREP12F	Trimethoprim resistant variant of DS4031-06 (serotype 12F)	7
NR-13396	STREP14	Streptomycin resistant variant of DS2214-94 (serotype 14)	2
NR-33666	TREP15B	Trimethoprim resistant variant of DS0556-97 (serotype 15B)	7
NR-31706	OREP17F	Optochin resistant variant of DS3022-06 (serotype 17F)	7
NR-13397	OREP18C	Optochin resistant variant of GP116 (serotype 18C)	2
NR-13398	TREP19A	Trimethoprim resistant variant of DS3519-97 (serotype 19A)	2
NR-13399	SPEC19F	Spectinomycin resistant variant of 2217-94 (serotype 19F)	2
NR-33664	SPEC20B	Spectinomycin resistant variant of DS3014-06 (serotype 20B)	7
NR-31707	TREP22F	Trimethoprim resistant variant of DS3433-06 (serotype 22F)	7
NR-13400	EMC23F	Clinical isolate (1212458), naturally resistant to trimethoprim (serotype 23F)	2
NR-33665	STREP33F	Streptomycin resistant variant of DS3052-06 (serotype 33F)	7

H. Flow Cytometry에 사용되는 시약

항목	제조사	Catalog Number
Anti-human CD11b PE	BDIS	555388
Anti-human CD35 PE	BDIS	559872
Anti-human CD71 PE	BDIS	555537
IgG1 PE Isotype	BDIS	556650

IgG2a PE Isotype	BDIS	555574
Propidium Iodide Solution	Sigma	P4864
Annexin V FITC	BD Pharmingen	51-65874X
10X Annexin V Binding Buffer	BD Pharmingen	51-66121E
Microtiter plate (V-bottom)	Nunc	249570
FACS tubes	Falcon	352008

I. 용액 제조 방법

물

용액 제조에 사용되는 물은 ultrapure water이어야 한다.

CM1(HL60 세포 증식에 사용되는 세포배양배지)

RPMI1640 1 L에 FetalClone I (56°C에서 30분간 heat-inactivated된 것) 114 mL, GlutaMax-1 11.4 mL 와 penicillin/streptomycin stock 11.4 mL를 넣는다. 원하는 경우 penicillin/streptomycin은 넣지 않을 수 있다.

CM2 (HL60 세포 분화에 사용되는 세포배양배지)

RPMI1640 1 L에 FetalClone I (56°C에서 30분간 heat-inactivated된 것) 114 mL, GlutaMax-1 11.4 mL DMF 9.1 mL를 넣는다. **Penicillin/streptomycin은 넣지 않아야 한다.**

CM3 (저온보관되어있던 HL60세포의 회복을 위한 세포배양배지)

RPMI1640 1 L에 FetalClone I (56°C에서 30분간 heat-inactivated된 것) 256 mL, GlutaMax-1 12.8 mL penicillin/streptomycin stock 12.8 mL를 넣는다. 원하는 경우 penicillin/streptomycin은 넣지 않을 수 있다.

Todd-Hewitt-Yeast broth (THYB)

멸균된 1 L 유리병에 물 1000 mL를 넣고 Todd-Hewitt broth 30 g과 yeast extract 5 g을 넣는다. 완전히 녹을때까지 섞어준다. 0.22 µm bottle top filter를 이용하여 멸균된 1 L 유리병에 멸균여과를 한다. 4°C에 보관한다. Note 14를 참고.

Todd-Hewitt-yeast extract agar plate (THYA plate)

Autoclave를 할 수 있는 500 mL 유리병에 물 400 mL를 넣고 Todd-Hewitt broth 12 g, yeast extract 2 g 과 Bacto agar 6 g을 넣는다. Autoclave한 후 water bath에 넣고 56°C로 식힌다. 수평이 맞춰진 표면에서 square Petri dish (~12 cm x ~12 cm)에 25 mL pipet을 사용하여 25 mL를 넣고 상온에서 20분간 둔다. Plastic bag에 넣고 밀봉하여 4°C에서 한달까지 보관할 수 있다.

Overlay agar

Autoclave를 할 수 있는 1 L 유리병에 물 800 mL를 넣고 Todd-Hewitt broth 24 g, yeast extract 4 g과 Bacto agar 6 g을 넣는다. Autoclave한 후, 상온에서 보관한다. 또는, overlay agar를 실험하는 당일에 만들어서 autoclave하고, 사용할때까지 50°C water bath에 보관할 수도 있다. (50°C로 되도록 하기 위해서 적어도 water bath에서 1-2시간은 두어야 한다.)

TTC stock

TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 1.25 g을 물 40 mL에 넣어 25 mg/mL (1000X) stock solution을 준비한다. 녹인 후, 물을 50 mL까지 넣고 0.2 µm filter로 멸균여과 한다. 4°C에서 보관한다. TTC 용액은 연노랑색이어야 한다. 만약 붉은색이 나타나면 버리고 새로운 stock을 만든다. TTC는 균 colony에 색을 나타내게 하여 colony의 개수를 세는 것을 용이하게 도와준다.

Streptomycin stock

항생제 3 g을 물 5 mL에 넣어서 300 mg/mL (1000X) stock solution을 준비한다. 녹인 후, 전체 양이 10 mL가 되도록 물을 더 넣고 0.2 µm filter로 멸균여과 한다. 1 mL씩 분주하여 -20°C에 3개월까지 보관한다.

Optochin stock

Note 19를 참고한다 (현재 사용하는 optochin lot은 8 mg/mL로 사용한다). 항생제 80 mg을 물 5 mL에 넣어 8 mg/mL (1000X) stock용액을 만든다. 녹인 후, 전체 양이 10 mL가 되도록 물을 더 넣고 0.2 µm filter로 멸균여과 한다. 1 mL씩 분주하여 -20°C에 3개월까지 보관한다.

Trimethoprim stock

항생제 250 mg을 DMSO 5 mL에 넣어 25 mg/mL (1000X) stock 용액을 만든다. 녹인 후, 전체 양이 10 mL가 되도록 DMSO를 더 넣고 0.2 µm filter로 멸균여과 한다. 1 mL씩 분주하여 -20°C에 3개월까지 보관한다.

Spectinomycin stock

항생제 3 g을 DMSO 5 mL에 넣어 300 mg/mL (1000X) stock 용액을 만든다. 녹인 후, 전체 양이 10 mL가 되도록 DMSO를 더 넣고 0.2 µm filter로 멸균여과 한다. 1 mL씩 분주하여 -20°C에 3개월까지 보관한다.

1% sterile gelatin solution

Gelatin 1 g을 물 100 mL에 넣는다. Autoclave하여 상온에서 보관한다.

약 80% glycerol

물 20 mL와 glycerol 100 g을 섞는다. Autoclave하여 상온에서 보관한다.

Opsonization Buffer B (OBB)

멸균된 물 80 mL, 10X HBSS (with Ca⁺⁺/Mg⁺⁺), 1% gelatin 10 mL와 FBS (56°C에서 30분간 heat-inactivation 한것) 5.3 mL를 섞는다. **이 버퍼는 하루동안만 사용한다.**

1X HBSS (Hanks' balanced salt solution)

10X HBSS stock 10 mL를 멸균된 물 450 mL에 넣고 섞는다.

10% (w/v) Sodium Azide

물 40 mL에 NaN₃ 5 g을 넣는다. 완전히 녹은 후에 물을 50 mL까지 넣는다.

10X PBS (with azide)

물 800 mL에 아래의 표와 같이 시약을 넣는다. 완전히 용해된 후, 1 L까지 물을 넣는다. PBS는 FACS분석을 위해서만 사용하고, azide가 들어있기 때문에 균배양에는 사용하지 않는다.

분말화학물질 (Dry chemical)	무게 (grams)
NaCl	80.00
KH ₂ PO ₄	3.14
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	20.61
KCl	1.60
NaN ₃	10.00

1X PBS (with azide)

10X PBS (with azide) 100 mL를 물 900 mL에 넣는다.

FACS Buffer (with azide)

10X PBS (with azide) 100 mL, FBS (heat-inactivated) 30 mL와 물 870 mL를 섞는다.

Calcium Chloride (0.3M)

물 40 mL에 CaCl₂ 1.66 g을 넣는다. 완전히 용해된 후, 50 mL까지 물을 넣는다.

Sodium Chloride (0.9%)

물 200 mL에 NaCl 2.25 g을 넣는다. 완전히 용해된 후에 물을 250 mL까지 넣는다.

5X Gelatin veronal buffer (GVB)

1 L 유리병에 물 750 mL, NaCl 41.5 g, Barbitol sodium C-IV 5.1 g (Note 1 참고), gelatin 5 g을 넣는다. Stir bar를 넣고 약 90°C로 가열된 magnetic stirrer위에 병을 놓는다. 모든 시약이 녹은 후에 (약 30-60분정도), 가열을 중지하고 10% NaN₃ 2 mL, 0.3M CaCl₂ 1 mL, 1M MgCl₂ 2 mL를 넣는다. 용액이 상온으로 식은 후에, 용액을 섞은 후 pH를 확인한다 (pH는 9정도 일 것이다). 6M HCl로 용액의 pH를 7.35±0.05로 맞춘다 (2.5 mL정도의 HCl이 들어갈것임). 물을 1 L까지 넣는다.

상온에서 한 달까지 보관한다.

1X Gelatin veronal buffer (GVB)

유리병에 5X GVB 100 mL와 물 400 mL를 넣는다.

11. 세포 계수 (Cell Counting)

1. Sample 10 μ L와 trypan blue 용액 40 μ L를 섞어서 5배 희석된 sample을 준비한다.
2. 혈구계 (Hemocytometer)의 counting chamber에 희석된 sample을 넣는다. Chamber가 넘치도록 sample을 넣지 않아야 한다.
3. Hemocytometer의 눈금이 있는 9개의 구획 중에서, 정가운데 구획과 각 corner의 4개 구획에 있는 살아있는 세포 (trypan blue로 염색되지 않은 세포)의 개수와 죽은 세포(trypan blue로 염색된 세포)의 개수를 센다. Assay cover sheet에 세포의 개수를 입력한다.
4. 세포의 농도를 계산한다
$$\text{세포수/mL} = (\text{5개 구획의 전체 세포수}) \times 10^4$$