

## 피막 다당류 6B-단백질 복합체를 이용한 폐렴구균에 대한 Multibead Assay의 안정성 향상

김지혜 · 임낙룡<sup>1</sup> · 박문국<sup>2\*</sup>

전북대학교 기초과학연구소, <sup>1</sup>전북대학교 사범대학 과학교육학부, <sup>2</sup>전북대학교 자연과학대학 생물과학부

폐렴구균의 혈청형 판별법인 multibead assay에서 사용하는 미세구슬 표면에 코팅한 다당류의 안정성을 높이기 위한 방안을 연구하였다. 폐렴구균 피막 다당류 6B에 bovine serum albumin (BSA)을 결합시킨 다당류-단백질 복합체로 코팅했을 경우와 기존의 방법인 다당류만으로 코팅했을 경우의 코팅 효율과 미세구슬 표면에서의 6B 안정성을 비교하였다. 다당류 6B-BSA 복합체를 사용했을 경우에 코팅 효율은 약 200 배 증가하였으며, 미세구슬 표면에서의 6B 안정성도 증가하여, 한번 코팅 후 미세구슬을 사용할 수 있는 기간이 3 일에서 30 일 이상으로 연장될 수 있음을 확인하였다.

**Key words** □ 6B-BSA, multibead assay, serotyping, *Streptococcus pneumoniae*

폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 중이염, 폐렴, 폐혈증과 뇌막염을 일으키는 사람의 주요 병원체로서, 세균 세포를 둘러싸고 있는 피막 다당류의 구조가 다른 90 가지 혈청형들이 알려져 있다. 폐렴구균의 여러 성질들이 혈청형과 연관되어 있다. 사람과 생쥐에 대한 병원성이 혈청형과 연관되어 있으며, 항생제 내성균 발생 빈도도 혈청형과 연관되어 있다(1,7). 이 세균 감염을 예방할 수 있는 효율적인 백신을 개발하기 위한 연구들이 오래 전부터 진행되어 왔으며, 피막 다당류에 대한 항체가 이 세균 감염을 예방할 수 있는 것으로 밝혀져 있다(3,11). 하나의 백신에 모든 혈청형의 피막 다당류들을 포함시킬 수 없는 기술적 한계 때문에, 효율적인 다가백신(polyvalent vaccine)의 개발에는 백신에 포함할 혈청형들의 선택이 주요한 문제가 된다. 감염 비율이 높은 혈청형들을 선정하기 위해서, 많은 임상 분리 균주들의 혈청형을 쉽게 판별할 수 있는 방법이 필요하다. 또한 기존의 혹은 새롭게 개발되고 있는 백신의 효과를 측정하기 위해서도 효율적인 혈청형 판별법의 개발이 필요한 시점이다.

현재 표준 방법으로 사용되고 있는 Neufeld 시험(12)을 포함해서 여러 가지 방법들이 폐렴구균의 혈청형 판별을 위해 고안되어 있다(4-6). 하지만, 기존 방법의 대부분은 많은 시료들을 분석하기에는 적합하지 않은 단점들을 가지고 있다. 이들은 특이성이나 민감도가 낮을 뿐만 아니라, 혈청형 판별 과정에 많은 시간과 노력이 소요되고, 결과 해석이 용이하지 않은 경우가 많다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해서 폐렴구균의 15 가지 혈청형을 동시에 판별할 수 있는 multibead assay가 개발되었다(8). 15 종의 다른 피막 다당류 항원을 각기 코팅시킨 15 종류의 미세구슬

(microbead) 표면에서의 항원-항체 반응을 유세포분석기(flow cytometer)로 분석하는 이 방법은 15 종류의 혈청형을 동시에 판별할 수 있어서 다량의 시료 분석에 대단히 유용한 방법이다. 하지만 이 방법도 미세구슬에 코팅하는 15 가지 다당류 중 6B 다당류 항원의 안정성이 낮아서, 매 실험마다 다당류 코팅을 반복해야 하는 단점을 가지고 있다. 구슬에 코팅된 다당류 항원의 안정성이 확보된다면, 이 방법은 여러 가지 혈청형들을 동시에 판별할 뿐만 아니라, 특이성과 민감성이 대단히 높아서, 폐렴구균의 혈청형 판별에 널리 활용될 수 있을 것이다.

본 연구는 multibead assay에 사용되는 6B 피막 다당류의 미세구슬 표면에서의 안정성을 증진시키기 위하여 수행되었다. 이를 위해서 polystyrene 표면에 잘 흡착하는 bovine serum albumin (BSA)을 6B 다당류에 결합시키고, 미세구슬 표면에서의 6B-BSA 복합체의 안정성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 6B-BSA의 준비

6B-BSA 복합체는 1-cyano-4-methylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP: Sigma, St. Louis, USA)를 이용하는 방법(10)으로 다음과 같이 마련하였다. 1 ml의 6B 용액(1 mg/ml)에 100 µl의 CDAP 용액(1 mg/ml)을 첨가하고, 30 초 후에 110 µl의 0.1 M sodium borate buffer (pH 10)를 첨가하고 1 분 동안 잘 섞었다. 0.1 M sodium borate buffer (pH 9.0)에 녹인 BSA 용액(10 mg/ml) 1 ml를 첨가하고 실온에서 3 시간 반응시킨 다음, 1 M ethanalamine (pH 9.0) 200 µl를 첨가하고 1 시간 동안 반응시켰다. 6B-BSA를 부착하지 않은 BSA로부터 분리하기 위하여, 반응 용액을 Sephacryl 300 column에 통과시켰다. 각 분획의 단

\*To whom correspondence should be addressed.  
TEL: 063-270-2787, Fax: 063-270-3362  
E-mail: mkpark@moak.chonbuk.ac.kr

백질 농도와 6B 농도를 측정하여 6B-BSA 분획을 확인하였다.

단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도 또는 BSA를 표준 물질로 사용하여 protein-dye binding assay (2)로 측정하였다. 6B 또는 6B-BSA 농도는 inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하였다. 분획에 존재하는 용액상의 6B 혹은 6B-BSA가 microtiter well에 코팅된 6B에 대한 항-6B 항체의 결합을 저해하는 원리를 이용하였다. 항-6B 항체로는 mouse anti-6B IgM monoclonal antibody인 M7 (Dr. Moon Nahm, University of Alabama, Birmingham, USA)을, 2차 항체로는 anti-mouse IgM-alkaline phosphatase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA)를, 기질로는 *p*-nitrophenyl phosphate (NPP)를 사용하였다. 각 분획의 6B 또는 6B-BSA의 농도는 405 nm에서의 흡광도를 측정하고, 그 값을 표준 용액의 흡광도와 비교하여 계산하였다.

### 6B-BSA의 microtiter plate에서의 코팅 효율 시험

6B와 6B-BSA의 polystyrene 표면에서의 코팅 효율을 비교하기 위해서, polystyrene microtiter plate (Nalge Nunc International, Rochester, USA)에 여러 농도의 6B 또는 6B-BSA를 처리하고, 코팅된 정도를 ELISA 방법으로 비교하였다. Phosphate buffered saline (PBS)에 희석한 여러 농도의 6B와 6B-BSA를 microtiter plate well에 넣고 4°C에서 12 시간 방치하여 코팅하였다. 코팅된 well에 일정량의 M7 항체를 첨가하고, 실온에서 2 시간 동안 방치하여 반응시켰다. 코팅된 항원에 결합한 M7 항체는 anti-mouse IgM-alkaline phosphatase (Southern Biotechnology Associates)와 NPP를 사용하여 검출하였다.

### 6B-BSA의 microbead 표면에서의 안정성 시험

6B (5 µg/ml in PBS containing 0.05% sodium azide) 또는 6B-BSA (5 µg 6B/ml in PBS containing 0.05% sodium azide) 용액에 polystyrene 미세구슬(Bangs laboratory, Fisher, USA; dia. 4.80 µm)을 0.1% (w/v)가 되게 첨가하고, 실온에서 12 시간 진탕 배양함으로써 미세구슬에 항원을 코팅하였다. 코팅된 미세구슬은 4°C에 보관하면서 일정 시간이 경과했을 때, 다음과 같이 실험하여 코팅의 안정성을 조사하였다. 원심분리하여(1,000×g, 10 min) 코팅된 미세구슬을 모으고 100 배 부피의 세척액(0.05% Tween 20, PBS)에 미세구슬을 현탁시킨 다음, 다시 원심분리하여 상등액을 제거함으로써 미세구슬에 부착되지 않은 항원을 제거하였다. 미세구슬을 봉쇄액(1% BSA, 0.05% Tween 20, PBS)에 현탁하고, 30 분간 진탕 배양하여 비특이적 결합부위를 봉쇄하였다. 원심분리로 다시 모은 미세구슬에 100 배 부피의 rabbit antiserum pool PT 용액(8)을 첨가하고 실온에서 30 분간 배양하였다. 미세구슬을 위의 방법으로 한 차례 세척한 다음, 봉쇄액에 50 배 희석한 fluorescein-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (Southern Biotechnology Associates)을 100 배 부피로 넣고 실온에서 30 분간 배양하였다. 배양 후 세척한 미세구슬을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 현탁해서 유세포분석기(FACSCalibur: Becton Dickinson, San Jose, USA)로 forward scatter와 녹색형광

을 측정하였다. 측정 자료는 CellQuest 프로그램(Beckton Dickinson)으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 6B-BSA의 제조

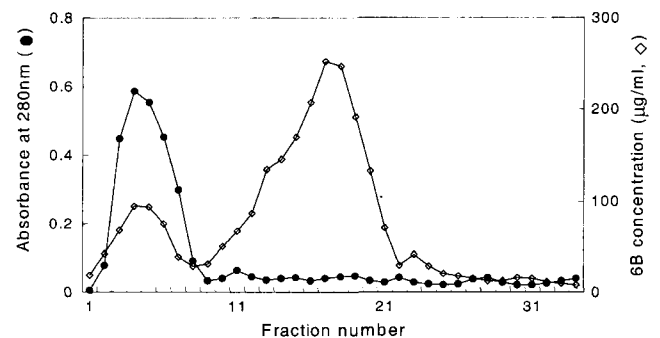
다당류를 단백질에 공유결합으로 연결시키기 위해 유기 시아닐화 시약(organic cyanylating reagent)인 CDAP를 사용하였다. CDAP는 이 목적으로 널리 이용되는 cyanogen bromide 보다도 독성이 낮아 사용하기 용이하고 부산물 생성이 낮은 것으로 알려져 있다(10). CDAP에 의해 형성된 6B-BSA 복합체는 Sephacryl S-300 column에 의해 쉽게 BSA로부터 분리할 수 있었다(Fig. 1). 분획 3-6 번을 합쳐서 6B-BSA 복합체 용액으로 사용하였다. 6B-BSA 복합체 용액의 6B에 대한 단백질 비율은 9%이었으며, 전체 과정에서 6B의 회수율은 85%이었다.

### 6B-BSA의 코팅 효율

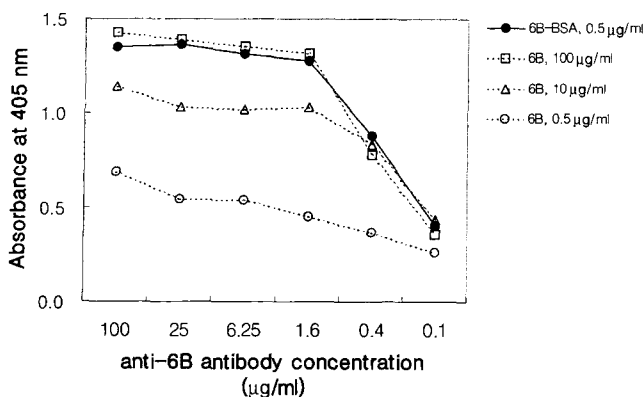
6B-BSA와 6B의 polystyrene 표면에서의 코팅 효율을 비교하기 위해서, 여러 농도의 6B-BSA와 6B로 코팅한 polystyrene microtiter well을 M7 항체를 이용한 ELISA로 분석하였다. 0.5 µg/ml의 6B-BSA로 코팅한 경우가 100 µg/ml의 6B로 코팅한 경우와 비슷한 결과를 보여, 6B-BSA가 6B에 비해 200 배 정도 코팅 효율이 높은 결과를 얻었다(Fig. 2). 이는 6B-BSA 복합체의 BSA 부분이 가지는 polystyrene 표면에서의 높은 부착성 때문으로 생각된다. 아울러 6B-BSA 복합체가 anti-6B 항체인 M7과의 반응성을 유지한다는 점을 확인하였다.

### 6B-BSA의 안정성

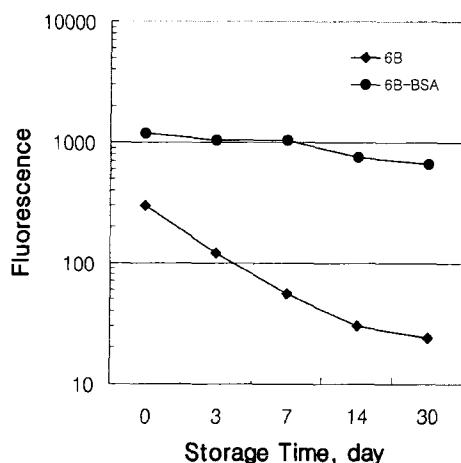
6B-BSA와 6B로 코팅한 polystyrene 미세구슬을 사용할 수 있는 기간을 측정하기 위해, 코팅된 미세구슬을 4°C에서 보관하면서 일정 시간이 지난 미세 구슬을 사용하여 각 미세구슬로부터 얻을 수 있는 신호의 크기를 유세포분석기로 측정하였다(Fig. 3). 5 µg/ml의 6B-BSA와 6B로 각각 코팅한 미세 구슬로부터 얻을 수 있는 녹색 형광의 평균 크기는 코팅 첫째 날(storage time 0)



**Fig. 1.** Elution profile of 6B-BSA preparation. Two ml of reaction mixture was applied to a Sephacryl S-300 column (1.5×90 cm) and eluted with 0.9% NaCl at a flow rate of 20 ml/h. Fraction size was 2.5 ml.



**Fig. 2.** Coating efficiency of 6B or 6B-BSA on polystyrene surface. Several concentrations of 6B or 6B-BSA were coated on the wells of a polystyrene microtiter plate and the ability of each well to attach an anti-6B monoclonal antibody (M7) was measured.



**Fig. 3.** Stability of 6B or 6B-BSA on microbead surface during storage of the microbeads at 4°C. Microbeads were coated with 6B or 6B-BSA and stored at 4°C for different time intervals. And then the microbeads were analyzed for their ability to attach polyclonal anti-6B antibodies by flow cytometry.

에 1200(임의 단위)과 300(임의 단위)으로서 4 배의 차이가 있었다. 6B-BSA로 코팅한 미세구슬의 경우에는, 30 일 동안 보관했을 때 녹색형광이 660으로서 45%의 녹색형광이 감소하였다. 6B로 코팅한 미세 구슬의 경우에는, 30 일 후에 92%의 녹색형광이 감소하였다. Multibead assay에서 사용할 수 있는 녹색형광의 최저 한계치는 100(임의 단위) 정도이기 때문에, 6B로 코팅한 미세구슬의 보관 한도는 3 일이며, 6B-BSA로 코팅한 미세구슬의 보관은 30 일 이상 가능한 것으로 나타났다. 이에 따라 6B-BSA로 코팅할 경우 multibead assay에 사용할 수 있는 미세구슬의 수명을 10 배 이상 증가시킬 수 있다는 것으로 판단된다.

Multibead assay에서는 15 종류의 미세구슬에 15 종류(혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F)의 피막 다당류를 하나씩 코팅하여 사용한다(8). 기존의 방법은 각 미세구슬에 단순 흡착의 방법으로 코팅하여 사용하였다. 이렇게 코팅된 다당류 중에서 특히 6B 다당류는 미세구슬 표면에서

의 안정성이 부족하여 4°C에 보관했을 때 3 일 정도밖에 사용할 수 없었다. 이는 6B 다당류 분자가 가지는 강한 친수성 때문에 라텍스 표면에 결합하는 성질이 약하기 때문으로 생각된다. 다당류 분자를 구슬에 강하게 부착시키는 방법으로는 우선 특정 작용기를 가지는 미세구슬에 다당류 분자를 공유결합으로 부착시키는 방법을 생각할 수 있으나, 작용기를 가지는 미세구슬의 단가가 비싸서 비용이 많이 드는 결점이 있다. 본 실험에서는 polystyrene 표면에 강하게 흡착하는 물질로 알려져 있는 BSA를 6B에 공유결합으로 연결하여 6B-BSA 복합체를 만든 다음, 이 복합체의 anti-6B 항체와의 반응성을 ELISA로 확인하였고, 또한 미세구슬에 코팅하여 코팅의 안정성을 시험하였다. 미세구슬에 코팅된 6B-BSA 복합체는 1달 이상 안정성을 유지할 수 있는 것으로 나타나서, multibead assay의 편의성을 크게 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 말

이 논문은 2000년도 전북대학교의 지원 연구비와 한국과학재단 목적기초연구(RO5-2002-000-01227-0)지원으로 수행되었음.

## 참고문헌

- Alonso De Velasco, E., A.F. Verheul, J. Verhoef, and H. Snippe. 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* 59, 591-603.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Butler, J.C., R.F. Breiman, J.F. Campbell, H.B. Lipman, C.V. Broome, and R.R. Facklam. 1993. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. *J. Amer. Med. Assoc.* 270, 1826-1831.
- Fenoll, A., A. Jado, D. Vicioso, and J. Casal. 1997. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* 35(3), 764-766.
- Holliday, M.G. 1981. Pneumococcal typing by polyvalent counter-immunoelectrophoresis. *J. Imm. Methods* 46, 243-249.
- Kaldor, J., R. Aszniewicz, and R. Dwyer. 1988. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by latexagglutination. *Pathology* 20, 45-47.
- Nesin, M., M. Ramirez, and A. Tomasz. 1998. Capsular transformation of a multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in vivo. *J. Infect. Dis.* 177, 707-713.
- Park, M.K., D.E. Briles, and M.H. Nahm. 2000. A latex bead-based flow cytometric immunoassay capable of simultaneous typing of multiple pneumococcal serotypes (Multibead assay). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 486-489.
- Rennels, M.B., K.M. Edwards, H. Keyserling, K.S. Reisinger, D.A. Hogerman, D.V. Madore, I. Chang, P.R. Paradiso, F.J. Malinoski, and A. Kimura. 1998. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatrics* 101, 604-611.
- Shafer, D.E., B. Toll, R.F. Schuman, B.L. Nelson, J.J. Mond, and A. Lees. 2000. Activation of soluble polysaccharides with 1-

- cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. *Vaccine* 18, 1273-1281.
11. Shapiro, E.D., A.T. Berg, R. Austrian, D. Schroeder, V. Parcells, A. Margolis, R.K. Adair, and J.D. Clemens. 1991. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* 325, 1453-1460.
12. Sorensen, U.B.S. 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2097-2100.

(Received November 18, 2002/accepted December 27, 2002)

---

**ABSTRACT : Improvement of the Stability of the Multibead Assay for Pneumococci by the Use of 6B-protein Complex**

**Jihye Kim, Nac Ryong Rim<sup>1</sup>, and Moon Kook Park<sup>2\*</sup>** (Basic Science Research Institute, <sup>1</sup>Faculty of Science Education, <sup>2</sup>Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

A procedure to increase the stability of 6B capsular polysaccharide on microbead surface in the multibead assay, a serotyping method for *Streptococcus pneumoniae*, was studied. Pneumococcal capsular polysaccharide 6B was conjugated to bovine serum albumin (BSA), and the coating efficiency and the stability of the 6B-BSA complex was measured. The 6B-BSA complex showed about 200-fold higher coating efficiency to polystyrene surface than 6B polysaccharide. And the stability of the 6B-BSA on polystyrene microbead surface was much higher than that of 6B, which permitted the microbeads coated with 6B-BSA to be used in the multibead assay for 30 days after coating.