

헤모글로빈 측정을 위한 맞춤형 분석법

NanoDrop One 분광광도계 사용

Abstract

Thermo Scientific™ NanoDrop™ 마이크로볼륨 UV-Vis 분광광도계는 1–2 µL의 미량 시료를 사용하여 핵산과 단백질 안정적으로 측정하기 위해 오랫동안 사용되었습니다. NanoDrop 분광 광도계는 다른 많은 응용 분야에도 사용할 수 있습니다. 이 어플리케이션 노트는 NanoDrop One/OneC 분광광도계를 사용하여 맞춤형 방법(custom method)으로 헤모글로빈을 측정하는 방법에 대해 설명합니다.

Introduction

헤모글로빈(Hemoglobin)은 전신의 조직으로 산소를 운반하고 조직에서 CO₂를 운반하는 적혈구에서 발견되는 4량체(tetrameric) 단백질입니다 [1]. 헤모글로빈은 산소와 가역적으로 결합할 수 있으며 일반적으로 환원된 상태의 철(Fe²⁺)을 포함합니다.

철이 Fe³⁺ 상태로 산화되면 헤모글로빈이 메트헤모글로빈(Methemoglobin)으로 전환되어 더 이상 산소와 결합할 수 없습니다 [2]. 메트헤모글로빈이 과다한 경우, 메트헤모글로빈혈증이 나타날 수 있습니다.

분광 광도계는 적절한 흡광 계수 및 피크 흡광도 값을 사용하여 다양한 형태의 헤모글로빈을 정량화하는데 사용할 수 있습니다. 옥시헤모글로빈(Oxyhemoglobin)은 결합된 산소를 포함하고 있으며 414nm, 541nm 및 576nm에서 흡광도 피크를 나타냅니다 [3]. 디옥시헤모글로빈(Deoxyhemoglobin)은 결합된 산소를 포함하지 않으며 431nm에서 흡광도 피크를 나타냅니다.



메트헤모글로빈은 Fe³⁺ 상태의 철 함유로 인해 산소와 결합할 수 없으며 406nm에서 흡광도 피크를 나타냅니다 [4].

용혈(hemolysis)에 대한 혈장 또는 혈청 샘플을 평가하기 위해 분광광도계를 사용할 수도 있습니다. 용혈은 적혈구 세포막이 파괴되어 헤모글로빈 및 기타 세포내 성분이 주변 혈청 또는 혈장으로 방출될 때 발생합니다 [5].

용혈의 예측은 실험 정확도에 영향을 줄 수 있으므로 매우 중요합니다. 분광광도계는 414nm에서 혈장 또는 혈청 샘플의 흡광도를 사용하여 용혈을 평가하는 데 사용할 수 있습니다. 414nm에서 상승된 흡광도는 증가된 유리 옥시헤모글로빈과 관련이 있습니다[3, 6].

분광광도계는 시료의 총 흡광도를 측정하는 장비입니다. 관심있는 분석물질과 다른 구성요소들이 동일한 파장에서 흡수된다면 각각을 구별할 수 없다는 점을 염두해야 합니다. 그러므로 분광광도계를 이용한 혈장(Plasma)의 헤모글로빈을 측정은 증가된 빌리루빈 수치, 혈장 단백질, 알부민, 지질 및 기타 흡수 성분의 간섭을 받을 수 있습니다 [5].

전혈에서 헤모글로빈을 정량하려면 Drabkin 시약을 사용하여 540nm에서 비색 분석을 할 수 있습니다. 비색 분석을 위해 사용자는 NanoDrop One/OneC 분광광도계에서 분석에 대한 맞춤형 방법을 설정할 수 있습니다.

Experimental Procedures

406 nm, 414 nm, 431 nm, 541 nm 및 576 nm에서 헤모글로빈의 흡광도를 측정하기 위해 NanoDrop One/OneC 기기에 대한 맞춤형 방법이 만들어졌습니다.

이 방법은 흡광 계수 524,280 M⁻¹cm⁻¹ 및 분자량 64.5 kDa를 사용하며, 옥시헤모글로빈(oxyhemoglobin) 농도를 계산하기 위해 414 nm에서 분석을 진행합니다 [7].

또한 디옥시헤모글로빈(deoxyhemoglobin)의 농도를 측정하기 위해, 431 nm에서 552,160 M⁻¹cm⁻¹의 흡광 계수 및 64.5 kDa의 분자량을 사용한 추가 계산식을 포함합니다 [7]. 이 방법은 모니터링할 파장 541nm 및 576nm를 포함하는데, 이는 옥시헤모글로빈이 이러한 파장에서 흡광도 피크를 나타내기 때문입니다 [5].

Custom Method Download

1. www.thermofisher.com/nanodrop으로 이동합니다.
2. "소프트웨어 업데이트"를 선택합니다.
3. "NanoDrop One/OneC 소프트웨어 설치" 탭을 선택합니다.
4. "로컬 제어 소프트웨어 다운로드 지침"을 선택합니다.
5. "NanoDrop One/OneC 사용자 지정 방법을 추가하는 방법"으로 스크롤합니다.
6. "옥시헤모글로빈 분석법/Oxy-hemoglobin Method"를 클릭합니다.
7. 맞춤 방법 파일의 압축을 풀고 .method 파일을 USB 장치에 복사한 다음 장비의 "Custom Method" 로 들어간 후 "import" 버튼을 클릭하여 분석법을 추가합니다.

이 방법은 메트헤모글로빈을 모니터링하기 위한 파장 406 nm를 포함합니다. 전체 스펙트럼에 대해 750nm의 베이스라인 보정과 360-500nm의 경사 베이스라인 보정을 기반으로 한 분석 파장 보정이 포함되었습니다.

헤모글로빈 맞춤형 방법은 MP Biomedicals, LLC (catalog# 100714, lot# 7541J) 에서 구입한 헤모글로빈을 사용하여 검증되었습니다. MP Biomedicals를 통해 사용할 수 있는 헤모글로빈 제제는 주로 메트헤모글로빈일 수 있으며 헤모글로빈의 철은 공기에 의해 쉽게 산화되기 때문에 산소와 결합할 수 없습니다.

시약 등급의 물을 사용하여 헤모글로빈 표준용액 Stock 을 8mg/mL로 준비했습니다. 그런 다음 희석을 통해 4 mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL 및 0.125mg/mL의 표준을 만들었습니다. 물로 Blank를 측정 한후에, NanoDrop One/OneC 분광광도계에서 옥시 헤모글로빈 분석법(Oxy-hemoglobin Custom Method) 을 사용하여 각 표준을 5회 반복 측정 했습니다.

Results

각 헤모글로빈 표준은 헤모글로빈 맞춤형 방법을 사용하여 NanoDrop One 기기에서 5회 반복 측정되었습니다. 각 솔루션의 5회 반복 실험을 기반으로 한 표준 편차는 0.015-0.552A 범위였습니다. 각 솔루션의 변동 계수는 0.61-2.79% 범위였습니다.

	Average A406 n=5	Standard Deviation n=5	%CV
Solution 1	44.493	0.487	1.09
Solution 2	22.846	0.552	2.41
Solution 3	11.127	0.068	0.61
Solution 4	5.549	0.058	1.05
Solution 5	2.660	0.019	0.71
Solution 6	1.245	0.035	2.79
Solution 7	0.579	0.015	2.66

표 1. NanoDrop One/OneC에서 헤모글로빈 맞춤형 방법을 사용하여 측정된 헤모글로빈 표준용액에 대한 결과

Conclusion

이 애플리케이션 노트에 설명된 헤모글로빈 맞춤형 방법을 사용하여 NanoDrop One/OneC 분광광도계에서 옥시헤모글로빈 및 디옥시헤모글로빈 농도를 측정할 수 있습니다. 또한 필요에 따라 샘플이 용혈될 수 있는지

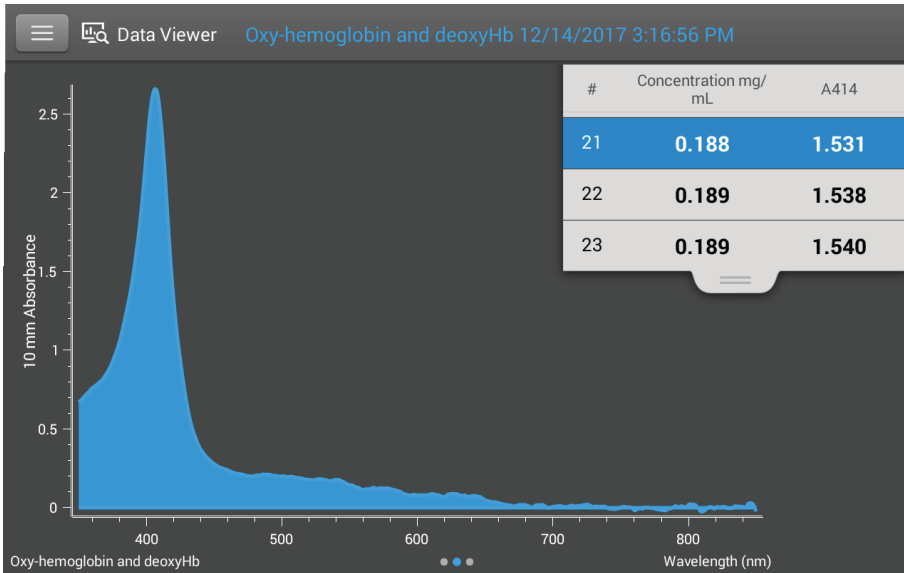


그림 1. NanoDrop One에서 측정된 메트헤모글로빈의 일반적인 흡광도 스펙트럼은 406nm에서 피크를 나타냅니다. 또한 옥시헤모글로빈에 존재하는 541nm 및 576nm에는 피크가 거의 없습니다.

확인하기 위해 414nm에서 흡광도를 모니터링 할 수 있습니다. 옥시헤모글로빈을 측정하는 경우 이 방법을 사용하여 541nm 및 576nm에서 흡광도를 모니터링할 수 있습니다. 메트헤모글로빈을 측정하는 경우 이 방법을 사용하여 406nm에서 흡광도를 모니터링할 수도 있습니다.

- J. S. Shah, P. S. Soon, D. J. Marsh, Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLOS ONE*. **11**, e0153200 (2016).
- Optical Absorption of Hemoglobin, (available at <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html>).

References

- Peter J. Kennelly, PhD & Victor W. Rodwell, PhD, in *Harper's Illustrated Biochemistry* (McGraw-Hill Companies, Inc, 29th Edition., 2012), pp. 48–55.
- Trefor Higgins, M.Sc., John H. Eckfeldt, M.D., Ph.D., James C. Barton, M.D., Basil T. Doumas, Ph.D., in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (Elsevier Saunders, Fifth Edition., 2012), pp. 985–988.
- M. B. Kirschner et al., Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLOS ONE*. **6**, e24145 (2011).
- E. J. van Kampen, W. G. Zijlstra, in *Advances in Clinical Chemistry*, A. L. Latner, M. K. Schwartz, Eds. (Elsevier, 1983; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242308604011>), vol. 23, pp. 199–257.
- S. O. Sowemimo-Coker, Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus. Med. Rev.* **16**, 46–60 (2002).

Find out more at thermofisher.com/nanodrop

Thermo Fisher Scientific 씨모피셔사이언티픽코리아 주식회사
 서울시 강남구 광평로 281 수서 오피스빌딩 10층, 06349 | 대표번호 : 1661-9555

