

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

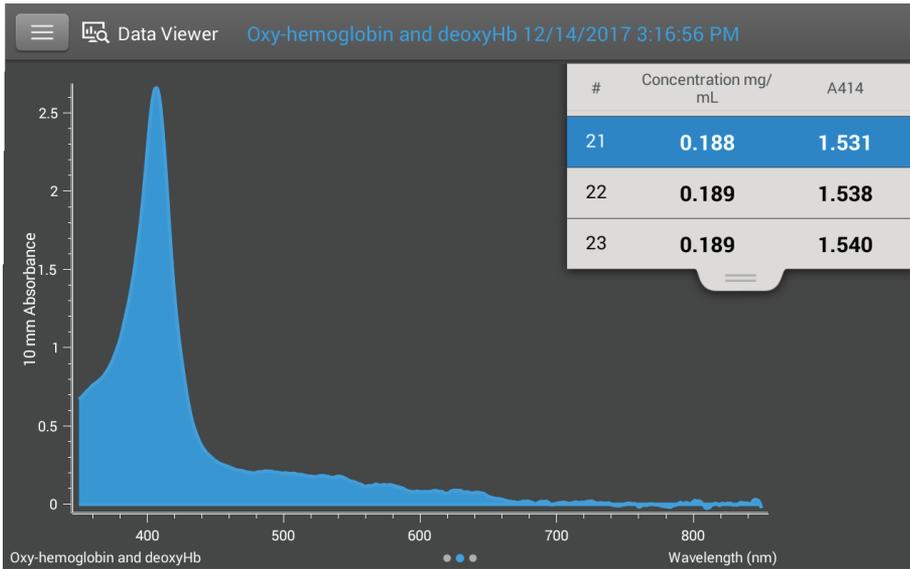


그림 1. NanoDrop One에서 측정된 메트헤모글로빈의 일반적인 흡광도 스펙트럼은 406nm에서 피크를 나타냅니다. 또한 옥시헤모글로빈에 존재하는 541nm 및 576nm에는 피크가 거의 없습니다.

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.

6. 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).
7. Optical Absorption of Hemoglobin, (available at <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html>).

References

1. Peter J. Kennelly, PhD & Victor W. Rodwell, PhD, in *Harper's Illustrated Biochemistry* (McGraw-Hill Companies, Inc, 29th Edition., 2012), pp. 48–55.
2. 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.
3. M. B. Kirschner et al., Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLOS ONE*. **6**, e24145 (2011).
4. 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.
5. 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 써모피셔사이언티픽코리아 주식회사
 서울시 강남구 광평로 281 수서 오피스빌딩 10층, 06349 | 대표번호 : 1661-9555

