creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

질량분석기를 이용한 유전용혈빈혈관련 적혈구막단백 및 효소의 새로운 정량분석법 개발

2016 년 8 월

서울대학교 대학원

의학과 검사의학 전공

박 철 민

국문 초록

유전용혈빈혈은 적혈구막단백의 이상이나 적혈구효소의 이상 등이 원인이다. 적혈구막단백에 대한 검사는 고전적인 전기영동법을 이용해 왔으나 재현성이 떨어지며 시간과 노력이 많이 든다. 적혈구효소이상은 분광광도법을 이용하여 측정하였으나, 다중검사가 어렵고 질환원인효소가 다양하여 효율이 떨어진다. 이에 최신의 질량분석 기법을 이용하여 유전용혈빈혈의 원인 중 적혈구막단백의 이상과 적혈구 대사 효소의 이상 진단에서 기존검사법보다 개선된 검사법을 개발하고, 그 성능을 검증하고자 한다.

적혈구막단백 분석은 질량분석기를 이용하여 적혈구막단백 유래 펩티드에서 임상적으로 유의한 적혈구막단백을 찾았다. 기존에 알려진 band3, spectrin alpha, spectrin beta, protein 4.1, protein 4.2, ankyrin 에 대해 식별하였다. 정밀도를 평가하고 기존방법과 비교하였고 참고범위를 설정하였다. 적혈구대사효소 분석은 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), pyruvate kinase (PK), pyrimidine 5'-nucleotidase (P5'N), hexokinase (HK), triosephosphate isomerase (TPI), adenosine deaminase (AD) 등 주요 효소 6 가지에 대해 질량분석기를 이용한 검사법 개발을 위해 ion suppression 을 평가하고 검체희석배수와 반응시간을 최적화하였다. 새 검사법의 직선성, 정밀도를 확인하였고 참고범위를 설정 및 환자예비검사를 하였다.

질량분석기를 이용한 적혈구막단백 분석에서는 임상적으로 유의한

6가지 막단백을 식별하였으며, 막단백 측정의 변이계수(coefficient of variation, CV)는 1.6-7.5% 범위였다. 새 검사법을 기존 검사법인 SDS-PAGE 법과 비교한 결과 Spectrin alpha와 beta의 합(r=0.8154, P=0.014)과 ankyrin(r=0.8743, P=0.005)은 강한 상관관계를, protein 4.1과 protein 4.2는 유의한 상관성이 없었다. 18명의 환자 중 protein 4.2 9명, band 3 7명, ankyrin 6명, spectrin alpha 2명, specrn beta 4명에서 결핍이 있었다. 질량분석기를 이용한 적혈구효소 검사법의 직선성은 모든 효소가 우수하였다. 정밀도 평가 결과 각 효소 측정값의 CV 범위는 7.5-17.0%였다. 각 효소의 참고범위는 G6PD (1.06-3.31 mg/min/gHb), PK (1.02-2.46 mg/min/gHb), P5'N (10.4-56.4 μg/min/gHb), HK (123-488 μg/min/gHb), TPI (409-834 μg/min/gHb), AD (76.9-249.7 μg/min/gHb) 이었다. 16명의 환자 검사 결과 6명에서 G6PD, 4명에서 PK, 각 1명에서 P5'N과 HK의 활성도 감소가 관찰되었다.

본 연구를 통해 새롭게 개발된 질량분석을 이용한 적혈구막단백과 적혈구효소에 대한 검사법이 향후 유전용혈빈혈의 진단에 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다.

주요어 : 용혈빈혈, 적혈구막단백, 적혈구효소, 질량분석기

학 번 : 2004-23819

CONTENTS

Abstract i

Contents iii

List of Tables iv

List of Figures v

List of Abbreviations and Symbols vi

서론 1

연구재료 및 방법 5

1. 적혈구막단백 분석 5

2. 적혈구효소 분석 14

연구결과 31

1. 적혈구막단백 분석 31

2. 적혈구효소 분석 40

고찰 57

참고문헌 64

영문초록 68

LIST OF TABLES

Table 1. Patients group characteristics for erythrocyte membrane protein analysis.... 12

Table 2. List of standard solutions for each enzyme reaction 19

Table 3. Reaction conditions for each erythrocyte enzyme 21

Table 4. Conditions for tandem mass spectrometry and multiple reaction monitoring (MRM) transitions of products and internal standards..... 23

Table 5. Patients group characteristics for erythrocyte enzyme..... 30

Table 6. Major identified erythrocyte membrane proteins..... 32

Table 7. Precision of six erythrocyte membrane protein amounts..... 34

Table 8. Reference intervals of six erythrocyte membrane proteins..... 36

Table 9. Proportions of six membrane proteins in suspicious patients with erythrocyte membrane disorders 38

Table 10. Protein deficiencies in suspicious patients with erythrocyte membrane disorders..... 39

Table 11. Optimized reaction conditions of dilution rate and incubation time..... 46

Table 12. Within-run and between-run precisions at low and high concentrations 48

Table 13. Pilot study results of suspicious patients with erythrocyte enzymopathy 55

LIST OF FIGURES

Figure 1. Reaction scheme for six erythrocyte enzymes 16

Figure 2. Representative UPLC-MS/MS MRM chromatograms of G6PD, PK, and P5'N (Set A) 41

Figure 3. Representative UPLC-MS/MS MRM chromatograms of HK, TPI, and AD (Set B) 42

Figure 4. Effect of sample amount on enzyme activity for each enzyme reaction . 44

Figure 5. Effect of reaction time on enzyme activity for each enzyme reaction 45

Figure 6. Linearity for each enzyme reactions 50

Figure 7. Comparison of the G6PD activities measured by newly developed assay and old spectrophotometric assay 52

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

ACN	acetonitrile
AD	adenosine deaminase
ADP	adenosine diphosphate
AK	adenylate kinase
ATP	adenosine triphosphate
CMP	cytidine monophosphate
DHAP	dihydroxyacetone phosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMA	eosin-5-maleimide binding test
G6P	glucose-6-phosphate
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
Gal-1-P	galactose-1-phosphate
GAP	glyceraldehyde-3-phosphate
GPI	glucose phosphate isomerase
HK	hexokinase
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
P5'N	pyrimidine 5' nucleotidase
PEP	Phosphoenolpyruvate
PFK	phosphofructokinase
PFOA	pentadecafluorooctanoic acid

PGK	phosphoglycerate kinase
PK	pyruvate kinase
PMSF	phenylmethane sulfonyl fluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TFA	trifluoroacetic acid
TPI	triose phosphate isomerase
UPLC-MS/MS	ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

서론

유전용혈빈혈(hereditary hemolytic anemia)는 유전적으로 발생하는 용혈빈혈의 통칭으로 원인에 따라 적혈구막의 이상, 적혈구 대사(효소)이상, 혈색소(hemoglobin) 변이에 의한 것 등 세 가지로 분류한다. 유전용혈빈혈은 임상적으로 빈혈, 황달, 비장 비대 등의 임상소견과 망상적혈구수(reticulocyte count), 말초혈액도말, 혈청 합토글로빈, LDH, 빌리루빈 등의 검사소견을 토대로 의심할 수 있다[1].

먼저, 적혈구막의 이상에 의한 유전용혈빈혈은 대표적으로 유전성 구상적혈구증(hereditary spherocytosis), 유전성 타원적혈구증 (hereditary elliptocytosis), 유전성 난형적혈구증(hereditary ovalocytosis) 등이 있다. 적혈구막 단백과 골격 단백은 서로 유기적으로 결합하여 적혈구의 형태를 유지하고 변형성을 갖게 한다. 이런 역할을 하는 대표적인 단백으로는 band 3, spectrin alpha, spectrin beta, ankyrin, protein 4.1, protein 4.2 등이 알려져 있으며, 이들 막단백 또는 골격 단백의 이상에 의해 적혈구의 상대적인 표면적의 감소, 세포 내 점도의 증가, 세포막 변형성의 감소 등이 일어나게 되면 용혈빈혈을 초래하는 것으로 알려졌다[2,3]. 적혈구막단백 질환의 유병률은 유전성 구상적혈구증의 경우 서구에서는 1:2,000-5,000, 유전성 타원적혈구증은 서아프리카에서 1:50, 유전성 난형적혈구증은 동남아시아에서 1:4-20으로 비교적 흔히 발생한다[4,5]. 지금까지 임상적으로 적혈구막단백 질환에 의한

유전용혈빈혈이 의심되면 선별검사로 전통적으로 삼투압취약성검사 (osmotic fragility test)를 시행해 왔으나 민감도, 특이도가 낮고 재현성이 떨어져 검사의 신뢰성이 낮은 단점이 있다. 이에 따라 최근에는 민감도, 특이도가 향상된 EMA (eosin-5-maleimide)-binding test)를 권장하고 있다[6].

적혈구막단백 이상의 확진 검사로는 전기영동법인 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 방법을 이용해 왔으나[7], 이 검사법은 1차원 PAGE를 이용하여 각 단백질 밴드의 농도를 비교하는 것으로 검사의 재현성이 떨어지며, 적혈구막단백 질환이 강력히 의심되는 환자에게서도 검사 결과가 음성이 나오는 예가 많아서 그 임상적 유용성에 한계가 있다. 또한, 모든 검사 과정이 수작업으로 이루어지고 검사소요시간이 최대 1주일 정도 되어 임상검사실에서 진단검사로서 쉽게 사용하기 어려운 점이 있다. 따라서 재현성이 있으면서 시간과 비용을 줄일 수 있는 새로운 검사 방법이 필요하다.

적혈구 대사이상이 원인인 유전용혈빈혈은 적혈구 내 에너지대사 과정에 관여하는 효소의 이상이 원인이다. 흔히 결핍되는 효소로 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)나 pyruvate kinase (PK), pyrimidine 5’-nucleotidase (P5’N) 등이지만[8], hexokinase (HK), triosephosphate isomerase (TPI), adenosine deaminase (AD) 등 적혈구 내 당 대사와 핵산 대사에 관여하는 다른 효소의 이상이 있어도 용혈빈혈을 일으킬 수 있으므로 진단을 위해서 많은 수의 효소에 대해 검사가 필요할 수 있다. 효소이상 중 G6PD 결핍증의 경우, 아프리카, 중동, 동남아 지역에서 최대 30%의

유병률을 보이며[9], 우리나라는 0.9%-3.5% 정도로 보고되고 있다[10]. 현재 우리나라는 외국에 비해 유병률이 비교적 낮으나 국제결혼이나 이주노동자의 급속한 증가 등으로 인해 환자가 점점 증가할 것으로 예상된다.

유전용혈빈혈 관련 대사효소 이상의 진단은 효소반응을 이용하여 효소의 활성도를 측정하거나 분자유전학적 방법으로 직접 효소 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법이 있다[11]. 이 중 효소의 활성도를 측정하는 검사는 대부분 NAD나 NADH (또는 NADP나 NADPH)의 산화 환원반응을 340 nm 에서 10분간의 kinetics로 측정하는 분광광도법이 이용되었다[12]. 그러나 이 방법은 효소반응과정이 여러 단계를 거쳐 복잡하고 모든 과정을 수작업으로 해야 하며, 효소 산물이 아닌 조효소를 측정하기 때문에 정확도와 특이도가 떨어질 수 있는 단점이 있다. 이런 단점을 극복하기 위한 방법으로 최근에 질량분석기를 응용한 검사법이 개발되어 다양한 대사이상질환의 검사에 적용되고 있다[13–15]. 질량분석기를 이용한 검사법은 단일 효소 반응으로 생성된 산물을 직접 특이적으로 측정할 수 있고, 동시에 여러 효소검사를 한꺼번에 할 수 있는 다중검사가 용이한 장점이 있으므로, 적혈구효소 검사에 대해서도 질량분석기를 이용하면 기존 검사의 단점을 보완할 수 있으리라 예상된다.

본 연구를 통해 질량분석기를 이용하여 유전용혈빈혈의 원인 중 적혈구막단백(band 3, spectrin alpha, spectrin beta, protein 4.1, protein 4.2, ankyrin)의

이상과 적혈구 대사 효소(G6PD, PK, P5’N, HK, TPI, AD)의 이상을 보다 쉽고 정확하게 검출할 수 있는 검사법을 개발하고, 그 검사법의 성능을 검증하여 임상에서 실제로 유전용혈빈혈의 진단검사로 활용할 수 있도록 하고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 적혈구막단백분석

1.1. 시약

본 연구에 사용한 acetonitrile (ACN; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)과 증류수는 HPLC grade를 사용하였다. Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), ammonium bicarbonate, ammonium formate, dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, trifluoroacetic acid (TFA), HCl는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 제조한 제품을 사용하였다. Sequencing grade의 modified trypsin 은 Promega (Medison, WI, USA) 제품을 사용하였다. 저장성 용해액(hypotonic lysis solution)은 5 mM의 Tris-HCl, 0.1 mM의 EDTA, 0.2 mM의 PMSF로 제조하였고, pH 조절은 0.5 M ammonium bicarbonate을 사용하였다.

1.2. 검체 전처리

EDTA 용기에 채취한 전혈 검체를 생리식염수로 3회 세척 후 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 혈색소 오염 제거를 위해 총 3회에 걸쳐 저장성 용해액 40 mL를 혼합하여 15,000 rpm에서 20 분간 원심분리하였다. 이후 Membrane Protein Extraction Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 단백을 추출하였다. 추출한 단백질은 50 mM ammonium bicarbonate와 RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA) 100 μL와 혼합하여 변성시켰다. 단백 농도 측정은 Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 80℃에서 20분 동안 가열한 다음, dithiothreitol을 첨가하여 농도를 5mM로 맞추고 60℃에서 30분간 가열하였다. 5분간 상온에 냉각시킨 후, 150 mM의 iodoacetamide를 혼합했고 암실에 30분간 두었다. Modified trypsin을 1:50(w/w) 비율로 섞은 다음 37℃에서 하룻밤 반응시켰다. 분해된 단백액에 1M HCl를 혼합하고, 30분 동안 37℃에서 반응시킨 다음 Oasis HLB Cartridge (Waters)으로 탈염하고 SpeedVac Concentrator (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany)로 용매를 건조시켰다. 100 mM ammonium formate 용액을 넣어 최종 단백의 양을 500 fg으로 조절하였다.

1.3. 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용한 분석

전처리 과정이 끝난 검체는 액체크로마토그래피 장비인 nanoAcquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC)와 질량분석기 Synapt MS (Waters)를 이용하여 분석하였다. 약 600 ng의 전처리된 검체를 주입하여 첫 번째 trapping column (XBridgeTM BEH C18, 5 μm, 300 μm × 50mm; Waters)를 용리액(eluent) 97:3(v:v) 20 mM ammonium formate + 용매(A:증류수, B:ACN)과 함께 1 μL/min 속도로 통과시켰다. 첫번째 trapping column에서는 ACN(55%)의 단일 농도구배를 이용하였다. 1차 trapping column에서 분리된 펩티드는 dilution tee로 옮겨지고 99.9:0.1(v:v) 0.1 formic acid + A: 증류수, B: ACN 이동상(mobile phase)을 이용하여 20 μL/min 속도로 용출하였다. 2차 trapping column (Symmetry C18, 5μm, 180 μm × 20 mm; Waters)을 이용하여 확보한 펩티드를 analytical column (BEH C18, 1.7 μm, 75 μm × 150 mm; Waters)를 이용하여 분리하였다. 2-50%의 이동상의 선형농도구배를 통해 110분 이상 300 nL/min의 속도로 110분 이상 분리용출하였다. 용출 시 온도는 40℃로 유지하였다. 정량을 위한 내부표준물질로 *Saccharomyces cerevisiae* (P00924) 기원의 enolase를 첨가하였다. m/z 값 보정을 위해 30% ACN + 0.1% formic acid 용액에 400 fmol/μL의 [Glu1]-Fibrinopeptide B 를 혼합하여 2 μL/min으로 분무하였다. 질량 분석기(MS)는 10,000 FWHM의 해상도로 positive ion mode에서 실행하였고, m/z 50-1,990 범위에서 연속 모드로 시행하였다. 탠덤

질량분석(MS/MS) 데이터는 15-38 eV 충돌에너지 범위를 동시에 모니터링하여 얻었다.

1.4. 데이터 처리 및 분석

질량분석을 통해 얻은 원시 데이터 파일은 PLGS 2.4 소프트웨어 (Waters)로 처리하였다. 단백 식별은 Uniprot reviewed human protein database[16]를 이용하였다. 데이터베이스를 통해 확인된 단백은 가장 양이 많은 3 개의 펩티드의 peak intensity 를 이용하여 정량하였다[17]. 내부표준물질로 첨가한 enolase 양과 비교하여 column 에 주입된 각 단백의 양을 정하였고, 최종 단백의 양은 column 에 분주한 총 단백 중 비율에서 100 배를 곱하여 계산하였다.

1.5. 검사법 성능평가

새 검사법의 성능을 평가하기 위해 6가지 단백에 대해 정밀도를 평가하고 기존 검사법인 Fairbanks SDS-PAGE법과 새 검사법의 검사결과를 서로 비교하였다. 새 검사법의 정밀도 평가는 환자 검체를 5일간 중복측정(duplicate)하여 평가하였고, 기존 검사법과의 비교 평가는 유전용혈빈혈 의심환자를 포함한 8명의 검체를 분석하여 band 3에 대한 각각의 단백의 비율을 구한 다음 기존 검사법에 의한 결과와 서로 비교하였다.

1.6. 정상인 잔여검체를 이용한 참고범위 설정 및 환자검체 예비검사

참고범위는 혈액 질환이 없고 혈구감별계산 결과가 정상인 47명의 임상검체를 이용하여 설정하였고, 그 중 남자는 29명이었다. 평균 나이는 22.4세 (범위 0-61세) 였고, 평균 혈색소 농도는 13.9 g/dL (범위 10.3-18.5) 였다. 참고범위는 전체 단백에서 차지하는 각 단백의 비율로 표기하였고, 전체 결과의 2.5와 97.5 백분위로 구하였다. 새 검사법에 대한 예비검사는 18명의 환자군을 대상으로 하였고, 개별 환자의 임상적 특성은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Patients group characteristics for erythrocyte membrane protein assay evaluation

Case No.	Sex	Age (yrs)	Hb (g/dL)	Osmotic fragility	Spherocyte	Transfusion Hx*
1	M	13	14.4	↑	+	-
2	F	34	12.9	NA	+/-	-
3	F	9	13.3	↑	+	-
4	M	3	8.8	↑	+/-	-
5	M	17	15.5	↑	+	NA
6	F	43	9.0	↑	+	-
7	F	12d	9.4	NA	+	NA
8	M	5	10.1	Normal	+	-
9	M	54	6.7	↑	+	-
10	M	26	16.7	NA	+	-
11	M	4	10.3	↑	+	-
12	F	17	9.2	↑	+/-	-
13	F	4mo	6.3	↑	+	-
14	F	18	10.0	↑	+	-
15	M	59	11.8	↑	+	-
16	F	41d	7.9	↑	+	-
17	F	12	12.3	↑	+	-
18	F	11	10.2	↑	+	+

*Transfusion Hx means whether a patient had received erythrocyte transfusions within three months before a testing or not.
Abbreviations: Hx, history; NA, not available

1.7. 통계분석

분석 소프트웨어는 IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) 및 Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)을 사용하였다. 정밀도 평가 결과는 는 측정값에 대한 변이계수(CVs; coefficients of variations)로 나타내었다. 기존 검사법과의 비교는 선형 회귀분석을 수행하였고, 상관계수(correlation coefficient, *r*)와 유의확률을 구하였다. 참고범위는 정상인 검체 측정결과의 2.5와 97.5 백분위수로 설정하였다.

2. 적혈구 효소분석

2.1. 시약

본 연구에 사용한 ACN (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)과 증류수는 HPLC grade를 사용하였다. 반응에서 필요한 각 효소마다 필요한 기질, 산물과 반응에 필요한 NADP, ATP, ADP, Tris buffer, HCl, EDTA, $MgCl_2$, KCl과 이동상에서 사용한 formic acid와 pentadecafluorooctanoic acid (PFOA)는 모두 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 제조한 제품을 사용하였다. 그리고 triosephosphate isomerase의 활성도를 측정하기 위하여 사용된 α-glycerophosphate dehydrogenase 효소도 역시 Sigma Aldrich에서 구매하였다.

2.2. 검사원리

검사의 원리는 Figure 1과 같다. G6PD, PK, P5'N, HK, AD 효소의 경우 각각의 효소 반응 산물인 6-phosphogluconate, pyruvate, cytidine, [$^{13}C_5$]glucose-6-phophate, inosine을 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기로 직접 측정하는 원리이다. TPI 효소의 경우에는 효소반응 산물인 dihydroxyactone phosphate의 분자량이 기질인 D-glyceraldehyde-3-phosphate와 같고 구조도 비슷하여 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기로는 구분이 불가능하기 때문에 부득이하게 2차 효소반응을 시킨 후 생성된 glycerol-3-phosphate를 측정하였다.

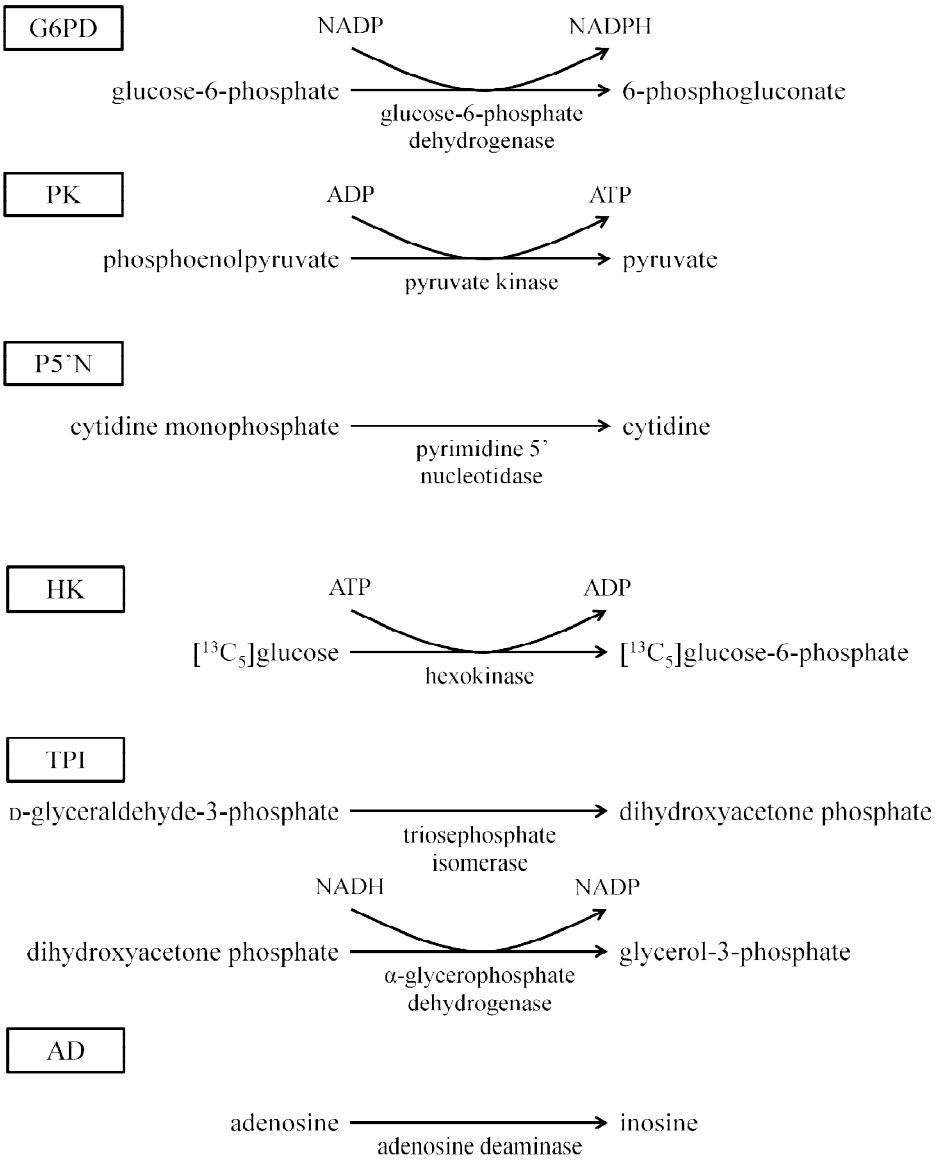


Figure 1. Reaction scheme for six erythrocyte enzymes

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

2.3. 검체 전처리

전혈 검체를 1.5 mL 튜브에 가득 담고 15,000*g*에서 3분 원심분리하였다. 상층 혈장과 백혈구 층을 제거하여 버린 후 남아 있는 적혈구에 동량만큼 생리식염수를 넣어 혼합한 후 다시 원심분리하였다. 같은 방법으로 2회 더 세척한 후, 상층액을 제거하고 남은 적혈구를 적절한 양으로 분주하여 -70℃에서 검사 전까지 보관하였다.

2.4. 효소반응

2.4.1. 표준용액의 제조

각 효소의 산물인 6-phosphogluconate, pyruvate, cytidine, [$^{13}C_5$]glucose-6-phosphate, glycerol-3-phosphate, inosine을 각각 증류수에 녹여서 필요한 가장 높은 표준용액을 제조하여 그 용액을 다시 희석하여 필요한 표준용액을 각각 제조하였다. 가장 낮은 농도의 표준용액은 증류수를 사용하였다. 각각의 효소의 활성을 고려하여 각각 제조한 표준용액의 농도는 Table 2과 같았다.

Table 2. List of standard solutions for each enzyme reaction (unit: μg/mL)

Product	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4
6-phosphate gluconate	0	200	1,000	2,000	4,000
Pyruvate	0	200	1,000	2,000	4,000
Cytidine	0	25	125	250	500
[$^{13}C_5$]glucose-6-phosphate	0	100	500	1,000	2,000
Glycerol-3-phosphate	0	50	250	500	1,000
Inosine	0	25	125	250	500

Abbreviations: STD, standard solution

2.4.2. 적혈구 효소반응

이미 제조한 표준용액과 대조검체 및 그 외 필요한 시약을 조제하여 준비하고, 환자검체는 희석액(0.001% EDTA, 0.00005% mercaptoethanol)을 이용하여 희석하여 준비하였다. 한 검체당 1.5 mL 튜브 3개씩 준비하여 2개는 중복측정 1개는 공시료(sample blank)로 사용하였다. 공시료는 적혈구 효소의 활성도를 없애기 위하여 95℃에서 5분 동안 가열한 후 다음의 단계를 조작하였다. 각각의 효소 반응에 필요한 완충용액과 기질, 그리고 그 외 반응에 필요한 시약을 각각의 정해진 양만큼 넣고 37℃에서 반응시켰다 (Table 3). 정해진 반응시간이 끝나고 효소반응을 중지시키기 위해 95℃에 5분 가열하였고, 13,000*g*에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 세트 검사에 해당하는 각 효소별 검체의 상층을 2개의 세트 튜브에 넣어 잘 혼합하였다. 세트의 구성은 사용하는 시약과 기질 및 산물에 따라서 세트 A는 G6PD (10 μL), PK (40 μL), P5'N (50 μL), 세트 B는 HK (40 μL), TPI (40 μL), AD (30 μL)으로 구성하였다. 검사가 끝나고 남은 희석 검체는 혈액자동분석기를 이용하여 혈색소치를 측정하였다.

Table 3. Reaction conditions for each erythrocyte enzyme

Set	Enzyme	Substrate	erythrocyte	Buffer	Additional reagents	Internal standard
A	G6PD	200 μL 20mM G6P	20μL	50 μL buffer1*	200 μL 10mM NADP	20 μL 0.2 mM [^{13}C]Gal-1-P
A	PK	100 μL 25mM PEP	20μL	100 μL buffer1*	100 μL 1M KCl 50 μL 30mM ADP	20 μL 0.2 mM [^{13}C]-Gal-1-P
A	P5'N	100 μL 4.6mM CMP	20μL	50 μL buffer1*		20 μL 1 mg/mL [$^{13}C_5$]cytidine
B	HK	200 μL 10mM [$^{13}C_5$]glucose	20μL	100 μL buffer1*	400 μL 20mM ATP	20 μL 0.2 mM [^{13}C]Gal-1-P
B	TPI	20 μL 5mM D-GAP	20μL	100 μL buffer2†	100 μL NADH 50 μL α-glycerophosphate dehydrogenase	20 μL 0.2 mM [^{13}C]Gal-1-P
B	AD	100 μL 2mM adenosine	20μL	100 μL buffer2†		20 μL 1 mg/mL [$^{13}C_5$]inosine

*buffer1: 1M Tris-HCl with 5mM EDTA and 0.1M $MgCl_2$, pH 8.0

†buffer2: 1M Tris-HCl with 5mM EDTA, pH 8.0

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase; G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; CMP, cytidine monophosphate; D-GAP, D-glyceraldehyde-3-phosphate; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; Gal-1-P, galactose-1-phosphate

2.5. 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용한 분석

질량분석기는 Quattro Premier MS/MS (Waters)를 사용하였고, UPLC의 column은 ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters)를 사용하였다. 이동상 A로 증류수에 0.1% formic acid와 0.1% pentadecafluorooctanoic acid (PFOA)를, 이동상 B로 ACN에 0.1% formic acid와 0.1% PFOA를 각각 사용하였다. 이동상은 2분까지는 이동상 A를 100%으로 유지하다가 2분부터 이동상 A를 70%로 2.5분까지 유지하고 2.5분에 다시 100%로 돌아오게 하였다. 유속은 0.2 mL/min을 유지하게 하였다. 탠덤질량분석기에서 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 이용하여 정량하였다. 구체적인 MRM transition 및 질량분석 조건은 Table 4과 같다.

Table 4. Conditions for tandem mass spectrometry and multiple reaction monitoring (MRM) transitions of products and internal standards

Enzyme	Compound	Cone (V)	Collision (eV)	MRM transition (*m/z*)
G6PD	6-phosphogluconate	25	15	275.1 → 97.0
PK	Pyruvate	19	8	86.9 → 43.4
P5'N	Cytidine	24	14	242.1 → 109.1
HK	[$^{13}C_5$]glucose-6-phosphate	35	22	264.1 → 79.0
TPI	Glycerol-3-phosphate	15	15	170.9 → 78.9
AD	Inosine	34	20	267.1 → 135.1
IS1*	[^{13}C]glactose-1-phosphate	35	22	260.1 → 79.0
IS2†	[$^{13}C_5$]cytidine	24	14	247.1 → 111.1
IS3‡	[$^{13}C_5$]inosine	34	20	272.1 → 135.1

*IS1: internal standard for G6PD, PK, HK, and TPI.

†IS2: internal standard for P5'N

‡IS3: internal standard for AD

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

2.6. Ion suppression 평가

Post-column infusion 방법을 이용하여 ion suppression을 평가하였다[18]. 실제 검사와 같은 조건으로 공시료를 검사하면서 각 효소 반응의 산물 또는 IS을 하나씩 infusion pump를 이용하여 일정하게 질량분석기로 동시에 주입한다. 이 때 주입하고 있는 산물 또는 IS가 나오는 retention time에서의 결과의 변화를 관찰하여 matrix의 영향을 평가하였다.

2.7. 적혈구 검체 양과 반응시간에 따른 각 효소 반응에 대한 효과

적혈구 검체량과 각 효소 반응에 대한 효과를 보기 위하여 반응시간은 30분으로 고정하고 전처리 과정을 거친 적혈구 검체와 희색액을 이용하여 희석배수를 G6PD는 5배, 10배, 20배, 40배, 그 외의 효소는 2배, 5배, 10배, 20배인 검체를 제조하여 각 희석배수마다 세 개씩 검사하였다. 반대로 반응시간에 따른 각 효소반응의 결과를 보기 위하여 희석배수를 고정하고 각 효소별 4가지 반응시간 조건(G6PD, HK, AD는 10, 20, 30, 40분, PK는 10, 20, 30, 45, 60분, P5'N은 60, 120, 180, 240분, TPI는 30, 60, 90, 120분)에서 각 반응시간마다 세 개씩 검사하였다.

2.8. 각 반응에 대한 정밀도 평가

Within-run에 대한 정밀도 평가를 하기 위해서 높은 농도의 검체와 낮은 농도의 검체를 5번씩 측정하여 CVs 값을 계산하였으며, Between-run에 대한 정밀도 평가를 하기 위해서 높은 농도와 낮은 농도의 검체를 5일 연속하여 측정하여 CVs값을 각각 구하였다.

2.9. 각 반응에 대한 직선성 평가

각 효소반응마다 표준용액을 희석하여 농도를 알고 있는 5개의 검체를 제조하고, 실제 측정결과와 예상농도를 선형회귀법으로 비교하여 직선성을 평가하였다.

2.10. 검사법 비교

기존방법과 새로운 검사법 비교를 위해 G6PD의 CAP 외부정도관리 검체 5개와 G6PD 검사용 정도관리물질 (Biochemical Enterprise, Milan, Italy) 3개를 이용하였다. 총 8개 검체를 새 검사법으로 검사한 다음 CAP 외부정도관리 검체의 경우 Trinity G6PD kit (Trinity Biotech, Wicklow, Ireland)의 group 평균값을, G6PD 정도관리물질은 제조회사에서 지정한 값과 비교하였다.

2.11. 정상인 잔여검체를 이용한 참고범위 설정 및 환자검체 예비검사

정상인의 잔여검체를 이용하여 검사하여 얻은 결과값의 2.5와 97.5 백분위수로 설정하여 참고범위를 구하였다. 성인참고치의 총 대상은 21명이었다. 남자는 10명, 여자는 11명이었으며, 나이는 평균 53세(범위 33-81세)였다.

소아의 참고범위는 3개월부터 9세까지 소아 총 26명을 대상으로 구하였다. 남자 16명 여자 10명이었으며, 평균 나이는 4.8세였다.

또한 임상적으로 적혈구 대사이상으로 인한 용혈빈혈이 의심되는 16명의 환자를 의뢰 받아 검사를 진행하였다. 그 중 2명에서 부모 형제 등 가족의 검체를 분석하였다. 환자의 임상 정보는 Table 5에 정리하였다.

Table 5. Patients group characteristics for erythrocyte enzyme analysis

Case No.	Sex	Age (yr)	Hb (g/dL)	Splenomegaly	Transfusion Hx*
1	M	3	4.4	+	+
2	M	17	15.5	NA	NA
3	M	17	6.0	+	NA
4	M	4	6.3	+	+
5	M	18	8.6	+	+
6	F	46	10.7	+	-
7	F	15	6.8	NA	+
8	M	20	7.4	Splenectomy	-
9	F	17	5.9	NA	-
10	F	1	7.7	NA	-
11	F	3	10.6	NA	-
12	M	19	8.3	Splenectomy	-
13	F	4	4.9	NA	+
14	F	16	10.8	NA	-
15	F	6	7.5	NA	+
16	M	22	15.6	NA	-

*Transfusion Hx means whether a patient had received erythrocyte transfusions within three months before a testing or not.
Abbreviations: Hx, history; NA, not available

연구결과

1. 적혈구막단백 분석

1.1. 적혈구막단백 확인

전체 122개 단백이 확인되었다. 6가지 막단백은 그 중 95% 이상을 차지하였고 가장 흔했다. 가장 흔한 세포 내 단백인 헤모글로빈은 전체 단백질의 1.5% 이내였다. 본 실험에서 확인된 단백을 Table 6에 나열하였다. 확인된 주요 단백의 정보는 이전 연구[19,20]에서 알려진 단백과 동일하였다.

Table 6. Major identified erythrocyte membrane proteins

Accession	Name	Sequence Coverage (%)
P02730	Band 3 anion transport protein	50.8
P02549	Spectrin alpha chain erythrocyte	63.0
P16157	Ankyrin 1	57.9
P11277	Spectrin beta chain erythrocyte	61.4
P11166	Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter membrane 1	28.7
P11171	Protein 4.1	45.1
P16452	Erythrocyte membrane protein protein 4.2	50.1
P04406	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	60.9
P60709	Actin cytoplasmic 1	54.6
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	51.1
Q08495	Dematin	36.2
Q00013	55kDa erythrocyte membrane protein	48.9
P35611	Alpha adducin	17.8
P35612	Beta adducin	19.5
P68871	Hemoglobin subunit beta	67.7
P28289	Tropomodulin	39.4
Q75955	Flotillin 1	37.1
Q14254	Flotillin 2	30.2

1.2. 질량분석 검사법의 분석성능

주요 6개 단백 측정 시 변이계수(coefficient of variation, CV)는 1.6-7.5%였다. Table 7에 정밀도 평가 결과를 정리하였다. 다른 단백에 비해 protein 4.1의 정밀도가 상대적으로 낮았다.

Table 7. Precision of six erythrocyte membrane protein amounts

Proteins	Mean amount (%)	Within-run CVs (%)	Total CVs (%)
Band 3	33.5	2.7	3.6
Spectrin alpha	15.6	4.1	4.1
Spectrin beta	12.0	1.6	1.6
Spectrin (alpha+beta)	27.7	2.1	2.1
Ankyrin	11.7	3.8	3.8
Protein 4.1	4.1	7.3	7.5
Protein 4.2	3.3	4.0	5.4

Abbreviations: CV, coefficient of variation

1.3. SDS-PAGE 법과 비교 및 참고범위

질량분석기를 이용한 새 검사법을 기존 방법인 Fairbanks SDS-PAGE 법과 비교한 결과, spectrin alpha 와 beta 의 합(r=0.8154, P=0.014)과 ankyrin (r=0.8743, P=0.005) 은 비교방법과 질량분석기를 이용한 새 검사법 결과 간에 서로 강한 상관관계를 보였다. 그러나, protein 4.1 (r=0.5632, P=0.147)과 protein 4.2 (r=0.131, P=0.816) 는 유의한 상관성을 보이지 않았다. 정상인 검체를 이용하여 산정한 6 가지 단백의 참고범위는 Table 8 에 나타내었다.

Table 8. Reference intervals of six erythrocyte membrane proteins

Protein	Reference interval (%)*
Band 3	28.26-34.43
Spectrin alpha	14.42-19.22
Spectrin beta	11.86-15.33
Spectrin (alpha+beta)	26.63-33.69
Ankyrin	12.43-17.78
Protein 4.1	3.16-5.05
Protein 4.2	2.80-3.95

*Reference interval was calculated as 2.5^{th} and 97.5^{th} percentiles from normal controls by dividing the amount of each protein by sum of total identified proteins

1.4. 환자에 대한 검사적용

계산된 참고범위를 18명의 유전구상적혈구증 의심환자에 적용하여 결핍유무를 판단하였다. 가장 흔하게 결핍된 단백은 protein 4.2 (50.0%, 9/18) 였다. 다음으로 band 3 (38.9%, 7/18)와 ankyrin (33.3%, 6/18) 이 결핍되었고, spectrin alpha (11.1%, 2/18)와 spectrin beta (22.2%, 4/18)도 일부 환자에서 결핍이 관찰되었다. Protein 4.1 은 어떤 환자에서도 감소되지 않았다. 9명에서는 두 종류 이상의 단백 결핍이 있었고, 1명은 결핍이 전혀 관찰되지 않았다. Table 9에 환자별 막단백 정량 결과를 나타내었고, Table 10에 환자별 결핍된 단백을 정리하였다.

Table 9. Proportions of six membrane proteins in suspicious patients with erythrocyte membrane disorders

Case No.	Band 3	Spectrin alpha	Spectrin beta	Ankyrin	Protein 4.1	Protein 4.2
1	25.91%	17.19%	14.44%	12.06%	4.90%	3.32%
2	31.56%	12.87%	10.78%	12.81%	4.27%	2.98%
3	28.90%	16.32%	14.02%	16.45%	4.72%	0.00%
4	31.06%	15.11%	11.37%	13.86%	4.00%	3.16%
5	25.31%	18.91%	14.43%	13.80%	4.76%	3.50%
6	31.31%	15.81%	13.28%	13.98%	4.32%	3.39%
7	32.76%	17.77%	11.34%	11.03%	5.32%	2.73%
8	29.08%	19.14%	13.72%	11.02%	4.43%	2.31%
9	24.86%	16.52%	15.84%	12.35%	4.70%	3.54%
10	25.53%	16.14%	14.94%	13.55%	4.81%	3.03%
11	31.22%	15.62%	12.36%	11.89%	4.62%	2.51%
12	31.90%	15.82%	12.74%	14.55%	4.32%	2.78%
13	31.54%	15.29%	11.13%	12.51%	4.11%	2.25%
14	31.23%	15.44%	15.57%	10.99%	4.40%	2.37%
15	27.99%	15.67%	14.72%	13.60%	3.95%	3.20%
16	27.76%	13.61%	12.30%	14.58%	4.38%	2.68%
17	23.90%	17.30%	15.24%	17.31%	4.65%	2.83%
18	29.38%	15.56%	13.66%	12.60%	3.80%	2.35%

Table 10. Protein deficiencies in suspicious patients with erythrocyte membrane disorders

Case No.	Observed protein deficiencies
1	band 3, ankyrin
2	spectrin alpha, spectrin beta
3	protein 4.2
4	spectrin beta
5	band 3
6	(none)
7	spectrin beta, ankyrin, protein 4.2
8	ankyrin, protein 4.2
9	band 3, ankyrin
10	band 3
11	ankyrin, protein 4.2
12	protein 4.2
13	spectrin beta, protein 4.2
14	ankyrin, protein 4.2
15	band 3
16	band 3, spectrin alpha, protein 4.2
17	band 3
18	protein 4.2

2. 적혈구 효소 분석

2.1. 각 효소에 대한 산물 정량 분석

액체크로마토그래피에서 각 효소에 대한 산물과 IS는 4분 안에 잘 분리되었다 (Figure 2, 3). 그리고 산물이나 IS가 나오는 retention time에서는 ion suppression이 관찰되지 않았다.

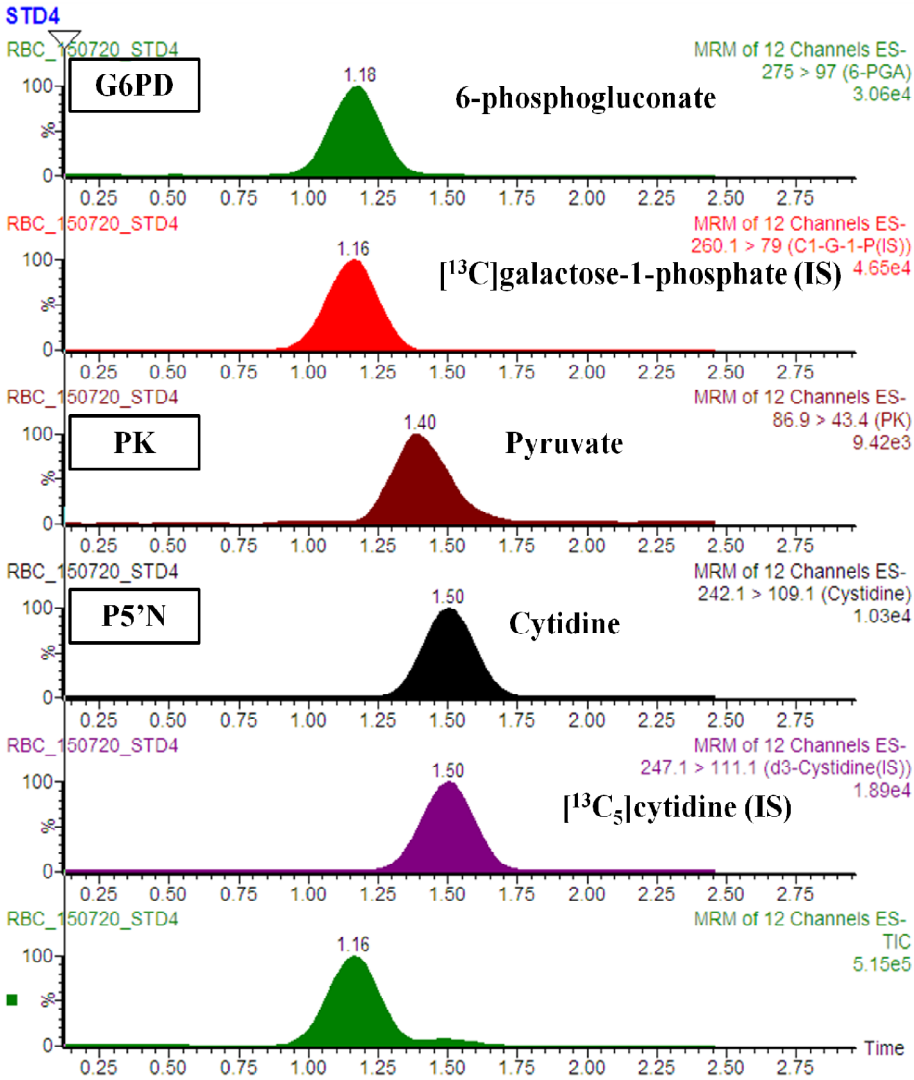


Figure 2. Representative UPLC-MS/MS MRM chromatograms of G6PD, PK, and P5'N (Set A).

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; IS, internal standard

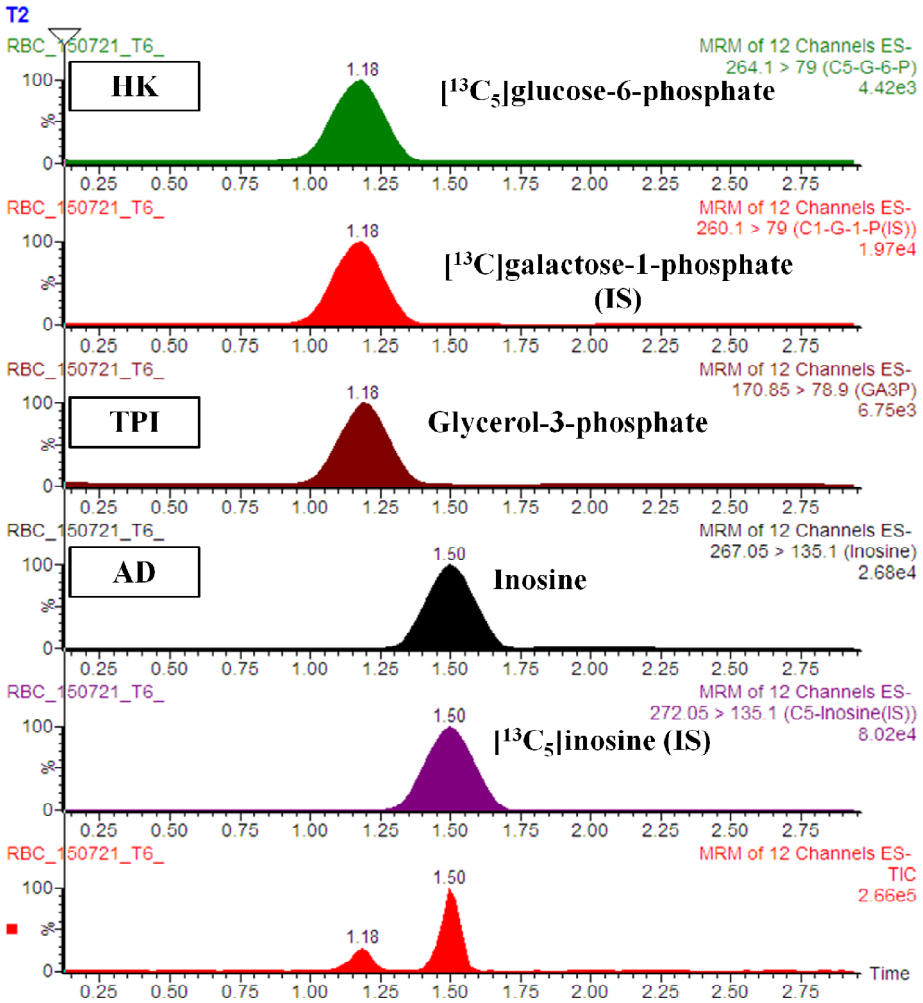


Figure 3. Representative UPLC-MS/MS MRM chromatograms of HK, TPI, and AD (Set B).

Abbreviations: HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase; IS, internal standard

2.2. 적혈구 검체양과 반응시간에 따른 각 효소 반응에 대한 효과

전처리 과정을 거친 적혈구 검체를 희석하여 각 효소마다의 반응 결과를 확인하였을 때 G6PD의 경우 희석배수가 5배에서 40배가 될 때까지 직선성이 유지되었고, P5'N의 경우 2배에서 20배까지 직선성이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 그 외 나머지 효소인 PK, HK, TPI, AD의 경우 2배에서 10배까지 직선성이 유지되었다 (Figure 4). 직선성이 유지되는 희석배수로 고정하고 반응시간에 따른 효소마다의 반응 결과를 확인하였을 때에는 P5'N의 경우 240분까지 직선성이 유지되는 것을 관찰할 수 있었으며, PK와 TPI의 경우 60분, HK와 AD의 경우 40분, G6PD의 경우 30분까지 직선성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 이 결과를 바탕으로 직선성이 유지되는 희석배수와 반응시간을 고려하여 각각의 효소반응마다의 최적의 반응조건을 결정하였다 (Table 11). 결정한 반응조건을 적용하여 이후의 평가를 진행하였다.

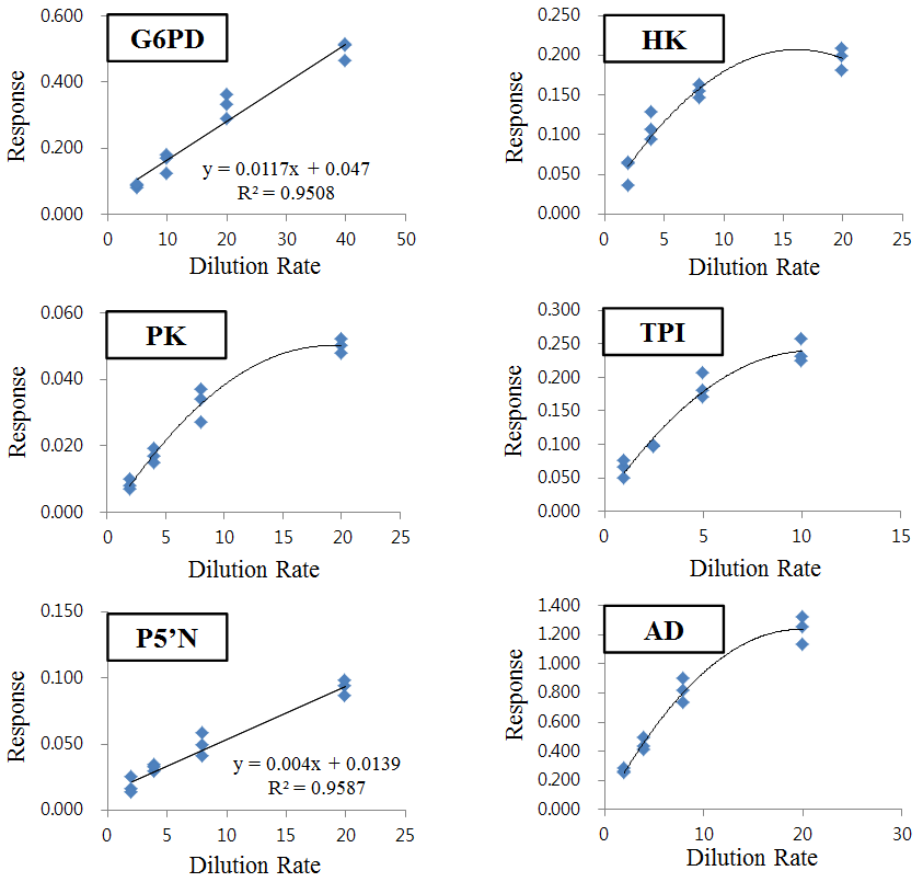


Figure 4. Effect of sample amount on enzyme activity for each enzyme reaction. Each incubation time was 30 min.

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

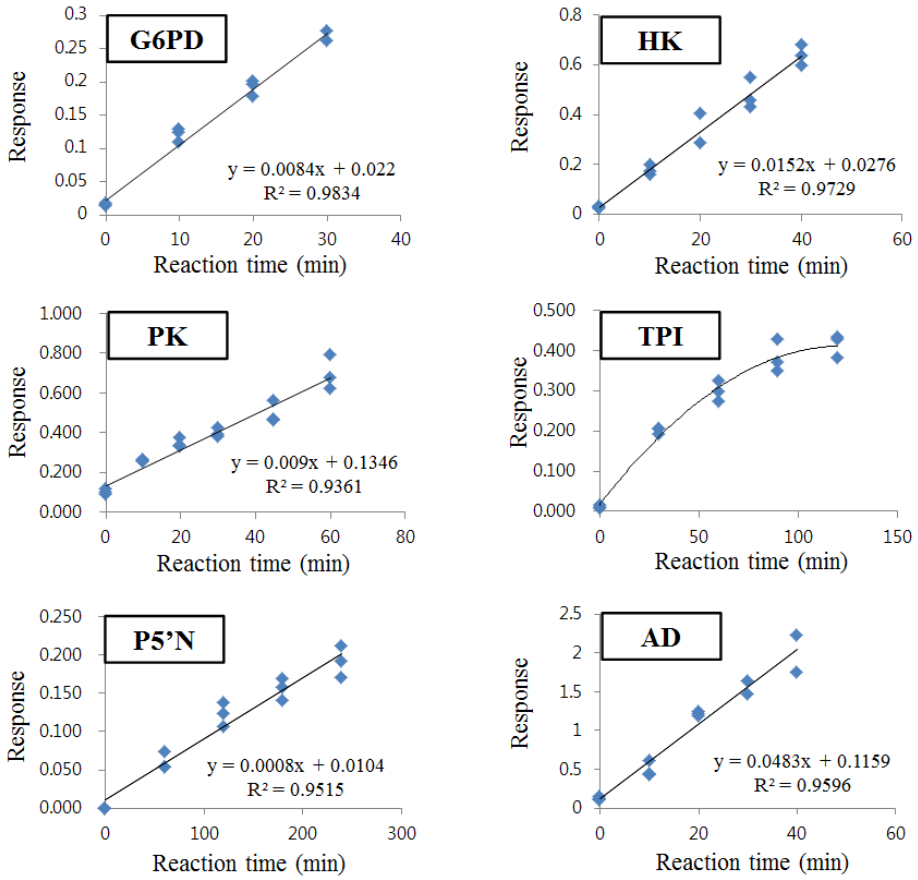


Figure 5. Effect of reaction time on enzyme activity for each enzyme reaction.

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

Table 11. Optimized reaction conditions of dilution rate and incubation time

Enzyme	Dilution rate	Incubation time (min)
G6PD	×10	30
PK	×5	30
P5'N	×5	120
HK	×5	30
TPI	×10	30
AD	×5	30

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

2.3. 각 반응에 대한 정밀도 평가

정밀도 평가를 하기 위해서 각각의 반응마다 높은 농도와 낮은 검체를 이용하여 within-run과 between-run에 대한 CV값을 구하여 Table 12에 정리하였다. Within-run CV값에서는 낮은 농도에서는 8.3-17.0%, 높은 농도에서는 7.5-15.0%를 보였으며, Between-run CV값에서는 낮은 농도에서는 12.1-28.0%, 높은 농도에서는 8.9-18.0%이었다.

Table 12. Within-run and between-run precisions at low and high concentrations

Enzyme	Within-run CV (%)		Between-run CV (%)	
	Low	High	Low	High
G6PD	13.3	7.5	14.4	15.7
PK	8.3	8.6	18.6	8.9
P5'N	9.2	7.7	22.3	16.8
HK	13.0	9.2	28.0	18.0
TPI	17.0	15.0	14.1	12.2
AD	9.5	7.8	12.1	13.8

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase; CV, coefficient of variation

2.4. 각 표준용액에 대한 직선성 평가

각 효소반응 산물의 정량을 위해 사용한 5가지 농도의 표준용액을 측정하여 그 결과값을 선형회귀방법으로 직선성을 평가한 결과, G6PD와 PK의 경우 0-4000 μg/mL, HK의 경우 0-2000 μg/mL, TPI의 경우 0-500 μg/mL, P5'N과 AD의 경우 0-500 μg/mL의 범위에서 모두 R^2값이 0.99 이상으로 직선성이 유지되었다 (Figure 6).

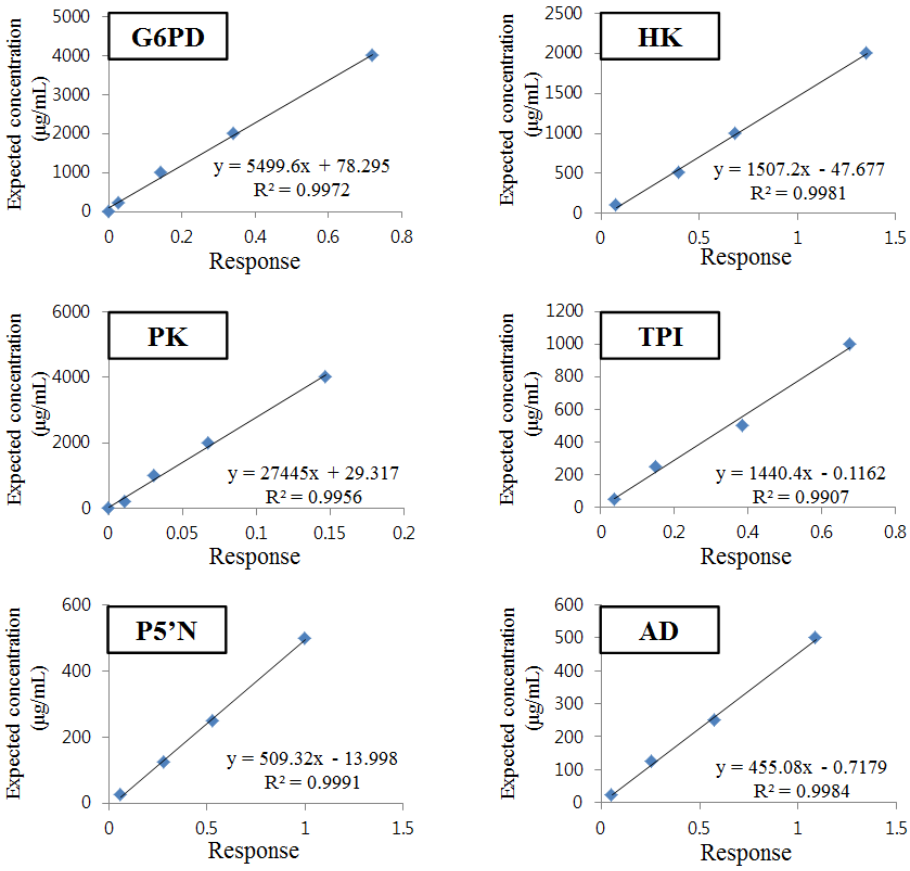
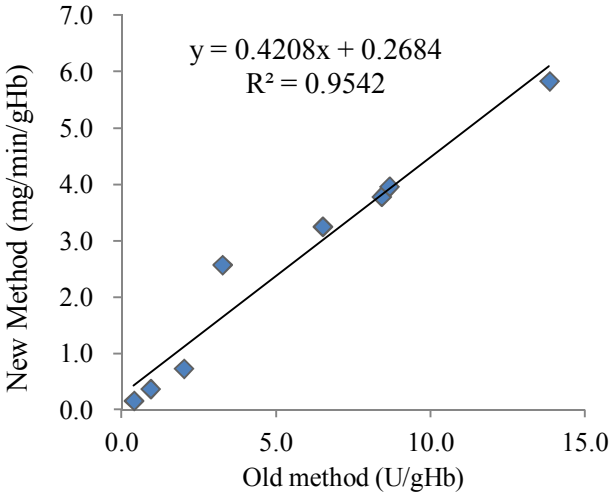


Figure 6. Linearity for each enzyme reactions

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

2.5. 검사법 비교

G6PD 검사법 비교 결과, 기존방법에 따른 결과값과 새 검사법의 결과값 간의 상관성은 결정계수 R^2=0.9538 (slope, 0.4196; intercept, 0.2725)으로 우수하였다. (Figure 7)



Sample*	Old†	New†
Control 1	2.0	0.73
Control 2	6.5	3.25
Control 3	13.9	5.83
CAP 1	3.25	2.57
CAP 2	8.41	3.78
CAP 3	0.92	0.37
CAP 4	8.66	3.96
CAP 5	0.38	0.16

Figure 7. Comparison of the G6PD activities measured by newly developed assay and old spectrophotometric assay

*Three control samples from BEN G6PD kit (Biochemical Enterprise) and five CAP proficiency testing samples in recent two years (2015-16)

†Units for old and new method results are U/gHb and mg/min/gHb, respectively.

Abbreviations: CAP, College of American Pathologists; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase

2.6. 정상인 잔여검체를 이용한 참고범위 설정

성인 21명에서 대해 효소 활성을 측정하여 계산한 각 효소의 참고범위는 G6PD (1.06-3.31 mg/min/gHb), PK (1.02-2.46 mg/min/gHb), P5'N (10.4-56.4 μg/min/gHb), HK (123-488 μg/min/gHb), TPI (409-834 μg/min/gHb), AD (76.9-249.7 μg/min/gHb) 이었다.

소아에서의 참고범위는 G6PD (1.74-2.71 mg/min/gHb), PK (1.04-3.27 mg/min/gHb), P5'N (3.45-47.1 μg/min/gHb), HK (225-515 μg/min/gHb), TPI (409-835 μg/min/gHb), AD (259.8-622.4 μg/min/gHb) 이었다.

2.7. 환자검체 예비검사

적혈구효소 이상에 의한 빈혈 의심 환자 검체를 검사한 결과를 Table 13에 정리하였다. 환자 1, 3, 5, 7, 9, 15에서 G6PD의 활성이 감소하였다. 환자 8, 10, 12, 15는 PK의 활성도가 감소하였다. 환자 3은 P5'N이 감소하였고, 환자 1은 HK 활성도가 감소하였다. 환자 1, 4는 AD의 활성도가 감소하였다. 그 외 나머지 환자에서는 모든 효소의 활성도가 정상 참고 범위였다. 가족검사에서 G6PD와 P5'N이 감소한 환자 3의 경우 부, 모, 여자형제(누나)에 대한 검사결과 어떤 효소활성도의 감소도 관찰할 수 없었다. G6PD와 PK의 활성이 감소한 환자 15의 부, 모, 남자형제(오빠)의 검사 결과, 어머니의 G6PD 활성도가 참고범위의 하한이었고, 그 외 가족 효소활성도의 감소는 관찰되지 않았다.

Table 13. Pilot study results of suspicious patients with erythrocytes enzymopathy

Case No.	Sex/Age (yrs)	G6PD	PK	P5'N	HK	TPI	AD
1	M/3	0.32	1.6	5.7	215	465	162.9
2	M/17	2.18	1.84	26.2	236	410	118.8
3	M/17	1.05	5.75	7.6	717	532	193.2
4	M/4	3.57	4.63	30.0	616	467	233.0
5	M/18	0.93	1.81	41.6	608	708	131.7
6	F/46	2.04	1.44	73.9	1217	922	531.0
7	F/15	0.92	1.57	10.7	336	525	139.3
8	M/20	4.02	0.84	138.7	327	1242	228.8
9	F/17	0.56	1.81	19.1	290	727	100.0
10	F/1	2.21	1.02	25.5	803	955	515.9
11	F/3	1.86	4.28	19.8	566	578	245.2
12	M/19	2.33	0.62	109.0	1429	759	309.0
13	F/4	1.86	4.28	19.8	566	578	245.2
14	F/16	1.50	2.70	27.9	924	986	397.3
15	F/6	0.92	0.95	19.2	869	955	391.5
16	M/22	2.46	2.23	12.9	1144	1058	416.2
Reference interval (Pediatric)		1.74-2.71	1.04-3.27	3.45-47.1	225-515	409-835	259.8-622.4

Reference interval (Adult)	1.06-3.31	1.02-2.46	10.4-56.4	123-488	409-834	76.9-249.7

*Unit for all results except G6PD and PK was µg/min/gHb. G6PD and PK unit was mg/min/gHb

Abbreviations: G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; P5'N, pyrimidine 5' nucleotidase; HK, hexokinase; TPI, triosephosphate isomerase; AD, adenosine deaminase

고찰

본 연구로 유전용혈빈혈 진단에서 적혈구막단백에 대해 질량분석법을 이용한 SDS-PAGE법을 대체할 새로운 방법과 적혈구 주요 효소의 이상에 대한 보다 간편하고 강력한 검사법을 개발하고 평가하였다.

적혈구막 단백은 세포막 단백의 비밀을 밝히는 열쇠로 생각되어 많은 연구가 이루어지고 있다[21]. 최근의 연구 경향은 단백분리기법의 발전[19,22–24]과 고성능 질량분석기의 개발[25–27]에 따라 기존에 알려지지 않은 새로운 적혈구막단백을 찾아내는 것에 중점을 두고 있다. 이러한 연구는 단백 검출의 민감도를 향상하고 적혈구의 생리와 발병 과정에 대한 이해를 돕는 데 일조하고 있다[28]. 그러나, 이렇게 찾아낸 새로운 단백은 실제 환자에서의 의미가 불분명하므로 임상 진단 목적으로는 아직은 쓸 수 없으며, 환자 진료에 오히려 혼란을 줄 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 기존 SDS-PAGE법에서 검출하는 실제 진단에 사용되는 주요 6가지 적혈구 단백에 초점을 맞추어 검사법 개발을 진행하였다.

본 연구에서 사용한 것과 같은 고해상도 질량분석기는 생명과학 연구에서 단백의 변화나 바이오마커 발견을 위한 단백 프로파일링에 널리 사용되며, 다양한 단백 분리 기술과 같이 결합하여 이전에는 불가능하였던 수천 가지의 단백을 식별할 수 있다[29]. 그러나, 이러한 연구의 주요 목적은 바이오마커 후보를 검색하고 가능한 많은 단백질을 찾아냄으로써 생리학적 과정을 밝히기 위함이므로 본 연구에서와같이

진단검사법으로서 특정 단백을 검출하는 목적에서는 방법 특유의 낮은 민감도와 높은 부정확성으로 인해 비교적 유용성이 낮다. 다만, 유전성 적혈구막단백 질환에서 중요한 단백들은 양이 비교적 많아 민감도와 재현성 측면에서 크게 문제가 되지 않았다. 이는 임상검사에서 혈장 알부민과 면역글로불린과 같은 풍부한 단백 검출이 용이한 것과 비슷하다.

적혈구막단백에 관한 이전 연구는 백혈구의 오염을 방지하는 데 노력을 기울였다[20,24,30]. 백혈구는 전체 혈액 세포의 0.1%에 불과하므로 본 연구의 대상인 6가지 단백 같은 적혈구에 주로 존재[31]하며 상대적으로 양이 풍부한 단백의 검사에는 영향을 미치지 않을 가능성이 높다. 따라서 본 연구에 사용된 간단한 백혈구 오염 방지 방법은 적혈구막의 주요 단백의 검사 목적으로는 충분하다고 판단된다.

새로운 혈구막단백 검사법의 단점은 총 단백에서의 비율을 측정하는 검사, 즉 상대적 정량이라는 점이다. 현재 임상에서 사용되는 검사 대부분이 절대 정량법임을 고려한다면 이는 단점이 될 수 있다. 향후 본 연구에서 얻은 적혈구 단백의 질량분석 결과를 토대로 MRM 기반의 절대 정량법을 개발할 수 있을 것으로 예상한다.

적혈구막단백에 대한 새 검사법의 성능 평가 결과 정밀도는 최대 8% 이하로 우수하였다. Protein 4.1의 정밀도가 상대적으로 가장 낮았지만 농도가 낮은 것을 감안하면 허용 가능한 수준으로 생각된다. 참고범위 설정 과정에서 나이나 성별에 따라 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았으므로,

참고범위를 구분 없이 하나로 설정하여 결과를 판정하였다. 다만, 유전질환의 특성상 나이별 성별 간 차이가 있을 수 있으므로, 차후 가능하다면 나이별 성별 참고범위 설정하려는 노력이 필요할 것으로 생각한다.

의심 환자를 대상으로 적혈구 단백의 이상을 검사한 결과는 1명을 제외한 17명 환자에서 하나 이상의 단백 감소를 검출할 수 있었다. Protein 4.2 감소가 가장 흔하게 관찰되었는데, 이는 유전구상적혈구증에서 백인에서는 드문 편이나[32,33], 일본[34]이나 국내에서는 비교적 흔하게 검출되는 것으로 알려져 있다. Ankyrin은 백인에서 50-60% 정도로 가장 흔하게 관찰되는 막단백 이상으로 본 연구에서는 33.3%(6/18)에서 감소하였는데 이는 이전 국내 연구[35]와 유사하였다. Band 3 감소는 7명(38.9%)으로 상대적으로 흔하게 관찰되었는데, 기존 SDS-PAGE법의 경우 band 3에 대한 비율로 감소 여부를 판단하므로 소량의 감소가 있으면 검출이 어려운 점[32]과 실제로 band 3 이상으로 인한 유전용혈빈혈이 많이 보고[36–38]되고 있는 것을 고려하면 기존 연구에서 band 3 결핍이 실제보다 과소평가되었을 가능성을 생각할 수 있다.

특정 적혈구막단백 결핍과 임상 증상의 중증도 관계에 대해서 많이 알려진 것은 없으나, band 3 결핍보다 spectrin의 결핍에서 평균 혈색소치가 낮으며 임상 증상이 심한 것으로 알려져 있다[5]. 본 연구에서도 spectrin이 감소한 환자군에서 band 3 감소군에 비해 평균

혈색소치가 낮았다(12.9 vs. 9.4 g/dL). 또한, 2개 이상의 단백감소가 동시에 있는 환자군이 1개 이하의 막단백감소가 있는 군에 비해 혈색소치가 낮았다(9.8 vs. 11.9 g/dL). 다만, 환자수가 적어 통계적 유의성은 없었다. 특정 막단백 결핍 환자에서 결핍의 정도와 임상 중증도에 대한 이전 연구는 없었으며, 본 연구에서도 band 3, ankyrin, spectrin 등 모든 단백에서 연관관계는 관찰되지 않았다. 이러한 막단백 결핍의 종류, 정도와 임상증상의 관계에 대해서는 차후에 많은 환자 검사결과와 임상정보가 축적되면 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각된다.

새로운 적혈구 막단백 검사법의 검사소요시간은 검체 전처리 과정에서 최종 결과보고까지 2-3일 정도 소요되며 이는 기존의 SDS-PAGE법이 수작업 위주로 일주일 정도 소요되던 것에서 크게 단축된 것으로 검사실에서 실제 환자 검사 수행 시 큰 이점으로 작용할 것으로 생각된다.

적혈구 효소 이상에 대한 새로운 검사법은 우선 기존 분광광도법에 비해 효소반응단계를 줄였다. 분광광도법으로 검출할 수 있도록 하기 위해 추가적인 효소반응단계가 필요한 기존 검사법에 비해 TPI을 제외한 나머지 효소에서 한 단계 반응만으로 검사가 가능하게 하였고 조효소가 아닌 효소 산물을 직접 측정하였다. 이는 검사의 정확도를 높이는 효과가 있을 것으로 생각된다. 다만, 효소반응단계에 기본적으로 소요되는 시간이 있어 기존 방법에 비해 검사소요시간의 이점은 크지 않으나, 6가지 효소 검사를 3가지씩 2세트로 나누어 한번에 검사를 할 수

있으므로 각 효소 별로 따로따로 측정해야 했던 번거로운 과정을 줄일 수 있었다. 새로운 검사법은 6가지 효소를 2세트로 나누어 검사하도록 하였는데, 이는 예비실험을 통해 다중검사 가능여부, 유병률 등 진단검사적 특성을 고려하여 설정하였다.

검사결과 판단을 위해 6가지 효소 모두에 참고범위를 설정하였다. 나이에 따라 효소의 활성도가 다르므로 성인과 10세 이하 소아의 참고치를 각각 설정하였다. 소아 환자가 많은 유전질환의 특성을 고려한다면 향후 소아 유전용혈빈혈 환자에 좀더 적합한 세분화된 참고범위를 추가 설정하는 것이 필요하다.

적혈구 효소검사가 의뢰된 16명의 환자에 대하여 예비검사를 시행하였을 때 G6PD의 활성도 감소를 보인 환자는 6명(37.5%), PK의 활성도 감소를 보인 환자는 4명(25.0%), AD는 2명(12.5%), P5'N과 HK는 각각 1명(6.2%)씩 감소되었다. 환자수가 그리 많지 않음에도 적혈구 효소 이상 중 가장 흔한 것으로 알려져 있는 세가지 효소, 즉 G6PD, P5'N, PK의 결핍이 모두 관찰되었다.

특이한 점은 유전자 검사를 통해 PK 효소이상이 확진된 환자 1명에서 PK의 활성도가 저하되지 않은 결과를 보였는데, 이러한 결과의 원인으로 백혈구 오염이나 mutant PK의 가능성을 생각할 수 있다. 백혈구에도 PK가 다량 존재하므로 백혈구 제거가 충분치 않으면 PK의 검사결과에 큰 영향을 미칠 수 있다[39]. Mutant PK의 경우 생체 내에서는 활성이 떨어지지만, 기질인 phosphoenolpyruvate의 농도가 높은

조건에서 검사를 시행하면 정상 활성도를 보이는 경우가 있다고 알려져 있다. PK의 활성도가 정상으로 나타나기 때문에 PK 결핍을 배제하기가 어려우며, 낮은 농도의 기질을 사용해야 진단할 수 있다[12]. 따라서, 검사 전에 백혈구 제거를 확인하고 mutant PK가 의심될 경우 기질 농도를 낮춘 조건에서 추가 검사를 시행하는 것이 필요하다.

환자 가족에 대한 검사에서 G6PD 감소를 보인 환자의 어머니에서 G6PD 활성도가 정상 범위의 하한을 보인 것 이외에는 모두 정상 범위를 보였다. G6PD의 경우 X염색체 열성(X-linked recessive)이며, 그 외 나머지 효소결핍은 대부분 상염색체 열성으로 유전[11]되므로 효소활성도 검사상 환자 가족은 정상으로 나올 가능성이 있으며, 보인자 여부 등의 정확한 확인을 위해서는 원인 유전자에 대한 분자진단 검사가 필요할 것으로 생각한다.

현재 국내에서 검사법이 확립된 효소는 10여 종류로 새로운 검사법에서 검사 가능한 6가지 외에 glucose phosphate isomerase (GPI), adenylate kinase (AK), phosphofructokinase (PFK), phosphoglycerate kinase (PGK) 등이 있으며, 이외에도 유전용혈빈혈을 일으킬 수 있는 효소 는 다양하다. 이들 효소에 대해서는 추가적인 검사법 개발이 필요하다.

유전용혈빈혈은 수혈을 하는 환자가 많으므로 이에 대한 검사법도 수혈의 영향을 반드시 고려해야 한다. 최근 수혈력이 있는 환자는 수혈된 적혈구에 의해 막단백이나 효소이상이 있더라도 정상으로 나올 수 있기 때문에 검사결과 위음성을 보일 수 있다. 이를 해결하기 위해서

수혈된 적혈구의 양을 계산하여 최종 검사결과를 보정하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나, 이를 위해서는 수혈된 적혈구의 막단백의 양이나 효소활성도를 알고 있어야 하며, 수혈된 적혈구를 정상적혈구로 간주하여 정상참고범위를 적용하는 것도 정상참고범위가 넓어 정확도가 떨어진다. 또한 실제 임상에서는 일반적으로 수혈 직후가 아니라 수혈 후 시간이 어느 정도 지나서 검사를 의뢰하므로 수혈 이후의 수혈된 적혈구의 변화를 추정하기 어렵다. 이와 같은 문제로 수혈력이 있는 환자에서 수혈 영향을 반영하여 검사결과를 보정하는 것은 현실적으로 어렵다고 판단된다. 그러므로 가능한 한 수혈 이후 많은 시간이 지난 이후에 검체 채취 및 검사를 진행하는 것이 수혈이 검사결과에 미치는 영향을 최소화할 수 있는 현실적인 방법으로 생각된다. 덧붙여서 검사 시행 시 반드시 최근 수혈력에 대한 조사를 실시하고, 만약 수혈력이 있다면 검사결과보고서에 최근의 수혈이 검사결과에 영향을 미칠 수 있음을 명기해야 한다. 또한, 검사결과가 정상이거나, 혹은 비정상이라도 추정진단과 맞지 않는 경우 등에서는 수혈의 영향이 없어진 이후에 재검사할 필요가 있다.

결론적으로 본 연구를 통해 새롭게 개발된 질량분석을 이용한 검사법이 앞으로 유전용혈빈혈의 선별과 진단에 실제적으로 사용될 수 있을 것으로 평가되며, 향후 본 연구에서 얻은 지식과 기술을 토대로 질량분석기 등 최신의 검사기기를 이용한 향상된 검사법 개발이 지속적으로 이루어질 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. Lancet. 2008 Oct 18;372(9647):1411–26.
2. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane : past , present , and future. Blood. 2009 Nov 15;112(10):3939–48.
3. Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW. Red blood cell (RBC) membrane proteomics - Part I: Proteomics and RBC physiology. J Proteomics. Elsevier B.V.; 2010;73(3):403–20.
4. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. Blood Rev. 2007 Jan;21(1):1–20.
5. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. Blood Transfus. 2011 Jul;9(3):274–7.
6. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King M-J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. Br J Haematol. 2012 Jan;156(1):37–49.
7. Lee YKJ, Cho HI, Park SS, Ra E, Chang YH, Hur M, et al. SDS-PAGE Analysis of Red Cell Membrane Proteins in Hereditary Hemolytic Anemia. Korean J Hematol. 1999 Nov 1;34(4):559–67.
8. Hah JO. Red Blood Cell Enzymopathies Causing Hereditary Hemolytic Anemia. Clin Pediatr Hematol. 2012 Apr 1;19(1):1–6.
9. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. Bull World Health Organ. 1989 Jan;67(6):601–11.
10. Kim MK, Yang CH, Kang SH, Lyu CJ, Kim KY. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency--report of 4 cases. J Korean Med Sci. 1992 Mar;7(1):71–5.
11. Koralkova P, van Solinge WW, van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. Int J Lab Hematol. 2014;36(3):388–97.

12. Beutler E. Red Cell Metabolism: Manual of Biochemical Methods. 2nd ed. Grune & Stratton, Inc., New York. 1984.
13. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, et al. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. Clin Chem. 2004 Oct;50(10):1785–96.
14. Ko D-H, Jun S-H, Park H-D, Song SH, Park KU, Kim JQ, et al. Multiplex enzyme assay for galactosemia using ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2010;56(5):764–71.
15. Han M, Jun S-H, Song SH, Park KU, Kim JQ, Song J. Use of tandem mass spectrometry for newborn screening of 6 lysosomal storage disorders in a Korean population. Korean J Lab Med. 2011 Oct 1;31(4):250–6.
16. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res. 2014 Oct 27;43(Database issue):D204–12.
17. Cheng F, Blackburn K, Lin Y, Goshe MB, Williamson JD. Absolute protein quantification by LC/MS(E) for global analysis of salicylic acid-induced plant protein secretion responses. J Proteome Res. 2009 Jan;8(1):82–93.
18. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem. 2003 Jul;49(7):1041–4.
19. Bruschi M, Seppi C, Arena S, Musante L, Santucci L, Balduini C, et al. Proteomic analysis of erythrocyte membranes by soft immobiline gels combined with differential protein extraction. J Proteome Res. 2005 Jan;4(4):1304–9.
20. Kakhniashvili DG, Bulla LA, Goodman SR. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. Mol Cell Proteomics. 2004 May;3(5):501–9.
21. Fowler VM. The human erythrocyte plasma membrane: a Rosetta Stone for decoding membrane-cytoskeleton structure. Curr Top Membr. 2013 Jan;72:39–88.
22. Low TY, Seow TK, Chung MCM. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser

desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Proteomics. 2002 Sep;2(9):1229–39.

23. Peker S, Akar N, Demiralp DO. Proteomic identification of erythrocyte membrane protein deficiency in hereditary spherocytosis. Mol Biol Rep. 2012 Mar;39(3):3161–7.

24. van Gestel RA, van Solinge WW, van der Toorn HWP, Rijksen G, Heck AJR, van Wijk R, et al. Quantitative erythrocyte membrane proteome analysis with Blue-Native/SDS PAGE. J Proteomics. Elsevier B.V.; 2010 Jan 3;73(3):456–65.

25. Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas MG, Darde VM, Zubiri I, Caramelo C, et al. A novel methodology for the analysis of membrane and cytosolic sub-proteomes of erythrocytes by 2-DE. Electrophoresis. 2009 Dec;30(23):4095–108.

26. Pesciotta EN, Sriswasdi S, Tang H-Y, Mason PJ, Bessler M, Speicher DW. A label-free proteome analysis strategy for identifying quantitative changes in erythrocyte membranes induced by red cell disorders. J Proteomics. 2012 Dec 5;76 Spec No:194–202.

27. Polprasert C, Chiangjong W, Thongboonkerd V. Marked changes in red cell membrane proteins in hereditary spherocytosis: a proteomics approach. Mol Biosyst. 2012 Sep;8(9):2312–22.

28. Pasini EEME, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. Blood. 2006 Aug 1;108(3):791–801.

29. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. Chem Rev. 2007 Aug;107(8):3601–20.

30. Debaugnies F, Cotton F, Boutique C, Gulbis B. Erythrocyte membrane protein analysis by sodium dodecyl sulphate-capillary gel electrophoresis in the diagnosis of hereditary spherocytosis. Clin Chem Lab Med. 2011 Mar;49(3):485–92.

31. Haudek VJ, Slany A, Gundacker NC, Wimmer H, Drach J, Gerner C. Proteome maps of the main human peripheral blood constituents. J Proteome Res. 2009 Aug;8(8):3834–43.

32. Saad ST, Costa FF, Vicentim DL, Salles TS, Pranke PH. Red cell membrane protein abnormalities in hereditary spherocytosis in Brazil. Br J Haematol. 1994 Oct;88(2):295–9.
33. Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, Marcello AP, Fermo E, Pedotti P, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. Haematologica. 2008;93(9):1310–7.
34. Yawata Y. Band 4.2 abnormalities in human red cells. Am J Med Sci. 1994 Mar;307(3):190–203.
35. Lee YK, Cho HI, Park SS, Lee YJ, Ra E, Chang YH, et al. Abnormalities of erythrocyte membrane proteins in Korean patients with hereditary spherocytosis. J Korean Med Sci. 2000. p. 284–8.
36. Alloisio N, Maillet P, Carré G, Texier P, Vallier a, Baklouti F, et al. Hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Association with a nonsense mutation of the band 3 gene (allele Lyon), and aggravation by a low-expression allele occurring in trans (allele Genas). Blood. 1996 Aug 1;88(3):1062–9.
37. Bracher NA, Lyons CA, Wessels G, Mansvelt E, Coetzer TL. Band 3 Cape Town (E90K) causes severe hereditary spherocytosis in combination with band 3 Prague III. Br J Haematol. 2001 Jun;113(3):689–93.
38. Sánchez-López JY, Camacho AL, Magaña MT, Ibarra B, Perea FJ, Sanchez-Lopez JY, et al. Red cell membrane protein deficiencies in Mexican patients with hereditary spherocytosis. Blood Cells, Mol Dis. 2003 Jan;31(3):357–9.
39. Beutler E, Baronciani L. Mutations in pyruvate kinase. Hum Mutat. 1996 Jan;7(1):1–6.

Abstract

Development of a new analysis method using mass spectrometry on erythrocyte membrane proteins and enzymes related to hereditary hemolytic anemia

Chul Min Park

Department of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

The causes of hereditary hemolytic anemia include erythrocyte membrane protein disorders, or erythrocyte enzymopathies. Classic conventional electrophoresis has been used to examine the erythrocyte membrane protein, but it showed lower reproducibility in addition to large consumption of time and efforts. Erythrocyte enzymopathies has been measured by using the spectrophotometry. But this method is difficult to perform multiple tests at once and its effectiveness is deteriorated due to the variety of causal enzymes. To this end, this study aims to develop and to verify the performance of a test method more improved than the existing method in diagnosis of erythrocyte membrane disorders and erythrocyte enzymopathies among the causes of hereditary hemolytic anemia by using the latest techniques of mass spectrometry.

For the analysis of erythrocyte membrane protein, clinically significant erythrocyte membrane protein from the erythrocyte membrane protein-derived peptides by using mass spectrometry. And they were distinguished from previous known band 3, spectrin alpha, spectrin beta, protein 4.1, protein 4.2, and ankyrin. The precision of new method was evaluated, compared to the previous methods and its reference range was established. For the analysis of erythrocyte metabolism enzymes, the ion suppression was evaluated for development of method by using a mass spectrometry and the test sample diluting multiple and reaction time were optimized for 6 types of main enzymes including the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), pyruvate kinase (PK), pyrimidine 5'-nucleotidase (P5'N), hexokinase (HK), triosephosphate isomerase (TPI) and adenosine deaminase (AD). Linearity and precision of new method were confirmed while the reference range was established and the preliminary evaluation for the patients was performed.

The analysis of erythrocyte membrane protein by using a mass spectrometry had identified 6 types of clinically significant membrane proteins, and the coefficients of variation (CVs) of membrane protein measurement were in the range of 1.6-7.5%. When compared the new test method to the previous test method:SDS-PAGE method, the sum of spectrin alpha and beta (r=0.8154, P=0.014) and ankyrin(r=0.8743, P=0.005) had shown strong correlation while protein 4.1 and protein 4.2 had no significant correlation. Of 18 patients, there were deficiencies of protein 4.2 in 9 patients, band 3 deficiencies in 7 patients, ankyrin deficiencies in 6 patients, spectrin alpha deficiencies in 2 patients, and specrn beta deficiencies in 4 patients. All enzymes had shown excellent linearity from the rythrocyte enzyme assay performed by using a mass spectrometry. When conducted the precision

assessment, the results had shown the CVs ranges of each enzyme's measured value was 7.5-17.0%. The reference ranges of each enzyme were G6PD (1.06-3.31 mg/min/gHb), PK (1.02-2.46 mg/min/gHb), P5'N (10.4-56.4 μg/min/gHb), HK (123-488 μg/min/gHb), TPI (409-834 μg/min/gHb) and AD (76.9-249.7 μg/min/gHb). After the essays for 16 patients, the reduction of activities were observed for G6PD in 6 patients, for PK in 4 patients, and for P5'N and for HK was observed from each one subject.

The erythrocyte membrane protein and erythrocyte enzyme assays by using newly developed mass spectrometry through this study, are considered to be helpful for the diagnosis of hereditary hemolytic anemia in the future.

Keywords: hemolytic anemia, erythrocyte membrane, erythrocyte enzyme, mass spectrometry

Student Number: 2004-23819