

# Chapter 7.

## ABO식 혈액형 판정 & Luminol Test



식품생명과학부/영양생화학실험  
이혜련



인제대학교  
INJE UNIVERSITY

# 학습목표

## 01 ABO식 혈액형 판정

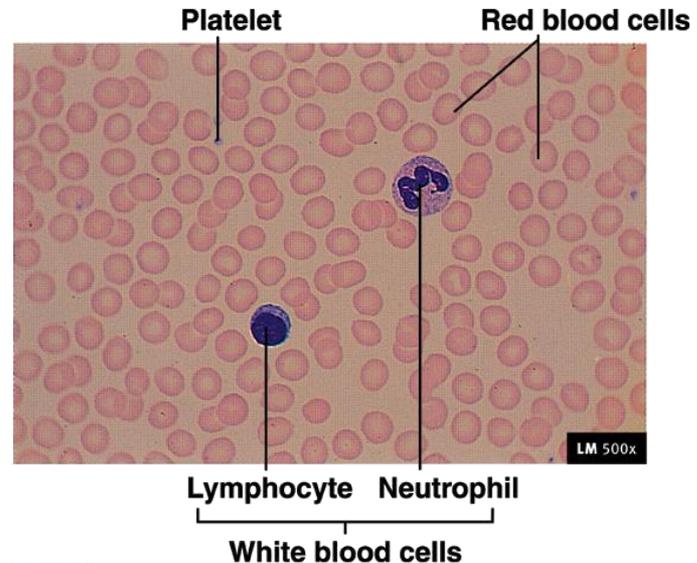
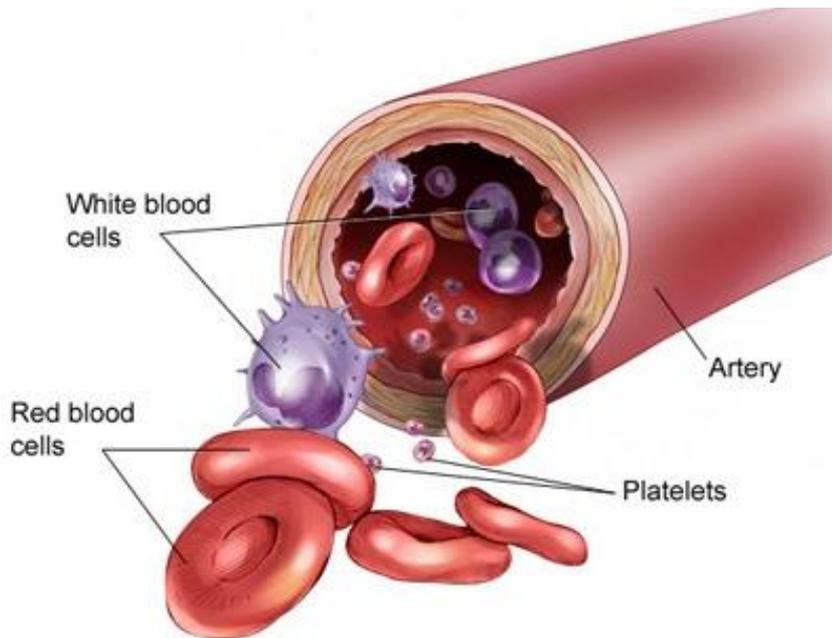
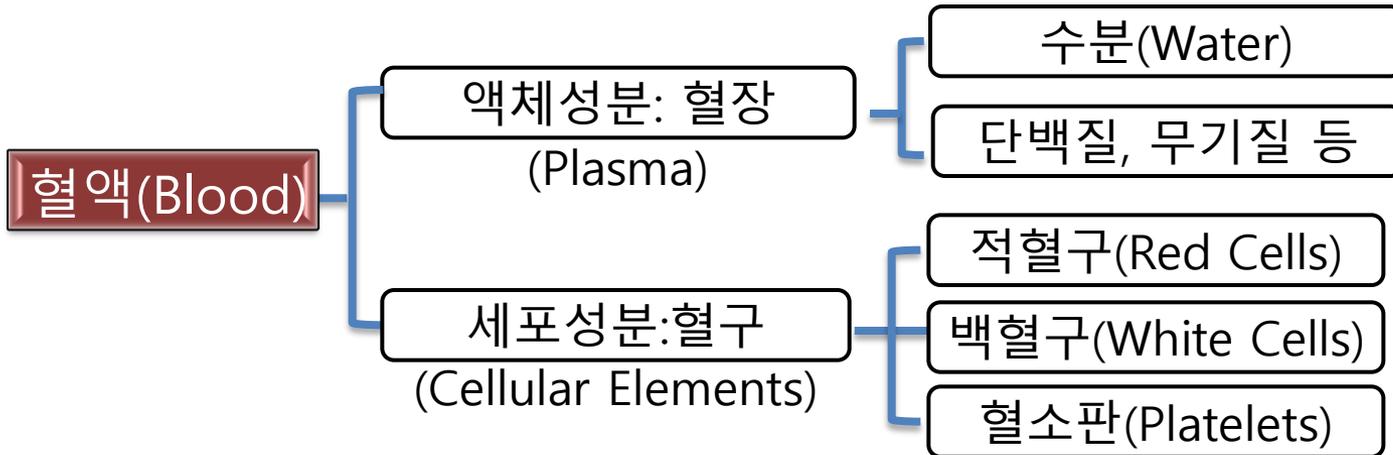
- 수혈 및 장기이식 또는 법의학 및 유전학 정보를 얻기 위하여 검사
- 혈액으로 응집 반응의 여부를 관찰
- 혈액형 구분에 따른 적혈구의 종류와 항원, 항체에 대해 알 수 있다.

## 02 Luminol Test

- 혈흔 예비시험법의 하나.
- 화학발광검사법에 대해 알 수 있다.



# ABO식 혈액형 판정



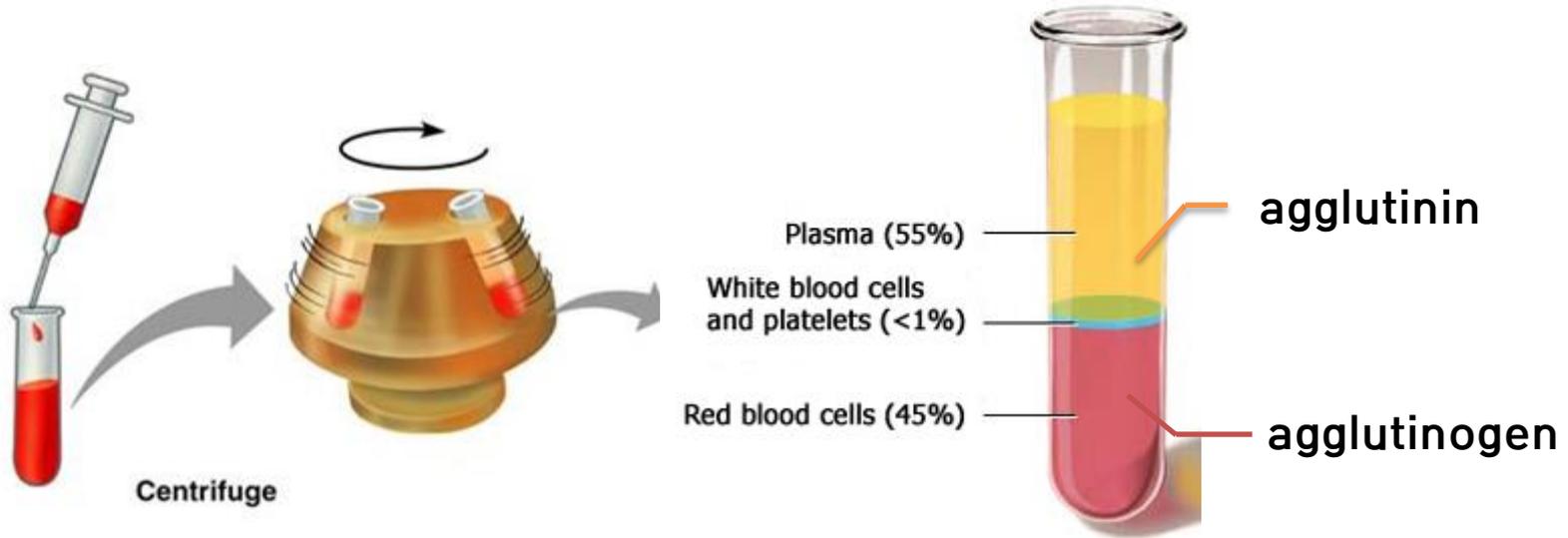
● 조성

혈장	조성	① 물(91%)	② 염류	③ 혈장단백질
	성분	물	<ul style="list-style-type: none"> <li>나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 염화물, 중탄산염 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>알부민, 피브리노겐, 면역 글로불린 등</li> </ul>
	기능	용매	<ul style="list-style-type: none"> <li>삼투압 평형, pH 조절, 막 전압 조절 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>삼투압 평형, pH 조절, 응고, 면역 반응 등</li> </ul>

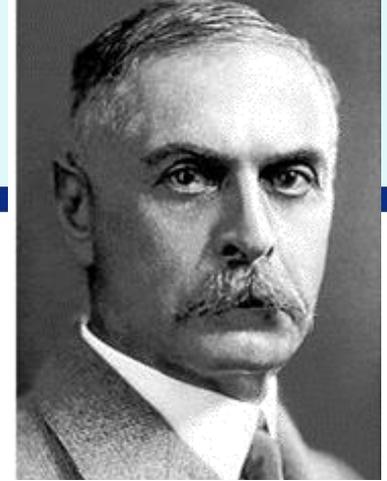
혈구	조성	① 적혈구	② 백혈구	③ 혈소판
	1ml당 갯수	500 - 600 백만	5 - 6 천	25 - 40 만
	기능	산소와 이산화탄소 수송	외래 세포 파괴 및 <b>항체 생산</b>	혈액 응고

- 응집소 & 응집원



- 응집소 (agglutinin) : 응집반응에 관여하는 항체를 말한다
- 응집원(agglutinogen): 적혈구에 있는 항원으로 응집소에 의하여 응집되는 물질

# ABO식 혈액형 판정



카를 란트슈타이너 [Karl Landsteiner]  
1868.06.14~1943.06.26

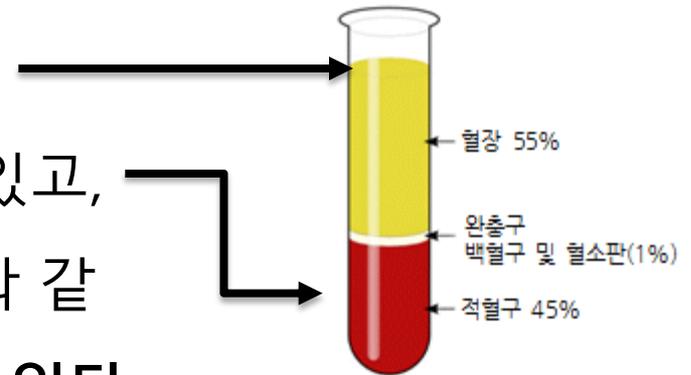
## ● ABO식 혈액형

1901년 오스트리아의 카를 란트슈타이너 발견한 혈액형 구분법이다.

## ● 혈액의 응집 반응

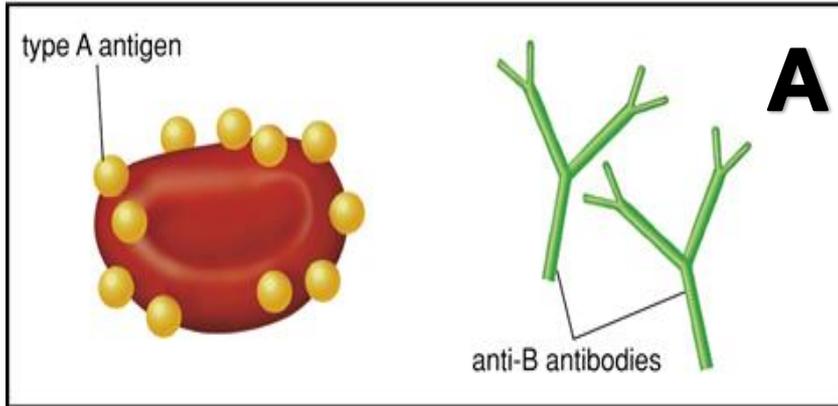
혈액형이 서로 다른 두 사람의 혈액을 섞었을 때 일어나는 응집 반응의 여부로 구분하며

- **혈장** - 항체로 작용하는 응집소가 있어
- **적혈구** - 항원으로 작용하는 응집원이 있고,
- 항원 항체 반응이 일어나기 때문에 이와 같은 응집 반응을 통해 혈액형을 판정할 수 있다.

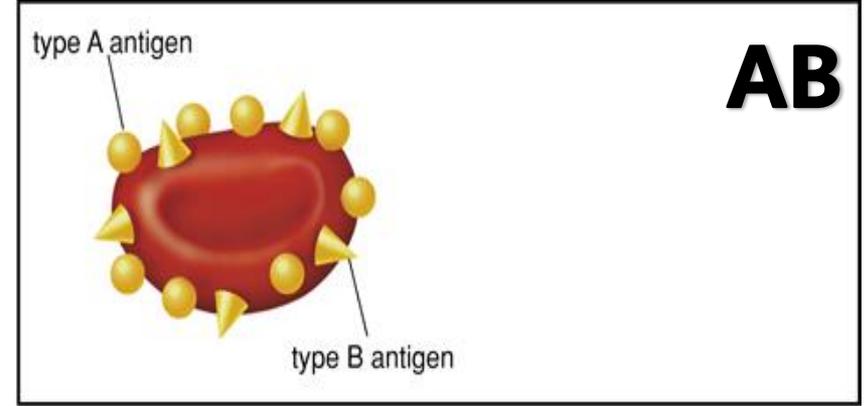


[혈액의 원심분리]

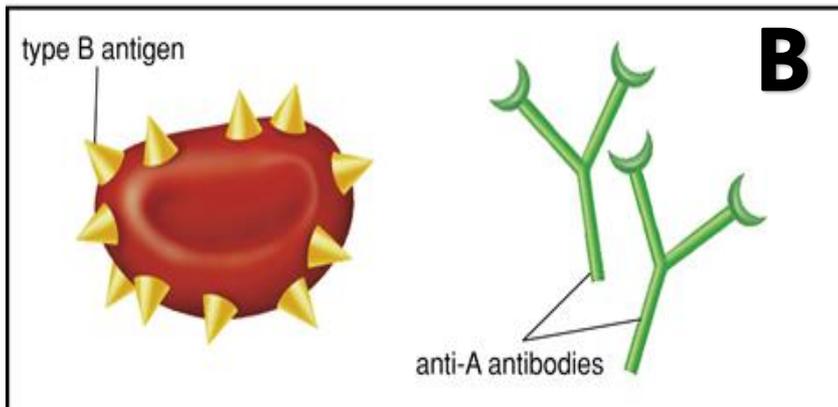
# ABO식 혈액형 판정



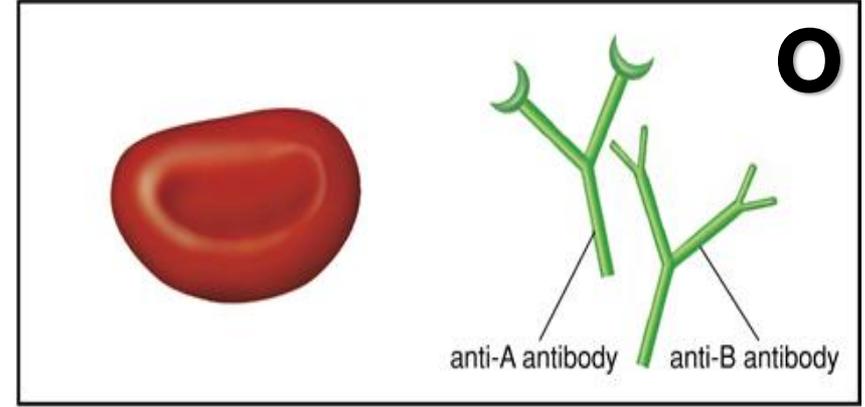
**Type A blood.** Red blood cells have type A surface antigens. Plasma has anti-B antibodies.



**Type AB blood.** Red blood cells have type A and type B surface antigens. Plasma has neither anti-A nor anti-B antibodies.



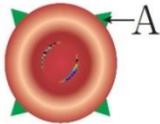
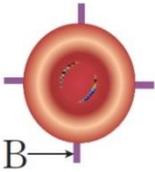
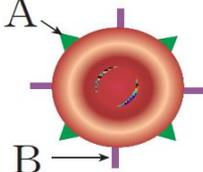
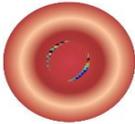
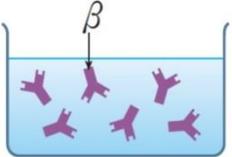
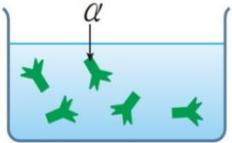
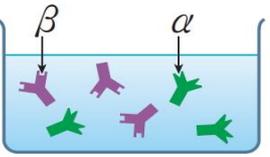
**Type B blood.** Red blood cells have type B surface antigens. Plasma has anti-A antibodies.



**Type O blood.** Red blood cells have neither type A nor type B surface antigens. Plasma has both anti-A and anti-B antibodies.

## ABO식 혈액형

### 1) ABO식 혈액형 종류

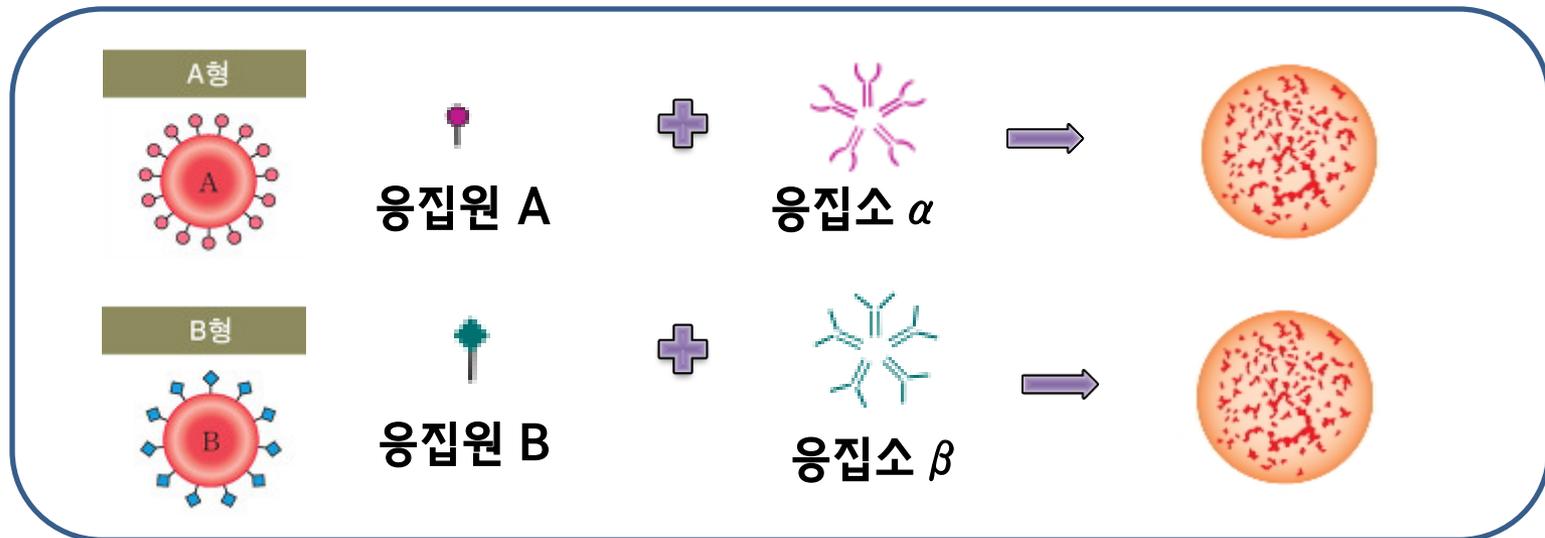
혈액형	A형	B형	AB형	O형
응집원(적혈구) 항원(antigen)				 응집원 없음
응집소(혈장) 항체(antibody)			응집소 없음	

### 2) 응집원과 응집소

응집원에는 A와 B가 있고, 응집소에는 α와 β가 있다.

## 3) ABO식 혈액형의 판정 원리

- 항원 항체 반응의 결과
- 응집원 A와 응집소  $\alpha$ 가 만나거나, 응집원 B와 응집소  $\beta$ 가 만나면 응집 반응이 일어남





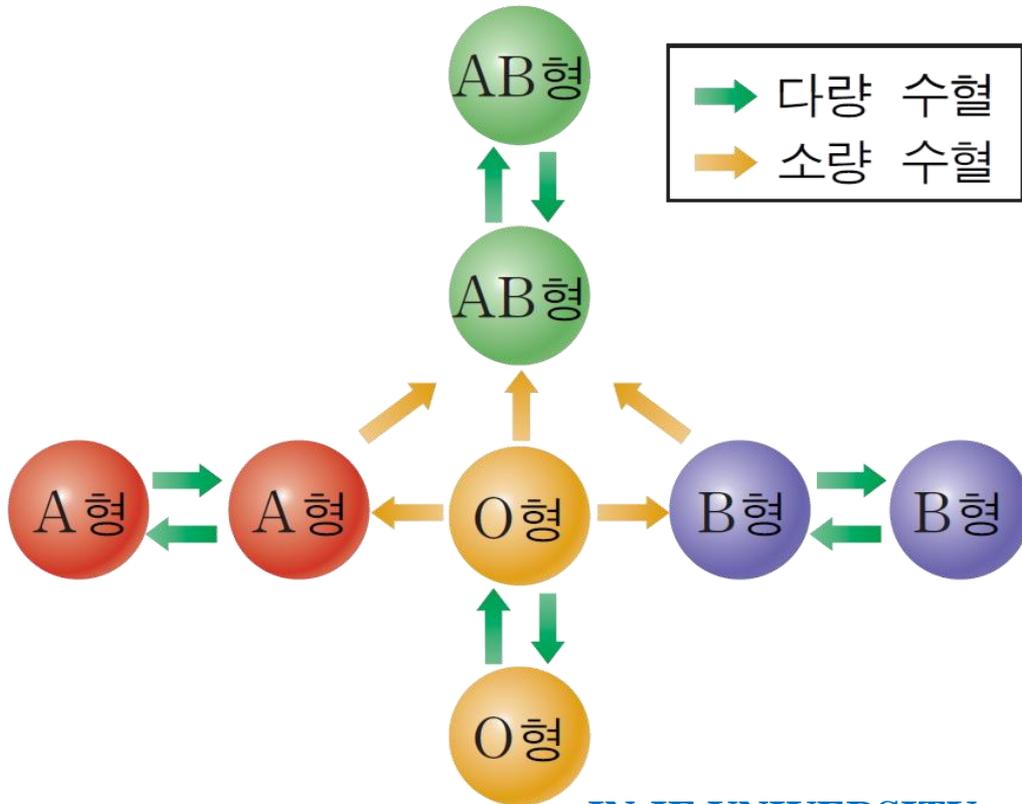
## 4) ABO식 혈액형 판정

- 항 A 혈청: 청색 색소, (응집소  $\alpha$  有) = B형 표준 혈청
- 항 B 혈청: 황색 색소, (응집소  $\beta$  有) = A형 표준 혈청

혈청	혈액형			
	A형	B형	O형	AB형
항A혈청	+	-	-	+
항B혈청	-	+	-	+

## 5) ABO식 혈액형과 수혈

- 0형: 응집원이 없기 때문에 ,수혈 가능 (소량)
- AB형: 응집소가 없어 , 수혈 받을 수 있다 (소량)



AB형	O형
<p>A → B →</p>	<p>응집원 없음</p>
<p>응집소 없음</p>	<p><math>\beta</math>     <math>\alpha</math></p>

## Rh식 혈액형

### 1) 종류

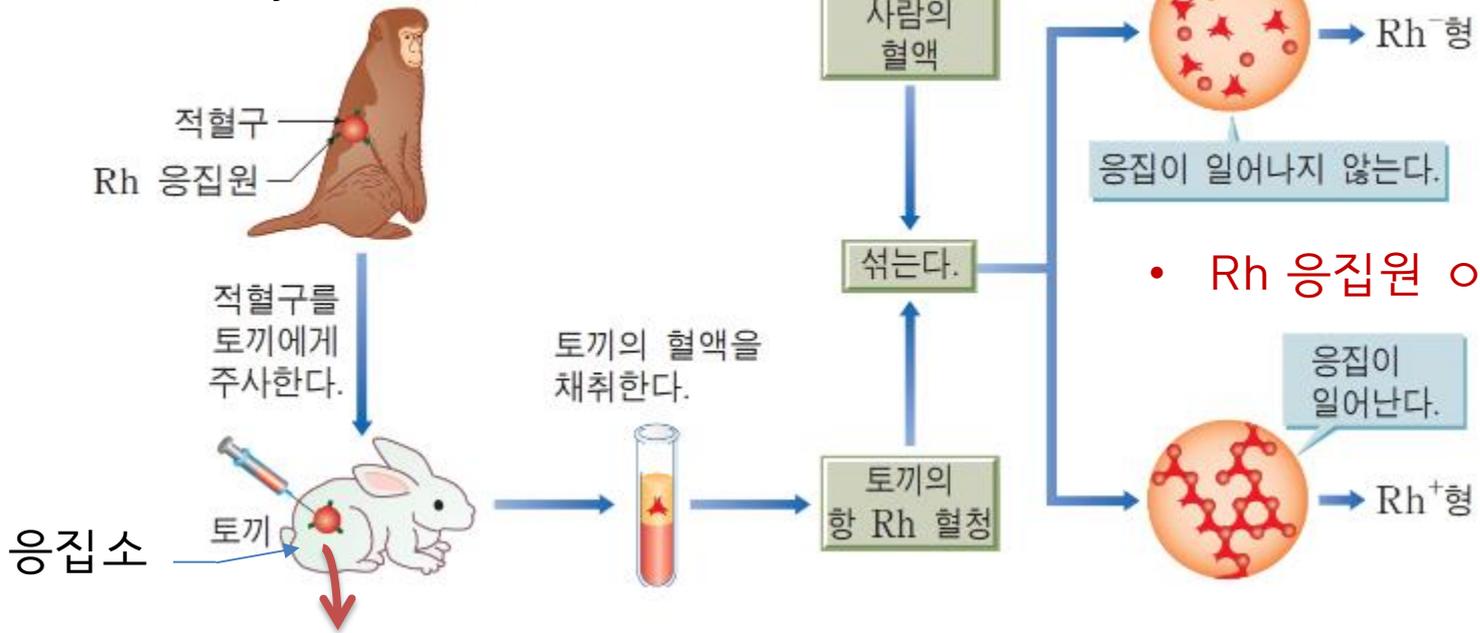
- 적혈구 막에 Rh 응집원(응집원D)이 있으면 Rh<sup>+</sup>형,  
없으면 Rh<sup>-</sup>형으로 구분한다.

### 2) 응집원과 응집소

혈액형	Rh <sup>+</sup> 형	Rh <sup>-</sup> 형
Rh 응집원(적혈구)	있다.(응집원D)	없다.
Rh 응집소(혈장)	없다.	Rh 응집원에 노출되면 생성(응집소 $\delta$ )

## 3) Rh식 혈액형의 판정 원리

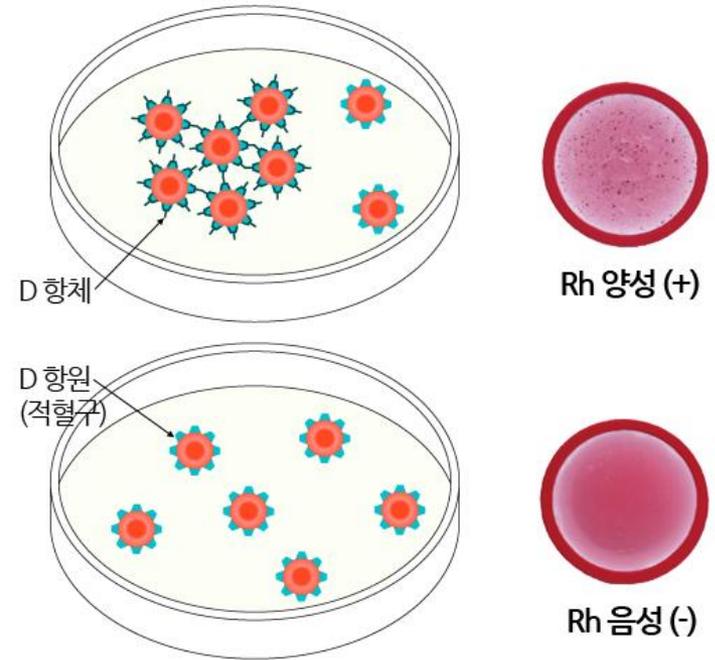
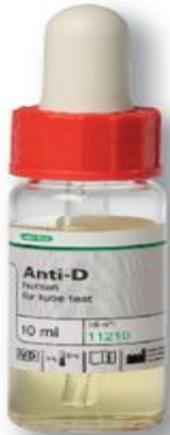
(Rhesis Monkey) 붉은털원숭이



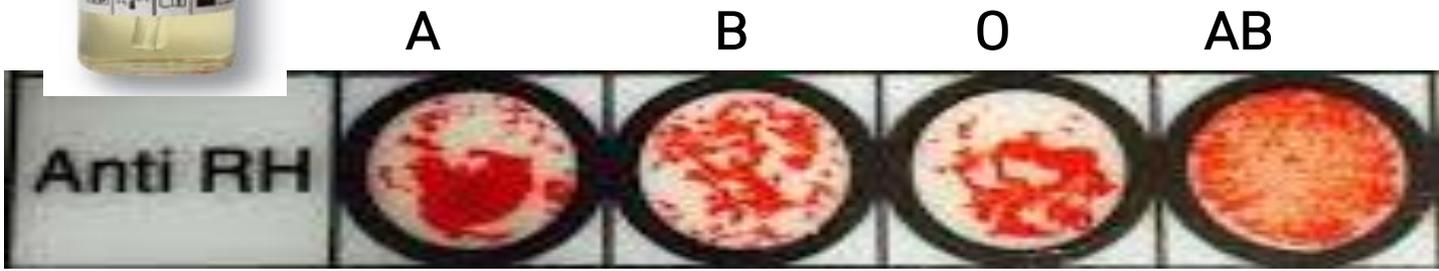
- 붉은털원숭이의 적혈구를 응집시키는 응집소(항체)가 생성
- 응집소가 형성된 토끼의 혈청(항 Rh 혈청)을 이용하여 이에 대한 응집 반응 여부로 Rh식 혈액형을 판정한다.

## 4) Rh식 혈액형의 판정

- 항 Rh 혈청: Rh 응집소 (응집소 $\delta$ )
- 응집 반응이 일어나면 Rh<sup>+</sup>형,
- 응집 반응이 일어나지 않으면 Rh<sup>-</sup>형



【Rh 혈액형 검사】



## 5) Rh식 혈액형과 수혈

- Rh<sup>+</sup>형  $\longrightarrow$  Rh 응집원이 없는 Rh<sup>-</sup>형이 수혈 받을 경우
- Rh 응집원에 대한 응집소(항체)가 생겨,
- 다시 Rh<sup>+</sup>형 혈액을 수혈 받을 경우 응집 반응에 의해 적혈구가 파괴되는 용혈 현상이 일어남



## 6) 기구

- 항 A혈청       항 B혈청       항 D혈청
- 란셋               알코올 솜
- 슬라이드글라스       피펫, 피펫 팁



### \*\*주의사항

1. 란셋 및 피를 낸 뒤에는 손가락을 다시 잘 소독!
2. 혈액은 **소량만!** 항체의 1/3 정도만 반응시켜야 응집반응이 잘 보인다.

## 7) 방법(Slide법)

Anti A	Anti B	Anti RH

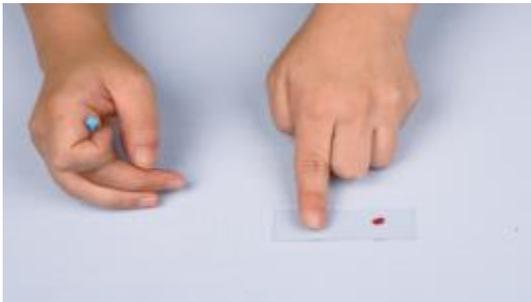
1. Slide glass에 wax pencil로 A와 B를 구분



2. 손가락 끝을 알코올 솜으로 소독



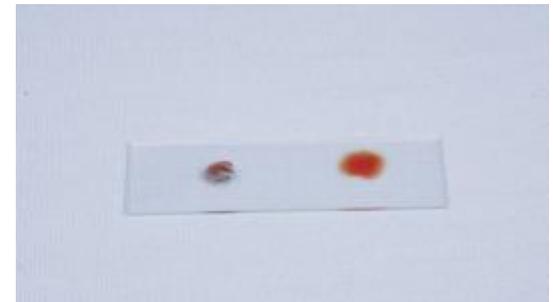
3. 란셋의 끝을 눌러 채혈을 낸다.



4. 혈액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨린다.

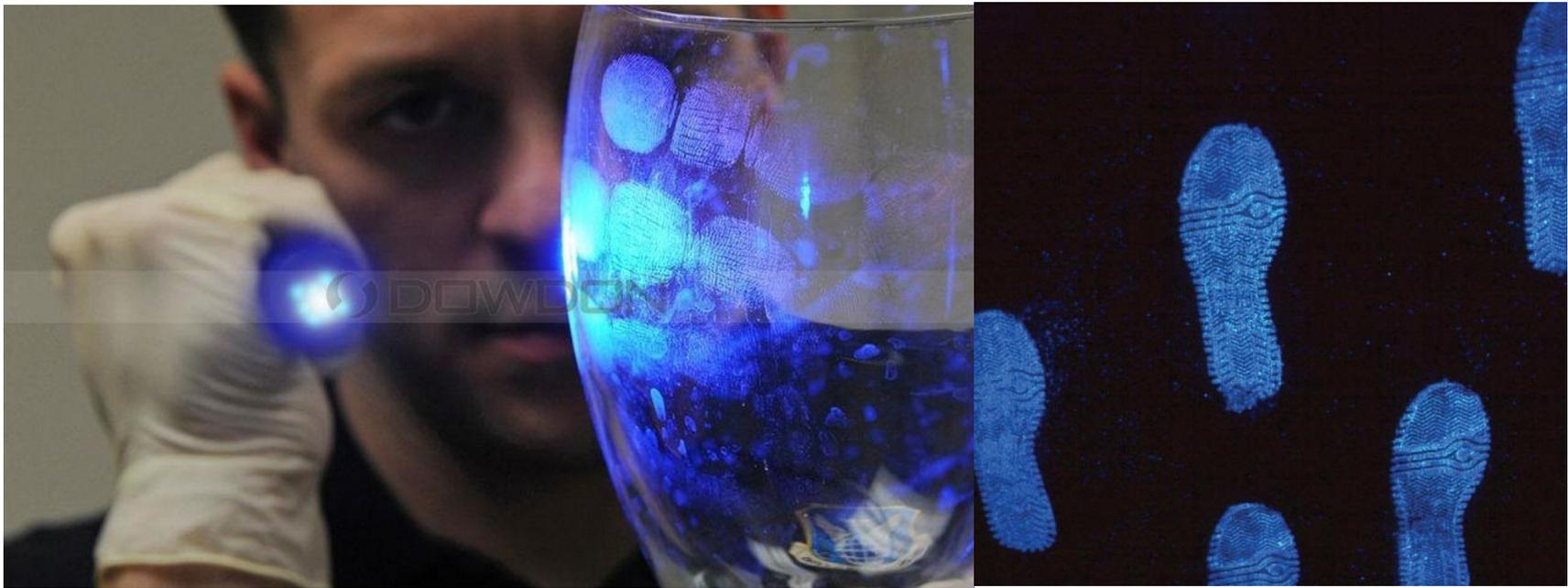


5. Anti-A, anti-B, anti-D 혈청을 각각 1 drop씩 적하



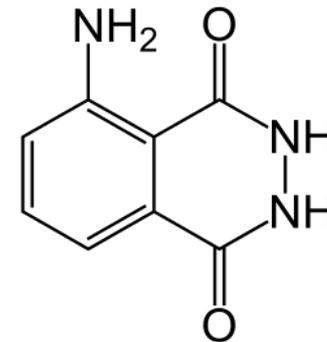
6. Slide를 전후 좌우로 기울여 반응을 촉진시킨 후 2분 이내 판독.

- 혈흔 예비시험법의 하나.
- 화학발광검사법



## 1) Luminol

- 화학발광을 나타내는 화학물질로,
- Luminol의 유도체가 **촉매** 존재하에서 **과산화수소**와 같은 산화제와 반응하여 화학발광을 낸다
- 에탄올, 에테르에는 잘 녹지 않는다
- 루미놀의 화학발광은 **420~450nm**의 파장을 갖는다.



(3-Aminophthalhydrazide)

화학식	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
분자량	177.16 g/mol

## 2) 화학 발광(Chemiluminescence)

- 화학반응에 의하여 전자가 들뜬 상태에서 바로 바닥상태로 돌아가면서 빛을 방출하는 것

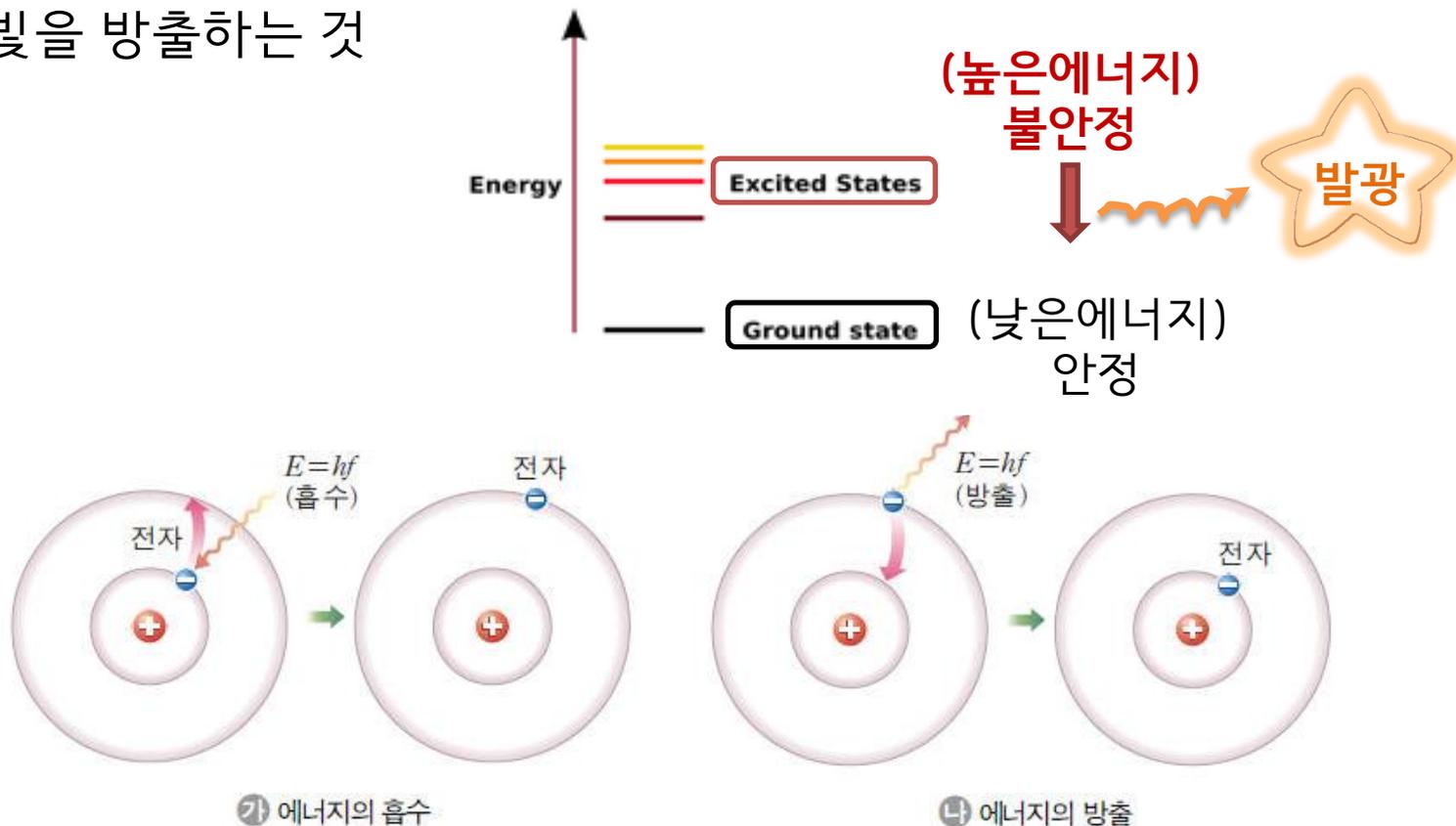
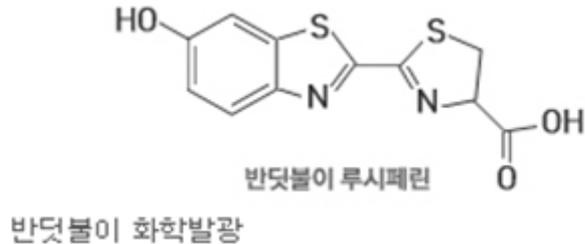


그림 II-34 에너지의 흡수와 방출

- 화학반응에 의해 발생하는 빛의 세기 분석
- 광원과 단색화장치 없이 비교적 간단
- 신속하게 분석 가능

## 반딧불 (Luciferin)



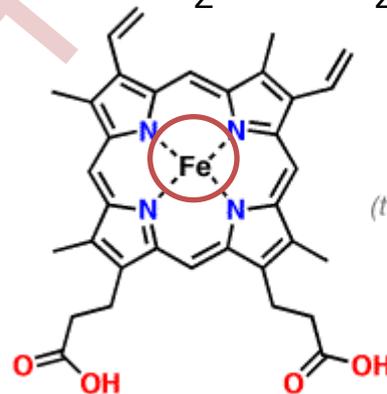
## 루미놀과 과산화수소의 산화반응에 기반한 화학발광법은

- 수은(II) 이온 정량
- 당화혈색소(HbA1c)의 정량
- 활성산소 소거 활성(항산화능)
- 방향족 아미노산 정량 등

금속이온, 음이온, 단당류, 항산화제, 신경전달물질 등 다양한 물질을 분석하기 위해 사용

## 3) 원리

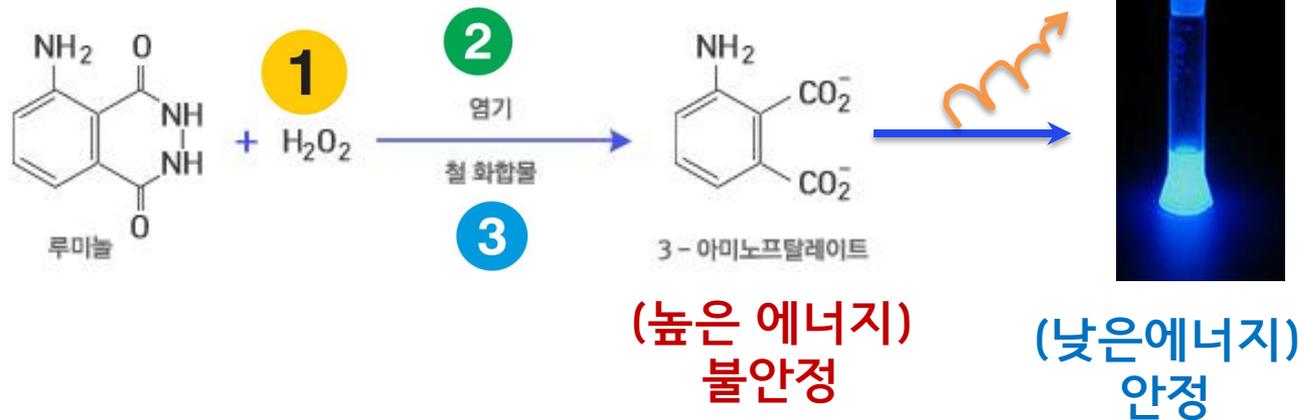
- 루미놀(luminol) + 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )간의 반응
- 알칼리 용액에서 Fe, Cu, Co 등 금속이온 성분이 촉매 역할



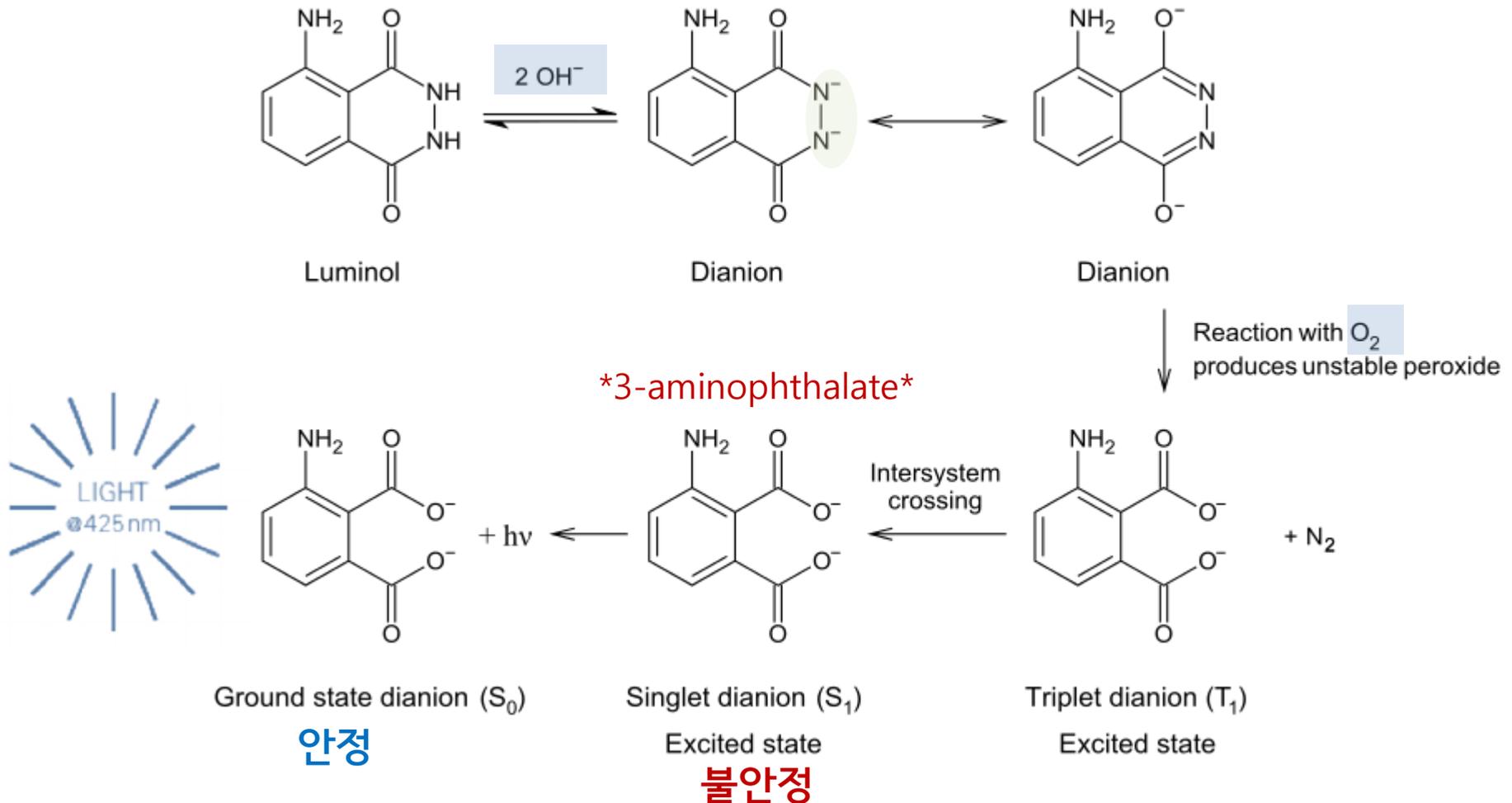
Heme  
(this version: heme b)  
*Red*

- 이때 발생하는 산소가 루미놀과 반응

- 이 반응에서는 들뜬 상태의 **3-aminophthalate**가 생성
- 이것이 바닥상태로 내려가면서 425nm에서 발광
- 빛을 발산하며 안정한 상태가 된다.



- 발광 세기는 luminol의 농도, 사용되는 산화제의 농도 및 촉매에 의해 조절



- 루미놀 화학발광 시스템의 방출 스펙트럼

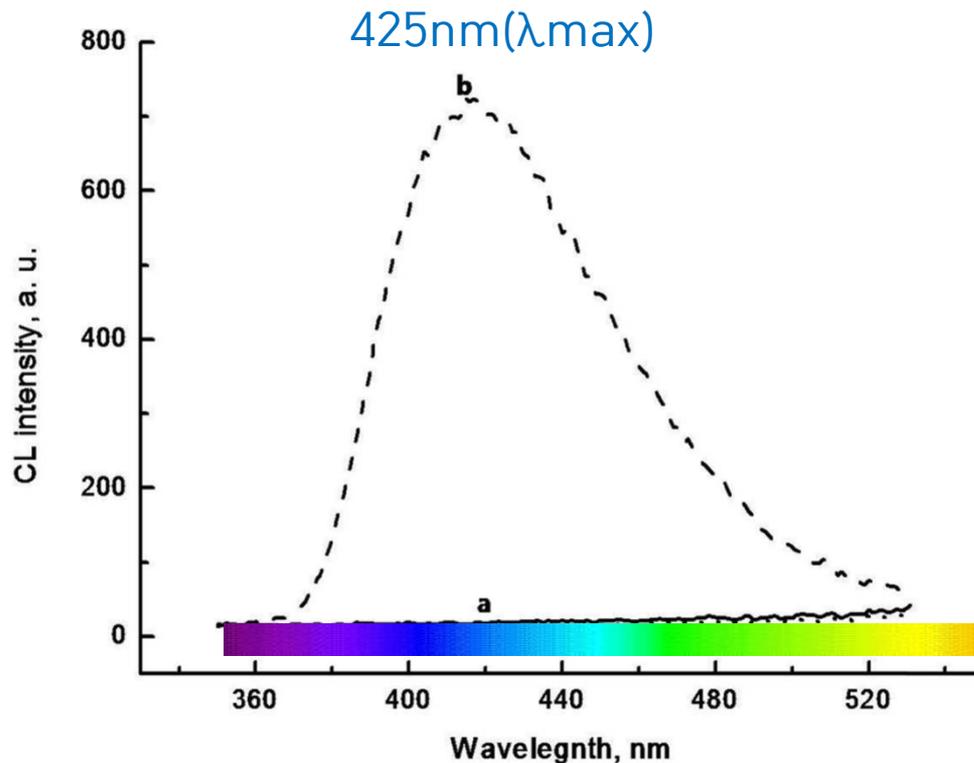


Fig. 1. Emission spectra of luminol CL system with/without mercury (I) or (II) ions. (a) luminol CL system without mercury ion (added 0.4 mL of DI water), (b) with mercury (II) ion (added 0.4 mL of 0.025 mM  $\text{Hg}^{2+}$ ), and (c) with mercury (I) ion (added 0.4 mL of 0.025 mM  $\text{Hg}^+$ ). Conditions: [luminol], 0.25 mM; [ $\text{H}_2\text{O}_2$ ], 2.5 mM; and pH, 13.

## 4) 시약 및 기구

- Luminol
- Mouse 혈액
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- $\text{H}_2\text{O}_2$
- 메스실린더, 비커, 삼각플라스크, 분무기
- 전자화학천칭



## 5) 루미놀 용액 제조법

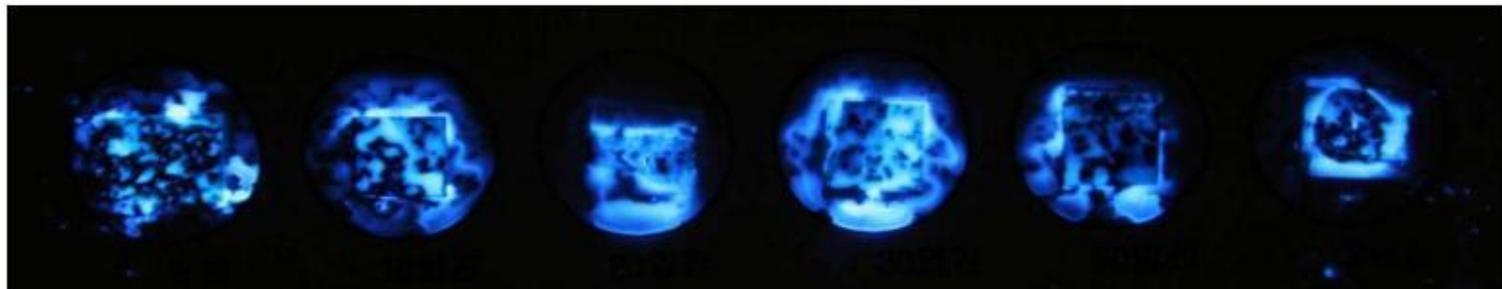
- ① Luminol 0.1 g +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5.0 g + 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  15.0 ml + D.W 100ml
  - ② Luminol 0.1 g + 0.5%  $\text{Na}_2\text{O}_2$  100 ml
  - ③ 10% NaOH 20 ml + Luminol 0.1g → Fill up to 200 ml (D.W)  
+ 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  20ml
- $\text{H}_2\text{O}_2$  에서 산소가 발생하므로 보관 시 뚜껑에 작은 구멍을 내어 용기가 터지는 것을 방지
  - 제조된 루미놀 용액의 유효기간은 냉장보관시 약 5일 정도

## 6) Method

- Luminol 시약을 암실내에서 분무해서 형광을 발하면 양성



경과 시일에 따른 혈흔의 종류



경과 시일에 따른 루미놀 반응의 정도