

นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินผลเอนไซม์ Bilirubin oxidase ชนิดแห้งใช้งานในการตรวจหาปริมาณ บิลิรูบินรวมในซีรัมโดยวิธี Kinetic

ดวงพร บุญขวลิต¹, ขจรศักดิ์ ตระกูลพั่ว², สิทธิพล สายสวัสดิ์¹, รุจาภา นิมสังข์^{1*}

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง : เอนไซม์บิลิรูบินออกซิเดส (Bilirubin oxidase, EC 1.3.3.5 ; BOX) ผลิตได้โดยเชื้อ *Myrothecium verrucaria* (Mv) หลายสายพันธุ์ เอนไซม์สามารถใช้บิลิรูบินเป็นสับสเตรทให้ผลเป็นบิลิเวอร์ดิน (biliverdin) ซึ่งตรวจพบปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ลดลงได้ที่ 450 nm.

วัตถุประสงค์ : เพื่อให้เอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากเชื้อ Mv สายพันธุ์ TISTR 3112 เข้มข้นโดยการระเหิดแห้งแล้วนำมา ประเมินผลการใช้งานในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัม

วัสดุและวิธีการทดลอง : นำเอนไซม์ BOX ที่มีในน้ำเลี้ยงเชื้อของ Mv TISTR 3112 มาทำให้เข้มข้นโดยการระเหิดแห้ง ในเครื่อง Lyophilizer แล้วนำมาประเมินผลใช้งานในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมโดยผสม เอนไซม์แห้งกับ 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH 8 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับบิลิรูบินที่ใช้เป็นสับสเตรท โดยอ่านปฏิกิริยาแบบ kinetic ที่อุณหภูมิ 37°C และอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 450 nm. ในเครื่อง Shimadzu UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer

ผลการทดลอง : เอนไซม์แห้ง 0.075 unit ผสมกับ 5 ml ของ 0.1 mol/L Tris SDS-buffer, pH 8.0 จะให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 U/L ของบัฟเฟอร์ซึ่งนำมาใช้ตรวจหาปริมาณบิลิรูบินรวมในซีรัม ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์มีอยู่ระหว่าง 0- 15 mg% ความแม่นยำที่ดีที่สุด (with-in run variation) และความแม่นยำระหว่างการวิเคราะห์ (between-run variation) สำหรับวิธีตรวจหาบิลิรูบินรวม มี %CV เท่ากับ 8.05 ($\bar{X}$ = 3.34 mg%) และ 7.02 ($\bar{X}$ = 3.10 mg%) ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ตรวจจากค่าเฉลี่ยของ % Recovery มีค่าเท่ากับ 95.6 % วิธีเอนไซม์ซึ่งพัฒนาขึ้นมาตรวจบิลิรูบินรวมในซีรัมด้วยปฏิกิริยาแบบ kinetic นี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ กับวิธี Diazo reagent ของ Jendrassik&Grof ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.972 ($p < 0.001$) และมีสมการถดถอย $y = 0.8078x + 0.6944$ และ สัมพันธ์กับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เอนไซม์ BOX ผลิตจาก Mv สายพันธุ์ MT-1 ที่ผลิตจำหน่ายโดยบริษัท Sigma Chemical (USA) อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9920 ($p < 0.001$) และ สมการถดถอย $y = 0.8873x + 0.2567$ ตามลำดับ

วิจารณ์ : เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับบิลิรูบินเร็วมาก ดังนั้นการวัดผลแบบ kinetic ควรนำไปใช้ตรวจในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติจะให้ความแม่นยำดีกว่า เนื่องจากนำเอนไซม์แห้งมาคั้นสภาพและสามารถนำมาใช้งานในการตรวจหาบิลิรูบินรวมในซีรัมได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรนำเอนไซม์มาทดลองใช้ตรวจวัดปริมาณบิลิรูบินรูปแบบอื่นในซีรัม เช่น direct และ conjugated bilirubin ด้วย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549, 39: 15-24.

คำรหัส : *Myrothecium verrucaria*, bilirubin oxidase, บิลิรูบินรวม, ปฏิกิริยา kinetic

¹ แขนงวิชาเคมีคลินิก, ² แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Abstract : Evaluation of Lyophilized Bilirubin Oxidase for Use in Determination of Total Bilirubin in Serum by Kinetic Method

Toungporn Boonchawalit¹, Khajornsak Tragoolpua², Sithipon Saisawadi¹ Rujapa Nimsung^{1*}

Abstract

Background : Bilirubin oxidase (EC 1.3.3.3 ; BOX) was shown to produced by different strains of *Myrothecium verrucaria* (Mv). Enzyme is able to use bilirubin substrate to give biliverdin product in which the decrease in absorbance of kinetic rate of reaction can be measured at 450 nm.

Purpose : To concentrate the BOX enzyme in culture media of Mv TISTR 3112 by lyophilization and evaluate for using in determination of bilirubin in serum.

Materials and Method : The BOX enzyme in culture media of Mv TISTR 3112 was concentrated by lyophilization. The dry enzyme was evaluated for reliability for using in determination of bilirubin in serum by mixing with 5 ml of 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH8.0 before reacting with bilirubin substrate. The reaction of BOX and bilirubin was carried out at 37°C and the decrease in kinetic rate was measured at 450 nm in Shimadzu UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer.

Results : Fifteen unit/L of enzyme-buffer solution could be obtained by mixing 0.075 Unit of dry enzyme with 5 ml of 0.1 mol/L Tris SDS-buffer, pH 8.0 which then use for reacting with bilirubin in serum. Linearity of BOX in using bilirubin substrate was in range of 0-15 mg%. The within and between-run variation expressed as %CV were 8.15 ($\bar{X} = 3.34$ mg%) and 7.02 ($\bar{X} = 3.10$ mg%) respectively. The accuracy of method calculated as mean of % recovery was shown to be 95.6%. The enzymatic method developed for measuring bilirubin in serum was correlated significantly with the diazo reagent method of Jendrassik and Grof which used as reference method at $r = 0.972$ ($p < 0.001$), giving $y = 0.8078x + 0.6944$ and also correlated significantly with the enzymatic method using BOX produced by Mv- MT-1 from by Sigma Chemical (USA) at $r=0.9920$ ($p<0.001$) and $y = 0.8873x + 0.2567$ respectively.

Discussion : Enzyme reacted quickly with bilirubin substrate, therefore in order to get more precised results, this kinetic measurement method was suggested to be performed in Autoanalyser. From the study showed that the rehydrated BOX could be used successfully for total bilirubin determination in serum, so far it can also be used in determination of other forms of bilirubin such as direct bilirubin and conjugated bilirubin in serum. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 15-24.**

Key word : Myrothecium verrucaria, bilirubin oxidase, total bilirubin, kinetic reaction

¹ Devision of Clinical Chemistry, ²Devision of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences.

* Corresponding author

บทนำ

เอนไซม์ Bilirubin oxidase (BOX, EC 1.3.3.5) เป็น metalloprotein มี copper 3 อะตอมอยู่ภายในโมเลกุล ในปี ค.ศ. 1981 Murao และ Tanaka¹ ได้แยกเอนไซม์ชนิดนี้ออกมาเป็นครั้งแรก จากเชื้อรา *Myrothecium verrucaria* (Mv) สายพันธุ์ MT-1 เชื้อราชนิดนี้ไม่ใช่เชื้อก่อโรค พบครั้งแรกในดินในทุ่งนาที่ประเทศญี่ปุ่น แต่เดิมใช้เอนไซม์นี้ฟอกสีวัตถุของเสียในโรงงานอุตสาหกรรมก่อนที่จะเป็นของเสีย² และต่อมาพบว่ามียประโยชน์ในทางคลินิก (3,4)

เอนไซม์ BOX ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนให้แก่สับสเตรท คือ บิลิรูบิน ซึ่งมีสีเหลืองให้ผลเป็นบิลิเวอดิน (Biliverdin) ซึ่งไม่มีสี การทดลองนำ BOX มาใช้ในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมมีมาตั้งแต่ คศ 1982² จนถึงปัจจุบัน ซึ่งในปี 1987 Kosaka *et al*³ ได้ศึกษาเพื่อนำเอนไซม์นี้มาใช้ตรวจบิลิรูบิน ส่วนต่างๆ ในซีรัม โดยพบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับบิลิรูบินรวมในซีรัม คือ ที่ pH 8.0 ใน 0.1 mol/L Tris-HCl-SDS buffer นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับบิลิรูบินส่วนอื่นในซีรัมได้แต่ใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดที่มี pH ต่างกัน

สำหรับในประเทศไทยได้มีการเตรียมเอนไซม์นี้จากเชื้อราที่ได้มาจาก Bangkok Mercen แต่เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ได้จาก Mv สายพันธุ์ TISTR 3112 และ 3225 มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ cellulase เป็นส่วนใหญ่⁵ และสามารถสร้าง bilirubin oxidase^{6,7} ได้ในปริมาณที่น้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีสายพันธุ์อื่น คือ Mv BCC 112 และ Mv BCC 9162 ซึ่งได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ หรือ BIOTEC (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand) สามารถสร้าง BOX ได้เช่นเดียวกัน⁸ แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้มี activity ค่อนข้างต่ำ จึงนำเอนไซม์ไปทำให้เข้มข้นโดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี BOX ไปทำให้แห้ง และนำไปผสมกับบัฟเฟอร์ใช้ในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองนำเอนไซม์ที่นำไปทำแห้งมาคืนสภาพ และนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัม โดยให้ทำปฏิกิริยากับ bilirubin

substrate ในสารละลายมาตรฐานและซีรัม และอ่านผลวิธี kinetic นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับวิธี diazo reagent ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิง⁹ และวิธีที่ใช้เอนไซม์ BOX ที่ผลิตจำหน่ายโดย Sigma Chemical (USA)

วัสดุและวิธีการทดลอง

วัสดุ :

น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์ BOX ได้จากการเตรียมของนางสาวชีพร เสนธรรม และคณะ⁸ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Activated charcoal ได้จาก Merck, Damstade, Germany

ซีรัมเหลืองใช้เก็บจากห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก หน่วยปฏิบัติการชั้นสูตร โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

สารเคมี : สารมาตรฐาน unconjugated bilirubin ได้จาก Sigma Chemicals, USA สารเคมีชนิดอื่นเป็นชนิด Analytical grade

เครื่องมือวิเคราะห์ : Shimadzu UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer

สารละลายเคมี :

1. สารละลายมาตรฐานบิลิรูบิน ความเข้มข้น 20 mg% ทำโดยใช้ bilirubin standard 20 mg ละลายใน 2.0 มล ของ 0.1 mol/L Na₂CO₃ และ 1.5 มล ของ 0.1 mol/L NaOH เติม 4% BSA (Bovine serum albumin 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล) จนครบปริมาตร 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร แล้วเก็บในขวดป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืด (9)

2. 4% BSA ใช้งาน เตรียมโดยเติม 2.0 มล ของ 0.1 mol/L Na₂CO₃ และ 1.5 มล ของ 0.1 mol/L NaOH ลงในขวดวัดปริมาตร แล้วเติม 4 % BSA จนครบ 100 มลผสม แล้วเก็บไว้เจือจางสารละลายมาตรฐาน หรือเติมลงเพื่อปรับปริมาตรตัวอย่างที่เตรียมขึ้นเพื่อตรวจหาความถูกต้อง

3. 0.1 mol/L Tris-SDS buffer⁷ ทำโดยชั่ง Trisma base 6.05 g และ Sodium dodecyl sulfate 0.72

g นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 450 ml แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วยน้ำกลั่นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าใช้งาน

วิธีการทดลอง :

1. การเตรียมเอนไซม์ BOX ชนิดแห้ง
นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์ BOX ไปบรรจุลงใน lyophilized vial ขวดละ 5 มล. แล้วนำไปแช่แข็งในเครื่อง Lyoalpha-10 Lyophilizer (Telstar, Spain) เอนไซม์แห้งนำมาเก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าใช้งาน
2. การตรวจหาความเข้มข้นของ BOX แห่ง

คินสภาพ

นำ BOX แห่งมาคินสภาพด้วยการเติม 0.1 mol/L Tris –SDS buffer, pH 8.0 ลงไปผสม 1 ml จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ ที่คินสภาพแล้ว โดยเติม 1 ml ของ 0.1 mol/L Tris –SDS buffer, pH 8.0 กับ 50 μ L ของสารละลายมาตรฐานบิลิรูบินความเข้มข้น 1 mg% ใน cuvet นำไปอุ่นที่ 37°C ในเครื่อง Shimadzu UV 2450 Spectrophotometer เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ 50 μ L ลงไปผสม จากนั้นติดตามอัตราเร็วของเอนไซม์เป็นเวลา 200 วินาที เครื่องจะคำนวณอัตราเร็วเฉลี่ยเป็น $\Delta A/\text{min}$ และคำนวณ BOX activity ออกมาเป็น U /L ตามสูตร

$$U /L \text{ ของ BOX} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา} \times 10^6}{\epsilon \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

เมื่อ $\Delta A/\text{min}$ = ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา = 1.1 ml

10^6 = เปลี่ยนหน่วย mole ให้เป็น μmole

ϵ = molar absorptivity ของบิลิรูบินใน 0.1 mole/L Tris –SDS buffer, pH 8.0

= 48,575 $L^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (7)

ปริมาตรของตัวอย่าง = 50 μ L

คำจำกัดความของเอนไซม์ คือ 1 Unit ของ BOX คือ ปริมาณของเอนไซม์ BOX ที่ใช้ bilirubin substrate ไป 1 μmol ให้ผลเป็น biliverdin ในเวลา 1 นาที ที่ 37 °C

3. วิธีการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินโดย BOX และอ่านผลแบบ kinetic

ผสม 0.1 mol/L Tris –SDS buffer, pH 8.0, 5 มล ลงในเอนไซม์แห้ง 1 ขวด ทำทั้งหมด 5 ขวด นำมารวมและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เอนไซม์ผสมบัพเฟอร์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมได้ไม่ต่ำกว่า 20 ตัวอย่าง ซึ่งในการวิเคราะห์ทำโดยนำ เอนไซม์บัพเฟอร์ใส่ลงใน cuvet 1050 μ L นำไปอุ่นที่ 37°C

ในเครื่อง Shimadzu U 2450 Spectrophotometer เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมซีรัม (หรือสารละลายมาตรฐาน) ลงไป 50 μ L ผสม แล้ว ติดตามอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นเวลา 200 วินาที เครื่องจะคำนวณ อัตราเร็วเฉลี่ยเป็น $\Delta A/\text{min}$ ส่วนการคำนวณค่าออกมาเป็นปริมาณ mg% ของบิลิรูบิน ทำได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์วิธีเดียวกัน

4. วิธีการประเมินผลการนำ เอนไซม์ BOX มาใช้งานในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินรวมในซีรัม

การประเมินความเป็นเส้นตรง ทำโดยวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-20 mg% ด้วยวิธีเอนไซม์ที่นำมาใช้แล้วตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดย plot ค่าที่

วิเคราะห์ได้ เทียบกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น

การตรวจหาความแม่นยำที่ดีที่สุด (with-in run variation) ของวิธีการวิเคราะห์บิลิรูบินรวม โดยวิเคราะห์หาบิลิรูบินในซีรัมควบคุมคุณภาพ ทำซ้ำกัน 20 ครั้ง และวิเคราะห์หาความแม่นยำระหว่างการวิเคราะห์ (between-run variation) โดยใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพชุดเดียวกัน

คำนวณหา % Coefficient of Variation (% CV) (10)

การประเมินความถูกต้องของวิธีทำโดยตรวจหา % recovery ซึ่งทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในซีรัมที่มีบิลิรูบินอยู่เดิม แล้วคำนวณหาปริมาณสารมาตรฐานที่ได้กลับคืนมา โดยการวิเคราะห์เทียบกับซีรัมเดียวกันที่ไม่เติมสารมาตรฐาน¹⁰ ทำการเตรียมตัวอย่างตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ตรวจหา ความถูกต้องในรูป %Recovery

หลอดที่	ปริมาตรซีรัม (ml.)	ปริมาตร 40 mg% standard added (ml)	ปริมาตร 4% BSA. ใช้งาน
1	1.0	-	0.5
2	1.0	0.025	0.475
3	1.0	0.1	0.4
4	1.0	0.2	0.2
5	1.0	0.4	0.1
6	1.0	0.5	-

การคำนวณหาความถูกต้องเป็น % Recovery ใช้สูตร (10)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Standard recovered}}{\text{Standard added}} \times 100$$

การประเมินผลความสัมพันธ์กับวิธีอ้างอิง ทำโดยนำตัวอย่างซีรัม 37 ราย มาวิเคราะห์โดยวิธีเอนไซม์ BOX จาก Mv TISTR 3112 เทียบกับค่าวิเคราะห์ที่ตรวจโดยวิธี diazo reagent (9) ซึ่งใช้เป็นวิธีอ้างอิง และเทียบกับค่าวิเคราะห์ที่ได้จากการใช้ BOX ที่ได้จากการผลิตจำหน่าย (Sigma Chemical, USA) โดยใช้เอนไซม์ผสมความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้กับ BOX ที่เตรียมเอง แล้วตรวจสอบสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) และแสดงผลความสัมพันธ์โดยสมการถดถอย และ regression line

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Microsoft Excel ที่ติดตั้งบน Window 2003 ของ Personal computer เพื่อการแปลผลทางสถิติ

ผลการทดลอง :

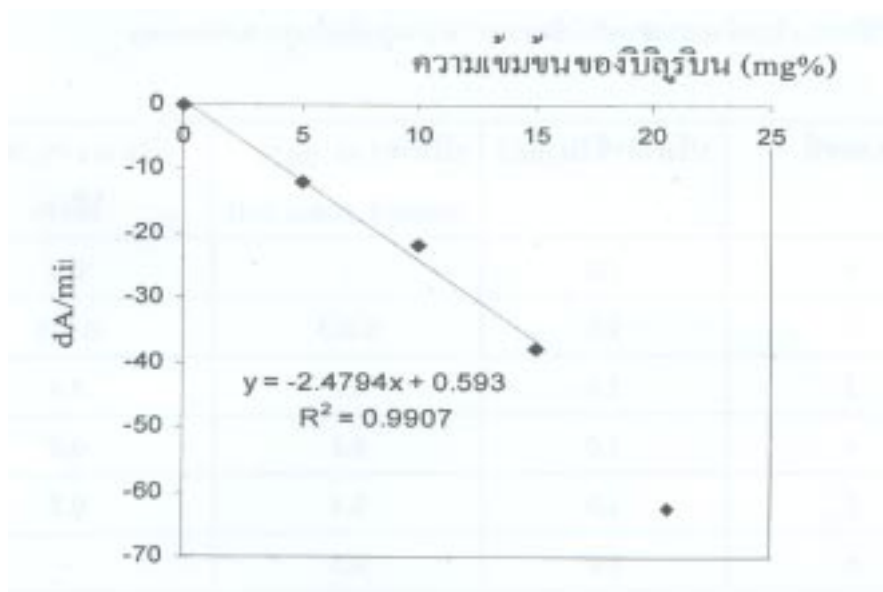
ผลการตรวจหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่คืนสภาพ และการเตรียมสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์

เอนไซม์ BOX คืนสภาพโดยเติม 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH 8.0 ลงไป 0.5 ml นำไปตรวจหา total

activity ใน 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH 8.0 ตามวิธีการวิเคราะห์หา BOX activity ซึ่งแสดงในวิธีการทดลองได้ค่า BOX activity เท่ากับ 6.956 U/L หรือมี BOX เท่ากับ 0.0765 U/vial ดังนั้นการใช้งานเอนไซม์จึงเติมบัฟเฟอร์ลงไป 5 mL/vial ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ BOX ใน 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH 8.0 เป็น 15 U/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม^{11,12} สำหรับการนำไปใช้งานในการตรวจหาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมต่อไป

ผลการทำกราฟมาตรฐาน

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินในสารละลายมาตรฐานบิลิรูบินตั้งแต่ความเข้มข้น 0-20 % จากรูปพบว่ากราฟให้ค่า $\Delta A/\text{min}$ เป็นเส้นตรงตั้งแต่ สารละลายมาตรฐานบิลิรูบินในหลอดทดลองมีค่าตั้งแต่ 0-15 mg%



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาบิลิรูบินรวมด้วยวิธีเอนไซม์ BOX ได้จาก Mv TISTR 3112 อ่านผลด้วยวิธี Kinetic ใน หลอดทดลอง

ผลการตรวจหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์
ตารางที่ 2 แสดงความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์บิลิรูบินโดยวิธีเอนไซม์ พบว่า %CV ของการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดมีค่า 8.05 โดยมีค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ของ with-in run

ไม่ต่างจาก between-run precision (unpaired t-test) แต่ %CV ของ between-run น้อยกว่า %CV ของ with-in run เล็กน้อย

ตารางที่ 2 ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์บิลิรูบินรวม ด้วยวิธีเอนไซม์ BOX (Mv TISTR 3112)

การทดสอบ	จำนวน	$\bar{X}$	SD	%CV
ความแม่นยำ	วิเคราะห์(N)	(mg%)	(mg%)	
With-in run precision	20	3.34	0.26	8.05
Between run precision	5	3.10	0.21	7.02

ผลการตรวจหาความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ แสดงในตาราง

ที่ 3 พบว่าสารมาตรฐานที่เติมลงไปสามารถวิเคราะห์
กลับคืนมาได้ โดยมี % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 95.9 %

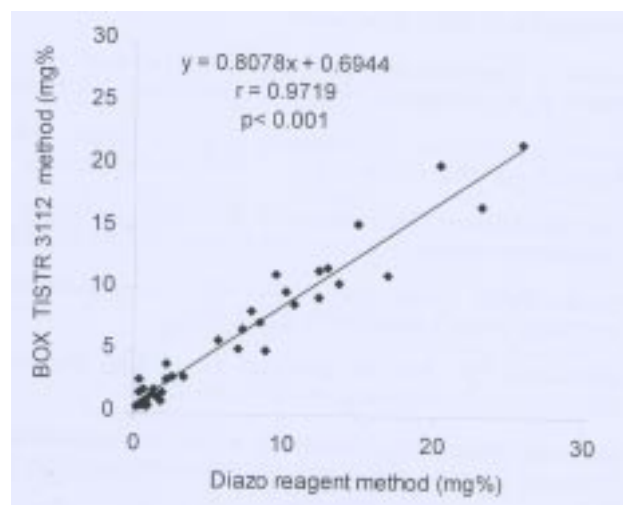
ตารางที่ 3 ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินรวมในซีรัมโดยวิธีเอนไซม์ BOX (Mv TISTR 3112)

หลอด ที่	บิลิรูบิน ในซีรัมเริ่มต้น (mg%)	Std(40mg%) เติม (mg%)	ความเข้มข้น รวม* (mg%)	ค่าตรวจพบ (mg%)	Standard recovered (mg%)	% Recovery
1	2.34	0	1.56	1.35	0	-
2	2.34	0.67	2.23	1.89	0.54	81
3	2.34	2.67	4.23	4.11	2.76	103.5
4	2.34	5.33	6.89	6.43	5.08	95.25
5	2.34	10.67	12.23	12.25	10.9	102.19
6	2.34	13.33	14.89	14.37	13.02	97.65
*ปริมาณสุดท้าย 1.5 มล.					เฉลี่ย	95.92

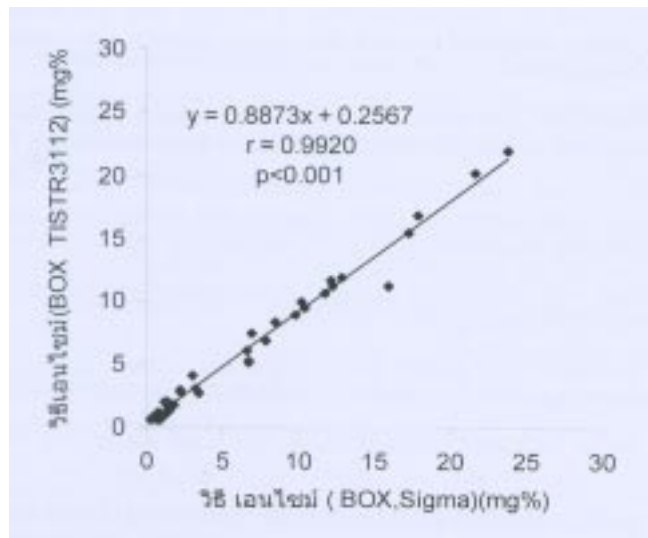
ความสัมพันธ์กับวิธีอ้างอิง

รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของวิธีเอนไซม์กับวิธี
dialzo reagent ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง พบว่าวิธีเอนไซม์ซึ่งใช้
BOX แห่งมาละลายในบัฟเฟอร์ และทำปฏิกิริยากับ
บิลิรูบินในตัวอย่างซีรัม 37 รายให้ผลสัมพันธ์กับวิธี Dialzo
reagent ซึ่งวิเคราะห์ในซีรัมชุดเดียวกัน โดยมีค่า

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9719 ($p < 0.001$)
และมีสมการถดถอย คือ $y = 0.8078x + 0.6944$ ส่วนรูปที่
3 แสดงความสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ที่ใช้เอนไซม์
BOX ที่ได้จาก Sigma Chemical, USA โดยได้ค่า $r =$
0.9920 และสมการถดถอย $y = 0.8873x + 0.2567$
ตามลำดับ แสดงว่าวิธีมีความสัมพันธ์กับวิธีอ้างอิงดี



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินในซีรัมด้วยวิธี BOX (Mv TISTR 3112) กับ วิธี Dialzo reagent ของ Jendrassik & Grof method (N = 37)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจวิเคราะห์บิลิรูบินในซีรัมโดย เอนไซม์ BOX (Mv TISTR 3112) และ วิธเอนไซม์ใช้ BOX จาก Sigma Chemical (USA) ผสมกับบัพเฟอร์ในความเข้มข้น 15 U/L เช่นเดียวกันใช้เป็น วิธเอนไซม์อ้างอิง (N= 37)

วิจารณ์ :

การตรวจวิเคราะห์บิลิรูบินรวมในซีรัมด้วยวิธีเอนไซม์ BOX โดยอ่านปฏิกิริยาแบบ kinetic เกิดปฏิกิริยาเร็วมาก จึงควรเลือกอ่านปฏิกิริยาที่เวลาในช่วงต้น และเนื่องในการวิจัยนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ อ่านผลแบบ manual จึงทำให้มีความล่าช้าในขั้นตอนการอ่านได้ ดังจะเห็นได้จากการตรวจหาความแม่นยำ เมื่อเปรียบเทียบค่า %CV ที่ได้ กับที่มีผู้ทดลองมาก่อนนี้ โดยเครื่อง Beckman CX-5⁷ ซึ่งได้ค่า %CV ของ with-in run เท่ากับ 5.18 ซึ่งต่ำกว่าในการวิจัยนี้ (%CV เท่ากับ 8.05) โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์เดียวกันในการผลิตเอนไซม์และการที่ได้ %CV ของ between-run น้อยกว่า with-in run เนื่องจากจำนวนที่วิเคราะห์มีเพียง 5 ครั้งเท่านั้น

เนื่องจากการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา Mv สายพันธุ์ TISTR 3112 นี้ ใช้การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และ น้ำเลี้ยงเชื้อรา มาทดสอบหาเอนไซม์ BOX ซึ่งผลผลิตที่ได้เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากสายพันธุ์ MT-1 ของ Muruo และ คณะ² แล้ว ยังพบว่าผลผลิตต่ำกว่า มากจึงต้องนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นโดยการทำให้แห้ง แต่เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์นี้สามารถนำมาใช้ได้ จึงควรหาวิธีการผลิตเอนไซม์ที่สามารถให้ผลผลิตได้มากขึ้น

เช่น การเตรียมเอนไซม์โดยเทคนิค recombinant protein¹³ หรือ การ clone gene ออกมา¹⁴ ซึ่งจะได้เอนไซม์ในปริมาณมากและเมื่อทำให้บริสุทธิ์จะให้ yield มากกว่า ด้วย สำหรับการใช้วิธีเลี้ยงเชื้อนี้ยังมีข้อเสียตรงที่ต้องทำการ subculture ต่อ ซึ่งจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อราได้ซึ่งเป็นผลให้ผลผลิตแต่ละครั้งจะลดลงเรื่อยๆ ทำให้ไม่สามารถควบคุม activity ของเอนไซม์ที่เตรียมแต่ละชุดให้เท่ากันได้ และหากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากแล้วควรนำมาศึกษาต่อเพื่อใช้ตรวจหาบิลิรูบินในรูปแบบอื่นเช่น การตรวจหา direct bilirubin ซึ่งทำปฏิกิริยาใน 0.1 mol/L Glycine- NaOH buffer, pH 10 และ conjugated bilirubin โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาใน 0.1 mol/L Lactic acid –sodium citrate, pH 3.7 ต่อไปได้³ สำหรับการทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปแบบแห้งนี้ นับว่าสะดวกในการใช้มากกว่า สะดวกในการผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป อีกทั้งยังคงตัวได้มากกว่าชนิดน้ำ

ความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณบิลิรูบินโดยเอนไซม์ที่เตรียมเอง นำมาทำให้แห้งเพื่อทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนละลายมาใช้งานสามารถยอมรับได้ แต่ %CV มีค่าค่อนข้างมากทั้งนี้เนื่องจาก อัตราเร็วของปฏิกิริยาเร็วมาก ดังนั้นการวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา

แบบนี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในเครื่องวิเคราะห์หัตถโนมิติมากกว่า ค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีเท่ากับ 0- 15 mg% ซึ่งน้อยกว่าวิธี Diazo reagent⁹ อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากกว่า 15 U/L ได้ เช่นละลายเอนไซม์แห้ง 5 ขวด ด้วย 19 มล. ของ 0.1 mol/L Tris-SDS buffer, pH 8.0 จะได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์เท่ากับ 20 U/L เป็นต้นแต่การวิเคราะห์ต้องทำสารละลายมาตรฐานควบคู่ไปกับการตรวจตัวอย่างส่งตรวจ การวัดความถูกต้องได้ % Recovey เป็นที่ยอมรับได้ และพบว่าวิธีมีความสัมพันธ์ดีกับวิธี Diazo reagent ของ Jendrassik and Grof⁹ และสัมพันธ์กับวิธีเอนไซม์ BOX ที่ได้จาก Sigma Chemical อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ (ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน) ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้งานได้

การตรวจหาปริมาณบิลิรูบินรวมในซีรัมซึ่งใช้วิธีเอนไซม์ซึ่งนำเสนอโดยงานวิจัยนี้ สามารถประหยัดเอนไซม์อย่างน้อย 35 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้การอ่านผลแบบ end point ซึ่งรายงานโดย Kasaka และ คณะซึ่งใช้เอนไซม์ถึง 880 U/L³ หรือ ของ Perry *et al.*¹⁵ ซึ่งพบว่าใช้เอนไซม์ เข้มข้นถึง 514 U/L ของปริมาตรของส่วนผสมสุดท้ายของปฏิกิริยา ซึ่งวิธีของผู้วิจัยดังกล่าวทำให้มีข้อจำกัดในการนำวิธีการตรวจโดยเอนไซม์ BOX มาใช้งาน เพราะราคาต่อ 1 การวิเคราะห์จะสูงกว่าวิธี Diazo reagent มาก

สรุปผลการวิจัย คือ สามารถนำเอนไซม์ BOX ชนิดแห้งมาทำเป็นน้ำยาสำหรับตรวจวัด ปริมาณบิลิรูบินในซีรัมโดยใช้การอ่านผลเป็นแบบ kinetic แต่เนื่องจากการเตรียมเอนไซม์โดยวิธีแยกสกัดและเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อให้ผลผลิตต่ำ จึงควรทำเอนไซม์ให้เข้มข้นก่อนนำมาผสมกับบัฟเฟอร์แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับบิลิรูบินซึ่งใช้เป็น substrate ต่อไป

เอกสารอ้างอิง :

1. Murao S, Tanaka N. Enzyme "Bilirubin oxidase produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1" *Agri Biol Chem* 1981; 45: 1383-84.

2. Murao S, Tanaka N. Isolation and Identification of a microorganism producing bilirubin oxidase. *Agri Biol Chem* 1982; 46: 2031-34.
3. Kosaka A, Yamamoto C, et al. Enzymatic Determination of Bilirubin Fraction in serum. *Clinical Biochemistry* 1987; 24: 1690-9.
4. Jian G, Xi-Xian L, Pei-Sheng M, Gao-Xiang Li. Purification and properties of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*. *Appl Biochem Biotechnol* 1991; 31: 135-43.
5. Bangkok Mercen: List of cultures. TISTR Culture Collection 1995 ed., Thailand Institute of Scientific and Technology Research, Bangkok, Thailand.
6. เกรียงศักดิ์ มงคลพุทธิรักษา วิธีการเตรียมเอนไซม์บิลิรูบินออกซิเดสจากเชื้อรา *Myrothecium verrucaria* ภาควิชาพันธุศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2540.
7. Phromnoi C. Purification and evaluation of bilirubin oxidase isolated from *Myrothecium verrucaria* TISTR 3112 & 3225. M.Sc Thesis. Chiang Mai University 2000.
8. ชีวพร เสนธรรม การพิสูจน์เอนไซม์ Bilirubin oxidase จากเชื้อรา *Myrothecium verrucaria* BCC112 และ 9162 ภาควิชาพันธุศาสตร์บัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ 2547.
9. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2 nd ed., Philadelphia, WB.Sunders Company, 1984 ; p 1463-68.
10. Weisbrot IM. Statistics for the Clinical Laboratory. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1985; p 12, 141-2.
11. Nimsung R, Sittiphon S. The determination of bilirubin fractions in serum by enzymatic method using a computer-interfaced microplate reader. 22nd Congress on Science and Technology of

- Thailand. Poster session held at Bangkok Convention Center, Central Plaza Hotel Phaholyothin Road, Bangkok, Thailand, 16-18 October 1996, Abstract part C (c-5) p.554-5.
12. รุจามา นิมสังข์, สิทธิพล สายสวัสดิ์ รายงานการวิจัย เรื่อง การตรวจหาส่วนของบิลิรูบินในซีรัมโดยวิธีเอนไซม์ใน Microplate reader ที่ต่อติดกับเครื่อง computer. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2539, 73 หน้า.
 13. Kataoka K, Tanaka k, Sakai Y, Sakurai T. High level expression of *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase in *Pichia pastoris* and its facile purification and characterization. Protein Expression and Purification 2005; 41: 77-83.
 14. Koikeda S, Ando K, Kaji H, Inoue T, Murao S, Takeuchi K, Samejima T. Molecular cloning of the gene for bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* and its expression in yeast. J Biol Chem 1993; 268: 18801-9.
 15. Perry B, Doumas BT, Buffone G *et al.* Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. Clin Chem 1986 ; 32 : 329-32.