

นิพนธ์ต้นฉบับ

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการตรวจแยก Alkaline Phosphatase Isoenzymes จากตับและกระดูกในซีรัม ด้วยวิธี Electrophoresis บน Cellulose Acetate Membrane

อวยชัย เสียงเพระ*

บทคัดย่อ

การตรวจหา Alkaline phosphatase (ALP) isoenzymes ในซีรัมมีประโยชน์เพื่อแสดงถึงพยาธิสภาพของอวัยวะต้นกำเนิดที่สร้าง Isoenzymes การตรวจหา ALP isoenzymes มีวิธีการหลายวิธี แต่ที่นิยม คือวิธีที่ใช้หลักการแยกโดย Electrophoresis แต่ยังมีปัญหาเนื่องจาก Isoenzymes ของตับและกระดูกไม่แยกออกจากกันโดยสมบูรณ์ การใช้เอนไซม์ Neuraminidase มาย่อย ALP isoenzymes ก่อนนำมาทำ Electrophoresis ช่วยในการตรวจแยกชนิดและวัดการทำงาน (Activity) ของส่วนของ Isoenzymes ทั้ง 2 ชนิดที่มีในซีรัมได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการแยก Isoenzymes ทั้ง 2 ชนิดออกจากกันด้วยวิธี Electrophoresis บน Cellulose acetate (CA) membrane

จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นหรือ Activity ที่เหมาะสมของ Neuraminidase คือ 0.21 U/mL. และใช้ในการอุ่นกับซีรัมในอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอนไซม์ : ซีรัม คือ 2 : 5 เวลาที่ใช้ในการอุ่น คือ 30 นาที ที่ 37 °ซ. แล้วจึงนำไปหยอดลงบน CA membrane เพื่อทำ Electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 180 โวลท์ พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการแยก Isoenzymes ของตับและกระดูก คือ 30 นาที และการปรากฏของ Fast liver ALP isoenzyme ในซีรัม มีผลอย่างสูงต่อการแยก ALP isoenzyme จากตับและกระดูกในซีรัมที่อุ่นกับเอนไซม์ บน CA membrane อย่างไรก็ดีตาม การเกิดการซ้อนกันของ ALP isoenzymes ชนิดอื่นในซีรัมแก้ไขได้โดยการทำให้ Electrophoresis ของตัวอย่างซีรัมก่อนและหลังการอุ่นกับ Neuraminidase ไปพร้อมกัน และคำนวณค่า จากผลต่างของ Isoenzymes activity บน Lanes ทั้งสอง หลังจากนั้นนำไป Scan ด้วย Densitometer

คำรหัส : อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสไอโซเอนไซม์, Cellulose acetate electrophoresis

* หน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก งานปฏิบัติการกลางและชันสูตรโรค คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Factors Affecting the Separation of Liver and Bone Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Serum by Cellulose Acetate Electrophoresis

Siangprorh O.*

The determination of Alkaline phosphatase (ALP) isoenzymes in serum is useful for evaluation of pathological condition of tissues. The popular method for separation and identification of ALP isoenzymes in serum is electrophoresis. However, the incomplete separation between liver and bone ALP isoenzymes is the major problem. Use of neuraminidase-pretreated serum samples before electrophoresis helped qualitative and quantitative assessment of their relative activities in serum. In this study, the factors affecting the separation of liver and bone isoenzymes using neuraminidase-pretreated serum samples following by electrophoresis on cellulose acetate (CA) membrane were demonstrated.

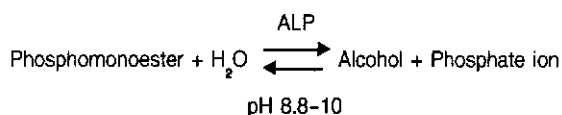
The results revealed that suitable activity of neuraminidase for pretreating was 0.21 U/mL serum with volume ratio of neuraminidase and serum of 2 : 5 at 37 °C for 30 minutes. Electrophoresis should be carried out at 180 volts for 30 minutes. The appearance of fast liver isoenzyme in serum sample affected greatly on separation of liver and bone ALP isoenzyme in treated serum on CA membrane. However, overlapping of fast liver with bone isoenzyme could be corrected by running the same serum sample, with and without neuraminidase treatment. Subtraction of activities between bands on the two lanes of isoenzymes separation after scanning by densitometer helped reporting the activities of each isoenzyme composed in a serum sample.

Key words : ALP isoenzymes, CA electrophoresis

* Clinical Chemistry section, Central Diagnostic Laboratory, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

บทนำ

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1, ALP) เป็น Glycoprotein ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของ Monophosphate ester ไปเป็นกรดฟอสฟอริก โดยจะเกิดปฏิกิริยาได้ที่ pH 8.8 - 10.2 ดังนี้



ALP พบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิดทั่วร่างกาย แต่ส่วนใหญ่จะมาจากตับ, รก, กระดูกและเซลล์บุผนังลำไส้เล็ก การเพิ่มสูงขึ้นของ ALP ในซีรัมนั้นมีสาเหตุเนื่องจากทั้งทางสรีรวิทยา และพยาธิวิทยา¹ ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

1. ทางสรีรวิทยา

พบ Activity สูงขึ้นในซีรัมเด็กตั้งแต่แรกเกิดจนถึงวัยหนุ่มสาวและในซีรัมหึงระหว่างตั้งครรภ์ โดยเฉพาะระยะสามเดือนสุดท้าย

2. ทางพยาธิวิทยา ระดับ ALP สูงขึ้นในภาวะโรคต่างๆ ดังนี้

2.1 โรคกระดูก ต่างๆ ได้แก่ Osteomalacia, Rickets, Paget's disease, Secondary carcinoma และ Osteogenic sarcoma รวมทั้งในภาวะที่มีการซ่อมแซมกระดูกอื่นๆ

2.2 โรคของตับ ได้แก่ ตับแข็ง (Hepatic cirrhosis), ตับอักเสบ (Hepatitis) และ ดีซ่าน (Jaundice) เป็นต้น

2.3 โรคอื่นๆ เช่น Hyperparathyroidism

การที่ตรวจพบว่า Activity รวมของ ALP สูงขึ้น ไม่เพียงพอในการที่จะวินิจฉัยโรค เนื่องจาก ALP ในซีรัมได้มาจากเนื้อเยื่อของอวัยวะหลายแห่ง การ

ตรวจหา ALP Isoenzymes จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรคให้จำเพาะ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงตัวแปรอื่นที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย คือ อายุ, การตั้งครรภ์ และหมู่เลือด ซึ่งทำให้มี Isoenzymes ชนิดใดชนิดหนึ่งเพิ่มสูงขึ้นในซีรัมได้

ชนิดของ ALP isoenzymes ที่อาจตรวจพบได้ในซีรัมของคนปกติ และผู้ป่วยโรคต่างๆ² มีดังนี้คือ

1. Fast liver ALP isoenzymes พบในโรค มะเร็งตับชนิดลุกลาม (Liver metastasis), Viral hepatitis, Alcoholic cirrhosis และ ภาวะท่อน้ำดีอุดตันภายนอกตับ (Extrahepatic obstruction)

2. Liver ALP isoenzymes พบในโรคตับ เช่น ตับอักเสบเฉียบพลัน, ตับแข็ง, ไขมันคั่งในตับ, โรคตับที่เกิดจากการใช้ยา, ทางเดินน้ำดีอุดตันจากก้อนมะเร็งที่ตับอ่อน, ท่อน้ำดีตีบ, มะเร็งลุกลามมายังตับ เป็นต้น

3. Bone isoenzymes พบในโรคกระดูก เช่น Paget's disease, มะเร็งกระดูก, Osteomalacia และในซีรัมผู้ป่วยโรคอื่นๆ ได้แก่ Celiac sprue, Hyperparathyroidism ค่าต่ำพบในโรค Creatinism หรือการมีฟอสเฟตต่ำในเลือด

4. Placenta isoenzymes พบในรกและซีรัมของหญิงมีครรภ์ โดยเฉพาะสัปดาห์ที่ 16-20 สูงขึ้นจนถึงคลอด และใน Infarction of placenta ในภาวะครรภ์เป็นพิษ

5. Intestinal isoenzymes พบในเซลล์บุผนังลำไส้ ในซีรัมผู้ป่วยที่มีเลือดหมู่ B, O, หลังรับประทานอาหารไขมัน, ในผู้ป่วยตับแข็ง และโรคของระบบย่อยอาหาร

6. Renal isoenzymes พบในไตและในซีรัมของผู้ป่วยที่ร่างกายไม่ยอมรับไตจากการเปลี่ยนไต (Kidney transplantation rejection)

7. Regan isoenzymes พบในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งที่ปอด เต้านม รังไข่ และลำไส้ใหญ่

8. Nagao isoenzymes พบในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งระยะลุกลามไปที่เยื่อหุ้มปอด และมะเร็งเนื้อเยื่อของตับอ่อน

9. Pancreatic isoenzymes พบในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งตับอ่อน

โดยทั่วไปนิยมใช้ ALP isoenzymes แปลผลในผู้ป่วยโรคตับ และโรคกระดูกมากกว่าโรคชนิดอื่นๆ

วิธีที่ใช้ในการตรวจหา ALP isoenzymes ที่นิยมกันมีดังนี้^{1,2} คือ

1. Heat Inactivation

ALP จากกระดูกจะถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56 ° ซ. ได้ง่าย ขณะที่ ALP จากตับจะถูกทำลายได้น้อยกว่า ส่วน ALP จากรกจะทนความร้อนได้ดีที่สุด

2. ใช้สารเคมียับยั้งการทำงานของ Isoenzymes เช่น L-phenylalanine จะยับยั้ง Activity ของ ALP จากรกและลำไส้ แต่ไม่ยับยั้ง ALP จากกระดูกและตับ

3. การทำ Electrophoresis ทำได้บนตัวกลางหลายชนิด เช่น Cellulose acetate membrane, Polyacrylamide gel และ Agarose gel

ปัญหาของการตรวจหา ALP isoenzymes โดยวิธี Electrophoresis คือ แถบของ Isoenzymes จากตับและกระดูกจะซ้อนกัน ทำให้ไม่สามารถหาปริมาณของ Isoenzymes แต่ละชนิดได้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการ เช่น Wheat germ agglutinin affinity electrophoresis⁴, การย่อยด้วย Neuraminidase ก่อนทำ Electrophoresis⁵ ทั้งนี้เพื่อช่วยในการแยก isoenzymes ทั้งสองออกจากกัน และคำนวณหาส่วนของ Isoenzymes ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มี

ผลกระทบต่อการแยก isoenzymes จากตับและกระดูกในซีรัมผู้ป่วยโรคตับเมื่อใช้ Neuraminidase ทำปฏิกิริยา กับโมเลกุลของ ALP ในซีรัมก่อนทำการแยกด้วยวิธี Electrophoresis บน Cellulose acetate membrane

วัสดุอุปกรณ์

ก. เครื่องมือ ที่สำคัญ คือ

1. Power supply (0-500 Volt)
2. Electrophoresis apparatus
3. Titan III Plates Iso-Visible (Cat. No. 3000)
4. Densitometer (Electro Data Center, EDC)
5. Merck Mega Autoanalyser (Merck, Darmstadt, Germany)

ข. ตัวอย่างซีรัม

ใช้ซีรัมจากผู้ป่วยที่ส่งมาที่หน่วยปฏิบัติการเคมีคลินิก งานปฏิบัติการกลางและชันสูตรโรค โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

ค. ซีรัมควบคุมคุณภาพ

สำหรับการตรวจหา Activity รวม ซึ่งทำโดยเครื่อง Merck Mega Autoanalyser ใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพ คือ Monitrol-LS Level II (Baxter, USA) ส่วนในการทำ Electrophoresis ใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพสำหรับการทำ Electrophoresis บน CA membrane ของ Helena Laboratories (USA)

ง. สารละลายเคมี

สำหรับการตรวจหา Activity รวมของ ALP

ใช้ชุดน้ำยา SMT แท่ง (Diagnostica จาก Merck, Darmstadt, Germany) เมื่อละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วจะคงตัวที่ 2-8 °ซ. อย่างน้อย 7 วัน น้ำยาที่ละลายแล้ว 1 ลิตรประกอบด้วย

p-nitrophenylphosphate substrate 10 mmol
Diethanolamine -HCl-buffer pH 9.8 1 mmol
Magnesium chloride 0.5 mmol

จ. สารละลายสำหรับทำ Electrophoresis

1. Barbitol buffer pH 8.8

ซึ่ง Sodium barbitol 8.8657 กรัม Barbituric acid 0.9735 กรัม และ Calcium tartrate 0.3083 กรัม ทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. Neuraminidase (EC 3.2.1.18) 2.92 U/mg (จาก *Clostridium perfringens*, Sigma Chemical Co. USA) เตรียมโดยละลาย Neuraminidase ด้วย NaCl 154 mM ปริมาตร 1 มล. เก็บไว้ใช้ที่ -20 °ซ.

3. Alkaline phosphatase indolyl blue reagent (Helena Laboratories, Cat. No. 5102) สีย้อม ALP isoenzyme ชนิดแห้งละลายด้วย Diluent ปริมาตร 3 มล. เมื่อละลายแล้วใช้ให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง

4. 5% Acetic acid

วิธีการทดลอง

1. การตรวจหา Total activity ของ ALP ทำด้วยวิธี Kinetic ในเครื่อง Merck-Mega Autoanalyser⁸

2. การตรวจหา ALP isoenzymes ทำโดยวิธี Electrophoresis²

2.1 ค่อยๆ จุ่ม Cellulose acetate (CA)

membrane ลงใน Barbitol buffer แช่ทิ้งไว้ 30 นาที นำออกมาซับ แล้ววางบน Aligning base ให้ขอบด้านหนึ่งให้ชิด "Center application"

2.2 หยดตัวอย่างที่ต้องการตรวจลงใน Sample well plate

2.3 Apply ซีรั่มลงบน CA membrane ตำแหน่งตรงกลางของ CA membrane ด้วย Applicator

2.4 นำ CA membrane ไปทำ Electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 180 โวลต์ นาน 20 นาที

2.5 เติม Alkaline phosphatase indolyl blue reagent ปริมาตร 0.5 มล. ลงบน CA membrane แล้วรีดให้ทั่วแผ่น โดยใช้แท่งแก้ว ขั้วสีที่มากเกินไปออกด้วยกระดาษซับ

2.6 นำ CA membrane ไปอบใน Moist chamber ที่ 37 °ซ. นาน 30 นาที

2.7 ล้าง CA membrane ใน 5% acetic acid นาน 20 นาที แล้วทำให้แห้ง โดยอุ่นใน Incubator ที่ 40 °ซ.

2.8 นำ CA membrane ไป Scan หา รูปแบบของ Isoenzymes ด้วยเครื่อง Electro Data Center (EDC) densitometer

3. การหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ Electrophoresis

นำ Commercial control มาทำตามวิธีในข้อ 2 โดยแปรเวลาที่ใช้ทำ Electrophoresis ให้เป็น 20, 30, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ

4. การหา Activity ที่เหมาะสม ของ Neuraminidase สำหรับใช้ในการอุ่น ALP isoenzymes ก่อนทำ Electrophoresis

ผสมซีรั่ม (หรือ Control) 50 µL กับ Neuraminidase 20 µL ทำให้มี Activity เมื่อผสมกับซีรั่มแล้วเป็น 0.42, 0.21 และ 0.05 U/mL.

ตามลำดับ นำไปอุ่นที่ 37 °ซ. นาน 30 นาที ก่อนทำ Electrophoresis ตามวิธีในข้อ 2

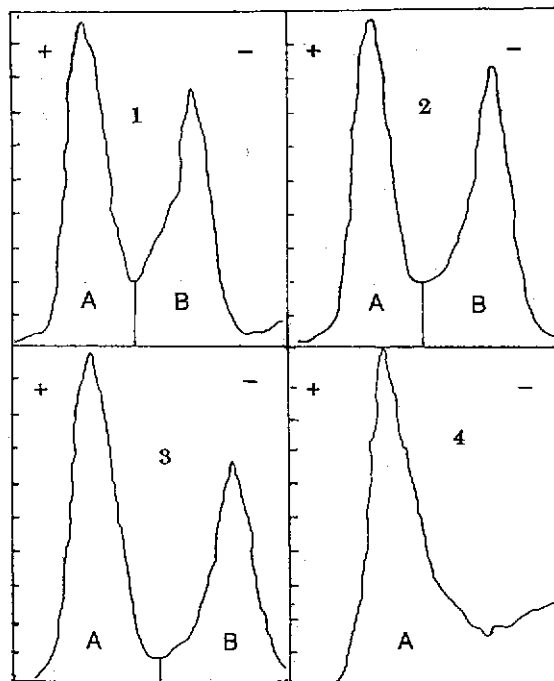
5. การตรวจหา ALP isoenzymes ทำการ Treat ซีรัม 50 μ L ด้วย Neuraminidase activity ที่เหมาะสมจากข้อ 4 ปริมาตร 20 μ L แล้วนำไปอุ่นที่ 37 °ซ. นาน 30 นาที ก่อนทำ Electrophoresis ตามวิธีในข้อ 2

ผลการทดลอง

การตรวจหา Activity รวมของ ALP ในซีรัมผู้ป่วยที่ได้นำมาศึกษาให้ผลการตรวจสูงกว่าระดับปกติ ค่าความเที่ยง (%CV) ของเครื่อง Merck Mega Autoanalyser สำหรับการวิเคราะห์ ALP มีค่าเท่ากับ 2.67% ($n = 10$, $\bar{X} \pm SD = 205.5 \pm 5.47$ U/L)

ผลการหาเวลาที่เหมาะสมในการแยก ALP isoenzymes ด้วยวิธี Electrophoresis ทำโดยการ ใช้ Commercial control (Liver และ Intestinal ALP) เป็นตัวอย่างที่ใช้ศึกษา ซึ่งใช้เวลาในการทำ 20, 30, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ พบว่าสามารถแยก ALP isoenzymes ออกจากกันได้ ตามที่แสดงในรูปที่ 1 เวลาที่เหมาะสมที่เลือกใช้ คือที่ 30 นาที เพราะสามารถแยก ALP isoenzymes ได้ชัดเจนที่สุด และเป็นช่วงเวลาที่ไม่นานหรือน้อยเกินไป ส่วนเวลา 60 นาที มีการแยกที่ไม่เหมาะสมที่สุด เพราะมี Isoenzymes ที่ตกออกจากช่วงระยะการอ่านผลของเครื่อง EDC

การทดลองหา Activity ที่เหมาะสมของ Neuraminidase ที่จะใช้ในการผสมกับซีรัมเพื่อตัด Sialic acid ออกจากปลายโมเลกุลของ ALP isoen-

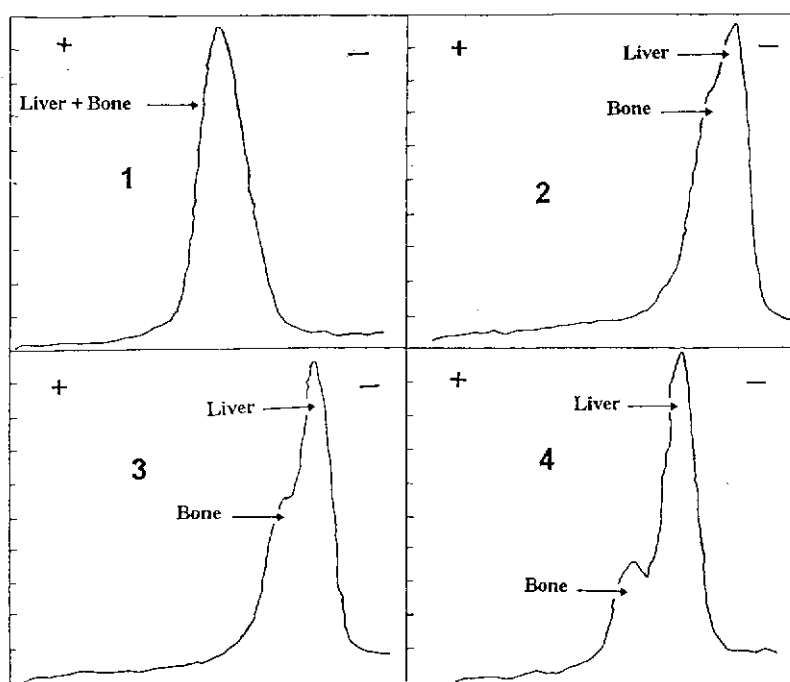


รูปที่ 1 ผลของเวลาในการทำ Electrophoresis เพื่อแยก Liver (A) และ Intestinal (B) ALP ใน Commercial control

1 = 20 นาที	;	3 = 40 นาที
2 = 30 นาที	;	4 = 60 นาที

zymes จากตับและกระดูกก่อนนำไปทำ Electrophoresis พบว่าซีรัมควบคุมคุณภาพ หรือซีรัมที่ไม่ถูกย่อย (ใช้ซีรัมผสมกับ 0.9% NaCl แทน Neuraminidase) จะทำให้ isoenzymes จากตับและกระดูกซ้อนกันอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แต่เมื่อย่อยด้วย Neuraminidase ที่มี Activity ต่างๆ กัน คือ 0.05, 0.21 และ 0.42 U/mL. ตามลำดับ ทำให้ isoenzymes ทั้งสองแยกออกจากกันได้ (รูปที่ 2) โดยที่ ALP จากกระดูกจะวิ่งไปทางซ้ายเร็วกว่า ALP จากตับ ซึ่งเคลื่อนที่อยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้น (Application point) การบอกตำแหน่งของ isoenzyme จากตับที่แสดงไว้ในรูป

ที่ 2 ทำโดยเทียบกับรูปที่ 3 ซึ่งเป็นการทำ Electrophoresis ของ Commercial control ที่มี ALP isoenzyme จากตับและลำไส้ประกอบอยู่ พบว่า Commercial control ที่อ่อนกับ Neuraminidase ทำให้ isoenzyme จากตับเคลื่อนมาอยู่ใกล้จุดเริ่มต้น ขณะที่ isoenzyme จากลำไส้เคลื่อนที่อยู่ในบริเวณเดิม เนื่องจาก Isoenzyme นี้ ไม่ถูกตัดด้วย Neuraminidase และในรูปที่ 2 เมื่อนำ Neuraminidase ที่มี Activity แตกต่างกันจะให้ผลแตกต่างกันไป โดยที่ Activity 0.21 U/mL. ให้รูปแบบการแยกที่ดีที่สุด และได้เลือกมาใช้ในการแยก ALP isoenzymes ในซีรัมผู้ป่วยต่อไป



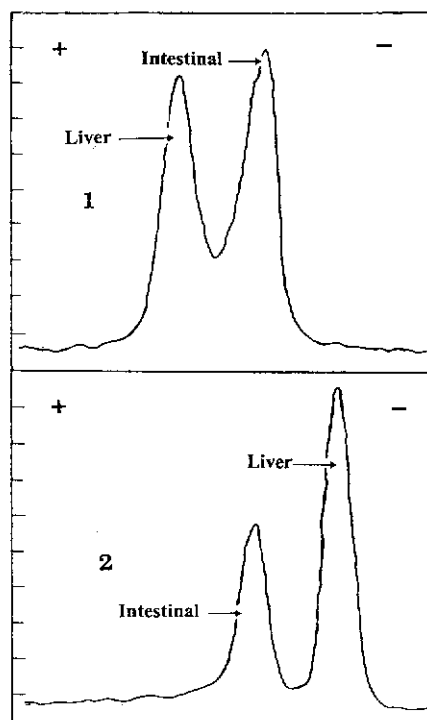
รูปที่ 2 ผลของ Neuraminidase ปริมาณต่างๆ ต่อการแยกตัวของ Liver และ Bone ALP

1 = Serum + NaCl

2 = Serum + Enzyme neuraminidase (0.05 U/mL.)

3 = Serum + Enzyme neuraminidase (0.10 U/mL.)

4 = Serum + Enzyme neuraminidase (0.21 U/mL.)



รูปที่ 3 แสดงแถบการแยกของ Liver และ Intestinal isoenzyme ใน Commercial control ก่อน (1) และ หลัง (2) การอุ่นกับ Neuraminidase

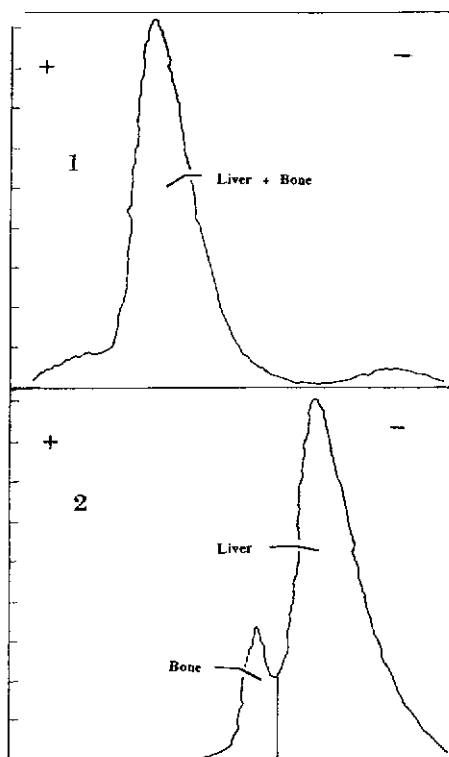
ในการตรวจแยก Isoenzymes จากซีรัมของผู้ป่วยรายที่ 1 พบว่าถ้าใช้ซีรัมธรรมดา ผลที่ได้ไม่พบการแยกของ Isoenzymes ที่ชัดเจนแสดงไว้ในรูปที่ 4-1 แต่ถ้าย่อยซีรัมเดียวกันนี้ด้วย Neuraminidase จะพบการแยกตัว อย่างชัดเจนดังรูปที่ 4-2 โดย isoenzyme จากกระดูกวิ่งไปทางซ้ายบวกได้เร็วกว่า isoenzyme จากตับเมื่อนำไป Scan ด้วยเครื่อง Densitometer ก็จะสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ หรือ Activity ของ Isoenzyme แต่ละชนิดออกมาได้

ในซีรัมโรคตับรายที่ 2 ซึ่งมี Fast liver isoenzyme อยู่ด้วย โดยพบ Liver isoenzymes 2 isoforms คือ Fast liver isoenzyme เคลื่อนที่ไปอยู่ใกล้ซ้ายบวกที่สุด ขณะที่ Liver กับ Bone isoen-

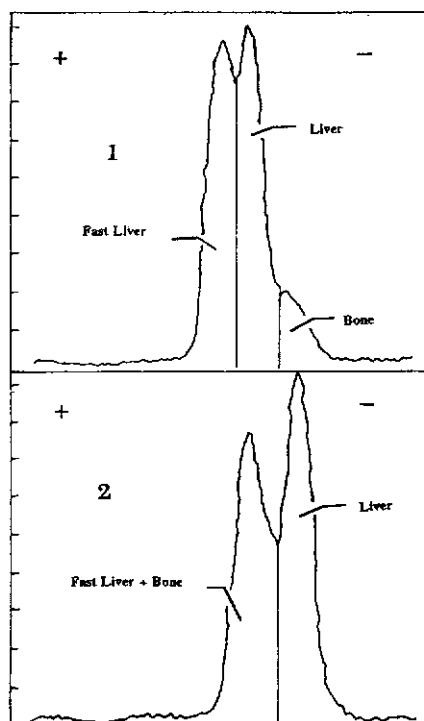
zymes เคลื่อนที่ซ้อนกันอยู่ เมื่อนำซีรัมเดียวกันมาย่อยด้วย Neuraminidase (0.21 U/mL.) พบว่า Liver isoform เคลื่อนที่มาอยู่ใกล้ซ้ายบวกมากที่สุด และ Fast liver ซ้อนอยู่กับ Bone isoenzyme (รูปที่ 5-1 และรูปที่ 5-2) ดังนั้นการทำ Electrophoresis ของซีรัมผู้ป่วยที่มี ALP liver isoenzyme มากกว่า 1 isoform จะทำให้เกิดการซ้อนกันของ Isoenzymes 2 ชนิดที่มีในซีรัมได้เมื่อย่อยซีรัมด้วย Neuraminidase ก่อน

วิจารณ์

การใช้ Neuraminidase เพื่อแยก และ isoenzyme จากตับและกระดูกออกจากกัน โดยวิธี Electrophoresis มีหลักการ คือ Neuraminidase จะตัด



รูปที่ 4 แสดงแถบการแยกของ Liver และ Bone isoenzymes ของซีรัมผู้ป่วย ก่อน (1) และหลัง (2) oun กับ Neuraminidase



รูปที่ 5 แสดงแถบการแยกของ Fast liver, Liver, Bone ALP ก่อน (1) และหลัง (2) การoun กับ Neuraminidase

Sialic acid ที่ปลาย ALP จากตับและกระดูกได้ไม่เท่ากัน ทำให้เกิดประจุลบสุทธิบนโมเลกุลของ isoenzyme ทั้งสองไม่เท่ากัน จึงเคลื่อนที่ต่างกัน ในสนามไฟฟ้า ทำให้แยกออกจากกันได้ การแยกได้มากนักเพียงใดขึ้นขึ้นอยู่กักระยะเวลาของการย่น Neuraminidase กับซีรัม และ Activity ของ Neuraminidase ในการทดลองนี้ใช้ 0.21 U/mL. ย่นกับซีรัม ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีรายงานจากผู้วิจัยอื่นพบว่า ALP isoenzyme อื่นอาจต้องการเวลาในการย่นกับซีรัมนานกว่านี้ เช่น ALP isoenzyme จากลำไส้ต้องใช้เวลาราว 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °ซ. จึงจะพบการยับยั้งการเคลื่อนที่ได้

การตรวจหา ALP isoenzymes ในห้องปฏิบัติการมีประโยชน์ในการช่วยแพทย์วินิจฉัยโรคที่ค่อนข้างจำเพาะมากกว่าการทำการตรวจสมรรถภาพของตับ ซึ่งอย่างน้อยต้องทำการตรวจวิเคราะห์ถึง 6 รายการ คือ Bilirubin, Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Alkaline phosphatase (Total activity), Total protein และ Albumin เพื่อบอกถึงความผิดปกติของตับ แต่การจะตัดสินว่าผู้ป่วยเป็น Hepatocellular disease หรือ Hepatobiliary disease ยังต้องตรวจเอนไซม์อีก 1 ชนิด คือ 5' - Nucleotidase (5'-NT) เพื่อแยกแยะระดับ ALP ที่สูงขึ้นในซีรัมนั้นมาจากโรคกระดูกหรือไม่ ส่วนการทำ ALP electrophoresis นอกจากจะบอกที่มาของ ALP ที่สูงขึ้นได้ในซีรัมแล้วยังสามารถบอกถึงสาเหตุของ Bilirubin ที่สูงขึ้นในซีรัมด้วย คือแยกโรคตับว่ามีสาเหตุมาจากการอักเสบหรือการอุดตันที่บริเวณท่อน้ำดีหรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอุดตันชนิด Extrahepatic^{10,11} ถ้ามีก็จะมีแถบของ Fast liver isoenzymes ปรากฏขึ้นด้วยการตรวจโดยใช้วิธี Electrophoresis แล้วพบว่า

Fast liver isoenzyme ปรากฏอยู่จะสามารถใช้แยกภาวะของ Liver metastases จากโรคตับอื่นๆ ได้ดีกว่าใช้การตรวจเอนไซม์หลายๆ ชนิดรวมกัน^{12, 13}

การตรวจแยก ALP isoenzymes ชนิดต่างๆ ในซีรัมของผู้ป่วยโดยย่นซีรัมกับ Neuraminidase ก่อนทำ Electrophoresis มักใช้ในการแยกโรคตับออกจากโรคกระดูก แต่ในซีรัมผู้ป่วยโรคตับมักพบ Fast liver, Liver และ Bone isoenzymes ไปพร้อมๆ กัน ดังนั้นในการทำ Electrophoresis จึงต้องทำในซีรัมก่อนและหลังย่อยด้วย Neuraminidase ควบคู่กันไป เพื่อทำการหักลบแถบของ Fast liver และ Bone ที่ซ้อนกันอยู่เมื่อ Scan ด้วย Densitometer เพื่อหา Activity ของ Isoenzyme แต่ละชนิดในซีรัม

จากการทดลองสรุปได้ว่า ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการแยก ALP isoenzymes ด้วยวิธี Electrophoresis นั้น คือ การย่อยด้วย Neuraminidase สามารถแยก isoenzyme จากตับและกระดูกออกจากกัน พบว่า Neuraminidase ปริมาณ 0.21 U/mL. เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ทำให้ Isoenzymes ทั้ง 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ชัดเจน เวลาในการทำ Electrophoresis ควรเป็น 30 นาที ให้สังเกตระยะห่างระหว่างแถบของ isoenzyme จากตับและลำไส้ใน Commercial control เพราะถ้าในซีรัมมี ALP isoenzyme จากกระดูกก็จะเคลื่อนที่อยู่ระหว่างแถบของตับ และลำไส้

การหาตรวจหา Isoenzymes แต่ละชนิดทำได้จากการคำนวณหา Activity ของ Isoenzyme แต่ละแถบได้โดยอาศัยเครื่อง Densitometer การตรวจแยกโดยวิธีนี้ Cellulose acetate membrane 1 แผ่น จะตรวจซีรัมได้อย่างน้อย 4 ราย (ถ้าซีรัมมี Fast liver isoenzyme) ค่าใช้จ่ายต่อ 1 ตัวอย่าง (2 lanes) เท่ากับ 180 บาท

เอกสารอ้างอิง

1. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. Clin Chem 1982; 28: 2007-16.
2. Alkaline Phosphatase Isoenzyme Procedure. Manual for electrophoresis reagent. Helena Laboratories, USA.
3. Rosalki SB. Diagnostic Enzymology 2nd ed. Florida : Dade Division American Hospital Supply Corporation, 1969; 27-30.
4. Day AP, Saward S, Royle CM, Mayne PD. Evaluation of two new methods for routine measurement of ALP Isoenzymes. J Clin Pathol 1992; 45: 68-71.
5. Moss DW, Edwards RK. Improved electrophoresis resolution of bone and liver alkaline phosphatases resulting from partial digestion with neuraminidase. Clin Chim Acta 1984; 143: 177-82.
6. Operation Manual for Merck Mega Autoanalyser.
7. Jung K, Pergande M, Klotzek S. Sialidase from sources compared for electrophoretically separating serum alkaline phosphatase fractions from liver and bone. Clin Chem 1989; 35: 1955-7.
8. Griffiths WC, Camera PD, Rosner M, Lev R, Brooks EM. Prevalence and properties of the intestinal alkaline phosphatase identified in serum by cellulose acetate electrophoresis. Clin Chem 1992; 38: 507-11.
9. Tietz NW. Fundamental of Clinical Chemistry. WB Saunder: Philadelphia 1982, p 619.
10. Taswell HF, Jeffers DM. Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in hepatobiliary and skeletal diseases. Am J Clin Pathol 1963; 40: 349-56.
11. Newton MA. The clinical application of alkaline phosphatase electrophoresis. QJ Med 1967; 36: 17-28.
12. Crofton PM, Elton RA, Smith AF. High molecular weight alkaline phosphatase : A clinical study. Clin Chim Acta 1981; 115: 349-58.
13. Viot M, Joulin C, Camton P, *et al.* The value of serum alkaline phosphatase α_1 isoenzyme in the diagnosis of liver metastases. Biomed 1979; 31: 74-7.