جمهورية العراق
وزارة التخطيط والتعاون الانمائي
الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
C.O.S.Q.C
Industrial Property Division
قسم الملكية الصناعية

إستخدام أنزيم اليوريز Urease المنتج والمنقى جزئياً من بكتيريا *Proteus mirabilis* في إنتاج عدة محلية لتقدير تركيز اليوريا في الدم

علاء كريم محمد
alaauniv@yahoo.com
جامعة بغداد / كلية الهندسة خوارزمي
٠٧٧١٨٦١CC٩١

علي حافظ عباس
ali_habbas@yahoo.com
جامعة بغداد / كلية العلوم
٠٧٨C٨٨٧٢٩٢٩

Using urease enzyme produced and partially purified from *Proteus mirabilis* in the estimation of blood urea concentration

Ali Hafedh Abbas

University of Baghdad

Sciences College

Alaa Kareem Mohammed

University of Baghdad

Al-Khawarzmi Engineering

إستخدام أنزيم اليوريز Urease المنتج والمنقى جزئياً من بكتيريا *Proteus mirabilis* في إنتاج عدة محلية لتقدير تركيز اليوريا في الدم

Using urease enzyme produced and partially purified from *Proteus mirabilis* in the estimation of blood urea concentration

الخلاصة

تناولت الدراسة إستخدام أنزيم اليوريز المنتج من بكتيريا *Proteus mirabilis* المعزولة محليا من عينات الأدرار والمنقى بطريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع بلغت 50% وبعدد مرات تنقية بلغت 245 مرة وبحصيلة أنزيمية بلغت 24% في إنتاج عدة محلية لتقدير تركيز اليوريا في الدم والتي يعد أنزيم اليوريز أحد مكوناتها الأساسية، ومقارنة النتائج المستحصلة من العدة المحلية مع النتائج المستحصلة من إستخدام عدة مستوردة من شركة Biocon بإستخدام طريقة Brothelote لتقدير تركيز اليوريا بكلتا العدتين المستخدمتين. وأظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية عند إستخدام العدة المحلية مقارنة بالعدة المستوردة في تقدير تركيز اليوريا لـ 149 عينة دم.

جمهورية العراق
وزارة التخطيط والتعاون الانمائي
الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
C.O.S.Q.C
Industrial Property Division
قسم الملكية الصناعية

Abstract

This study was included the using of urease enzyme that produced from *Proteus mirabilis* bacteria that locally isolated from urine samples and purified by ammonium sulfate precipitation with 50% saturation ratio and several times purification reached to 245 times with enzyme production reached to 24% of local kit to estimate urea concentration in the blood that urease enzyme is one of the basic kit components comparing the results that obtained from the kit with the results that obtained from the use imported kit from Biocon company using Brothelote method for estimating the concentration of urea with both kits that used. The results showed there were no significant differences from using local Kit compared with imported kit to estimate the urea concentration in 149 samples of blood.

C.O.S.G.C
Industrial Property Division

جمهورية العراق
وزارة التخطيط والتعاون الانمائي
الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
C.O.S.Q.C
Industrial Property Division

المقدمة

تتحرر الى البيئة وبصورة مستمرة كميات كبيرة من اليوريا والتي تُنتج من الفعاليات الحيوية للكائنات الحية المختلفة كناتج عرضي لعملية الأيض للمركبات المحتوية على النتروجين، فاليوريا تُعد المكون الرئيسي للإدرار في اللبائن كناتج لعملية Detoxification، وان إدرار الانسان يحتوي على (0.4 – 0.5) مولار من اليوريا، بينما الطيور وغالبية الحشرات والزواحف (Reptiles) تفرز حامض اليوريك الذي يتحلل بفعل العوامل البيئية منتجاً اليوريا. إن اليوريا المضافة الى البيئة بسبب هذه العمليات تمتاز بصورة عامة بعمر قصير، أي بقاؤها في البيئة لا يستمر طويلاً وذلك نتيجة لفعالية أنزيم اليوريز Urease، الذي يعمل على تحليل اليوريا التي هي من النواتج النتروجينية غير البروتينية المفرزة في جسم الانسان والحيوان (الغراوي، 2001).

إن أنزيم اليوريز (Urea amido hydrolase) أحد الأنزيمات التابعة للمجوعة المميئة (Hydrolases) ذي الرقم التصنيفي (E. C. 3. 5. 1. 5)، ويحتاج هذا الأنزيم إلى أيون النيكل لتحفيز التحلل المائي لليوريا لتحرير جزيئة امونيا وجزيئة كارباميت (Carbamate) التي تتحلل تلقائياً لإعطاء جزيئة اخرى من الأمونيا وحامض الكربونيك.

ينتج أنزيم اليوريز من قبل العديد من الكائنات الحية:

- كالبكتيريا والذي يعد عامل من عوامل ضراوة كل من بكتيريا *Proteus, Staphylococcus, Klebsiella, Micrococcus, Ureaplasma, Pseudomonas, Corynbacterium, Morganella* (Tokunaga *etal.*, 1998; Mobley, 1992).
- الخمائر مثل Rodosporidium (Phillips *etal.*, 1991) .
- الفطريات مثل فطر *Aspergillus* (Creaser and Porter, 1985) .
- النباتات مثل نباتات العائلة البقولية ومعظم النباتات الاخرى (Blakeley and Zerner, 1984; Smith *etal.*, 1993; Das *etal.*, 1998).

استخدمت أشعة X لدراسة التركيب البلوري ثلاثي الأبعاد لجزيئة الأنزيم و أظهرت الدراسات أن أنزيم اليوريز هو أنزيم معدني له تركيب رباعي للبروتين و يتكون من 16 Poly peptides تتخذ شكلا كرويا تتألف من 840 حامض أميني بوزن 486 كيلو دالتون ، و لوحظ أن أغلب أنواع أنزيم اليوريز البكتيري تتكون من ثلاث وحدات فرعية هي : ألفا ، بيتا ، كاما ما عدا جنس *Helicobacter* فان التركيب الرباعي يتكون من وحدتين هي : ألفا ، بيتا

(Tokunaga *etal.*, 1998; Blanchard *etal.*, 1998) ، تحتاج الوحدات الفرعية لأنزيم اليوريز أيون النيكل للفعالية التحللية، وان عناقيد جينات أنزيم اليوريز البكتيري (Bacterial Urease Genes Cluster) التي تشفر لتلك الوحدات عُزلت ووصّفت وقورنت مع أنواع اخرى لعناقيد جينات أنزيم اليوريز، ووجد ان معظم أنزيمات اليوريز البكتيري تتألف من ثلاث وحدات فرعية هي ألفا وبيتا وكاما التي يُشفر لها بواسطة جينات (*ure* A, B & C) (Mobley and Hasinger, 1989; Mobley *etal.*, 1995; Chen *etal.*, 1998) ، ومما تقدم هدفت هذه الدراسة الى إستخلاص أنزيم اليوريز الذي يعد كعامل ضراوة لبكتيريا *Proteus mirabilis* المنقى جزئيا لغرض إستخدامه في تحضير عدة محلية الصنع لتقدير تركيز اليوريا في الدم ، وتعتبر هذه التقنية كتطبيق عملي لأحدى إستخدامات أنزيم اليوريز وذات كلفة واطئة مقارنة بكلفة العدة المستوردة وذات فعالية عالية لأن فترات الخزن لها قصيرة مقارنة بالعدة المستوردة التي تصنّع وتخزن بدرجة حرارة 2 – 8 درجة مئوية لحين الطلب ، لأم أنزيم اليوريز من الأنزيمات التي تتأثر بالفترة الزمنية حيث تنخفض فعاليته كلما طالت فترة الخزن.

المواد وطرائق العمل

التحضير Preparation

- **العُدة التشخيصية المستوردة:**

تم الحصول على العُدة المجهزة من شركة BioCon من الاسواق المحلية والتي يتم تحضير محاليلها كالآتي: -

1. المحلول المنظم R1:

ان المحلول المنظم R1 يكون جاهز للاستعمال مباشرةً بعد اضافة (Vial 1) سعة (ml 1) من محلول الانزيم R2 الى عبوة واحدة من المحلول المنظم R1 سعة (ml 100) مع الرج المستمر لمدة 15 دقيقة باستخدام جهاز الرج والتحريك (Shaker) لضمان تجانس المزيج، وبهذا سيكون محلول العمل (Working solution) ثابتاً لمدة اربعة اسابيع عند حفظه بدرجة حرارة 8-2 مْ أو ستة ايام عند حفظه في درجة حرارة 25-20 مْ كما يجب حفظ هذا المحلول في عبوة بلاستيكية معتمة.

2. محلول الانزيم R2:

تم الحصول على محلول الانزيم جاهزاً من شركة BioCon وبفعالية انزيمية أكبر من 5000 U/l، ويبقى الانزيم فعالاً حتى نهاية مدة صلاحية استخدام العُدة المستوردة.

3. محلول الهايبوكلورات R3:

عند استخدام اجهزة مطياف ضوئي خلاياها (Cuvette) تحتاج الى (ml 2) من محلولي الاختبار (1 ml R1 + 1 ml R3) فان محلول الهايبوكلورات R3 يخفف بأربعة اضعاف حجمه ماء مقطر، والمحلول المخفف (Diluted R3) يبقى ثابتاً ضد التغيرات لمدة ستة شهور عند حفظه بدرجة حرارة (8 – 2 مْ) ، بينما محلول الهايبوكلورات يبقى ثابتاً حتى نهاية مدة صلاحية استخدام العُدة وخصوصاً عند حفظه في درجة حرارة (8 – 2 مْ).

4. محلول اليوريا القياسي R4:

تم الحصول على محلول اليوريا القياسي جاهزاً من شركة BioCon وبتركيز 8.325 mmol/l، ويبقى ثابتاً حتى نهاية مدة صلاحية استخدام العُدة المستوردة.

- **العدة التشخيصية المحلية:**

1. المحلول المنظم R1:

تم وزن الكميات المبينة في الملحق رقم (1) وإذابتها في ml 70 من الماء المقطر مع تحريك المزيج بواسطة المحرك المغناطيسي وبعد ضمان الاذابة الكاملة لمكونات المزيج، يُكمّل الحجم الى ml 100 ويضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.7 بواسطة مقياس الرقم الهيدروجيني ويحفظ في عبوات بلاستيكية معتمة في درجة حرارة (8 – 2 م°)، ويبقى ثابتاً لمدة اسبوع عند حفظه في درجة حرارة (8 – 2 م°).

C.O.S.Q.C
Industrial Property Division

2. محلول الانزيم R2:

تم الحصول على انزيم اليوريز المستخلص والمنقى من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من الإدرار البشري لأشخاص مصابين بهذا النوع من البكتيريا بعد تنمية بكتريا *Proteus mirabilis* في مرق Tryptic Soy Broth، وحضنت في الحاضنة الهزازة لمدة 48 ساعة وبدرجة حراره 37°م بعدها تم اجراء الطرد المركزي (10000 دورة / دقيقة)، ثم أخذ الرائق الذي تم معاملته بمحلول كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 50% لتنقية الأنزيم من الرائق المستحصل كما هو مبين في الفقرة التالية، حيث كانت الفعالية الانزيمية له 502000 U/l. إضيف 1ml من محلول الانزيم الى ml 100 من المحلول المنظم (R1)، رُج المزيج بشكل مستمر لمدة 15 دقيقة باستخدام جهاز الرج والتحريك (Shaker) لضمان تجانس المزيج (الشكرجي، 2004).

أ. تنقية أنزيم اليوريز:

تمت تنقية انزيم اليوريز بترسيب الأنزيم الخام في الرائق المستحصل من الطرد المركزي في الخطوة السابقة بوساطة بلورات كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (50%)، فُصل الراسب في جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 10000 rpm ولمدة 20 دقيقة. أُهمل الرائق وأُذيب الراسب في كمية صغيرة من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 8 وأُجريت عملية الديلزة حيال دارئ الفوسفات نفسه للتخلص من بقايا كبريتات الأمونيوم، قُدرت الفعالية الأنزيمية وقيس تركيز البروتين، من خلال تمرير المحلول الأنزيمي المديلز(20) ملليلتر على سطح العمود (الذي حضر بأستخدام المبادل الآيوني ثنائي أثيل أمينواثيل سليلوز DEAE-Cellulose حسب تعليمات الشركة المجهزة Whatman وعُبئ المبادل في عمود زجاجي ليعطي أبعاداً (3.5 x 2.5 سم) وأُجريت عملية الموازنة (Equilibration) لعمود المبادل بواسطة محلول دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 7.5 حتى اليوم

التالي بسرعة جريان 60 مليلتر/ ساعة) بهدوء وغسل العمود بالمحلول الدارئ فوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 لإنزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الأجزاء المتدفقة من العمود بمعدل 3 مليلتر/ أنبوب (الأمير، 1998)، تم استرداد الأنزيم من العمود باستعمال تدرج ملحي خطي من محلول منظم الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 مضاف له 0.5 مولار من كلوريد الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 وتم متابعة البروتين في الأجزاء التي جمعت وذلك بقياس الامتصاص الضوئي لها عند طول موجي 280 نانومتر. قيست الفعالية الأنزيمية في الأجزاء ورسم منحنى لعدد الأجزاء المنفصلة إزاء كل من الامتصاصية للبروتين (280 نانومتر) والفعالية الأنزيمية (وحدة/مليلتر)، ثم جمعت الأجزاء القريبة من ذروة منحنى الفعالية وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيها.

مُرر محلول الأنموذج الأنزيمي المركز بواسطة السكروز الجاف الذي تم الحصول عليه بالخطوة السابقة على سطح عمود الترشيح الهلامي (الذي حضر حسب التعليمات المبينة من شركة Pharmacia Fine chemical المجهزة لهلام Sephacryl S-200) بمقدار 2 مليلتر وبشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام، ثم أجريت عملية الإسترداد بمحلول الموازنة نفسه وجُمعت الأجزاء بواقع 3مليلتر/أنبوب بسرعة جريان 30 مليلتر/ساعة، قيس أمتصاص الضوء على طول موجي 280 نانومتر للأجزاء المستردة، وتمت متابعة الأجزاء التي أعطت فعالية أنزيمية ضمن القمة الواحدة وحُسبت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين للأنزيم المنقى كما جاء في الفقرة أعلاه، ثم رسمت العلاقة بين رقم الأنبوب إزاء كل من الإمتصاصية والفعالية النوعية للأنزيم بعدها تم تجميع محتويات الأنابيب التي أظهرت فعالية نوعية عالية، ثم تم تركيزها وإضافتها على عمود السيفاكريل S-200 مرة ثانية وأستعملت لأجراء الإختبارات الخاصة لتوصيف الأنزيم المنقى.

عُينت نقاوة أنزيم اليوريز بطريقة الترحيل الكهربائي تحت ظروف غير ماسخة من خلال تحضير هلام الاكريل أمايد بتركيز 5%، وأجري الترحيل الكهربائي وفق ما وصفه (Blackshear, 1984) بأستعمال تيار كهربائي بقوة 2 ملي أمبير/أنبوب في مرحلة الرص لمدة 30 دقيقة و5 ملي أمبير/أنبوب في مرحلة الفصل لمدة 4 -5 ساعة مع التبريد بدرجة 4 مئوي. تم التصبيغ بإستعمال صبغة كوماسي الزرقاء.

ب. قياس الفعالية الأنزيمية

قيست الفعالية الأنزيمية في العُدة المحضرة محلياً من خلال إضافة 1ml من الانزيم المنقى بالطريقة السابقة الى 100ml من المحلول المنظم المحضر محلياً R1 وقُدرت فعالية

الأنزيم في تكسير جزيئات اليوريا في مصل العينات التي جمعت لغرض تقدير تركيز اليوريا فيها، بمقارنة النتائج المستحصلة من إستخدام العُدة المحلية بالنتائج المستحصلة من إستخدام العُدة المستوردة والمصنعة من قبل شركة Biocon (Spain) ، (الملحق رقم 2).

3. محلول الهايبوكلورات R3:

وُزن gm 1.8 من مسحوق Sodium Hydroxide (NaOH) وإضافته الى ml 1.3 من محلول Sodium Hypochloride وذُوّب الخليط في ml 80 ماء مقطر ويحفظ في عبوات بلاستيكية معتمة وبدرجة حرارة (8 – 2 م°).

4. محلول اليوريا القياسي R4:

تم وزن gm 0.5 من مسحوق اليوريا وذوّب في ml 1 من الماء المقطر الخالي من الاملاح وتم حفظه في قنينة محكمة الغلق.

طريقة القياس

استخدمت طريقة Brothelote في تقدير تركيز اليوريا في الدم باستخدام العُدتين المحلية والمستوردة لغرض اجراء المقارنة بينهما. وفي هذه الطريقة يستخدم جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 590 لتقدير تركيز اليوريا في الدم، حيث تتفاعل الامونيا المتحررة مع كاشف Sodium nitroprusside بوجود Sodium hypochloride لتعطي لوناً اخضر، وهذه الطريقة سهلة ويمكن بواسطتها تقدير تركيز اليوريا لغاية 50 mmol/l وفي النماذج التي تحوي على تركيز يوريا أعلى من ذلك يمكن تخفيف المحلول الناتج بحجم مكافئ من المحلول الفسيولوجي (Normal Saline) والنتيجة تضرب في 2 (Valery, 2001).

تقدير قيمة الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي والمكافئ:

أُخذت انبوبتي اختبار ووُضع في كل منها (ml 1) من محلول العمل R1، بعدها تمت اضافة (µl 10) من محلول اليوريا القياسي R4 الى انبوبة المحلول القياسي، وبعد الرج الخفيف للأنبوبة حُضنت الانبوبتين في الحمام المائي بدرجة حرارة (37 م°) لمدة خمسة دقائق.

بعد انتهاء مدة الحضن تم اضافة (ml 1) من محلول الهايبوكلورات المخفف (Diluted R3)، وبعد الرج الخفيف للأنبوبتين حُضنتا في الحمام المائي بدرجة حرارة (37 م°) لمدة خمسة دقائق.

وتمت قراءة امتصاصية (Absorbance) المحلول القياسي والمكافئ مقابل الماء المقطر عند الطول الموجي 580 نانومتر بواسطة جهاز المطياف الضوئي الرقمي.

جمهورية العراق
وزارة التخطيط والتعاون الإنمائي
الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
C.O.S.Q.C

تقدير تركيز اليوريا في الدم

أُخذ (1 ml) من محلول العمل R1 في انبوبة اختبار وأُضيف له (10 µl) من مصل الدم وبعد الرج الخفيف للأنبوبة حُضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة خمس دقائق، ثم أُضيف (1 ml) من محلول هايبوكلورات المخفف وبعد رج الانبوبة رجاً خفيفاً حُضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة خمس دقائق، وبعد انتهاء مدة الحضن قيست قيمة الامتصاصية الضوئية لمحلول الاختبار عند طول موجي 580 نانومتر.

تم حساب تركيز اليوريا في الدم بأستخدام طريقة Brothelote باستخدام العُدتين المحلية والمستوردة من المعادلة الاتية:

$$Urea\ concentration\ (con.) = \frac{Absorbance\ (Abs.) of\ Test - Abs.\ of\ Blank}{Abs.\ of\ Standard - Abs.\ of\ Blank} \times Standard\ con.$$

Abs. of blank: قيمة امتصاصية المحلول المكافئ

Standard concentration (mmol/L): قيمة تركيز المحلول القياسي

Abs. of standard: قيمة امتصاصية المحلول القياسي

Abs. of test: قيمة امتصاصية محلول الاختبار

Urea concentration (con.) (mmol/L): قيمة تركيز اليوريا

ولغرض بيان الحيود بين نتيجتي العُدة المحلية والمستوردة في تقدير تركيز اليوريا في الدم تم حساب النسبة المئوية للخطأ المطلق (Absolute Percent Error) لكل نموذج وكما ياتي:

$$\text{APE} = \frac{|CCK - CBK|}{CCK} \times 100$$

حيث أن:

APE: Absolute Percent Error النسبة المئوية للخطأ المطلق

CCK: Urea Concentration in Imported Kit. تركيز اليوريا في النموذج باستخدام العُدة المستوردة

CBK: Urea Concentration in Local Kit. تركيز اليوريا في النموذج باستخدام العُدة المحلية

النتـــائج والمناقشة

يبـين الملحـق رقـم (2) النتـائج العمليـة لتركيـز اليوريـا فـي الـدم التـي تـم الحصـول عليهـا مـن 149 نمـوذج دم لمتطـوعين عـراقيين باسـتخدام العـدة التشخيصـية المحليـة (Local Kit) ومقارنـة نتائجهـا مع نتائج العدة التشخيصية المستوردة (Control Kit) والمجهزة من قبل شركة Biocon.

إستُخدم في هذه الدراسة أنزيم اليوريز المستخلص والمنقى جزئياً من بكتيريا *Proteus mirabilis* في عدة لتقدير تركيز يوريا الدم، وتتكون هذه العُدة التشخيصية من:

1. المحلول المنظم (R 1)

والـذي يتكون من كـلٍ من Phosphate Buffer, EDTA, Sodium Salicylate, Sodium Nitroprusside. فوجود Phosphate Buffer في المحلول المنظم R1 يوفر حماية للانزيم من التغيرات المفاجئة في الرقم الهيدروجيني، اما EDTA فانه يزيد من قوة ارتباط الأيون بالانزيم ويبقي الأيون قريباً من الانزيم في التراكيز الواطئة، بينما يعد Sodium Salicylate أحد مكونات المحلول المنظم الذي يقاوم التغيرات في الظروف الملائمة لفعالية الانزيم.

وتم اسـتخـدام كـاشــف Sodium Nitroprusside للكشــف عن الامونيـا المتحررة من تحلل اليوريـا، حيث يتفاعل الكاشــف مع أيون الامونيوم ليعــطي لونـــاً اخضـــر نتيجة تكوّن (2,2 Dicarboxylindophenol).

2. محلول الهايبوكلورات (R 3)

إذ يتكون محلول الهايبوكلورات R3 من Sodium Hydroxide & Sodium Hypochloride، حيث يوفر Sodium Hydroxide رقماً هيدروجينياً قاعدياً لإيقاف التفاعل الانزيمي ويُحفِّز تفاعل أيون الامونيوم مع كاشف Sodium Nitroprusside بوجود Sodium Hypochloride.

$$H_2N-\overset{\overset{O}{||}}{C}-NH_2 + H_2O \xrightarrow{Urease} \underset{Ammonia}{NH_3} + \underset{Carbamate}{NH_2-\overset{\overset{O}{||}}{C}-OH}$$

وإن إضافة 10 µl من مصل الدم إلى 1 ml من المحلول العامل في أنبوبة اختبار يؤدي إلى حصول تفاعل محفز أنزيميا بواسطة أنزيم اليورييز الموجود في المحلول العامل مع اليوريا الموجودة في مصل الدم وبالتالي

تميؤ اليوريا إلى جزيئة امونيا وكارباميت والتي تتحلل تلقائياً لتكوين جزيئة اخرى من الامونيا وحامض الكربونيك.

$$\underset{Carbamase}{H_2N-\overset{\overset{O}{||}}{C}-OH} + H_2O \longrightarrow \underset{Amonia}{NH_3} + \underset{Carbonic\ acid}{H_2CO_3}$$

وجزيئة الامونيا المتحررة تتفاعل مع (Sodium Hypochloride) الموجود في محلول الهايبوكلورات لتكوين كلوريد الامونيوم.

$$NH_3 + NaClOH \longrightarrow NH_4Cl + NaOH$$

والأخير يتفاعل مع Sodium Salicylate بوجود كاشف Sodium Nitroprusside الموجودان في المحلول العامل R1 لتكوين مركب 2,2 Dicarboxyl Indophenol والمركب الناتج ذو لون اخضر، تقاس كثافته الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 580 نانوميتر ومنها يتم تقدير تركيز اليوريا في الدم.

أظهرت نتائج تقدير تركيز اليوريا في الدم (ملحق رقم 2) بعدم وجود فروق في قيمة تركيز اليوريا المقاسة في الدم بإستخدام العُدتين المحلية والمستوردة ، وأكد هذه النتيجة التحليل الإحصائي بتوظيف البرنامج الجاهز SPSS بعدم وجود فرق معنوي ($P\leq0.05$) بين العُدتين المستخدمتين لتقدير تركيز اليوريا في الدم بإستخدام T – Test حيث كانت قيمة t المحسوبة (1.11) اقل من قيمة t الجدولية (1.96) عند مستوى خطأ 0.05 ، ، و قد أعطت النتائج معدل فرق مطلق مقدارهُ 12.17% ، ولهذا فلا توجد أي فروق معنوية بين العُدتين التشخيصيتين المستخدمتين وبذلك يمكن استخدام العُدة التشخيصية المحلية في تقدير تركيز اليوريا في الدم كبديل عن العدة المستوردة.

الادعاءات

1- عنصر الحماية رقم (1): استخدام أنزيم اليوريز المستخلص من بكتيريا *Proteus mirabilis* والمنقى باستخدام طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم في تحضير عدة محلية لتقدير تركيز يوريا الدم.

2- إشارة الى عنصر الحماية رقم 1 تم استخدام أنزيم اليوريز المستخلص من بكتيريا *Proteus mirabilis* والمنقى باستخدام طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم في تقدير تركيز يوريا الدم.

3- إشارة الى عنصر الحماية رقم 1 تم استخدام أنزيم اليوريز في تصنيع العدة المحضرة محليا ومن مواد أولية بسيطة ومتوفرة وغير مكلفة وكبديل عن العدة المستوردة من خارج القطر والتي تكلف البلد خسارة العملة الصعبة في ظل هذه الظروف.

4- إشارة الى عناصر الحماية رقم 1 و2 و3 في أعلاه تم التوصل الى كفاءة العدة المحضرة والمصنعة محليا مقارنة بالعدة المستوردة التي تحمل علامة شركة Biocon في تقدير تركيز يوريا الدم في 149 عينة دم لمتطوعين عراقيين.

5- إشارة الى عناصر الحماية 1 و2 و 3 و4 في أعلاه يمكن استخدام مصادر بكتيرية متعددة منتجة لهذا الأنزيم واستخدامه في تصنيع عدة محلية لتقدير تركيز يوريا الدم وذات كفاءة تفوق كفاءة العدة المستوردة.

الملاحق

الملحق رقم (1): مكونات المحلول المنظم R1.

المادة	الوزن بالغرامات
Phosphate Buffer	10.45
EDTA	0.27
Sodium Salicylate	0.8
Sodium Nitroprusside	0.15

الملحق رقم (2) نتائج تقدير تركيز اليوريا في الدم بإستخدام العُدتين المحلية والمستوردة

العُدة المستوردة والمستخدمة كسيطرة			العُدة المحلية		
النماذج Samples	قيمة الامتصاصية الضوئية	تركيز اليوريا في الدم mmol/l	قيمة الامتصاصية الضوئية	تركيز اليوريا في الدم mmol/l	Absolute Percent Error (%)
Blank	0.1586		0.1049		
Standard	0.4398		0.3775		
1	0.3863	6.7	0.3366	7.1	6 %
2	0.3629	6.1	0.3296	6.8	10 %
3	0.3656	6.1	0.2821	5.1	16 %
4	0.3229	4.9	0.3099	6.3	29 %
5	0.3082	4.4	0.2849	5.5	25 %
6	0.3086	4.4	0.2530	4.5	02 %
7	0.3123	4.6	0.2901	5.7	24 %
8	0.4119	7.5	0.4028	9.1	21 %
9	0.3058	4.4	0.2671	5.0	13 %
10	0.5268	10.9	0.4701	11.2	03 %
11	0.3652	6.1	0.3562	7.7	27 %
12	0.3733	6.4	0.3650	7.9	23 %
13	0.3263	5.0	0.3075	6.2	24 %
14	0.3171	4.7	0.2882	5.6	19 %
15	0.29	3.9	0.25	4.4	13 %
16	0.295	4.0	0.225	3.7	08 %
17	0.3075	4.4	0.28	5.4	23 %
18	0.2925	4.0	0.27	5.0	25 %
19	0.3075	4.4	0.235	4.0	09 %
20	0.5	10.1	0.49	11.8	17 %
21	0.3	4.2	0.289	5.6	33 %
22	0.355	5.8	0.345	7.3	26 %
23	0.3	4.2	0.29	5.7	36 %
24	0.35	5.6	0.3	6.0	07 %
25	0.3525	5.7	0.32	6.6	16 %
26	0.38	6.6	0.35	7.5	14 %
27	0.315	4.6	0.285	5.5	19 %
28	0.3038	4.3	0.285	5.5	28 %
29	0.315	4.6	0.275	5.2	13 %
30	0.3	4.2	0.28	5.4	29 %
31	0.3173	4.7	0.295	5.8	23 %
32	0.315	4.6	0.22	3.5	24 %
33	0.3195	4.8	0.215	3.4	29 %
34	0.315	4.6	0.28	5.4	17 %
35	0.306	4.4	0.355	7.6	74 %
36	0.3075	4.4	0.3325	5.4	23 %
37	0.2895	3.9	0.3	6.0	54 %
38	0.3075	4.4	0.28	5.4	23 %
39	0.33375	5.2	0.27	5.0	04 %

C.O.S.Q.C

40	0.3623	6.0	0.3	6.0	0 %
41	0.315	4.6	0.25	4.4	05 %
42	0.315	4.6	0.28	5.4	17 %
43	0.4125	7.5	0.36	7.8	04 %
44	0.3938	7.0	0.3425	7.3	04 %
45	0.41625	7.6	0.32	6.6	13 %
46	0.325	5.0	0.302	6.0	20 %
47	0.425	7.9	0.38	8.4	06 %
48	0.32	4.8	0.235	4.0	17 %
49	0.3325	5.2	0.34	7.2	39 %
50	0.323	4.9	0.276	5.2	06 %
51	0.328	5.0	0.282	5.4	08 %
52	0.326	5.0	0.26	4.7	06 %
53	0.4	7.2	0.39	8.7	21 %
54	0.4	7.2	0.35	7.5	04 %
55	0.4125	7.5	0.33	6.9	08 %
56	0.4313	8.1	0.38	8.4	04 %
57	0.5175	10.6	0.44	10.2	04 %
58	0.6055	13.2	0.52	12.7	04 %
59	0.495	10.0	0.49	11.8	18 %
60	0.56	11.9	0.51	12.4	04 %
61	1.057	27.0	1.05	28.9	07 %
62	0.616	13.5	0.53	13.0	04 %
63	0.6	13.1	0.585	14.7	12 %
64	0.4	7.2	0.345	7.3	01 %
65	0.402	7.2	0.36	7.8	08 %
66	0.39	6.9	0.305	6.1	12 %
67	0.35	5.7	0.297	5.9	03 %
68	0.4074	7.4	0.36	7.8	05 %
69	0.41	7.4	0.344	7.3	01 %
70	0.37	6.3	0.321	6.6	05 %
71	0.385	6.7	0.339	7.2	07 %
72	0.3315	5.1	0.285	5.5	07 %
73	0.4116	7.5	0.39	8.7	16 %
74	0.351	5.7	0.309	6.2	08 %
75	0.392	6.9	0.345	7.3	06 %
76	0.351	5.7	0.28	5.4	05 %
77	0.285	3.7	0.255	4.6	24 %
78	0.354	5.8	0.283	5.4	07 %
79	0.32	4.8	0.267	5.0	04 %
80	0.378	6.5	0.355	7.6	17 %
81	0.364	6.1	0.32	6.6	08 %
82	0.4675	9.1	0.418	9.6	05 %
83	0.3535	5.8	0.3	6.0	03 %
84	0.35	5.7	0.27	5.0	13 %
85	0.41	7.4	0.3325	7.0	05 %
86	0.299	4.2	0.265	4.9	16 %
87	0.3616	6.0	0.306	6.1	02 %
88	0.33	5.1	0.286	5.5	08 %
89	0.4025	7.2	0.32	7.5	04 %
90	0.3833	6.7	0.35	7.5	12 %
91	0.3375	5.3	0.28	5.4	02 %
92	0.385	6.7	0.325	6.7	0 %

جمهورية العراق
وزارة التخطيط والتعاون الانمائي
الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
C.O.S.Q.C
Industrial Property Division
قسم الملكية الصناعية

93	0.3645	6.1	0.33	6.9	13 %
94	0.345	5.5	0.28	5.4	02 %
95	0.39	6.9	0.235	6.7	03 %
96	0.343	5.5	0.294	5.8	05 %
97	0.315	4.6	0.26	4.7	02 %
98	0.412	7.5	0.365	7.9	05 %
99	0.4025	7.2	0.345	7.3	01 %
100	0.4	7.4	0.36	7.8	05 %
101	0.408	7.4	0.36	7.8	5 %
102	0.2642	3.1	0.2642	3.5	13 %
103	0.2874	3.8	0.2719	3.7	03 %
104	0.3484	5.6	0.3397	6.0	07 %
105	0.3170	4.7	0.3077	4.9	04 %
106	0.3085	4.4	0.2816	4.0	09 %
107	0.4418	8.4	0.4130	8.5	01 %
108	0.4209	7.8	0.4033	8.2	05 %
109	0.3256	4.9	0.3022	4.7	04 %
110	0.3108	4.5	0.2723	3.7	17 %
111	0.3122	4.5	0.2769	3.9	13 %
112	0.3169	4.7	0.2655	3.5	26 %
113	0.3132	4.6	0.3	4.7	02 %
114	0.3098	4.5	0.3111	5.0	11 %
115	0.3275	5.0	0.3504	6.4	28 %
116	0.2977	4.0	0.2523	3.1	23 %
117	0.2446	2.6	0.2452	2.8	07 %
118	0.2701	3.3	0.2757	3.8	15 %
119	0.4007	7.2	0.3642	6.8	06 %
120	0.3017	4.2	0.2988	4.6	09 %
121	0.3778	6.5	0.3415	6.1	06 %
122	0.3510	5.7	0.3195	5.3	08 %
123	0.3735	6.4	0.3503	6.4	0 %
124	0.6736	15.3	0.6229	15.6	02 %
125	0.3536	5.8	0.3152	5.2	10 %
126	0.3310	5.1	0.2953	4.5	12 %
127	0.3569	5.9	0.3523	6.4	08 %
128	0.3689	6.2	0.3605	6.7	08 %
129	0.4211	7.8	0.4376	9.3	19 %
130	0.5402	11.3	0.5112	11.8	04 %
131	0.3	4.8	0.3252	5.5	15 %
132	0.3695	6.2	0.3266	5.6	10 %
133	0.3491	5.6	0.3431	6.1	08 %
134	0.3330	5.2	0.3083	5.0	04 %
135	0.3413	5.4	0.3230	5.5	02 %
136	0.3392	5.4	0.3575	6.6	22 %
137	0.3378	5.3	0.3479	6.3	19 %
138	0.4882	9.8	0.4786	10.7	09 %
139	0.5390	11.3	0.4905	11.1	02 %
140	0.3474	5.6	0.2871	4.2	25 %
141	0.3469	5.6	0.2969	4.6	17 %
142	0.3469	5.6	0.3082	5.0	11 %
143	0.3716	6.3	0.3552	6.5	03 %
144	0.3577	5.9	0.3344	5.8	02 %
145	0.3753	6.4	0.3859	7.6	19 %

C.O.S.Q.C

146	0.3665	6.2	0.3753	7.2	16 %
147	0.3671	6.2	0.3517	6.4	03 %
148	0.3746	6.4	0.3096	5.0	22 %
149	0.3607	6.0	0.3210	5.4	10 %

المصادر

1. **الغـــراوي، حنـــان ياســـين، (2001).** إســتخلاص وتنقيــة وتوصــيف اليــوريز مــن بعــض البــذور المحليــة. رســالة ماجســتير، علــوم الحيــاة/ التقنيــة الحياتيــة، كليــة التربيــة (إبــن الهيــثم)، جامعــة بغــداد: 82 ص.
2. **Tokunaga, Y., Shirahase, H., Yamamoto, E., Gouda, Y., Kanaji, K. & Ohsumi, K. (1998).** Semi Quantitative Evaluation for diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in relation to Histological Changes. Am. J. Gastroenterol., 93 (1): 26 – 29
3. **Mobley, H.L.T. (1992).** Ureases, Microbial, Encyclopedia of Gastroentrology. Suppl., 187:39– 46.
4. **Phillips, A., Pretorius, G.H. & Du – Toit, P.J. (1991).** A Survey of Yeast Urease and Characterization of Partially Purified *Rhodosporidium paludigenum* Urease. FEMS. Microbiol. Lett., 63 (1): 21 – 25
5. **Creaser, E.H. and Porter, R.L. (1985).** The Purification of Urease from *Aspergillus* **nidulans**. J. Biochem., 17: 1339 – 1341.
6. **Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1984).** Jack bean Urease: The First Nickel Enzyme. J. Mol. Catalysis., 23: 263 – 292.
7. **Smith, P.T., King, A.D. Jr. and Goodman, N. (1993).** Isolation and Characterization of Urease from *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol., 139: 957 – 962.
8. **Das, N., Kayastha, A. and Malhotra, O. (1998).** Immobilization of Urease from **Pigeonpeae** (*Cajanus cajan*). In: Polyacrylamide Gels and Calcium alginate beeds. Biotechnol. Appl. Biochem., 27: 25 – 29.
9. **Blanchard, A., Razin, S., Kenny, G. and Bariley, M. (1988).** Characteritcs of *Ureaplasma urealyticum*. Urease. J. Bacteriol., 170 (6): 2692 – 2697.
10. **Mobley, H.L.T. and Hasinger, R.P. (1989).** Microbial Urease: Significance Regulation and Molecular Characterization. Microbiol. Rev. March: 85 – 108.
11. **Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hausinger, R.P. (1995).** Molecular Biology of Microbial Ureases. Microbiol. Rev., 59 (3): 451 – 480.
12. **Chen, Yi – Ywan, Weaver, M., Cheryl A., Mendelsohn, D.R. and Burne, R.A. (1998).** Transcriptional Regulation of the *Streptococcus salivarius* Urease Operon. J. Bacteriol., 180 (21): 5769 – 5775.
13. **الشـكرجي، فريـال حيـاوي محمـد (2004).** إسـتخلاص وتنقيـة وتوصـيف أنـزيم اليـوريز مـن نـوى تمر الزهدي *Phoenix datctylifera*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
14. **الأميـر، لينـه عبـد الكـريم عبـد الـرزاق (1998).** دراسـة جزيئيـة لعوامـل الضـراوة فـي بكتيريـا *Pseudomonas aeruginosa*. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد.

15. **Blackshear, J. P. (1984).** Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. In: Methods in Enzymology." (eds. W.B. Jakoby) Vol.104.pp:237-256 Academic press. New York.
16. **Valery, H. (2001).** Non Protein Nitrogen. In: Practical Clinical Biochemistry. P.: 456 – 470. Academic Press. New York.