وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
كلية اليرموك الجامعة
قسم التحليلات المرضية

تحضير عدة قياس اليوريا
بالطريقة الانظيمية

د.عبدالرزاق جبارعبد الحسين
أستاذ مساعد
كلية اليرموك الجامعة
قسم التحليلات المرضية

د.راشد جدي عبدالله
أختصاص الكيمياء السريرية
مدرس
كلية الطب جامعة واسط

الخلاصـــة

تم استخدام بذور محلية وذلك للحصول على انظيم اليورياز وقد اجريت عليها طرائق

الاستخلاص المختلفة وذلك بتنظيف وازالة القشور والطحن والنخل لهذه البذور ومن ثم تم انتزاع الزيت

من المسحوق باستخدام احد المذيبات بطريقة الغمر المتحرك بدرجة حرارة 21-25م ولمدة

15 دقيقة وبعد اجراء عملية التنبيذ المبرد امكن الحصول على انظيم اليورياز الخام على هيئة مسحوق جاف.

اظهرت نتائج الفحص المختبري بانه يمكن استخدام كمية قليلة تتراوح بين 20-30 ملغم من مسحوق

الانظيم الخام لكل اختبار في قياس يوريا الدم كما امكن الحصول على (54) غم من الانظيم الخام من كل

(100) غم من البذور المستخدمة

كما تم تحضير عدة لقياس يوريا الدم محورة عن شركة بريطانية

BDH Limited poole BH124NN England تحوي على هذا الانظيم المحضر محليا وعلى

مرسبات البروتين ويمكن تصميم هذه العدة لاجراء 50-100 اختبار

المقدمـــة

انظيم اليورياز هو من الانظيمات المحللة Hydrolytic حيث يعمل على تحلل اليوريا الى امونيا وثاني اوكسيد الكاربون (Sood , 1987) .وان عمية تحلل اليوريا بفعل هذا الانظيم تتم بدرجة حرارة 37م واس هيدروجيني 6.4-6.9 (White et at , 1978)

يستخدم هذا الانظيم في قياس يوريا الدم في الحالات المرضية والسوية ولقد اجريت محاولات متعددة من قبل الباحثين لغرض استخلاص هذا الانظيم وقد توجت هذه المحاولات بنجاح (1926) ، SUMNER في استخلاص انظيم اليورياز لاول مرة على شكل بلورات من بذور الفاصوليا Jakbeans وكذلك دراسة التي قام بها (1941) Dounce والتي تمكن من الحصول على بلورات نقية لهذا الانظيم من البلورات الخام المحضرة من بذور الفاصوليا . كما وجد (1962) ,Segal et at بان حبوب البطيخ الاحمر(الرقي) تحتوي ايضا على هذا الانظيم ان العراق يعتمد اعتمادا كليا على استيراد انظيم اليورياز المستخدم في قياس يوريا الدم بالطريقة الانظيمية والمستخلص من قبل الشركات من الفاصوليا حيث ان الحاجة ملحة وكبيرة عليه من قبل كافة مختبرات التحليلات المرضية وفي دراستنا هذه نقوم باستخلاص هذا الانظيم من بذورتزرع محليا لكونها من المحاصيل المتوفرة والتي نجحت زراعتها في القطر وكذلك ايجاد عدة جديدة محورة لعملية قياس اليوريا في الدم .

ومن هنا تأتي اهمية هذا المشروع من الناحية التطبيقية حيث انه سوف يمكننا من تحضير عدة قياس يوريا الدم بالطريقة الانظيمية محليا دون الاعتماد على استيراد الانظيم وهو المادة المهمة في هذا الاختبار .

المـــــواد وطرائق العمل

اولا :- تحضير الانظيم الخام

تم الحصول على بذور تنتج محليا وقد اجري عليها عملية استخلاص انظيم اليورياز

وحسب طريقة الباحث عبد الحسين وجماعته (1996) وباتباع الخطوات التالية :-

اولا :-

1 - تنظيف البذور من الشوائب والمواد الغريبة

2 - تنقع البذور بالماء لمدة 15 دقيقة لغرض التخلص من القشور

3 - تجفيف البذور المزالة منها القشور بدرجة حرارة 25م لمدة 24 ساعة

4 - تم تكسير البذور باستخدام هاون حديدي ثم طحنت باستخدام مطحنة كهربائية حيث اجريت عملية

الطحن بشكل متقطع لغرض عدم رفع درجة حرارة النموذج المطحون لانه من المعروف بان

الانظيمات بشكل عام تتلف عند تعرضها لدرجات الحرارة العالية

5 - تم نخل النموذج المطحون باستخدام منخل قطر فتحاته 425 مايكرون وذلك للحصول على الحبيبات الناعمة

6 - تم التخلص من الزيت في مسحوق باستخدام احد المذيبات بواقع اربعة اجزاء اسيتون الى

جزء واحد مسحوق وقد كان الاستخلاص بطريقة الغمر المتحرك حيث استخدم لهذا الغرض جهاز

الخلاط المغناطيسي وتمت هذه العملية بدرجة حرارة المختبر التي كانت تتراوح بين 21-25م ولمدة 15 دقيقة.

ثم تم فصل الراسب عن الزيت الذائب بطريقة الطرد المركزي المبرد بعدها تم تجفيت الراسب الحاوي

على الانظيم لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 21-25م

7 - بعد جفاف الراسب عند فصل الزيت منه تم طحنه في الهاون الزجاجي لغرض تنعيمه بعدها ثم حفظ هذا المسحوق في قناني صغيرة ذات اغطية محكمة وحفظه في مكان بارد وجاف لحين الاستخدام حيث استخدم هذا المسحوق كانظيم خام في اجراء التحليل الخاص لتقدير يوريا الدم بالطريقة الانظيمية

8 - لغرض تقدير فاعلية هذا الانظيم في قياس يوريا الدم فقد استخدمت طريقة نسلر Nessler وحسب (محمد فتحي وفؤاد وهبي ،1986) في قياس يوريا الدم لاشخاص اسوياء ومرضى وقد استخدمت اوزان تصاعدية من هذا المسحوق الحاوي على الانظيم بشكله الخام حيث كانت 10 ,20 ،30 ،40 ،50 ،60 ،70 ملغم وتم تكرار التحليل بواقع 100 مرة للوزن الواحد ولغرض المقارنة فقد استخدمت نفس هذه الاوزان التصاعدية لانظيم اليورياز المستورد

9- تم استخدام جهاز High pressure liquid chromatographs (HPLC%) لمعرفة شكل وترتيب الببتيدات البروتينية في كلا الانظيمين المحضرمحليا والمستوردة Tones et al(1981)

10-تم التقاط صور للبلورات في الانظيم الخام المحضر محليا وكذلك المستورد وذلك باستخدام المجهر الضوئي ذو قوة التكبير 500%

ثانيا :- تحضير عدة قياس ليوريا الدم بطريقة محورة عن شركة بريطانيا وهي

BDH Limited poole BH124NN Egland وباتباع الخطوات التالية :-

1 - ضع في انبوبة اختبار نظيفة (4.3) مل ماء مقطر او محلول اسوي التوتر

2 - اضف الى نفس الانبوبة 0.1 مل من المصل المراد فحصه

3 - اضف كذلك الى الانبوبة نفسها كمية قليلة من انظيم اليورياز المحلي المحضر من البذور المحلية

4 - احضن في حمام مائي بدرجة 37م لمدة 20 دقيقة

5 - اضف 0.3 مل 10% محلول تنكستات الصوديوم ورج الانبوبة جيدا ثم اضف N 2/3 حامض

الكبريتيك ورج الانبوبة مرة اخرى واترك الانبوبة لمدة 15 دقيقة لترسب البروتينات ثم انبذ بجهاز

المنبذة لمدة 10 دقائق عند 3000 لفة / دقيقة

6 - انقل الى انبوبة اختبار نظيفة 1 مل من المحلول العلوي الرائق واضف اليه 1.5 مل ماء مقطر ثم

اضف 0.5 مل من كاشف نسلر وأقرء حالا في جهاز المطياف الضوئي Spectro photometer

عند الموجة 450 نانوميتر

النتائج والمناقشـــــة

تناول هذا البحث واحدا من المواضيع العلمية والاقتصادية المهمة وهو عملية استخلاص انظيم

اليورياز من احد البذور التي تزرع محليا والتي نجحت زراعتها على نطاق واسع في القطر وكذلك ايجاد عدة

kit كاملة لقياس يوريا الدم حيث يشكل هذا الانظيم الجزء المهم فيها حيث تعاني المختبرات دائما

من النقص الحاد لهذا الانظيم

فقد اظهرت نتائج هذا البحث بانه يمكن الحصول على (54) غم من الانظيم الخام من كل (100)

من البذور المستخدمة حيث تستخدم كميات قليلة في الاختبار تقدر ب 20-30 ملغم وهذه عملية

اقتصادية من الناحية التطبيقية

ان استخدام الانظيم على هيئة مسحوق خام يكفي لانجاز الاختبار بصورة تامة وان وجود المواد

الاخرى مع المسحوق مثل المواد الكاربوهيدراتية لاتؤثر على سير الاختبار

لقد تبين من خلال التحليل الكروماتوغرافي لمسحوق الانظيم المحضر من بذور فول الصويا بانه

يتشابه تقريبا في شكل وترتيب السلاسل الببتيدية مع الانظيم المستورد وهذا يشير الى وجود

الانظيم بصورة بصورة كافية في المسحوق الخام والتي تكفي لانجاز الاختبار كما في الشكل (1,2)

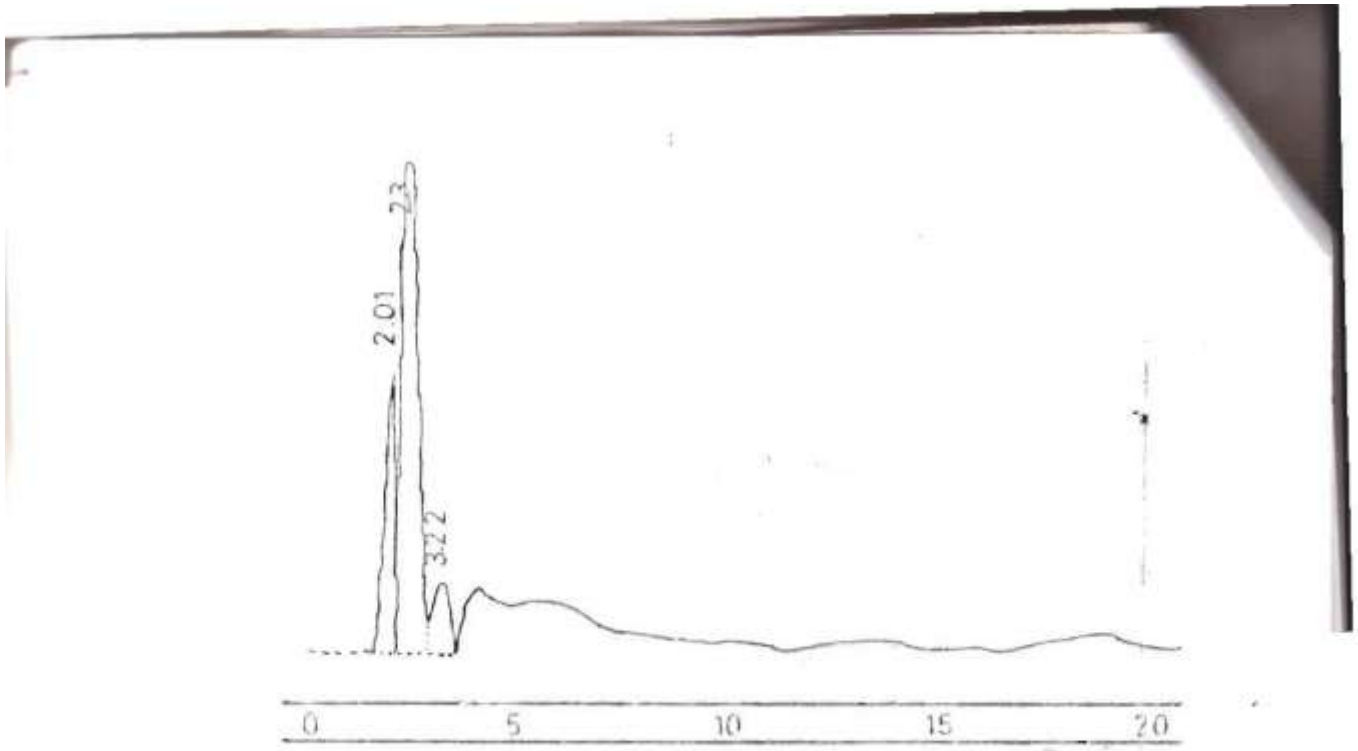
وتوضع الصور المرقمة (1,2) توزيع بلورات الانظيم في المسحوق الخام المحضر من بذور فول

الصويا مع مسحوق الانظيم المستورد مؤشر فيها وجود الانظيم في المسحوق المحضر بهذه

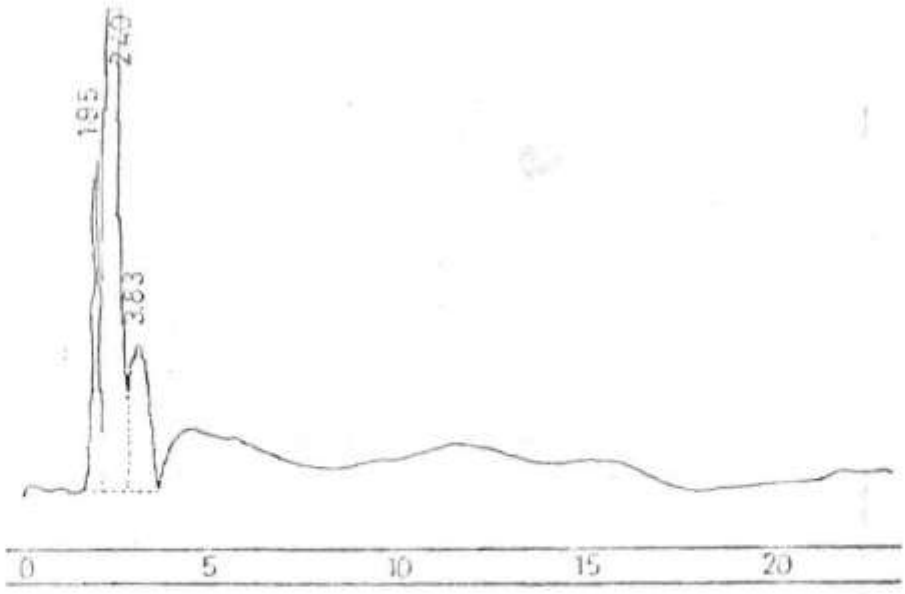
الطريقة بكمية كافية

أن تحضير عدة للاختبار تحتوي على انظيم اليورياز ومرسبات البروتين كانت ناجحة مختبريا

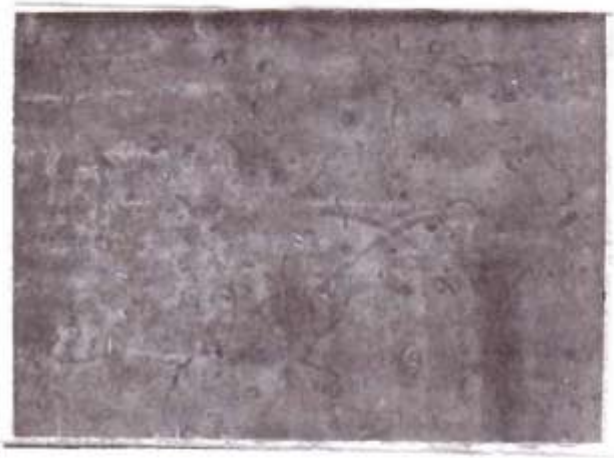
حيث يمكن استخدام عدة تكفي لانجاز 50 او 100 اختبار



شكل ١ . شكل وترتيب السلاسل البيتيدية في مستخلص الأنظيم الخام المصنع محليا .
باستخدام جهاز (HPLC)



شكل ٢ . شكل وترتيب السلاسل البيتيدية في مستخلص الأنظيم المستورد .
باستخدام جهاز (HPLC)



صورة رقم (٢٠) توزيع بلورات اسبوريار في المسحوق الجاف
المحضر محليا من بذور فول الصويا (X500)

صورة رقم (٢١) توضح توزيع بلورات اسبوريار في المسحوق المستورد
والمحضر من بذور الماهونيا (X500)

الاستنتـــاج

1 - ان النتيجة التي تم الحصول عليها من هذا البحث هي امكانية استخلاص انظيم اليورياز من احد البذور المحلية وبطريقة اقتصادية واستخدام هذا الانظيم ضمن عدة لقياس يوريا الدم

2 - ايجاد عدة بسيطة لقياس يوريا الدم يدخل في محتوياتها انظيم اليورياز المحضر محليا وقد تم تقييم مواصفات هذه العدة من حيث الدقة والضبط والاستقرارية من قبل السيطرة النوعية حيث اثبت صلاحيتها للاستخدام المختبري

3 - نوصي بتصنيع هذه العدة محليا وبعبوات تكفي الى 50-100 اختبار

4 - تم استخدام هذه العدة والانظيم في جميع مختبرات التحليلات المرضية في محافظة واسط وبنجاح

REFERENCES

1- DOUNCE . A . L . (1941) . Animproved Method for Recrystalizing Ureas J . Biol . Chem ., 140 , 307

2- Tones ,B . N . ;PAABO , S . and STOIN , S . (1981) . Amino acid analysis And enzymatic sequences determention of poptides by animproved_O_phth Aldia dehyde prevoiumn lebeling . J . lip . Chromatogr . 4:565_565

3- SEEGAL , P . P . , Tanis , R . J . and Nylor , A . W . (1965) . Alow Molacular weight from of urease . Biochem . Biochem . Biophys . Res . Comm . , 20 , 250

4- SOOD , R . (1987) . BloodUreaNitrogen , Medical laboratory Technology Technology (Methods and interpretations) , 2nd , ed . , pp . 258

5- Sumner , J . B . (1926) . J . Biol . Chem . 69 : 435

6- White , A . ; HANDLER , P . ; SMITH , B . L . ; HILL . R . L . and LOHAN , I . R . (1978) . Urease . principle of Biochemistry . Eo . Jeffer . J . D . andmacrow , McCraw , HILL , INC . Newyork , pp . 79 , 214 , 780 .

7- WOLF , W . J . and COMAR , J . C . (1975) . Soybeans as food source , R . ED . Puplished by CRC press Inc , cleve land chio , U . S . A .

المصادر العربيـــــة

1 -محمد فتحي الهواري وفؤاد وهبي ،1986 ، الكيمياء السريرية العملي
الطبعة الثانية مؤسسة المعاهد الفنية ، مطبعة عشتار ، بغداد
2 -رزق وتوكل يونس وحكمت عبد علي ،1981 ، المحاصيل الزيتية والسكرية
، كلية الزراعة والغابات ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل
، العراق
3 - عبد الرزاق جبار عبد الحسين وهيثم لطفي وسمير محسن بدن وراشد جدي عبد الله

امكانية استخلاص انظيم اليورياز من بذور فول الصويا لغرض استخدامه في قياس يوريا الدم بحث مقبول للنشر في مجلة البحوث التقنية .

موصـــفات مـــادة البحـــث

لتعيين اليوريا في الدم تم استخلاص انظيم اليورياز الخام محليا من البذور المحلية على هيئة

مسحوق حيث يستخدم كميات قليلة منه مقدار 20-30 ملغم لكل اختبار تم تعبئتها في عبوات تكفي

ل 100 اختبار حيث تحوي العبوة على 300 ملغم .

1- انظيم اليورياز	3غم
2- 10% تنكستات الصوديوم	30 مل
3- حامض الكبريتيك عيارية	3/2 30 مل

متطلبــات تحويل البحث الى مشروع انتاجي

1 -المواد المطلوبـــــــة

1 - بذورتزرع محليا

2 - مادة مذيبة

3 - حامض الكبريتيك

4 - تنكستات الصوديوم

2 -الاجهزة المطلوبـــــــة

1 - مطحنه كهربائية مع هاون

2 - جهاز منبذة

3 - ثلاجة

4 - جهاز المطياف الضوئي

5 - عبوات تصميم لوضع العدة فيها