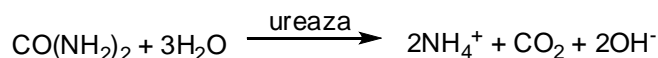


Oznaczanie mocznika w płynach ustrojowych metodą hydrolizy enzymatycznej

Wprowadzenie:

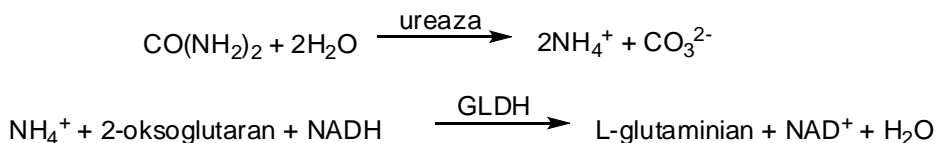
Większość lądowych organizmów kręgowych część jonów amonowych NH_4^+ , produktu rozpadu białek, wykorzystuje w biosyntezie związków azotowych. Nadmiar wydalany jest w postaci mocznika, produkowanego w wątrobie w cyklu mocznikowym. Zawartość mocznika we krwi wyraża się często jako azot mocznikowy krwi - BUN (Blood Urea Nitrogen). W warunkach fizjologicznych stanowi on 50% azotu niebiałkowego. Zawartość mocznika kształtuje się na poziomie 15-40 mg/100ml (2.49-6.64 mmol/l). Podwyższony poziom tego składnika krwi towarzyszy najczęściej chorobom nerek. Może być również rezultatem odwodnienia, diety wysokobiałkowej, nadmiernego ketabolizmu białek w ustroju. Powodem obniżonego stężenia mocznika we krwi może być dieta niskobiałkowa lub głodzenie, nadmierne nawodnienie, a także uszkodzenie wątroby.

Metody enzymatyczne, katalizowane przez ureazę, opierają się na pomiarze stężenia produktów reakcji hydrolizy mocznika zgodnie z równaniem:



Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości mocznika w płynach ustrojowych kinetyczną metodą enzymatyczną, z ureazą i dehydrogenazą glutaminianową.



Ureaza katalizuje hydrolizę mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Amoniak z 2-oksoglutaranem w obecności formy zredukowanej dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) pod wpływem dehydrogenazy glutaminianowej

przekształca się w L-glutaminian. W metodzie tej diagnostycznej jest pasmo przy długości fali 340 nm, pochodzące od NADH. W trakcie ćwiczenia obserwujemy zmniejszenie intensywności tego pasma, związane ze zmianą maksimum absorpcji światła formy utlenionej koenzymu. Obserwowana zmiana jest wprost proporcjonalna do zawartości mocznika w badanej próbce.

Sprzęt i materiały:

- Roztwór wzorcowy mocznika o stężeniu 7,13 mmol/l (42,8mg/dl) 3-STANDARD,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia mocznika *Lquick Cor-UREA* składa się z dwóch oddzielnych odczynników 1-UREA i 2-UREA. Skład i stężenie składników w odczynniku roboczym :
 - Bufor Tris (pH 7.8) 96 mmol/l
 - ADP 0,6 mmol/l
 - Ureaza 266,7 μ kat/l
 - GLDH 16 μ kat/l
 - NADH 0,25 mmol/l
 - 2-Oksoglutaran 9 mmol/l
- 7 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 μ l) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wyrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr CECIL 2501.

Ostrzeżenia i uwagi:

Odczynniki są konserwowane azotkiem sodu (0,09%). Unikać kontaktu odczynnika ze skórą i błonami śluzowymi.

Wykonanie ćwiczenia:

Próba Składnik próbki	Odczynnikowa (PO)	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
1-UREA	1 ml	1 ml	1 ml
Ogrzać do 25-30°C. Następnie dodać:			
Roztwór wzorcowy	---	10 µl	---
Roztwór badany	---	---	10 µl
Dokładnie wymieszać, inkubować ok. 5 min. Następnie dodać:			
2-UREA	250 µl	250 µl	250 µl
Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Po upływie ok. 1 min. odczytać absorbancję A1 próby wzorcowej i badanej względem próby odczynnikowej przy długości fali 340 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki, dokładnie po 1 min. zmierzyć absorbancję A2 próby wzorcowej i badanej względem próby odczynnikowej.			

1. Próba odczynnikowa: do próbki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UREA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25-30°C. Następnie dodać 250 µl odczynnika do oznaczeń 2-UREA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiary absorbancji A1 i A2 próby wzorcowej i badanej względem próby odczynnikowej przy długości fali 340 nm.
2. Próba wzorcowa: do próbki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UREA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25-30°C. Następnie dodać 10 µl roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i inkubować ok. 5 min. Następnie dodać 250 µl odczynnika do oznaczeń 2-UREA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Po upływie ok. 1 min. od dodania odczynnika odczytać absorbancję A1 próby wzorcowej względem próby odczynnikowej przy długości fali 340 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki,

- dokładnie po 1 min. zmierzyć absorbancję A2 próby wzorcowej względem próby odczynnikowej. Obliczyć $\Delta A/\text{min}$. ($A1 - A2$). Pomiar wykonać trzykrotnie.
3. Próba badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń 1-UREA. Ogrzać do temperatury oznaczenia 25-30°C. Następnie dodać 10 μl roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i inkubować ok. 5 min. Następnie dodać 250 μl odczynnika do oznaczeń 2-UREA. Dokładnie wymieszać i przenieść 800 μl roztworu do kuwetki. Po upływie ok. 1 min. od dodania odczynnika odczytać absorbancję A1 próby badanej względem próby odczynnikowej przy długości fali 340 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki, dokładnie po 1 min. zmierzyć absorbancję A2 próby badanej względem próby odczynnikowej. Obliczyć $\Delta A/\text{min}$. ($A1 - A2$). Pomiar wykonać trzykrotnie.

Opracowanie wyników:

- Obliczyć $\Delta A = A1 - A2$ dla obydwu prób;
- Obliczyć stężenie mocznika w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie mocznika} = \Delta A(\text{PB}) / \Delta A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

1 mg mocznika odpowiada 0,467 mg azotu mocznikowego (BUN)

WARTOŚCI PRAWDIŁOWE

Surowica, osocze	<50mg/dl (<8,3 mmol/l)
Mocz: zbiórka dobową	20-35 g/24h (300-550 mmol/24h)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość mocznika w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. mocznik (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi mocznika w organizmie, kolorymetryczne i enzymatyczne metody oznaczania mocznika we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.