------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 2، ص79-91، 2006 ------

عزل ودراسة خواص أنزيم اليوريز من بذور نبات الباقلاء المحلي (*Vicia faba L.*)

طارق يونس احمد **ليلاس فرحان بديوي**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/5/4 ، تاريخ القبول 2005/11/21)

الملخص

تضمن البحث عزل أنزيم اليوريز من بذور نبات الباقلاء المحلي (*Vicia faba L.*) باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة، حيث تبين من تقنية الترشيح الهلامي احتواء محلول الراسـب البروتينـي النـاتج مـن الترسيب بالأسيتون بعد أن اجري له معاملة حرارية وترسيبه بالحامض على ثلاث حزم بروتينية، وتبـين أن الحزمتين الأولى والثانية تمتلكان فعالية متباينة لأنزيم اليوريز، وفي الوقت الذي تمتلك الحزمة الأولـى فعالية نوعية منخفضة لأنزيم اليوريز فان الحزمة الثانية تمتلك فعالية نوعية عالية لأنزيم اليوريز وبنقـاوة بلغت (40.1) مرة.

فضلا عن ذلك تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم اليوريز المنقى جزئيـا باسـتخدام تقنيـة الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية وكان بمدى (8000 ± 480000) و(5000 ± 460000) دالتون على التوالي.

بعد ذلك حددت الظروف المثلى لعمل الأنزيم المعزول، وبينت النتائج أن الأنزيم يعمل في المحلـول المنظم (sodium phosphate buffer) عند تركيز امثل (50) ملي مولار واس هيدروجيني امثـل (8.3) ودرجة حرارة مثلى 50 درجة مئوية وتركيز (5) ملي مولار للمادة الأساس اليوريا وباسـتخدام رسـم لاينويفر برك وجد أن السرعة القصوى التي يعمل بها الأنزيم تساوي (0.8) وحدة/مليلتر، وان قيمة ثابت ميكيلس – منتن تساوي(6.06) ملي مولار، وأشارت النتائج إلى انخفاض فعالية الأنزيم بصورة تدريجيـة إلى (70%) و (59%) عند خزنه لمدة (30) يوم عند درجة حرارة 4 درجة مئوية ودرجة حرارة الغرفـة على التوالي. كذلك أظهرت المركبات مثيل يوريا وكلوريد النحاس فعلا تثبيطياً لعمل الأنزيم وكان التثبيط من النوع التنافسي.

اخيرا بينت النتائج بعدم وجود فروقات معنوية بين فعالية أنزيم اليوريز المعزول من بذور الباقلاء المحلي وفعالية اليوريز المستخدم في العبوة القياسية (Standard kit) لقياس تركيز اليوريا في دم بعـض الأشخاص الأصحاء والمرضى.

Isolation and Characterization of Urease from Local *Vicia faba L.*

Tareq Y. Ahmad **Laylas F. Bedewia**
Department of chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The research was concerned with the isolation of urease form local *Vica faba* using different biochemical techniques.

It was shown that gel filtration chromatography of the proteinous precipitate which was produced by acetone, heat treatment and acid precipitation gave three proteinous peaks. The first and the second peaks possessed a variable activity of urease where maximum specific activity was obtained in the second peak which showed (40.1) folds of purification.

Furthermore, the comparative molecular weight of the partially purified urease using both sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration chromatography techniques was found to be (460000 ± 5000)and (480000 ± 8000) dalton respectively .

The optimum conditions of urease was obtained using (50 mM) sodium phosphate buffer at pH (8.3) with incubation temperature (50)˚C, incubation time (30) minutes and (5 mM) of urea as a substrate. Using Lineweaver-Burk plot, it was found that V_{max} and K_m had the values of (0.8) unit/ml and (6.06 mM) respectively.

The results were also indicated that the activity of the enzyme decreased gradually to (70%) and (59%) when the enzyme was stored for (30) days at (4)˚C and room temperature respectively. The activity of the enzyme was inhibited by $CuCl_2$ or methyl urea where the inhibition is competitive .

Finally, the results predicted that there was no significant differences between the activity of urease extracted from local *Vicia faba* and the urease used in the standard kit for the determination of urea in blood for normal and patients.

المقدمة

أنزيم اليوريز (E.C. 3.5.1.5) من الأنزيمات المميئة حيث يحلل اليوريا بوجود الماء إلى امونيـا وغاز ثاني اوكسيد الكاربون، وتفاعله العام كما يأتي :

$$H_2N\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}NH_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2NH_3 + CO_2$$

الاسم النظامي له هو (Urea amido hydrolyase) والشائع (Urease)، ومن أهم مصادره النباتات، الفطريات (الأعفان)، البكتريا، الاشنات، الخمائر وهو من نوع البروتينات الفلزية (Metalloproteins) التي يتداخل معها عنصر النيكل (Nickloprotein) (Dixon and Weeb, 1979)، وتم اكتشافه لاول مرة في نبات فول الصويا عام 1909 (Florkin and Howard, 1960) وهو أول أنزيم تم الحصول عليه بصورة بلورية ولقد عزله الباحث Sumner في سنة 1926 من بذور فاصوليا الجاك (Jack beans) (Dixon and Weeb, 1979)، كما قام العديد من الباحثين بعزل الأنزيم من مصادر نباتية أخرى باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة ودراسة الظروف اللازمة لاستخلاصه ومنهم (Pandy and Pandy 1991) حيث عزلوا الأنزيم من بذور نبات البسلة الهندية (*Cajanus cajan*) (Campeanu et al., 1996). كما تم عزل الأنزيم من بذور نبات الرقي (Mohammed et al., 1999) وعزل أيضا من أوراق شجرة التوت (Hirayma et al., 2000)، وقام الباحثان (خفاجي وياسين، 2001) بعزل الأنزيم من بذور نبات القرط المحلي (*Medicago Hispidia*). كما تم عزل الأنزيم من أحياء مجهرية حيث قام الباحثون (Kakimoto et al., 1990) بعزل الأنزيم من بكتريا المكورات السبحية (*Staphlylococcal*) والبكتريا المعوية الملوية البوابية (*Helicobacter pylori*). وأشارت معظم الدراسات السابقة إلى ان الوحدات الثانوية المكونة لأنزيم اليوريز المشتق من المصادر المختلفة تعطي تشابه بنسب مختلفة مما يؤكد ان جميع أنواع هذا الأنزيم مشتق من بروتين سلفي واحد.

تهدف الدراسة الحالية إلى استخدام نبات الباقلاء المحلي مصدراً لعزل أنزيم اليوريز ومقارنة فعالية الأنزيم المستخلص مع فعالية الأنزيم الموجود ضمن العبوة القياسية Standard Kit لقياس تركيز اليوريا في الدم.

المواد المستعملة وطرائق العمل

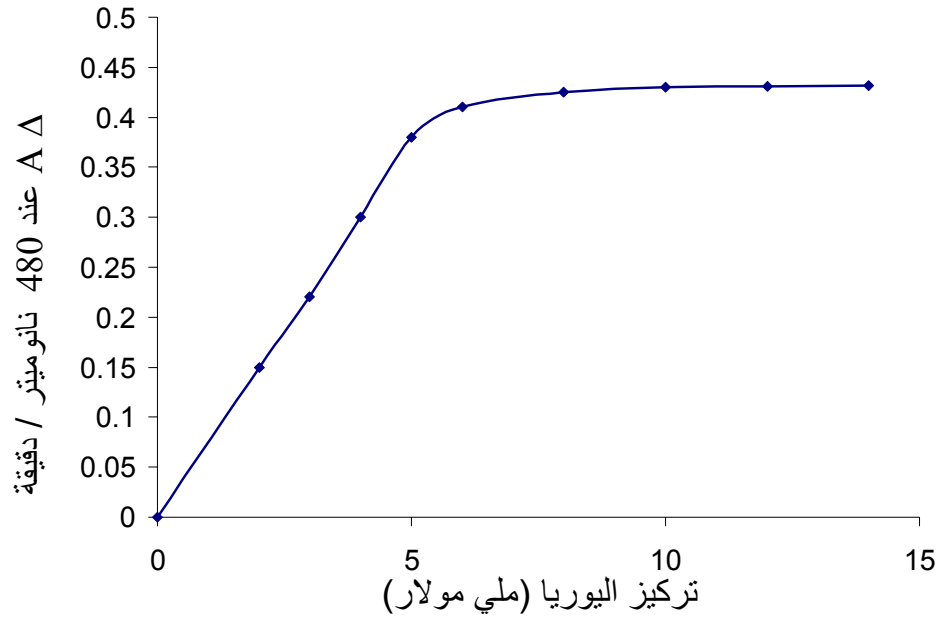
المواد المستعملة :

1- نبات الباقلاء المحلي *Vicia faba* L.

2- عبوة قياسية (Standard Kit) لقياس تركيز اليوريا رقم 61912 من شركة Biomerieux الفرنسية.

تحضير المتجانس المائي للنبات المستخدم :

تم اخذ كمية معينة من بذور نبات الباقلاء المحلي الطرية وبصورة عشوائية، وبعد إزالة القشور تم وزن (750) غرام منها، بعد ذلك قطعت بذور النبات إلى قطع صغيرة، ثم مزجت القطع بالماء المقطر بنسبة (V:W 3:1) ثم سحق المزيج باستخدام آلة الثرم (Blender) لمدة (10) دقائق مع التبريد، وبعد ذلك حرك المزيج بوساطة المحرك الكهربائي لمدة (24) ساعة مع مراعاة التبريد باستخدام حمام



الشكل 8 : تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية انزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي

ثلجي، ثم رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركـزي المبـرد لمدة (15) دقيقة وعند سرعة (9000 xg) وعند (4°م) للتخلص من المواد غير الذائبة بعد ذلك تـم قيـاس فعالية أنزيم اليوريز في المستخلص المائي المحضر حسب طريقة الباحـث (Campeanu et al., 1996) وتم تقدير البروتين حسب طريقة لاوري المحـورة (Schaterle and Pollack, 1973) ثـم تـم توزيـع المستخلص في دوارق بلاستيكية وضعت بعد ذلك في جهاز التجفيد (Lyophilizer) إلى ان تـم تقلـيص الحجم إلى الثلث تقريبا ثم بعد ذلك تم فصل أنزيم اليوريز باستخدام الأسيتون وحسب طريقـة البـاحثون (Sung et al., 1989) .

تجزئة البروتين :

تم استخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الأبعاد (4.25 × 60) الذي يحتوي علـى مادة الهلام من نوع (Ultra gel AcA 22) على ارتفاع (50) سم باستخدام محلـول الفوسـفات المـنظم بتركيز 50 ملي مولار عند أس هيدروجيني 7 كمحلول ذوبان لتجزئة البروتين من الخطوة السابقة.

تقدير الوزن الجزيئي: تم تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم اليوريز باستخدام تقنية الترشيح الهلامـي والـذي استخدم لهذا الغرض نفس عمود الفصل المستخدم في تجزئة البروتين وتم مقارنة حجم استرداد الأنزيم مع حجم استرداد أنزيم اليوريز القياسي وبروتينات معلومة الوزن الجزيئي. واستخدمت كذلك تقنية الهجـرة الكهربائية بطريقة الباحث (Laemmli, 1970) حيث كان تركيز هلام متعـدد الاكريلاميـد 7.5% وتـم

توصيل التيار الكهربائي بمقدار 6 ملي أمبير/أنبوب وتم مقارنة المسافة التي قطعها مع المسافة التي قطعتها مركبات معلومة الوزن الجزيئي.

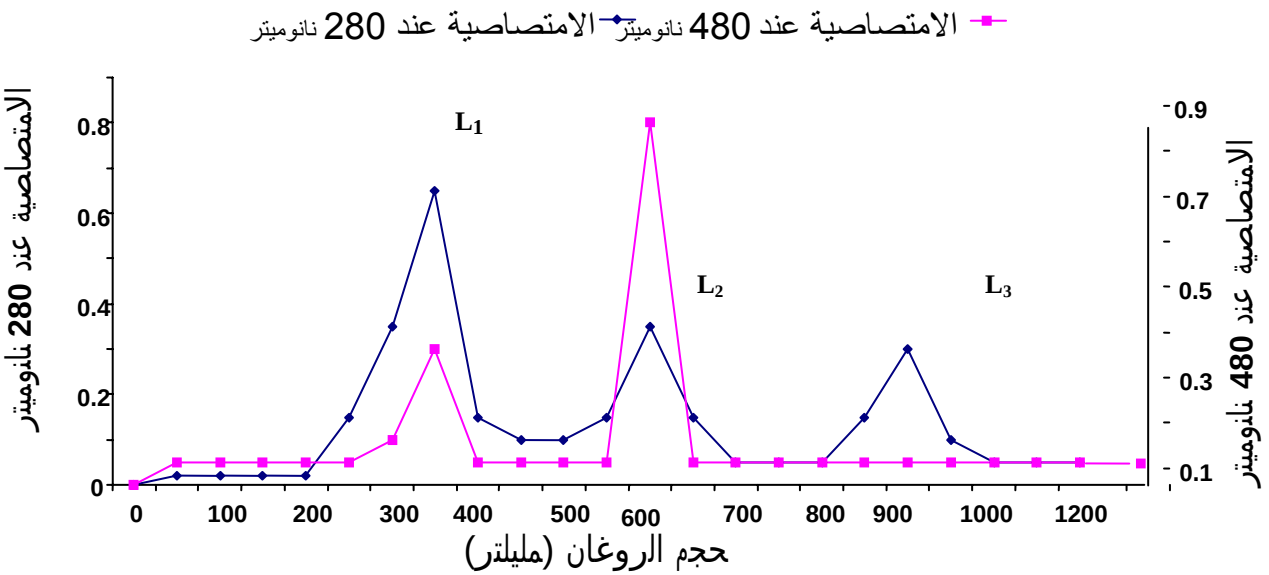
قياس فعالية أنزيم اليوريز:

تم قياس فعالية أنزيم اليوريز حسب طريقة الباحثون (Campeanu et al., 1996) والتي اعتمدت على قياس امتصاص المعقد الناتج من تفاعل الأمونيا مع كاشف نيسلر عند الطول الموجي (480 nm).

النتائج والمناقشة

الترشيح الهلامي:

أظهرت النتائج من تقنية الترشيح الهلامي ظهور ثلاث حزم بروتينية كما موضح في الشكل (1) ومن متابعة فعالية أنزيم اليوريز بعد عملية الفصل تبين ان الحزمة البروتينية الثالثة (L_3) لا تمتلك أي فعالية لأنزيم اليوريز بينما تمتلك الحزمتان البروتينيتان (L_1,L_2) فعالية متباينة لأنزيم اليوريز حيث ان الفعالية النوعية للحزمة البروتينية الثانية (L_2) أعلى بمقدار (12) مرة من الفعالية النوعية للحزمة البروتينية الأولى (L_1)، وبذلك اعتبرت الحزمة البروتينية الثانية هي الحزمة البروتينية الفعالة الرئيسية والممثلة لأنزيم اليوريز في الدراسات اللاحقة حيث تمتلك هذه الحزمة أعلى فعالية لأنزيم اليوريز.



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان المحلول البروتيني الناتج من الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الأبعاد (4.25 × 60) والحاوي على مادة الهلام Ultra Gel AcA 22

يوضح الجدول (1) خلاصة نتائج مراحل تنقية أنزيم اليوريز من نبات الباقلاء المحلي.

الجدول 1 : مراحل تنقية أنزيم اليوريز من نبات الباقلاء المحلي

مراحل الاستخلاص		تركيز البروتين ملغرام / مليلتر	الفعالية الأنزيمية Unit (U)	الفعالية النوعية U / ملغرام بروتيني	عدد مرات التنقية
المتجانس الخام		2.352	94.08	40	1
الرائق		1.88	102.65	56.2	1.4
الترسيب بالأسيتون		1.59	190.8	120	3
المعاملة الحرارية		1.38	317.7	230	5.75
الترسيب بالحامض		2.1	1260	600	15
الترشيح الهلامي	الحزمة الأولى	0.128	17.408	136	3.4
	الحزمة الثانية	0.062	83.308	1604	40.1

U: وحدة الأنزيم : كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول واحد من المادة الناتجة (الأمونيا) /دقيقة/مليلتر.

تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم اليوريز:

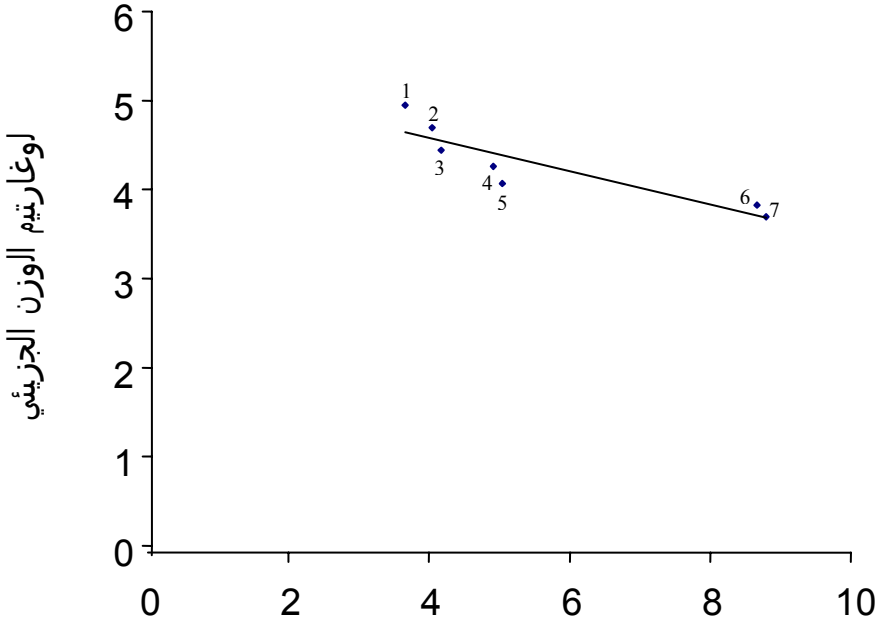
1- باستخدام تقنية الترشيح الهلامي:

تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم اليوريز حسب طريقة الباحث (Andrews, 1965) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي. وتبين ان الوزن الجزيئي لأنزيم اليوريز المستخلص من نبات الباقلاء المحلي كان بمدى(8000 ±480000) دالتون، وهذه النتيجة تتفق مع دراسات سابقة إذ ذكروا ان الوزن الجزيئي لأنزيم اليوريز يقدر بـ (480000) دالتون (Sung et al., 1989; Dixon and Weeb, 1979).

2- تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الهجرة الكهربائية:

تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم اليوريز باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية الحاوية على الـ SDS واستخدم لهذا الغرض أنزيم اليوريز القياسي من الـ (Jack bean) ذو الوزن الجزيئي (480000) دالتون.

أشارت النتائج الموضحة في الشكل (2) ان الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم اليوريز يقع بمدى (5000 ± 460000) دالتون.



الشكل 2 :المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية SDS-PAGE

1 = الحزمة البروتينية الأولى من أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي (L_1)

2 = الحزمة البروتينية الثانية من أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي (L_2)

3 = البومين مصل البقر BSA

4 = البيروكسيديز

5 = الحزمة البروتينية الثالثة من أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي (L_3)

6 = لايزوزايم

7 = تريبسين

تقنية الهجرة الكهربائية بدون استخدام الـ SDS :

تم إجراء هذه التجربة من اجل مقارنة سلوك أنزيم اليوريز القياسي المعزول من فاصوليا الجاك مـع سلوك أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي وتم مقارنة المسافة التي قطعها كلا الأنزيمين واشارت النتائج الموضحة في الجدول (2) ان سلوك الحزمة البروتينية الثانية (L_2) الممثلة لأنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء يشابه سلوك أنزيم اليوريز القياسي، كما أشارت النتائج إلى ظهور حزمة واحدة للأنزيم باستخدام هذه التقنية ، وهذا مطابق لدراسات سابقة .

الجدول 2 :العلاقة بين نوع المادة والمسافة التي قطعتها (سم)

المادة	المسافة التي قطعتها
أنزيم اليوريز القياسي	4 سم
الحزمة البروتينية الأولى L_1	3.5,2.5 سم
الحزمة البروتينية الثانية L_2	4 سم

دراسة بعض العوامل المؤثرة في فعالية أنزيم اليوريز:

تأثير تركيز الأنزيم:

أشارت النتائج (بديوي، 2001) ان سرعة التفاعل الأنزيمي تزداد بازدياد تركيز الأنـزيم ولقـد استخدم تركيز (50) مايكروغرام بتركيز ثابت للأنزيم في جميع التجارب اللاحقة .

تأثير تركيز المحاول المنظم:

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (3) ان أعلى فعالية نوعية لأنزيم كانت عند تركيز (50) ملي مولار لذلك استخدم هذا التركيز كتركيز ثابت للمحاول المنظم في جميع التجارب اللاحقة.

الجدول3 : تأثير التراكيز المختلفة للمحاول المنظم على فعالية النوعية لأنزيم اليوريز المنقى جزئيـاً مـن نبات الباقلاء المحلي.

Sodium phosphate buffer pH(7) ملي مولار	الفعالية النوعية U / ملغرام بروتين
25	1029
50	1103
75	1050
100	1035

تأثير الأس الهيدروجيني للمحاول المنظم:

أشارت النتائج (بديوي، 2001) ان الأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم اليوريز هو (8.3) وهذا مشابه لما تم الحصول عليه من دراسات سابقة إذ أكدت ان الأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم اليوريز هو (8).

تأثير زمن التفاعل :

تبين من النتائج (بديوي، 2001) ان الفترة الزمنية المثلى لاكتمال التفاعل الأنزيمي هي (30) دقيقة وهذا مشابه لما وجده الباحثون (Mohammed et al., 1999)،(Campeanu et al., 1996) فقد ذكر ان الفترة الزمنية المثلى لتفاعل أنزيم اليوريز هي (25) دقيقة.

تأثير درجة الحرارة:

تبين ان الدرجة الحرارية المثلى لعمل الأنزيم هي (50)°م وهذه النتيجة مقاربة لما وجده الباحثون (Kakimoto et al., 1990) إذ ذكروا ان الدرجة الحرارية المثلى لأنزيم اليوريز هي (55)°م في حين ذكر الباحثان (الخفاجي وياسين، 2001) ان الدرجة الحرارية المثلى له هي (45)°م.

تأثير تركيز المادة الأساس:

ان التركيز الأمثل للمادة الأساس لعمل أنزيم اليوريز هو (5) ملي مولار ومن رسم لاينويفر برك (بديوي، 2001) وجد ان قيمة السرعة القصوى V_{max} لأنزيم اليوريز تساوي (0.8) وحدة / مليلتر وقيمة ثابت ميكليس – منتن K_m تساوي (6.06) ملي مولار. ومن ملاحظة الدراسات السابقة تبين ان قيمة K_m تساوي 5.5 ملي مولار لأنزيم اليوريز (Sing, 1995)، أما الباحثون (Khanolkal et al., 2000) فوجدوا ان قيمة K_m لأنزيم اليوريز تساوي 6.2 ملي مولار.

أن القيم المدرجة في الجدول (4) تمثل الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم اليوريز المعزول من نبات الباقلاء المحلي.

الجدول 4 :الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم اليوريز المعزول من نبات الباقلاء المحلي.

تركيز الأنزيم مايكروغرام/مليلتر	زمن التفاعل دقيقة	التركيز والأس الهيدروجيني للمحلول المنظم	*درجة الحرارة درجة مئوية	تركيز مادة الأساس ملي مولار
50	30	50 ملي مولار pH=8.3	50(37.5)	5

*درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم في المختبر (in vitro) تساوي (50) درجة مئوية لكن تم اختيار (37.5) درجة مئوية لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة.

تأثير الخزن على أنزيم اليوريز:

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (5) ان أنزيم اليوريز احتفظ بـ 70 % من فعاليته عند خزنه لمدة 30 يوم في درجة حرارة 4 °م و 59% من فعاليته عند خزنه لمدة 30يوم في درجة حرارة الغرفة 25-30 م .

تأثير بعض المثبطات على فعالية أنزيم اليوريز:

تم دراسة تأثير بعض المركبات مثل كلوريد النحاس ومثيل يوريا على فعالية أنزيم اليوريز كما موضح في الجدولين (7,6) .

كما تم دراسة نوع التثبيط الحاصل عند استخدام مثيل يوريا كما هو موضح في الشكل (3)، وتبين ان التثبيط من النوع التنافسي وهذا يتفق مع دراسات سابقة (Saboury et al., 1997) .

الجدول 5 : تأثير فترات الخزن على فعالية أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي عند درجة حرارة الغرفة (25-30) درجة مئوية ودرجة حرارة (4) درجة مئوية.

فترة الخزن بالأيام	% للفعاليات * ، ** عند درجة 4 مْ	% للفعاليات * ، ** عند درجة حرارة الغرفة (25-30 مْ)
0	100	100
5	96	94
10	90	88
15	87	80
20	82	74
25	75	65
30	70	59

* % للفعالية / تحتسب بالاعتماد على ان فعالية الأنزيم قبل الخزن هي(100%)

** تم قياس فعالية الأنزيم تحت الظروف المثلى الموضحة في الجدول (4)

الجدول 6 :تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد النحاس على فعالية أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي.

تركيز $CuCl_2$ مايكرو مولار	الفعالية النوعية ** ، ***	% للفعالية *
25	1205	95
50	1098	84
100	1002	77
150	870	65
200	790	59

* الفعالية من غير وجود مثبط هي 100% .

** الفعالية النوعية ، مايكرومول من الناتج الامونيا / دقيقة / مليلتر /مليغرام بروتين .

*** تم قياس فعالية الأنزيم تحت الظروف المثلى في الجدول (4)

قياس تركيز اليوريا في الدم :

تم قياس تركيز اليوريا في الدم لنماذج متعددة ، أصحاء ومرضى باستخدام العبوة القياسية المجهزة من شركة Biomerieux الفرنسية ومقارنتها مع أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي وأشارت التحاليل الإحصائية بعدم وجود فروقات معنوية بين فعالية أنزيم اليوريز المعزول من بذور

نبات الباقلاء المحلي وأنزيم اليوريز الموجود ضمن العبوة القياسية كما هو موضح في الجدول (8) وهذا مطابق لما تم الحصول عليه من دراسات سابقة (Mohammed et al., 1999; Sung et al., 1989) .

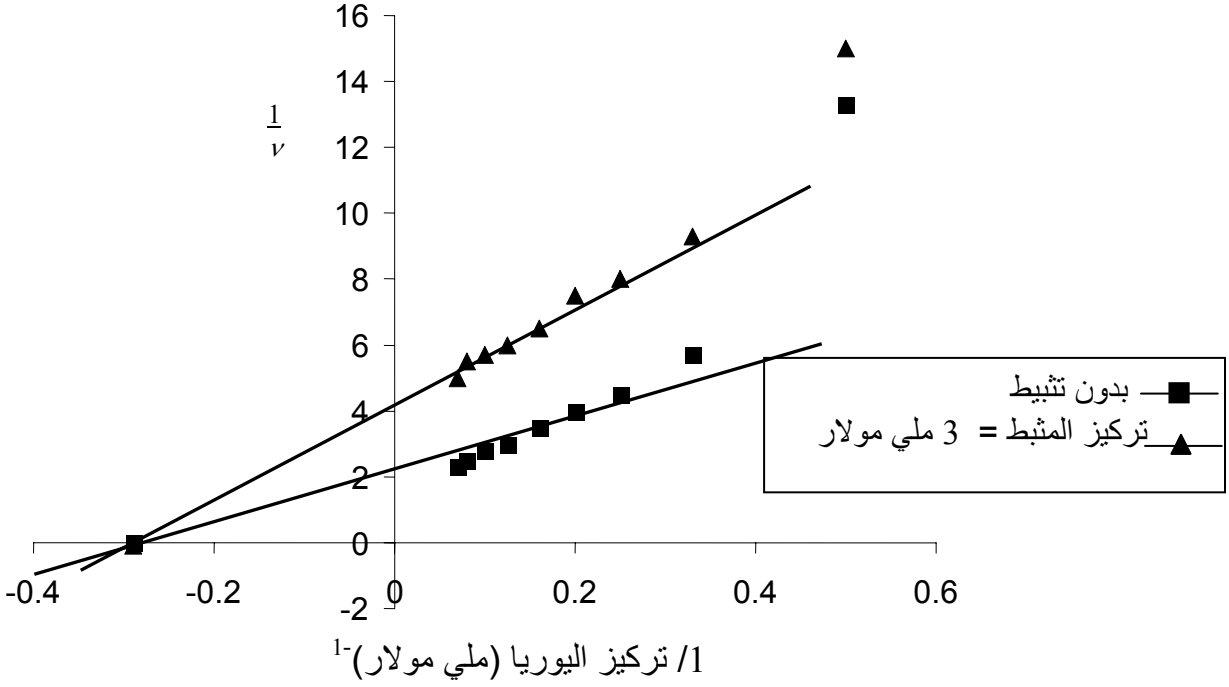
الجدول 7 :تأثير تراكيز مختلفة من مثيل يوريا على فعالية أنزيم اليوريز المعزول من بذور نبـات البـاقلاء المحلي

تركيز مثيل يوريا ملي مولار	الفعالية النوعية ** ، ***	الفعالية %*
1	1308	93
1.5	1210	86
2	1101	78
2.5	948	67
3	819	85

* الفعالية من غير وجود مثبط هي 100%.

** الفعالية النوعية هي مايكرومول من المادة الناتجة للامونيا /دقيقة / مليلتر / ملغرام بروتين .

*** تم قياس فعالية أنزيم اليوريز تحت الظروف المثلى الموضحة في الجدول (4) .



الشكل 3 : رسم لاينويفر- يوضح تأثير المثبط مثيل يوريا على فعالية انزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي

الجدول 8 : يوضح قياس تركيز اليوريا في مصل أشخاص أصحاء ومرضى باستخدام العبـوة القياسـية وأنزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي.

Sample No.	الأصحاء		المرضى	
	تركيز اليوريا باستخدام العبوة القياسية mg / dI	تركيز اليوريا باستخدام انزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي mg / dI	تركيز اليوريا باستخدام العبوة القياسية mg / dI	تركيز اليوريا باستخدام انزيم اليوريز المعزول من بذور نبات الباقلاء المحلي mg / dI
1	27.4	28.80	65.96	66.20
2	27.86	29.00	51.69	52.00
3	31.79	32.14	70.197	70.98
4	18.124	19.01	84.46	85.10
5	20.90	21.00	61.723	62.32
6	30.36	31.35	55.43	54.12
7	18.14	19.63	71.23	71.98
8	83.55	37.67	72.25	72.86
9	26.30	26.50	80.14	79.00
10	22.40	22.98	63.15	64.10
11	22.35	21.20	53.72	54.35
12	32.35	33.10	48.98	49.20
13	22.12	25.00	69.66	70.20
14	23.32	24.20	67.30	68.32
15	36.46	36.00	64.96	65.40
16	19.60	18.01	58.62	58.89
17	18.79	19.22	47.98	47.00
18	15.14	24.98	82.12	81.00
19	24.4	24.40	90.24	90.84
20	38.62	37.33	88.45	89.10

المصادر العربية

الخفاجي، ابتسام عبد الحسين وحنان ياسين، 2001. غربلة وتنقية وتوصيف اليوريز مـن بـذور بعـض النباتات المحلية، المؤتمر الثاني للعلوم الطبية والحياتية، جامعة الزرقاء الأهلية، 141 صفحة.

بديوي، ليلاس فرحان، 2001. عزل ودراسة خواص أنزيم اليوريز من بذور نبات الباقلاء المحلي، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Andrews, P., 1965. The gel filtration of proteins related to their molecular weight over a wide range J. Biol. Chem, 96: 595 p.

Campeanu, G.H., Iordachescu, I., Turcu, G., 1996. Purification of urease from *Glycinae hispida* seeds and immobilization on polyacrylonitrile gel, Rev. Roum Biochim, 33, pp.161-166.

Dixon, M. and Weeb, E.C., 1979. Enzymes, 3rd ed., Academic Press Inc. New York. pp.3,27,306

Florkin, M. and Howaders, M., 1960. "Comparative Biochemistry", Academic Press, New York, 2: 882 p.

Hirayama, C., Sugimara, M., Satio, H. and Nakamura, N., 2000. Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Mosulaba*. Phytochemistry. 53(3): pp.325-330.

Kakimoto, S., Sumino, Y., Kawabara, K., Eilchirou, N. and Isam, U., 1990. "Purification and characterization of acid urease from *Lacto bacillus* fermentum". Appl. Micrbiol Biotechnol, 32(5): pp.538-43, Chem. Abst. 1990, 112(7): 154167C.

Khanolkar, G.S., Relabish, G.K., Lee, C.K. and Stadtlander, C.T., 2000. ''Isolation of bacteria other than *Hilecobacter pylori* from stomach of squirrel monkeys with gastritis". Dig. Dis. Sci. 45(2) : pp.272-80.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophagety. Nature, 227: 680 p.

Mohammed, T.M., Mohammed, M.A., Mohammed, S.A. and Fahmy, A..S., 1999. "Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits". Biosource Technology, 68(3): pp.215-223.

Pandy, P.C. and Pandy, V., 1991. Urease purification from the seeds of *Cajanus cajan* and its application in a biosensor construction. Appl. Biochem. Biothechnol. 31(3): pp.247-51.

Saboury, A.A., Moosari, A.S. and Morahedi, A.A., 1997. A simple novel method for studying the combined inhibitory effects of ethyl urea and N-methyl urea on jack beans urease. Enzyme Inhib., 11(3) : pp.217-22 .

Schacterle, G.R. and Pollack R.L., 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biologic material, Anal. Biochem. 51: pp.654-655.

Sing, S., 1995. Partial purification and some properties of urease form the *Alkaliphilic* cynobacterium nostoc calcicole. Folia Microbiologica. 40(5): pp.529-533.

Sung, H.Y., Lee, M.W., Chiou, M.J. and Chang, C.T., 1989. A procedure for purifying jack bean urease for clinical use, Proc. Nat. Sci. Coun. Repub. China [B]. 13(4): pp.250-70.