



Undersøgelse af diabetesrelateret albuminuri

Det protein som forekommer i blodet i størst mængde, hedder albumin, se figur 24 side 21. Forhøjet koncentration af protein i urinen forekommer hyppigt ved diabetes. Det skyldes et stort slid på nyrerne, der bliver mere gennemtrængelige for protein, som derefter udskilles med urinen. Nyrernes almindelige rolle er at filtrere blodet (ca. 200 gange i døgnet) og fjerne alle uønskede stoffer. Hvis nyrerne er utætte for protein, kan det måles i en urinprøve. Man bruger opsamling af døggnurin gennem 24 timer eller en morgenurinprøve.

Albuminuri er betegnelsen for det forhøjede niveau af proteinet albumin i urinen som ses hos bl.a. diabetikere (>200 mg protein/L urin). Stigningen i albumin i urinen hænger sammen med graden af den udviklede diabetes. Derfor vil man på såkaldte præ-diabetikere, kunne spore forhøjede mængder protein, som dog stadig er mindre end man finder ved diabetikere. Denne tilstand kaldes mikroalbuminuri (20-200 mg/L). Man kan også bruge metoden til at overvåge nyreproblemer hos erkendte diabetikere. Se i øvrigt side 33.

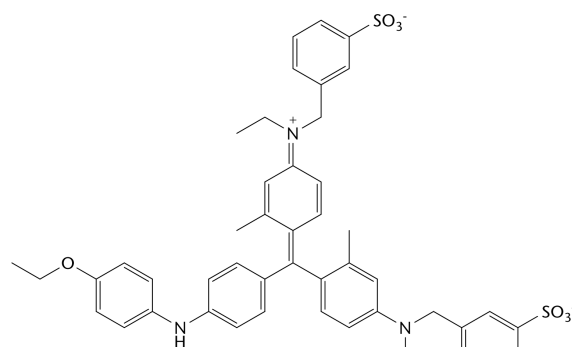
Mængden af protein skal være meget lav fx 5-10 mg/L. Den almindelige sammensætning af urin ses i tabel 1.

	Vand	Urinstof	Chlorid	Natriumion	Kaliumion	Creatinin
Koncentration (g/L)	> 950	9,3	1,87	1,17	0,750	6,67

Tabel 1.

Kroppens to nyre justerer kroppens vand/salt balance, og derfor kan den nævnte sammensætning selvfølgelig variere en del. Salte (ioner) kan opkoncentreres af nyrerne. Urinen er steril, men der kan forekomme bakterier fra urinsens vej ud gennem urinrøret. Pga. smitterisiko skal man udvise forsigtighed ved håndtering af urinprøver. Til forsøget anvendes derfor kunstigt fremstillede urinprøver fra fiktive patienter.

Proteinindholdet i urinprøverne måles vha. et Bradford Assay. Denne metode er især velegnet til at måle på albumin (der normalt bruges som metodens reference-protein). Et assay er en samlet beskrivelse af en måleteknik og dens anvendelsesområde. Princippet er at lade albuminindholdet i prøven reagere med Bradford reagens, som indeholder farvestoffet coomassie blue, der ved binding til proteiner bliver blå, se figur 1. Koncentrationen af albumin-farvestof komplekset bestemmes derefter spektrofotometrisk ved fremstilling af en standardkurve. Læs evt. mere om spektrofotometri på side 42. Da Bradford reagenset bindes til alle proteiner, måles totalprotein i urinen. Albumin vil dog udgøre langt størsteparten.



Figur 1. Farvestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Farven afhænger af pH-værdi og binding til basiske aminosyrer i proteiner. Det kan både eksistere som positivt ladet og brunligt ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$), mere grønligt ($\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$) og blå ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$). I stærk syre er det brunt, men når det bindes til proteiner, bliver det blå.



Formål

At vurdere fiktive patienters risiko for diabetes-relateret albuminuri (forhøjet indhold af albumin i urinen).

Materialer til hver gruppe

- Spektrofotometer (SpectroVis), PC m. LoggerPro 3.15
- Stopur (mobil)

Til klargøring af fortyndingsrække:

- 5 stk 1,5 mL mikrocentrifugerør i rack (klare)
- 1 stk 100-1000 μ L mikropipette med spidser i rack (10 stk)
- 20 mL bæger med fysiologisk saltvand, 0,15 M NaCl (0,9%)

Til måleserie med spektrofotometer:

- Rack med 10 stk 1,5 mL plastkuvetter (små kuvetter)
- 1 stk 20-200 μ L mikropipette med spidser i rack (10 stk)
- 250 mL bægerglas til væskeaffald
- 250 mL bægerglas til brugte pipettespidser
- 50 mL bæger med Bradford farvereagens

Rack med mikrocentrifugerør:

- Gul: human serum albumin i saltvand, 'BSA- standard' 250 μ g/mL
- A, grøn: urin fra patient 1
- B, orange: urin fra patient 2

Sikkerhed

Gruppen aftaler hvem der håndterer kemikalierne. Opgaven kan gå på skift. Der kræves sikkerhedsbriller, handsker og kittel på grund af arbejdet med det kraftige farvereagens, som også indeholder ca. 8 % phosphorsyre (pH = 0,5).

Oprydning og rengøring

Undervejs kan alle væsker fra prøverør og kuvetter hældes sammen i et 250 mL affaldsbægerglas, som læreren efterfølgende håndterer. Brugte pipettespidser kan løbende opsamles i 250 mL bægerglas. Efter forsøget smides pipettespidser og mikrocentrifugerør i skraldespand.



Fremgangsmåde

Klargøring af spektrofotometer:

Brug samme spektrofotometer til alle gruppens målinger. Tryk på 'regnbueikonet' og vælg 'absorption vs tid'. I 'rullegardinet' vælges 'individuelle bølgelængder', der gør det muligt at måle ved to specifikke bølgelængder samtidigt. Vælg 460 og 590 nm.

Spektrofotometeret skal KUN kalibreres forud for første måling (og hvis man skifter PC undervejs). Overfør fysiologisk saltvand til kuvetten og placér den i spektrofotometeret. I LoggerPro vælges menuen Forsøg → kalibrer → SpectroVis. Følg programmets instruktion, men husk at 'tom kuvette' betyder 'med saltvand, uden farvereagens'.

Fremstilling af fortyndinger til standardkurven:

- Hent et gult mikrocentrifugerør med 1500 µL af BSA-STANDARD (koncentration 250 µg/mL). Klargør 6 tomme mikrocentrifugerør i holderen, og mærk de 6 rør 250, 200, 150, 100, 50 og 25.
- Tilsæt 0,15 mol/L saltvand til hvert mikrocentrifugerør som angivet i tabel 2. Brug samme pipettespids til alle.
- Tilsæt BSA-STANDARD til hvert mikrocentrifugerør som angivet i tabel 2. Brug ny pipettespids til alle.

Koncentration (µg/mL)	250	200	150	100	50	25
Tilsat saltvand (µL)	0	100	200	300	400	450
Tilsat BSA-STANDARD (µL) Gult rør	500	400	300	200	100	50

Tabel 2.

1. Forberedelsesfase:

Ti nye, tomme mikrocentrifugerør opstilles i nummerorden i et rack. Nr. 1-6 bruges til protein standarder, nr. 7-10 bruges til prøve A, B (dobbelbestemmelser). Hver af de ti nye mikrocentrifugerør tilsættes 100 µL prøve fra de 'gamle' rør. Brug ny pipettespids til hver tilsætning.

Hver prøve bør have samme tid til reaktionen med farvereagens. Derfor bruges et tilsætningsskema til at holde styr på tiden, se tabel 3.

2. Tilsætningsfase:

Start stopuret ved første tilsætning og følg tidsskemaet. Med 1 minuts tidsforskydning tilsættes 1300 µL farvereagens (tilsæt 2 · 650 µL). Efter tilsætningen er det vigtigt at der suges op og ned med pipetten 2-3 gange for at opblande proteinprøve og farvereagens. Anvend ny pipettespids til hver tilsætning.

**3. Målefase:**

Overfær det totale indhold af det første mikrocentrifugerør til kuvetten (bare hæld) og placér denne i spektrofotometeret inden der er gået 10 minutter, og vær klar til at følge tidsskemaet. På det præcise minuttal startes en måling i LoggerPro. Målingen skal køre indtil hele forsøget er slut!! Når programmet har målt 4-5 sekunder, noteres absorbansen ved begge bølgelængder i tabel 3. Kuvetten tømme og skylles med demineraliseret vand og rystes godt inden den er klar til næste prøve. Den næste prøve overføres i god tid til kuvetten og målingen startes (noteres) præcis når tidtagningen passer.

Hvis det skulle ske, at I kommer for sent med en tilsætning, spilder en prøve eller lignende, så fortvivl ikke. Fortsæt så vidt muligt efter tidsskemaet, så vil det kun være enkelte målinger som er behæftet med fejl.

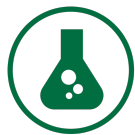
Resultater

1. forberedelsesfase										
Prøve nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Koncentration (µg/mL) efter fortynding	250	200	150	100	50	20	A1	A2	B1	B2
Tilsat prøve	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2. Tilsætningsfase, proteinprøver tilsættes farvereagens										
Stopur tid (min.)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Farvereagens (µL)	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300
3. Målefase, måling af absorbans med spektrofotometer.										
Stopur tid (min.)	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Absorbans (590 nm)										
Absorbans (460 nm)										

Tabel 3.

Databehandling

1. Opret en tabel i et regneark, fx Microsoft Excel. Tabellen skal indeholde kolonner til klasse/gruppenavn, prøvenavn, prøvekoncentration (µg/mL), og målt absorbans ved 590 nm og ved 460 nm for alle 6 standardprøver.
2. Overfær de målte absorbanser i tabel 3 til regnearket.
3. Tegn et XY-punktdiagram med absorbans v. 590 nm (afhængig, Y-akse) som funktion af koncentration (uafhængig, X-akse). Denne bølgelængde svarer til 'stigning i blå farveintensitet' (målingen ved 460 nm bruges i ekstraopgaven).



4. Brug regnearkets diagramværktøjer til at tegne en lineær tendenslinje gennem punkterne (standardkurve). Vis linjens funktion og R^2 -værdi i diagrammet. Husk at tendenslinjen ikke skal skære (0,0), da farvereagenset også selv absorberer lys.
5. Opstil en tabel, med måleresultater for hver af prøverne A1, A2, B1 og B2 samt det beregnede gennemsnit.
6. Find koncentrationen af protein i prøverne A og B ud fra standardkurvens regressionsligning. Ved dobbeltbestemmelser beregnes ud fra gennemsnittet af de to målinger.
7. Lav et overskueligt skema med det beregnede forsøgsresultat for proteinkoncentration i de analyserede prøver.

Diskussion

1. Hvad var indholdet af protein i de to fiktive patientprøver?
2. Diskutér analysemetodens gyldighed (giver den benyttede metode data som kan give svar på formålet).
3. Diskutér analyseresultaternes nøjagtighed (kan vi stole på målingerne, herunder standardkurven). Er det et problem for jeres konklusion, hvis jeres analyser fx er 10% unøjagtige?
4. Hvad kan I konkludere om patienternes risiko for alvorlige nyreskader og mistanke om problemer med diabetes? Husk at konklusionen skal have udgangspunkt i jeres forsøgsresultat (eller fælles resultatopsamling for hele klassen).

Ekstraopgave:

1. Lav en ekstra kolonne i regnearket, og beregn A_{590}/A_{460} . Optegn diagram hvor y-aksen er forholdet mellem absorbans ved de to målte bølgelængder. Dette forholdstal svarer til, at man både udnytter viden om den aftagende brune farve, samt den tiltagende blå farve.
2. Bestem de ukendte proteinprøver ud fra den nye standardkurve. Er resultaterne anderledes?
3. Beregn gennemsnit af absorbansmålinger for alle grupper som har målt på samme proteinkoncentrationer. Gentag resultatbehandlingen.
4. Diskutér styrker og svagheder ved denne fremgangsmåde.