

STUDII COMPARATIVE ASUPRA UNOR METODE DE DOZARE A PROTEINEMIEI, BAZATE PE REACȚIA BIURET

Susana Bordy, M. Kerekes, Elza Tatár

Metodele destinate dozării proteinemiei, bazate pe reacția biuret, se folosesc de mai multe decenii în laboratoarele medicale. În cursul reacției apare o colorație violetă care se datorează formării unui complex între ionii de cupru bivalent și legăturile peptidice din proteine. Aminoacizii precum și alți compuși azotați simpli nu interferează.

Dintre metodele chimice, cea mai precisă este metoda Kjeldahl; fiind însă prea laborioasă, este azi aproape complet abandonată. S-a mai propus utilizarea reacției Folin-Ciocalteu (Lowry), foarte sensibilă, însă și ea nespecifică, fiind mult influențată de variațiile fracțiunilor proteice din ser. Metodele fizice ca: calcularea proteinemiei din greutatea specifică a serului, refractometria și determinarea absorbției în ultraviolet la 210, respectiv 280 nm, s-au dovedit a fi și ele nespecifice și nesatisfăcătoare din punctul de vedere al preciziei, respectiv necesită parțial aparatură specială. Astfel, în ultima vreme, metodele bazate pe reacția biuret și care nu este influențată de compoziția proteinelor, este din nou aproape exclusiv utilizată.

Există o serie de variante în privința tehnicii metodelor bazate pe reacția biuret. Acestea se referă la natura ligandului (tartarat, citrat ș.a.), la concentrația sulfatului de cupru și a NaOH, precum la tehnica execu-

ției (raport reactiv-ser, durata dezvoltării culorii, temperatura ș.a.). Dintre numeroasele variante, cea mai răspândită este tehnica propusă de *Weichselbaum* (1). Aceasta este, de altfel, recomandată ca metodă standard, pentru laboratoarele medicale.

Ne-am propus să efectuăm studiul comparativ al metodei *Weichselbaum* și a altor două metode bazate pe reacția biuret (2, 3), care folosesc tot un singur reactiv, pentru a le compara sensibilitatea și alte caracteristici, pentru a stabili care dintre acestea s-ar recomanda pentru uzul de rutină în laboratorul clinic.

Material și metodă

Ca standard de proteină, am utilizat serumalbumină umană cristalizată (Fluka), seralbumină bovină cristalizată (Fluka), gamaglobulină din ser bovin cristalizată (Schuchardt) și ser uman standard (Precilip-Boehringer). Din aceste substanțe am preparat cu apă distilată, respectiv, cu solu-

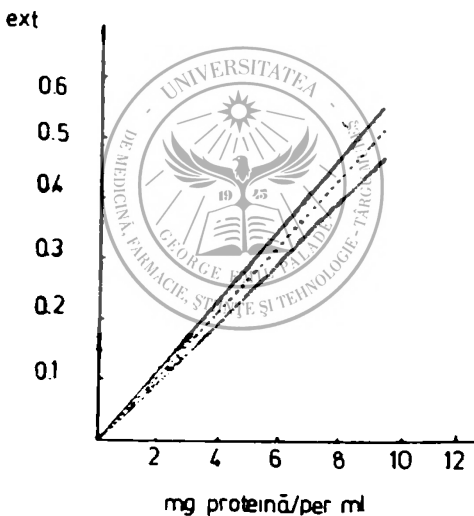


Fig. nr. 1: Etalonarea metodelor studiate, cu albumină bovină cristalizată. Linia plină — metoda (3); linia întreruptă — metoda (2); linia punctată — metoda (1).

ție fiziologică NaCl 0,9% o serie de diluții cu un conținut în proteină de 2—10 mg/ml, luând în considerare că albuminele cristalizate conțin 10% apă. Pentru a putea compara metodele, am utilizat o tehnică unitară: la 4 ml reactiv am adăugat 1 ml soluție proteică, determinând extincția probelor după timpul de așteptare indicat pentru fiecare metodă: 1—30 min., 2—15 min., 3—20 min., la lungimea de undă de 546 nm, în cuvă de 1 cm, față de blanc (4 ml reactiv + 1 ml apă distilată). Am stabilit curbele de etalonare pentru fiecare preparat de proteină în parte, respectiv, am mai studiat următoarele aspecte:

- coeficientul de extincție pentru proteine;
- efectul diluantului (apă, respectiv ser fiziologic);
- efectul raportului reactiv/diluant;
- intensitatea culorii la serurile umane.

Rezultate și discuții

Curbele de etalonare obținute pentru serumalbumina bovină cristalizată sînt redată în fig. nr. 1. Curbele obținute cu serumalbumina umană, respectiv cu serul standard sînt practic identice cu cele din fig. nr. 1. Se observă deci că metoda Velösy (3), care folosește ca ligand citrat, furnizează extincțiile cele mai crescute.

Extincțiile directe, precum cele calculate pentru 1 g proteină/100 ml, obținute cu serul standard, sînt redată în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Metoda	Proteine 0/0	Ext.	Ext _{10'0}
(1)	6	0,310	0,051
(2)	6	0,350	0,058
(3)	6	0,365	0,061

Ca diluant, respectiv solvent poate fi folosit în cazul serumalbuminelor atît apă, cît și ser fiziologic, obținindu-se practic aceleași rezultate (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Metoda	4 ml reactiv 0,9 ml apă 0,1 ml ser	4 ml reactiv 0,9 ml ser fiziol. 0,1 ml ser
Extincția probelor		
(1)	0,442	0,452
(2)	0,465	0,475
(3)	0,508	0,517

Avînd în vedere că unele metode execută reacția, folosind 5 ml reactiv și 0,1 ml ser, am comparat acest raport cu cel de 4 ml reactiv, 0,9 ml apă și 0,1 ml ser (tabelul nr. 3). Se observă că metodele Gornall (2) și Velösy (3) furnizează rezultate egale în ambele cazuri, în timp ce cu metoda Weichselbaum (1) se obțin valori mai scăzute în varianta cu 5 ml reactiv și 0,1 ml ser.

Tabelul nr. 3

Metoda	Extincția cu 5 ml reactiv 0,1 ml ser	Extincția cu 4 ml reactiv 0,9 ml apă 0,1 ml ser
(1)	0,383	0,407
(2)	0,421	0,420
(3)	0,475	0,475

Executând cele trei metode cu 0,1 ml ser, se constată același aspect, ca în cazul etalonării: valorile cele mai crescute ale extincției se obțin cu metoda Velösy (3).

Rezultatele obținute arată că metoda Velösy (3) este cea mai sensibilă, datorită citratului ca ligand și astfel ea permite și obținerea unei precizii mai bune. Reactivul este simplu (2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și 20 g acid citric dizolvate în 500 ml apă, la care se adaugă 500 ml NaOH N), costul lui fiind inferior celor folosite la metodele Weichselbaum (1) și Gornall (2). Timpul de așteptare este mai scurt decât la metoda Weichselbaum (1). Dozarea proteinemiei poate fi executată folosind 4 ml reactiv, 0,9 ml apă și 0,1 ml ser, sau și în varianta 5 ml reactiv + 0,1 ml ser, folosind un blanc corespunzător al reactivului (4 ml reactiv + 1 ml apă, respectiv 5 ml reactiv + 0,1 ml apă).

Pe baza acestor considerente, recomandăm metoda Velösy (3) ca metodă standard, pentru laboratoarele medicale.

Bibliografie

1. Weichselbaum T. E.: *Am. J. Clin. Path.* (1946), 10, 40; 2. Gornall A. G., Bardawill C. S., David M. M.: *J. Biol. Chem.* (1949), 177, 751; 3. Velösy G., Szabó A.: *Kisérl. Orvostud.* (1974), 26, 440.

Sosit la redacție: 24 aprilie 1980.

Susana Bordy, M. Kerekes, Elza Tatár

INVESTIGATIONS ON SOME METHODS BASED ON THE BIURET REACTION, USED FOR THE ASSAY OF SERUM PROTEINS

The estimation of serum protein level is at present performed almost exclusively by methods based upon the biuret reaction which are used, however, in numerous variants. We carried out a comparative study of three of the most used techniques, in order to establish their sensitiveness and other peculiarities. The results obtained proved that the technique with citric acid as ligand is the most sensitive and simple one and, therefore, most suitable for current use in medical laboratories.