



Stanbio Total Protein LiquiColor® Procedure No. 0250

Quantitative Colorimetric Determination of
Total Protein in Serum

Summary and Principle

Protein molecules contain a large number of peptide bonds. When treated with copper ions (Cu²⁺) in alkaline solution, a colored complex is formed between the copper and the carbonyl and imine groups of these peptides. As a similar reaction occurs with biuret (the simplest of such compounds formed by heating urea), the term "biuret reaction" was adopted.

The method described is based on the reports of Weischelbaum¹ and Gornal et al.² The violet color developed is proportional to the number of peptide bonds in the protein and is nearly independent of the relative concentration of albumin and globulin.³

Reagents

Total Protein LiquiColor® Reagent, Cat. No. 0251

Solution of copper sulfate pentahydrate, 0.3 g/dL, in aqueous sodium hydroxide, 0.8 g/dL. Also contains potassium iodide and potassium sodium tartrate.

Total Protein Standard, Cat. No. 0256 (10 g/dL)

Aqueous solution of Bovine Albumin, Fraction V, with sodium azide as preservative.

Precautions: *For In Vitro Diagnostic Use.*

Standard contains sodium azide as a preservative. May react with copper or lead plumbing to form explosive metal azide build up.

Reagent Preparations: The reagent and standard are ready to use.

Reagent Storage and Stability: Total Protein kit is stable at 2-8°C until the expiration date on the label. Total Protein Reagent is stable at 2-30°C. Store standard at 2-8°C.

Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 550 nm
Accurate pipetting devices
Test Tubes
Cuvets
Vortex mixer

Specimen Collection and Preparation⁴

Carefully separate serum from clot. Avoid hemolysis. Do not use plasma, as fibrinogen gives increased results.

Sample Stability: Total protein in serum is reportedly stable for 1 week at room temperature and for 30 days at 2-8°C.

Interfering Substances: Gross hemolysis and lipemia must be avoided. This method is **not** to be used for the determination of protein in urine or spinal fluid, due to low protein levels and high concentrations of interfering compounds.

Automated Analyzer

Parameters:

Wavelength 550 nm
Reaction Type Endpoint
Reaction Direction Increasing
Reaction Temperature 37°C
Sample/Reagent Ratio 1:100
Equilibration Time 4 Seconds
Read Time 3 Seconds
Lag Time 300 Seconds
Blank Absorbance Limit 0.200A
High Absorbance 1.200A
Standard 10 g/dL
Low Normal 6.6 g/dL
High Normal 8.3 g/dL

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Total Protein. Consult your instrument manual for programming instructions.

Manual Procedure

1. Pipet into appropriately labeled cuvetts the following volumes (mL) and mix well:

	UNKNOWN (U)	STANDARD (S)	REAGENT BLANK (RB)
Reagent	1.0	1.0	1.0
Sample	0.01	–	–
Standard	–	0.01	–

Note: For instruments requiring volumes greater than 1.0 mL, reagent and sample volumes may be doubled.

2. Allow all tubes to stand for at least 5 minutes.
3. Read S and U vs RB at 550 nm within 1 hour.

Quality Control: Control sera of known total protein content should be included with each set of unknowns.

Results

Values are derived by the following equation:

$$\text{Serum Total Protein (g/dL)} = \frac{A_u}{A_s} \times 10$$

Where Au and As are the absorbance values of UNKNOWN and STANDARD, respectively, and 10 the concentration of STANDARD (g/dL).

Expected Values⁴

Normal Range: 6.6 - 8.3 g/dL

Performance Characteristics⁵

1. Precision: Between run \pm 5.0%
2. Accuracy: Average deviation \pm 0.2 g/dL.
3. Specificity: Reaction equal with both albumin and globulin.
4. Linearity: Reaction obeys Beer-Lambert Law from 0-10 g/dL.

References

1. Weichselbaum TE. Am J Clin Pathol 7:40, 1946
2. Gornal AG, Bardawil CJ, David MM. J Biol Chem 177:751, 1949
3. Weissman N, Schoenbach EB, Armistead EB. J Biol Chem 187:153, 1950
4. Cannon DC et al. IN Clinical Chemistry – Principles and Techniques, 2nd Ed. RJ Henry et al., Eds. Harper & Row, Hagerstown, MD, 1974, pp 411-421
5. Stanbio Laboratory data

STANBIO LABORATORY, LP DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES OF THE MERCHANTABILITY AND FITNESS PERTAINING TO THIS PRODUCT WHICH ARE NOT EXPRESSLY DETAILED IN THIS PACKAGING INFORMATION OR A WRITTEN AGREEMENT BETWEEN THE BUYER AND SELLER OF THIS PRODUCT.

STANBIO LABORATORY, LP MAINTAINS THAT THIS PRODUCT CONFORMS TO THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INSERT. PURCHASER MUST DETERMINE THE SUITABILITY OF THE PRODUCT FOR ITS PARTICULAR USE. USE ONLY IN ACCORDANCE WITH LABELING INSTRUCTIONS.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0250.CE.EN.00-M • Last Revision: 08/05 • Procedure No. 0250



Stanbio Proteínas Totales LiquiColor®

Proced. No. 0250

Para la determinación cuantitativa colorimétrica de Proteínas Totales en suero

Agente de Diagnóstico

Resumen y Principio

La moléculas de proteínas contienen un largo número de péptidos unidos. Cuando se tratan con iones de cobre (Cu²⁺) en solución alcalina, se forma un complejo coloreado entre el Cobre y el Carbonil y grupos aminos de estos péptidos. Una reacción igual ocurre con el Biuret. (Los compuestos simples formados por el simple calentamiento de urea). De donde fué adoptado el término de "Reacción de Biuret".

El método descrito está basado en los reportes de Weichselbaum¹ y Gornal et al². El color violeta desarrollado es proporcional a el número de uniones peptídicas de la proteína y relativamente independiente de la concentración de Albumina y Globulina³.

Reactivos

Reactivo de Proteínas Totales LiquiColor®, Cat. No. 0251

Solución de Sulfato de Cobre pentahidratado 0.3 g/dL, en solución de Hidroxido de Sodio 0.9 g/dL. También contiene Ioduro de Potasio y Tartrato de Sodio y Potasio.

Estandar de Proteínas Totales (10 g/dL), Cat. No. 0256

Solución acuosa de Albumina Bovina Fracción V, con azida de sodio como preservativo.

Precauciones: Para uso de diagnóstico in vitro.

El estandar contiene azida de sodio como preservativo, puede reaccionar con el cobre y formar metales explosivos en la cañería, eliminar con mucha agua corriente.

Preparación del Reactivo: El reactivo y el estandar están listos para su usarse.

Estabilidad y Almacenamiento del Reactivo: El equipo de Proteínas Totales es estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El reactivo es estable a 2-30°C. Conservar el estandar a 2-8°C.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro capaz de leer absorbancias a 550 nm
Pipetas con divisiones exactas
Tubos para prueba y crónometro
Celdillas
Vortex

Recolección y Preparación de la Muestra⁴

Separe cuidadosamente el suero del coagulo para evitar la hemólisis. No usar plasma, el fibrinógeno puede incrementar los resultados.

Estabilidad de la Muestra: Las proteínas Totales en suero está reportada estable por 1 semana a temperatura ambiente y por 30 días a 2-8°C.

Substancias Interferentes: Marcada hemólisis o lipemia deben evitarse. Este método no puede ser usado para la determinación de proteínas en orina o líquido cerebro espinal. Debido a que niveles de concentración de proteínas bajas o altas pueden interferir.

Analizador Automatizado

Parámetros:

Longitud de onda 550 nm
Tipo de reacción Punto final
Dirección de la reacción Incremento
Temperatura de la reacción 37°C
Relación muestra/reactivo 1:100
Tiempo de equilibrio 4 segundos
Tiempo de lectura 3 segundos
Tiempo lag 300 segundos
Absorbancia límite del blanco 0.200A
Absorbancia alta 1.200A
Estandar 10 g/dL
Normal bajo 6.6 g/dL
Normal alto 8.3 g/dL
Linealidad 10 g/dL

Los parámetros arriba deben ser empleados en la programación analizadores automatizados para Proteínas Totales. Consulte su manual del instrumentación para el instrumento que esta utilizando.

Procedimiento Manual

1. Pipetea en celdillas perfectamente marcadas lo siguiente: Volúmenes (mL) y mezcle bien.

	Muestra (U)	Estandar (S)	Reactivo Blanco (RB)
Reactivo	1.0	1.0	1.0
Muestra	0.01	—	—
Estandar	—	0.01	—

NOTA: Para instrumentos que requieran mas de 1.0 mL el reactivo y la muestra pueden usarse al doble.

2. Dejar los tubos incubar por lo menos 5 minutos.
3. Lea S y U contra RB a 550 nm antes de 1 hora.

Control de Calidad: Controles de suero conocidos conteniendo Proteínas Totales deben ser incluidos en cada serie de muestras.

Resultado

Los valores se derivan de la siguiente ecuación:

$$\text{Suero Proteínas Totales (g/dL)} = \frac{A_u}{A_s} \times 10$$

Donde Au y As son los valores de las absorbancias de la muestra y el estandar respectivamente y 10 es la concentración del estandar (g/dL).

Valores Esperados⁴

Rango normal 6.6-8.3 g/dL

Características³

- Precisión:** Corridos ± 5.0%
- Exactitud:** Desviación estandar ± 0.2 g/dL
- Especificidad:** Relación igual con ambos Albumina y Globulina.
- Linealidad:** La reacción obedece la ley de Beer-Lambert de 0-10 g/dL.

Referencias

- Weichselbaum TE. Am J Clin Pathol 7:40, 1946.
- Gornal AG, Bardawil CJ, David MM. J. Biol. Chem. 177:751, 1949.
- Weissman N., Schoenbach EB, Armistead EB. J Biol. Chem 187:153, 1950.
- Cannon DC et al, IN Clinical Chemistry-Principles and Techniques, 2nd ed., RJ Henry et al., Eds. Harper & Row, Hagerstown, MD, 1974, pp 511-421.
- Stanbio Laboratory data.

STANBIO LABORATORY, LP DECLINA TODAS LAS GARANTIAS EXPRESADAS E INVOLUCRADAS EN LA NEGOCIABILIDAD Y PROPIEDAD CONCERNIENTE A ESTE PRODUCTO, QUE NO ESTEN EXPRESAMENTE DETALLADAS EN LA INFORMACION CONTENIDA EN EL EMPAQUE O SI NO HAY UN ACUERDO ESCRITO ENTRE EL COMPRADOR Y EL VENDEDOR DE ESTE PRODUCTO.

STANBIO LABORATORY, LP SOSTIENE QUE ESTE PRODUCTO CUMPLE CON LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE INSERTO. EL COMPRADOR DEBE DETERMINAR LA CONFORMIDAD DEL PRODUCTO PARA SU USO PARTICULAR. USELO SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia tecnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0250.CE.ES.00-M • Última Revisión: 08/05 • Proced No. 0250