

# Doku Protein Düzeylerinin Belirlenmesinde Pyrogallol Red-Molibdat ve Lowry Yöntemlerinin Karşılaştırılması: Metodolojik Araştırma

## Comparison of Pyrogallol Red-Molybdate and Lowry Assay in Determination of Tissue Protein Levels: Methodological Research

 Berrak GÜVEN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Zonguldak, TÜRKİYE

**ÖZET Amaç:** Total protein içeriğinin belirlenmesi, biyokimya araştırmalarında ve rutin klinik laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılır. Bu çalışmada, Lowry ve pyrogallol-red molibdat analizleri kullanarak dokudaki protein konsantrasyonlarını karşılaştırdık. **Gereç ve Yöntemler:** Analiz için rat beyin doku (n=35) örnekleri kullanıldı. Dokular çıkarıldı ve %1,15 KCl içeren tamponla (ağırlıkça %4) homojenize edildi. Homojenatlar 10 dk boyunca 1.000 g'de santrifüjleme ile ayrıldı. Total protein konsantrasyonları, homojenatların çözünür protein fraksiyonlarında Lowry ve pyrogallol red-molibdat spektrofotometrik teknikleriyle ölçüldü. **Bulgular:** Pyrogallol-red molibdat metoduyla ölçülen ortalama protein değerleri (6,66±4,59 mg/mL) Lowry metoduyla ölçülen ortalama protein değerlerine (6,67±3,21 mg/mL) yakındı. Bu çalışmada 2 yöntem arasında Pearson korelasyon analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterildi (r=0,99 p<0,0001). Bland-Altman analizine göre bias değeri 0,059, üst uyuma limiti 3,16 (%43), alt uyuma limiti ise -3,04 (%71) olarak bulundu. **Sonuç:** Bu 2 yöntem, dokudaki proteinin ölçülmesinde birbirinin yerine kullanılamaz. Ölçümler arasındaki farklılık, kalibratörlerin farklılığına, doku protein stabilitesine ve ürünlerdeki interferansa bağlı olarak oluşabilir.

**ABSTRACT Objective:** Determination of total protein content is common to use in biochemistry research and routine clinical laboratory practice. In this study, we compared protein concentrations of tissue using Lowry and pyrogallol red-molibdat assays. **Material and Methods:** Rat brain tissue (n=35) samples were used for analysis. Tissues were minced and homogenized (4% wt/vol) with buffer containing 1.15% KCl. The homogenates were separated by centrifugation at 1,000 g for 10 min. Total protein concentrations were measured by the Lowry and pyrogallol red-molibdat spectrophotometric techniques in the soluble protein fractions of the homogenates. **Results:** Mean protein values (6.66±4.59 mg/mL) assayed by pyrogallol-red molybdate method were close to mean protein values (6.67±3.21 mg/mL) assayed by Lowry method. In this study, there was a statistically significant correlation between the two methods according to the Pearson correlation analysis (r=0.99, p<0.0001). According to Bland Altman analysis, the bias value was 0.059, the upper agreement limit was 3.16 (43%), and the lower agreement limit was -3.04 (71%). **Conclusion:** These two methods may not be used interchangeably in measuring protein in tissue. The difference in measurements can occur due to differences of calibrators, tissue protein stability and interference in the products.

**Anahtar Kelimeler:** Lowry; pyrogallol red-molibdat; doku protein düzeyi

**Keywords:** Lowry; pyrogallol red-molibdat; tissue protein level

Biyolojik sıvılarda, kantitatif protein tayini için klinik biyokimya ve araştırma laboratuvarlarında birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler, proteinlerin kolorimetrik, turbidimetrik ve boya bağlama reaksiyonlarına dayanır. Kolorimetrik ölçümlerden en bilineni 1949 yılında geliştirilen Biüret metoduyla ölçüm prensibidir. Biüret metodunda, proteinlerin peptid bağlarına alkali

ortamda bağlanan bakır (II) iyonlarının indirgenmesiyle oluşan bakır (I) iyonları, solüsyonun renginin maviden mora dönmesini sağlar.<sup>1</sup> Bu metot daha sonradan yanlış indirgenmeleri önleyen Folin-phenol reaktifinin (Folin-Ciocalteu's phenol) eklenmesiyle Lowry metodu adı altında geliştirilmiştir.<sup>2</sup> Günümüzde bu yöntem, uzun ve hassas çalışma prosedürü nedeniyle pek sık tercih

**Correspondence:** Berrak GÜVEN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Zonguldak, TÜRKİYE/TURKEY  
E-mail: berrak\_guven@hotmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences.

Received: 09 Apr 2021

Received in revised form: 02 Jul 2021

Accepted: 05 Jul 2021

Available online: 13 Aug 2021

2146-8850 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

edilmese de ekonomik olması nedeniyle araştırma laboratuvarlarında hâlen kullanılmaktadır.

Klinik biyokimya laboratuvarlarında boya bağlama yöntemleri yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. 1983 yılında Fujita ve ark. tarafından rapor edilen boya bağlama metotlarından biri olan pyrogallol red-molibdat metodu, asidik pH'de proteinlerin protonlanmış bazik amino gruplarına bağlanmasıyla absorpsiyonda meydana gelen değişikliğin 596/694 nm'de ölçülmesine dayanır.<sup>3</sup>

Deneysel araştırmalarda çalışılan doku örneklerinde, kantitatif protein tayini araştırmacılar için zaman alıcı bir prosedürdür. Literatürde, idrar protein ölçümünde boya bağlama metotlarıyla Lowry metodunun karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır.<sup>4,5</sup> Fakat dokuda protein ölçümü için bu 2 metodun karşılaştırılmasıyla ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, pyrogallol red-molibdat ölçümünü Lowry metoduyla kıyaslayarak, pyrogallol red-molibdat doku protein ölçümü açısından güvenilirliğini göstermektir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan gerekli onay alınmıştır ("B.30.2.Z.K. Ü.0.20.00. 00/HADYEK-39" 2010). Çalışmamızda 35 adet rat beyin dokusu örneği kullanıldı. Doku örnekleri analiz edilene kadar -80°C'de saklandı. Dokular %1,15 KCl eklenerek Ultra-Turrax (IKA Werke GmbH & Co., Staufen, Germany) homojenizatör (%4wt/vol) ile homojenize edildi. Homojenatların 1.000\*g'de 10 dk (4°C) santrifüj edilmesiyle süpernatantlar elde edildi.

Elde edilen süpernatantların öncelikle Lowry metodu ile spektrofotometrik (Shimadzu UV 1601,

Kyoto, Japan) protein tayini yapıldı. Bu analizde kalibrasyon için 1 mg/ml olarak hazırlanan bovine serum albumin (BSA) (Sigma (St. Louis, MO) protein solüsyonu stok kalibratör olarak kullanıldı. Daha sonra bu süpernatantlardan Pyrogallol red-molibdat metotlu aynı markalı kitleri kullanan Advia 2400 otoanalizöründe (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Deerfield, IL, USA) protein ölçümü yapıldı. Pyrogallol red-molibdat yönteminin kalibrasyonunda kitin orijinal kalibratörleri kullanıldı.

Metotlar arasındaki doğrusal ilişki basit regresyon modeli ve Pearson korelasyon analizi ile incelendi. Lowry ve Pyrogallol-red molibdat metotlarıyla elde edilen sonuçlar arasındaki uyum, Bland-Altman grafiği Excel uygulamasında çizilerek değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak p<0,05 olarak alındı. İstatistiksel analiz SPSS 18 paket programı kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

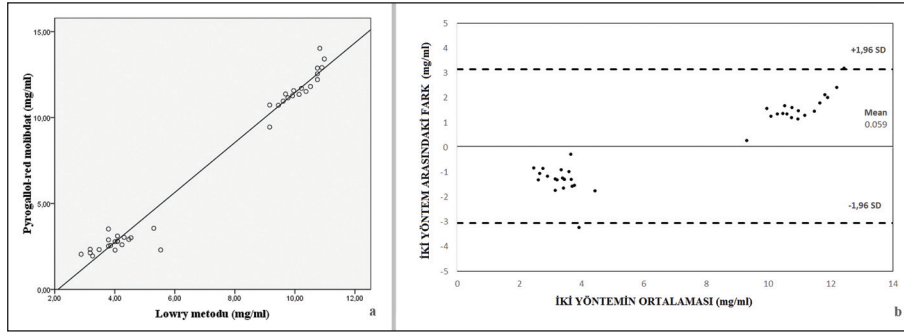
Protein ölçümünde ortalama protein değerleri Lowry metodu kullanıldığında 6,67 mg/mL (minimum-maksimum değer 2,88-10,98 mg/mL), pyrogallol-red molibdat metodu kullanıldığında 6,66 mg/mL (minimum-maksimum değer 1,95-13,41 mg/mL) bulundu. pyrogallol-red molibdat yöntemiyle ölçülen konsantrasyon değerleri, Lowry yöntemine göre daha geniş bir aralığa ve yüksek bir standart sapmaya sahipti (Tablo 1).

Bu çalışmada 2 yöntemle yapılan ölçümler arasında Pearson korelasyon analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterildi (r=0,99 p<0,0001). İki metodun ölçümleri arasında kurulan regresyon modeli  $y=1,451x-3,057$  olup (y: "pyrogallol-red molibdat" metodu, x: Lowry metoduyla elde edilen total protein değerleri) bu modelin tahminlerdeki başarısı (R<sup>2</sup>) %97,9 olarak

**TABLO 1:** Lowry ve Pyrogallol-red molibdat yöntemiyle belirlenen doku protein konsantrasyonlarının istatistiksel özellikleri.

Yöntem	Minimum değer (mg/dL)	Maksimum değer (mg/dL)	Ortalama değer (mg/mL)	SS (mg/mL)
Lowry	2,88	10,98	6,67	3,21
Pyrogallol-red	1,95	13,41	6,66	4,59

SS: Standart sapma.



**ŞEKİL 1:** Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan Lowry ve Pyrogallol red-molibdat yönteminin karşılaştırmaları. A) Korelasyon (Pearson correlation coefficient,  $r=0,99$ ,  $p<0,0001$ ). B) Bland Altman analizi.

bulundu (Şekil 1A). Bland-Altman analizine göre bias değeri 0,059, üst uyuşma limiti 3,16 (%43), alt uyuşma limiti ise -3,04 (%71) olarak bulundu (Şekil 1B).

## TARTIŞMA

Kolorimetrik ölçüme dayanan Lowry yöntemi, araştırmacıların doku protein ölçümünde sıklıkla tercih ettiği bir yöntemdir. Pyrogallol red-molibdat yöntemi ise günümüzde rutin laboratuvarlarda protein tayininde otomatize ve hızlı sonuç vermeleri nedeniyle gittikçe daha fazla tercih edilen boya bağlama yöntemlerinden biridir. Bu çalışmada, dokuda protein ölçümünde 2 metot karşılaştırılmış, yöntemin korele olduğu gösterilmiştir ( $r=0,99$   $p<0,0001$ ). Yöntem karşılaştırma araştırmalarında sadece korelasyon katsayısı ve regresyon analiziyle değerlendirme uygun değildir. Bu nedenle pyrogallol red-molibdat metodu ve Lowry metodunun ölçümleri arasında Bland-Altman analiziyle değerlendirme yapılmıştır. Bland-Altman analizine göre özellikle düşük protein konsantrasyonlarında yüzde biasın yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda biyolojik sıvıların protein ölçümünde Lowry metodunun, boya bağlama metotlarına Bradford (Coomassie Brilliant Blue), Pesce ve Strande (Ponceau-S/TCA) ve Schaffner-Weismann modifiye metoduna (Amido black 10B) göre daha sensitif olduğu gösterilmiştir.<sup>6</sup> Boya bağlama yöntemleri güvenilir yöntemlerdir, ancak farklı protein tiplerinde gram protein başına farklı miktarda renk oluşturma

dezavantajları vardır.<sup>7</sup> Bununla birlikte Lowry testi de diğer testlere göre interferanslara daha duyarlıdır.

## SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına göre doku protein ölçümünde bu 2 metodun birbirinin yerine kullanılması uygun değildir. İki metot arasında görülen farklılık, kalibratörlerin farklılığına, doku proteinlerinin stabilitesine ve ürünlerdeki interferansa bağlı olarak oluşabilir. Yöntemin, doku örneklerinde denenmesi ve olası interferansların belirlenmesi için ileri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

### Finansal Kaynak

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

### Çıkar Çatışması

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

### Yazar Katkıları

*Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.*

## KAYNAKLAR

1. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949;177(2):751-66. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
3. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku.* 1983;32(12):379-86. [[Crossref](#)]
4. Prakash M, Shetty JK, Dash S, Barik BK, Sarkar A, Prabhu R. Determination of urinary peptides in patients with proteinuria. *Indian J Nephrol.* 2008;18(4):150-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
5. Yalamati P, Karra ML, Bhongir AV. Comparison of urinary total proteins by four different methods. *Indian J Clin Biochem.* 2016; 31(4):463-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
6. Okutucu B, Dinçer A, Habib O, Zihnioglu F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70(5):709-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Lucarini AC, Kilikian BV. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnol Tech.* 1999;13:149-54. [[Crossref](#)]