

Zbigniew Burski, Ewa Grudzińska

Zastosowanie elektroforezy do analizy spoiw

Ochrona Zabytków 34/3-4 (134-135), 201-202

1981

Artykuł został zdigitalizowany i opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

ZASTOSOWANIE ELEKTROFOREZY DO ANALIZY SPOIW

Jednym z problemów analiz dokonywanych w celu ustalenia prawidłowej technologii konserwacji zabytkowych dzieł malarstwa jest określenie spoiw. Czułość i rzetelność klasycznych metod fizykochemicznych, wymagając pobrania z obiektu stosunkowo dużych ilości materiału do analizy¹, doprowadzają do kolizji interesów konserwatora i analityka. Z tego względu autorzy niniejszego komunikatu podjęli próbę znalezienia kompromisu między konieczną destrukcją malarstwa a pełnym obrazem analitycznym poprzez sprawdzenie przydatności w konserwacji zabytków analizy elektroforetycznej.

Wiemy, że spoiwa malarskie w technikach tradycyjnych dzielą się na²:

1) roztworzalne w wodzie

— węglowodany (gumy, kleiki skrobiowe, dekstryna),
— białka (kleje skórne, kostne, rybne, żelatyna, albumina jajka, albumina z krwi, witelina i lecytyna z żółtka jajka kurzego, kazeina),

2) nieroztworzalne w wodzie

— oleje schnące (lniany, makowy, słonecznikowy i orzechowy),
— woski (pszczeli, karnauba),
— żywice (kalafonia, mastyks, damara, kopal, sandarak, gumigutta, terpentyna wenecka, olej terpentynowy, balsam kopaiwa, balsam elemi).

Spośród wymienionych spoiw, ze względu na własności fizyczne, idealnie nadawały się do identyfikacji za pomocą elektroforezy³ spoiwa białkowe. One też stały się obiektem badań autorów.

Białka roślinne i zwierzęce, będąc związkami o dużym ciężarze cząsteczkowym (większym od 10 000), zastosowane jako substancje klejące w postaci wodnych roztworów koloidalnych o pH różnym od punktu izoelektrycznego mają elektryczny ładunek dodatni lub ujemny. Cząsteczki takie (obdarzone ładunkiem) zaczynają migrować, gdy wodny ich roztwór umieścimy w polu elektrycznym. Różnica w szybkościach migracji stwarza możliwość rozdzielania konglomeratów białek na poszczególne indywidua. Dodatkowym czynnikiem rozdzielającym białka mogą być żele organiczne, wytwarzane w roztworach wodnych rozdzielanych białek przed umieszczeniem ich w polu elektrycznym. Żele te działają jako tzw. sito molekularne.

Doświadczenia przeprowadzone przez autorów niniejszego komunikatu wykonane zostały na żelu poliakrylamidowym⁴ (po wyeliminowaniu żelu agarowego⁵, skrobiowego⁶ i folii polioctanowych⁷ jako gorszych) z dodatkiem soli sodowej siarczanu dodecyłu. Obecność soli powodowała otaczanie się cząsteczek polipeptydów otoczką anionu siarczanu. Na skutek tworzącej się w efekcie otoczki ładunku ujemnego następowała zmiana własności elektrycznych analizowanych białek. Przyłożony potencjał elektryczny ok. 100 V przy $I_1 = 1$ mA i $I_2 = 2$ mA powodował wędrówkę ujemnie naładowanych cząsteczek w kierunku anody, a rozdzielane białka tworzyły wtedy migrujące strefy, które uwidaczniane były poprzez zabarwienie ich barwnikiem białkowym (np. błękitem bromofenolowym).

Wyżej opisaną metodą wykonano próby rozdzielania białek następujących spoiw: kleju skórno, kleju rybiego (jesiotrowego), białka jajka kurzego, żółtka jajka kurzego, żelatyny, kleju z płatków owsianych i z mąki żytniej⁸. Uzyskane elektroforegramy spoiw znacznie różniły się między sobą. Obrazy te zawierały frakcje białkowe o różnych R_b i intensywności (stężeniu), co umożliwiło identyfikację poszczególnych spoiw (patrz tabela). Wyjątkiem były: klej skórny i żelatyna, które ze względu na to, że wyjściowe białko do ich produkcji stanowił kolagen z ssaków, różniły się między sobą bardzo nieznacznie. Kolejnym etapem eksperymentu było zbadanie wpływu takich czynników, jak promieniowanie UV, tlen i temperatura na spoiwa, a w rezultacie na elektroforegramy tych białek. Roztwory wodne czystych klejów poddano działaniu O_2 i UV w temperaturze $+ 25^\circ C$ w okresach czasowych od 0,5 do 50 h (osobno UV, osobno O_2 i razem $UV + O_2$). W wyniku tych działań uzyskane zostały następujące rezultaty:

— elektroforegramy porównywane dla tych samych spoiw zawierały nieznaczne zmiany w stosunku do wzorca, co nie zmieniło możliwości identyfikacyjnych poszczególnych indywiduów;

— wystarczającą ilością próbki spoiwa jest masa 50 mg (przy osiągnięciu wprawy w wykonaniu analizy ilość ta może ulec zmniejszeniu do ok. 20 mg, gdyż minimalne stężenie białka nie może być mniejsze niż 4 mg/cm^3 ; w czasie pełnej analizy zużywa się ok. 5 cm^3 roztworu). Wyniki doświadczeń wskazują więc na to, że metoda analizy spoiw białkowych za pomocą elektroforezy jest

¹ J. Lehmann, *Chemia malarstwa i jego konserwacji*, „Biblioteka Muzealnictwa i Ochrony Zabytków”, seria B, Warszawa 1974.

² J. Hopliński, *Farby i spoiwa malarskie*, „Ossolineum”, 1959.

³ Wł. Ostrowski, *Elektroforeza w badaniach chemicznych i klinicznych*, PWN, Warszawa 1970.

⁴ R. Chu, *Identification of Commercially Used Fish Found in the Pacific by Disk Electrophoresis*, „J. Ass. Offic. Agr. Chem.”, 51, 1968, s. 743; Y. B. Lee, D. A. Ricandsrud, E. C. Haggberg, E. I. Briskey, *Quantitative Determination of Soybean Protein in Fresh and Cooked Meat-Soy Blends*, „J. of Food Sci.”, 40, 1975, s. 380; Y. B. Lee, D. A. Ricandsrud, E. C. Haggberg, R. H. Forsythe, *Detection of Various Nonmeat Extenders in Meat Products*, „J. of Food Sci.”, 41, 1976, s. 589; E. Spell, *Die Elektrophoretische Unterscheidung Verschiedener*

Fleischarten, „Die Fleischwirtschaft”, 54, 1974, s. 533; E. Spell, *Nachweis von Milcheiweiß und Sojaprotein in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Vertikalen Flochdisk-elektrophorese*, „Die Fleischwirtschaft”, 52, 1972, s. 1451.

⁵ W. S. Hill, R. J. Learson, J. P. Lane, *Identification of Fish Species by Agar Gel Electrophoresis*, „J. Ass. Offic. Agr. Chem.”, 49, 1966, s. 1245.

⁶ R. R. Thompson, *Species Identification by Starch Gel Zone Electrophoresis of Protein Extracts. I. Fish*, „J. Ass. Offic. Agr. Chem.”,

⁷ J. Kohn, *A New Supporting Medium for Zone Electrophoresis*, „Biochem. J.”, 65, 1957, s. 9.

⁸ W chwili oddania materiału do druku na ukończeniu były próby z kazeiną, albuminą bydłą i hemoglobina.

Tabela. Średnie wartości R_b Table, Mean Values of R_b

Klej skórnny	Żelatina	Klej jesiortowy	Białko jajka	Żółtko jajka	Płatki owsiane	Mąka żytnia
0,04	0,04	0,03	0,065	0,04	0,58	0,26
0,12	0,11	0,14	0,24	0,13	0,64	0,32
0,18	0,16	0,19	0,38	0,16	0,88	0,41
0,20	0,18	0,22	0,46	0,24	0,90	0,63
0,25	0,21	0,23	0,51	0,30		0,77
0,28	0,25	0,27	0,65	0,35		
0,32	0,29	0,30	0,76	0,44		
0,35	0,33	0,33		0,55		
0,37	0,39	0,37		0,66		
0,41	0,45	0,42				
0,48	0,50	0,52				

przydatna do celów konserwatorskich. Oczywiście ma ona swoje mankamenty, z których najważniejszym jest stosunkowo duża pracochłonność. Jednakże z drugiej strony patrząc na to zagadnienie, w wypadku konserwacji obiektu o szczególnie dużej wartości ten mankament staje się zaletą, gdyż gwarantuje pewność analizy. W wypadku wdrażania elektroforezy jako metody analitycznej trzeba jeszcze pamiętać o tym, że należy wykonać atlas wzorców elektroforegramów dla każdego aparatu do elektroforezy (w celu uzyskania porównywalnych warunków).

OPIS METODY

1. Przygotowanie próbek

50 mg białka (spoiwa) ekstrahowano 3,5 cm³ roztworu zawierającego 0,0625 M Tris-HCl (pH = 6,8), 3% SDS i 1% beta-merkapt-etanolu. Zawiesinę ogrzewano w gotującej się wodzie przez 15 minut, po czym odwirowano przy 6 tys. obr./min. w temperaturze pokojowej. Przesącz zatrzymano, a pozostałość ekstrahowano jeszcze dwukrotnie. Po odwirowaniu uzupełniono do ostatecznej objętości 10 cm³.

2. Przygotowanie żelu i przeprowadzenie elektroforezy

Całkowity żel składa się z dwóch partii (górnny żel i dolny rozdzielający).

Do 14 rurek przygotowano 10-procentowy roztwór akrylamidu, składający się z 18 cm³ roztworu akrylamidu (22,2g akrylamidu, 0,9g metyleno-bis-akrylamidu w 100cm³ roztworu), 10cm³ 1,5-molowego buforu Tris-HCl, zawierającego 0,4% SDS (pH = 8,8), 1cm³ roztworu nadsiarczanu amonu (10 mg rozpuszczano w 1 cm³ wody), 11 cm³ wody i 0,03 cm³ TEMED (N,N,N',N' — tetrametylenediamine). 7 cm³ żelu wprowadzono do 14 tubelek o średnicy 5 mm. Po całkowitej polimeryzacji żelu rozdzielającego wprowadzono 0,25 cm³ żelu górnego. Żel górny (3-procentowy akrylamid) przygotowano przez mieszanie 0,66cm³ roztworu akrylamidu, 1,25cm³ 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 0,4% SDS, 0,1 cm³ nadsiarczanu amonu (10 mg w 1 cm³ wody), 3 cm³ wody, 0,01 cm³ TEMED. Po całkowitej polimeryzacji żelu do tubelek wprowadzono 10 μl próbki, 10 μl błękitu bromofenolowego (0,05%) i 10 μl 8 M mocznika. Kolumny z żelami umieszczano w buforze składającym się z 0,025 M Tris, 0,192 M glicyny i 0,1% SDS.

Elektroforeza była prowadzona przy natężeniu prądu 1 mA na tubelek do chwili dojścia błękitu bromofenolowego do żelu rozdzielającego (ok. 50 minut). Następnie przy natężeniu prądu 2 mA na tubelek do momentu dojścia błękitu bromofenolowego do końca żelu (ok. 4,5 h). Po elektroforezie żele wyjmowano z tubelek, barwiono 1,5 h roztworem Brilliant Comassie Blue (0,4% błękitu, 50% metanolu, 9,2% kwasu octowego). Do wybarwiania stosowano roztwór 50% metanolu i 9,2% kwasu octowego przez noc, a następnie roztwór 7,5% kwasu octowego i 5% metanolu.

Po całkowitym wybarwieniu wykonano densytmetryczne wykresy.

dr inż. Zbigniew Burski
PP PKZ — Oddział we Wrocławiu
mgr inż. Ewa Grudzińska
Instytut Technologii Przemysłu
Chemicznego i Spożywczego
Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu

THE USE OF ELECTROPHORESIS IN THE ANALYSIS OF BINDING AGENTS

The authors of the present work have carried out studies on the use of disc electrophoresis on polyacrylamid gel to analyze protein binders. Standard electrophoregrams were made of seven binders (hide glue, gelatine, sturgeon glue, egg white, egg yolk, glue from oats and from rye flour). The proteins were then subjected to aging by means of UV radiation, oxygen and temperature. The results obtained have shown the usefulness of the examined method as a way of identifying protein binders. The only identification problem was to differentiate hide glue from gelatine, although this difficulty

was due to the fact that an initial protein was collagen from mammals.

In the majority of cases, disc electrophoresis on polyacrylamid gel has been found very useful. One of the biggest advantages of that method is the confidence in identification and small quantities of samples necessary to make the analysis (from 20 to 50 mg of protein). It may be believed that this method shall become a compromise between the interests of conservators and of analytical chemists.