

Ugotavljanje prisotnosti proteinov v slikarskih barvah s testom ELISA

1. PROTEINI V PREDMETIH KULTURNE DEDIŠČINE

V zgodovini tehnologije umetnosti so se proteini najpogosteje uporabljali kot lepila ter vezna sredstva za pigmente pri izdelavi slikarskih barv. Prevladovale so predvsem tri vrste proteinov: kazein (iz mleka), ovalbumin (iz jajca) in kolagen (iz kosti ali kože živali). Ugotavljanje prisotnosti in tipov proteinov v umetniških predmetih predstavlja velik izziv, saj so običajno prisotni v nizkih koncentracijah in kompleksnih mešanicah različnih organskih in anorganskih materialov. Izzivi lahko nastanejo tudi že samo zaradi staranja umetniškega predmeta, ki povzroči spremembe v strukturi proteinov. Za ugotavljanje prisotnosti proteinov v predmetih kulturne dediščine se je v zadnjem času izkazala metoda indirektni encimskoimunski test ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay).



Slika 1: Priprava barve iz rumenjaka in modrega pigmenta. (Foto: Ana Penko)

2. UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTEINOV V VZORCIH KULTURNE DEDIŠČINE

Encimskoimunski test ELISA je imunološka metoda, pri kateri z zelo specifičnimi protitelesi "prepoznamo" tarčni protein, kompleks »tarčni protein-protitelo« pa prikažemo z barvno reakcijo. To reakcijo lahko zaznamo s prostim očesom ali merilnimi instrumenti. Prednosti testa je nizka meja zaznave – manj kot 1 nanogram tarčnega proteina, kar je cca. 10 ng iz slike odvzetega vzorca.

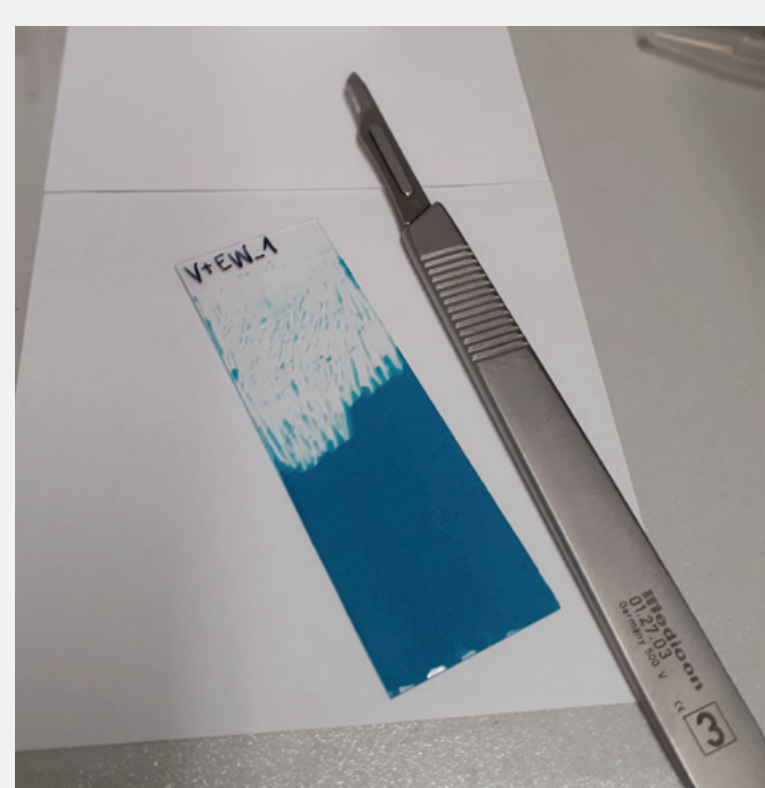
Test ELISA se odlikuje tudi po visoki občutljivosti in visoki specifičnosti, sama analiza pa je relativno hitra in poceni. V mešanici proteinov v vzorcu lahko, z uporabo različnih protiteles, identificiramo vsak posamezen protein, mogoče je ugotoviti tudi biološki izvor tarčnega proteina (npr. ovčji/praiščji kolagen). Identificiramo pa lahko le proteine, proti katerim imamo pripravljena protitelesa. Izzivi testa se pojavijo tudi zaradi nečistoč, kot so npr. kovinski ioni, prisotni v nekaterih pigmentih. Ti lahko motijo reporterski sistem ELISA. Interference povzročajo tudi lipidi, sladkorji in ostale snovi v barvah, podlagah in lakih. S testom ELISA pa ne moremo določiti lokacije proteina v odvzetem vzorcu (npr. v kateri plasti poslikave se identificirani protein nahaja).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	Water Sub	Water Sub	Water Sub
B	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	Water Sub	Water Sub	Water Sub
C	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	Water Sub	Water Sub	Water Sub
D	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Ov AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Cas AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	VZ 1 AB I Col AB III Sub	Water Sub	Water Sub	Water Sub
E	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub
F	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub
G	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub
H	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Ov AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Cas AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	VZ 2 AB I Col AB III Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub	EB, Bic Sub

Slika 2: Načrt mikrotitrne plošče, ki ga pripravimo pred izvedbo testa ELISA za ugotavljanje prisotnosti proteinov v vzorcih z oznako VZ 1 in VZ 2. Rumeno obarvane oznake Ab I označujejo dodatek primarnih protiteles proti ovalbuminu (oznaka Ov), proti kazeinu (oznaka Cas) in proti kolagenu (oznaka Col), zeleno obarvane oznake Ab II označujejo nanos sekundarnih protiteles, oznaka Sub pomeni dodatek brezbarvnega substrata. V stolpcih 10 – 12 so umeščene negativne kontrole, kjer EB, Bic označuje dodatek mešanice ekstrakcijskega (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 6 M urea, 0,1 % SDS, Miliq H₂O, pH 7,4) in bikarbonatnega pufru (0,1 M NaHCO₃, pH 9,6). (Grafični prikaz: Ana Penko).

2.1 EKSTRAKCIJA PROTEINOV IN KORAKI INDIRECTNEGA TESTA ELISA

Pred začetkom izvedbe indirektnega testa ELISA moramo proteine ekstrahirati, naj si bo to iz standarda, modelnega vzorca (Slika 3) ali vzorca, vzetega iz umetniškega dela. V preiskovanem vzorcu se poleg proteinov lahko nahajajo tudi druge snovi, npr. olja, naravne smole in voski, sintetični materiali idr. S postopkom ekstrakcije (5 h, 37 °C) (Slika 4) v vzorcu morebiti prisotne proteine raztopimo v vodno fazo. Po ekstrakciji sledi nanos raztopine vzorca na trden polistirenski nosilec, t.i. mikrotitrno ploščico (Slika 5 in 1. korak na Sliki 6) po vnaprej pripravljenem načrtu (Slika 2). Na nosilec poleg preiskovanih vzorcev nanese tudi pozitivne in negativne kontrole, da potrdimo pravilno delovanje sistema in ovržemo prisotnost neželenih reakcij, zaradi katerih lahko dobimo lažno pozitivne rezultate.



Slika 3: Odvzem vzorca z modelnega vzorca. (Foto: Ana Penko)

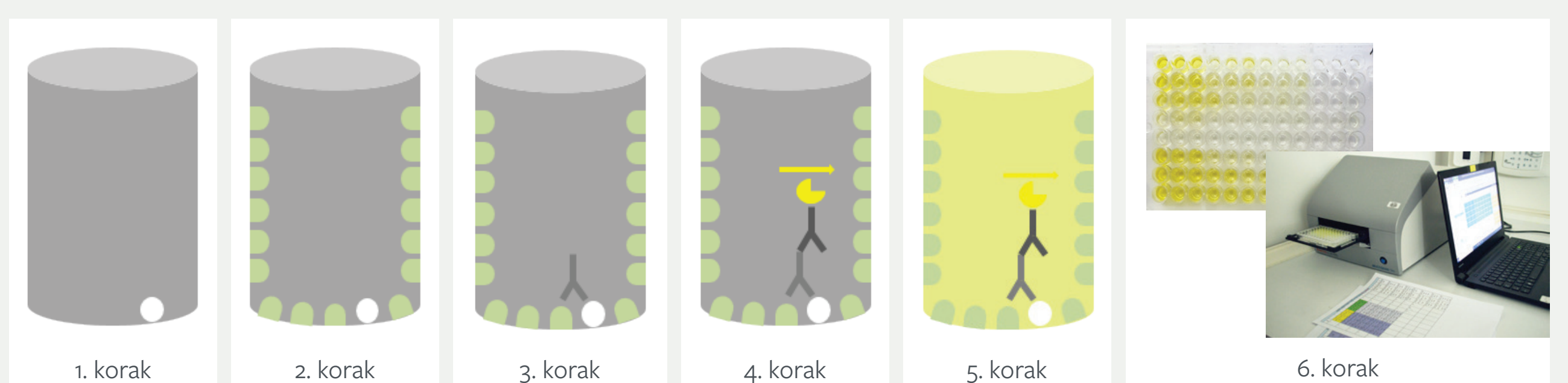


Slika 4: Peturna ekstrakcija proteinov (37 °C) iz odvzetega vzorca. (Foto: Ana Penko)



Slika 5: Nanos raztopine vzorca na mikrotitrno ploščico. (Foto: Maša Kavčič)

- 1. korak:** Nanos raztopine vzorca in imobilizacija tarčnih proteinov (bel krogec na Sliki 6) na mikrotitrno ploščico
- 2. korak:** Nanos telečjega serumskega albumina (zeleni krogeci na Sliki 6), ki blokira nezasedena mesta na stenah mikrotitrne plošče
- 3. korak:** Nanos in inkubacija (1 h, sobna T) raztopine primarnih protiteles, specifičnih za tarčni protein (svetlo siva oznaka v obliki črke Y na Sliki 6)
- 4. korak:** Nanos in inkubacija (1 h, sobna T) raztopine sekundarnih protiteles (temno siva oznaka v obliki črke Y na Sliki 6), ki so specifična za primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa so konjugirana z encimom alkalna fosfataza (odrezan rumen krogec na Sliki 6).
- 5. korak:** Nanos brezbarvnega substrata p-nitrofenilfosfata, ki se zaradi reakcije z encimom pretvori v obarvan produkt, ki nam omogoči detekcijo
- 6. korak:** Zaznava signala s prostim očesom ali spektrofotometrična meritev optične gostote pri valovni dolžini 405 nm



Slika 6: Shema korakov indirektnega testa ELISA; bel krogec označuje tarčni protein iz vzorca, zeleni krogeci označujejo blokirni reagent na stenah mikrotitrne plošče, s svetlo sivo barvo je označeno primarno protitelo Ab I, s temno sivo pa sekundarno protitelo Ab II, konjugirano z reporterskim encimom, označenim z rumenim odrezanim krogecem. Rumena puščica označuje substrat. (Foto in grafični prikaz: Ana Penko)