

## ЕФЕКТИВНИ МЕТОДИ ЗА ПРЕЧИСТВАНЕ НА ПРОТЕИНИ ЗА ЦЕЛИТЕ НА КОНСЕРВАЦИОННИЯ АНАЛИЗ

*Диана Николова*

Разшифроването на автентичните технологии се основава на дефиниране на субстанциите, изграждащи музейните предмети. За целта, преди да бъде подложена на идентификационен анализ, всяка отделна органична субстанция трябва да бъде изолирана и пречистена.

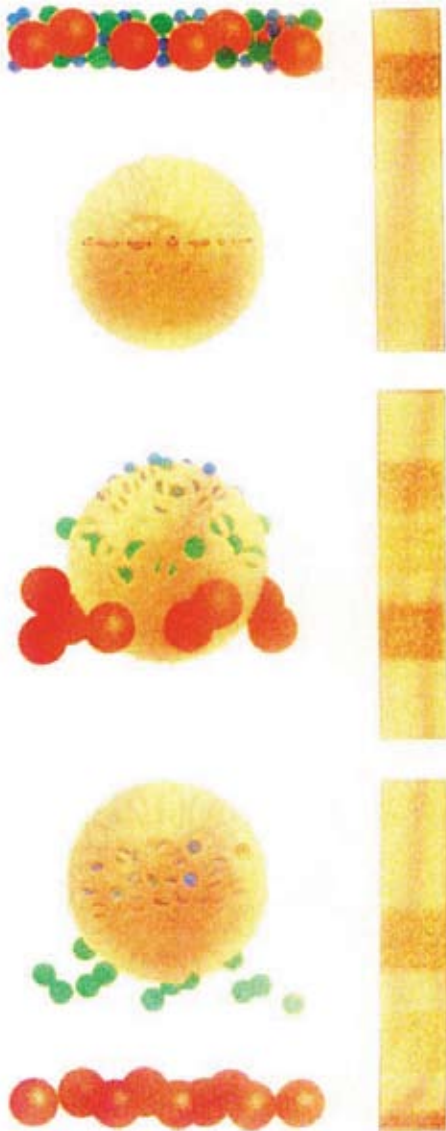
В настоящата статия са представени ефективни методи за изолиране и пречистване на белтъчни вещества като албумин, казеин, желатин, които са широко застъпени в старите технологии като свързватели. Разглежданите методи са популярни в протеиновата химия.

Пробите за анализ, вземани от оригиналните музейни предмети, по правило са в минимални количества. Ето защо за изолирането и пречистването на подлежащите на идентификация субстанции в тях, трябва да бъдат прилагани техники и методи, свързани с минимални загуби. От тая гледна точка, сред многообразието от възможности, при разработването на изходните проби с цел идентификация на съдържащите се в тях белтъчни вещества, се явяват удачни следните методи:

**ГЕЛ-ХРОМАТОГРАФИЯ.** Методът е известен още като молекулно-ситова хроматография, гел-филтруване (1,2,3), При него белтъчните вещества се фракционират в съответствие с големината на молекулите им. Ролята на молекулни сита изпълняват декстранови, полиамидни или агарозни гелове с тридименционална

структура. Сухите полимери се предлагат на пазара под формата на сферични гранули. Всяка марка на тези продукти се характеризира с определена степен на омрежване, т.е. порьозност, и големина на гранулите. В зависимост от молекулната маса на веществата, които ще се фракционират, се избира подходящата марка продукт. След набъбване на полимерните гранули във водни разтвори, се получават геловите, играещи ролята на “молекулни сита”. Принципът на разделяне на белтъчните вещества се свежда до следното: Матрицата (гелът) представлява множество порести частици между които се намират елуентът – подвижната течна фаза. Когато на повърхността на колона, напълнена с гел се постави белтъчната смес, големите молекули не могат да влязат в порите на частиците на гела, а ги заобикалят и изтичат първи от колоната. Молекулите с по-малки размери минават през порите на гелните зърна, при което се задържат за известно време и се елуират след големите молекули по реда на намаляване на молекулните им тегла и размери- фиг. 1.

Процедурата по провеждане на гел-хроматографията започва с избор на подходящата суха матрица в зависимост от молекулната маса на подлежащите на разделяне белтъчни вещества. След третирането и с водни разтвори се получава гелът, с който се запълва хроматографската колона (подбрана по размери в зависимост от количеството на подлежа-

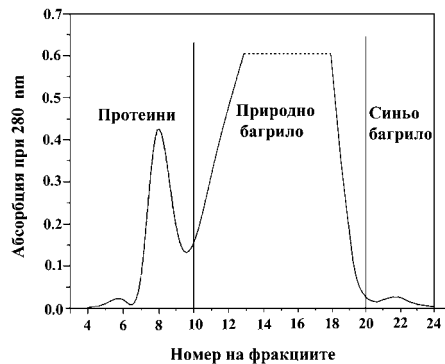


Фиг.1. Принцип на гел-хроматографията (по LKB – Швеция)

щата на разделяне белтъчна смес) и се изчаква известно време за уплътняване и стабилизиране на гела. След това на повърхността му се нанася концентрирания белтъчен разтвор. Горният край на колоната се затваря и посредством шлаух, в нея се подава елуиращия разтвор (буфе-

рен разтвор, подходящ по вид и йонна сила за конкретния случай) под съответно налягане, осигурявано от помпа или хидростатичното налягане на буферния разтвор, така че да се гарантира определена скорост на изтичане на елуатите от колоната. Изтичащите от колоната елуати се събират на равни интервали от време в отделни епруветки, поставени в колектор. Белтъчното съдържание във всяка една от фракциите се индикира по абсорбцията и при 280 nm. След това се построява т.н. елуационна крива – абсорбцията като функция от номера на фракциите или сумарния обем от началото на елуирането. На фиг.2 е представена елуационната крива от гел-хроматографското разделяне на протеиновите свързватели и багрилата от проба от покривна боя на кожа (10). Съгласно нея, фракциите с белтъчни вещества се обединяват в сборна проба ( в случая от първа до десета включително). Така се получава чист, почти без загуби, воден разтвор на извлечените от изходната проба протеини, които след това се подлагат на идентификация.

За целите на гел-хроматографията се предлага широк спектър от сухи матрици,



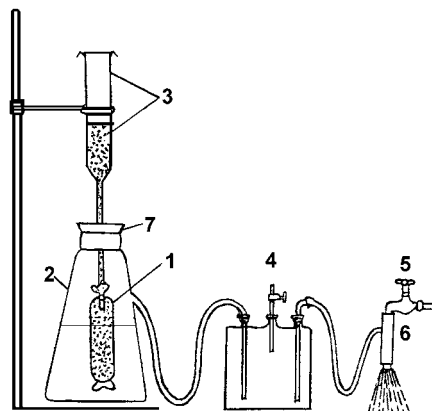
Фиг.2. Елуационна крива от гел-хроматография върху Sephadex G- 25 на проба от покривна боя на белтъчна основа от кожа на чанта, датирана XX век.

респ. гелове Така например декстрановите гелове са въведени от Шведската фирма Pharmacia под търговското наименование Sephadex . Фирмата предлага и агарозни гелове с търговската марка Sepharose Американската фирма Bio-Rad е известна с производството на полиакриламидни гелове Bio-gels. Гелове на същата химическа основа произвежда и фирмата LKB (Швеция), познати като ултрагели (4).

Гел-хроматографията намира приложение за фракциониране на белтъчни вещества, за определяне на молекулната им маса, за за обезсоляването им. За консервационния анализ гел-хроматографията е особено подходяща за обезсоляване на белтъчни разтвори, след което вече могат да се прилагат идентификационни анализи. В този случай е подходящ декстрановият гел Sephadex G-25.

Предимство на гел-хроматографията е и това, че е възможно по поглъщането на фракциите при 280 nm и техния обем да се добие представа за количеството на фракционирани или обезсолени белтъчни вещества(5). За консервационния анализ смисълът на определяне на изолираните в чист вид белтъчни вещества е този, че в зависимост от наличното им количество може да се подбере най-удачния метод или методи за тяхната идентификация.

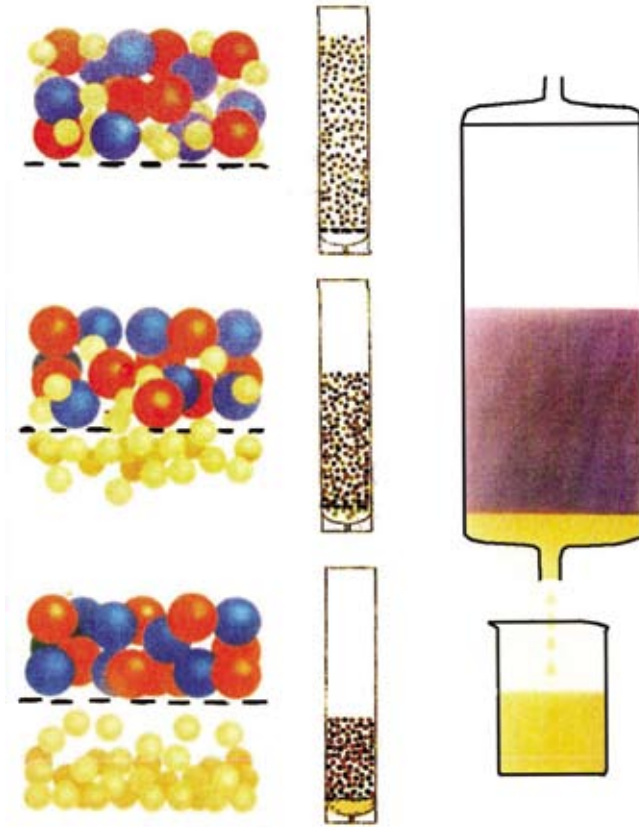
ФОРС-ДИАЛИЗА. При този метод белтъчните разтвори се очистват от нискомолекулни органични и неорганични примеси чрез дифузия през полупропусклива мембрана в условията на вакуум (2) В случая диализната торбичка, наричана още диализно черво, се свързва към съда, от който се подава изходния белтъчен разтвор и се поставя в смукателно шише. Вакуумът се създава чрез водна помпа (Фиг.3). При тези условия нискомолекулните продукти и част от разтворителя преминават през диализната торбичка, а в нея остава пречистен и концентриран белтъчен разтвор. В зависимост от голе-



Фиг.3. Схема на установка за форс-диализа (съгласно (2)): 1- диализно черво, 2- смукателно шише, 3- приемник за подлежащия на форс-диализа разтвор, 4- Вулфово шише, 5- кран към водопроводната мрежа, 6- водна помпа, 7- запушалка

мината на белтъчните молекули се подбира диализно черво със съответната пропускливост. В съвременната лабораторна практика най-употребявани мембрани (респ. диализни черва) са на базата на синтетични полимери.

УЛТРАФИЛТРАЦИЯ. Този вид филтрация се осъществява през капилярни мембрани (1,2,7). Използват се синтетични мембрани с различна порьозност, т.е. пропускливост. При ултрафилтрацията се постига ефект на обезсоляване, фракциониране и концентриране на белтъчни вещества. Процедурата се свежда до поставяне на белтъчния разтвор в ултрафилтрационната клетка с мембрана, през порите на която не може да преминава пречиствания протеин, но преминават молекулите на разтворителя и малките молекули на онечистванията. Преминаването на последните се осъществява при прилагане на налягане към изходния разтвор в ултрафилтрационната клетка или създаването на вакуум в камерата, в която се събира филтратата (фиг.4). Предимство на ултрафилтрацията



Фиг.4. Принцип на ултрафилтрация ( по LKB- Швеция).

пред останалите методи за пречистване и концентриране на белтъчни вещества е стабилността на ултрафилтрите( те могат да се използват многократно) и бързото и осъществяване. Например значителни обеми белтъчни разтвори могат да се пречистят и концентрират до няколко милилитра за един-два часа. Освен това ниските налягания и инертната атмосфера (например 1-2 атмосфери максимално налягане на съгъстения азот при провеждането на

ултрафилтрация в условия на повишено налягане) не позволяват деструкция на белтъчните вещества (1,2).

В литературата има епизодични данни за използването само на гел-хроматографията в областта на консервацията и реставрацията като молекулно сито – например при изследване на степен на разграждане на коприна в условията на състаряване(7), охарактеризиране на продукти с оглед евентуално приложение в консервационно-реставрационната практика ((8,9). Няма данни за приложение на изложените методи в консервационния анализ за изолиране, пречистване и концентриране на белтъчни субстанции от оригинални обекти преди идентификацията на тези субстанции за разшифроване на автентични технологии.

Опитът на автора в областта на белтъчната химия и ензимологията, нъдето разглежданите методи са рутинни, му дава основани да ги приложи успешно в аналитичната си работа по разработването на проби от оригинални музейни обекти и идентификацията на съдържащите се в тях белтъчни свързатели – желатин, албумин, казеин (10,11).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Колев, Дим., Ензими, Наука и изкуство, София, 1976
2. Стамболова, М., Т. Чомонева, Т. Аргирова, Ръководство за практически занятия по биохимия, Наука и изкуство, София, 1978.
3. Чобанов, Д., А. Коцев, Хроматография, Наука и изкуство, София, 1981.
4. Остерман, А.Л., Хроматография белков и нуклеиновых кислот, Наука, Москва, 1985.
5. Кантор, Ч., П.Шимел, Биофизическая химия, том 2, Мир, Москва, 1984.
6. Диксон М., Э.Уэбб, Ферменты, Мир, Москва, 1982.
7. Hawell, D., Silk degradation studies, In book: "Silk: Harper's Ferry Regional Group' 11th Symposium, November 12-13, 1992, National Museum of American History (1992), pp. 11-12.
8. Chikamai, B.N., M.E. Osman, A.R.Menzies and W.B.Banks, An evaluation of methods for characterising and monitoring gum arabic of commerce and related Acacia gums, Wood science and technology, 30, no.1, 49-61 (1995).
9. De La Rie, E. Rene and Christopher W. McClinchey, New synthetic resins for picture varnishes. In proceedings: Cleaning, retouching and coatings technology and practice for easel paintings and polychrome sculpture: preprints of the contributions to the Brussels Congress, 3-7 September 1990, Milles John S. and Smith, Perry, Editors (1990), 168-173.
10. Николова, Д., Ив. Гошев, Идентификация на свързвателите в покривна боя на кожа от чанта от втората четвърт на XX век, Известия на Националния исторически музей, том XII, 2001, 233-244.
11. Николова, Д., Ив. Гошев, Багрилни компоненти в покривна боя и състав на лустрото върху кожа от чанта от втората четвърт на XX век, Известия на Националния исторически музей, том XIV, 2004, 378-384.

#### EFFECTIVE METHODS FOR PURIFICATION OF PROTEINS FOR THE PURPOSE OF CONSERVATION ANALYSIS

##### *Summary*

Diana Nikolova

Three methods for separation, purification and concentration of protein solutions, largely applied in protein chemistry are described in the article. According to the literature, only the gel-chromatography is episodically used in the analytical practice of conservation and restoration. The author has successfully applied the three methods in her research work and she recommends them as effective methods for conservation analysis in purification, separation, concentration and desalting of protein binders in the course of the preparation of this type of substances for their identification.