

# **Der Einsatz immunologischer Methoden zum Nachweis von Proteinen und Gummen an Kunst und Kulturgut**

**Dissertation**

der Staatlichen Akademie der Bildenden Künste Stuttgart  
zur Erlangung des Grades

**eines Doktors der Philosophie**

vorgelegt von

**Julia A. Schultz**

geboren am 20. Juni 1975 in Göttingen

Tag der mündlichen Qualifikation: 18.07.2014

RektorIn:

Petra von Olschowski

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christoph Krekel

2. Berichterstatter:

Prof. Volker Schaible

Staatliche Akademie der Bildenden Künste

Stuttgart

Betreuerin:

Prof. Dr. Karin Petersen

HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft  
und Kunst Hildesheim/ Holzminden/ Göttingen

## Kurzfassung

Die Identifizierung von Bindemitteln an Kunst und Kulturgut kann zum Verständnis von Materialien und Techniken beitragen, die Grundlage für Restaurierungskonzepte sein oder bei der Überprüfung der Echtheit eines Objektes helfen. Derzeit gängige Verfahren zur Analyse von proteinhaltigen Bindemitteln wie Anfärbemethoden, spektroskopische und chromatographische Methoden sind häufig durch geringe Probengrößen, komplexe Materialmischungen und –degradation erschwert und sind darüber hinaus mit einem hohen Investitions- und Zeitaufwand verbunden. Demgegenüber zeichnen sich immunologische Methoden aus dem Bereich der medizinischen und biologischen Forschung vor allem durch eine relativ einfache Handhabung, minimale Probenaufbereitung und hohe Empfindlichkeit aus. Sie beruhen auf der spezifischen Reaktion von Antigenen und Antikörpern und können auch in komplexen Mischungen zwischen einzelnen Proteinen und Gummen unterscheiden. Mit geeigneten Antikörpern sind zudem artspezifische Aussagen möglich. Besonders hervorzuheben haben sich dabei die *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM). Während ELISA die Proteine und Gummen innerhalb der ganzen Probe – ohne Bezug zur räumlichen Verteilung - nachweist, ermöglicht IFM eine Lokalisierung der gesuchten Proteine am Anschliff.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Möglichkeiten und Grenzen immunologischer Verfahren zum Nachweis von Proteinen und Gummen an Proben von Kunst und Kulturgut. Der Schwerpunkt liegt auf der Entwicklung und Erweiterung einer ELISA *Screening*-Methode zur Identifizierung der vier gebräuchlichsten natürlichen Bindemittel Ei, Kasein, tierischer Leim und Pflanzengummen. Durch gezielte Veränderung der Versuchsparameter und Materialien wird die Möglichkeit zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit der Assays umfangreich untersucht (Extraktion, Inkubation, Blocken, Mikrotiterplatten). Alle verwendeten Antikörper werden anhand einer Vielzahl von Referenzmaterialien auf ihre Spezifität und mögliche Kreuzreaktivität hin überprüft und ihre Nachweisgrenzen bestimmt. Der Einfluss von Alterung und Pigmenten auf die Empfindlichkeit der immunologischen Reaktion wird mittels künstlich gealterten Fassungsproben näher betrachtet. Abschließend werden an verschiedenen Fallbeispielen die Möglichkeiten und Grenzen der Methoden belegt.

**Schlagwörter:** Kunstobjekte, immunologische Methoden, Proteine, Pflanzengummen, Bindemittelanalytik

## Abstract

The identification of binding media in art objects can contribute to the understanding of materials and techniques, inform conservation strategies, and help in evaluating authenticity. Traditional analytical methods for the identification of binding media such as chemical staining, chromatographic and spectroscopic techniques can be limited by sample size, sample mixtures and natural degradation of materials. In addition they require relatively expensive equipment and can be time-consuming. Immunological techniques from the fields of medical and biological research are based on the specific reaction of antigens and antibodies. They are characterized by relatively simple handling, minimal sample preparation and high sensitivity. These techniques can distinguish between different proteins and gums even in complex mixtures and allow, with the appropriate antibodies, species specific information. In particular, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Immunofluorescence Microscopy (IFM) show much potential. While ELISA analyzes the protein and gum content of the whole sample – regardless the spatial distribution - IFM offers the possibility to locate the materials of interest in embedded cross-sections. The present study describes the possibilities and limitations of immunological techniques for the identification of proteins and gums in art works. The focus is on the development and expansion of an ELISA screening method for the identification of four commonly used natural organic binding media: egg, casein, animal glue and plant gums. The possibility of increasing the assay's sensitivity is evaluated by systematic modification of the experimental parameters and materials (extraction, incubation, plate type, blocking buffer). The specificity and potential for cross reactivity of the various antibodies is assessed by means of a variety of reference materials and their detection limits are determined. The influence of aging and pigments on the sensitivity of the immunological response is examined on the basis of artificially aged reference materials. Finally, several case studies illustrate the possibilities and limitations of the methods.

**Keywords:** art objects, immunological techniques, antibodies, proteins, gums, binding media analysis

## Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Karin Petersen, die mich mit den immunologischen Verfahren vertraut gemacht hat und mir optimale Arbeitsbedingungen ermöglichte. Für die inhaltlichen Anregungen und uneingeschränkte Unterstützung möchte ich ihr an dieser Stelle danken.

Prof. Dr. Christoph Krekel und Prof. Volker Schaible danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Geduld.

Die vorliegende Arbeit konnte nur durch die Hilfe und Unterstützung vieler Personen, Institutionen und Stiftungen verwirklicht werden. Ihnen sei an dieser Stelle gedankt (alphabetische Reihenfolge):

- Julie Arslanoglu, Associate Research Scientist, Metropolitan Museum of Art, New York, USA
- Ursula Baumer, Chemikerin, Doerner Institut, München, Deutschland
- Brigitte Brandmaier, Dipl.-Restauratorin, Tandern, Deutschland
- Prof. Maria Perla Colombini, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Universität von Pisa, Italien
- Dr. Patrick Dietemann, Chemiker, Doerner Institut, München, Deutschland
- Dr. Jean-Philippe Echard, Musée de la musique - Cité de la musique, Paris, Frankreich
- Ulli Freyer, Restaurator, Bern, Schweiz
- Markus Ulrich Fritz, Dipl.-Biologe, HAWK Hildesheim, Deutschland
- Cécile Gombaud, Paper Conservator, Rijksmuseum Amsterdam, Niederlande
- Arlen Heginbotham, Associate Conservator, Jean Paul Getty Museum, Los Angeles, USA
- Prof. Dr. Stepanka Kuckova, Institute of Chemical Technology, Prag, Tschechische Republik
- Idelette van Leeuwen, Senior Paper Conservator, Rijksmuseum, Amsterdam, Niederlande
- Carla Leupold, Dipl.-Restauratorin, Braunschweig, Deutschland
- Prof. Dr. Mark Abbe, University of Georgia, Athens, USA
- Joy Mazurek, Assistant Scientist, Getty Conservation Institute, Los Angeles, USA
- Dr. Francesca Modugno, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Universität von Pisa, Italien
- Adriana Rizzo, Assistant Research Scientist, Metropolitan Museum of Art, New York, USA

- 
- Dr. Anke Scharrahs, Dipl.-Restauratorin, Coswig, Deutschland
  - Dr. Crtomir Tavzes, Director and Research Group Leader am Institute of Wood Science and Technology, and Sustainable Development, Ljubljana, Slovenien
  - Akiko Yamazaki-Kleps, Paper Conservator, New York, USA
  
  - Bayerischen Nationalmuseum München, Deutschland
  - Getty Conservation Center, Los Angeles, USA
  - Rijksmuseum Amsterdam, Niederlande
  - The Metropolitan Museum of Art, New York, USA
  
  - The Andrew W. Mellon Foundation, New York, USA

Mein persönlichster Dank geht an meine Familie und Freunde für ihre Liebe und Unterstützung nicht nur während meiner Promotionszeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>iv</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>4</b>
<b>I Allgemeiner Teil</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einführung</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Nachweis von Proteinen und Gummen an Kunst und Kulturgut – Stand der Forschung</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Bindemittel</b> .....	<b>16</b>
3.1 Proteinhaltige Bindemittel an Kunst und Kulturgut .....	17
3.1.1 Ei (Ovalbumin, Phosvitin).....	19
3.1.2 Milch (Kasein).....	22
3.1.3 Tierische Leime (Kollagen).....	24
3.1.4 Pflanzengummen (Glykoproteine) .....	27
<b>4 Einführung in die Immunologie</b> .....	<b>30</b>
4.1 Immunologische Grundlagen .....	30
4.2 Antigene .....	30
4.3 Antikörper.....	32
4.4 Antikörperherstellung.....	33
4.5 Immunoassays (IA) und Assaykonzepte .....	34
<b>II Experimenteller Teil</b> .....	<b>38</b>
<b>5 Entwicklung einer ELISA Methode zum Nachweis von Proteinen und Gummen</b> .....	<b>39</b>
5.1 Prinzip: indirekter ELISA.....	40
5.2 Ausgangssituation und Durchführung .....	42
5.3 Bestimmung der geeigneten Antikörperverdünnung.....	45
5.4 Extraktion .....	47
5.5 Mikrotiterplatten.....	55
5.6 Inkubation.....	57

5.7	Blocken.....	61
5.8	Bestimmung des Cut-off.....	63
5.9	Bestimmung von Nachweisgrenzen .....	64
5.10	Spezifität und Kreuzreaktivität der einzelnen Antikörper.....	66
5.10.1	Ovalbumin (#AB1225) und Phosvitin (#SC-46681).....	68
5.10.2	Kasein (#RCAS-10A).....	71
5.10.3	Kollagene (# ab34710, #T89171R und Störkollagen AIS2006) .....	73
5.10.4	Pflanzengummen (#JIM13, #MAC207, #MAC265).....	77
5.11	Zusammenfassung und Diskussion .....	82
5.12	Optimierte indirekte ELISA Methode zur Untersuchung von realem Probenmaterial (Protokoll) .....	87
<b>6</b>	<b>Anwendung der ELISA Methode an definierten Probekörpern .....</b>	<b>89</b>
6.1	Probetafel mit Fassungs Aufbau – Versuche zum Nachweis unterschiedlicher Proteine innerhalb einer Probe .....	89
6.2	Fassungsproben einer Referenzsammlung – Nachweis von Proteinen an Blindproben .....	93
6.3	Künstlich gealterte Fassungsproben – Nachweis von Proteinen an gealterten Proben.....	95
6.4	Zusammenfassung und Diskussion .....	99
<b>7</b>	<b>Anwendung der ELISA Methode an realem Probenmaterial; Fallbeispiele.....</b>	<b>102</b>
7.1	Untersuchung zu Binde- und Klebemitteln an verschiedenen Möbeln in Boule-Technik .....	102
7.2	Untersuchung von Streichinstrumentenlacken .....	105
7.3	Verzierte Stangentuschen (Ink sticks) – Untersuchung der Binde- und Anlegemittel .....	112
7.4	Polychrome Holzskulptur (Italien, 13. Jh.) – Untersuchung der Binde- und Anlegemittel von Grundierung und Metallauflagen.....	115
7.5	Polychrome hölzerne Raumaustattung aus Syrien - Systematische Untersuchung der Bindemittel.....	118
7.6	Fragmente polychromer antiker Steinstatuen – Untersuchung der Bindemittel .....	123
7.7	Untersuchung zu Fixativen an Pastellgemälden (18. Jh.).....	126
7.8	Zusammenfassung und Diskussion .....	132
<b>8</b>	<b>Versuche zur Lokalisierung der Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) .....</b>	<b>136</b>
8.1	Prinzip: indirekte IFM .....	136
8.2	Durchführung .....	138
8.3	Versuche an definierten Probekörpern .....	138

---

8.4	Ergebnisse und Diskussion .....	143
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>146</b>
<b>10</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>153</b>
10.1	Literaturverzeichnis .....	153
10.2	Abbildungsverzeichnis .....	171
10.3	Tabellenverzeichnis .....	172
10.4	Diagrammverzeichnis .....	176
10.5	Abbildungs- und Tabellennachweis .....	177
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>179</b>



## Abkürzungen

ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AD	Anno Domini (lateinisch für nach Christi Geburt)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (abgeschwächte Totalreflexion)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CP	Carbonatpuffer
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTIR	Fourier-Transform Infrarotspektroskopie
GAMs	<i>goat-anti-mouse</i>
GARb	<i>goat-anti-rabbit</i>
GARt	<i>goat-anti-rat</i>
GC/MS	Gaschromatographie Massenspektrometrie
Hg.	Herausgeber
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MALDI-MFP	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass-Fingerprinting</i>
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight Mass Spectrometry</i>
MMA	The Metropolitan Museum of Art
MS	Massenspektrometrie
Ms	<i>mouse</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Parallelen
NCS	<i>newborn calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
ng	Nanogramm

---

nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PLM	Polarisationsmikroskopie
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PO	Peroxidase
PS	Polystyrol (oder: Polystyren)
PT	Probetafel
PVC	Polyvinylchlorid
Py-GC/MS	Pyrolyse – Gaschromatographie Massenspektrometrie
Rb	<i>rabbit</i>
RT	Raumtemperatur
Rt	<i>rat</i>
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
Rcf	<i>relative centrifugal force</i> (siehe RZB)
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM/EDX	<i>Scanning Electron Microscope - energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> (Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie)
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i> (Spektroskopie mit oberflächenverstärkter Raman-Streuung)
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochloridpuffer
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht
VT	Volumenteile
w/v	<i>weight/volume</i>
w/w	<i>weight/weight</i>
µg	Mikrogramm

## **I Allgemeiner Teil**

Im allgemeinen Teil wird in die Thematik der vorliegenden Arbeit eingeführt, die Problemstellungen zusammengefasst und die Ziele der Arbeit definiert. Nach einem kurzen Überblick über Analysemethoden zur Untersuchung von proteinhaltigen Bindemitteln, mit besonderem Augenmerk auf die immunologischen Nachweisverfahren, folgt eine Vorstellung und Zusammenfassung der für die Arbeit relevanten Bindemittel aus der Literatur, hinsichtlich ihres Aufbaus, Eigenschaften und historischer Verwendung. Abschließend erfolgt eine Einführung in die Immunologie und die damit verbundenen theoretischen Grundlagen zur Wirkungsweise, Struktur, Zusammensetzung und Herstellung von Antikörpern sowie eine Vorstellung der wichtigsten Assaykonzepte.

# 1 Einführung

Materialkundliche Untersuchungen mit naturwissenschaftlichen Methoden sind unverzichtbarer Bestandteil moderner Konservierungswissenschaften. Oftmals sind ihre Ergebnisse eine wichtige Voraussetzung zur Erkenntnis der Erhaltungsbedingungen, der Schadensfaktoren, der Schadenprozesse und ihrer Dynamik. Die Materialidentifizierung kann Auskunft darüber geben, welches Material, zu welcher Zeit, an welchem Ort oder von welchem Künstler Verwendung fand (Keck & Peters 1969). Daraus lassen sich Rückschlüsse auf dessen Verbreitung, individuelle Vorlieben und Handelsbeziehungen zwischen Städten, Ländern oder Kulturen ziehen. Sie können aber auch dazu beitragen, Herstellungstechniken und Arbeitsweisen eines Künstlers, einer Schule oder Epoche aufzudecken. Als Beispiel sei hier die Ablösung der Eitemperamalerei durch die Ölmalerei in der 2. Hälfte des 15. Jahrhunderts in Italien genannt, die eine bedeutende Änderung in der Mal- und Herstellungstechnik markiert (Dunkerton 1997; Higgitt & White 2005). Die Kenntnis über die verwendeten Materialien kann zudem hilfreich bei der Datierung und Überprüfung der Echtheit (Authentizität) eines Objektes sein. Zum Beispiel gibt es Pigmente, deren Verwendung auf einen bestimmten Zeitraum begrenzt ist, oder die erst ab einem bestimmten Zeitpunkt aufkamen. Blei-Zinngelb beispielsweise ist nur bis ins 18. Jahrhundert belegt (Kühn 1988), wohingegen Berliner Blau erst ab 1706 aufkommt (Bartoll 2008). Durch ihren Nachweis können in Verbindung mit anderen Informationen, Rückschlüsse auf die Entstehungszeit und/oder Echtheit eines Objekts gezogen werden. Die Interpretation von Analyseergebnissen setzt umfangreiche Kenntnisse zur Herstellungstechnik sowie Beschaffenheit, Vorkommen und Alterung von Materialien voraus. In Zusammenarbeit mit Kunsthistorikern, Restauratoren und Naturwissenschaftlern ist im Idealfall dann die Erhaltung und Restaurierung von Kunstobjekten wesentlich effektiver möglich (Walch 1997). Die Materialidentifizierung gewinnt daher mehr und mehr an Bedeutung und somit steigt auch die Nachfrage nach analytischen Verfahren zur Untersuchung und Erhaltung von Kunstwerken.

Organische Naturstoffe bilden eine bedeutende Materialgruppe bei der Untersuchung von Kunstobjekten. Sie werden seit Menschengedenken nicht nur als Nahrungs-, Kleidungs- und Baustoffquellen sondern auch als Bindemittel, Klebstoffe oder Überzüge verwendet. Als Bindemittel gemischt mit Pigmenten sind sie die Basis für Farben, als Klebstoff fügen sie die unterschiedlichsten Materialien fest zusammen, und als Überzug schützen sie darunterliegenden Malschichten und Materialien.<sup>1</sup> Erste Zeugnisse menschlicher Malerei finden sich in erhaltenen Höhlenmalereien (Mirimanow 1973; Wehlte 2005). Die Gruppe der natürlichen Bindemittel umfasst

---

<sup>1</sup> in der Folge vereinfacht unter dem Bindemittel zusammengefasst

neben trocknenden Ölen, tierischen Fetten, Wachse und Harze, vor allem die hier relevanten Proteine (u.a. Ovalbumin, Kasein, Kollagen) und Pflanzengummen (u.a. Gummi arabicum, Tragant) (Schramm & Hering 1995).

Die Untersuchung von Proteinen und Gummen an Kunstobjekten stellt eine große Herausforderung dar, da es sich um komplexe Stoffgemische mit schwankender Zusammensetzung handelt, die mit der Zeit Veränderungen unterliegen (Jones 1962). Schon während der Aufbereitung der natürlichen Materialien durch den Künstler oder Handwerker werden Proteine denaturiert (Herauslösen aus der biologischen Matrix, Schlagen, Mischen, Erhitzen, Trocknen, Zugabe von Säuren oder Laugen) (Karpowicz 1981; Baumer et al. 2009). Sie können allein, untereinander gemischt und in Kombination mit anderen Materialien wie Harze, Öle und Pigmente etc. verwendet werden. Im Laufe der Zeit folgen weitere Veränderungen durch atmosphärische (Wärme, Licht, Feuchtigkeit, Umwelteinflüsse), biogene (Biodeterioration) und anthropogene (Restaurierungsmaßnahmen) Einflüsse sowie chemische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Materialien (Karpowicz 1981; Mills & White 1994; Schilling & Khanjian 1996a-b).

Kunstobjekte weisen selten nur ein Bindemittel auf; vielmehr finden mehrere oder Bindemittelgemische Anwendung (Colombini & Modugno 2004). Das ist zum einen abhängig von der Intention und Vorliebe des Künstlers, wird aber darüber hinaus von der Migration zwischen benachbarten Schichten, sowie der Penetration von später eingebrachten Restaurierungsmaterialien beeinflusst. Diese Faktoren machen es oft unmöglich, einzelne Schichten zu isolieren und erschweren somit die Zuordnung der Bindemittel im stratigraphischen Aufbau eines Kunstwerkes. Das Bindemittel liegt zudem in der Regel nur in geringen Konzentrationen vor und ist oftmals in einer komplexen festen Matrix eingebunden (Colombini & Modugno 2004). Die wohl größte Herausforderung bei der Analyse von Proteinen und Gummen in der Konservierung/Restaurierung bleibt aber, neben der Materialvielfalt und der fortschreitenden Alterung, die Begrenzung durch das Probenmaterial (Doménech-Carbó 2008). Der unschätzbare historische Wert von Kunst und Kulturgut lässt oft - wenn überhaupt - nur die Entnahme sehr geringer Probenmengen zu, was eine stetig steigende Anforderung an die Empfindlichkeit der Untersuchungsmethoden stellt.

Immunologische Methoden aus dem Bereich der medizinischen und biologischen Forschung beruhen auf der spezifischen Reaktion von Antigenen und Antikörpern und zeichnen sich vor allem durch eine relativ einfache Handhabung, minimale Probenaufbereitung und hohe Empfindlichkeit aus (Heginbotham et al. 2006). Sie können auch in komplexen Mischungen zwischen einzelnen Proteinen unterscheiden und lassen mit geeigneten Antikörpern auch artspezifische Aussagen zu. Das Potential

immunologischer Methoden für die Bindemittelanalytik ist seit längerem bekannt (Andreiew 1927; Jones 1962; Johnson & Packard 1971; Talbott 1982), doch erst durch die Weiterentwicklung und Verbesserung der verwendeten Materialien und Reagenzien in Bezug auf ihre Spezifität, Stabilität und Wirtschaftlichkeit rücken sie seit einiger Zeit wieder in den Fokus (Heginbotham et al. 2006; Mazurek 2006; Vagnini et al. 2008; Klausmeyer 2009a/b; Cartechini et al. 2010). Besonders hervorgeraten haben sich dabei der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM). Während ELISA die Proteine innerhalb der ganzen Probe – ohne Bezug zur räumlichen Verteilung - nachweist, ermöglicht IFM eine Lokalisierung der gesuchten Proteine am Anschliff. Trotzdem gibt es bisher nur wenige systematische Untersuchungen zu diesem Thema und die Literatur hinsichtlich ihrer Verwendung in der Konservierung/Restaurierung ist begrenzt. Das Fehlen einer einheitlichen Methodik für den Einsatz von immunologischen Methoden im Bereich der Bindemittelanalytik/Kunsterhaltung macht einen Vergleich der bisherigen Ergebnisse schwierig.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Ergebnissen der Master-Thesis der Autorin (Schultz 2006). Dort wurden immunologische Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen erfolgreich zur Identifizierung von proteinischen Bindemitteln adaptiert. Erstmals in diesem Kontext wurde die Meerrettich Peroxidase (HRP, von engl. *horseradish peroxidase*) als Markerenzym für die ELISA Technik verwendet. Darüber hinaus wurde in Ermangelung tierartspezifischer Antikörper die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Störkollagen in Auftrag gegeben. Erste Versuche zur Spezifität der Analytik waren äußerst vielversprechend; eine abschließende Überprüfung sämtlicher Parameter war innerhalb des begrenzten Zeitrahmens der Master-Thesis nicht möglich. Die Arbeit zeigte, dass die immunologische Nachweismethodik grundsätzlich für die Erfassung von Ei, Kasein und Störkollagen an Proben von Kunstobjekten geeignet ist und ebnete damit den Weg für die hier nachfolgenden systematischen Untersuchungen zur Optimierung und Erweiterung der Methoden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Anwendung einer ELISA-*Screening*-Methode zur Identifizierung der vier gebräuchlichsten natürlichen Bindemittel Ei, Kasein, tierischer Leim und Pflanzengummen an Kunst und Kulturgut. Die Möglichkeiten artspezifischer Untersuchungen werden überprüft und diskutiert. Abschließend wird der Einsatz der Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung von Proteinen am Anschliff erprobt und bewertet. Ziel der Arbeit ist es, Möglichkeiten und Grenzen der immunologischen Methoden zu bestimmen, die dabei ablaufenden Prozesse möglichst gut zu verstehen und die Arbeitsabläufe zu standardisieren, so dass zuverlässige Methoden zur Identifizierung von Proteinen und Gummen gewonnen werden.

## 2 Nachweis von Proteinen und Gummen an Kunst und Kulturgut – Stand der Forschung

Derzeit gängige Methoden zur Untersuchung von proteinhaltigen Bindemitteln sind neben mikrochemischen vor allem spektroskopische und chromatographische Verfahren (Doménech-Carbó 2008). Hier sind vorrangig Fourier Transform Infrarotspektroskopie (FTIR), Gaschromatographie Massenspektrometrie (GC/MS) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu nennen, die alle verschiedene analytische Vor- und Nachteile aufweisen. Diese komplexen Verfahren sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher erläutert werden. Doménech-Carbó (2008) listet eine umfangreiche Zusammenfassung der gebräuchlichsten Nachweismethoden auf.

Mikrochemische Methoden wie beispielsweise histochemische Anfärbungen nutzen die Affinität spezifischer funktioneller Gruppen für bestimmte Farbstoffe (charakteristische Anfärbungen), wodurch die Differenzierung einiger organischer Verbindungen, wie z.B. Proteine und Öle, möglich ist (Doménech-Carbó 2008). Die Methode ist mit vergleichsweise geringem Aufwand durchführbar und ermöglicht eine Lokalisierung des Bindemittels in der Probe am An- oder Dünnschliff. Jedoch ist diese Technik durch ihre geringe Spezifität limitiert und funktioniert oftmals nicht mit denaturierten Proteinen (Baumer et al. 2009). Eine Unterscheidung der Proteine ist nicht möglich (Doménech-Carbó 2008).

Bei der Untersuchung mit FTIR werden die funktionellen Gruppen in einer Verbindung durch IR Strahlung zu Schwingungen angeregt. Die Detektion der erfolgten Absorption wird im IR-Spektrum abgebildet. Durch den Vergleich mit Referenzspektren ist der Nachweis von Proteinen und Gummen möglich. Allerdings kann bei komplexen Materialmischungen die Interpretation der FTIR-Spektren sehr schwierig sein und die Unterscheidung zwischen Ei, tierischem Leim und Kasein ist nur in wenigen Fällen möglich (Ramirez-Barat & De la Viña 2001; Colombini & Modugno 2004; Paris et al. 2005). Da gleichzeitig alle in der Probe enthaltenen Verbindungen analysiert werden, bietet FTIR die Möglichkeit weitere organische und anorganische Materialien nachzuweisen (Nevin et al. 2007). Die Vielzahl der dabei erhaltenen Absorptionsbanden erschwert aber die Interpretation der Ergebnisse (Schramm & Hering 1995). Andere Verfahren wie GC/MS oder HPLC erlauben es, einzelne Proteine und Gummen qualitativ und quantitativ zu identifizieren (Halpine 1992; Grzywacz, 1994; Ronca 1994; Mills & White 1994; Schilling & Khanjian 1996 a-c; Fiedler 2001; Chiavari et al. 2003; Tokarski et al. 2003; Andreotti et al. 2006). Sie beruhen auf dem Nachweis des Aminosäurespektrums, das jedoch durch mikrobiellen Befall und Degradation der Proteine verändert werden kann und die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigt

(Karpowicz 1981; Mills & White 1994; Doménech-Carbó 2008). Die Identifizierung von Proteinmischungen oder eine tierartenspezifische Identifizierung der Proteine ist nicht möglich. Während FTIR nur geringe Mengen an Probenmaterial für die Untersuchung benötigt, sind die gewonnenen Erkenntnisse begrenzt. GC/MS und HPLC Analyse sind spezifischer, erfordern in der Regel aber größere Probenmengen als FTIR, was je nach Objekt nicht immer vertretbar ist. Grundsätzlich sind diese Verfahren mit einem hohen Investitions- und Zeitaufwand verbunden und oft für kleine und mittlere Museen nicht zugänglich. Die Interpretation der Ergebnisse erfordert große Erfahrung, auch in Bezug auf den Umgang mit den Geräten und kann nur von Fachleuten ausgeführt werden. Neuere kombinierte Techniken wie MALDI-TOF-MS oder LC-MS/MS, die unter dem Sammelbegriff Proteomik zusammengefasst werden, zeigen vielversprechende Ansätze und Ergebnisse für die Identifizierung von Proteinen, doch sind sie extrem aufwendig und zählen noch nicht zu den gebräuchlichen Methoden in der Restaurierung (Hynek et al. 2004; Tokarski et al. 2003, 2006; Kuckova et al. 2005, 2009; Fremout et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle Methoden zur Untersuchung von Proteinen und Gummen an Kunst und Kulturgut häufig durch Probengröße, Materialmischungen und –Degradation sowie mikrobiellen Befall limitiert sind.

Immunologische Verfahren, die auf der Bindung von Antigenen mit Antikörpern beruhen, sind seit dem frühen 20. Jahrhundert aus dem Bereich der Medizin bekannt (Arrhenius 1907). Aber erst die Einführung radioaktiver Isotope in den 60er Jahren (Berson & Yalow 1959; Ekins 1960) und die enzymatische Markierung der Antikörper Anfang der 70er Jahre (Engvall & Perlmann 1971), führten zum Durchbruch der immunologischen Verfahren. Heute sind sie fester Bestandteil in der modernen biomedizinischen Forschung wie auch in der Routinediagnostik. Sie werden insbesondere in Bereichen genutzt, in denen kleine Moleküle oder einzelne Proteine nachgewiesen werden sollen. Typische Anwendungen sind beispielsweise Schwangerschafts- und Drogentests (Nachweis eines spezifischen Moleküls), HIV Test, Blutgruppenbestimmung oder die Diagnose und Behandlung von Krebs (einzelne Proteine) (Campbell 1998; Madigan et al. 2001). Darüber hinaus finden sie mittlerweile auch Anwendung in der Lebensmittelforschung, Landwirtschaft oder Forensik (Panheleux et al. 2000; Watanabe et al. 2005; Sensabaugh et al. 1971), aber auch zum Nachweis von Mikroorganismen an Kunstobjekten (Rolfes 1991; Möhlenhoff 2002; Reichmann 2003; Leupold 2006).

Bis vor ein paar Jahren hat sich die Anwendung von immunologischen Methoden in der Konservierung/Restaurierung weitgehend auf den Bereich der Archäologie beschränkt. Seit etwa 1980 sind zahlreiche immunologische Untersuchungen bekannt, die sich mit



der Spezies spezifischen Identifizierung von archäologischen Knochenfunden und deren Überresten, Blutresten an Artefakten (z.B. Steinwerkzeuge) oder Blut als Bindemittel für Farben beschäftigten (u.a. Lowenstein 1980, 1999, 2006; Ascenzi et al. 1985; Hyland et al. 1990; Cattaneo et al. 1990, 1992a-b; Scott et al 1996; Parsche & Nerlich 1997). Oftmals sind die Ergebnisse aber äußerst widersprüchlich bzw. nicht reproduzierbar, so dass ihr Aussagewert kritisch betrachtet werden muss.

Erst durch die Weiterentwicklung und Verbesserung der verwendeten Materialien und Reagenzien in Bezug auf ihre Spezifität und Stabilität folgten Ende der 1980er Jahre bedeutende Arbeiten zur Untersuchung von Bindemitteln an Kunstobjekten. Wolbers (1988) gelang es erstmalig eine dünne Schicht Albumin mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) an Proben von Gemälden um die Jahrhundertwende des 19. Jahrhunderts mit Rhodamin markierten Antikörpern nachzuweisen. Er empfahl, das Ergebnis mit anderen Methoden bestätigen zu lassen, um mögliche unspezifische Bindungen ausschließen zu können. Erst im darauffolgenden Jahr wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie systematisch zur Identifizierung von Ovalbumin in Bindemitteln untersucht. Kockaert et al. (1989) wendeten das Verfahren erfolgreich an Anschliffen von natürlich und künstlich gealterten Referenzproben sowie realem Probenmaterial von mehreren Gemälden und Skulpturen aus dem 12.-20. Jahrhundert an. Sie beobachteten Schwierigkeiten bei der Visualisierung positiver Ergebnisse, wenn der Fluoreszenzfarbstoff und die zu untersuchende Malschicht ähnliche Farbigkeit besaßen, die Materialien der Malschichten eine Autofluoreszenz aufwiesen, oder wenn die Probe ein poröses Gefüge war, was zu unspezifischen Fluoreszenzen durch unspezifische Anlagerung von Antikörpern führen kann. Abschließend hielten die Autoren fest, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse oftmals problematisch sei, und dass Negativergebnisse nicht unbedingt bedeuten, dass das gesuchte Protein nicht vorhanden ist, sondern lediglich nicht gefunden wurde.

Ramirez-Barat & De la Viña (2001) machten wesentliche Fortschritte bei der Anwendung der Immunfluoreszenzmikroskopie an Anschliffen. Anhand im Labor hergestellter Malschichtproben wurden unterschiedliche Einbettharze, Blockpuffer und anderen verfahrenstechnische Schritte evaluiert. Sie schlagen eine Vorbehandlung der Proben mit Trypsin (Protease Enzym) vor, um die Zugänglichkeit gealterter Proteine zu verbessern, und verweisen auf die Verwendung eines Blockpuffers zur Reduktion unspezifischer Bindungen/Fluoreszenz. Trotz des erfolgreichen Nachweises von Ovalbumin an den frischen und künstlich gealterten Referenzproben, weisen sie - ähnlich wie Wolbers & Landrey (1987) - ausdrücklich auf die Problematik des Herauswaschens von wasserlöslichen Stoffen aus den Proben hin. Verschiedene Versuche zur Fixierung oder Imprägnierung der Proben schlugen aber letztlich fehl.

Erstmalig Erwähnung findet hier die Möglichkeit Gummi arabicum an Kunst und Kulturgut mit immunologischen Methoden nachzuweisen.

Besonderer Bedeutung kommt den systematischen Untersuchungen zur Anwendung immunologischer Methoden von Hodgins & Hedges (1998, 1999, 2000) sowie Hodgins (1999) zu. Sie untersuchten mittels der ELISA Technik die Möglichkeiten und Grenzen durch Antikörper artspezifische Kollagene - sowohl in archäologischen Knochenfunden als auch historischen Leimen - zu unterscheiden. Ihre Arbeiten demonstrieren, dass kollagenspezifische Antikörper zur Identifizierung von historischen Leimen angewendet werden können, aber dass nur begrenzte artspezifische Informationen in archäologischen Artefakten bewahrt werden (1998). Sie verweisen bei den kommerziellen Kollagen-Antikörpern auf hohe Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Spezies, insbesondere zwischen Hornträgern (Rinderartige). Mit hoch aufgereinigten Antikörpern stellten sie fest, dass einer der untersuchten kommerziellen Hasenhautleime, nicht aus Hasen, sondern höchstwahrscheinlich aus Haut von Rinderartigen hergestellt worden ist (→ Kap. 5.10.3). Sie beobachteten darüber hinaus, dass bei der Verwendung aufgereinigter bzw. artspezifischer Antikörper die Immunreaktivität mit zunehmendem Alter der Proben abnimmt (1999). Hodgins & Hedges (2000) untersuchten erstmalig den Einfluss von Pigmenten auf die Immunreaktivität von Proteinen am Beispiel von Kollagen. Bei der Verwendung eines polyklonalen artunspezifischen Kollagen-Antikörpers kam es bei sieben ausgewählten Pigmenten, lediglich bei Grünspan zu einer verringerten Reaktivität. Demgegenüber stellten sich die Ergebnisse der Immunreaktivität mit einem rinderspezifischen Kollagen-Antikörper bei gleichem Versuchsaufbau abweichend dar. Ultramarin, Azurit, Grünspan schienen die immunologische Reaktivität zu stören bzw. zu zerstören; Zinnober und Bleiweiß zeigten keine Effekte und Siena sowie Auripigment schienen die Reaktivität noch zu erhöhen. Die Immunreaktivität scheint daher stark von den verwendeten Pigmenten abhängig zu sein, was zur Folge hat, dass eine quantitative Analyse von Proteinen in Malschichtproben problematisch ist. Ähnliche Erkenntnisse zu den Wechselwirkungen zwischen Pigmenten und Bindemitteln sind auch bei Klausmeyer (2009a) und Cartechini et al. (2010) zu finden. Der Einfluss von Pigmenten auf das gewählte Detektionssystem (Enzym/Substrat) wurde bisher nicht berücksichtigt (→ Kap. 6.3).

Die Arbeit von Heginbotham et al. (2006) lieferte eine umfassende Zusammenfassung der immunologischen Grundlagen und die Anwendung entsprechender Verfahren in der Konservierung/Restaurierung. Sie verwiesen auf die Schwierigkeit instrumenteller Verfahren, innerhalb komplexer mehrschichtiger Proben verschiedene Proteine eindeutig zu identifizieren und darüber hinaus bestimmten Schichten zuzuordnen zu können. Daher schlagen die Autoren ELISA und IFM als Ergänzungstechniken zu den traditionellen Verfahren der Bindemittelanalytik vor. Die beiden Techniken wurden

erfolgreich zur Identifizierung einer extrem dünnen transparenten Eiklarschicht in einer mehrschichtigen Probe von einem bedeutenden Kabinettschrank aus dem 17. Jahrhundert aus der Sammlung des Jean Paul Getty Museums herangezogen. Durch die Identifizierung konnten Rückschlüsse auf die Funktion dieser Schicht im Probenverbund gezogen werden. Sie diente vermutlich zur Versiegelung der Temperagrundierung, um die darüber liegenden, ölgebundenen Farbschichten vor dem Eindringen zu bewahren. Verschiedene Techniken zur Reduzierung des Quellverhaltens und/oder Auswaschen von Malschichten für die IFM Untersuchungen wurden evaluiert, ohne dass das Problem jedoch gelöst werden konnte. Schultz (2006) schlug zur Reduktion der Autofluoreszenz von Materialien, insbesondere von Kreidegrundierungen, die Vorbehandlung der Anschliffe mit einem Komplexbildner (EDTA) vor. Dadurch konnten in Einzelfällen überschüssige Metallionen (z.B. Ca-Ionen) in einem Chelatkomplex gebunden und so die (unerwünschten) chemischen Eigenschaften von Metallionen (Autofluoreszenz) maskieren werden.

Ermutigt durch die vielversprechenden Ergebnisse von Heginbotham et al. (2006) entstanden in der Folge die wohl bisher umfassendsten Arbeiten zum Einsatz von ELISA und IFM an Kunst und Kulturgut. Mazurek (2006) und Mazurek et al. (2008) führten umfangreiche ELISA Versuche an einer Vielzahl von Materialien durch und entwickelten die erste ELISA *Screening*-Methode zur Untersuchung von Bindemitteln an Proben von Kunstobjekten. Der Assay umfasst den Nachweis von Ovalbumin (Eiklar), Phosvitin (Eigelb), Kasein, Kollagen und Gummen. Alle verwendeten Antikörper wurden anhand einer Vielzahl unpigmentierter Referenzmaterialien auf ihre Spezifität und mögliche Kreuzreaktivität hin untersucht und ihre Nachweisgrenzen bestimmt. Begleitet wurden die Untersuchungen an verschiedenen Fallbeispielen durch zusätzliche GC/MS Analysen (Mazurek 2006, 2010; Scott et al. 2009). Eher ernüchternd sind dagegen die Ergebnisse von Porter (2007) zur Untersuchung von Wandgemäldeproben aus den Mogao Grotten in Dunhuang, China (6. Jh. AD) mittels der ELISA *Screening*-Methode von Mazurek (2006). Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit der Verwendung von organischen Bindemitteln, basierend auf kunsthistorischen Aspekten (Art der Malerei) und den Ergebnissen ergänzender instrumenteller Analysen, konnte in nur drei von neununddreißig untersuchten Originalproben Kollagen nachgewiesen werden. Porter schreibt das vor allem den Problemen bei der Extraktion und Aufreinigung der Proben, sowie den Auswirkungen der Proteindegradation zu. Diesbezüglich zeigten ELISA Untersuchungen am Getty Conservation Institute (GCI) anhand von künstlich gealterten, nicht pigmentierten Proben, dass die Immunreaktivität von Proteinen bei künstlicher Alterung und hoher Luftfeuchtigkeit (69 - 75 % RH) drastisch abnimmt, während der Einfluss von niedriger (20 - 25 % RH) oder schwankender Luftfeuchtigkeit (12 - 85 % RH) geringere Auswirkungen zeigte (Mazurek & Porter 2009; Cartechini et al. 2010). In diesem

Zusammenhang beschäftigte sich Klausmeyer (2009a) mit der Auswirkung künstlicher Alterung auf Fassungsproben und untersuchte den Einfluss von 21 Pigmenten auf den Nachweis von Ovalbumin, Kasein, Kollagen und Pflanzengummen. Trotz eindeutiger Abnahme der Immunreaktivität gealterter Fassungsproben waren alle Proteine und Gummen noch nachweisbar.

Sämtliche relevanten Publikationen der jüngeren Vergangenheit zur ELISA Technik auf dem Gebiet der Konservierung/Restaurierung basieren auf der Markierung der Antikörper mit der Alkalischen Phosphatase (AP). Dabei wurden oftmals erhöhte unspezifische Bindungen der Antikörper festgestellt, die zu einem hohen Cut-off führten und das Risiko von falsch-negativ Ergebnissen erhöhen. Schultz (2006) zeigte hingegen, dass bei der Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (HRP) als Markerenzym zum Nachweis von Proteinen an Kunstobjekten die unspezifischen Bindungen äußerst gering sind. HRP zeichnete sich zudem durch ihre hohe Enzymaktivitätsrate (starkes Signal in kurzer Zeitspanne) und hohe Reproduzierbarkeit aus, was auf eine hohe Stabilität hindeutet.

Abschließend ist nochmals darauf hinzuweisen, dass die hier beschriebenen immunologischen Methoden bisher auf den Nachweis von Proteinen und Gummen beschränkt sind, so dass andere analytische Verfahren (z.B. FTIR, GC/MS) notwendig sind, um Proben auf weitere Inhaltsstoffe zu untersuchen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass immunologische Verfahren in der jüngeren Vergangenheit gezeigt haben, dass sie eine Alternative zu den bisherigen Verfahren zur Untersuchung von Proteinen und Gummen sein können. Daher verdienen diese Methoden mehr Aufmerksamkeit und eine intensivere Beschäftigung, da sie Potential für wichtige, neue Untersuchungsansätze bieten.

### 3 Bindemittel

Unter Bindemittel versteht man im Allgemeinen klebende Stoffe, die in Form von Lösungen, Emulsionen oder Dispersionen vorliegen und an der Luft zu einem Film aufrocknen (Bartl et al. 2005). Von der Antike bis zur Neuzeit finden ausschließlich die natürlichen Bindemittel Anwendung. Dabei handelt sich um eine umfangreiche Stoffgruppe chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen. Während man bei Ölen, Wachsen und Harzen von nicht-wässrigen natürlichen Bindemitteln spricht, gehören Proteine und Pflanzengummen zu den wässrigen natürlichen Bindemitteln (Doerner 2011). Ab dem frühen 19. Jahrhundert kommen die synthetischen Bindemittel auf Naturstoffbasis dazu, die die natürlichen Bindemittel in vielen Bereichen allmählich verdrängen (Kühn 1974). Ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich aber grundlegend von denen der natürlichen Bindemittel, weshalb hier nicht näher auf sie eingegangen wird.

Bindemittel können allein, untereinander gemischt und in Kombination mit anderen Materialien und Zusätzen wie Pigmenten, Lösemitteln, Tensiden, Weichmachern etc. verwendet werden (Colombini & Modugno 2004). Dadurch sind ihre Arbeits- und Materialeigenschaften gezielt veränderbar (u.a. Glanzgrad, Deckvermögen, Konsistenz, Trocknungsgeschwindigkeit, Härte, Klebkraft, Haltbarkeit) und unerwünschte mögliche Wechselwirkungen mit anderen Materialien vermeidbar (Wehlte 2005). So empfahl bereits Cennino Cennini in seinem *Libro dell'Arte* im 15. Jahrhundert Lapis Lazuli, aber vor allem kupferhaltige Pigmente wie Azurit und Grünspan mit tierischem Leim anzureiben, da diese Pigmente mit ölhaltigen Bindemitteln ihren optischen Eindruck nachteilig verändern (Raft 1982). Mischungen können daher bewusst durch den Künstler, aber auch durch Migration/Penetration benachbarter Schichten oder durch das Einbringen von Konsolidierungsmitteln während einer Konservierung/Restaurierung entstehen. Die Verarbeitung erfolgt nach handwerklichen Regeln und unterliegt somit oft subjektiven Faktoren. Identische Materialien können je nach Verarbeitung und Auftragsart unterschiedliche Wirkungen hervorbringen (Schramm & Hering 1995). Wertvolle Hinweise über Bindemittel finden sich in zahlreichen Quellschriften, Traktaten und Anweisungen von der Antike bis heute. Sie geben Aufschluss über Einsatzgebiete, Techniken, einzelne Arbeitsschritte und Rezepturen. Dennoch ist eine kritische Auseinandersetzung mit diesen Quellen unter Berücksichtigung der zeitlichen und regionalen Einordnung, Vorlieben, Materialverfügbarkeit und Kosten stets notwendig.

### 3.1 Proteinhaltige Bindemittel an Kunst und Kulturgut

Proteinhaltige Bindemittel sind natürliche, organische Verbindungen. Dabei handelt es sich um klebrige Substanzen, die aus in Wasser kolloidal gelösten natürlichen Substanzen bestehen (Florian 2007). Blut, Ei, Milch und tierische Leime<sup>2</sup> zählen zu den bekanntesten Vertretern proteinischer Bindemittel. Sie werden aus Tieren oder Tierprodukten gewonnen und setzen sich u.a. aus Proteinen zusammen. Gummen hingegen sind Polysaccharide und werden aus Pflanzen gewonnen (Doerner 2011). Aufgrund ihres, wenn auch geringen, Proteinanteils (Glykoproteine) werden sie hier mit aufgeführt (→ Kap. 3.1.4).

Proteine sind Makromoleküle, die neben Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff auch Stickstoff und manchmal Schwefel enthalten (Doerner 2011). Grundbausteine der Proteine sind 20 proteinogene, d.h. proteinaufbauende  $\alpha$ -Aminosäuren, die über Peptidbindungen unter Abspaltung von Wasser (Polykondensation) zu Ketten verknüpft sind. Polypeptide mit mehr als 100 Aminosäuresequenzen werden Proteine genannt (Florian 2007). Die Primärstruktur der Proteine wird durch die Aminosäuresequenz bestimmt, durch die die Sekundär- und Tertiärstruktur festgelegt ist. Von ihr hängen alle Eigenschaften und Funktionen eines Proteins ab. Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung innerhalb einer Polypeptidkette. Durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken entstehen wendelartige Strukturen ( $\alpha$ -Helix) oder faltblattartige Formen ( $\beta$ -Faltblatt). Die räumliche Anordnung aller Polypeptidketten innerhalb eines Proteinmoleküls wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Sie entsteht durch Faltung der Peptidketten und wird durch intermolekulare Bindungen stabilisiert. Die Quartärstruktur legt die räumliche Anordnung mehrerer in Tertiärstruktur vorliegender Peptidketten in komplexe Proteineinheiten fest (Campbell 1998). Die Form, in die ein Protein sich in seiner natürlichen Umgebung faltet, wird als sein nativer Zustand bezeichnet.

Neben den sogenannten einfachen Proteinen gibt es die zusammengesetzten Proteine oder Proteide. Diese besitzen zusätzlich nicht-proteinische Komponenten wie Phosphorsäure, Kohlenhydrate (Glykoproteine), Fette (Lipoprotein) oder Nucleinsäuren (Nucleoprotein). Kasein (Milchprotein) und Phosvitin (Dotterprotein) zählen beispielsweise aufgrund ihres Phosphorsäuregehaltes zu den Phosphoproteiden (Buchholz 2003). Proteine werden aufgrund ihrer räumlichen Anordnung in faserartige Skleroproteine (z.B. Kollagen) und globuläre Sphäroproteine (z.B. Ovalbumin) eingeteilt (Campbell 1998).

---

<sup>2</sup> Der Begriff tierische Leime bezieht sich in der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf die kollagenbasierten tierischen Leime und nicht wie ebenfalls häufig gebräuchlich auf alle Bindemittel aus Tieren oder Tierprodukten (Kasein, Ei).

Die Anwendung proteinhaltiger Bindemittel an Kunst und Kulturgut ist so vielfältig wie ihre Eigenschaften und reicht von wasserunempfindlichem Kalkkasein in Wandmalereien bis hin zu wasserempfindlichen Verklebungen mit tierischem Leim oder Eitempera in der Malerei (Fiedler 2001). Als organische Reste von Verbrauchsgütern sowie in tierischen oder menschlichen Geweben kommen sie an archäologischen und ethnographischen Objekten vor. Als Beispiele seien hier Kasein von Milchresten in antiken Keramiken (Craig et al. 2003; Barnard et al. 2007) oder Blutreste an Steinwerkzeugen oder Knochenfunden (Eisele et al. 1995; Gerlach et al. 1996; Fiedel 1995) erwähnt. Darüber hinaus finden sie seit jeher große Anwendung in der Konservierung/Restaurierung als Klebe- und Bindemittel.

Proteinhaltige Bindemittel zeichnen sich durch relativ hohe Klebkraft bei langer Haltbarkeit, Reversibilität/Reaktivierbarkeit (tierische Leime), Witterungsbeständigkeit (Kalkkaseine) sowie zum Teil günstiges Viskosität- und Adhäsionsverhalten aus (Wehlte 2005). Da es sich um Naturprodukte handelt, war ihre Verfügbarkeit zeit- und kulturübergreifend in der Regel gesichert. Sie unterliegen, wie alle anderen Bindemittel auch, physikalisch-chemischen Veränderungen, was ihre ursprünglichen Eigenschaften beeinflusst und u.a. zur Verminderung der Klebkraft und Haltbarkeit oder zur Veränderung der Löslichkeit führen kann (Karpowicz 1981; Schilling & Khanjian 1996a-b; Florian 2007). Bereits während der Aufbereitung als Bindemittel z.B. durch Erhitzen, Schlagen oder Zugabe von Säuren oder Laugen werden die Proteine verändert (denaturiert) (→ Kap. 1). Dabei werden intermolekulare Bindungen gelöst; es kommt zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur, ohne dass sich die Reihenfolge der Aminosäuren (Primärstruktur) ändert (Buchholz 2003). Als Folge verliert das Protein seine native Konformation; man spricht von Denaturierung. Diese Denaturierungsprozesse können reversibel oder irreversibel sein (Campbell 1998). Eine partielle Denaturierung macht man sich bei der Herstellung und Verarbeitung von proteinischen Bindemitteln oftmals zu Nutze, um einen festen Ausgangsstoff in kolloidale Lösungen zu bringen (z.B. tierische Leime). Änderungen der Proteinstruktur sind unvermeidlich und bestimmte Abbauprozesse können durch Materialkombinationen, die Anwesenheit von Metallionen, wie sie in Pigmenten vorkommen, durch ungünstige Umgebungsbedingungen (Licht, Wärme, Luftfeuchtigkeit) oder durch mikrobielle Aktivität beschleunigt werden (Karpowicz 1981; Schilling & Khanjian 1996a-b; Mills & White 1994).

Die ursprüngliche Qualität und Eigenschaften eines Bindemittels werden primär vom Ausgangsprodukt und dessen Aufbereitung bestimmt. Selten wird dabei berücksichtigt, dass sich nicht nur die Lebensbedingungen der Tiere sondern auch die Produktionsbedingungen über die Jahrhunderte geändert haben. Die Herstellung tierischer Leime etwa ist heute nur noch ein Nebenprodukt viel größerer Industriezweige (Lebensmittel- oder Pharmaindustrie) (Wilde 2006). Diese

Massenprodukte können nicht deklarierungspflichtige Zusatzstoffe bzw. unterschiedliche Anteile an Zusatzstoffen enthalten (Wilde 2006), die zu Veränderungen der Eigenschaften proteinischer Bindemittel führen können. Heute ist es technisch möglich hochaufgereinigte Proteine mit zuverlässiger und reproduzierbarer Zusammensetzung und Qualität herzustellen, die auch tierartspezifische Identifizierungen zulassen; doch unterliegen proteinhaltige Restaurierungsmaterialien oftmals nicht diesen hohen Standards. Tierische Leime spiegeln die Schwierigkeit der Qualitätssicherung am besten wieder. Sie werden aus tierischem Gewebe hergestellt, enthalten verschiedene Proteine (Kollagen, Keratin, Elastin, Albumine und Globuline und weitere) und können zudem aus einer oder mehreren Tier- oder Gewebearten stammen (Florian 2007). Derzeit sind asiatische und südamerikanische Länder die Hauptproduzenten tierischer Leime (Wilde 2006), was die Frage nach der Vergleichbarkeit der verwendeten Ausgangsstoffe mit denen in Europa oder anderswo aufwirft. Selbst tierische Leime, die als „Hasenleim“ oder „Hausenblasenleim“ gekennzeichnet sind, können Proteine aus verschiedenen Tier- oder Gewebearten enthalten (Schellmann 2007), weshalb Qualitätssicherung oder auch tierartenspezifische Untersuchungen eher problematisch sind, ganz gleich ob es sich um historische oder moderne Leime handelt oder welche Nachweisttechnik eingesetzt wird (→ Kap. 3.1.3, → Kap. 5.10.3).

Hühnerei, Kasein, tierischer Leim und Pflanzengummen bilden den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Die Geschichte dieser Bindemittel, ihre vielfältige Anwendung sowie ihre Eigenschaften und chemischen Zusammensetzungen sind weitläufig bekannt und in der Literatur eingehend beschrieben (u.a. Mills & White 1994; Kühn 1974, 1988; Doerner 2011; Wehlte 2009; Florian 2007; Horie 2010; Burley & Vadehra 1989; Sutermeister & Brühl 1988; Willers 1980; Greber 2003; Smith & Montgomery 1959; Nussinovitch 2009). Daher folgt lediglich eine kurze Zusammenfassung zu den einzelnen Proteinen und Gummen.

### **3.1.1 Ei (Ovalbumin, Phosvitin)**

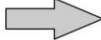

Eier bestehen neben der Schale aus Eiklar und Eidotter. Diese unterscheiden sich nicht nur optisch, sondern auch in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften deutlich voneinander (Phenix 1997).

Das Eiklar ist die schützende, gallertartige Flüssigkeit um den Dotter. Es besteht überwiegend aus Wasser und Proteinen, sowie geringen Mengen an Kohlenhydraten, Lipiden und Mineralstoffen (Kühn 1974). Die vorherrschenden Proteine im Eiklar sind Ovalbumin, Ovotransferrin, Ovomucoïd, Ovomuclin, Lysozym und Globulin (Burley &



Vadehra 1989; Stadelman & Cotterill 1995) (Tabelle 1). Eiklar wird aufgrund seiner weißen Farbe nach dem Kochen oder Schlagen auch als Eiweiß bezeichnet. Der Dotter aufgrund seiner Farbe auch Eigelb genannt, ist ein sehr komplexes, heterogenes Stoffgemisch und besteht hauptsächlich aus Wasser, Lipiden und Proteinen (Burley & Vadehra 1989). Die Proteine im Eigelb sind nicht identisch mit denen des Eiklars und setzen sich primär aus Lipoproteinen, Phosvitin, Lipovitellin und Livetin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , und andere) zusammen (Tabelle 1). Eigelb ist eine natürliche Wasser-in-Öl-Emulsion (Doerner 2011). Als Emulgatoren wirken Phospholipide und Lipoproteine. Die gelbe Eigenfarbe ist auf Carotinoide (Farbstoffe) zurückzuführen (Burley & Vadehra 1989).

**Tabelle 1:** Zusammensetzung von Ei (nach Burley & Vadehra 1989 und Stadelman & Cotterill 1995)

<b>Ei</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Gew. % des gesamten Eis</b>	<b>Proteine</b>	<b>Gew. % der Proteine im Ei</b>
Schale (~11 %)	Calciumcarbonat	94-97	Ovalbumin	54
	Weitere anorg. Salze	2	Ovotransferrin	12
	Org. Substanzen	3	Ovomucoid	11
Eiklar (~57 %)	Wasser	88-89	Ovomucin	3,5
	<u>Proteine</u>	<u>10-12</u> 	Lysozym	3,4
	Kohlehydrate	0,5	Globuline	8
	Lipide	0,02	Avidin	0,05
	Mineralstoffe	0,5	Sonstige	~ 9
Dotter (~32 %)	Wasser	47,5		
	Lipide	33	Lipoproteine	22
	<u>Proteine</u>	<u>17,4</u> 	Phosvitin	12
	Kohlehydrate	0,2	Lipovitellin	36
	Sonstige	~ 2	Livetin	30

Das Eiklar sollte vor der Verwendung zu Schaum geschlagen werden, damit es vernal- oder mischbar wird (Fiedler 2001). Als Bindemittel wird idealerweise erst die abgesetzte Eikläre verwendet. Die Haltbarkeit von frischem Eiklar ist begrenzt. Anfänglich ist es stark alkalisch (pH 9,5), fällt aber infolge mikrobieller Zersetzung innerhalb weniger Wochen auf ca. pH 6 (Bartl et al. 2005). Eiklar trocknet unter Verdunstung von Wasser spannungsreich auf (Doerner 2011). Die getrockneten Eiklarfilme sind zunächst noch wasserlöslich, werden aber bei der Alterung durch atmosphärische Einflüsse unlöslich (Kühn 1988). Sie neigen zum Verspröden, weshalb häufig Zusätze wie Honig, Kandiszucker oder Gummi arabicum zugegeben werden (Brachert 2001).

Eigelb und Vollei sind mit wässrigen Bindemitteln wie Gummen und tierischen Leimen, aber auch mit nicht-wässrigen Bindemitteln wie Ölen und Harzen mischbar. Daher zählen sie zu den klassischen Temperabindemitteln (Reinkowski-Häfner 1994).

Als Malmittel ist Eigelb sehr fett, trocknet zunächst physikalisch durch Wasserverdunstung auf und härtet bis zur Wasserunlösbarkeit durch chemische Veränderung aus (Kühn 1988). Der pH Wert von frischem Eigelb liegt bei pH 6 und steigt nur graduell mit der Zeit auf pH 6,4-6,9 (Stadelman & Cotterill 1995). Eihaltige Malmittel verderben schnell, weshalb sie häufig mit Alkohol, Knoblauch, Rosenwasser, Spiköl oder Campher konserviert werden (Brachert 2001).

Das Ei als Bindemittel nimmt einen großen Stellenwert in der Maltechnik ein, wohingegen es als Klebstoff eher ungeeignet ist. In der Malerei finden sowohl Eiklar und Eigelb, als auch das Vollei Verwendung. Neben Gummen, Bienenwachs, Feigenmilch und tierischen Leimen sind Eizusätze bereits in der antiken Wand- und Tafelmalerei zu finden (Doerner 2011). Schon Plinius der Ältere (1. Jh. n.Chr.) erwähnte in seinem naturwissenschaftlichen Werk *Naturalis historia* (Buch XXXIII, Kap. 20: 64) Eiklar als Anlegemittel für Vergoldungen auf Marmor (König 1989) (→ Kap. 7.6). Cennino Cennini (14/15. Jh) nennt es in seinem Werk *Libro dell' Arte* (Kap. 131) als Bindemittel für Poliment- und Bolusschichten (Verkade 1916). Darüber hinaus rät er für Vergoldungen auf Papier Gips und etwas Bleiweiß mit Eiklar, Kandiszucker und Wasser zu binden, um dann das Gold aufzulegen (Kap. 157) (Verkade 1916). Als Bindemittel für Pigmente insbesondere in der Buchmalerei und zur Illuminierung von mittelalterlichen Handschriften als Goldtinten oder Muschelgold, wird Eiklar unter anderem bei Cennini (Kap. 10) und in Theophilus Presbyters (12. Jh.) Schriftensammlung *Schedula diversarum artium* (Buch 1, Kap. XXIX) erwähnt (Verkade 1916; Brepohl 1999). Eiklar allein als Zwischen- bzw. Abschlussfirnis ist bei Cennini (Kap. 157) beschrieben (Verkade 1916). Die Anwendung beschränkt sich dabei nicht nur auf die Buchmalerei, sondern wird gleichfalls für Holz- und Leinwandgemälde sowie polychrome Skulpturen aus Holz und Stein genannt (Gürtler Subal 1993).

Dem Eigelb kommt als natürliche Emulsion eine besondere Bedeutung zu. Heraclius (12. Jh.) erwähnt Eigelb lediglich als Bindemittel für Auripigment (Buch 3, Kap. XL), während Theophilus Presbyter es als Bindemittel für Azur auf trockenen Mauern und Putz vorschlägt (Buch 1, Kap. XVI) (Ilg 1873; Brepohl 1999). Die schichtenweise aufgebaute, oft gestrichelte Maltechnik ist für die Eitempera charakteristisch und fand besonders in der frühitalienischen Tafelmalerei Anwendung. Cennini erwähnt in vielen seiner Rezepte Eigelb als Malmittel beispielsweise auch als Universalbindemittel für die Wandmalerei (Kap.72) (Verbake 1916). In der Temperamalerei wird Eigelb häufig als Zusatz zur Steigerung des Glanzes durch den Ölanteil des Eigelbs, zur Verdickung der Konsistenz der Farbe oder zur Erhöhung der Geschmeidigkeit von Malgrundierungen zugegeben. Aufgrund der Eigenfarbe kann das Eigelb sich farbverändernd auf Pigmente

auswirken, aber auch als eigenständige Farbe zum Florieren verwendet werden (Bartl et al. 2005).

Ovalbumin ist das vorherrschende Protein im Eiklar, leicht zu isolieren und daher bereits eingehend untersucht (Ulrich 1990). Zudem ist es auch in Volleimischungen anzutreffen. Es ist kein Protein im Eigelb und wurde daher in der vorliegenden Arbeit als Markerprotein für den allgemeinen Nachweis von Eiklar ausgewählt (→ Kap. 5.10.1). Ovalbumin ist ein Glykoprotein und setzt sich aus 385 Aminosäuren zusammen. Es hat ein Molekulargewicht von ~44,5 kDa und besteht aus einem Polypeptid, das Phosphor, Mannose und Glucosamin enthält (Nisbet et al. 1981; Huntington & Stein 2001).

Um die Möglichkeit einer Differenzierung von Eiklar und Eigelb zu überprüfen, wurde ebenfalls ein Markerprotein für Eigelb ausgewählt. Dabei musste Livetin ausgeschlossen werden, da es ähnlich wie Ovotransferrin im Eiklar, mit Proteinen im Blut kreuzreagiert (Williams 1962). Da Blut als Bindemittel an Kunst und Kulturgut nicht ausgeschlossen werden kann (Scott et al. 1996), wurde Phosvitin als Marker für Eigelb ausgewählt. Phosvitin ist ein Glykoprotein und hat eine unverwechselbare Aminosäureverteilung, die einen hohen Anteil von Serin aufweist (Phenix 1997).

### 3.1.2 Milch (Kasein)

Milch besteht aus Wasser, Milchfett, Proteinen, Kohlehydraten und Mineralstoffen, sowie Vitaminen, Enzymen und verschiedenen anderen stickstoffhaltigen Substanzen (Baltes 2000). Kasein (vom lat. caesus = Käse) ist das vorherrschende Milchprotein, weshalb es auch als Markerprotein für die nachfolgenden immunologischen Untersuchung gewählt wurde. Es macht etwa 80 % der Gesamtproteine der Milch aus (Tabelle 2). Kuhmilch enthält ~ 2,8 % Kasein, menschliche Muttermilch ~ 0,4 %, und Schafmilch ~ 4,6 % (Baltes 2000).

**Tabelle 2:** Mittlere Zusammensetzung von Kuhmilch (nach Baltes 2000)

Milch	Zusammensetzung	Gew. %	Proteine	Gew. %
Wasser (87 %)				
Trockenmasse (13 %)				
	Milchfett	3-5		
	<u>Proteine</u>	<u>3,4</u>	→ Kasein	76-86
	Kohlehydrate	4,8	Molkeneiweiß	14-24
	Mineralstoffe	1		

Kasein ist ein Phosphoproteingemisch mit einer durchschnittlichen molaren Masse zwischen 19-25 kDa (Walstra et al. 2006). Der hohe Prolingehalt verhindert den Aufbau einer komplexen räumlichen Struktur (Beutel 2000). Kasein liegt in vier Hauptstrukturvarianten vor,  $\alpha$  (s1 und s2),  $\beta$  und  $\kappa$ -Kasein, die in unterschiedlichen Anteilen in der Milch enthalten sind. Die Gehalte variieren in Abhängigkeit der Art des Milchlieferanten (Ziege, Kuh etc), Herkunft und örtlichen Nahrungsmittelangebotes (Beutel 2000). Es gibt weitere Unterfraktionen, die aber aufgrund ihres geringen Gehaltes in der Regel nicht berücksichtigt werden. Die Gewinnung erfolgt aus Magermilch durch enzymatische oder saure Fällung. Bei der enzymatischen Fällung erfolgt der Kaseinausfall durch so genannte Labfermente. Durch Säuren (z.B. Essigsäure, Salzsäure) lässt sich Kasein fällen und ist als Milchsäure- oder Salzsäurekasein im Handel erhältlich.

Kasein ist wasser- und temperaturunempfindlich, kann jedoch in Wasser gequollen werden. Um es als Bindemittel nutzen zu können, muss es mit Alkalien wie Kalk, Borax (Natriumtetraborat) oder Ammoniak aufgeschlossen werden. Mit Kalk aufgeschlossenes Kasein, so genanntes Kalkkasein, muss frisch verarbeitet werden. Es trocknet hart, unelastisch und sehr spannungsreich auf. Im getrockneten Zustand ist es wasserunempfindlich bis –unlöslich. Kaseine, die mit Ammoniak, Borax, Natron- und Kalilauge aufgeschlossen werden, sind dagegen weniger wasser- und witterungsbeständig. Die Trocknung kann durch Zugabe von Formaldehyd oder Glutaraldehyd beschleunigt werden. Gemischt mit trocknenden Ölen und Harzen, trocknen sie spannungsfreier auf und werden wasserunempfindlicher.

Kaseinlösungen lassen sich emulgieren, was nicht nur Einfluss auf den optischen Eindruck eines Werkes hat, sondern auch auf die Eigenschaften. Die Haltbarkeit von Kaseinlösungen ist durch mikrobielle Zersetzung begrenzt, so dass ihnen oft Konservierungsmittel zugesetzt werden.

Werkstoffgeschichtlich ist Kasein bereits seit der Antike als Bindemittel für anorganische Pigmente und als Klebstoff bekannt. Als so genannter Käseleim findet er sowohl bei Theophilus Presbyter (12. Jh.) als auch bei Cennini (14/15. Jh.) zum Verleimen von Holz Erwähnung (Buch 1, Kap. XVII: Brepohl 1999; Kap. 112: Verkade 1916). Dieser zumeist auf Kalkkaseinbasis hergestellte Kaltleim stellte bis ins 20. Jahrhundert hinein den einzigen hitze- und wasserbeständigen Holzleim dar (Greber 2003). Heute spielt Käseleim in der Holzverarbeitung keine Rolle mehr. Aufgrund der aufwendigen Herstellung und der vergleichsweise ungünstigen chemischen und physikalischen Eigenschaften wurde er durch die Anwendung von synthetischen Leimen völlig verdrängt.

Kalkkasein bildet durch seine Wasserunempfindlichkeit und Witterungsbeständigkeit eines der bedeutendsten Bindemittel für die Secco-Wandmalerei im Innen- und Außenbereich. Kaseinfarben wurden aber auch zum Bemalen von Bauernmöbeln verwendet und sind heute in Plakafarben zu finden (Kühn 1988). Ende des 19. Jahrhunderts wird die Herstellung von absolut wasserfestem Kasein entdeckt, welches durch Einwirkung von Formaldehyd auf bereits aufgeschlossenes Kasein entsteht und Anfang des 20. Jahrhunderts zur Herstellung von Galalith, einem der ersten Kunststoffe, genutzt wurde.

### 3.1.3 Tierische Leime (Kollagen)

Tierische Leime sind Umwandlungsprodukte der im tierischen Bindegewebe enthaltenen Kollagene (Kühn 1988). Mit ~30 % der Gesamtproteine sind Kollagene die mengenmäßig dominierenden Proteine bei den Säugetieren und der wichtigste Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Dentin (Haupt 2000).

Kollagen ist ein Skleroprotein mit hoher Zugfestigkeit und einer durchschnittlichen Molekülmasse von ~300 kDa (Horie 2010). Derzeit sind 28 Kollagentypen (I-XXVIII) bekannt, die sich in Aufbau und Eigenschaften unterscheiden. Über 90 % des Kollagens im menschlichen Körper entfallen auf den Typ I und kommen vorrangig in Haut, Knochen und Sehnen vor (Gorgieva & Kokol 2011). Daher wird der Kollagentyp I im allgemeinen Sprachgebrauch, wie auch hier, mit dem Begriff Kollagen gleichgesetzt (Wilde 2006) und bildet in der vorliegenden Arbeit das Markerprotein für die immunologischen Untersuchungen von tierischen Leimen.

Das Hauptstrukturmerkmal aller Kollagentypen ist die Helixkonfiguration. Kollagen besteht aus einzelnen, langen Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten), die sich zu einer linksdrehenden Helix verschrauben (Sekundärstruktur), wovon sich je drei zu einer rechtgängigen Tripelhelix zusammenlagern (Tertiärstruktur) und durch intramolekulare Bindungen stabilisiert werden (Haupt 2000). Die Ausbildung der fibrillären Struktur erfolgt durch intermolekulare Quervernetzung (Quartärstruktur), wodurch Kollagene weitestgehend kristallin vorliegen und wasserunlöslich sind (Wilde 2006). Mit zunehmendem Alter der Tiere entstehen immer mehr Querverbindungen, die Vernetzung der Kollagenmoleküle wächst und die Quellbarkeit sowie die Löslichkeit nehmen ab. Kollagen enthält einen hohen Anteil an den Aminosäuren Glycerin, Prolin und Hydroxyprolin, was im Wesentlichen zur Stabilisierung der Helixstruktur beiträgt (Wilde 2006). Bei Fischkollagen ist der Prolin und Hydroxyprolinegehalt deutlich geringer und führt daher zu einer niedrigeren Denaturierungs- und Gelbildungstemperatur (Haupt 2005).

Bei der Leimherstellung wird das wasserunlösliche Kollagen aus dem tierischen Gewebe durch partielle Hydrolyse in eine wasserlösliche Form überführt, die in der älteren Literatur als Glutin bezeichnet wird (Haupt 2000). Tierische Leime kommen in fester Form (Tafeln, Gries, Graupen, Pulver, ganze getrocknete Schwimmblasen) in den Handel und müssen vor dem Gebrauch mit Wasser quellen und in Abhängigkeit vom Ausgangsprodukt auf max. 60 °C erwärmt werden (Coerdts 2007). Sie müssen warm verarbeitet werden, weshalb sie als Warmleime bezeichnet werden. Dem gegenüber stehen die sogenannten Kaltleime auf Kollagenbasis, die durch chemische Veränderung der Molekülstruktur unter Zugabe von Salzen oder Säuren bei Raumtemperatur flüssig sind wie beispielsweise der kaltflüssige Fischleim (Coerdts 2007). Sie bieten den Vorteil einer längeren offenen Verarbeitungszeit, spielen werkstoffgeschichtlich aber keine Rolle. Ihre Zusätze und chemische Zusammensetzung sind oft unzureichend bekannt/deklariert (Schellmann 2007).

Die historische Leimherstellung, wie sie beispielsweise bei Duhamel de Monceau (1772) beschrieben ist, fand in Leimsiedereien statt. Zunächst wurden die leimgebenden Rohmaterialien in Wasser gereinigt und eingeweicht. Es folgte die Äscherung zur Entfettung und Enthaarung durch längere Behandlung der Rohmaterialien mit Kalkmilch. Erst dann wurde der Leim ausgekocht. Abschließend wurde die Leimbrühe geklärt und der Leim getrocknet (→ Anhang B1.3). Knochen mussten erst mit Säure zersetzt und unter Dampfdruck gekocht werden. Das war technisch und im nennenswerten Umfang erst nach der Industrialisierung im 19. Jahrhundert möglich. Vor dieser Zeit wurden ausschließlich Haut-, Pergament-, Fisch- und Störleime verwendet, auch wenn vereinzelt die Beimischungen von zerstoßenem Hirschhorn, eine Art Vorstufe zur Herstellung von Knochenleim, Erwähnung fand (Willers 1980).

Je nach Ausgangsmaterial und Aufbereitungsart haben tierische Leime ein charakteristisches Aussehen und unterschiedliche Klebefähigkeit (Doerner 2011). Knochenleime sind aufgrund der extremen Extraktionsbedingungen viel stärker denaturiert als die Hautleime (Wilde 2006). Sie sind hart, spröde, wasserarm und in der Regel sehr dunkel. Haut- und Lederleime sind oft heller, eher zähelastisch und wasserhaltig. Fischblasenleime wie der Störleim sind sehr elastisch, besitzen eine gute Klebkraft und sind weißlich transparent (Schellmann 2007). Fischleim aus Fischabfällen ist dagegen weniger elastisch, gelblich und von minderer Qualität (Doerner 2011; Bartl et al. 2005). Gelatine kam im 19. Jahrhundert auf und bezeichnet einen besonders reinen, schonend gewonnen und weniger denaturierten Leim (Haupt 2000). Sie ist annähernd farblos (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Handelsübliche Leimbezeichnungen und ihre Ausgangsmaterialien (nach Wilde 2006)

<b>Leimbezeichnung</b>	<b>Ausgangsmaterial</b>
Knochenleim	Hauptsächlich frische Knochen; seit BSE Krise 2000/2001 in Europa überwiegend Schwein
Haut- und Lederleim	Frische Haut- und Lederabfälle, überwiegend Rind und Kleintiere
Pergamentleim	Getrocknete, ungegerbte Tierhaut, überwiegend Schaf, Kalb und Ziege
Hasenleim	Abfälle von Kaninchen/Hasen und anderen Kleintieren
Gelatine	Tierisches Gewebe, Knochen und Häute, überwiegend Schwein und Rind, aber auch Fisch
Störleim/ Hausenblasenleim	Schwimmbblasen von Fischen aus der Familie der Störe (Hausen, Sterlet, Sibirischer Stör etc), aber auch andere Fische möglich
Fischleim	Fischgräten und –abfälle, überwiegend Kabeljau/Dorsch, Seelachs und Schellfisch

Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, folgen die Leimbezeichnungen nicht immer streng den Ausgangsmaterialien, weshalb sie eher als Qualitätsmerkmal zu verstehen sind. Schon früher wurde die Qualität eines Leimes, soweit sein Ausgangsmaterial nicht bekannt war, durch rein optische Gesichtspunkte gemessen. Je heller der Leim, desto hochwertiger wurde er gehandelt (Willers 1980). Andere Leimbezeichnungen können nach Verwendungszweck (Tischlerleim, Vergolderleim), Handelsform (Tafeln, Gries, Pulver) oder Herkunft (Kölner Leim, Russischer Leim) erfolgen. Heute ist die geläufigste Bezeichnung oft eine Kombination aus den verwendeten Rohstoffen und der Handelsform, wie z.B. Hasenleim in Griesform oder Knochenleim in Perlen.

Allgemeine Eigenschaften von tierischen Leimen sind die Wasserlöslichkeit und die damit verbundene Reversibilität bzw. Reaktivierung. Sie sind in kaltem Wasser quellbar, aber erst bei Wärmezufuhr kolloidal löslich. Wird eine bestimmte Temperatur überschritten, werden die enthaltenen Proteine weiter hydrolysiert/denaturiert, wodurch die Klebkraft des Leimes abnimmt (Bartl et al. 2005; Schellmann 2007). Tierische Leime sind leicht verderblich, können aber durch Zugabe von Konservierungsmitteln wie Salicylsäure haltbarer gemacht werden (Doerner 2011). Beim Abkühlen der Leimlösung bildet sich eine Gallerte. Das Trocknen erfolgt durch Verdunstung des Wassers beim Abkühlen. Die Aushärtung kann mit erheblichen Schrumpfprozessen verbunden sein. Leimlösungen trocknen daher unter Spannung auf (Doerner 2011). Sie sind weder feuchtigkeits- noch wärmebeständig und sind von Bakterien und Schimmelpilzen abbaubar. Wegen ihrer Hygroskopizität können tierische Leime quellen und schrumpfen, was aber zur Verminderung der Elastizität führt (Doerner 2011)

Tierische Leime sind schon seit dem Altertum bekannt. Ägyptische Wandmalereien und Grabbeigaben liefern Zeugnisse für den Gebrauch (Greber 2003). Die frühesten quellschriftlich belegbaren Anweisungen über die Verwendung von tierischem Leim als Bindemittel finden sich bei Vitruv (~ 25 v. Chr.) und Plinius, dem Älteren (1. Jh. n. Chr.), die Rußschwarz mit Leim für Wandmalereien nennen (Kap. X: Prestel 1912; Buch XXXV, Kap. 25: König 1978). Im Mittelalter entstanden dann begünstigt durch das Aufkommen der Klosterschulen zahlreiche Lehrbücher und Quellschriften mit unzähligen Rezepturen für die Anwendung von tierischen Leimen. Sie eignen sich nicht nur als Klebstoff für Holz, Glas, Stein und Metall, sondern auch als Bindemittel für Farbmittel und werden quellschriftlich insbesondere als Anlegemittel und im Zusammenhang mit Vergoldungen erwähnt (Willers 1980). Als Klebstoff werden sie unter anderem für Verleimungen von Möbeln und Holzbildträgern, Furnieren und Einlegearbeiten (→ Kap. 7.1), aber auch zum Vorleimen und Doublieren von Leimwänden verwendet (Stratmann-Döhler 1986). Anwendung finden sie auch als Isolierschicht (Leimlöse) auf Holz (→ Kap. 7.2), Leinwand, Putz oder Papier (Willers 1980). Als Bindemittel sind sie von großer Bedeutung für Grundierungen mit Kreide und Gips von Holz- und Leinwandbildern sowie gefassten Skulpturen (→ Kap. 7.4-7.5), in der Buchmalerei, Malerei auf Stoff und für Wandfarben in Innenräumen (Kühn 1988, Doerner 2011). Eine eher untergeordnete Rolle spielen Leime aufgrund ihrer Hygroskopizität als Überzüge, Firnisse oder Fixative (→ Kap. 7.7). Auch heute noch finden sie vielfältigen Einsatz in der Restaurierung zur Verleimung oder Festigung.

Je nach Verwendungszweck wurden dem Leim verschiedene Zusätze wie Knoblauch, Salz, Wermut, Brandwein, Essig, Feigensaft, Milch, Honig, Gummen, Stärke, Terpentin bis hin zu Glasstaub zugegeben (Willers 1980).

Für eine detaillierte und ausführliche Beschreibung der geschichtlichen Verwendung tierischer Leime sei an dieser Stelle auf die Arbeiten von Willers (1980) und Habel-Schablitzky (1992) verwiesen.

### **3.1.4 Pflanzengummen (Glykoproteine)**

Pflanzengummen werden die harzhaltigen, jedoch im Unterschied zu den Harzen wasserlöslichen oder –quellbaren Pflanzenexsudate genannt, die aus bestimmten Bäumen und Sträuchern als natürlicher Wundverschluss bei Verletzung austreten (Doerner 2011). Nach dem Erstarren können sie als Tropfen oder größere Stücke vom Stamm abgeerntet werden. Sie gehören zu der Gruppe der Kohlehydrate (Saccharide), während die Harze hauptsächlich aus Di-, Tri- und höheren Polyterpenen bestehen (Doerner 2011).



Pflanzengummen sind Polysaccharide mit sehr komplexer Chemie und Struktur, die bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Twilley 1984; Stephen et al 1990; Newman & Serpico 2000; Showalter 2001; Dror et al. 2006; Belitz et al 2009). Sie bestehen in der Regel aus einer Reihe von Zuckern (z.B. Arabinose, Galactose, Mannose), die über glykosidische Bindungen verbunden sind. Die meisten Pflanzengummen besitzen schwankende, geringe Anteile an Proteinen (Verbeken et al. 2003). Diese sind oft an einen oder mehrere Zucker kovalent gebunden und werden daher als Glykoproteine bezeichnet.

Für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind die Arabinogalactan-Proteine (AGPs) (→ 5.10.4). Das sind pflanzliche Glykoproteine (früher Proteoglykane), wobei der Polysaccharidanteil mindestens 90 % ausmacht und der Proteinanteil mit 1-10 % wesentlich kleiner ist (Thude 2005). Der Kohlenhydratanteil besteht vor allem aus Galactose und Arabinose sowie aus geringen Mengen an Galacturonsäure, Rhamnose und Xylose. Ihr Vorkommen in der Pflanzenwelt ist ubiquitär und man hat sie schon in vielen höheren und niederen Pflanzen gefunden (Thude 2005). AGPs sind Hauptkomponenten von Gummen (z. B. Gummi arabicum), aber auch anderen Exkreten (Akiyama et al. 1984; Gleeson et al. 1989). Die Funktionen von AGPs in der Pflanze sind noch nicht ganz aufgeklärt, dennoch gibt es Hinweise auf die Beteiligung von AGPs am Wachstum und an der Differenzierung von Zellen (Yates et al. 1996; Showalter 2001).

Gummen bilden mit Wasser viskose und kolloide Lösungen. Sie trocknen durch Verdunstung des Wassers und bleiben auch im gealterten Zustand wasserlöslich (Kühn 1988). Ihre Klebkraft variiert je nach Herkunft deutlich. Eine detaillierte Beschreibung aller für die Restaurierung relevanter Gummen ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Gummi arabicum, Tragant und Kirschgummi gehören wohl zu den bekanntesten Vertretern, aber auch Ghatti Gummi soll hier Erwähnung finden.

Gummi arabicum wird aus den getrockneten Exsudaten afrikanischer und indischer Akazienarten (*Acacia sp.*) gewonnen. Die Gattung *Acacia* ist die zweitgrößte innerhalb der Familie der Leguminosae und besteht aus mehr als 900 Arten (Verbeken et al. 2003). Besonders hochwertige Formen sollen von den Bäumen *Acacia senegal*, *Acacia arabica* und *Acacia seyal* stammen. Chemisch ist Gummi arabicum eine Mischung aus Calcium-, Magnesium- und Kaliumsalzen der Arabinsäure, eines hochverzweigten leicht sauren Polysaccharids (Anderson & Morrison 1989). Es besteht aus Arabinose, Galactose, Rhamnose, und Glucuronsäure (Verbeken et al. 2003). Gummi arabicum ist farblos bis gelblich-braun. Die Stücke sind matt, spröde und geruchlos (Wehlte 2009). Es löst sich in Wasser vollständig zu einer klaren, zähen, klebrigen und schwach sauer reagierenden Flüssigkeit, während es in Alkohol unlöslich ist (Doerner 2011).

Tragant oder auch Traganth ist ein stark verzweigtes, heterogenes Polysaccharid und wird aus verschiedenen Gewächsen der Gattung *Astragalus* sp. gewonnen (Verbeken et al. 2003). Diese kommen weltweit in tropischen Regionen vor und bestehen aus ~2000 Arten, die in mehr als 100 Untergruppen unterteilt werden (Anderson & Grant 1988). Tragant löst sich in Wasser nur wenig, quillt aber zu einer schleimigen Masse und eignet sich daher als Verdickungsmittel (Doerner 2011). Es besteht aus einer Mischung von ~ 40 % wasserlöslichem Tragathin und ~ 60 % wasserunlöslicher Traganthinsäure (Bassorin) (Verbeken et al. 2003). Die Polysaccharidketten enthalten Arabinose, Galactose, Fucose, Xylose, Rhamnose und Galacturonsäure.

Kirschgummi wird aus Exsudaten von einheimischen und ausländischen Steinobstbäumen (Kirsche, Pflaume, Mandel) gewonnen. Es besteht aus wasserlöslichen und wasserquellbaren Bestandteilen, weshalb es sich nicht rückstandlos auflöst (Polleyn 1909). Es ist höher viskos als Gummi arabicum, weshalb es in geringerer Konzentration angesetzt wird.

Ghatti Gummi oder auch indisches Gummi wird aus dem wasserlöslichen Exsudat der Rinde des in Indien und Sri Lanka vorkommenden Baumes *Anogeissus latifolia* gewonnen. Es kommt als leicht saures Calcium- und Magnesiumsalz der Arabinsäure vor und kann die Viskosität einer wässrigen Lösung exponentiell erhöhen und zudem als natürlicher Puffer fungieren (Klausmeyer 2009a). Ghatti Gummi ist ein verzweigtes Polysaccharid aus Arabinose, Galactose, Mannose, Xylose und Glucuronsäure (Elias 2009).

Pflanzengummen trocknen teilweise spröde auf. Zur Erhöhung der Geschmeidigkeit und Vermeidung der Versprödung wurden den Gummen häufig hygroskopische Zusätze wie Honig, Zucker oder Kandis zugesetzt (Teumer 1993). Dadurch wurde auch eine zu rasche Trocknung verhindert. Die Wasserlöslichkeit wurde durch Zusatz von Alaun und/oder Eiklar vermindert (Teumer 1993).

Pflanzengummen werden hauptsächlich als Bindemittel für Aquarellfarben und Pastellstifte oder als Zusatz für Malfarben (z.B. Leimtemperafarben) verwendet (Doerner 2011). Sie wurden von verschiedenen Kulturen als Einbalsamierungsmittel verwendet und können auch als Verdicker für ölige Emulsionen verwendet werden (Kühn 1988). Sie dienen als Bindemittel für Tinten, Gold- und Silbertuschen sowie als Anlegemittel für Vergoldungen. Darüber hinaus wurden sie zum Anreiben von Pigmenten verwendet (Straub 1988).

## 4 Einführung in die Immunologie

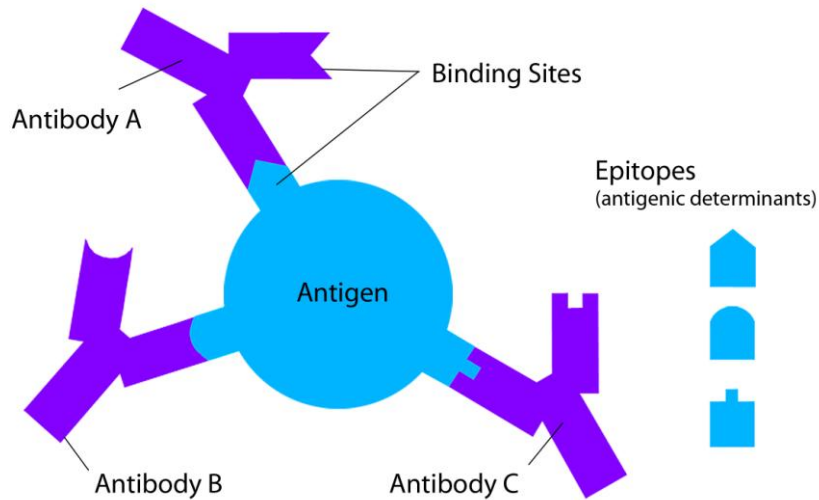
### 4.1 Immunologische Grundlagen

Immunologie ist die Wissenschaft des körpereigenen Abwehrsystems gegen Krankheitserreger (Bakterien, Viren und Pilzen) und Fremdstoffe (Toxine, Umweltgifte). Das Immunsystem kann dabei zwischen „körpereigenen“ und körperfremden“ Substanzen unterscheiden und letztere bekämpfen (Campbell 1998). Wird eine Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt, bildet es Antikörper (Ak), die an das fremde Molekül, auch Antigen (*antibody-generator*: Ag) genannt, binden und einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden. Diese Reaktion bezeichnet man als Immunantwort. Die Aufgabe von Antikörpern besteht also in der Bindung und Markierung von Antigenen und in der Vermittlung dieser Bindungen an weitere Komponenten des Immunsystems, die dann die Zerstörung der Pathogene bewirkt (Lange 2002). Ein gesundes Immunsystem kann keine Antikörper gegen körpereigene Stoffe bilden.

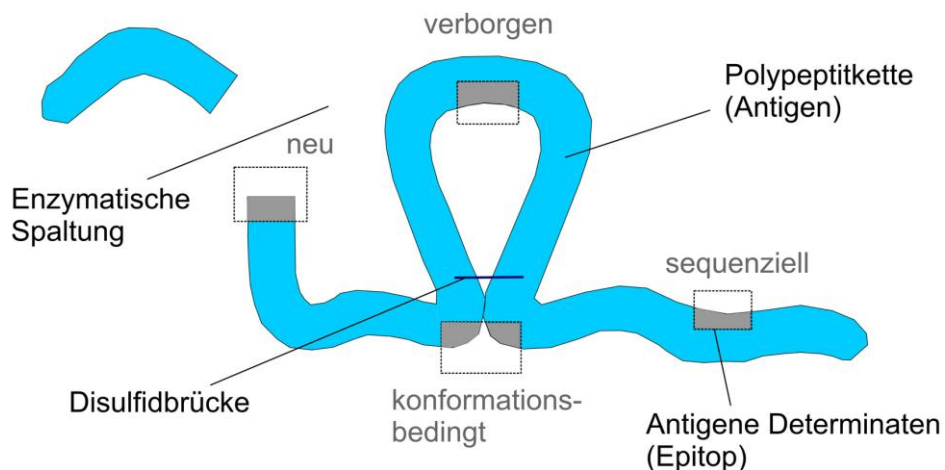
### 4.2 Antigene

Als Antigen werden alle Substanzen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden, bezeichnet. Sie können also eine Immunantwort auslösen und damit immunogen wirken; jedoch ist nicht jedes Antigen auch immunogen. Entscheidend für die Immunogenität sind vor allem die Molekülgröße, Körperfremdheit und chemische Struktur. Makromoleküle wie Proteine oder komplexe Polysaccharide beispielsweise sind vor allem aufgrund ihrer Größe sehr gute Immunogene ( $> 5000$  Da), wohingegen kleine Moleküle (Vitamine, Lipide oder Aminosäuren) ( $< 5000$  Da) keine Immunantwort hervorrufen (Deshpande 1996). Bindet man sie aber vor der Immunisierung kovalent an ein Trägerprotein, können auch Antikörper gegen ein solches Konjugat gebildet werden (Luttmann et al. 2009).

Antikörper sind nicht gegen das ganze Antigen gerichtet, sondern erkennen und reagieren nur mit Teilbereichen der Oberfläche, den sogenannten antigenen Determinanten (Epitopen) (Abbildung 1).

**Abbildung 1:** Antikörper-Antigen Wechselwirkung (nach Campbell 1998)

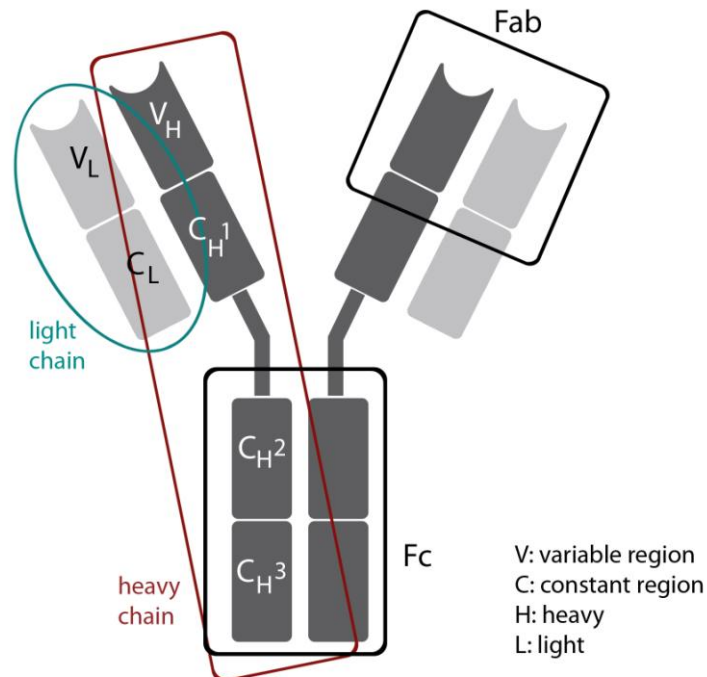
Die Bindung beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen sowie van der Waal'schen Kräften (Luttmann et al. 2009). Epitope haben die Größe von 5-8 Aminosäuren und können sequenziell, konformationsbedingt und verborgen sein oder auch nach enzymatischer Spaltung neu auftreten (Lottspeich & Engels 2006). Die meisten Antigene können daher je nach Größe und Struktur viele verschiedene Epitope aufweisen (Abbildung 2).

**Abbildung 2:** sequenzielle, konformationsbedingte, verborgene und nach enzymatischer Spaltung neu entstandene Epitope (nach Lottspeich & Engels 2006)

Jedes dieser Epitope kann die Bildung verschiedener Antikörper induzieren, die sich bezüglich ihrer Struktur, aber auch ihrer Affinität zum Antigen unterscheiden. Es ist möglich, dass zwei verschiedene Antigene ein identisches Epitop aufweisen. In diesem Fall bindet ein Antikörper, der gegen dieses Epitop gerichtet ist, an beide Antigene. Dieser Antikörper ist nicht weniger spezifisch; er ist lediglich epitop-, aber nicht antigen- oder artenspezifisch (Schütt & Bröker 2006; Deshpande 1996). Das führt je nach Fragestellung zu falsch-positiven Ergebnissen und wird als Kreuzreaktivität bezeichnet.

### 4.3 Antikörper

Antikörper sind lösliche Glykoproteine aus der Familie der Immunglobuline (Ig). Die Grundstruktur aller Antikörper besteht aus vier Polypeptidketten, die in einer Ypsilon-ähnlichen Struktur angeordnet sind (Abbildung 3). Nach ihrer molekularen Masse unterscheiden sie sich in je zwei identische schwere (H) und leichte Ketten (L), die über Disulfidbrücken verbunden sind (Harlow & Lane 1999). Jede schwere Kette hat vier konsekutive Regionen, die so genannten Domänen: drei konstante (C) und eine variable (V). Die leichten Ketten besitzen jeweils eine konstante und eine variable Region. Die variablen Regionen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle (Paratop) und werden als Fab Fragment (*fragment antigen binding region*) bezeichnet. Der konstante Fc (*fragment constant*) Teil bestimmt die Antikörperklasse. In der Familie der Immunglobuline gibt es fünf Klassen (IgA, IgG, IgM, IgD und IgE) sowie im Fall von IgG und IgA weitere Unterklassen (IgG1-4 und IgA1-2), die sich im konstanten Teil der schweren Ketten unterscheiden und unterschiedliche Funktionen aufweisen (Harlow & Lane 1999). IgG ist das vorherrschende Serumimmunglobulin und findet daher oft Anwendung in der Immunologie (Schütt & Bröker 2006).

**Abbildung 3:** Struktur eines Antikörpers (vereinfacht)

#### 4.4 Antikörperherstellung

Die klassische Herstellung spezifischer Antikörper beruht auf der Immunisierung von Säugetieren (z.B. Kaninchen, Ratten, Mäuse, Ziegen) mit einem Antigen. Einige Wochen nach der Immunisierung sind die Antigen spezifischen Antikörper im Blutserum des Tieres zu finden. Die so gewonnenen Antiseren enthalten immer ein Gemisch von Antikörpern verschiedener Bindungsaffinitäten. Man spricht von polyklonalen Antikörpern, da sie verschiedene Epitope eines Antigens erkennen. Grundsätzlich ist jede normale Immunantwort polyklonal. Sie verläuft stets willkürlich und daher ist die Herstellung von identischen Chargen polyklonaler Antikörper problematisch (Luttmann et al. 2009). Im Gegensatz dazu stehen die monoklonalen Antikörper, deren Herstellung technisch weitaus aufwendiger und teurer ist. Nach der Immunisierung des Versuchstieres werden Antikörper produzierende Zellen aus der Milz isoliert, fusioniert, selektiert, geklont und in Zellkultur aufbewahrt (Hybridom Technik nach Milstein und Köhler, 1975) (Deshpande 1996). Die geklonte Zelllinie liefert dann identische, monoklonale Antikörper mit gewünschter Spezifität, die prinzipiell in unbegrenzter Menge reproduziert werden können. Beide Antikörpertypen haben Vor- und Nachteile, die u.a. bei Deshpande (1996), Harlow & Lane (1999) oder Luttmann et al. (2009) detailliert beschrieben sind. Monoklonale Antikörper sind hoch spezifisch und ermöglichen in manchen Fällen auch eine Identifizierung der Spezies des

gesuchten Proteins. Ist durch Degradation oder mikrobiellen Abbau das spezifische Epitop beschädigt oder verloren gegangen, bleibt eine Reaktion aus, was zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führt. In Abhängigkeit vom gewählten Zielmolekül können monoklonale Antikörper aber auch Spezies unabhängig binden, d.h. zum Beispiel an ein charakteristisches Epitop, das typisch für mehrere Antigene ist (→ Kap. 5.10.4).

Polyklonale Antikörper haben den Vorteil, dass sie eine höhere Bandbreite an Strukturen abdecken, da sie verschiedene Epitope eines Antigens erkennen. Das erscheint insbesondere bei Proben von Kunstobjekten sinnvoll, da Art, Herkunft und der Abbauzustand der Proteine unbekannt sind. Grundlegende Nachteile polyklonaler Antikörper sind allerdings die mangelnde Spezifität und das erhöhte Risiko von Kreuzreaktionen (Luttmann et al. 2009). Daher sind Spezifitätstests im Vorfeld der Methodenentwicklung für beide Antikörpertypen unabdingbar (→ Kap. 5.10).

Mittlerweile sind mehrere tausend Antikörper (mono- und polyklonal) von hunderten von Anbietern gegen die unterschiedlichsten Antigene und in verschiedenen Tierarten produziert, kommerziell erhältlich. Sie finden hauptsächlich Anwendung in der Medizin, Agrar- oder Lebensmittelindustrie, sind aber auch für den Einsatz in der Restaurierung denkbar. So sind bereits Antikörper, die Milchprodukte (Kasein), Eiklar (Ovalbumin), tierische Leime (Kollagen), Pflanzengummen (Polysaccharide) oder Blut (Ferritin) nachweisen auf dem Markt verfügbar. Darüber hinaus gibt es aber auch die Möglichkeit Antikörper herstellen zu lassen, die individuell auf die Bedürfnisse und Fragestellungen zugeschnitten sind (engl. *custom-made*; dt. Auftragsimmunisierung), wie im Falle des in dieser Arbeit eingesetzten Störkollagenantikörper (Schultz 2006). Solche Spezialanfertigungen sind kostspielig und das verwendete Material muss möglichst rein, immunogen und injizierbar sein.

## 4.5 Immunoassays (IA) und Assaykonzepte

Antigen-Antikörper Bindungen sind nicht unmittelbar sichtbar oder messbar. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe können die Antikörper mit Markern versehen werden. Diese Bindung erfolgt in der Regel kovalent, um ein möglichst stabiles Marker-Antikörper Konjugat zu erhalten. Immunologische Verfahren werden häufig nach Art ihrer Antikörper Markierung (radioaktive Isotope, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder Goldpartikel) unterschieden (Luttmann et al. 2009). Diese bestimmen nicht nur die Art der Detektion, sondern geben dem jeweiligen Verfahren auch die Bezeichnung (RIA, ELISA, IF).

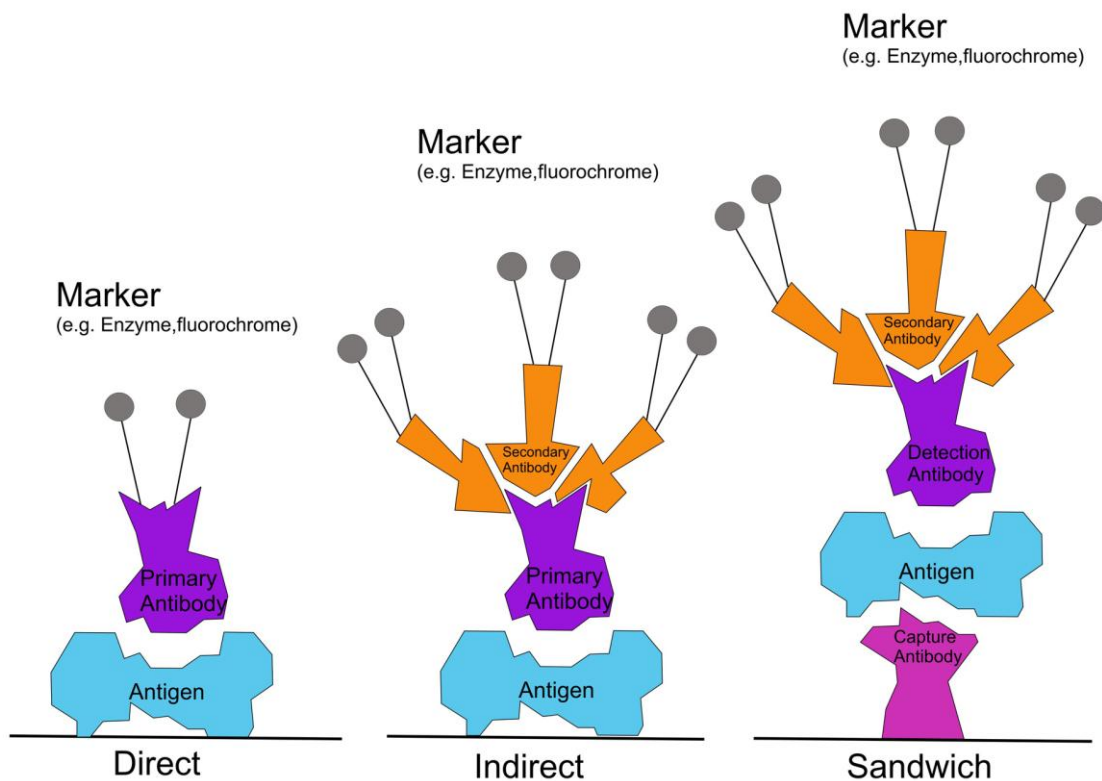
In der immunochemischen Analytik haben sich im Laufe der Entwicklung einige Methoden besonders bewährt und durchgesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung werden in der klinischen Medizin und Forschung bevorzugt Immunoassays verwendet (Luttmann et al. 2009). Sie zeichnen sich vor allem durch ihre Empfindlichkeit und Spezifität, aber auch durch ihre einfache Probenaufbereitung, hohen Probendurchlauf (Automatisierung möglich), einfache Auswertung, kurze Testzeit und relativ niedrigen Kosten aus. Daher werden sie häufig als bevorzugte *Screening*-Methoden eingesetzt. In niedrigen Konzentrationsbereichen haben sich aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit vor allem der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzymimmunoassay (ELISA) durchgesetzt. Trotz der höheren Empfindlichkeit (Antigenkonzentrationen bis 0,5 pg/ml; Lottspeich & Engels 2006) wird der RIA aufgrund der Nachteile, die sich im Umgang mit radioaktivem Material ergeben, heute wenn möglich durch enzymgekoppelte Farbreaktionen oder Fluoreszenznachweise, die in der Empfindlichkeit dem RIA nahe kommen, ersetzt. Die Empfindlichkeit ist aber letztlich abhängig von der Affinität der Antikörper zum jeweiligen Antigen, Art der Markierung, sowie dem gewählten Assaykonzept, so dass die theoretischen Werte, die in der Literatur angegeben sind, praktisch nie erreicht werden (→ Kap. 5) (Luttmann et al. 2009).

Immunoassays werden nach folgenden Kriterien eingeteilt: nicht-kompetitiv und kompetitiv, homogen und heterogen, direkt und indirekt (Luttmann et al. 2009; Deshpande 1996; Crowther 2001). Bei nicht-kompetitiven Verfahren liegt der Antikörper im Überschuss vor. Beim kompetitiven Verfahren hingegen besteht eine Konkurrenz zwischen markierten und nicht markierten Antigenmolekülen um die limitierten Antikörperbindungsstellen. Homogene Verfahren finden vollständig in Lösung statt, wohingegen heterogene Verfahren an einer Festphase erfolgen, an die eine der Komponenten immobilisiert wird. Das hat den Vorteil einer einfachen Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen und ist daher trotz des längeren Zeitaufwands häufiger anzutreffen (Lange 2002). Antikörper, die an Epitope des gesuchten Antigens binden, werden als Primärantikörper bezeichnet. Bei der direkten Methode ist dieser markiert und dient zum Nachweis und der Sichtbarmachung des Antigens. Beim indirekten Verfahren wird ein unmarkierter Primärantikörper durch einen gegen ihn gerichteten zweiten markierten Antikörper (Sekundärantikörper) nachgewiesen (Crowther 2001). Folglich dient der Primärantikörper als Antigen für den Sekundärantikörper (Nachweis von Antikörpern). Die meisten Sekundärantikörper sind polyklonal; daher kann mehr als ein Sekundärantikörper an die verschiedenen Epitope der Fc Region des Primärantikörpers binden (Abbildung 4). Somit steigt auch der gebundene Enzymgehalt, der zum Farbumschlag führt, und es kommt zu einer Signalverstärkung um etwa das 20-100fache (Lottspeich & Engels 2006). Eine Sonderform ist das Sandwich Verfahren. Dabei wird das gesuchte Antigen zwischen



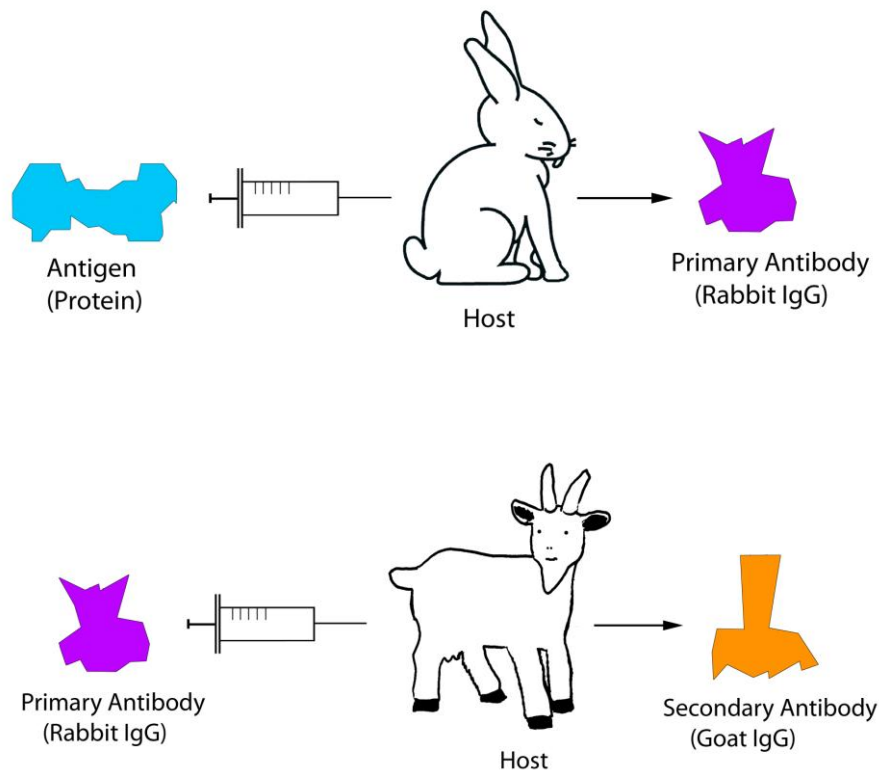
zwei verschiedenen unmarkierten Primärantikörpern (Fänger- und Detektionsantikörper) gebunden und mit einem markierten Sekundärantikörper gegen den Detektionsantikörper nachweisbar gemacht (Luttmann et al. 2009). Nützlich ist die Sandwichmethode insbesondere, wenn die Konzentration des Antigens gering ist oder eine hohe Konzentration anderer Antigene eine Probe verschmutzt. Von Nachteil ist der höhere Zeit- und Kostenaufwand (Abbildung 4).

**Abbildung 4:** verschiedene heterogene Verfahren (Auswahl)



Der Sekundärantikörper entsteht durch Immunisierung einer zweiten Tierart (z.B. goat) mit dem Primärantikörper (z.B. rabbit IgG). Das ist notwendig, da der Wirt im Normalfall für den Primärantikörper keine Antikörper gegen Immunsystem eigene Moleküle herstellen kann (Madgigan et al. 2001). Sekundärantikörper sind gegen die konstanten Regionen der Primärantikörper gerichtet (z.B. goat-anti-rabbit Fc) und charakteristisch für die Tierart, die sie hergestellt hat (Abbildung 5). Da der Sekundärantikörper mit jedem Antikörper reagiert, der durch Immunisierung der gleichen Tierart (z.B. rabbit) hergestellt wurde, ist er vielseitig einsetzbar und das unabhängig von der Spezifität des Primärantikörpers. Der Einsatz weiterer Antikörper (Tertiärantikörper) zur Signalverstärkung ist möglich, aber erhöht das Risiko von Kreuzreaktivitäten und hat sich in der Praxis nicht durchgesetzt.

**Abbildung 5:** Herstellung von Primär- und Sekundärantikörpern durch Immunisierung von Wirbeltieren



Die Zusammensetzung der Proben von Kunstwerken ist in der Regel unbekannt. Daher bieten sich *Screening*-Methoden, also die Möglichkeit innerhalb eines Versuchs auf verschiedene Proteine zu testen, an. Immunoassays haben einen hohen Probandendurchlauf und erfüllen diese Voraussetzung. Die Anwendung eines kompetitiven Verfahrens ist zwar denkbar, aber auch kostenintensiv, da für jedes gesuchte Protein, ausreichend markiertes Antigen zur Verfügung stehen muss. Aufgrund komplexer Materialmischungen eignet sich die Anwendung eines heterogenen Verfahrens, da automatisch eine Aufreinigung der Probe durch die Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen vorgenommen wird. Der Bindemittelanteil in den Proben ist oft sehr gering, zudem ist die Probenmenge limitiert, so dass Signalverstärkungen wünschenswert sind, weshalb sich die nicht-kompetitiven, heterogenen indirekten Verfahren zur Untersuchung von Proteinen und Gummen an Proben von Kunstobjekten anbieten (Schultz 2006).

## II Experimenteller Teil

Im experimentellen Teil wird im Wesentlichen die quantitative Technik des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) eingesetzt. Sie basiert auf der Anwendung enzymmarkierter Antikörper. Der Nachweis der Bindemittel erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion, die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit einem Photometer gemessen wird. Eine tatsächliche Quantifizierung der im Test enthaltenen Bindemittelkonzentration kann aufgrund der vielfältigen Einflussfaktoren bei Proben von Kunstobjekten (siehe später) nicht erfolgen (→ Kap. 5-6). Das Nachweisverfahren liefert eine Aussage über das jeweils im einzelnen Testansatz enthaltene Bindemittel. Eine Lokalisierung innerhalb des Schichtenaufbaus ist nicht möglich. Es sei denn, die Schichten können im Vorfeld getrennt und einzeln parallel zueinander im gleichen Analysedurchgang untersucht werden (→ Kap. 7). Eine schichtbezogene Analyse wäre mit der Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) möglich und wird abschließend an wenigen Proben beschrieben (→ Kap. 8). Hier erfolgt die Visualisierung am eingebetteten Probenanschliff über fluoreszenzmarkierte Antikörper unter der Betrachtung im Mikroskop. Es muss darauf hingewiesen werden, dass mit immunologischen Verfahren nur die Bindemittel nachgewiesen werden können, gegen die im Test Antikörper eingesetzt wurden.

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind mit Bezugsquellen im → Anhang A aufgeführt.

## 5 Entwicklung einer ELISA Methode zum Nachweis von Proteinen und Gummen

Der ELISA ist ein mehrstufiges System, indem jeder Schritt, jedes eingesetzte Material und jede Chemikalie die nachfolgende Durchführung beeinflussen kann. Für jegliche Änderung in der Durchführung muss daher die Auswirkung auf das gesamte System überprüft werden. Der Vorteil der ELISA Methode ist, dass die Durchführung (Protokoll) auf die jeweilige Fragestellung zugeschnitten werden kann. Aktuelle ELISA Methoden aus der klinischen Medizin berücksichtigen die Herausforderungen, die Proben von Kunstobjekten darstellen, nicht. Es sind hier vor allem die geringen Probenmengen, die relativ großen Mengen anorganischer Zusätze/Verunreinigungen (z.B. Pigmente) und insbesondere die hohe Wahrscheinlichkeit der Materialdegradation zu nennen. Es ist daher unrealistisch zu erwarten, dass eine ELISA Methode für die Erkennung von kanzerogenen Markern ebenfalls optimale Ergebnisse für den Nachweis von proteinhaltigen Bindemitteln in Jahrhunderte alten Kunstwerken erbringt.

Die entscheidenden Schritte bei einer ELISA Methode sind primär die Probenextraktion, die Wahl der Mikrotiterplatte, das Beschicken der Platte (*coaten*), das Blocken der freien Bindungsstellen, die Inkubationsbedingungen und vor allem die Spezifität der eingesetzten Antikörper. Die Entwicklung optimaler Bedingungen für eine ELISA Methode erfordert daher umfangreiche Testungen für jedes nachzuweisende Antigen. Ziel ist es dabei im vorliegenden Fall aber nicht, für jedes einzelne Antigen, die bestmöglichen Versuchsparameter und höchstmögliche Nachweisempfindlichkeiten zu bestimmen, sondern zugunsten einer *Screening*-Methode ein breites Spektrum an Proteinen und Gummen innerhalb einer Probe zu erfassen.

Das ideale Probenaufbereitungs- und Ablaufschema für das ELISA Testverfahren wurde zunächst an reinen Bindemitteln (Antigenen) entwickelt. Die Evaluierung einiger Parameter erfolgte nur für die drei wesentlichen Proteinen Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Als Positivkontrollen und zur vergleichbaren Bewertung der Versuchsparameter wurden definierte Antigene angesetzt, die im Folgenden als „Standardantigene“ bezeichnet werden (→ Anhang A2). Für bestimmte Untersuchungen war es erforderlich, neben kommerziellen Produkten, die nachzuweisenden Bindemittel selber herzustellen, um Verunreinigungen oder Mischungen auszuschließen (→ Anhang B1-2). Die so entwickelte ELISA Methode wurde für Probekörper definierter Zusammensetzungen eingesetzt und auf die Anwendbarkeit (Möglichkeiten und Grenzen) an Probenmaterial überprüft (→ Kap. 6). Abschließend konnte reales Probenmaterial unbekannter Zusammensetzung untersucht

und unter Einbeziehung der zuvor gewonnenen Ergebnisse bewertet werden (→ Kap. 7).

## 5.1 Prinzip: indirekter ELISA

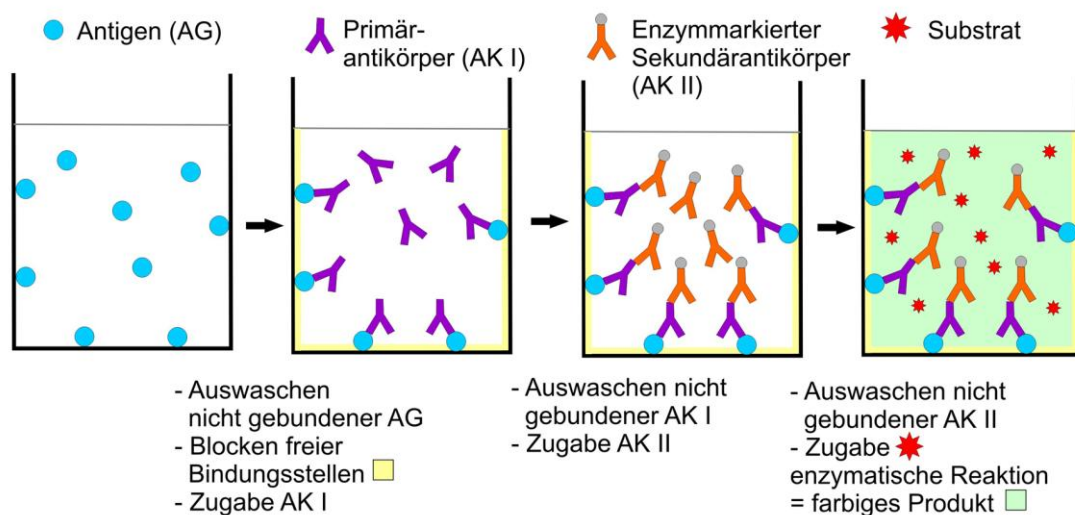
Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist aktuell wohl einer der gebräuchlichsten quantitativen Immunoassays und basiert auf dem Einsatz enzymmarkierter Antikörper.

Jeder ELISA beruht auf drei chemisch-physikalische Prozessen: (1) Adsorption von Antigen oder Antikörper an eine Festphase, (2) spezifische Bindung von Antigen und Antikörpern und (3) eine enzymatische Nachweisreaktion durch Umsetzung eines Substrates.

Vereinfacht dargestellt, basiert der indirekte ELISA auf der Immobilisierung einer unbekannt Menge Antigen an eine feste Phase. Als feste Phase haben sich Mikrotiterplatten im 96-Well Format aus Polystyrol (PS) oder Polyvinylchlorid (PVC) weitgehend durchgesetzt (Luttmann et al. 2009; Deshpande 1996). Eine antigenhaltige Lösung wird in die Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte eingefüllt, was als Beschicken oder *Coaten* bezeichnet wird. Die Adsorption der Antigene an die Plastikoberfläche der Platte ist ein rein physikalischer Vorgang und beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Antigenen und der unpolaren Plastikoberfläche. Nicht gebundene Antigene werden nach einer Inkubationszeit durch mehrfaches Waschen mit antigenfreien Pufferlösungen aus den Wells entfernt. Nicht immer sind alle freien Bindungsstellen in den Wells nach der Inkubation mit dem Antigen belegt. Gründe dafür können Auswaschungen während der Waschvorgänge oder eine geringe Antigenkonzentration sein. Um eine unspezifische Adsorption der Antikörper (proteinische Makromoleküle) an diese freien Bindungsstellen zu unterbinden und falsch-positiv Ergebnisse zu vermeiden, müssen alle freien Stellen mit einem Blockpuffer belegt werden, was als Blocken bezeichnet wird. Nach dem Auswerfen des Blockpuffers erfolgt die Zugabe und Bindung des spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) an das immobilisierte Antigen in der Mikrotiterplatte. Ungebundene Antikörper werden nach der Inkubationszeit durch mehrfaches Waschen entfernt. Bei Anwesenheit des gesuchten Antigens bleibt ein Antigen-Antikörper-Komplex in den Wells zurück. Die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen ist ein Vorgang, der nicht direkt sichtbar oder messbar ist. Es folgt die Zugabe des Sekundärantikörpers, der mit hoher Affinität und Spezifität an den Primärantikörper bindet und chemisch mit einem aktiven Enzym (z.B. Meerrettich Peroxidase (HRP oder nur PO) oder Alkalische Phosphatase (AP)) markiert ist. Während der Inkubationsphase bindet der enzymmarkierte Sekundärantikörper an den

nicht-markierten Primärantikörper. Durch letztmaliges Waschen der Platte wird überschüssiger enzymmarkierter Sekundärantikörper entfernt. Es folgt die Zugabe eines chromogenen Substrats (z.B. 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS) oder para-Nitrophenylphosphat (pNPP)), das vom Enzym in ein farbiges Reaktionsprodukt umgewandelt wird (Abbildung 6-7). Die Enzymreaktion wird durch Zugabe einer entsprechenden Stopplösung (z.B. 0,05 % Natriumazidlösung oder 3 M Natriumhydroxidlösung) beendet. Anschließend erfolgt die Messung der optischen Dichte (OD) (Extinktion) des bis zu diesem Zeitpunkt gebildeten farbigen Reaktionsproduktes bei entsprechender Wellenlänge im Photometer. Die Farbintensität ist proportional zu der Konzentration des gesuchten Antigens.

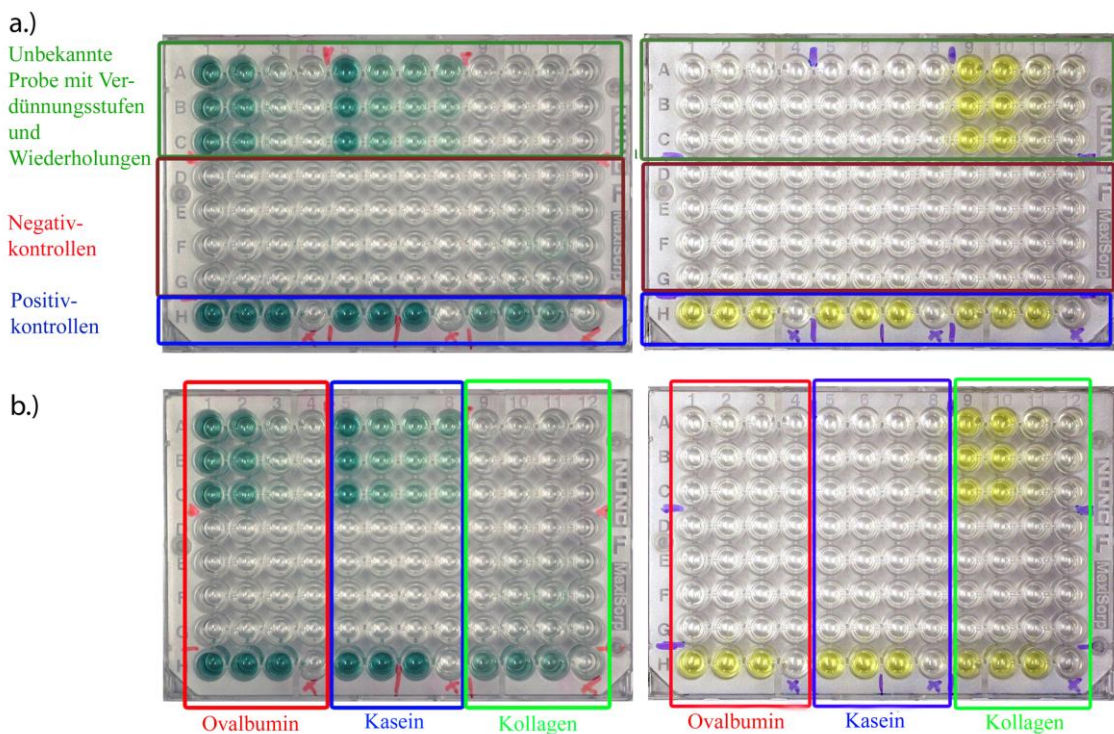
**Abbildung 6:** Prinzip des indirekten ELISA



Ein positiver Nachweis von Antigenen mittels indirekten ELISA ist aber nur dann möglich, wenn (1) die Probe überhaupt Antigene enthält, (2) die Antigene erfolgreich extrahiert worden sind und nicht unterhalb der Nachweisgrenze liegen, und (3) die für das jeweilige Antigen spezifischen Antikörper verwendet wurden. Bei Abwesenheit des gesuchten Antigens bindet der spezifische Primärantikörper nicht und somit auch nicht der enzymmarkierte Sekundärantikörper. Durch Fehlen des Enzyms kann das zugesetzte Substrat nicht umgesetzt werden; die Wells bleiben farblos. Zudem kann nur das Antigen nachgewiesen werden, nach dem im Assay durch Zugabe des spezifischen Primärantikörpers gesucht wird. Alle ELISA Versuche müssen von Kontrollen begleitet werden, um die Zuverlässigkeit der Assays (Funktionstüchtigkeit aller Reagenzien, unspezifische Bindungen, Pipettierfehler etc) zu sichern und die Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen. Positivkontrollen müssen bei Anwesenheit aller Komponenten des ELISA (Antigen, Primär-, Sekundärantikörper und Substrat) eine

deutliche Farbreaktion aufzeigen. Wohingegen es beim Weglassen einer der Komponenten zu keinen erkennbaren Farbreaktionen (= unspezifische Bindungen) in den Wells kommen darf, um so falsch-positiv Ergebnisse ausschließen zu können. Erst diese Kontrollen machen es möglich, eine Farbreaktion in den Wells mit den Proben als zweifelsfreien Nachweis für das gesuchte Antigen zu bewerten (Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Beispiel für die Detektion von Ovalbumin und Kasein mit dem HRP/ABTS Detektionssystem (links) und die Detektion von Kollagen mit dem AP/pNPP Detektionssystem (rechts) auf MaxiSorp™ (NUNC #439454) Mikrotiterplatten. a.) Jeweils eine unbekannte Probe/Platte wurde in drei Wiederholungen mit je 4 Verdünnungsstufen (links nach rechts), sowie Positiv- und Negativkontrollen belegt und auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen untersucht. b.) Positivkontrollen = positiv; Negativkontrollen = negativ (keine Farbe). Eindeutige Identifizierung von Ovalbumin und Kasein (links) und Kollagen (rechts).



## 5.2 Ausgangssituation und Durchführung

Den Ausgangspunkt bildete die nicht-kompetitive indirekte ELISA Methode zum Nachweis von Bakterien auf Wandgemäldeproben nach Rolfes (1991), die durch Schultz (2006) bereits auf ihre grundsätzliche Anwendbarkeit zum Nachweis von Ovalbumin, Kasein und Störkollagen an Probekörpern und vereinzelt an Proben von Kunstobjekten erfolgreich überprüft wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung dieses ELISA Systems im Hinblick auf das Extraktionsverfahren, Art der Mikrotiterplatte und des Blockpuffers, Inkubationstemperatur und -dauer sowie die

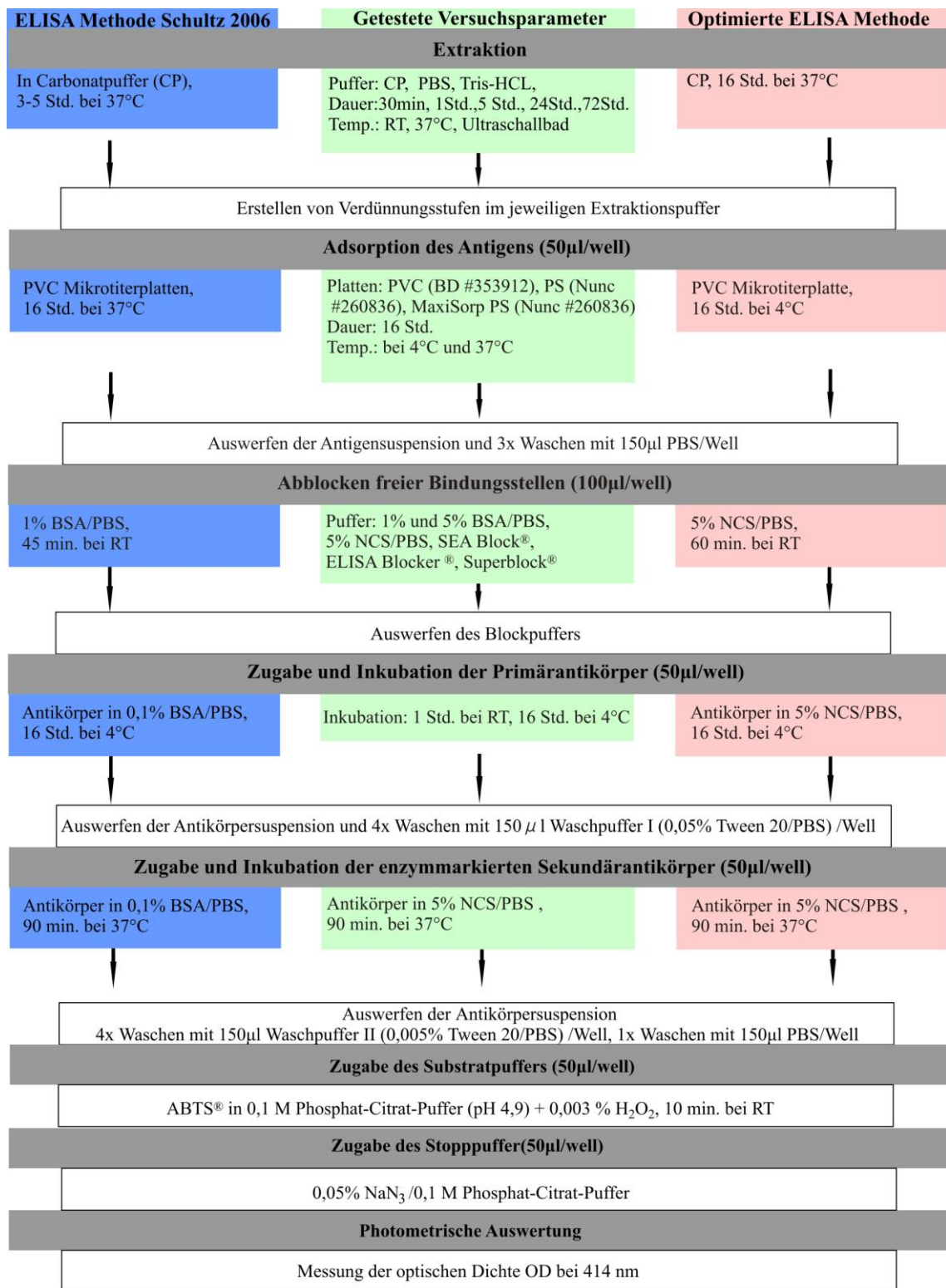
Ausweitung des Verfahrens auf anderen relevante proteinhaltige Bindemittel. Tabelle 4 stellt das ELISA Protokoll von 2006 vor (Spalte 2). Die im folgenden Kapitel evaluierten Schritte und Materialien sind in Spalte 3 aufgelistet. Die optimierte und erweiterte ELISA Methode ist in Spalte 4 aufgeführt und unter → Kap. 5.12 abschließend zusammengefasst.

Zum allgemeinen Versuchsaufbau: Jede Mikrotiterplatte wurde, wie bereits beschrieben, mit Positiv- und Negativkontrollen versehen. Die restlichen Wells der Mikrotiterplatten wurden mit den Proben oder Standardantigenen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen beschickt. Die Wahl der Verdünnungsstufen ist immer abhängig von der Probengröße, -zusammensetzung und Alter der Kunstobjekte. Für unpigmentierte, reine Bindemittel bieten sich niedriger konzentrierte Verdünnungsstufen (1:10-1:100.000) an, während bei pigmentierten Proben höher konzentrierte Stufen (1:2-1:100) geeigneter sind. In der vorliegenden Arbeit wurden in der Regel 3-4 Verdünnungsstufen in mindestens 2 Parallelen (2 Wells/Stufe) getestet. Die Messergebnisse wurden gemittelt, Standardabweichung berechnet und tabellarisch oder als Balkendiagramm dargestellt.

Da das untersuchte Probenmaterial zumeist pigmentiert und eine vollständige Extraktion der nachzuweisenden Substanzen unwahrscheinlich ist (→ Kap. 5.4), werden grundsätzlich der Probenansatz (w/v) und die gewählten Verdünnungsstufen angegeben.



**Tabelle 4:** Tabellarische Übersicht zu den einzelnen ELISA Schritten, der ELISA Methode von Schultz 2006, die evaluierte Versuchparameter im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie die erweiterte, optimierte ELISA Methode.



### 5.3 Bestimmung der geeigneten Antikörperverdünnung

Vor der Anwendung jeder immunologischen Technik muss die optimale Arbeitsverdünnung der Antikörper anhand der Titerbestimmung ermittelt werden. Der Titer ist eine Maßangabe für Verdünnungen von Antikörpern, die gerade noch eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion ergeben. Die geeigneten Arbeitsverdünnungen werden oft schon vom Hersteller für die gängigen Verfahren angegeben. Diese beziehen sich in der Regel auf die Detektion von ungealterten, nativen Proteinen bei medizinischen oder biochemischen Fragestellungen. Für den Einsatz an gealterten Proben von Kunstwerken, die zudem oft in einer komplexen Matrix eingebunden sind, sind sie daher zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen.

Zur Erfassung der Arbeitsverdünnung wurden die Standardantigene Ovalbumin, Phosvitin, Kasein, Gelatine, Leim aus Forellenabfällen, Störleim, Ghatti Gummi und Tragant in 1 mg/ ml Carbonatpuffer angesetzt (→ Anhang A2), stufenweise verdünnt und Mikrotiterplatten damit beschickt. Es folgte die Zugabe von ebenfalls stufenweise verdünnten Antikörperlösungen bis zum Ausbleiben einer positiven Reaktion, die mittels ELISA überprüft wurde. Die Arbeitsverdünnung wurde dann zwei bis drei Verdünnungsstufen niedriger eingestellt (Friemel 1984). Die Arbeitsverdünnung folgender Primärantikörper wurde bestimmt: anti-Ovalbumin (Chemicon/Millipore #AB1225), anti-Phosvitin (Santa Cruz Biotechnology #SC-46681), anti-Kasein (ICL #RCAS-10A), anti-Kollagen (Abcam #ab34710), anti-Fischkollagen (Bioscience Resource #T89171R), anti-Störkollagen (Biotrend AIS2006), anti-Arabinogalactan-Proteine (CCRC #JIM13, #MAC207) und anti-Tragant (CCRC #MAC265). Die Bestimmung der Arbeitsverdünnung der Sekundärantikörper spielt eher eine untergeordnete Rolle, da in der Regel eine einheitliche Arbeitsverdünnung für alle korrespondierenden Primärantikörper gesucht wird. Die Feineinstellung erfolgt über die Arbeitsverdünnung der Primärantikörper. Folgende Sekundärantikörper mit einer Meerrettich Peroxidase Markierung kamen zum Einsatz: goat-anti-rabbit (GARb/PO), goat-anti-rat (GART/PO), goat-anti-mouse (GAMs/PO) (Southern Biotech #4050-05, #3050-05 und #1031-05). Weitere Informationen zu allen Antikörpern sind im → Kap. 5.10 sowie im → Anhang A1 aufgeführt.

Die getesteten Antikörperverdünnungen orientierten sich zumeist an den Herstellerempfehlungen und die Durchführung erfolgte wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5-6 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Empfohlene, getestete und verwendete Primärantikörperverdünnungen

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Empfohlene Verdünnung (Hersteller)</b>	<b>Getestete Verdünnungen</b>	<b>Verwendete Verdünnung</b>
Ovalbumin (#AB1225)	1:10.000 – 1:50.000	1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000	1:1000
Phosvitin (#SC-46681)	1:50 – 1:500	1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000	1:100
Kasein (#RCAS-10A)	1:5000	1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000	1:1000
Kollagen (#ab34710)	1:4000 – 1:8000	1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000	1:500
Fischkollagen (#T89171R)	1: 10 - 1:200	1:200, 1:500	1:200
Störkollagen (AIS2006)	-	1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000	1:500
Arabinogalactan-Proteine (#JIM13)	1:1 – 1:10	1:10, 1:100	1:10
Arabinogalactan-Proteine (#MAC207)	1:1 – 1:10	1:10, 1:100	1:10
Tragant (#MAC265)	1:1 – 1:10	1:10, 1:100	1:10

**Tabelle 6:** Empfohlene, getestete und verwendete Sekundärantikörperverdünnungen

<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Empfohlene Verdünnung (Hersteller)</b>	<b>Getestete Verdünnung</b>	<b>Verwendete Verdünnung</b>
GARb/PO, (#4050-05)	1:4000 – 1:8000	1:300, 1:500, 1:600	1:500
GARt/PO, (#3050-05)	1:4000 – 1:8000	1:500, 1:1000	1:1000
GAMs/PO, (#1031-05)	1:4000 – 1:8000	1:500, 1:1000	1:500

Die Arbeitsverdünnungen der Primärantikörper sind: 1:1000 für anti-Ovalbumin (#AB1225) und anti-Kasein (#RCAS-10A), 1:500 für anti-Kollagen (#ab34710) und anti-Störkollagen (AIS2006), 1:200 für anti-Fischkollagen (#T89171R), 1:100 für anti-Phosvitin (#SC-46681), 1:10 für anti-Arabinogalactan-Proteine (#JIM13, #MAC207) sowie anti-Tragant (#MAC265). Die Arbeitsverdünnungen für die jeweiligen Sekundärantikörper sind: 1:500 für GARb/PO (#4050-05) und GAMs/PO (#1031-05), 1:1000 für GARt/PO (#3050-05). Die Arbeitsverdünnungen beziehen sich nur für die in der Arbeit eingesetzten Antikörper sowie das verwendete ELISA System. Allerdings gilt zu beachten, dass insbesondere bei polyklonalen Antikörpern mit

chargenabhängigen Schwankungen zu rechnen ist und sich daher gegebenenfalls auch die Arbeitsverdünnungen ändern. Bei Erhalt einer neuen Antikörpercharge ist die Arbeitsverdünnung anhand des jeweiligen Standardantigens mittels ELISA zu kontrollieren.

## 5.4 Extraktion

Der erste Schritt für einen erfolgreichen Nachweis von proteinhaltigen Bindemitteln mittels ELISA ist die Extraktion der Zielmoleküle aus der Probe, um sie für die Adsorption an die Festphase und in der Folge für die Bindung der Antikörper zugänglich zu machen. Idealerweise sollten Extraktionspuffer die Löslichkeit von Proteinen und ihr Herauslösen aus der anorganischen Matrix (z.B. Pigmente) fördern, ohne dabei Protein zu verlieren. Darüber hinaus ist es wichtig, eine minimale Extraktionsdauer und ideale Extraktionsbedingungen zu etablieren, um Proteinverluste durch Präzipitation und möglichen Abbau in Folge mikrobieller Kontamination zu vermeiden und einen effizienten Arbeitsablauf im Labor zu gewährleisten, ohne dabei die Nachweisempfindlichkeit zu verringern.

Die Löslichkeit von Proteinen ist u.a. abhängig von der Art des Proteins, Alter, Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration (Ionenstärke) und Polarität des Lösungsmittels (Florian 2007; Schäfer 2013). Wärmezufuhr, extreme pH-Werte, Ultraschalleinwirkung sowie die Zugabe von organischen Lösemitteln, Komplexbildnern oder Detergenzien können zu teilweise reversiblen, aber auch irreversiblen Veränderungen der Proteinstruktur (vor allem Sekundär- und Tertiärstruktur) führen (Buchholz 2003). Die native Konformation geht dabei verloren und es kommt zur Denaturierung des Proteins. Denaturierte Proteine haben die Tendenz sich aneinanderzulagern, was die Löslichkeit verschlechtert. Auf die Anwesenheit von Metall-Ionen, wie sie beispielsweise in einigen Pigmenten vorkommen, reagieren die Proteine ebenfalls empfindlich (Schilling & Khanjian 1996a-b; Khandekar & Phenix 2000).

Crowther (2001) gibt an, dass eine leichte, partielle Denaturierung bestimmter Proteine zu einer stärkeren Bindung an die Mikrotiterplatte führen kann. Normalerweise sind die hydrophoben Reste eines Proteins nach innen gerichtet und die hydrophilen Reste nach außen orientiert. Eine partielle Denaturierung führt zu einer Veränderung der Proteinstruktur (Entfaltung), macht die hydrophoben Reste zugänglich und erhöht deren Adsorption an die Wells einer Mikrotiterplatte (Klausmeyer 2009a). Das kann durch die Behandlung der Proteine mit niedrigen pH-Wert oder milden Detergenzien erreicht werden (Crowther 2001). Chaotrope Substanzen wie Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Thiocyanate werden ebenfalls eingesetzt, um diese Denaturierung der Proteine zu bewirken (Klausmeyer 2009a).

Verschiedene wässrige Extraktionspuffer wurden an pigmentierten und unpigmentierten Probekörpern getestet. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4), Carbonatpuffer (CP, pH 9,6) und Tris-Hydrochloridpuffer (Tris-HCL, pH 7,4) wurden verwendet, um Proteine aus einer Vielzahl an Proben zu extrahieren. PBS und CP unterscheiden sich hauptsächlich in Bezug auf ihren pH-Wert und sind zwei typische Extraktions- und Coatingpuffer für ELISA Anwendungen (Luttmann et al. 2009). Heginbotham et al. (2006) empfehlen Tris-HCL mit Zusätzen von EDTA, Harnstoff und SDS, da dieser durch die partielle Denaturierung der Proteine, das Herauslösen aus der Matrix verbessert. Die Zugabe eines Chelatbildners (EDTA) soll helfen Metall-Ionen von Pigmenten zu binden, damit sie nicht weiter mit den Proteinen wechselwirken und/oder das Detektionssystem des ELISA störend beeinflussen. Um einer Proteinfällung vorzubeugen, versetzen die Autoren die in Tris-HCL extrahierten Proben mit dem doppelten Volumen an Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 9,2), bevor weitere Verdünnungsstufen mit diesem Puffer erstellt werden.<sup>3</sup>

Die Extraktionsversuche wurden über eine unterschiedliche Dauer (30 Min., 1 Std., 5 Std., 24 Std. und 72 Std.) und bei unterschiedlichen Temperaturen (RT oder ~ 37 °C) sowie im Ultraschallbehandlung durchgeführt. Nicht gelöste Stoffe wurden anschließend für 10 Min. bei 18890 RZB abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand zur Weiterverarbeitung abgenommen. Die Effizienz der Extraktion wurde über Proteinbestimmung ermittelt und mittels ELISA stichprobenartig überprüft.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay der Firma Pierce (Rockfort, USA) verwendet. Dieser Test ermöglicht einen photometrischen, quantitativen Nachweis, basierend auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion), wobei die reduzierten Kupferionen mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 562 nm und ist proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Mittels einer Kalibrationsreihe aus BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen kann die Proteinkonzentration einer Probe bestimmt werden. Im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Lowry (Lottspeich & Engels 2006) ist der BCA kompatibel mit den meisten ionischen und nicht ionischen Detergenzien (z.B. SDS bis zu 5 %) und zudem schneller. Die Intensität der Farbstoffbildung hängt dabei von der Temperatur ab, so dass der BCA-Assay für eine gewünschte Sensitivität über die Temperatur gesteuert werden kann (*enhanced protocol*). Der BCA Protein Assay Kit wurde entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt (→ Anhang D1). Die BSA-Standardreihen mit einem Konzentrationsbereich von 25-2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 5-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (*enhanced protocol*) wurden in dem jeweiligen Extraktionspuffer angesetzt. Die

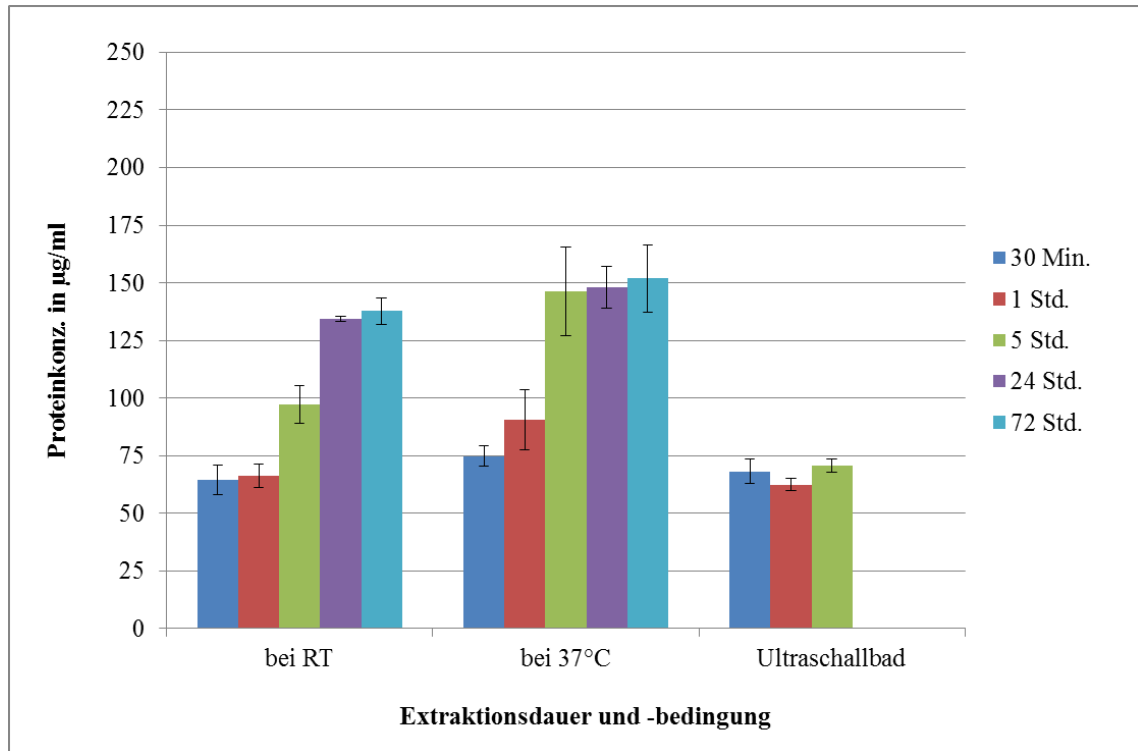
---

<sup>3</sup> Wenn nicht anders angegeben, beinhaltet die Abkürzung Tris-HCL stets die Zugabe von Natriumhydrogencarbonatpuffer

Proben wurden je nach Art, pigmentiert oder unpigmentiert, zwischen 1-10 mg/ ml in dem jeweiligen Extraktionspuffern angesetzt und vor Assaybeginn in unterschiedliche Verdünnungsstufen vorverdünnt, da unterschiedlich hohe Proteinkonzentrationen erwartet wurden. Jeweils 25 µl der Proben und der gemäß BCA Protokoll erstellten BSA Standards wurden mit 200 µl *Working Reagent* (Pierce Lösungen A + B, Mischungsverhältnis 50:1) in die Mikrotiterplatten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 37 °C bzw. 30 Min. bei 60 °C (*enhanced protocol*) wurde die Extinktion im Photometer bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der BSA-Standardkurve errechnet.

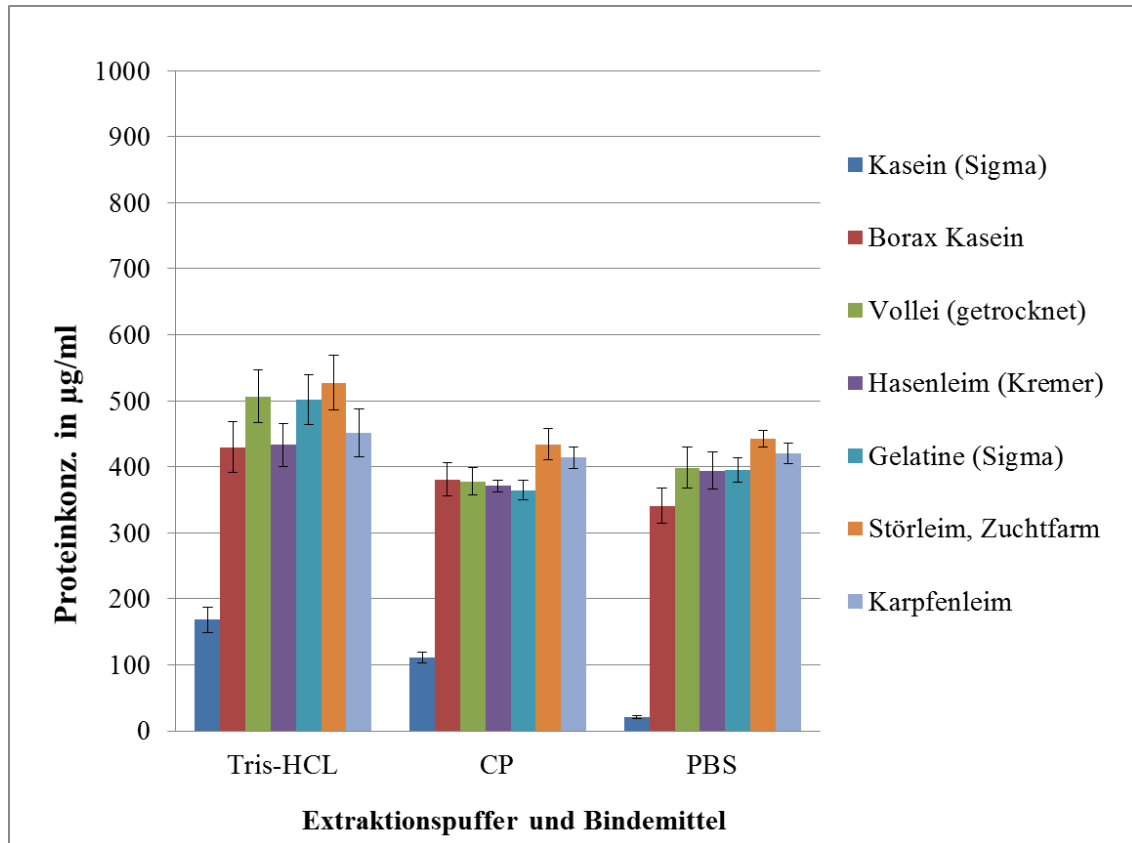
Diagramm 1 zeigt, die Extraktion mit Tris-HCL am Beispiel von Proben einer Kreidegrundierung (#PT1: Kreide/tierischer Leim) (→ Anhang B2.1). Die höchste Proteinausbeute wurde durchweg bei der Extraktion bei 37 °C erzielt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration macht deutlich, dass eine Extraktionsdauer von mindestens 5 Stunden bei 37 °C die Extraktionsausbeute im Vergleich zu 30 Minuten annähernd verdoppelt. Die Verlängerung der Extraktionsdauer über 5 Stunden hinaus oder eine Ultraschallbehandlung führten dagegen zu keiner signifikanten Erhöhung der Proteinausbeute.

**Diagramm 1:** Beurteilung der Extraktionsdauer und -bedingung durch Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA *enhanced protocol*) am Beispiel einer Kreidegrundierung (#PT1, Kreide/tierischer Leim) extrahiert mit Tris-HCL. Probenansatz (w/v) jeweils 10 mg/ml, dargestellt Verdünnung 1:2. (n = 3).



In einem weiteren Versuch wurden jeweils die reinen Bindemittel Kasein (Sigma #C3400), getrocknetes Borax-Kasein und Vollei (→ Anhang B1.5), Hasenleim (Kremer #63025), Gelatine (Sigma #G2500), Störleim (Zuchtfarm 1, Fulda) und Karpfenleim (→ Anhang B1.3) jeweils in den drei unterschiedlichen Extraktionspuffer für 5 Stunden bei 37 °C extrahiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA, die Ergebnisse sind in Diagramm 2 dargestellt. Es gibt kaum statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Extraktionspuffern. Tendenziell ist aber festzustellen, dass die Proteinausbeute mit Tris-HCL minimal höher ist als mit Carbonatpuffer oder PBS. Auffällig ist die generell niedrige Proteinausbeute bei Kasein (Sigma #C3400), was darin begründet liegt, dass Kasein in Wasser lediglich quellbar ist. Erst durch den Aufschluss mit Alkalien wie beispielsweise Borax wird es wasserlöslich(er), was auch die höhere Proteinausbeute dieser Proben bestätigt (→ Kap. 3.1.2, → Kap. 5.10.2).

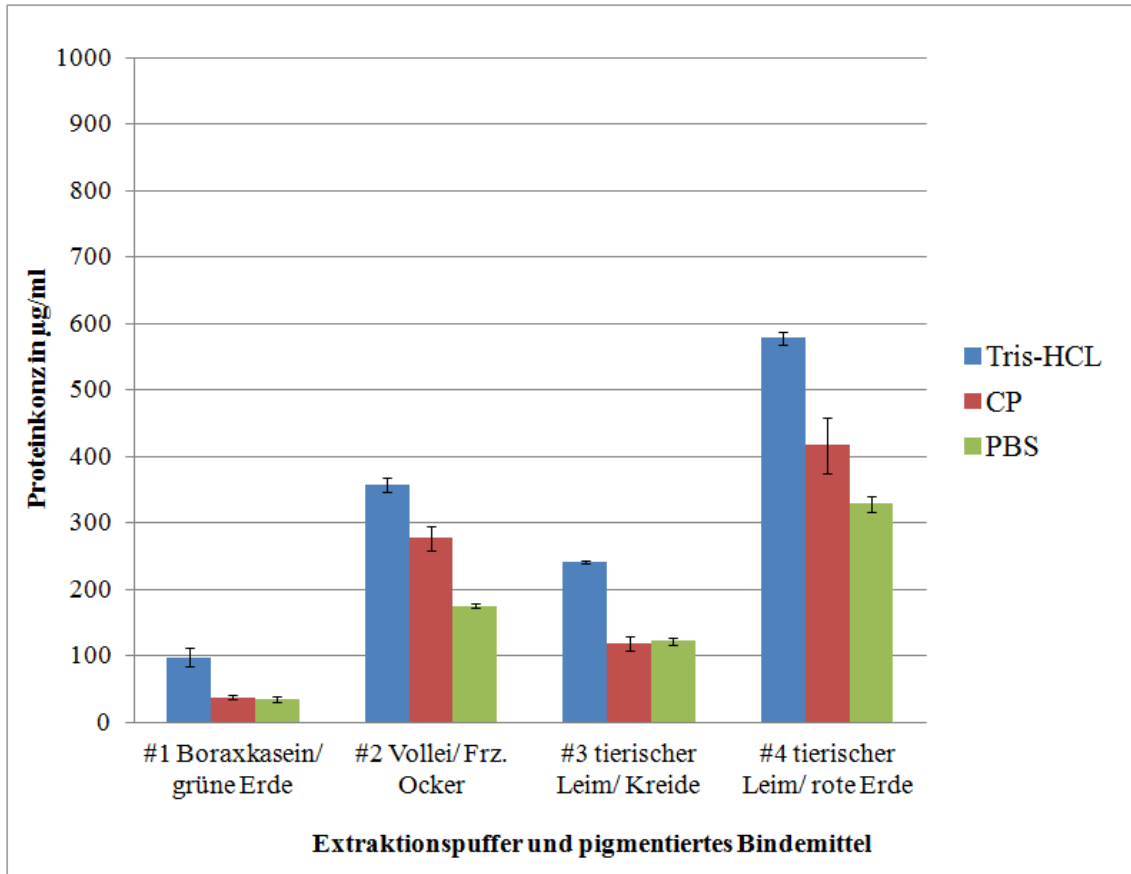
**Diagramm 2:** Proteinbestimmung mittels BCA an reinen Bindemitteln. Extraktion mit drei verschiedenen Extraktionspuffern Tris-HCL, CP und PBS für 5 Stunden bei 37 °C. Probenansatz im jeweiligen Extraktionspuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:1 (n = 3).



Abschließend erfolgten Versuche mit den drei Extraktionspuffern an pigmentierten Proben. Proben von vier verschiedenen Aufstrichpräparaten (#1 Boraxkasein/Grüne Erde, #2 Vollei/frz. Ocker, #3 tierischer Leim/Kreide und #4 tierischer Leim/rote Erde) wurden genommen, zermahlen und auf jeweils drei Proben gleicher Menge aufgeteilt (→ Anhang B1.5). Diese wurden dann jeweils in den drei Extraktionspuffern für 5 Stunden bei 37 °C extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren der Feststoffe (Pigmente) erfolgte die Proteinbestimmung des Überstandes mittels BCA. Diagramm 3 zeigt die Ergebnisse der Proteinbestimmung. Die Unterschiede zwischen den drei Extraktionspuffern im Vergleich zu den unpigmentierten Proben in Diagramm 2 sind deutlicher. Tris-HCL zeigte in allen Proben die höchsten Proteinausbeuten, gefolgt von CP. PBS unterscheidet sich aber nur geringfügig von der Extraktion mit CP.



**Diagramm 3:** Proteinbestimmung mittels BCA an pigmentierten Proben. Extraktion mit drei verschiedenen Extraktionspuffern Tris-HCL, CP und PBS für 5 Stunden bei 37 °C. Probenansatz im jeweiligen Extraktionspuffer (w/v) 10 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:1. (n = 3).



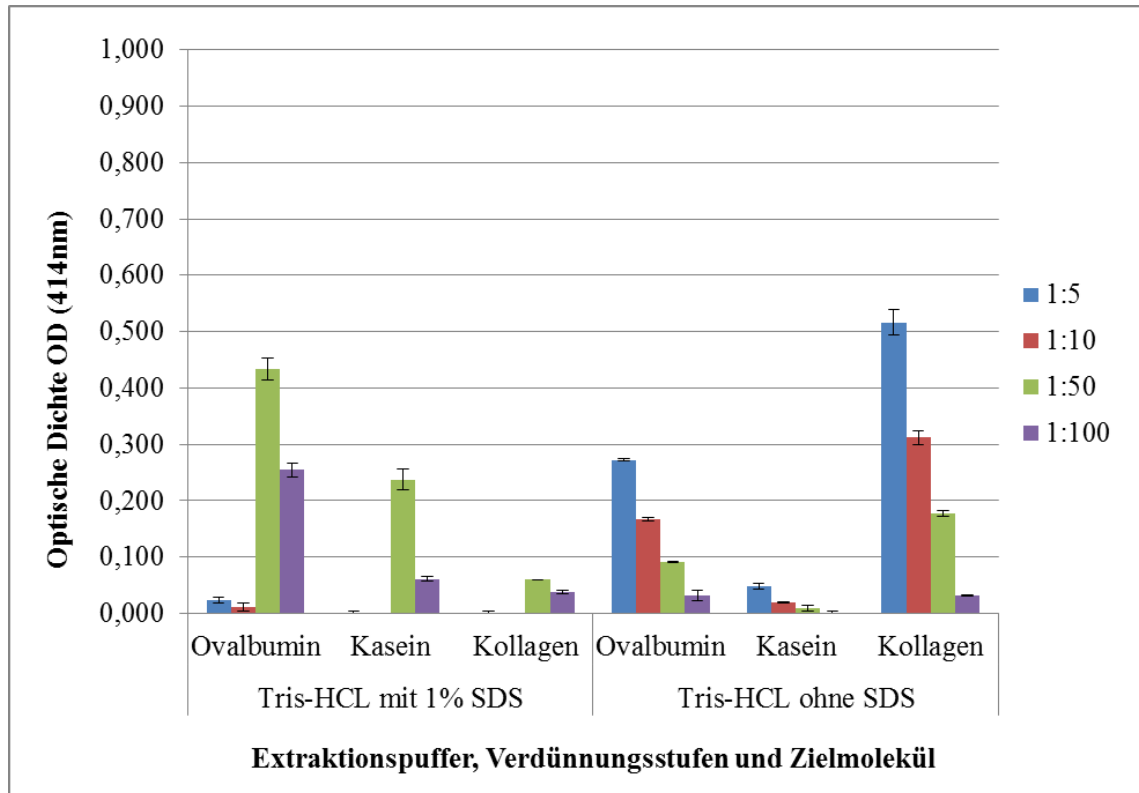
Grundsätzlich haben die drei vorangegangenen Versuche gezeigt, dass eine vollständige Extraktion der Proteine auf wässriger Basis nicht möglich ist, sondern im Gegenteil, die Proteinausbeute am Beispiel der ungealterten, reinen Bindemitteln teilweise unter 50 %, bei unbehandeltem Kasein sogar unter 20 % liegt (vgl. Diagramm 2). Alternativ ist eine Extraktion mit Lösemitteln denkbar, doch erhöht sich dadurch das Risiko des Proteinverlustes durch Degradation und Präzipitation, weshalb in der vorliegenden Arbeit davon abgesehen wurde.

Bei der Extraktion mit Tris-HCL fiel bei den später folgenden ELISA Versuchen an Proben mit bekannter Zusammensetzung immer wieder auf, dass die hochkonzentrierten Verdünnungsstufen für jedes Protein im ELISA niedrigere oder gar keine Extinktionswerte aufzeigten, während niedriger konzentrierte Verdünnungsstufen eindeutig, teilweise sogar hohe, positive Werte ergaben (Diagramm 4-5). Dieses Phänomen wurde in der Vergangenheit auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet,

aber nicht weiter diskutiert (mündl. Kommunikation Joy Mazurek, Getty Conservation Institute und Dr. Crtomir Tavzes, Institute of Wood Science and Technology).

Der Extraktionspuffer Tris-HCL enthält neben EDTA und Harnstoff auch 1 % SDS. Dieses anionische Tensid soll helfen, wasserunlösliche Proteinfractionen in Lösung zu bringen (Lechtzier et al. 2002). Dabei werden aber auch nichtkovalente Bindungen der Proteine unterbrochen und so deren Quartär- und Tertiärstruktur zerstört (Denaturierung), was u.a. zur Folge haben kann, dass die Epitope für die Antikörperbindung verloren gehen. Lechtzier et al. (2002) berichteten, dass die Zugabe von 2 % SDS zu einem ELISA System zur kompletten Hemmung des ELISA führt und dass schon eine Anwesenheit von mehr als 0,02 % SDS in der Lösung schädliche Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate im ELISA haben kann. Die Autoren fügen an, dass dieser Effekt auf die Denaturierung der Proteine durch SDS zurückzuführen ist, aber durch Verdünnung der Lösung bis auf eine SDS-Konzentration von weniger als 0,02 % partiell rückgängig (Renaturierung) gemacht werden kann. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden mehrschichtigen Probekörper mit bekannter Zusammensetzung (Probetafel #PT5: Mischung aus Kreide/tierscher Leim, Grüne Erde/Kasein und frz. Ocker/Vollei; → Anhang B2.1) in Tris-HCL sowohl mit als auch ohne SDS für 16 Stunden bei RT extrahiert. Die Probe wurde vorher zerrieben und gleichmäßig auf die Extraktionspuffer verteilt. Nach der Extraktion und Entfernung ungelöster Feststoffe (Zentrifugation) wurden Verdünnungsstufen mit dem Überstand erstellt und im ELISA auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben und die Ergebnisse sind in Diagramm 4 dargestellt. Die Extraktion mit SDS zeigt hier einen positiven Nachweis der gesuchten Proteine erst ab der dritten Verdünnungsstufe, was zum einen bestätigt, dass in den ersten beiden Verdünnungsstufen die SDS Konzentration zu hoch ist und zum anderen, dass durch eine Weiterverdünnung die Konzentration der freien SDS Moleküle verringert wird und dadurch eine partielle Renaturierung der Proteine möglich ist. Dabei scheinen sich auch teilweise die für die Antikörper notwendigen Epitope zurückzubilden, so dass sie wieder an das Protein binden können. Ob darüber hinaus, die Adsorption der durch SDS veränderten Proteine an die Plastikoberfläche der Wells beeinflusst wird, wurde nicht weiter untersucht. Die Extraktion ohne SDS hingegen zeigt, dass alle vier Verdünnungsstufen entsprechend ihrer Proteinkonzentration von der ersten bis zur vierten Stufe abnehmen und bestätigt somit die hemmende Wirkung von 1 % SDS auf das ELISA Verfahren.

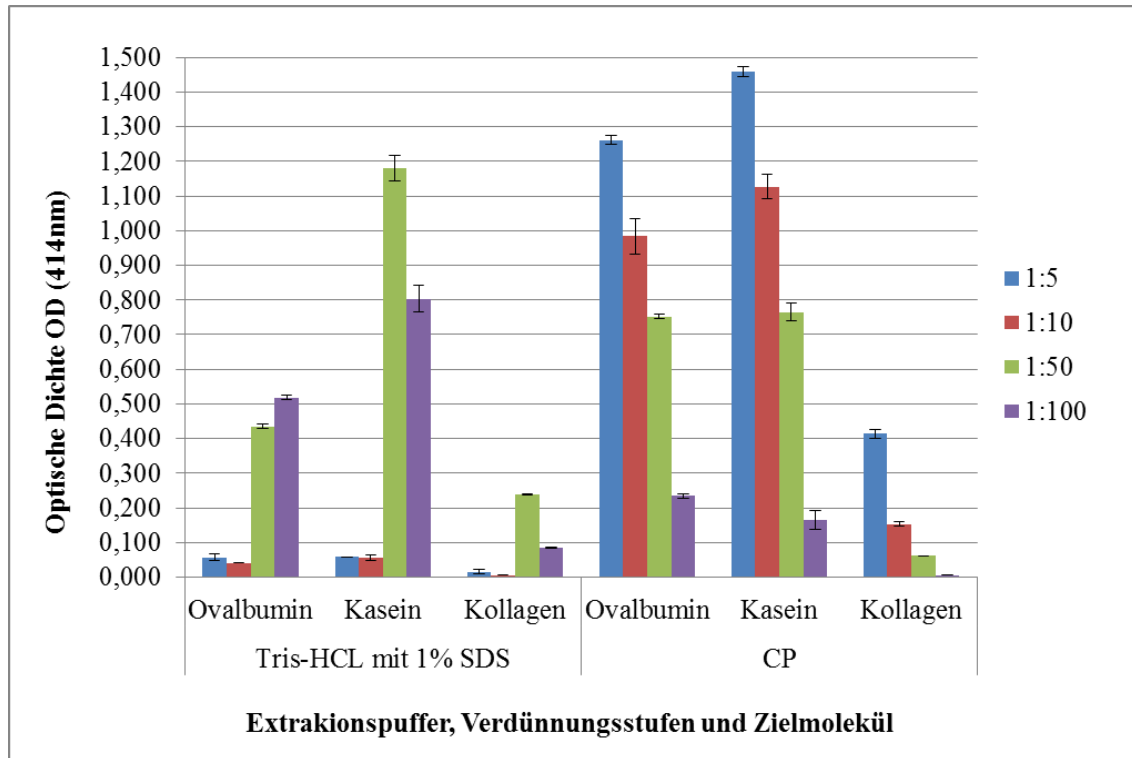
**Diagramm 4:** Der Einfluss von SDS im Extraktionspuffer auf das ELISA Ergebnis am Beispiel von Tris-HCL mit und ohne 1 % SDS. Probekörper: PT#5 (Probetafel) Mischung aus Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein und frz. Ocker/Vollei), Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. (n = 2).



Die Hemmung durch SDS ist ebenfalls von der Konzentration des Proteins im Allgemeinen abhängig. Je mehr Protein in der Probe, desto mehr SDS könnte ohne schädigende Wirkung verwendet werden und umgekehrt. Da die Proteinkonzentration in Proben von Kunstwerken in der Regel unbekannt ist, erhöht sich bei der Verwendung von SDS im Extraktionspuffer das Risiko eines falsch-negativ Ergebnisses, falls ungeeignete Verdünnungsstufen gewählt werden.

Bei der Extraktion einer Probe mit Tris-HCL oder Carbonatpuffer zeigt sich im ELISA deutlich, dass nicht nur die Menge des Proteins ausschlaggebend ist, sondern auch in welchem Erhaltungszustand sich das Protein befindet. Vergleicht man also die ersten eindeutig positiven Extinktionswerte beider Extraktionspuffer im ELISA, so erzielt die mit Carbonatpuffer extrahierte Probe höhere Extinktionswerte als die Probe mit Tris-HCL (Diagramm 5). Daher wurde Tris-HCL trotz der höheren Proteinausbeute (vgl. BCA Ergebnisse), aber aufgrund der potentiellen Hemmung durch SDS als Extraktionspuffer für die vorliegende Arbeit verworfen und ausschließlich der Carbonatpuffer (CP) verwendet.

**Diagramm 5:** Der Einfluss von SDS in Tris-HCL im Vergleich zur Extraktion mit Carbonatpuffer (CP) auf das ELISA Ergebnis. Probekörper: PT#5 Mischung aus Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein und frz. Ocker/Vollei), Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 200 µg/ 500 µl. (n = 2).



## 5.5 Mikrotiterplatten

Der erste Folgeschritt bei einem ELISA besteht darin, das extrahierte Antigen an die feste Phase (Mikrotiterplatte) zu binden, was allgemein als Beschicken (*coat*) bezeichnet wird. Um Reproduzierbarkeit und Automatisierung des ELISA Verfahrens zu erreichen, werden heute in der Regel Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Wells) gewählt. Die transparenten Kunststoffplatten für die ELISA Anwendung sind meist aus Polystyrol (PS) oder Polyvinylchlorid (PVC) und aufgrund ihrer hohen Bindekapazität ( $\sim 400 \text{ ng Protein/cm}^2$ ) für die Anbindung von Proteinen besonders gut geeignet. Unbehandeltes PS oder PVC ist hydrophob. Diese Oberflächeneigenschaft kann aber gezielt durch physikalisch-chemische Verfahren modifiziert werden, um die Bindungsaffinitäten zwischen Antigen und der Festphase zu beeinflussen. So gibt es beispielsweise Platten mit einer höheren Affinität zu stärker hydrophoben Molekülen, oder Platten, die sich für die Immobilisierung von stark polaren Molekülen besser eignen. Alle namenhaften Hersteller auf dem Gebiet des Kunststofflaborbedarfs stellen solche speziellen Mikrotiterplatten her, daher sind Auswahl und Bezeichnungen äußerst vielfältig.

Die Bindung der Proteine an die Mikrotiterplatte beruht auf einer rein physikalischen Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der unpolaren Plastikoberfläche. Diese Art der Bindung ist relativ pH-Wert unabhängig und macht eine Diskussion über die Vor- und Nachteile des Extraktionspuffers mit pH 7 oder 9 nahezu hinfällig (Luttmann et al. 2009).

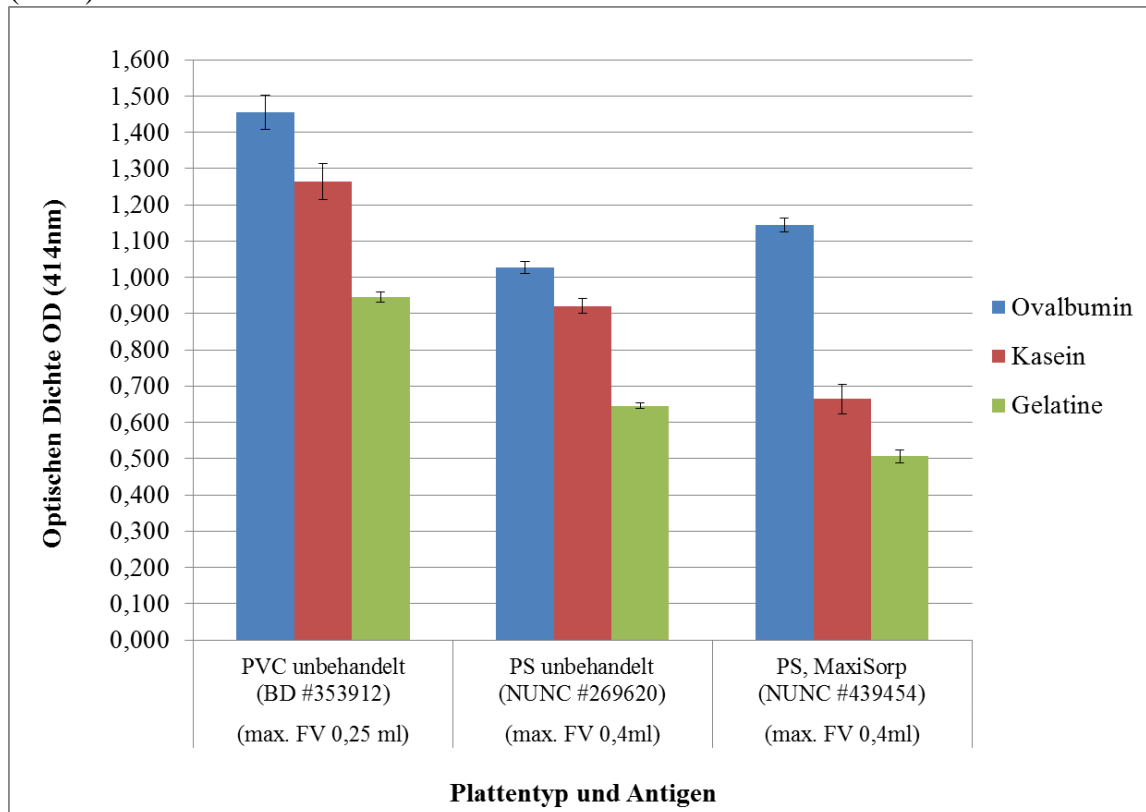
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedenen 96-Well Mikrotiterplatten getestet: eine unbehandelte PS-Platte (MicroWell™ #269620) und eine oberflächenmodifizierte PS-Platte (MaxiSorp™ #439454) (beide Nalge NUNC) sowie eine unbehandelte PVC-Platte (PVC #353912) (BD Falcon™). Während die unbehandelten Platten sich lediglich durch den Kunststoff unterscheiden, hat MaxiSorp™ eine modifizierte Oberfläche mit hoher Affinität für polare Gruppen und Moleküle mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Diese Oberfläche wird laut Hersteller für Assays empfohlen, bei denen Glykoproteine an die Kunststoffoberfläche adsorbiert werden. Außerdem unterscheiden sich die drei Plattentypen in der Form und dem Volumen ihrer Wells. Die Wells der beiden PS-Platten haben bei identischer Form ein maximales Füllvolumen (FV) von 0,4 ml. Die Wells der PVC Platte haben lediglich ein maximales FV von 0,25 ml und sind ein wenig schmaler (→ Anhang D2).

Die drei Mikrotiterplatten wurden jeweils mit den Standardantigenen für Ovalbumin, Kasein und Kollagen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen beschickt (→ Anhang A2) und die Wiederfindungsrate mittels ELISA überprüft. Die Durchführung erfolgte wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben und die Ergebnisse sind in Diagramm 6 dargestellt. Die Versuche sollten zeigen, ob die Art des Kunststoffes oder der Oberflächenmodifikation zu signifikanten Unterschieden in der Bindungsaffinität der Antigene führt und so eventuell die Nachweisempfindlichkeit gesteigert werden kann. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Schichtdicke (Füllhöhe) auf die ELISA Ergebnisse überprüft werden.

Diagramm 6 veranschaulicht, dass es kaum signifikante Unterschiede zwischen den drei Mikrotiterplatte in Bezug auf die Bindungsaffinität der getesteten Antigene gibt. Der Nachweis von Ovalbumin führte auf allen Platten zur höchsten Extinktion, gefolgt von Kasein und Kollagen. Die modifizierte Beschichtung der MaxiSorp™ Platte ergab im Vergleich zur unbehandelten PS Platte höhere Extinktionswerte für Ovalbumin, aber jeweils niedriger Werte für Kasein und Kollagen. Eine deutliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit zwischen der unbehandelten und behandelten PS Platte konnte aber nicht festgestellt werden. Die PVC Platte erreicht deutlich die höchsten Extinktionswerte für alle drei Antigene. Das ist weniger auf die Kunststoffart zurückzuführen als vielmehr auf die Schichtdicke. Bei gleicher Füllmenge pro Well (hier 50µl/Well) ist die Schichtdicke (Füllhöhe) bei Wells mit geringerem Durchmesser höher, der Weg des Lichtstrahls durch das Medium bei der photometrischen Messung also länger, was zu einer Erhöhung der Extinktion führt (Lambert-Beersches Gesetz).

Die Versuche zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kunststoffarten noch durch modifizierte Beschichtung, daher wurde aufgrund der kleineren Wells und der daraus resultierenden geringeren Nachweisempfindlichkeit für in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der PVC Mikrotiterplatte gearbeitet.

**Diagramm 6:** ELISA Ergebnis zur Evaluierung von drei verschiedenen Mikrotiterplatten anhand von Ovalbumin, Kasein und Gelatine. (FV) Füllvolumen Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2).



## 5.6 Inkubation

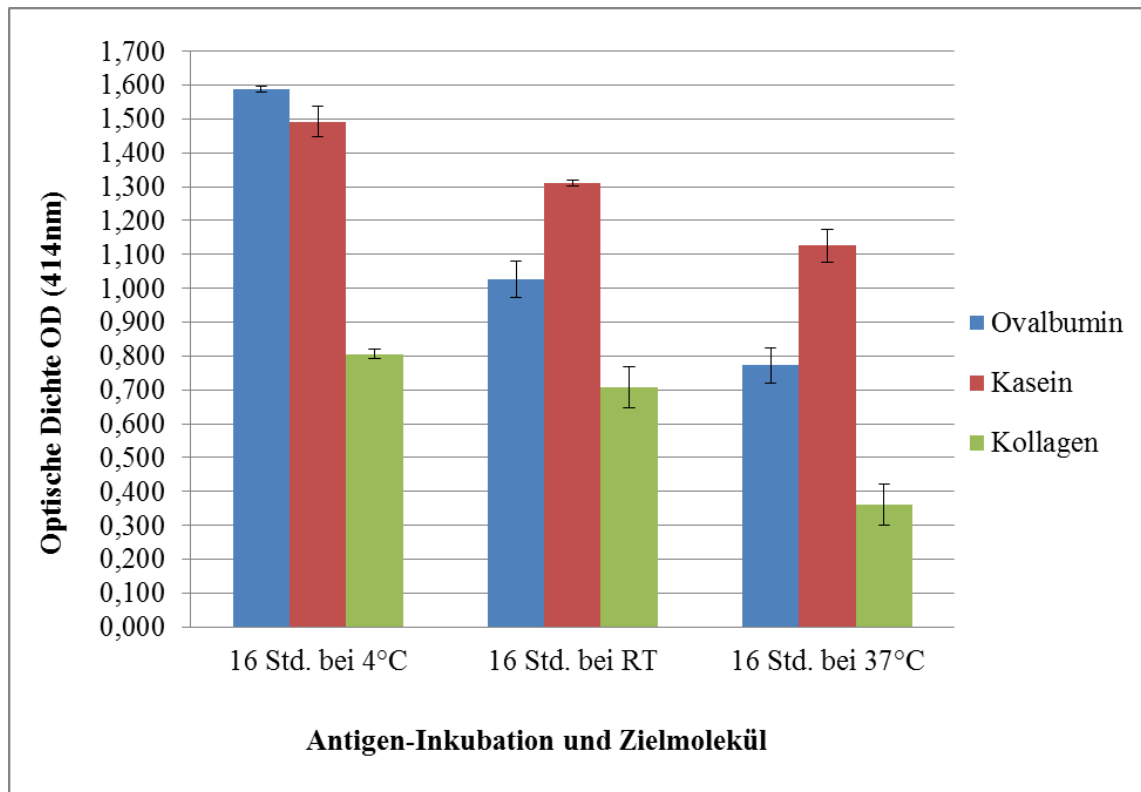
Um bei einem Assay eine maximale Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, ist es üblich, die Platten für eine ausreichende Zeit zu inkubieren, damit sich zwischen allen Reagenzien und Reaktionspartnern ein Gleichgewicht einstellt. Die Bindung des Antigens an die Mikrotiterplatte oder der Antikörper an das Antigen kann daher durch die Dauer und Temperatur der Inkubation beeinflusst werden und so zur Empfindlichkeit des Assays beitragen (Crowther 2001).

Erste Versuche beschäftigen sich mit der Antigeninkubation. In der Literatur sind, abhängig vom Einsatzgebiet und des jeweiligen ELISA Systems, unterschiedliche Angaben zu finden. Sie reichen von der Inkubation für 16 Stunden bei 2-8 °C, RT oder 37 °C bis hin zu 1-3 Stunden bei RT oder 37 °C und kürzer (Luttmann et al. 2009;

Rolfes 1991; Deshpande 1996; Heginbotham et al. 2006; Crowther 2001). Längere Inkubationszeiten können unter Umständen zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit eines Assays (bis zum Erreichen der Gleichgewichtskonstante) führen (Deshpande 1996). Da bei Proben von Kunstobjekten, aufgrund der geringen Probenmenge und Proteinkonzentration, eine hohe Assayempfindlichkeit gefordert ist, wurden ausschließlich längere Inkubationszeiten (16 Stunden) mit in die Versuche aufgenommen und lediglich die Inkubationstemperatur verändert. Die Versuche sollten zeigen, welchen Einfluss unterschiedliche Temperaturen auf die Nachweisempfindlichkeit des verwendeten ELISA Systems haben. Dafür wurden die Standardantigene für Ovalbumin, Kasein und Kollagen in Carbonatpuffer überführt (1 mg/ ml), für 5 Stunden bei 37 °C extrahiert und Verdünnungsstufen erstellt (1:100-1:100.000) (→ Anhang A2). Drei Mikrotiterplatten wurden mit allen Verdünnungsstufen beschickt. Jeweils eine Platte wurde 16 Stunden bei 4 °C, bei RT oder bei 37 °C inkubiert und die Wiederfindungsrate mittels ELISA überprüft. Die ELISA Durchführung erfolgte wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben, die Ergebnisse sind in Diagramm 7 dargestellt.

Diagramm 7 zeigt deutlich den Einfluss der unterschiedlichen Inkubationstemperaturen auf die Nachweisempfindlichkeit. Die Inkubation bei 4 °C zeigte für alle drei Antigene die höchsten Extinktionswerte. Im Vergleich zur Inkubation bei 37 °C konnten die Werte für Ovalbumin und Kollagen mehr als verdoppelt und für Kasein um etwa ein Drittel bei gleicher Ausgangsantigenmenge gesteigert werden. Die Inkubation beim RT führte, wenn auch weniger deutlich, ebenfalls zu einer Steigerung der Empfindlichkeit verglichen mit der Inkubation bei 37 °C. Die Ergebnisse zeigen, dass die nachzuweisenden Proteine temperaturempfindlich sind. Zum einen ist es möglich, dass es durch die leicht erhöhten Temperaturen zu einer partiellen Denaturierung der Proteine kommt, die in der Folge zu vereinzelt Epitopverlusten führt und die Antikörperbindung reduziert. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die Bindung der Antigene an die Oberfläche der Wells durch die erhöhte Temperatur weniger stabil ist und es in der Folge zu Auswaschungen des Antigens kommt. Allerdings besteht zur Reaktionskinetik in Festphasenassays aufgrund der Platten- und Antigenvielfalt noch Forschungsbedarf, weshalb die Ursachen der temperaturabhängigen Bindungskinetik nicht abschließend geklärt werden können (Deshpande 1996).

**Diagramm 7:** ELISA Ergebnis zum Einfluss der Temperatur der Antigen-Inkubation am Beispiel der Standardproteine für Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2).

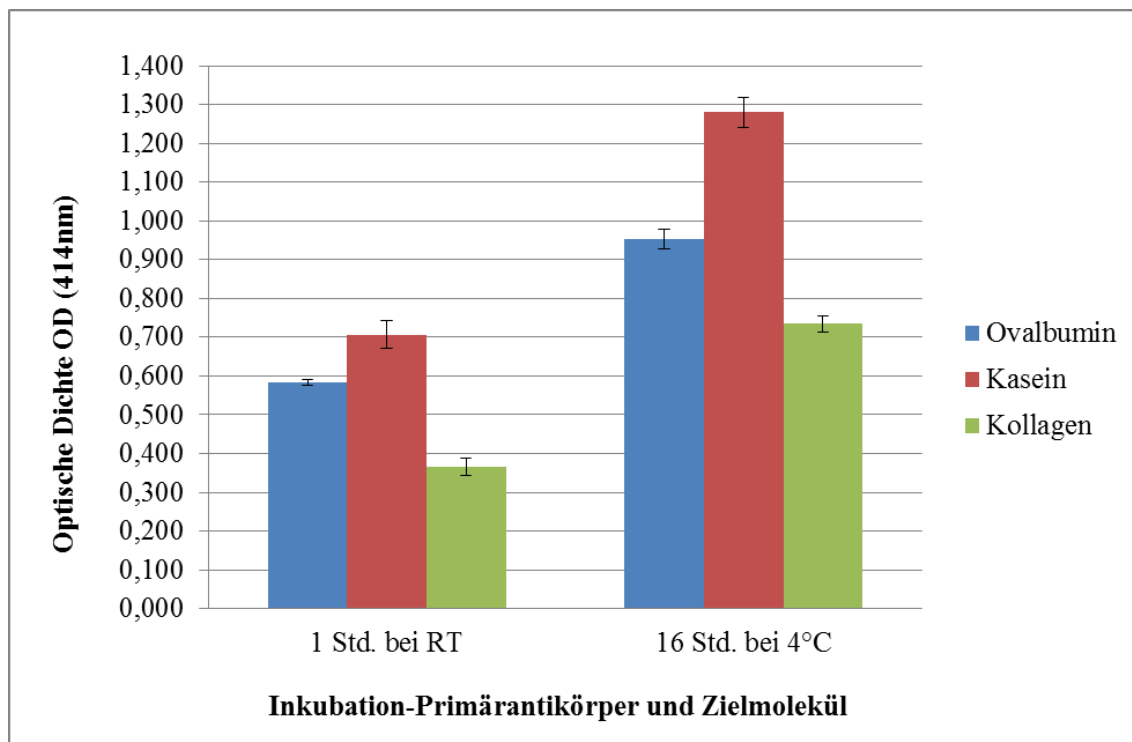


In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Einflüsse der Inkubationsdauer und -Temperatur auf die Bindung der Primärantikörper untersucht. Dabei stand vor allem im Vordergrund, ob eine Verkürzung der Inkubationszeit für die Primärantikörper möglich ist, um die Gesamtzeit für einen Analysedurchgang zu reduzieren. Nach Schultz (2006) wurden die Primärantikörper für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert, während in der Literatur Angaben von 1-2 Stunden bei RT oder 37 °C zu finden sind (Heginbotham et al. 2006, Mazurek 2006, Klausmeyer 2009a). Die Inkubation der Primärantikörper für 16 Stunden bei 4 °C sowie für 1 Stunde bei RT wurde an den Standardantigenen für Ovalbumin, Kasein und Kollagen untersucht (→ Anhang A2) und die Wiederfindungsrate mittels ELISA überprüft. Die Standardantigene wurden in Carbonatpuffer überführt (1 mg/ ml), für 5 Stunden bei 37 °C extrahiert und Verdünnungsstufen erstellt (1:100-1:100.000). Zwei Mikrotiterplatten wurden jeweils mit allen Verdünnungsstufen beschickt und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach dem Auswerfen der Antigenlösungen, Waschen und Blocken der Platten folgten die relevanten Primärantikörper für Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Eine Platte wurde für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert, die andere für 1 Stunde bei RT. Danach folgte die ELISA Durchführung wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben, die Ergebnisse sind in Diagramm 8 dargestellt.



Diagramm 8 macht deutlich, dass eine Verkürzung der Inkubationszeit bei RT zu einer Abnahme der Assayempfindlichkeit führt. Die Inkubation der Primärantikörper für 16 Stunden bei 4 °C zeigte für alle drei Antigene die höchsten Extinktionswerte. Im Vergleich zur 1-stündigen Inkubation bei RT konnten die Werte für Kollagen verdoppelt und für Kasein und Ovalbumin um 81 % bzw. 63 % bei gleicher Ausgangskonzentration gesteigert werden. Anders als bei den Versuchen zur Antigen-Inkubation ist die geringere Empfindlichkeit bei der 1-stündigen Inkubation weniger auf die Temperatur zurückzuführen, als vielmehr auf die verkürzte Zeit.

**Diagramm 8:** ELISA Ergebnis zum Einfluss der Dauer der Primärantikörper-Inkubation am Beispiel der Standardproteine für Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2).



Aufgrund der Ergebnisse wurde die Inkubation der Antigene und Primärantikörper auf 16 Stunden bei 4 °C festgelegt. Für die Inkubation der enzymmarkierten Sekundärantikörper fanden sich in der Literatur keine Angaben zu einer verlängerten Inkubation. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Überprüfung der Inkubation der Sekundärantikörper zugunsten der kurzen Inkubationsdauer von 90 Min. bei 37 °C verzichtet.

## 5.7 Blocken

Ein Problem beim ELISA ist der sogenannte Hintergrund, der durch unspezifisch adsorbierte Antigene und Antikörper verursacht wird. In der Regel sind nicht immer alle freien Bindungsstellen der Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte mit dem Antigen belegt. Gründe dafür sind beispielsweise eine zu geringe Antigenkonzentration oder auch Verluste bei den Waschgängen. Im weiteren Verlauf der Durchführung kann es dann zu unspezifischen Bindungen von Primär- und Sekundärantikörpern an diese freien Plätze kommen. Das Blocken freier Proteinbindestellen ist daher ein essentieller Schritt bei einem ELISA, um unspezifische Bindungen zu minimieren und falsch-positiv Ergebnisse zu verhindern (→ Kap. 5.1).

Proteine sind die wirksamsten Blockreagenzien. Durch ihre Molekülgröße genügt ein einmaliges Einbringen, und Konzentrationen zwischen 0,1-5 % sind oft schon ausreichend. Mittlerweile gibt es proteinische Fertiglösungen für den routinemäßigen Einsatz bei immunologischen Verfahren. Sie sind sofort verwendungsbereit und je nach Anwendungsgebiet ist ihre Auswahl vielfältig. Die Proteine der Blockreagenzien dürfen dabei auf keinen Fall mit den im Versuch nachzuweisenden Proteinen identisch sein, da es sonst zu einer Bindung der Antikörper an den Blockpuffer kommt und somit zu falsch-positiv Ergebnissen führt. Neben BSA sind vor allem Kasein, Magermilchpulver und Gelatine als Blockreagenz weit verbreitet, mussten in der vorliegenden Arbeit aber verworfen werden, weil genau diese Proteine nachgewiesen werden sollten. Die Möglichkeit unterschiedliche Blockreagenzien je nach nachzuweisendem Antigen zu verwenden, wurde verworfen, da sie weder zeit- noch kosteneffektiv ist und zudem das Fehlerrisiko erhöht. Stattdessen wurde nach einer Blockreagenz für alle nachzuweisenden Proteine und Gummen gesucht, weshalb nur Proteine als Blockreagenz zum Einsatz kamen, die im Probenmaterial nicht vorkommen.

Es wurden fünf verschiedene Blockreagenzien (1-5 % BSA in PBS (w/v), 5 % NCS in PBS (v/v), ELISA Blocker™, SEA Block™ und SuperBlock™) auf ihre Effizienz hin überprüft. BSA und NCS werden aus dem Blut von Rindern bzw. Kälberfoeten gewonnen. ELISA Blocker™, SEA Block™ und SuperBlock™ sind Fertiglösungen. Laut Hersteller wird SEA Block™ aus dem Serum von Lachsforellen gewonnen. Es enthält einen Zusatz von 0,1 % Natriumazid und wird auf der Basis von PBS angeboten. Bei dem ELISA Blocker™ handelt es sich um Saccharose in PBS; nähere Angaben sind nicht bekannt. SuperBlock™ auf PBS Basis, ist als „irrelevantes“ Protein für Immunoassays klassifiziert und enthält laut Hersteller kein Albumin oder Biotin.

Die ELISA Versuche zur Auswahl geeigneter Blockpuffer erfolgten auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten (PVC, PS, MaxiSorp™) für die Antikörper gegen

Ovalbumin (#AB1225), Kasein (#RCAS-10A) und Kollagen (#ab34710). Je zwei antigenfreien Wells wurden mit den unterschiedlichen Blockreagenzien versehen und für 60 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe der Primär- und Sekundärantikörper, die im jeweiligen Blockpuffer auf die bestimmten Arbeitskonzentrationen gebracht wurden, folgte die Zugabe des Substrat- und Stopp-Puffers (vgl. Tabelle 4 → Kap. 5.2). Nach der photometrischen Messung bei 414 nm wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Je höher die Extinktionswerte, desto mehr unspezifische Bindungen liegen vor und desto ungeeigneter ist der Blockpuffer. Die Ergebnisse der Blockeffizienz sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** ELISA Ergebnis zur Evaluierung verschiedener Blockreagenzien. Mittelwerte der unspezifischen Bindungen der Antikörper für Ovalbumin (#AB1225), Kasein (#RCAS-10A) und Kollagen (#ab34710) in antigenfreien Wells mit verschiedenen Blockpuffern und auf verschiedenen Plattentypen. Markierte Werte zeigen erhöhte unspezifische Bindungen ( $> 0,1 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ). n/d = nicht durchgeführt. (n = 2).

Platten- typ	Antikörper	Blockreagenz ( $\text{OD}_{414\text{nm}}$ )					
		1 % BSA/ PBS	5 % BSA/ PBS	5 % NCS/ PBS	ELISA Blocker	SEA Block	SuperBlock / PBS
MaxiSorp	anti-Oval. #AB1225	0,072	0,042	0,018	0,026	0,061	<b>0,779</b>
	anti-Kasein, #RCAS-10A	<b>0,204</b>	0,045	0,018	<b>0,220</b>	<b>0,149</b>	<b>0,154</b>
	anti-Kollagen #ab34710	0,052	0,010	0,016	0,050	0,065	<b>0,791</b>
PS	anti-Oval. #AB1225	0,028	0,017	0,015	0,037	0,044	n/d
	anti-Kasein, #RCAS-10A	<b>0,167</b>	0,066	0,020	<b>0,232</b>	<b>0,181</b>	n/d
	anti-Kollagen #ab34710	0,030	0,013	0,012	0,016	0,036	n/d
PVC	anti-Oval. #AB1225	n/d	n/d	0,011	n/d	n/d	n/d
	anti-Kasein, #RCAS-10A	n/d	n/d	0,025	n/d	n/d	n/d
	anti-Kollagen #ab34710	n/d	n/d	0,008	n/d	n/d	n/d

Die Tabelle 7 zeigt deutlich, dass 5 % NCS/PBS nach 60 Minuten Blockdauer bei RT durchschnittlich die beste Blockeffizienz unabhängig vom Plattentyp oder verwendeten Antikörpern aufweist, gefolgt von 5 % BSA/PBS. Die Wirksamkeit von 1 % BSA/PBS ist im Falle des Antikörpers gegen Kasein nicht zufriedenstellend. Alle drei Fertiglösungen scheinen für die vorliegende Anwendung mit den hier verwendeten

Antikörpern, Reagenzien und Methode weniger geeignet. ELISA Blocker™ und SEA Block™ wiesen erhöhte Extinktionswerte im Zusammenspiel mit dem Kaseinantikörper auf. Da Kasein selber hervorragende Blockeigenschaften besitzt, ist ein Zusatz in sehr geringen Mengen in den Fertiglösungen denkbar; dies wäre eine mögliche Erklärung für die leicht erhöhten Werte beim Kaseinnachweis. Insbesondere beim ELISA Blocker™ auf Zucker-Basis, ist ein solcher Zusatz als unterstützende Blockkomponente vorstellbar. Auf die Verwendung von ELISA Blocker™ wurde aber generell verworfen, da im weiteren Verlauf der Untersuchungen auch Antikörper gegen Polysaccharide zum Einsatz kamen und Kreuzreaktionen mit dem ELISA Blocker™ nicht ausgeschlossen werden konnten.

Die leicht erhöhten Werte beim SEA Block™ beim Nachweis von Kasein sind nicht zu erklären, da Serum-Proteine selbst hervorragende Blockreagenzien sind und ein Kaseinzusatz im Blockpuffer somit nicht logisch erscheint. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu erfolgreichen Anwendungen von SEA Block™ insbesondere beim Kaseinnachweis (Mazurek et al. 2008, Cartechini et al. 2010). Diese Studien beruhen allerdings auf der Anwendung von Alkalischer Phosphatase als Enzymmarkierung für die Antikörper und damit verbunden, auch anderen Reagenzien sowie ELISA Durchführung.

Die teilweise sehr hohen Extinktionswerte bei der Verwendung von SuperBlock™ sind wahrscheinlich auf einen falschen Einsatz der Reagenz zurückzuführen. Statt wie laut Hersteller angegeben dreimal hintereinander ohne längere Inkubationszeit mit SuperBlock™ die Wells zu waschen, wurde er, wie alle anderen Blockreagenzien, für 60 Minuten inkubiert. Auf eine Wiederholung des Versuchs wurde verzichtet, weshalb die Ergebnisse für den SuperBlock™ nicht mit in die Bewertung aufgenommen wurden.

Aufgrund der Neigung zur Blasenbildung von BSA in PBS wurde 5 % NCS in PBS als Blockpuffer festgelegt. Abschließend sei noch erwähnt, dass keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Mikrotiterplatten (MaxiSorp™ und PS) festgestellt werden konnten (→ Kap. 5.5).

## 5.8 Bestimmung des Cut-off

Der Cut-off legt fest, ab wann ein ELISA Ergebnis als positiver Nachweis zu werten ist und wird aus den unspezifischen Bindungen jedes Antikörper an antigenfreie Wells berechnet. Dafür wurden für jeden Primärantikörper 24 antigenfreie Wells mit 5 % NCS/PBS geblockt und anschließend mit Primär- und Sekundärantikörper versehen. Die weitere ELISA Durchführung erfolgte wie in Tabelle 4 unter → Kap. 5.2 beschrieben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der 24 Wells für jeden

Antikörper wurden berechnet (Tabelle 8). Ein ELISA Ergebnis gilt als positiv, wenn der Extinktionswert höher ist als der Wert der antigenfreien Kontrollen mit beiden Antikörpern multipliziert mit der dreifachen Standardabweichung (3-Sigma Regel) (Crowther 2001).

**Tabelle 8:** Bestimmung des Cut-off anhand von antigenfreien Wells mit Antikörpern

Antikörper	MW (n=24) OD <sub>414nm</sub>	SD	3 Sigma Regel
Anti-Ovalbumin (#AB1225)	0,013	0,006	0,032
Anti-Phosvitin (#SC-46681)	0,004	0,001	0,008
Anti-Kasein (#RCAS-10A)	0,030	0,005	0,046
Anti-Kollagen (#ab34710)	0,008	0,003	0,019
Anti-Fischkollagen (#T89171R)	0,009	0,003	0,018
Anti-Störkollagen (AIS2006)	0,006	0,004	0,017
Anti-Arabinogalactan-Proteine (#JIM13)	0,004	0,003	0,013
Anti-Arabinogalactan-Proteine (#MAC207)	0,003	0,002	0,008
Anti-Tragant (#MAC265)	0,004	0,002	0,010

Tabelle 8 gibt an, dass die höchste unspezifische Bindung bei anti-Kasein mit 0,046 OD<sub>414nm</sub> vorliegt. Daher wurde der Cut-off für die vorliegende ELISA Methode auf 0,05 OD<sub>414nm</sub> festgelegt. Werte darüber gelten als positiver Nachweis für ein Protein/Gumme, Werte darunter als negativ. Allerdings kam es bei einigen Experimenten im Verlaufe nachfolgender Untersuchungen zu Ausreißern, insbesondere bei Kasein, weshalb es eine Grauzone zwischen 0,05-0,1 OD<sub>414nm</sub> gibt, in der der Nachweis als nicht eindeutig zu werten war. Gründe dafür können unter anderem eine andere Antikörpercharge sein, der Druck mit dem die Reagenzien mittels Pipette eingebracht oder ausgewaschen wurden, der zu schwankenden Bindungen zwischen Antikörper und Platte, oder Primär- und Sekundärantikörper führt oder letztlich auch Kontaminationen. Daher ist es wichtig, für jeden Versuch auf jeder Platte diese antigenfreien Kontrollen mitlaufen zu lassen.

## 5.9 Bestimmung von Nachweisgrenzen

Jedes Messverfahren hat Grenzen bezüglich der kleinsten noch nachweisbaren Substanzmenge. Daher ist es wichtig diese Nachweisgrenzen auch für die hier entwickelte ELISA Methode zu bestimmen, um eine Interpretationsgrundlage für die Ergebnisse zu erhalten und Anhaltspunkte für die benötigte Antigen-/Probenmindestmenge zu bekommen. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte an einer Auswahl reiner Bindemittel. Diese wurden jeweils 1 mg/ml in Carbonatpuffer angesetzt und 16 Stunden bei 37 °C extrahiert. Verdünnungsreihen wurden erstellt und

in zwei Parallelen geprüft, um die minimale Menge an noch nachweisbarem Bindemittel (Antigene) mittels ELISA für die entsprechenden Antigen-Antikörper-Kombinationen zu bestimmen. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12), die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgelistet. Sie beziehen sich ausschließlich auf ungealterte, reine Bindemittel und berücksichtigen nicht die Schwierigkeiten der Alterung oder Materialmischungen. Die Nachweisgrenzen sind in Nanogramm Bindemittel pro Well angegeben. Bei den Werten handelt es aber um Näherungswerte, da sie auf der Annahme basieren, dass das gesamte Protein in Lösung gegangen ist, wovon nicht ausgegangen werden kann (→ Kap. 5.4). Die Extinktionswerte geben den letzten noch als positiv wertbaren Messwert oberhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> wieder.

**Tabelle 9:** ELISA Ergebnis zur Bestimmung der Nachweisgrenze an ausgewählten Standardantigenen. Gezeigt wird die niedrigste noch positiv nachweisbare Antigenkonzentration. Arbeitsverdünnung der Antikörper sind in Spalte 1 vermerkt. Die Extinktionswerte liegen oberhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub>. Die Standardantigene sind farbig hinterlegt.

<b>Antikörper und Arbeitsverdünnung</b>	<b>Antigen</b>	<b>ng/well</b>	<b>OD<sub>414nm</sub></b>
Anti-Ovalbumin (#AB1225) (1:1000)	Ovalbumin (Sigma #A2512)	0,05	0,097
Anti-Phosvitin (#SC-46681) (1:100)	Phosvitin (Sigma #P1253)	25	0,162
Anti-Kollagen (#ab34710) (1:500)	Gelatine (Sigma #G2500)	50	0,121
	Hasenleim (Kremer #6302)	5	0,139
	Technische Gelatine (Kremer #63040)	5	0,126
	Hausenblase in Blättern (Kremer #63100)	5	0,108
	Flüssiger Fischleim (Kremer #63550)	5	0,091
	Störblase (Zuchtfarm Fulda)	50	0,228
Anti-Fischkollagen (#T89171R) (1:200)	Leim aus Forellenabfällen	5	0,140
	Flüssiger Fischleim (Kremer #63550)	50	0,095
	Hausenblase in Blättern (Kremer #63100)	10	0,053
Anti-Störkollagen (AIS2006) (1:500)	Störblase (Zuchtfarm Fulda)	5	0,134
	Salianski Hausenblase (Kremer #63110)	50	0,116
Anti-Kasein (#RCAS-10A) (1:1000)	Kasein (Kremer #63200)	0,05	0,155

Anti-Arabinogalactan-Proteine (#JIM13) (1:10)	Ghatti Gummi (Sigma #G0378)	1	0,101
	Gummi arabicum (Kremer #63300)	5	0,120
	Karaya Gummi (Sigma #63350)	500	0,078
	<i>Locust bean gum</i> (aus Johanisbrotkernen) (Sigma #G0753)	500	0,058
	Kirschgummi (Kremer #63350)	50	0,096
Anti-Arabinogalactan-Proteine (#MAC207) (1:10)	Ghatti Gummi (Sigma #G0378)	50	0,090
	Gummi arabicum (Kremer #63300)	50	0,057
	Kirschgummi (Kremer #63350)	5	0,123
Anti-Tragant (#MAC265) (1:10)	Tragant (Sigma #G1128)	5	0,142

Tabelle 9 zeigt, dass Nachweisgrenzen zwischen 0,05–500 ng/Well je nach eingesetztem Antigen und Antikörpern erreicht wurden. Darüber hinaus wird deutlich, dass es teilweise enorme Unterschiede innerhalb der einzelnen Protein- und Polysaccharidgruppen gibt. So liegen die Nachweisgrenzen für die getesteten tierischen Leime zwischen 5–50 ng/Well und bei den getesteten Pflanzengummen sogar zwischen 1-500 ng/Well mit den entsprechenden Antikörpern. Die Empfindlichkeit eines Assays ist also in erster Linie von der Affinität der Antikörper zu den jeweiligen Antigenen abhängig. Daher gelten die in Tabelle 9 aufgeführten Nachweisgrenzen nur für die in diesen Versuchen eingesetzten Antikörper, Antikörperchargen, Antigene und das verwendete ELISA System. Das gilt ebenfalls für alle in der Literatur angegebene Nachweisgrenzen, weshalb ein Vergleich schwierig ist. Bei gealterten Proben müssen die Nachweisgrenzen neu bestimmt werden.

## 5.10 Spezifität und Kreuzreaktivität der einzelnen Antikörper

Die Aussagekraft jedes immunologischen Nachweises ist abhängig von der Spezifität der eingesetzten Antikörper. Daher müssen alle verwendeten Antikörper auf mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen (Proteinen und Polysacchariden) überprüft werden, um falsch-positiv Ergebnisse ausschließen zu können. Die Möglichkeit, Verunreinigungen durch Spuren anderer Antigene oder bewusst eingesetzter Bindemittelmischungen in realem Probenmaterial vorzufinden, ist vielfältig, dies ist bei unklaren Ergebnissen stets zu berücksichtigen. Im Folgenden werden die eingesetzten

Antikörper mit einer Vielzahl von Materialien ohne Anspruch auf Vollständigkeit auf Spezifität und Kreuzreaktivität untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die als Standardantigen ausgewählten Bindemittel (Gelatine, Leim aus Forellenabfällen, Störblase, Ovalbumin, Phosvitin, Kasein, Ghatti Gummi und Tragant) auf Kreuzreaktionen mit allen Primärantikörpern und den dazugehörigen Sekundärantikörpern untersucht (→ Anhang A2). Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit den Standardantigenen in unterschiedlichen Konzentrationen beschickt und mit folgenden Primärantikörpern getestet: anti-Kollagen (#ab34710), anti-Fischkollagen (#T89717R), anti-Störkollagen (AIS2006), anti-Ovalbumin (#AB1225), anti-Phosvitin (#SC-46681), anti-Kasein (#RCAS-10A), anti-Arabinogalactan-Proteine (#JIM13) und anti-Tragant (#MAC265). Die Durchführung erfolgte nach der optimierte ELISA Methode (→ Kap. 5.12), die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Die Kreuzreaktivität der Antikörper für Gruppe der Kollagene (Kollagen, Fischkollagen, Störkollagen), der eihaltigen Bindemittel (Ovalbumin, Phosvitin) und der Gummen (#JIM13, #MAC207, #MAC265) wurden in separaten Versuchen untersucht, die Ergebnisse sind unter den dazugehörigen Antikörpern in diesem Kapitel aufgelistet.

**Tabelle 10:** ELISA Ergebnis zur Kreuzreaktivität der verschiedenen Primärantikörper mit den 8 Standardantigenen. Antigenansatz in Carbonatpuffer (1 mg/ ml), verwendete Verdünnungen sind in der Tabelle vermerkt. \*eigene Herstellung. (/) nicht auf dieser Platte getestet. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. Extinktionswerte in Klammern liegen unterhalb des Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub>. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

Antigen (Ansatz 1mg/ml)	Kollagen (#ab34710)	Fischkollagen (#T89171R)	Störkollagen (AIS2006)	Ovalbumin (#AB1225)	Phosvitin (#SC-46681)	Kasein (#RCAS-10A)	Arabinogalactan Proteine (#JIM13)	Tragant (#MAC265)
	OD <sub>414nm</sub>							
Gelatine (1:500) (Sigma #G2500)	+	/	/	-	-	-	-	-
Leim aus Forellenabfällen* (1:500)	/	+	/	-	-	-	-	-
Störblase* (1:500)	/	/	+	-	-	-	-	-



Ovalbumin (1:1000) (Sigma #A2512)	- (0,015)	- (0,009)	- (0,008)	+ (1,612)	/	- (0,013)	- (0,010)	- (0,004)
Phosvitin (1:100) (Sigma #P1253)	- (0,010)	- (0,006)	- (0,007)	/	+ (0,548)	- (0,011)	- (0,006)	- (0,004)
Kasein (1:1000) (Kremer #63200)	- (0,013)	- (0,010)	- (0,011)	- (0,008)	- (0,008)	+ (1,617)	- (0,013)	- (0,015)
Ghatti Gummi (1:1000) (Sigma #G0378)	- (0,011)	- (0,007)	- (0,008)	- (0,004)	- (0,006)	- (0,015)	+ (0,672)	/
Tragant (1:100) (Sigma #G1128)	- (0,008)	- (0,001)	- (0,002)	- (0,006)	- (0,005)	- (0,007)	/	+ (0,755)

Tabelle 10 zeigt deutlich, dass alle Primärantikörper ausschließlich mit dem zugehörigen Zielantigen binden. Die Extinktionswerte der anderen Antigen-Antikörper-Kombinationen liegen alle unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> und sind daher als negativ zu bewerten. Kreuzreaktionen mit den anderen im Assay eingesetzten Antigenen können daher ausgeschlossen werden.

In einem zweiten Versuch wurden die Sekundärantikörper aus Kaninchen, Maus und Ratte auf mögliche unspezifische Bindungen mit den Standardantigenen hin überprüft (→ Anhang A2). Eine Mikrotiterplatte wurde mit den Standardantigenen in unterschiedlichen Konzentrationen beschickt und mit den folgenden Sekundärantikörpern getestet: GARb/PO (#4050-05), GAMs/PO (#1031-05) und GART/PO (#3050-05). Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12), wobei nach dem Blocken keine Primär- sondern direkt die Sekundärantikörper eingebracht wurden. Sollte einer der Sekundärantikörper mit einem Antigen reagieren, kann er ungehindert binden, da die freien Bindungsstellen nicht durch den Primärantikörper belegt sind. Die Folge wäre ein falsch-positives Ergebnis. In keiner dieser Antigen-Sekundärantikörper-Kombinationen kam es zu messbaren (Farb-) Reaktionen, weshalb Kreuzreaktionen dieser Sekundärantikörper mit den getesteten Antigenen ausgeschlossen werden können (Daten nicht gezeigt).

### 5.10.1 Ovalbumin (#AB1225) und Phosvitin (#SC-46681)

Anti-Ovalbumin (#AB1225) ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Ovalbumin aus Hühner-Eiklar. Dem gegenüber steht der monoklonale Antikörper aus Maus gegen Phosvitin (#SC-46681) aus Hühner-Eigelb. Neben der Spezifität galt es zu überprüfen, ob eine Unterscheidung zwischen Eiklar, Eigelb und Vollei durch den Einsatz dieser beiden Antikörper möglich ist. Dafür wurden Eiklar, Eigelb und Vollei von Huhn- und Wachteleiern auf Objektträger gestrichen und getrocknet (→ Anhang

B1.5). Die Standardantigene (Ovalbumin und Phosvitin) (→ Anhang A2) und Aufstrichpräparate wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Ovalbumin und Phosvitin getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12), die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11:** ELISA Ergebnis zur Spezifität von anti-Ovalbumin (#AB1225) und anti-Phosvitin (#SC-46681). Antigenansatz in Carbonatpuffer (1 mg/ ml), verwendete Verdünnungen sind in der Tabelle vermerkt. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. Die Extinktionswerte in Klammern liegen unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub>. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

Antigene (Ansatz 1 mg/ ml)	Anti-Ovalbumin (#AB1225)		Anti-Phosvitin (#SC-46681)	
	OD <sub>414nm</sub>	Ergebnis	OD <sub>414nm</sub>	Ergebnis
Ovalbumin von Hühnereiklar (Standard) (1:1000) (Sigma #A2512)	1,601	+	(0,003)	-
Phosvitin von Hühnereigelb (Standard) (1:100) (Sigma #P1253)	(0,013)	-	0,687	+
Hühner-Eiklar (1:1000)	1,605	+	(0,002)	-
Hühner Eigelb (1:10)	0,715	+	0,118	+
Hühner Vollei (1:100)	1,379	+	(0,007)	-
Wachtel-Eiklar (1:1000)	1,579	+	(0,001)	-
Wachtel-Eigelb (1:10)	0,597	+	0,101	+
Wachtel-Vollei (1:100)	1,280	+	(0,002)	-

Tabelle 11 zeigt, dass die beiden Standardantigene eindeutig nachgewiesen und Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden können. Anti-Ovalbumin reagierte nur mit Ovalbumin, aber nicht mit Phosvitin und anti-Phosvitin nur mit Phosvitin, aber nicht mit Ovalbumin.

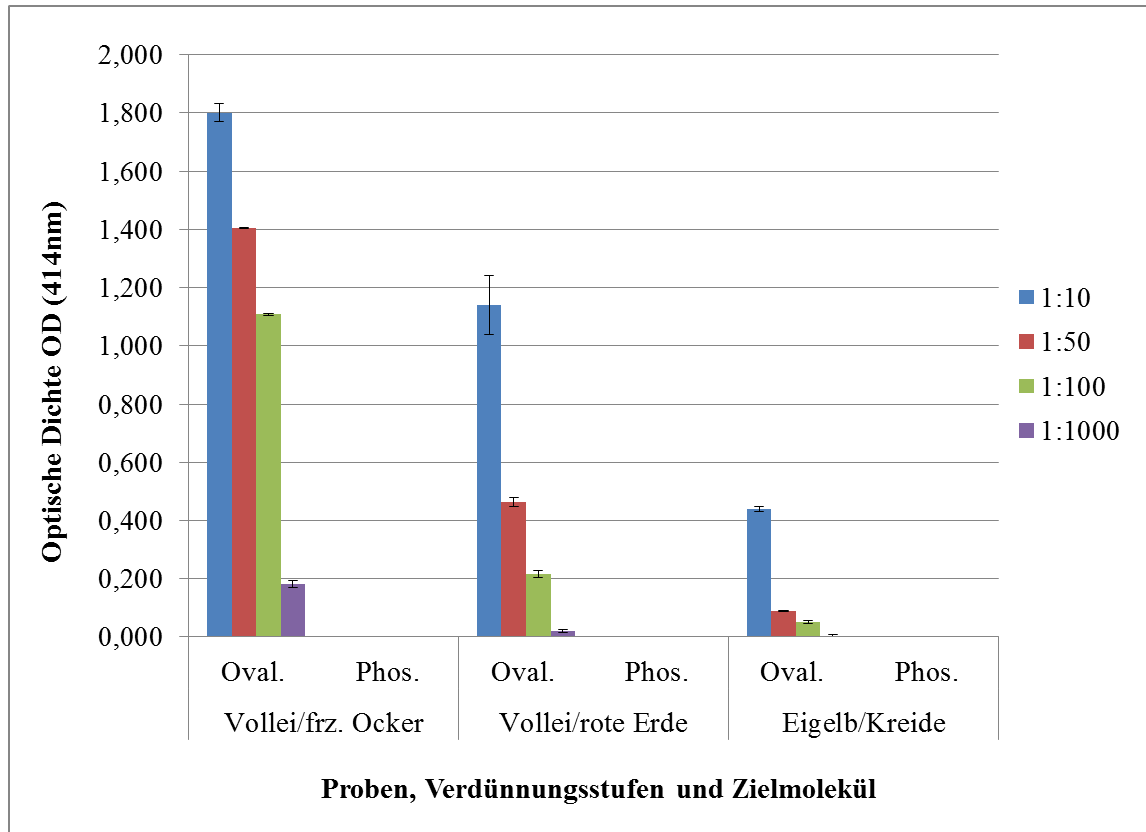
Bei den Aufstrichpräparaten hingegen wurde in allen Proben, unabhängig welcher Teil vom Ei oder welche Vogelart verwendet wurde, Ovalbumin nachgewiesen. Bei der stark-positiven Detektion von Ovalbumin, selbst in den Eigelbproben, handelt es sich nicht um eine Kreuzreaktion, sondern ist der Herstellungstechnik der Proben geschuldet. Im Gegensatz zu den aufgereinigten Standardantigenen sind die Aufstrichpräparate nach haushaltstypischer Trennmethode hergestellt, wie sie auch typisch bei der Herstellung von Kunstwerken ist. Das Ei wird aufgeschlagen und das Eiklar abgossen. Eine komplette Trennung des Eiklar vom Eigelb ist so nicht möglich und Reste von Eiklar werden auch stets in Eigelbproben anzutreffen sein (siehe später).

Phosvitin wurde in den Aufstrichpräparaten ausschließlich und auch nur sehr schwach-positiv in den Eigelbproben detektiert. Die bereits sehr niedrigen Extinktionswerte von Phosvitin für die Eigelbproben legen die Vermutung nahe, dass die Phosvitinkonzentration in den Volleiproben bereits unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Gründe für die allgemein schwache Reaktion können u.a. die niedrige Konzentration der Antikörper im Antiserum, die allgemein geringe Konzentration von Phosvitin in Eigelb oder eine unzureichende Extraktion des Proteins aus der Eigelb Matrix sein. Der Verlust des relevanten Epitopes für den monoklonalen Antikörper kann dagegen weitestgehend ausgeschlossen werden, da es sich um ungealtertes Probenmaterial handelte. Der bereits nur schwach-positive Nachweis von Phosvitin an den frischen und nicht pigmentierten Proben macht diesen Antikörper für den Einsatz an komplexen, gealterten Proben von Kunstobjekten ungeeignet. In einem abschließenden Versuch an Fassungspollen mit bekannter Zusammensetzung konnte dies bestätigt werden. Dazu wurden Aufstrichpräparate aus Vollei und Eigelb mit verschiedenen Pigmenten (Ocker, rote Erden und Kreide) in einem Ansatz von 400 µg/ml in Carbonatpuffer vorbereitet, extrahiert, Verdünnungsstufen erstellt und mittels ELISA auf Ovalbumin und Phosvitin getestet (→ Anhang B1.5). Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12). Diagramm 9 zeigt einen eindeutigen Nachweis von Ovalbumin in allen Proben, wohingegen Phosvitin in keiner der Proben detektierbar war. Der Nachweis von Ovalbumin in der Eigelbprobe fiel erwartungsgemäß schwächer aus als bei den beiden Volleiproben. Die untere Nachweisgrenze der Eigelb/frz. Ocker Probe ist noch nicht erreicht, wohingegen sie bei den anderen beiden Proben zwischen 1:100 und 1:1000 liegt.

Die mangelnde Reaktivität von Phosvitin steht im Widerspruch mit der bereits berichteten erfolgreichen Anwendung des gleichen Antikörpers an Referenzmaterialien und Probekörpern (Mazurek 2006). Gründe dafür könnten die Verwendung unterschiedlicher Antikörperchargen sein, aber auch die unterschiedlichen ELISA Systeme mit denen gearbeitet wurde. Auf die Verwendung des Phosvitin Antikörpers wird aufgrund der fehlenden Reaktivität in der vorliegenden Arbeit im weiteren Verlauf verzichtet. Eine Unterscheidung in Eiklar, Vollei und Eigelb ist daher nicht möglich. Da Ovalbumin sowohl in Eiklar und Vollei sowie, wenn auch weniger stark, in Eigelb nachweisbar ist, wird in der Folge Ovalbumin zum allgemeinen Nachweis von Ei verwendet.

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass sich weder Ovalbumin noch Phosvitin für tierartspezifische Untersuchungen eignen, da sie sowohl in den Ei-Proben aus Wachtel als auch aus Huhn nachweisbar waren.

**Diagramm 9:** ELISA Ergebnis an eihaltigen Fassungsproben mit bekannter Zusammensetzung zum Nachweis von Ovalbumin und Phosvitin. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 400 µg/ ml mit stufenweiser Verdünnung. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> gelten als negativ. (n = 2).



### 5.10.2 Kasein (#RCAS-10A)

Anti-Kasein (#RCAS-10A) ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen hochaufgereinigtes Kasein aus Kuhmilch. Es galt zu überprüfen, ob der Antikörper tierartspezifisch (Rind) ist und/oder nur an bestimmte Kaseinfraktionen bindet (→ Anhang B1.2). Dafür wurden verschiedene Milchprodukte aus Ziege, Schaf und Kuh, sowie mehrere kommerziell erhältliche Kaseine und Kaseinfraktionen getestet. Aufstrichpräparate von unterschiedlich aufgeschlossenen Kaseinen (Kalk, Borax, Ammoniumcarbonat), wie sie an Kunstobjekten oder in der Restaurierung anzutreffen sind, sollten zeigen, ob die Art des Aufschlusses Auswirkungen auf den Nachweis hat (→ Anhang B1.5). Die Reinstoffe und getrockneten Aufstrichpräparate wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Kasein getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12) und die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** ELISA Ergebnisse zur Spezifität von anti-Kasein (#RCAS-10A) an unterschiedlichen kaseinhaltigen Proben. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ml, dargestellte Verdünnung 1:10.000. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

	<b>Antigene</b> (Ansatz 1 mg/ ml, dargestellt Verdünnung 1:10.000)	<b>Anti-Kasein</b> (#RCAS-10A)	
		<b>OD<sub>414nm</sub></b>	<b>Ergebnis</b>
<b>Materialproben</b>	Ziegenkäse	0,437	+
	Schafskäse	0,844	+
	Quark (Kuh)	0,867	+
<b>Standards/ Ausgangsprodukte</b>	Kasein Kremer #63200	1,345	+
	Skim Milk Powder, Oxoid #LP0031	1,207	+
	Kasein nach Hammarsten, VWR #440203H	1,291	+
	Kappa Kasein, Sigma #C0406	1,256	+
	Beta Kasein, Sigma #C6905	0,973	+
	Alpha Kasein, Sigma #C6780	1,071	+
	Kasein, Sigma #C3400	1,156	+
<b>Aufgeschlossene Kaseine (Aufstrichpräparate)</b>	Kalkkasein / Quark	0,354	+
	Kalkkasein / Pulver	0,630	+
	Boraxkasein	1,346	+
	Ammoniumcarbonatkasein	1,336	+

Tabelle 12 veranschaulicht, dass in allen Proben, unabhängig von der Bezugsquelle, Zusammensetzung oder Aufbereitungsart eindeutig Kasein nachgewiesen werden konnte. Der Antikörper ist weder tierartspezifisch noch an eine Kaseinfraktion gebunden. Sowohl die Milchprodukte aus Ziege, Schaf und Kuh als auch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ - Kaseinfraktionen reagierten positiv auf den Kaseinnachweis. Die geringeren Extinktionswerte in den Milchprodukten sind vermutlich auf unterschiedliche Zusammensetzungen und Wassergehalt zurückzuführen. Das führt letztlich zu einer geringeren Ausgangskonzentration des Kaseins bei gleicher Einwaage im Vergleich zu den anderen Proben in diesem Versuch.

In allen Aufstrichpräparaten konnte ebenfalls eindeutig Kasein nachgewiesen werden. Auffällig ist aber die schwächere Reaktion der Kalkkaseine auf den Kaseinnachweis. Zum einen hat das mit der verringerten Löslichkeit von Kalkkasein nach der Trocknung zu tun, was zu einer geringeren Extraktionsausbeute führt. Zum anderen kann es durch den stark basischen Aufschluss mit Kalk zum Abbau/Verlust von Epitopen kommen, was ebenfalls zu einem schwächeren Nachweis führt. Der pH-Wert der Kalkkaseine lag

während der Herstellung bei 12,5, bei Boraxkasein und Ammoniumcarbonatkasein hingegen nur bei 8,0 bzw. 8,5 – 9,0.

Die Versuche haben gezeigt, dass der verwendete Antikörper (#RCAS-10A) Kaseine unterschiedlicher Herkunft und Aufbereitung erfasst und zum allgemeinen Nachweis von Kasein verwendet werden kann. Tierartsspezifische oder aufschlussspezifische Aussagen sind mit diesem Antikörper aber nicht möglich.

### **5.10.3 Kollagene (# ab34710, #T89171R und Störkollagen AIS2006)**

Anti-Kollagen (#ab34710) ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Kollagen Typ I aus Human- und Rinderplazenta und reagiert laut Hersteller mit den meisten Säugetier Typ I Kollagenen. Anti-Fischkollagen (#T89171R) ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Kollagen Typ I aus Lachshaut und reagiert laut Hersteller mit Lachs, Thunfisch, Seeszunge, aber nicht mit Goldfisch, Säugetier oder Vogel Kollagen. Anti-Störkollagen ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Schwimmblasenkollagen des Sibirischen Störs (*A.baerii*) aus einer Zuchtfarm. Es handelt sich um eine Auftragimmunisierung, weshalb über die Spezifität und Kreuzreaktivität noch wenig bekannt ist. Die Vorversuche von Schultz (2006) deuten darauf hin, dass der Antikörper spezifisch an Störleime bindet, aber nicht mit anderen Fischarten (Hering, Lachs, Aal) oder Fischleimen reagiert. Eine eingehende Untersuchung der Spezifität steht aber noch aus. Anhand dieser drei Antikörper sollte untersucht werden, ob eine nähere Eingrenzung der biologischen Quelle der Leime möglich ist.

Kommerziell erhältliche Leime haben den Nachteil, dass die Herkunft, Art der Herstellung und verwendete Materialien, sowie eventuelle Modifikationen oder Zusätze (z.B. Bleichmittel, Konservierungsmittel, Neutralisationsmittel) häufig nur teilweise oder gar nicht bekannt sind. Daher wurden für die Spezifitätsprüfungen der drei verschiedenen Kollagenantikörper nicht nur 6 kommerzielle Leime, sondern auch 12 Leime aus eigener Herstellung oder gesicherter Herkunft getestet (→ Anhang B1.3). Alle Proben wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Kollagen, Fischkollagen und Störkollagen getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12) und die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13:** ELISA Ergebnisse zur Spezifität von anti-Kollagen (#ab34710), anti-Fischkollagen (#T89171R) und dem nicht kommerziellen anti-Störkollagen (AIS2006) an verschiedenen kommerziellen Leimen und \*Leimen aus eigener Herstellung. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> gelten als negativ (-), darüber als positiv (+). n/d = nicht getestet. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

Antigene (Ansatz 1 mg/ ml, dargestellt 1:10)	Anti-Kollagen (#ab34710) aus Kaninchen		Anti-Fischkoll. (#T89171R) aus Kaninchen		Anti-Störkoll. (AIS2006) aus Kaninchen	
	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis
Gelatine (Sigma #G2500)	1,562	+	0,214	+	0,016	-
Technische Gelatine (Kremer #63040)	1,148	+	0,290	+	0,031	-
Leim aus Rinderknochen*	0,223	+	0,003	-	0,003	-
Leime aus Schweineknöchel*	0,258	+	0,020	-	n/d	-
Leim aus Rinderhaut*	0,990	+	0,005	-	0,003	-
Leim aus Ziegenpergament*	1,591	+	0,016	-	0,008	-
Hasenleim (Kremer #63025)	1,554	+	0,041	-	0,008	-
Leim aus Kaninchenhaut*	0,030	-	0,007	-	0,005	-
Hechtblasenleim*	n/d		0,308	+	0,017	-
Karpfenblasenleim*	0,769	+	0,454	+	0,033	-
Leim aus Forellenabfällen*	0,478	+	0,948	+	0,028	-
Leim aus Karpfenabfällen*	0,270	+	0,358	+	0,015	-
flüssiger Fischleim (Lee Valley #56K60.01)	0,792	+	0,234	+	0,037	-
Flüssiger Fischleim (Kremer #63550)	0,850	+	0,379	+	0,026	-
Salianski Hausenblase (Kremer #63110)	0,570	+	0,673	+	0,506	+
Hausenblase in Blättern (Kremer #63100)	1,123	+	0,573	+	0,050	-
Störleim (Zuchtfarm 1)*	0,592	+	0,479	+	0,787	+
Störleim (Zuchtfarm 2)*	n/d		n/d		0,689	+
Störleim (Zuchtfarm 3)*	n/d		n/d		0,738	+

Tabelle 13 zeigt, dass mit Ausnahme des Leimes aus Kaninchenhaut alle getesteten Leime, unabhängig von ihrer Herkunft oder biologischen Quelle positiv mit dem Kollagenantikörper (#ab34710) reagiert haben. Das bedeutet, dass sich dieser Antikörper hervorragend zum unspezifischen Nachweis von Kollagen eignet. Die verhältnismäßig schwache Reaktion der Knochenleime aus eigener Herstellung

(Schwein und Rind) ist vermutlich auf einen geringen Kollagengehalt aufgrund von unzureichender Extraktion bei der Herstellung und Verunreinigungen zurückzuführen. Tendenziell haben die Fischleime weniger stark reagiert. Auffällig ist aber der recht hohe Extinktionswert der Hausenblase in Blättern (Kremer #63100).

Das Ausbleiben einer Reaktion beim Leim aus Kaninchenhaut erklärt sich daraus, dass ein Antikörper aus Kaninchen nicht gegen sich selbst binden kann. Der kommerzielle Hasenleim (Kremer #63025) hingegen hat stark positiv reagiert. Daher galt es zu überprüfen, wie stark der Verwandtschaftsgrad von Hase und Kaninchen ist oder ob der Antikörper gegen Hase bindet. Dafür wurde Leim aus Hasenhaut und Hasenohren selber hergestellt (→ Anhang B1.3). Die Proben wurden zusammen mit den anderen beiden Hasen- und Kaninchenleimen in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA nochmals auf Kollagen getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12.), die Ergebnisse sind in Diagramm 10 dargestellt.

Das Diagramm 10 zeigt deutlich, dass weder die Kaninchen- noch die Hasenleime aus eigener Herstellung positiv mit dem Kollagenantikörper aus Kaninchen reagieren. Weder „Kaninchen“ noch „Hasen“ sind eine systematische Gruppen, sie gehören beide zu der Familie der Hasen (Leporidae), weshalb ihr Verwandtschaftsgrad genauso groß ist, wie mit den anderen Tieren aus dieser Familie. Der Antikörper scheint nicht zwischen Hase und Kaninchen zu unterscheiden. Der kommerzielle Hasenleim ist ein wichtiges Beispiel dafür wie irreführend Handelsbezeichnungen sein können. Denn anders als der Name vermuten lässt, wird er laut Hersteller aus Abfällen von Hasen- oder Kaninchenfell und anderen Kleintieren hergestellt. Die hohen Extinktionswerte für den kommerziellen Hasenleim können zwar die Verwendung von Hasen- und Kaninchenhaut nicht ausschließen, zeigen aber, dass vor allem andere (Klein-) Tiere verwendet worden sein müssen. Zum Nachweis von Hasen- oder Kaninchenleim wäre ein Antikörper aus einer anderen Tierart, z.B. Ratte gegen Kollagen notwendig. Dieser müsste dann parallel mit dem Antikörper aus Kaninchen gegen Kollagen getestet werden, um Kollagen eindeutig nachzuweisen. Die Verwendung eines weiteren Primärantikörpers hätte zur Folge, dass mehr Probenmaterial benötigt wird. Zudem muss ein anderer Sekundärantikörper verwendet, da der bisherige aus Ziege ausschließlich gegen Primärantikörper aus Kaninchen gerichtet ist. Alle in der Arbeit aufgeführten Versuche haben aber gezeigt, dass die verwendeten Leime in der Regel eine Mischung aus Abfällen unterschiedlicher Tierarten darstellen, unabhängig von ihrer Handelsbezeichnung, weshalb auf einen weiteren Antikörper zum Nachweis von Kaninchen- bzw. Hasenleim zugunsten der Probenmenge verzichtet wird.



**Diagramm 10:** ELISA Ergebnis zur Überprüfung, ob der Kollagenantikörper aus Kaninchen (#ab34710) gegen sich selber binden kann anhand von Hasen- und Kaninchenleimen aus eigener Herstellung sowie einem kommerziellen Hasenleim. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml mit stufenweiser Verdünnung. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> gelten als negativ. (n = 2).

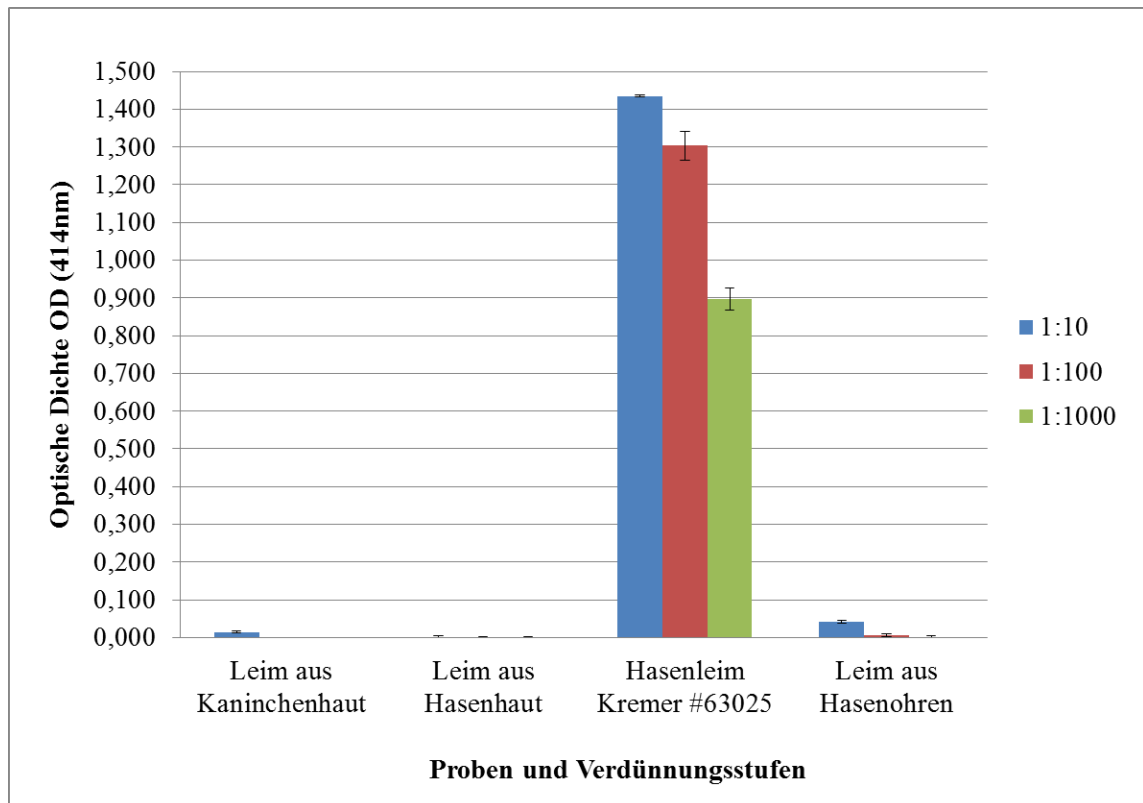


Tabelle 13 bestätigt, dass der Fischkollagenantikörper (#T89171R) mit allen getesteten Fischleimen, unabhängig von der Herkunft oder Fischart, reagiert hat. Es kam zu keiner Reaktion mit den herkömmlichen Leimen aus Säugetieren mit Ausnahme der beiden Gelatinen. Gelatine wird primär aus Haut und Knochen von Schweinen und Rindern gewonnen, aber auch Fische und Geflügel werden heute verwendet. Das lässt darauf schließen, dass die hier getesteten Gelatinen neben Rind und/oder Schwein, auch Fisch beinhalten und es deshalb zu einer Bindung mit dem Antikörper kam. Allerdings handelt es sich bei Gelatine um einen reinen, weniger denaturierten Leim, was die Anzahl der durch Denaturierung verlorengangener Epitope reduziert. Die Anzahl der möglichen Bindungsstellen erhöht sich und das Risiko für Kreuzreaktionen steigt. Daher können auch Kreuzreaktionen des Fischkollagenantikörpers mit Gelatine ohne Fischanteil nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Der Störkollagenantikörper (AIS2006) hat mit Ausnahme der Hausenblase in Blättern (Kremer #63100) mit allen Störleimen reagiert (Tabelle 13). Es kam zu keinen Kreuzreaktionen mit anderen Fisch- oder Säugetierleimen. Beim Hausen handelt es sich

um eine Fischgattung aus der Familie der Störe. Vorversuche konnten bestätigen, dass der Störkollagenantikörper nicht spezifisch an den Sibirischen Stör bindet, aus dem er hergestellt wurde, sondern gegen Stör im Allgemeinen (Daten hier nicht gezeigt). Daher ist es ungewöhnlich, dass die Hausenblase in Blättern nicht reagiert hat. Dieses Produkt war Ende des 20. Jahrhunderts in der Restaurierung sehr populär, ist heute aber nicht mehr erhältlich. Das Aussehen und der niedrige Preis der Hausenblase in Blättern unterscheiden sich stark von dem der anderen Störleime. Beim Erwärmen mit Wasser ergibt der Leim eine milchig, irisierende Lösung. Näheres zur Herstellung bzw. Aufbereitungsart dieses Produktes ist nicht bekannt. Warum die Reaktion bei der Hausenblase in Blättern ausblieb, kann nicht abschließend geklärt werden. Dennoch deutet es darauf hin, dass es sich bei dem Ausgangsmaterial nicht um eine Störart handelt und/oder dass das Störkollagen bei der Aufbereitung derart denaturiert wurde, dass die störspezifischen Epitope verloren gegangen sind und der Antikörper nicht mehr binden kann. Das Ergebnis zeigt erneut deutlich die Problematik der kommerziellen Handelsbezeichnungen, aber noch wichtiger, es unterstreicht die Bedeutung eines gut gewählten Antigens für die Herstellung eines Antikörpers. Der polyklonale Störkollagenantikörper hat sich als hochspezifisch herausgestellt und eignet sich daher zur eindeutigen Identifizierung von Störleim.

#### **5.10.4 Pflanzengummen (#JIM13, #MAC207, #MAC265)**

Die monoklonalen Antikörpern #JIM13 und #MAC207 sind aus Ratte gegen Arabinogalactan-Proteine. Bisher ist nur bekannt, dass sie mit dem Kohlenhydrat-Epitop  $(\beta)\text{GlcA1}\rightarrow 3(\alpha)\text{GalA1}\rightarrow 2\text{Rha}$  auf Arabinogalactan-Proteinen reagieren, die ein Bestandteil vieler Pflanzengummen ist. Die genauen Eigenschaften dieses Epitopes sind aber noch nicht charakterisiert (Knox et al. 1991). Der monoklonale Antikörper #MAC265 ist ebenfalls aus Ratte und bindet laut des Produktdatenblattes der Herstellerfirma an ein Epitop, das nur auf Tragant vorkommt, ohne es zu benennen.

Für die Spezifitätsversuche erfolgt aus der Fülle an möglichen Pflanzengummen (Typ, Herkunft, Pflanzenart) eine kleine Auswahl. Weitere Spezifitätsprüfungen durch den Antikörper Hersteller sind dem → Anhang D3 zu entnehmen. Die drei Antikörper wurden an sieben verschiedenen Gummen ausgetestet. Neben den typischen Vertretern Tragant, Kirschgummi und zwei Gummi arabicum Proben wurden Ghatti Gummi, *Locust bean gum* (aus Johannisbrotkernen) und Karayagummi (aus Arten der indischen Stinkbäume (*Sterculia*)) mit in die Versuche aufgenommen. Außerdem wurden zwei unbekannte Proben untersucht, bei denen es sich um Bindemittel aus Syrien handelt, die dort häufig unter den Bezeichnungen *Sras* und *Kathira* verwendet werden. Aufgrund ihres Aussehens und ihrer Löslichkeit in Wasser wurde vermutet, dass es sich um Gummen handelt. Alle Proben wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert,

stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Arabinogalactan-Proteine und Tragant getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12) und die Ergebnisse sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

**Tabelle 14:** ELISA Ergebnisse zur Spezifität von #JIM13, #MAC207 und #MAC265 an ausgewählten Pflanzengummen mit bekannter Herkunft und Proben unbekannter Herkunft. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (+) gilt als positiv Nachweis ( $> 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ), (-) als negativ ( $< 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ). (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

Antigene (Pflanzengummen)	Anti-Arabinogalactan-Proteine (#JIM13)		Anti-Arabinogalactan-Proteine (#MAC207)		Anti-Tragant (#MAC265)	
	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis
Tragant (Sigma #G1128)	0,040	-	0,047	-	0,863	+
Kirschgummi (Kremer #63350)	0,724	+	0,720	+	0,009	-
<i>Locust bean gum</i> (Sigma #G0753)	0,359	+	0,003	-	0,000	-
Karayagummi (Sigma #0503)	0,383	+	0,028	-	0,003	-
Ghatti Gummi (Sigma #G0378)	0,935	+	0,679	+	0,009	-
Gummi arabicum I (Sigma #51198)	0,211	+	0,162	+	0,003	-
Gummi arabicum II (unbekannt)	0,904	+	0,171	+	0,009	-
<i>Sras</i> (syrisches Bindemittel)	0,041	-	0,042	-	0,915	+
<i>Kathira</i> (syrisches Bindemittel)	0,281	+	0,033	-	0,000	-

Tabelle 14 macht deutlich, dass #JIM13 und #MAC207 mit einer Reihe von Pflanzengummen reagieren, während #MAC265 tatsächlich Tragant spezifisch ist. #JIM13 hat mit Ausnahme von Tragant auf alle getesteten Gummen positiv reagiert und deckt ein breiteres Spektrum ab als #MAC207, der nicht an Tragant, *Locust bean gum* und Karayagummi bindet. Bei den beiden Gummi arabicum Proben I und II fällt auf, wie unterschiedlich die Reaktion mit #JIM13 ausfällt. Gummi arabicum wird aus Akazienbäumen gewonnen, wovon es weltweit mehr als 900 verschiedene Arten gibt. #JIM13 scheint empfindlich auf die Akazienart zu reagieren. Andernfalls handelt es sich bei der Probe II nicht um Gummi arabicum, sondern eine andere Pflanzengumme, da die Herkunft der Probe nicht bekannt war.

Beide Bindemittel aus Syrien konnten eindeutig als Pflanzengummen identifiziert werden. *Sras* hat nur mit #MAC265 positiv reagiert, was bedeutet, dass es sich um Tragant handelt. *Kathira* dagegen hat nur mit #JIM13 positiv reagiert, was ausschließt, dass es sich bei der Probe um Tragant handelt. Eine nähere Klassifizierung ist anhand der verwendeten Antikörper aber nicht möglich.

An Kunstobjekten und in der Restaurierung werden eine Fülle an Polysacchariden und Harzen aber auch anderen Pflanzensäften verwendet. Daher galt es die Selektivität sowie eventuelle Kreuzreaktivität der drei Antikörper mit diesen Materialien zu überprüfen, um Fehlinterpretationen durch falsch-positiv Ergebnisse ausschließen zu können (→ Anhang B1.4). Cellulosen und Stärken zählen zu den Polysacchariden und werden beispielsweise in Form von Hydroxypropylcellulose (Klucel G) und Weizen- oder Reisstärke häufig in der Papierrestaurierung verwendet. Die japanische Funori Rotalge kommt zum Verkleben von Papierfasern vor und basiert ebenfalls auf Polysacchariden. Bei den natürlichen Harzen handelt es sich auch um Baum- und Pflanzenexsudate, die im Gegensatz zu den Gummen nicht wasserlöslich sind und hauptsächlich aus Di-, Tri- und anderen Polyterpenen bestehen. Dammar, Mastix oder Kopal bilden häufig die Grundlage für Firnisse und Überzüge. Feigenbaumsaft findet Erwähnung als schwaches Netz-, Binde- und Konservierungsmittel für Wasserfarben, als Bindemittelzusatz in der Temperamalerei oder auch zum Anlegen von Blattgold (Brachert 2001). Es handelt sich ebenfalls um ein aus einer Pflanze stammendes Terpen.

Die verschiedenen Polysaccharide, Harze und Feigensaft wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Kreuzreaktivität mit #JIM13, #MAC207 und #MAC265 getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12) und die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15:** ELISA Ergebnisse zur Kreuzreaktivität von #JIM13, #MAC207 und #MAC265 an ausgewählten Polysacchariden, Naturharzen und Pflanzensäften. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (+) gilt als positiv Nachweis ( $> 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ), (-) als negativ ( $< 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ). (/) nicht getestet. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind.

Antigene (Polysaccharide, Harze, Pflanzensaft)	Anti-Arabino- galactan-Protein (#JIM13)		Anti-Arabino- galactan-Protein (#MAC207)		Anti-Tragant (#MAC265)	
	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis	(OD <sub>414nm</sub> )	Ergebnis
Klucel G (#TAD010004)	0,000	-	0,000	-	0,001	-
Methylcellulose (Fisher #10144440)	0,000	-	0,000	-	0,001	-
(Hydroxypropyl)-methyl	0,000	-	0,001	-	0,000	-

Cellulose (Sigma #H7509)						
Dextrin/Kartoffelstärke (Kremer #63420)	0,001	-	0,001	-	0,000	-
Reisstärke (Kremer #63440)	0,000	-	0,000	-	0,000	-
Weizenstärke (Kremer #63451)	0,001	-	0,000	-	0,000	-
Funori (Kremer #63477)	0,007	-			0,004	-
Mastix (Sigma #G0878)	0,026	-	0,007	-	0,002	-
Dammar (Kremer #60001)	0,002				0,003	-
Manila Kopal (Kremer #60150)	0,030				0,002	-
Feigenbaumsaft ( <i>Ficus Benjamina</i> )	0,003	-			0,002	-

Tabelle 15 beweist, dass keiner der drei Antikörper Kreuzreaktionen mit den getesteten Polysacchariden, Harzen oder Feigensaft aufweist.

Bäume und Sträucher sind nicht nur die Produzenten der meisten Pflanzengummen sondern bilden auch die Basis für eine Vielzahl von Kunstobjekten (Möbel, Tafelgemälde, Skulpturen). Sie bestehen u.a. aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Proben von Kunstobjekten auf Holz können je nach Fragestellung kleine Mengen des Trägermaterials beinhalten, da eine Trennung der Schichten bei der Entnahme nicht immer möglich ist, oder eine Fragestellung sich spezifisch auf den Holzträger bezieht. Daher wurde überprüft, ob es zu Reaktionen zwischen den Antikörpern und verschiedensten Holzarten kommt. Laut Hersteller bindet #JIM13 an Rhamnogalacturonan I (Galacturonsäuren mit Rhamnoseeinheiten) aus Bergahorn, weshalb er in die Versuche mit aufgenommen wurde. Daneben wurden verschiedenen Obsthölzer (Apfel, Birne, Pflaume, Kirsche) getestet, da sie bekannte Lieferanten von Pflanzengummen sind (z.B. Kirschgummi). Außerdem wurden verschiedene Laub- (Eiche, Nussbaum, Kastanie, Linde, Pappel) und Nadelhölzer (Fichte, Zeder) untersucht. Die 12 Holzarten wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert, stufenweise verdünnt und mittels ELISA auf Kreuzreaktivität mit #JIM13 und #MAC265 getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12) und die Ergebnisse sind in Diagramm 11 dargestellt.

**Diagramm 11:** ELISA Ergebnisse zur Kreuzreaktivität von #JIM13 und #MAC265 an ausgewählten Holzarten. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 10 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (n = 2). Extinktionswerte unterhalb des Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> gelten als negativ.

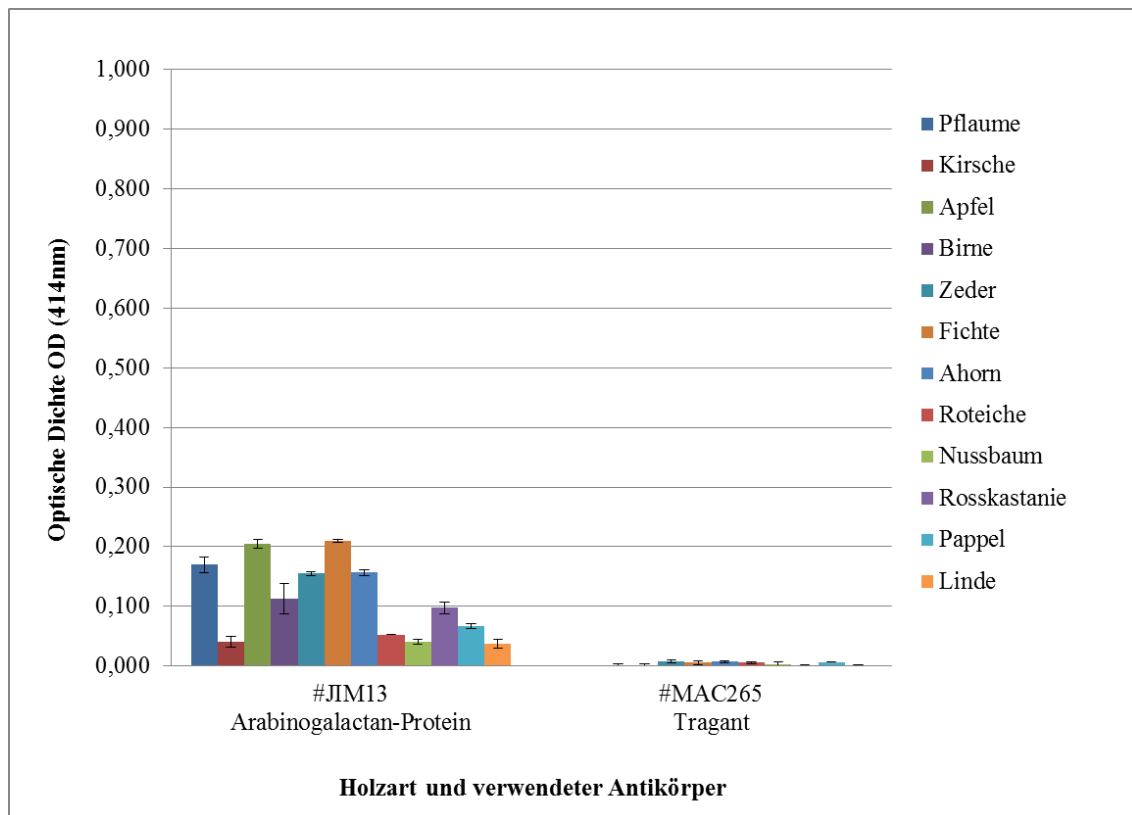


Diagramm 11 macht deutlich, dass es zu schwach-positiven Reaktionen von #JIM13 mit verschiedenen Holzarten kommt. Die Obsthölzer mit Ausnahme des Kirschbaumholzes haben alle schwach-positiv mit #JIM13 reagiert. Auffällig ist, dass beide Nadelhölzer (Zeder und Fichte) ebenfalls schwach-positiv reagieren. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie mehr Galacturonsäure enthalten als Laubhölzer (Euring 2008). Bei den Laubhölzer hat erwartungsgemäß Ahornholz, aber auch Nussbaum und Pappel schwach-positiv reagiert ( $OD_{414nm} > 0,05$ ). Bei den anderen Hölzern liegen die Extinktionswerte unterhalb des Cut-off von  $0,05 OD_{414nm}$ , weshalb sie als negativ gewertet werden. Bei #MAC265 kam es bei keiner Holzart zu einer Reaktion, weshalb Kreuzreaktionen dieses Antikörpers mit den getesteten Hölzern ausgeschlossen werden können.

Es ist festzuhalten, dass es bei der Verwendung von #JIM13 zu Kreuzreaktionen mit verschiedenen Holzarten kommt. Insgesamt sind die Extinktionswerte bei einer Probenmenge von 1 mg aber eher schwach. Die Probenmengen von Kunstwerken hingegen liegen in der Regel weit unter dieser Größe. Darüber hinaus besteht das Probenmaterial je nach Fragestellung und Objekt weniger aus dem Trägermaterial, als vielmehr aus den Schichten (Fassung, Überzug) darüber. Trotzdem sollte im Falle einer

Untersuchung auf Pflanzengummen mittels ELISA bei der Probenentnahme darauf geachtet werden, dass kein oder möglichst wenig Trägerholz mit entnommen wird. Ganz auszuschließen sind migrationsbedingte falsch-positiv Ergebnisse in den darüber liegenden Schichten aber nicht. Sollte der Nachweis in einer Probe, die auch Holzanteile enthält, mit #JIM13 stark-positiv ausfallen, gilt es als eindeutiger Nachweis, dass auch Pflanzengummen enthalten sind. Sollte der Nachweis aber nur schwach-positiv sein, ist das Ergebnis nicht eindeutig. Manchmal können Objektherkunft, Holzart, Probengröße und –aufbau helfen eine Ergebnisinterpretation zu unterstützen.

Die Versuche zur Spezifität und Kreuzreaktivität der drei monoklonalen Antikörper #JIM13, #MAC207 und #MAC265 haben gezeigt, dass #JIM13 ein breiteres Spektrum an Pflanzengummen abdeckt als #MAC207, weshalb in der Folge auf die Anwendung von #MAC207 verzichtet wird. #MAC265 reagiert ausschließlich ohne jegliche Kreuzreaktionen mit Tragant und ermöglicht so eine eindeutige Identifizierung. #JIM13 reagiert nicht mit Tragant, weshalb bei einer Bindemitteluntersuchung auf Pflanzengummen mittels ELISA stets #JIM13 und #MAC265 verwendet werden sollten. Während #MAC265 also antigen- und gattungsspezifisch ist, ist #JIM13 nur epitopspezifisch (→ Kap. 4.2). Bei holzhaltigen Proben ist die Verwendung von #JIM13 kritisch, da der Antikörper schwache Kreuzreaktionen mit verschiedenen Holzarten aufweist.

Abschließend muss festgehalten werden, dass aus der Fülle an verschiedenen Pflanzengummen aus den unterschiedlichsten Pflanzenarten nur Einzelproben getestet werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass #JIM13 nicht mit allen weltweit existierenden Pflanzengummen reagiert, was man schon wegen der schwankenden Extinktionswerte der getesteten Gummen erwarten muss (Tabelle 14). Das Beispiel mit den beiden Gummi Arabicum Proben macht deutlich, dass der Antikörper sogar schon innerhalb einer Gummenart unterschiedlich reagiert. Um mögliche falsch-negativ Ergebnisse nicht falsch zu interpretieren, werden in der vorliegenden Arbeit nur stark-positiv Ergebnisse als eindeutiger Nachweis für Gummen gewertet. Eine nähere Eingrenzung der Gummen ist mit Ausnahme der eindeutigen Identifizierung von Tragant mit den eingesetzten Antikörpern ist nicht möglich.

## 5.11 Zusammenfassung und Diskussion

Die Experimente zur Optimierung und Erweiterung der Versuchsparameter der indirekten ELISA Methode mit Meerrettich Peroxidase konjugierten Antikörpern zum Nachweis von Proteinen und Pflanzengummen haben gezeigt, dass die Wahl der Materialien (Mikrotiterplatten), Reagenzien (Puffer), Inkubationsdauer und -Temperatur entscheidenden Einfluss auf die ELISA Methode haben kann und dass durch gezielte

Veränderungen eine Erhöhung der Assayempfindlichkeit möglich ist. Je nach Anwendungsgebiet und Fragestellung sind diese Parameter für jedes ELISA System neu zu überprüfen. Die vorgestellten Ergebnisse beziehen sich daher nur auf die hier verwendete Methode.

Die Extraktionsversuche haben gezeigt, dass eine Dauer von mindestens 5 Stunden bei 37 °C die Wiederfindungsrate für Proteine verdoppeln kann. Eine Ultraschallbehandlung oder Verlängerung der Extraktion darüber hinaus ergab keine signifikante Erhöhung. Der Extraktionsprozess kann durch gelegentliches Aufschütteln des Probenansatzes auf dem Vortex unterstützt werden. Die Extraktion auf der Basis wässriger Puffersysteme ist unter anderem protein- und matrixabhängig, scheint aber in den meisten Fällen für eine Untersuchung mittels ELISA ausreichend. Die Wahl der Extraktionspuffer ist weniger abhängig von dem pH-Wert als von den Zusätzen. Die Versuche haben keine signifikanten Unterschiede zwischen pH 7,4 und pH 9,6 gezeigt. Aber der Zusatz von 1 % SDS im Extraktionspuffer hat das ELISA System entscheidend gehemmt. Zusätze von Detergenzien und Chelatbildnern können zwar helfen die proteinhaltigen Bindemittel aus ihrer komplexen Matrix herauszulösen, sie sind aber auf ihren Einfluss auf das jeweilige ELISA System zu überprüfen. Bei Puffern mit vielen Zusätzen wie beispielsweise in Tris-HCL kann es aufwendig und zeitintensiv sein, jede Komponente auf ihre Auswirkung zu überprüfen. Der Carbonatpuffer (pH 9,6) ohne Zusätze hat im Zuge der Untersuchungen konstante Ergebnisse erzielt, weshalb er als Extraktionspuffer festgelegt wurde.

Die Versuche zu verschiedenen Mikrotiterplatten zeigten, dass weniger die Art des Kunststoffes (PS oder PVC) oder der Oberflächenmodifikation der getesteten Platten bei den eingesetzten Antigenen ausschlaggebend ist als vielmehr der Durchmesser und damit die Füllhöhe der Wells bei gleicher Probenmenge. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt bei der photometrischen Messung, je länger der Strahlenweg durch ein Medium, desto höher die optische Dichte (Extinktion). Das bedeutet im Umkehrschluss, je schmaler und kleiner die Wells einer Mikrotiterplatte, desto weniger Probenmaterial wird benötigt, weshalb die Mikrotiterplatte mit dem kleinsten Welldurchmesser ausgewählt wurde (PVC #353912).

Die Assayempfindlichkeit kann durch die Dauer und Temperatur der Inkubation der Antigene und Antikörper beeinflusst werden. Die Antigeninkubation für 16 Stunden bei 4 °C im Vergleich zu 37 °C führte zu einer deutlichen Erhöhung der Signalstärke. Die Ergebnisse zeigen, dass die nachzuweisenden Proteine temperaturempfindlich sind. Bei der Inkubation der Primärantikörper für 16 Stunden bei 4 °C im Vergleich zu einer Stunde bei RT konnte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Signalstärke erreicht werden. Dabei ist die geringere Empfindlichkeit bei der 1-stündigen Inkubation weniger der Temperatur geschuldet als vielmehr der verkürzten Zeit. Es lässt sich festhalten, dass verlängerte Inkubationszeiten bei niedrigen Temperaturen zu einer Erhöhung der



Assayempfindlichkeit führen. Wenn die Empfindlichkeit nicht im Vordergrund steht (bei hohen Konzentrationen) können Assays mit einer kürzeren Inkubationszeit durchgeführt werden. Dann können leicht erhöhte Temperaturen unter Umständen helfen die Reaktion (Bindung) zu beschleunigen (Crowther 2001). Da die Empfindlichkeit der Nachweismethode bei Proben von Kunstobjekten ausschlaggebend sein kann, wurde die Inkubation der Antigene sowie der Primärantikörper auf 16 Stunden bei 4 °C festgelegt. Für die Inkubation der Sekundärantikörper fanden sich in der Literatur keine Angaben zu verlängerten Inkubationszeiten, weshalb sie 90 Min. bei 37 °C inkubiert wurden (Schultz 2006).

Um unspezifische Bindungen und somit falsch-positiv Ergebnisse zu vermeiden, ist das Abblocken freier Bindungsstellen in den Wells bei einer ELISA Untersuchung essentiell. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die in der Regel proteinische Blockreagenz nicht identisch mit den im Versuch nachzuweisenden Proteinen ist. Die Verwendung von Fertiglösungen ist einfach und schnell, aber oft sind die exakte Zusammensetzung und/oder Zusätzen nicht bekannt. Sie sind daher sehr genau auf ihre Beeinflussung des jeweiligen ELISA Systems zu überprüfen. Im Fall von ELISA Blocker™ und SEA Block™ (Pierce), die laut Hersteller den Nachweis der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Proteinen nicht beeinflussen sollten, kam es zu leicht erhöhten Extinktionswerte bei Verwendung des Kaseinantikörpers. Der Zusatz von geringen Mengen Kasein kann aufgrund seiner ausgezeichneten Blockeigenschaften nicht ausgeschlossen, weshalb auf ihren Einsatz verzichtet wurde. Bei der Verwendung von 5 % NCS in PBS kam es zu konstant niedrigen unspezifischen Bindungen bei allen getesteten Antikörperpaaren (Primär- und Sekundärantikörper).

Die Bestimmung des Cut-off, der Extinktionswert, ab dem ein ELISA Ergebnis als positiver Nachweis zu werten ist, erfolgte aus den unspezifischen Bindungen jedes Antikörperpaares in antigenfreien Wells nach der 3 Sigma Regel (Mittelwert +3\*SD) und konnte für die eingesetzte ELISA Methode auf 0,05 OD<sub>414nm</sub> festgelegt werden. Aufgrund von Antikörperchargen bedingten Schwankungen und/ oder Kontamination kam es vereinzelt zu höheren Werten, weshalb es eine Grauzone zwischen 0,05-0,1 OD<sub>414nm</sub> gibt, die kritisch ist und nicht als eindeutig positiv zu werten ist.

Die Überprüfung der verwendeten Antikörper hat ergeben, dass sie hochspezifisch sind und mit Ausnahme von #JIM13 keine Kreuzreaktionen untereinander oder mit anderen getesteten Substanzen aufweisen. Die Untersuchung eihaltiger Proben hat gezeigt, dass anti-Phosvitin (#SC-46681) nicht für den Einsatz an Proben von Kunstwerken geeignet ist, da er schon bei ungealterten Eigelbproben nur schwach positiv reagierte. Mit anti-Ovalbumin (#AB1225) hingegen konnte in allen eihaltigen Proben, unabhängig, ob Eiklar, Eigelb oder Vollei verwendet wurde, Ovalbumin eindeutig nachgewiesen werden. Die Versuche haben darüber hinaus gezeigt, dass sich Ovalbumin und Phosvitin nicht für tierartenspezifische Untersuchungen eignen, da sie mit Huhn- und

Wachteleiern reagieren. Das ist vermutlich auf Homologien in den Aminosäuresequenzen von Ovalbumin und Phosvitin aus Huhn und Wachtel zurückzuführen (Webster et al. 1981, Byrne 1984). Der Nachweis von Ovalbumin bestätigt daher nur, dass sich Ei in der Probe befindet, aber nicht welcher Teil vom Ei verwendet worden ist, noch von welcher Vogelart es stammt. Ähnlich verhält es sich mit anti-Kasein (#RCAS-10A). Die Versuche mit diesem Antikörper haben gezeigt, dass ein eindeutiger Nachweis von Kasein unabhängig der Herkunft und Aufbereitung, möglich ist. Die unterschiedlich aufgeschlossenen Kaseine wiesen teilweise erheblichen Schwankungen der Signalstärke auf, was weniger mit der Antikörperspezifität, als vielmehr mit der Extraktion zu tun hat. Mit Kalk aufgeschlossenes Kasein ist wenig bis gar nicht wasserlöslich, die Proteinausbeute also gering, was zu einer schwächeren Reaktion im ELISA führt. Ist in einer Probe Kalkkasein zu erwarten (z.B. bei Wandmalereiprobe), gilt es zu beachten und wenn möglich, die Probenmenge zu erhöhen.

Die Untersuchungen der drei Kollagenantikörper verdeutlichen, dass anti-Kollagen (#ab34710) mit allen getesteten Leimen, unabhängig der Herkunft (Säugetier oder Fisch) reagiert. Allerdings ist der Antikörper aus Kaninchen nicht in der Lage mit Kaninchen- und Hasenkollagen zu reagieren, da ein Organismus in der Regel keine Antikörper gegen sich selber herstellen kann. Durch die eigene Herstellung tierartenspezifischer Leime konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem kommerziellen Hasenleim (Kremer #63025), weniger, wenn überhaupt, um Hasen- oder Kaninchenhaut als vielmehr um eine Mischung aus kollagenhaltigem Material von unterschiedlichen Tierarten handelt. Eine Unterscheidung von Haut- und Knochenleim ist mittels des eingesetzten Antikörpers nicht möglich, weshalb auch keine Aussagen zur Art des Ausgangsmaterials (Haut und/oder Knochen) gemacht werden können.

Anti-Fischkollagen (#T89171R) hat mit allen getesteten Fischleimen (kommerziell oder eigene Herstellung) eindeutig positiv reagiert. Die Reaktion mit Gelatine (Sigma #G2500, Kremer #63040) ist nicht abschließend zu klären, basiert aber höchstwahrscheinlich auf der Verwendung von Fisch bei der Herstellung der Gelatine, weshalb hier nicht von einer Kreuzreaktion ausgegangen wird. Der Störkollagenantikörper (AIS2006), der aus einer Auftragsimmunisierung von 2006 stammt, ist hochspezifisch und reagiert ausschließlich mit Störkollagen. Eine Identifizierung der Gattung, nicht der Art ist somit möglich. Es konnten keine Kreuzreaktion mit anderen Säugetier- oder Fischleimen festgestellt werden. Allerdings blieb der Nachweis von Störkollagen bei der kommerziellen Hausenblase in Blättern (Kremer #63100) aus. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Produkt, entweder nicht um Stör handelt, oder die störspezifischen Epitope, die für die Antikörperbindung notwendig sind, durch die Aufbereitung der Störblase verloren gegangen sind. Die Herstellung eigener Leime hat gezeigt, dass kommerzielle Produkte

sich nicht für tierartspezifische Untersuchungen eignen und verdeutlicht darüber hinaus die Problematik der kommerziellen Handelsbezeichnungen. Die Bezeichnungen sind oftmals eher als Qualitätsmerkmal zu verstehen und beziehen sich weniger auf die Zusammensetzung oder Herkunft. So steht „Hasenleim“ oder „Störleim“ in der Restaurierung für einen besonders hochwertigen Hautleim bzw. Schwimmblasenleime. Trotz seiner relativ dunklen Eigenfarbe wird Hasenleim aufgrund seiner hohen Elastizität bevorzugt für Grundierungs- und Vergoldungstechniken verwendet (Wehlte 2009). Studien zur Verwendung von Hecht- und Karpfenblasenleimen als Alternative zu Störleim haben gezeigt, dass die guten Leimeigenschaften weniger von der Fischart als vielmehr vom Ausgangsmaterial (Schwimmblase) abhängen (Geißinger 2006). Die Überlegung Handelsbezeichnungen weniger nach der Tierarten (Hase, Stör) als vielmehr nach dem Ausgangsprodukt (Haut, Schwimmblase) zu benennen, könnte in der Zukunft die Diskussion über die verwendeten Tierarten hinfällig werden lassen.

Die Untersuchung der drei Gummen-Antikörper bestätigt, dass #MAC265 hochspezifisch nur mit Tragant reagiert. #MAC207 reagierte mit weniger als der Hälfte der getesteten Pflanzengummen positiv, weshalb auf den Einsatz dieses Antikörpers in der Folge verzichtet wird. #JIM13 zeigte schwache Kreuzreaktionen mit verschiedenen Hölzern, was bei der Untersuchung von realen Probenmaterial berücksichtigt werden muss. Der Antikörper reagierte aber mit Ausnahme von Tragant mit allen getesteten Pflanzengummen. Aufgrund der zahllos existierenden verschiedenen Pflanzengummen weltweit kann nicht ausgeschlossen werden, dass er nicht mit allen Gummen reagiert. Negative Ergebnisse bedeuten daher nicht, dass keine Pflanzengummen in der Proben enthalten sind, sondern dass #JM13 keine Gummen detektiert hat, was prinzipiell auf alle eingesetzten Antikörper zutrifft.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen an ungealterten, reinen Bindemittelproben hat ergeben, dass Werte zwischen 0,05–500 ng/Well je nach eingesetztem Antigen und Antikörper erreicht werden konnten. Die Nachweisgrenzen für Ovalbumin und Kasein lagen bei 0,05ng/Well, für die getesteten tierischen Leime zwischen 5–50 ng/Well und für die Pflanzengummen sogar zwischen 1-500 ng/Well mit den entsprechenden Antikörpern. Diese Nachweisgrenzen gelten nur für die in diesen Versuchen eingesetzten Antikörper, Antikörperchargen, Antigene und das verwendete ELISA System. Die Ergebnisse veranschaulichen die Problematik einer Quantifizierung der proteinhaltigen Bindemittel aus unbekanntem Probenmaterial von Kunstwerken mittels der ELISA Methode. Neben Schwierigkeiten der Extraktion (→ Kap. 5.4) und Materialmischungen und –Degradation, auf die im Verlaufe der Arbeit noch eingegangen wird, ist vor allem die Affinität der Antikörper zu den jeweiligen Antigenen zu nennen. Die Versuche verdeutlichen, dass ein Antikörper sehr unterschiedlich auf verschiedene Antigene der gleichen Gruppe reagieren kann. Die Verwendung von allgemeinen Gruppenmarkern wie Kollagen oder Arabinogalactan-

Proteinen kann bei der Vielzahl an möglichen Antigenen und Mischungen in den meisten Fällen nur zu einer ja/nein Aussage führen. Eine Eingrenzung der Herkunft oder eine Quantifizierung wäre dann im Idealfall an ungealterten, reinen Bindemitteln nur mit weiteren spezifischen Antikörpern möglich (z.B. Stör oder Tragant).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Überprüfung der einzelnen Versuchsparameter eine Optimierung der ELISA Methode erzielt werden konnte. Die Erweiterung der Methode zum Nachweis von Proteinen und Gummen hat gezeigt, dass die eingesetzten Antikörper eine hohe Spezifität aufweisen. Die schrittweise Durchführung der optimierten Methode ist im Anschluss nochmal zusammengefasst und im nächsten Kapitel folgt die Anwendung der Methode an definierten, teilweise gealterten Probekörpern.

## 5.12 Optimierte indirekte ELISA Methode zur Untersuchung von realem Probenmaterial (Protokoll)

- Extraktion der Probe (\_\_\_µg/\_\_\_µl) in Carbonatpuffer (0,05M NaCO<sub>3</sub>, pH 9,6) für 16 Stunden bei 37 °C, regelmäßig aufschütteln (Vortex). 10 Minuten bei 18890 RZB zentrifugieren und Überschuss mit den extrahierten Proteinen abnehmen. Herstellung von Verdünnungsstufen in Carbonatpuffer und ansetzen der Positivkontrollen (→ Anhang A2)
- Beschicken der PVC Mikrotiterplatte (BD Biosciences); Adsorption des Antigens: 50 µl Probensuspension/Well für 16 Stunden abgedeckt bei 4 °C inkubieren.
- Probensuspension auswerfen und 3x waschen mit 150 µl PBS/Well (pH 7,4).
- Blocken freier Bindungsstellen mit 100 µl Blockpuffer/Well (5 % NCS/PBS) 1 Stunde bei RT inkubieren.
- Auswerfen des Blockpuffers.
- Zugabe von 50 µl Primärantikörper/Well (1:1000 Ovalbumin (Chemicon/Millipore #AB1225), 1:1000 Kasein (ICL #RCAS-10A), 1:500 Kollagen (Abcam #ab34710), 1:500 Störkollagen (nicht kommerziell AIS2006), 1:200 Fischkollagen (Biodesign #T89171R), 1:10 Gummen (CCRC #JIM13, #MAC265) in 5 % NCS/PBS) für 16 Stunden bei 4 °C inkubieren.
- Lösungen auswerfen und 4x waschen mit 150 µl Waschpuffer I/Well (0,05 % Tween 20/PBS).
- Zugabe von 50 µl enzymmarkierter Sekundärantikörper/Well (1:500 GARb/PO (Southern Biotech #4050-95), 1:1000 GARt/PO (Southern Biotech #3050-05) in 5 % NCS/PBS 1,5 Stunden bei 37 °C inkubieren.

- Lösungen auswerfen, 4x waschen mit 150 µl Waschpuffer II/Well (0,005 % Tween/PBS) und 1x mit 150 µl PBS/Well.
- Zugabe von 50 µl Substratpuffer/Well (ABTS® in 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer (pH 4,9), 0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 10 Minuten bei RT inkubieren.
- Zugabe von 50 µl Stopp-Puffer/Well (0,05 % NaN<sub>3</sub>/ 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer)
- photometrische Messung der optischen Dichte bei 414 nm.

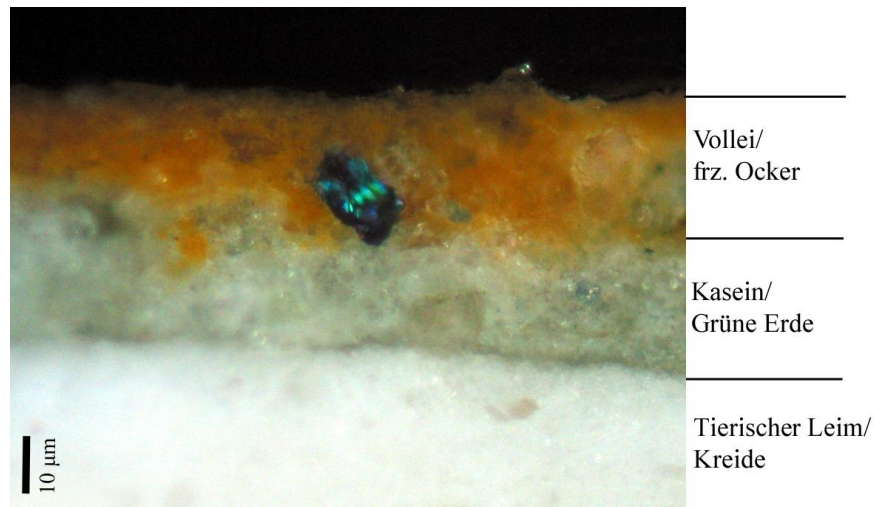
## **6 Anwendung der ELISA Methode an definierten Probekörpern**

Vor dem Einsatz an realem Probenmaterial wurde die optimierte ELISA Methode an drei verschiedenen Gruppen von Referenzproben auf ihre Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit hin überprüft und der Einfluss von Pigmenten und Alterung auf die Nachweisreaktion überprüft. Die erste Gruppe beschäftigt sich mit Fassungssproben bekannter Zusammensetzung einer 2005 hergestellten polychromen Probeplatte mit bis zu 4 verschiedenen proteinischen Bindemitteln (→ Anhang B2.1). Die zweite Gruppe umfasst 22 Fassungssproben aus der Referenzsammlung der Universität in Pisa, deren Zusammensetzungen der Autorin vor und während der Analyse nicht bekannt waren. Den Abschluss bildet eine Gruppe von 40 künstlich gealterten Fassungssproben mit bekannter Zusammensetzung aus dem Getty Conservation Institute. Die beiden letzten Gruppen wurden darüber hinaus mit einer zweiten ELISA Methode basierend auf Alkalischer Phosphatase markierten Antikörpern untersucht. Diese unveröffentlichte Methode wurde anfänglich, im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes der Autorin am Metropolitan Museum of Art New York, parallel zur der eingesetzten Methode entwickelt. Mittlerweile wird dort aber auch mit dem in dieser Arbeit entwickelten ELISA System gearbeitet. Die beiden Methoden werden aufgrund ihrer Enzymmarkierung in der Folge als HRP (horseradish peroxidase) und AP (Alkalische Phosphatase) ELISA Methode bezeichnet. Die Durchführung der AP ELISA Methode ist dem → Anhang C zu entnehmen.

### **6.1 Probetafel mit Fassungsaufbau – Versuche zum Nachweis unterschiedlicher Proteine innerhalb einer Probe**

Die nachfolgenden Untersuchungen an Fassungssproben von einer Probetafel mit bekannter Zusammensetzung sollten zeigen, ob mehrere proteinhaltige Bindemittel innerhalb einer Probe mittels ELISA nachgewiesen und darüber hinaus bestimmten Schichten im Fassungsaufbau zugeordnet werden können. Die Basis der Probeplatte (PT) bilden drei Schichten: Grundierung aus Kreide und tierischem Leim (Kollagen), darüber eine Fassungsschicht aus Grüner Erde und Boraxkasein und abschließend einer Schicht aus frz. Ocker und Vollei (→ Anhang B2.1, #PT5) (Abbildung 8).

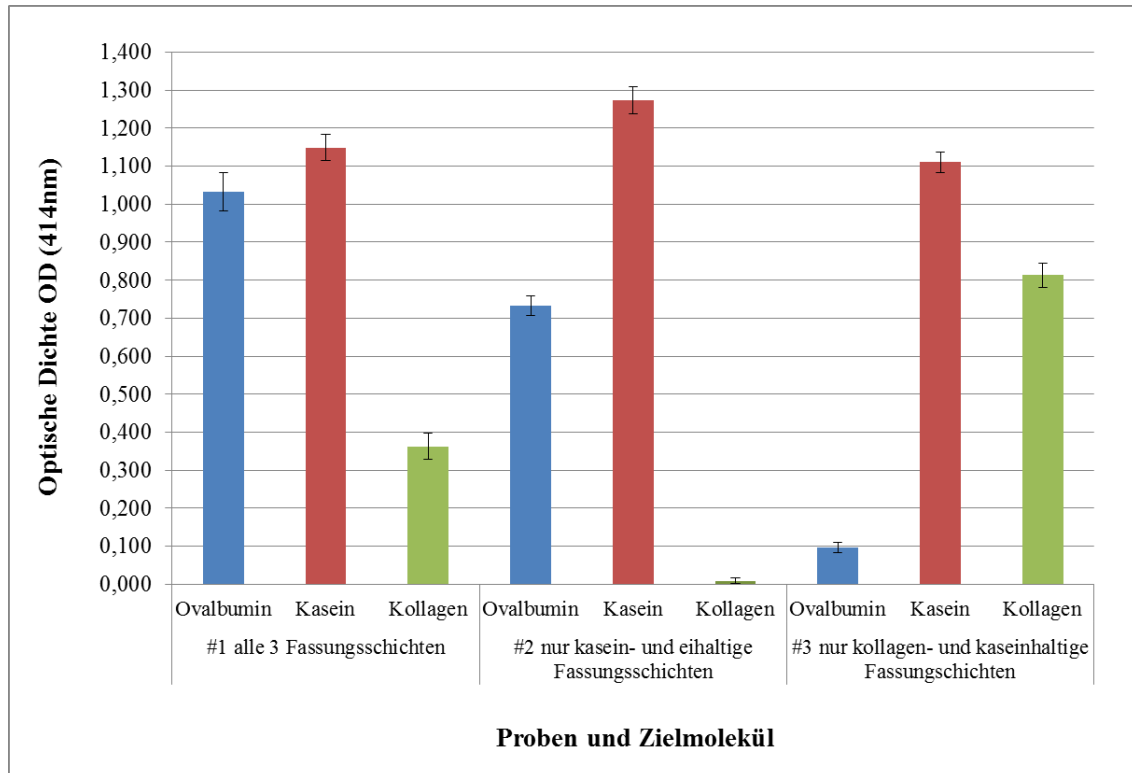
**Abbildung 8:** Anschliff der Probe #PT5 der Probetafel. V.u.n.o.: Grundierung (tierischer Leim/Kreide), grüne Schicht (Kasein/Grüne Erde) und orange Schicht (Vollei/frz. Ocker)



Es wurden drei Proben von der Probetafel im Bereich #PT5 genommen: Probe #1 umfasste alle drei Fassungsschichten, Probe #2 enthielt lediglich die Kasein und Ei gebundenen Malschichten und Probe #3 nur die Kollagen und Kasein gebundenen Schichten. Bei den Proben #2-3 wurden die relevanten Schichten unter Vergrößerung mit einem Skalpell nach der Probenahme vom Rest so gut wie möglich getrennt. Alle drei Proben wurden in Carbonatpuffer überführt (150 µg/ 500 µl), extrahiert, Verdünnungsstufen erstellt und auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen mittels ELISA untersucht. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12), die Ergebnisse sind in Diagramm 12 dargestellt.

Diagramm 12 bestätigt die Anwesenheit aller drei Proteine in Probe #1. In Probe #2 wurden lediglich Ovalbumin und Kasein nachgewiesen, während Kasein und Kollagen in Proben #3 detektiert worden sind. Zudem wurden Spuren von Ovalbumin ( $< 0,1 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ) in Probe #3 erfasst, die auf Penetration der Ei gebundenen Fassungsschicht in die darunterliegende Kasein-Schicht zurückzuführen ist. Das Ergebnis erlaubt in diesem Fall eine Zuordnung der Proteine zu bestimmten Schichten: Das Fehlen von Kollagen in Probe #2 lässt den Schluss zu, dass das Bindemittel für die Grundierung tierischer Leim war, während die überwiegende Abwesenheit von Ovalbumin in Probe #3 darauf hindeutet, dass das Bindemittel der grünen Fassungsschicht Kasein ist.

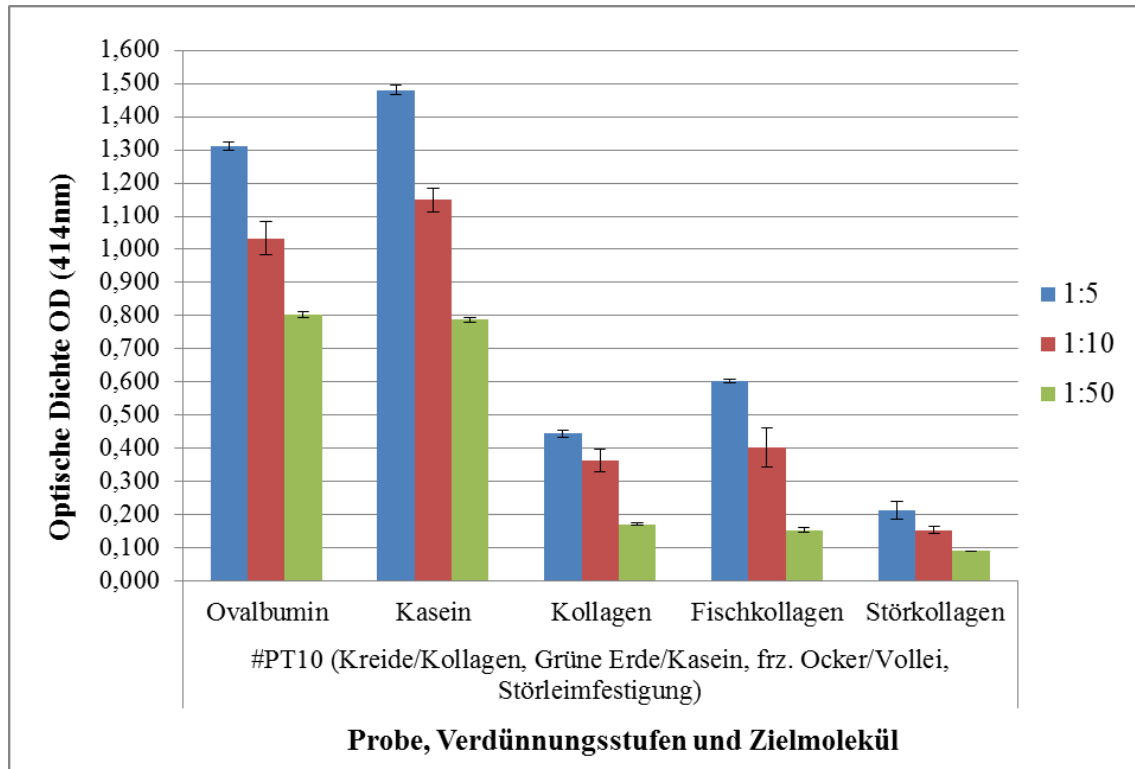
**Diagramm 12:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung an drei verschiedenen Fassungsproben bekannter Zusammensetzung (Probetafel). Test auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. Dargestellte Verdünnungsstufe: 1:10. Cut-off: 0,05 OD<sub>414nm</sub>. (n = 2).



Eine weitere Probe der Probetafel mit allen drei Fassungsschichten sowie einer dünnen Schicht Störleim, die einer Malschichtfestigung nachempfunden ist (→ Anhang B2.1, #PT10), wurde mittels ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen (unspezifisch), Fischkollagen und Störkollagen hin untersucht. Der Versuch soll zeigen, ob mehr als drei Bindemittel innerhalb einer Probe nachweisbar sind und darüber hinaus eine weitere Differenzierung der tierischen Leime möglich ist. Die Probe wurde in Carbonatpuffer überführt (150 µg/ 500 µl), extrahiert und Verdünnungsreihen erstellt (1:5, 1:10, 1:50). Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12). Das Ergebnis in Diagramm 13 bestätigt die Detektion von Ovalbumin, Kasein, Kollagen sowie Fisch- und Störkollagen. Aussagen zur Lokalisierung der Bindemittel innerhalb des Schichtenaufbaus sind hier nicht möglich, da keine Schichtentrennung der Probe im Vorfeld stattfand. Ob nur Störleim oder eine Mischung aus tierischen Leim, Fisch- und Störleim verwendet worden ist, kann mit den hier verwendeten Antikörpern nicht geklärt werden, da alle drei Kollagenantikörper beim Einsatz von Störleim positiv reagieren (→ Kap. 5.10.3, Tabelle 13).



**Diagramm 13:** ELISA Ergebnis einer Fassungsprobe bestehend aus drei Fassungsschichten (Kreide/Kollagen, Grüne Erde/Kasein, Frz, Ocker/Vollei) und einer Malschichtfestigung (Störleim) als Abschlußschicht. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. Cut-off 0,05 OD<sub>414nm</sub>. (n = 2).



Die Versuche belegen, dass mehrere unterschiedliche Proteine/Bindemittel auch in komplexen Proben eindeutig nachweisbar sind. Eine Zuordnung oder Eingrenzung der Bindemittel innerhalb eines Schichtenaufbaus ist in günstigen Fällen möglich, wenn, zum einen keine ursprünglichen Proteinmischungen innerhalb einer Schicht vorkommen und zum anderen die Schichten sich im Vorfeld trennen lassen und separat untersucht werden. Aufgrund der geringen Probengrößen und Schichtstärken sind vollständige Schichtentrennungen in der Regel nicht möglich. Außerdem ist mit migrationsbedingten Vermischungen zu rechnen, weshalb in den separaten Probenansätzen in der Regel mindestens zwei Proteine (falls unterschiedlich und in ausreichender Konzentration) zu erwarten sind. Anhand einer Probe sind Aussagen zur Verteilung nicht möglich.

## 6.2 Fassungsproben einer Referenzsammlung – Nachweis von Proteinen an Blindproben

Die zweite Studie umfasste 22 Fassungsproben mit bekannter Zusammensetzung aus der Referenzsammlung der Universität in Pisa, Italien (→ Anhang B2.2). Der Probensatz beinhaltete unpigmentierte und pigmentierte Proben, die auf unterschiedliche Trägermaterialien (Glas, Gips und Putz) aufgetragen und vereinzelt künstlich gealtert worden sind. Alle Proben enthielten mindestens ein proteinisches Bindemittel (Ei, Kasein oder Kollagen) und einige zudem einen Zusatz von Leinöl. Zwei Proben enthielten anstelle von Pigmenten organische Farbstoffe. Die Informationen zu den Proben wurden in einem verschlossenen Umschlag aufbewahrt und waren zum Zeitpunkt der Analysen nicht bekannt. Es sollte überprüft werden, ob die Identifizierung der Proteine und Proteinmischungen möglich ist, ohne die Zusammensetzung zu kennen. Die Proben wurden mittels ELISA auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen hin untersucht. Die ELISA Durchführung erfolgte sowohl nach der optimierten HRP ELISA Methode (→ Kap. 5.12) also auch nach der AP ELISA Methode (→ Anhang C). Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Probeninformationen aus dem Umschlag mit den Analyseergebnissen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16:** ELISA Ergebnisse der Blindproben (Universität Pisa). Alle Proben wurden in 450 µl Carbonatpuffer extrahiert. Die getesteten Probenmengen waren je nach Verfügbarkeit unterschiedlich und sind in Spalte 5 angegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse der OD der niedrigsten Verdünnungsstufe (1:2). Grün = HRP Methode, Gelb = AP Methode. \*markieren die Proben mit der künstlichen Alterung. Die Klammern bedeuten, dass nicht genug Probenmaterial vorhanden war, um beide ELISA Methoden zu überprüfen. (n = 2).

Binde- mittel	Proben- nr.	Pigment/ Farbstoff	Träger	Menge (in µg)	OD <sub>414nm</sub>		
					Oval. (#AB1225)	Kasein (#RCAS- 10A)	Koll. (#ab34710)
Leim	I*	Smalte	Glas	107	-	-	+
				191	-	-	++
	XIII	Azurit	Glas	82	-	-	+++
				136	+ (?)	-	+++
	XVI	Calcium- sulfat	Glas	77	-	-	+++
				119	+ (?)	-	+++
XXII	-	Glas	(30)	-	-	+++	
Kasein	III*	Bleiweiß	Putz	208	-	+++	-
				163	-	+++	-
	VIII*	Grüne Erde	Glas	214	-	+++	-
				180	-	+++	-

	XII	Azurit	Glas	221	-	+++	-
				207	-	+++	-
	XVII*	-	Glas	(188)	+ (?)	+++	-
Ei	II	Grüne Erde	Putz	214	+++	-	-
				217	+++	-	-
	IV*	Smalte	Glas	211	+++	-	-
				192	+++	-	-
	V	Malachit	Glas	216	+++	-	-
				173	+++	-	-
	X	Zinnober	Putz	81	+++	-	-
				204	+++	-	-
	XI*	-	Glas	50	+++	-	-
				87	+++	-	-
	XIV	Azurit	Glas	50	+++	-	-
				169	+++	-	-
	XVIII	Cochenille	Glas	(184)	+++	-	-
XIX	Krapp	Glas	(160)	+++	-	-	
XXI	Bleiweiß	Putz	164	+++	-	-	
			187	+++	-	-	
Öl- tempera (Ei+Öl)	VII	Malachit	Gips	95	++	-	-
				193	+	-	-
	IX	Zinnober	Putz	98	+	-	-
				173	+	-	-
	XV	Bleiweiß	Gips	110	++	-	-
				216	+++	-	-
XX	-	Glas	192	++	-	-	
			202	+++	-	-	
Protein Mischung	VI	Azurit	Putz	201	+++	-	+++
				200	+++	-	+++

## Legende

HRP Methode (OD <sub>414nm</sub> )		AP Methode (OD <sub>405nm</sub> )	
+++	Starkes Signal, < 0,9 OD <sub>414nm</sub>	+++	Starkes Signal, > 2,5 OD <sub>405nm</sub>
++	Mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>	++	Mittleres Signal, > 1 OD <sub>405nm</sub>
+	Schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>	+	Schwaches Signal, < 1 OD <sub>405nm</sub>
+ (?)	Sehr schwaches Signal, nicht eindeutig, < 0,1 OD <sub>414nm</sub>	+ (?)	Sehr schwaches Signal, nicht eindeutig, < 0,3 OD <sub>405nm</sub>
-	Keine Detektion		

Zunächst ist festzuhalten, dass beide ELISA Methoden zu identischen Ergebnissen führten und alle Proteine korrekt identifiziert worden sind. Vereinzelt nicht eindeutige Ergebnisse (XIII, XVI, XVII) sind vermutlich auf Kontaminationen bei der Probenahme oder –Aufbereitung zurückzuführen. Die einzige Probe (VI) auf der Basis von zwei

Proteinen (Ovalbumin und Kollagen) wurde ebenfalls eindeutig identifiziert. Mit einigen Ausnahmen zeigten alle Proben - relativ unabhängig von ihrem Trägermaterial (Glas, Putz, Gips) - ein starkes Signal, so dass weitaus weniger Probenmaterial für einen Nachweis ausgereicht hätte. Am Beispiel der beiden unpigmentierten Proben XI und XXII wird deutlich, dass auch mit weniger als 50 µg bzw. 30 µg Probenmaterial das ELISA Signal immer noch sehr stark ausfallen kann und bei reinem Bindemittel sich die benötigte Probenmenge noch weiter verringern lässt. In den Proben, in denen Ei mit Öl gemischt vorlag (Öltempera), ist die ELISA Reaktion teilweise deutlich schwächer, aber immer noch positiv. Zwei Aspekte müssen hierbei berücksichtigt werden: Erstens, wenn Ei mit Öl gemischt wird, ist weniger Ei erforderlich, weshalb die Probe weniger Protein enthält. Zweitens, kann die Extraktion von Proteinen aus einem nicht-wasserlöslichen Gefüge (Öl) mit wässrigen Puffern unzureichend sein. Beides führt dazu, dass weniger Protein für die ELISA Untersuchung zur Verfügung steht und es daher zu einem schwächeren Signal kommt.

Aussagen zum Einfluss der künstlichen Alterung sind an diesem Probensatz nur schwer möglich, da für die Versuche unterschiedliche Probenmengen zur Verfügung standen und der Vergleich mit den ungealterten Proben fehlt. Alle künstlich gealterten Proben haben aber mit einer Ausnahme stark positiv reagiert. Probe I zeigte dagegen nur eine schwache, wenn auch eindeutig positive Reaktion. Die Versuche verdeutlichen, dass unabhängig von der ELISA Methode, einzelne Proteine aber auch Proteinmischungen in Proben unbekannter Zusammensetzung eindeutig identifiziert werden können.

### **6.3 Künstlich gealterte Fassungsproben – Nachweis von Proteinen an gealterten Proben**

Die letzte Gruppe an Probekörpern umfasste 40 künstliche gealterte Fassungsproben mit bekannter Zusammensetzung aus dem Getty Conservation Institute (GCI) (→ Anhang B2.3). Es sollte geprüft werden, ob ein Nachweis von Proteinen in künstlich gealterten Proben mittels der entwickelten ELISA Methode möglich ist und ob mögliche Einflüsse von Pigmenten auf den ELISA Nachweis erkennbar sind.

Vier verschiedene Bindemittel (Ei, Kasein, Kollagen und Gummi arabicum) wurden jeweils mit den 10 Pigmenten Kreide, Bleiweiß, Auripigment, Roter Ocker, Zinnober, Malachit, Grüne Erde, Lapislazuli, Maya Blau und Beinschwarz gemischt, 47 Tage künstlich gealtert (Lichtalterung, bei RH 60-80 % und 40 °C) und im Anschluss mittels ELISA untersucht. Lediglich die gummenhaltigen Proben wurden ungealtert getestet, da Voruntersuchungen am GCI gezeigt hatten, dass diese Proben schon nach 2 Tagen der künstlichen Alterung mittels der dort eingesetzten ELISA Methode nicht mehr nachweisbar waren (mündl. Kommunikation Joy Mazurek, GCI). Die

Zusammensetzung der Proben war bekannt und der ELISA wurde nur für das jeweils verwendete Bindemittel durchgeführt. Der Probenansatz in Carbonatpuffer war bei allen Proben gleich (200 µg/ 500 µl), Verdünnungsstufen wurden hergestellt (1:2, 1:5, 1:10, 1:500) und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die Durchführung erfolgte sowohl nach der optimierten HRP ELISA Methode (→ Kap. 5.12) als auch nach der AP ELISA Methode (→ Anhang C). Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** ELISA Ergebnisse der künstlich gealterten Fassungproben (GCI). Die Proben mit Ei, Kasein und Kollagen sind 47 Tage künstlich gealtert, die Proben mit Gummi arabicum sind ungealtert. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 200 µg/ 500 µl. Getestet wurde mit zwei verschiedenen ELISA Methoden (HRP und AP). Dargestellt sind Ergebnisse der niedrigsten Verdünnung (1:2). \* ~ 50 % weniger Probenmaterial. (n = 2).

Pigmente	Bindemittel (Gew. %) und verwendetes Enzym (Detektionssystem)							
	Ei (50 %)		Kasein (15 %)		Kollagen (5 %)		Gummen (5 %)	
	HRP	AP	HRP	AP	HRP	AP	HRP	AP
Kreide	+++	+++	+++	+	++	n.d.	++	+++
Bleiweiß	+++	+++	+	-	+	n.d.	++	+++
Auripigment	+++	+++	+++	n.d.	++	++	++	n.d.
Roter Ocker	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Zinnober	+++	+++	+++	++	+	+	+	+++
Malachit	+++	+++	+++	+++	+	-	++	+++
Grüne Erde	+++	+++	+	+	-	+	+	+++
Lapislazuli	+++	+++	++	-	++	++	++	+++
Maya Blau	+++	+++	+	-	+	+	++	+++
Beinschwarz	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	+++

Legende

	HRP Methode (OD <sub>414nm</sub> )	AP Methode (OD <sub>405nm</sub> )
+++	Starkes Signal, < 0,9 OD <sub>414nm</sub>	Starkes Signal, > 2,5 OD <sub>405nm</sub>
++	Mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>	Mittleres Signal, > 1 OD <sub>405nm</sub>
+	Schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>	Schwaches Signal, < 1 OD <sub>405nm</sub>
-	Keine Detektion	
n.d.	Nicht durchgeführt, da zu wenig Probenmaterial	

Tabelle 17 zeigt, dass in den meisten Fällen die Bindemittel auch nach der künstlichen Alterung mittels der ELISA Technik noch nachweisbar waren. Es wird deutlich, dass in Abhängigkeit des eingesetzten Bindemittels bestimmte Pigmente, Alterung und/oder das verwendete Detektionssystem (HRP oder AP) die Empfindlichkeit eines ELISA beeinflussen können. In wie weit die unterschiedlichen Nachweisintensitäten (Signalstärken) auf den Einfluss der Pigmente, deren spezifisches Gewicht und/oder auf die Alterung zurückzuführen sind, kann nur vermutet werden, da der Vergleich mit den ungealterten Proben fehlt. Allerdings zeigen die Untersuchungen deutlich, dass

Wechselwirkungen zwischen bestimmten Pigmenten und dem jeweiligen Detektionssystem (Enzym/Substrat) eine bedeutende Rolle spielen.

Ovalbumin konnte eindeutig in allen eihaltigen Proben auch nach 47 Tage der künstlichen Alterung unabhängig vom Pigment mit beiden eingesetzten ELISA Methoden nachgewiesen werden (Tabelle 17, Spalten 2-3). Das ELISA Signal war aber aufgrund des hohen Bindemittelanteils (50 %) so stark, dass mögliche Einflüsse durch Pigmente, Alterung und/oder auf das Detektionssystem nicht erkennbar waren.

Beim Nachweis von Kasein und Kollagen kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen in Abhängigkeit von der eingesetzten ELISA Methode (Tabelle 17, Spalten 4-5, 6-7). Alle kaseinhaltigen Proben waren mittels der HRP ELISA Methode, wenn auch mit unterschiedlichen Signalstärken, nachweisbar. Grüne Erde, Bleiweiß und Maya Blau zeigten schwache ELISA Reaktionen. Bei den kaseinhaltigen Proben, die mit der AP ELISA Methode untersucht wurden, kam es zu einigen Negativergebnissen. In den Proben mit Bleiweiß, Lapislazuli, Maya Blau und Beinschwarz war Kasein nach 47 Tagen der künstlichen Alterung nicht mehr nachweisbar. Im Fall von Beinschwarz und Lapislazuli ist das Negativergebnis eindeutig auf die Wechselwirkungen zwischen Pigment und Detektionssystem zurückzuführen, da beide Pigmente mit der HRP ELISA Methode deutlich (mittlere bis starke Signalintensität) detektierbar waren. Bei Bleiweiß, Maya Blau und Grüne Erde hingegen scheinen weitere Gründe (z. B. Protein-Pigment Wechselwirkungen, Proteindegradation) eine Rolle zu spielen, da beide Detektionssysteme (HRP und AP + Substrat) nur schwache ELISA Reaktionen zeigten. Doch sind abschließende Aussagen diesbezüglich ohne den Vergleich mit den ungealterten Proben nicht möglich.

Der Nachweis von Kollagen zeigte bei der Hälfte der Proben nur schwach positive ELISA Signale (Tabelle 17, Spalten 6-7). Mit einer Ausnahme (Grüne Erde/Kollagen) war Kollagen mittels der HRP ELISA Methode in allen Proben noch nachweisbar. Die Untersuchung mit der AP ELISA Methode führte zu ähnlichen Ergebnissen (Signalstärken). Allerdings war statt der Probe mit Grüner Erde die malachithaltige Probe nicht mehr nachweisbar. Auch hier waren die Proben mit Bleiweiß und Maya Blau wieder schwer detektierbar (schwache Signalstärke), aber auch der Nachweis in den Proben mit Zinnober und Malachit war nur schwach positiv.

Im allen Proben mit Gummi arabicum konnte das Bindemittel mit beiden ELISA Methoden eindeutig nachgewiesen werden (Tabelle 17, Spalten 8-9). Die Untersuchung mit der HRP ELISA Methode zeigte in Abhängigkeit vom verwendeten Pigment deutliche Schwankungen in den Signalstärken auf, wohingegen der Nachweis mit der AP ELISA Methode durchweg starke Signale hervorgerufen hat. Zinnober, Grüne Erde und Beinschwarz in Kombination mit Gummi arabicum scheinen einen Einfluss auf das Detektionssystem mit HRP zu haben, da es im Vergleich zur AP ELISA Methode zu

einer verminderten ELISA Reaktion bei gleicher Probenmenge kam. Ein Vergleich mit den gealterten Proben war nicht möglich. Allerdings zeigte die Wiederholung der Versuche am GCI unter Verwendung eines neuen Sekundärantikörpers, dass bei der Hälfte der Proben nach 47 Tagen künstlicher Alterung kein Nachweis mehr möglich war (mündl. Kommunikation Joy Mazurek, GCI; Cartechini et al. 2010).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Pigmente und/oder Alterung die Empfindlichkeit der ELISA Reaktion in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein nachteilig beeinflussen können. Gründe dafür sind vor allem der Verlust von Epitopen, Wechselwirkungen zwischen Protein und Pigment, fortschreitende Vernetzung und begrenzte Löslichkeit gealterter Proteine (Schilling & Khanjian 1996a-b; Khandekar & Phenix 2000; Fiedler 2001; Colombini & Modugno 2004; Gautier & Colombini 2007). Darüber hinaus spielen Wechselwirkungen zwischen Pigment und Detektionssystem (Enzym/Substrat) eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass bestimmte Metallionen die enzymatische Reaktion hemmen bzw. fördern können (Chen et al. 2000; Zollner 1999). Metallionen sind Bestandteil vieler Pigmente und liegen daher auch in den Extrakten der Proben für den ELISA vor. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Lapislazuli, Maya Blau, Beinschwarz und Grüne Erde, aber auch bei einigen kritischen Metallpigmenten wie Zinnober (Quecksilber), Bleiweiß (Blei), Malachit (Kupfer) mit Wechselwirkungen je nach eingesetztem Detektionssystem zu rechnen ist. Während mittels der HRP ELISA Methode nur in einer Probe (Kollagen/Grüne Erde) das Protein nicht mehr detektierbar war, kam es beim Einsatz der AP ELISA Methode bei fünf Proben zu Negativergebnissen. Vier dieser fünf Proben waren kaseinhaltig, was zum einen darauf hindeutet, dass hier vermehrt die Bildung von Metallkomplexen auftritt (Klausmeyer 2009a) und andererseits zeigt, dass die Alkalische Phosphatase empfindlicher gegenüber Metallionen ist, als die Meerrettich Peroxidase.

Die spezifische Rolle, die die verschiedenen Pigmente bei der Alterung von Bindemitteln spielen, ist nach wie vor noch nicht eindeutig geklärt (Mills & White 1994, Schilling & Khanjian 1996a-b, Colombini & Modugno 2004). Hier besteht noch Forschungsbedarf. Festzuhalten bleibt, dass der Einfluss von Pigmenten auf das ELISA System sowohl abhängig ist von dem verwendeten Protein als auch von dem verwendeten Detektionssystem. Kein Pigment konnte unabhängig vom Bindemittel durchgängig den ELISA Nachweis stören. Daraus resultiert die Notwendigkeit alle neuen Antikörper auch an gealterten pigmentierten Proben auf ihre Reaktivität und Anwendbarkeit hin zu überprüfen, bevor sie für die Untersuchung an realem Probenmaterial eingesetzt werden. Zudem müssen diese Mechanismen bei der Interpretation von ELISA Ergebnissen berücksichtigt werden. Letztlich haben die Untersuchungen aber auch gezeigt, dass der Nachweis mit wenigen Ausnahmen auch an gealterten, pigmentierten Proben mittels ELISA möglich ist.

## 6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Das Kapitel 6. hat sich mit der Überprüfung der Anwendbarkeit der entwickelten ELISA Methode auf verschiedenen Gruppen von Referenzproben im Hinblick auf die Möglichkeit der Detektion mehrerer Proteine, der Lokalisierung sowie möglicher Einflüsse von Pigmenten und Alterung beschäftigt. Die Untersuchung an Fassungsproben mit bekannter Zusammensetzung belegt, dass ein Nachweis mehrerer Proteine innerhalb einer Probe möglich ist. So konnte beispielsweise innerhalb einer Probe im Zuge eines Analysedurchgangs die Anwesenheit von Ovalbumin, Kasein, Kollagen, Fischkollagen und Störkollagen bestätigt werden. Eine Differenzierung der tierischen Leime in Leim von Säugetieren, Fischen oder Störleim ist nur im Zusammenspiel aller drei in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kollagenantikörper möglich. Bei einem positiven Nachweis von Kollagen und negativem Nachweis von Fisch- und Störkollagen kann von der Verwendung eines Säugetierleimes ausgegangen werden. Ist Fischkollagen, aber kein Störkollagen nachweisbar, handelt es sich um irgendeinen anderen Fischleim. Nicht ausgeschlossen werden kann hingegen, dass es sich um eine Mischung aus Säugetierleim und Fischleim handelt, da auch der unspezifischen Kollagenantikörper auf Fischleim reagiert. Gleiches gilt für den positiven Nachweis von Störleim. Da alle drei Kollagenantikörper beim Einsatz von Störleim positiv reagieren, kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Mischung aus Säugetier-, Fisch und Störleim handelt. Eine Differenzierung der tierischen Leime spielt aus restauratorischer Sicht für die Erhaltung eines Kunstobjektes eher eine untergeordnete Rolle, oftmals reicht der Nachweis von Kollagen (unspezifisch) aus. Die Verwendung aller drei Kollagenantikörper (Kollagen-*Screening*) kann aber von Bedeutung sein, wenn beispielsweise Rezepturen oder Arbeitsanweisungen aus kunsttechnologischen Quellen an einem Objekt überprüft werden sollen (→ Kap. 7.1, → Kap. 7.4).

Grundsätzlich eignet sich die ELISA Technik nicht zur Lokalisierung von Proteinen innerhalb einer Probe. Allerdings haben die Untersuchungen gezeigt, dass eine Zuordnung der detektierten Proteine zu bestimmten Fassungsschichten unter gewissen Umständen möglich ist. Voraussetzung ist, dass keine Proteinmischungen innerhalb einer Schicht vorkommen, sich die Schichten im Vorfeld der Analyse trennen lassen und separat im selben Analysedurchgang untersucht werden. Eine vollständige Trennung einzelner Schichten ist aufgrund der geringer Probengröße und Schichtstärken oftmals unmöglich. Die Migration von Bindemitteln in benachbarte Schichten und/oder später eingebrachte Restaurierungsmaterialien können die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Dennoch hat sich im Laufe der gesamten Arbeit gezeigt, dass bei



ausreichendem Probenmaterial eine Isolierung einzelner Schichten oder Separierung einzelner Teilbereiche hilfreich sein kann und in Einzelfällen eine schichtbezogene Zuordnung einzelner Proteine/Gummen zulässt (→ Kap. 7.3-7.4).

Die ELISA Methode wurde ebenfalls erfolgreich zum Nachweis von Proteinen an Referenzprobenproben unbekannter Zusammensetzung überprüft. In 22 Fassungsproben konnten die verwendeten Proteine, auch in Mischungen vorkommend, eindeutig identifiziert werden. Bei Probenmischungen von Proteinen und Öl kam es vermehrt zu schwächeren ELISA Signalen. Neben der geringeren Proteinkonzentration aufgrund des Ölanteils scheint die Extraktion von Proteinen aus einem nicht-wasserlöslichen Gefüge (z.B. Öl) mit wässrigen Puffern Schwierigkeiten hervorzurufen. Es ist daher dienlich, alle Proben im Vorfeld auf andere Inhaltsstoffe (Stoffgruppen, Pigmente) zu untersuchen (z.B. FTIR), um die Interpretation der ELISA Ergebnisse zu unterstützen.

Die Untersuchungen belegen außerdem, dass künstliche Alterung, Pigmente und/oder Wechselwirkungen zwischen bestimmten Pigmenten und dem ELISA Detektionssystem (Enzym/Substrat) einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der ELISA Methode haben. Letzteres konnte durch die Anwendung einer zweiten ELISA Methode mit einem anderen Detektionssystem (AP/Substrat) verdeutlicht werden. Während einige Protein-Pigment-Kombinationen mit der HRP Methode nachweisbar waren, konnten dieselben Proben bei der Anwendung der AP Methode nicht detektiert werden. Grund dafür ist die unterschiedliche Empfindlichkeit der Enzyme auf bestimmte Metallionen, die Bestandteil vieler Pigmente sind. Dabei hat sich gezeigt, dass die Meerrettich Peroxidase weniger empfindlich auf die Metallionen der getesteten Pigmente reagiert. Für andere Pigmente ist dies noch zu überprüfen. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass es Unterschiede zwischen den eingesetzten Methoden gibt, was die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen mit anderen Systemen erschwert.

Der Einfluss der künstlichen Alterung und/oder Pigmente auf den ELISA Nachweis kann anhand der untersuchten Probensätze nicht abgeschätzt werden, da zum Vergleich die ungealterten Proben nicht zur Verfügung standen. Dennoch ist festzuhalten, dass mit einer Ausnahme in allen gealterten Proben das Protein, wenn auch teilweise mit schwacher Signalstärke, mit der entwickelten ELISA Methode noch nachweisbar war. ELISA Untersuchungen von Klausmeyer (2009a) zeigen ebenfalls die Abnahme der Immunreaktivität der Proteine/Gummen durch Alterung, wohingegen Cartechini et al. (2010) sogar den Verlust der Immunreaktivität bei bestimmten Protein-Pigment-Kombinationen nach der Alterung beklagen. Die abweichenden Ergebnisse sind auf unterschiedliche ELISA Systeme zurückzuführen, weshalb jedes System individuell auf den Einfluss von Pigmenten und Alterung überprüft werden sollte.

Festzuhalten ist, dass sich die entwickelte ELISA Methode als *Screening*-Methode eignet, da die Differenzierung mehrere Proteine innerhalb einer Probe möglich ist. Die

ELISA Empfindlichkeit scheint zwar durch Alterung, Pigmente und Wechselwirkungen zwischen bestimmten Pigmente und dem eingesetzten ELISA Detektionssystem vermindert, aber ein positiver Nachweis war trotzdem auch an gealterten Proben mit einer einzigen Ausnahme noch möglich.

## 7 Anwendung der ELISA Methode an realem Probenmaterial; Fallbeispiele

Abschließend wurde die entwickelte ELISA *Screening*-Methode zur Untersuchung von realem Probenmaterial herangezogen. Die Fallbeispiele an Möbeln, Streichinstrumenten, dekorativen Stangentuschen, polychromen Holzskulpturen, hölzernen Raumausstattungen, Fragmente polychromer antiker Steinstatuen und Pastellgemälden zeigen die breite Anwendungsmöglichkeit der ELISA Technik (→ Anhang B3.1). Einige der vorgestellten ELISA Untersuchungen erfolgten im Rahmen großer, interdisziplinärer Forschungsprojekte. Eine detaillierte Beschreibung jedes einzelnen Objektes ist in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, daher wird an gegebener Stelle auf Fachliteratur verwiesen.

### 7.1 Untersuchung zu Binde- und Klebemitteln an verschiedenen Möbeln in Boulle-Technik

Die Boulle-Technik, benannt nach André Charles Boulle (1642-1732), ist eine Sonderform der Marketerie, bei der Schildpatt in Kombination mit Messing oder Zinn verwendet und als Furnier auf die Oberflächen eines Möbels aufgeleimt wird. Neben Schildpatt finden vor allem aber auch Horn, Elfenbein, Perlmutter sowie Edelmetalle und farbige Hölzer Verwendung. Die Rückseite der teilweise transparenten Materialien ist oft bemalt oder mit bemaltem Papier hinterlegt, das dann auf das Trägerholz geleimt wird. Schildpatt oder Horn, wo es Schildpatt imitieren soll, sind in der Regel mit roter Farbe hinterlegt, wohingegen Horn, wo es Lapislazuli imitieren soll, blau hinterlegt ist (Franke & Schwarz 2011). Die Binde- und Klebemittel für Boulle-Möbel basieren auf tierischen Leimen (Stratmann-Döhler 1986). In historischen Quellenschriften finden aber darüber hinaus explizit Fisch- und Störleim Erwähnung (Roubo 1772: 1011; Cröker 1736: 511). Naturwissenschaftliche Untersuchungen konnten tierische Leime, teilweise mit unterschiedlichen Zusätzen von Ölen, Harzen und Gummen an verschiedenen Boulle-Objekten bestätigen (Demeter 2006, Ronfort 2009, Baumer et al. 2011); ein positiver Nachweis von Fisch- bzw. Störleim fehlt jedoch bisher. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 14 Proben von 6 Objekten in Boulle-Technik unterschiedlicher Herkunft/Provenienz mittels ELISA auf Kollagen (unspezifisch), Fisch- und Störkollagen sowie auf Gummen hin untersucht. Bei den Proben #A1-E2 handelt es sich um 13 Leim- bzw. Kittproben, die während der Restaurierung durch den zuständigen Restaurator unterhalb der Metall-, Holz- oder Schildpatteinlagen von 5

verschiedenen Objekten (→ Anhang B3.1) entnommen worden sind. Auffällig war, dass alle Leimproben sehr dunkel, teilweise eine grünlich bis schwarze Farbe hatten, was eventuell auf nicht-proteinische Zusätze und/oder Reaktionsprodukte des Metalls hinweisen könnte. Beides kann mittels ELISA nicht beantwortet werden, soll hier aber trotzdem Erwähnung finden. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Probe #B2 (kleiner Hausaltar) fiel auf, dass auf den bräunlichen Leimpartikeln eine transparente Schicht lag. Diese Schicht (#B2b) ließ sich unter dem Mikroskop vom bräunlichen Kern (#B2a) hervorragend trennen und wurde separat untersucht, da es sich um zwei verschiedenen Materialien handeln könnte.

Die letzte Probe (#P3891) stammt von einem Doppelschreibtisch (R 3891) von Johann Puchwiser (um 1680–1744) aus der Sammlung des Bayerischen Nationalmuseums (BNM) in München, der im Rahmen des interdisziplinären Forschungsprojekts „Möbel in Boulle-Technik“ am BNM (2007-2010) aufwendig untersucht und restauriert wurde (Eikermann 2011). Die Restaurierungsarbeiten ermöglichten die Probenahme an bisher unzugänglichen Bereichen, so dass Verfälschungen durch frühere Restaurierungsmaßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Die Probe wurde von der blauen Hintermalung eines abgenommenen Hornstücks genommen und auf Binde- und Klebemittel hin untersucht. Aminosäureanalyse (Ionenaustauschchromatographie) und Untersuchungen mittels GC/MS ergaben für diese Probe tierischen Leim (Kollagen) sowie geringe Zusätze von Gummi arabicum und Lärchenterpentin (Baumer et al. 2011). Eine tierartspezifische Identifizierung des Kollagens war nicht möglich. Baumer et al. (2011) versuchten anhand des Verhältnisses der beiden gesättigten Fettsäuren Palmitin und Stearin eine tierartspezifische Eingrenzung des Leimes und vermuten eine Mischung aus z.B. Rinderleim mit Hasenleim; schließen aber auch Fischleim nicht aus.

Alle Proben wurden in Carbonatpuffer überführt, extrahiert (#A-E ~ 2 mg/ 500 µl; #P3891 ~60 µg/ 300 µl), Verdünnungsreihen erstellt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, bzw. 1:2 1:5, 1:10, 1:100) und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12).

Die ELISA Ergebnisse in Tabelle 18 zeigen, dass in allen Proben eindeutig Kollagen (unspezifisch) nachgewiesen werden konnten. Mit einer Ausnahme (#B2a) wurde in keiner der Proben Fisch- und Störkollagen detektiert. Die im Vorfeld separierte Probe #B2a war sowohl positiv auf Fisch- als auch auf Störkollagen. Ob es sich um eine Mischung aus Fisch- und Störleim handelt oder nur um Störleim, lässt sich mit den hier verwendeten Antikörpern nicht eindeutig klären. Nicht nur das unterschiedliche Erscheinungsbild der Proben #B2a-b, sondern auch die Tatsache, dass die transparente Schicht auf den bräunlichen Partikeln auflag und sich einfach trennen ließ, legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine spätere Zugabe im Zuge einer Restaurierungsmaßnahme (Festigung) handelt. In der Probe #P3891 konnten neben

unspezifischen Kollagen auch Gummen (Arabinogalactan-Proteine) nachgewiesen werden, was die Untersuchungen von Baumer et al. (2011) bestätigt. In allen anderen Proben konnten weder Gummen noch spezifisch Tragant detektiert werden. Eine weitere Differenzierung der Gummen ist hier nicht möglich, da der verwendete Antikörper (#JIM13) mit einer Vielzahl von Gummen reagiert (→ Kap. 5.10.4). Gründe für die Beimengung von Gummen sowie anderer Zusätze zum tierischen Leim sind vielfältig und können im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht diskutiert werden.

**Tabelle 18:** ELISA Ergebnisse der Binde- und Klebemittel an Proben verschiedener Boule-Möbel. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) #A-E ~ 2 mg/ 500 µl, #P3891 ~60 µg/ 300 µl. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:10 bzw. 1:2 (#P3891). (n = 2)

Proben#	OD <sub>414nm</sub>				
	Kollagen (unspez.) (#ab34710)	Fisch- kollagen (#T89171R)	Stör- kollagen (AIS2006)	Gummen (#JIM13)	Tragant (#MAC265)
#A1 Leim unter Zinnprofil	+++	-	-	-	-
#A2 Leim unter Schildpatt	+++	-	-	-	-
#A3 Leim unter Ebenholz	+++	-	-	-	-
#A4 Leim, Konstruktion	+++	-	-	-	n/d
#B1 Leim unter Zinnprofil	+++	-	-	-	n.d.
#B2a Leim (Konstruktion) transparent	++	+	+	n/d	n/d
#B2b Leim (Konstruktion) bräunlich	++	-	-	-	n/d
#B3 Kitt	+++	-	-	-	n/d
#C1 Leim unter Messingblech	+++	-	-	-	n/d
#C2 Leim unter Boulemarketerie	+++	-	-	-	n/d
#D1 Leim unter Boulemarketerie	+++	-	-	-	n/d
#D2 Kitt	+++	-	-	-	n/d
#E1 Leim mit grünen Pigmentpartikeln	+++	-	-	-	-
#E2 Leim unter Messingblech	+++	-	-	-	-
#P3891 blaue Farbschicht	+	-	-	++	n/d

## Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>
n/d	Nicht durchgeführt

Marketerien an Boule-Möbeln sind selten unrestauriert geblieben. Hauptschadensphänomen ist die Ablösung der Marketerie vom Trägerholz, was primär auf die verschiedenen technischen Eigenschaften der Materialien und die damit verbundene Empfindlichkeit gegenüber Klimaschwankungen zurückzuführen ist. Oftmals wurden sie schon kurz nach ihrer Herstellung restauriert, wobei nicht selten die komplette Marketerie abgenommen und neu verleimt wurde. Daher muss abschließend darauf hingewiesen werden, dass die hier gewonnenen ELISA Ergebnisse nichts darüber aussagen, ob es sich um das originale Binde- oder Klebemittel handelt oder im Zuge einer Restaurierung eingebracht wurde (Ausnahme Probe #B2a). Eine Beurteilung über die ursprüngliche Verwendung von Fisch- bzw. Störleim an Möbeln in Boule-Technik ist darum problematisch und kann anhand der wenigen hier untersuchten Proben nicht gemacht werden. Untersuchungen an weiteren Proben von unzugänglichen Bereichen, wie im Falle der Probe #P3891, könnten darüber in Zukunft möglicherweise mehr Auskunft geben.

## 7.2 Untersuchung von Streichinstrumentenlacken

Das ELISA Verfahren wurde ebenfalls zur Untersuchung von Streichinstrumentenlacken herangezogen. Streichinstrumente, insbesondere aus der Gegend um Cremona, sind weltweit für ihre herausragende Qualität, aber auch ihre ästhetische Schönheit bekannt. Neben Andrea und Nicolo Amati sowie Guisepe Guarneri `del Gesù ist vor allem Antonio Stradivari (ca. 1647-1737) der wohl bekannteste aller Instrumentenbauer dieser Region.

Worauf die außerordentliche Qualität der Cremoneser Instrumente beruht, ist bisher nur ansatzweise geklärt. Mit Sicherheit spielen die besonderen handwerklichen Fähigkeiten der Meister eine wesentliche Rolle. Aber auch die verwendeten Hölzer, deren Güte, sowie Vor- und Weiterbearbeitung tragen entscheidend zur Qualität und Einzigartigkeit dieser Instrumente bei. Von besonderem Interesse sind dabei die Überzüge, die neben einer Schutzwirkung gegen äußere Einflüsse, auch Auswirkungen auf die Qualität und

das Erscheinungsbild der Instrumente haben können. Obwohl die Lacke von Streichinstrumenten oft bewundert werden, ist nur sehr wenig über die Lacktechniken und verwendeten Materialien bekannt. In der Vergangenheit beruhten die Untersuchungen auf der Anwendung singulärer Verfahren an vereinzelt zur Verfügung stehenden Proben (u.a. Condax 1966, 1982; White 1978, 1984; Nagyvary 1988, von Bohlen & Meyer 1996/97; Barlow et al. 1988; Barlow & Woodhouse 1998a-b, 1990). Erst in den letzten Jahren, insbesondere durch Echard et al. (2004, 2007, 2008a-b, 2009), Pollens (2009) und Brandmair & Greiner (2010) wird versucht, das Probenmaterial mit Hilfe einer methodologischen Kombination aus verschiedensten, mitunter sehr aufwendigen, Verfahrenstechniken eingehender zu untersuchen. Die nachfolgenden ELISA Untersuchungen waren Teil dieses methodologischen Vorgehens und sind ausführlich bei Brandmair & Greiner (2010) im Zusammenhang mit anderen Analyseergebnissen nachzulesen.

Typische historische Überzüge basieren auf natürlichen organischen Substanzen (Proteine, Harze, Öle, Lösemittel, Farbstoffe) und zu einem geringeren Teil auf anorganischen Zusätzen (Trockenmittel, Füllstoffe, Pigmente) (Echard et al. 2007). Es handelt sich oft um mehrschichtige Applikationsverfahren, zu denen die Imprägnierung und das Färben des Holzes, das Füllen der Holzporen, eine farblose Grundlackierung und/oder ein abschließender Farblack gehören können (Brandmair & Greiner 2010). Die Komplexität der Proben (Aufbau und Materialien), sowie die oftmals eingeschränkte Möglichkeit der Probenentnahme erschweren die Identifizierung der einzelnen Materialien. Daher liegt der Schwerpunkt vieler Publikationen auf zerstörungsfreien Analysen. Nur wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit den organischen Bestandteilen, da hierfür in der Regel eine Probenentnahme unumgänglich ist. Die organischen Bestandteile können typischerweise sowohl tierischen (Albumin, Kasein, Kollagen, Propolis) als auch pflanzlichen Ursprungs (Öle, Gummen, Harze) sein (Echard et al. 2010).

Im Folgenden liegt der Fokus auf der Imprägnierung des Holzes. Wie der Name schon sagt, hat sie die Funktion das Holz bzw. die Poren zu imprägnieren, abzusperren, was vor allem das Absorptionsvermögen des Holzes herabsetzt und später bei der Oberflächenveredelung eine schnelle und homogene Schichtbildung zulässt. Anmerkungen zur Präparierung der Resonanzhölzer noch vor dem Grundieren der Instrumente werden in Traktaten von Adlung (1769) und Keeß (1819) beschrieben (Fontana et al. 1999). Behandlungen mit Milch, Öl, Harzlösungen, Kaseingrundierung, tierischem Leim etc. werden erwähnt (Fulton 1988; Walch 1997; Fontana et al. 1999; Bruyn-Ouboter 2000). Es finden sich aber auch Hinweise zum Aussieden und Auslaugen der Hölzer, sowie die Anwendung von Salzen. So erfolgten beispielsweise Vorbehandlungen mit Kalkmilch und Urin oder Salmiakgeist, um neben der braunen

Färbung eine höhere Dichtigkeit und Zähigkeit des Holzes zu bekommen (Hammerl & Hammerl 1995).

Der Hinweis auf Proteine und Gummen sowie die erhöhte Anforderung an die Empfindlichkeit der Untersuchungsmethoden aufgrund minimaler Probenmengen, machen diese Proben zu einem idealen Kandidaten für die ELISA Technik. Vier Proben von vier verschiedenen Streichinstrumenten (→ Anhang B3.1), die Antonio Stradivari zugeschrieben sind, wurden u.a. mittels ELISA auf Proteine hin untersucht. Im Vorfeld galt es zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Holzimprägnierungen in so komplexen Proben, inklusive Holz und Lacküberzug, mittels der ELISA Technik überhaupt nachweisbar bzw. differenzierbar sind. Insbesondere die Schichtdicke (oft nur einmaliger, dünner Auftrag) sowie die Unmöglichkeit der Schichttrennung waren dabei kritisch zu betrachten, da die ELISA Technik nur in Einzelfällen eine Lokalisierung des gesuchten Proteins innerhalb des Schichtenaufbaus zulässt. Es wurden Mustertafeln (Ahornholz) mit 9 verschiedenen proteinischen Bindemitteln mit und ohne Zusätze und Überzug (Öllack) hergestellt und im ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen, Fisch- und Störkollagen hin untersucht. Dabei wurde von den Mustertafeln #1-7 jeweils eine Schabeprobe von der Vorderseite ohne Überzug und eine mit Überzug, sowie eine von der unbehandelten Rückseite der Mustertafeln als Negativkontrolle genommen. Die Tafeln #8-9, die erst in einem zweiten Zyklus hergestellt worden sind, und ohne Überzug sind, wurden lediglich von der Vorderseite beprobt. Alle Proben enthielten Holz und wurden in Carbonatpuffer überführt (70-150 µg/ 500 µl) und extrahiert. Verdünnungsreihen wurden erstellt (1:2, 1:10, 1:50, 1:100) und in zwei Parallelen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12). Die vollständige Beschreibung der Mustertafeln ist dem → Anhang B2.4 zu entnehmen.

Die ELISA Ergebnisse in Tabelle 19 zeigen, dass die unterschiedlichen Proteine mit einer Ausnahme (#1.2) sowohl ohne als auch mit Überzug nachweisbar waren. Bei der Probe #1 wurde eine Eigelb-Öllack-Emulsion aufgetragen und der Nachweis von Ovalbumin war schon in der Probe ohne Überzug (#1.1) nur schwach positiv. In der Probe mit Überzug (#2.1) war Ovalbumin dann nicht mehr detektierbar, was auf verschiedene Gründe zurückzuführen ist: Zum einen ist Ovalbumin kein Protein im Eigelb, so dass es nur in geringen Mengen als Reste bei der Eitrennung in der Eigelbprobe vorliegt (→ Kap. 3.1.1, → Kap. 5.10.1). Zum anderen wird die Konzentration des Proteins aufgrund der Mischung mit einem weiteren Bindemittel (Öl) weiter herabgesetzt, da weniger Eigelb benötigt wird. Letztlich könnte eine solche Mischung aber auch die wässrige Extraktion der Proteine aus der Probe hemmen, so dass unterhalb der Nachweisgrenze gearbeitet wurde. Grundsätzlich lässt sich die Tendenz feststellen, dass die Proben ohne Überzug stärkere Signale ergeben haben als



die Proben mit Überzug (#2, #7), was an den höheren nicht-proteinischen Anteilen in diesen Proben liegt.

Die ELISA Ergebnisse für die Proben der Rückseiten waren mit einer Ausnahme (#3.3) alle erwartungsgemäß negativ. Der starke positive Nachweis von Ovalbumin auf der Rückseite der Mustertafel #3.3 ist auf die Penetration des Eiklars durch das sehr dünne Holz der Mustertafel zurückzuführen. Auch der Zusatz von Alaun zur Gelatine (#7) zur Härtung des Leimes und die damit verbundene partielle Denaturierung des Proteins scheinen keinen messbar hemmenden Einfluss auf die Nachweisreaktion zu haben.

Die Proben von den Mustertafeln #8-9 wurden jeweils positiv auf Kollagen (unspezifisch) und Fischkollagen getestet. Während die Probe #8 allerdings negativ auf Störkollagen reagierte, konnte Störleim in der Probe #9 eindeutig nachgewiesen werden. Wie bereits in → Kap. 5.10.3 diskutiert, ist die sogenannte Hausenblase in Blättern (Kremer #63100) entweder stark modifiziert oder frei von Stör, da sie nicht mit dem Störkollagenantikörper reagiert. Das Ergebnis ist daher folgerichtig.

**Tabelle 19:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung von 9 Mustertafeln zu Instrumentenlacken mit proteinischer Holzimprägnierung ohne und mit Überzug (oÜ bzw. mÜ), sowie unbehandelter Rückseite (RS); VS: Vorderseite. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 70-150 µg/ 500 µl. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2)

Nr.	Holz- imprägnierung	Proben- entnahmestelle	OD <sub>414nm</sub>				
			Oval. (#AB 1225)	Kasein (#RCAS- 10A)	Koll. (#ab34710)	Fisch- koll. (#T89171R)	Stör- koll. (AIS2006)
#1	Eigelb- Öllack- Emulsion	#1.1 VS oÜ	+	-	n/d	n/d	n/d
		#1.2 VS mÜ	-	-	n/d	n/d	n/d
		#1.3 RS	-	-	n/d	n/d	n/d
#2	Eigelb	#2.1 VS oÜ	++	-	n/d	n/d	n/d
		#2.2 VS mÜ	+	-	n/d	n/d	n/d
		#2.3 RS	-	-	n/d	n/d	n/d
#3	Eiklar	#3.1 VS oÜ	+++	-	-	n/d	n/d
		#3.2 VS mÜ	+++	-	-	n/d	n/d
		#3.3 RS	+++	-	-	n/d	n/d
#4	Kalkkasein	#4.1 VS oÜ	-	+++	-	n/d	n/d
		#4.2 VS mÜ	-	+++	-	n/d	n/d
		#4.3 RS	-	-	-	n/d	n/d
#5	Milch 3,5 %	#5.1 VS oÜ	-	+++	n/d	n/d	n/d
		#5.2 VS mÜ	-	+++	n/d	n/d	n/d
		#5.3 RS	-	-	n/d	n/d	n/d
#6	Hautleim	#6.1 VS oÜ	-	-	++	n/d	n/d
		#6.2 VS mÜ	-	-	++	n/d	n/d
		#6.3 RS	-	-	-	n/d	n/d
#7	Gelatine mit Zusatz von Alaun	#7.1 VS oÜ	-	-	+++	n/d	n/d
		#7.2 VS mÜ	-	-	++	n/d	n/d
		#7.3 RS	-	-	-	n/d	n/d

#8*	Hausenblase (Kremer #63100)	#8 VS oÜ	n/d	n/d	++	++	-
#9*	Störleim aus Zucht	#9 VS oÜ	n/d	n/d	++	++	++

## Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>
n/d	Nicht durchgeführt

Die Untersuchungen an den Mustertafeln bestätigen, dass eine Differenzierung und Identifizierung der unterschiedlichen Proteine bei relativ geringen Probenmaterial und Schichtdicken (Konzentrationen) sowie mit Materialkombinationen möglich ist. Eine Lokalisierung der Proteine im Schichtenaufbau ist aufgrund der Untrennbarkeit der einzelnen Schichten dagegen nicht möglich.

Nach diesen erfolgreichen Voruntersuchungen folgte die Analyse der vier Originalproben. Die detaillierte Beschreibung der Objekte sowie das methodologische Vorgehen bei der Untersuchung mit allen Ergebnissen sind bei Brandmair & Greiner (2010) nachzulesen. Bei den hier untersuchten Objekten handelt es sich um zwei Celli sowie zwei Violinen aus Privatbesitz, die A. Stradivari zugeschrieben sind. Die Probe #C1707 stammt von einem Holzspan ohne Lack von der Innenseite des Cellobodens. Die Untersuchung sollte zeigen, ob auch die Innenseite des Instrumentes mit einer proteinische Imprägnierung/Vorbehandlung versehen worden ist. Die Probe #5167 wurde an der Zarge des Unterbügels eines altitalienischen Cellos mit Lackaufbau genommen. Die Probe wurde im Vorfeld für die unterschiedlichen Untersuchungen mehrfach getrennt. Die Holzprobe #4058 stammt vom Boden einer Violine, wobei keine Lackreste erkennbar waren. Die letzte Holzprobe #5640 wurde von der Zarge einer Violine genommen, wies keine Lackreste auf und wurde ebenfalls im Vorfeld mehrfach geteilt. Die Probenmengen variierten zwischen 79-125 µg, wobei das Holz dabei den größten Teil ausmachte. Die Extraktion erfolgte in je 500 µl Carbonatpuffer. Verdünnungsstufen (1:2, 1:5, 1:10, 1:100) wurden erstellt und in jeweils zwei Parallelen im ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen, Fisch- und Störkollagen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierte Methode (→ Kap. 5.12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 aufgelistet.

**Tabelle 20:** ELISA Ergebnisse der Untersuchungen zur Holzimprägnierung an vier Streichinstrumenten. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 79-125 µg/ 500 µl. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2).

Objekte	OD <sub>414nm</sub>				
	Oval. (#AB1225)	Kasein (#RCAS-10A)	Koll. (#ab34710)	Fisch- Koll. (#T89171R)	Stör- Koll. (AIS2006)
#C1707 Cello	-	-	+	-	-
#5167 Cello	+++	-	++	-	-
#4058 Violine	-	+ (?)	-	-	-
#5640 Violine	++	+ (?)	+++	-	-

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>

In der Probe #C1707 konnte mittels ELISA eindeutig Kollagen nachgewiesen werden. Alle anderen Proteinnachweise blieben negativ. Fisch- und Störkollagen können ebenfalls ausgeschlossen werden. GC/MS Analysen durchgeführt am CNR in Perugia konnten die Anwendung von Kollagen bestätigen (Brandmair & Greiner 2010). Ob es sich bei dem positiven Nachweis auf Kollagen um eine bewusste Holzimprägnierung in Form einer Leimlöse oder lediglich ein Nebenprodukt bei der Verleimung (Wegwischen des Leimüberschusses) des Instruments handelt, kann nicht abschließend geklärt werden.

Histochemische Anfärbungen der Probe #5167 hatten im Vorfeld der Untersuchung Proteine in oberflächennahen Bereichen nachweisen können; eine weitere Spezifizierung war jedoch nicht möglich (Brandmair & Greiner 2010). Bei der Untersuchungen der Probe #5167 mittels ELISA wurden sowohl Kollagen als auch Ovalbumin eindeutig nachgewiesen. Kasein, Fischkollagen und Störkollagen wurden nicht detektiert. Mehrere Interpretationsansätze sind denkbar: Das Holz wurde mit Ei vorbehandelt, wobei mit den hier verwendeten Antikörper keine Unterscheidung in Eiklar, Eigelb oder Vollei möglich ist. Kollagen ist lediglich ein Nebenprodukt bei der Instrumentverleimung durch Wegwischen des Leimüberschusses. Ebenfalls denkbar ist die Mischung beider Proteine beispielsweise als Emulsion aufgetragen. Auch die spätere Zugabe eines der beiden Bindemittel oder sogar beider im Zuge von Restaurierungsarbeiten ist nicht auszuschließen. Da diese Probe Holz und den Lack

beinhaltete, könnte ein weiterer Interpretationsansatz sein, dass das Ei als Sperrschicht oder als Zusatz in einer der anderen Lackschichten zugesetzt worden ist. Interessanterweise konnten GC/MS Analysen durchgeführt am CNR in Perugia lediglich die Anwesenheit von Kollagen, nicht aber von Ovalbumin (Ei) bestätigen (Brandmair & Greiner 2010). Wie es zu dieser Diskrepanz kommt, kann nicht geklärt werden. Natürlich können Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden, aber auch eine ungleichmäßige Verteilung der Bindemittel ist denkbar, da für die beiden Untersuchungsverfahren (ELISA und GC/MS) unterschiedliche Proben verwendet worden sind.

In der Probe #4048 zeigte lediglich der Nachweis auf Kasein ein äußerst schwach positives Signal ( $< 0,1 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ), was nicht als eindeutiger Nachweis gewertet werden kann. Antwort darauf könnte lediglich eine Wiederholung des Versuches mit mehr Probenmaterial geben. Histochemische Untersuchungen durch Brandmaier & Greiner (2010) hatten im Vorfeld die Anwesenheit von Proteinen belegt. Den Nachweis von Phosphor und Stickstoff mittels SEM/EDX interpretieren die beiden Autoren mit der Möglichkeit, dass ein phosphorhaltiges Protein, zu dem Kasein zählt, zur Holzimprägnierung verwendet worden ist. Beides, weder Kasein, noch irgendein anderes Protein konnte mittels der ELISA Untersuchung eindeutig bestätigt werden.

In der Probe #5640 konnten ebenfalls durch histochemische Anfärbungen und FTIR Analysen die Anwesenheit von Proteinen nachgewiesen werden (Brandmair & Greiner 2010). Die durchgeführten ELISA Untersuchungen bestätigten die Gegenwart von verschiedenen Proteinen. Es wurden eindeutig Kollagen und Ovalbumin identifiziert, während der Nachweis von Kasein wieder nur ein sehr schwaches Signal ( $< 0,1 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ) zeigte, was nicht als eindeutiger Nachweis gewertet werden kann. Fisch- und Störkollagen konnten hingegen ausgeschlossen werden. Wie schon bei der Probe #5167 sind die Interpretationsmöglichkeiten vielfältig (s.o.) und können nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in drei von vier Proben jeweils zwei Proteine mittels der ELISA Technik eindeutig nachgewiesen werden konnten. Dass es sich dabei nicht ausschließlich um Kollagen (tierischen Leim) handelt, unterstützt die Aussage historischer Quellen, die auch die Anwendung andere Proteine wie Ovalbumin (Ei) und Kasein erwähnen (s.o.). In mindestens zwei Fällen (#5167, #5640) hätte weit weniger Probenmaterial ausgereicht, da die ELISA Signale stark ausfielen. Mit der Ausnahme der GC/MS Analyse der Probe #5167 (Ovalbumin) konnten die ELISA Ergebnisse sämtliche Untersuchungen stützen und erweitern. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind daher als wichtiger Beitrag zur Materialforschung an Streichinstrumenten anzusehen und unterstützen die Aufnahme der ELISA Technik in den traditionellen Untersuchungskatalog.

### 7.3 Verzierte Stangentuschen (Ink sticks) – Untersuchung der Binde- und Anlegemittel

Stangentusche, als *mo* in China und *sumi* in Japan bezeichnet, ist eine der wichtigsten Materialien in der fernöstlichen Malerei und Kalligraphie und seit über zwei Jahrtausenden bekannt (Swider et al. 2003). Diese in der Regel schwarze Wasserfarbe zählt zusammen mit dem Papier, dem Schreibpinsel und dem Reibstein zu den „Vier Schätzen des Gelehrtenzimmers“ (Chi-Chen 1930). Als Stangentusche werden längliche Stifte bezeichnet, die aus mit tierischem Leim zusammengepresstem Ruß bestehen. Sie müssen mit Wasser auf einem Reibstein angerieben werden, bis die gewünschte Konsistenz der Tusche erreicht ist und werden dann mit einem Pinsel aufgetragen. Für die Herstellung wird eine Leimlösung mit Ruß zu einer teigartigen Konsistenz vermischt, durch intensives Kneten, Schlagen und wiederholtes Anfeuchten homogenisiert und dann in Holzformen gepresst. Das Endprodukt ist ein handlicher schwarzer Stift, der häufig mit eingepprägtem Muster oder Inschriften reich verziert ist und oft vergoldet oder bemalt wird (Abbildung 9). Viele Stangentuschen sind keine bloßen Gebrauchsgegenstände mehr, sondern vielmehr eigene kleine Kunstwerke.

**Abbildung 9:** Beispiel zweier Stangentuschen. T.J. Morris Stangentusche (#5) (links); vergoldete Winsor & Newton Stangentusche (ca. 1850) (#1) (rechts).



Klassischerweise wurde der Ruß aus harzhaltigem Kiefernholz hergestellt, später kam die Gewinnung aus Erd- und Pflanzenölen hinzu (Chi-Chen 1930, Wehlte 2009). Der Leim wird vor allem aus Häuten von Säugetieren hergestellt. Neben Leim aus Büffel- oder Rinderhaut sowie Hirschhornleim finden in der älteren Literatur aber auch Fischleime und Pflanzengummen Erwähnung (Forbes 1932; Franke 1962). Um den mitunter unangenehmen Leimgeruch zu überdecken, wurden Kampfer, Moschus, seltener auch Gewürznelken und Zimt als Duftstoffe zugesetzt. Andere Zusatzstoffe dienten entweder zur Verbesserung der Farbkraft, Erreichen eines bestimmten Farbtons, besserer Verteilung der Tusche oder zur Vermeidung von Rissbildung der Stangentusche (Swider et al. 2003). Über mögliche Anlegemittel der Vergoldung, Bindemittel der Bemalung oder ob die Stangen abschließend mit einem Schutzüberzug versehen worden sind, ist wenig bekannt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Folgenden vier verschiedene Stangentuschen aus einer Referenzsammlung von Malkästen aus dem 19. Jahrhundert sowie eine moderne Stangentusche aus den 1990er Jahren aus Nara, Japan mittels ELISA auf Kollagen, Ovalbumin, Kasein und Pflanzengummen hin untersucht. Von den vier historischen Stangentuschen, weisen drei eine Vergoldung auf und eine Reste einer roten Bemalung. Alle besitzen einen mehr oder weniger starken Oberflächenglanz, was auf einen Schutzüberzug hindeutet und sie variieren im Grad ihrer Brüchigkeit (Schwundrisse). Die moderne Stangentusche hat keinerlei farbige Verzierung, noch zeigt sie einen erkennbaren Oberflächenglanz.

Proben von etwa 100 µg wurden jeweils vom Kern (Kernprobe) sowie der dekorativ gestalteten Oberfläche (Schabeprobe) jeder Stangentusche genommen, in 500 µl Carbonatpuffer überführt, extrahiert und Verdünnungsreihen (1:2, 1:5, 1:10, 1:100) erstellt. Die Verdünnungsstufen der Kern- und Schabeprobe jeder Stange wurden nebeneinander in jeweils zwei Parallelen auf einer Mikrotiterplatte getestet. Sollte das Bindemittel der Stangentusche (Kernprobe) sich von dem der Vergoldung, Bemalung oder Überzug (Schabeprobe) unterscheiden - vorausgesetzt es handelt sich ebenfalls um ein Protein - wird das ELISA Ergebnis der Schabeprobe eine Kombination von mindestens zwei Proteinen sein. Aussagen über andere, nicht getestete Proteine oder nicht-proteinische Bindemittel sowie Zusatzstoffe können nicht gemacht und diese daher auch nicht ausgeschlossen werden. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12). Die ELISA Ergebnisse in Tabelle 21 belegen, dass unabhängig von der Entnahmestelle in allen Proben eindeutig Kollagen nachgewiesen wurde, was Kollagen als primäres Bindemittel für die Stangentuschen bestätigt. Während in sämtlichen Kernproben lediglich ein Protein identifiziert wurde, konnte mit Ausnahme der modernen Stangentusche (#2) in allen Schabeproben mindestens zwei, im Falle der W. Reeves & Sons Tusche #3 sogar drei verschiedene Bindemittel detektiert werden. Neben Kollagen wurde in der Schabeprobe #1 (Winsor & Newton) Kasein, in Probe #3 (W. Reeves & Sons) Kasein und Gummen, in Probe #4 (W. Reeves

& Sons) Kasein und in Probe #5 (T.J. Morris) Gummen nachgewiesen. In der Schabeprobe der modernen Stangentusche (#2) wurde lediglich Kollagen detektiert. Ovalbumin wurde hingegen in keiner der Proben gefunden.

**Tabelle 21:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung von fünf Stangentuschen; jeweils eine Kernprobe und eine Schabeprobe von der Oberfläche. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 100 µg/ 500 µg. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2).

OD <sub>414nm</sub>						
Nr	Objekt/ Herkunft	Entnahmestelle	Oval. (#AB1225)	Kasein (#RCAS-10A)	Koll. (#ab34710)	Gummen (#JIM13)
#1	Winsor & Newton (ca. 1850)	#1.1 Oberfläche, Vergoldung	-	+++	+++	-
		#1.2 Kernprobe	-	-	+++	-
#2	Moderne Stangentusche, Japan (~1990)	#2.1 Oberfläche	-	-	++	-
		#2.2 Kernprobe	-	-	+++	-
#3	W. Reeves & Sons	#3.1 Oberfläche, rote Farbe	-	++	+++	++
		#3.2 Kernprobe	-	-	+++	-
#4	W. Reeves & Sons	#4.1 Oberfläche, Vergoldung	-	+	+++	-
		#4.2 Kernprobe	-	-	+++	-
#5	T.J. Morris	#5.1 Oberfläche, Vergoldung	-	-	+++	++
		#5.2 Kernprobe	-	-	+++	-

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>

Nicht abschließend zu klären ist, ob es sich bei dem nachgewiesenen Kasein und Gummen um das Bindemittel der dekorativen Applikationen oder doch um einen Überzug handelt. Insbesondere bei Kasein ist denkbar, dass es sich um einen Schutzüberzug handelt. Es ist weniger wasser- und wärmeempfindlich als Kollagen, so dass die Verzierungen bei Gebrauch der Stange nicht so leicht abgerieben werden oder die Stange klebrig wird. Gummen hingegen sind sehr wasserempfindlich, und daher weniger als Schutzüberzug geeignet. Im Fall der Stangentusche #3 (W. Reeves & Sons) ist es möglich, dass die Gummen als Bindemittel der roten Farbe verwendet worden sind und Kasein als Schutzüberzug darüber gelegt worden ist. Grundsätzlich ist aber auch der wiederholte Auftrag eines Schutzüberzuges möglich, da dieser sich bei

Gebrauch stetig abnutzt. Eine Kreuzreaktion von #JIM13, dem Antikörper gegen Arabinogalactan-Proteine, mit Bestandteilen des verbranntes Holzes kann aber ausgeschlossen werden, da die Kernproben alle negativ auf den Gummennachweis waren (→ Kap. 5.10.4).

Bei den Analysen von fernöstlichen Tuschemalereien und Kalligrafien gilt daher zu beachten, dass es beim Abrieb der Farbe auf dem Reibstein zu einer Vermischung der Proteine und Gummen kommt und diese dann auch am Kunstwerk nachweisbar sind. Das könnte zu Fehlinterpretationen und Spekulationen über Bindemittelrezepturen der Stangentuschen oder spätere Einbringung im Zuge von Restaurierungsmaßnahmen führen und sollte daher stets berücksichtigt werden.

#### **7.4 Polychrome Holzskulptur (Italien, 13. Jh.) – Untersuchung der Binde- und Anlegemittel von Grundierung und Metallaufgaben**

Die Anwendung der ELISA Methode hat sich als äußerst hilfreich bei der Untersuchung von *Saint John* (Heiliger Johannes), einer gefassten Holzskulptur aus der Cloisters Sammlung in New York herausgestellt. Die italienische Holzskulptur stammt aus dem späten 13. Jahrhundert und wurde im Zuge der Erstellung eines Sammlungskatalogs eingehend untersucht (Castelnuovo-Tedesco & Soutanian 2010). Das Holz ist mit einer Kreidegrundierung versehen und dann farbig gefasst (Abbildung 10). Das Gewand ist mit Zinnfolie verziert, die mit mehreren Schichten einer Öl-Harz Lasur versehen ist. Blattmetalle können u.a. entweder mit einer zusätzlichen Bolus Schicht oder direkt auf die Grundierung mit tierischem Leim oder Eiklar appliziert werden (Nadolny 2006).

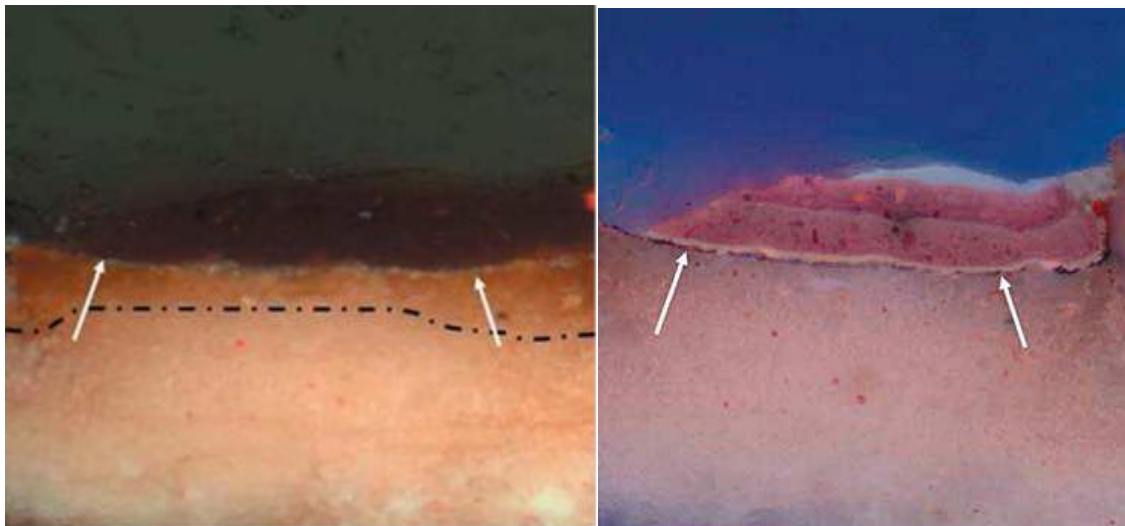


**Abbildung 10:** *Saint John* (MMA, #25.120.215), gefasste Holzskulptur, Italien, spätes 13. Jh. (146,1 x 38,4 x 8,3 cm). The Metropolitan Museum of Art, The Cloisters Collection.



Abbildung 11 zeigt einen Anschlag einer Gewandprobe im sichtbaren (VIS) und ultravioletten (UV) Licht. Im sichtbaren Licht (links) ist unterhalb der Metallfolie eine leichte Sättigung der Kreidegrundierung (gestrichelte schwarze Linie) zu erkennen, was auf die Verwendung eines Anlegemittels hindeutet. Die Metallfolie ist durch die weißen Pfeile gekennzeichnet und besser unter UV (rechts) erkennbar.

**Abbildung 11:** Anschlag einer Gewandprobe von *Saint John* (MMA, #25.120.215) im sichtbaren (links) und UV-Licht (rechts).

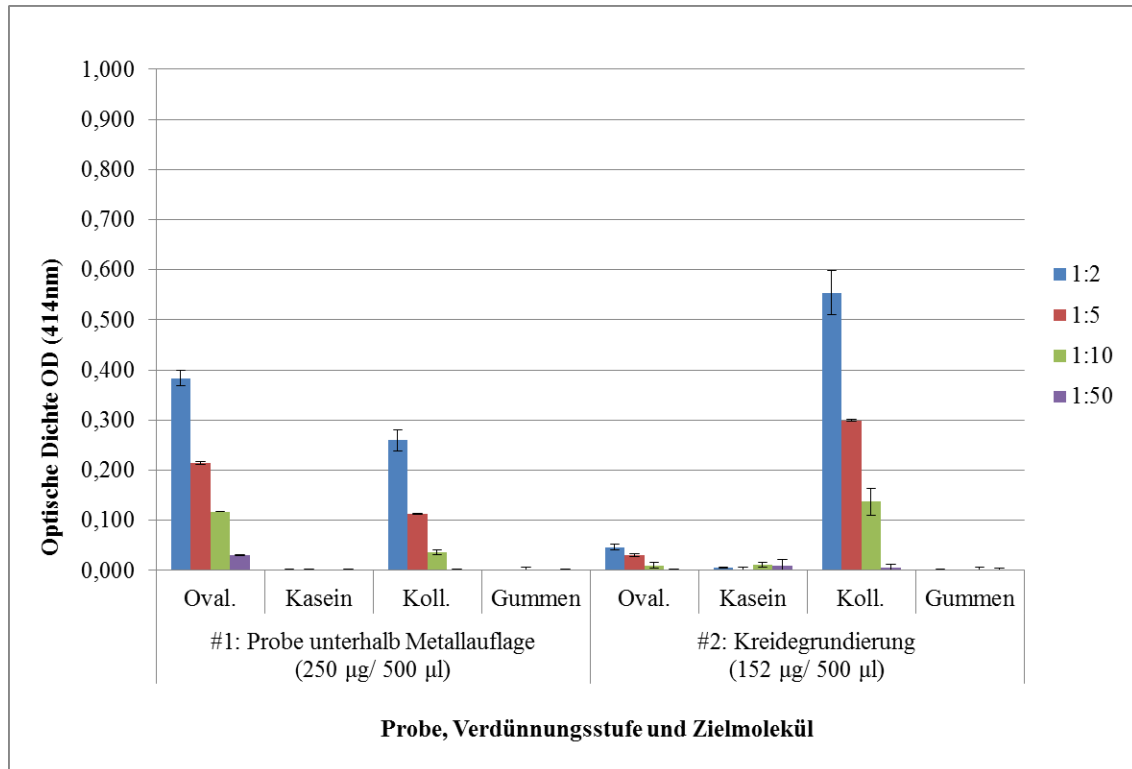


(ATR)-FTIR Analysen (durchgeführt am Metropolitan Museum of Art; *Department of Scientific Research*) hatten die Anwesenheit von Protein in den Bereichen der Grundierung und unterhalb der Metallfolie bestätigt, ergaben aber keine weitere Spezifizierung. Jedoch konnten diese Analysen Harze und Öle als Anlegemittel ausschließen (Castelnuovo-Tedesco & Soultanian 2010). ELISA Analysen wurden zur Identifizierung des Proteins herangezogen und sollten Aufschluss darüber geben, ob das Bindemittel der Grundierung identisch mit dem Anlegemittel der Zinnfolie ist.

Die Schwierigkeit bei mehrschichtigen Proben ist Migration/Penetration der Materialien ineinander. Eine klare Trennung der Schichten ist in der Regel nicht möglich. Daher wurden an diesem Objekt zwei Proben, eine direkt unterhalb der Metallfolie (#1) und eine von der Grundierung (#2) genommen (Abbildung 11). Beide Proben wurden im ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen und Gummen getestet. Die Durchführung erfolgte nach der optimierten ELISA Methode (→ Kap. 5.12). Sollte das Anlegemittel also nicht identisch mit dem Bindemittel der Grundierung sein, ist die Probe eine Mischung aus mindestens zwei Proteinen.

Das ELISA Ergebnis in Diagramm 14 zeigt zweifelsfrei, dass Binde- und Anlegemittel unterschiedlich sind. In der Kreidegrundierung (#2) konnte eindeutig Kollagen nachgewiesen werden, während in der Probe unterhalb der Metallfolie (#1) neben Kollagen auch Ovalbumin detektiert wurde. Es wurden weder Kasein noch Gummen nachgewiesen. Das lässt den Schluss zu, dass die Grundierung mit Kollagen und die Metallaufgabe mit Eiklar (Ovalbumin) gebunden ist (Arslanoglu & Schultz 2009; Arslanoglu et al. 2010a; Arslanoglu et al. 2010b). Die Anwendung von Eiklar als Anlegemittel für Vergoldungen wird in vielen Quellschriften ohne große Abweichung erwähnt (u.a. bei Plinius (Buch XXXIII, Kap. 20: 64 (König 1989); Theophilus Presbyter, Buch 1, Kap. XXIII (Brepohl 1999), Cennino Cennini, Kap. 134 und 172 (Verkade 1916) und findet somit Bestätigung.

**Diagramm 14:** ELISA Ergebnis zur Untersuchung der Binde- und Anlegemittel an Proben von *Saint John* (MMA, #25.120.215) einer gefassten Holzskulptur aus dem 13. Jh.. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) siehe Diagramm. (n = 2). Cut-off 0,05 OD<sub>414nm</sub>.



## 7.5 Polychrome hölzerne Raumaustattung aus Syrien - Systematische Untersuchung der Bindemittel

Die ELISA Methode wurde zur Untersuchung der Bindemittel am so genannten *Nūr ad-Dīn Room*, einer bemalten, mit Blattmetallen belegten, hölzernen Raumaustattung aus dem frühen 18. Jahrhundert, herangezogen (Abbildung 12). Dieses Empfangszimmer ist heute unter seinem neuen Namen *Damascus Room* im Metropolitan Museum of Art in New York ausgestellt und ist eine der ältesten erhaltenen Wand- und Deckenvertäfelungen aus Damaskus (inschriftlich datiert 1119 H = 1707-08 AD). Es hat beachtliche Ausmaße von ca. 5 m x 8 m Länge und 6,70 m Höhe, was vermuten lässt, dass es aus einem der größeren, bedeutenderen Häuser in Damaskus stammt. Aufgrund von Galerie-Umbaumaßnahmen am Metropolitan Museum of Art wurde das Zimmer 2008 demontiert und konnte so zwischen 2008-2010 von einem interdisziplinären Team an Restauratoren, Kunsthistorikern und Naturwissenschaftlern intensiv kunsttechnologisch und naturwissenschaftlich untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes sind mit Abstand die wohl umfassendsten Untersuchungen zu

einem polychromen syrisch-osmanischen Interieur. In Anbetracht der Größe und Komplexität des Objektes muss an dieser Stelle auf die Publikationen von Rizzo et al. (2010), Schultz et al. (2010), Arslanoglu & Schultz (2009) sowie Scharrahs (2011) verwiesen werden. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zu den untersuchten Malmaterialien und Blattmetallen, die mit Hilfe einer breiten Palette an Untersuchungsmethoden (u.a. PLM, FTIR, SEM-EDS, GC/MS, Py-GC/MS, Raman, SERS, ELISA, HPLC) bestimmt wurden, ist bei Baumeister et al. (2010) publiziert und dem → Anhang B3.3 der vorliegenden Arbeit zu entnehmen.

**Abbildung 12:** Gesamtaufnahme des *Damascus Room* (MMA #1970.170). The Metropolitan Museum of Art.



Dominierendes Gestaltungsmerkmal der syrischen Holzvertäfelungen des 17.-19. Jahrhunderts sind die reliefartig aufgetragenen Ornamente und Muster auf der Oberfläche, die in Europa Pastiglia und in Syrien *ʿajami* genannt werden (Scharrahs

2011). In der Regel wird das Holz mit einer Gipsgrundierung überzogen, auf die die Ornamente, florale Muster oder poetischen Inschriften in arabischer Sprache mit Schablonen und Kohlepausbeuteln übertragen werden. Die so sichtbar gemachten Umrisslinien werden dann mit einer dickflüssigen Gips-Bindemittel-Masse reliefartig ausgefüllt, bevor sie bemalt, mit unterschiedlichen Blattmetallen und transparenten, farbig getönten Überzügen verziert werden. *ʿAjami* bezeichnet nicht nur die Technik selber, sondern auch die Ornamente und die holzgetäfelten Räume als Ganzes (Scharrahs 2008a). Die hölzernen Elemente des *Damascus Room* sind in *ʿajami* Technik und folgen dem beschriebenen Aufbau. Da die alten Handwerkstechniken mündlich in Familienbetrieben weiter gegeben wurden, gibt es in Syrien kaum schriftliche Quellen, wie sie beispielsweise in Form von Malereitraktaten in Europa überliefert sind. Die wenigen bekannten Schriften legen nahe, dass tierischer Leim, Ei und Pflanzengummen als mögliche Bindemittel für die Pastiglia und die verschiedenen Farben in Frage kommen (Dickson & Welch 1981; Daskalakis-Mathews 1997). Proteine konnten an wenigen Einzelproben verschiedener syrischer Raumausstattungen oftmals anhand von Anfärbungen oder FTIR Analysen nachgewiesen werden, wohingegen Pflanzengummen bisher noch nicht identifiziert wurden (Ilisius & Riederer 1996; Nippa et al. 1998; Scharrahs 2008b-c; Kovács Mravik 2010; Trevathian & Thiagarajah 2010).

FTIR Analysen (durchgeführt am Metropolitan Museum of Art, *Department of Scientific Research*) an Proben des *Damascus Room* zeigten, neben anderen Komponenten, ebenfalls Protein als Bindemittel in den meisten Proben; eine weitere Spezifizierung war jedoch nicht möglich. Elf Fassungsproben von der Holzgrundierung über die Grundierung sowie Pastiglia bis hin zu den einzelnen Farben wurden mittels ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen und Pflanzengummen hin untersucht. Da der *Damascus Room* durch die Deinstallation in seine Einzelteile zerlegt war, bot sich die einmalige Gelegenheit, die Proben nach Möglichkeit an verdeckten, geschützten Bereichen wie beispielsweise an Rändern, Rückseiten oder zwischen Verbindungen zu nehmen, um möglichst unverfälschtes Probenmaterial zu bekommen. Detailaufnahmen der Probeentnahmestellen sind dem → Anhang B3.2 zu entnehmen. Die zu untersuchenden Proben bestanden in der Regel aus mehreren Farbschichten und konnten auch nicht weiter getrennt werden. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12). Die Proben (zwischen 50–170 µg) wurden in 500 µl Carbonatpuffer extrahiert, Verdünnungsreihen erstellt (1:2, 1:5, 1:10, 1:100) und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22:** ELISA Ergebnisse der Fassungsproben vom *Damascus Room* (MMA #1970.170). Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 50- 70 µg/ 500 µl. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2).

Probe#	Beschreibung	OD <sub>414nm</sub>			
		Oval. (#AB1225)	Kasein (#RCAS-10A)	Koll. (#ab34710)	Gummen (#JIM13)
E9a_01	Holzgrundierung, Vorleimung	-	-	++	-
CT3E_05	Grundierungsschicht (Calciumsulfat)	-	-	++	n/d
CA5_03	'ajami/Pastiglia (Calciumsulfat) Schicht	+ (?)	-	++	-
N7_01	Blaue (Smalte) und weiße (Bleiweiß) Farbschicht	+++	-	-	-
CA5_01	Blaue (Smalte) Farbschicht	++	-	-	-
CA5_02	Blaue (Smalte), rosa und weiße (organischer roter Farblack und Bleiweiß) Farbschicht	++	-	+	-
S7- 9CoU_01	Blaue (Smalte) Farbschicht von einem geschützten Bereich auf der Brettrückseite	++	-	-	-
NAr_04	Rote (Mennige) Farbschicht	++	-	-	n/d
CT3E_03	Rosa (organischer roter Farblack/Bleiweiß) Farbschicht	+++	-	-	n/d
N1- 3CoL_03	Grüne (Grünspan/Bleiweiß) Farbschicht	++	-	-	n/d
SAr_01	Gelbe (Auripigment) Farbschicht	++	-	-	-

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>
n/d	Nicht durchgeführt

Kollagen wurde als Bindemittel für die Vorleimung des Holzes (#E9a\_01), die Gipsgrundierung (#CT3E\_05) sowie die Pastiglia-Masse (#CA5\_03) eindeutig mittels ELISA identifiziert. Die Spuren von Ovalbumin, die in der Pastiglia Probe #CA5\_03 detektiert wurden, resultieren aus der Migration/Penetration der darüber liegenden eihaltigen Farbschichten.

Ei (Ovalbumin) wurde durchgängig als Bindemittel der rosa (CT3E\_03), roten (NAr\_04), gelben (#SAr\_01), grünen (N1-3CoL\_03) und blauen (#CA5\_01, #CA5\_02, #N7\_01, #S7-9CoU\_01) Farben nachgewiesen. Das bedeutet, dass Smalte, Mennige, Auripigment, grüne Ausmischung aus Grünspan und Bleiweiß sowie rosa Ausmischung aus organischem rotem Farblack und Bleiweiß mit Ei gebunden sind. In der mehrschichtigen Probe #CA5\_02 wurde darüber hinaus Kollagen nachgewiesen, was auf Migration/Penetration der angrenzenden Schichten zurückzuführen ist. Weder Kasein noch Pflanzengummen wurden in den elf Proben detektiert.

Die Identifizierung von Ei als Bindemittel in allen Farbfassungen lieferte wichtige neue Erkenntnisse. Die mögliche Verwendung von Ei als Bindemittel in syrischen Interieurs wurde mehrfach vermutet (Duda 1971; Scharrahs 2008b) und fand auch als Alternative zu Pflanzengummen in historischen Abhandlungen Erwähnung (Minorsky 1959); allerdings fehlte bisher jeglicher analytischer Nachweis. Pflanzengummen konnte hingegen erstmalig an verschiedenen später datierten syrischen Raumausstattungen mittels der in der vorliegenden Arbeit entwickelten ELISA Methode eindeutig nachgewiesen werden (Scharrahs et al. 2013).

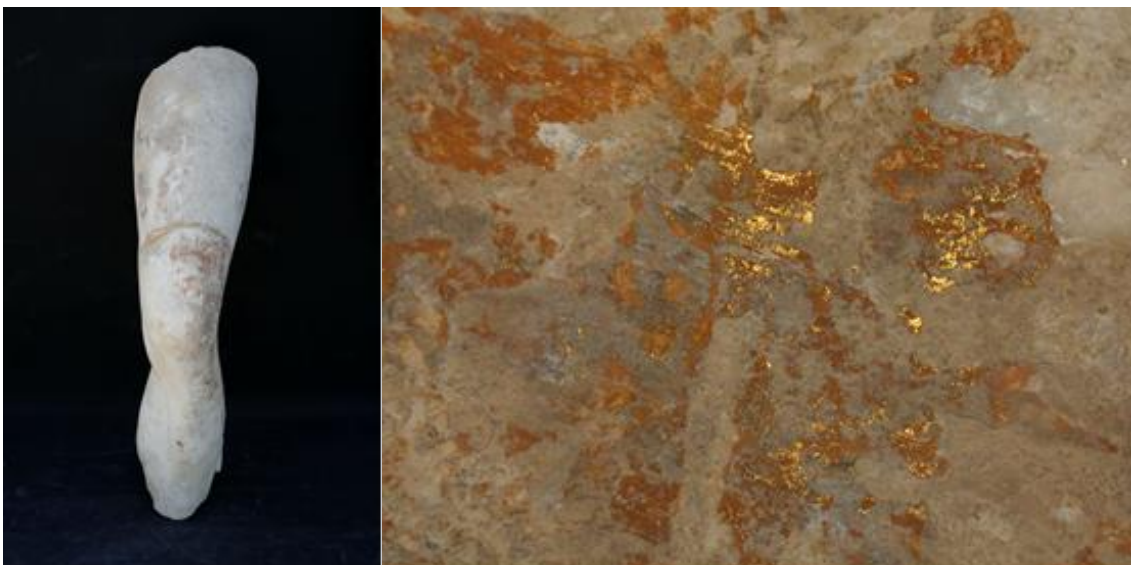
Eine Differenzierung, ob Eiklar, Eigelb oder eine Mischung aus beiden verwendet worden ist, kann mittels des eingesetzten Antikörpers nicht vorgenommen werden (→ Kap. 5.10.1). Der positive ELISA Nachweis bestätigt lediglich die Anwendung von Ei, aber nicht welcher Teil, Mischungsverhältnis oder weitere nicht-proteinische Zusätze. FTIR und ATR-FTIR, sowie Pyrolyse-GC/MS Analysen einiger Proben aus dem *Damascus Room* deuten auf die Verwendung einer Öl-Protein-Emulsion mit einem trocknenden Öl hin, wie es typisch für Eigelb ist (Rizzo et al. 2010). Durch Untersuchungen mittels MALDI-mass fingerprinting (MALDI-MFP) wurde Eigelb in den roten, rosa, gelben, grünen und blauen Farben nachgewiesen. Anteile von Eiklar wurden lediglich in der rosa und gelben Farbe detektiert (Kirby et al. 2010, 2011). Diese Ergebnisse bestätigen Ei als Bindemittel für die untersuchten Farben und deuten auf die überwiegende Verwendung von Eigelb als Medium hin. Allerdings sind diese Ergebnisse im Einzelfall aus maltechnischer Sicht kritisch zu betrachten. Smalte beispielsweise wird beim Vermalen mit Eigelb dunkel (bräunlich), was laut Scharrahs (2011) nicht dem Erscheinungsbild der in Damaskus vorgefundenen originalen Oberflächen entspricht, wo das Blau eine strahlende Intensität aufweist. Eine abschließende Klärung der Frage ist daher bisher nicht möglich.

## 7.6 Fragmente polychromer antiker Steinstatuen – Untersuchung der Bindemittel

Die antike Stadt Aphrodisias ist eine der bedeutendsten archäologischen Stätten der griechischen und römischen Zeit in der Türkei. Sie wurde nach Aphrodite, der griechischen Göttin der Liebe benannt und liegt in der Nähe des heutigen Ortes Geyre. Die Blütezeit von Aphrodisias lag zwischen dem 1. Jahrhundert vor Chr. bis ins 6. Jahrhundert nach Chr. Heute haben Ausgrabungen zahlreiche feine Marmorstatuen und andere Artefakte freigelegt, von denen hier zwei Beispiele vorgestellt werden (Abbildung 13-14).

Das erste Beispiel ist ein Beinfragment (#76-101) einer überlebensgroßen, männlichen Statue, wahrscheinlich eines römischen Kaisers, welches sich verbaut (Sekundärverwendung als Füllmaterial) in der spätantiken, südlichen Stadtmauer wiederfand (mündl. Kommunikation Prof. Dr. Mark Abbe, University of Georgia). Die Marmoroberfläche zeigt Reste von Polychromie. Über einer Grundierung - vermutlich Calciumcarbonat - befindet sich eine Bolus-ähnliche rote Fassungsschicht, die abschließend mit Blattmetall vergoldet wurde (Abbildung 13).

**Abbildung 13:** Beinfragment einer überlebensgroßen, männlichen Marmorstatue (#76-101) (links). Detail der Reste von Polychromie mit Vergoldung (rechts).



Das zweite Beispiel ist ein Gewandfragment einer überlebensgroßen Marmorstatue und wurde 1975 ebenfalls in der südlichen, spätantiken Stadtmauer wiederverbaut, freigelegt. Auch hier sind Reste von Polychromie deutlich erkennbar (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Gewandfragment einer überlebensgroßen Marmorstatue (#75-290). Vorderseite (rechts), Rückseite (links). Reste roter Polychromie erkennbar.



Seit langem ist bekannt, dass Kunstwerke aus der Antike farbig gefasst waren, aber durch die fehlende Anschauung wird diese Kenntnis oft verdrängt. Noch heute prägt das Weiß der Statuen und Architekturelemente beim Rundgang durch Antikensammlungen das Auge des Betrachters. Oft sind nur geringe Spuren der einst reichen Farbfassung bis heute erhalten. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass das organische Bindemittel der Farben über die Jahrtausende weitestgehend abgebaut worden ist, so dass Malschichten zerfallen und nur wenige Pigmentpartikel in den Tiefen der Marmoroberfläche zurückblieben. Dennoch haben zerstörungsarme sowie –freie Untersuchungsmethoden wie beispielsweise Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, SEM/EDX, UV/VIS Absorptionsspektroskopie, FTIR und HPLC in der Vergangenheit zur Charakterisierung antiker Farbmittel beigetragen (Santamaria & Morresi 2007; Piening 2007; Piening & Stege 2007; Stege et al. 2007). Die Palette der bisher identifizierten Farbmitteln umfasst vor allem rote und braunrote Farberden (Eisenoxidfarben), gelbe- und gelbbraune Ocker, Arsenverbindungen wie Realgar und Auripigment, Azurit, Malachit, ägyptisch Blau, Bleiweiß, Ruß und Krapplack (Brinkmann 2007). An Haaren, Rüstungen und Waffen finden sich häufig Reste von Blattvergoldungen und Auflagen von silberfarbenen Zinnfolien. Die Identifizierung der organischen Bindemittel ist ohne Probenahme nicht möglich. Neben Ei- und

Kaseintempera wird von der sogenannten Enkaustik einer Malerei mit heißem Wachs berichtet (Brinkmann 2007). Bisher konnte die Verwendung von Proteinen nur durch wenige erfolgreiche Analysen bestätigt werden. Stege et al. (2007) bestimmten mittels Ionenaustauschchromatographie Ei als Bindemittel der Farbfassung einer Marmorbüste des Caligula (~ 40 n. Chr.) aus der Ny Carlsberg Glyptotek in Kopenhagen. Die Untersuchungen von Santamaria & Morresi (2007) an Fassungsproben einer Augustus Statue aus den Vatikanischen Museen in Rom ließen mittels Mikro-FTIR auf ein Phosphoprotein (Kasein) schließen.

Die folgenden Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob die hoch empfindliche ELISA Technik zum Nachweis stark abgebauter Proteine eingesetzt werden kann. Von dem Beinfragment #76-101 wurden zwei Proben der Vergoldung samt der Grundierung/Bolus entnommen und vom Gewandfragment #75-290 eine Probe der roten Farbe von der Rückseite. Alle drei Proben wurden im ELISA auf Ovalbumin, Kasein, Kollagen und Pflanzengummen getestet. Ausschlaggebend für die Untersuchung waren der gute Erhaltungszustand der Vergoldung und das hinreichend vorhandene Probenmaterial. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12). Die Proben wurden in 500 µl Carbonatpuffer überführt, extrahiert, Verdünnungsreihen erstellt (1:2, 1:5, 1:10, 1:100) und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung zu polychrome gefassten antiken Marmorstatuen. Beinfragment #76-101, Gewandfragment #75-290. Probenansätze sind jeweils angegeben. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2 (n = 2).

Probe#	Ansatz	OD <sub>414nm</sub>			
		Ovalbumin (#AB1225)	Kasein (#RCAS-10A)	Kollagen (#ab34710)	Gummen (#JIM13)
#76-101.1	217 µg/ 500 µl	+	-	-	-
#76-101.2	643 µg/ 500 µl	-	-	-	-
#75-290	326 µg/ 500 µl	-	-	-	-

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>

Das Ergebnis der Probe #76-101.1 weist eindeutig die Anwesenheit von Ovalbumin auf. Andere Proteine oder Pflanzengummen wurden nicht detektiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Passage aus Plinius' *Naturalis historia* (XXXII, Kap. 20: 64) im 1. Jh. n.Chr., wo die Verwendung von Eiklar als Anlegemittel für Blattgold auf

Marmorstatuen Erwähnung findet (König 1989). Trotz dreifacher Probenmenge konnten bei Probe #76-101.2 vom gleichen Objekt weder Ovalbumin noch ein anderes Protein oder Pflanzengummen nachgewiesen werden. In der Probe #75-290 vom Gewandfragment wurden ebenfalls keine Proteine oder Pflanzengummen detektiert.

Gründe für das unterschiedliche Ergebnis der Proben #76-101.1 und #76-101.2 vom selben Objekt sind vielfältig, aber nicht abschließend zu klären. Auch wenn die Proben dicht beieinander genommen worden sind, sind sie nicht identisch. Die Verteilung des Bindemittels kann in einem porösen System sehr unterschiedlich sein (Beutel 2000), was zudem auch den Erhaltungszustand des Proteins beeinflussen kann. Kontaminationen durch spätere Konservierungsmaßnahmen bei der Ausgrabung und/oder später können nicht ausgeschlossen werden. Unklar ist auch, welchen Einfluss die umliegenden Materialien bei der Wiederverbauung auf das Fragment hatten. Daher sollten die Materialien, die das Objekt bei der Freilegung umgeben haben ebenfalls untersucht werden, um weitere Kontaminationen ausschließen zu können. Trotz erhöhter Probenmengen ist anzunehmen, dass unterhalb der Nachweisgrenze gearbeitet worden ist, da es sich um extrem abgebautes, verkrustetes Probenmaterial handelte. Der Nachweis von Ovalbumin in Probe #76-101.1 kann nur unter Vorbehalt als positiv gewertet werden, da das Ergebnis nicht reproduzierbar war.

Anhand von drei ausgewählten Proben können keine belastbaren Erkenntnisse für die Anwendbarkeit der ELISA Technik zum Nachweis von proteinhaltigen Bindemitteln antiker Kunstobjekte gewonnen werden. Dennoch, wie in den Vorversuchen belegt (→ Kap. 6.2-6.3), lässt sich daraus ableiten, dass Proteindegradation, Bindemittelverteilung sowie Probenmenge einen Einfluss auf die ELISA Technik haben und dadurch die Reproduzierbarkeit erschweren.

## **7.7 Untersuchung zu Fixativen an Pastellgemälden (18. Jh.)**

Die ELISA Technik wurde ebenfalls zur Untersuchung von Fixativen an drei Pastellgemälden von Jean Etienne Liotard (1702-1789) aus der Sammlung des Rijksmuseums Amsterdam herangezogen (Abbildung 15). Im Zuge eines großen Konservierungsprojektes von Pastellgemälden am Rijksmuseum (2007-2009) wurde eine Vielzahl von Pastellen aus dem 18. Jahrhundert eingehend untersucht und dafür aus ihrer Rahmung entfernt; dies bot die Gelegenheit Mikroproben zu nehmen (Tabelle 24).

**Abbildung 15:** Pastellgemälde von Jean Etienne Liotard: *La Liseuse* (links) und *The three Graces* (rechts); *The view of Geneve* (unten). Rijksmuseum Amsterdam.



Bei der Pastellmalerei werden Pigmente auf einen mehr oder weniger rauen Malgrund aufgetragen, wo sie allein durch Adhäsion haften bleiben (Doerner 1985). Die Pigmente können als Pulver direkt oder in Form von Pastellstiften aufgetragen und mit den Fingern oder speziellen Pinseln verwischt werden. Dabei lassen sich die Farbtöne hervorragend mischen, so dass feinste Farbnuance und fließende Übergänge geschaffen werden. Bindemittel werden lediglich verwendet, um die Pigmente in Stiffform zu bringen und somit das Malen zu erleichtern (Wehlte 2005). In der Literatur finden vor

allem geringe Mengen wässriger Bindemittel (2-3 %) wie Tragant, Gummiarabikum, Leim, Gelatine, Seifenwasser, abgerahmte Milch, Wachsemulsionen, sowie Zusätze von Honig und Kandiszucker Erwähnung (Burns 2008; Doerner 1985).

Diese Maltechnik zeichnet sich neben der schnellen Ausführbarkeit vor allem durch die Farbfresche aus, da es zu keinen oder nur sehr geringen Beeinträchtigungen durch Bindemittelveränderungen im Trocknungs- oder Alterungsprozeß kommt. Allerdings ist die Haftung der Pigmente auf dem Malgrund schwach, was das Pastell sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen (Vibrationen, Luftbewegung, mechanische Beanspruchung) macht und weshalb in manchen Fällen ein Fixativ zum Schutz aufgetragen wird. Die Schwierigkeit dabei ist, dass sich durch das Fixativ die optische Wirkung der Farbschichten verändert. Sie werden dunkler und der weiche, fließende Charakter geht verloren. Oft entsteht ein nicht gewolltes Tiefenlicht, weshalb die Anwendung immer wieder kontrovers diskutiert wird (Burns 2008). Rezepturen für Fixative sind vielfältig und können u.a. aus schwachen Harzlösungen oder auch auf wässriger Basis mit Proteinen bestehen. Ein häufig verwendetes Fixativ im 18. Jahrhundert war „Fischleim gemischt mit gleichen Teilen Wasser und Weingeist“ (Shelley 2005). Durch den Zusatz des alkoholischen Lösemittels wird die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt; zudem ist diese Mischung schneller flüchtig als reines Wasser. Offenbar bezieht Liotard sich in mehreren Schreiben auf dieses Rezept, ob er allerdings davon Gebrauch gemacht hat, geht daraus nicht eindeutig hervor (Trivas 1941; Anderson 1994). Daher wurden drei Proben von Liotards „*La Liseuse*“, „*The three Graces*“ und „*The View of Geneve*“ zur Untersuchung des Fixativs mittels ELISA auf Kollagen (unspezifisch), Fisch- und Störkollagen getestet. Die drei Proben wurden in 300 µl Carbonatpuffer extrahiert, Verdünnungsreihen (1:2, 1:5, 1:10) erstellt und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12), die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Weder Stör- noch Fischkollagen oder überhaupt Kollagen waren in den Originalproben nachweisbar. Mehrere Interpretationsmöglichkeiten bestehen: Liotard hat kein Fixativ verwendet, das Fixativ basiert nicht auf Kollagen oder anderen Proteinen, das Protein ist zu degradiert und/oder liegt unterhalb der Nachweisgrenzen.

**Tabelle 24:** Liste der untersuchten Objekte von J.E. Liotard sowie die ELISA Ergebnisse der drei untersuchten Proben. \*teilweise mit Pergamentfragmenten. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) X µg (siehe Tabelle)/ 300 µl. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2).

Objekt	Probenbeschreibung, Entnahmestelle	Proben- menge*	OD <sub>414nm</sub>		
			Koll. (unspez.) (#ab34710)	Fisch- Koll. (#T89171R)	Stör- Koll. (AIS2006)
La Liseuse (SK-A-228)	Braune Pastellpartikel, linke untere Bildseite	39,7 µg	-	-	-
The Three Graces (SK-A-242)	Grüne Pastellpartikel, rechte untere Bildseite	5,5 µg	-	-	-
The View of Geneve (SK-A-1197)	Braune Pastellpartikel, linke untere Bildseite	10,4 µg	-	-	-

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>

Um eine bessere Einschätzung der Ergebnisse zu bekommen sowie den grundsätzlichen Einsatz der ELISA Methode zur Identifizierung von Fixativen zu überprüfen, wurden Referenzproben mit und ohne Pastellauftrag und Fixativ auf Pergament hergestellt. Diese wurden anschließend ungealtert und künstlich gealtert (15 Tage bei 80 °C und 65 % RH) mittels ELISA auf Kollagen, Fisch- und Störkollagen untersucht (→ Anhang B2.5). Das Fixativ wurde wie folgt hergestellt: 0,5 % (w/v) Störleim in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (1:1) und im Spritzverfahren aufgetragen. Die ELISA Versuche wurden mehrfach mit zunehmenden Probenmengen wiederholt, um Nachweisgrenzen festlegen zu können. Die Trennung der Pastellfarbe vom Trägermaterial erwies sich als schwierig, weshalb die Proben stets auch größere Mengen von Pergament enthielten. Ebenfalls in die Untersuchung der Referenzproben mit einbezogen, wurden die Ausgangsmaterialien Pergament und Störblase sowie das reine, getrocknete Fixativ (#A-D). Die Proben wurden in Carbonatpuffer extrahiert (Probenansätze siehe Tabelle 25), Verdünnungsreihen (#A-B: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, alle anderen 1:2, 1:5, 1:100) erstellt und in jeweils zwei Parallelen getestet. Die ELISA Durchführung erfolgte nach der optimierten Methode (→ Kap. 5.12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25:** ELISA Ergebnisse der Ausgangsmaterialien und Referenzproben für Fixative an Pastellgemälden. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) sind jeweils aufgeführt. Dargestellt ist jeweils die niedrigste Verdünnungsstufe. (n = 2). Graue Markierung = künstlich gealterte Proben.

Nr.	Ausgangsmaterialien und Referenzproben	Probenansatz*	OD <sub>414nm</sub>		
			Kollagen (unspez.) (#ab34710)	Fisch-Kollagen (#T89171R)	Stör-Kollagen (AIS2006)
#A	Störblase	1 mg/ ml	+	++	++
#B	Fixativ, gefiltert und getrocknet	1 mg/ ml	+	++	++
#C	Kalbspergament (Z.H.de Groot)	2,5 mg/ 350 µl	+	-	-
#D	Kalbspergament (Jansen, Wijsmuller & Beuns B.V.)	2,5 mg/ 350 µl	+++	-	-
#1	Kalbspergament, Störleim-Fixativ, ungealtert	50 µg/ 450 µl	-	-	-
		567 µg/ 450 µl	+	-	-
		2,3 mg/ 350 µl	+++	-	-
#2	Kalbspergament mit Pastell, Störleim-Fixativ, ungealtert	58 µg/ 450 µl	-	-	-
		143 µg/ 450 µl	-	-	-
		277 µg/ 450 µl	+	+ (?)	+ (?)
		2,5 mg/ 350 µl	++	++	++
#3	Ziegenpergament, Störleim-Fixativ, künstlich gealtert	67 µg/ 450 µl	-	-	-
		176 µg/ 450 µl	-	-	-
		2,6 mg/ 350 µl	+	-	-
#4	Kalbspergament mit Pastell, Störleim-Fixativ, künstlich gealtert	69 µg/ 450 µl	-	-	-
		136 µg/ 450 µl	-	-	-
		2,6 mg/ 350 µl	++	-	-
#5	Kalbspergament mit Pastell, kein Fixativ, künstlich gealtert	90 µg/ 450 µl	-	-	-
		129 µg/ 450 µl	-	-	-
		2,8 mg/ 350 µl	+++	-	-

\* Gewicht der Proben #1-5 bezieht sich auf die gesamte Probe inklusive Pergament, Pigment und Fixativ (falls aufgetragen)

#### Legende

-	Keine Detektion, < Cut off 0,05 OD <sub>414nm</sub>
+ (?)	Positiver Nachweis, sehr schwaches Signal, < 0,1 OD <sub>414nm</sub> , nicht eindeutig
+	Positiver Nachweis, schwaches Signal, < 0,3 OD <sub>414nm</sub>
++	Positiver Nachweis, mittleres Signal, > 0,3 OD <sub>414nm</sub>
+++	Positiver Nachweis, starkes Signal, > 0,9 OD <sub>414nm</sub>

Die ELISA Untersuchungen der Ausgangsmaterialien #A Störleim und #B getrocknetes Fixativ auf Störleimbasis reagieren mit allen drei Kollagenantikörpern positiv, wenn auch mit unterschiedlicher Signalstärke. Das Protein bleibt also nach der Zugabe von Ethanol ausreichend immunreaktiv, obwohl Ethanol zur Denaturierung von Proteinen

beiträgt. Die verschiedenen, unbehandelten Kalbspergamente #C und #D reagieren erwartungsgemäß nicht auf Fisch- und Störkollagen, sondern sind lediglich positiv auf unspezifisches Kollagen. Auffällig allerdings ist bei gleicher Probenmenge die unterschiedliche Signalstärke, was darauf schließen lässt, dass Kalb nicht gleich Kalb ist und/oder die Pergamente unterschiedlich hergestellt oder behandelt worden sind. Somit ist es nicht überraschend, dass es zwischen Pergamenten aus verschiedenen Tierarten (Probe# 1, 2, 4, 5 (Kalb) und Probe#3 (Ziege)) beim Nachweis von Kollagen ebenfalls zu hohe Signalschwankungen kommt (Tabelle 25). Diese Beobachtung ist nicht relevant für die hier untersuchte Fragestellung zu den Fixativen, doch verdeutlicht sie die Schwierigkeit der Pergamentidentifizierung mittels immunologischer Methoden und unterstreicht nochmals, dass erwartungsgemäß mit dem eingesetzten unspezifischen Kollagenantikörper (#ab34710) keine tierartspezifischen Aussagen (auch keine Tendenzen) gemacht werden können (→ Kap. 5.10.3).

Alle fünf Referenzproben (#1-5) waren bei der maximal eingesetzten Probenmenge – vereinzelt auch bei geringeren Mengen - positiv auf Kollagen (unspezifisch), was primär auf das Kollagen im Pergament innerhalb der Proben zurückzuführen ist. Fisch- und Störkollagen konnte nur in der ungealterten, pigmentierten Probe (#2) bei der größten, getesteten Probenmenge (2,5 mg) detektiert werden (Tabelle 25). In der ungealterten, nicht pigmentierten Probe (#1) hingegen sowie in den beiden gealterten Proben (#3-4) gelang der Nachweis bei ähnlicher Probenmenge nicht. Wie bereits erwähnt, bezieht sich das Gewicht der Probe nicht allein auf die Pastellkreide und das Fixativ, sondern auch auf die in der Probe enthaltenen Pergamentanteile.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Nachweis des Fixativs nur unter Verwendung enormer Probenmengen möglich ist. Darüber hinaus zeigt sich der deutliche Einfluss, den die Materialalterung auf die Immunreaktivität der Proteine hat, da der Nachweis nur an einer ungealterten Probe möglich war. Dass der Nachweis des Proteins an der ungealterten Probe ohne Pigmentierung (#1) ausblieb, ist vermutlich auf die geringere Oberfläche im Vergleich zu der Probe mit Pigmentierung (#2) zurückzuführen.

In Bezug auf die untersuchten Proben der Pastellgemälde von Liotard soll das folgende Rechenbeispiel versuchen zu erklären, warum eine Reaktion ausblieb und wie das Negativergebnis zu interpretieren ist. Für die ELISA Untersuchung der braunen Pastellprobe von Liotards „*The view of Geneve*“ (SK-A-1197) standen ~ 10 µg Probenmaterial zur Verfügung. Unter der Annahme, dass ein Fixativ verwendet worden ist, liegt das Bindemittel in der Probe in der Minderheit vor. Der Bindemittelanteil ist nur schwer einschätzbar. Schramm & Hering (1995) beispielsweise geben bei pigmentierten Proben einen allgemeinen Bindemittelanteil zwischen 15 - 50 % an, doch ist davon auszugehen, dass für Fixative weitaus weniger anzusetzen ist. Die folgenden Berechnungen basieren danach auf einem willkürlich angenommenen Bindemittelanteil von 1 %. Demnach enthielt die ungealterte braune Pastellprobe ursprünglich 0,1 µg



Fixativ, woraus sich bei einem Probenansatz von 10 µg/ 300 µl bei einer Verdünnung von 1:2, 8 ng Protein pro Well (50 µl) errechnen (Tabelle 24). Dieser Wert berücksichtigt nicht die Proteindegradation durch die Alterung und/oder Zugabe des Ethanolis bei der Herstellung des Pastells, die zur Veränderung der Löslichkeit des Proteins sowie zum Verlust der Immunreaktivität führen kann. Außerdem wird bei der Berechnung eine vollständige Extraktion des Proteins angenommen, die auf wässriger Basis nicht zu erwarten ist (→ Kap. 5.4) und zu weiteren erheblichen Proteinverlusten führt. Es ist daher anzunehmen, dass für die ELISA Analysen im vorliegenden Fall der Proteingehalt weit unterhalb von 8 ng/Well lag und eher im Pikogramm-Bereich anzusiedeln ist. Vergleicht man diesen Wert mit den Nachweisgrenzen der eingesetzten Kollagenantikörper, die zwischen 5-50 ng/Well für ungealterte, reine kollagenhaltige Bindemittel liegen (→ Kap. 5.9), wird deutlich, dass unterhalb der Nachweisgrenze gearbeitet wurde und die Probenmenge für einen Nachweis mittels ELISA nicht ausreichend war. Der Vergleich mit den Referenzproben zeigt, dass eine sehr große Menge an Probenmaterial (im Milligramm-Bereich) notwendig ist, um in einen nachweisbaren Bereich zu kommen. Für die ELISA Untersuchung der drei Pastellgemälde bedeutet das, dass keine Aussagen zum Fixativ möglich sind. Weder ob ein Fixativ verwendet worden ist, noch ob es sich dabei um Störleim handelt. Abschließend lässt sich also festhalten, dass eine Identifizierung von proteinhaltigen Fixativen an Pastellen mittels der ELISA Technik nach derzeitigem Stand der Forschung ohne entsprechende Probenmengen oder zusätzliche Signalamplifizierung nicht möglich ist.

## 7.8 Zusammenfassung und Diskussion

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit entwickelte ELISA Methode wurde abschließend an realem Probenmaterial auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft. Eine breite Palette an Objekten unterschiedlicher Herkunft, Datierung und Kulturen mit den verschiedensten Fragestellungen wurde untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass ein qualitativer Nachweis von Proteinen und Gummen an realem Probenmaterial mittels der optimierten ELISA *Screening*-Methode grundsätzlich möglich ist. So lieferte z.B. die Identifizierung von Ei als Bindemittel neue Erkenntnisse zu maltechnischen Methoden an polychromen syrisch-osmanischen Interieur. Neben dem Nachweis einzelner Proteine konnten aber auch mehrere Proteine und/oder Gummen innerhalb komplexer Probenmischungen eindeutig identifiziert werden. Hier sei auf den Nachweis verschiedener Proteine an Resonanzhölzern, Stangentuschen, polychromen Holzskulpturen verwiesen, was als wichtiger Beitrag zur Materialforschung gewertet werden darf. Die gezielte Beprobung (z.B. chinesische Stangentuschen) oder Trennung

bestimmter Fassungsschichten (z.B. *Saint John* Skulptur) im Vorfeld einer ELISA Untersuchung führte in Einzelfällen zu einer eindeutigen Zuordnung der nachgewiesenen Proteine und Gummen innerhalb des Proben- bzw. Objektaufbaus.

Die Fallbeispiele zeigen aber auch die Schwächen und Grenzen der entwickelten ELISA Methode. Bei antiken Ausgrabungsobjekten führte die ELISA Untersuchung innerhalb eines Objektes zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der Nachweis von Ovalbumin war nicht reproduzierbar, was die Interpretation der Ergebnisse erschwerte. Es impliziert, dass die Verteilung der Bindemittel und/oder die Proteindegradation innerhalb eines Objekts unterschiedlich sein kann, dass es durch Proteindegradation zu einem kompletten Verlust der Immunreaktivität kommt oder dass es sich um eine Kontamination handelt. Eine abschließende Aussage bezüglich des Bindemittels war daher nicht möglich.

Die Untersuchung der Fixative auf Pastellgemälden zeigte ebenfalls die Grenzen für den Einsatz der ELISA Methode auf. An ungealterten Referenzproben konnte bei erhöhtem Einsatz von Probenmaterial im Milligramm Bereich, ein positiver Nachweis von Störkollagen erzielt werden. Die Proben von den Originalobjekten lagen hingegen im unteren Mikrogramm Bereich und waren darüber hinaus natürlich gealtert. Ein Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nachweisgrenzen für Kollagen, zeigt deutlich, dass unterhalb der Nachweisgrenze gearbeitet worden ist, weshalb keine Aussagen zum Fixativ möglich waren.

Eine Quantifizierung der Proteine mit der ELISA Technik ist grundsätzlich denkbar, doch wird bei der Anwendung an Proben von Kunst und Kulturgut davon abgeraten. Neben der Probenmenge (siehe später) ist sie vor allem von der Proteindegradation, Pigment-Enzym-Wechselwirkungen (→ Kap. 6.3) sowie Extraktion und Affinität der eingesetzten Antikörper zu den jeweiligen Antigenen abhängig. Letzteres erklärt auch, warum mit der ELISA Technik weder Aussagen zum Erhaltungszustand der Proteine noch ob sie ursprünglich oder später eingebracht worden sind, möglich sind.

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Proben der Fallbeispiele haben gezeigt, dass mit durchschnittlich 50 - 200 µg Probenmaterial ein positiver Nachweis möglich war. Trotzdem sind Angaben zur Mindestprobenmenge für die ELISA Untersuchungen, wie für viele andere analytische Verfahren zur Bindemitteluntersuchung auch, kritisch, da sie von zahlreichen Faktoren beeinflusst werden. Primär ist die Menge von der Zusammensetzung der Probe abhängig. Bei reinen Bindemittelproben (z.B. Leimreste von Verklebungen) ist in der Regel weniger Material notwendig als bei Proben mit komplexer Zusammensetzung, da das Protein in konzentrierter Form vorliegt. Letztere werden stark von den verwendeten Materialien beeinflusst. Bei Pigmenten ist vor allem der unterschiedliche Bindemittelbedarf zu nennen. Der ist u.a. von der Struktur, Größe

und Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Pigmentpartikel und der Korngrößenverteilung sowie der Art des Bindemittels abhängig. Beispielsweise kann es bei der Verwendung von öligen Bindemitteln je nach Pigment (Ölzahl) zu Schwankung des Bindemittelbedarfs zwischen 15 - 200 % kommen (Wehlte 2009). Vergleichbare Werte für den Einsatz von proteinischen Bindemitteln gibt es nicht. Oft liegen die Pigmente in Mischungen vor, was den Bindemittelbedarf verändern kann. Aber auch die Bindemittel können Gemische sein und nicht selten sind unterschiedliche Bindemittel an einem Objekt verwendet worden. Überzug- und Trägermaterialien können die benötigte Probenmenge ebenfalls beeinflussen und sollten, wenn sie nicht untersuchungsrelevant sind, bei den Probenahmen möglichst minimiert werden. Aber der wohl unkalkulierbarste Faktor ist die Materialalterung, die durch atmosphärische (Wärme, Licht, Feuchtigkeit, Umwelteinflüsse), biogene (Biodeterioration) und anthropogene (Restaurierungsmaßnahmen) Einflüsse sowie chemische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Materialien erfolgt und objektabhängig ist. Schwer einschätzbar ist zudem die Verteilung der Bindemittel innerhalb eines Objekts oder einer Probe. Je nach Verteilung ist es möglich, dass bei Proben von benachbarten Entnahmestellen unterschiedliche Mengen für einen positiven Nachweis nötig sind. Die Probenmenge ist also abhängig von der Art, Anzahl, Verteilung und dem Erhaltungszustand der Materialien, was schwer vorhersehbar ist. Grundsätzlich gilt, je mehr Materialien eingesetzt wurden und je degradiierter diese sind, desto mehr Probenmaterial wird benötigt. In Hinblick auf eine ELISA Untersuchung ist die Probenmenge aber auch abhängig von der Fragestellung. Soll nur nach einem Protein oder Gumme gesucht werden, ist weniger Material nötig als für ein vollständiges Protein- und Gummen-*Screening*. Außerdem haben die Extraktionsversuche in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Proteinausbeute einer Probe bei der Extraktion auf wässriger Basis weit unterhalb von 50 % liegen kann (→ Kap. 5.4), was den Bedarf an Probenmaterial erhöht. Insbesondere der Zusatz von nicht-wässrigen Bindemitteln wie Öl oder auch Wachs scheinen die Extraktion darüber hinaus zu hemmen. Das alles veranschaulicht, warum eine Angabe zur Mindestprobenmenge schwierig ist. Erfahrungswerte haben allerdings gezeigt, dass durchschnittlich eine Probenmenge zwischen 50 - 150 µg für ein komplettes Protein und Gummen ELISA-*Screening* ausreicht. Der Wert bezieht sich auf das Gesamtgewicht der zu untersuchenden Proben unabhängig von den verwendeten Materialien (Pigmente, Blattmetalle, sonstige Bindemittel, Überzugs- und Trägermaterial) oder Alter. Bei reinen Bindemittelproben ist eine Menge von bereits 1 - 50 µg ausreichend. Bildlich gesprochen, werden Proben, so groß wie Stecknadelköpfe und kleiner benötigt. Diese Angaben sind lediglich Empfehlungen und selbstverständlich in Abhängigkeit des zu untersuchenden Objektes und Fragestellung vor jeder ELISA Analyse mit den zuständigen Restauratoren zu diskutieren.

Grundsätzlich hat sich gezeigt, dass die Interpretation der Ergebnisse und insbesondere der Umgang mit Negativergebnissen schwierig ist. Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht zwangsläufig, dass das gesuchte Protein nicht in der Proben enthalten ist, sondern lediglich, dass es nicht detektiert wurde. Gründe dafür können u.a. der Verlust der Immunreaktivität durch Proteindegradation, unzureichende Extraktion oder auch Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Pigmenten und dem Detektionssystem der eingesetzten ELISA Methode sein. Die Interpretation der ELISA Ergebnisse ist nur mit umfangreichen Kenntnissen über Materialien und Techniken möglich und sollte stets im Dialog zwischen Restauratoren, Kunsthistorikern und Naturwissenschaftlern stattfinden.

## 8 Versuche zur Lokalisierung der Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

Neben der Identifizierung der Bindemittel ist vor allem die Lokalisierung innerhalb des Probenmaterials für die kunsttechnologische Untersuchung eines Objektes von Interesse. Während bei der ELISA Analyse die räumliche Information der Probe zugunsten eines hochempfindlichen Nachweises verloren geht, bietet die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) eine Möglichkeit die Proteine zu lokalisieren. Die Visualisierung erfolgt bei Proben von Kunstobjekten am Anschliff über fluoreszenzmarkierte Antikörper unter Betrachtung im Mikroskop. Diese Methode findet immer wieder Erwähnung in der Literatur (Kockaert et al. 1989, Ramírez-Barat & De la Viña 2001, Heginbotham et al. 2006), wobei die Ergebnisse aber aufgrund vielfältiger Einflussfaktoren (→ Kap. 8.3-8.4) oft limitiert sind. Schultz (2006) konnte bereits an einer Vielzahl von Probekörpern mit bekannter Zusammensetzung den Einsatz der IFM zur Lokalisierung von Kasein und Ovalbumin bestätigen, wenngleich der Nachweis an realem, gealtertem Probenmaterial nicht gelang. Trotzdem soll die Technik im Folgenden kurz vorgestellt und exemplarisch an wenigen definierten Probekörpern die Schwierigkeiten der Lokalisierung am Anschliff erläutert werden. Zudem galt es, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörper auf ihre Anwendbarkeit für die IFM zu überprüfen.

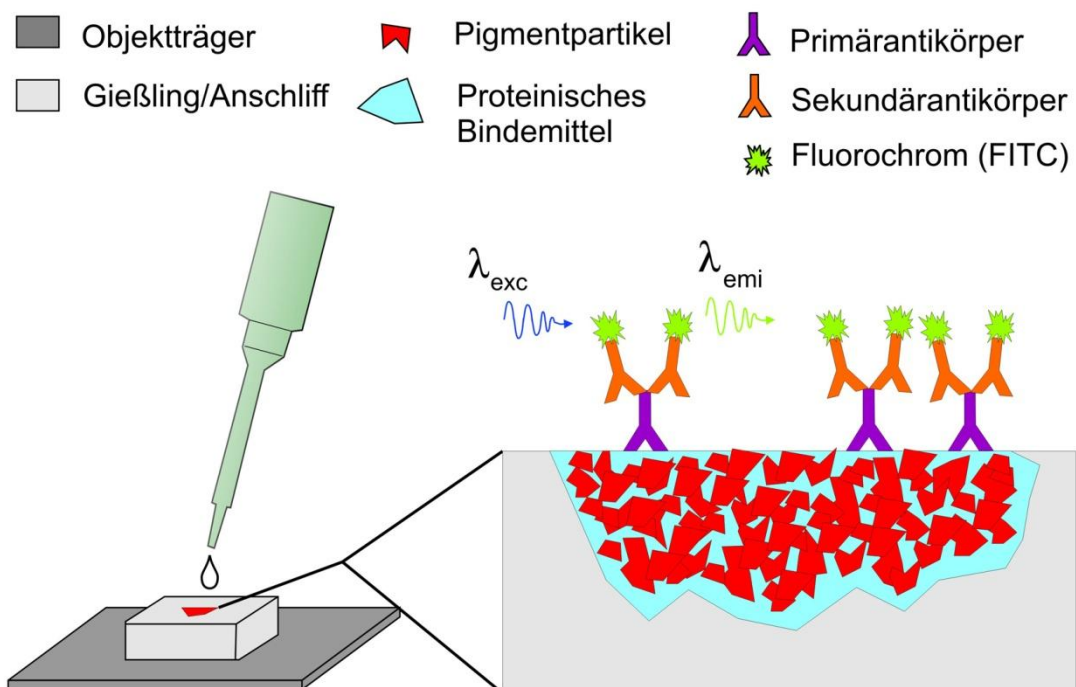
### 8.1 Prinzip: indirekte IFM

Die Immunfluoreszenzmethode ist ein mikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Proteinen in Geweben (Immunhistochemie) oder an Einzelzellen (Immunocytochemie). Wie alle Immundetektionen basiert auch die Immunfluoreszenzmikroskopie auf der Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei die Antikörper hier mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dabei nutzt man den Effekt, dass fluoreszierende Farbstoffe (auch Fluorochrome oder Fluorophore) Licht bei einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und es bei einer anderen, längeren Wellenlänge emittieren (Strokersche Regel). Bei der Bestrahlung eines Fluoreszenzfarbstoffes mit Licht der Wellenlänge des Absorptionsbereiches und anschließender mikroskopischer Betrachtung durch einen Filter, der nur für Licht des emittierten Wellenlängenbereichs durchlässig ist, wird die Fluoreszenz sichtbar. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist ein sehr gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei 495nm), grünes Licht

(Emissionsmaximum 519 nm) emittiert. Der Einsatz von zwei oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Identifizierung verschiedener Antigene in einer Probe, vorausgesetzt sie sind an unterschiedliche Antikörper gekoppelt, unterscheiden sich in ihren Absorptions- und Emissionsmaxima und die benötigten Filtersätze sind vorhanden.

Beim indirekten IFM Verfahren wird die Probe (hier: Anschliff) zunächst mit einem spezifischen, nicht markierten Primärantikörper behandelt. Ist das gesuchte Antigen vorhanden und für den Antikörper zugänglich, bindet dieser und es entsteht ein nicht sichtbarer Antigen-Antikörper-Komplex. Nach dem Abwaschen nichtgebundener Antikörper erfolgt die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, der bei Anwesenheit des Primärantikörpers an diesen spezifisch bindet. Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dieser Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar und ermöglicht die Lokalisierung des gesuchten Antigens innerhalb des Probengefüges (Abbildung 16). Die Durchführung sollte stets Positiv- und Negativkontrollen enthalten, auch wenn sie angesichts der Materialvielfalt an historischen Objekten eher zweitrangig sind. Sie können nur Auskunft über die korrekte Funktion der Antikörper geben.

**Abbildung 16:** Prinzip der indirekten IFM an Anschliffen



## 8.2 Durchführung

Die IFM wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Anschliffen von Referenzproben zum Nachweis und zur Lokalisierung proteinhaltiger Bindemittel durchgeführt. In Anlehnung an Schultz (2006) wurde die Durchführung wie folgt modifiziert:

Einbettung der Proben in Technovit® 2000 LC (Heraeus Kluzer GmbH) mit anschließendem trocken Schleifen und Polieren bis zu einer Körnung von 12000. Primärantikörper in PBS 1:100 verdünnen und je 25 µl/Anschliff aufpipettieren; 16 Stunden bei 4 °C inkubieren. Abschlagen der überschüssigen Antikörperlösung und 4x mit PBS waschen. Dabei je 25 µl/Anschliff aufpipettieren, 1-2 Minuten einwirken und vorsichtig abpipettieren. FITC markierten Sekundärantikörper (GARb/FITC) in PBS 1:100 verdünnen und je 25 µl/Anschliff aufpipettieren. Da Fluoreszenzfarbstoffe sehr lichtempfindlich sind, den Auftrag in einem möglichst abgedunkelten Raum durchführen. 60 Minuten bei 37 °C inkubieren. Die Anschliffe während der Inkubationszeiten abdecken. Abschlagen der überschüssigen Antikörperlösung und 4x mit PBS waschen. Dabei je 25 µl/Anschliff aufpipettieren, 1-2 Minuten einwirken und vorsichtig abpipettieren. 15-30 Minuten abgedeckt (im Dunkeln) trocknen lassen und unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüfen, ob es zu spezifischen Fluoreszenzerscheinungen aufgrund der Antikörperbindung gekommen ist. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axioplan II Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Zeiss Filtersatz 9 (Anregung BP 450-495 nm, Strahlteiler FT 510 nm und Emission LP 515 nm) für FITC (Anregungswellenlänge 495 nm, Emissionswellenlänge 519). Mikroskopiert wurde im Auflicht bei unterschiedlichen Vergrößerungen (100, 200, 400x). Fotografiert wurde mit einer installierten Digitalkamera (Spot 16.4 4 Mp Slider, Diagnostic Instruments, Inc. oder Canon Powershot G2, 4 Megapixel). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop CS und ImageJ 1.4.

## 8.3 Versuche an definierten Probekörpern

Die Versuche zur Immunfluoreszenzmikroskopie wurden an Fassungsproben einer Probetafel mit bekannter Zusammensetzung durchgeführt (→ Anhang B2.1), von denen zwei in der Folge exemplarisch vorgestellt werden.

Die Probe #PT5 hat einen dreischichtigen Aufbau und setzt sich aus Schichten von Kreide/Leim, Grüne Erde/Boraxkasein und frz. Ocker/Vollei zusammen (Abbildung 17-

18). Die Probe #PT10 hat denselben Aufbau und Zusammensetzung, wurde abschließend aber noch mit einer dünnen Störleim Schicht belegt, die eine Malschichtfestigung imitieren soll (Abbildung 19). Als Negativkontrollen dienten Proben bestehend aus Kreide/Leim, Rote Erde/Leim (#PT4), da in den Versuche nur auf Kasein, Ovalbumin und Störkollagen getestet wurden. Sie wurden parallel zu den Versuchen getestet und zeigten durchgängig negative Ergebnisse (Bilder nicht gezeigt).

Die Proben wurden in Kunstharz eingebettet, geschliffen und im Auflicht, sowohl im sichtbaren Licht (Zeiss Filtersatz 2 (365 nm)) als auch unter Blaulicht-Anregung im Zeiss Filtersatz 09 (450-495 nm; FITC) vor der Zugabe der Antikörper betrachtet und fotografiert. Die Probe #PT5 wurde zuerst auf Kasein und nach der Trocknung und einem Zwischenschliff in einem zweiten Durchgang auf Ovalbumin getestet. Die Probe #PT10 wurde ausschließlich auf Störkollagen untersucht. Die Primärantikörper sind identisch mit denen der ELISA Methode. Der Sekundärantikörper (GARb/FITC, Southern Biotech #4050-02) ist statt mit einem Enzym mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert, dessen Anregungswellenlänge bei 495 nm liegt (→ Anhang A1). Alle Antikörper wurden 1:100 in PBS angesetzt. Die Durchführung erfolgte nach der unter → Kap. 8.2 beschriebenen Methode.

Abbildung 17 zeigt die Probe #PT5 beim Versuch zur Lokalisierung von Kasein (a.; Schicht 2). Vor der Zugabe der kaseinspezifischen Antikörper zeigte die Betrachtung im FITC Filter keine auffällige Fluoreszenz in der kaseinhaltigen Schicht (b.). Nach der Zugabe der spezifischen Antikörper sowie der FITC-markierten Sekundärantikörper wies die kaseinhaltige Schicht im Anschliff unter Blaulichtanregung (450-495 nm) eine deutliche hellgrüne, typische Fluoreszenz für FITC auf (c.). Kasein konnte also eindeutig nachgewiesen und lokalisiert werden.



**Abbildung 17:** Versuch zur Lokalisierung von Kasein (Schicht 2) an der Probe #PT5 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei). Betrachtung der Probe im sichtbaren Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).

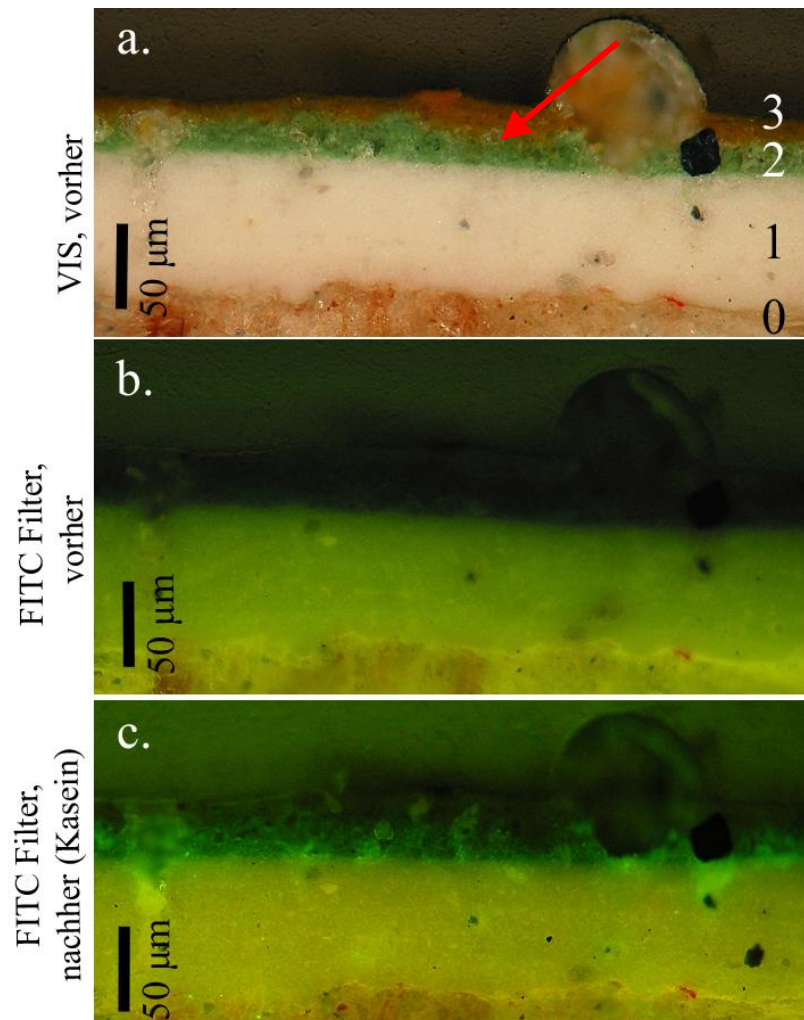


Abbildung 18 zeigt dieselbe Probe (#PT5), aber einen anderen Ausschnitt, nach der Trocknung und einem Zwischenschliff beim Versuch zur Lokalisierung von Ovalbumin (a.; Schicht 3). Vor der Zugabe der ovalbuminspezifischen Antikörper zeigte die Betrachtung der Probe im FITC Filter keine auffällige Fluoreszenz in der eihaltigen Schicht (b.). Zudem kann ausgeschlossen werden, dass sich Reste von fluoreszenzmarkierten Antikörpern aus dem vorangegangenen Versuch noch im Probengefüge befinden und so den Nachweis von Ovalbumin störend beeinflussen könnten. Nach der Zugabe der spezifischen Antikörper sowie der FITC-markierten Sekundärantikörper zeigte die eihaltige Schicht im Anschliff unter Blaulichtanregung (450-495 nm) eine deutliche hellgrüne Fluoreszenz (c.). Allerdings ist die Abgrenzung der fluoreszierenden Schicht zur kaseinhaltigen Fassungsschicht nicht deutlich, was

vermutlich auf die Penetration des eihaltigen Bindemittels in die darunterliegende Schicht (Kasein) zurückzuführen ist. Die Kreidegrundierung zeigt hingegen erwartungsgemäß keine Fluoreszenz und schließt somit Ei als Bindemittel im vorliegenden Fall aus.

Ovalbumin konnte zwar in der Probe am Anschliff nachgewiesen werden, doch die Zuordnung zu einer bestimmten Schicht war nicht eindeutig. Darüber hinaus zeigt die Probe, dass es durch wiederholtes Waschen zum Quellen von Schichten insbesondere in der leimhaltigen Grundierungsschicht kam. Das hat zur Folge, dass nicht alle Bereiche der Probe die gleiche Tiefenschärfe aufweisen und es zu unscharfen Abbildungsbereichen kommt.

**Abbildung 18:** Versuch zur Lokalisierung von Ovalbumin (Schicht 3) an der Probe #PT5 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei). Betrachtung der Probe im sichtbarem Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).

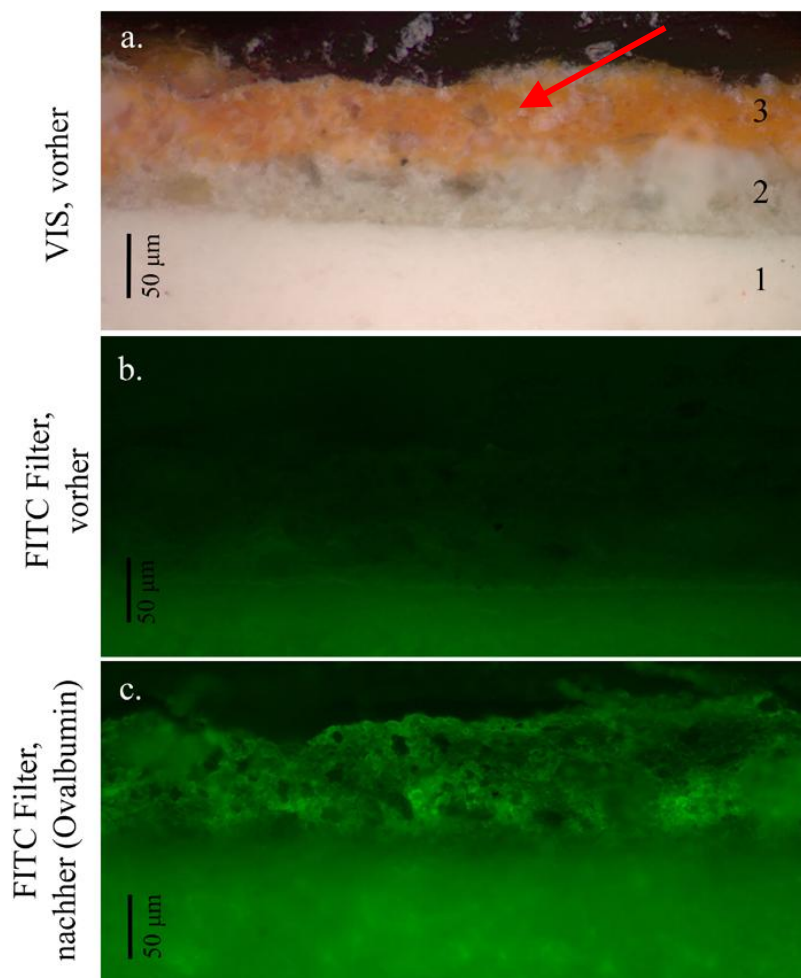
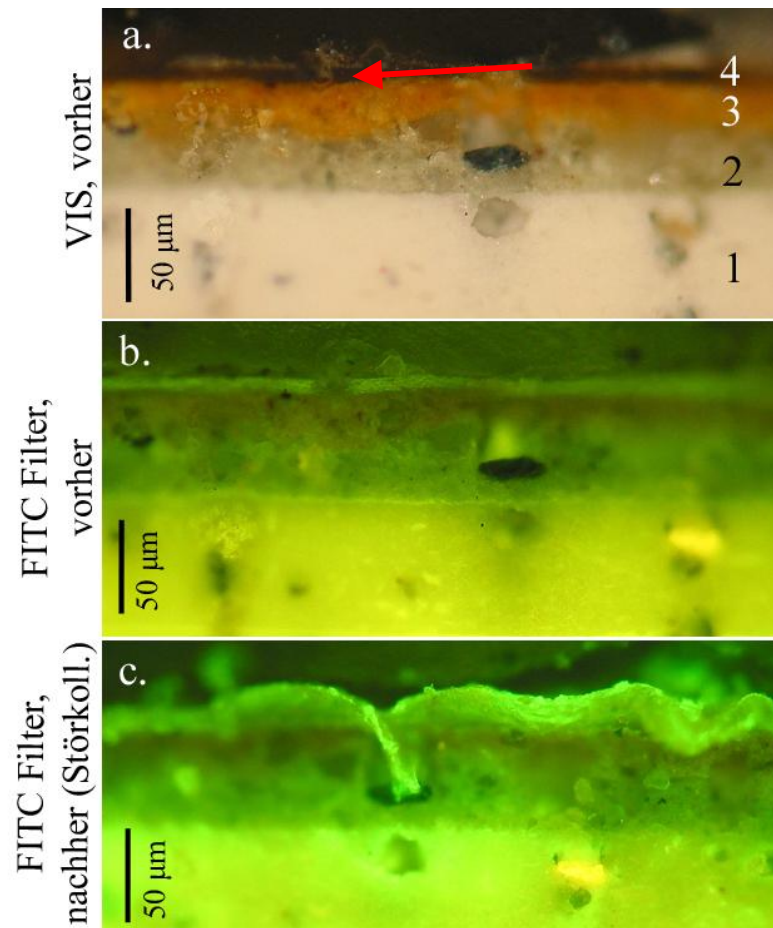


Abbildung 19 zeigt die Probe (#PT10) beim Versuch zur Lokalisierung von Störleim, der als Konsolidierungsschicht aufgetragen wurde (a.; Schicht 4). Vor der Zugabe des störkollagenspezifischen Antikörpers zeigte die Betrachtung der Probe im FITC Filter bereits eine geringe Fluoreszenz/Farbigkeit der Störleimschicht (b.). Diese Fluoreszenz zeigt sich ebenfalls in der zwischen Schicht 1 und 2 aufgetragenen Leimlöse, um das Absinken der später aufgetragenen kaseinhaltigen Schicht zu verhindern. Wieso sich diese Schicht bei der Probe #PT5 nicht so deutlich abzeichnete, kann nicht geklärt werden. Nach der Zugabe der spezifischen Antikörper sowie der FITC-markierten Sekundäntikörper zeigte sich eine starke Quellung der Störleimschicht durch die verschiedenen Waschgänge (c.). Allerdings wies sie im Anschliff unter Blaulichtanregung (450-495 nm) eine etwas stärkere hellgrüne Fluoreszenz auf als vor der Zugabe der Antikörper. Trotzdem kann aufgrund der geringen Differenz der Fluoreszenzerscheinung vor und nach der Antikörperapplikation nicht von einem eindeutigen Nachweis gesprochen werden. In der Kreidegrundierung ist es ebenfalls zu Fluoreszenzerscheinungen gekommen. Sie sind aber nicht auf eine spezifische Bindung der Antikörper zurückzuführen, da diese ausschließlich mit Störkollagen reagiert (→ Kap. 5.10.3), sondern beruhen entweder auf dem Fluoreszenzvermögen der Materialien (Pigment, Bindemittel) oder auf unspezifischen Anlagerungen der Antikörper im heterogenen Materialgefüge, die sich auch durch Waschen nicht vollständig entfernen lassen. Durch das zusätzliche Quellen der Kreidegrundierung wird der Fluoreszenzeffekt noch verstärkt, so dass die benachbarten Schichten maskiert/überlagert werden und eine Auswertung erschwert wird.

**Abbildung 19:** Versuch zur Lokalisierung von Störkollagen (Schicht 4) an der Probe #PT10 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei, Störleim (Konsolidierung)). Betrachtung der Probe im sichtbare Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).



## 8.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Anwendung der Immunfluoreszenzmikroskopie hat gezeigt, dass an ungealterten Probekörpern mit bekannter Zusammensetzung in einem mehrschichtigen Aufbau, die gesuchten Proteine eindeutig nachgewiesen und lokalisiert werden konnten. Durch Wiederholung der Untersuchung nach Trocknung und Zwischenschliff mit verschiedenen Antikörpern war es möglich, an einer einzigen Probe verschiedene Proteine am Anschliff zu lokalisieren. Die Versuche bestätigen die Anwendbarkeit der eingesetzten Antikörper für IFM Untersuchungen.

Die Untersuchungen zeigen aber auch, dass es aufgrund von Penetration der Bindemittel aus darüber liegenden Schichten zu Vermischungen kommen kann, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Eine Lokalisierung der Bindemittel ist daher

nicht immer gleichbedeutend mit der eindeutigen Zuordnung zu den ursprünglichen Schichten. Es ist möglich, dass beispielsweise in benachbarten Schichten die Bindemittel identisch sind, dass Bindemittelgemische verwendet worden sind oder dass es zu einer Vermischung der Bindemittel durch Penetration/Migration bei der Entstehung des Kunstwerkes oder durch später eingebrachte Materialien gekommen ist. Beim Nachweis von Kasein in der ersten Probe wurde die Penetration von Kasein in die Kreidegrundierung durch den Auftrag einer Leimlöse, die als Sperrschicht fungierte, gehemmt (Abbildung 17). Das nachgewiesene Kasein ließ sich so eindeutiger einer bestimmten Schicht zuordnen. Aber auch hier war die Fluoreszenz an der Grenzfläche zur unteren Schicht stärker. Die Vermischung von Materialien ist eine grundsätzliche Schwierigkeit beim Nachweis von Bindemitteln und nicht auf die Untersuchung mittels IFM beschränkt. Die Interpretation der Ergebnisse ist daher oft nur mit der Kenntnis über Materialien und maltechnische Grundlagen möglich.

Durch die Behandlung mit wässrigen Lösungen bei den verschiedenen Waschgängen und Inkubationsschritten kam es zum Quellen einzelner Schichten, die sich störend auf die Betrachtung unter dem Mikroskop auswirkten. Dabei kommt es zu einer Bindung der Wassermoleküle an die polaren Gruppen der Proteine, wodurch sich der Abstand der Polymerketten zueinander vergrößert und es zum Schwellen der Schichten kommt. Besonders betroffen davon sind Schichten mit tierischem Leim aufgrund seines enormen Quellvermögens. Die gequollenen Schichten liegen dann in einer anderen Betrachtungsebene bei der mikroskopischen Untersuchung, wodurch die Grenzflächen zu den anderen Schichten nicht mehr klar erkennbar sind. Der Einsatz von wässrigen Lösungen kann darüber hinaus auch zum kompletten Herauswaschen wasserlöslicher Stoffe führen. Hier sind vor allem die wasserlöslichen Pflanzengummen zu nennen, deren Lokalisierung am Anschliff daher schwierig ist. Das Quellen, Auswaschen und Herauswaschen durch wässrige Systeme kann neben der Art der Bindemittels und der Probenzusammensetzung aber auch von dem pH-Wert, der Ionenkonzentration sowie der Temperatur und der Einwirkzeit beeinflusst werden (Schäfer 2013).

Viele organische und anorganische Stoffe und Substanzen wie Pigmente, Farbstoffe, Harze oder Proteine zeigen bei Bestrahlung mit UV Licht farbige Fluoreszenzen. Dabei wird die unsichtbare, kurzwellige Strahlung von den Stoffen absorbiert und in langwelligeres, sichtbares Licht umgewandelt, das dann als Fluoreszenz sichtbar wird. Diese kann sich störend auf den Nachweis mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auswirken, da die Differenzierung zwischen Material- und durch markierten Antikörper erzeugte Fluoreszenz nicht immer möglich ist. In manchen Fällen kann die Intensität der Fluoreszenz so stark sein, dass sie benachbarte Schichten maskieren/überstrahlen und eine Auswertung der Ergebnisse unmöglich macht. Fluoreszenzerscheinungen sind u.a. abhängig von der Materialzusammensetzung, -beschaffenheit und Schichtdicke, aber auch vom Alter der Materialien und können sich im Laufe der Zeit verändern

(Baumeister 1988; Bäschlin 1994; Fiedler & Walch 1997; Simons 1998). Die Anschliffe der Proben sind daher stets im Vorfeld einer Untersuchung mittels IFM auf Fluoreszenzerscheinungen zu überprüfen und mit denen nach der Antikörperapplikation zu vergleichen.

Trotz der hohen Spezifität der eingesetzten Antikörper (→ Kap. 5.10) kam es aufgrund des heterogenen/porösen Probengefüges während der verschiedenen Untersuchungen mittels IFM immer wieder zu unspezifischen Anlagerungen der Antikörper. Dabei handelt es sich nicht um eine echte Bindung, sondern lediglich um eine An- bzw. Einlagerung der Antikörper in kleinste Vertiefungen, Auswaschungen und Risse der Probenoberfläche, die sich auch durch Waschen nicht wieder vollständig entfernen lassen. Dort kommt es in der Folge zu unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen, die eine Interpretation der Ergebnisse erschweren und zu falsch-positiv Ergebnissen führen können.

Grundvoraussetzung einer Lokalisierung im Probenaufbau ist, dass die Proteine für die spezifischen Antikörper zugänglich sind. Das ist u.a. abhängig von der Probenzusammensetzung und dem Erhaltungszustand der Proteine. Oftmals ist die Zugänglichkeit der Proteine limitiert, da sie in einer festen komplexen Matrix eingebunden sind. Durch äußere Einflüsse (Licht, Feuchtigkeit, Wärme, Umwelteinflüsse) und Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Materialien kommt es zur Proteindegradation, die zum Verlust der Immunreaktivität führen kann. Trotz der Verwendung eines Proteins, wäre es dann nicht mehr mittels IFM oder einer anderen immunologischen Methode nachweisbar, da die spezifischen Epitope für die Antikörper durch die Degradation verloren gegangen sind.

Versuche an realem Probenmaterial haben in der Vergangenheit gezeigt, dass ein Nachweis mittels IFM oftmals zu Negativergebnissen führt, selbst, wenn ELISA Analysen im Vorfeld die Anwesenheit eines Proteins bestätigen konnten (Schultz 2006). Das belegt die geringere Empfindlichkeit der IFM, weshalb sie, wenn überhaupt, nur in Verbindung mit vorangegangenen ELISA Untersuchungen durchgeführt werden sollte. Abschließend sei noch auf die Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs hingewiesen. Unter Lichtanregung verblasst FITC sehr schnell, was die Auswertung erschwert bzw. die Auswertungszeit verkürzt.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich mit der Immunfluoreszenzmikroskopie die gesuchten Proteine lokalisieren lassen, der Einsatz zur Lokalisierung von Proteinen an Proben von Kunstobjekten aber äußerst limitiert ist.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Die Identifizierung von Bindemitteln steht häufig im Interesse restauratorischer Fragestellungen, da sich aus der Kenntnis der verwendeten Materialien mögliche Rückschlüsse auf Schadensphänomene oder Hinweise auf Restaurierungskonzepte ergeben. Derzeit gängige Verfahren zur Analyse von proteinhaltigen Bindemitteln sind häufig durch Probengröße, komplexe Materialmischungen und -Degradation störend beeinflusst und sind darüber hinaus mit einem hohen Investitions- und Zeitaufwand verbunden. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Möglichkeiten und Grenzen immunologischer Verfahren zum Nachweis von Proteinen und Gummen an Proben von Kunst und Kulturgut. Der Schwerpunkt lag auf der Entwicklung und Erweiterung einer ELISA *Screening*-Methode zur Identifizierung der vier natürlichen Bindemittel Ei, Kasein, tierischer Leim und Pflanzengummen. Die Überprüfung der Methode erfolgte an Referenzmaterial bekannter Zusammensetzung sowie abschließend an realem Probenmaterial. Zur Lokalisierung der Proteine am Anschliff wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie vorgestellt und an wenigen Probekörpern bekannter Zusammensetzung überprüft. Eine Anwendung an realem Probenmaterial erfolgte aufgrund der vielfältigen Einflussfaktoren nicht.

Die Entwicklung und Erweiterung der ELISA Methode hat gezeigt, dass durch gezielte Veränderung der Versuchsparameter und Materialien (Extraktion, Inkubation, Blocken Mikrotiterplatten) eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit der Assays möglich ist (→ Kap. 5.11). Bei den wässrigen Extraktionspuffern ist weniger der pH-Wert als vielmehr die Zusätze (Detergenzien, Chelatbildner) entscheidend. Der Zusatz von 1 % SDS im Extraktionspuffer führte zu einer deutlichen Hemmung des ELISA Systems und kann daher nicht erfolgen. Durch die Extraktionsdauer von mindestens 5 Stunden bei 37 °C kam es zu einer deutlichen Steigerung der Wiederfindungsrate für Proteine.

Bei den getesteten Mikrotiterplatten ist vor allem das Fassungsvermögen der Wells von Bedeutung. Bei gleicher Füllmenge ist die Füllhöhe bei Wells mit geringerem Durchmesser höher, was aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes zu einer Erhöhung der Extinktion führt. Über den Welldurchmesser kann die benötigte Probenmenge reduziert werden. Sogenannte *half area plates*, Platten mit sehr geringem Welldurchmesser, könnten zukünftig die Probenmenge weiter reduzieren und werden derzeit getestet.

Bei der Inkubation der Antigene und Antikörper führten längere Inkubationszeiten bei niedrigeren Temperaturen zu einer deutlichen Erhöhung der Assayempfindlichkeit.

Bei proteinischen Blockpuffern ist darauf zu achten, dass sie nicht identisch mit den im Versuch nachzuweisenden Proteinen sind. Die Verwendung von Fertiglösungen hat gezeigt, dass sie nicht deklarierte Zusätze enthalten können, die zu erhöhten unspezifischen Bindungen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Einige der getesteten Fertiglösungen wiesen auf einen Zusatz von Kasein hin, weshalb sie für den Einsatz in der vorliegenden Arbeit ungeeignet waren.

Die Versuche verdeutlichen, dass bei einem Austausch einer Reagenz, einer Chemikalie oder eines Materials, die Auswirkungen auf das eingesetzte ELISA System stets zu überprüfen sind.

Alle getesteten Antikörper zeigten sich hochspezifisch und mit nur einer Ausnahme konnten keine Kreuzreaktionen nachgewiesen werden. Die Kreuzreaktion von #JIM13 auf Galacturonsäuren in bestimmten Holzarten ist zwar nur schwach, muss aber bei der Interpretation von ELISA Ergebnissen berücksichtigt werden. Mit den eingesetzten Antikörper gegen Kollagen (#ab34710), Ovalbumin (#AB1225), Kasein (#RCAS-10A) und Arabinogalactan-Proteine (#JIM13) sind keine tier- oder pflanzenspezifischen Aussagen möglich, wohingegen der Antikörper gegen Fischkollagen (#T89171R) zumindest eine Eingrenzung auf die Gruppe der Fische erlaubt. Dagegen ist eine eindeutige Identifizierung auf Gattungsniveau mit den Antikörpern gegen Störkollagen (AIS2006) und Tragant (#MAC265) möglich. Der Einsatz des Phosvitin Antikörpers wurde aufgrund seiner mangelnden Reaktivität verworfen, ebenso wie die Verwendung des Arabinogalactan-Proteine spezifischen Antikörpers #MAC207.

Die Untersuchungen an eihaltigen Proben haben gezeigt, dass eine Differenzierung von Eiklar, Eigelb und Vollei nicht möglich ist. Eine vollständige Trennung von Eiklar und Eigelb kann durch bloßes Abgießen des Eiklars nicht erreicht werden, weshalb Ovalbumin in allen eihaltigen Proben nachweisbar bleibt. Durch die eigene Herstellung tierartenspezifischer Leime konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem getesteten kommerziellen Hasenleim weniger, wenn überhaupt, um Hasen- oder Kaninchenhaut als vielmehr um einer Mischung aus kollagenhaltigem Material verschiedener Tierarten handelt. Bei der kommerziellen Hausenblase in Blättern verlief der Nachweis von Störkollagen negativ, was bedeutet, dass es sich entweder nicht um Stör handelt, oder die störspezifischen Epitope bei der Aufbereitung der Störblase bei der Herstellung verloren gegangen sind.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen an ungealterten Proteinen und Gummen hat gezeigt, dass diese vom eingesetzten Antigen sowie Antikörper abhängig sind. Dennoch hat sich die ELISA Methode als hochspezifisch mit Nachweisgrenzen im Nanogramm



Bereich erwiesen. Eine Überprüfung und Bestimmung von Nachweisgrenzen an gealterten Proteinen und Gummen steht noch aus.

Nach Abschluss der Entwicklung und Erweiterung der ELISA Methode erfolgte die Überprüfung an Probekörpern mit bekannter Zusammensetzung (→ Kap. 6.4). Der Einsatz der entwickelten *Screening*-Methode ermöglichte die Identifizierung mehrerer Proteine innerhalb einer Probe in einem Analysedurchgang. Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass es bei der Mischung von wässrigen und nicht-wässrigen Bindemitteln (Öl, Wachs, Harz etc.) zu einem verringerten ELISA Signal kommen kann. Ob es sich dabei lediglich um einen geringeren Proteingehalt innerhalb der Probe oder um eine verminderte Extraktion aufgrund der verschiedenen Materialien handelt, gilt es zukünftig zu untersuchen und gegebenenfalls das Extraktionsverfahren zu ändern.

Die Untersuchung an künstlich gealterten Fassungsproben zeigte, dass Proteindegradation durch Alterung und Pigmente und/oder Wechselwirkungen zwischen Pigmenten und dem ELISA Detektionssystem (Enzym/Substrat) einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der ELISA Methode haben. Durch die parallele Anwendung von zwei ELISA Methoden mit verschiedenen Detektionssystemen (HRP und AP) konnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Enzyme auf bestimmte Metallionen, die Bestandteil vieler Pigmente sind, in Abhängigkeit von den eingesetzten Proteinen bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Meerrettich Peroxidase weniger empfindlich auf die Metallionen der getesteten Pigmente reagiert als die Alkalische Phosphatase. Kein Pigment konnte unabhängig vom Bindemittel durchgängig den ELISA Nachweis stören. Welchen Einfluss die Materialalterung auf den ELISA Nachweis hat oder welche Rolle die verschiedenen Pigmente bei der Alterung von Bindemitteln spielen, ist ein eigenes Forschungsthema und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Die Untersuchungen haben aber gezeigt, dass der Nachweis von Proteinen mit nur einer Ausnahme (Grüne Erde/Kollagen) auch an gealterten Proben mittels der entwickelten ELISA Technik möglich ist.

Abschließend erfolgte die Anwendung der ELISA Methode an realem Probenmaterial von Objekten unterschiedlichster Herkunft, Datierung und Kulturen (→ Kap. 7). Die Ergebnisse zeigen, dass ein qualitativer Nachweis von Proteinen und Gummen an realem Probenmaterial mittels der entwickelten ELISA *Screening*-Methode grundsätzlich möglich ist. So konnte z.B. die Verwendung von Fisch- oder Störleim an Leimproben verschiedener Möbel in Boule Technik ausgeschlossen werden. Aber auch der Nachweis mehrerer Proteine und/oder Gummen innerhalb komplexer Probenmischungen war möglich. An einer polychromen Skulptur aus dem 13.

Jahrhundert konnte durch gezielte Trennung der Probe im Vorfeld der ELISA Untersuchung tierischer Leim als Bindemittel für die Kreidegrundierung und Ovalbumin (Ei) als Anlegemittel für die Metallfolie nachgewiesen werden. Aber auch der Nachweis verschiedener Proteine an Proben von Resonanzhölzern, Stangentuschen und einer polychromen syrischen Raumausstattung, kann als wichtiger Beitrag zur Materialforschung gewertet werden.

Die Grenzen der ELISA Methode zeigten sich bei der Untersuchung von Fixativen auf Pastellgemälden aus dem 18. Jahrhundert sowie Proben von Fragmenten polychromer antiker Steinstatuen. Im Fall der Pastellgemälde bewies der Vergleich mit Referenzproben, dass eine sehr große Menge an Probenmaterial (Milligramm Bereich) notwendig ist, um in einen nachweisbaren Bereich für das Fixativ zu kommen. Die Proben der Pastellgemälde lagen weit unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb keine Aussagen zum Fixativ möglich waren. Die Untersuchung von extrem abgebautem Probenmaterial antiker Ausgrabungsobjekte führt zu unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb eines Objektes. Der Nachweis von Ovalbumin war nicht reproduzierbar, was primär auf den Verlust der Immunreaktivität durch die Proteindegradation bei derart abgebautem Material zurückzuführen ist. Es impliziert aber auch, dass die Verteilung der Bindemittel und/oder die Proteindegradation innerhalb eines Objekts unterschiedlich sein können, wenngleich auch Kontaminationen nie auszuschließen sind. Eine abschließende Aussage bezüglich des Bindemittels war auch hier nicht möglich. Die Ergebnisse deuten aber auch darauf hin, dass abhängig von den Lagerungsbedingungen der Objekte, die Immunreaktivität von Proteinen auch an sehr alten Objekten erhalten bleiben kann.

Die ELISA Technik hat gezeigt, dass sie in der Lage ist, ein oder mehrere Proteine und Gummen innerhalb komplexer Probenmischungen eindeutig zu identifizieren. Sie ist hochempfindlich, vergleichsweise kostengünstig und benötigt keinen hohen apparativen Aufwand. Die Durchführung ist relativ schnell und mit einem hohen Probendurchsatz möglich, was sie für einen routinemäßigen Einsatz in der Konservierung/Restaurierung auszeichnen könnte. Allerdings ist die Anwendung immunologischer Verfahren nicht zum Aufgabenbereich von Restauratoren zu zählen, sondern sollte Speziallabors mit entsprechender Erfahrung in archäometrischen wie biochemischen Fragestellungen und geeigneter Ausstattung überlassen werden, in denen die vorgestellten Verfahren routinemäßig eingesetzt werden.

Für jede ELISA Analyse gilt, dass lediglich die Proteine und Gummen nachgewiesen werden können, gegen die Antikörper eingesetzt werden. Aussagen über andere, nicht getestete Proteine oder nicht-proteinhaltige Bindemittel sowie Zusatzstoffe können nicht gemacht und diese daher auch nicht ausgeschlossen werden. Negativergebnisse

bedeuten nicht zwangsläufig, dass das gesuchte Antigen (Protein/Gumme) nicht in der Probe ist, sondern lediglich, dass es nicht detektiert wurde (absence of evidence does not equal evidence of absence (Altman & Bland 1995)). Deshalb sind begleitende Untersuchungen mit Analyseverfahren, die zur Beantwortung dieser Fragen beitragen können, notwendig. Ein Abgleich mit anderen Methoden ist bei jeglicher Analyseform oder Fragestellung wünschenswert.

Die Möglichkeit von Kontaminationen ist im Einzelfall nicht auszuschließen und ein grundsätzliches Problem bei der Analyse von Proben, unabhängig vom eingesetzten Nachweisverfahren. Letztlich steht und fällt aber jede Form der Analyse mit der Probenentnahmestelle. Der Nachweis gilt immer nur für die eingesetzte Probe und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Gesamtobjekt, insbesondere bei größeren Objekten ist kritisch, wie beispielweise die Untersuchung an antiken Ausgrabungsobjekten gezeigt hat.

Grundsätzlich zu berücksichtigen ist, dass die Herstellung von Antikörpern auf Tierversuchen basiert, die es gilt, möglichst gering zu halten. Die Relevanz der Bindemitteluntersuchung sollte in Abhängigkeit von der tatsächlich relevanten Fragestellung für das jeweilige Objekt stets neu geprüft werden. In vielen Fällen ist eine Klassifizierung der Bindemittel ausreichend. Ist eine Differenzierung der Proteine notwendig, haben die vorgestellten Untersuchungen gezeigt, dass die ELISA Technik eindeutige Vorteile gegenüber vielen anderen analytischen Verfahren hat.

Versuche zur Lokalisierung der Proteine erfolgten über die Immunfluoreszenzmikroskopie. Während die Durchführung der IFM einfach und schnell ist, erfordert die Auswertung einige Erfahrung. An ungealterten Probekörpern mit bekannter Zusammensetzung konnten die gesuchten Proteine mehr oder weniger deutlich nachgewiesen und lokalisiert werden. Eine Lokalisierung mehrerer Proteine war durch eine Wiederholung der Untersuchung nach Trocknung und Zwischenschliff an einer einzigen Probe möglich. Dennoch zeigten sich deutlich die Schwierigkeiten bei der Anwendung an Proben von Kunstwerken. Hier ist vor allem das Fluoreszenzvermögen der Materialien innerhalb der Probe, aber auch das Quellen von Schichten und Herauswaschen von wasserlöslichen Stoffen durch die verschiedenen Waschgänge zu nennen. Zudem kann es aufgrund des heterogenen Materialgefüges einer Probe zu unspezifischen Anlagerungen der Antikörper kommen, die sich auch durch Waschen nicht mehr vollständig entfernen lassen. Letztlich ist aber die Zugänglichkeit der gesuchten Antigene an der Oberfläche des Anschliffs für die spezifischen Antikörper entscheidend. Diese wird durch Materialmischungen, aber vor allem durch die Verringerung der Immunreaktivität durch Proteindegradation beeinträchtigt. Das ist vermutlich auch der Grund, weshalb der Nachweis an gealtertem,

realem Probenmaterial mittels IFM bisher nur in wenigen Einzelfällen erfolgreich war (Heginbotham et al. 2006).

Die Schwierigkeiten bei der Anwendung des IFM zur Lokalisierung der Proteine an Anschliffen haben in der jüngeren Vergangenheit vereinzelt zu neuen Ansätzen geführt, die zumeist auf erhöhtem instrumentellen Aufwand basieren. Schäfer (2013) empfiehlt zur Vorbehandlung der Proben eine Fixierung mit Formaldehyddämpfen, um das Quellen der Schichten und Herauswaschen der Proteine zu verringern. Vagnini et al. (2007) schlagen die Verwendung der konfokalen Mikroskopie vor. Sie erlaubt Aufnahme von vielen Bildern in verschiedenen Schärfeebenen und macht somit die Erstellung von scharfen, dreidimensionalen Bildern möglich. Cartechini et al. (2010) verwenden zur Lokalisierung von Proteinen sogenannte *quantum* oder *Q-dots* (Quantenpunkte). Das sind anorganische Nanokristalle ( $\emptyset$  2-10 nm) aus der Halbleiterindustrie (zusammengesetzt aus Elementen der Gruppen II-VI und II-V), die als neuartige Fluorochrome verwendet werden und sich mit Antikörper koppeln lassen. Sie zeichnen sich durch hohe Quantenausbeuten, breite Absorptionsspektren und größenabhängige, schmale Emissionsbanden aus und haben zudem eine hohe Photostabilität (Frasco & Chaniotakis 2010). Je nach Größe und chemischer Verbindung emittieren die *Q-dots* Licht unterschiedlicher Wellenlänge, die durch eine einzige Wellenlänge gleichzeitig angeregt werden können. Das eröffnet neue Möglichkeiten für den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Zielmoleküle innerhalb einer Probe (*multiplex detection*).

Arslanoglu et al. (2010b) kombinieren moderne Raman-Spektroskopie mit immunologischen Techniken und rücken damit von direkten bildgebenden Verfahren ab. Durch Markierung der Antikörper mit so genannten *Surface-enhanced Raman scattering* (SERS) Nano-Partikeln (Marker: trans-1,2-bis(4-pyridyl)-ethylen) können durch Abrastern der einzelnen Farbschichten eines Anschliffs mit dem Laserstrahl die Raman-aktiven Moleküle mittels Raman Spektroskop detektiert werden, falls die Antikörper an das gesuchte Antigen gebunden haben. Die Autoren begründen den Vorteil dieser Technik darin, dass es durch das markante SERS Signal neben einer Erhöhung der Empfindlichkeit auch zu einer Verringerung der Störung durch andere Farbstoffe/Pigmente in der Probe kommt. Zudem scheinen SERS markierten Antikörper aufgrund ihrer Größe (120 nm) nicht in die Oberfläche der Probe einzudringen, so dass falsch-positiv Ergebnisse, durch Penetration und Anlagerung in dem heterogenen Probengefüge, ausbleiben. Sowohl die Markierung von Antikörpern mit *Q-dots* als auch mit SERS Nano-Partikeln zeigen erhebliche Fortschritte zur Lokalisierung der Proteine am Anschliff, allerdings bleibt das Grundproblem der Zugänglichkeit der Proteine durch Degradation und Materialmischungen bestehen. Darüber hinaus sind diese Verfahren mit dem Einsatz kostenintensiver Instrumente (Laserscanning Mikroskop, Raman-

Spektroskop) verbunden, die üblicherweise nicht zur typischen Laborausstattung in Museen zählen.

Immunologische Methoden wurden für die medizinische und biochemische Forschung entwickelt und sind nicht einfach in andere Bereiche übertragbar. Daher zeigt auch die ELISA Technik bei der Anwendung an Proben von Kunstwerken Einschränkungen und Bereiche, in denen es noch weiterer Forschung bedarf. Hier wird vor allem auf die Schwierigkeiten bei der Extraktion, den Einfluss von Materialalterung sowie Pigmenten auf den ELISA Nachweis verwiesen.

Die Erhöhung der Empfindlichkeit kann zudem über das verwendete Substrat gesteuert werden und sollte systematisch durchgetestet werden. Hier sind neben ABTS für die Meerrettich Peroxidase, vor allem oPD (o-Phenylendiamin) und TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu nennen.

Eine Erweiterung von tierarten- oder gattungsspezifischer Antikörper ist theoretisch möglich, aber aufgrund der limitierten Probenmengen, die für Analysen in der Regel zur Verfügung stehen, wenig praktikabel, da sich die Probenmenge nach der Anzahl der eingesetzten Antikörper richtet. Zur Identifizierung der Tierart sei an dieser Stelle auf molekularbiologische Verfahren verwiesen, die sich mit der Entschlüsselung und Identifizierung der DNA und RNA beschäftigen, deren Einsatz zur Identifizierung von Bindemitteln an Proben von Kunstwerken bisher aber nur vereinzelt erprobt wurde (Albertini et al. 2011).

Bezüglich der Herstellung weiterer Antikörper wäre zu überlegen, Antikörper gegen partiell denaturierte Proteine herstellen zu lassen, um leicht veränderte (degradierte) Epitope besser nachweisen zu können. Solche Spezialanfertigungen sind kostspielig, aber könnten letztlich zu geeigneteren Antikörpern für die Anwendung in der Restaurierung führen. Voraussetzung ist allerdings, dass eine entsprechende degradierte, homogene Materialprobe zur Verfügung steht, injizierbar und immunogen ist.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass immunologische Verfahren und insbesondere die ELISA Technik sich als wichtiges Hilfsmittel bei der Analyse von Bindemitteln bewährt hat und zukünftig als Erweiterung der Analyseverfahren zur Untersuchung von Kunstobjekten mit aufgenommen werden sollte.

## 10 Verzeichnisse

### 10.1 Literaturverzeichnis

AKIYAMA, Y.; EDA, S.; KATO, K. (1984): Gum arabic is a kind of arabinogalactan-protein. *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 235-237

ALBERTINI, E.; RAGGI, L.; VAGNINI, M.; SASSOLINI, A.; ACHILLI, A.; MARCONI, G.; CARTECHINI, L.; VERONESI, F.; FALCINELLI, M.; BRUNETTI, B. G.; MILIANI, C. (2011): Tracing the biological origin of animal glues used in paintings through mitochondrial DNA analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 2987–2995

ALTMAN, D. G. & BLAND, J. M. (1995): Absence of evidence is not evidence of absence. *British Medical Journal Statistics Notes* 311: 485

ANDERSON, J. (1994): Fixing Pastels: A Letter from Liotard to the 2nd Earl of Bessborough in 1763. *The Burlington Magazine* 13: 23-25

ANDERSON, D. & MORRISON, N. (1989): The characterization of four proteinaceous Acacia gums which are not permitted food additives. *Food Hydrocolloids* 3: 57-63

ANDERSON, D. & GRANT, D. (1988): The chemical characterization of some Astragalus gum exudates. *Food Hydrocolloids* 2, 5: 417–423

ANDREIEW, N. (1927): Testing the application of the biological method for detecting the binding media of paintings. *Muzeinoe delo* 6: 5

ANDREOTTI, A.; BONADUCE, I.; COLOMBINI, M. P.; GAUTIER, G.; MODUGNO, F.; RIBECHINI, E. (2006): Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous, and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample. *Analytical Chemistry* 78: 4490-4500

ARRHENIUS, S. (1907): *Immunochemie*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig

ARSLANOGLU, J. & SCHULTZ, J. (2009): Immunology and Art: Using antibody-based techniques to identify proteins and gums in binding media and adhesives. *The Metropolitan Museum of Art Bulletin, New York, Vol. LXVII, 1*: 40-46

ARSLANOGLU, J.; SCHULTZ, J.; LOIKE, J.; PETERSEN, K. (2010a): Immunology and art: Using antibody-based techniques to identify proteins and gums in artwork. *Journal for Bioscience* 35, 1: 3-10

ARSLANOGLU, J.; ZALESKI, S.; LOIKE, L. (2010b): An improved method of protein localization in artworks through SERS nanotag-complexed antibodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 9: 2997-3010

ASCENZI, A.; BRUNORI, M.; CITRO, G.; ZITO, R. (1985): Immunological Detection of Hemoglobin in Bones of Ancient Roman Times and of Iron and Eneolithic Ages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 21: 7170-7172

BALTES, W. (2000): *Lebensmittelchemie*. Aufl. 5, Springer Verlag: Heidelberg

BARLOW, C. Y.; EDWARDS, P. P.; MILLWARD, G. R.; RAPHAEL, R. A.; RUBIO, D. J. (1988): Wood treatment used in Cremonese instruments. *Nature* 332: 313

BARLOW, C. Y. & WOODHOUSE, J. (1989a): Firm ground? A detailed analysis of ground layers under the microscope. Part I. *The Strad* 100: 195-197

BARLOW, C. Y. & WOODHOUSE, J. (1989b): Firm ground? A detailed analysis of ground layers under the microscope. Part II. *The Strad* 100: 275-278

BARLOW, C. Y. & WOODHOUSE, J. (1990): Bottomless pits? Microscopic examination of spruce from old Italian violins. *Journal of Microscopy* 160: 203-211

BARTOLL, J. (2008): The early use of Prussian blue in paintings. 9th International Conference on NDT of Art, Jerusalem Israel, 25-30 May

BÄSCHLIN, N. (1994): Fluoreszenzmikroskopie. Möglichkeiten und Grenzen dieser Untersuchungsmethode bei der Auswertung von Schichtquerschliffen. *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK)* 8, 2: 318-336

BARNARD, H.; AMBROSE, S. H.; BEEHR, D. E.; FORSTER, M. D.; LANEHART, R. E.; MALAINEY, M. E.; PARR, R. E.; RIDER, M.; SOLAZZO, C.; YOHE II, R. M. (2007): Mixed Results of Seven Method for Organic Residue Analysis applied to one Vessel with the Residue of a known Foodstuff. *Journal of Archaeological Science* 34: 28-37

BARTL, A.; KREKEL, C.; LAUTENSCHLAGER, M.; OLTROGGE, D. (Hg.) (2005): *Der "Liber illuministarum" aus Kloster Tegernsee*. Edition, Übersetzung und Kommentar der kunsttechnologischen Rezepte. Veröffentlichung des Instituts für Kunsttechnik und Konservierung am Germanischen Nationalmuseum: Nürnberg, Buch 8. Franz Steiner Verlag: Stuttgart

BAUMEISTER, M. (1988): Die Fluoreszenzmikroskopie als Untersuchungsmethode für historische Möbeloberflächen. *Restaura* 2: 100-104

BAUMEISTER, M.; EDELSTEIN, B.; RIZZO, A.; GAMBIRASI, A.; HAYES, T.; KEPPLER, R.; SCHUTLZ, J. (2010): A splendid welcome to the „house of praises, glorious deeds and magnanimity“. In: Rozeik, C., Roy, A. and Saunders, D. (Hg.): *Conservation and the Eastern Mediterranean*. International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works (IIC), Contributions to the Istanbul Congress, 20-24 September 2010. London: IIC: 126-133

BAUMER, U.; DIETEMANN, P.; FIEDLER, I. (2011): Nicht nur Leim – Analyse der Binde- und Klebemittel der Münchner Boulle-Möbel. In: Renate Eikermann (Hg.):

Prunkmöbel am Münchner Hof. Barocker Dekor unter der Lupe. Katalog zur Ausstellung am Nationalmuseum München: 139-143

BEUTEL, S. (2000): Innovative Verfahren zur enzymatischen Abnahme von schädigenden Kaseinüberzügen auf Wandgemälden. Dissertation, Universität Hannover, Fachbereich Chemie, Hannover

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. (2009): Food chemistry. 4th revised and extended ed. Springer Verlag: Berlin

BERSON, S. A. & YALOW, R. S. (1959): Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648-1649

BRACHERT, T. (2001): Lexikon historischer Maltechniken. Veröffentlichung des Instituts für Kunsttechnik und Konservierung im Germanischen Nationalmuseum. Callwey Verlag: München

BRANDMAIR, B. & GREINER, S. P. (Hg.) (2010): Stradivari Varnish. Scientific analysis of his finishing technique on selected instruments. Eigenverlag, Vertrieb: Robert Weindl, [www.stradivarivarnish.com](http://www.stradivarivarnish.com)

BREPOHL, E. (1999): Theophilus Presbyter und das mittelalterliche Kunsthandwerk. Böhlau Verlag: Köln-Weimar – Wien

BRINKMANN, V. (2007): Farben und Maltechnik. In: Bunte Götter, die Farbigkeit antiker Skulptur. Katalog zur Ausstellung im Museum für Kunst und Gewerbe Hamburg: 265-269

BRUYN-OUBOTER, V. (2000): Schäden und Veränderungen von transparenten Überzügen auf Musikinstrumenten. Diplomarbeit, Fachhochschule Köln

BUCHHOLZ, M. (2003): Versuche zur Gewinnung muriner monoklonaler Antikörper zum Tierartennachweis in Lebensmitteln unter Verwendung verschiedener Immunisierungs-Antigenaufbereitungen. Dissertation. Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

BURLEY, R. W. & VADHERA, D. V. (1989): The Avian Egg: Chemistry and Biology. John Wiley & Sons: New York

BURNS, T. (2008): The invention of pastel paintings. Archetype Publications: London

BYRNE, M. (1984): Amino Acid Sequence of Phosvitin Derived from the Nucleotide Sequence of Part of the Chicken Vitellogenin Gene. *Biochemistry* 23: 4275-4279

CAMPBELL, N. A. (1998): Biologie. Jürgen Markl (Hg.). 1. korrigierter Nachdruck. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg

CARTECHINI, L.; VAGNINI, M.; PALMIERI, L.; PITZURRA, T.; MELLO, T.; MAZUREK, J.; CHIARI, G. (2010): Immunodetection of proteins in ancient paint media. *Accounts of Chemical Research* 43, 6: 867-876



CATTANEO, C.; GELSTHORPE, K.; PHILLIPS, P.; SOKOL, R. S. (1990): Blood in ancient human bone. *Nature* 247: 339

CATTANEO, C.; GELSTHORPE, K.; PHILLIPS, P.; SOKOL, R. S. (1992a): Reliable Identification of Human Albumin in Ancient Bone using ELISA and monoclonal Antibodies. *American Journal of Physical Anthropology* 87: 365-372

CATTANEO, C.; GELSTHORPE, K.; PHILLIPS, P.; SOKOL, R. S. (1992b): Detection of blood Proteins in Ancient Human Bone using ELISA: a comparative study of the survival of IgG and Albumin. *International Journal of Osteoarchaeology* 2: 103-107

CENNINI, Cennino (Colle di Val d'Elsa, um 1360 – Anfang des 15. Jhs.): *Il Libro dell'Arte*. Edition siehe: Verkade 1916

CHEN, Q. X.; ZHENG, W. Z.; LIN, J. Y.; SHI, Y.; XIE, W. Z.; Zhou, H. M. (2000): Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32: 879-885

CHIAVARI, G.; LANTERNA, G.; LUCA, C.; MATTEINI, M.; PRATI, S.; SANDU, I.C.A. (2003): Analysis of proteinaceous binders by in-situ pyrolysis and silylation. *Chromatographia* 57: 645-648

CHI-CHEN, W. (1930): Notes on chinese ink. *Metropolitan Museum Studies* 3, 1: 114-133

COERDT, A. (2007): zum Leimen zu gebrauchen. Untersuchungen zu klatflüssigen Glutinleimen – Teil 1. *Restauro* 1: 32-38

COLOMBINI, M. P. & MODUGNO, F. (2004): Characterization of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. *Journal of Separation Science* 27: 147-160

CONDAX, L. M. (1966): Violin Varnishes created by two prominent authors, George Fry and Joseph Michelmann: Their comparison to the Old Masters. *Catgut Acoustical Society Newsletter* 6: 7-11

CONDAX, L. M. (1982): Final summary report of violin varnish research project. *Catgut Acoustical Society Newsletter* 37: 31-36

CRAIG, O. E.; FIGLER, A.; PATAY, P.; COLLINS, M. J.; CHAPMANN, J.; TAYLOR, G. (2003): Milk Jugs' and other Myths of the Copper Age of Central Europe. *European Journal of Archaeology* 6, 3: 251-265

CRÖKER, J. M. (1736): *Der wohl anführende Mahler...* Jena 1736. Nachdr. Mittenwald 1982 mit Einführung und Glossar von Ulrich Schiessl

CROWTHER, J. R. (2001): *The ELISA Guidebook*; Humana Press: Totowa, NJ

DASKALAKIS-MATHEWS, A. C. (1997): A room of "splendor and generosity" from Ottoman Damascus'. *Metropolitan Museum Journal* 32: 111-139

DICKSON, M. B. & WELCH, S. C. (1981): Appendix 1: the canons of painting by Sādiqī Bek'. The Houghton Shahnameh. Harvard University Press: Cambridge MA, Vol. I: 259–269

DEMETER, S. (2006): Studien zur Boule-Technik. Drei Schreibkommoden aus der Zeit von Kurfürst Max Emanuel im Bayerischen Nationalmuseum. Diplomarbeit Technischen Universität München, Lehrstuhl für Restaurierung, Kunsttechnologie und Konservierungswissenschaft. München

DESHPANDE, S. S. (1996): Enzyme Immunoassays: From concept to product development. Chapman & Hall: New York

DOERNER, M. (1985): Malmaterial und seine Verwendung im Bilde. 16. Auflage, neu bearbeitet von Hans Gert Müller. Enke Verlag: Stuttgart

DOERNER, M. (2011): Malmaterial und seine Verwendung im Bilde. 24 Auflage hrsg. Thomas Hoppe. Christophorus Verlag: Freiburg

DOMENECH-CARBO, M. T. (2008): Novel Analytical Methods for Characterizing Binding Media and Protective Coatings in Artworks. *Analytica Chimica Acta* 621: 109-139

DROR, Y.; COHEN, Y.; YERSHALMI-ROZEN, R. (2006): Structure of gum arabic in aqueous solution. *Journal of Polymer Science: Part B Polymer Physics* 44: 3265-3271

DUDA, D. (1971): Innenarchitektur syrischer Stadthäuser des 16.-18. Jahrhunderts. Die Sammlung Henri Pharaon in Beirut. *Beiruter Texte und Studien*. Wiesbaden

DUHAMEL DE MONCEAU, J. H. (1772): Die Kunst verschiedene Arten von Leim zu Machen....(Schauplatz der Künste und Handwerke, Bd. 1). Leipzig – Königsberg (Kanter)

DUNKERTON, J. (1997): Modifications to traditional egg tempera techniques in fifteenth century Italy. In: *Early Italian Paintings: Techniques and Analysis*, Symposium, Maastricht, 9-10 October 1996. Bakkenist, T.; Hoppenbrouwers R.; Dubois H. (Hg.) Maastricht: Limburg Conservation Institute: 29–34

ECHARD, J. P. (2004): In situ multi-element analyses by energy-dispersive X-ray fluorescence on varnishes of historical violins. *Spectrochimica Acta Part B* 59: 1663-1667

ECHARD, J. P.; BENPOIT, C.; PERIS-VICENTE, J.; MALECKI, V.; GIMENO-ADELANTADE, J. V.; VAIEDELICH, S. (2007): Gas chromatography/mass spectrometry characterization of historical varnishes of ancient Italian lutes and violins. *Analytica Chimica Acta* 584: 172-180

ECHARD, J. P. & LAVÉDRINE, B. (2008a): Review on the characterisation of ancient stringed musical instruments varnishes and implementation of an analytical strategy. *Journal of Cultural Heritage* 9: 420-429

ECHARD, J. P.; COTTE, M.; DOORYHEE, E.; BERTRAND, L. (2008b): Insights into varnishes of historical musical instruments using synchrotron micro-analytical methods. *Applied Physics A* 92 (2008): 77-81

ECHARD, J. P.; BERTRAND, L.; VON BOHLEN, A.; LE HÔ, A.; PARIS, C.; BELLOT-GURLET, L.; SOULIER, B.; LATTUATI-DERIEUX, A.; THAO, S.; ROBINET, L.; LAVÉDRINE, B.; VAIEDELICH, S. (2010): Zusammensetzung und Aufbau des berühmten Stradivari-Lackes. *Angewandte Chemie* 122: 202-206

EIKELMANN, R. (Hg.) (2011): Prunkmöbel am Münchner Hof. Barocker Dekor unter der Lupe. Katalog zur Ausstellung am Bayerischen Nationalmuseum München

EISELE, J. A.; FOWLER, D. D.; Haynes, G.; LEWIS, R. A. (1995): Survival and detection of blood residues on stone tools. *Antiquity* 66: 36-46

ELIAS, H. G. (2009): Makromoleküle: Chemische Struktur und Synthesen. Sechste, vollständig überarbeitete Auflage. John Wiley & Sons: Weinheim

ENGVALL, E. & PERLMANN, P. (1971): Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 874-879

EKINS, R. P. (1960): The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clinica Chimica Acta* 5: 453-459

EURING, M. (2008): Einsatz von Mediatoren bei der enzymatischen Aktivierung der fasereigenen Bindekräfte zur Herstellung von enzymgebundenen, bindemittelfreien Holzwerkstoffen. Dissertation, Georg-August-Universität, Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie. Göttingen

FIEDEL, S. J. (1995): Blood from stones? Some Methodological and Interpretive Problems in Blood residue Analysis. *Journal of Archaeological Science* 23, 1: 139-147

FIEDLER, I. (2001): Anorganische Biochemie und Kunst: Zur Stabilität proteinhaltiger Matrices in Gegenwart anorganischer Pigmente. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

FIEDLER, I. & WALCH, K. (1997): Fluoreszenzunterschiede von Leimen an Furnieren. In: Walch, K.; Koller, M.: Lacke des Barock und Rokoko. Arbeitshefte des Bayerischen Landesamt für Denkmalpflege, Bd. 81, Edition Lipp.: München: 297-304

FLORIAN, M. L. E. (2007): Protein Facts: Fibrous Proteins in Cultural Artifacts. Archetype Books: London

FONTANA, E.; FRIEDEMANN, H.; MARTIUS, K. (1999): Historische Lacke und Beizen auf Musikinstrumenten in deutschsprachigen Quellen bis 1900. Veröffentlichung des Instituts für Kunsttechnik und Konservierung im Germanischen Nationalmuseum. 3., überarb. und erw. Aufl. – Germanisches Nationalmuseum Nürnberg

FRANKE, H. (1962): Kultergeschichtliches über die chinesische Tusche. Bayerische Akademie der Wissenschaften, Philosophisch-historisch Klasse, Abhandlungen 54: 1–157

FRANKE, F. & SCHWARZ, R. (2011): Erforschen, konservieren, dokumentieren – Die Arbeiten an den Prunkmöbeln in Boulle Technik von Johann Puchwiser. In: Renate Eikelmann (Hg.): Prunkmöbel am Münchner Hof. Barocker Dekor unter der Lupe. Katalog zur Ausstellung am Nationalmuseum München, 2011: 111-131

FREMOUT, W.; DHAENENS, M.; SAVERWYNS, S.; SANYOVA, J.; VANDENABEELE, P.; DEFORCE, D.; MOENS, L. (2010): Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 658: 156-162

FRIEMEL, H. (1984): Immunologische Arbeitsmethoden. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag: Jena

FULTON, W. M. (1988): Turpentine violin varnish. Fulton: San Diego

GAUTIER, G. & COLOMBINI, M. P. (2007): GC/MS identification of proteins in wall painting samples: A fast clean-up procedure to remove copper-based pigments interferences. *Talanta* 73: 95-102

GEIßINGER, K. (2006): Leim aus Hecht- und Karpfenschwimmblasen – eine mögliche Alternative zu Störleim?. Diplomarbeit, Staatliche Akademie der Bildenden Künste Stuttgart, Studiengang Konservierung und Restaurierung von Gemälden und gefassten Skulpturen. Stuttgart

GERLACH, S. G.; NEWMAN, M.; KNELL, E. J.; HALL Jr., E.S. (1996): Blood Protein Residues on Lithic Artifacts from Two Archaeological Sites in the De Long Mountains, Northwestern Alaska. *Arctic* 49, 1: 1–10

GLEESON, P. A.; McNAMARA, M.; WETTENHALL, R. E.; STONE, B. A.; FINCHER, G. B. (1989): Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension-cultured *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) endosperm cells. *Biochemical Journal* 264: 857–862

GORGIEVA, S. & KOKOL, V. (2011): Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives, *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Rosario Pignatello (Hg.), ISBN: 978-953-307-661-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/collagen-vs-gelatine-basedbiomaterials-and-their-biocompatibility-review-and-perspectives>

GÜRTLER SUBAL, C. (1993): Eiklarüberzüge in der Staffelmalerie. *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK)* 7, 1: 219-245

GREBER, J. M. (2003): Die tierschen Leime. Reprint nach Auflage von 1950. Schäfer Verlag: Hannover

GRZYWACZ, C. (1994): Identification of proteinaceous binding media in paintings by amino acid analysis using 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 676: 177-183

HABEL-SCHABLITZKY, A. (1992): Fischblasenleim – Geschichte und Eigenschaften sowie Anwendung in der Holzrestaurierung. Diplomarbeit, Fachhochschule Köln

HALPINE, S. M. (1992): Amino Acid Analysis of Proteinaceous Media from Cosimo Tura's 'The Annunciation with Saint Francis and Saint Louis of Toulouse'. *Studies in Conservation* 37, 1: 22-38

HAMMERL, J. & HAMMERL, R. (Hg.) (1995): Geigenlacke: Wissenswertes über Harze und Grundstoffe für Geigenlacke sowie Ratschläge zur Lackierung. 2. Aufl., Erwin Bochinsky Verlag: Frankfurt am Main

HARLOW, E. & LANE, D. (1999): Using Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York

HAUPT, T. (2000): Zubereitung von Störleim. Diplomarbeit, Staatliche Akademie der Bildenden Künste Stuttgart, Institut für Technologie der Malerei. Stuttgart

HAUPT, T. (2005): Zubereitung von Störleim. Auswirkungen der Zubereitungstemperatur und -zeit auf Viskosität, Gelierverhalten und Molekulargewicht. *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK)* 1: 318–328

HEGINBOTHAM, A.; MILLAY, V.; QUICK, M. (2006): The Use of Immunofluorescence Microscopy (IFM) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) as Complementary Techniques for Protein Identification in Artists' Materials. *Journal of the American Institute for Conservation* 45, 2: 89-106

HERACLIUS (12. Jh.): *De Coloribus et Artibus Romanorum*. Edition: ILG 1873

HIGGITT, C. & WHITE, R. (2005): Analysis of Paint Media: New Studies of Italian Paintings of the Fifteenth and Sixteenth Centuries. *National Gallery Technical Bulletin* 26: 88–97

HODGINS, G. & HEDGES, R. (1998): The immunological detection of collagen based paints and adhesives in art and artifacts. In: *Art et chimie, la couleur: Congrès International sur l'apport de la chimie aux oeuvres d'art*, Paris: 16–18

HODGINS, G. & HEDGES, R. (1999): A systematic investigation of the immunological detection of collagen-based adhesives. In: *Sixth International Conference on Non-destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of the Cultural and Environmental Heritage*, Rome: 1795–1810.

HODGINS, G. (1999): Investigating Methods of Identifying Pre-Renaissance Artists' Paints and Glues. PhD thesis. University of Oxford, UK

HODGINS, G. & HEDGES, R. (2000): Towards the immunological detection of media: the Detection of artificially aged collagen-based paints. *Art et chimie, la couleur: actes du Congrès/sous la direction de Jacques Goupy et Jean-Pierre Mohen*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris: 75-79

HORIE, V. (2010): *Materials for Conservation: Organic Consolidants, Adhesives and Coatings*. Routledge: London

HUNTINGTON, J. A. & STEIN, P. E. (2001): Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B* 756, 1-2: 189-198

HYLAND, D. C.; TERSAK, J.; ADOVASIO, J. M.; SIEGEL, M. I. (1990): Identification of the Species of Origin of Residual Blood on Lithic Material. *American Antiquity* 55, 1: 104-112

HYNEK, R.; KUCKOVA, S.; HRADILOVA, J.; KODICEK, M. (2004): Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 1896-1900

ILG, A. (Hg.) (1873): *Heraclius. Von der Farben und Künsten der Römer. Quellenschriften für Kunstgeschichte und Kunsttechnik des Mittelalters und der Renaissance*, Bd. 4). Wien, Nachdr. Osnabrück 1970

ILISIUS, M. & RIEDERER, J. (1996): Die Pigmente des Aleppo-Zimmers“. In: Gonnella, J. (Hg.): *Ein christlich-orientalisches Wohnhaus des 17. Jahrhunderts aus Aleppo (Syrien). Das ‘Aleppo-Zimmer’: Museum für Islamische Kunst, Staatliche Museen zu Berlin und Preußischer Kulturbesitz*. Verlag Phillip von Zabern: Mainz: 71-73

JOHNSON, M. & PACKARD, E. (1971): Methods used for the identification of binding media in Italian paintings of the fifteenth and sixteenth centuries. *Studies in Conservation* 16, 4: 145-164

JONES, P. L. (1962): Some observation on methods for identifying proteins in paint media. *Studies in Conservation* 7, 1: 10-16

KARPOWICZ, A. (1981): Ageing and deterioration of proteinaceous media. *Studies in Conservation* 26, 4: 153-160

KECK, S. & PETERS, T. (1969): Identification of protein-containing paint media by quantitative amino acid analysis. *Studies in Conservation* 14: 75-82

KHANDEKAR, N. & PHENIX, A. (2000): Some observations on the effects of a selection of pigments on an artificially aged egg tempera paint film. *The Australian Institute for the conservation of cultural material AICCM Bulletin* 25: 1-7

KIRBY, D. P.; ARSLANOGLU, J.; RIZZO, A.; SCHULTZ, J. (2010): Identification of Proteins in Works of Art: Combined Use of MALDI Mass Fingerprinting and ELISA. Poster at the 58<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, Utah 23-27 May 2010

KIRBY, D. P.; KHANDEKAR, N.; ARSLANOGLU, J. SUTHERLAND. K. (2011): Protein Identification in Artworks by Peptide Mass Fingerprinting. Preprints: 16th triennial ICOM-CC conference in Lisbon, 19-23 September 2011

KLAUSMEYER, P. A. (2009a): An immunological approach to the analysis of art materials: the effect of aging and pigment interaction on antigenic detection of proteinaceous paint binding media using an improved protocol for enzyme-linked immunosorbent assays. Dissertation, Clark University, Worcester, Massachusetts

KLAUSMEYER, P. A.; ALBERTSON, R. P.; SCHMIDT, M. R.; WOODLAND, R. T.; BLEWETT, M. (2009b): Analysis and treatment of a painting by Kees van Dongen: FTIR and ELISA as complementary techniques in the analysis of art materials. E-Presentation Science 6: 151-162

KNOX, J. P.; LINSTED, P. J.; PEART, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. (1991): Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. Plant Journal 1: 317-326.

KOCKAERT, L.; GAUSSET, P.; DUBI-RUCQUOY, M. (1989): Detection of ovalbumin in paint media by immunofluorescence. Studies in Conservation 34, 4: 183-188

KÖNIG, R. (Hg.) (1978): C. Plinii Secundi Naturalis Historiae libri XXXVII. Buch XXXV. Artemis & Winkler: München

KÖNIG, R. (Hg. und Überarb.) (1989): C. Plinii Secundi Naturalis Historiae libri XXXVII. Buch XXXIII. Artemis & Winkler: München

KOVACS-MRAVIK, P. (2010): A little known Damascus Room in the Museum of Applied Arts, Budapest. In: Rozeik, C., Roy, A. and Saunders, D. (Hg.): Conservation and the Eastern Mediterranean. International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works (IIC), Contributions to the Istanbul Congress, 20-24 September 2010. London: IIC: 281

KUCKOVA, S.; NEMEC, I.; HYNEK, R.; HRADILOVA, J.; GRYGAR, T. (2005): Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art work. Analytical and Bioanalytical Chemistry 382: 275-282

KUCKOVA, S.; CRHOVAC, M.; VANKOVAC, L.; HNIZDAD, A.; HYNEKC, R.; KODICEKC, M. (2009): Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials. International Journal of Mass Spectrometry 284: 42-46

KÜHN, H. (1988): Farbmaterialien, Pigmente und Bindemittel. Reclams Handbuch der künstlerischen Techniken Bd. 1., 2. Aufl., Reclam Philipp, jun. GmbH Verlag: Stuttgart: 11-52

KÜHN, H. (1974): Erhaltung und Pflege von Kunstwerken und Antiquitäten mit Materialkunde und Einführung in künstlerische Techniken. Keyzersche Verlagsbuchhandlung München

LANGE, S. (2002): Etablierung von neuen Methoden zur Herstellung rekombinanter Antikörper und zur spezifischen Selektion von Antikörpervarianten im hohen Durchsatz. Dissertation. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart

LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. (2002): Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. *Journal of Immunological Methods* 270: 19-26

LEUPOLD, C. (2006): Rosafarbene Bakterien auf Wandflächen. Untersuchung zu den Wachstumsbedingungen. Diplomarbeit, HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst Hildesheim/ Holzminde/ Göttingen. Fachbereich Restaurierung und Konservierung. Hildesheim

LOTTSPREICH, F. & ENGELS, J. (Hg.) (2006): *Bioanalytik*. 2. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg

LOWENSTEIN, J. M. (1980): Species-specific proteins in fossils. *Naturwissenschaften* 67: 343-346

LOWENSTEIN, J. M.; BORJA, C.; GARCIA-OLIVARES, E. (1999): Species-specific albumin in fossil bones from Orce, Granada, Spain. *Human Evolution* 14, 1-2: 21-28

LOWENSTEIN, J. M.; REUTHER, J. D.; HOOD, D. G.; SCHEUENSTUHL, G.; GERLACH, S. C.; UBELAKER, D. H. (2006): Identification of animal species by protein radioimmunoassay of bone fragments and bloodstained stone tools. *Forensic Science International* 159: 182-188

LUTTMANN, W.; BRATKE, K.; KÜPPER, M.; MYRTEK, D. (2009): *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. (2001): *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Berlin

MAZUREK, J. (2006): Identification of Proteins in Work of Art by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). MSc thesis in Biology, California State University Northridge, Los Angeles, CA

MAZUREK, J.; HEGINBOTHAM, A.; SCHILLING, M.; CHIARI, G. (2008): Antibody Assay to Characterize Binding Media in Paint. *ICOM Committee for Conservation, Vol. 2: 678-685*

MAZUREK, J. & PORTER, J. (2009): The Effects of environmental Deteriogens in the ELISA Analysis of organic Media used in Wall Paintings. Unpublished Presentation, 37<sup>th</sup> Annual AIC conference, Los Angeles, CA

MAZUREK, J. (2010): Antibodies and Art: Characterization of Albumen and Gelatin on Paper. *International Preservation News* 50: 17-20

MILLS, J. S. & WHITE, R. (1994): *The organic chemistry of museum objects*. 2nd rev. ed. Butterworth-Heinemann: London



MINORSKY, V. (Übers.) (1959): Calligraphers and painters: A treatise by Qadi Ahmad, Son of Mir Munshi (circa A.H. 1015/A.D. 1606). In: Smithsonian Institution, Freer Gallery of Art, Occasional Papers 3, 2, Washington, D.C.: 174–201

MIRIMANOW, W. (1973): Kunst der Urgesellschaft. Verlag der Kunst, Dresden: 79-156

MÖHLENHOFF, P. (2002): Untersuchungen zum Gefahrenpotential von Mikroorganismen (Mikromyceten) in Museen – Materialschädigung und Gesundheitsgefährdung. Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Fachbereich Biologie, Geo- und Umweltwissenschaften. Oldenburg

NAGYVARY, J. (1988): The chemistry of a Stradivarius. Chemical and Engineering News 66: 24-31

NEVIN, A.; OSTICIOLI, I.; ANGLOS, D.; BURNSTOCK, A.; CATHER, S.; CASTELLUCCI, E. (2007): Raman Spectra of Proteinaceous Materials Used in Paintings: A Multivariate Analytical Approach for Classification and Identification. Analytical Chemistry 79: 6143-6151

NEWMAN, R. & SERPICO, M. (2000): Adeshives and binders. In: Nicholson, P.; Shaw, I (Hg.): Ancient Egyptian Materials and Technology. Cambridge University Press: Cambridge: 475-494

NIPPA, A.; FÄßLER, A.; SIEGEL, U. (1998): Das Damaskus-Zimmer aus dem Staatlichen Museum für Völkerkunde Dresden. Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK) 12, 1: 144-155

NISBET, A.D.; SAUNDRY, R., MOIR, A.; FETHERGILL, L. (1981): The complete amino acid sequence of hen ovalbumin. European Journal of Biochemistry 115: 335-345

NUSSINOVITCH, A. (2009): Plant Gum Exudates of the World: Sources, Distribution, Properties, and Applications. CRC Press: Boca Raton, Florida

PANHELEUX, M.; NYS, Y.; WILLIAMS, J.; GAUTRON, J.; BOLDICKE, T.; HINCKE, M. T. (2000): Extraction and Quantification by ELISA of Eggshell Organic Matrix Proteins (Ovocleidin-17, Ovalbumin, Ovotransferrin) in Shell from Young and Old Hens. Poultry Science 79: 580-588

PARSCHE, F. & NERLICH, A. G. (1997): Suitability of immunohistochemistry for the determination of collagen stability in historic bone tissue. Journal of Archaeological Science 24: 275-281

PHENIX, A. (1997): The composition and chemistry of eggs and egg tempera. In: Early Italian Paintings: Techniques and Analysis, Symposium, Maastricht, 9-10 October 1996. Bakkenist, T.; Hoppenbrouwers R.; Dubois H. (Hg.) Maastricht: Limburg Conservation Institute: 11-20

PIENING, H. & STEGE H. (2007): Pigmentanalysen an den Skulpturen des Aphaiaheiligtums auf Ägina. In: Brinkmann, V.; Hornbostel, W.; Wünsche, R. (Hg.):

Bunte Götter. Die Farbigkeit antiker Skulptur. Ausstellungskatalog, Museum f. Kunst u. Gewerbe; 4., erw. u. überarb. Aufl., Museum für Kunst und Gewerbe: Hamburg: 202-205

PIENING, H. (2007): Ein farbiges Vermächtnis – die Farbmittel am Alexander Sarkophag. In: Brinkmann, V.; Hornbostel, W.; Wünsche, R. (Hg.): Bunte Götter. Die Farbigkeit antiker Skulptur. Ausstellungskatalog, Museum f. Kunst u. Gewerbe; 4., erw. u. überarb. Aufl., Museum für Kunst und Gewerbe: Hamburg: 120-121

PLINIUS SECUNDUS, C. (23-79 n. Chr.): *Naturalis Historiae libri XXXVII* ("Naturkunde"). Edition siehe: KÖNIG 1978 und 1989

POLLENS, S. (2009): Recipe for success. The chemical analysis of Stradivari's varnish. *The Strad* 120: 34-38

POLLEYN, F. (1909): *Die Appreturmittel und ihre Verwendung*. Hartlebens' Verlag: Wien - Leipzig

PORTER, J. (2007): *ELISA in the Analysis of proteinaceous media in wall paintings*. MA Thesis, Courtauld Institute of Art, London

PRESTEL, J. (1912): *Zehn Bücher über Architektur des Marcus Vitruvius Pollio / übersetzt u. erläutert von J. Prestel*. Heitz: Strassburg

RAFT, A. (1982): Die Quellentexte zur Verwendung besonderer Bindemittel für blaue Farbe. *Restauro* 88, 2: 112-119

RAMIREZ-BARAT, B. & DE LA VINA, S. (2001): Characterization of Proteins in Paint Media by Immuno-fluorescence: a Note on Methodological Aspects. *Studies in Conservation* 46, 4: 282-288

REICHMANN, G. (2003): *Der Echte Hausschwamm Serpula lacrymans* (Wulf. Fr.) Schroeter – Möglichkeiten der Anwendung spezieller Nachweisverfahren an Kunst- und Kulturgut. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Fachbereich Biologie, Geo- und Umweltwissenschaften. Oldenburg

REINKOWSKI-HÄFNER, E. (1994): Tempera – Zur Geschichte eines maltechnischen Begriffs. *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK)* 8, 2: 297-317

RIZZO, A.; BAUMEISTER, M.; EDELSTEIN, B.; GAMBIRASI, A., SCHARRAHS, A. with contributions by SCHULTZ, J.; KIRBY, D. P. (2010): A rediscovered opulence: the surface decoration of an early 18th century Damascene reception room at The Metropolitan Museum of Art. In: *Post prints of the 4th International Architectural Paint Research Conference sharing Information, Sharing decisions*; University of Lincoln, UK, 3<sup>rd</sup>-6<sup>th</sup> August 2010, Archetype Publications, London, forthcoming

ROLFES, H. (1991): *Anwendung und Entwicklung immunologischer Verfahren zum Nachweis von Bakterien auf Wandgemälden*. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Fachbereich Biologie, Geo- und Umweltwissenschaften. Oldenburg

RONCA, F. (1994): Protein Determination in Polychromed Stone Sculptures, Stuccoes and Gesso Grounds. *Studies in Conservation* 39, 2: 107-120

RONFORT, J. N. (2009): Der Beitrag der Wissenschaften zur Erforschung des Werks von André Charles Boulle. In: Ronfort, J. N. (Hg.): André Charles Boulle 1642 - 1732: ein neuer Stil für Europa. Kat. Ausstl., Museum für Angewandte Kunst: Frankfurt a. Main: 103-113

ROUBO, A. J. (1774): *L'art du menuisier*. Bd. 3. Repr. der Ausg. von 1769-1782. Slatkine: Genf, 1984

SANTAMARIA, U. & MORRESI, F. (2007): Die naturwissenschaftlichen Untersuchungen zur Farbigkeit des August von Prima Porta. In: Brinkmann, V.; Hornbostel, W.; Wünsche, R. (Hg.): *Bunte Götter. Die Farbigkeit antiker Skulptur. Ausstellungskatalog, Museum f. Kunst u. Gewerbe; 4., erw. u. überarb. Aufl., Museum für Kunst und Gewerbe: Hamburg: 218-221*

SCHÄFER, S. (2013): A luminescent metal chelate stain and its application protocol for the identification of proteinaceous binding media within paint cross sections. In: Emmerling, E.; Kühenthal, M.; Richter, M. (Hg.): *Lüsterfassungen des Barock und Rokoko/ Coloured Glazes on Metal Leaf from the Baroque and Rokoko*. Anton Siegl Verlag: München: 709-713

SCHARRAHS, A.; WERNER, A.; OTT, C. (2008a): Das Dresdner Damaskus-Zimmer. Ein Kleinod osmanischer Innenarchitektur in Dresden, Museum für Völkerkunde Dresden

SCHARRAHS, A. (2008b): 'Ajamī rooms — polychrome wooden interior decorations from Syria of the 17th to the 19th centuries: a view into art technology and conservation problems'. In: Bridgland, J. (Hg.): *Proceedings of the ICOM Committee for Conservation 15th Triennial Meeting New Delhi*. Allied Publishers, New Delhi, Vol. II: 926-931

SCHARRAHS, A. (2008c): 'Kunsttechnologische Studien zum Aleppo-Zimmer'. In: Gonnella, J.; Kröger, J. (Hg.): *Angels, Peonies, and Fabulous Creatures. The Aleppo Room in Berlin*. International Symposium of the Museum für Islamische Kunst Staatliche Museen zu Berlin, 12.-14. April 2002, Rhema-Verlag: Münster: 179-183

SCHARRAHS, A. (2011): *Ajami-Zimmer - polychrome Wand- und Deckenvertäfelungen repräsentativer Empfangsräume in syrischen Stadthäusern des 17. - 19. Jahrhunderts - Untersuchungen zu Herstellungstechnik, ursprünglichem Erscheinungsbild sowie materieller Alterung und nutzungsbedingter Veränderung*. Dissertation, Hochschule für Bildende Künste Dresden, Kunsttechnologie, Konservierung und Restaurierung von Kunst- und Kulturgut. Dresden

SCHARRAHS, A.; EDELSTEIN, B.; SCHULTZ, J. (2013): Historic 'ajamī interiors in Syrian residences of the 18<sup>th</sup> & 19<sup>th</sup> centuries: research and conservation. In: *Post prints of the Joint Interim Conference on ICOM-CC Heritage Wood: Research & Conservation in 21st Century*, National Museum in Warsaw, 28-30 October 2013, Warsaw, forthcoming

SCHELLMANN, N. C. (2007): Animal glues: a review of their key properties relevant to conservation. *Reviews in Conservation* 8: 55-66

SCHILLING, M. R. & KHANJIAN, H. P. (1996a): Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives. Part 1. Composition of proteins associated with art objects and monuments. *Journal of the American Institute for Conservation* 35: 45-59

SCHILLING, M. R. & KHANJIAN, H. P. (1996b): Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives. Part 2. Effects of pigments and accelerated aging on the identification of proteinaceous binding media. *Journal of the American Institute for Conservation* 35, 2: 123-144

SCHILLING, M. R. & KHANJIAN, H. P. (1996c): Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives. Part 3. Identification of proteinaceous binding media by interpretation of amino acid composition. Preprints of the 11th triennial meeting of the ICOM Committee for Conservation, Edinburgh, UK, 1: 211-219

SCHRAMM, H. P. & HERING, B. (1995): Historische Malmaterialien und ihre Identifizierung. Reprint der 1988 im VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin/DDR erschienen Ausgabe, Enke Verlag: Stuttgart

SCHULTZ, J. (2006): Immunologische Methoden zur Analytik tierischer Bindemittel-Möglichkeiten und Grenzen. Masterarbeit, HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst Hildesheim/ Holzminde/ Göttingen. Fachbereich Restaurierung und Konservierung. Hildesheim

SCHULTZ, J.; ARSLANOGLU, J.; PETERSEN, K. (2010): The use of ELISA for the identification of proteins using the example of a Damascene reception room in The Metropolitan Museum of Art. In: Rozeik, C., Roy, A. and Saunders, D. (Hg.): Conservation and the Eastern Mediterranean. International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works (IIC), Contributions to the Istanbul Congress, 20-24 September 2010. London: IIC: 269

SCHÜTT, C & BRÖKER, B. (2006): Grundwissen Immunologie. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg

SCOTT, D. A.; NEWMAN, M.; SCHILLING, M.; DERRICK, M.; KHANJIAN, H. P. (1996): Blood as a binding Medium in a Chumash Indian Pigment cake. *Archaeometry* 38, 1: 103-112

SCOTT, D. A.; WARMLANDER, S.; MAZUREK, J.; QUIRKE, S. (2009): Examination of Some Pigments, Grounds and Media from Egyptian Cartonnage Fragments in the Petrie Museum, University College London. *Journal of Archaeological Science* 36: 923-932

SENSABAUGH, G. F.; WILSON, A. C.; KIRK, P. L. (1971): Protein stability in preserved biological remains. I. Survival of biologically active protein in eight year old sample of dried blood. *International Journal of Biochemistry* 2: 545-557

SHELLEY, M. (2005): Pastelists at Work: Two Portraits at the Metropolitan Museum by Maurice Quentin de La Tour and Jean Baptiste Perronneau. *Metropolitan Museum Journal* 40: 105-120

SHOWALTER, A. M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1399-1417

SIMONS, V. (1998): Möglichkeiten und Grenzen der Untersuchung von Möbeloberflächen mittels UV-Fluoreszenz. Diplomarbeit, HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst Hildesheim /Holzminden/ Göttingen, Fachbereich Konservierung und Restaurierung. Hildesheim

SMITH, F. & MONTGOMERY, R. (1959): *The Chemistry of Plant Gums and Mucilages and some related Polysaccharides*. Reinhold Publishing Corporation: New York

STADELMAN, W. J. & COTTERILL, O. J. (Hg.) (1995): *Egg Science and Technology*. The Harworth Press: Binghamton, New York

STEGE, H.; FIEDLER, I.; BAUMER, U. (2007): Die Untersuchung der Pigmente und Bindemittel in der Farbfassung der Marmorbüste des Caligula. In: Brinkmann, V.; Hornbostel, W.; Wünsche, R. (Hg.): *Bunte Götter. Die Farbigekeit antiker Skulptur. Ausstellungskatalog, Museum f. Kunst u. Gewerbe; 4., erw. u. überarb. Aufl., Museum für Kunst und Gewerbe: Hamburg: 230-231*

STEPHEN, A.; CHURMS, S.; VOGT, D. (1990): Exudate Gums. *Methods in Plant Biochemistry* 2: 483-522

STRATMANN-DÖHLER, R. (1986): Möbel, Intarsie und Rahmen. *Reclams Handbuch der künstlerischen Techniken Bd. 3., Reclam Philipp, jun. GmbH Verlag: Stuttgart: 139-209*

STRAUB, R. E. (1988): Tafel- und Tüchleinmalerei des Mittelalters. *Reclams Handbuch der künstlerischen Techniken Bd. 1., 2. Aufl., Reclam Philipp, jun. GmbH Verlag: Stuttgart: 125-259*

SUTERMEISTER, E. & BRÜHL, E. (1988): *Das Casein: Chemie und technische Verwertung*. Reprint [d. Ausg.] Berlin, Springer, 1932, Kremer Reprint: Aichstetten

SWIDER, J. R.; HACKLES, V. A.; WINTER, J. (2003): Characterization of Chinese ink in size and surface. *Journal of Cultural Heritage* 4: 175-186

TALBOTT, R. R. (1982): The fluorescent antibody technique in the identification of proteinaceous materials. *Third Annual Conference of Art Conservation Training Programs, Queens University, Kingston Ontario: 140-149*

TEUMER, S. (1993): Pflanzliche Gummen und ihre Anwendung in der Malerei anhand von Quellenschriften für Maltechnik. Semesterarbeit. HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst Hildesheim/ Holzminden/ Göttingen

THEOPHILUS PRESBYTER: *De diversis artibus*. Deutschland, 1. Hälfte des 12. Jhs. Verwendete Edition und Übersetzung: siehe BREPOHL (1999)

THUDE, S. (2005): Strukturelle und immunpharmakologische Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen und einem Arabinan aus *Echinacea* sp.. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Kiel

TOKARSKI, C.; CREN-OLIVE, C.; ROLANDO, C.; MARTIN, E. (2003): Protein studies in cultural heritage. In: Saiz-Jimenez, C. (Hg.): *Molecular Biology and Cultural Heritage*: 219-230

TOKARSKI, C.; MARTIN, E.; ROLANDO, C.; CREN-OLIVE, C. (2006): Identification of Proteins in Renaissance paintings by Proteomics. *Analytical Chemistry* 78: 1494-1502

TREVATHIAN, I. & THIAGARAJAH L. (2010): The Ottoman room at the Islamic Arts Museum Malaysia: a technical study of its methods and materials. In: Rozeik, C., Roy, A. and Saunders, D. (Hg.): *Conservation and the Eastern Mediterranean*. International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works (IIC), Contributions to the Istanbul Congress, 20-24 September 2010. London: IIC: 120-125

TRIVAS, N. S. (1941): Two Formulas by Liotard. *Technical Studies* 10: 29-32

TWILLEY, J. (1984): The analysis of exudates plant gums in their artistic applications: An interim report. *Archaeological Chemistry* 9: 357-399

ULRICH, K. (1990): *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Thieme Verlag: Stuttgart

VAGNINI, M.; PITZURRA, L.; CARTECHINI, L.; MILIANI, C.; BRUNETTI, B. G.; SGAMELLOTTI, A. (2008): Identification of Proteins in Painting Cross-sections by Immuno-Fluorescence Microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 57-64

VERBEKEN, D.; DIERCKX, K.; DEWETTINCK, K. (2003): Exudate gums: occurrence, production and application. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 10-21

VERKADE, W. (Hg. und übersetzt) (1916): *Cennino Cennini, Handbüchlein der Kunst*. Heitz: Straßburg

VITRUV (~ 25 v. Chr.): *De Architectura Libri Decem*. Rom. Edition: PRESTEL 1912

VON BOHLEN, A. & MEYER, F. (1996): Arsen und Blei im Geigenlack. *Restauro* 7: 472-477

VON BOHLEN, A. & MEYER, F. (1997): Microanalysis of old violin varnishes by total-reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B* 52: 1053-1056

WALCH, K. (1997): Transparente Glanzlacke des Barock und Rokoko. I. Rekonstruktion „Weißer Lacke“ aufgrund quellenkundlicher Studien und technischer Untersuchungen. In: Walch, K.; Koller, M.: *Lacke des Barock und Rokoko*.

Arbeitshefte des Bayerischen Landesamt für Denkmalpflege, Bd. 81, Edition Lipp.: München: 21-51

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. (2006): Dairy Science and Technology. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York

WATANABE, Y.; ABURATANI, K.; MIZUMURA, T.; SAKAI, M.; MURAOKA, S.; MAMEGOSI, S.; HONJOH, T. (2005): Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. *Journal of Immunological Methods* 300: 115–123

WEBSTER, D. M.; FISHER, W. K.; KOUREAS, D. D. (1981): Amino acid sequences containing cysteine or cystine residues in ovalbumin from eggs of the quail *Coturnix coturnix japonica*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34 (5-6): 505-14

WEHLTE, K.(2005): Werkstoffe und Techniken der Malerei. überarbeitete Auflage mit Tafelteil, Urania Verlag: Stuttgart

WEHLTE, K. (2009): Werkstoffe und Techniken der Malerei. Neuaufl.. Christophorus Verlag: Freiburg

WHITE, R. (1978): An Examination of Varnish from three Eighteenth Century Musical Instruments. *Proceedings of ICOM Committee for Conservation, 5<sup>th</sup> Triennial meeting Zagreb*. Paris, ICOM: 1-5

WHITE, R. (1984): Varnish: Eighteenth Century Instruments examined. *The Strad* 95: 258-259

WILDE, A. (2006): Zur heutigen Herstellung von Glutinleimen. *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung (ZKK)* 20, 2: 379-406

WILLERS, H. (1980): Herstellung von tierischem Leim und seine Verwendung im Bereich der Tafel- und Fassmalerei nach Angaben deutschsprachiger Quellenliteratur des 16. bis Mitte des 19. Jahrhunderts. Diplomarbeit, Akademie der Bildenden Künste Stuttgart, Studiengang Restaurierung und Technologie von Gemälden und gefassten Skulpturen, Stuttgart

WILLIAMS, J. (1962): Serum proteins and the livetins of hen's egg yolk. *Biochemical Journal* 83: 346-355

WOLBERS, R. & LANDREY, G. (1987): The use of direct reactive fluorescent dyes for the characterization of binding media in cross sectional examination. *AIC Conference Vancouver, AIC preprints*. Washington DC, AIC: 168–202

WOLBERS, R. (1988): Aspects of the Cleaning of a Pair of Portraits Attributed to William and Richard Jennys. *AIC Conference New Orleans, AIC Preprints*. Washington DC, AIC: 245-260

YATES, E. A.; VALDOR, J. F.; HASLAM, S, M.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; MACKIEL, W.; KNOX, J. P. (1996): Characterization of carbohydrate structural

features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 2: 131-139

ZOLLNER, H. (1999): *Handbook of Enzyme Inhibitors*. 3rd revised and enlarged edition, Wiley – VCH: Weinheim

## 10.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Antikörper-Antigen Wechselwirkung (nach Campbell 1998) .....	31
<b>Abbildung 2:</b> sequenzielle, konformationsbedingte, verborgene und nach enzymatischer Spaltung neu entstandene Epitope (nach Lottspeich & Engels 2006) .....	31
<b>Abbildung 3:</b> Struktur eines Antikörpers (vereinfacht).....	33
<b>Abbildung 4:</b> verschiedene heterogene Verfahren (Auswahl) .....	36
<b>Abbildung 5:</b> Herstellung von Primär- und Sekundärantikörpern durch Immunisierung von Wirbeltieren .....	37
<b>Abbildung 6:</b> Prinzip des indirekten ELISA .....	41
<b>Abbildung 7:</b> Beispiel für die Detektion von Ovalbumin und Kasein mit dem HRP/ABTS Detektionssystem (links) und die Detektion von Kollagen mit dem AP/pNPP Detektionssystem (rechts) auf MaxiSorp™ (NUNC #439454) Mikrotiterplatten. a.) Jeweils eine unbekannte Probe/Platte wurde in drei Wiederholungen mit je 4 Verdünnungsstufen (links nach rechts), sowie Positiv- und Negativkontrollen belegt und auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen untersucht. b.) Positivkontrollen = positiv; Negativkontrollen = negativ (keine Farbe). Eindeutige Identifizierung von Ovalbumin und Kasein (links) und Kollagen (rechts). .....	42
<b>Abbildung 8:</b> Anschliff der Probe #PT5 der Probetafel. V.u.n.o.: Grundierung (tierischer Leim/Kreide), grüne Schicht (Kasein/Grüne Erde) und orange Schicht (Vollei/frz. Ocker).....	90
<b>Abbildung 9:</b> Beispiel zweier Stangentuschen. T.J. Morris Stangentusche (#5) (links); vergoldete Winsor & Newton Stangentusche (ca. 1850) (#1) (rechts). .....	112
<b>Abbildung 10:</b> <i>Saint John</i> (MMA, #25.120.215), gefasste Holzskulptur, Italien, spätes 13. Jh. (146,1 x 38,4 x 8,3 cm). The Metropolitan Museum of Art, The Cloisters Collection.....	116
<b>Abbildung 11:</b> Anschliff einer Gewandprobe von <i>Saint John</i> (MMA, #25.120.215) im sichtbaren (links) und UV-Licht (rechts).....	116
<b>Abbildung 12:</b> Gesamtaufnahme des <i>Damascus Room</i> (MMA #1970.170). The Metropolitan Museum of Art. ....	119
<b>Abbildung 13:</b> Beinfragment einer überlebensgroßen, männlichen Marmorstatue (#76-101) (links). Detail der Reste von Polychromie mit Vergoldung (rechts). .....	123
<b>Abbildung 14:</b> Gewandfragment einer überlebensgroßen Marmorstatue (#75-290). Vorderseite (rechts), Rückseite (links). Reste roter Polychromie erkennbar....	124



<b>Abbildung 15:</b> Pastellgemälde von Jean Etienne Liotard: <i>La Liseuse</i> (links) und <i>The three Graces</i> (rechts); <i>The view of Geneve</i> (unten). Rijksmuseum Amsterdam.....	127
<b>Abbildung 16:</b> Prinzip der indirekten IFM an Anschliffen .....	137
<b>Abbildung 17:</b> Versuch zur Lokalisierung von Kasein (Schicht 2) an der Probe #PT5 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei). Betrachtung der Probe im sichtbaren Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).....	140
<b>Abbildung 18:</b> Versuch zur Lokalisierung von Ovalbumin (Schicht 3) an der Probe #PT5 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei). Betrachtung der Probe im sichtbarem Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).....	141
<b>Abbildung 19:</b> Versuch zur Lokalisierung von Störkollagen (Schicht 4) an der Probe #PT10 (Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein, frz. Ocker/Vollei, Störleim (Konsolidierung). Betrachtung der Probe im sichtbare Licht (VIS) (a.) und mit dem FITC Filter (Zeiss Filtersatz 09, 450-495 nm) vor (b.) und nach der Zugabe der spezifischen Antikörper (c.).....	143

### Abbildungen im Anhang

<b>Abbildung B-1:</b> Enthaarung der Häute durch Behandlung mit einer Kalklösung.....	191
<b>Abbildung B-2:</b> Klärung des Leimsuds und Reduzierung des Fettgehalts.....	192
<b>Abbildung B-3:</b> Trocknung und Aufbewahrung des Leims.....	192
<b>Abbildung B-4:</b> Störblasenaufbereitung: Trennung der Außenhaut von der eigentlich klebenden Innenhaut der frischen Störblase.....	193
<b>Abbildung B-5:</b> Probetafel #PT.....	197
<b>Abbildung B-6:</b> Beispiel einer Probetafel zur Untersuchung der Holzvorbehandlung von Streichinstrumenten (#4). Vorderseite mit Holzimprägnierung zur Hälfte mit einem Öllack versehen (oben); unbehandelte Rückseite (unten).....	203
<b>Abbildung B-7:</b> Referenzproben zur Untersuchung von Fixativen auf Pastellgemälden auf verschiedenen Pergamenten, mit und ohne Pastell (Hämatit (Eisenoxid)), Fixativ und künstlicher Alterung. V.l.n.r. Proben 1-5.....	205

## 10.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung von Ei (nach Stadelman & Cotterill 1995 und Burley & Vadehra 1989).....	20
<b>Tabelle 2:</b> Mittlere Zusammensetzung von Kuhmilch (nach Baltes 2000) .....	22

<b>Tabelle 3:</b> Handelsübliche Leimbezeichnungen und ihre Ausgangsmaterialien (nach Wilde 2006).....	26
<b>Tabelle 4:</b> Tabellarische Übersicht zu den einzelnen ELISA Schritten, der ELISA Methode von Schultz 2006, die evaluierte Versuchparameter im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie die erweiterte, optimierte ELISA Methode. ....	44
<b>Tabelle 5:</b> Empfohlene, getestete und verwendete Primärantikörperverdünnungen .....	46
<b>Tabelle 6:</b> Empfohlene, getestete und verwendete Sekundärantikörperverdünnungen .....	46
<b>Tabelle 7:</b> ELISA Ergebnis zur Evaluierung verschiedener Blockreagenzien. Mittelwerte der unspezifischen Bindungen der Antikörper für Ovalbumin (#AB1225), Kasein (#RCAS-10A) und Kollagen (#ab34710) in antigenfreien Wells mit verschiedenen Blockpuffern und auf verschiedenen Plattentypen. Markierte Werte zeigen erhöhte unspezifische Bindungen (> 0,1 OD <sub>414nm</sub> ). n/d = nicht durchgeführt. (n = 2). .....	62
<b>Tabelle 8:</b> Bestimmung des Cut-off anhand von antigenfreien Wells mit Antikörpern .....	64
<b>Tabelle 9:</b> ELISA Ergebnis zur Bestimmung der Nachweisgrenze an ausgewählten Standardantigenen. Gezeigt wird die niedrigste noch positiv nachweisbare Antigenkonzentration. Arbeitsverdünnung der Antikörper sind in Spalte 1 vermerkt. Die Extinktionswerte liegen oberhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> . Die Standardantigene sind farbig hinterlegt. ....	65
<b>Tabelle 10:</b> ELISA Ergebnis zur Kreuzreaktivität der verschiedenen Primärantikörper mit den 8 Standardantigenen. Antigenansatz in Carbonatpuffer (1 mg/ ml), verwendete Verdünnungen sind in der Tabelle vermerkt. *eigene Herstellung. (/) nicht auf dieser Platte getestet. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. Extinktionswerte in Klammern liegen unterhalb des Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> . (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. ....	67
<b>Tabelle 11:</b> ELISA Ergebnis zur Spezifität von anti-Ovalbumin (#AB1225) und anti-Phosvitin (#SC-46681). Antigenansatz in Carbonatpuffer (1 mg/ ml), verwendete Verdünnungen sind in der Tabelle vermerkt. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. Die Extinktionswerte in Klammern liegen unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> . (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. ....	69
<b>Tabelle 12:</b> ELISA Ergebnisse zur Spezifität von anti-Kasein (#RCAS-10A) an unterschiedlichen kaseinhaltigen Proben. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10.000. (+) gilt als positiv Nachweis, (-) als negativ. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. ....	72
<b>Tabelle 13:</b> ELISA Ergebnisse zur Spezifität von anti-Kollagen (#ab34710), anti-Fischkollagen (#T89171R) und dem nicht kommerziellen anti-Störkollagen (AIS2006) an verschiedenen kommerziellen Leimen und *Leimen aus eigener Herstellung. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:10. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> gelten als negativ (-), darüber als positiv (+). n/d = nicht getestet. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. ....	74

- Tabelle 14:** ELISA Ergebnisse zur Spezifität von #JIM13, #MAC207 und #MAC265 an ausgewählten Pflanzengummen mit bekannter Herkunft und Proben unbekannter Herkunft. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (+) gilt als positiv Nachweis ( $> 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ), (-) als negativ ( $< 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ). (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. .... 78
- Tabelle 15:** ELISA Ergebnisse zur Kreuzreaktivität von #JIM13, #MAC207 und #MAC265 an ausgewählten Polysacchariden, Naturharzen und Pflanzensäften. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (+) gilt als positiv Nachweis ( $> 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ), (-) als negativ ( $< 0,05 \text{ OD}_{414\text{nm}}$ ). (/) nicht getestet. (n = 2). Die Standardabweichungen hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis, weshalb sie hier nicht aufgeführt sind. .... 79
- Tabelle 16:** ELISA Ergebnisse der Blindproben (Universität Pisa). Alle Proben wurden in 450  $\mu\text{l}$  Carbonatpuffer extrahiert. Die getesteten Probenmengen waren je nach Verfügbarkeit unterschiedlich und sind in Spalte 5 angegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse der OD der niedrigsten Verdünnungsstufe (1:2). Grün = HRP Methode, Gelb = AP Methode. \*markieren die Proben mit der künstlichen Alterung. Die Klammern bedeuten, dass nicht genug Probenmaterial vorhanden war, um beide ELISA Methoden zu überprüfen. (n = 2). .... 93
- Tabelle 17:** ELISA Ergebnisse der künstlich gealterten Fassungsproben (GCI). Die Proben mit Ei, Kasein und Kollagen sind 47 Tage künstlich gealtert, die Proben mit Gummi arabicum sind ungealtert. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 200  $\mu\text{g}$ / 500  $\mu\text{l}$ . Getestet wurde mit zwei verschiedenen ELISA Methoden (HRP und AP). Dargestellt sind Ergebnisse der niedrigsten Verdünnung (1:2). \* ~ 50 % weniger Probenmaterial. (n = 2). .... 96
- Tabelle 18:** ELISA Ergebnisse der Binde- und Klebemittel an Proben verschiedener Boule-Möbel. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) #A-E ~ 2 mg/ 500  $\mu\text{l}$ , #P3891 ~60  $\mu\text{g}$ / 300  $\mu\text{l}$ . Dargestellt Verdünnungsstufe 1:10 bzw. 1:2 (#P3891). (n = 2) ..... 104
- Tabelle 19:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung von 9 Mustertafeln zu Instrumentenlacken mit proteinischer Holzimprägnierung ohne und mit Überzug (oÜ bzw. mÜ), sowie unbehandelter Rückseite (RS); VS: Vorderseite. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 70-150  $\mu\text{g}$ / 500  $\mu\text{l}$ . Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2) ..... 108
- Tabelle 20:** ELISA Ergebnisse der Untersuchungen zur Holzimprägnierung an vier Streichinstrumenten. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 79-125  $\mu\text{g}$ / 500  $\mu\text{l}$ . Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2) ..... 110
- Tabelle 21:** ELISA Ergebnisse der Untersuchung von fünf Stangentuschen; jeweils eine Kernprobe und eine Schabeprobe von der Oberfläche. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 100  $\mu\text{g}$ / 500  $\mu\text{g}$ . Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2). .... 114
- Tabelle 22:** ELISA Ergebnisse der Fassungsproben vom *Damascus Room* (MMA #1970.170). Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) 50- 70  $\mu\text{g}$ / 500  $\mu\text{l}$ . Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2). .... 121

<b>Tabelle 23:</b> ELISA Ergebnisse der Untersuchung zu polychrome gefassten antiken Marmorstatuen. Beinfragment #76-101, Gewandfragment #75-290. Probenansätze sind jeweils angegeben. Dargestellte Verdünnungsstufe 1:2 (n = 2).....	125
<b>Tabelle 24:</b> Liste der untersuchten Objekte von J.E. Liotard sowie die ELISA Ergebnisse der drei untersuchten Proben. *teilweise mit Pergamentfragmenten. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) X µg (siehe Tabelle)/ 300 µl. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:2. (n = 2).....	129
<b>Tabelle 25:</b> ELISA Ergebnisse der Ausgangsmaterialien und Referenzproben für Fixative an Pastellgemälden. Probenansätze in Carbonatpuffer (w/v) sind jeweils aufgeführt. Dargestellt ist jeweils die niedrigste Verdünnungsstufe. (n = 2). Graue Markierung = künstlich gealterte Proben. ....	130

### Tabellen im Anhang

<b>Tabelle A-1:</b> Liste der getesteten Antikörper.....	181
<b>Tabelle A-2:</b> Liste der internen Standardantigene.....	183
<b>Tabelle A-3:</b> Liste der verwendeten Reagenzien und Pufferlösungen.....	184
<b>Tabelle A-4:</b> Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte.....	185
<b>Tabelle A-5:</b> Liste der sonstige Verbrauchsmaterialien.....	187
<b>Tabelle B-6:</b> Liste der eihaltigen Proben für die Spezifitätsversuche.....	188
<b>Tabelle B-7:</b> Liste der hergestellten Kaseine.....	189
<b>Tabelle B-8:</b> Liste der verwendeten Leime zur Überprüfung der Spezifität der Kollagenantikörper.....	190
<b>Tabelle B-9:</b> Liste der polysaccharidhaltigen Proben und verwandten Stoffe.....	194
<b>Tabelle B-10:</b> Liste der hergestellten Kaseine.....	195
<b>Tabelle B-11:</b> Liste der pigmentierten Aufstrichpräparate.....	196
<b>Tabelle B-12:</b> Rezepte und Anweisungen zur Herstellung der Probetafeln.....	198
<b>Tabelle B-13:</b> verwendete Materialien zur Herstellung der Probetafeln.....	198
<b>Tabelle B-14:</b> Probenbeschreibung, Universität Pisa.....	199
<b>Tabelle B-15:</b> Liste der verwendeten Pigmente.....	201
<b>Tabelle B-16:</b> Liste der verwendeten Bindemittel sowie Mischungsverhältnisse.....	201
<b>Tabelle B-17:</b> Zusammensetzung der Probetafeln zur Untersuchung der Holzvorbehandlung von Streichinstrumenten.....	202
<b>Tabelle B-18:</b> Liste der Referenzproben zur Untersuchung von Fixativen auf Pastellgemälden.....	204
<b>Tabelle B-19:</b> Liste der untersuchten Objekte.....	206
<b>Tabelle B-20:</b> Damascus Room (MMA, #1970.170): Liste der Probenentnahmestellen und Beschreibungen. The Metropolitan Museum of Art.....	208
<b>Tabelle B-21:</b> Damascus Room (MMA, #1970.170), tabellarische Zusammenfassung aller Analyseergebnisse (Baumeister et al. 2010).....	211

## 10.4 Diagrammverzeichnis

- Diagramm 1:** Beurteilung der Extraktionsdauer und -bedingung durch Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA *enhanced protocol*) am Beispiel einer Kreidegrundierung (#PT1, Kreide/tierischer Leim) extrahiert mit Tris-HCL. Probenansatz (w/v) jeweils 10 mg/ ml, dargestellt Verdünnung 1:2. (n = 3)..... 50
- Diagramm 2:** Proteinbestimmung mittels BCA an reinen Bindemitteln. Extraktion mit drei verschiedenen Extraktionspuffern Tris-HCL, CP und PBS für 5 Stunden bei 37 °C. Probenansatz im jeweiligen Extraktionspuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:1 (n = 3)..... 51
- Diagramm 3:** Proteinbestimmung mittels BCA an pigmentierten Proben. Extraktion mit drei verschiedenen Extraktionspuffern Tris-HCL, CP und PBS für 5 Stunden bei 37 °C. Probenansatz im jeweiligen Extraktionspuffer (w/v) 10 mg/ ml, dargestellte Verdünnung 1:1. (n = 3)..... 52
- Diagramm 4:** Der Einfluss von SDS im Extraktionspuffer auf das ELISA Ergebnis am Beispiel von Tris-HCL mit und ohne 1 % SDS. Probekörper: PT#5 (Probetafel) Mischung aus Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein und frz. Ocker/Vollei), Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. (n = 2). ..... 54
- Diagramm 5:** Der Einfluss von SDS in Tris-HCL im Vergleich zur Extraktion mit Carbonatpuffer (CP) auf das ELISA Ergebnis. Probekörper: PT#5 Mischung aus Kreide/Leim, Grüne Erde/Kasein und frz. Ocker/Vollei), Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 200 µg/ 500 µl. (n = 2)..... 55
- Diagramm 6:** ELISA Ergebnis zur Evaluierung von drei verschiedenen Mikrotiterplatten anhand von Ovalbumin, Kasein und Gelatine. (FV) Füllvolumen Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml, dargestellte Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2). ..... 57
- Diagramm 7:** ELISA Ergebnis zum Einfluss der Temperatur der Antigen-Inkubation am Beispiel der Standardproteine für Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2). ..... 59
- Diagramm 8:** ELISA Ergebnis zum Einfluss der Dauer der Primärantikörper-Inkubation am Beispiel der Standardproteine für Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Antigenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml. Dargestellt Verdünnungsstufe 1:1000. (n = 2). ..... 60
- Diagramm 9:** ELISA Ergebnis an eihaltigen Fassungsproben mit bekannter Zusammensetzung zum Nachweis von Ovalbumin und Phosvitin. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 400 µg/ ml mit stufenweiser Verdünnung. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD<sub>414nm</sub> gelten als negativ. (n = 2)..... 71
- Diagramm 10:** ELISA Ergebnis zur Überprüfung, ob der Kollagenantikörper aus Kaninchen (#ab34710) gegen sich selber binden kann anhand von Hasen- und Kaninchenleimen aus eigener Herstellung sowie einem kommerziellen Hasenleim. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 1 mg/ ml mit stufenweiser

Verdünnung. Extinktionswerte unterhalb des festgelegten Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> gelten als negativ. (n = 2).....	76
<b>Diagramm 11:</b> ELISA Ergebnisse zur Kreuzreaktivität von #JIM13 und #MAC265 an ausgewählten Holzarten. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 10 mg/ml, dargestellte Verdünnung 1:10. (n = 2). Extinktionswerte unterhalb des Cut-off von 0,05 OD <sub>414nm</sub> gelten als negativ. ....	81
<b>Diagramm 12:</b> ELISA Ergebnisse der Untersuchung an drei verschiedenen Fassungsproben bekannter Zusammensetzung (Probetafel). Test auf Ovalbumin, Kasein und Kollagen. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. Dargestellte Verdünnungsstufe: 1:10. Cut-off: 0,05 OD <sub>414nm</sub> . (n = 2).....	91
<b>Diagramm 13:</b> ELISA Ergebnis einer Fassungsprobe bestehend aus drei Fassungsschichten (Kreide/Kollagen, Grüne Erde/Kasein, Frz, Ocker/Vollei) und einer Malschichtfestigung (Störleim) als Abschlußschicht. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) 150 µg/ 500 µl. Cut-off 0,05 OD <sub>414nm</sub> . (n = 2). ....	92
<b>Diagramm 14:</b> ELISA Ergebnis zur Untersuchung der Binde- und Anlegemittel an Proben von <i>Saint John</i> (MMA, #25.120.215) einer gefassten Holzskulptur aus dem 13. Jh.. Probenansatz in Carbonatpuffer (w/v) siehe Diagramm. (n = 2). Cut-off 0,05 OD <sub>414nm</sub> . ....	118

## 10.5 Abbildungs- und Tabellennachweis

**Abbildung 1:** nach Campbell 1998

**Abbildung 2:** nach Lottspeich & Engels 2006

**Abbildung 9:** The Metropolitan Museum of Art, The Cloisters Collection, 1925 (25.120.215) Image © The Metropolitan Museum of Art

**Abbildung 10:** The Metropolitan Museum of Art, The Conservation and Scientific Research Departments Image © The Metropolitan Museum of Art.

**Abbildung 11:** The Metropolitan Museum of Art; gift of The Hagop Kevorkian Fund, 1970 (1970.170) Image © Metropolitan Museum of Art

**Abbildung 12:** © Dr. M. Abbe; Aphrodisias Excavations

**Abbildung 13:** © Dr. M. Abbe; Aphrodisias Excavations

**Abbildung 14:** Pastellgemälde von Jean Etienne Liotard: La Liseuse und The three Graces © Rijksmuseum, Amsterdam. M.A. Liotard Bequest, Amsterdam. The view of Geneve © Rijksmuseum Amsterdam, Gift of J.V. Tilanus-Liotard, Amsterdam

**Tabelle 1:** nach Burley & Vadehra 1981 und Stadelman & Cotterill 1995

**Tabelle 2:** nach Baltes 2000

**Tabelle 3:** nach Wilde 2006

**Nachweis Anhang B**

**Tabelle B-20:** The Metropolitan Museum of Art, The Conservation and Scientific Research Departments, Image © The Metropolitan Museum of Art

Alle weiteren Abbildungen, Diagramme und Tabellen stammen von der Autorin.

## **Anhang**



## Anhangsverzeichnis

<b>Anhang A: Verwendete Materialien und Geräte .....</b>	<b>181</b>
A1 Antikörper .....	181
A2 Standardantigene .....	183
A3 Reagenzien und Pufferlösungen.....	184
A4 Chemikalien und Geräte.....	185
A5 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	187
<b>Anhang B: Probenmaterial.....</b>	<b>188</b>
B1 Probenmaterialien zur Bestimmung der Antikörperspezifität.....	188
B1.1 Eihaltige Proben .....	188
B1.2 Kaseinhaltige Proben.....	189
B1.3 Kollagenhaltige Proben .....	190
B1.4 Polysaccharidhaltige Proben .....	194
B1.5 Aufstrichpräparate .....	195
B2 Herstellung definierte Probekörper .....	197
B2.1 Probetafel mit Fassungs Aufbau.....	197
B2.2 Fassungsproben einer Referenzsammlung (Universität Pisa).....	199
B2.3 Künstlich gealterte Fassungsproben (Getty Conservation Institute).....	201
B2.4 Probetafeln zur Untersuchung von Streichinstrumentenlacken .....	202
B2.5 Referenzproben zu Fixativen auf Pastellgemälden .....	204
B3 Reales Probenmaterial.....	206
B3.1 Untersuchte Objekte und ihre Herkunft .....	206
B3.2 <i>Damascus Room</i> (MMA, #1970.170): Probenentnahmestellen und – Beschreibung.....	208
B3.3 <i>Damascus Room</i> (MMA, #1970.170): Tabellarische Zusammenfassung aller Analyseergebnisse.....	211
<b>Anhang C: Durchführung der AP ELISA Methode .....</b>	<b>213</b>
<b>Anhang D: Datenblätter und Herstelleranweisungen.....</b>	<b>214</b>
D1 Arbeitsanweisung BCA Durchführung (Pierce) .....	214
D2 Mikrotiterplatten Abmessungen.....	221
D2.1 Polyvinylchlorid PVC, BD #353912.....	221
D2.2 Polystyren PS, Nunc Maxisorp #439454, Nunc MicroWell #260836.....	223
D3 Spezifitätsuntersuchungen CCRC (Datenblätter).....	224
D3.1 #JIM13 .....	224
D3.2 #MAC207.....	225
D3.3 #MAC265.....	226

## Anhang A: Verwendete Materialien und Geräte

### A1 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle A-1 aufgeführt. Mit Ausnahme des Störkollagen-Antikörpers, der aus einer Auftragsimmunisierung aus dem Jahr 2006 stammt, handelt es sich um kommerzielle Produkte. Die meisten der eingesetzten polyklonalen Primärantikörper sind in Kaninchen hergestellt, nur die zum Nachweis von Gummen und Eigelb verwendeten monoklonalen Antikörper stammen aus Ratte bzw. Maus. Die enzym- (HRP) oder fluoreszenzmarkierten (FITC) Sekundärantikörper sind polyklonal und aus Ziege gegen die Tierart des jeweiligen Primärantikörpers (Kaninchen, Ratte, Maus) gerichtet. Außerdem aufgelistet sind die verwendeten Sekundärantikörper für die AP ELISA Methode (→ Kap. 6.2-6.3) (→ Anhang C).

**Tabelle A-1:** Liste der getesteten Antikörper.

<b>Primärantikörper</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Antigen-Quelle</b>	<b>Antikörper Typ</b>	<b>Host</b>	<b>Hersteller, Katalog #</b>
Ovalbumin, Eiklar (rb-anti-ovalbumin)	Huhn	Polyklonal IgG	Rabbit	Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA #AB1225
Kollagen Typ I (rb-anti-Kollagen)	Human, Rind	Polyklonal IgG	Rabbit	Abcam, Cambridge, MA, USA #ab34710
Fisch-Kollagen Typ I (rb-anti-Fischkollagen)	Fisch	Polyklonal IgG	Rabbit	Biodesign Saco, ME, USA #T89171R
Störblasen-Kollagen (rb-anti-Störkollagen)	Stör ( <i>A. baerii</i> )	Polyklonal IgG	Rabbit	Biotrend, Köln, Deutschland nicht kommerziell erhältlich (AIS2006)
Kasein, Milch (rb-anti-Kasein)	Rind	Polyklonal IgG	Rabbit	ICL Inc., Newberg, OR, USA #RCAS-10A
Arabinogalactan Proteine (rt-anti-#JIM13)	Karotte	Monoklonal IgG	Rat, Hybridom	CCRC* University of Georgia Complex Carbohydrates Research Center, Atlanta, GA, USA #JIM13

Arabinogalactan Proteine (rt-anti-#MAC207)	Erbse ( <i>Pisum sativum</i> )	Monoklonal IgM	Rat, Hybridom	CCRC* University of Georgia Complex Carbohydrates Research Center, Atlanta, GA, USA #MAC207
Tragant (rt-anti-#MAC265)	Tragant	Monoklonal, IgG2	Rat, Hybridom	CCRC* University of Georgia Complex Carbohydrates Research Center, Atlanta, GA, USA #MAC265
Phosvitin (D-5) (ms-anti-phosvitin)	Huhn	Monoklonal, IgG	Mouse	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA #SC-46681

\*alle CCRC Antikörper sind in Teilen durch das NSF Grant #0090281 unterstützt worden

<b>Sekundärantikörper</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Antikörper Typ</b>	<b>Host</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller, Katalog #</b>
Rabbit IgG (GARb/PO)	Polyklonal IgG	Goat	HRP	Southern Biotech, Birmingham, LA, USA #4050-05
Rat IgG (GARt/PO)	Polyklonal IgG	Goat	HRP	Southern Biotech, Birmingham, LA, USA #3050-05
Mouse IgG (GAMs/PO)	Polyklonal IgG	Goat	HRP	Southern Biotech, Birmingham, LA, USA #1031-05
Rabbit IgG (GARb/FITC)	Polyklonal IgG	Goat	FITC	Southern Biotech, Birmingham, LA, USA #4050-02
Rabbit IgG (GARb/AP)	Polyklonal IgG	Goat	AP	Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA #AP132A
Rat IgM (GARt/AP)	Polyklonal IgG	Goat	AP	Abcam, Cambridge, MA, USA #ab6846

## A2 Standardantigene

Zur Qualitätssicherung und Vergleichbarkeit werden interne Standardantigene festgelegt, die anschließend für alle Versuche als Positivkontrollen dienen (Tabelle A-2). Mit Ausnahme des Standards für Fischkollagen werden ausschließlich hochaufgereinigte und/oder kommerzielle Produkte mit definierter Zusammensetzung verwendet. Lediglich beim Fischkollagen wird auf den Forellenleim aus der eigenen Herstellung ausgewichen, um sicher zu gehen, dass kein Kollagen aus Säugetieren beigemischt ist (→ Anhang B1.3).

**Tabelle A-2:** Liste der internen Standardantigene

Nachweis für	Antikörper	Standards	Hersteller, Kat#
Eiklar	#AB1225	Albumin from chicken egg white, Grade VI	Sigma Aldrich, #A2512
Eigelb	#SC-46681	Phosvitin from egg yolk	Sigma Aldrich, #P1253
Kasein	#RCAS-10A	Kaseinpulver	Kremer, #63200
Kollagen	#ab34710	Gelatine, Type A	Sigma Aldrich, #G2500
Fischkollagen	#T89171R	Forellenleim	eigene Herstellung (→ Anhang B1.3)
Störkollagen	AIS2006*	Störblase (Herstellungsantigen)	Fulda, Zuchtfarm 1 (Desietra)
Arabinogalactan-Proteine	#JIM13 #MAC207	Ghatti Gummi	Sigma Aldrich, #G0378
Tragant	#MAC265	Tragant	Sigma Aldrich, #G1128

\*Auftragimmunisierung aus dem Jahr 2006; interne Bezeichnung AIS2006

Die Standards werden in einer Konzentration (w/v) von 1 mg/ ml in Carbonatpuffer angesetzt, 16 Stunden bei 37 °C extrahiert, nicht gelöste Feststoffe abzentrifugiert und der Überstand zur Weiterverwendung abgenommen. Diese Stammlösungen können dann mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für die Positivkontrollen werden die Stammlösungen auf die für die entwickelte ELISA Methode festgelegte Konzentration weiterverdünnt: 1:1000 für Ovalbumin (#A2512), Kasein (#63200), Ghatti Gummi (#G0378), 1:500 für Gelatine (#G2500), Forellenleim (eigene Herstellung) und Störleim (Zuchtfarm 1), 1:100 für Tragant (#G1128) und Phosvitin (P1235).

### A3 Reagenzien und Pufferlösungen

Für die Durchführung der ELISA Methode werden eine Vielzahl an Reagenzien und Pufferlösungen benötigt. Diese und die bei der Methodenentwicklung unter → Kap. 5 zusätzlich getesteten Reagenzien sind in Tabelle A-3 aufgelistet.

**Tabelle A-3:** Liste der verwendeten Reagenzien und Pufferlösungen

---

**Extraktions- und Verdünnungspuffer**

---

Carbonatpuffer: 0,05 M gepufferte Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung; pH 9,6

PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

Tris-HCL: 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 6 M Urea, 1 % SDS; pH 7,4

Natriumhydrogencarbonatpuffer: 100 mM gepufferte NaHCO<sub>3</sub> Lösung; pH 9,2

---

---

**Blockpuffer**

---

BSA (bovine serum albumin): 1 % und 5 % in PBS

NCS (newborn calf serum): 5 % in PBS

ELISA Blocker<sup>TM</sup>, SEA Block<sup>TM</sup> und SuperBlock<sup>TM</sup> in PBS (Fertiglösungen, Pierce)

---

---

**Waschpuffer**

---

Waschpuffer I (0,05 % Tween 20 in PBS)

Waschpuffer II (0,005 % Tween 20 in PBS)

---

---

**Substrat- und Stopp-Puffer**

---

Phosphat-Citrat-Puffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM Citronensäure, pH 5,0

Substratpuffer: ABTS® in 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 4,9, unmittelbar vor Gebrauch 0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben

Stopp-Puffer: 0,05 % NaN<sub>3</sub>/ 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer

---

## A4 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien und Geräte sind in Tabelle A-4 aufgelistet.

**Tabelle A-4:** Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>	
NaHCO <sub>3</sub> (#6885.2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (#T486.1)		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (#K300.1)		
PBS (#1058.1)		
Zitronensäure (#6490.3)		
Natriumazid (#S2002)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	
ABTS® Diamonium Salz (#0202-01)	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	
Wasserstoffperoxid 30 % (#H325-500)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
SDS (#226145000)		
Tween 20 (#BP337)		
Zitronensäure (#H325)		
Tris (#28358)		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (#206515000)		
ELISA Blocker™ (#N502)		
SuperBlock™ (#37535)		
SEA Block™ (#37527)		
NCS (#SH30118.02)		
BSA (#BP1600-100)		
BCA (#23225)		
Technovit 2000 LC (#64708496)	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland	

<b>Verwendete Geräte</b>	<b>Typbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
8 Kanal Pipette (50-300µl), Pipetten (0,1-10µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop-Filter	Zeiss Filtersatz 09 Zeiss Filtersatz 02	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kamera	Powershot G2, 4 Megapixel	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
Blaulicht- Polymerisationsgerät	Technotray CU- Gerät	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH Level 1	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Photometer	SLT Spectra	SLT Labinstrumente GmbH, Achterwehr, Deutschland
	Molecular Devices, SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

---

Waagen	Ohaus Explorer Pro	Ohaus, Kirchheim, Deutschland
	Mettler Toledo UMX2	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Zentrifuge	Hettich EBA12	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

---

## A5 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Alle sonstigen Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle A-5 aufgelistet.

**Tabelle A-5:** Liste der sonstige Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorf-Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml) Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flüssigkeitsreservoirs, unsteril, PVC, 55 ml (#E830.1)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatte BD Polyvinylchlorid PVC, (#353912)	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Mikrotiterplatte NUNC MaxiSorp™ (#439454) und NUNC Polystyrol (PS) (#260836)	Nalge NUNC International, Rochester, NY, USA
PP-Röhrchen, 14 ml, 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik, Fridensborg, Dänemark



## Anhang B: Probenmaterial

### B1 Probenmaterialien zur Bestimmung der Antikörperspezifität

#### B1.1 Eihaltige Proben

Für die Spezifitätsversuche von anti-Ovalbumin (#AB1225) und anti-Phosvitin (#SC-46681) wurden neben kommerziellen aufgereinigten Proteinen (Standards) auch handelsübliche Eier verwendet (Tabelle B-6). Dafür wurden Eiklar, Eigelb und Vollei von Hühner- und Wachteleiern auf Objektträger gestrichen. Die Trennung des Eiklars vom Dotter erfolgte in haushaltstypische Weise. Das Eiklar wurde anschließend aufgeschlagen und die sich absetzende Eikläre weiterverwendet. Vollei wurde 1:1 (w/w) gemischt. Nach dem Trocknen wurden alle Proben, wenn nicht anders angegeben, in 1 mg/ ml Carbonatpuffer (w/v) überführt und extrahiert.

**Tabelle B-6:** Liste der eihaltigen Proben für die Spezifitätsversuche

	<b>Eihaltige Proben</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Standards</b>	Ovalbumin von Hühnereiklar	Sigma Aldrich #A2512
	Phosvitin von Hühnereigelb	Sigma Aldrich #P1253
<b>Aufstrichpräparate (OT)</b>	Hühner-Eiklar	Einzelhandel
	Hühner-Eigelb	
	Hühner-Vollei	
	Wachtel-Eiklar	
	Wachtel-Eigelb	
	Wachtel-Vollei	

## B1.2 Kaseinhaltige Proben

Die Überprüfung der Spezifität des Kaseinantikörpers (#RCAS-10A) erfolgte an kommerziellen, teilweise hochaufgereinigten Proteinen, aber auch verschiedenen kaseinhaltigen Lebensmittel und an Aufstrichpräparate von unterschiedlich aufgeschlossenen Kaseinen (Tabelle B-7) (→ Anhang B1.5). Alle Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, in 1 mg/ ml Carbonatpuffer (w/v) überführt und extrahiert. Die Lebensmittelproben wurden zusätzlich mit dem Ultra Turrax homogenisiert.

**Tabelle B-7:** Liste der hergestellten Kaseine

	<b>Kaseinhaltige Proben</b>	<b>Bezugsquelle/ Rezeptanleitung</b>
<b>Standards/ Ausgangsprodukte</b>	Kasein, milchsäure-gefällt, feines Pulver	Kremer #63200
	Skim Milk Powder	Oxoid #LP0031
	Kasein nach Hammarsten	VWR #440203H
	Kappa Kasein aus Kuhmilch	Sigma Aldrich #C0406
	Beta Kasein aus Kuhmilch	Sigma Aldrich #C6905
	Alpha Kasein aus Kuhmilch	Sigma Aldrich #C6780
	Kaseinpulver aus Kuhmilch	Sigma Aldrich #C3400
<b>Aufgeschlossene Kaseine (Aufstrichpräparate)</b>	Kalkkasein / Quark	5 VT gut ausgedrückten Magerquark auf 1 VT Sumpfkalk (Kremer #31800) geben und mischen
	Kalkkasein / Pulver	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 125 ml Wasser einweichen, 33 g Sumpfkalk (Kremer #31800) dazugeben
	Boraxkasein	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 125 ml Wasser, 16 g Borax (Kremer #64000) in 125 ml heißem Wasser gelöst dazugeben
	Ammoniumkasein	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 225 ml warmem Wasser einweichen, 10 g Ammoniumcarbonat (Kremer #64020) in wenig Wasser gelöst dazugeben
<b>Material- proben</b>	Ziegenkäse Schafskäse Quark (Kuh)	Einzelhandel

### B1.3 Kollagenhaltige Proben

Für die Untersuchung zur Spezifität der verschiedenen Kollagenantikörper wurde eine Vielzahl von tierischen Leimen überprüft. Neben kommerziellen Leimen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Reihe tierischer Leime selber hergestellt und die Detektionsmöglichkeit überprüft (Tabelle B-8).

**Tabelle B-8:** Liste der verwendeten Leime zur Überprüfung der Spezifität der Kollagenantikörper.

	<b>Leimbezeichnungen</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Kommerzielle Leime/Produkte</b>	Gelatine	Sigma Aldrich #G2500
	Technische Gelatine	Kremer #63040
	Hasenleim	Kremer #63025
	Hausenblase in Blättern	Kremer #63100
	Salianski Hausenblase	Kremer #63110
	Kaltflüssiger Fischleim	Lee Valley Tools, #56K60.01
	Kaltflüssiger Fischleim	Kremer #63550
<b>Leime aus eigener Herstellung</b>	Leim aus Rinderhaut	
	Leim aus Rinderknochen	
	Leime aus Schweineknochen	
	Leim aus Kaninchenhaut (Stallkaninchen)	
	Leim aus Hasenhaut (Feldhase)	
	Leim aus Hasenohren	
	Leim aus Ziegenpergament	
	Leim aus Forellenabfällen	
	Leim aus Karpfenabfällen	
	Hechtblasenleim	
	Karpfenblasenleim	
	Störleim (Schwimmbhase Sibirischer Stör ( <i>A. baerii</i> ))	Zuchtfarm 1: DESIETRA, Fulda
	Störleim (Schwimmbhase Sibirischer Stör ( <i>A. baerii</i> ))	Zuchtfarm 2: Caviar Creator, Demmin
Störleim (Schwimmbhase Sibirischer Stör ( <i>A. baerii</i> ))	Zuchtfarm 3: Holsten-Stör, Kiel	

Die frischen Ausgangsmaterialien zur Leimherstellung wurden von lizenzierten Störzuchtfarmen sowie direkt vom Schlachter, Angler und Jäger bezogen. Die Pergamente stammen aus dem Fachhandel. Ein Großteil der Leime wurde in den Werkstätten der HAWK Hildesheim im Sommer 2006 hergestellt. Die Herstellung der Hasenleime erfolgte 2011, wobei die Hasenohren und Hasenhaut von zwei unterschiedlichen Tieren stammen. Die Hecht- und Karpfenblasenleime wurden an der ABK Stuttgart im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt (Geißinger 2006). Auf jegliche Zusätze oder Modifikationen vor und während der Behandlung wurde

verzichtet. Qualität, Farbe und Klebkraft der Leime waren sekundär und wurden im Zuge dieser Arbeit auch nicht überprüft.

Die frischen Häute (Kaninchen, Hase, Rind), Knochen (Schwein, Rind) und Fischabfälle (Karpfen, Forelle) wurden unter fließendem Wasser gereinigt, um Blut und anhaftende Verunreinigungen zu beseitigen. Zur Äscherung (Entfettung und Enthaarung) wurden die Häute 2-3 Tage unter mehrfacher Rotation in eine gesättigte Kalklösung gelegt. Versuche die Häute in Sumpfkalk einzulegen, führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Haare ließen sich nun ganz leicht samt Haarfollikeln von der Haut lösen (Abbildung B-1). Danach wurden die Häute gründlich mit Wasser gewaschen. Die trockenen Pergamentreste (Ziege) zur Pergamentleimherstellung wurden möglichst klein geschnitten und 3 Tage in Wasser eingeweicht. Auf eine Vorbehandlung der frischen Knochen (Schwein, Rind) mit Säure wurde verzichtet. Sie wurden lediglich mit Wasser von Blut und anhaftende Verunreinigungen gereinigt.

**Abbildung B-1:** Enthaarung der Häute durch Behandlung mit einer Kalklösung



Für das eigentliche Leimsieden wurden alle Materialien (Häute, Knochen, Pergamente, Fischabfälle) möglichst klein gesägt oder geschnitten, mit Wasser bedeckt und mehrere Stunden gekocht. Während des Kochens müssen die Materialien stets mit Wasser bedeckt sein, weshalb gegebenenfalls Wasser zugegeben wurde. Die Ermittlung der Kochzeit erfolgte durch mehrfache Überprüfung des Leimsuds auf Klebrigkeit durch eine Fingerprobe.

Die Hydrolyse von Knochenkollagen erfordert höhere Temperaturen als die Extraktion von Hautkollagen, was durch einen erhöhten Dampfdruck erreicht wird. Daher wurden sämtliche Knochenleime für 1-2 Stunden in einem Schnellkopftopf (erhöhter Druck) gekocht, während die Hautleime für 3-5 Stunden und die Fischleime für 1 Stunde in herkömmlichen Kochtöpfen hergestellt wurden. Die Verkürzung der Kochzeit bei den Fischleimen resultiert aus der leichteren Löslichkeit von Fischkollagen.

Für die Klärung wurde der Leimsud zuerst durch ein Sieb abgelassen und danach nochmals durch ein Leinentuch filtriert, um restliche Feststoffe zu entfernen. Der Sud

enthält je nach Ausgangsmaterial noch eine Menge Fett, dass sich nach Abkühlung als feste, manchmal auch weichere, gelblich-weiße Schicht an der Oberfläche absetzt. Sie wurde anschließend manuell, wenn möglich, weitestgehend entfernt; ganz fettfrei ist der Leim aber danach dennoch nicht (Abbildung B-2).

**Abbildung B-2:** Klärung des Leimsuds und Reduzierung des Fettgehalts



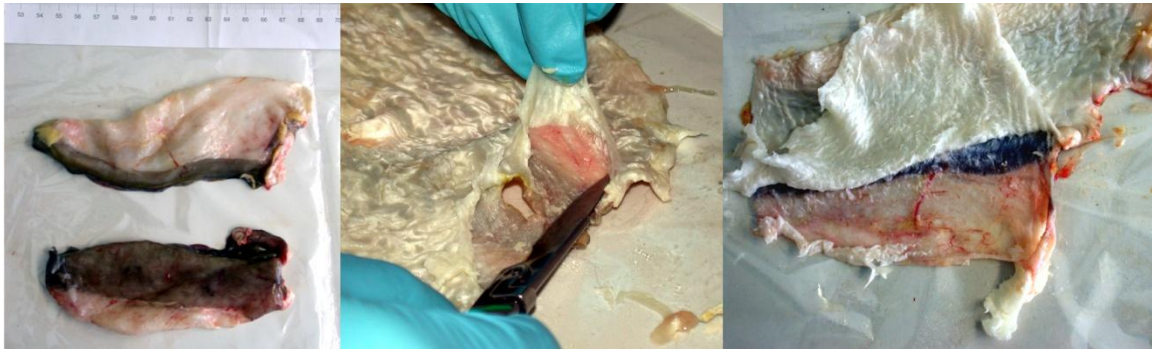
Nach erneutem Erwärmen des gelierten Leimsuds wurde er zum Trocknen auf Folie gegossen und im Wärmeschrank getrocknet. Danach wurden die Leime von der Folie entfernt und in verschließbaren Plastikbehältern, vor Feuchtigkeit geschützt, aufbewahrt (Abbildung B-3).

**Abbildung B-3:** Trocknung und Aufbewahrung des Leims



Für die Aufbereitung der frischen Störschwimmbblasen aus verschiedenen Zuchtfarmen wurde die kollagenhaltige Innenhaut der Blase mit dem Skalpell von der braunen Außenhaut (Muskelgewebe) vorsichtig getrennt (Abbildung B-4). Nach der Trocknung der Innenhäute (ca. 48 Std. bei RT) wurden diese über Nacht in Wasser eingeweicht und im Wasserbad für 2 Stunden bei 60 °C erwärmt. Nach dem Abfiltrieren ungelöster Rückstände wurden die Leime auf Folie ausgegossen, bei RT getrocknet und nach der Entfernung von der Folie ebenfalls in verschließbaren Plastikbehältern aufbewahrt.

**Abbildung B-4:** Störblasenaufbereitung: Trennung der Außenhaut von der eigentlich klebenden Innenhaut der frischen Störblase



Alle Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, in 1 mg/ ml Carbonatpuffer (w/v) überführt und extrahiert. Die kaltflüssigen Fischleime wurden vorher zum Trocknen auf Objektträger gestrichen.

### B1.4 Polysaccharidhaltige Proben

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper gegen Arabinogalactan-Proteine (#JIM13, #MAC207) und Tragant (#MAC265) wurden neben kommerziellen, aufgereinigten Gummen auch andere polysaccharidhaltige und verwandte Stoffe (Baumharze) getestet. Darüber hinaus wurden auch Materialien überprüft, deren Herkunft unbekannt war sowie verschiedene Holzarten (Tabelle B-9). Alle Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, in 1 mg/ ml Carbonatpuffer (w/v) überführt und extrahiert.

**Tabelle B-9:** Liste der polysaccharidhaltigen Proben und verwandte Stoffe

	Polysaccharidhaltige Proben	Bezugsquelle
Pflanzengummen	Tragant	Sigma Aldrich #G1128
	Kirschgummi	Kremer #63350
	<i>Locust bean gum</i> from <i>Ceratonia siliqua</i> seeds/ (Johannisbrotkernmehl) (auch Galactomannan Polysaccharid)	Sigma Aldrich #G0753
	Karayagummi aus verschiedenen Arten der indischen Stinkbäume ( <i>Sterculia</i> ) (auch Indischer Tragant)	Sigma Aldrich #G0503
	Ghatti Gummi (auch indisches Gummi)	Sigma Aldrich #G0378
	Gummi arabicum I	Sigma Aldrich #51198
	Gummi arabicum II	Herkunft unbekannt
	SRAS, Bindemittel aus Syrien	Markt Damaskus
	<i>Kathira</i> , Bindemittel aus Syrien	Markt Damaskus
Weitere polysaccharidhaltige	Klucel G (Hydroxypropylcellulose)	Talas #TAD010004
	Methylcellulose	Fisher Scientific #10144440
	(Hydroxypropyl)methyl Cellulose	Sigma Aldrich #H7509
	Dextrin aus Kartoffelstärke	Kremer #63420
	Reisstärke	Kremer #63440
	Weizenstärke	Kremer #63451
	Funori	Kremer #63477
	Holzarten: Pflaume, Kirsche, Apfel, Birne, Zeder, Nuss, Roteiche, Pappel, Ahorn, Fichte, Linde, Birke	Holzwerkstatt der HAWK
Baumharze	Mastix (Harz)	Sigma Aldrich #G0878
	Dammar (Harz)	Kremer #60001
	Manila Kopal (Harz)	Kremer #60150
	Feigenbaum-Saft ( <i>Ficus Benjamina</i> )	Eigene Ernte

## B1.5 Aufstrichpräparate

Für die ELISA Versuche bezüglich der Extraktions- und Spezifitätsversuche wurden verschiedene pigmentierte und unpigmentierte Aufstrichpräparate hergestellt. Dafür wurden unterschiedlich aufgeschlossene Kaseine, Eigelb und Vollei sowie Hautleim mit verschiedenen Pigmenten gemischt (Tabelle B-10-11).

Für die Proben mit Eigelb und Vollei wurde Hühnerei wie bereits beschrieben (→ Anhang B1.1) aufbereitet. Eigelb wurde anschließend mit Kreide, Vollei mit frz. Ocker und Terra Pozzuoli (rote Erden) unter Zugabe von etwas Wasser zu einer vermalbaren Konsistenz verarbeitet.

Für den Aufschluss von Kasein wurde getrocknetes Kaseinpulver in warmem Wasser vorgequollen und mit Alkalien (Ammoniumcarbonat, Borax und Sumpfkalk) aufgeschlossen. Die Rezeptanleitungen sind aus der Literatur entnommen (Doerner 2011; Wehlte 2005) und in Tabelle B-10-11 zusammenfasst. Für die Herstellung der Kaseinfarbe wurde Boraxkasein mit grüner Erde unter Zugabe von etwas Wasser zu einer vermalbaren Konsistenz verarbeitet.

Für die Herstellung der leimgebundenen Farben wurde eine Leimlöse mit Körnerhautleim (35 g), Hasenleim (35 g) und Wasser (1 L) angesetzt (über Nacht gequollen), erwärmt und jeweils mit Kreide und Terra Pozzuoli (rote Erden) vermischt und zu einer vermalbaren Konsistenz verarbeitet. Alle pigmentierte und unpigmentierten Ansätze wurden auf Objektträger gestrichen und nach der Trocknung, wenn nicht anders angegeben, in 1 mg/ ml Carbonatpuffer (w/v) überführt und extrahiert.

**Tabelle B-10:** Liste der hergestellten Kaseine

<b>Bezeichnung</b>	<b>Materialien/Rezepturen</b>
Kalkkasein / Quark	5 VT gut ausgedrückten Magerquark auf 1 VT Sumpfkalk (Kremer #31800) geben und mischen
Kalkkasein / Pulver	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 125 ml Wasser einweichen, 33 g Sumpfkalk (Kremer #31800) dazugeben
Boraxkasein	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 125 ml Wasser, 16 g Borax (Kremer #64000) in 125 ml heißem Wasser gelöst dazugeben
Ammoniumkasein	40 g Kaseinpulver (Kremer #63200) in 225 ml warmem Wasser einweichen, 10 g Ammoniumcarbonat (Kremer #64020) in wenig Wasser gelöst dazugeben



**Tabelle B-11:** Liste der pigmentierten Aufstrichpräparate

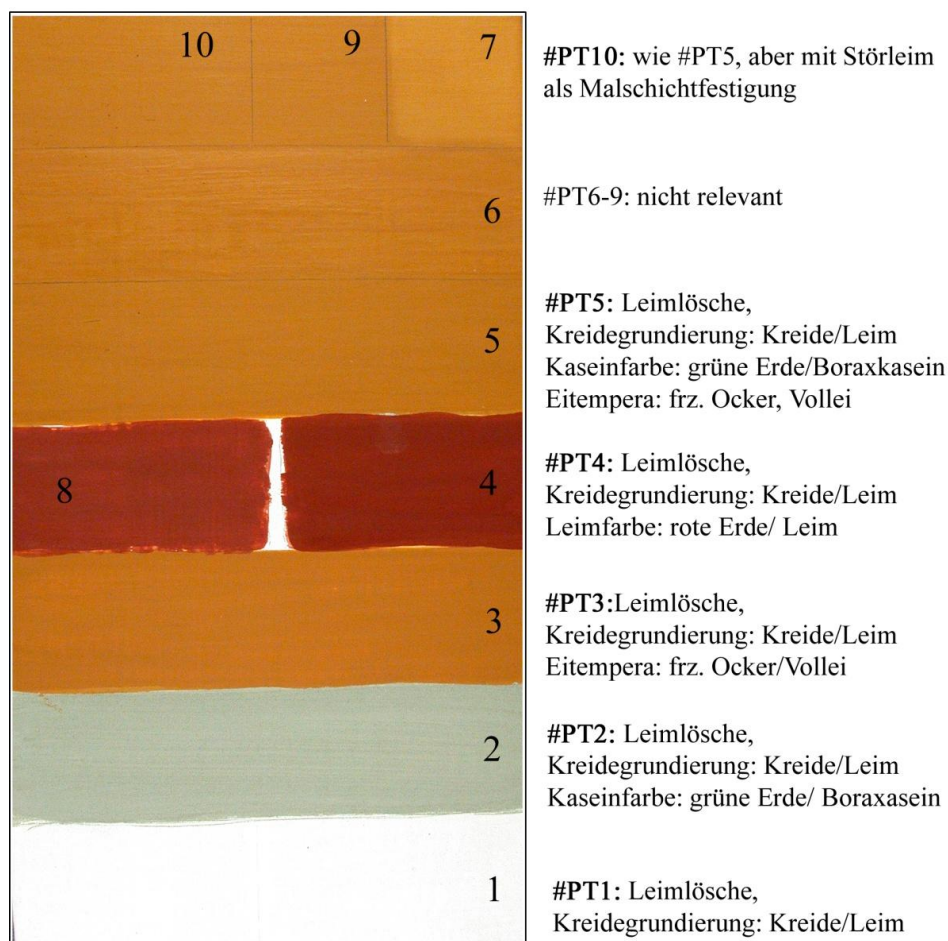
<b>Bezeichnung in der Arbeit</b>	<b>Verwendete Materialien</b>
Vollei/frz. Ocker	Vollei 1:1 (w/w), Wasser, frz. Ocker (Kremer #40010)
Vollei/rote Erde	Vollei 1:1 (w/w), Wasser, Rote Erden (Terra Pozzuoli; Kremer #41550)
Eigelb/Kreide	Eigelb, Wasser, Bologneser Kreide (Kremer #58100)
Boraxkasein/grüne Erde	Boraxkasein, Wasser, Böhmisches Grüne Erde (Kremer #41800)
Hautleim/Kreide	35 g Körnerhautleim (Kremer #63010), 35 g Hasenleim (Kremer #63025) und Wasser (1 L), Bologneser Kreide (Kremer #58100)
Hautleim/rote Erde	35 g Körnerhautleim (Kremer #63010), 35 g Hasenleim (Kremer #63025) und Wasser (1 L), Rote Erden (Terra Pozzuoli; Kremer #41550)

## B2 Herstellung definierte Probekörper

### B2.1 Probetafel mit Fassungs Aufbau

Die Probetafel (#PT) wurde bereits 2006 im Rahmen der Master Thesis der Autorin hergestellt (Schultz 2006). Seitdem ist sie natürlich gealtert und zumeist im Dunkel gelagert. Die Basis bilden unterschiedlich gebundene Fassungsschichten auf einem Holzträger. Die Rezepturen stammen aus der Literatur (Doerner 1985, Wehlte 2005) (Tabelle B-12) und die verwendeten Materialien sind in der Tabelle B-13 aufgelistet. Auf eine Leimlöschung zum Absperren des Holzträgers folgen eine leimhaltige Kreidegrundierung, eine kaseinhaltige Farbschicht mit Grüner Erde und eine eihaltige Schicht mit französischem, gelbem Ocker. Die Schichten wurden einzeln, sowie übereinander zu einem Schichtenpaket aufgetragen. Um restauratorische Maßnahmen in Form einer Malschichtfestigung nachzuempfinden, wurde abschließend Störleim auf einen definierten Teil der Platte in einer dünnen Schicht aufgetragen (Abbildung B-5).

**Abbildung B-5:** Probetafel #PT



**Tabelle B-12:** Rezepte und Anweisungen zur Herstellung der Probetafeln

<b>Bezeichnung</b>	<b>Arbeitsanweisung</b>	<b>Auftrag</b>
Leimlöse	Körnerhautleim (35 g), Hasenleim (35 g), Wasser (1 L)	1x
Kreide- grundierung	Champagner Kreide (1 VT), Bologneser Kreide (1 VT), Wasser, Leimlöschensatz (s.o.) (2 VT)	6x*
Kaseinfarbe	Kaseinpulver (40 g) in Wasser (125 ml), Borax (16 g) in heißem Wasser (125 ml) Grüne Erde mit etwas Wasser anreiben, Kaseinansatz (1 VT) mit Wasser verdünnen (3 VT) und zufügen	3x
Eitempera	Frz. Ocker (gelb) mit Wasser anreiben, Vollei und Wasser zugeben bis zur gewünschten Konsistenz	4x
Störleim	Störblase ~ 20 % in Wasser (w/v)	1x
Leimfarbe	Terra Pozzuoli mit Wasser anreiben, Leimlöschensatz (s.o.) bis zur gewünschten Konsistenz dazugeben	3x

\* zwischen 4. und 5. Auftrag sowie zum Abschluss wurde nochmals eine Leimlöse aufgetragen

**Tabelle B-13:** verwendete Materialien zur Herstellung der Probetafeln

<b>Bindemittel und Pigmente</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Körnerhautleim (#63010)	Kremer Pigmente, Aichstetten, Deutschland
Hasenleim (#63025)	
Kaseinpulver (#63200)	
Französischer Ocker JTCLES (#40010)	
Champagner Kreide (#58000)	
Bologneser Kreide (#58100)	
Böhmische Grüne Erde (#41800)	
Terra Pozzuoli (rotes Erdfarbenpigment) (#41550)	
Hühnerei	Einzelhandel
Störblase	Störzuchtfarm Desietra Fulda

## B2.2 Fassungsproben einer Referenzsammlung (Universität Pisa)

Die 22 Fassungsproben wurden von der Fakultät für Chemie und Technische Chemie der Universität in Pisa (Arbeitsgruppe Prof. Maria Perla Colombini) zur Verfügung gestellt. Mit Ausnahme der Proben XII-XVI und XVII-XIX wurden sämtliche Proben in den Werkstätten des Opificio delle Pietre Dure in Florenz im Zeitraum 1997-1998 hergestellt. Seitdem sind die Proben natürlich gealtert und zumeist im Dunkel gelagert. Einige der Proben wurden kurz nach ihrer Herstellung für zwei Wochen durch Einwirkung von UV Licht bzw. von Stickoxiden (NO<sub>x</sub>) künstlich gealtert. Die Proben XII-XVI und XVII-XIX sind jünger und wurden 2007 in den Laboren der Universität in Pisa hergestellt. Seitdem sind sie ebenfalls natürlich gealtert und zumeist im Dunkel gelagert.

Die Basis der Proben bilden die drei Bindemittel Ei, Kasein und tierischer Leim, die entweder rein, pigmentiert oder gemischt mit organischen Farbstoffen auf Glass, Putz oder Gips aufgetragen wurden. Zudem sind einige der Proben in Öltempera hergestellt und beinhalten neben Ei einen zusätzlich Ölanteil (Leinöl). Es wurde stets Vollei verwendet und bei dem tierischen Leim handelt es sich um kommerziellen Hasenhautleim (Quelle nicht mitgeteilt). Die vollständige Beschreibung der einzelnen Proben ist der Tabelle B-14 zu entnehmen.

**Tabelle B-14:** Probenbeschreibung, Universität Pisa

Proben-nr.	Original-bezeichnungen	Beschreibung	Alterung
I	Sm/Cp-v,22pS.UV	Smalte gebunden mit tierischem Leim auf Glas	UV
II	Tv/Ui-i, 13p	Grüne Erde gebunden mit Ei auf Putz	-
III	Bp/Lt-i 22pS.UV	Bleiweiß gebunden mit Kasein auf Putz	UV
IV	Sm/ui-vi, 15pS2 (UV)	Smalte gebunden mit Ei auf Glas	UV
V	Mn/Ui-i, 13p	Malachit gebunden mit Ei auf Putz	-
VI	Az/Cp Ui-i 13p	Azurit gebunden mit tierischem Leim und Ei auf Putz	-
VII	Mn/Tg-g 22p	Malachit gemischt mit Öltempera (Ei mit Leinöl) auf Gips	-
VIII	Tv/Lt-v 13pS.UV	Grüne Erde gemischt mit Kasein auf Glas	UV
IX	Cn/Tg-i 15p	Zinnober gemischt mit Öltempera (Ei mit Leinöl) auf Putz	-
X	Cn/Ui-i 13p	Zinnober gemischt mit Ei auf Putz	
XI	Ui-vi Nox 13p	Ei auf Glas	NO <sub>x</sub>
XII	Az1	Azurit gemischt mit Kasein auf Glas	
XIII	Az3	Azurit gemischt mit tierischem Leim	-

---

		auf Glas	
XIV	Az2	Azurit gemischt mit Ei auf Glas	-
XV	Bp/Tg-g 15p	Bleiweiß gebunden mit Öltempera (Ei mit Leinöl) auf Gips	-
XVI	Gs/Cp-v 15	Gips gemischt mit tierischem Leim auf Glas	-
XVII	Lt-v Nox 13p	Kasein auf Glas	NOx
XVIII	L2	Cochennille gemischt mit Ei auf Glas	-
XIX	L1	Krapp gemischt mit Ei auf Glas	-
XX	Tg-v 22	Öltempera (Ei mit Leinöl) auf Glas	-
XXI	Bp/Ui-I 22p	Bleiweiß gemischt mit Ei auf Putz	-
XXII	Cp-v	Tierischer Leim auf Glas	-

---

### B2.3 Künstlich gealterte Fassungsproben (Getty Conservation Institute)

Die Fassungsproben wurden von Joy Mazurek, *Assistant Scientist* am Getty Conservation Institute in Los Angeles zur Verfügung gestellt. Ei, Kasein, Kollagen und Gummi arabicum wurden mit jeweils 10 in der Wandmalerei gebräuchlichen Pigmenten gemischt (Tabelle B-15–16). Die Proben wurden nach traditionellen Rezeptanweisungen hergestellt, auf Objektträger aufgetragen und für 47 Tage künstlich gealtert (ATLAS Ci400 Weather-Ometer® mit Xenon-Lampe, Filter zum Abblocken des fernen UV Lichts, Bestrahlungsstärke 0,5 w/ m<sup>2</sup>, bei einer relativen Luftfeuchte zwischen 60-80 % und 40 °C Kammertemperatur) (Cartechini et al. 2010).

**Tabelle B-15:** Liste der verwendeten Pigmente

<b>Pigmente</b>	<b>Chemische Bezeichnung</b>	<b>Quelle/Herkunft</b>
Kreide	Calciumcarbonat	Kremer Pigmente (1992)
Bleiweiß	Basisches Blei(II)-carbonat	Zaandam (1994)
Auripigment	Arsen(III)-sulfid	Kremer Pigmente (1992)
Roter Ocker	Eisen(III)-oxid	Zaandam (1994)
Zinnober	Quecksilber(II)-sulfid	Kremer Pigmente (1992)
Malachit	Basisches Kupfer(II)-carbonat	Kremer Pigmente (2005)
Grüne Erde	Alumosilikate von Magnesium, Eisen und Kalium	Sennelier (1992)
Lapislazuli	Natrium-Aluminium-Silikat, enthält Schwefel	Keine Angabe
Maya Blau	-	Keine Angabe
Beinschwarz	-	Kremer Pigmente (1992)

**Tabelle B-16:** Liste der verwendeten Bindemittel sowie Mischungsverhältnisse

<b>Bindemittel</b>	<b>Menge des Bindemittels je Pigment (in Gew. %)</b>
Kasein	15 %, hergestellt aus Milch
Ei (Vollei)	50 %, hergestellt aus handelsüblichem Ei
Kollagen	5 %, Leimquelle unbekannt
Gummen	5 %, Gummiarabikum (Kremer)

## B2.4 Probetafeln zur Untersuchung von Streichinstrumentenlacken

Die Probetafeln wurden von Dipl.-Restauratorin Brigitte Brandmair hergestellt. Als Träger wurde Ahornholz verwendet, das mit Ammoniakdämpfen 3 Monate in einem Zelt vorbehandelt wurde. Die Probetafeln wurden vorderseitig mit verschiedenen proteinischen Bindemitteln versehen. Der Gelatine wurde Alaun zugesetzt, was eine härtende Wirkung auf den Leim hat und die Quellbarkeit des Proteins aufgrund von Denaturierung verringert. Neben den reinen proteinischen Bindemitteln wurde eine Probetafel (#1) mit einer Eigelb-Öllack-Wasser Emulsion behandelt.

Der Auftrag der Holzimprägnierung erfolgte einmalig und der Überschuss wurde jeweils mit Zellstoff abgetragen. Danach wurde je eine Hälfte der Vorderseite mit einem Öllack bestehend aus Sandarak, Kolophonium, Leinölfirnis und Terpentinersatz versehen. Die Rückseite blieb unbehandelt (Tabelle B-17, Abbildung B-6). Weitere Angaben zu den verwendeten Materialien und Bezugsquellen wurden nicht mitgeteilt.

**Tabelle B-17:** Zusammensetzung der Probetafeln zur Untersuchung der Holzvorbehandlung von Streichinstrumenten

<b>Probetafel- nr. #</b>	<b>Art der Holzvorbehandlung</b>
1	Eigelb mit Öllack und Wasser als Emulsion aufgetragen: 1:4:2
2	Eigelb pur aufgetragen
3	Eiklar pur aufgetragen
4	Kalkkasein (Quark mit Sumpfkalk; 2:1) pur aufgetragen
5	Milch 3,5 %; 3x mit Pinsel aufgetragen
6	Hautleim (Kremer #63020) : Wasser: 1:100
7	Gelatine mit Zusatz von Alaun (Aluminiumsulfat)
8*	Hausenblase in Blättern (Kremer #63100) mit Wasser verdünnt 5:100
9*	Störleim aus Zucht mit Wasser verdünnt 5:100

\* ohne Öllack

**Abbildung B-6:** Beispiel einer Probetafel zur Untersuchung der Holzvorbehandlung von Streichinstrumenten (#4). Vorderseite mit Holzimprägnierung zur Hälfte mit einem Öllack versehen (oben); unbehandelte Rückseite (unten).





## B2.5 Referenzproben zu Fixativen auf Pastellgemälden

Im Zuge der Untersuchungen von Fixativen an Pastellgemälden aus der Sammlung des Rijksmuseums in Amsterdam wurden Referenzproben auf verschiedenen Pergamenten, mit und ohne Pastellfarbe (Hämatit (Eisenoxid)), Fixativ und künstlicher Alterung hergestellt (Tabelle B-18, Abbildung B-7). Die Proben wurden von Cécile Gombaud, Restauratorin im Pastellkonservierungsprojekt am Rijksmuseum (2007-2009), hergestellt.

Das Fixativ für die Referenzproben wurde wie folgt hergestellt: 0,5 % (w/v) Störleim in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (1:1). Der Leim wurde zuerst in lauwarmem Wasser (50 ml) gelöst, bevor die langsame Zugabe von Ethanol (50 ml) in kleinen Mengen unter stetigem Rühren erfolgte, da sonst das Protein aus der Mischung ausfällt. Der Auftrag erfolgte im Spritzverfahren.

Ebenfalls in die Untersuchung der Referenzproben einbezogen, werden die Ausgangsmaterialien Pergament und Störleim (#A-D): Zwei verschiedene kommerzielle, laut Hersteller, unbehandelte Kalbspergamente, ein kommerzieller Störleim sowie das nach Rezept hergestellte, getrocknete Fixativ. Die künstliche Alterung erfolgte bei 80 °C und relative Luftfeuchte von 65 % für 15 Tage in der Klimakammer. Weitere Angaben zu den verwendeten Materialien und Bezugsquellen wurden nicht mitgeteilt.

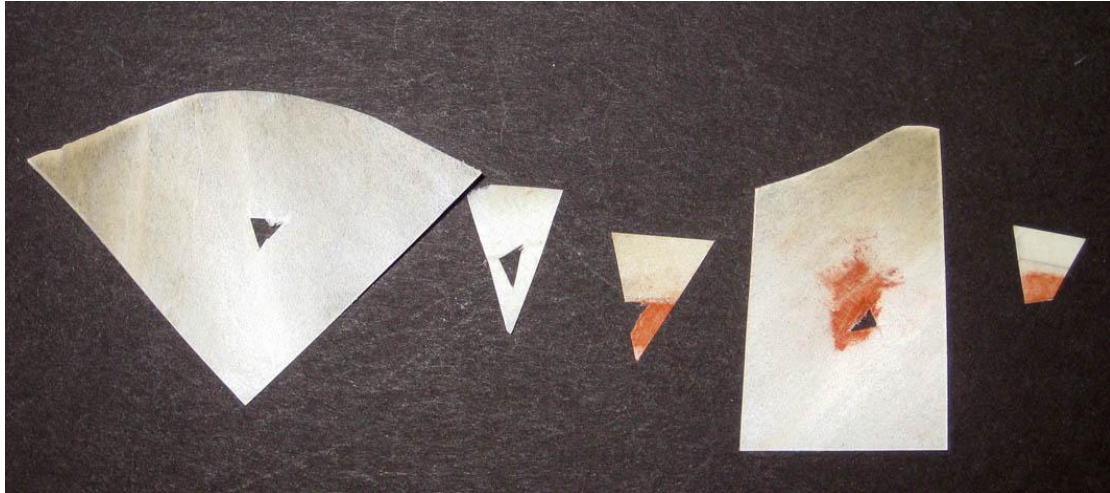
**Tabelle B-18:** Liste der Referenzproben zur Untersuchung von Fixativen auf Pastellgemälden

Proben- nr. #	Beschreibung	Künstliche Alterung
1	Kalbspergament mit Störleim-Fixativ	
2	Ziegenpergament mit Störleim-Fixativ	X
3	Kalbspergament mit Pastell (Hämatit Pastel Roché R2921) und Störleim-Fixativ	X
4	Kalbspergament mit Pastell (Hämatit Pastel Roché R2921) und Störleim-Fixativ	
5	Kalbspergament mit Pastell (Hämatit Pastel Roché R2921) ohne Störleim-Fixativ	X
A	Salianski Störleim (Kremer #63110)	
B	Fixativ-Rezept: 0,5 % Störleim in Wasser/Ethanol 1:1, gefiltert und getrocknet	
C	Kalbspergament (Z.H. de Groot)* 2009	
D	Kalbspergament (Jansen, Wijsmuller & Beuns B.V.)** 2009	

\* <http://www.dedas.com/parchment>

\*\* <http://jwb-ceka.com/>

**Abbildung B-7:** Referenzproben zur Untersuchung von Fixativen auf Pastellgemälden auf verschiedenen Pergamenten, mit und ohne Pastell (Hämatit (Eisenoxid)), Fixativ und künstlicher Alterung. V.l.n.r. Proben 1-5.



## B3 Reales Probenmaterial

### B3.1 Untersuchte Objekte und ihre Herkunft

Die ELISA Methode wurde an einer Auswahl von Kunstobjekten auf ihre Anwendbarkeit zum Nachweis von Proteinen und Gummen hin überprüft. Die unterschiedlichen Objekte stammen sowohl aus Privatbesitz als auch aus Museumssammlungen und sind in Tabelle B-19 aufgelistet. Dort ist auch die Anzahl der untersuchten Proben vermerkt. Die unterschiedlichen Fragestellungen zu den Objekten sind in den jeweiligen Fallbeispielen unter → Kap. 7 beschrieben.

**Tabelle B-19:** Liste der untersuchten Objekte

Objekt	Herkunft, Datierung, Hersteller	Sammlung	Inv. Nr.	Probenanzahl
Cello	Italien, 1. Hälfte 18. Jh., Zuschreibung A. Stradivari	Privat	#5167*	1
Cello	Italien, 1707, A. Stradivari	Privat	#C1707*	1
Violine	Italien, um 1730, A. Stradivari	Privat	#4058*	1
Violine	Italien, um 1720, A. Stradivari	Privat	#5640*	1
Satz von 5 Stangen- tuschen (ink)	Winsor & Newton, Malkasten von 1850	Referenz- sammlung,	#1*	2
	Stangetusche aus Nara (Japan), um 1990 (modern)	Privat	#2*	2
	Stangentusche von W. Reeves & Sons		#3*	2
	Stangentusche von W. Reeves & Sons		#4*	2
	T.J.Morris Malkasten		#5*	2
Gefasste Holzskulptur	Italien, spätes 13. Jh., Darstellung des Heiligen Johannes („ <i>Saint John</i> “)	The Cloisters Collection, New York	#25.120.215	2
Polychrome, hölzerne Raum- ausstattung,	Damaskus, 1707 (Inscription), Empfangsraum “ <i>Damascus Room</i> ”	The Metropolitan Museum of Art (MMA), New York	#1970.170	11
Beinfragment einer antiken Steinstatue	Aphrodisias, antike Stadt (1. Jh. v. Chr. – 6. Jh. n. Chr.), archäologische Stätte (Türkei); Fragment einer heroischen, nackten	“ <i>Aphrodisias excavations</i> ” (Türkei)	#76-101	2




männlichen Statue				
Gewand- fragment einer antiken Steinstatue	Aphrodisias, antike Stadt (1. Jh. v. Chr. – 6. Jh. n. Chr.), archäologische Stätte (Türkei), Fragment einer überlebensgroße Marmorstatue	“ <i>Aphrodisias excavations</i> ” (Türkei)	#75-290	1
Pastell	„La Liseuse“, J. É. Liotard (1702-1789), datiert 1746	Rijksmuseum Amsterdam	#SK-A-228	1
Pastell	“The three Graces”, J. É. Liotard (1702-1789), datiert 1737		#SK-A-242	1
Pastell	“The view of Geneve” J. É. Liotard (1702-1789); datiert zwischen 1765- 1760		#SK-A-1197	1
Schreib- schrank	Doppelschreibrack in Boulle Technik, Johann Puchwiser, München, 1704-1715	Bayerisches National- museum (BNM), München	#R3891	1
Kabinett- schrank	Schrank in Boulle Technik, 1685 datiert, süddeutsch	Museum Würth, Künzelsau/ Schwäbisch Hall	A*	4
Kleiner Hausalter	Holzaltar in Boulle Technik, 1. Hälfte 18. Jh., vermutlich süddeutsch	privat	B*	3
Pendule	Frz. Pendeluhr in Boulle Technik, um 1730 – 1750, Paris	privat	C*	2
Pendule	Frz. Pendeluhr in Boulle Technik, Anfang 18. Jh., Paris, evtl. aus der Werkstatt von Charles A. Boulle	privat	D*	2
Pendule	Frz. Pendeluhr in Boulle Technik, gegen Mitte des 18. Jh., Paris	privat	E*	2




\*Bezeichnung der Autorin bzw. der zuständigen Restauratoren


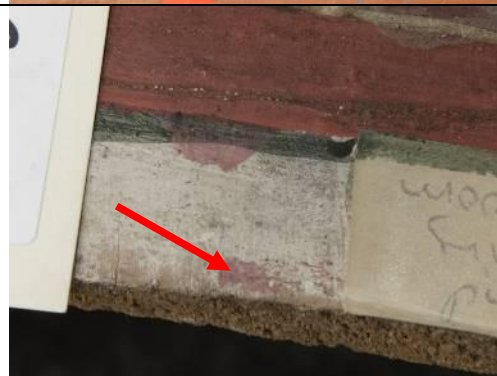


### B3.2 *Damascus Room* (MMA, #1970.170): Probenentnahmestellen und – Beschreibung

Die Untersuchung der Bindemittel im *Damascus Room* (MMA, #1970.170) mittels ELISA umfasste insgesamt elf Fassungsproben. Detailaufnahmen der Probeentnahmestellen und -Beschreibung sind in Tabelle B-20 aufgeführt.

**Tabelle B-20:** *Damascus Room* (MMA, #1970.170): Liste der Probenentnahmestellen und Beschreibungen. The Metropolitan Museum of Art.

Probennr. #	Beschreibung und Standort des architektonischen Elements	Detailaufnahmen der Probeentnahmestellen
E9a_01	Inschrift-Panel, Rückseite, Randbereich; Holzgrundierung, Vorleimung	
CT3E_05	Deckenpanel, geschützter Bereich an der Kante/Rand; Grundierungsschicht (Calciumsulfat)	
CA5_03	Deckenbalken; 'ajami/Pastiglia (Calciumsulfat) Schicht	

N7_01	Schranktüren, Blumenmuster; Blaue (Smalte) und weiße (Bleiweiß) Farbschicht	
CA5_01	Deckenbalken, Hintergrundfarbe; Blaue (Smalte) Farbschicht	
CA5_02	Deckenbalken; Blaue (Smalte), rosa und weiße (organischer roter Farblack und Bleiweiß) Farbschicht	Wie CA5_01
S7- 9CoU_01	Rückseite eines Gesimsbrettes, geschützten Bereich auf dem Zapfen; Blaue (Smalte) Farbschicht	

NAr_04	Grenzlinie, aus einem geschützten Bereich eines Bogenabschnitt; Rote (Mennige) Farbschicht	
CT3E_03	Deckenpanel, geschützter Bereich am Rand; Rosa (organischer roter Farblack/Bleiweiß) Farbschicht	
N1-3CoL_03	Gesimsabschnitt, Rückseite, geschützter Bereich; Grüne (Grünspan/Bleiweiß) Farbschicht	
SAr_01	Bogenabschnitt, Randbereich ohne Firnis/Überzug; Gelbe (Auripigment) Farbschicht	

### B3.3 *Damascus Room* (MMA, #1970.170): Tabellarische Zusammenfassung aller Analyseergebnisse

Der *Damascus Room* (MMA, #1970.170) aus dem Metropolitan Museum of Art wurde zwischen 2008 - 2010 von einem interdisziplinären Team an Restauratoren, Kunsthistorikern und Naturwissenschaftlern intensiv kunsttechnologisch und naturwissenschaftlich untersucht werden. Tabelle B-21 zeigt die tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus Baumeister et al. (2010) zu den Malmaterialien und Blattmetallen.

**Tabelle B-21:** *Damascus Room* (MMA, #1970.170), tabellarische Zusammenfassung aller Analyseergebnisse (Baumeister et al. 2010)

	Pigment/ colorant	Binder	Methods	Comments
<b>PAINT</b>				
<b>Red 1</b>	Red lead, often with vermilion impurities	Egg (whole)	Raman, FTIR, GC/MS, PyGC/MS, ELISA	ELISA detected ovalbumin. The oil:protein ratio and amount of fatty acids are close to whole egg
<b>Red 2</b>	Vermilion	Oil-protein	Raman, ATR-FTIR	Most likely egg medium. Found in conjunction with red lead underlayer.
<b>Orange</b>	Vermilion/orpiment		FTIR	
<b>Pink</b>	Organic red lake (cochineal?)/lead white	Egg	Raman, SERS, FTIR, ELISA	FTIR shows oil- protein, possibly egg.
<b>Violet</b>	Organic red lake/smalt	oil-protein	Raman, SERS, FTIR	Poor SERS spectrum for the organic red
<b>Blue 1</b>	Smalt (potash-based glass)	Egg (whole or white)	Raman, FTIR, GC/MS, PyGC/MS, ELISA, SEM/EDS	ELISA detected ovalbumin. SEM/EDS shows 1-2 % cobalt content; barium, arsenic, aluminum are also present. GC/MS and PyGC/MS show non-drying oil. The oil:protein ratio and the amount of fatty acids are between those of egg white and whole egg.
<b>Blue 2</b>	Indigo/lead white	Oil-protein	Raman, FTIR, PLM	
<b>Green 1</b>	Basic verdigris/lead white	Egg (whole or yolk)	Raman, FTIR, GC/MS, PyGC/MS, ELISA	ELISA detected ovalbumin. Oil:protein ratio and amount of fatty acids are between egg yolk and whole egg
<b>Green 2</b>	Orpiment/indigo	Oil-protein	Raman, FTIR, PLM	
<b>Yellow</b>	Orpiment	Egg	FTIR, PyGC/MS, ELISA	ELISA detected ovalbumin. Non-drying oil. Slight contamination from <i>Pinaceae</i> resin and possibly oil from varnish
<b>Black</b>	Carbon black	Protein-gum	FTIR, PyGC/MS, GC/MS	
<b>White 1</b>	Lead white	Oil-protein	FTIR, ATR-FTIR, Raman	
<b>White 2</b>	Gypsum		Raman	Exposed ground layer used as white background



**GLAZES**

<b>Green</b>	Verdigris	Drying oil-Pinaceae resin	FTIR, PyGC/MS	Probable linseed oil, based on palmitic acid/ stearic acid ratio
<b>Red</b>	Cochineal (probable), no inorganic substrate	Drying oil-Pinaceae resin	Raman, SERS, FTIR, ATR-FTIR, PyGC/MS, SEM/EDS	Likely contaminated from upper varnishes
<b>Yellow</b>	Undetermined	Drying oil-Pinaceae resin	FTIR, PyGC/MS (Scan), HPLC	Likely contaminated from upper varnishes
<b>Orange</b>	Aloe (probable)	Drying oil-Pinaceae resin	FTIR, PyGC/MS (Scan and SIM), GC/MS (Scan and SIM), HPLC	Probable linseed oil, on the basis of the palmitic acid/ stearic acid ratio.

**PREPARATION LAYERS**

<b>Wood size</b>	---	Collagen glue	FTIR, ELISA	ELISA detected collagen
<b>Ground and ajami</b>	Gypsum	Collagen glue	FTIR, ELISA	ELISA detected collagen

**METAL LEAF**

	<b>Composition</b>	<b>Methods</b>	<b>Comments</b>
<b>Tin</b>	Tin, cassiterite (SnO <sub>2</sub> ) and romarchite (SnO)	SEM/EDS, Micro-XRD	Romarchite and cassiterite are corrosion products present in some samples.
<b>Gold</b>	95.5 % Au, 4 % Ag and 0.5 % Cu	SEM/EDS	

## Anhang C: Durchführung der AP ELISA Methode

Unveröffentlichte ELISA Methode (Metropolitan Museum of Art New York) (Stand September 2009)

- Extraction: Place sample (\_\_\_\_µg) in a plastic tube containing \_\_\_\_µl sodium carbonate buffer (0.05 M NaCO<sub>3</sub> solution, pH 9.6). Mix well on a vortex and store over night at 40 °C. Centrifugation at 18890 rcf for 10 min., transfer of supernatant with the extracted proteins to a new vial. Prepare appropriate dilutions using 0.05 M sodium carbonate buffer.
- Plate 50 µl of sample dilutions into appropriate wells of a flat bottom micro-ELISA plate (96 MicroWell™ Plates MaxiSorp™, Nunc #439454, Rochester, NY), cover the plate and incubate at least for 24h at 4 °C.
- Empty the content of the plate and wash twice with 300 µl/well with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) only.
- Add 300 µl/well of blocking buffer (5 % Newborn calf serum (NCS) diluted in PBS) and incubate 1 hour at room temperature.
- Empty content and wash twice with 300 µl of 0.05 % Tween-20 in PBS and twice with PBS only.
- Add 100 µl/well of primary antibody solution (1:10.000 ovalbumin (#AB1225), casein (#RCAS-10A); 1:500 collagen (#ab34710); 1:10 gums (#JIM13) in 5% NCS/PBS). Cover the plate and incubate 1h at room temperature.
- Empty content and wash twice with 0.05 % Tween-20 in PBS, twice with PBS only.
- Add 100 µl/well of secondary antibody solution (1:500 GARb/AP (#AP132A) for ovalbumin, casein, collagen; 1:1000 GART/AP (#ab6846) for gums in 5 % NCS/PBS). Cover the plate and incubate 1h at room temperature.
- Empty content, wash twice with 300 µl of 0.05 % Tween-20 in PBS, twice with PBS only and twice with alkaline phosphatase buffer (AP) (10 mM Tris, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl<sub>2</sub>, pH 9.5).
- Add 100 µl/well p-Nitrophenyl Phosphate solution (p-NPP) (1-step-p-NPP, Pierce Chemicals, #34045). Measure the optical density of the yellow color (at 405 nm) developed by conversion of the substrate using an automated plate reader (Molecular Devices, SpectraMax 250) at the intervals: 15, 30, 45, 60 minutes.
- Add 100 µl/well of 0.75 M NaOH stopping reagent. Read one more time.

# Anhang D: Datenblätter und Herstelleranweisungen

## D1 Arbeitsanweisung BCA Durchführung (Pierce)<sup>1</sup>

### INSTRUCTIONS



## Pierce™ BCA Protein Assay Kit

23225 23227

1296.9

Number	Description
23225	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 500 test-tube or 5000 microplate assays
23227	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 250 test-tube or 2500 microplate assays

#### Kit Contents:

**BCA Reagent A**, 1000mL (in Product No. 23225) or 500mL (in Product No. 23227), containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide

**BCA Reagent B**, 25mL, containing 4% cupric sulfate

**Albumin Standard Ampules, 2mg/mL**, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at 2mg/mL in 0.9% saline and 0.05% sodium azide

**Storage:** Upon receipt store at room temperature. Product shipped at ambient temperature.

**Note:** If either Reagent A or Reagent B precipitates upon shipping in cold weather or during long-term storage, dissolve precipitates by gently warming and stirring solution. Discard any kit reagent that shows discoloration or evidence of microbial contamination.

### Table of Contents

Introduction .....	1
Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures).....	2
Test Tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20) .....	3
Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8) .....	3
Troubleshooting .....	4
Related Thermo Scientific Products .....	5
Additional Information .....	5
References .....	6

### Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay is a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^{+1}$  by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation ( $\text{Cu}^{+1}$ ) using a unique reagent containing bicinchoninic acid.<sup>1</sup> The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20-2000 $\mu\text{g/mL}$ ). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA.<sup>2</sup> Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups.<sup>2</sup> Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknown(s) before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is required, it is advisable to select a protein

<sup>1</sup> <https://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf> (aufgerufen März 2014)



standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see Related Thermo Scientific Products) may be used when assaying immunoglobulin samples.

Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10-25µL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is 1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

## Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

### A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of 2mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

**Table 1.** Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5-250µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

### B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

- Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$$

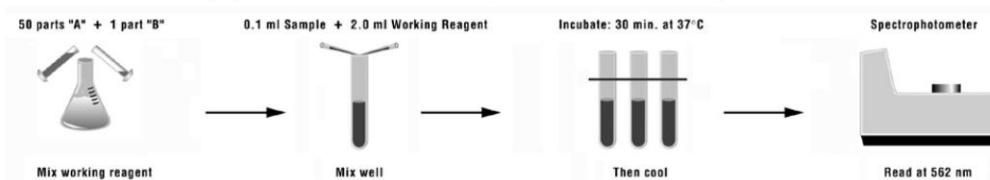
Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:

$$(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2\text{mL}) = 48\text{mL WR required}$$

**Note:** 2.0mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200 µl of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

- Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50mL of Reagent A with 1mL of Reagent B.

**Note:** When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

**Procedure Summary (Test-tube Procedure, Standard Protocol)**

**Test-tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)**

1. Pipette 0.1mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
2. Add 2.0mL of the WR to each tube and mix well.
3. Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
  - Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20-2000µg/mL)
  - RT Protocol: RT for 2 hours (working range = 20-2000µg/mL)
  - Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5-250µg/mL)

**Notes:**

- Increasing the incubation time or temperature increases the net 562nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
  - Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.
4. Cool all tubes to RT.
  5. With the spectrophotometer set to 562nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water. Subsequently, measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.
 

**Note:** Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.
  6. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.
  7. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

**Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)**

1. Pipette 25µL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2000µg/mL) (e.g., Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).

**Note:** If sample size is limited, 10µL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2000µg/mL.

2. Add 200µL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.
4. Cool plate to RT. Measure the absorbance at or near 562nm on a plate reader.

**Notes:**

- Wavelengths from 540-590nm have been used successfully with this method.
- Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.
- Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.



5. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

**Note:** If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

### Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
No color in any tubes	Sample contains a copper chelating agent	Dialyze, desalt or dilute sample Increase copper concentration in working reagent (e.g., use 50:2, Reagent A:B) Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
Blank absorbance is OK, but standards and samples show less color than expected	Strong acid or alkaline buffer, alters working reagent pH	Dialyze, desalt, or dilute sample
	Color measured at the wrong wavelength	Measure the absorbance at 562nm
Color of samples appears darker than expected	Protein concentration is too high	Dilute sample
	Sample contains lipids or lipoproteins	Add 2% SDS to the sample to eliminate interference from lipids <sup>3</sup> Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
All tubes (including blank) are dark purple	Buffer contains a reducing agent	Dialyze or dilute sample
	Buffer contains a thiol	Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
	Buffer contains biogenic amines (catecholamines)	
Need to measure color at a different wavelength	Spectrophotometer or plate reader does not have 562nm filter	Color may be measure at any wavelength between 540nm and 590nm, although the slope of standard curve and overall assay sensitivity will be reduced

#### A. Interfering substances

Certain substances are known to interfere with the BCA assay including those with reducing potential, chelating agents, and strong acids or bases. Because they are known to interfere with protein estimation at even minute concentrations, avoid the following substances as components of the sample buffer:

Ascorbic acid	EGTA	Iron	Impure sucrose
Catecholamines	Impure glycerol	Lipids	Tryptophan
Creatinine	Hydrogen peroxide	Melibiose	Tyrosine
Cysteine	Hydrazides	Phenol Red	Uric acid

Other substances interfere to a lesser extent with protein estimation using the BCA assay, and these have only minor (tolerable) effects below a certain concentration in the original sample. Maximum compatible concentrations for many substances in the Standard Test Tube Protocol are listed in Table 2 (see last page of Instructions). Substances were compatible at the indicated concentration in the Standard Test Tube Protocol if the error in protein concentration estimation caused by the presence of the substance was less than or equal to 10%. The substances were tested using WR prepared immediately before each experiment. Blank-corrected 562nm absorbance measurements (for a 1000 $\mu\text{g/mL}$  BSA standard + substance) were compared to the net 562nm measurements of the same standard prepared in 0.9% saline. Maximum compatible concentrations will be lower in the Microplate Procedure where the sample to WR ratio is 1:8 (v/v).

Furthermore, it is possible to have a substance additive affect such that even though a single component is present at a concentration below its listed compatibility, a sample buffer containing a combination of substances could interfere with the assay.



### B. Strategies for eliminating or minimizing the effects of interfering substances

The effects of interfering substances in the Pierce BCA Protein Assay may be eliminated or overcome by one of several methods.

- Remove the interfering substance by dialysis or gel filtration.
- Dilute the sample until the substance no longer interferes. This strategy is effective only if the starting protein concentration is sufficient to remain in the working range of the assay upon dilution.
- Precipitate the proteins in the sample with acetone or trichloroacetic acid (TCA). The liquid containing the substance that interfered is discarded and the protein pellet is easily solubilized in ultrapure water or directly in the alkaline BCA WR.<sup>4</sup> A protocol detailing this procedure is available from our website. Alternatively, Product No. 23215 may be used (see Related Thermo Scientific Products).
- Increase the amount of copper in the WR (prepare WR as 50:2 or 50:3, Reagent A:B), which may eliminate interference by copper-chelating agents.

**Note:** For greatest accuracy, the protein standards must be treated identically to the sample(s).

### Related Thermo Scientific Products

15041	Pierce 96-Well Plates, 100/pkg.
15075	Reagent Reservoirs, 200/pkg.
15036	Sealing Tape for 96-Well Plates, 100/pkg.
23209	Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA)
23208	Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set, 7 × 3.5mL
23212	Bovine Gamma Globulin Standard, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules
23213	Pre-Diluted Protein Assay Standards, (BGG) Set, 7 × 3.5mL aliquots
23235	Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, working range of 0.5-20µg/mL
23236	Coomassie Plus™ (Bradford) Assay Kit, working range of 1-1500µg/mL
23215	Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set
23250	Pierce BCA Protein Assay Kit—Reducing Agent Compatible

### Additional Information

#### A. Please visit our website for additional information including the following items:

- Tech Tip #8: Eliminate interfering substances from samples for BCA Protein Assay

#### B. Alternative Total Protein Assay Reagents

If interference by a reducing substance or metal-chelating substance contained in the sample cannot be overcome, try the Thermo Scientific Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Product No. 23236), which is less sensitive to such substances.

#### C. Cleaning and Re-using Glassware

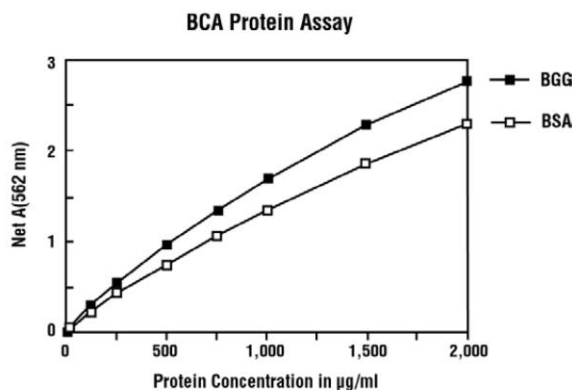
Exercise care when re-using glassware. All glassware must be cleaned and given a thorough final rinse with ultrapure water.

#### D. Response characteristics for different proteins

Each of the commonly used total protein assay methods exhibits some degree of varying response toward different proteins. These differences relate to amino acid sequence, pI, structure and the presence of certain side chains or prosthetic groups that can dramatically alter the protein's color response. Most protein assay methods use BSA or immunoglobulin (IgG) as the standard against which the concentration of protein in the sample is determined (Figure 1). However, if great accuracy is required, prepare the standard curve from a pure sample of the target protein.

Typical protein-to-protein variation in color response is listed in Table 3. All proteins were tested at 1000µg/mL using the 30-minute/37°C Test Tube Protocol. The average net color response for BSA was normalized to 1.00 and the average net color response of the other proteins is expressed as a ratio to the response of BSA.

**Thermo**  
SCIENTIFIC



**Figure 1:** Typical color response curves for BSA and BGG using the Standard Test Tube Protocol (37°C/30-minute incubation).

**Table 3. Protein-to-protein variation.** Absorbance ratios (562nm) for proteins relative to BSA using the Standard Test Tube Protocol.

Ratio = (Avg "test" net Abs.) / (avg. BSA net Abs.)

Protein Tested	Ratio
Albumin, bovine serum	1.00
Aldolase, rabbit muscle	0.85
$\alpha$ -Chymotrypsinogen, bovine	1.14
Cytochrome C, horse heart	0.83
Gamma globulin, bovine	1.11
IgG, bovine	1.21
IgG, human	1.09
IgG, mouse	1.18
IgG, rabbit	1.12
IgG, sheep	1.17
Insulin, bovine pancreas	1.08
Myoglobin, horse heart	0.74
Ovalbumin	0.93
Transferrin, human	0.89
<b>Standard Deviation</b>	<b>1.02</b>
<b>Coefficient of Variation</b>	<b>0.15</b>
	<b>14.7%</b>

#### Cited References

1. Smith, P.K., *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
2. Wiechelman, K., *et al.* (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**:231-7.
3. Kessler, R. and Fanestil, D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **159**:138-42.
4. Brown, R., *et al.* (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* **180**:136-9.

#### Product References

- Adilakshami, T. and Laine, R.O. (2002). Ribosomal protein S25 mRNA partners with MTF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem* **277**:4147-51.
- Fischer, T., *et al.* (1999). Clathrin-coated vesicles bearing GAIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. *Proc Nat Acad Sci* **96**:6722-7.
- Prozialeck, W.C., *et al.* (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequester  $\beta$ -catenin in human cervical epithelial cells. *Infection and Immunity* **70**:2605-13.
- Roberts, K.P., *et al.* (2002). A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biology of Reproduction* **67**:525-33.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS.

Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to humans or animals.

Current product instructions are available at [www.thermoscientific.com/pierce](http://www.thermoscientific.com/pierce). For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Triton is a trademark of The Dow Chemical Company. Brij, Tween and Span are trademarks of Croda International PLC. Zwittergent is a trademark of Merck KGaA. All (other) trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Pierce Biotechnology  
3747 N. Meridian Road

PO Box 117  
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747  
(815) 968-7316 fax

[www.thermoscientific.com/pierce](http://www.thermoscientific.com/pierce)





**Table 2. Compatible substance concentrations in the Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (see text for details).<sup>§</sup>**

Substance	Compatible Concentration	Substance	Compatible Concentration
<b>Salts/Buffers</b>		<b>Detergents**</b>	
ACES, pH 7.8	25mM	Brij™-35	5.0%
Ammonium sulfate	1.5M	Brij-56, Brij-58	1.0%
Asparagine	1mM	CHAPS, CHAPSO	5.0%
Bicine, pH 8.4	20mM	Deoxycholic acid	5.0%
Bis-Tris, pH 6.5	33mM	Octyl β-glucoside	5.0%
Borate (50mM), pH 8.5 (# 28384)	undiluted	Nonidet P-40 (NP-40)	5.0%
B-PER™ Reagent (#78248)	undiluted	Octyl β-thioglucoopyranoside	5.0%
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10mM	SDS	5.0%
Na-Carbonate/Na-Bicarbonate (0.2M), pH 9.4 (# 28382)	undiluted	Span™ 20	1.0%
Cesium bicarbonate	100mM	Triton™ X-100	5.0%
CHES, pH 9.0	100mM	Triton X-114, X-305, X-405	1.0%
Na-Citrate (0.6M), Na-Carbonate (0.1M), pH 9.0 (# 28388)	1:8 dilution*	Tween™-20, Tween-60, Tween-80	5.0%
Na-Citrate (0.6M), MOPS (0.1M), pH 7.5 (#28386)	1:8 dilution*	Zwittergent™ 3-14	1.0%
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	0.8mM	<b>Chelating agents</b>	
EPPS, pH 8.0	100mM	EDTA	10mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10mM	EGTA	-----
Glycine•HCl, pH 2.8	100mM	Sodium citrate	200mM
Guanidine•HCl	4M	<b>Reducing &amp; Thiol-Containing Agents</b>	
HEPES, pH 7.5	100mM	N-acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	10mM
Imidazole, pH 7.0	50mM	Ascorbic acid	-----
MES, pH 6.1	100mM	Cysteine	-----
MES (0.1M), NaCl (0.9%), pH 4.7 (#28390)	undiluted	Dithioerythritol (DTE)	1mM
MOPS, pH 7.2	100mM	Dithiothreitol (DTT)	1mM
Modified Dulbecco's PBS, pH 7.4 (#28374)	undiluted	Glucose	10mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10mM	Melibiose	-----
PBS; Phosphate (0.1M), NaCl (0.15M), pH 7.2 (# 28372)	undiluted	2-Mercaptoethanol	0.01%
PIPES, pH 6.8	100mM	Potassium thiocyanate	3.0M
RIPA lysis buffer; 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS, pH 8.0	undiluted	Thimerosal	0.01%
Sodium acetate, pH 4.8	200mM	<b>Misc. Reagents &amp; Solvents</b>	
Sodium azide	0.2%	Acetone	10%
Sodium bicarbonate	100mM	Acetonitrile	10%
Sodium chloride	1M	Aprotinin	10mg/L
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200mM	DMF, DMSO	10%
Sodium phosphate	100mM	DMSO	10%
Tricine, pH 8.0	25mM	Ethanol	10%
Triethanolamine, pH 7.8	25mM	Glycerol (Fresh)	10%
Tris	250mM	Hydrazides	-----
TBS; Tris (25mM), NaCl (0.15M), pH 7.6 (# 28376)	undiluted	Hydrides (Na <sub>2</sub> BH <sub>4</sub> or NaCNBH <sub>3</sub> )	-----
Tris (25mM), Glycine (192mM), pH 8.0 (# 28380)	1:3 dilution*	Hydrochloric Acid	100mM
		Leupeptin	10mg/L

\* Diluted with ultrapure water.

\*\* Detergents were tested using high-purity Thermo Scientific Surfact-Amps Products, which have low peroxide content.

-- Dashed-line entry indicates that the material is incompatible with the assay.

<sup>§</sup> For a more extensive list of substances, download Tech Tip # 68: Protein assay compatibility table from our website. This Tech Tip includes compatible substances for all of our protein assays and enables easy comparisons.

## D2 Mikrotiterplatten Abmessungen

### D2.1 Polyvinylchlorid PVC, BD #353912<sup>2</sup>



Document Number: Rev:  
LSR00008 3.0

Page  
1 of 2

### PVC Flexible Assay Plates - 96 Well - Flat Bottom

---

#### APPLICATIONS:

Flexible assay plates are used for nonquantitative experiments in serial dilutions or where the wells must be cut apart for analysis.

#### FEATURES:

- Can be cut apart for radioimmunoassay (RIA) analysis
- Can be used in a water bath
- Packaged in convenient dispenser box

#### STERILITY:

- Non-sterile

#### RESTRICTIONS:

- Refer to "Thermoplastics Properties Chart," available via internet at [http://www.bdbiosciences.com/discovery\\_labware/technical\\_resources/pdf/p30-31.pdf](http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/technical_resources/pdf/p30-31.pdf)

---

<sup>2</sup> [http://www.bdbiosciences.com/discovery\\_labware/technical\\_resources/pdf](http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/technical_resources/pdf) (aufgerufen September 2009)



Document Number: Rev:  
**LSR00008 3.0**

Page  
**2 of 2**

## PVC Flexible Assay Plates - 96 Well - Flat Bottom

**MATERIAL: PVC .024" Thick**

Related Catalog Numbers:  
 Non-sterile

**Cat. No.**  
 353912

**Packout Description**  
 25/box 50/case w/lid

**Nominal Dimensions: = XXX mm (XXX inches)**

**PLATE:**

Length: A = 128.02 (5.040)

Width: B = 86.06 (3.388)

Height: C = 11.56 (.455)

Markings:

Alpha-Numerical

Ht. w/lid on = 15.24 (.600)

**WELL:**

Top Int. Diameter = 6.85 (.270)

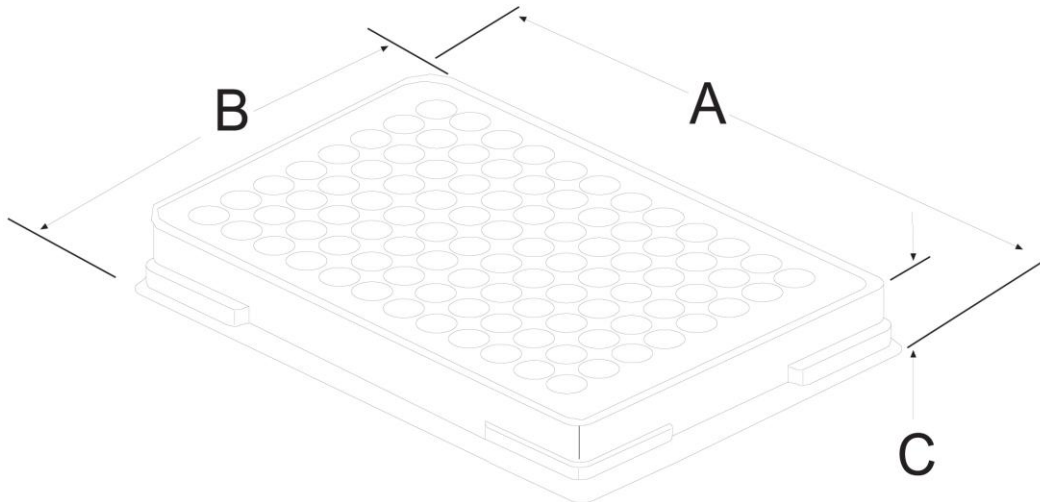
Bot. Int. Diameter = 5.66 (.223)

Depth = 8.50 (.335)

Bottom area = 0.267 sq. cm<sup>2</sup> (0.042 sq. in<sup>2</sup>)

Center to center = 8.99 (.354)

Bottom Thickness = .60 (.024)



## D2.2 Polystyren PS, Nunc Maxisorp #439454, Nunc MicroWell #260836<sup>3</sup>

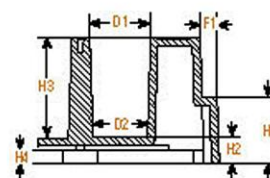
### F96 MicroWell Plates, Polystyrene



High Flange Design

Pinchbar Design

(Cat. Nos. 269620, 269787, 439454, 442404 and 475094)



	mm
Total height of plate	14.4 ± 0.2
H2 Vertical distance from inside well bottom to resting plane	3.0
H3 Inside depth of well	11.4
H4 Vertical distance from external well bottom to resting plane	1.9
H5 Height of flange on the short side	2.4
H6 Height of flange on the long side	7.4
D1 Well diameter, top	7.0
D2 Well diameter, bottom	6.2
F1 Depth of flange	1.7

Cat. No.	Surface	Color	Total vol., µl/well	Sterile	With lid	Barcode	Units per pack/case
145397	Low Cell Binding	Clear	300	Irradiated	Yes	No	1/8
158545*	NuncIonΔ	Clear	400	Yes	No	No	10/180
161093*	NuncIonΔ	Clear	400	Yes	Yes	No	10/180
167008*	NuncIonΔ	Clear	400	Yes	Yes	No	1/50
168055*	NuncIonΔ	Clear	400	Yes	No	No	1/50
152038	Collagen I	Clear	400	No**	Yes	No	5/20
152039	Poly-D-Lysine	Clear	400	No**	Yes	No	5/20
174897	UpCell	Clear	200	Yes	Yes	No	1/8
174907	HydroCell	Clear	200	Yes	Yes	No	1/8
258510‡	Non-treated	Clear	400	Yes	No	No	10/180
260838	Non-treated	Clear	400	No	No	No	10/180
260844	Non-treated	Clear	400	No	No	Yes	10/180
260860	Non-treated	Clear	400	Yes	Yes	No	10/180
260887	Non-treated	Clear	400	Yes	Yes	Yes	10/160
260895	Non-treated	Clear	400	No	Yes	No	10/160
458529	PolySorp	Clear	400	No	No	No	10/180
458537*	MaxiSorp	Clear	400	No	No	No	10/180
460984*	MaxiSorp	Clear	400	No	No	Yes	10/180
467320*	MediSorp	Clear	400	No	No	No	5/60
467340*	MultiSorp	Clear	400	No	No	No	5/60
268120†	Non-treated	Clear	400	Yes	Yes	No	25/100
269620	Non-treated	Clear	400	No	No	No	5/60
269787	Non-treated	Clear	400	Yes	No	No	1/50
439454*	MaxiSorp	Clear	400	No	No	No	5/60
442404	MaxiSorp	Clear	400	No	No	No	5/60
475094	PolySorp	Clear	400	No	No	No	5/60

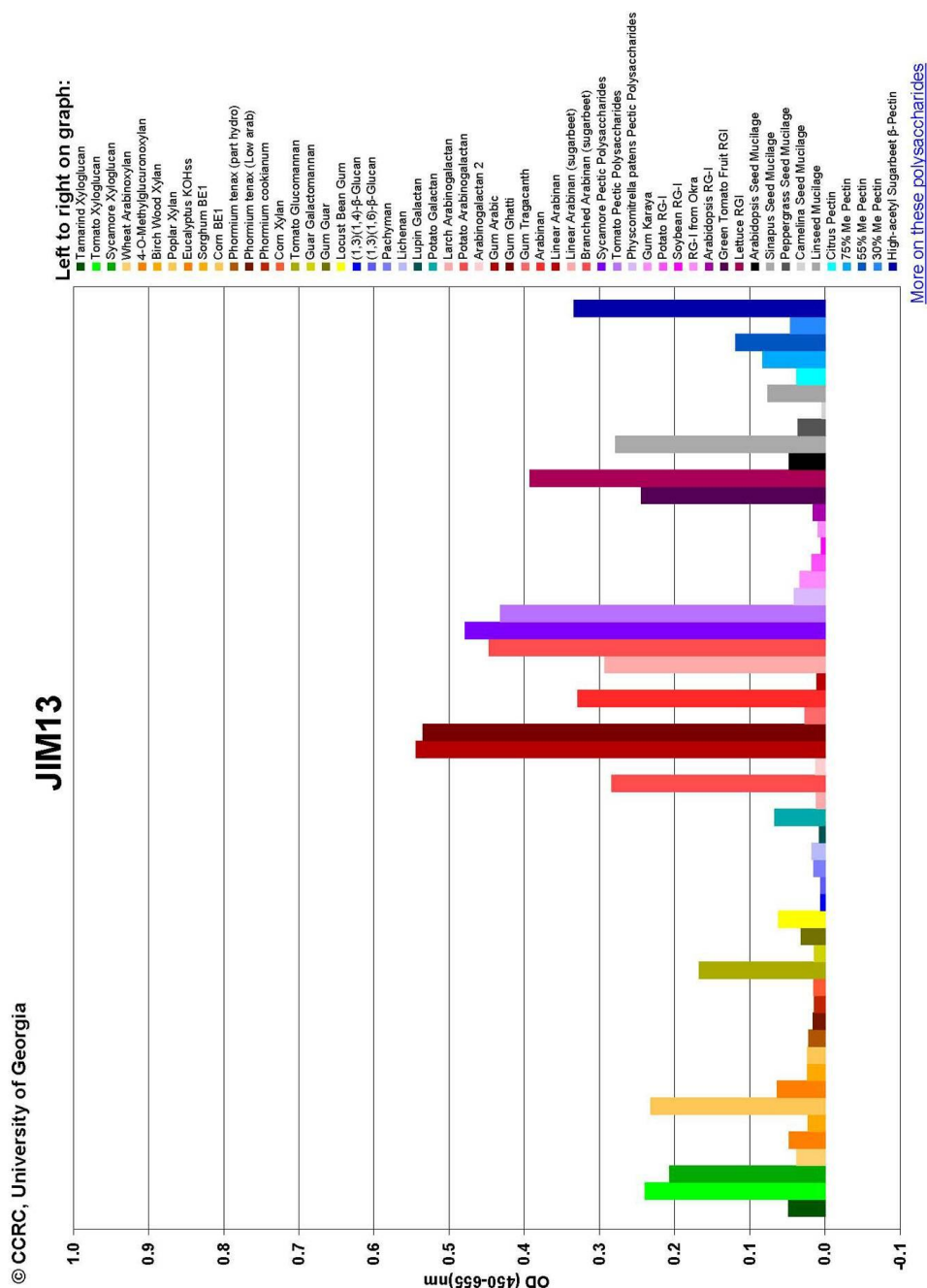
\* Certified \*\*Produced in a clean environment  
 †Not available in Americas ‡Americas Only

Thermo Scientific Plates • [www.thermoscientific.com/plateguide](http://www.thermoscientific.com/plateguide)

<sup>3</sup> [www.thermoscientific.com/plateguide](http://www.thermoscientific.com/plateguide), Seite 10 (aufgerufen März 2014)

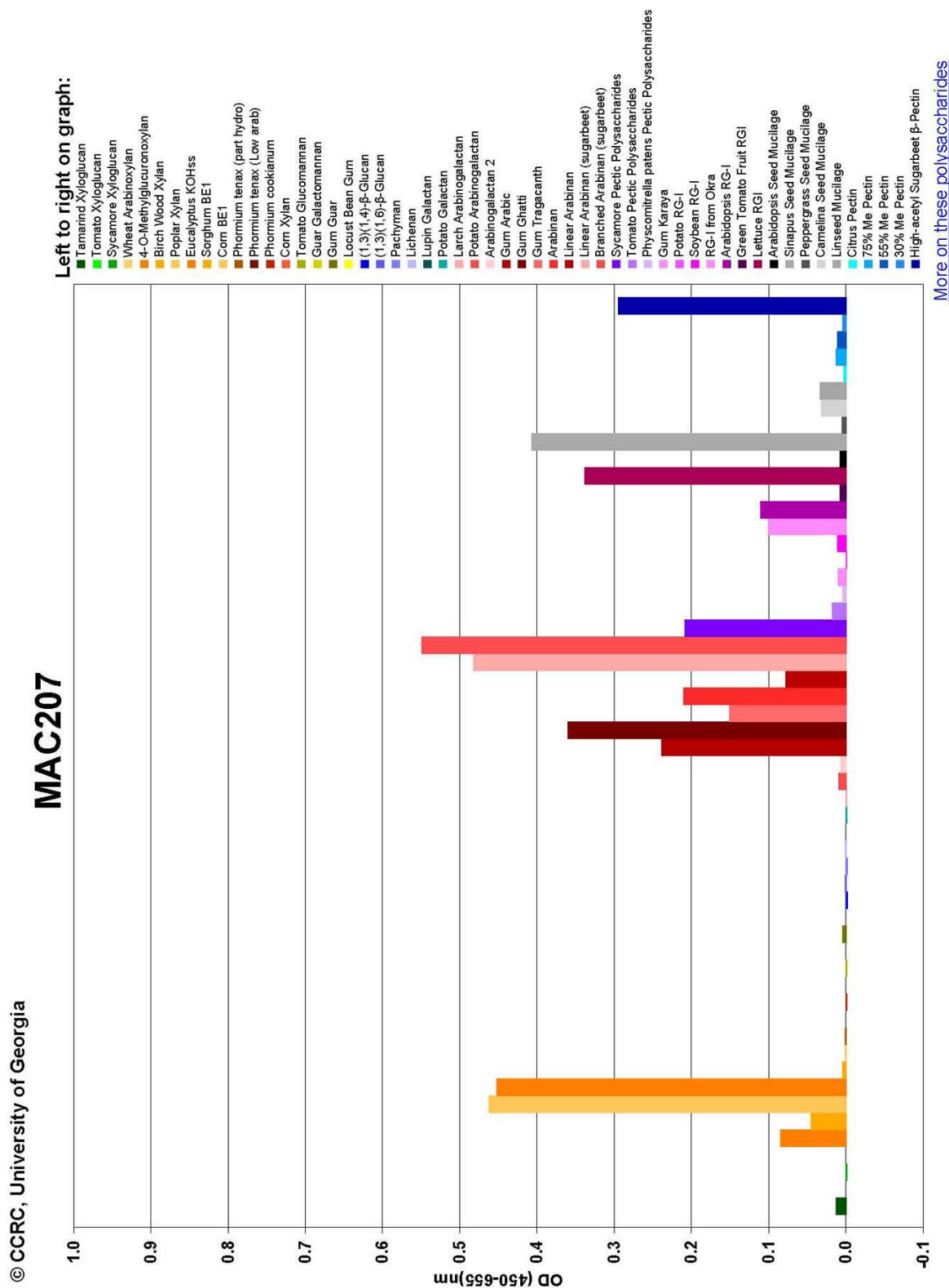
### D3 Spezifitätsuntersuchungen CCRC (Datenblätter)

#### D3.1 #JIM13<sup>4</sup>



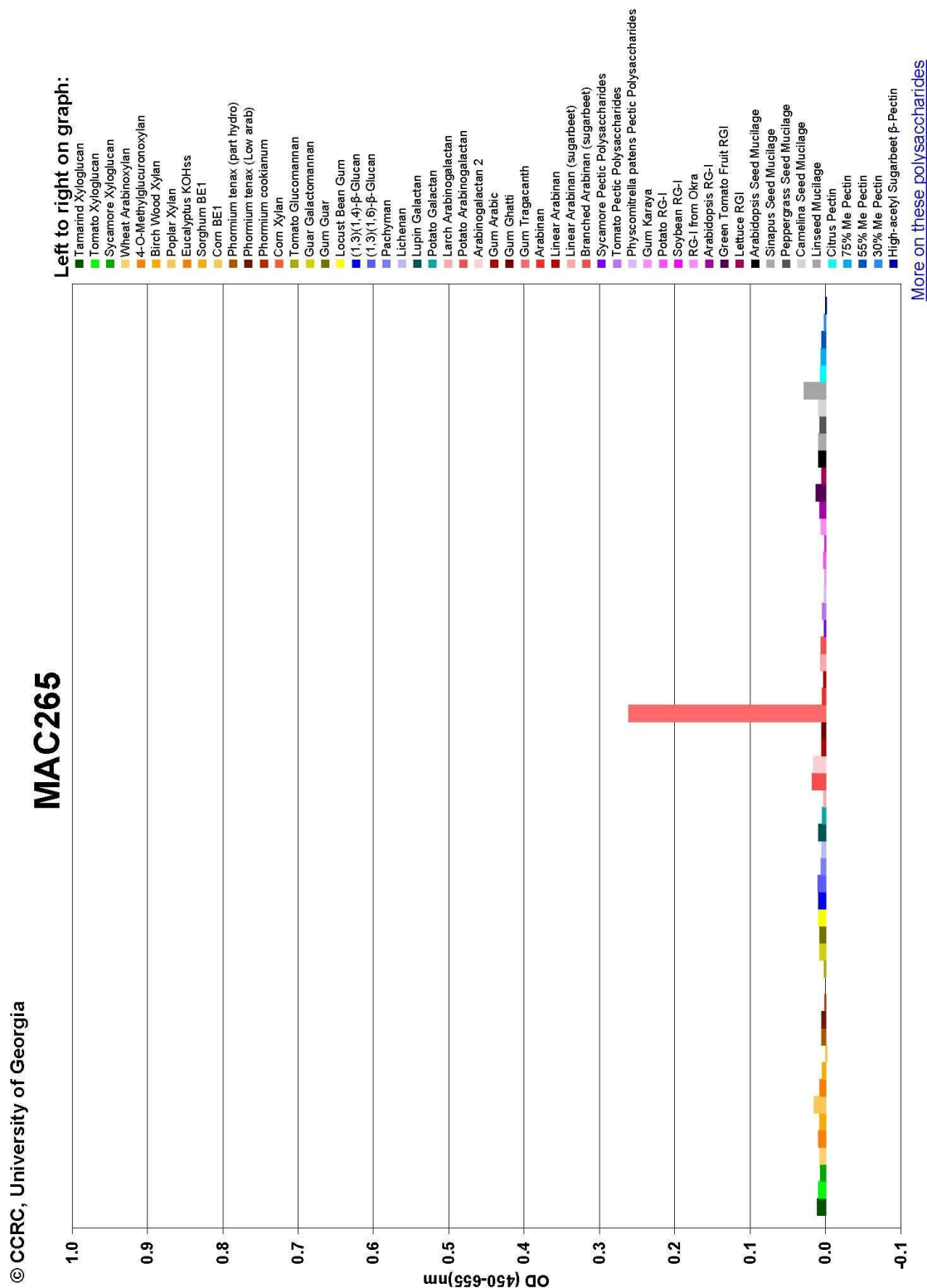
<sup>4</sup> <http://glycomics.ccrcc.uga.edu/wall2/jsp/abdetails.jsp?abnumber=30&abname=JIM13> (aufgerufen März 2014)

D3.2 #MAC207<sup>5</sup>



<sup>5</sup> <http://glycomics.ccrcc.uga.edu/wall2/jsp/abdetails.jsp?abnumber=22&abname=MAC207> (aufgerufen März 2014)

D3.3 #MAC265<sup>6</sup>



<sup>6</sup> <http://glycomics.crc.uga.edu/wall2/jsp/abdetails.jsp?abnumber=97&abname=MAC265> (aufgerufen März 2014)

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift