



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699660 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201610102038. 9

(22) 申请日 2016. 02. 24

(71) 申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙经济开发区
2 号大街 928 号浙江理工大学

(72) 发明人 王秉 游秋实 刘意 刘杨

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务有限公司
33109

代理人 尉伟敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种古代羊毛的特异性免疫检测方法

(57) 摘要

本发明涉及文物检测技术领域,公开了一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,采用以下步骤:
a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备 ;b. 试纸的组装 ;c. 试纸的灵敏性检测 ;d. 古代羊毛的特异性免疫检测。利用本发明方法制备的检测试纸对古代羊毛微痕迹进行检测时,具有快速、准确、高灵敏性的特点。

1. 一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于采用以下步骤:

a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备:采用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺介导法偶联标记聚苯乙烯纳米球和特异性羊毛抗体,制得荧光标记特异性羊毛抗体;

b. 试纸的组装:将上述制备的荧光标记特异性羊毛抗体喷涂在玻璃纤维素膜上,然后置于36-38℃下干燥;将羊毛角蛋白抗原和山羊抗兔抗体分别划在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,并置于36-38℃下干燥;分别将样品垫、荧光标记结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组装在PVC底板上,将组装好的板条切成条状,制得检测试纸,备用;

c. 试纸的灵敏性检测:配制梯度浓度的羊毛角蛋白抗原溶液,分别取等量滴加到样品垫上,进行荧光检测,得到试纸的检测线荧光强度和羊毛角蛋白抗原溶液浓度之间的标准曲线和回归方程;分别测定15-25组空白样品的荧光强度,其平均值作为阳性样品荧光强度的最高阈值;根据回归方程计算该阈值对应的最低羊毛角蛋白抗原检测浓度,即检测下限,作为试纸灵敏性的标准;

d. 古代羊毛的特异性免疫检测:取古代羊毛微痕迹样品,研磨均匀,溶于pH7.4的PBS缓冲液中使古代羊毛微痕迹样品浓度为1mg/mL,搅拌均匀,0.5-1.5h后取一滴上清液滴在检测试纸的样品垫上;20-30min后,进行荧光检测,得到检测线荧光强度与步骤c中的阳性样品荧光强度的最高阈值进行比较,如果荧光强度低于阈值,说明样品中含有羊毛角蛋白,该微痕迹样品为羊毛微痕迹;如果荧光强度高于阈值,说明样品中不含羊毛角蛋白,该微痕迹样品不是羊毛微痕迹。

2. 如权利要求1所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,所述荧光标记特异性羊毛抗体的制备方法具体为:分别将标记聚苯乙烯纳米球、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和特异性羊毛抗体加入到20 mmol/L的PBS缓冲液中;在室温条件下搅拌反应1.5-2.5h后,将得到的产物用10 mmol/L的PBS缓冲液洗涤,然后重新分散于含有0.1%(w/v)牛血清蛋白的40 mmol/L的Tris-HCl溶液中封闭未反应的羧酸盐;最后采用离心法收集得到荧光标记羊毛检测抗体,将抗体于4℃下保存备用。

3. 如权利要求2所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,所述标记聚苯乙烯纳米球、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和羊毛检测抗体的质量比为1:30:30。

4. 如权利要求1所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,在步骤b中荧光标记羊毛检测抗体的喷涂量为1 μL/cm。

5. 如权利要求4所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,在步骤b中羊毛角蛋白抗原的浓度为4.8mg/mL;山羊抗兔抗体的浓度为1.5mg/mL;羊毛角蛋白抗原和山羊抗兔抗体的用量为1 μL/cm。

6. 如权利要求4所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,所述检测试纸的具体组装方法为:在PVC底板长1.5 cm端下侧粘贴样品垫,在PVC底板下方距离1cm处粘贴荧光标记结合垫,所述荧光标记结合垫与样品垫重合1mm,在PVC底板中间2.5 cm处粘贴上述硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜和荧光标记结合垫重合1 mm,在PVC底板上方2cm处粘贴吸水垫,硝酸纤维素膜和所述吸水垫重合1 mm;将组装好的板条切成条状,制得检测试纸,装于塑料卡中备用。

7. 如权利要求1所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,步骤b中切

成条状后的检测试纸的宽度为4mm。

8. 如权利要求1所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,步骤c中所述空白样品为不含羊毛角蛋白抗原的PBS缓冲液。

9. 如权利要求1所述的一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,其特征在于,步骤c中羊毛角蛋白抗原溶液的梯度浓度分别为0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL。

一种古代羊毛的特异性免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及文物检测技术领域,尤其涉及一种古代羊毛的特异性免疫检测方法。

背景技术

[0002] 羊毛是天然蛋白质纤维,是由氨基酸通过肽键作用连接而成的天然高分子材料。羊毛织物埋藏在地底下,经过温度、湿度、土壤的酸碱性、细菌、霉菌等的影响,蛋白质纤维容易被老化、降解。羊毛织物在老化的过程中,多肽链发生断裂,结晶度降低,导致丝织品物理特性(诸如拉伸强度、延伸率、柔韧性、吸湿能力等)和化学特性(特征粘度、分子量等)的变化。尤其是墓葬中出土的衣物,由于受到体液、尸腐物的侵蚀,从而变硬、变脆,甚至矿化、降解,在肉眼下已经无法辨识,且年代越早的证据越难寻觅,给羊毛类文物的鉴定和保护研究带来了很大的困难。因此如何利用现代先进的自然科学手段,从羊毛微痕迹中提取古代羊毛的信息,具有重要的科学和文化价值。

[0003] 现阶段,国内外对古代羊毛织物的研究较少,国内外对于羊毛微痕迹的鉴定,大多数还停留在对纤维形态的分析上,所得出的鉴定结果也没有十足的准确性。如何寻找一种更为科学的手段来鉴定羊毛微痕迹一直是文物保护界悬而未决的难题。

发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种古代羊毛的特异性免疫检测方法。利用本发明方法制备的检测试纸对古代羊毛微痕迹进行检测时,具有快速、准确、高灵敏性的特点。

[0005] 本发明的具体技术方案为:一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,采用以下步骤:

a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备:采用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺介导荧光偶联标记聚苯乙烯纳米球和特异性羊毛抗体,制得荧光标记特异性羊毛抗体。

[0006] b. 试纸的组装:将上述制备的荧光标记特异性羊毛抗体喷涂在玻璃纤维素膜上,然后置于36-38℃下干燥;将羊毛角蛋白抗原和山羊抗兔抗体分别划在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,并置于36-38℃下干燥;分别将样品垫、荧光标记结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组装在PVC底板上,将组装好的板条切成条状,制得检测试纸,备用。

[0007] c. 试纸的灵敏性检测:配制梯度浓度的羊毛角蛋白抗原溶液,分别取等量滴加到样品垫上,进行荧光检测,得到试纸的检测线荧光强度和羊毛角蛋白抗原溶液浓度之间的标准曲线和回归方程;分别测定15-25组空白样品的荧光强度,其平均值作为阳性样品荧光强度的最高阈值;根据回归方程计算该阈值对应的最低羊毛角蛋白抗原检测浓度,即检测下限,作为试纸灵敏性的标准。

[0008] d. 古代羊毛的特异性免疫检测:取古代羊毛微痕迹样品,研磨均匀,溶于pH7.4的PBS缓冲液中使古代羊毛微痕迹样品浓度为1mg/mL,搅拌均匀,0.5-1.5h后取一滴上清液滴在检测试纸的样品垫上;20-30min后,进行荧光检测,得到检测线荧光强度与步骤c中的阳性样品荧光强度的最高阈值进行比较,如果荧光强度低于阈值,说明样品中含有羊毛角蛋

白,该微痕迹样品为羊毛微痕迹;如果荧光强度高于阈值,说明样品中不含羊毛角蛋白,该微痕迹样品不是羊毛微痕迹。

[0009] 作为优选,所述荧光标记特异性羊毛抗体的制备方法具体为:分别将铕标记聚苯乙烯纳米球、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和特异性羊毛抗体加入到20 mmol/L的PBS缓冲液中;在室温条件下搅拌反应1.5-2.5h后,将得到的产物用10 mmol/L的PBS缓冲液洗涤,然后重新分散于含有0.1%(w/v)牛血清蛋白的40 mmol/L的Tris-HCl溶液中封闭未反应的羧酸盐;最后采用离心法收集得到荧光标记羊毛检测抗体,将抗体于4 °C下保存备用。

[0010] 作为优选,所述铕标记聚苯乙烯纳米球、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和羊毛检测抗体的质量比为1:30:30。

[0011] 作为优选,在步骤b中荧光标记羊毛检测抗体的喷涂量为1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0012] 作为优选,在步骤b中羊毛角蛋白抗原的浓度为4.8mg/mL;山羊抗兔抗体的浓度为1.5mg/mL;羊毛角蛋白抗原和山羊抗兔抗体的用量为1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0013] 作为优选,所述检测试纸的具体组装方法为:在PVC底板长1.5 cm端下侧粘贴样品垫,在PVC底板下方距离1cm处粘贴荧光标记结合垫,所述荧光标记结合垫与样品垫重合1mm,在PVC底板中间2.5 cm处粘贴上述硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜和荧光标记结合垫重合1 mm,在PVC底板上方2cm处粘贴吸水垫,硝酸纤维素膜和所述吸水垫重合1 mm;将组装好的板条切成条状,制得检测试纸,装于塑料卡中备用。

[0014] 作为优选,步骤b中切成条状后的检测试纸的宽度为4mm。

[0015] 作为优选,步骤c中所述空白样品为不含羊毛角蛋白抗原的PBS缓冲液。

[0016] 作为优选,步骤c中羊毛角蛋白抗原溶液的梯度浓度分别为0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL。

[0017] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

(1)利用免疫层析的原理和方法,结合考古学信息,构建基于免疫层析技术的羊毛文物微痕检测体系,可为早期墓葬和遗址中已经化作无形的羊毛残留物提供一种敏感、特异、快捷的辨识方法。

[0018] (2)开发针对羊毛微痕检测的免疫荧光层析试纸,为古代羊毛现场检测提供产品和技术支撑。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0020] 实施例1

一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,采用以下步骤:

a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备:分别加入1 μg 铕标记聚苯乙烯纳米球、10 μL 3mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和30 μL 1mg/mL特异性羊毛抗体到10 mL的20 mmol/L的PBS(pH 7.4)缓冲液中;在室温条件下搅拌反应2小时后,得到的产物用10mmol/L的PBS缓冲液洗涤,重新分散于含有0.1%(w/v)牛血清蛋白的40mmol/L的Tris-HCl溶液中封闭未反应的羧酸盐。采用离心法收集荧光标记特异性羊毛抗体,于4°C冰箱中保存备用。

[0021] b. 试纸的组装:将荧光标记特异性羊毛抗体喷涂在玻璃纤维素膜上(喷涂量为1 μ L/cm),然后将其置于37 $^{\circ}$ C下干燥。将羊毛角蛋白抗原(4.8 mg/ml)和山羊抗兔抗体(二抗, 1.5 mg/ml)分别划在硝酸纤维素膜的检测线(T)和质控线(C)上(划膜仪,用量为1 μ L/cm),并置于37 $^{\circ}$ C下干燥。在PVC底板长1.5 cm端下测粘贴样品垫,在PVC底板下方距离1.0 cm的地方粘贴荧光标记结合垫(荧光标记结合垫与样品垫重合1 mm)在PVC底板中间2.5 cm处粘贴硝酸纤维素膜(上面喷涂有T线和C线,硝酸纤维素膜和荧光标记结合垫重合1 mm)。在PVC底板上方2 cm处粘贴吸水垫(硝酸纤维素膜和吸水垫重合1 mm)。将组装好的板条切成宽4 mm的小条状,装在塑料卡里面备用。

[0022] c. 试纸的灵敏性检测:配制0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL的羊毛角蛋白抗原溶液,分别取20 μ L滴加到样品垫上;25 min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度和羊毛角蛋白抗原溶液浓度之间的标准曲线和回归方程;分别测定20组空白样品(不含羊毛角蛋白抗原的PBS缓冲液)的荧光强度,其平均值18500作为阳性样品荧光强度的最高阈值;根据回归方程计算该阈值对应的最低羊毛角蛋白抗原检测浓度40ng/mL,即检测下限,作为试纸灵敏性的标准。

[0023] d. 古代羊毛的特异性免疫检测:取2mg古代羊毛微痕迹样品,研磨均匀,溶解于2 mL PBS (pH 7.4)缓冲液中,搅拌均匀,1h后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;25 min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度与步骤c中的阳性样品荧光强度的最高阈值18500进行比较,如果荧光强度低于18500,说明样品中含有羊毛角蛋白,该微痕迹样品为羊毛微痕迹;如果荧光强度高于18500,说明样品中不含羊毛角蛋白,该微痕迹样品不是羊毛微痕迹。

[0024] 实施例2

一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,采用以下步骤:

a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备:分别加入1 μ g钬标记聚苯乙烯纳米球、10 μ L 3mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和30 μ L 1mg/mL特异性羊毛抗体到10 mL的20 mmol/L的PBS(pH 7.4)缓冲液中;在室温条件下搅拌反应1.5小时后,得到的产物用10mmol/L的PBS缓冲液洗涤,重新分散于含有0.1%(w/v)牛血清蛋白的40mmol/L的Tris-HCl溶液中封闭未反应的羧酸盐。采用离心法收集荧光标记特异性羊毛抗体,于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

[0025] b. 试纸的组装:将荧光标记特异性羊毛抗体喷涂在玻璃纤维素膜上(喷涂量为1 μ L/cm),然后将其置于36 $^{\circ}$ C下干燥。将羊毛角蛋白抗原(4.8 mg/ml)和山羊抗兔抗体(二抗, 1.5 mg/ml)分别划在硝酸纤维素膜的检测线(T)和质控线(C)上(划膜仪,用量为1 μ L/cm),并置于36 $^{\circ}$ C下干燥。在PVC底板长1.5 cm端下测粘贴样品垫,在PVC底板下方距离1.0 cm的地方粘贴荧光标记结合垫(荧光标记结合垫与样品垫重合1 mm)在PVC底板中间2.5 cm处粘贴硝酸纤维素膜(上面喷涂有T线和C线,硝酸纤维素膜和荧光标记结合垫重合1 mm)。在PVC底板上方2 cm处粘贴吸水垫(硝酸纤维素膜和吸水垫重合1 mm)。将组装好的板条切成宽4 mm的小条状,装在塑料卡里面备用。

[0026] c. 试纸的灵敏性检测:配制0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL的羊毛角蛋白抗原溶液,分别取20 μ L滴加到样品垫上;20min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度和羊毛角蛋白抗原溶液浓度之间的

标准曲线和回归方程;分别测定15组空白样品(不含羊毛角蛋白抗原的PBS缓冲液)的荧光强度,其平均值18500作为阳性样品荧光强度的最高阈值;根据回归方程计算该阈值对应的最低羊毛角蛋白抗原检测浓度40ng/mL,即检测下限,作为试纸灵敏性的标准。

[0027] d. 古代羊毛的特异性免疫检测:取2mg古代羊毛微痕迹样品,研磨均匀,溶解于2mL PBS (pH 7.4)缓冲液中,搅拌均匀,0.5h后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;20 min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度与步骤c中的阳性样品荧光强度的最高阈值18500进行比较,如果荧光强度低于18500,说明样品中含有羊毛角蛋白,该微痕迹样品为羊毛微痕迹;如果荧光强度高于18500,说明样品中不含羊毛角蛋白,该微痕迹样品不是羊毛微痕迹。

[0028] 实施例3

一种古代羊毛的特异性免疫检测方法,采用以下步骤:

a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备:分别加入1 μ g钬标记聚苯乙烯纳米球、10 μ L 3mg/mL 的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和30 μ L 1mg/mL特异性羊毛抗体到10 mL 的20 mmol/L的PBS(pH 7.4)缓冲液中;在室温条件下搅拌反应2.5小时后,得到的产物用10mmol/L的PBS缓冲液洗涤,重新分散于含有0.1%(w/v) 牛血清蛋白的40mmol/L的Tris-HCl溶液中封闭未反应的羧酸盐。采用离心法收集荧光标记特异性羊毛抗体,于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

[0029] b. 试纸的组装:将荧光标记特异性羊毛抗体喷涂在玻璃纤维素膜上(喷涂量为1 μ L/cm),然后将其置于38 $^{\circ}$ C下干燥。将羊毛角蛋白抗原(4.8 mg/ml)和山羊抗兔抗体(二抗, 1.5 mg/ml)分别划在硝酸纤维素膜的检测线(T)和质控线(C)上(划膜仪,用量为1 μ L/cm),并置于38 $^{\circ}$ C下干燥。在PVC底板长1.5 cm端下测粘贴样品垫,在PVC底板下方距离1.0 cm的地方粘贴荧光标记结合垫(荧光标记结合垫与样品垫重合1 mm)在PVC底板中间2.5 cm处粘贴硝酸纤维素膜(上面喷涂有T线和C线,硝酸纤维素膜和荧光标记结合垫重合1 mm)。在PVC底板上方2 cm处粘贴吸水垫(硝酸纤维素膜和吸水垫重合1 mm)。将组装好的板条切成宽4 mm的小条状,装在塑料卡里面备用。

[0030] c. 试纸的灵敏性检测:配制0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL的羊毛角蛋白抗原溶液,分别取20 μ L滴加到样品垫上;30 min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度和羊毛角蛋白抗原溶液浓度之间的标准曲线和回归方程;分别测定25组空白样品(不含羊毛角蛋白抗原的PBS缓冲液)的荧光强度,其平均值18500作为阳性样品荧光强度的最高阈值;根据回归方程计算该阈值对应的最低羊毛角蛋白抗原检测浓度40ng/mL,即检测下限,作为试纸灵敏性的标准。

[0031] d. 古代羊毛的特异性免疫检测:取2mg古代羊毛微痕迹样品,研磨均匀,溶解于2 mL PBS (pH 7.4)缓冲液中,搅拌均匀,1.5h后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;30 min后,将试纸置于免疫荧光定量检测仪中进行检测,得到检测线荧光强度与步骤c中的阳性样品荧光强度的最高阈值18500进行比较,如果荧光强度低于18500,说明样品中含有羊毛角蛋白,该微痕迹样品为羊毛微痕迹;如果荧光强度高于18500,说明样品中不含羊毛角蛋白,该微痕迹样品不是羊毛微痕迹。

[0032] 本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0033] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

专利名称(译)	一种古代羊毛的特异性免疫检测方法		
公开(公告)号	CN105699660A	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201610102038.9	申请日	2016-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
[标]发明人	王秉 游秋实 刘意 刘杨		
发明人	王秉 游秋实 刘意 刘杨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/558 G01N2333/4742		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及文物检测技术领域，公开了一种古代羊毛的特异性免疫检测方法，采用以下步骤：a. 荧光标记特异性羊毛抗体的制备；b. 试纸的组装；c. 试纸的灵敏性检测；d. 古代羊毛的特异性免疫检测。利用本发明方法制备的检测试纸对古代羊毛微痕迹进行检测时，具有快速、准确、高灵敏性的特点。