



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107389641 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(21)申请号 201710645247.2

(22)申请日 2017.08.01

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区2
号大街浙江理工大学

(72)发明人 胡智文 陈茹茹 李津 梁军龙
尚亚廷

(74)专利代理机构 嘉兴永航专利代理事务所
(普通合伙) 33265

代理人 江程鹏

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法

(57)摘要

本发明涉及文物检测领域,公开了一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,本发明先制备了荧光碳点标记的蚕丝二抗,之后逐步采用离子液体和PM₁₃-碱性蛋白酶对现代蚕丝和古代泥化丝织品文物样进行水解,得到蛋白提取液后,经透析、纯化,进行SDS-PAGE凝胶电泳,将得到的蛋白条带转移到PVDF膜上,经蚕丝一抗和荧光碳点标记的二抗孵育后,可在凝胶成像系统中观察到免疫荧光条带,鉴别古代丝织品的种类。本发明中化学试剂用量少,反应温和、环保无害;在对古代丝织品进行检测时,具有样品用量少、直观、快速和高灵敏性的特点。

1. 一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 荧光碳点的制备:将果糖溶解于去离子水和无水乙醇的混合溶剂中,于水热反应釜内反应,制得荧光碳点溶液,之后经透析纯化、冷冻干燥,得到荧光碳点粉末;

2) 荧光碳点标记蚕丝丝素蛋白二抗的制备:采用碳化二亚胺介导法偶联荧光碳点和蚕丝丝素蛋白二抗,制得荧光碳点标记蚕丝二抗;

3) 称取现代蚕丝作为对照样品,以1:95-105的浴比在含有0.4-0.6wt% Na_2PO_4 和0.8-1.2wt% $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$ 的混合溶液中煮沸25-35min,进行脱胶处理,共脱胶两次;脱胶之后,将蚕丝用去离子水搓洗4次以上,放入烘箱干燥,得到现代蚕丝丝素纤维;然后将现代蚕丝丝素纤维以1:45-55的浴比浸入[AMIM]Cl离子液体中,加热反应,冷却;加入 PM_{13} -碱性蛋白酶粉末恒温孵育5-7h,进行灭酶,得到丝素蛋白/离子液体溶液A;

4) 称取带有古代泥化丝织品的土样,用研钵研磨后,按固液比25-35g/60mL 加入到[AMIM]Cl离子液体中,加热反应,冷却;加入 PM_{13} -碱性蛋白酶粉末恒温孵育5-7h,进行灭酶,得到离子液体悬浮液;将悬浮液高速冷冻离心,取上层清液得到蚕丝蛋白/离子液体溶液B;

5) 分别向丝素蛋白/离子液体溶液A、B中加入无水乙醇,反复浸泡,使蛋白析出,滤出蛋白后,加入去离子水溶解,得到纯净的丝素蛋白提取液A、B;

6) 将丝素蛋白提取液A、B分别在1-5℃条件下用透析袋透析40-50h,除去小分子杂质;真空浓缩至终体积约为150-250 μL ,分别得到丝素蛋白浓缩液A、B;

7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取40-60 μL 丝素蛋白浓缩液A、B,用CB 9.6缓冲液稀释至4-6mL,在98-102℃条件下加热4-6min,进行变性处理;冷却后至室温后,将两种样品和蛋白质Marker加入制备好的免染胶加样孔中,在电解槽中加满电解液,电泳完成后,可在成像系统中观察电泳图像;

8) 电转移:将电泳后的胶平铺在经甲醇和电转缓冲液处理过的PVDF膜上,夹在滤纸和海绵中间组装成转运夹层,放入湿式转膜装置中,恒流转膜;

9) 膜成像:电转移完成后,取出PVDF膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况;

10) 封闭:取出PVDF膜,用10-20mL的TBS液洗膜4-6min,用封闭液在室温条件下处理50-70min;

11) 免疫处理:用抗体稀释液以950-1050:1的体积比稀释一抗,将膜浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1~2 h;取出膜后用TBST液洗膜,之后浸入8-12mL稀释的荧光碳点标记的二抗液中室温条件下孵育1-2 h;

12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜在凝胶成像系统中成像,利用荧光碳点在紫外光照射下发射荧光的性能,得到免疫印迹图像;如果两样品都得荧光条带,说明古代泥化丝织品属于蚕丝;如果只有现代蚕丝具有荧光条带,说明古代泥化丝织品不属于蚕丝。

2. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤1)中,荧光碳点的制备方法具体为:将8-12mL去离子水和8-12mL无水乙醇混合,加入0.35-0.45g果糖,搅拌至完全溶解;将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于155-165℃烘箱中加热2~3 h,待溶液变为浅黄色,反应完成,自然冷却至室温,得到荧光碳点溶液;将得到的溶液用截留分子量为1000的透析袋透析20-28 h以除去其他小分子杂质;最后对纯化的碳点溶液进行冷冻干燥,可得到荧光碳点粉末。

3. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤2)中,荧光碳点标记蚕丝二抗的制备方法具体如下:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入到9-11mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌2~3 h后,用PBS缓冲液对溶液进行多次洗涤离心,得到荧光碳点标记的蚕丝丝素蛋白二抗。

4. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤3)、步骤4)中,所述PM₁₃-碱性蛋白酶的制备:向95-105mL的0.1M的硼酸钠缓冲溶液中加入0.10-0.20g碱性蛋白酶和3.5-4.0g的MW15000的梳状PEG,在1-5℃条件下缓慢搅拌0.5-1.5h,在外加45-55mL 1mmol/L HCl的条件下超滤除去未反应的PM₁₃,重复三次,将滤液进行冷冻干燥,得到PM₁₃-碱性蛋白酶粉末。

5. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤6)中,透析袋的截留分子量为1000。

6. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤7)中,电泳具体操作为:先恒压80V,8-12min后蛋白进入分离胶,调整恒定电压为120V,15-25min后电泳完成,取出凝胶,观察电泳图像。

7. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤8)中,电转移操作中,使用的PVDF膜先用甲醇浸泡50-70s,再用电转缓冲液浸泡;所用的滤纸、海绵需要用电转缓冲液浸润,按照海绵—滤纸—电泳凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵的顺序组装转运夹层,恒流转膜是在100mA恒流下转膜1~2 h;本操作采用湿法转膜,转移过程中放热,需将转膜装置放在冰浴中。

8. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤10)中,孵育一抗和二抗后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次4-6min。

9. 如权利要求1或8所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤10)中,所述封闭液为5wt%脱脂奶粉。

10. 如权利要求1所述的一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,其特征在于,步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及文物检测领域,尤其涉及一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法。

[0003]

背景技术

[0004] 我国是世界广泛承认的丝绸起源地,丝绸的发明在中华民族的历史文化中有着举足轻重的地位。几千年来,丝绸一直是古老中国的象征,而悠久灿烂的中华文化通过丝绸之路走向世界。中国丝绸主要利用的是蚕丝,蚕丝是天然蛋白质纤维,是由氨基酸通过肽键作用连接而成的天然高分子材料。丝织物埋藏在地底下,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。

[0005] 在古代丝绸遗存中,从历年来的考古发掘可以看出,丝绸遗存表现形式主要分为四个类型:丝织品实物、灰化丝织品、矿化丝织品和泥化丝织品。尤其是泥化丝织品,确切的说纺织品的印痕,其原来的纺织材料可能是丝绸,也可能是其他纺织物,为叙述方便,通常在没有鉴定出纺织材料之前统称为泥化丝织品。这类遗存其纺织材料已经降解,其降解产物或遗存于土壤之中,或经雨水冲刷,在土壤表面只能够看到织物的形状或图案。因此如何利用现代先进的自然科学手段,从古代泥化丝织品中提取有效信息,对文物鉴别和丝绸的起源有重要的价值。

[0006] 在现阶段的研究中,国内外对古代丝织品的研究手段大多还是采用红外光谱、拉曼光谱、X射线衍射等技术,这些技术灵敏度低,受杂质影响较大,不适合对微量文物样品进行检测,如何寻找一种更为科学的手段来鉴定古代丝织品一直是文物保护界的难题。

[0007]

发明内容

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法。利用本发明方法对古代泥化丝织品进行检测时,具有直观、准确、高灵敏性的特点。

[0009] 本发明的具体技术方案为:一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法,包括以下步骤:

1) 荧光碳点的制备:将果糖溶解于去离子水和无水乙醇的混合溶剂中,于水热反应釜内反应,制得荧光碳点溶液,之后经透析纯化、冷冻干燥,得到荧光碳点粉末。

[0010] 2) 荧光碳点标记蚕丝丝素蛋白二抗的制备:采用碳化二亚胺介导法偶联荧光碳点和蚕丝丝素蛋白二抗,制得荧光碳点标记蚕丝二抗。

[0011] 3) 称取现代蚕丝作为对照样品,以1:95-105的浴比在含有0.4-0.6wt% Na_2PO_4 和0.8-1.2wt% $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$ 的混合溶液中煮沸25-35min,进行脱胶处理,共脱胶两次;脱胶之后,将蚕丝用去离子水搓洗4次以上,放入烘箱干燥,得到现代蚕丝丝素纤维;然后将现代蚕

丝丝素纤维以1:45-55的浴比浸入[AMIM]Cl离子液体中,加热反应,冷却;加入PM13-碱性蛋白酶粉末恒温孵育5-7h,进行灭酶,得到丝素蛋白/离子液体溶液A。

[0012] 在脱胶过程中,随着丝胶的水解,溶液中氨基酸的浓度逐渐增加,pH降低,脱胶效率减弱,所以需加碱以维持脱胶液pH值的稳定,但碱浓度过大会损伤丝素,所以采用C₁₇H₃₅COONa作为缓冲剂。

[0013] 4)称取带有古代泥化丝织品的土样,用研钵研磨后,按固液比25-35g/60mL 加入到[AMIM]Cl离子液体中,加热反应,冷却;加入PM₁₃-碱性蛋白酶粉末恒温孵育5-7h,进行灭酶,得到离子液体悬浮液;将悬浮液高速冷冻离心,取上层清液得到蛋丝素白/离子液体溶液B。

[0014] 5)分别向丝素白/离子液体溶液A、B中加入无水乙醇,反复浸泡,使蛋白析出,滤出蛋白后,加入去离子水溶解,得到纯净的丝素蛋白提取液A、B。

[0015] 使用在低温条件下对现代蚕丝和古代泥化丝织品的提取液进行透析,可以减少丝素蛋白损失,保证精准度。

[0016] 6)将丝素蛋白提取液A、B分别在1-5℃条件下用透析袋透析40-50h,除去小分子杂质;真空浓缩至终体积约为150-250μL,分别得到丝素蛋白浓缩液A、B。

[0017] 7)SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取40-60μL丝素蛋白浓缩液A、B,用CB 9.6缓冲液稀释至4-6mL,在98-102℃条件下加热4-6min,进行变性处理;冷却后至室温后,将两种样品和蛋白质Marker加入制备好的免染胶(上层为浓缩胶,下层为分离胶)加样孔中,在电解槽中加满电解液,电泳完成后,可在成像系统中观察电泳图像。

[0018] 使用免染胶进行凝胶电泳,可减少化学试剂的使用,同时节约时间。

[0019] 8)电转移:将电泳后的胶平铺在经甲醇和电转缓冲液处理过的PVDF膜上,夹在滤纸和海绵中间组装成转运夹层,放入湿式转膜装置中,恒流转膜。

[0020] 使用的PVDF膜先用甲醇浸泡,目的是活化PVDF膜上面的正点集团,使它更容易与带负电的蛋白质结合。

[0021] 9)膜成像:电转移完成后,取出PVDF膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0022] 对膜进行成像,观察蛋白条带的转移情况,方便掌握实验进度,优化实验步骤。

[0023] 10)封闭:取出PVDF膜,用10-20mL的TBS液洗膜4-6min,用封闭液在室温条件下处理50-70min。

[0024] 11)免疫处理:用抗体稀释液以950-1050:1的体积比稀释一抗,将膜浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1~2 h;取出膜后用TBST液洗膜,之后浸入8-12mL稀释的荧光碳点标记的二抗液中室温条件下孵育1-2 h。

[0025] 12)发光显色:直接将免疫处理后的膜在凝胶成像系统中成像,利用荧光碳点在紫外光照射下发射荧光的性能,得到免疫印迹图像。如果两样品都得荧光条带,说明古代泥化丝织品属于蚕丝;如果只有现代蚕丝具有荧光条带,说明古代泥化丝织品不属于蚕丝。

[0026] 作为优选,步骤1)中,荧光碳点的制备方法具体为:将8-12mL去离子水和8-12mL无水乙醇混合,加入0.35-0.45g果糖,搅拌至完全溶解;将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于155-165℃烘箱中加热2~3 h,待溶液变为浅黄色,反应完成,自然冷却至室温,得到荧光碳点溶液;将得到的溶液用截留分子量为1000的透析袋透析20-28 h以除去其他小分子

杂质;最后对纯化的碳点溶液进行冷冻干燥,可得到荧光碳点粉末。

[0027] 荧光碳点表面具有很多缺陷能带,当受到激发光照射时,由于其电子和空穴被量子限域,连续的能带结构变成具有分子特性的分立能级结构,受激后激子会发生辐射重组而发射荧光。

[0028] 作为优选,步骤2)中,荧光碳点标记蚕丝二抗的制备方法具体如下:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入到9-11mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌2~3 h后,用PBS缓冲液对溶液进行多次洗涤离心,得到荧光碳点标记的蚕丝丝素蛋白二抗。

[0029] 荧光碳点经过偶联后,其荧光能力增强。荧光碳点表面含有丰富的基团如羧基、羟基、氨基等,他们在一定程度上可以捕获辐射荧光的激子,因此经偶联后荧光能力增强,同时也可以避免荧光碳点粒子团聚现象。

[0030] 作为优选,步骤3)、步骤4)中,所述PM13-碱性蛋白酶的制备:向95-105mL的0.1M的硼酸钠缓冲溶液中加入0.10-0.20g碱性蛋白酶和3.5-4.0g的MW15000的梳状PEG,在1-5℃条件下缓慢搅拌0.5-1.5h,在外加45-55mL 1mmol/L HCl的条件下超滤除去未反应的PM₁₃,重复三次,将滤液进行冷冻干燥,得到PM₁₃-碱性蛋白酶粉末。

[0031] 本发明先使用离子液体对样品进行初步溶解,再使用PM₁₃-碱性蛋白酶对丝素进行进一步溶解。离子液体是近年来兴起的一类极具应用前景的绿色溶剂,是一种强极性溶剂,可与丝素蛋白大分子上的氨基和羧基形成氢键,从而破坏丝素蛋白分子内部的氢键,从而实现蛋白质的溶解。生物酶是一种无毒无害、与环境友好的催化剂,拥有高效的特异性;且用量少,减少污染,节约资源;水解条件(温度、pH)温和,对氨基酸破坏小,同时,经PM₁₃修饰过的碱性蛋白酶的水解能力和稳定性都有所增强,可提高对样品中蛋白的溶解率和提取率。

[0032] 本发明采用PM₁₃对碱性蛋白酶进行修饰,以保持碱性蛋白酶在离子液体中的稳定性和活性。碱性蛋白酶本身也是一种蛋白质,离子液体对其结构具有一定的破坏作用,PM₁₃处是一种梳状共聚物,可以覆盖在碱性蛋白酶表面,防止碱性蛋白酶被离子溶液破坏,同时借助PM₁₃链对IL的亲水性,不但可以提高酶的稳定性,保证酶在离子液体中的活性,而且使酶均匀地分散在IL中。

[0033] 作为优选,步骤6)中,透析袋的截留分子量为1000。

[0034] 作为优选,步骤7)中,电泳具体操作为:先恒压80V,8-12min后蛋白进入分离胶,调整恒定电压为120V,15-25min后电泳完成,取出凝胶,观察电泳图像。

[0035] 作为优选,步骤8)中,电转移操作中,使用的PVDF膜先用甲醇浸泡50-70s,再用电转缓冲液浸泡;所用的滤纸、海绵需要用电转缓冲液浸润,按照海绵—滤纸—电泳凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵的顺序组装转运夹层,恒流转膜是在100mA恒流下转膜1~2 h;本操作采用湿法转膜,转移过程中放热,需将转膜装置放在冰浴中。

[0036] 作为优选,步骤10)中,孵育一抗和二抗后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次4-6min。以洗脱未结合的一抗和荧光二抗。

[0037] 作为优选,步骤10)中,所述封闭液为5wt%脱脂奶粉。

[0038] 作为优选,步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

[0039] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

- (1)本发明使用果糖作为荧光碳点的来源,充分利用资源,节能环保,绿色无害。

[0040] (2) 本发明选用荧光碳点作为荧光成像材料,表现出荧光稳定性强、耐光漂白、发射波长可调控等优良的荧光性能,和荧光试剂和量子点相比,还具有毒性低、生物相容性好和粒径可调控等特点,能够取代传统荧光染料和量子点而应用于生命科学领域的研究。

[0041] (3) 本发明在脱胶过程中,加入 $C_{17}H_{35}COONa$ 缓冲剂,提高脱胶效率,同时减少对丝素纤维的伤害。

[0042] (4) 本发明利用离子液体和生物酶的双重溶解作用,逐步对丝素蛋白进行处理,提高了丝素蛋白的溶解度。同时,而离子液体是“绿色溶剂”,环保无害,基团可设计,并且易于回收,可循环使用。生物酶无毒无害、与环境友好,同时用量少,节约资源;特异性高,作用条件温和,对丝素蛋白的破坏小。

[0043] (5) 本发明样品用量少,可以直观、准确、高灵敏性地检测出丝素蛋白,特别是针对腐坏严重、检验困难的古代泥化丝织品。

[0044]

具体实施方式

[0045] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0046] 实施例1:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:分别量取10mL的去离子水和无水乙醇(体积比1:1),混合溶解在烧杯中,加入0.40 g果糖,搅拌至完全溶解。将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于160℃烘箱中加热2 h,待溶液变为浅黄色,反应完成,自然冷却至室温,得到荧光碳点溶液;将得到的溶液用透析袋(截留分子量 1000)透析24h以除去其他小分子杂质;最后对纯化的碳点溶液进行冷冻干燥,可得到荧光碳点粉末。

[0047] 2) 荧光碳点标记蚕丝丝素蛋白二抗的制备:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入10mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌2 h后,用PBS缓冲液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到荧光碳点标记的蚕丝丝素蛋白二抗。

[0048] 3) 称取0.3g现代蚕丝作为对照样品,以1:100的浴比在含有0.5% Na_2PO_4 和1% $C_{17}H_{35}COONa$ 的混合溶液中煮沸30min,进行脱胶处理,共脱胶两次;脱胶之后,将蚕丝用去离子水搓洗4次以上,放入烘箱干燥,得到现代蚕丝丝素纤维。将现代蚕丝丝素纤维,以1:50的浴比浸入[AMIM]Cl离子液体中,加热反应一定时间,冷却;加入 PM_{13} -碱性蛋白酶粉末恒温孵育6h,进行灭酶,得到丝素蛋白/离子液体溶液A。

[0049] 其中,所述 PM_{13} -碱性蛋白酶的制备方法为:向100mL的0.1M的硼酸钠缓冲溶液中加入0.15g碱性蛋白酶和3.75g的MW15000的梳状PEG,在4℃条件下缓慢搅拌1h,再外加50mL 1mmol/L HCl的条件下超滤除去未反应的 PM_{13} ,重复三次,将滤液进行冷冻干燥,得到 PM_{13} -碱性蛋白酶粉末。

[0050] 4) 称取30g带有古代泥化丝织品的土样,用研钵研磨后,加入60mL [AMIM]Cl离子液体中,按照3)中步骤操作,得到离子液体悬浮液。将悬浮液进行高速冷冻离心,上层清液即丝素蛋白/离子液体溶液B。

[0051] 5) 在丝素蛋白/离子液体溶液A、B中加入无水乙醇,使蛋白析出,滤出蛋白,加入去离子水溶解,得到纯净的丝素蛋白提取液A、B。

[0052] 6) 将得到的两种提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子量1000)透析48 h,除去

小分子杂质;利用真空浓缩仪浓缩丝素蛋白水溶液至终体积约为200 μ L。

[0053] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50 μ L丝素蛋白浓缩液A、B,用CB 9.6缓冲液稀释至5mL,在100 $^{\circ}$ C条件下加热5min,进行变性处理;冷却后至室温后,将两种样品和蛋白质Marker加入制备好的免染胶(上层为浓缩胶,下层为分离胶)加样孔中,在电解槽中加满电解液,电泳完成后,可在成像系统中观察电泳图像。其中,电泳具体操作为:先恒压80V,10min后蛋白进入分离胶,调整恒定电压为120V,20min后电泳完成。

[0054] 8) 电转移:将电泳后的胶平铺在经甲醇和电转缓冲液处理过的PVDF膜上,夹在滤纸和海绵中间组装成转运夹层,所用的滤纸、海绵需要用电转缓冲液浸润,按照海绵—滤纸—电泳凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵的顺序组装转运夹层,放入湿式转膜装置中,在100mA恒流下转膜1 h,转移过程中放热,需将转膜装置放在冰浴中。

[0055] 9) 膜成像:电转移完成后,用镊子取出PVDF膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0056] 10) 封闭:取出PVDF膜,用15mL的TBS液洗膜5min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理1h。

[0057] 11) 免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:1000的比例稀释一抗,将膜浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1 h;取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟,之后浸入10mL以1:1000的比例稀释的荧光碳点标记的二抗液中,室温条件下孵育1.5 h,取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟。

[0058] 12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜在凝胶成像系统中成像,利用荧光碳点在紫外光照射下发射荧光的性能,得到免疫印迹图像。如果两样品都得荧光条带,说明古代泥化丝织品属于蚕丝;如果只有现代蚕丝具有荧光条带,说明古代泥化丝织品不属于蚕丝。

[0059]

实施例2:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:分别量取10mL的去离子水和无水乙醇(体积比1:1),混合溶解在烧杯中,加入0.40 g果糖,搅拌至完全溶解。将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于160 $^{\circ}$ C烘箱中加热2.5 h,待溶液变为浅黄色,反应完成,自然冷却至室温,得到荧光碳点溶液;将得到的溶液用透析袋(截留分子量 1000)透析24 h以除去其他小分子杂质;最后对纯化的碳点溶液进行冷冻干燥,可得到荧光碳点粉末。

[0060] 2) 荧光碳点标记蚕丝丝素蛋白二抗的制备:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入10mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌2.5 h后,用PBS缓冲液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到荧光碳点标记的蚕丝丝素蛋白二抗。

[0061] 3) 称取0.3g现代蚕丝作为对照样品,以1:100的浴比在含有0.5% Na_2PO_4 和1% $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$ 的混合溶液中煮沸30min,进行脱胶处理,共脱胶两次;脱胶之后,将蚕丝用去离子水搓洗4次以上,放入烘箱干燥,得到蚕丝丝素纤维。现代蚕丝丝素纤维,以1:50的浴比浸入[AMIM]Cl离子液体中,加热反应一定时间,冷却;加入 PM_{13} -碱性蛋白酶粉末恒温孵育6h,进行灭酶,得到丝素蛋白/离子液体溶液A。

[0062] 其中,所述 PM_{13} -碱性蛋白酶的制备方法为:向100mL的0.1M的硼酸钠缓冲溶液中加入0.15g碱性蛋白酶和3.75g的MW15000的梳状PEG,在4 $^{\circ}$ C条件下缓慢搅拌1h,再外加50mL 1mmol/L HCl的条件下超滤除去未反应的 PM_{13} ,重复三次,将滤液进行冷冻干燥,得到 PM_{13} -

碱性蛋白酶粉末。

[0063] 4) 称取30g带有古代泥化丝织品的土样,用研钵研磨后,加入60mL [AMIM]Cl离子液体中,按照3)中步骤操作,得到离子液体悬浮液。将悬浮液进行高速冷冻离心,上层清液即丝素蛋白/离子液体溶液B。

[0064] 5) 在丝素蛋白/离子液体溶液A、B中加入无水乙醇,使蛋白析出,滤出蛋白,加入去离子水溶解,得到纯净的丝素蛋白提取液A、B。

[0065] 6) 将得到的两种提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子量1000)透析48 h,除去小分子杂质;利用真空浓缩仪浓缩丝素蛋白水溶液至终体积约为200μL。

[0066] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50μL丝素蛋白浓缩液A、B,用CB 9.6缓冲液稀释至5mL,在100℃条件下加热5min,进行变性处理;冷却后至室温后,将两种样品和蛋白质Marker加入制备好的免染胶(上层为浓缩胶,下层为分离胶)加样孔中,在电解槽中加满电解液,电泳完成后,可在成像系统中观察电泳图像。其中,电泳具体操作为:先恒压80V,10min后蛋白进入分离胶,调整恒定电压为120V,20min后电泳完成。

[0067] 8) 电转移:将电泳后的胶平铺在经甲醇和电转缓冲液处理过的PVDF膜上,夹在滤纸和海绵中间组装成转运夹层,所用的滤纸、海绵需要用电转缓冲液浸润,按照海绵—滤纸—电泳凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵的顺序组装转运夹层,放入湿式转膜装置中,在100mA恒流下转膜1.5 h,转移过程中放热,需将转膜装置放在冰浴中。

[0068] 9) 膜成像:电转移完成后,用镊子取出PVDF膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0069] 10) 封闭:取出PVDF膜,用15mL的TBS液洗膜5min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理1h。

[0070] 11) 免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:1000的比例稀释一抗,将膜浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1.5 h;取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟,之后浸入10mL以1:2000的比例稀释的荧光碳点标记的二抗液中,室温条件下孵育1.5 h,取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟。

[0071] 12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜在凝胶成像系统中成像,利用荧光碳点在紫外光照射下发射荧光的性能,得到免疫印迹图像。如果两样品都得荧光条带,说明古代泥化丝织品属于蚕丝;如果只有现代蚕丝具有荧光条带,说明古代泥化丝织品不属于蚕丝。

[0072]

实施例3:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:分别量取10mL的去离子水和无水乙醇(体积比1:1),混合溶解在烧杯中,加入0.40 g果糖,搅拌至完全溶解。将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于160℃烘箱中加热3 h,待溶液变为浅黄色,反应完成,自然冷却至室温,得到荧光碳点溶液;将得到的溶液用透析袋(截留分子量1000)透析24 h以除去其他小分子杂质;最后对纯化的碳点溶液进行冷冻干燥,可得到荧光碳点粉末。

[0073] 2) 荧光碳点标记蚕丝丝素蛋白二抗的制备:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入10mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌2~3 h后,用PBS缓冲液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到荧光碳点标记的蚕丝丝素蛋白二抗。

[0074] 3) 称取0.3g现代蚕丝作为对照样品,以1:100的浴比在含有0.5% Na₂PO₄和1%

C₁₇H₃₅COONa的混合溶液中煮沸30min,进行脱胶处理,共脱胶两次;脱胶之后,将蚕丝用去离子水搓洗4次以上,放入烘箱干燥,得到蚕丝丝素纤维。现代蚕丝丝素纤维,以1:50的浴比浸入[AMIM]Cl离子液体中,加热反应一定时间,冷却;加入PM₁₃-碱性蛋白酶粉末恒温孵育6h,进行灭酶,得到丝素蛋白/离子液体溶液A。

[0075] 其中,所述PM₁₃-碱性蛋白酶的制备方法为:向100mL的0.1M的硼酸钠缓冲溶液中加入0.15g碱性蛋白酶和3.75g的MW15000的梳状PEG,在4℃条件下缓慢搅拌1h,再外加50mL 1mmol/L HCl的条件下超滤除去未反应的PM₁₃,重复三次,将滤液进行冷冻干燥,得到PM₁₃-碱性蛋白酶粉末。

[0076] 4)称取30g带有古代泥化丝织品的土样,用研钵研磨后,加入60mL [AMIM]Cl离子液体中,按照3)中步骤操作,得到离子液体悬浮液。将悬浮液进行高速冷冻离心,上层清液即丝素蛋白/离子液体溶液B。

[0077] 5)在丝素蛋白/离子液体溶液A、B中加入无水乙醇,使蛋白析出,滤出蛋白,加入去离子水溶解,得到纯净的丝素蛋白提取液A、B。

[0078] 6)将得到的两种提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子量1000)透析48 h,除去小分子杂质;利用真空浓缩仪浓缩丝素蛋白水溶液至终体积约为200μL。

[0079] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50μL丝素蛋白浓缩液A、B,用CB 9.6缓冲液稀释至5mL,在100℃条件下加热5min,进行变性处理;冷却后至室温后,将两种样品和蛋白质Marker加入制备好的免染胶(上层为浓缩胶,下层为分离胶)加样孔中,在电解槽中加满电解液,电泳完成后,可在成像系统中观察电泳图像。其中,电泳具体操作为:先恒压80V,10min后蛋白进入分离胶,调整恒定电压为120V,20min后电泳完成。

[0080] 8)电转移:将电泳后的胶平铺在经甲醇和电转缓冲液处理过的PVDF膜上,夹在滤纸和海绵中间组装成转运夹层,所用的滤纸、海绵需要用电转缓冲液浸润,按照海绵—滤纸—电泳凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵的顺序组装转运夹层,放入湿式转膜装置中,在100mA恒流下转膜2 h,转移过程中放热,需将转膜装置放在冰浴中。

[0081] 9)膜成像:电转移完成后,用镊子取出PVDF膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0082] 10)封闭:取出PVDF膜,用15mL的TBS液洗膜5min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理1h。

[0083] 11)免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:1000的比例稀释一抗,将膜浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育2 h;取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟,之后浸入10mL以1:3000的比例稀释的荧光碳点标记的二抗液中,室温条件下孵育1.5 h,取出膜后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟。

[0084] 12)发光显色:直接将免疫处理后的膜在凝胶成像系统中成像,利用荧光碳点在紫外光照射下发射荧光的性能,得到免疫印迹图像。如果两样品都得荧光条带,说明古代泥化丝织品属于蚕丝;如果只有现代蚕丝具有荧光条带,说明古代泥化丝织品不属于蚕丝。

[0085] 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。

[0086] 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)	一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法		
公开(公告)号	CN107389641A	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	CN201710645247.2	申请日	2017-08-01
[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	胡智文 陈茹茹 李津 梁军龙 尚亚廷		
发明人	胡智文 陈茹茹 李津 梁军龙 尚亚廷		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533		
代理人(译)	江程鹏		
其他公开文献	CN107389641B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及文物检测领域，公开了一种基于免疫痕迹法检测古代泥化丝织品的方法，本发明先制备了荧光碳点标记的蚕丝二抗，之后逐步采用离子液体和PM13-碱性蛋白酶对现代蚕丝和古代泥化丝织品文物样进行水解，得到蛋白提取液后，经透析、纯化，进行SDS-PAGE凝胶电泳，将得到的蛋白条带转移到PVDF膜上，经蚕丝一抗和荧光碳点标记的二抗孵育后，可在凝胶成像系统中观察到免疫荧光条带，鉴别古代丝织品的种类。本发明中化学试剂用量少，反应温和、环保无害；在对古代丝织品进行检测时，具有样品用量少、直观、快速和高灵敏性的特点。