



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107462728 A

(43)申请公布日 2017.12.12

(21)申请号 201710645261.2

(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
郑浩然

(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 33/68(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鉴别古代丝织品残片
蚕丝种类的方法

(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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,先以红薯为碳源制备了荧光碳点,然后用荧光碳点标记桑蚕丝和柞蚕丝蚕丝的二抗,之后逐步采用离子液体和PM₁₃-碱性蛋白酶对混淆的古代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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征在于采用如下步骤:

1) 荧光碳点的制备:将红薯碎块和 KH_2PO_4 浸入蒸馏水中,于水热反应釜内反应,取出反应液,经超声、抽滤、透析得到荧光碳点溶液,之后经冷冻干燥,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:将荧光碳点分散在PBS缓冲液中,加入碳化二亚胺后,分别加入桑蚕丝和柞蚕丝丝素蛋白二抗,制得荧光碳点标记桑蚕丝二抗和荧光碳点标记柞蚕丝二抗;

3) 分别称取等质量已被混淆的由桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝制作的古代纺织品残片作为样品,小心用去离子水清洗,去除表面污染物,烘干,分别标记为A,B,C三组;

4) 将A,B,C三组样品以1:95-105的浴比在含有0.4-0.6wt% Na_2PO_4 和0.2-1.2wt% $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$ 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,样品用去离子水小心搓洗4次以上,放入烘箱干燥;

5) 将A,B,C三组古代丝织品残片以1:45-55的浴比浸入[AM1M]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,得到三组丝素蛋白/离子液体溶液A、B、C;

6) 待丝素蛋白/离子液体溶液冷却至室温,加入无水乙醇,反复浸泡,使丝素蛋白析出,对混合物进行真空抽滤,向滤出的丝素蛋白中加入去离子水,反复浸泡后过滤,分别得到丝素蛋白提取液A、B、C;将三组丝素蛋白提取液在1-5℃条件下用透析袋透析10-14 h,除去小分子杂质;对透析后的丝素蛋白提取液进行真空浓缩,在2500-3500rpm、温度8-12℃条件下浓缩至终体积约为200 μL ,得到丝素蛋白浓缩液A、B、C;

7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取45-55 μL 丝素蛋白浓缩液A、B、C,用CB 9.6缓冲液稀释至4.5-5.5mL,在98-102℃条件下加热4-6min,进行变性处理;冷却后至室温后,将三种样品和蛋白质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,在成像系统中观察电泳图像;本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2;

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;可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2;

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14-16mL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的体积比稀释桑蚕丝一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1~2 h;取出膜1后用TBST液洗膜,之后浸入8-12mL稀释的荧光碳点标记的桑蚕丝二抗液中室温条件下孵育1-25 h;膜2用柞蚕丝抗体进行同样处理;

12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜1、膜2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;膜1中得到荧光条带为桑蚕丝纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为柞蚕丝纺织品残片,则另一样品即为蓖麻蚕丝纺织品残片。

2. 根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤1)中,所述荧光碳点的制备方法具体为:称取1.8-2.2g红薯块茎碎块和5.5-

6.5g KH_2PO_4 ,加入8-12mL蒸馏水,将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于180~220℃烘箱中加热10~15 h,冷却至室温后,取出反应液,超声10min,用0.22 μm 微孔膜抽滤,得到浅黄色的荧光碳点液体;将得到的溶液用截留分子量 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.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤2)中,荧光碳点标记桑蚕丝二抗和荧光碳点标记柞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8-12mmol/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桑蚕丝素蛋白二抗和柞蚕丝素蛋白二抗。

4.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤5)中,所述 PM_{13} -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 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。

5.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是: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。

6.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是: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。

7.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是: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。

8.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤6)中,透析袋的截留分子量为1000。

9.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤10)中,所述封闭液为5wt%脱脂奶粉。

10.根据权利要求1所述一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,其特征是:步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

一种基于免疫痕迹法鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法

[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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法。

[0003]

背景技术

[0004] 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。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。常用的蚕丝包括桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝等,因其氨基酸含量和分子间的微观结构不同,其纺织品具有不同的力学性质和服用性能。

[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。尤其是墓葬中出土的衣物,由于经过温度、湿度、土壤的酸碱性、细菌、霉菌、体液和尸腐物的侵蚀,从而变硬脆,甚至矿化、降解,不同种蚕丝的丝织物已经无法辨识,且年代越早的证据越难寻觅,给丝绸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,从古代丝织品中提取有效信息,对确定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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法。利用本发明方法对古代丝织品残片进行鉴别时,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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法,采用如下步骤:

1) 荧光碳点的制备:将红薯碎块和 KH_2PO_4 浸入蒸馏水中,于水热反应釜内反应,取出反应液,经超声、抽滤、透析得到荧光碳点溶液,之后经冷冻干燥,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:将荧光碳点分散在PBS缓冲液中,加入碳化二亚胺后,分别加入桑蚕丝和柞蚕丝丝素蛋白二抗,制得荧光碳点标记桑蚕丝二抗和荧光碳点标记柞蚕丝二抗。

[0011] 3) 分别称取等质量已被混淆的由桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝制作的古代纺织品残片作为样品,小心用去离子水清洗,去除表面污染物,烘干,分别标记为A,B,C三组。

[0012] 4) 将A,B,C三组样品以1:95-105的浴比在含有0.4-0.6wt% Na_2PO_4 和0.2-1.2wt%

C₁₇H₃₅COONa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,样品用去离子水小心搓洗4次以上,放入烘箱干燥。

[0013] 5) 将A,B,C三组古代丝织品残片以1:45-55的浴比浸入[AM1M]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,得到三组丝素蛋白/离子液体溶液A、B、C。

[0014] 6) 待丝素蛋白/离子液体溶液冷却至室温,加入无水乙醇,反复浸泡,使丝素蛋白析出,对混合物进行真空抽滤,向滤出的丝素蛋白中加入去离子水,反复浸泡后过滤,分别得到丝素蛋白提取液A、B、C;将三组丝素蛋白提取液在1-5℃条件下用透析袋透析10-14 h,除去小分子杂质;对透析后的丝素蛋白提取液进行真空浓缩,在2500-3500rpm、温度8-12℃条件下浓缩至终体积约为200μL,得到丝素蛋白浓缩液A、B、C。

[0015] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取45-55μL丝素蛋白浓缩液A、B、C,用CB 9.6缓冲液稀释至4.5-5.5mL,在98-102℃条件下加热4-6min,进行变性处理;冷却后至室温后,将三种样品和蛋白质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,在成像系统中观察电泳图像;本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0016] 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。

[0017] 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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 10) 封闭:取出PVDF膜,用14-16mL的TBS液洗膜4-6min,用封闭液在室温条件下处理50-70min。

[0022] 11) 免疫处理:用抗体稀释液以950-1050:1的体积比稀释桑蚕丝一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1~2 h;取出膜1后用TBST液洗膜,之后浸入8-12mL稀释的荧光碳点标记的桑蚕丝二抗液中室温条件下孵育1-25 h;膜2用柞蚕丝抗体进行同样处理。

[0023] 12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜1、膜2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;膜1中得到荧光条带为桑蚕丝纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为柞蚕丝纺织品残片,则另一样品即为蓖麻蚕丝纺织品残片。

[0024] 作为优选,步骤1)中,所述荧光碳点的制备方法具体为:称取1.8-2.2g红薯块茎碎块和5.5-6.5g KH₂PO₄,加入8-12mL蒸馏水,将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于180~220℃烘箱中加热10~15 h,冷却至室温后,取出反应液,超声10min,用0.22μm微孔膜抽滤,得到浅黄色的荧光碳点液体;将得到的溶液用截留分子量 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。

[0025] 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。

[0026] 作为优选,步骤2)中,荧光碳点标记桑蚕丝二抗和荧光碳点标记柞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8-12mmol/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桑蚕丝素蛋白二抗和柞蚕丝素蛋白二抗。

[0027] 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。

[0028] 作为优选,步骤5)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。

[0029] 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。

[0030] 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,而且使酶均匀分散在离子液体中。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 作为优选,步骤6)中,透析袋的截留分子量为1000。

[0035] 作为优选,步骤10)中,所述封闭液为5wt%脱脂奶粉。

[0036] 作为优选,步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

[0037] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

(1)本发明使用红薯作为荧光碳点的碳源,充分利用资源,节能环保,绿色无害。

[0038] (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。

[0039] (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。

[0040] (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。

[0041] (5) 本发明样品用量少,可以直观、准确、高灵敏性地鉴别出不同种类的丝素蛋白,特别是针对腐坏严重、检验困难的古代丝织品残片。

[0042]

具体实施方式

[0043] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0044] 实施例1:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:称取2.00g红薯块茎碎块和6.00g KH_2PO_4 ,加入10mL蒸馏水,将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于180℃烘箱中加热10 h,冷却至室温后,取出反应液,超声10min,用0.22 μ m微孔膜抽滤,得到浅黄色的荧光碳点液体;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。

[0045] 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到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桑蚕丝素蛋白二抗和柞蚕丝素蛋白二抗。

[0046] 3) 称取等质量已被混淆的由桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝制作的古代纺织品残片作为样品,小心用去离子水清洗,去除表面污染物,烘干,分别标记为A,B,C三组。

[0047] 4) 将A,B,C三组样品以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,样品用去离子水小心搓洗4次以上,放入烘箱干燥。

[0048] 5) 将A,B,C三种古代丝织品残片以1:50的浴比浸入[AM1M]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、B、C。

[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] 6) 待丝素/离子液体溶液冷却至室温,加入无水乙醇,反复浸泡,会有丝素蛋白析出。将混合物进行真空抽滤,向滤出的丝素蛋白中加入去离子水,反复浸泡后过滤,分别得到丝素蛋白提取液A、B、C;将得到的三种丝素蛋白提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子

量1000)透析12 h,除去小分子杂质;将透析后的丝素蛋白提取液装入浓缩管中真空浓缩,在3000rpm、温度10℃条件下浓缩丝素蛋白溶液至终体积约为200μL,得到丝素蛋白浓缩液A、B、C。

[0051] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50μL丝素蛋白浓缩液A、B、C,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,将三种样品和蛋白质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。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0052] 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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 11) 免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1000:1的比例稀释桑蚕丝一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1h;取出膜1后用TBST液洗膜,之后浸入10mL以一定比例稀释的荧光碳点标记的桑蚕丝二抗液中室温条件下孵育1.5 h。膜2用柞蚕丝抗体进行同样处理。

[0056] 12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜1、膜2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。膜1中得到荧光条带为桑蚕丝纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为柞蚕丝纺织品残片,则另一样品即为蓖麻蚕丝纺织品残片。

[0057]

实施例2:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:称取2.00g红薯块茎碎块和6.00g KH_2PO_4 ,加入10mL蒸馏水,将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于200℃烘箱中加热13 h,冷却至室温后,取出反应液,超声10min,用0.22μm微孔膜抽滤,得到浅黄色的荧光碳点液体;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。

[0058] 2) 荧光碳点标记蚕丝素蛋白二抗的制备:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入到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桑蚕丝素蛋白二抗和柞蚕丝素蛋白二抗。

[0059] 3) 称取等质量已被混淆的由桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝制作的古代纺织品残片作为样品,小心用去离子水清洗,去除表面污染物,烘干,分别标记为A、B、C三组。

[0060] 4) 将A、B、C三组样品以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,样品用去离子水小心搓洗4次以上,放入烘箱干燥。

[0061] 5) 将A,B,C三种古代丝织品残片以1:50的浴比浸入[AM1M]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、B、C。

[0062] 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。

[0063] 6) 待丝素/离子液体溶液冷却至室温,加入无水乙醇,反复浸泡,会有丝素蛋白析出。将混合物进行真空抽滤,向滤出的丝素蛋白中加入去离子水,反复浸泡后过滤,分别得到丝素蛋白提取液A、B、C;将得到的三种丝素蛋白提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子量1000)透析12 h,除去小分子杂质;将透析后的丝素蛋白提取液装入浓缩管中真空浓缩,在3000rpm、温度10℃条件下浓缩丝素蛋白溶液至终体积约为200μL,得到丝素蛋白浓缩液A、B、C。

[0064] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50μL丝素蛋白浓缩液A、B、C,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,将三种样品和蛋白质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。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0065] 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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 11) 免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1000:1的比例稀释桑蚕丝一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1.5 h;取出膜1后用TBST液洗膜,之后浸入10mL以一定比例稀释的荧光碳点标记的桑蚕丝二抗液中室温条件下孵育1.5 h。膜2用柞蚕丝抗体进行同样处理。

[0069] 12) 发光显色:直接将免疫处理后的膜1、膜2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。膜1中得到荧光条带为桑蚕丝纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为柞蚕丝纺织品残片,则另一样品即为蓖麻蚕丝纺织品残片。

[0070]

实施例3:

1) 荧光碳点(CDs)的制备:称取2.00g红薯块茎碎块和6.00g KH₂PO₄,加入10mL蒸馏水,将混合溶液倒入水热反应釜中密封,置于220℃烘箱中加热15 h,冷却至室温后,取出反应液,超声10min,用0.22μm微孔膜抽滤,得到浅黄色的荧光碳点液体;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。

[0071] 2) 荧光碳点标记蚕丝素蛋白二抗的制备:将荧光碳点、碳化二亚胺和二抗加入到10mmol/L的PBS缓冲液中,在室温条件下搅拌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桑蚕丝素蛋白二抗和柞蚕丝素蛋白二抗。

[0072] 3) 称取等质量已被混淆的由桑蚕丝、柞蚕丝和蓖麻蚕丝制作的古代纺织品残片作为样品,小心用去离子水清洗,去除表面污染物,烘干,分别标记为A,B,C三组。

[0073] 4) 将A,B,C三组样品以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,样品用去离子水小心搓洗4次以上,放入烘箱干燥。

[0074] 5) 将A,B,C三种古代丝织品残片以1:50的浴比浸入[AM1M]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、B、C。

[0075] 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。

[0076] 6) 待丝素/离子液体溶液冷却至室温,加入无水乙醇,反复浸泡,会有丝素蛋白析出。将混合物进行真空抽滤,向滤出的丝素蛋白中加入去离子水,反复浸泡后过滤,分别得到丝素蛋白提取液A、B、C;将得到的三种丝素蛋白提取液在4℃条件下用透析袋(截留分子量1000)透析12 h,除去小分子杂质;将透析后的丝素蛋白提取液装入浓缩管中真空浓缩,在3000rpm、温度10℃条件下浓缩丝素蛋白溶液至终体积约为200 μL ,得到丝素蛋白浓缩液A、B、C。

[0077] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:分别量取50 μL 丝素蛋白浓缩液A、B、C,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,将三种样品和蛋白质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。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0078] 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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 11) 免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1000:1的比例稀释桑蚕丝一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育2 h;取出膜1后用TBST液洗膜,之后浸入10mL以一定比例稀释的荧光碳点标记的桑蚕丝二抗液中室温条件下孵育1.5 h。膜2用柞蚕丝抗体进

行同样处理。

[0082] 12) 发光显色: 直接将免疫处理后的膜1、膜2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。膜1中得到荧光条带为桑蚕丝纺织品残片, 膜2中得到荧光条带的为柞蚕丝纺织品残片, 则另一样品即为蓖麻蚕丝纺织品残片。

[0083] 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。

[0084] 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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法		
公开(公告)号	CN107462728A	公开(公告)日	2017-12-12
申请号	CN201710645261.2	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 郑浩然		
发明人	胡智文 陈茹茹 李津 梁军龙 郑浩然		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/6803		
代理人(译)	江程鹏		
其他公开文献	CN107462728B		
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鉴别古代丝织品残片蚕丝种类的方法，先以红薯为碳源制备了荧光碳点，然后用荧光碳点标记桑蚕丝和柞蚕丝蚕丝的二抗，之后逐步采用离子液体和PM13-碱性蛋白酶对混淆的古代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。