



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187949 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811040988.9

(22)申请日 2018.09.07

(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 王秉 王钟元 周莲 杨慧
彭志勤 胡智文

(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 侯兰玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/561(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片
羊毛种类的方法

(57)摘要

本发明涉及文物检测领域,公开了一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,本发明先用反向微乳液法制备了碳量子点,用碳量子点标记山羊毛和绵羊毛的二抗,之后用金属盐法和还原法提取现代羊毛和古代毛织品残片,透析、纯化,进行SDS-PAGE凝胶电泳,用碳量子点溶液进行染色,观察电泳图像。将得到的蛋白条带转移到聚偏氟乙烯膜上,经羊毛一抗和碳量子点标记的二抗孵育后,可在凝胶成像系统中观察到免疫条带,鉴别古代毛织品的羊毛种类。本发明中化学试剂用量少,反应温和、环保无害;在对古代毛织品进行检测时,具有样品用量少、灵敏、准确、直观等优点。

1. 一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 碳量子点的制备:将水和十二烷基苯磺酸钠加入到正庚烷中,制得油相溶液;加入生物物质焦油水溶液、正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,振荡得到反相微乳液;加入十二胺,超声,马弗炉中保温,冷却,破乳,离心,制得碳量子点溶液;然后取一半经透析纯化、冷冻干燥,得到碳量子点;

2) 碳量子点标记羊毛角蛋白二抗的制备:将碳量子点、碳化二亚胺和二抗加入到9-11mmol/L的磷酸缓冲盐溶液中,在室温条件下搅拌2-3 h后,用磷酸缓冲盐溶液对溶液进行多次洗涤离心,得到碳量子点标记羊毛角蛋白二抗;

3) 用酒石酸将0.03-0.06 mol/L的酒石酸钠溶液的pH调为2.5-2.8,将此溶液与350-450 μ l步骤1)所剩余的碳量子点溶液混合均匀,制得碳量子点染胶溶液;

4) 分别称取等质量已被混淆的由山羊毛、绵羊毛和岩羊毛制作的古代毛织品残片作为样品,用去离子水清洗,烘干;分别浸在pH =1.5-2.5的HBr溶液中1-2h,用去离子水搓洗,烘干,分别标记为A,B,C三组;将A,B,C三组以1:15-25的浴比加入含有0.05-0.15mol/L的LiBr和0.02-0.04mol/L的十二烷基硫酸钠的溶液中浸没,调节pH值到8-11,超声,放入微波反应器辐射水解6-8min;

5) 从反应器中取出,将三个样品分别倒入三口烧瓶,将三口烧瓶放在恒温水浴锅中,调节水浴温度70-90 $^{\circ}$ C,通氮气10-20分钟,缓缓加入10-25ml的2.5-3.5 mol/L 三(2-羧乙基)膦溶液,通氮气搅拌,使羊毛溶解,真空抽滤,去除未溶羊毛及杂质;

6) 分别加入20-35g硫酸铵,搅拌均匀,调节滤液pH,离心8-15min,将下层溶液在2-6 $^{\circ}$ C条件下用透析袋透析50-60h;低温真空浓缩至原体积的1/4-1/2,得到羊毛角蛋白提取液A、B、C;

7) SDS-PAGE凝胶电泳:取羊毛角蛋白提取液A、B、C于2*样品缓冲液按1:0.8-1.2比例混合,水浴加热于93-97 $^{\circ}$ C下加热1.5-2.5 min,使蛋白质变性;样品冷却至室温后,分别取羊毛角蛋白提取液A、B、C 10-20 μ l加入凝胶点样孔,进行SDS-PAGE凝胶电泳;浸入步骤3)所得碳量子点染胶溶液,以低速在摇床上振荡2.5-3.5h,观察样品的电泳图像;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聚偏氟乙烯膜上,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,取出聚偏氟乙烯膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况;

10) 封闭:取出聚偏氟乙烯膜,用10-20mL的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜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的体积比稀释山羊毛一抗,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稀释的碳量子点标记羊毛二抗中室温条件下孵育1-2 h;膜2用绵羊毛抗体进行同样处理;

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,利用碳量子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中得到荧光条带为山羊毛纺织品残

片,膜2中得到荧光条带的为绵羊毛纺织品残片,则另一样品即为岩羊毛纺织品残片。

2.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤1)中,碳量子点的制备方法具体如下:向15-25 mL有机溶剂正庚烷中,加入摩尔质量比为18-22:1的水和十二烷基苯磺酸钠,制得油相溶液;向油相溶液中,加入质量分数为45-55%的生物质焦油水溶液,再加入摩尔质量比为1.8-2.2:1的正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,用力摇晃,得到反相微乳液,静置10-13h;向反相微乳液中,加入0.2-0.4 g十二胺,室温下超声8-12 min,倒入含聚四氟乙烯内胆的反应釜内,在110-130℃马弗炉中放置2-4 h,取出,自然冷却至室温;用无水甲醇破乳,洗涤数次,离心,制得碳量子点溶液;将一半溶液用截留分子量为1000的透析袋透析20-28 h,冷冻干燥,可得到碳量子点。

3.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤4)中,超声的具体操作为:室温下以190-210W的功率超声30-50min。

4.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤5)中,所述通氮气搅拌具体为向三口烧瓶中持续通入氮气,利用机械搅拌以180-220r/min的速度搅拌1.8-2.2 h至羊毛溶解,溶液变澄清。

5.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤6)中,所述调节滤液pH具体为用4-5mol/L的硫酸溶液调节步骤9)得到的滤液pH值至羊毛角蛋白等电点4.1-4.3;所述透析袋的截留分子量为3500-4000。

6.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤7)中,所述样品缓冲液为1.8-2.2ml 0.4-0.6mol/L三(羟甲基)氨基甲烷-HCl, 1.8-2.2ml甘油,1.8-2.2ml 18-22%十二烷基硫酸钠, 0.4-0.6mol 0.08-0.12%溴酚蓝,0.8-1.2mlβ-巯基乙醇的混合溶液;三(羟甲基)氨基甲烷-HCl的pH为6.7-6.9。

7.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤7)中,凝胶电泳具体操作为:将电压调至28-32V电泳18-22min;当样品完全进入分离胶后,再将电压调成80-100V;当样品的溴酚蓝迁移至玻璃胶板底部约0.8-1.2cm时,即可停止电泳。

8.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤8)中,电转移操作中,使用的聚偏氟乙烯膜先用甲醇浸泡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—聚偏氟乙烯膜—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。

9.如权利要求1所述的一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,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;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印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,其特征在于,步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法

[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印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法。

[0003]

背景技术

[0004] 中国历史悠久,从中国早期的墓葬中出土有大量的羊毛制品,其数量,还是织造之精美程度都让人叹为观止。研究这些出土毛织品的羊毛种类,可以帮助我们更好地了解古代毛织品的起源和少数民族服饰、民族间的文化交流。

[0005] 在古代毛织品遗存中,羊毛遗存主要表现为毛织品残片,这类遗存长期埋藏在地下环境中,受到水、热、氧气、微生物等环境因素的影响,羊毛角蛋白会发生变性和老化降解。而出土后因环境条件的剧烈变化,进一步加速了纤维的老化,因此,不难想象,在漫长的历史长河中,当年埋入墓葬或者遗址中的毛织品早已经失去原有的形貌,降解成肽段或者氨基酸,肉眼无法识别,且年代越早的证据越难寻觅,给毛织品文物的羊毛种类鉴别带来了很大的困难。

[0006] 目前,普通的分析检测技术,如傅里叶红外光谱,拉曼光谱,X-衍射分析等,在遇到这种残留物分析时,往往束手无策,国内外对于古代毛织品的鉴定,大多数还停留在对纤维形态的分析上,难以鉴别不同古代毛织品的羊毛种类;因此,寻找一种更为科学的手段来鉴别古代毛织品是非常必要的。

[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印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法。利用本发明方法对古代毛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:一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法,包括以下步骤:

1) 碳量子点的制备:将水和十二烷基苯磺酸钠加入到正庚烷中,制得油相溶液;加入生物质焦油水溶液、正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,振荡得到反相微乳液;加入十二胺,超声,马弗炉中保温,冷却,破乳,离心,制得碳量子点溶液;然后取一半经透析纯化、冷冻干燥,得到碳量子点。

[0010] 将原本工业生产中应该去除的污染物生物质焦油作为原料,来源丰富,并且解决了污染物处理的问题,起到了变废为宝的作用。

[0011] 用反相微乳液法制备碳量子点溶液,产率远高于一般制备方法,并且碳量子点粒度均匀,尺寸可调。

[0012] 2) 碳量子点标记羊毛角蛋白二抗的制备:将碳量子点、碳化二亚胺和二抗加入到9-11mmol/L的磷酸缓冲盐溶液中,在室温条件下搅拌2-3 h后,用磷酸缓冲盐溶液对溶液进行多次洗涤离心,得到碳量子点标记羊毛角蛋白二抗。

[0013] 碳量子点经过偶联后,其荧光能力增强,同时也可以避免碳量子点粒子团聚现象。

[0014] 3) 用酒石酸将0.03-0.06 mol/L的酒石酸钠溶液的pH调为2.5-2.8,将此溶液与350-450 μ l步骤1)所剩余的碳量子点溶液混合均匀,制得碳量子点染胶溶液;

4) 分别称取等质量已被混淆的由山羊毛、绵羊毛和岩羊毛制作的古代毛织品残片作为样品,用去离子水清洗,烘干;分别浸在pH =1.5-2.5的HBr溶液中1-2h,用去离子水搓洗,烘干,分别标记为A,B,C三组;将A,B,C三组以1:15-25的浴比加入含有0.05-0.15mol/L的LiBr和0.02-0.04mol/L的十二烷基硫酸钠的溶液中浸没,调节pH值到8-11,超声,放入微波反应器辐射水解6-8min。

[0015] 十二烷基硫酸钠能够与角蛋白形成巨大的胶束,进而保护生成的-SH被氧化,利于还原反应的发生,防止沉淀,同时由于十二烷基硫酸钠溶液有很大的表面能,从而使羊毛能与还原剂充分接触,使反应时间有效的减少。可以得到分子量高、浓度高的角蛋白溶液。

[0016] 金属盐LiBr对羊毛分子中的氢键有极大的破坏作用,与还原性物质共同作用,可以溶解羊毛提取角蛋白。相较于其他金属盐,LiBr具有更好的溶解率和提取率。

[0017] 超声可以辅助水解,使浊液分散均匀,提高蛋白的提取率。微波可以促进羊毛的溶胀,使溶剂等分子振动,提高分子内能,加大水解效果,使羊毛更易溶解,从而降低后续还原所需温度。因为提取羊毛体系的复杂性,超声、微波水解的效果不同于提取其他蛋白,不能马上体现,其表现在最终溶解率、提取率的增大,和后续还原温度的降低上。并且因为提取羊毛体系的特殊性,超声微波不能像提取其他蛋白一样简单加入提取步骤,温度和时间也需调整,经过反复试验,优化条件,确定将其放在还原前的水解步骤上。

[0018] 5) 从反应器中取出,将三个样品分别倒入三口烧瓶,将三口烧瓶放在恒温水浴锅中,调节水浴温度70-90 $^{\circ}$ C,通氮气10-20分钟,缓缓加入10-25ml的2.5-3.5 mol/L 三(2-羧乙基)膦溶液,通氮气搅拌,使羊毛溶解,真空抽滤,去除未溶羊毛及杂质。

[0019] 三(2-羧乙基)膦是一种非常有效的硫醇类还原剂。该试剂在水溶液中的稳定性和溶解性都很好。在酸性、碱性溶液中的稳定性也不错。与其他类别的硫醇类还原剂相比,三(2-羧乙基)膦是更加高效的二硫键还原剂,其还原效果不易因pH的变化而改变。在使用三(2-羧乙基)膦还原时排除氧气,防止其被空气氧化。

[0020] 6) 分别加入20-35g硫酸铵,搅拌均匀,调节滤液pH,离心8-15min,将下层溶液在2-6 $^{\circ}$ C条件下用透析袋透析50-60h;低温真空浓缩至原体积的1/4-1/2,得到羊毛角蛋白提取液A、B、C。

[0021] 用硫酸铵盐析,温度系数小,溶解度大,不易引起蛋白质变性。

[0022] 在冰箱中透析,防止蛋白质在较高温度下脱盐变性析出,更稳定,回收率更高。

[0023] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:取羊毛角蛋白提取液A、B、C于2*样品缓冲液按1:0.8-1.2比例混合,水浴加热于93-97 $^{\circ}$ C下加热1.5-2.5 min,使蛋白质变性;样品冷却至室温后,分别取羊毛角蛋白提取液A、B、C 10-20 μ l加入凝胶点样孔,进行SDS-PAGE凝胶电泳;浸入步骤3)所得碳量子点染胶溶液,以低速在摇床上振荡2.5-3.5h,观察样品的电泳图像;本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0024] 用碳量子点染凝胶,灵敏度高,电泳图像清晰,分辨率高。解决了传统SDS-PAGE凝胶电泳图像模糊不清的问题。

[0025] 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聚偏氟乙烯膜上,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。

[0026] 使用的聚偏氟乙烯膜先用甲醇浸泡,目的是活化聚偏氟乙烯膜上面的正点基团,使它更容易与带负电的蛋白质结合。

[0027] 9)膜成像:电转移完成后,取出聚偏氟乙烯膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0028] 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。

[0029] 10)封闭:取出聚偏氟乙烯膜,用10-20mL的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜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的体积比稀释山羊毛一抗,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稀释的碳量子点标记羊毛二抗中室温条件下孵育1-2 h;膜2用绵羊毛抗体进行同样处理;

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,利用碳量子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中得到荧光条带为山羊毛纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为绵羊毛纺织品残片,则另一样品即为岩羊毛纺织品残片。

[0030] 作为优选,步骤1)中,碳量子点的制备方法具体如下:向15-25 mL有机溶剂正庚烷中,加入摩尔质量比为18-22:1的水和十二烷基苯磺酸钠,制得油相溶液;向油相溶液中,加入质量分数为45-55%的生物质焦油水溶液,再加入摩尔质量比为1.8-2.2:1的正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,用力摇晃,得到反相微乳液,静置10-13h;向反相微乳液中,加入0.2-0.4 g十二胺,室温下超声8-12 min,倒入含聚四氟乙烯内胆的反应釜内,在110-130℃马弗炉中放置2-4 h,取出,自然冷却至室温。用无水甲醇破乳,洗涤数次,离心,制得碳量子点溶液;将一半溶液用截留分子量为1000的透析袋透析20-28 h,冷冻干燥,可得到碳量子点。

[0031] 作为优选,步骤4)中,超声的具体操作为:室温下以190-210W的功率超声30-50min。

[0032] 作为优选,步骤5)中,所述通氮气搅拌具体为向三口烧瓶中持续通入氮气,利用机械搅拌以180-220r/min的速度搅拌1.8-2.2 h至羊毛溶解,溶液变澄清。

[0033] 作为优选,步骤6)中,所述调节滤液pH具体为用4-5mol/L的硫酸溶液调节步骤9)得到的滤液pH值至羊毛角蛋白等电点4.1-4.3。

[0034] 盐析和等电点沉淀两种方法结合使用,加大了角蛋白的提取率。

[0035] 作为优选你,所述透析袋的截留分子量为3500-4000。

[0036] 选用截留分子量较小的透析袋,减少小分子蛋白的流失,大大增加提取率。因为古代毛织品存在降解现象,很多蛋白质降解成分子量较小的多肽、氨基酸,所以减少小分子蛋白的流失对于古代毛织品检测非常重要。

[0037] 作为优选,步骤7)中,所述样品缓冲液为1.8-2.2ml 0.4-0.6mol/L三(羟甲基)氨基甲烷-HCl,1.8-2.2ml甘油,1.8-2.2ml 18-22%十二烷基硫酸钠,0.4-0.6mol 0.08-0.12%溴酚蓝,0.8-1.2mlβ-巯基乙醇的混合溶液;三(羟甲基)氨基甲烷-HCl的pH为6.7-

6.9。

[0038] 作为优选,步骤7)中,凝胶电泳具体操作为:将电压调至28-32V电泳18-22min;当样品完全进入分离胶后,再将电压调成80-100V;当样品的溴酚蓝迁移至玻璃胶板底部约0.8-1.2cm时,即可停止电泳。

[0039] 作为优选,步骤8)中,电转移操作中,使用的聚偏氟乙烯膜先用甲醇浸泡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—聚偏氟乙烯膜—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1~2h;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。

[0040] 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;所述封闭液为5wt%脱脂奶粉。

[0041] 作为优选,步骤11)中,所述抗体稀释液为TBST液。

[0042] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

(1)本发明优选碳量子点同时作为SDS-PAGE凝胶电泳的染色液和成像材料,反应灵敏,电泳图像清晰,分辨率高,解决了传统SDS-PAGE凝胶电泳图像模糊的问题。

[0043] (2)本发明采用反相微乳液法制备碳量子点,产率远高于电弧放电法、水热合成法、激光消蚀法等一般制备方法,并且碳量子点粒度均匀,尺寸可调。选用原料生物质焦油为工业废料,一举解决了原料和污染处理两大难题。

[0044] (3)本发明结合利用金属盐法和还原法提取羊毛角蛋白,优选对羊毛分子中的氢键有极大的破坏作用的金属盐LiBr,与强还原性三(2-羧乙基)膦共同作用,弥补了金属盐法溶解率低的缺陷,溶解率比单用金属盐法和还原法都高。

[0045] (4)本发明用量少,检测角蛋白非常灵敏、准确度高,特别适合鉴定年代久远、降解严重的古代毛织品残片。

[0046] (5)本发明利用超声、微波促进水解,使羊毛更易溶胀,使浊液分散均匀,提高分子内能,降低后续还原所需温度,优化了金属盐法和还原法结合提取羊毛角蛋白的方法。

[0047] (6)本发明将盐析和等电点沉淀两种方法结合使用,加大了角蛋白的提取率。

[0048]

具体实施方式

[0049] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0050] 实施例1:

1)碳量子点的制备:向20 mL有机溶剂正庚烷中,加入摩尔质量比为20:1的水和十二烷基苯磺酸钠,制备油相溶液;向油相溶液中,加入质量分数为50%的生物质焦油水溶液,再加入摩尔质量比为2:1的正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,用力摇晃,得到反相微乳液,静置12h;向反相微乳液中,加入0.3 g十二胺,室温下超声10 min,倒入含聚四氟乙烯内胆的反应釜内,在120℃马弗炉中放置3 h,取出,自然冷却至室温。用无水甲醇破乳,洗涤数次,离心,制得碳量子点溶液。将一半溶液用截留分子量为1000的透析袋透析24 h,冷冻干燥,可得到碳量子点。

[0051] 2)碳量子点标记羊毛角蛋白二抗的制备:将碳量子点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入10mmol/L的磷酸缓冲盐溶液中,在室温条件下搅拌2.5 h后,用磷酸

缓冲盐溶液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到碳量子点标记的羊毛角蛋白二抗。

[0052] 3)用酒石酸将0.05 mol/L的酒石酸钠溶液的pH调为2.6,将此溶液与400 μ l步骤1)所得碳量子点溶液混合均匀,制得碳量子点染胶溶液。

[0053] 4)分别称取等质量已被混淆的由山羊毛、绵羊毛和岩羊毛制作的古代毛织品残片作为样品,用去离子水清洗,烘干;分别浸在pH =2的HBr溶液中1.5h,用去离子水搓洗,烘干,分别标记为A,B,C三组;将A,B,C三组以1:20的浴比加入含有0.1mol/L LiBr和0.03mol/L 十二烷基硫酸钠的溶液中浸没,调节pH值到10,室温下以200W的功率超声40min,放入微波反应器辐射水解7min。

[0054] 5)从反应器中取出,将三个样品分别倒入三口烧瓶,将三口烧瓶放在恒温水浴锅中,调节水浴温度80 $^{\circ}$ C,通氮气15分钟,缓缓加入20ml的3 mol/L 三(2-羧乙基)膦溶液,通氮气,利用机械搅拌以200r/min的速度搅拌2 h,使羊毛溶解,真空抽滤,去除未溶羊毛及杂质。

[0055] 6)分别加入30g硫酸铵,搅拌均匀,用4.5mol/L的硫酸溶液调节pH值至羊毛角蛋白等电点4.1-4.3。离心12min,将下层溶液在3 $^{\circ}$ C条件下用透析袋透析55h(截留分子量为3500);低温真空浓缩至原体积的1/3,得到羊毛角蛋白提取液A、B、C。

[0056] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:取羊毛角蛋白提取液A、B、C于2*样品缓冲液(2ml pH为6.8的0.5mol/L三(羟甲基)氨基甲烷-HCl,2ml甘油,2ml 20%十二烷基硫酸钠,0.5mol 0.1%溴酚蓝,1ml β -巯基乙醇的混合溶液)按1:1比例混合,水浴加热于95 $^{\circ}$ C下加热2 min,使蛋白质变性。样品冷却至室温后,分别取羊毛角蛋白提取液A、B、C 15 μ l加入凝胶点样孔,进行SDS-PAGE凝胶电泳;浸入步骤3)所得碳量子点染胶溶液,以低速在摇床上振荡3h,观察样品的电泳图像。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0057] 其中,凝胶电泳具体操作为:将电压调至30V电泳20min。当样品完全进入分离胶后,再将电压调成90V。当样品的溴酚蓝迁移至玻璃胶板底部约1cm时,即可停止电泳。

[0058] 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聚偏氟乙烯膜上,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—聚偏氟乙烯膜—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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0059] 9)膜成像:电转移完成后,用镊子取出聚偏氟乙烯膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0060] 10)封闭:取出聚偏氟乙烯膜,用15mL的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜5min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理1h。

[0061] 11)免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:1000的比例稀释山羊毛一抗,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,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的比例稀释的碳量子点标记的二抗液中,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。膜2用绵羊毛抗体进行同样处理。

[0062] 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,利用碳量子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中得到荧光条带为山羊毛纺织

品残片,膜2中得到荧光条带的为绵羊毛纺织品残片,则另一样品即为岩羊毛纺织品残片。

[0063] 实施例2:

1) 碳量子点的制备:向15 mL有机溶剂正庚烷中,加入摩尔质量比为18:1的水和十二烷基苯磺酸钠,制备油相溶液;向油相溶液中,加入质量分数为45%的生物质焦油水溶液,再加入摩尔质量比为1.8:1的正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,用力摇晃,得到反相微乳液,静置10h;向反相微乳液中,加入0.2 g十二胺,室温下超声8 min,倒入含聚四氟乙烯内胆的反应釜内,在110℃马弗炉中放置2 h,取出,自然冷却至室温。用无水甲醇破乳,洗涤数次,离心,制得碳量子点溶液。将一半溶液用截留分子量为1000的透析袋透析20h,冷冻干燥,可得到碳量子点碳量子点。

[0064] 2) 碳量子点标记羊毛角蛋白二抗的制备:将碳量子点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入9mmol/L的磷酸缓冲盐溶液中,在室温条件下搅拌2 h后,用磷酸缓冲盐溶液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到碳量子点标记的羊毛角蛋白二抗。

[0065] 3) 用酒石酸将0.03 mol/L的酒石酸钠溶液的pH调为2.5,将此溶液与350μl步骤1)所得碳量子点溶液混合均匀,制得染胶溶液。

[0066] 4) 分别称取等质量已被混淆的由山羊毛、绵羊毛和岩羊毛制作的古代毛织品残片作为样品,用去离子水清洗,烘干;分别浸在pH =1.5的HBr溶液中1h,用去离子水搓洗,烘干,分别标记为A,B,C三组;将A,B,C三组以1:15的浴比加入含有0.05mol/L LiBr和0.02mol/L 十二烷基硫酸钠的溶液中浸没,调节pH值到8,室温下以190W的功率超声30min,放入微波反应器辐射水解6min。

[0067] 5) 从反应器中取出,将三个样品分别倒入三口烧瓶,将三口烧瓶放在恒温水浴锅中,调节水浴温度70℃,通氮气10分钟,缓缓加入10ml的2.5 mol/L 三(2-羧乙基)膦溶液,通氮气,利用机械搅拌以180r/min的速度搅拌1.8 h,使羊毛溶解,真空抽滤,去除未溶羊毛及杂质。

[0068] 6) 分别加入20g硫酸铵,搅拌均匀,用4mol/L的硫酸溶液调节pH值至羊毛角蛋白等电点4.1-4.3。离心8min,将下层溶液在2℃条件下用透析袋透析50h(截留分子量为3500);低温真空浓缩至原体积的1/4,得到羊毛角蛋白提取液A、B、C。

[0069] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:取羊毛角蛋白提取液A、B、C于2*样品缓冲液(1.8ml pH为6.7的0.4mol/L三(羟甲基)氨基甲烷-HCl, 1.8ml甘油,1.8ml 18%十二烷基硫酸钠,0.4mol 0.08%溴酚蓝,0.8mlβ-巯基乙醇的混合溶液)按1:0.8比例混合,水浴加热于93℃下加热1.5 min,使蛋白质变性。样品冷却至室温后,分别取羊毛角蛋白提取液A、B、C 10μl加入凝胶点样孔,进行SDS-PAGE凝胶电泳;浸入步骤3)所得碳量子点染胶溶液,以低速在摇床上振荡2.5h,观察样品的电泳图像。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0070] 其中,凝胶电泳具体操作为:将电压调至28V电泳18min。当样品完全进入分离胶后,再将电压调成80V。当样品的溴酚蓝迁移至玻璃胶板底部约0.8cm时,即可停止电泳。

[0071] 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聚偏氟乙烯膜上,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—聚偏氟乙烯膜—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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0072] 9)膜成像:电转移完成后,用镊子取出聚偏氟乙烯膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0073] 10)封闭:取出聚偏氟乙烯膜,用10mL的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜4min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理50min。

[0074] 11)免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:950的比例稀释山羊毛一抗,将膜1浸没在一抗稀释液中,室温条件下摇床孵育1 h;取出膜1后,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟,之后浸入8mL以1:1000的比例稀释的碳量子点标记的二抗液中,室温条件下孵育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。膜2用绵羊毛抗体进行同样处理。

[0075] 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,利用碳量子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中得到荧光条带为山羊毛纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为绵羊毛纺织品残片,则另一样品即为岩羊毛纺织品残片。

[0076] 实施例3:

1)碳量子点的制备:向25 mL有机溶剂正庚烷中,加入摩尔质量比为22:1的水和十二烷基苯磺酸钠,制备油相溶液;向油相溶液中,加入质量分数为55%的生物质焦油水溶液,再加入摩尔质量比为2.2:1的正丙醇和十二烷基苯磺酸钠,用力摇晃,得到反相微乳液,静置13h;向反相微乳液中,加入0.4 g十二胺,室温下超声12 min,倒入含聚四氟乙烯内胆的反应釜内,在130℃马弗炉中放置4 h,取出,自然冷却至室温。用无水甲醇破乳,洗涤数次,离心,制得碳量子点溶液。将一半溶液用截留分子量为1000的透析袋透析28h,冷冻干燥,可得到碳量子点。

[0077] 2)碳量子点标记羊毛角蛋白二抗的制备:将碳量子点、碳化二亚胺和二抗加入按1:20:20的质量比加入11mmol/L的磷酸缓冲盐溶液中,在室温条件下搅拌3h后,用磷酸缓冲盐溶液对溶液进行多次洗涤离心,即可得到碳量子点标记的羊毛角蛋白二抗。

[0078] 3)用酒石酸将0.06 mol/L的酒石酸钠溶液的pH调为2.5,将此溶液与450μl步骤1)所得碳量子点溶液混合均匀,制得碳量子点染胶溶液。

[0079] 4)分别称取等质量已被混淆的由山羊毛、绵羊毛和岩羊毛制作的古代毛织品残片作为样品,用去离子水清洗,烘干;分别浸在pH =2.5的HBr溶液中2h,用去离子水搓洗,烘干,分别标记为A,B,C三组;将A,B,C三组以1:25的浴比加入含有0.15mol/L LiBr和0.04mol/L 十二烷基硫酸钠的溶液中浸没,调节pH值到11,室温下以210W的功率超声50min,放入微波反应器辐射水解8min。

[0080] 5)从反应器中取出,将三个样品分别倒入三口烧瓶,将三口烧瓶放在恒温水浴锅中,调节水浴温度90℃,通氮气20分钟,缓缓加入25ml的3.5 mol/L 三(2-羧乙基)膦溶液,通氮气,利用机械搅拌以180r/min的速度搅拌1.8 h,使羊毛溶解,真空抽滤,去除未溶羊毛及杂质。

[0081] 6)分别加入35g硫酸铵,搅拌均匀,用5mol/L的硫酸溶液调节pH值至羊毛角蛋白等电点4.1-4.3。离心15min,将下层溶液在6℃条件下用透析袋透析60h(截留分子量为4000);低温真空浓缩至原体积的1/2,得到羊毛角蛋白提取液A、B、C。

[0082] 7) SDS-PAGE凝胶电泳:取羊毛角蛋白提取液A、B、C于2*样品缓冲液(2.2ml pH为6.9的0.6mol/L三(羟甲基)氨基甲烷-HCl, 2.2ml甘油,2.2ml 22%十二烷基硫酸钠,

0.6mol 0.12%溴酚蓝,1.2ml β -巯基乙醇的混合溶液)按1:1.2比例混合,水浴加热于97℃下加热2.5 min,使蛋白质变性。样品冷却至室温后,分别取羊毛角蛋白提取液A、B、C 20 μ l加入凝胶点样孔,进行SDS-PAGE凝胶电泳;浸入步骤3)所得碳量子点染胶溶液,以低速在摇床上振荡3.5h,观察样品的电泳图像。本实验中一次制作两张样品胶,记为胶1、胶2。

[0083] 其中,凝胶电泳具体操作为:将电压调至32V电泳22min。当样品完全进入分离胶后,再将电压调成100V。当样品的溴酚蓝迁移至玻璃胶板底部约1.2cm时,即可停止电泳。

[0084] 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聚偏氟乙烯膜上,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—聚偏氟乙烯膜—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。可得到两张电转移膜,记为膜1、膜2。

[0085] 9)膜成像:电转移完成后,用镊子取出聚偏氟乙烯膜,放入凝胶成像系统中成像,观察蛋白条带转移情况。

[0086] 10)封闭:取出聚偏氟乙烯膜,用20mL的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜6min,用封闭液(5%脱脂奶粉)在室温条件下处理70min。

[0087] 11)免疫处理:用抗体稀释液(TBST液)以1:1050的比例稀释山羊毛一抗,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,室温下在摇床上用TBST液洗膜三次,每次五分钟,之后浸入12mL以1:1000的比例稀释的碳量子点标记的二抗液中,室温条件下孵育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。膜2用绵羊毛抗体进行同样处理。

[0088] 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,利用碳量子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中得到荧光条带为山羊毛纺织品残片,膜2中得到荧光条带的为绵羊毛纺织品残片,则另一样品即为岩羊毛纺织品残片。

[0089] 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。

[0090] 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)	一种基于免疫印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法		
公开(公告)号	CN109187949A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811040988.9	申请日	2018-09-07
[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 周莲 杨慧 彭志勤 胡智文		
发明人	王秉 王钟元 周莲 杨慧 彭志勤 胡智文		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/561		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/561		
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印迹法鉴定古代毛织品残片羊毛种类的方法，本发明先用反向微乳液法制备了碳量子点，用碳量子点标记山羊毛和绵羊毛的二抗，之后用金属盐法和还原法提取现代羊毛和古代毛织品残片，透析、纯化，进行SDS-PAGE凝胶电泳，用碳量子点溶液进行染色，观察电泳图像。将得到的蛋白条带转移到聚偏氟乙烯膜上，经羊毛一抗和碳量子点标记的二抗孵育后，可在凝胶成像系统中观察到免疫条带，鉴别古代毛织品的羊毛种类。本发明中化学试剂用量少，反应温和、环保无害；在对古代毛织品进行检测时，具有样品用量少、灵敏、准确、直观等优点。