



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541218 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811541884.6

(22)申请日 2018.12.17

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市江干区下沙高
教西区2号大街928号

(72)发明人 陈茹茹 王秉 胡铭周 朱诚
胡智文

(74)专利代理机构 杭州永航联科专利代理有限
公司 33304

代理人 侯兰玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

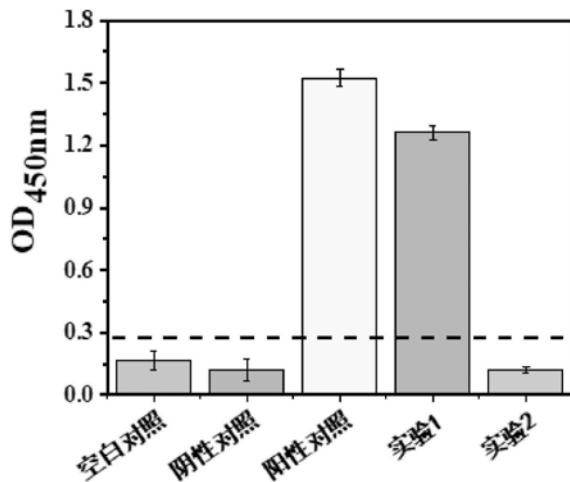
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法

(57)摘要

本发明涉及文物检测技术领域,公开了一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,本发明先制备了桑蚕丝丝素蛋白和柞蚕丝丝素蛋白的单克隆抗体,然后利用固定化木瓜蛋白酶对抗体进行处理,得到具有较高活性的Fab片段抗体,并将该片段和金纳米粒子复合,得到具特异性的Fab-Au NP复合物。经酶联免疫实验表明,该复合物能高效地鉴别出古代丝织品残片的种类。本发明反应温和、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. 一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 蚕丝特异性抗体的制备:称取桑蚕丝和柞蚕丝,经脱胶、溶解、透析、纯化和冷冻干燥后,分别得到桑蚕丝丝素蛋白粉末和柞蚕丝丝素蛋白粉末;将两种丝素蛋白粉末分别溶解在PBS中注射进SPF级Balb/C纯种雌性小鼠体内,经多次脾脏免疫后,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,经克隆、筛选、培养和纯化后,分别得到桑蚕丝丝素蛋白单克隆抗体和柞蚕丝丝素蛋白单克隆抗体;

2) Fab片段抗体的制备:先在分离柱中对固定化木瓜蛋白酶进行活化,同时将步骤1)中所得两种抗体分别在buffer交换柱中进行前处理,得到两种抗体溶液;将两种抗体溶液分别加入到活化的固定化木瓜蛋白酶中,拧紧柱子盖子,置于35-39℃恒温震荡孵化箱中酶解反应,采用亲和层析法纯化和凝胶过滤层析柱对酶解产物进行分离纯化后,得到桑蚕丝丝素蛋白Fab片段抗体和柞蚕丝丝素蛋白Fab片段抗体;

3) Fab-Au NP复合物的制备:将步骤2)所得两种Fab片段抗体进行硫醇化处理后,分别取50-80 μL加入到Au NP溶液中,于35-39℃恒温震荡孵化箱中反应40-50min,11000-14000rpm 离心10-20min后,重新分散在PBST中,得到Fab-BM-Au NP复合物和Fab-AP-Au NP复合物;

4) 包被抗原的制备:按固液比0.8-1.2g/100mL将丝织品残片溶于钙醇溶液中,在96-100℃下加热1.5-2 h,得到蚕丝蛋白溶液;取部分蚕丝蛋白溶液,加入Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液,并于6000-10000rpm离心5-15min,取上清液作为抗原包被液,抗原包被液浓度为1mg/mL;

5) 抗原包被和封闭:将抗原包被液加入96孔板中,每组5个孔,每孔100 μL,加入两组形成实验组1、2,实验组1后续加入Fab-BM-Au NP 复合物,实验组2后续加入Fab-AP-Au NP复合物,并设立只加入Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液的阴性对照组、用BSA代替Fab-Au NP复合物的空白对照组和含有丝素蛋白溶液的阳性对照组,于1-5℃过夜包被,弃去包被液,洗涤;加入0.8-1.2wt% BSA,于35-39 ℃ 孵育1-3 h,封闭掉多余的结合位点后,弃去封闭液,洗涤;

6) 免疫结合:将步骤3)中所得Fab-BM-Au NP复合物和Fab-AP-Au NP复合物稀释为Fab-BM-Au NP复合物溶液和Fab-AP-Au NP复合物溶液,实验组1每孔加入100 μL Fab-BM-Au NP复合物溶液,实验组2每孔加入100 μL Fab-AP-Au NP复合物溶液,空白对照组加入等量PBST,于35-39℃孵育0.5-1.5 h,弃去后洗涤;每孔加入100 μL过氧化辣根酶标记的二抗,于35-39℃孵育0.5-1.5 h,弃去后洗涤;

7) TMB显色:向孔板中分别加入50 μL A液和B液,置于黑暗环境下反应8-12 min,每孔加入100 μL 2mol/L H₂SO₄终止反应;

8) 吸光度测量:将孔板置于酶标仪中,读取450 nm处的吸光度数值,将孔板的阴性对照组OD均值加上 3×标准偏差作为该次实验的cut-off值:

若实验组1的OD均值>阴性对照组的cut-off值,则丝织品残片为桑蚕丝;若实验组2的OD均值>阴性对照组的cut-off值,则丝织品残片为柞蚕丝。

2. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤2)中,固定化木瓜蛋白酶活化的方法具体为:将0.2-0.3mL木瓜蛋白酶溶液加入0.7-0.9 mL分离柱中,将分离柱放入离心管内,8000-12000 rmp离心0.5-1.5 min,弃去离心出来的蛋白储存液,加入0.4-0.6 mL 18-22mM半胱氨酸消化液,重复离心,弃去离心出来的液体,用橡胶

管密封分离柱底部,待用。

3. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤2)中,两种抗体的前处理的方法具体如下:将Buffer交换柱放入离心管内,2000-4000rpm 离心1-3 min,弃去离心出来的存储液,加入 0.8-1.2mL 18-22 mM半胱氨酸消化液,2000-4000rpm 离心1-3min,弃去离心出来的液体,重复离心2-4次;吸取 0.4-0.6m L抗体加入到柱子中,并将柱子放入新的离心管中,2000-4000rpm离心1-3min,收集离心出来含半胱氨酸的抗体溶液,待用。

4. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤2)中,酶解制备Fab片段抗体的具体条件如下:酶和抗体的质量比为 0.0080-0.0090 mg酶/mg IgG,采用20 mM Cys浓度的消化液,酶解时间7.5-8.5h;孵育完成后,将分离柱放入离心管中,8000-12000 rpm 离心1-3 min,收集离心出来的酶解液,再加入0.25 mL PBS 到柱子中,放入离心管中,8000-12000rpm离心1-3min,重复清洗两次,将离心出来的液体计入到酶解液中,共得到1 mL的酶解液。

5. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤2)中,Fab片段抗体的分离纯化方法具体如下:用Protein A Plus柱除去抗体Fc片段,收集含有Fab片段的流出物;然后将流出物在20mM Tris、25mM NaCl中透析后,在HiTrap Q FF柱上通过阴离子交换色谱进一步纯化,用20mM Tris、1000mM NaCl梯度洗脱,通过在PBS中的Superdex 200柱上的尺寸排阻色谱法进一步纯化Fab片段抗体。

6. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤3)中,Fab片段抗体硫醇化的方法具体如下:按体积比1:8-12将10μM HS-(CH₂)₁₀-N-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯的四氢呋喃溶液与抗体 Fab片段溶液混合,在室温下搅拌40-50min。

7. 如权利要求1所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤4)中,钙醇溶液中各物质摩尔比为CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1:7.5-8.5:1.5-2.5。

8. 如权利要求1或7所述的基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,其特征在于,步骤4)中,丝织品残片与钙醇溶液的浴比为1:90-110。

一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及文物检测技术领域,尤其涉及一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法。

[0002]

背景技术

[0003] 作为中华文明的重要象征和载体,丝绸承载着丰富的文化、技术和社会内涵,带领古老的中国文明从丝绸之路走向世界,对促进世界人类文明的发展做出了不可磨灭的贡献。

[0004] 1958年,浙江钱山漾良渚文化遗址出土了一批丝线、丝带和没有炭化的绢片;20世纪80年代,在河南荥阳青台村新石器时代遗址发现丝麻织物残片。国内外很多学者对考古挖掘出土的丝绸残留物进行分析,以期发现更早的丝绸。在古代丝绸的发掘中,由于气候环境、时间、土壤和微生物等因素的影响,丝绸会呈现出不同的遗存形式:丝织品实物、灰化丝织品、矿化丝织品和泥化丝织品。对于保存形式比较完好的丝绸,通过傅里叶红外光谱(FTIR)、拉曼光谱、X-射线衍射(XRD)和氨基酸分析(AAA)等传统的方法即可鉴别。但随着保存或者埋葬时间的延长,丝绸逐渐老化降解,为短链纤维或者肽段,甚至降解为氨基酸等小分子,它们的微痕迹遗存于土壤中。

[0005] 古代丝织品残片的织物含量相应减少,样品杂质增多,干扰增大,若继续沿用传统的方法将很难对其做出准确的判断,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。

[0006]

发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法。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。

[0008] 本发明的具体技术方案为:一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法,包括以下步骤:

1)蚕丝特异性抗体的制备:称取桑蚕丝和柞蚕丝,经脱胶、溶解、透析、纯化和冷冻干燥后,分别得到桑蚕丝丝素蛋白粉末和柞蚕丝丝素蛋白粉末;将两种丝素蛋白粉末分别溶解在PBS中注射进SPF级Balb/C纯种雌性小鼠体内,经多次脾脏免疫后,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,经克隆、筛选、培养和纯化后,分别得到桑蚕丝丝素蛋白单克隆抗体和柞蚕丝丝素蛋白单克隆抗体。

2)Fab片段抗体的制备:先在分离柱中对固定化木瓜蛋白酶进行活化,同时将步骤1)中所得两种抗体分别在buffer交换柱中进行前处理,得到两种抗体溶液;将两种抗体溶液分别加入到活化的固定化木瓜蛋白酶中,拧紧柱子盖子,置于35-39℃恒温震荡孵化箱中酶解反应,采用亲和层析法纯化和凝胶过滤层析柱对酶解产物进行分离纯化后,得到桑蚕丝丝

素蛋白Fab片段抗体和柞蚕丝丝素蛋白Fab片段抗体。

[0009] 在步骤2)中,本发明选用固定化木瓜蛋白酶制备Fab片段抗体。木瓜蛋白酶在催化过程中首先与底物快速结合,接着酶活性中心的巯基被底物的羧基酰化,形成酰化酶,最后是酰化酶的分解,生成产物,酶恢复到初始状态。与游离酶切相比,固定化木瓜蛋白酶可更好地控制消化过程,酶解程度可通过控制时间来调节,可快速有效地将酶解产物和酶分开,无酶-抗体结合物的产生。同时,固定化的木瓜蛋白酶可以避免其在酸碱和有机介质中失活,热稳定性提高,实现酶的反复利用,达到节约生产成本的目的。通过活化,可以提高酶活性,增加酶解速率。

[0010] 3) Fab-Au NP复合物的制备:将步骤2)所得两种Fab片段抗体进行硫醇化处理后,分别取50-80 μ L加入到Au NP溶液中,于35-39℃恒温震荡孵育箱中反应40-50min,11000-14000rpm 离心10-20min后,重新分散在PBST中,得到Fab-BM-Au NP复合物和Fab-AP-Au NP复合物。

[0011] 在步骤3)中,本发明对Fab片段抗体与金纳米粒子进行连接,制备Fab-Au NP复合物,可以放大检出信号,可以提高检测的灵敏性。

[0012] 4) 包被抗原的制备:按固液比0.8-1.2g/100mL将丝织品残片溶于钙醇溶液中,在96-100℃下加热1.5-2 h,得到蚕丝蛋白溶液;取部分蚕丝蛋白溶液,加入Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液,并于6000-10000rpm离心5-15min,取上清液作为抗原包被液,抗原包被液浓度为1mg/mL。

[0013] 步骤4)中加入Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液除去Ca²⁺,省去透析、过滤、纯化和浓缩等步骤,缩短了样品处理时间,同时减少了丝素蛋白的流失与破坏,提高检测结果的可靠性。

[0014] 5) 抗原包被和封闭:将抗原包被液加入96孔板中,每组5个孔,每孔100 μ L,加入两组形成实验组1、2,实验组1后续加入Fab-BM-Au NP 复合物,实验组2后续加入Fab-AP-Au NP复合物,并设立只加入Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液的阴性对照组、用BSA代替Fab-Au NP复合物的空白对照组和含有丝素蛋白溶液的阳性对照组,于1-5℃过夜包被,弃去包被液,洗涤;加入0.8-1.2wt% BSA,于35-39 ℃ 孵育1-3 h,封闭掉多余的结合位点后,弃去封闭液,洗涤。

[0015] 6) 免疫结合:将步骤3)中所得Fab-BM-Au NP复合物和Fab-AP-Au NP复合物稀释为Fab-BM-Au NP复合物溶液和Fab-AP-Au NP复合物溶液,实验组1每孔加入100 μ L Fab-BM-Au NP复合物溶液,实验组2每孔加入100 μ L Fab-AP-Au NP复合物溶液,空白对照组加入等量PBST,于35-39℃孵育0.5-1.5 h,弃去后洗涤;每孔加入100 μ L过氧化辣根酶标记的二抗,于35-39℃孵育0.5-1.5 h,弃去后洗涤。

[0016] 在步骤6)中选择PBST作为洗涤液和抗体稀释液,在PBS缓冲液(磷酸盐缓冲液)中加入吐温 20可有效降低免疫结合过程中的非特异性反应,提高检测结果的准确性和可靠性。

[0017] 7) TMB显色:向孔板中分别加入50 μ L A液和B液(市购),置于黑暗环境下反应8-12 min,每孔加入100 μ L 2mol/L H₂SO₄终止反应。

[0018] 8) 吸光度测量:将孔板置于酶标仪中,读取450 nm处的吸光度数值,将孔板的阴性对照组OD均值加上 3×标准偏差作为该次实验的cut-off值:

若实验组1的OD均值>阴性对照组的cut-off值,则丝织品残片为桑蚕丝;若实验组2的OD均值>阴性对照组的cut-off值,则丝织品残片为柞蚕丝。

[0019] 作为优选,步骤2)中,固定化木瓜蛋白酶活化的方法具体为:将0.2-0.3mL木瓜蛋白酶溶液加入0.7-0.9 mL分离柱中,将分离柱放入离心管内,8000-12000 rpm离心0.5-1.5 min,弃去离心出来的蛋白储存液,加入0.4-0.6 mL 18-22mM半胱氨酸消化液,重复离心,弃去离心出来的液体,用橡胶管密封分离柱底部,待用。

[0020] 作为优选,步骤2)中,两种抗体的前处理的方法具体如下:将Buffer交换柱放入离心管内,2000-4000rpm 离心1-3 min,弃去离心出来的存储液,加入 0.8-1.2mL 18-22 mM 半胱氨酸消化液,2000-4000rpm离心1-3min,弃去离心出来的液体,重复离心2-4次;吸取 0.4-0.6m L抗体加入到柱子中,并将柱子放入新的离心管中,2000-4000rpm离心1-3min,收集离心出来含半胱氨酸的抗体溶液,待用。

[0021] 本发明先对用半胱氨酸溶液对抗体进行前处理。IgG和Fab片段由二硫键维持其结构稳定和保持活性,其二硫键分为链内二硫键和链间二硫键。链内二硫键在免疫球蛋白折叠内是高度保守的,对于维持抗体及片段的结构稳定和保持活性具有十分重要的作用,半胱氨酸溶液可以将其破坏,部分还原,有利于酶解进行。

[0022] 作为优选,步骤2)中,酶解制备Fab片段抗体的具体条件如下:酶和抗体的质量比为 0.0080-0.0090 mg酶/mg IgG,采用20 mM Cys浓度的消化液,酶解时间7.5-8.5h;孵育完成后,将分离柱放入离心管中,8000-12000 rpm 离心1-3 min,收集离心出来的酶解液,再加入0.25 mL PBS 到柱子中,放入离心管中,8000-12000rpm离心1-3min,重复清洗两次,将离心出来的液体计入到酶解液中,共得到1 mL的酶解液。

[0023] 木瓜蛋白酶因不是特异性酶,其酶切位点不止一个,因此酶解时可能也会对抗体暴露出来的具有延伸性的部位(如重链和轻链的 N 端)进行酶切,从而得到更小的片段,因此需要控制好酶解反应时间、酶和抗体的质量比、酶解环境的pH。

[0024] 作为优选,步骤2)中,Fab片段抗体的分离纯化方法具体如下:用Protein A Plus 柱除去抗体Fc片段,收集含有Fab片段的流出物;然后将流出物在20mM Tris、25mM NaCl中透析后,在HiTrap Q FF柱上通过阴离子交换色谱进一步纯化,用20mM Tris、1000mM NaCl 梯度洗脱,通过在PBS中的Superdex 200柱上的尺寸排阻色谱法进一步纯化Fab片段抗体。

[0025] 作为优选,步骤3)中,Fab片段抗体硫醇化的方法具体如下:按体积比1:8-12将10μ M HS- (CH₂)₁₀-N-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯的四氢呋喃溶液与抗体 Fab片段溶液混合,在室温下搅拌40-50min。

[0026] 步骤3)中使用HS- (CH₂)₁₀-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯对Fab片段抗体进行硫醇化处理。HS- (CH₂)₁₀-NHS是一种用于官能化硫醇配体化合物,可用于基片类材料、各种生物化学以及材料表面改性,本发明将其与抗体结合,可以与金纳米粒子形成Au-S键,保证Fab-Au NP复合物的形成和稳定。

[0027] 作为优选,步骤4)中,钙醇溶液中各物质摩尔比为CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1:7.5-8.5:1.5-2.5。

[0028] 作为优选,步骤4)中,丝织品残片与钙醇溶液的浴比为1:90-110。

[0029] 步骤4)中选择钙醇溶液(CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1: 8: 2)对丝织品残片进行溶解,可减少对丝素蛋白分子结构的破坏,最大程度保证其二级结构的稳定性。

[0030] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

(1)本发明选择Fab片段抗体作为免疫结合的复合物的核心部分。Fab片段抗体是第三

代基因工程抗体,较好地保持了天然抗体分子的抗原结合部位结构;同时,其分子量只有完整抗体的 1/6-1/2 大小,具有分子量小、免疫原性低、穿透性强、不与Fc 受体结合等特点,在食品安全检测、结构生物学研究等方面显示出前两代抗体无法比拟的优点。

[0031] (2) 本发明选择酶解法制备Fab片段抗体。酶解制备法生产成本低、转化率高、工艺简便,只需简便的纯化操作便可得到高纯度 Fab片段抗体,尤其适合非重组Fab 抗体片段的制备,是制备 Fab片段抗体的一种便捷且经济的途径。

[0032] (3) 本发明制备Fab-Au NP复合物进行丝织品残片的免疫检测,该复合物因连接有大量Fab片段,因此具有放大检测信号的作用,大大提高了检测灵敏度。

[0033] (4) 本发明在丝织品残片溶解后,加入缓冲液除去Ca²⁺对免疫检测过程的影响,有效节省了纯化浓缩的时间,兼顾了效率和准确性。

[0034] (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。

[0035]

附图说明

[0036] 图1为本发明实施例1的检测结果图。

[0037]

具体实施方式

[0038] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0039] 实施例1

1) 蚕丝特异性抗体的制备:称取桑蚕丝和柞蚕丝,经脱胶、溶解、透析、纯化和冷冻干燥后,得到丝素蛋白粉末。将丝素蛋白粉末溶解在PBS中注射进SPF级Balb/C 纯种雌性小鼠体内,经多次脾脏免疫后,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,经克隆、筛选、培养和纯化后,分别得到桑蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-BM) 和柞蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-AP)。

[0040] 2) 抗体Fab片段的制备:选取固定化木瓜蛋白酶酶解制备Fab片段。在分离柱中对固定化木瓜蛋白酶进行活化,将0.25 mL木瓜蛋白酶溶液加入0.8 mL分离柱中,将分离柱放入2 mL的离心管内,10000 rpm 离心1 min,弃去离心出来的蛋白储存液,加入0.5 mL 20 mM 半胱氨酸消化液,重复离心,弃去离心出来的液体,用橡胶管密封分离柱底部,待用。同时,将1)中制备的抗体在Buffer交换柱中进行前处理,将 Buffer 交换柱放入离心管内,3000 rpm 离心2 min,弃去离心出来的存储液。加入 1mL 20 mM 半胱氨酸消化液到柱子中,3000 rpm离心2 min,弃去离心出来的液体,重复离心3次。吸取 0.5 mL 抗体加入到柱子中,并将柱子放入新的离心管中,3000 rpm离心2 min,收集离心出来含半胱氨酸的抗体溶液,将抗体溶液加入到活化好的固定化木瓜蛋白酶中,拧紧柱子的盖子,保证酶和抗体的质量比为 0.0080 mg 酶/mg IgG,20 mM Cys 浓度的消化液(pH 为 7)、酶解时间控制在 7.5 小时,放入37 °C恒温震荡孵化箱中反应。孵育完成后,将分离柱放入2mL离心管中,10000 rpm 离心 1 min,收集离心出来的酶解液。再加入0.25 mL PBS 到柱子中,放入2mL 离心管中,10000 rpm 离心 1 min,重复清洗两次,将离心出来的液体计入到酶解液中,共得到1 mL的酶解液。采用亲和层析法纯化和凝胶过滤层析柱对酶解产物进行分离纯化后,

用Protein A Plus柱除去抗体Fc片段,收集含有Fab片段的流出物;然后将流出物在20mM Tris (pH 8.5)、25mM NaCl中透析后,在HiTrap Q FF柱(GE Healthcare)上通过阴离子交换色谱进一步纯化,用20mM Tris、1000mM NaCl梯度洗脱。通过在PBS中的Superdex 200柱上的尺寸排阻色谱法进一步纯化Fab片段。最终得到桑蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-BM)和柞蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-AP)。

[0041] 3) Fab-Au NP复合物的制备:将2)中得到的Fab片段抗体进行硫醇化,即将10 μ L 10 μ M HS-(CH₂)₁₀-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯)溶液(溶于四氢呋喃)与100 μ L Fab片段溶液混合,在室温下搅拌45min后,取80 μ L加入到Au NP 溶液中,于37℃恒温震荡孵化箱中反应45 min。13000 rpm 离心15 min后,重新分散在PBST中,得到Fab-BM-Au NP 复合物和Fab-AP-Au NP复合物。

[0042] 4) 包被抗原的制备:将0.1g的丝织品残片溶于10 mL 钙醇溶液(CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1: 8: 2(摩尔比),)中,浴比是1:100。在96℃下加热2 h,得到蚕丝蛋白溶液;取50 μ L蛋白溶液,加入1 mL Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(CB 9.6),并于8000 rpm离心10 min,取上清液作为抗原包被液(1mg/mL)。

[0043] 5) 抗原包被和封闭:将4)中的抗原包被液加入96孔板中,每组5个孔,每孔100 μ L,加入两组形成实验组1、2,实验组1后续加入Fab-BM-Au NP 复合物,实验组2后续加入Fab-AP-Au NP复合物,并设立阴性对照(只加入CB 9.6)、空白对照(用BSA代替Fab/Au NP复合物)和阳性对照(丝素蛋白溶液)。于4 ℃ 过夜包被。之后弃去包被液,洗涤3次;加入1 wt% BSA,于37 ℃ 孵育2 h,封闭掉多余的结合位点后,弃去封闭液,洗涤3次。

[0044] 6) 免疫结合:将3)中制备的复合物稀释,实验组1每孔加入100 μ L Fab-BM-Au NP 复合物溶液,实验组2每孔加入100 μ L Fab-AP-Au NP复合物溶液,空白对照加入等量PBST,于37℃孵育1 h;弃去后洗涤3次;每孔加入100 μ L 过氧化辣根酶标记的二抗,于37℃孵育1 h,弃去后洗涤5次。

[0045] 7) TMB显色:向孔板中分别加入50 μ L A液和B液,置于黑暗环境下反应10 min,每孔加入100 μ L 2mol/L H₂SO₄终止反应。

[0046] 8) 吸光度(OD)测量;将孔板置于酶标仪中,读取450 nm处的吸光度数值。将孔板的阴性对照OD值平均值加上 3 \times 标准偏差(SD)作为该次实验的cut-off值:

若实验组1的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为桑蚕丝;若实验组2的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为柞蚕丝。

[0047] 按照实施例1的方法进行实际检测后,检测结果如图1所示,实验检测证明,该Fab-Au NP复合物具有特异性和高灵敏度,并且证明该丝织品残片为桑蚕丝。

[0048] 实施例2

1) 蚕丝特异性抗体的制备:称取桑蚕丝和柞蚕丝,经脱胶、溶解、透析、纯化和冷冻干燥后,得到丝素蛋白粉末。将丝素蛋白粉末溶解在PBS中注射进SPF 级 Balb/C 纯种雌性小鼠体内,经多次脾脏免疫后,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,经克隆、筛选、培养和纯化后,得到桑蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-BM)和柞蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-AP)。

[0049] 2) 抗体Fab片段的制备:选取固定化木瓜蛋白酶酶解制备Fab片段。在分离柱中对固定化木瓜蛋白酶进行活化,将0.25 mL木瓜蛋白酶溶液加入0.8 mL分离柱中,将分离柱放入2 mL的离心管内,10000 rpm 离心1 min,弃去离心出来的蛋白储存液,加入0.5 mL 20

mM 半胱氨酸消化液,重复离心,弃去离心出来的液体,用橡胶管密封分离柱底部,待用。同时,将1)中制备的抗体在Buffer交换柱中进行前处理,将 Buffer 交换柱放入离心管内,3000 rpm 离心2 min,弃去离心出来的存储液。加入 1mL 20 mM 半胱氨酸消化液到柱子中,3000 rpm离心2 min,弃去离心出来的液体,重复离心 3 次。吸取 0.5 mL 抗体加入到柱子中,并将柱子放入新的离心管中,3000 rpm离心 2 min,收集离心出来含半胱氨酸的抗体溶液,将抗体溶液加入到活化好的固定化木瓜蛋白酶中,拧紧柱子的盖子,保证酶和抗体的质量比为 0.0085 mg 酶/mg IgG,20 mM Cys 浓度的消化液(pH 为 7)、酶解时间控制在 8 小时,放入37 °C恒温震荡孵化箱中反应。孵育完成后,将分离柱放入2mL离心管中,10000 rpm 离心 1 min,收集离心出来的酶解液。再加入0.25 mL PBS 到柱子中,放入2mL离心管中,10000 rpm 离心 1 min,重复清洗两次,将离心出来的液体计入到酶解液中,共得到1 mL的酶解液。采用亲和层析法纯化和凝胶过滤层析柱对酶解产物进行分离纯化后,用 Protein A Plus 柱除去抗体Fc片段,收集含有Fab片段的流出物;然后将流出物在20mM Tris (pH 8.5)、25mM NaCl中透析后,在HiTrap Q FF柱(GE Healthcare)上通过阴离子交换色谱进一步纯化,用20mM Tris、1000mM NaCl梯度洗脱。通过在PBS中的Superdex 200柱上的尺寸排阻色谱法进一步纯化Fab片段。最终得到桑蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-BM)和柞蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-AP)。

[0050] 3)Fab-Au NP复合物的制备:将2)中得到的Fab片段抗体进行硫醇化,即将10μL 10 μM HS-(CH₂)₁₀-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯)溶液(溶于四氢呋喃)与100 μL Fab片段溶液混合,在室温下搅拌45min后,取65 μL加入到Au NP 溶液中,于37°C恒温震荡孵化箱中反应45 min。13000 rpm 离心15 min后,重新分散在PBST中,得到Fab-BM-Au NP 复合物和Fab-AP-Au NP复合物。

[0051] 4)包被抗原的制备:将0.05g的丝织品残片溶于50 mL 钙醇溶液(CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1: 8: 2(摩尔比),)中,溶比是1:100。在98°C下加热2 h,得到蚕丝蛋白溶液;取50 μL蛋白溶液,加入1 mL Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(CB 9.6),并于8000 rpm离心10 min,取上清液作为抗原包被液(1mg/mL)。

[0052] 5)抗原包被和封闭:将4)中的抗原包被液加入96孔板中,每组5个孔,每孔100 μL,加入两组形成实验组1、2,实验组1后续加入Fab-BM-Au NP 复合物,实验组2后续加入Fab-AP-Au NP复合物,并设立阴性对照(只加入CB 9.6)、空白对照(用BSA代替Fab/Au NP复合物)和阳性对照(丝素蛋白溶液)。于4 °C 过夜包被。之后弃去包被液,洗涤3次;加入1 wt% BSA,于37 °C 孵育2 h,封闭掉多余的结合位点后,弃去封闭液,洗涤3次。

[0053] 6)免疫结合:将3)中制备的复合物稀释,实验组1每孔加入100 μL Fab-BM-Au NP 复合物溶液,实验组2每孔加入100 μL Fab-AP-Au NP复合物溶液,空白对照加入等量PBST,于37°C孵育1 h;弃去后洗涤3次;每孔加入100 μL过氧化辣根酶标记的二抗,于37°C孵育1 h,弃去后洗涤5次。

[0054] 7)TMB显色:向孔板中分别加入50 μL A液和B液,置于黑暗环境下反应10 min,每孔加入100 μL 2mol/L H₂SO₄终止反应。

[0055] 8)吸光度(OD)测量;将孔板置于酶标仪中,读取450 nm处的吸光度数值。将孔板的阴性对照OD值平均值加上 3×标准偏差(SD)作为该次实验的cut-off值:

若实验组1的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为桑蚕丝;若实验组

2的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为柞蚕丝。

[0056] 实施例3

1) 蚕丝特异性抗体的制备:称取桑蚕丝和柞蚕丝,经脱胶、溶解、透析、纯化和冷冻干燥后,得到丝素蛋白粉末。将丝素蛋白粉末溶解在PBS中注射进SPF 级 Balb/C 纯种雌性小鼠体内,经多次脾脏免疫后,将脾细胞与骨髓瘤细胞融合,经克隆、筛选、培养和纯化后,得到桑蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-BM) 和柞蚕丝素蛋白单克隆抗体(McAb-AP)。

[0057] 2) 抗体Fab片段的制备:选取固定化木瓜蛋白酶酶解制备Fab片段。在分离柱中对固定化木瓜蛋白酶进行活化,将0.25 mL木瓜蛋白酶溶液加入0.8 mL分离柱中,将分离柱放入2 mL的离心管内,10000 rpm 离心1 min,弃去离心出来的蛋白储存液,加入0.5 mL 20 mM 半胱氨酸消化液,重复离心,弃去离心出来的液体,用橡胶管密封分离柱底部,待用。同时,将1)中制备的抗体在Buffer交换柱中进行前处理,将 Buffer 交换柱放入离心管内,3000 rpm 离心2 min,弃去离心出来的存储液。加入 1mL 20 mM 半胱氨酸消化液到柱子中,3000 rpm离心2 min,弃去离心出来的液体,重复离心 3 次。吸取 0.5 mL 抗体加入到柱子中,并将柱子放入新的离心管中,3000 rpm离心 2 min,收集离心出来含半胱氨酸的抗体溶液,将抗体溶液加入到活化好的固定化木瓜蛋白酶中,拧紧柱子的盖子,保证酶和抗体的质量比为 0.0090 mg 酶/mg IgG,20 mM Cys 浓度的消化液(pH 为 7)、酶解时间控制在 8.5 小时,放入37 °C恒温震荡孵化箱中反应。孵育完成后,将分离柱放入2mL离心管中,10000 rpm 离心 1 min,收集离心出来的酶解液。再加入0.25 mL PBS 到柱子中,放入2mL 离心管中,10000 rpm 离心 1 min,重复清洗两次,将离心出来的液体计入到酶解液中,共得到1 mL的酶解液。采用亲和层析法纯化和凝胶过滤层析柱对酶解产物进行分离纯化后,用Protein A Plus柱除去抗体Fc片段,收集含有Fab片段的流出物;然后将流出物在20mM Tris (pH 8.5)、25mM NaCl中透析后,在HiTrap Q FF柱(GE Healthcare)上通过阴离子交换色谱进一步纯化,用20mM Tris、1000mM NaCl梯度洗脱。通过在PBS中的Superdex 200柱上的尺寸排阻色谱法进一步纯化Fab片段。最终得到桑蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-BM) 和柞蚕丝丝素蛋白抗体Fab片段(Fab-AP)。

[0058] 3) Fab-Au NP复合物的制备:将2)中得到的Fab片段抗体进行硫醇化,即将10μL 10 μM HS-(CH₂)₁₀-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺基-11-巯基十一酸酯) 溶液(溶于四氢呋喃)与100 μL Fab片段溶液混合,在室温下搅拌45min后,取80 μL加入到Au NP 溶液中,于37°C恒温震荡孵化箱中反应45 min。13000 rpm 离心15 min后,重新分散在PBST中,得到Fab-BM-Au NP 复合物和Fab-AP-Au NP复合物。

[0059] 4) 包被抗原的制备:将0.01g的丝织品残片溶于1 mL 钙醇溶液(CaCl₂: H₂O: C₂H₅OH=1: 8: 2(摩尔比),)中,浴比是1:100。在100°C下加热1.5 h,得到蚕丝蛋白溶液;取50 μL蛋白溶液,加入1 mL Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(CB 9.6),并于8000 rpm离心10 min,取上清液作为抗原包被液(1mg/mL)。

[0060] 5) 抗原包被和封闭:将4)中的抗原包被液加入96孔板中,每组5个孔,每孔100 μL,加入两组形成实验组1、2,实验组1后续加入Fab-BM-Au NP 复合物,实验组2后续加入Fab-AP-Au NP复合物,并设立阴性对照(只加入CB 9.6)、空白对照(用BSA代替Fab-Au NP复合物)和阳性对照(丝素蛋白溶液)。于4 °C 过夜包被。之后弃去包被液,洗涤3次;加入1 wt% BSA,于37 °C孵育2 h,封闭掉多余的结合位点后,弃去封闭液,洗涤3次。

[0061] 6) 免疫结合:将3)中制备的复合物稀释,实验组1每孔加入100 μL Fab-BM-Au NP复合物溶液,实验组2每孔加入100 μL Fab-AP-Au NP复合物溶液,空白对照加入等量PBST,于37℃孵育1 h;弃去后洗涤3次;每孔加入100 μL 过氧化辣根酶标记的二抗,于37℃孵育1 h,弃去后洗涤5次。

[0062] 7) TMB显色:向孔板中分别加入50 μL A液和B液,置于黑暗环境下反应10 min,每孔加入100 μL 2mol/L H_2SO_4 终止反应。

[0063] 8) 吸光度(OD)测量;将孔板置于酶标仪中,读取450 nm处的吸光度数值。将孔板的阴性对照OD值平均值加上 $3 \times$ 标准偏差(SD)作为该次实验的cut-off值:

若实验组1的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为桑蚕丝;若实验组2的OD均值>该板阴性对照的cut-off值,则该丝织品残片为柞蚕丝。

[0064] 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。

[0065] 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。

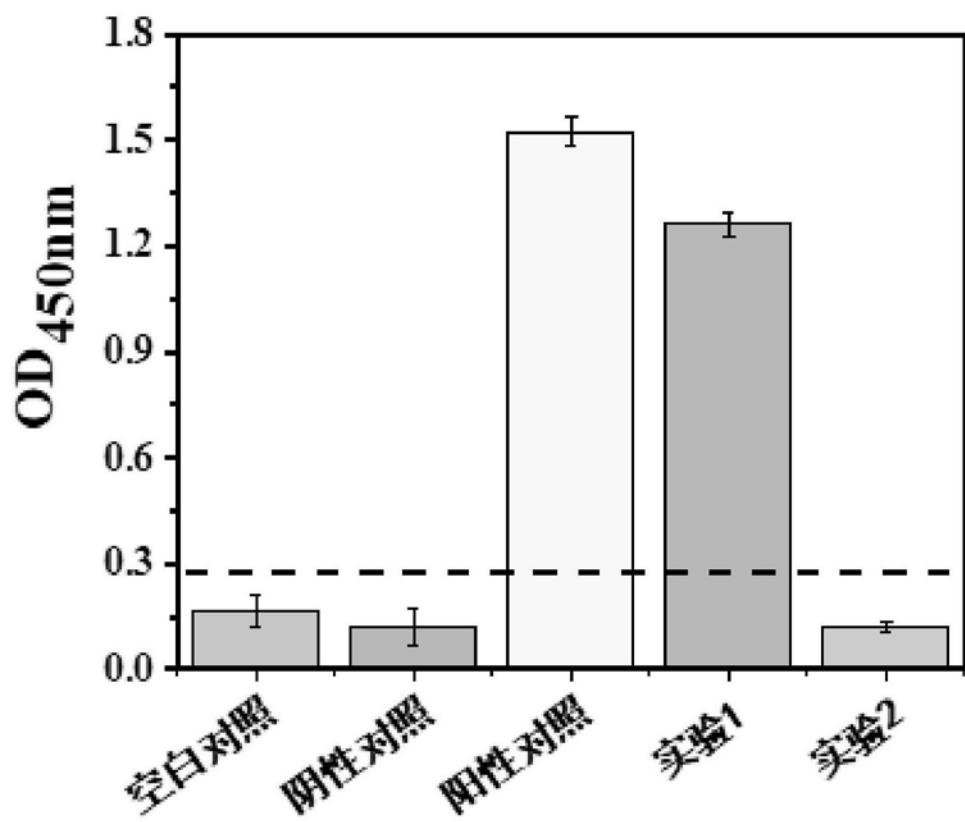


图1

专利名称(译)	一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法		
公开(公告)号	CN109541218A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811541884.6	申请日	2018-12-17
[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	陈茹茹 王秉 朱诚 胡智文		
发明人	陈茹茹 王秉 胡铭周 朱诚 胡智文		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及文物检测技术领域，公开了一种基于酶联免疫鉴别丝织品残片的方法，本发明先制备了桑蚕丝丝素蛋白和柞蚕丝丝素蛋白的单克隆抗体，然后利用固定化木瓜蛋白酶对抗体进行处理，得到具有较高活性的Fab片段抗体，并将该片段和金纳米粒子复合，得到具特异性的Fab-Au NP复合物。经酶联免疫实验表明，该复合物能高效地鉴别出古代丝织品残片的种类。本发明反应温和、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。

