



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110542756 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201910846627.1

(22)申请日 2019.09.08

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市钱塘新区下沙
高教西区2号大街928号浙江理工大学

(72)发明人 杨海亮 郑浩然 尚亚廷 翟雨洁
王秉 彭志勤

(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 33/561(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法

(57)摘要

本发明涉及皮革鉴定技术领域,公开了一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法,本发明采用碱法提取皮革中的蛋白,然后通过鹿蛋白标准序列筛选,得到了特征肽段,接着通过免疫反应得到了蛋白序列抗体,并采用western blot技术对其进行分析,探究其样品皮革是否为鹿皮。这种方法环保无污染。具有所需测样量较少,并且不受被测样表面损坏或降解等不利因素的影响、能准确高效的解决动物皮革中的仿冒问题等优点。

1. 一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 取待测皮革样品,研磨成粉,以1:50-70g/mL的浴比加入蒸馏水,浸泡20-30h;

2) 用碱土金属水解液调节pH值至碱性,并加热至沸腾,加热过程中不断慢速搅拌,在此状态下反应1~2h;

3) 趁热过滤,将滤液pH值调节至中性,过滤后,减压浓缩至粘稠状,烘干后粉碎,得到可溶性蛋白粉;

4) 用蒸馏水清洗制胶架,在55-65℃下干燥10-20min后取出,搭好制胶架后,检查是否漏水,如不漏水则进行后续制胶操作,制得中间包夹有若干泳道的两块玻璃板;

5) 将可溶性蛋白粉溶解于CB中制得浓度为8-12mg/mL的蛋白混合液,取2.5-3.5ul的还原型5XSDS上样缓冲液于试管中,然后加入蛋白混合液,在95-100℃水浴中加热8-12min,离心处理;

6) 取上清液进行电泳操作,在泳道内加入上清液进行电泳,电泳完成后将玻璃板之间的胶剥离并用蒸馏水清洗,清洗后通过化学发光成像仪观察电泳结果;

7) 观察后,裁剪一个PVDF膜,将其浸泡于甲醇中0.5-1.5min激发,然后将PVDF膜和海绵滤纸浸泡至转移缓冲液中,进行三明治结构的搭建,然后进行转印,转印过程中用冰袋包裹于反应装置四周,转印电流为190-210mA,转印过程持续20-40min;

8) 将18-22mL封闭液倒在PVDF膜上,摇床封闭0.5-1.5h后倒掉,加入8-12mL用TBST稀释好的一抗,一抗摇床孵育0.5-1.5h,然后用TBST清洗多次,每次用量18-22mL,摇床8-12min,清洗多次后,再加入8-12mL稀释后的二抗并孵育0.5-1.5h,孵育完成后用TBST清洗多次,最后将显色液均匀滴加在PVDF膜上,用锡箔纸包住避光3-7min,通过化学发光成像仪观察免疫结果,如果有阴影条带,则为真皮革,若无则为仿冒皮革。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)中,调节的pH值为7.1-7.3。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤4)中,制胶操作具体为:将分离胶用移液枪注射入两块玻璃板之间,然后取异丙醇注入至玻璃板间使其液面齐平;然后将玻璃板置于35-40℃下15-20min;待分离胶凝固后,将异丙醇倒掉,然后再加入浓缩胶并立即插上梳子,再次将装置将玻璃板置于35-40℃下10-20min,将制胶后的玻璃板放入电泳槽中进行检漏操作;放置时要短的玻璃板朝里,长的玻璃板朝外;然后拨去梳子形成泳道。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)中,电泳操作过程为:调节电压到75-85V,电泳8-12min后将电压升至110-130V,等待溴酚蓝到达底部附近时,停止电泳。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤8)中,一抗的抗原为鹿蛋白特征序列;将这种特征序列作为半抗原,和载体蛋白结合后进行动物免疫,得到蛋白序列抗体。

一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及皮革鉴定技术领域,尤其涉及一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法。

背景技术

[0002] 目前,革制品越来越受到了人们的欢迎,皮革及其制品的市场潜力是很大的,全球皮革总需求量约为1.0亿平方米,相当于3亿张牛皮(标准皮)的产量,中国皮革产量折合标准皮近7000万张,约占全球皮革产量的23.33%。市场上售卖的革制品主要分为动物皮革(真皮)和人工皮革(假皮),其中,动物皮革主要是牛、羊、猪、鹿或其他动物身上剥下的原皮。在区分人造皮革和动物皮革方面,因为人造皮革一般是塑料制品,人们一般可通过简单的鉴别方法来区分,但是,市场上有很多不良商贩用牛皮、羊皮来代替价值较高的鹿皮,这让消费者非常的难以分辨。根据12315网站上关于皮革产品的投诉中,很多是关于材质“以假乱真”。另外在鉴别人造皮革和动物皮革中所用到的红外光谱法,虽有无损样品、操作简单等优点,但却并不适用于动物皮革间的鉴别。

发明内容

[0003] 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别皮革的方法,发明采用碱法提取皮革中的蛋白,然后通过鹿蛋白标准序列筛选,得到了特征肽段,接着通过免疫反应得到了蛋白序列抗体,并采用western blot技术对其进行分析,探究其样品皮革是否为鹿皮。这种方法环保无污染。具有所需测样量较少,并且不受被测样表面损坏或降解等不利因素的影响、能准确高效的解决动物皮革中的仿冒问题等优点。

[0004] 本发明的具体技术方案为:一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法,包括如下步骤:

[0005] 1) 取待测皮革样品,研磨成粉,以1:50-70g/mL的浴比加入蒸馏水,浸泡20-30h;

[0006] 2) 用碱土金属水解液调节pH值至碱性,并加热至沸腾,加热过程中不断慢速搅拌,在此状态下反应1~2h;

[0007] 3) 趁热过滤,将滤液pH值调节至中性,过滤后,减压浓缩至粘稠状,烘干后粉碎,得到可溶性蛋白粉;

[0008] 4) 用蒸馏水清洗制胶架,在55-65℃下干燥10-20min后取出,搭好制胶架后,检查是否漏水,如不漏水则进行后续制胶操作,制得中间包夹有若干泳道的两块玻璃板;

[0009] 5) 将可溶性蛋白粉溶解于CB中制得浓度为8-12mg/mL的蛋白混合液,取2.5-3.5ul的还原型5XSDS上样缓冲液于试管中,然后加入蛋白混合液,在95-100℃水浴中加热8-12min,离心处理;

[0010] 6) 取上清液进行电泳操作,在泳道内加入上清液进行电泳,电泳完成后将玻璃板之间的胶剥离并用蒸馏水清洗,清洗后通过化学发光成像仪观察电泳结果;

[0011] 7) 观察后,裁剪一个PVDF膜,将其浸泡于甲醇中0.5-1.5min激发,然后将PVDF膜和海绵滤纸浸泡至转移缓冲液中,进行三明治结构的搭建,然后进行转印,转印过程中用冰袋包裹于反应装置四周,转印电流为190-210mA,转印过程持续20-40min;

[0012] 8) 将18-22mL封闭液倒在PVDF膜上,摇床封闭0.5-1.5h后倒掉,加入8-12mL用TBST稀释好的一抗,一抗摇床孵育0.5-1.5h,然后用TBST清洗多次,每次用量18-22mL,摇床8-12min,清洗多次后,再加入8-12mL稀释后的二抗并孵育0.5-1.5h,孵育完成后用TBST清洗多次,最后将显色液均匀滴加在PVDF膜上,用锡箔纸包住避光3-7min,通过化学发光成像仪观察免疫结果,如果有阴影条带,则为真皮革,若无则为仿冒皮革。

[0013] 作为优选,步骤3)中,调节的pH值为7.1-7.3。

[0014] 作为优选,步骤4)中,制胶操作具体为:将分离胶用移液枪注射入两块玻璃板之间,然后取异丙醇注入至玻璃板间使其液面齐平;然后将玻璃板置于35-40℃下15-20min;待分离胶凝固后,将异丙醇倒掉,然后再加入浓缩胶并立即插上梳子,再次将装置将玻璃板置于35-40℃下10-20min,将制胶后的玻璃板放入电泳槽中进行检漏操作;放置时要短的玻璃板朝里,长的玻璃板朝外;然后拨去梳子形成泳道。

[0015] 作为优选,步骤6)中,电泳操作过程为:调节电压到75-85V,电泳8-12min后将电压升至110-130V,等待溴酚蓝到达底部附近时,停止电泳。

[0016] 作为优选,步骤8)中,一抗的抗原为鹿蛋白特征序列;将这种特征序列作为半抗原,和载体蛋白结合后进行动物免疫,得到蛋白序列抗体。与现有技术对比,本发明的有益效果是:

[0017] (1) 本发明可以准确高效的解决动物皮革中的仿冒皮革(如鹿皮)问题。

[0018] (2) 本发明中采用的免疫印迹技术结果可行度高,并可以推广到鉴别出不同的动植物种类皮革,有望成为皮革鉴定的科学方法。

[0019] (3) 本发明所需测样量较少,并且不受被测样表面损坏或降解等不利因素的影响。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0021] 实施例1

[0022] 1) 称取5g的皮革样品,研磨成粉,并以1:60的浴比加入蒸馏水,浸泡24h;

[0023] 2) 用浓碱土金属水解液调节pH值至强碱性,并加热至沸腾,加热过程中不断慢速搅拌,在此状态下反应1h;

[0024] 3) 趁热过滤,然后将滤液pH值调节至中性,过滤后,减压浓缩至粘稠状,接着移至蒸发器烘干。烘干后在经粉碎操作即得到可溶性蛋白粉;

[0025] 4) 首先用蒸馏水清洗制胶架,在60度烘箱中干燥15min后取出,搭好制胶架后,检查是否漏水。如不漏水则进行后续制胶操作,具体的制胶操为将已配制好的分离胶用移液枪慢慢的注射入两块玻璃板之间,然后取一定量的异丙醇也注入到玻璃板间使其液面齐平。然后把装置放入37度烘箱中使分离胶凝固,放置时间为15min。待其凝固后,将上面的异丙醇倒掉,然后再加上浓缩胶并立即插上梳子。插入后便再次将装置放置于37度烘箱中15min,时间到后,将制好胶的玻璃板放入电泳槽中,这是再次进行检漏操作。注意放置时要短板朝里,长板朝外。然后就拨去梳子,这里要缓慢的平稳拔出以确保泳道成形标准;

[0026] 5) 将可溶性蛋白粉溶解于CB(pH=9.6)中,形成的溶液浓度为10mg/mL,然后各取3uL的还原型5XSDS上样缓冲液于1.5mL的小试管中,然后加入蛋白混合液,并在98度水浴锅中加热10min,然后在进行离心处理;

[0027] 6) 取上清液进行接下来的电泳操作,在泳道内加入上清液。然后电泳的操作过程为调节电压到80V,电泳10min后将电压升至120V,等待溴酚蓝到达底部附近时,便停止电泳,完成后将玻璃板取出放置于盛有蒸馏水的培养皿中,然后将胶从玻璃板间剥离出来并用蒸馏水清洗3次,清洗完全后便可以通过化学发光成像仪来观察电泳结果;

[0028] 7) 观察完后,先裁剪一个长5cm、宽5.5cm的PVDF膜,然后将其浸泡在甲醇中1min激发,随后和海绵及滤纸一起泡在转移缓冲液中,接下来进行三明治结构的搭建,然后便可以转印,因转印过程会放出热量,需用冰袋包裹在反应装置四周,转印电流为200mA,整个转印过程持续一个0.5h左右;

[0029] 8) 转印完成后,将PVDF膜置于化学发光成像仪中,检测转印结果是否良好。然后将配制好的20mL封闭液倒在膜上,摇床封闭1h后倒掉,接着把用TBST稀释好的一抗10mL加入,所用的一抗的抗原为鹿蛋白特征序列,一抗摇床孵育1h,然后用TBST清洗3次,每次用量20mL,摇床10min,清洗3次后,再加入稀释后的二抗10mL孵育1h,孵育完成后同样用TBST清洗3次,最后把配制好的显色液均匀滴加在膜上,用锡箔纸包住避光6min,然后便可以通过化学发光成像仪观察免疫结果。如果有阴影条带,则为鹿皮,若无则为仿冒皮革。

[0030] 实施例2

[0031] 1) 称取5g的皮革样品,研磨成粉,并以1:60的浴比加入蒸馏水,浸泡30h;

[0032] 2) 用浓碱土金属水解液调节pH值至强碱性,并加热至沸腾,加热过程中不断慢慢搅拌,在此状态下反应1.5h;

[0033] 3) 趁热过滤,然后将滤液pH值调节至中性,过滤后,减压浓缩至粘稠状,接着移至蒸发器烘干。烘干后在经粉碎操作即得到可溶性蛋白粉;

[0034] 4) 首先用蒸馏水清洗制胶架,在60度烘箱中干燥15min后取出,搭好制胶架后,检查是否漏水。如不漏水则进行后续制胶操作,具体的制胶操作为将已配制好的分离胶用移液枪慢慢的注射入两块玻璃板之间,然后取一定量的异丙醇也注入到玻璃板间使其液面齐平。然后把装置放入37度烘箱中使分离胶凝固,放置时间为20min。待其凝固后,将上面的异丙醇倒掉,然后再加上浓缩胶并立即插上梳子。插入后便再次将装置放置于37度烘箱中15min,时间到后,将制好胶的玻璃板放入电泳槽中,这是再次进行检漏操作。注意放置时要短板朝里,长板朝外。然后就拨去梳子,这里要缓慢的平稳拔出以确保泳道成形标准;

[0035] 5) 将可溶性蛋白粉溶解于CB (pH=9.6) 中,形成的溶液浓度为10mg/mL,然后各取3ul的还原型5XSDS上样缓冲液于1.5mL的小试管中,然后加入蛋白混合液,并在98度水浴锅中加热12min,然后在进行离心处理;

[0036] 6) 取上清液进行接下来的电泳操作,在泳道内加入上清液。然后电泳的操作过程为调节电压到80V,电泳12min后将电压升至120V,等待溴酚蓝到达底部附近时,便停止电泳,完成后将玻璃板取出放置于盛有蒸馏水的培养皿中,然后将胶从玻璃板间剥离出来并用蒸馏水清洗4次,清洗完全后便可以通过化学发光成像仪来观察电泳结果;

[0037] 7) 观察完后,先裁剪一个长6cm、宽5.5cm的PVDF膜,然后将其浸泡在甲醇中1min激发,随后和海绵及滤纸一起泡在转移缓冲液中,接下来进行三明治结构的搭建,然后便可以转印,因转印过程会放出热量,需用冰袋包裹在反应装置四周,转印电流为200mA,整个转印过程持续一个0.5h左右;

[0038] 8) 转印完成后,将PVDF膜置于化学发光成像仪中,检测转印结果是否良好。然后将

配制好的20mL封闭液倒在膜上,摇床封闭1h后倒掉,接着把用TBST稀释好的一抗10mL加入,所用的一抗的抗原为鹿蛋白特征序列,一抗摇床孵育1h,然后用TBST清洗3次,每次用量20mL,摇床10min,清洗3次后,再加入稀释后的二抗10mL孵育1h,孵育完成后同样用TBST清洗3次,最后把配制好的显色液均匀滴加在膜上,用锡箔纸包住避光7min,然后便可以通过化学发光成像仪观察免疫结果。如果有阴影条带,则为鹿皮,若无则为仿冒皮革。

[0039] 实施例3

[0040] 1) 称取5g的皮革样品,研磨成粉,并以1:60的浴比加入蒸馏水,浸泡28h;

[0041] 2) 用浓碱土金属水解液调节pH值至强碱性,并加热至沸腾,加热过程中不断慢速搅拌,在此状态下反应2h;

[0042] 3) 趁热过滤,然后将滤液pH值调节至中性,过滤后,减压浓缩至粘稠状,接着移至蒸发器烘干。烘干后在经粉碎操作即得到可溶性蛋白粉;

[0043] 4) 首先用蒸馏水清洗制胶架,在60度烘箱中干燥15min后取出,搭好制胶架后,检查是否漏水。如不漏水则进行后续制胶操作,具体的制胶操作为将已配制好的分离胶用移液枪慢慢的注射入两块玻璃板之间,然后取一定量的异丙醇也注入到玻璃板间使其液面齐平。然后把装置放入37度烘箱中使分离胶凝固,放置时间为25min。待其凝固后,将上面的异丙醇倒掉,然后再加上浓缩胶并立即插上梳子。插入后便再次将装置放置于37度烘箱中15min,时间到后,将制好胶的玻璃板放入电泳槽中,这是再次进行检漏操作。注意放置时要短板朝里,长板朝外。然后就拨去梳子,这里要缓慢的平稳拔出以确保泳道成形标准;

[0044] 5) 将可溶性蛋白粉溶解于CB (pH=9.6) 中,形成的溶液浓度为10mg/mL,然后各取3ul的还原型5XSDS上样缓冲液于1.5mL的小试管中,然后加入蛋白混合液,并在98度水浴锅中加热16min,然后在离心处理;

[0045] 6) 取上清液进行接下来的电泳操作,在泳道内加入上清液。然后电泳的操作过程为调节电压到80V,电泳11min后将电压升至120V,等待溴酚蓝到达底部附近时,便停止电泳,完成后将玻璃板取出放置于盛有蒸馏水的培养皿中,然后将胶从玻璃板间剥离出来并用蒸馏水清洗4次,清洗完全后便可以通过化学发光成像仪来观察电泳结果;

[0046] 7) 观察完后,先裁剪一个长3cm、宽5.5cm的PVDF膜,然后将其浸泡在甲醇中1min激发,随后和海绵及滤纸一起泡在转移缓冲液中,接下来进行三明治结构的搭建,然后便可以转印,因转印过程会放出热量,需用冰袋包裹在反应装置四周,转印电流为200mA,整个转印过程持续一个0.5h左右;

[0047] 9) 转印完成后,将PVDF膜置于化学发光成像仪中,检测转印结果是否良好。然后将配制好的20mL封闭液倒在膜上,摇床封闭1h后倒掉,接着把用TBST稀释好的一抗10mL加入,所用的一抗的抗原为鹿蛋白特征序列,一抗摇床孵育1h,然后用TBST清洗3次,每次用量20mL,摇床10min,清洗4次后,再加入稀释后的二抗10mL孵育1h,孵育完成后同样用TBST清洗4次,最后把配制好的显色液均匀滴加在膜上,用锡箔纸包住避光5min,然后便可以通过化学发光成像仪观察免疫结果。如果有阴影条带,则为鹿皮,若无则为仿冒皮革。

[0048] 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。

[0049] 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别皮革的方法		
公开(公告)号	CN110542756A	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201910846627.1	申请日	2019-09-08
[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	杨海亮 郑浩然 尚亚廷 王秉 彭志勤		
发明人	杨海亮 郑浩然 尚亚廷 翟雨洁 王秉 彭志勤		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/561 G01N2550/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及皮革鉴定技术领域，公开了一种基于免疫印迹法鉴别皮革的方法，本发明采用碱法提取皮革中的蛋白，然后通过鹿蛋白标准序列筛选，得到了特征肽段，接着通过免疫反应得到了蛋白序列抗体，并采用western blot技术对其进行分析，探究其样品皮革是否为鹿皮。这种方法环保无污染。具有所需测量量较少，并且不受被测样表面损坏或降解等不利因素的影响、能准确高效的解决动物皮革中的仿冒问题等优点。