

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699642 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

---

(21) 申请号 201610092565. 6

(22) 申请日 2016. 02. 19

(71) 申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙经济开发区  
2号大街 928 号浙江理工大学

(72) 发明人 游秋实 王秉 刘杨 刘意

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公  
司 33109

代理人 尉伟敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

---

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测  
方法

(57) 摘要

本发明涉及文物检测技术领域，公开了一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法，包括：A)将三块文物样放于A、B、C三个打孔皿中；用PBS缓冲液对文物样进行洗涤；向A中加入兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液，C中加入PBS溶液；冷藏后向各打孔皿中加入PBS溶液，浸泡、洗涤；B)向A、B中加入绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体稀释液，C中加入PBS溶液；将A、B、C避光孵育；然后向各打孔皿中加入PBS溶液，浸泡，洗涤；C)向A、B、C中加入缓冲甘油进行封片；D)将A、B、C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察检测。本发明方法灵敏度高，操作简单，成本低，结果直观，易于分析。

1.一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于采用如下步骤:

A)取三块大小一致的文物样并分别放置于三个打孔皿中,并将打孔皿分别标记为A、B、C;用pH 7.4的PBS缓冲液对文物样进行洗涤直至文物样表面无附着物;接着向A中加入10-50体积份的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液,向C中加入10-50体积份的pH7.4的PBS溶液,B不作处理;分别将A、B、C冷藏10-14h;然后分别向各打孔皿中加入1500-2500体积份的pH7.4的PBS溶液,浸泡4-6min,洗涤三次,每次2-4min;

B)分别向A、B中加入10-50体积份的绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液,向C中加入10-50体积份的pH 7.4的PBS溶液;然后分别将A、B、C放置于底层铺有湿毛巾的盒子中,用锡箔纸将盒子密封,36-38℃避光孵育0.5-2h;然后分别向各打孔皿中加入1500-2500体积份的pH 7.4 的PBS溶液,浸泡4-6min,洗涤三次,每次2-4min;

C)分别向A,B,C中加入8-12体积份的缓冲甘油进行封片;

D)将A,B,C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察;若B,C未发出绿色的荧光,而A发出了绿色的荧光,说明文物样与兔抗羊毛角蛋白抗体发生了特异性结合,证明文物样为羊毛织品。

2.如权利要求1所述的一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于,所述pH7.4的PBS缓冲液配制方法如下:称取KCl 0.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27g,NaCl 8.0g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.42g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至7.4。

3.如权利要求1所述的一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于,步骤C)中所述缓冲甘油的配制方法如下:称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.15g,NaHCO<sub>3</sub> 0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至 1000mL,调节pH至9.6;将pH 9.6的PBS缓冲液和丙三醇按照体积比1:1混合。

4.如权利要求1所述的一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于,所述兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液的制备方法为:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将初始浓度为1mg/mL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释10-200倍。

5.如权利要求1所述的一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于,所述绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液的制备方法如下:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液稀释50-500倍。

6.如权利要求5所述的一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,其特征在于,绿色荧光素山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液的制备方法如下:向每2.5-3.5mL pH为5.5的PBS缓冲液中依次加入0.14-0.16mg的绿色荧光微球、2.6-2.8μL的现配的浓度为4-6mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和8-12μL的浓度为1mg/mL的山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液,得到混合液,将所述混合液在室温下搅拌1.5-2.5h,用1wt%的牛血清蛋白溶液封闭25-35min后在8000-10000 r/min、4℃条件下离心处理8-12min,移除上清液,将沉淀加入到体积为山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液1倍pH为5.5的PBS缓冲液中复溶、混匀,制得绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液。

## 一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及文物检测技术领域,尤其涉及一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法。

### 背景技术

[0002] 羊毛织品是古代北方地区主要的纺织原料,是中国的宝贵遗产。但由于北方地区的环境因素以及羊毛蛋白纤维的性质,腐朽文物大都化为痕迹,如何采用科学的手段鉴定羊毛成了燃眉之急。常用的检测方法受样品、杂质等影响较大,结果准确性不高,所以一种更加简便、直观的科学方法迫切需要。

[0003] 申请号为201010577180.1的中国专利公开了一种物理法细化羊毛纤维与羊绒、羊毛混纺纤维含量分析方法,是利用纤维照相技术把所有物理细化绵羊毛纤维工艺生产的拉伸绵羊毛进行分类拍照建成图谱库,把物理细化绵羊毛纤维工艺技术得到的拉伸羊毛纤维整纤维长度上的鳞片变化形态、特点分类说明。采取对比、分类比对综合观测分析方法定性,用投影显微镜根据国家方法标准GB/T16988-1997《特种动物纤维与绵羊毛混和物含量的测定》检测不同纤维混纺比例。该方法的实施,解决了物理细化绵羊毛纤维与绵羊毛、羊绒等特种动物纤维形成的二组分或多组分混纺产品的纤维含量测定没有相应的国家标准的问题,测定准确率 100%,检验结果均在国家产品标准的误差范围内。

[0004] 但是上述方法只是适用于现代羊毛织品中的羊毛含量检测,对于羊毛织品文物并不适用。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法。本发明采用免疫荧光的方法对古代羊毛织品进行了检测,一方面灵敏度高,操作简单,成本低,结果直观,易于分析。另一方面能够避免来自其它蛋白的干扰,特异性强。

[0006] 本发明的具体技术方案为:一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,采用如下步骤:

A)取三块大小一致的文物样并分别放置于三个打孔皿中,并将打孔皿分别标记为A、B、C;用pH 7.4的PBS缓冲液对文物样进行洗涤直至文物样表面无附着物;接着向A中加入10-50体积份的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液,向C中加入10-50体积份的pH7.4的PBS溶液,B不作处理;分别将A、B、C冷藏10-14h;然后分别向各打孔皿中加入1500-2500体积份的pH7.4的PBS溶液,浸泡4-6min,洗涤三次,每次2-4min。

[0007] B)分别向A、B中加入10-50体积份的绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液,向C中加入10-50体积份的pH 7.4的PBS溶液;然后分别将A、B、C放置于底层铺有湿毛巾的盒子中,用锡箔纸将盒子密封,36-38℃避光孵育0.5-2h;然后分别向各打孔皿中加入1500-2500体积份的pH 7.4 的PBS溶液,浸泡4-6min,洗涤三次,每次2-4min。

[0008] C)分别向A,B,C中加入8-12体积份的缓冲甘油进行封片。

[0009] D)将A,B,C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察;若B,C未发出绿色的荧光,而A发出了绿色的荧光,说明文物样与兔抗羊毛角蛋白抗体发生了特异性结合,证明文物样为羊毛织品。

[0010] 本发明采用免疫荧光的方法对古代羊毛织品进行了检测,将兔抗羊毛角蛋白抗体浸渍于文物样表面,洗涤干净后,加入绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体,形成抗原-一抗-二抗复合物,然后洗涤干净将文物样放在激光共聚焦显微镜下观察。可根据样品是否发出绿色荧光进行定性分析。

[0011] 作为优选,所述pH7.4的PBS缓冲液配制方法如下:称取KCl0.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.27g,NaCl 8.0g,Na<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub>1.42g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至7.4。

[0012] 作为优选,步骤C)中所述缓冲甘油的配制方法如下: 称取Na<sub>2</sub>C0<sub>3</sub>0.15g, NaHCO<sub>3</sub>0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至 1000mL,调节pH至9.6;将pH 9.6的PBS缓冲液和丙三醇按照体积比1:1混合。

[0013] 作为优选,所述兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液的制备方法为:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将初始浓度为1mg/mL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释10-200倍。

[0014] 作为优选,所述绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液的制备方法如下:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液稀释50-500倍。

[0015] 作为优选,绿色荧光素山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液的制备方法如下:向每2.5-3.5mL pH为5.5的PBS缓冲液中依次加入0.14-0.16mg的绿色荧光微球、2.6-2.8μL的现配的浓度为4-6mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和8-12μL的浓度为1mg/mL的山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液,得到混合液,将所述混合液在室温下搅拌1.5-2.5h,用1wt%的牛血清蛋白溶液封闭25-35min后在8000-10000 r/min、4℃条件下离心处理8-12min,移除上清液,将沉淀加入到体积为山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液1倍pH为5.5的PBS缓冲液中复溶、混匀,制得绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液。

[0016] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:本发明采用免疫荧光的方法对古代羊毛织品进行了检测,一方面灵敏度高,操作简单,成本低,结果直观,易于分析。另一方面能够避免来自其它蛋白的干扰,特异性强。

## 具体实施方式

[0017] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0018] 实施例1

一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,采用如下步骤:

原料制备:

pH7.4的PBS缓冲液:称取KCl0.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.27g,NaCl 8.0g,Na<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub>1.42g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至7.4。

[0019] 缓冲甘油:称取Na<sub>2</sub>C0<sub>3</sub>0.15g,NaHCO<sub>3</sub>0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至 1000mL,调节pH至9.6;将pH 9.6的PBS缓冲液和丙三醇按照体积比1:1混合。

[0020] 兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将初始浓度为1mg/mL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释100倍。

[0021] 绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液:向3mL pH为5.5的PBS缓冲液中依次加入0.15mg的绿色荧光微球、2.7μL的现配的浓度为5mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和10μL的浓度为1mg/mL的山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液,得到混合液,将所述混合液在室温下搅拌2h,用1wt%的牛血清蛋白溶液封闭30min后在9000 r/min、4℃条件下离心处理10min,移除上清液,将沉淀加入到体积为山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液1倍pH为5.5的PBS缓冲液中复溶、混匀,制得绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液。用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液稀释300倍。

[0022] A)取三块大小一致的文物样并分别放置于三个打孔皿中,并将打孔皿分别标记为A、B、C;用pH 7.4的PBS缓冲液对文物样进行洗涤直至文物样表面无附着物;接着向A中加入30μL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液,向C中加入30μL的pH7.4的PBS溶液,B不作处理;分别将A、B、C冷藏12h;然后分别向各打孔皿中加入2000μL的pH7.4的PBS溶液,浸泡5min,洗涤三次,每次3min。

[0023] B)分别向A、B中加入30μL的绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液,向C中加入30μL的pH 7.4的PBS溶液;然后分别将A、B、C放置于底层铺有湿毛巾的盒子中,用锡箔纸将盒子密封,37℃避光孵育1.25h;然后分别向各打孔皿中加入2000μL的pH 7.4 的PBS溶液,浸泡5min,洗涤三次,每次3min。

[0024] C)分别向A,B,C中加入10μL的缓冲甘油进行封片。

[0025] D)将A,B,C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察;结果B,C未发出绿色的荧光,而A发出了绿色的荧光,说明文物样与兔抗羊毛角蛋白抗体发生了特异性结合,证明文物样为羊毛织品。

## [0026] 实施例2

一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,采用如下步骤:

原料制备:

pH7.4的PBS缓冲液:称取KCl0.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.27g,NaCl 8.0g,Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>1.42g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至7.4。

[0027] 缓冲甘油:称取Na<sub>2</sub>C0<sub>3</sub>0.15g,NaHC0<sub>3</sub>0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至 1000mL,调节pH至9.6;将pH 9.6的PBS缓冲液和丙三醇按照体积比1:1混合。

[0028] 兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将初始浓度为1mg/mL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释10倍。

[0029] 绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液:向2.5mL pH为5.5的PBS缓冲液中依次加入0.14mg的绿色荧光微球、2.6μL的现配的浓度为4mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和8μL的浓度为1mg/mL的山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液,得到混合液,将所述混合液在室温下搅拌1.5h,用1wt%的牛血清蛋白溶液封闭25min后在8000 r/min、4℃条件下离心处理8min,移除上清液,将沉淀加入到体积为山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液1倍pH为5.5的PBS缓冲液中复溶、混匀,制得绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液。用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液稀释50倍。

[0030] A)取三块大小一致的文物样并分别放置于三个打孔皿中,并将打孔皿分别标记为A、B、C;用pH 7.4的PBS缓冲液对文物样进行洗涤直至文物样表面无附着物;接着向A中加入10μL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液,向C中加入10μL的pH7.4的PBS溶液,B不作处理;分别将

A、B、C冷藏10h;然后分别向各打孔皿中加入1500 $\mu$ L的pH7.4的PBS溶液,浸泡4min,洗涤三次,每次2min。

[0031] B)分别向A、B中加入10 $\mu$ L的绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液,向C中加入10 $\mu$ L的pH 7.4的PBS溶液;然后分别将A、B、C放置于底层铺有湿毛巾的盒子中,用锡箔纸将盒子密封,36℃避光孵育0.5h;然后分别向各打孔皿中加入1500 $\mu$ L的pH 7.4 的PBS溶液,浸泡4min,洗涤三次,每次2min。

[0032] C)分别向A,B,C中加入8 $\mu$ L的缓冲甘油进行封片。

[0033] D)将A,B,C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察;结果B,C未发出绿色的荧光,而A发出了绿色的荧光,说明文物样与兔抗羊毛角蛋白抗体发生了特异性结合,证明文物样为羊毛织品。

#### [0034] 实施例3

一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法,采用如下步骤:

原料制备:

pH7.4的PBS缓冲液:称取KCl0.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.27g,NaCl 8.0g,Na<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub>1.42g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至7.4。

[0035] 缓冲甘油:称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0.15g,NaHCO<sub>3</sub>0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至 1000mL,调节pH至9.6;将pH 9.6的PBS缓冲液和丙三醇按照体积比1:1混合。

[0036] 兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液:用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将初始浓度为1mg/mL的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释200倍。

[0037] 绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液:向3.5mL pH为5.5的PBS缓冲液中依次加入0.16mg的绿色荧光微球、2.8 $\mu$ L的现配的浓度为6mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液和12 $\mu$ L的浓度为1mg/mL的山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液,得到混合液,将所述混合液在室温下搅拌2.5h,用1wt%的牛血清蛋白溶液封闭35min后在10000 r/min、4℃条件下离心处理12min,移除上清液,将沉淀加入到体积为山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液1倍pH为5.5的PBS缓冲液中复溶、混匀,制得绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液。用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液将绿色荧光素标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体溶液稀释500倍。

[0038] A)取三块大小一致的文物样并分别放置于三个打孔皿中,并将打孔皿分别标记为A、B、C;用pH 7.4的PBS缓冲液对文物样进行洗涤直至文物样表面无附着物;接着向A中加入50 $\mu$ L的兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液,向C中加入50 $\mu$ L的pH7.4的PBS溶液,B不作处理;分别将A、B、C冷藏14h;然后分别向各打孔皿中加入2500 $\mu$ L的pH7.4的PBS溶液,浸泡6min,洗涤三次,每次4min。

[0039] B)分别向A、B中加入50 $\mu$ L的绿色荧光素标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体稀释液,向C中加入50 $\mu$ L的pH 7.4的PBS溶液;然后分别将A、B、C放置于底层铺有湿毛巾的盒子中,用锡箔纸将盒子密封,38℃避光孵育2h;然后分别向各打孔皿中加入2500 $\mu$ L的pH 7.4的PBS溶液,浸泡6min,洗涤三次,每次4min。

[0040] C)分别向A,B,C中加入12 $\mu$ L的缓冲甘油进行封片。

[0041] D)将A,B,C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察;结果B,C未发出绿色的荧光,而A发出了绿色的荧光,说明文物样与兔抗羊毛角蛋白抗体发生了特异性结合,证明文物样为

羊毛织品。

[0042] 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。

[0043] 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)	一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105699642A</a>	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201610092565.6	申请日	2016-02-19
[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	游秋实 王秉 刘杨 刘意		
发明人	游秋实 王秉 刘杨 刘意		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68 G01N2333/4742		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明涉及文物检测技术领域，公开了一种利用免疫荧光测定古代羊毛织品的检测方法，包括：A) 将三块文物样放于A、B、C三个打孔皿中；用PBS缓冲液对文物样进行洗涤；向A中加入兔抗羊毛角蛋白抗体稀释液，C中加入PBS溶液；冷藏后向各打孔皿中加入PBS溶液，浸泡、洗涤；B) 向A、B中加入绿色荧光素标记山羊抗兔IgG (H+L) 抗体稀释液，C中加入PBS溶液；将A、B、C避光孵育；然后向各打孔皿中加入PBS溶液，浸泡，洗涤；C) 向A、B、C中加入缓冲甘油进行封片；D) 将A、B、C放置于激光共聚焦显微镜下进行观察检测。本发明方法灵敏度高，操作简单，成本低，结果直观，易于分析。