



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104459118 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201410848069. X

(22) 申请日 2014. 12. 31

(73) 专利权人 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 5 号

(72) 发明人 刘苗苗 刘意 胡智文

(74) 专利代理机构 杭州之江专利事务所 (普通
合伙) 33216

代理人 朱枫

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/537(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103509108 A, 2014. 01. 15,

CN 102590482 A, 2012. 07. 18,

CN 104059131 A, 2014. 09. 24,

US 2012/0156688 A1, 2012. 06. 21,

CN 103509107 A, 2014. 01. 15,

JP 特开平 5-72205 A, 1993. 03. 23,

郑秦等. 利用丝素蛋白抗体鉴定古代丝织
品. 《蚕业科学》. 2014, 第 40 卷 (第 3 期), 第
520-526 页.

审查员 贾静

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备
方法

(57) 摘要

本发明公开了一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法,采用免疫胶体金层析技术的原理来检测古代墓葬中丝织品的痕迹,即将胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体溶解在胶体金结合垫上,将鼠抗丝素蛋白抗体和山羊抗兔 IgG(H+L) 抗体分别喷在硝酸纤维素薄膜上形成检测线和质控线。若检测线未显色,质控线显色,证明样品中不含有丝素蛋白;若检测线和质控线均显色,证明样品中含有丝素蛋白。本发明采用双抗夹心免疫胶体金层析技术的原理对古代丝织品进行了检测,一方面,灵敏度高,操作简单。另一方面,成本低,反应时间短,不需要专业人员操作,适合于考古现场检测。

1. 一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法,其特征在于采用步骤如下:

A) 金纳米粒子的制备:采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备出粒径为 25-50nm 的金纳米粒子;即将 100mL 的质量浓度为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1.0-1.5mL 的质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,煮沸 7-10min,溶液呈现出红色,即制得金纳米溶胶;

B) 金标兔抗丝素蛋白抗体的制备:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 100mL 的胶体金溶液调节 pH 至 9.0,边搅拌边加入兔抗丝素蛋白抗体 20-50 μ L,所述抗体浓度为 3.15mg/mL;接着加入 5mL 的质量浓度为 1%-10% 的聚乙二醇 20000 溶液,室温下搅拌 5min,然后在 9000-11000r/min 下离心 40-60min,弃去上清液;将沉淀溶于 0.01mol/L 的 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,即 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液中还含有质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖;于 4℃ 下保存;

C) 试纸条的组装:用喷膜机将 5-20 μ L、用 pH8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 100-400 倍的鼠抗丝素蛋白抗体溶液和羊抗兔抗体溶液分别喷在长 2.5cm、宽 4mm 的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,37℃ 烘干备用;将用质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖, pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 10-20 倍的金标记的兔抗丝素蛋白抗体包被在胶体金结合垫上,37℃ 烘干备用;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次组装在 PVC 底板上,用切刀切割成 4mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的铝箔袋中密封储存;

D) 取 1g 纺织品痕迹样,溶解于 50-100mL、pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液缓冲溶液中,搅拌均匀,2h 后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;5-10min 后,检测线和质控线均显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于古代丝织品痕迹的检测领域,尤其涉及一种快速检测古代丝织品的双抗夹心法检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 丝织品由蚕丝编织而成,是中华民族智慧的结晶,是我国的宝贵遗产。但是蚕丝作为一种有机高分子材料,长期埋葬于墓葬环境中,必然会受到氧气、水、微生物等因素的影响而发生降解,以至于外观严重受到破坏而腐朽,肉眼根本无法识别。常规的检测方法有红外光谱分析,氨基酸分析,液相色谱分析等,但是由于糟朽丝织品杂质含量多,谱图解析困难,耗时长,灵敏度低,并且不能排除其它蛋白质的干扰,给研究工作者带来了一定的困难。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是:针对上述现有技术存在的问题提供一种快速、直观、简便的古代丝织品检测方法。

[0004] 本发明所采取的技术方案是:一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法,其特征在于采用步骤如下:

[0005] A) 金纳米粒子的制备:采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备出粒径为 25-50nm 的金纳米粒子;即将 100mL 的质量浓度为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1.0-1.5mL 的质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,煮沸 7-10min,溶液呈现出红色,即制得金纳米溶胶;

[0006] B) 金标兔抗丝素蛋白抗体的制备:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 100mL 的胶体金溶液调节 pH 至 9.0,边搅拌边加入兔抗丝素蛋白抗体 20-50 μ L,所述抗体浓度为 3.15mg/mL;接着加入 5mL 的质量浓度为 1%-10% 的聚乙二醇 20000 溶液,室温下搅拌 5min,然后在 9000-11000r/min 下离心 40-60min,弃去上清液;将沉淀溶于 0.01mol/L 的 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,即 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液中还含有质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖;于 4℃ 下保存;

[0007] C) 试纸条的组装:用喷膜机将 5-20 μ L、用 pH8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 100-400 倍的鼠抗丝素蛋白抗体溶液和羊抗兔抗体溶液分别喷在长 2.5cm、宽 4mm 的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,37℃ 烘干备用;将用质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖, pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 10-20 倍的金标记的兔抗丝素蛋白抗体包被在胶体金结合垫上,37℃ 烘干备用;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次组装在 PVC 底板上,用切刀切割成 4mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的铝箔袋中密封储存;

[0008] D) 取 1g 纺织品痕迹样,溶解于 50-100mL、pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液缓冲溶液中,搅拌均匀,2h 后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;5-10min 后,检测线和质控线均显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

[0009] 本发明采用免疫胶体金层析技术的原理来检测古代墓葬中丝织品的痕迹,即将胶

体金标记的兔抗丝素蛋白抗体溶解在胶体金结合垫上,将鼠抗丝素蛋白抗体和山羊抗兔 IgG(H+L) 抗体分别喷在硝酸纤维素薄膜上形成检测线和质控线。样品加入样品吸收垫,样品中的液体首先溶解胶体金垫中含有的胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体,同时,样品中待测抗原与胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体结合,形成胶体金标记兔抗丝素蛋白抗体-抗原复合物,并靠毛细作用向检测线移动。样品经过检测线时,样品中抗原的未结合位点与硝酸纤维素膜上的鼠抗丝素蛋白抗体结合。若样品中含有抗原,胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体-抗原复合物就会在硝酸纤维素膜上聚集,检测线显出红色。胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体-抗原-鼠抗丝素蛋白抗体复合物经过质控线,与山羊抗兔 IgG(H+L) 抗体反应,胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体聚集在质控线上,显出红色。即若检测线未显色,质控线显色,证明样品中不含有丝素蛋白;若检测线和质控线均显色,证明样品中含有丝素蛋白。

[0010] 本发明的有益效果是:采用双抗夹心免疫胶体金层析技术的原理对古代丝织品进行了检测,一方面,灵敏度高,操作简单。另一方面,成本低,反应时间短,不需要专业人员操作,适合于考古现场检测。

具体实施方式

[0011] 实施例 1 采用步骤如下:

[0012] A) 金纳米粒子的制备:采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备出粒径为 25nm 的金纳米粒子;即将 100mL 的质量浓度为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1.0mL 的质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,煮沸 7min,溶液呈现出红色,即制得金纳米溶胶;

[0013] B) 金标兔抗丝素蛋白抗体的制备:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 100mL 的胶体金溶液调节 pH 至 9.0,边搅拌边加入兔抗丝素蛋白抗体 20 μ L,所述抗体浓度为 3.15mg/mL;接着加入 5mL 的质量浓度为 1% 的聚乙二醇 20000 溶液,室温下搅拌 5min,然后在 9000r/min 下离心 40min,弃去上清液;将沉淀溶于 0.01mol/L 的 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,即 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液中还含有质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖;于 4℃ 下保存;

[0014] C) 试纸条的组装:用喷膜机将 5 μ L、用 pH8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 100 倍的鼠抗丝素蛋白抗体溶液和羊抗兔抗体溶液分别喷在长 2.5cm、宽 4mm 的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,37℃ 烘干备用;将用质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖, pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 10 倍的金标记的兔抗丝素蛋白抗体包被在胶体金结合垫上,37℃ 烘干备用;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次组装在 PVC 底板上,用切刀切割成 4mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的铝箔袋中密封储存;

[0015] D) 取 1g 纺织品痕迹样,溶解于 50mL、pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液缓冲溶液中,搅拌均匀,2h 后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;5min 后,检测线和质控线均显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

[0016] 实施例 2 采用步骤如下:

[0017] A) 金纳米粒子的制备:采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备出粒径为 35nm 的金纳米粒子;即将 100mL 的质量浓度为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1.3mL 的质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,煮沸 8min,溶液呈现出红色,即制得金纳米溶胶;

[0018] B) 金标兔抗丝素蛋白抗体的制备:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 100mL 的胶体金溶

液调节 pH 至 9.0,边搅拌边加入兔抗丝素蛋白抗体 30 μ L,所述抗体浓度为 3.15mg/mL;接着加入 5mL 的质量浓度为 5% 的聚乙二醇 20000 溶液,室温下搅拌 5min,然后在 10000r/min 下离心 50min,弃去上清液;将沉淀溶于 0.01mol/L 的 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,即 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液中还含有质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖;于 4℃ 下保存;

[0019] C) 试纸条的组装:用喷膜机将 15 μ L、用 pH8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 200 倍的鼠抗丝素蛋白抗体溶液和羊抗兔抗体溶液分别喷在长 2.5cm、宽 4mm 的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,37℃ 烘干备用;将用质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖,pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 15 倍的金标记的兔抗丝素蛋白抗体包被在胶体金结合垫上,37℃ 烘干备用;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次组装在 PVC 底板上,用切刀切割成 4mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的铝箔袋中密封储存;

[0020] D) 取 1g 纺织品痕迹样,溶解于 70mL、pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液缓冲溶液中,搅拌均匀,2h 后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;8min 后,检测线和质控线均显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

[0021] 实施例 3 采用步骤如下:

[0022] A) 金纳米粒子的制备:采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法制备出粒径为 50nm 的金纳米粒子;即将 100mL 的质量浓度为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾,迅速加入 1.5mL 的质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,煮沸 10min,溶液呈现出红色,即制得金纳米溶胶;

[0023] B) 金标兔抗丝素蛋白抗体的制备:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液将 100mL 的胶体金溶液调节 pH 至 9.0,边搅拌边加入兔抗丝素蛋白抗体 50 μ L,所述抗体浓度为 3.15mg/mL;接着加入 5mL 的质量浓度为 10% 的聚乙二醇 20000 溶液,室温下搅拌 5min,然后在 11000r/min 下离心 60min,弃去上清液;将沉淀溶于 0.01mol/L 的 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液,即 Tris-HCl 缓冲液,所述 Tris-HCl 缓冲液中还含有质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖;于 4℃ 下保存;

[0024] C) 试纸条的组装:用喷膜机将 20 μ L、用 pH8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 400 倍的鼠抗丝素蛋白抗体溶液和羊抗兔抗体溶液分别喷在长 2.5cm、宽 4mm 的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上,37℃ 烘干备用;将用质量浓度比例为 0.15% 的吐温-20、1% 的牛血清蛋白、5% 的蔗糖,pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液稀释 20 倍的金标记的兔抗丝素蛋白抗体包被在胶体金结合垫上,37℃ 烘干备用;将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次组装在 PVC 底板上,用切刀切割成 4mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的铝箔袋中密封储存;

[0025] D) 取 1g 纺织品痕迹样,溶解于 100mL、pH 为 8.2 的 Tris-HCl 溶液缓冲溶液中,搅拌均匀,2h 后取一滴上清液滴在组装好的试纸条的样品垫上;10min 后,检测线和质控线均显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

专利名称(译)	一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法		
公开(公告)号	CN104459118B	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201410848069.X	申请日	2014-12-31
[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	刘苗苗 刘意 胡智文		
发明人	刘苗苗 刘意 胡智文		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/6803		
代理人(译)	朱枫		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN104459118A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种古代丝织品双抗夹心法检测试纸的制备方法，采用免疫胶体金层析技术的原理来检测古代墓葬中丝织品的痕迹，即将胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体溶解在胶体金结合垫上，将鼠抗丝素蛋白抗体和山羊抗兔IgG(H+L)抗体分别喷在硝酸纤维素薄膜上形成检测线和质控线。若检测线未显色，质控线显色，证明样品中不含有丝素蛋白；若检测线和质控线均显色，证明样品中含有丝素蛋白。本发明采用双抗夹心免疫胶体金层析技术的原理对古代丝织品进行了检测，一方面，灵敏度高，操作简单。另一方面，成本低，反应时间短，不需要专业人员操作，适合于考古现场检测。