



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104459162 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201410848077. 4

(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 王秉 刘苗苗 杨颖超

(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 33/68(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 刘迎鸣

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种古代丝织品间接竞争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间接竞争法检测试纸的制备方法,利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,即将兔抗丝素蛋白抗体进行胶体金标记,然后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,将丝素蛋白标准品和山羊抗兔 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,证明样品中含有丝素蛋白;若检测线和质控线均显色,证明样品中未含有丝素蛋白或者丝素蛋白的浓度低于试纸条的检出限。本发明采用间接竞争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. 一种古代丝织品间接竞争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 $^{\circ}$ C下保存;

C) 试纸条的组装:用喷膜机分别将5-20 μ L、0.5-4mg/mL、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释后的丝素蛋白溶液和5-20 μ L、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释100-400倍的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 $^{\circ}$ C烘干备用;将5-20 μ L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缓冲液稀释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 $^{\circ}$ C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缓冲液中,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,只有质控线显出红色,说明样品中含有丝素蛋白,该纺织品痕迹为丝织品的痕迹。

一种古代丝织品间接竞争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,尤其涉及一种古代丝织品间接竞争法检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 丝织品主要成分是天然蛋白质纤维,因此容易受到多种环境因素,如光照、射线和微生物等的影响,造成蚕丝蛋白质发生变性和分子链的断裂,从而使其降解破坏,传统的检测方法已经不能满足考古的需要。对于古代文物中蛋白质的检测方法,通常有蛋白质组学法和酶联免疫的方法,但是前者谱图分析较为困难,后者分析时间较长。结果都不直观,并不适合于考古现场分析。

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、直观的古丝织品间接竞争法检测试纸的检测方法。

[0004] 为此本发明所采取的技术方案是:一种古代丝织品间接竞争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 $^{\circ}$ C下保存;

[0007] C)试纸条的组装:用喷膜机分别将5-20 μ L、0.5-4mg/mL、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释后的丝素蛋白溶液和5-20 μ L、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释100-400倍的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 $^{\circ}$ C烘干备用;将5-20 μ L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缓冲液稀释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 $^{\circ}$ C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缓冲液中,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,只有质控线均显出红色,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] 本发明利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,即将兔

抗丝素蛋白抗体进行胶体金标记,然后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,将丝素蛋白标准品和山羊抗兔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,形成抗原-兔抗丝素蛋白抗体胶体金复合物,并靠毛细作用向检测线移动。样品经过检测线时,样品中的抗原与硝酸纤维素膜上的抗原进行竞争兔抗丝素蛋白抗体。若样品中含有抗原,聚集在硝酸纤维素膜上的胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体就会减少,检测线不显色。抗原-胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体或者胶体金标记的兔抗丝素蛋白抗体(样品中不含有抗原)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,显出明显的红色。即若检测线未显色,质控线显色,证明样品中含有丝素蛋白;若检测线和质控线均显色,证明样品中未含有丝素蛋白或者丝素蛋白的浓度低于试纸条的检出限。

[0010] 本发明的有益成果是:采用间接竞争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 $^{\circ}$ C下保存;

[0014] C)试纸条的组装:用喷膜机分别将5 μ L、0.5mg/mL、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释后的丝素蛋白溶液和5 μ L、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释100倍的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 $^{\circ}$ C烘干备用;将5 μ L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缓冲液稀释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 $^{\circ}$ C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缓冲液中,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,只有质控线均显出红色,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400nm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85min,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 $^{\circ}$ C下保存;

[0019] C)试纸条的组装:用喷膜机分别将15 μ L、2mg/mL、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释后的丝素蛋白溶液和15 μ L、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释200倍的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 $^{\circ}$ C烘干备用;将15 μ L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缓冲液稀释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 $^{\circ}$ C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缓冲液中,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;7min后,只有质控线均显出红色,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 $^{\circ}$ C下保存;

[0024] C)试纸条的组装:用喷膜机分别将20 μ L、4mg/mL、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释后的丝素蛋白溶液和20 μ L、用pH8.2的Tris-HCl缓冲液稀释400倍的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 $^{\circ}$ C烘干备用;将20 μ L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缓冲液稀释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 $^{\circ}$ C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缓冲液中,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,只有质控线均显出红色,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)	一种古代丝织品间接竞争法检测试纸的制备方法		
公开(公告)号	CN104459162B	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201410848077.4	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	王秉 刘苗苗 杨颖超		
发明人	王秉 刘苗苗 杨颖超		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/6803		
代理人(译)	朱枫		
其他公开文献	CN104459162A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种古代丝织品间接竞争法检测试纸的制备方法，利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，即将兔抗丝素蛋白抗体进行胶体金标记，然后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，将丝素蛋白标准品和山羊抗兔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，证明样品中含有丝素蛋白；若检测线和质控线均显色，证明样品中未含有丝素蛋白或者丝素蛋白的浓度低于试纸条的检出限。本发明采用间接竞争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。