



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459163 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410848078. 9

(22) 申请日 2014. 12. 31

(71) 申请人 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 杨颖超 王秉

(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 33/537(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种古代丝织品的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种古代丝织品的检测方法,采用间接酶联免疫的方法对丝织品丝肽成分进行了检测,即将丝织品文物洗脱液包被到酶标板上,然后添加兔抗丝素蛋白抗体与抗原结合形成抗原抗体复合物。洗涤后加入碱性磷酸酯酶标山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体,形成抗体-抗原-抗体复合物,洗涤加入四甲基联苯胺溶液,底物被酶催化为有色产物,根据产物颜色变化的深浅可进行定性分析。由于酶的催化效率极高,间接方法了免疫反应的结果,使测试具有较高的灵敏度。

1. 一种古代丝织品的检测方法,其特征在于采用如下步骤:

A) 溶液的配制:PBS 7.4 缓冲液配制:KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.27g, NaCl 8.0g, Na_2HPO_4 1.42g,用800ml 蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至7.4;PBS 9.6 缓冲溶液配制: Na_2CO_3 0.15g, NaHCO_3 0.29g,用800ml 蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至9.6;

B) 将0.001g-0.01g 丝素蛋白粉和0.01g-0.1g 文物样分别溶解于10-1000ml PH为9.6 的PBS 缓冲溶液中,混合搅拌均匀,静置,分别取50-120 μl 上清液加入到酶标板中,形成阳性对照和实验对照;取50-120 μl PH为7.4 的PBS 缓冲溶液作为空白对照用;阴性对照为不加兔抗丝素蛋白一抗,其包被液和阳性对照设为一样;然后将各阴性对照,阳性对照,实验组各放置于4℃冰箱中12h;

C) 各孔中加入质量浓度1%牛血清白蛋白溶液100-300 μl ;37℃下封闭1-2h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤3次,每次3min;

D) 取用质量浓度1%牛血清白蛋白溶液稀释1000-12000 倍的兔抗丝素蛋白抗体50-120 μl ,加入到酶标板中,保鲜膜封板,37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

E) 各孔中加入3000-10000 倍稀释的磷酸酯酶山羊抗兔IgG (H+L) 抗体50-120 μl ;37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

F) 各孔内加底物液1%的四甲基联苯胺溶液100 μl ,置黑暗处使其反应10min;

G) 各孔内加1 mol/L H_2SO_4 溶液50-120 μl ,终止反应;

H) 将酶标板置于酶标仪中,读取 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较阳性对照,阴性对照与实验组测得的OD值;

若 $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{阴性对照}} > 2.1$,则证明所检测的样品呈现阳性,

若 $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{阴性对照}} \leq 2.1$,则证明所测得的样品呈现阴性。

一种古代丝织品的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于古代丝织品的检测领域,尤其涉及一种古代丝织品的检测方法。

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灵敏度高、简单高效的古代丝织品的检测方法。

[0004] 为此采用如下的技术方案:一种古代丝织品的检测方法,其特征在于采用如下步骤:

A) 溶液的配制:PBS 7.4 缓冲液配制:KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.27g, NaCl 8.0g, Na_2HPO_4 1.42g,用800ml 蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至7.4;PBS 9.6 缓冲溶液配制: Na_2CO_3 0.15g, NaHCO_3 0.29g,用800ml 蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至9.6;

B) 将0.001g-0.01g 丝素蛋白粉和0.01g-0.1g 文物样分别溶解于10-1000ml PH为9.6 的PBS 缓冲溶液中,混合搅拌均匀,静置,分别取50-120 μl 上清液加入到酶标板中,形成阳性对照和实验对照;取50-120 μl PH为7.4 的PBS 缓冲溶液作为空白对照用;阴性对照为不加兔抗丝素蛋白一抗,其包被液和阳性对照设为一样;然后将各阴性对照,阳性对照,实验组各放置于4℃冰箱中12h;

C) 各孔中加入质量浓度1% 牛血清白蛋白溶液100-300 μl ;37℃下封闭1-2h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤3次,每次3min;

D) 取用质量浓度1% 牛血清白蛋白溶液稀释1000-12000 倍的兔抗丝素蛋白抗体50-120 μl ,加入到酶标板中,保鲜膜封板,37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

E) 各孔中加入3000-10000 倍稀释的磷酸酯酶山羊抗兔IgG (H+L) 抗体50-120 μl ;37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4 的PBS 缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

F) 各孔内加底物液1% 的四甲基联苯胺溶液100 μl ,置黑暗处使其反应10min;

G) 各孔内加1 mol/L H_2SO_4 溶液50-120 μl ,终止反应;

H) 将酶标板置于酶标仪中,读取 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较阳性对照,阴性对照与实验组测得的OD值;

若 $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{阴性对照}} > 2.1$,则证明所检测的样品呈现阳性,

若 $\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{阴性对照}} \leq 2.1$,则证明所测得的样品呈现阴性。

[0005] 本发明的有益效果是：1 本发明采用间接酶联免疫的方法对丝织品中的丝素蛋白成分进行检测，一方面灵敏度高、操作简单。另一方面，避免了其它蛋白的干扰，特异性强。2 与现有技术相比，本发明所采取的方法成本低、检测简单、快捷。

具体实施方式

[0006] 本发明采用间接酶联免疫的方法对丝织品丝肽成分进行了检测，即将丝织品文物洗脱液包被到酶标板上，然后添加兔抗丝素蛋白抗体与抗原结合形成抗原抗体复合物。洗涤后加入碱性磷酸酯酶标山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体，形成抗体-抗原-抗体复合物，洗涤加入四甲基联苯胺溶液，底物被酶催化为有色产物，根据产物颜色变化的深浅可进行定性分析。由于酶的催化效率极高，间接方法了免疫反应的结果，使测试具有较高的灵敏度。

[0007] 实施例 1 具体实施步骤如下：

A) 溶液的配制：PBS 7.4 缓冲液配制：KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.27g, NaCl 8.0g, Na_2HPO_4 1.42g, 用 800ml 蒸馏水溶解并定容至 1000ml, 调节 PH 至 7.4；PBS 9.6 缓冲溶液配制： Na_2CO_3 0.15g, NaHCO_3 0.29g, 用 800ml 蒸馏水溶解并定容至 1000ml, 调节 PH 至 9.6；

B) 将 0.001g 丝素蛋白粉和 0.01g 文物样分别溶解于 10ml PH 为 9.6 的 PBS 缓冲溶液中，混合搅拌均匀，静置，分别取 50 μ l 上清液加入到酶标板中，形成阳性对照和实验对照；取 50 μ l PH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为空白对照用；阴性对照为不加兔抗丝素蛋白一抗，其包被液和阳性对照设为一样；然后将各阴性对照，阳性对照，实验组各放置于 4℃ 冰箱中 12h；

C) 各孔中加入质量浓度 1% 牛血清白蛋白溶液 100 μ l；37℃ 下封闭 1h；然后将溶液吸出，用 PH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次，每次 3min；

D) 取用质量浓度 1% 牛血清白蛋白溶液稀释 1000 倍的兔抗丝素蛋白抗体 50 μ l，加入到酶标板中，保鲜膜封板，37℃ 下孵育 1h；然后将溶液吸出，用 PH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液洗涤 5 次，每次 3min；

E) 各孔中加入 3000 倍稀释的磷酸酯酶山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 50 μ l；37℃ 下孵育 1h；然后将溶液吸出，用 PH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液洗涤 5 次，每次 3min；

F) 各孔内加底物液 1% 的四甲基联苯胺溶液 100 μ l，置黑暗处使其反应 10min；

G) 各孔内加 1 mol/L H_2SO_4 溶液 50 μ l，终止反应；

H) 将酶标板置于酶标仪中，读取 $\lambda = 450\text{nm}$ 处的吸光度数值；比较阳性对照，阴性对照与实验组测得的 OD 值；

若 $\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{阴性对照}} > 2.1$ ，则证明所检测的样品呈现阳性，

若 $\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{阴性对照}} \leq 2.1$ ，则证明所测得的样品呈现阴性。

[0008] 实施例 2 具体实施步骤如下：

A) 溶液的配制：PBS 7.4 缓冲液配制：KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.27g, NaCl 8.0g, Na_2HPO_4 1.42g, 用 800ml 蒸馏水溶解并定容至 1000ml, 调节 PH 至 7.4；PBS 9.6 缓冲溶液配制： Na_2CO_3 0.15g, NaHCO_3 0.29g, 用 800ml 蒸馏水溶解并定容至 1000ml, 调节 PH 至 9.6；

B) 将 0.005g 丝素蛋白粉和 0.05g 文物样分别溶解于 500ml PH 为 9.6 的 PBS 缓冲溶液中，混合搅拌均匀，静置，分别取 80 μ l 上清液加入到酶标板中，形成阳性对照和实验对照；取 80 μ l PH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为空白对照用；阴性对照为不加兔抗丝素蛋白一抗，

其包被液和阳性对照设为一样;然后将各阴性对照,阳性对照,实验组各放置于4℃冰箱中12h;

C) 各孔中加入质量浓度1%牛血清白蛋白溶液200 μ l;37℃下封闭1.5h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤3次,每次3min;

D) 取用质量浓度1%牛血清白蛋白溶液稀释7000倍的兔抗丝素蛋白抗体80 μ l,加入到酶标板中,保鲜膜封板,37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

E) 各孔中加入8000倍稀释的磷酸酯酶山羊抗兔IgG(H+L)抗体80 μ l;37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

F) 各孔内加底物液1%的四甲基联苯胺溶液100 μ l,置黑暗处使其反应10min;

G) 各孔内加1 mol/L H₂SO₄溶液80 μ l,终止反应;

H) 将酶标板置于酶标仪中,读取 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较阳性对照,阴性对照与实验组测得的OD值;

若 $OD_{\text{实验组}}/OD_{\text{阴性对照}} > 2.1$,则证明所检测的样品呈现阳性,

若 $OD_{\text{实验组}}/OD_{\text{阴性对照}} \leq 2.1$,则证明所测得的样品呈现阴性。

[0009] 实施例3具体实施步骤如下:

A) 溶液的配制:PBS 7.4缓冲液配制:KCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.27g, NaCl 8.0g, Na₂HPO₄ 1.42g,用800ml蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至7.4;PBS 9.6缓冲溶液配制:Na₂CO₃ 0.15g, NaHCO₃ 0.29g,用800ml蒸馏水溶解并定容至1000ml,调节PH至9.6;

B) 将0.01g丝素蛋白粉和0.1g文物样分别溶解于1000ml PH为9.6的PBS缓冲溶液中,混合搅拌均匀,静置,分别取120 μ l上清液加入到酶标板中,形成阳性对照和实验对照;取120 μ l PH为7.4的PBS缓冲溶液作为空白对照用;阴性对照为不加兔抗丝素蛋白一抗,其包被液和阳性对照设为一样;然后将各阴性对照,阳性对照,实验组各放置于4℃冰箱中12h;

C) 各孔中加入质量浓度1%牛血清白蛋白溶液300 μ l;37℃下封闭2h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤3次,每次3min;

D) 取用质量浓度1%牛血清白蛋白溶液稀释12000倍的兔抗丝素蛋白抗体120 μ l,加入到酶标板中,保鲜膜封板,37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

E) 各孔中加入10000倍稀释的磷酸酯酶山羊抗兔IgG(H+L)抗体120 μ l;37℃下孵育1h;然后将溶液吸出,用PH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤5次,每次3min;

F) 各孔内加底物液1%的四甲基联苯胺溶液100 μ l,置黑暗处使其反应10min;

G) 各孔内加1 mol/L H₂SO₄溶液120 μ l,终止反应;

H) 将酶标板置于酶标仪中,读取 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较阳性对照,阴性对照与实验组测得的OD值;

若 $OD_{\text{实验组}}/OD_{\text{阴性对照}} > 2.1$,则证明所检测的样品呈现阳性,

若 $OD_{\text{实验组}}/OD_{\text{阴性对照}} \leq 2.1$,则证明所测得的样品呈现阴性。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种古代丝织品的检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN104459163A | 公开(公告)日 | 2015-03-25 |
| 申请号 | CN201410848078.9 | 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 杨颖超 王秉 | | |
| 发明人 | 刘苗苗 杨颖超 王秉 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6803 | | |
| 代理人(译) | 朱枫 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种古代丝织品的检测方法，采用间接酶联免疫的方法对丝织品丝肽成分进行了检测，即将丝织品文物洗脱液包被到酶标板上，然后添加兔抗丝素蛋白抗体与抗原结合形成抗原抗体复合物。洗涤后加入碱性磷酸酯酶标山羊抗兔IgG (H+L) 抗体，形成抗体-抗原-抗体复合物，洗涤加入四甲基联苯胺溶液，底物被酶催化为有色产物，根据产物颜色变化的深浅可进行定性分析。由于酶的催化效率极高，间接方法了免疫反应的结果，使测试具有较高的灵敏度。