



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104483476 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410848087.8

(22)申请日 2014.12.31

(73)专利权人 中国丝绸博物馆

地址 310000 浙江省杭州市西湖区玉皇山路73-1号

(72)发明人 周旻 郑海玲 赵丰 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 33/53(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

审查员 陈伟潘

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法,利用直接酶联免疫的方法来检测古代泥化丝织品模拟样中的丝素蛋白成分,即将溶解后的模拟土样上清液包被到酶标板上,然后添加辣根过氧化物标记的兔抗丝素蛋白抗体形成抗原抗体复合物。洗涤后加入四甲基联苯胺显色液,底物被酶催化为有色产物,根据颜色变化的深浅可进行定性分析。一方面,本方法灵敏度高、成本低,另一方面,本方法特异性强,操作简单,响应速度快,因此能够有效代替现有对古代泥化丝织品的检测方法。

1. 一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法,其特征在于采取步骤如下:

1)缓冲溶液的配制:配制PBS 7.4缓冲液:称取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;配制pH 9.6的碳酸盐缓冲液:称取 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;

2)分别称取1g标准土样,按字母顺序标记为A-1共九组;按照分组依次加入1mL的丝素蛋白溶液;所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下放置1-3天;再按照分组依次加入99mL的丝素蛋白溶液,所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下静置2h;各组分别取上清液;

3)将步骤2)获得的九组上清液分别取80-120 μL 包被于酶标板上;同时单独将 10^{-3} - 10^{-5} g/mL、溶剂为PBS 9.6缓冲液的丝素蛋白溶液设立为阴性对照组并标记为N,也包被于酶标板上;将上述10组样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12h,然后用PBS 7.4溶液洗涤三次,每次三分钟;

4)向A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内分别加入100-200 μL 的牛血清白蛋白溶液,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为1%,溶剂为PBS 7.4缓冲液;之后用保鲜膜封板,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2h,然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

5)向A-1组的酶标板孔内分别加入100 μL 的3000-10000倍稀释的辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体,所述稀释溶剂为质量浓度1%的牛血清白蛋白溶液,同时阴性对照组N的孔内加入100 μL 的PBS 7.4缓冲液代替抗体;将上述10组样品控制温度在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h;然后用PBS7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

6)向经步骤5)处理后A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内加底物液质量浓度为1%的四甲基联苯胺溶液80-120 μL ,置于黑暗处反应10min;再向各孔中加入1mol/L的 H_2SO_4 溶液80-120 μL ,终止反应;

7)将步骤6)处理后的酶标板放置于酶标仪中,读取波长 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较实验组A-1与阴性对照组N测得的吸光度OD的值:

若 $\text{OD}_{\text{A-1}}/\text{OD}_{\text{N}} > 2.1$,则证明所检测的溶液呈现阳性,

若 $\text{OD}_{\text{A-1}}/\text{OD}_{\text{N}} \leq 2.1$,则证明所测得的溶液呈现阴性;

通过阴阳性判断可以推测出丝素蛋白在标准土样中的检出限。

一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于古代丝织品检测领域,尤其涉及一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法。

背景技术

[0002] 丝绸是中华民族宝贵的物质遗产,研究丝绸的起源对华夏五千年文明有很深远的科学意义。丝织品主要由丝素蛋白构成,很容易受到外界的水、热、氧气、光照、酸、碱、微生物等因素的影响而发生降解,导致蛋白质大分子链断裂,使之劣化降解。不难想象,在漫长的历史进程中,当年埋入墓葬或遗址中的丝织品早已经失去实体容貌,降解成为肽段和氨基酸,或者化为痕迹,或者化为泥土,肉眼已经无法辨识。因此,采用自然科学的手段,构建丝织品微痕检测技术体系,从印痕、残留物、土壤中提取古代丝绸的信息,对研究丝绸起源非常迫切。由于文物非常宝贵,可用于科学研究的又少之又少,因此对泥化丝织品模拟样的检测非常重要。传统的检测方法主要有质谱检测,红外光谱法,可是由于受到土壤中杂质的干扰,图谱较为复杂,难以解析,给考古带来了很大的困扰。

发明内容

[0003] 为了解决上述现有技术中的问题,本发明提出一种灵敏、快捷的古代泥化丝织品模拟样的测试方法,并对其最低检出限做出评估。

[0004] 为此采用如下的技术方案:一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法,其特征在于采取步骤如下:

[0005] 1)缓冲溶液的配制:配制PBS 7.4缓冲液:称取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;配制pH 9.6的碳酸盐缓冲液:称取 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;

[0006] 2)分别称取1g标准土样,按字母顺序标记为A-1共九组;按照分组依次加入1mL的丝素蛋白溶液;所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下放置1-3天;再按照分组依次加入99mL的丝素蛋白溶液,所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下静置2h;各组分别取上清液;

[0007] 3)将步骤2)获得的九组上清液分别取80-120 μL 包被于酶标板上;同时单独将 10^{-3} - 10^{-5} g/mL、溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液的丝素蛋白溶液设立为阴性对照组并标记为N,也包被于酶标板上;将上述10组样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12h,然后用PBS 7.4溶液洗涤三次,每次三分钟;

[0008] 4)向A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内分别加入100-200 μL 的牛血清白蛋白溶液,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为1%,溶剂为PBS 7.4缓冲液;之后用保鲜膜封板,在

37℃下孵育2h,然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0009] 5)向A-1组的酶标板孔内分别加入100μL的3000-10000倍稀释的辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体,所述稀释溶剂为质量浓度1%的牛血清白蛋白溶液,同时阴性对照组N的孔内加入100μL的PBS 7.4缓冲液代替抗体;将上述10组样品控制温度在37℃下孵育1h;然后用PBS7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0010] 6)向经步骤5)处理后A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内加底物液质量浓度为1%的四甲基联苯胺溶液80-120μL,置于黑暗处反应10min;再向各孔中加入1mol/L的H₂SO₄ 溶液80-120μL,终止反应;

[0011] 7)将步骤6)处理后的酶标板放置于酶标仪中,读取波长λ=450nm处的吸光度数值;比较实验组A-1与阴性对照组N测得的吸光度OD的值;

[0012] 若OD_{A-1}/OD_N > 2.1,则证明所检测的溶液呈现阳性;

[0013] 若OD_{A-1}/OD_N ≤ 2.1,则证明所测得的溶液呈现阴性;

[0014] 通过阴阳性判断可以推测出丝素蛋白在标准土样中的检出限。

[0015] 本发明采用直接酶联免疫的方法对古代泥化丝织品模拟样进行检测,一方面,本方法灵敏度高、成本低,另一方面,本方法特异性强,操作简单,响应速度快,因此能够有效代替现有对古代泥化丝织品的检测方法。

具体实施方式

[0016] 实施例1采取步骤如下:

[0017] 1)缓冲溶液的配制:配制PBS 7.4缓冲液:称取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;配制pH 9.6的碳酸盐缓冲液:称取Na₂CO₃ 0.15g, NaHCO₃ 0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至9.6;

[0018] 2)分别称取1g标准土样,按字母顺序标记为A-1共九组;按照分组依次加入1mL的丝素蛋白溶液;所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下放置1天;再按照分组依次加入99mL的丝素蛋白溶液,所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下静置2h;各组分别取上清液;

[0019] 3)将步骤2)获得的九组上清液分别取80μL包被于酶标板上;同时单独将10⁻³g/mL、溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液的丝素蛋白溶液设立为阴性对照组并标记为N,也包被于酶标板上;将上述10组样在4℃下放置12h,然后用PBS7.4溶液洗涤三次,每次三分钟;

[0020] 4)向A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内分别加入100μL的牛血清白蛋白溶液,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为1%,溶剂为PBS 7.4缓冲液;之后用保鲜膜封板,在37℃下孵育2h,然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0021] 5)向A-1组的酶标板孔内分别加入100μL的3000倍稀释的辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体,所述稀释溶剂为质量浓度1%的牛血清白蛋白溶液,同时阴性对照组N的孔内加入100μL的PBS 7.4缓冲液代替抗体;将上述10组样品控制温度在37℃下孵育1h;然后用PBS7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0022] 6)向经步骤5)处理后A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内加底物液质量浓度为1%的四甲基联苯胺溶液80 μ L,置于黑暗处反应10min;再向各孔中加入1mol/L的H₂SO₄ 溶液80 μ L,终止反应;

[0023] 7)将步骤6)处理后的酶标板放置于酶标仪中,读取波长 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较实验组A-1与阴性对照组N测得的吸光度OD的值:

[0024] 若 $OD_{A-1}/OD_N > 2.1$,则证明所检测的溶液呈现阳性,

[0025] 若 $OD_{A-1}/OD_N \leq 2.1$,则证明所测得的溶液呈现阴性;

[0026] 通过阴阳性判断可以推测出丝素蛋白在标准土样中的检出限。

[0027] 实施例2采取步骤如下:

[0028] 1)缓冲溶液的配制:配制PBS 7.4缓冲液:称取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;配制pH 9.6的碳酸盐缓冲液:称取Na₂CO₃ 0.15g,NaHCO₃ 0.29g,用800mL蒸馏水溶解并定容至1000mL,调节pH至9.6;

[0029] 2)分别称取1g标准土样,按字母顺序标记为A-1共九组;按照分组依次加入1mL的丝素蛋白溶液;所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下放置2天;再按照分组依次加入99mL的丝素蛋白溶液,所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL,加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} ,所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液;将上述九组分别搅拌均匀,常温下静置2h;各组分别取上清液;

[0030] 3)将步骤2)获得的九组上清液分别取100 μ L包被于酶标板上;同时单独将 10^{-4}g/mL 、溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液的丝素蛋白溶液设立为阴性对照组并标记为N,也包被于酶标板上;将上述10组样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12h,然后用PBS7.4溶液洗涤三次,每次三分钟;

[0031] 4)向A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内分别加入150 μ L的牛血清白蛋白溶液,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为1%,溶剂为PBS 7.4缓冲液;之后用保鲜膜封板,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2h,然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0032] 5)向A-1组的酶标板孔内分别加入100 μ L的8000倍稀释的辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体,所述稀释溶剂为质量浓度1%的牛血清白蛋白溶液,同时阴性对照组N的孔内加入100 μ L的PBS 7.4缓冲液代替抗体;将上述10组样品控制温度在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h;然后用PBS7.4缓冲液洗涤三次,每次三分钟;

[0033] 6)向经步骤5)处理后A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内加底物液质量浓度为1%的四甲基联苯胺溶液100 μ L,置于黑暗处反应10min;再向各孔中加入1mol/L的H₂SO₄ 溶液100 μ L,终止反应;

[0034] 7)将步骤6)处理后的酶标板放置于酶标仪中,读取波长 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值;比较实验组A-1与阴性对照组N测得的吸光度OD的值:

[0035] 若 $OD_{A-1}/OD_N > 2.1$,则证明所检测的溶液呈现阳性,

[0036] 若 $OD_{A-1}/OD_N \leq 2.1$,则证明所测得的溶液呈现阴性;

[0037] 通过阴阳性判断可以推测出丝素蛋白在标准土样中的检出限。

[0038] 实施例3采取步骤如下:

[0039] 1)缓冲溶液的配制:配制PBS 7.4缓冲液:称取KCl 0.2g,KH₂PO₄ 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; 配制pH 9.6的碳酸盐缓冲液: 称取 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;

[0040] 2) 分别称取1g标准土样, 按字母顺序标记为A-1共九组; 按照分组依次加入1mL的丝素蛋白溶液; 所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL, 加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} , 所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液; 将上述九组分别搅拌均匀, 常温下放置3天; 再按照分组依次加入99mL的丝素蛋白溶液, 所述丝素蛋白溶液的浓度单位为g/mL, 加入量分别是为 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} , 所用溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液; 将上述九组分别搅拌均匀, 常温下静置2h; 各组分别取上清液;

[0041] 3) 将步骤2)获得的九组上清液分别取120 μL 包被于酶标板上; 同时单独将 10^{-5}g/mL 、溶剂为pH 9.6的碳酸盐缓冲液的丝素蛋白溶液设立为阴性对照组并标记为N, 也包被于酶标板上; 将上述10组样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12h, 然后用PBS 7.4溶液洗涤三次, 每次三分钟;

[0042] 4) 向A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内分别加入200 μL 的牛血清白蛋白溶液, 所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为1%, 溶剂为PBS 7.4缓冲液; 之后用保鲜膜封板, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2h, 然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次, 每次三分钟;

[0043] 5) 向A-1组的酶标板孔内分别加入100 μL 的10000倍稀释的辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体, 所述稀释溶剂为质量浓度1%的牛血清白蛋白溶液, 同时阴性对照组N的孔内加入100 μL 的PBS 7.4缓冲液代替抗体; 将上述10组样品控制温度在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h; 然后用PBS 7.4缓冲液洗涤三次, 每次三分钟;

[0044] 6) 向经步骤5)处理后A-1组及阴性对照组N的酶标板孔内加底物液质量浓度为1%的四甲基联苯胺溶液120 μL , 置于黑暗处反应10min; 再向各孔中加入1mol/L的 H_2SO_4 溶液120 μL , 终止反应;

[0045] 7) 将步骤6)处理后的酶标板放置于酶标仪中, 读取波长 $\lambda=450\text{nm}$ 处的吸光度数值; 比较实验组A-1与阴性对照组N测得的吸光度OD的值;

[0046] 若 $\text{OD}_{\text{A-1}}/\text{OD}_{\text{N}} > 2.1$, 则证明所检测的溶液呈现阳性,

[0047] 若 $\text{OD}_{\text{A-1}}/\text{OD}_{\text{N}} \leq 2.1$, 则证明所测得的溶液呈现阴性;

[0048] 通过阴阳性判断可以推测出丝素蛋白在标准土样中的检出限。

专利名称(译)	一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法		
公开(公告)号	CN104483476B	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201410848087.8	申请日	2014-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国丝绸博物馆		
申请(专利权)人(译)	中国丝绸博物馆		
当前申请(专利权)人(译)	中国丝绸博物馆		
[标]发明人	周昉 郑海玲 赵丰 王秉		
发明人	周昉 郑海玲 赵丰 王秉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535		
代理人(译)	朱枫		
其他公开文献	CN104483476A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种古代泥化丝织品模拟样的检测方法，利用直接酶联免疫的方法来检测古代泥化丝织品模拟样中的丝素蛋白成分，即将溶解后的模拟土样上清液包被到酶标板上，然后添加辣根过氧化酶标记的兔抗丝素蛋白抗体形成抗原抗体复合物。洗涤后加入四甲基联苯胺显色液，底物被酶催化为有色产物，根据颜色变化的深浅可进行定性分析。一方面，本方法灵敏度高、成本低，另一方面，本方法特异性强，操作简单，响应速度快，因此能够有效代替现有对古代泥化丝织品的检测方法。