



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108680405 A

(43)申请公布日 2018.10.19

(21)申请号 201810235676.7

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.03.21

(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928号

(72)发明人 王秉 李津 梁军龙 陈茹茹
李昊晖

(74)专利代理机构 浙江纳祺律师事务所 33257
代理人 郑满玉

(51)Int.Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/38(2006.01)

G01N 1/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

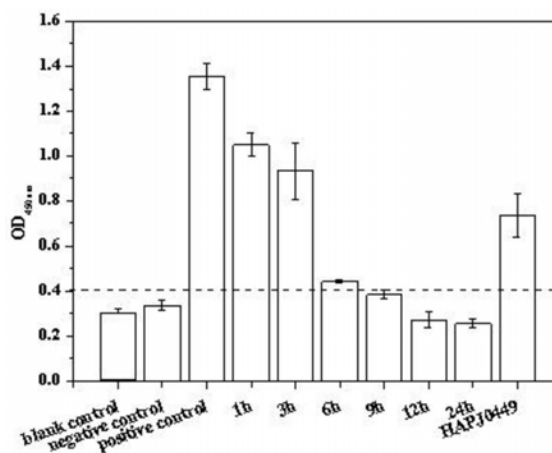
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法

(57)摘要

本发明公开的是一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,属于文物模拟领域,采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化,碱老化结束以后将PH调节为中性,对溶液进行过滤,透析,冷冻干燥,研磨等操作后,利用研磨所得的粉末进行间接ELISA实验,根据实验结果筛选出了最接近文物样的碱老化样,该样品在今后利用不同抗体对未知丝绸文物样进行检测时,可以作为文物样的替代样,用于抗体最佳稀释倍数的筛选和抗体特异性、灵敏度测试等实验,一定程度上解决了文物样在大量不同、重复实验中样品不足的问题。



1. 一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,其特征在于包括如下制备步骤:

A) 取10-15g桑蚕丝生丝置于烧杯中,加入1000-1500ml浓度为0.5%的 Na_2CO_3 溶液,在94-98℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,并重复进行一次上述操作,然后将烧杯中剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

B) 取1-1.5g步骤A)所得的桑蚕丝置于烧杯中,剪碎后加入100-150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

C) 将步骤B)所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4-6小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得碱老化3小时、6小时、9小时、12小时以及24小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

E) 分别取1-2mg步骤C)、步骤D)所制得的桑蚕丝素蛋白粉末以及研磨好的丝绸文物样,将其分别放入15ml的离心管中,每支离心管中加入10mlPH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液;

F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100 μl 步骤E)中所得包被液,所述酶标板中的每列加五个孔,该五个孔中均加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,其分别按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时,丝绸文物样的顺序完成布板;

G) 对步骤F)中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μl 的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μl 的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μl 的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μl 的兔抗丝素蛋白一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200 μl 的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μl 的HRP标记的山羊抗兔抗体,37℃下孵育1h;每孔加入200 μl 的pH7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μl 的TMB显色的剂A液,再加入50 μl 的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μl 的 H_2SO_4 终止反应,测试其在450nm处的吸光度,记为 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 。

2. 如权利要求1所述的一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,其特征在于,步骤E)中所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6。

3. 如权利要求1所述的一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,其特征在于,所述空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白一抗加入,所述阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,所述阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被。

4. 如权利要求1所述的一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,其特征在于,步骤G)中所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4。

一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种模拟丝绸文物样的方法,尤其涉及一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,属于文物模拟领域。

背景技术

[0002] 桑蚕丝是一种天然高分子蛋白质纤维,我国是最早养蚕缫丝织绸的国家,但桑蚕丝的起源问题一直笼罩在迷雾中。解决我国桑蚕丝起源的问题不仅仅是探索华夏文明起源的需要,而且也是为“我国是世界上公认的丝绸起源地”这一说法提供更加信服的证据。桑蚕丝的常规检测方法主要有傅里叶红外光谱、拉曼光谱、X-射线衍射等,但桑蚕丝长期处于墓葬或遗址环境中会受到多种因素影响,从而出现蛋白质降解及大分子链断裂等问题,采用传统的一些方法很难检测到丝素蛋白的存在。当前蛋白质检测的先进技术是基于抗体-抗原的ELISA法,目前已出现了桑蚕丝素蛋白的多克隆抗体,可以检测出含量较小的桑蚕丝素蛋白。但目前出土的丝织品表现方式主要以泥化丝织品为主,这类织物往往已经降解为短链纤维或者肽段,甚至降解为氨基酸等小分子,它们的微痕迹遗存于土壤中。而实验室能获得的土样一般仅有几克,从这些泥化样中提取出来的丝素蛋白往往只能满足一两次的ELISA实验。

发明内容

[0003] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,本发明方法利用氢氧化钠对桑蚕丝进行碱老化,筛选出了最接近文物样的碱老化样。该样品在今后利用不同抗体对未知丝绸文物样进行检测时,可以作为文物样的替代样,用于抗体最佳稀释倍数的筛选和抗体特异性、灵敏度测试等实验,一定程度上解决了文物样在大量不同、重复实验中样品不足的问题。

[0004] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法,包括如下制备步骤:

[0006] A) 取10-15g桑蚕丝生丝置于烧杯中,加入1000-1500ml浓度为0.5%的 Na_2CO_3 溶液,在94-98℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,并重复进行一次上述操作,然后将烧杯中剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0007] B) 取1-1.5g步骤A) 所得的桑蚕丝置于烧杯中,剪碎后加入100-150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0008] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4-6小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0009] D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得碱老化3小时、6小时、9小时、12小时以及24小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0010] E) 分别取1-2mg步骤C)、步骤D)所制得的桑蚕丝素蛋白粉末以及研磨好的丝绸文物样,将其分别放入15ml的离心管中,每支离心管中加入10mlPH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液;

[0011] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100 μ l步骤E)中所得包被液,所述酶标板中的每列加五个孔,该五个孔中均加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,其分别按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时,丝绸文物样的顺序完成布板;

[0012] G) 对步骤F)中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μ l的1wt%的牛血清蛋白溶液,37 $^{\circ}$ C下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的兔抗丝素蛋白一抗,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应,测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm}。

[0013] 作为一种改进,步骤E)中所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6。

[0014] 作为一种改进,所述空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白一抗加入,所述阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,所述阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被。

[0015] 作为一种改进,步骤G)中所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4。

[0016] 与现有技术对比本发明的有益效果:

[0017] 1) 采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化,与传统的湿热老化方法相比,达到相同老化程度所需时间极大缩短,从数月降低到数小时,且碱老化结束以后立刻将PH调节为中性,精确控制老化时间,若不调节PH,则会出现透析过程中样品被二次老化的情况,使实验的准确性和说服力下降,同时在碱老化过程中采用磁力搅拌器匀速搅拌,将脱胶后的桑蚕丝先剪碎再加入氢氧化钠溶液,可减少在搅拌过程中样品相互缠绕的程度,同时提高了老化的均匀程度,若不剪碎和搅拌,则容易出现样品老化不均匀的现象,使重复实验结果偏差较大;

[0018] 2) 采用的丝绸文物样已被鉴定来自桑蚕丝织物,并且相关实验均已完成,为残留的文物样,对此残留样再次利用,充分挖掘了样品的剩余价值;

[0019] 3) 选择出最接近文物样的碱老化样,该样品在今后利用不同抗体对未知丝绸文物样进行检测时,可以作为文物样的替代样,用于抗体最佳稀释倍数的筛选和抗体特异性、灵敏度测试等实验,一定程度上解决了文物样在大量不同、重复实验中样品不足的问题。

附图说明

[0020] 图1是本发明间接酶联免疫测试结果统计图。

具体实施方式

[0021] 以下通过具体的实施方式对本发明作进一步的说明,但本发明的实施方式并不受以下实施例的限制。

[0022] 如图1所示为本发明间接酶联免疫测试的结果统计图,其中HAPJ0449为文物样的数据,根据间接酶联免疫测试结果统计图,选择碱老化4小时左右的样品作为文物样的替代样品最佳,可进行相关实验。

[0023] 实施例1

[0024] A) 取10g桑蚕丝生丝于烧杯,加入1000ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在94℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作,将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0025] B) 取1g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯,剪碎后加入100ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0026] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0027] D) 根据步骤B) 和步骤C) 所述,继续分别制备碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末,加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间;

[0028] E) 分别取1mg步骤C)、步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末以及研磨好的丝绸文物样,将其分别放入放入15ml离心管中,每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液,所用的丝绸文物样由浙江丝绸博物馆提供,该文物样已被鉴定出是来自桑蚕丝织物,并且相关实验均已完成,为残留的文物样,所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6;

[0029] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100μl步骤E) 中所得包被液,每列加五个孔,这五个孔加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时,丝绸文物样的顺序完成布板,所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白一抗加入,阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被;

[0030] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200μl的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100μl的兔抗丝素蛋白一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100μl的HRP标记的山羊抗兔抗体,37℃下孵育1h;每孔加入200μl的pH 7.4缓冲

溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应。测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm},所述间接酶联免疫测试结果,选择最接近文物样的碱老化时间,作为以后模拟丝绸文物样的参考,所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4。

[0031] 实施例2

[0032] A) 取13g桑蚕丝生丝于烧杯,加入1300ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在96℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作。将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0033] B) 取1.3g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯,剪碎后加入130ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0034] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔5小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0035] D) 根据步骤B) 和步骤C) 所述,继续分别制备碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末,加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间;

[0036] E) 分别取1.5mg步骤C)、步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末以及研磨好的丝绸文物样,将其分别15ml离心管中,每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液,所用的丝绸文物样由浙江丝绸博物馆提供,该文物样已被鉴定来自桑蚕丝织物,并且相关实验均已完成,为残留的文物样,所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6;

[0037] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100 μ l步骤E) 中所得包被液,每列加五个孔,这五个孔加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时,丝绸文物样的顺序完成布板,所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白一抗加入,阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被;

[0038] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μ l的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的兔抗丝素蛋白一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37℃下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应。测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm},所述间接酶联免疫测试结果,选择最接近文物样的碱老化时间,作为以后模拟丝绸文物样的参考,所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法

为：称取0.27g磷酸二氢钾，1.42g磷酸氢二钠，8g氯化钠和0.2g氯化钾，加入到800mL去离子水中，然后混合搅拌直到全部溶解，用1000mL的容量瓶进行定容，调节溶液的pH为7.4。

[0039] 实施例3

[0040] A) 取15g桑蚕丝生丝于烧杯，加入1500ml的0.5%Na₂CO₃溶液，在98℃水浴中加热30min，倒掉烧杯中的溶液，重复进行一次上述操作。将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍，置于60℃的烘箱中烘干备用；

[0041] B) 取1.5g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯，剪碎后加入150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液，在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上，匀速搅拌1小时后，加入冰醋酸调节PH至7；

[0042] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤，用分子截留量为8000的透析袋进行透析，每隔6小时换一次水，透析3天后，将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨，得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末；

[0043] D) 根据步骤B) 和步骤C) 所述，继续分别制备碱老化3小时，6小时，9小时，12小时，24小时的桑蚕丝素蛋白粉末，加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间；

[0044] E) 分别取2mg步骤C)、步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末以及研磨好的丝绸文物样，将其分别放入15ml离心管中，每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液，震荡均匀后得到澄清的包被液，所用的丝绸文物样由浙江丝绸博物馆提供，该文物样已被鉴定出来自桑蚕丝织物，并且相关实验均已完成，为残留的文物样，所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液，其配制方法为：称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠，加入到800ml去离子水中，然后混合搅拌直到全部溶解，用1000ml的容量瓶进行定容，调节溶液的pH为9.6；

[0045] F) 取一块96孔酶标板，每孔加入100μl步骤E) 中所得包被液，每列加五个孔，这五个孔加入同一种包被液，列与列之间使用不同的包被液，按照空白对照，阴性对照，阳性对照，碱老化1小时，碱老化3小时，碱老化6小时，碱老化9小时，碱老化12小时，碱老化24小时，丝绸文物样的顺序完成布板，所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白一抗加入，阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被，阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被；

[0046] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试，其具体步骤为：每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤，每次2分钟，共洗涤3次，然后每孔加入200μl的1wt%的牛血清蛋白溶液，37℃下孵育2h，进行封闭处理；每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤，每次2分钟，共洗涤3次，然后每孔加入100μl的兔抗丝素蛋白一抗，37℃下孵育1h；每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤，每次2分钟，共洗涤3次，然后每孔加入100μl的HRP标记的山羊抗兔抗体，37℃下孵育1h；每孔加入200μl的pH 7.4缓冲溶液进行洗涤，每次2分钟，共洗涤5次，然后每孔加入50μl的TMB显色的剂A液，再加入50μl的TMB显色剂的B液，摇晃均匀，避光反应10min，然后每孔加入100μl的H₂SO₄终止反应，测试其在450nm处的吸光度，记为OD_{450nm}，所述间接酶联免疫测试结果，选择最接近文物样的碱老化时间，作为以后模拟丝绸文物样的参考，所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为：称取0.27g磷酸二氢钾，1.42g磷酸氢二钠，8g氯化钠和0.2g氯化钾，加入到800mL去离子水中，然后混合搅拌直到全部溶解，用1000mL的容量瓶进行定容，调节溶液的pH为7.4。

[0047] 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。

[0048] 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。

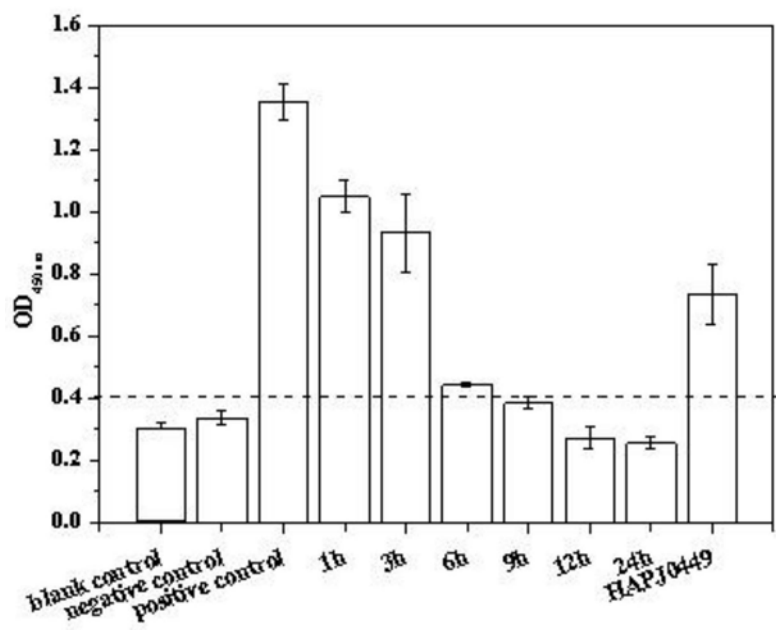


图1

专利名称(译)	一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法		
公开(公告)号	CN108680405A	公开(公告)日	2018-10-19
申请号	CN201810235676.7	申请日	2018-03-21
[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 李津 梁军龙 陈茹茹 李昊晖		
发明人	王秉 李津 梁军龙 陈茹茹 李昊晖		
IPC分类号	G01N1/28 G01N1/38 G01N1/44 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N1/28 G01N1/286 G01N1/38 G01N1/44 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/68 G01N2001/2866 G01N2001/2893 G01N2001/386		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开的是一种碱老化桑蚕丝模拟丝绸文物样的方法，属于文物模拟领域，采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化，碱老化结束以后将PH调节为中性，对溶液进行过滤，透析，冷冻干燥，研磨等操作后，利用研磨所得的粉末进行间接ELISA实验，根据实验结果筛选出了最接近文物样的碱老化样，该样品在今后利用不同抗体对未知丝绸文物样进行检测时，可以作为文物样的替代样，用于抗体最佳稀释倍数的筛选和抗体特异性、灵敏度测试等实验，一定程度上解决了文物样在大量不同、重复实验中样品不足的问题。

