



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109283332 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201811336715.9

G01N 27/447(2006.01)

(22)申请日 2018.11.11

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市江干区下沙高
教园区2号大街浙江理工大学

(72)发明人 古锦翠 王秉 尚亚廷 徐城锋

(74)专利代理机构 杭州永航联科专利代理有限
公司 33304

代理人 侯兰玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/561(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝
蛋白微痕迹的方法

(57)摘要

本发明涉及文物检测领域,公开了一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,本发明首先采用非传统方法将古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提出,然后利用非传统的Western Bolt技术进行古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的检测,利用特异性强的抗桑蚕丝素蛋白抗体,完成对样品的检测。本发明一方面优化了古遗址中蚕丝蛋白的提取,另一方面加大了所提取出的蚕丝蛋白浓度及检测信号,除此之外,采用“抗原抗”类似三明治结构技术,避免了因抗原浓度不足导致的假阴性结果,同时也提高了抗原与抗体的结合几率。方法简便,结果准确,本发明为分析古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提供了明确的指导方向。

1. 一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征包括以下步骤:

1) 取2.5-3.5mg古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,用乙醇水溶液对其常温浸泡25-35min,然后离心处理,移去上清液,下层物质于通风处晾干;

2) 向晾干后的样品中加入100-200 μ L的RIPA裂解液,震荡混匀,在60-70 $^{\circ}$ C下裂解10-20min,期间震荡3-5次;

3) 充分裂解后,向溶液中加入4-6wt%的NaCl溶液100-150 μ L,于-25 $^{\circ}$ C至-15 $^{\circ}$ C下静置8-12min析出蚕丝蛋白,离心处理;

4) 移上清液到另一离心管中,重复步骤3)至少两次,然后用乙醇水溶液分别洗涤多次离心后所得的蛋白沉淀,震荡均匀后将多个离心管内样品合为一管,离心处理,移去上清液,通风晾干;

5) 向步骤4)所得蛋白沉淀中加入1-2 μ L的DNA酶,1-2 μ L的RNA酶以及35-45 μ L体积比为1:7-9:1-3的CaCl₂:H₂O:ethanol溶液,于60-70 $^{\circ}$ C孵育8-12min,获得蚕丝蛋白微痕迹溶液;

6) 按重量比1:1-2向蚕丝蛋白微痕迹溶液中加入叠氮化合物缓冲液,在1-5 $^{\circ}$ C下轻微震荡过夜,得到叠氮化合物标记的蚕丝蛋白;

7) 在1mL的PBS缓冲液中加入1mg的NHS-三芳基磷,0.5mL的N,N-二甲基甲酰胺和20mg的HRP标记的羊抗兔抗体,将所得混合物室温震荡1-3h,然后过30kDa截留分子量的柱纯化,获得三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体;

8) 采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶;对抗桑蚕丝素蛋白抗体进行跑电泳测试,使用4-6 μ L未染marker作为蛋白分子量标准物,在浓缩胶中控制电压80v,在分离胶中控制电压120v,待溴酚蓝前沿到达凝胶底部停止电泳,在化学发光成像仪中可观察电泳结果;紧接着将电泳分离之后的抗体在300mA、冰水浴条件下50-70min转印到聚偏氟乙烯膜上,在化学发光成像仪中可观察转印结果;在室温摇床上使用20-30mL的0.4-0.6wt%的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯膜上的非特异性结合点,封闭时间控制在1-2h;待封闭结束后,使用步骤5)所获得的蚕丝蛋白微痕迹溶液点到聚偏氟乙烯膜上并室温孵育1-2h,使用标准的蚕丝蛋白溶液作为阳性对照,缓冲液作为阴性对照;孵育结束后,使用缓冲液洗涤2-4次,每次4-6min,紧接着加入20-30mL的三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体,保持在室温摇床上孵育1-2h,然后再次使用缓冲液洗涤2-4次,避光向聚偏氟乙烯膜上加入0.8-1.2mL显色液,反应4-6min后移至化学发光成像仪中观察免疫结果;

若检测到条带则证实所提取的样品由桑蚕丝制作而成,若没有检测到条带则说明所提取的样品不是由桑蚕丝制作而成。

2. 如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征包括,步骤1)中,所述乙醇水溶液浓度为70-80wt%,离心速率为500-1000r/min,离心时间为1-3min。

3. 如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征包括,步骤3)中,离心速率为10000-15000r/min,离心时间3-5min。

4. 如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征包括,步骤4)中,所述乙醇水溶液浓度为70-80wt%,离心速率为10000-15000r/min,离心时间3-5min。

5.如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征在于,步骤6)中,所述叠氮化合物缓冲液包括:20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,50mM的氯化钠,9mM的氯化锰和质量分数为1.5-2.5%的乙基苯基聚乙二醇。

6.如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征在于,步骤8)中,所述缓冲液由50mL的1M, pH=7.5的Tris • HCl, 8g NaCl, 0.2g KCl和0.5mL吐温混合后加蒸馏水定容至1L配制而成。

7.如权利要求1所述的一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,其特征在于,步骤8)中,采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶,首先将分离胶A液、分离胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按照1:1:0.01:0.001的重量比混合,注入搭好的两玻璃板之间,加入1mL异丙醇,置于37℃干燥箱中10min待分离胶凝固,倒掉异丙醇;然后将浓缩胶A液、浓缩胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按重量比1:1:0.01:0.002混合,注入两块玻璃板之间至液体溢出,最后将梳子插入两块玻璃板之间放于37℃干燥箱中10min备用。

一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及文物检测领域,尤其涉及一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法。

背景技术

[0002] 早在五六千年的新石器时代,中国便开始了采桑养蚕缫丝织绸了。距今5630年的新时期时代中期,位于河南清台村出土的罗织物被发现。距今4750年的新时期时代晚期,位于浙江湖州钱山漾的绢片和丝带被出土。公元1800-1900年,在大印度河文明流域发现了野蚕丝的存在。在漫长的历史进程中,这些古遗址中出土的随葬丝织品都已成残片,腐烂,碳化,有的甚至失去了实体面貌,降解成肽段和氨基酸,在肉眼下已经无法辨识。如何利用现代先进的自然科学手段,从古遗址中提取丝绸的信息,构建丝绸微痕迹检测体系,对丝绸的研究至关重要。

发明内容

[0003] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,本发明首先采用非传统的提取蚕丝蛋白的方法将古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提出,然后利用非传统的Western Bolt技术进行古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的检测,利用特异性强的抗桑蚕丝素蛋白抗体,完成对样品的检测,利用叠氮化合物和三芳基膦的高度特异性增大信号强度,从而判断所分析的样品是否由桑蚕丝制作而成。本发明采用Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,一方面优化了古遗址中蚕丝蛋白的提取,另一方面加大了所提取出的蚕丝蛋白浓度,除此之外,采用“抗原抗”类似三明治结构技术,避免了因抗原浓度不足导致的假阴性结果,同时也提高了抗原与抗体的结合几率。方法简便,结果准确,本发明为分析古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提供了明确的指导方向。

[0004] 本发明的具体技术方案为:一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,包括以下步骤:

[0005] 1) 取2.5-3.5mg古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,用乙醇水溶液对其常温浸泡25-35min,然后离心处理,移去上清液,下层物质于通风处晾干。

[0006] 2) 向晾干后的样品中加入100-200 μ L的RIPA裂解液,震荡混匀,在60-70 $^{\circ}$ C下裂解10-20min,期间震荡3-5次。

[0007] 3) 充分裂解后,向溶液中加入4-6wt%的NaCl溶液100-150 μ L,于-25 $^{\circ}$ C至-15 $^{\circ}$ C下静置8-12min析出蚕丝蛋白,离心处理。

[0008] 4) 移上清液到另一离心管中,重复步骤3) 至少两次,然后用乙醇水溶液分别洗涤多次离心后所得的蛋白沉淀,震荡均匀后将多个离心管内样品合为一管,离心处理,移去上清液,通风晾干。

[0009] 5) 向步骤4) 所得蛋白沉淀中加入1-2 μ L的DNA酶,1-2 μ L的RNA酶以及35-45 μ L体积比为1:7-9:1-3的CaCl₂:H₂O:ethanol溶液,于60-70 $^{\circ}$ C孵育8-12min,获得蚕丝蛋白微痕迹溶

液。

[0010] 6) 按重量比1:1-2向蚕丝蛋白微痕迹溶液中加入叠氮化合物缓冲液,在1-5℃下轻微震荡过夜,得到叠氮化合物标记的蚕丝蛋白;

[0011] 7) 在1mL的PBS缓冲液中加入1mg的NHS-三芳基磷,0.5mL的N,N-二甲基甲酰胺和20mg的HRP标记的羊抗兔抗体,将所得混合物室温震荡1-3h,然后过30kDa截留分子量的柱纯化,获得三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体;

[0012] 8) 采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶;对抗桑蚕丝素蛋白抗体进行跑电泳测试,使用4-6μL未染marker作为蛋白分子量标准物,在浓缩胶中控制电压80v,在分离胶中控制电压120v,待溴酚蓝前沿到达凝胶底部停止电泳,在化学发光成像仪中可观察电泳结果;紧接着将电泳分离之后的抗体在300mA、冰水浴条件下50-70min转印到聚偏氟乙烯膜上,在化学发光成像仪中可观察转印结果;在室温摇床上使用20-30mL的0.4-0.6wt%的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯膜上的非特异性结合点,封闭时间控制在1-2h;待封闭结束后,使用步骤5)所获得的蚕丝蛋白微痕迹溶液点到聚偏氟乙烯膜上并室温孵育1-2h,使用标准的蚕丝蛋白溶液作为阳性对照,缓冲液作为阴性对照;孵育结束后,使用缓冲液洗涤2-4次,每次4-6min,紧接着加入20-30mL的三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体,保持在室温摇床上孵育1-2h,然后再次使用缓冲液洗涤2-4次,避光向聚偏氟乙烯膜上加入0.8-1.2mL显色液,反应4-6min后移至化学发光成像仪中观察免疫结果;

[0013] 若检测到条带则证实所提取的样品由桑蚕丝制作而成,若没有检测到条带则说明所提取的样品不是由桑蚕丝制作而成。

[0014] 步骤8)中,不仅利用抗原抗体的特异性结合同时也利用叠氮化合物和三芳基磷的高度特异性,增加了检测结果的信号强度,将蚕丝蛋白微痕迹的微弱信号加大,更有利于蚕丝蛋白微痕迹的检测鉴定。

[0015] 作为优选,步骤1)中,所述乙醇水溶液浓度为70-80wt%,离心速率为500-1000r/min,离心时间为1-3min。

[0016] 作为优选,步骤3)中,离心速率为10000-15000r/min,离心时间3-5min。

[0017] 作为优选,步骤4)中,所述乙醇水溶液浓度为70-80wt%,离心速率为10000-15000r/min,离心时间3-5min。

[0018] 作为优选,步骤6)中,所述叠氮化合物缓冲液包括:20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,50mM的氯化钠,9mM的氯化锰和质量分数为1.5-2.5%的乙基苯基聚乙二醇。

[0019] 作为优选,步骤8)中,所述缓冲液由50mL的1M, pH=7.5的Tris·HCl, 8g NaCl, 0.2g KCl和0.5mL吐温混合后加蒸馏水定容至1L配制而成。

[0020] 作为优选,步骤8)中,采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶,首先将分离胶A液、分离胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按照1:1:0.01:0.001的重量比混合,注入搭好的两玻璃板之间,加入1mL异丙醇,置于37℃干燥箱中10min待分离胶凝固,倒掉异丙醇;然后将浓缩胶A液、浓缩胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按重量比1:1:0.01:0.002混合,注入两块玻璃板之间至液体溢出,最后将梳子插入两块玻璃板之间放于37℃干燥箱中10min备用。加入异丙醇的作用是使分离胶液面压平,减少不均匀的分离胶对样品电泳时产生的影响。

[0021] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:本发明首先采用非传统的提取蚕丝蛋白的方法将古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提出,利用盐析法析出样品中的蛋白质,然后对蛋白质

进行纯化和去除杂质的步骤,简单便捷的提取出所需的蚕丝蛋白,同时减少了对样品的损失。紧接着,本发明采用非传统的Western Bolt技术进行古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的检测,利用特异性强的抗桑蚕丝素蛋白抗体,完成对样品的检测,尤其使用叠氮化合物标记蛋白质,三芳基磷标记抗体,利用叠氮化合物和三芳基磷的高特异性增强了免疫信号强度,这对古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的信号检测尤为重要。另外,本发明使用“抗原抗”类似三明治结构体系完成western blot操作,在完成抗体的电泳后再孵育抗原,为抗原提供了充分的结合位点,使得微量蚕丝蛋白可以被高效结合,从而避免了因抗原浓度不足导致的假阴性结果。方法简便,结果准确,本发明为分析古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提供了明确的指导方向。

具体实施方式

[0022] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0023] 实施例1

[0024] 一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,包括以下步骤:

[0025] 1) 取3mg古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,用乙醇水溶液对其常温浸泡30min,然后离心处理,移去上清液,下层物质于通风处晾干;所述乙醇水溶液浓度为75wt%,离心速率为750r/min,离心时间为2min。

[0026] 2) 向晾干后的样品中加入150 μ L的RIPA裂解液,震荡混匀,在65℃下裂解15min,期间震荡4次;

[0027] 3) 充分裂解后,向溶液中加入5wt%的NaCl溶液125 μ L,于-20℃下静置10min析出蚕丝蛋白,离心处理;心速率为12500r/min,离心时间4min。

[0028] 4) 移上清液到另一离心管中,重复步骤3)两次,然后用乙醇水溶液分别洗涤多次离心后所得的蛋白沉淀,震荡均匀后将多个离心管内样品合为一管,离心处理,移去上清液,通风晾干;其中,所述乙醇水溶液浓度为75wt%,离心速率为2500r/min,离心时间4min。

[0029] 5) 向步骤4)所得蛋白沉淀中加入1.5 μ L的DNA酶,1.5 μ L的RNA酶以及40 μ L体积比为1:8:2的CaCl₂:H₂O:ethanol溶液,于65℃孵育10min,获得蚕丝蛋白微痕迹溶液;

[0030] 6) 按重量比1:1.5向蚕丝蛋白微痕迹溶液中加入叠氮化合物缓冲液,在4℃下轻微震荡过夜,得到叠氮化合物标记的蚕丝蛋白;所述叠氮化合物缓冲液包括:20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,50mM的氯化钠,9mM的氯化锰和质量分数为2%的乙基苯基聚乙二醇。

[0031] 7) 在1mL的PBS缓冲液中加入1mg的NHS-三芳基磷,0.5mL的N,N-二甲基甲酰胺和20mg的HRP标记的羊抗兔抗体,将所得混合物室温震荡2h,然后过30kDa截留分子量的柱纯化,获得三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体;

[0032] 8) 采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶;对抗桑蚕丝素蛋白抗体进行跑电泳测试,使用5 μ L未染marker作为蛋白分子量标准物,在浓缩胶中控制电压80v,在分离胶中控制电压120v,待溴酚蓝前沿到达凝胶底部停止电泳,在化学发光成像仪中可观察电泳结果;紧接着将电泳分离之后的抗体在300mA、冰水浴条件下60min转印到聚偏氟乙烯膜上,在化学发光成像仪中可观察转印结果;在室温摇床上使用25mL的0.5wt%的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯膜上的非特异性结合点,封闭时间控制在1-2h;待封闭结束后,使用步骤5)所获得的蚕丝蛋白微痕迹溶液点到聚偏氟乙烯膜上并室温孵育1.5h,使用标准的蚕丝蛋白溶液作为阳性对照,缓冲液(由50mL的1M, pH=7.5的Tris·HCl, 8g NaCl, 0.2g KCl和

0.5mL吐温混合后加蒸馏水定容至1L配制而成)作为阴性对照;孵育结束后,使用缓冲液洗涤3次,每次5min,紧接着加入25mL的三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体,保持在室温摇床上孵育1.5h,然后再次使用缓冲液洗涤3次,避光向聚偏氟乙烯膜上加入1mL显色液,反应4-6min后移至化学发光成像仪中观察免疫结果;

[0033] 若检测到条带则证实所提取的样品由桑蚕丝制作而成,若没有检测到条带则说明所提取的样品不是由桑蚕丝制作而成。

[0034] 其中,采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶,首先将分离胶A液、分离胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按照1:1:0.01:0.001的重量比混合,注入搭好的两玻璃板之间,加入1mL异丙醇,置于37℃干燥箱中10min待分离胶凝固,倒掉异丙醇;然后将浓缩胶A液、浓缩胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按重量比1:1:0.01:0.002混合,注入两块玻璃板之间至液体溢出,最后将梳子插入两块玻璃板之间放于37℃干燥箱中10min备用。

[0035] 实施例2

[0036] 一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,包括以下步骤:

[0037] 1) 取2.5mg古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,用乙醇水溶液对其常温浸泡25min,然后离心处理,移去上清液,下层物质于通风处晾干;所述乙醇水溶液浓度为70wt%,离心速率为500r/min,离心时间为3min。

[0038] 2) 向晾干后的样品中加入100μL的RIPA裂解液,震荡混匀,在60℃下裂解20min,期间震荡3次;

[0039] 3) 充分裂解后,向溶液中加入4wt%的NaCl溶液150μL,于-25℃下静置8min析出蚕丝蛋白,离心处理;心速率为10000r/min,离心时间5min。

[0040] 4) 移上清液到另一离心管中,重复步骤3)三次,然后用乙醇水溶液分别洗涤多次离心后所得的蛋白沉淀,震荡均匀后将多个离心管内样品合为一管,离心处理,移去上清液,通风晾干;其中,所述乙醇水溶液浓度为70wt%,离心速率为10000r/min,离心时间5min。

[0041] 5) 向步骤4)所得蛋白沉淀中加入1μL的DNA酶,1μL的RNA酶以及35μL体积比为1:7:1的CaCl₂:H₂O:ethanol溶液,于60℃孵育12min,获得蚕丝蛋白微痕迹溶液;

[0042] 6) 按重量比1:1向蚕丝蛋白微痕迹溶液中加入叠氮化合物缓冲液,在1℃下轻微震荡过夜,得到叠氮化合物标记的蚕丝蛋白;所述叠氮化合物缓冲液包括:20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,50mM的氯化钠,9mM的氯化锰和质量分数为1.5%的乙基苯基聚乙二醇。

[0043] 7) 在1mL的PBS缓冲液中加入1mg的NHS-三芳基磷,0.5mL的N,N-二甲基甲酰胺和20mg的HRP标记的羊抗兔抗体,将所得混合物室温震荡1h,然后过30kDa截留分子量的柱纯化,获得三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体;

[0044] 8) 采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶;对抗桑蚕丝素蛋白抗体进行跑电泳测试,使用4μL未染marker作为蛋白分子量标准物,在浓缩胶中控制电压80v,在分离胶中控制电压120v,待溴酚蓝前沿到达凝胶底部停止电泳,在化学发光成像仪中可观察电泳结果;紧接着将电泳分离之后的抗体在300mA、冰水浴条件下50min转印到聚偏氟乙烯膜上,在化学发光成像仪中可观察转印结果;在室温摇床上使用20mL的0.6wt%的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯膜上的非特异性结合点,封闭时间控制在1-2h;待封闭结束后,使用步骤5)所获得的蚕丝蛋白微痕迹溶液点到聚偏氟乙烯膜上并室温孵育1-2h,使用标准的蚕丝蛋

白溶液作为阳性对照,缓冲液(由50mL的1M, pH=7.5的Tris·HCl, 8g NaCl, 0.2g KCl和0.5mL吐温混合后加蒸馏水定容至1L配制而成)作为阴性对照;孵育结束后,使用缓冲液洗涤2-4次,每次4min,紧接着加入20mL的三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体,保持在室温摇床上孵育2h,然后再次使用缓冲液洗涤2次,避光向聚偏氟乙烯膜上加入0.8mL显色液,反应4min后移至化学发光成像仪中观察免疫结果;

[0045] 若检测到条带则证实所提取的样品由桑蚕丝制作而成,若没有检测到条带则说明所提取的样品不是由桑蚕丝制作而成。

[0046] 其中,采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶,首先将分离胶A液、分离胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按照1:1:0.01:0.001的重量比混合,注入搭好的两玻璃板之间,加入1mL异丙醇,置于37℃干燥箱中10min待分离胶凝固,倒掉异丙醇;然后将浓缩胶A液、浓缩胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按重量比1:1:0.01:0.002混合,注入两块玻璃板之间至液体溢出,最后将梳子插入两块玻璃板之间放于37℃干燥箱中10min备用。

[0047] 实施例3

[0048] 一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法,包括以下步骤:

[0049] 1) 取3.5mg古遗址中蚕丝蛋白微痕迹,用乙醇水溶液对其常温浸泡35min,然后离心处理,移去上清液,下层物质于通风处晾干;所述乙醇水溶液浓度为80wt%,离心速率为1000r/min,离心时间为1min。

[0050] 2) 向晾干后的样品中加入200μL的RIPA裂解液,震荡混匀,在70℃下裂解10min,期间震荡5次;

[0051] 3) 充分裂解后,向溶液中加入6wt%的NaCl溶液150μL,于-15℃下静置12min析出蚕丝蛋白,离心处理;心速率为15000r/min,离心时间3min。

[0052] 4) 移上清液到另一离心管中,重复步骤3)两次,然后用乙醇水溶液分别洗涤多次离心后所得的蛋白沉淀,震荡均匀后将多个离心管内样品合为一管,离心处理,移去上清液,通风晾干;其中,所述乙醇水溶液浓度为80wt%,离心速率为15000r/min,离心时间3min。

[0053] 5) 向步骤4)所得蛋白沉淀中加入2μL的DNA酶,2μL的RNA酶以及45μL体积比为1:9:3的CaCl₂:H₂O:ethanol溶液,于70℃孵育8min,获得蚕丝蛋白微痕迹溶液;

[0054] 6) 按重量比1:2向蚕丝蛋白微痕迹溶液中加入叠氮化合物缓冲液,在5℃下轻微震荡过夜,得到叠氮化合物标记的蚕丝蛋白;所述叠氮化合物缓冲液包括:20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,50mM的氯化钠,9mM的氯化锰和质量分数为2.5%的乙基苯基聚乙二醇。

[0055] 7) 在1mL的PBS缓冲液中加入1mg的NHS-三芳基磷,0.5mL的N,N-二甲基甲酰胺和20mg的HRP标记的羊抗兔抗体,将所得混合物室温震荡3h,然后过30kDa截留分子量的柱纯化,获得三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体;

[0056] 8) 采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶;对抗桑蚕丝素蛋白抗体进行跑电泳测试,使用6μL未染marker作为蛋白分子量标准物,在浓缩胶中控制电压80v,在分离胶中控制电压120v,待溴酚蓝前沿到达凝胶底部停止电泳,在化学发光成像仪中可观察电泳结果;紧接着将电泳分离之后的抗体在300mA、冰水浴条件下70min转印到聚偏氟乙烯膜上,在化学发光成像仪中可观察转印结果;在室温摇床上使用30mL的0.4wt%的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯膜上的非特异性结合点,封闭时间控制在2h;待封闭结束后,使用步骤5)

所获得的蚕丝蛋白微痕迹溶液点到聚偏氟乙烯膜上并室温孵育2h,使用标准的蚕丝蛋白溶液作为阳性对照,缓冲液(由50mL的1M,pH=7.5的Tris·HCl,8g NaCl,0.2g KCl和0.5mL吐温混合后加蒸馏水定容至1L配制而成)作为阴性对照;孵育结束后,使用缓冲液洗涤4次,每次4min,紧接着加入30mL的三芳基磷标记与HRP标记的羊抗兔抗体,保持在室温摇床上孵育2h,然后再次使用缓冲液洗涤4次,避光向聚偏氟乙烯膜上加入1.2mL显色液,反应6min后移至化学发光成像仪中观察免疫结果;

[0057] 若检测到条带则证实所提取的样品由桑蚕丝制作而成,若没有检测到条带则说明所提取的样品不是由桑蚕丝制作而成。

[0058] 其中,采用TGX快速免染制胶试剂盒制备SDS-PAGE凝胶,首先将分离胶A液、分离胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按照1:1:0.01:0.001的重量比混合,注入搭好的两玻璃板之间,加入1mL异丙醇,置于37℃干燥箱中10min待分离胶凝固,倒掉异丙醇;然后将浓缩胶A液、浓缩胶B液、10%APS、四甲基乙二胺按重量比1:1:0.01:0.002混合,注入两块玻璃板之间至液体溢出,最后将梳子插入两块玻璃板之间放于37℃干燥箱中10min备用。

[0059] 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。

[0060] 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。

专利名称(译)	一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法		
公开(公告)号	CN109283332A	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201811336715.9	申请日	2018-11-11
[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 尚亚廷 徐城锋		
发明人	古锦翠 王秉 尚亚廷 徐城锋		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/535 G01N33/532 G01N33/68 G01N21/76 G01N27/447		
CPC分类号	G01N33/561 G01N21/76 G01N27/44726 G01N27/44747 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及文物检测领域，公开了一种基于Western Bolt测定古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的方法，本发明首先采用非传统方法将古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提出，然后利用非传统的Western Bolt技术进行古遗址中蚕丝蛋白微痕迹的检测，利用特异性强的抗桑蚕丝素蛋白抗体，完成对样品的检测。本发明一方面优化了古遗址中蚕丝蛋白的提取，另一方面加大了所提取出的蚕丝蛋白浓度及检测信号，除此之外，采用“抗原抗”类似三明治结构技术，避免了因抗原浓度不足导致的假阴性结果，同时也提高了抗原与抗体的结合几率。方法简便，结果准确，本发明为分析古遗址中蚕丝蛋白微痕迹提供了明确的指导方向。