



山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的制备及应用

徐 冰, 李艺畅, 张 超, 王 秉

(浙江理工大学材料科学与工程学院, 杭州 310018)

摘 要: 为检测古代皮革文物, 制备了一种山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸。通过设计制备胶原蛋白多克隆抗体, 并采用胶体金作为示踪物对抗体进行标记, 利用免疫反应完成后产生的颜色变化检测山羊皮革胶原蛋白; 优化胶体金标记抗体的最适 pH 和最佳抗体标记量, 利用不同浓度的山羊皮革胶原蛋白溶液分析了试纸的灵敏度, 选用 7 种抗原分析了试纸的特异性。结果表明: 在胶体金标记抗体的 pH 值 8、抗体标记量为 48 $\mu\text{g/mL}$ 时, 所制备的快速检测试纸对山羊皮革胶原蛋白的检出限 (Limit of detection, LOD) 可达 800 ng/mL, 15 min 内可获得检测结果, 并且具有优异的特异性, 能有效排除一些干扰蛋白的影响, 精准鉴别山羊皮制文物。该研究可为古蛋白文物考古现场快速检测研究提供新思路。

关键词: 古代皮革文物; 胶原蛋白多克隆抗体; 胶体金; 快速检测试纸; 考古现场

中图分类号: TS195.644

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2025) 03-0214-07

引文格式: 徐冰, 李艺畅, 张超, 等. 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的制备及应用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2025, 53(2): 214-220.

Reference Format: XU Bing, LI Yichang, ZHANG Chao, et al. Preparation and application of an assay strip for the rapid detection of collagen in goat leather[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(2): 214-220.

Preparation and application of an assay strip for the rapid detection of collagen in goat leather

XU Bing, LI Yichang, ZHANG Chao, WANG Bing

(College of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech
University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To detect ancient leather artifacts, a test strip for rapid collagen detection in goat leather was prepared. The collagen polyclonal antibody was prepared by design, and colloidal gold was used as a tracer to label the antibody, and the colour change produced after the completion of the immune reaction was used to detect goat leather collagen. The optimum pH and the optimum amount of colloidal gold-labelled antibody were optimized, the sensitivity of the test strip was analyzed by using different concentrations of goat leather collagen solutions, and the specificity of the test strip was analyzed by choosing seven kinds of antigens. The results showed that when the pH value of colloidal gold-labeled antibody was 8 and the labelled amount of antibody was 48 $\mu\text{g/mL}$, the limit of detection (LOD) of the prepared rapid detection test strip for goat leather collagen could reach 800 ng/mL, and the detection results could be obtained within 15 min. The test strip had excellent specificity, could effectively eliminate the influence of some interfering proteins and accurately identify goat skin artifacts. This study offers a new approach for the rapid detection of ancient protein artifacts at archaeological sites.

Key words: ancient leather artifacts; collagen polyclonal antibody; colloidal gold; rapid test strip; archaeological site

收稿日期: 2024-04-13 网络出版日期: 2024-07-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFF0904100); 国家自然科学基金项目 (52273096)

作者简介: 徐 冰 (1997—), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 主要从事纺织品文物考古方面的研究。

通信作者: 王 秉, E-mail: wbing388@163.com

0 引言

在丝、麻、棉等纤维材料出现之前,皮革就已广泛应用于人类的服饰^[1]。《礼记·礼运》记载了古代人们“未有丝麻,衣其羽皮”的情形。《后汉书·舆服志》中也提到,“上古穴居而野处,衣毛而冒皮”。然而,由于受到埋藏环境的长期影响,在光、热、水汽和微生物等作用下,大多数皮革文物在出土时就已腐烂不堪,失去了原有的形态^[2-3]。

传统的皮革文物鉴定方法主要包括光学显微镜、扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱和核磁共振波谱法等^[4]。光学显微镜和扫描电子显微镜可以简单评估皮革文物的外观和结构特征,但对于保存不佳、特征模糊的文物样品,实现准确的种属鉴定仍然困难^[5-6]。傅里叶变换红外光谱法可通过测量样品对红外辐射的吸收,确定皮革的组成成分(如蛋白质、脂肪、胶原等);但对于劣化严重的样品,可供分析的成分较少,导致光谱信号弱,难以获得清晰的谱图,因而结果的可靠性和准确性不高^[7-8]。核磁共振波谱法利用核磁共振现象来测量样品中核子的磁共振频率,获取皮革中的蛋白质结构、水分含量与有机物含量等信息^[9];但对于劣化严重的样品,可能存在多种有机物质或分解产物,导致核磁共振波谱图中信号重叠,难以准确识别^[10-11]。此外,上述方法所需的仪器体积大、操作复杂,不利于考古现场应用^[12-13]。因此,急需新的、更快速、更便捷和更准确的皮革文物鉴定方法^[14-15]。

本文以山羊皮革胶原蛋白特征序列“TPEVDKEALEK”为半抗原,制备了特异性抗体(anti-BLG-goat),利用金纳米颗粒将该抗体标记形成探针,制备了山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸;通过优化胶体金溶液的 pH 值、抗体的标记量等关键因素来提高试纸的特异性和灵敏度。该试纸具有操作简单、快速便捷、灵敏度高等特点,为传统方法无法现场快速检测皮革制文物的难题提供了一个可行的解决方案,因此在皮革制品考古领域具有良好的应用前景。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

四硼酸钠十水合物($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)、四氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、浓硫酸(H_2SO_4)、氯化钾(KCl)、

蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)、氯化钠(NaCl)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)和聚乙二醇 20000(PEG-20000)均购自上海麦克林生化科技有限公司,吐温-20(Tween 20)购自杭州高晶精细化工有限公司。山羊抗兔抗体(IgG-HRP)、显色液(TMB)、血蓝蛋白(KLH)、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)均购自杭州华安生物技术有限公司,牛血清白蛋白(BSA)、人血白蛋白(HSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、胶原蛋白(BAT)和胶原蛋白(pigskin)均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 仪器

电子分析天平(FA604B,上海精密仪器仪表有限公司);恒温培养箱(ZHS-100SC,上海喆图科学仪器有限公司);型纯水仪(MILLI-Q® IQ7003/7005,美国密理博);中速切割机(DK7740CT,三星机械);金标检测仪(MD-1000,南京微测生物科技有限公司);台式喷金划膜机(GA-RFDS-001,常州普天仪器制造有限公司);高速离心机(JXN-30,贝克曼库尔特);紫外分光光度计(UV752 N,青岛路扬环保科技有限公司);透射电子显微镜(FESEM,日本电子);超声波清洗器(KQ-250DE,杭州格伦坤科技有限公司);纳米粒度电位仪(ZS90,英国马尔文帕纳科有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗体的制备

通过蛋白质组学筛选出山羊胶原蛋白的特征氨基酸序列“TPEVDKEALEK”。通过多肽合成器合成相应序列的肽段,随后将多肽偶联至载体蛋白(血蓝蛋白)上制备免疫原。将 1 mg 的免疫原溶解于 10 mL PBS 中,与预先准备好的完全弗氏佐剂按 1:1 的体积比充分混合,加入 50 μL 乳化剂(吐温-20)对免疫原和佐剂的混合物进行乳化,并将乳化后的混合物低温保存。

选用新西兰成年兔子,每只重约 2.5 kg。初次免疫时,将所制备的乳化后的混合物通过多点皮下注射给兔子,每次注射剂量约为 500 μL ;每隔 1 周使用不完全弗氏佐剂对兔子进行加强免疫,其他条件同第一次免疫,加强免疫共持续 4 周。采集兔子的血液样本,分离血清供后续分析和检测,对采集的血清样本,通过间接 ELISA 法进行抗体效价检测,选择效价最高的免疫动物进行多次加强免疫,来增加抗体的产量。采用免疫亲和层析技术对抗体进行纯化,并将纯化后的抗体置于低温冷冻冰箱备用。

1.2.2 胶体金溶液的制备

将 100 mL 超纯水加热至沸点,然后在连续搅拌下加入 4 mL 质量分数为 1% $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。在沸腾温度下加入 5 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液后,继续搅拌反应溶液,直至颜色变为稳定的酒红色,再搅拌 15 min,并在室温下冷却,获得稳定的胶体金溶液,收集溶液低温避光保存。

1.2.3 金标抗体复合物的制备

将 2 mL 胶体金溶液加入 5 mL 离心管中,通过 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节至 pH 值 8,室温下搅拌摇匀,逐滴加入 48 μL anti-BLG-goat,缓慢搅拌孵育 1 h;缓慢加入 500 μL 质量分数为 10.0% 的 BSA,继续孵育 1 h;再缓慢加入 100 μL 质量分数为 5.0% 的 PEG-20000,并继续搅拌反应 45 min;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 8000 r/min 的转速将收集的上清液离心

30 min,离心完成后使用金标抗体重悬缓冲液重悬沉淀,低温避光储存。

1.2.4 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的制备

将样品垫和金标垫分别置于相应的处理液中浸泡 1 h,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中干燥 3 h,并取出密封备用;使用喷金划膜机将金标抗体复合物(Au NPs-Ab)以 4 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷量喷涂到干燥处理后的结合垫上,在室温下干燥备用;将 BLG-goat(1.5 mg/mL)和山羊抗兔 IgG(1.0 mg/mL)分别喷洒在 NC 膜上,作为测试(T)线和质控(C)线,并在室温下干燥。室温下干燥膜的目的是将蛋白质或蛋白质复合物固定并稳定在 NC 膜上;将涂布的膜附着在 PVC 底板上,将吸水垫附着在 NC 膜的上方,并覆盖 NC 膜 2 mm,金标垫粘贴在 NC 膜的下方,覆盖 NC 膜 1 mm,山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸示意图如图 1 所示。

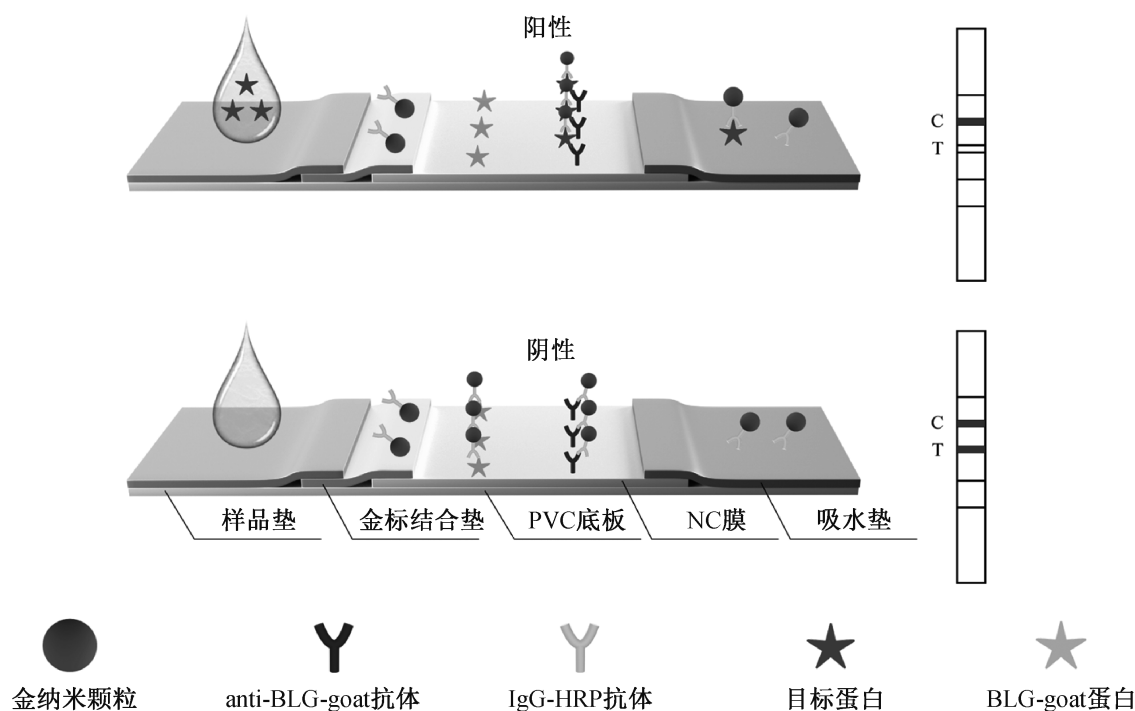


图 1 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的示意图

1.2.5 胶体金标记多克隆抗体的条件优化

a)最适标记 pH 值。将事先标记好的 2 mL 离心管中加入 1.0 mL 所制备的胶体金溶液,并分别向每个离心管中缓慢滴加不同体积的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液,在旋涡仪上充分混合均匀,并使用 pH 计进行读数测量;再向每个离心管中分别添加 50 μL 制备的 anti-BLG-goat(1.0 mg/mL),充分混匀后静置 10 min,将混合液进行低温离心,并收集上清液。

b)最适抗体用量选择。将已调节至最适标记 pH 值的胶体金溶液加入事先标记好的 2 mL 离心管,依次加入不同体积的 anti-BLG-goat(1.0 mg/

mL),充分混匀后静置 15 min。静置结束后,分别加入 200 μL 质量分数为 10% NaCl 溶液,充分混匀后静置 10 min;随后将静置完的混合液低温离心,并收集上清液;使用紫外分光光度计在 520 nm 波长处对上清液进行光度测量。

1.2.6 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的性能检测及应用

a)灵敏度检测。用 PBS 缓冲液稀释 BLG-goat 多肽粉末,配制成一系列不同质量浓度的胶原蛋白溶液(0、100、200、300、400、500、600、700、800 ng/mL 和 900 ng/mL);取 100 μL 每种浓度的溶液滴加至试纸的样品垫处,静置 15 min;通过肉眼观察

不同浓度之间的显色差异,并借助金标读卡仪读取 T 线和 C 线的显色强度,重复 3 次,并记录实验结果。

b) 特异性检测。选取牛血清蛋白(BSA)、丝素蛋白(SF)、鸡卵清蛋白(OVA)、人血白蛋白(HSA)、胶原蛋白(BAT)、和胶原蛋白(pigskin)为干扰蛋白进行特异性测试,并以 PBS 缓冲液作为空白对照。将 BLG-goat 多肽粉末和上述干扰蛋白分别溶解于 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH 值 9.6)中,配置成质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测溶液;取每个待测溶液 100 μL 滴加至试纸样品垫处,静置 15 min,通过肉眼观察不同浓度之间的显色差异,并借助金标读卡仪读取 T 线和 C 线的显色强度,实验重复 3 次,并记录结果。

c) 文物样品的检测。由于文物样的珍贵性,每种文物样品仅称取 2 mg。文物样品经过去离子水与乙醇清洗,烘干置于碳酸盐缓冲液中溶解并在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下加热 30 min,待溶液冷却至室温后转移至透析袋(截留分子量为 5000 Da)中,透析 12 h,期间每隔 2 h 更换一次水;透析完成后,取出溶液 100 μL 滴加至试纸上,静置 15 min 后观察显色情况并拍照记录。

2 结果与讨论

2.1 胶体金与胶原蛋白多克隆抗体偶联 pH 优化

使用紫外分光光度计对低温离心收集的上清液在波长范围 400~600 nm 内进行光谱扫描,结果如图 2 所示。图 2 显示:在 pH 值为 6 的上清液中,复合物的吸光度最低,这可能是由于在该 pH 值下 AuNPs 发生聚集导致的;随着 pH 值的增加,聚集现象逐渐消失,吸光度也相应增加。当 pH 值为 8 时,溶液的吸光度达到最大值,表明在该 pH 值下胶体金的稳定性最高,同时也更有利于 AuNPs-Ab 复合物的合成;随着 pH 值继续升高,溶液的吸光度开始下降,这可能是由于过高的碱性环境破坏了胶体金的稳定性;因此,选择 pH 值 8 作为最适标记 pH 值。

2.2 胶体金与胶原蛋白多克隆抗体偶联量优化

使用紫外分光光度计对低温离心收集的上清液在 520 nm 波长处光度测量结果如图 3 所示。由图 3 可知:当 anti-BLG-goat 抗体添加量为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其紫外吸收光谱吸光度值达到最大;继续增加抗体用量,吸光度基本稳定在约 0.9,不再发生显著变化,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 被确定为最适抗体标记用量;在此基

础上增加 20%,获得稳定胶体金溶液的实际用量。综上可知,本文最适抗体标记量为 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

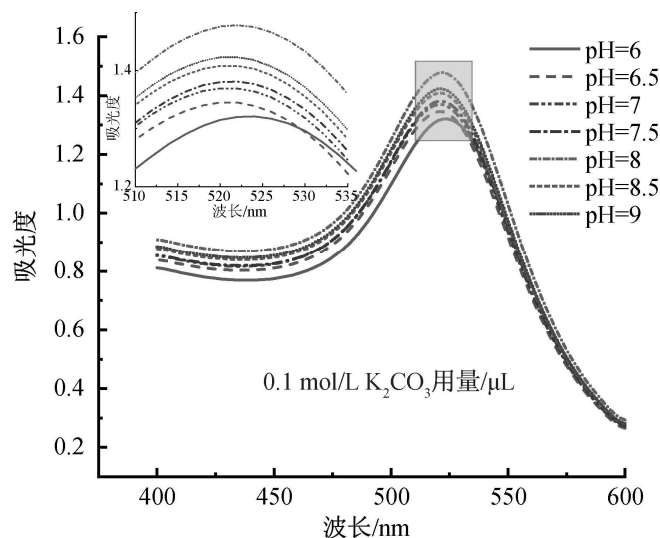


图 2 不同 pH 值的金标抗体复合物紫外吸收光谱图

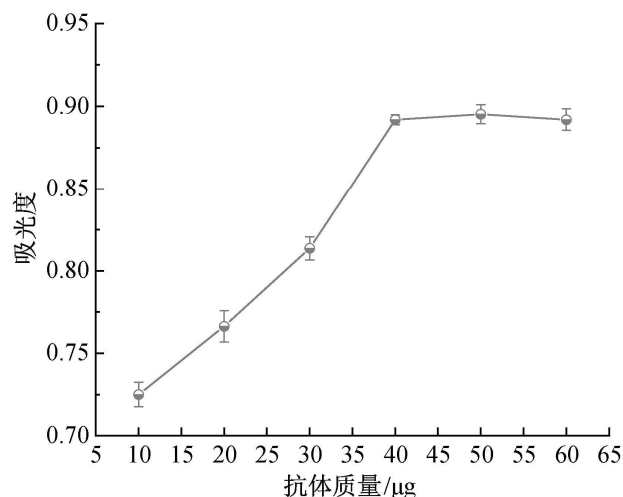


图 3 不同抗体用量的金标抗体复合物紫外吸收光谱图

2.3 胶体金标记抗体复合物的鉴定

胶体金颗粒与抗体偶联前后的紫外可见吸收光谱如图 4(a)所示。图 4(a)显示:胶体金溶液的最大吸收峰位于 518 nm,而抗体偶联后的最大吸收峰位于 526 nm,偶联前后的吸光值和吸收峰都发生了明显变化,其原因可能是抗体的氨基是发色团,被吸附到胶体金颗粒表面后会导致吸收带的最大吸收峰波长红移;吸附抗体后的胶体金颗粒尺寸也会发生变化,进一步影响紫外吸光度和吸收峰峰宽。为进一步验证金标抗体复合物是否成功制备,采用纳米粒度电位仪对胶体金及金标抗体复合物进行了检测,结果如图 4(b)所示。图 4(b)表明:胶体金标记抗体前的电位约为 -37 mV,这是由于在不同的 pH 值下,金纳米颗粒表面的电荷密度会发生变化,从而影响其 Zeta 电位;当带有正电荷的抗体吸附到带有负电荷的金颗粒表面后,颗粒表面的负电位减少,整体电位下降至约 -10 mV,进一步证明金标抗体复合物的成功制备。

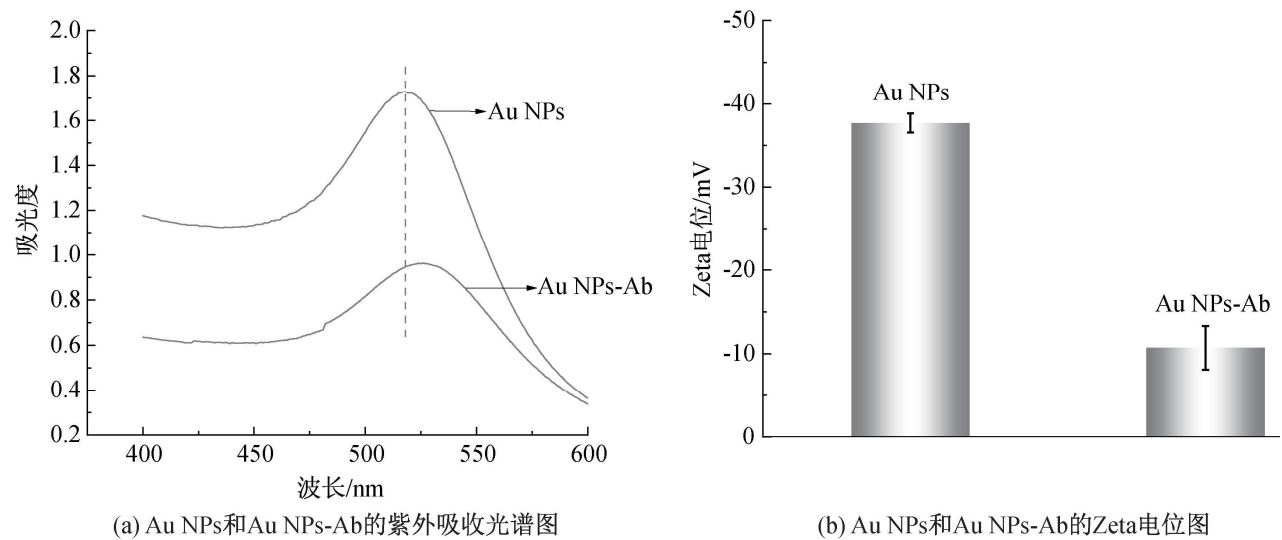
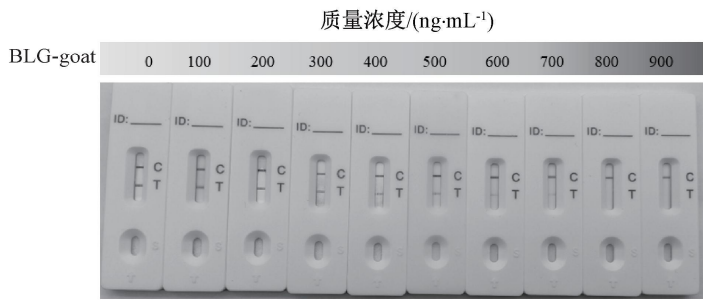


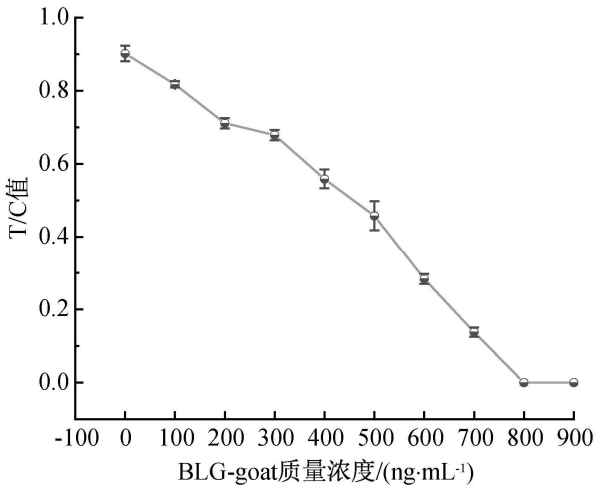
图 4 金标抗体复合物的鉴定

2.4 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的灵敏度分析

通过肉眼观察试纸检测不同浓度胶原蛋白溶液后 T 线的显色差异,结果如图 5(a)所示。图 5(a)显示:随着样品中 BLG-goat 质量浓度从 0 增加至 700 ng/mL,试纸 T 线的显色强度逐渐降低;当样品中的 BLG-goat 质量浓度达到 800 ng/mL 时,T 线的颜色完全消失,呈现阳性结果;随后继续增加样品质量浓度,仍然观察到阳性结果。因此,将样品质量浓度 800 ng/mL 视为检出限。再将不同质量浓度下的试纸放置于金标读卡仪中,采用消线法检测



(a) 试纸检测结果



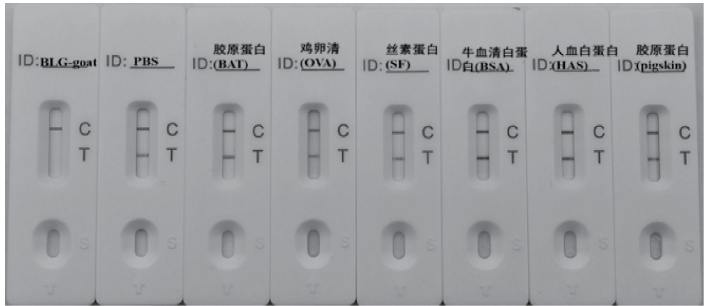
(b) 金标读卡仪 T/C 值扫描曲线

图 5 试纸的灵敏度检测

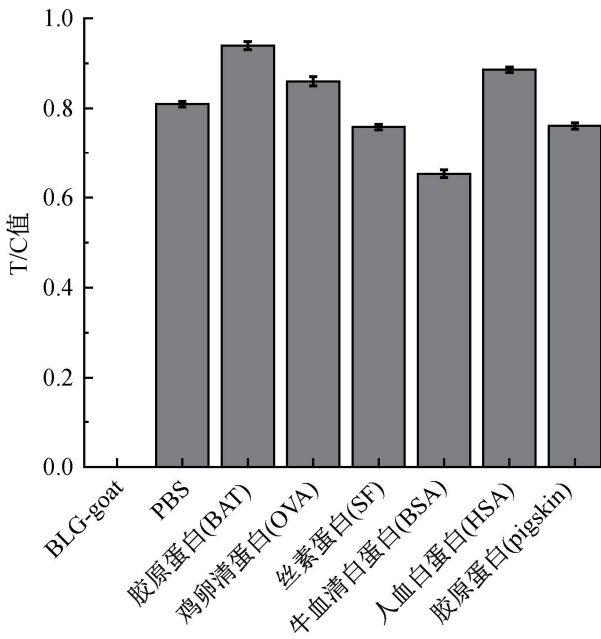
模式进行测试,结果如图 5(b)。从图 5(b)可以看出:随着样品中 BLG-goat 质量浓度的增加,其相对显色强度比值(T/C 值)逐渐降低,曲线整体呈现负增长趋势。综上所述,本文制备的试纸具有较好的灵敏性。

2.5 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的特异性分析

试纸的特异性检测结果 6 所示。图 6 显示:



(a) 试纸检测结果



(b) 金标读卡仪 T/C 值柱状图

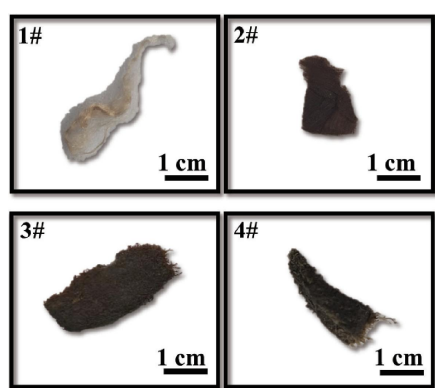
图 6 试纸的特异性检测

当山羊皮革胶原蛋白与T线处固定的抗原竞争结合金标抗体复合物探针时,导致T线不显色,T/C值为0,呈阳性结果;其他干扰蛋白在层析作用下,金标抗体复合物溶解释放,并被T线处的竞争抗原捕获,T线显色强度较高,T/C值显著增大,呈阴性结果。以上结果表明,本文制备的试纸具有优异的特异性。

2.6 山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸在文物样品测试中的应用

文物样品照片如图7(a)所示,其中:1#为江苏无锡明代钱氏墓的龟背万字纹缎残片,2#为安吉五福楚墓的镜衣绢残片,3#为内蒙古辽驸马墓的皮革残片,4#为新疆小河墓地的皮革残片。利用所制备的山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸对上述4种文物

样品进行测试,结果如图7(b)所示。图7(b)显示:4种文物样品中的1#、2#和4#样品的T线和C线均显色呈现2道杠,为阴性结果,而3#样品的T线不显色,只有C线显色呈现一道杠,为阳性结果。这是因为1#、2#和4#样品中并不含有山羊皮革胶原蛋白,因此不与T线上的蛋白竞争,导致试纸结果为两道杠。3#样品中含有山羊皮革胶原蛋白,溶液中的目标蛋白与T线上的蛋白竞争结合,使得T线不显色而只有C线显色,呈现阳性结果。综上所述,1#和2#样品均不是皮革文物,因此无法被试纸检测出来。4#样品虽然也是皮革样品,但不是山羊皮鞣制成的,而是其他动物的皮鞣制而成,因此也无法被试纸检测出来,3#样品主要是由山羊皮鞣制而成,可以被试纸条检测出来。



(a) 文物样品照片



(b) 试纸检测结果

图7 文物样品照片及试纸检测结果

3 结论

为检测山羊皮革制文物,本文设计了一种山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸,通过制备胶原蛋白多克隆抗体,并采用胶体金作为示踪物对抗体进行标记,利用免疫反应完成后产生的颜色变化检测山羊皮革胶原蛋白,主要结论如下:

a)山羊皮革胶原蛋白快速检测试纸的最低检出限达800 ng/mL,只需15 min可得到检测结果,可以实现对山羊皮革胶原蛋白的定性检测。

b)试纸对于山羊皮革制品的检测具有良好的特异性,可以鉴定皮革文物的物种来源属于山羊。

参考文献:

- [1] 张勇剑, 席琳, 胡晓军, 等. 青海哇沿水库出土皮革文物保护修复[J]. 草原文物, 2019(1): 103-114.
- [2] 宋晓东, 张亭亭. 国内皮质文物保存与保护研究[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 2017, 33(5): 93-96.
- [3] 何露, 陈武勇. 中国古代皮革及制品历史沿革[J]. 西部皮革, 2011, 33(24): 43-45.

- [4] 张杨, 龚德才. 现代仪器分析技术在皮质文物保护中的应用[J]. 文物保护与考古科学, 2020, 32(3): 111-117.
- [5] Zhang Y, Chen Z, Liu X, et al. SEM, FTIR and DSC investigation of collagen hydrolysate treated degraded leather[J]. Journal of Cultural Heritage, 2021, 48(2): 205-210.
- [6] Bernath A, Miu L, Guttman M. Identifications, microanalysis, evaluations and diagnosis of an ethnographical leather object[C]// Proceedings of the 9th International Conference on NDT of Art. Jerusalem Israel. German: Annual Meeting of the German Society, 2008(5): 25-30.
- [7] Braz C, Jacinto M, Pereira-Filho E, et al. Potential of near-infrared spectroscopy for quality evaluation of cattle leather[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 202: 182-186.
- [8] Yang Z, Chen Z, Wang C, et al. Studies of structure changes of archeological leather by FTIR spectroscopy[J]. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 2018, 102(5): 262-267.
- [9] Bardet M, Gerbaud G, Le Pape L, et al. Nuclear magnetic resonance and electron paramagnetic resonance as analytical tools to investigate structural features of archaeological leathers[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(4): 1505-1511.

- [10] Rosu L, Varganici C, Crudu A, et al. Influence of different tanning agents on bovine leather thermal degradation [J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2018, 134(1): 583-594.
- [11] Li L, Zhang M. The efficient extraction method of collagen from deteriorated leather artifacts [J]. *Polymers*, 2023, 15(16): 3459.
- [12] Cucos A, Budrugaac P, Miu L. DMA and DSC studies of accelerated aged parchment and vegetable-tanned leather samples [J]. *Thermochimica Acta*, 2014, 583: 86-93.
- [13] Carşote C, Badea E, Miu L, et al. Study of the effect of tannins and animal species on the thermal stability of vegetable leather by differential scanning calorimetry [J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2016, 124(3): 1255-1266.
- [14] Xia N, Chen Z, Liu Y, et al. Peptide aptamer-based biosensor for the detection of human chorionic gonadotropin by converting silver nanoparticles-based colorimetric assay into sensitive electrochemical analysis [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 243: 784-791.
- [15] Xia N, Deng D, Yang S, et al. Electrochemical immunosensors with protease as the signal label for the generation of peptide-Cu(II) complexes as the electrocatalysts toward water oxidation [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 291: 113-119.

(责任编辑:廖乾生)