RESEARCH PAPER

Development of an enzyme-linked-immunosorbent-assay technique for accurate identification of poorly preserved silks unearthed in ancient tombs

Qin Zheng[1] · Xiaofeng Wu[1] · Hailing Zheng[2] · Yang Zhou[2]

Rece ed: 15 N e be 2014 / Re ed: 4 Ma c 2015 / Acce ed: 4 Ma c 2015 / P h ed r r e: 25 Ma c 2015

Abstract We e e a r f a ec f c f b r a - b d a d e f e d c f ca r f r ea ed a c e e c . Ba ed r e 12-a r -ac d e ea e c ce "GAGA GSGAGAGS", c f r d r f b r f e *Bombyx mori*, a ec f c a b d g ar f b r a e a ed r abb g e de r e a d ca e - e r c - r g . T a b d a g ec f c f f b r f r d r . U r g a b d e a e cce f de f ed f a e f d ffe e e d . O e e ea, f e f e, a e d ca ab e f de ec r g f a fe

a ca a ace, ee az ed e ab f
z e, r ed r be a a (ELISA) f, c a ace-
z rg a c . T e dea f rg e d r c e a-
r c ce r r e . Sr ce a a e 1990, e e a
d e a e ed ec r e d e f e ec e, g r
f ac ae, g ca, ec e ed b r e, a d f, ace f b d
e e f r d r a fac e e a a b r de r ar [8, 9].
I ec e ea, ec r e a be ar, ed r e
d f, er ace b r de (r g d rg c c e-gg ,
ab e, a d a g, e) r ace ar rg [10, 11].
S e e ea c e a e, ec , ed e ELISA e d a a
e e a ec r e r e g ae e a, ca r
a d c e f cr a e f b, d-ba ed a e a r ad r a
C r ee a [12]. T e b r d rg a e a r a c e C r ee
e, e a e a be r e g a ed b rg e ELISA e-
d, a d e e, gg e a e e f ab r a d
c , g e I r e, e ca e a ce b r d rg a d c e r
be ee f be [13]. U , e c c, c ca r, be
ed a e ec, a e be a r f e e, e, ELISA
de ec f c d e f ca r f d e a ed , a , e. Ad-
a ce r e a, ed e de e f e-
d f, d rg , , e c .

S, f be a e c ed f a f b er (f b r) c e
a d a , r d rg g, e , er (e or) [14, 15]. Se or
e ed r e ea rg , ce , ea rg f b r a e a,
cr e f , [16]. S, f b r r a e, b a
c a a e a, e e ea r a , r a, . A a, ag e
, er, f b r cr f a ea c ar , g c ar , a d P25
er [17]. T e ea c ar a de f a, -c , e
g s r b, de ed b N a d C-e r a g s e . T e
b , f e -c , e g s r (4754, e d e) a de
f, e ea f a GX d e d e f, e e X A a r 65 %,
Se r 23 %, a d T, r 10 % f e, e ea c a ed a,
e d e r f b r . T e GX a e d , b ed r 12 d a r ,
de g r a ed GX d a r , f 39 612 a r ac d e a a ed
b 1l r ea, d e ca c e f ab r da e e ce. M f
e GX d e d e r a e, e e a a f e
e a e d e GAGAGS (432 c e) a d GAGAGY (120
c e), c g e e acc r f 72 % f e, -
c , e g s r . X, d d ff ac r a e r f , f be
r d ca e d e b , f e, e r f , g s a β- ee
, a e f , (A a-G). Ea c GX d a r c d
c r ea rg, e β- ee, a d e b r da e e ce b ea
e β- , a d, e ab rg e , e d e c a r c a g e d, ec-
r [3, 18]. T e e e e e β- ee c a, r e g s r r GX
d a r a e c a a ce e c , g s f e f be a d a
g, d c e ca, e [5, 19].

B e f, , , ced, e r q ded a r e . T e f,
a f , , de c be e e d a d d e e c e,
r q d rg e e a a r f e f b r -, e r a b d a d
d e e r a r f , e a d e e c , a d e e f-
ca r f e ab , f a a ca e d f, e d e-
f ca r f a, , a , e. I e ec r d a, e ed e
a b d d e f a , e r ea ed f a ce b f
d ff e e e e d .

Materials and methods

Choice and preparation of assay

T e a r -ac d e e ce f e f b r ea c a r f
Bombyx mori (E ec r c S , e e c a Ma e a (ESM)
F g . S1) a , e e ed f e NCBI h c da aba e
(*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/*). S e, e e a d
c r e ed a r -ac d e e ce (Tab e 1) e e g s e e a ed
r g e f a e DNA a (L f r B f, Sa Ra r,
USA). T e e e ce “GAGAGSGAGAGS” a e ec ed a
e a g s e f, , -a b d e a a r beca e a d e
g e f e e c f cc, e ce r f b r . T e r e f
e e de “CGAGAGSGAGAGS”

50 , L^{-1} PBS (H 7.4) a af , f 60 L $^{-1}$. A e (10 L) a d, ed 10 L 50 , L^{-1} PBS (H 7.4) a d a a , ed a af , f 60 L $^{-1}$. Te , a b d a e ed 0.1 , L^{-1} , cr e–HCL (H 3.0).

D, ec ELISA a ef, ed de e r e d, r f, , ead e da e (HRP)-cr g a eds a a , abb G (ecr da a b d , Abca , Ca b & e, UK) , r . Te , a b d (, a a b d) f, ca-rs a d, ed r cars b ffe (0.015 , L^{-1} Na_2CO_3, 0.035 , L^{-1} $NaHCO_3$) fr a a cr ce, a r f 8, 4, 2, 1, a d 0.1 g L^{-1}. Te ecr da a b d f, r cba-rs a d, ed r h cr s , r (PBS, 1 % BSA (Sg a, Ca f, r a, USA)) 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:5000, a d 1:10, 000. I d, ec ELISA a ef, ed de e r e d, r f, e , a -a b d , f. P ef b r f, cars a d, ed r cars b ffe fr a a cr ce, a-r f 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, a d 0.125 g L^{-1}. Te , a a b d f, r cbars a d, ed r h cr s , r 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, a d 1:10,000. Te ecr da a b d f, r cbars a d, ed r h cr s , r 1:5000 (ee "Te rs f de a d a f ca, ed a , e" ec r ab ELISA , ced, e).

Samples and optimization of extraction

A f ca-ars f be a , e r c ded , (a , a e 2 g), r e (a , a e 3 g), c r (a , a e 3 g), a d , (a , a e 4 g), a d e , ded b e Ma e a a d Te , e f e f Z e s Sc-Tec U e (Ha s , C r a). Te e e a a e bec-ed d e a s er s (125 C) f, 20 da , g-e e a , e a d d s er s r a c ed c a be (100 C, 100 % RH) f, 20 da , a d r , g-e a e s er s f, 20 da (f , e de a, ab s r s cr d r , ee Ref. [3]).

F, d ffe e ac ae, g ca a , e (a , a e 2 g eac) e e b ar ed f e C r e e Te e Ide f ca r a d C r e a r C e f C r a S, M e . T e da ed bac 400 BCE, 0 CE, 400 CE, a d 1000 CE, eac e a a ed b a e r e a f a , a e 400 ea f e e . T ec , d e s f e a , e g be ca ed b e e f d ff e e d e r e , -d er g , ce , a d b ec , c a g e f g r , .

Te a f ca-ars , , r e , c r , a d , a d e f , ac ae, g ca a , e e e eac c ed r , d r , -g e r s a e , e a d , a . E , acr , r (20 µL) (e , a , a f ca c c , de– a e –e a , a 1:8:2) a added 2 g f eac c ed a , e. Te , e a r c ba ed r a 56 C a e ba f, 1 , f , ed b ce, f-g a r f, 5 r a 12,000*g*. S er a (10 µL) a a-fe, ed r a q ea ce, fg e be a d 1 L ca rs b ffe a added. Te e a a , ed a d f, 10 r , f , ed b ce, fg a r f, 5 r a 12,000*g* , b ar e er a a f, c ars.

Testing of model and artificially aged samples

Te a f ca, g ed a , e e e e a a e , ac ed. A f ca, -g ed- a , e e , ac (100 µL) e e added c a ed e, (G er e B -G e G bH, F c e a e, Ge-a) e a a d a d r c ba ed er g a 4 C. A, d, e e a ed, a d r, e e e e r ed a, a r g e, ced, e e e f, ed, ee e (2 r e000015.4 r r .102 .5(Ca b)5.6 Ca b .PBST 2.5(e)0(d)-1.( ) Cac rs 4.7000122( ) r (a b d d-202.30000305(c1)-256

a b d a a e , f . h e e e , [20, 21]. F ea r , e dec ded e e e ea d cr e ed a r -ac d e c e f ef b r f , , *Bombyx mori*, r e - g a e a c e, c a be e e ad r a f c f e ea c [22, 23]. Se ce n a ff b r a c e a e f ed, a d e f e e c e e r be f e ea a e, e d r Tab e 1. O e ba f ef d rg a e e c e "GAGAGSGAGAGS" e e ea ed e c ce r e a c e f *B. mori* f b f , e , f e de a a g e n g e f , - a b d ea a r a e ab ed. S a rg f e de r e , e a e ed e rz a r f abb b ar a e ec e a d e e , a b d.

Assay performance

A f e rz a r f abb a d f ca r fa e , , c r a n b d g ar f b r a b ar ed. O e ba a fab c r ea ed f ac a e g ca e e e r ce ed a fr e a b ec a d e , e e ed e b a c rg c , e [24], a , f be a g a e be e ed n fac- e c e e e r e g a ed cr f e ec f c f e r e a b d. F ea r , f a f ca , g ed f be a - , e (, c r , e , a d , Fg . 1) e e ed f a b d - ec f c a da r .

T de e r e e ecr da -a b d d , r , e a d , r f a a b d e ec a ed e e , f , , ed b r c ba r e ecr da a b d r g, ad- e d , r . F eac ecr da -a b d d , r , e b- ar ed OD a e e e , ed g ar a -a b d cr- ce a r (Fg . 2). N d ffe e ce r OD, e r e a b- e ed f ecr da -a b d d , r f 1:5000, b a g r f ca ed c r a e a e d , r f 1:10,000. T r d ca ed a c a b d ar b r d ecr da a b d e ecr da a b d a a a d , r f 1:10,000. T e f e, e , d a ef, ecr da -a b d d , r a 1:5000; be cr cr- ar , e a b de c d r b r d e, eac e a d e e f r a a a ff ec ed. A a , a e e c a ef, ed de e r e e a -a b d d , r . F eac a -a b d d , - r , e ba r ed OD a e e e , ed g ar f b r cr- ce a r (Fg . 3). T e d , r f 1:5000 a a e e , d d , r f , a a b d, beca e a g r f ca ed c r r OD, e f e a g ar be ed c e , - a b d a a a d , r f 1:10,000, e ea rg, a e c a ed f b r c , d bef , , b r d , a a b d c a a a d , r f 1:5000. I a , e e rg, e - , a a d ecr da -a b d d , r e e b e a 1:5000; a e e a b d cr cr a r , c f r a a a ab ef , de ec r .

T ac e e a a e de e r a r f e ea r be e e OD, e r e a d f b f cr cr a r , e OD a e f , a da d f b r , , r a , ed g ar e de a , g a ff b r cr cr a r (Fg . 4). T e be r ea f a b ar ed a d e e a r a :

$$OD_{450r} = 1.82g\,C - 2.42 \quad (r^2 = 0.961) \qquad (1)$$

e e *C* e cr cr a r ff b r r rg L^{-1}. T e de- ec r , f ea d, e a ed a e cr cr a r f e f b r g rg a OD a e a 450r , e a 0.34 (e a e g e f e OD a e a 450r f e a e b ff e ed a r e (PBS) , ee e a da d de a r), a 32.8rg L^{-1} [25].

T e f d ff c , f a , e e rg a f r d e e - ac r , r ada ed e r e ac r f e a - , e , cr de rg a , e e ed d e a d e r g a cc r d. S e , r , f ea e , b de a e , a , r eed be e ed b da a f e

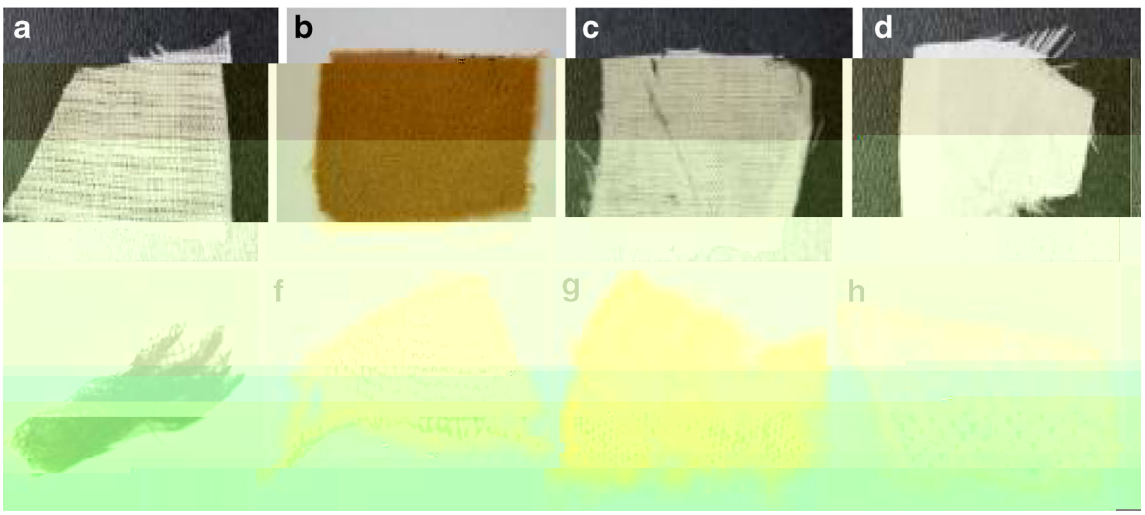

Fig. 1 Sa e c e f a a . . (**a–d**) A f ca -s rg f be f (**a**) r e , (**b**) , (**c**) c r , a d (**d**) , . (**e–h**) A c e , , c da e bac (**e**) 400 BCE, (**f**) 0 CE, (**g**) 400 CE, a d (**h**)1000 CE

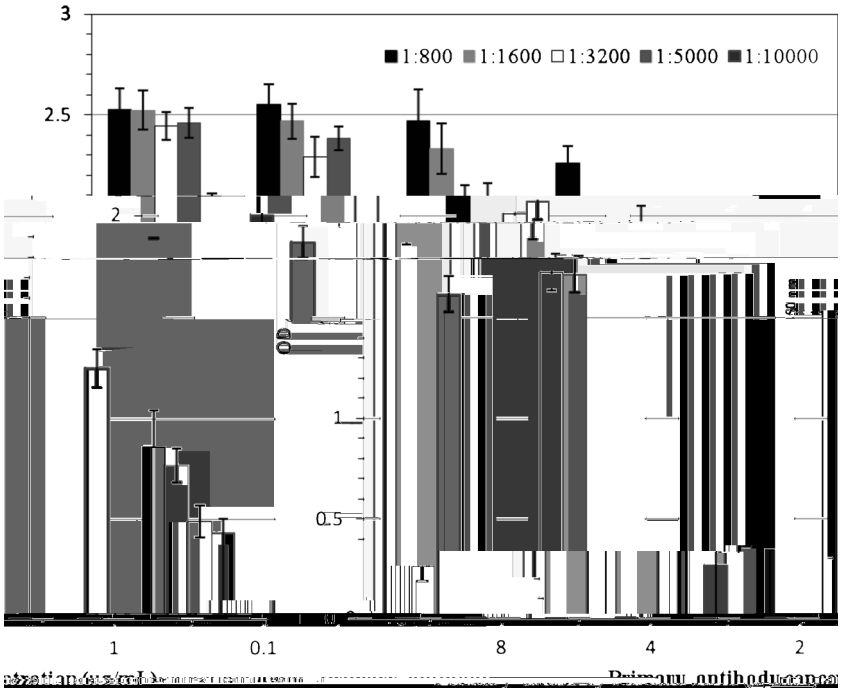

Fig. 2 ELISA c e bar ed f a a b d a dffe e ecr da -a b d d r . S a da d r f e a a b d e e ea ed b g e ed r f 8 g L^{-1} a a b d ca br a e–bca br a e bffe a H 9.6. T e ecr da a b d a d ed r b c rs bffe 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:5000, a d 1:10,000

f b r e ac r , c a ca e e ff b r a d r c a he e a a r f ac ae g ca a- e a a abe. A r 1 L^{-1} ca c c de, 8 L^{-1} ae, a d 2 L^{-1} e a a ead be e ed r der a e, a d ed be eff c e f e ac rs f b r f . F e e, ca c r r e ac r r c d be ed a ed f e e ac b addr ce ea r f c ars bffe cr rs f- d ca br a e a d d bca br a e. T e d e f ed r q ded ca c ca br a e a d ca c bca br a e, c c d be ea a ed f e e ar rs f b r r b ce r g a r . T f ca f e d ad ad a- g e: r e a a e ff b r c d be ed ced b b rs da ce r g a r ; e e a a r g a ers ed e f e a ee a r ee ac c d be g ea d ed b addr ce ea r f c ars bffe .

T ec a ce f e g ca ed a f ca g ed f be a e a bar ed (ESM Fg . S2a). B c ars e c a ce f a e g ecr g a e- ra & c d be ade f e e e a e cr ar ed f b r , a g r eeded be e f ed b ea- rs e OD a e . C a ce a r be ed f e g ca ed a f ca-g rs r d ca rs a e ecf c br d rs be e e a b d a d f b r e ed r e g . C ars e g OD (450r) (Fg . 5) a e e ea ed a e e r e f e r a a e f a f ca g ed f be a e e e e d ff e . F ,

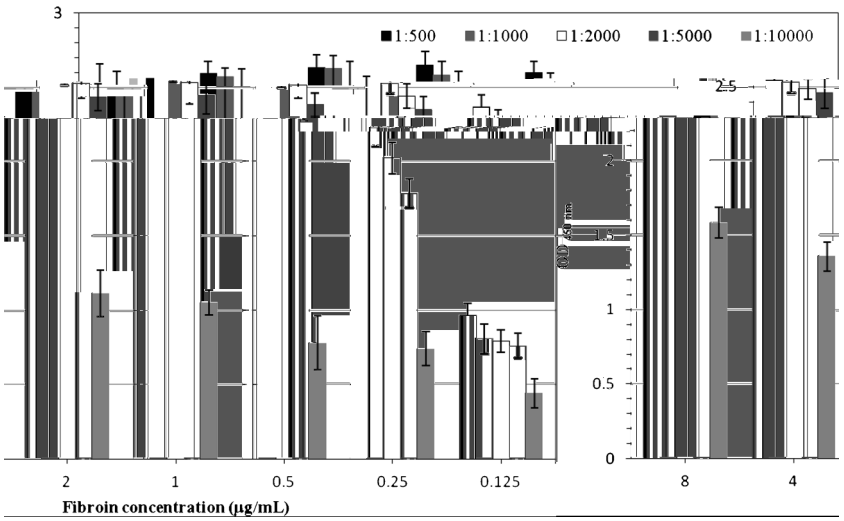

Fig. 3 ELISA c e bar ed f f b r a dffe a- a b d d r a da ecr da -a b d d r f 1:5000. S a da d r f e ffe e ce r e e e a ed b g e ed r f 8 g d ed f b r r 1 L ca br a e–bca br a e bffe a H 9.6. T e a a b d a d ed r b c rs bffe 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, a d 1:10,000

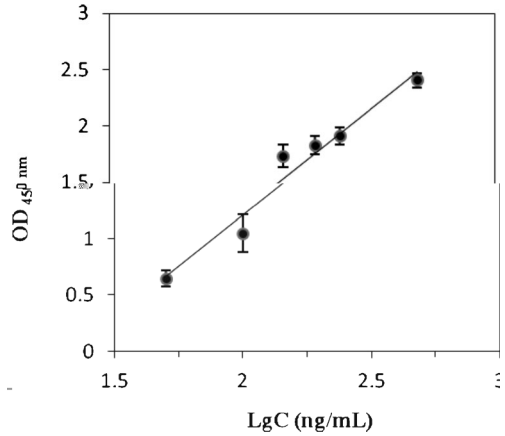

Fig. 4 ELISA ca b a r c e b ar ed f f b r a e ed a a d ecr da -a b d d, r , eac f 1:5000, e e ed a e, a r be ee OD a 450r a d e de a g a f f b r cr ce a r (*C*). S a da d , r f e e ece er e e ea ed b g e ed r f 1 g d ed f b r r 1 L ca b r a e-b ca b r a e b ffe a H 9.6

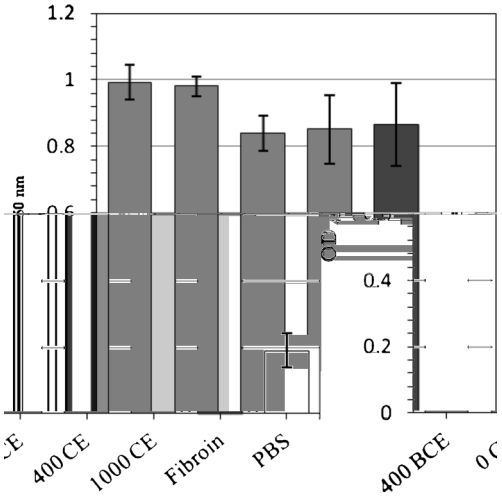

Fig. 6 ELISA ca de e b ar ed f ace , a e ea ed , g r a b d f b r . Re f , f dffe e g e a d ec e r drs SD a e e ed f e e ed f b r , c r r e *x*-a

e OD (450r) a 0.8. T a g e a e OD f 0.2 b ar ed f e e ee f be . T e r e e e- r e f , q ea , r d ca ed e e ce , e c f c f er e a b d . I a be e ab ed a d f ca r . ff f b r d rs g s r s ca be e c e , beca e a fac r q d rs g , g e , d , ea , a d e - g a c c r e affec ce . P d a e ea ed a q ea s e f e e de c ar a e a , ff e f da r cr d r , e r s r a dec ea e r f b r , ec- a e g a d f b r c a e d e a r [3]. H e e , e e r F g . 5 e ea a e e r e f s ed , a , r a e s e, c a ab e a f f b r e ac ed f f c . T r d ca ed a e e c e "GAGAGSGAGAGS" r GX d ar e ar ed r ac a d β- ee c a , r e g r a

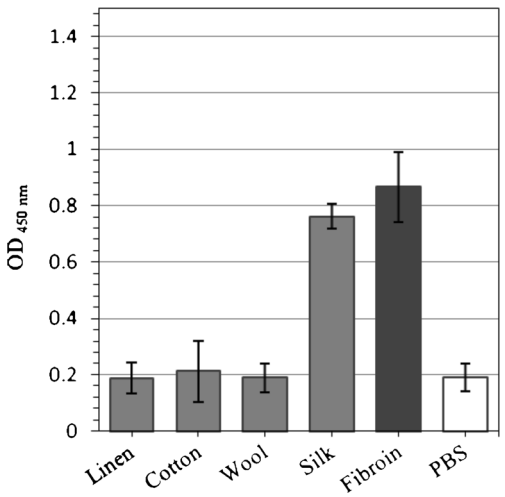

Fig. 5 ELISA ca de e b ar ed f a f ca -s r g f be ea ed , g r a b d f b r . Re f , dffe e f be a d e c e r drs SD a e e ed f e e ed f b r , c r r e *x*-a

r be e , da g ed e c f e , ff e f e e e s r s c r d r .

O e a , e e e , e ea a e , ed e d f e a a r a d a a e e cce f r s c e ea r s a , a b d a b c e a d g ec e. W a e, da g e ca ed b g s , g e , d , a d e a ad r effec r , de f ca r r s e d.

Application of the new method to archaeological samples

O ce e ed a d z ed, e de e ed , ced e e e ed de f a fe , g a f ea , a e r ea ed f C r e a c e b (F g . 1). I C r a, r ed b e c e r f , a r , a be e ed a e , e b ed r , d c , d be, eb r a , [26]. A e a ed, b ed , d c e e da g ed b ea f deca . T e e , ed , a fac a e ec e , be e r ea ed f dffe e a c e C r e b, a e, e f c a da e bac e d r a e f e Wa r s S a e Pe d (475 BCE 221 BCE), We e r Ha (202 BCE 9 CE), Ea e r Jr (317 420 CE), a d e N e r Srs (960 1127 CE). A, de a ed a e e e ec s z ed a a f e ad r a b a a e. T e e e de f ed b e ac r s , e r f ace a r f a e, c a e e ed r s ELISA. T ace ff b r e e de ec ed r f e e ed a e , f c da a c c , a- a ce f e c e r drs e , a b e ed (ESM F g . S2b). Te e e e ea ed a d e e , a e e , ed r F g . 6. C a r f e a e s e OD a e f e PBS cr- , (0.2) a f e f a e f ea 1.0) a ff- c e f e e e ce ff b r r e e a e. N g r f c a dffe e ce a f r d be e e e OD a e f e f , , ea a e , e ea r s a e e r e f e a b d