

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2025 年 1 月 2 日 (02.01.2025)



(10) 国际公布号  
**WO 2025/001021 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C08F 299/00* (2006.01) *C08L 55/00* (2006.01)  
*C08F 2/48* (2006.01) *C08K 3/08* (2006.01)  
*C08J 3/075* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/142460
- (22) 国际申请日: 2023 年 12 月 27 日 (27.12.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202310785693.9 2023年6月29日 (29.06.2023) CN
- (71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

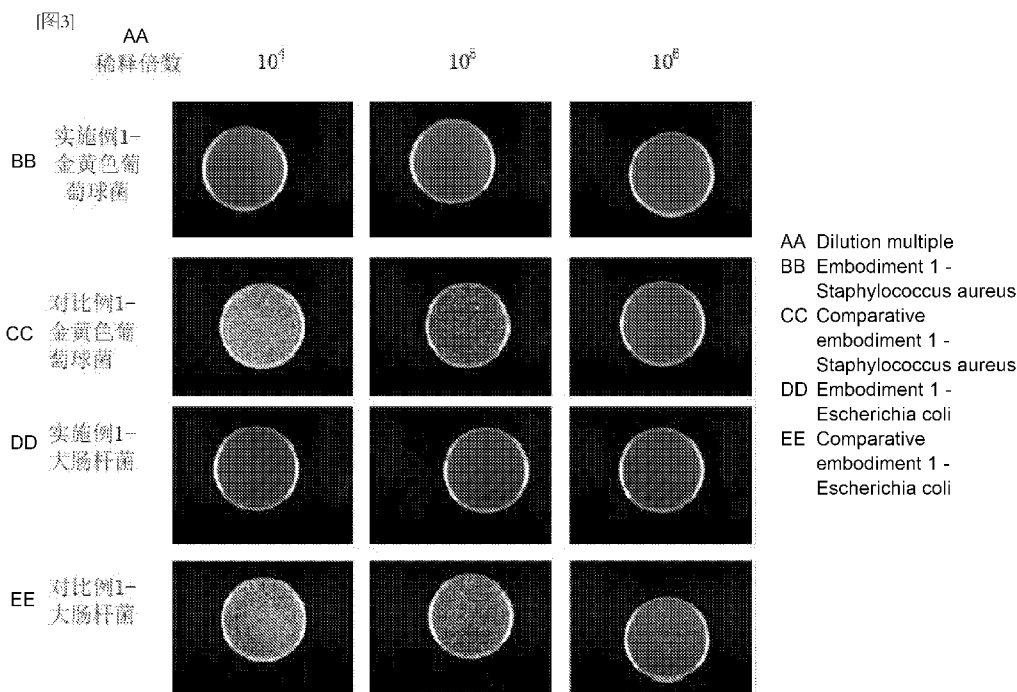
南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 张静 (ZHANG, Jing); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。张曦昊 (ZHANG, Xihao); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。詹阳 (ZHAN, Yang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街 1 号院 2 号楼 7 层 7C1, Beijing 100044 (CN)。

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR SILK FIBROIN HYDROGEL

(54) 发明名称: 丝素蛋白水凝胶的制备方法



(57) Abstract: Provided in the present application is a preparation method for a silk fibroin hydrogel. The preparation method comprises the following steps: adding natural silk to a sodium carbonate solution, and heating the solution to obtain degummed natural silk; dissolving the degummed natural silk in a lithium bromide solution, and adding glycidyl methacrylate thereto to perform a reaction, so as to obtain a reaction solution; dialyzing the reaction solution to obtain a supernate; freeze-drying the supernate to obtain a freeze-dried protein; and mixing an antibacterial agent solution with a photoinitiator solution, adding the freeze-dried protein thereto, and irradiating

[见续页]

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

same with blue-violet light to obtain a silk fibroin hydrogel. In the present application, glycidyl methacrylate is used to modify the degummed natural silk (fibroin); and an antibacterial agent and a photoinitiator are added in the hydrogel-forming step, and irradiation is performed with blue-violet light to subject the modified fibroin to curing crosslinking, thereby preparing a silk fibroin hydrogel having antibacterial performance, which hydrogel can be widely used in the fields of biomedical materials, etc. The preparation method of the present application is simple and fast, and has a high hydrogel-forming speed.

(57) 摘要: 本申请提出一种丝素蛋白水凝胶的制备方法, 包括如下步骤: 将蚕丝加入碳酸钠溶液中, 加热, 得到脱胶蚕丝; 将脱胶蚕丝溶于溴化锂溶液中, 加入甲基丙烯酸缩水甘油酯进行反应, 得到反应液; 将反应液进行透析, 得到上清液; 将上清液冻干, 得到冻干蛋白; 将抗菌剂溶液与光引发剂溶液混合, 加入冻干蛋白, 用蓝紫光照射, 得到丝素蛋白水凝胶。本申请利用甲基丙烯酸缩水甘油酯对脱胶蚕丝(丝素)进行改性, 并在成胶步骤中加入抗菌剂和光引发剂, 利用蓝紫光照射使改性后的丝素发生固化交联, 从而制备出具有抗菌性能的丝素蛋白水凝胶, 可广泛应用于生物医用材料等领域。本申请的制备方法简单快捷, 成胶速度快。

# 说明书

## 发明名称: 丝素蛋白水凝胶的制备方法

### 技术领域

[0001] 本申请涉及凝胶材料技术领域，尤其涉及一种丝素蛋白水凝胶的制备方法。

### 背景技术

[0002] 丝素蛋白具有良好的生物相容性，能够促进人体细胞的生长，具有一定的生物可降解性，因此，丝素蛋白在纺织、生物医学等领域受到了广泛的关注。

[0003] 凝胶是介于固体与液体之间的一种物理状态，具有独特的性质，尤其是水凝胶，在其中保持有大量的水分，能保持一定的形状，目前被广泛用于人工皮肤、组织工程材料、药物释放、人造肌肉、生物传感器等方面。

[0004] 丝素蛋白水凝胶可由丝素蛋白溶液制得，丝素蛋白溶液在静置下会逐渐向凝胶化转变。丝素蛋白水凝胶可用于伤口修复、手术缝合、组织修复等领域，但现有的丝素蛋白水凝胶存在凝胶时间较长、功能单一（例如，不具备抗菌性）等缺点，制约了丝素蛋白水凝胶的使用。

[0005] 发明内容

[0006] 有鉴于此，本申请提出一种丝素蛋白水凝胶的制备方法，其凝胶时间短，且制得的丝素蛋白水凝胶具有抗菌性能。

[0007] 本申请一实施方式提供一种丝素蛋白水凝胶的制备方法，包括如下步骤：

[0008] 脱胶：将蚕丝加入碳酸钠溶液中，加热，得到脱胶蚕丝；

[0009] 改性：将所述脱胶蚕丝溶于溴化锂溶液中，然后加入甲基丙烯酸缩水甘油酯进行反应，得到反应液；

[0010] 透析：将所述反应液进行透析，得到上清液；

[0011] 冻干：将所述上清液冻干，得到冻干蛋白；

[0012] 成胶：将抗菌剂溶液与光引发剂溶液混合，然后加入所述冻干蛋白，得到冻干蛋白溶液，用蓝紫光照射所述冻干蛋白溶液，得到所述丝素蛋白水凝胶。

[0013] 一种实施方式中，所述抗菌剂溶液包括纳米银溶液、纳米铜溶液或纳米锌溶液。

- [0014] 一种实施方式中，所述光引发剂溶液为苯基（2,4,6-三甲基苯甲酰基）磷酸锂盐溶液，所述光引发剂溶液的质量体积浓度为0.25%~5%。
- [0015] 一种实施方式中，所述蓝紫光的波长为365 nm~405 nm。
- [0016] 一种实施方式中，所述蓝紫光照射的时间为10 S~20 S。
- [0017] 一种实施方式中，在所述溶解步骤之前，所述制备方法还包括：将所述脱胶蚕丝烘干。
- [0018] 一种实施方式中，所述反应液完成透析后，所述制备方法还包括：对完成透析后的所述反应液进行离心，以得到所述上清液。
- [0019] 一种实施方式中，所述抗菌剂溶液与所述光引发剂溶液的摩尔比为（1~2）:1。
- [0020] 一种实施方式中，所述溴化锂溶液的浓度为9.3 mol/L~9.5 mol/L。
- [0021] 一种实施方式中，所述碳酸钠溶液的浓度为0.02 mol/L~0.05 mol/L。
- [0022] 本申请利用甲基丙烯酸缩水甘油酯对脱胶蚕丝（丝素）进行改性，并在成胶步骤中加入抗菌剂和光引发剂，利用蓝紫光照射使改性后的丝素发生固化交联，从而制备出具有抗菌性能的丝素蛋白水凝胶，可广泛应用于生物医用材料等领域。本申请的制备方法简单快捷，成胶速度快。

## 附图说明

- [0023] 图1为本申请实施例1和对比例1制备的丝素蛋白水凝胶的紫外-可见光谱图。
- [0024] 图2为本申请实施例1和对比例1制备的丝素蛋白水凝胶的抑菌环实验结果。
- [0025] 图3为本申请实施例1和对比例1制备的丝素蛋白水凝胶的抗菌率实验结果。
- [0026] 如下具体实施方式将结合上述附图进一步说明本申请实施例。
- [0027] 具体实施方式
- [0028] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请实施例的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的术语只是为了描述具体的实施方式的目的，不是旨在限制本申请实施例。
- [0029] 本申请提出一种丝素蛋白水凝胶的制备方法，包括脱胶、改性、透析、冻干和成胶等步骤。

- [0030] 蚕丝的主要成分为丝胶和丝素（SF，一种蛋白质，又可称为丝朊、丝质），其中，丝胶约占蚕丝重量的20%–30%，丝素约占蚕丝重量的70%–80%。脱胶步骤便是将蚕丝中的丝胶去除。所述脱胶步骤具体为：将蚕丝加入碳酸钠（ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ）溶液中，加热，直至无黄色胶质沉淀产生（黄色胶质沉淀即丝胶），得到脱胶蚕丝（即丝素）。所述 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液的浓度可为但不限于0.02 mol/L~0.05 mol/L。例如， $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液的浓度可为0.02 mol/L、0.03 mol/L、0.04 mol/L、0.05 mol/L，等等。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液可先加热至沸腾，然后在沸腾的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中加入剪碎的桑蚕蚕丝（蚕茧），持续加热，使蚕丝脱胶，得到脱胶蚕丝。脱胶蚕丝可以用大量去离子水清洗，以去除丝胶和多余碳酸钠。
- [0031] 一些实施例中，在脱胶完成后，还可以对所述脱胶蚕丝进行烘干。例如，可将所述脱胶蚕丝置于真空干燥箱中干燥，使得所述脱胶蚕丝完全脱水，得到干燥的丝素。
- [0032] 所述改性步骤具体为：将所述干燥后的脱胶蚕丝（干燥后的丝素）溶于溴化锂溶液中，然后加入甲基丙烯酸缩水甘油酯（GMA）进行反应，得到反应液。反应可在加热并搅拌的条件下进行，固体物质完全溶解且溶液变黄，表明反应结束。GMA可以在避光条件下加入，以免原材料氧化分解。由于丝素分子特殊的空间结构，其在改性前极易形成结晶而难溶于水。通过GMA对丝素进行甲基丙烯酸化改性，可以在丝素分子上引入双键。由于引入额外的化学基团，改性后的丝素分子（SF-GMA）不易结晶，可在水中溶解，这使得SF-GMA可在后续的步骤中可光固化形成水凝胶。GMA的应用使反应稳定，其主要机理是环氧化物开环，没有酸性副产物。此外，GMA还可以促进与氨基的反应。理论上，两个GMA分子可以与一个游离氨基反应，因此，GMA的使用能使SF上的乙烯基数量最大化。GMA还能与SF分子中的羟基和羧基发生反应，这些官能团可以通过酯交换机制（作为次要机制）促进SF的进一步甲基丙烯酸化，增加甲基丙烯酸乙烯酯的量，从而使水凝胶的交联密度最大化，能大幅缩短水凝胶的成胶时间。并且，所述SF-GMA具有嵌段结构，能负载包裹抗菌剂，从而使得形成的丝素蛋白水凝胶具备抗菌性。

- [0033] 一些实施例中,所述溴化锂溶液的浓度为9.3 mol/L~9.5 mol/L。例如,溴化锂溶液的浓度可为9.3 mol/L、9.4 mol/L、9.5 mol/L,等等。
- [0034] 所述透析步骤具体为:将所述反应液装入透析袋中,透析三天,每天换水三次。所述透析能去除溴化锂以及未反应完全的丝素和GMA等杂质。当所述透析袋内的液体由澄清变得浑浊且透析袋膨胀后,表明透析完成。一些实施例中,还可以将透析完的SF-GMA进行离心,取出上清液。离心机的转速可为5000 rpm,时间可为1 h,离心的转速和时间可根据实际需求调整。
- [0035] 所述冻干步骤具体为:将所述上清液置于-20℃冰箱中冷冻过夜,然后再置于冻干机中冷冻干燥过夜,即可得到海绵状(多孔)的冻干蛋白。
- [0036] 所述成胶步骤具体为:将抗菌剂溶液与光引发剂溶液混合,然后加入所述冻干蛋白,可通过搅拌和超声处理以促进所述冻干蛋白的溶解,得到冻干蛋白溶液,用蓝紫光照射所述冻干蛋白溶液,得到所述具有抗菌性的丝素蛋白水凝胶。
- [0037] 一些实施例中,所述抗菌剂溶液包括纳米银溶液、纳米铜溶液或纳米锌溶液。
- [0038] 一些实施例中,所述光引发剂溶液为苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP, CAS号: 85073-19-4)溶液,所述光引发剂溶液的质量体积浓度(w/v)为0.25%~5%。例如,所述光引发剂溶液的质量体积浓度可为0.25%、0.30%、0.40%、0.50%、1%、2%、3%、4%、5%等等。
- [0039] 一些实施例中,所述抗菌剂溶液与所述光引发剂溶液的摩尔比为(1~2):1。例如,所述抗菌剂溶液为纳米银溶液,所述光引发剂溶液为LAP溶液时,当将纳米银溶液滴加到LAP溶液中时,二者的混合液中,纳米银的含量为0.1 mol时,LAP的含量最高为0.1 mol(此时纳米银与LAP的摩尔比为1:1),最低为0.05 mol(此时纳米银与LAP的摩尔比为2:1)。
- [0040] 一些实施例中,所述蓝紫光的波长为365 nm~405 nm。例如,所述蓝紫光的波长为365 nm、370 nm、375 nm、380 nm、390 nm、400 nm、405 nm等等。光引发剂LAP可在波长为365 nm~405 nm的蓝紫光照射下,使溶解的冻干蛋白发生交联反应,形成丝素蛋白水凝胶。
- [0041] 一些实施例中,所述蓝紫光照射的时间为10 S~20 S。
- [0042] 以下将结合具体实施例对本申请作进一步说明。

[0043] 实施例1

- [0044] (1) 脱胶：向1.5 L超纯水中加入3.18 g碳酸钠固体，配置成浓度为0.02 M (mol/L) 的碳酸钠溶液，加热所述碳酸钠溶液直至其沸腾；称量20 g桑蚕蚕丝（蚕茧），将其剪碎，然后将剪碎的桑蚕蚕丝放入沸腾的碳酸钠溶液中，持续加热1 h左右，直至无黄色胶质沉淀产生，表明丝胶全部去除，停止加热，倒去碳酸钠溶液，取出脱胶蚕丝并用大量去离子水清洗脱胶蚕丝。
- [0045] (2) 烘干：将清洗后的脱胶蚕丝置于真空干燥箱中12 h，使其完全脱水。将脱水的脱胶蚕丝置于精密天平称量，得到15 g左右的干燥丝素。
- [0046] (3) 改性：配置40 ml浓度为9.3 M的溴化锂溶液，取4 g烘干的脱胶蚕丝（干燥丝素）溶于溴化锂溶液中，将盛有溴化锂和丝素溶液的烧杯置于加热搅拌器上，并向烧杯中加入GMA，将加热搅拌器设置为60℃，持续加热搅拌4h，直至固体物质完全溶解且溶液变黄，得到反应液，所述反应液的主要成分为改性后的丝素分子（SF-GMA）。
- [0047] (4) 透析：将烧杯中的反应液装入透析带中，透析三天，每天换水三次。然后将透析完的液体倒入离心管中，放入离心机中以5000 rpm的转速离心1h，取出上清液。
- [0048] (5) 冻干：将上清液置于-20℃冰箱中冷冻过夜，然后再置于冻干机中冷冻干燥过夜，即可得到海绵状（多孔）的冻干蛋白。
- [0049] (6) 成胶：将纳米银溶液与浓度为0.25% (w/v) 的LAP溶液通过磁力搅拌器混合，磁力搅拌器搅拌5 h~6 h，得到的混合液中，纳米银与LAP的摩尔比为1:1。将冻干蛋白加入纳米银和LAP的混合液中，搅拌并超声处理以促进冻干蛋白的溶解。冻干蛋白完全溶解后，用波长为365 nm的蓝紫光照射冻干蛋白溶液，可观察到液态向水凝胶态转变，蓝紫光照射十余秒（10 S~20 S）后便生成了携带纳米银的丝素蛋白水凝胶AgNPs-GSF。
- [0050] 纳米银不易产生耐药性，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、肺炎链球菌等数十种致病微生物都有强烈的抑制和杀灭作用。负载有纳米银的丝素蛋白水凝胶AgNPs-GSF具有优良的抑菌作用，它可以在环境中释放纳米银颗粒，抑

制环境中细菌的生长，并且因纳米银独特的杀菌机理从而能避免使细菌产生耐药性。

[0051] 对比例1

[0052] 对比例1中，脱胶、烘干、改性、透析、冻干步骤与实施例1中的完全相同，此处不再赘述。对比例1与实施例1的区别仅在于成胶步骤不同，对比例1的成胶步骤为：将冻干蛋白加入LAP溶液中，搅拌并超声处理以促进冻干蛋白的溶解。冻干蛋白完全溶解后，用波长为365 nm的蓝紫光照射冻干蛋白溶液，得到丝素蛋白水凝胶GMA-SF。

[0053] 测试例1：紫外-可见光谱

[0054] 将实施例1成胶步骤中光照前的AgNPs-GSF水溶液（即冻干蛋白完全溶解后但未进行光照固化前的溶液）加入到96孔板中，将对比例1成胶步骤中光照前的GMA-SF水溶液（即冻干蛋白完全溶解后但未进行光照固化前的溶液）加入到96孔板中，将纳米银溶液加入到96孔板中，然后在96孔板中使用蓝紫光（365 nm）对水溶液进行照射使其发生光交联形成水凝胶，然后使用酶标仪在260 nm-700 nm的范围内对96孔板进行扫描，得到图1所示的紫外-可见光谱图。

[0055] 如图1所示，纳米银溶液在415 nm处出现较为明显的吸收峰，这是由其表面的等离子体共振所引起的。实施例1的丝素蛋白水凝胶在415 nm处出现了较为明显的吸收峰，表明纳米银成功地负载到丝素蛋白水凝胶中（得到了AgNPs-GSF），并保持了纳米银原有的粒径。对比例1的丝素蛋白水凝胶（GMA-SF）在415 nm未出现吸收峰。

[0056] 测试例2：抑菌环测试

[0057] （1）准备水凝胶样品：准备直径10 mm的金属片若干，使用移液枪将实施例1成胶步骤中光照前的AgNPs-GSF水溶液（即冻干蛋白完全溶解后但未进行光照固化前的溶液）涂抹在金属片两面上，每面涂抹量为50  $\mu$ L，涂抹后使用蓝紫光（365 nm）照射使其固化。对照组使用对比例1成胶步骤中光照前的GMA-SF水溶液（即冻干蛋白完全溶解后但未进行光照固化前的溶液）重复上述操作。每组取三个样品，并在固化之后用紫外照射灭菌封存备用。

- [0058] (2) 配置LB培养基：使用超纯水、胰蛋白胨、酵母提取物和NaCl配置培养基溶液，然后将溶液放入蒸汽灭菌锅中高温高压灭菌。待培养基溶液冷却至40–50℃左右，用电动移液器吸取培养基倒入无菌培养皿（平板）中，冷却待用。
- [0059] (3) 涂布细菌：使用移液枪取适量的菌液（大肠杆菌）接种于冷却后的固体培养基上，然后使用无菌涂布棒均匀地将菌液涂布在培养基表面，得到接种有大肠杆菌的个平板。按照相同步骤，得到接种有金黄色葡萄球菌的平板。
- [0060] (4) 放置材料：用镊子将上述涂有均匀水凝胶的金属片放置于平板正中间并轻压使其贴附，然后将平板倒置放入37℃恒温培养箱中。
- [0061] (5) 观察结果：从培养箱中培育12 h后取出，观察菌落的生长和抑菌环的生成情况并进行记录，结果如图2所示。
- [0062] 通过抑菌环可以定性地判断材料是否具有抑菌性能，是一种较为直观且方便的判断材料抑菌性能的方法。如果细菌可以在材料周围的琼脂平板上生长，说明材料对细菌没有杀灭和抑制的作用。如果材料周围出现一个或多个无菌区域，这个无菌区域被称为抑菌环，一般来说，抑菌环越大，说明材料的抗菌效果越好。
- [0063] 请参阅图2，对比例1制得的GMA–SF水凝胶在接种有金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的平板上并没有产生抑菌环，说明GMA–SF水凝胶对这两种细菌没有抑菌性。而在实施例1中，AgNPs–GSF水凝胶在接种有金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的平板上均出现了较为清晰的抑菌圈，这说明本申请实施例1制得的AgNPs–GSF水凝胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有着明显的抑制和杀伤作用。
- [0064] 测试例3：抗菌率测试
- [0065] (1) 样品的制备：将实施例1成胶步骤中光照前的AgNPs–GSF水溶液（即冻干蛋白完全溶解后但未进行光照固化前的溶液）和对比例1成胶步骤中光照前的GMA–SF水溶液水溶液置于48孔板中，并在48孔板中对其进行蓝紫光（365 nm）照射使其在孔板底部固化成水凝胶。

- [0066] (2) 待测样品制备：向固化有水凝胶的48孔板中加入酒精，使酒精浸泡水凝胶，然后用PBS（磷酸缓冲液）置换酒精，重复多次，去除酒精，以免酒精对抗菌实验结果产生影响，并将样品置于紫外线下照射30 min后，晾干，备用。
- [0067] (3) LB培养基配置：使用超纯水、胰蛋白胨、酵母提取物和NaCl配置溶液，然后将溶液放入蒸汽灭菌锅中高温高压灭菌。待培养基冷却至40–50℃左右，用电动移液器吸取培养基倒入无菌培养皿（平板）中，冷却待用。
- [0068] (4) 共培养+稀释涂布计数测试：用LB液体培养基将菌液（大肠杆菌、金黄色葡萄球菌）稀释至 $10^6$  CFU/mL，分别在实施例1和对比例1的待测样品中均匀滴加400  $\mu$ L菌液，然后放于37℃恒温振荡器中振荡培养12 h。振荡培养完成后，用无菌PBS溶液将菌液分别稀释 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 倍数后，取100  $\mu$ L稀释后的菌液涂布于平板的培养基上。将接种后的平板置于恒温培养箱中培养18h，取出平板，对其进行拍照，并计算菌落数，每种材料可做三次平行实验。
- [0069] 振荡共培养–稀释涂布平板法是一种常见的用于测试细菌对抗菌物质的敏感性的方法，使材料和菌液共培养，并使用共培养之后的菌液进行涂布，能较为客观地评判材料的抗菌率，并可以对其进行定量的测量，计算出抗菌率。
- [0070] 抗菌率测试的实验结果如图3所示。由图3可知，即使是在最小的稀释倍数（ $10^4$ ）的情况下，实施例1制得的AgNPs–GSF水凝胶共培养的实验组中，无论是对于大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌，都没有菌落生成（细菌总菌落数为0）。而在对比例1制得的GMA–SF水凝胶共培养的对照组中，在 $10^4$ 的稀释倍数下，两种菌的菌落几乎长满了平板，表明本申请实施例1制备的AgNPs–GSF水凝胶具有优异的抗菌性能。

- [0071] 抗菌率按照下列公式进行计算：
$$\eta = \frac{a - A}{a} \times 100\%$$
。其中， $\eta$

表示实施例1制得的AgNPs–GSF的抗菌率， $a$ 表示对比例1制得的GMA–SF振荡共培养后的细菌总菌落数， $A$ 表示实施例1制得的AgNPs–GSF振荡共培养后的细菌总菌落数。在 $10^6$ 的稀释倍数下，对比例1制得的GMA–SF振荡共培养后的三个培养基中，金黄色葡萄球菌的菌落数分别为30个、50个和87个。在 $10^6$ 的稀释倍数

下，对比例1制得的GMA SF振荡共培养后的三个培养基中，大肠杆菌的菌落数分别为56个、61个和75个。本申请实施例1制备的AgNPs-GSF水凝胶，抗菌率为100%。

[0072] 本申请利用甲基丙烯酸缩水甘油酯对脱胶蚕丝（丝素）进行改性，并在成胶步骤中加入抗菌剂和光引发剂，利用蓝紫光照射使改性后的丝素发生固化交联，从而制备出具有抗菌性能的丝素蛋白水凝胶，可广泛应用于生物医用材料等领域。本申请的制备方法简单快捷，成胶速度快。

[0073] 以上说明是本申请一些具体实施方式，但在实际的应用过程中不能仅仅局限于这些实施方式。对本领域的普通技术人员来说，根据本申请的技术构思做出的其他变形和改变，都应该属于本申请的保护范围。

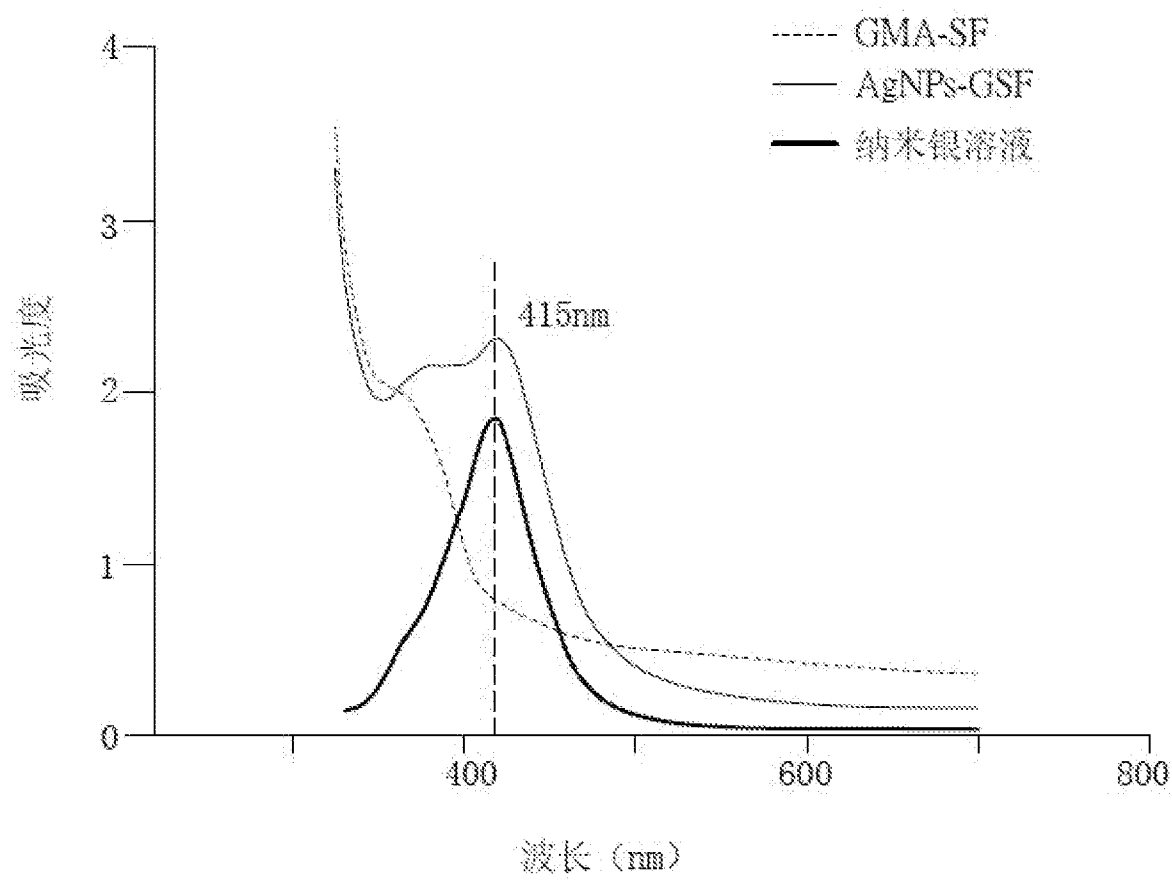
## 权利要求书

- [权利要求 1] 一种丝素蛋白水凝胶的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括如下步骤：
- 脱胶：将蚕丝加入碳酸钠溶液中，加热，得到脱胶蚕丝；
- 改性：将所述脱胶蚕丝溶于溴化锂溶液中，然后加入甲基丙烯酸缩水甘油酯进行反应，得到反应液；
- 透析：将所述反应液进行透析，得到上清液；
- 冻干：将所述上清液冻干，得到冻干蛋白；
- 成胶：将抗菌剂溶液与光引发剂溶液混合，然后加入所述冻干蛋白，得到冻干蛋白溶液，用蓝紫光照射所述冻干蛋白溶液，得到所述丝素蛋白水凝胶。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述抗菌剂溶液包括纳米银溶液、纳米铜溶液或纳米锌溶液。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述光引发剂溶液为苯基（2,4,6-三甲基苯甲酰基）磷酸锂盐溶液，所述光引发剂溶液的质量体积浓度为0.25%~5%。
- [权利要求 4] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述蓝紫光的波长为365 nm~405 nm。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述蓝紫光照射的时间为10 S~20 S。
- [权利要求 6] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，在所述溶解步骤之前，所述制备方法还包括：将所述脱胶蚕丝烘干。
- [权利要求 7] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述反应液完成透析后，所述制备方法还包括：对完成透析后的所述反应液进行离心，以得到所述上清液。
- [权利要求 8] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述抗菌剂溶液与所述光引发剂溶液的摩尔比为（1~2）:1。

[权利要求 9] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述溴化锂溶液的浓度为9.3 mol/L~9.5 mol/L。

[权利要求 10] 如权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述碳酸钠溶液的浓度为0.02 mol/L~0.05 mol/L。

[图1]

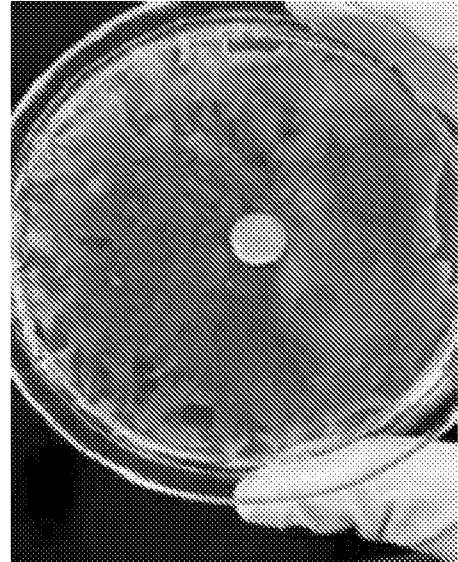
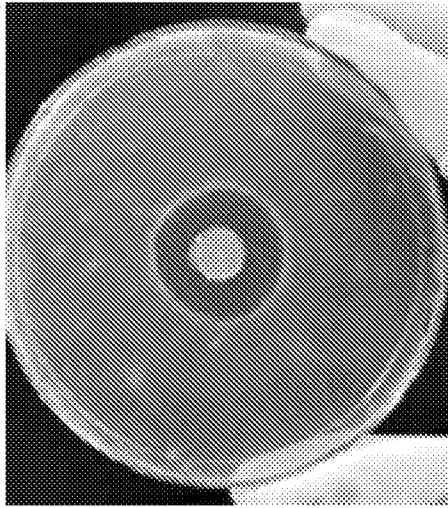


[图2]

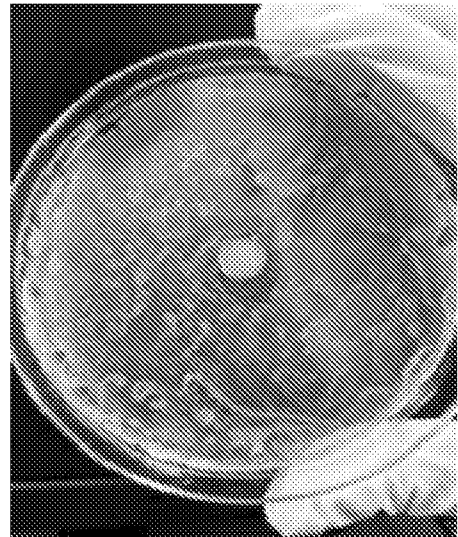
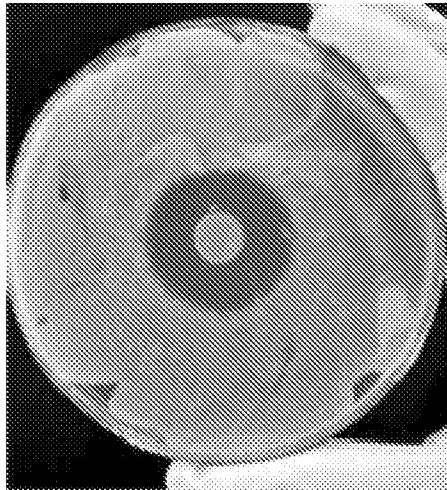
大肠杆菌

金黄色葡萄球菌

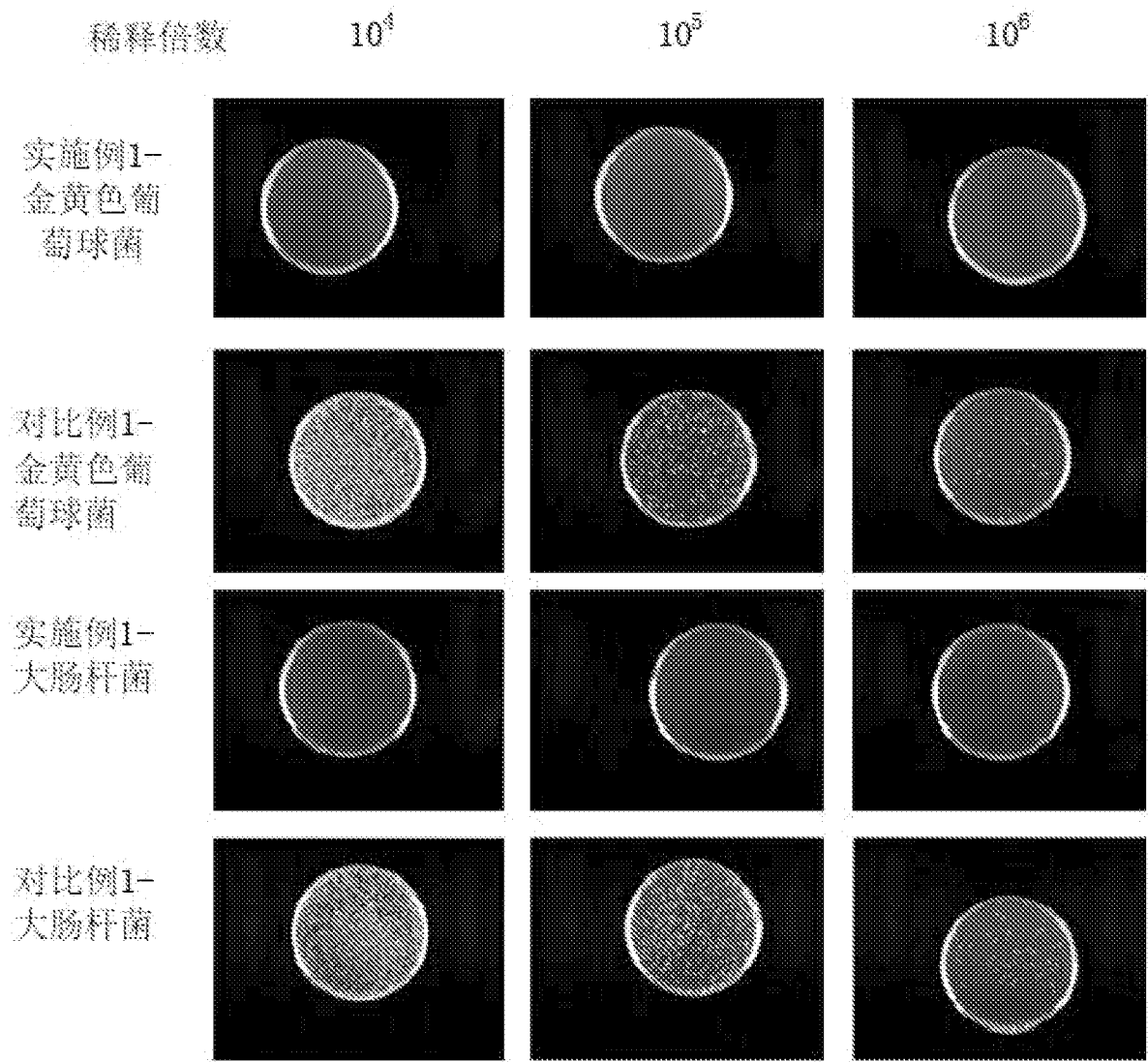
对比例1



实施例1



[图3]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/142460

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C08F299/00(2006.01)i; C08F2/48(2006.01)i; C08J3/075(2006.01)i; C08L55/00(2006.01)i; C08K3/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C08F, C08L, C08J, C08K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, VEN, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VCN, CNKI, ISI: 丝素蛋白, 丙烯酸, 缩水甘油酯, 抗菌, 银, 铜, 锌, silk, fibroin, acrylate, glycidyl, antibacterial, silver, Ag, copper, cuprum, Cu, zinc, zincum, Zn

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 116854872 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 October 2023 (2023-10-10)<br>entire document             | 1-10                  |
| X         | CN 113698560 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY et al.) 26 November 2021 (2021-11-26)<br>description, paragraphs [0004]-[0057]            | 1-10                  |
| A         | CN 114773549 A (ZHEJIANG A&F UNIVERSITY) 22 July 2022 (2022-07-22)<br>entire document                                                                | 1-10                  |
| A         | CN 114870015 A (AFFILIATED CANCER HOSPITAL OF GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY) 09 August 2022 (2022-08-09)<br>entire document                           | 1-10                  |
| A         | KR 20210124767 A (G-HAAN INC.) 15 October 2021 (2021-10-15)<br>entire document                                                                       | 1-10                  |
| A         | US 2016136241 A1 (UNION HOSPITAL, TONGJI MEDICAL COLLEGE, HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 19 May 2016 (2016-05-19)<br>entire document | 1-10                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 March 2024

Date of mailing of the international search report

13 March 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,  
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/142460**

| Patent document<br>cited in search report |             |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-------------|----|--------------------------------------|-------------------------|------------|----|--------------------------------------|
| CN                                        | 116854872   | A  | 10 October 2023                      | None                    |            |    |                                      |
| CN                                        | 113698560   | A  | 26 November 2021                     | None                    |            |    |                                      |
| CN                                        | 114773549   | A  | 22 July 2022                         | None                    |            |    |                                      |
| CN                                        | 114870015   | A  | 09 August 2022                       | None                    |            |    |                                      |
| KR                                        | 20210124767 | A  | 15 October 2021                      | None                    |            |    |                                      |
| US                                        | 2016136241  | A1 | 19 May 2016                          | WO                      | 2015127711 | A1 | 03 September 2015                    |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3112396    | A1 | 04 January 2017                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3112396    | A4 | 27 September 2017                    |
|                                           |             |    |                                      | JP                      | 2016531179 | A  | 06 October 2016                      |
|                                           |             |    |                                      | JP                      | 6138370    | B2 | 31 May 2017                          |

A. 主题的分类

C08F299/00(2006.01)i; C08F2/48(2006.01)i; C08J3/075(2006.01)i; C08L55/00(2006.01)i; C08K3/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C08F, C08L, C08J, C08K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, VEN, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VCN, CNKI, ISI, 丝素蛋白, 丙烯酸, 缩水甘油酯, 抗菌, 银, 铜, 锌, silk, fibroin, acrylate, glycidyl, antibacterial, silver, Ag, copper, cuprum, Cu, zinc, zincum, Zn

C. 相关文件

| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                        | 相关的权利要求 |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PX  | CN 116854872 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2023年10月10日 (2023 - 10 - 10)<br>全文                                                                       | 1-10    |
| X   | CN 113698560 A (深圳先进技术研究院等) 2021年11月26日 (2021 - 11 - 26)<br>说明书[0004]-[0057]                                                             | 1-10    |
| A   | CN 114773549 A (浙江农林大学) 2022年7月22日 (2022 - 07 - 22)<br>全文                                                                                | 1-10    |
| A   | CN 114870015 A (广州医科大学附属肿瘤医院) 2022年8月9日 (2022 - 08 - 09)<br>全文                                                                           | 1-10    |
| A   | KR 20210124767 A (G HAAN INC) 2021年10月15日 (2021 - 10 - 15)<br>全文                                                                         | 1-10    |
| A   | US 2016136241 A1 (UNION HOSPITAL TONGJI MEDICAL COLLEGE HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2016年5月19日 (2016 - 05 - 19)<br>全文 | 1-10    |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年3月6日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

肖刚

电话号码 (+86) 010-62084458

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2023/142460

| 检索报告引用的专利文件 |             |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-------------|----|----------------|------|------------|----|----------------|
| CN          | 116854872   | A  | 2023年10月10日    | 无    |            |    |                |
| CN          | 113698560   | A  | 2021年11月26日    | 无    |            |    |                |
| CN          | 114773549   | A  | 2022年7月22日     | 无    |            |    |                |
| CN          | 114870015   | A  | 2022年8月9日      | 无    |            |    |                |
| KR          | 20210124767 | A  | 2021年10月15日    | 无    |            |    |                |
| US          | 2016136241  | A1 | 2016年5月19日     | WO   | 2015127711 | A1 | 2015年9月3日      |
|             |             |    |                | EP   | 3112396    | A1 | 2017年1月4日      |
|             |             |    |                | EP   | 3112396    | A4 | 2017年9月27日     |
|             |             |    |                | JP   | 2016531179 | A  | 2016年10月6日     |
|             |             |    |                | JP   | 6138370    | B2 | 2017年5月31日     |