

(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
2017 年 6 月 15 日 (15.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/097070 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/78 (2006.01) *G01N 1/38* (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/104538
- (22) 国际申请日: 2016 年 11 月 4 日 (04.11.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510909061.4 2015 年 12 月 10 日 (10.12.2015) CN
- (71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。
- (72) 发明人: 谢红国 (XIE, Hongguo); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。于炜婷 (YU, Weiting); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。谢威杨 (XIE, Weiyang); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。马小军 (MA, Xiaojun); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。
- (74) 代理人: 沈阳科苑专利商标代理有限公司 (SHENYANG PATENT & TRADEMARK AGENCY)

ACADEMIA SINICA); 中国辽宁省沈阳市和平区三好街 24 号, Liaoning 110004 (CN)。

- (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))。

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY DETECTING CONTENT OF PROTEINS IN ALGINATE MATERIAL BY USING BICINCHONINIC ACID

(54) 发明名称: 二喹啉甲酸用于海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法

(57) Abstract: A method for quantitatively detecting the content of proteins in an alginate material by using a bicinchoninic acid. Under an alkaline condition, a protein content-absorbance detection standard curve is drawn at a micro interval by using a protein standard substance, and then the content of proteins in an alginate material is quantitatively detected according to the standard curve.

(57) 摘要: 一种将二喹啉甲酸用于海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法, 在碱性条件下, 用蛋白标准品在微量区间绘制蛋白含量-吸光度检测标准曲线, 再依此标准曲线, 定量检测海藻酸盐材料中的蛋白含量。



WO 2017/097070 A1

二喹啉甲酸用于海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法

技术领域

本发明涉及一种蛋白含量的测定方法，具体说是一种将二喹啉甲酸用于海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法。

背景技术

海藻酸盐材料因其良好的生物相容性，作为组织再生的生物材料显示出广阔的应用前景。但海藻酸盐材料中杂质蛋白将严重影响其在应用过程中的生物相容性。作为组织工程的原材料产品，其产品中的杂蛋白成分将被严格限制。目前，国家相关标准中针对蛋白的定量表征方法均采用考马斯亮蓝法。但，该方法在测试过程中，需要在酸性环境下进行，而海藻酸盐材料在 pH 酸性环境下形成凝胶态，无法形成均匀溶液，使得常规考马斯亮蓝检测蛋白的方法无法应用到海藻酸盐材料杂蛋白的检测中。

发明内容

针对常规考马斯亮蓝检测蛋白的方法无法应用到海藻酸盐材料杂蛋白的检测中的缺陷，本发明提出，将可在碱性条件下测定蛋白含量的方法用于海藻酸盐材料中杂质蛋白含量的检测。

本发明提出的具体技术方案如下：

(1) 用生理盐水配制成 $100.0 \mu\text{g/ml}$ 的蛋白质标准液。

(2) 将步骤(1)配制的标准液用生理盐水依此稀释成 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $20.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $30.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $40.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $50.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $60.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $70.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $80.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $90.0 \mu\text{g/ml}$ 。

(3) 配制二喹啉甲酸试剂及其工作液：

试剂 A：分别称取 10.0g BCA(二喹啉甲酸) (1%)， 20.0g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2%)， 1.6g 酒石酸钠 ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16%)， 4.0g NaOH (0.4%)， 9.5g NaHCO_3 (0.95%)，定容至 1L ，用 10mol/L NaOH 或固体 NaHCO_3 调节 pH 值至 11.25。

试剂 B：精确称取 2.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4%)，蒸馏水定容至 50mL 。

取 50 体积份试剂 A 与 1 体积份试剂 B 混合均匀，即配制成绿色的工作液。

(4) 向步骤(2)获得的梯度蛋白质标准液中加入二喹啉甲酸工作液，二者质量比为 1:5-1:50 均匀混合， $40-70^\circ\text{C}$ 水浴中反应 10-60 分钟，不含蛋白质标准液的生理盐水为对照组，测定各组在 562nm 处的吸光度值，绘制蛋白含量-吸光度标准曲线。

(5) 生理盐水配制海藻酸盐样品溶液 ($1-20\text{mg/ml}$)。

(6) 向步骤(5)配制的海藻酸盐溶液中加入二喹啉甲酸工作液，二者质量比为 1:5-1:50 均匀混合， $40-70^\circ\text{C}$ 水浴中反应 10-60 分钟，生理盐水为对照组，测定对照组与海藻酸盐样品组在 562nm 处的吸光度值，根据步骤(4)获得的蛋白含量-吸光度标准曲线，计算海藻酸盐溶液中的蛋白含量，根据海藻酸盐溶液浓度计算海藻酸盐材料样品中的蛋白含量。

(7) 也可将海藻酸钠样品直接溶解在二喹啉甲酸工作液中，海藻酸盐样品的配制浓度在 $10 \mu\text{g/ml}-10\text{mg/ml}$ ， $40-70^\circ\text{C}$ 水浴中反应 10-60 分钟，在 562nm 处测定吸光度值，根据步骤(4)获得的蛋白含量-吸光度标准曲线，计算海藻酸盐溶液中的蛋白含量。

本发明提出的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法, 适合测定分子量在 10-500kDa 的海藻酸盐材料。

本发明提出的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法, 适合测定海藻酸的钠盐或钾盐。

5 具体实施方式

实施例 1:

(1) 配制二喹啉甲酸试剂及其工作液:

试剂 A: 分别称取 10.0g BCA (1%), 20.0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2%), 1.6 g 酒石酸钠 ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16%), 4.0 g NaOH (0.4%), 9.5 g NaHCO_3 (0.95%), 定容至 1L, 用 10 mol/L NaOH 或固体 NaHCO_3 调节 pH 值至 11.25。

试剂 B: 精确称取 2.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4%), 蒸馏水定容至 50 mL。

取 50 体积份试剂 A 与 1 体积份试剂 B 混合均匀, 即配制成绿色的工作液。

(2) 绘制蛋白含量-吸光度标准曲线:

配制梯度蛋白标准液: 用生理盐水配制成 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 的牛血清白蛋白标准液, 用生理盐水依此稀释成 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 、30.0 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 、50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、60.0 $\mu\text{g/ml}$ 、70.0 $\mu\text{g/ml}$ 、80.0 $\mu\text{g/ml}$ 、90.0 $\mu\text{g/ml}$ 。向梯度蛋白质标准液中加入二喹啉甲酸工作液, 二者质量比为 1:10 均匀混合, 60°C 水浴中反应 30 分钟, 不含蛋白质标准液的生理盐水为对照组, 测定各组在 562 nm 处的吸光度值, 绘制蛋白含量-吸光度标准曲线。

(3) 测定待测海藻酸钠样品中的蛋白含量: 取海藻酸钠样品, 用生理盐水配制成 5mg/ml 的海藻酸钠溶液, 向海藻酸钠溶液中加入二喹啉甲酸工作液, 二者质量比为 1:10 均匀混合, 60°C 水浴中反应 30 分钟, 生理盐水为对照组, 测定两组在 562 nm 处的吸光度值, 根据蛋白含量-吸光度标准曲线, 求得海藻酸钠溶液中蛋白含量为 45.0 $\mu\text{g/ml}$ 。根据海藻酸钠溶液浓度, 计算得待测海藻酸钠样品中蛋白含量为 0.9% (质量分数)。

实施例 2:

(1) 配制二喹啉甲酸试剂及其工作液:

试剂 A: 分别称取 10.0g BCA (1%), 20.0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2%), 1.6 g 酒石酸钠 ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16%), 4.0 g NaOH (0.4%), 9.5 g NaHCO_3 (0.95%), 定容至 1L, 用 10 mol/L NaOH 或固体 NaHCO_3 调节 pH 值至 11.25。

试剂 B: 精确称取 2.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4%), 蒸馏水定容至 50 mL。

取 50 体积份试剂 A 与 1 体积份试剂 B 混合均匀, 即配制成绿色的工作液。

(2) 绘制蛋白含量-吸光度标准曲线:

配制梯度蛋白标准液: 用生理盐水配制成 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 的牛血清白蛋白标准液, 用生理盐水依此稀释成 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 、30.0 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 、50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、60.0 $\mu\text{g/ml}$ 、70.0 $\mu\text{g/ml}$ 、80.0 $\mu\text{g/ml}$ 、90.0 $\mu\text{g/ml}$ 。向梯度蛋白质标准液中加入二喹啉甲酸工作液, 二者质量比为 1:10 均匀混合, 60°C 水浴中反应 30 分钟, 不含蛋白质标准液的生理盐水为对照组, 测定各组在 562 nm 处的吸光度值, 绘制蛋白含量-吸光度标准曲线。

- (3) 测定待测海藻酸钾样品中的蛋白含量：取海藻酸钾样品，用二喹啉甲酸工作液配制成 1mg/ml 的海藻酸钾溶液，60℃水浴中反应 30 分钟，测定在 562 nm 处的吸光度值，根据蛋白含量-吸光度标准曲线，求得海藻酸钾溶液中蛋白含量为 28.0 μ g/ml。根据海藻酸钾溶液浓度，计算得待测海藻酸钾样品中蛋白含量为 0.28% (质量分数)。
- 5

权 利 要 求 书

1、二喹啉甲酸用于海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法，其特征在于：在碱性条件下，用蛋白质标准品绘制蛋白含量-吸光度检测标准曲线，再依此标准曲线，定量检测海藻酸盐材料中的蛋白含量。

5 2、按照权利要求 1 所述的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法，其特征在于所述方法的具体步骤如下：

 (1) 用生理盐水配制成 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白质标准液；

 (2) 将步骤(1)配制的标准液用生理盐水依此稀释成 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 、30.0 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 、50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、60.0 $\mu\text{g/ml}$ 、70.0 $\mu\text{g/ml}$ 、80.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 90.0 $\mu\text{g/ml}$ ；

 (3) 配制二喹啉甲酸试剂及其工作液：

 试剂 A：分别称取 10.0g BCA (1%)，20.0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2%)，1.6 g 酒石酸钠 ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16%)，4.0 g NaOH (0.4%)，9.5 g NaHCO_3 (0.95%)，定容至 1L，用 10 mol/L NaOH 或固体 NaHCO_3 调节 pH 值至 11.25；

15 试剂 B：精确称取 2.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4%)，蒸馏水定容至 50 mL；

 取 50 体积份试剂 A 与 1 体积份试剂 B 混合均匀，即配制成绿色的二喹啉甲酸工作液；

 (4) 向步骤(2)获得的梯度蛋白质标准液中分别加入二喹啉甲酸工作液，蛋白质标准液与二喹啉甲酸工作液二者质量比为 1:5-1:50 均匀混合，40-70℃水浴中反应 20 10-60 分钟，不含蛋白质标准液的生理盐水为对照组，测定各组在 562 nm 处的吸光度值，绘制蛋白含量-吸光度标准曲线；

 (5) 生理盐水配制海藻酸盐样品溶液 (1-20mg/ml)；向配制的海藻酸盐溶液中加入二喹啉甲酸工作液，海藻酸盐溶液与二喹啉甲酸工作液二者质量比为 1:5-1:50 均匀混合；或将海藻酸钠样品直接溶解在二喹啉甲酸工作液中，海藻酸盐样品的配制 25 浓度在 10 $\mu\text{g/ml}$ -10mg/ml；

 40-70℃水浴中反应 10-60 分钟，生理盐水为对照组，测定对照组与海藻酸盐样品组在 562 nm 处的吸光度值，根据步骤(4)获得的蛋白含量-吸光度标准曲线，计算海藻酸盐溶液中的蛋白含量，根据海藻酸盐溶液浓度计算海藻酸盐材料样品中的蛋白含量。

30 3、按照权利要求 1 或 2 所述的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法，其特征在于：该方法适合测定分子量在 10-500kDa 的海藻酸盐材料。

 4、按照权利要求 1 或 2 所述的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法，其特征在于：该方法适合测定海藻酸的钠盐或钾盐。

35 5、按照权利要求 1 或 2 所述的测定海藻酸盐材料中蛋白含量的定量检测方法，其特征在于：所述蛋白质为白蛋白、酪蛋白、免疫球蛋白等。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/104538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/78 (2006.01) i; G01N 21/31 (2006.01) i; G01N 1/38 (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)

G01N

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)

CHINA ACADEMIC JOURNALS FULL-TEXT DATABASE, CNABS, CNTXT, WPI, USTXT, WOTXT, EPTXT, EPODOC, STN, ISI web of knowledge: XIE, Guohong; DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; casein, 2-quinolinecarboxylic acid, protein, albumin, content, Sodium alga acid, potassium alginate, detection methods

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAN, Fuliang et al., "The Principle, Influence Factors and Advantages of Bicinchoninic Acid Method (BCA) for Protein and Peptide Assay", FOOD AND FERMENTATION INDUSTRIES, vol. 40, no. 11, 19 September 2014 (19.09.2014), pages 202-207	1-5
A	US 2006182654 A1 (CUMBERLAND, B.M. et al.), 17 August 2006 (17.08.2006), the whole document	1-5
A	CN 101105457 (NANCHANG UNIVERSITY), 16 January 2008 (16.01.2008), the whole document	1-5
A	LV, Yuan et al., "Bicinchoninic Acid Method for Determination of Protein Content in Milk", FOOD SCIENCE, vol. 31, no. 6, 15 March 2010 (15.03.2010), pages 151-154	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 21 December 2016 (21.12.2016)	Date of mailing of the international search report 03 January 2017 (03.01.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Tiesheng Telephone No.: (86-10) 010-62413770

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/104538

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2006182654 A1	17 August 2006	US 2009124017 A1	14 May 2009
CN 101105457	16 January 2008	CN 101105457 B	19 January 2011

A. 主题的分类 G01N 21/78(2006.01)i; G01N 21/31(2006.01)i; G01N 1/38(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) G01N 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)) 中国期刊全文数据库, CNABS, CNTXT, WPI, USTXT, WOTXT, EPTXT, EPODOC, STN, ISI web of knowledge: 谢国红, 中国科学院大连化学物理研究所, 二喹啉甲酸, 蛋白质, 白蛋白, 酪蛋白, 含量, 海藻酸钠, 海藻酸钾, 检测方法, 2-quinolinecarboxylic acid, protein, albumin, content, Sodium alga acid, potassium alginate, detection methods		
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
X	韩富亮等. “二喹啉甲酸法 (BCA) 分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点” 食品与发酵工业, 第40卷, 第11期, 2014年 9月 19日 (2014 - 09 - 19), 第202-207页	1-5
A	US 2006182654 A1 (CUMBERLAND B. M. ET AL.) 2006年 8月 17日 (2006 - 08 - 17) 全文	1-5
A	CN 101105457 (南昌大学) 2008年 1月 16日 (2008 - 01 - 16) 全文	1-5
A	吕媛等. “二喹啉甲酸法在牛奶蛋白质定量中的应用” 食品科学, 第31卷, 第6期, 2010年 3月 15日 (2010 - 03 - 15), 第151-154页	1-5
☐ 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 “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		国际检索报告邮寄日期
2016年 12月 21日		2017年 1月 3日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		吴铁生 电话号码 (86-10)010-62413770

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/104538

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2006182654	A1	2006年 8月 17日	US	2009124017	A1	2009年 5月 14日
CN	101105457		2008年 1月 16日	CN	101105457	B	2011年 1月 19日