

(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 12 月 28 日 (28.12.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/219952 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 1/22 (2006.01) **C12N 15/70** (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089103

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 20 日 (20.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610451059.1 2016年6月21日 (21.06.2016) CN

(71) 申请人: 深圳大学(SHENZHEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(72) 发明人: 郑易之(ZHENG, Yizhi); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 刘国宝(LIU, Guobao); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 陈丽伊(CHEN, Liyi); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 彭显明(PENG, Xianming); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市恒申知识产权事务所(普通合伙)(HENSEN INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国广东省深圳市福田区南园路 68 号上步大厦 10H, Guangdong 518000 (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, JO, JP, KE, KG, KH, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR AND USES OF ANTIFREEZE PROTEIN OF SOYBEAN

(54) 发明名称: 一种大豆抗冻蛋白的制备方法、应用

(57) Abstract: The present invention provides a preparation method for an antifreeze protein of soybean. The method comprises the steps of: transforming plasmids containing the expression sequence of the antifreeze protein to expressed escherichia coli for protein expression; purifying the protein by using an affinity chromatography method; and excising an His label by using thrombin after purification, so as to obtain the antifreeze protein. The antifreeze protein is a PM1 protein or a PM1-N oligopeptides. The present invention also provides uses of the PM1 protein or the PM1-N oligopeptides in the preparation of transgenic antifreeze or cold-resistant plant products and in the preparation of cryopreserved protecting agents for biological products.

(57) 摘要: 本发明提供了一种大豆抗冻蛋白的制备方法, 包括以下步骤: 将含有所述抗冻蛋白表达序列的质粒转化至大肠杆菌中, 进行蛋白表达; 用亲和层析法对蛋白进行纯化; 纯化后用凝血酶切除 His 标签, 获得抗冻蛋白。所述抗冻蛋白为 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽。本发明还提供了 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽在制备转基因抗冻或抗寒植物、生物类制品的冻存保护剂方面的应用。



WO 2017/219952 A1

一种大豆抗冻蛋白的制备方法、应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，尤其涉及一种大豆抗冻蛋白的制备方法、应用。

背景技术

生物在遭受低温胁迫时，造成细胞内环境脱水、形成结晶，继而造成细胞膜结构破裂或蛋白质失活，细胞或细胞器受到破坏，导致生物体受到损伤。因此，生物体要抵御低温冻害、寒害，最重要、最基本的要素有：一、避免细胞内结冰；二、提高细胞膜（结构）及生物大分子的低温稳定性。在低温条件下，有的生物体内会产生具有提高生物抗冻能力的蛋白质，如上世纪 60 年代在极区的海洋鱼类血清中发现一种可阻止冰晶生长的特异性蛋白质-抗冻蛋白（AFP）。目前发现的抗冻蛋白多为有序蛋白，对被保护对象有一定的选择特性。抗冻蛋白的发现，为在农业低温育种、食品工业、医药行业上的广泛的潜在应用奠定了重要基础。

大豆是我国的主要经济作物，科学工作者已从大豆种子中发现了一种新型抗冻蛋白—PM1 蛋白，PM1 蛋白是 LEA 蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)的一种，属于固有无序蛋白，在天然溶液中呈现无结构状态。与有序蛋白相比较，无序蛋白具有对热稳定、高可溶性特性，也具有可与被保护对象无特异性结合的特性。现有的 PM1 蛋白的提取方法较为繁琐，且提取的 PM1 蛋白纯度较低；对于 PM1 蛋白，普遍认可的观点是其具有广泛的应用前景，但对于它的具体用途，目前尚无法确定。

发明内容

本发明采用一种大豆抗冻蛋白的制备方法、应用，旨在拓展 PM1 蛋白和 PM1-N 短肽（PM1 的 N 端短肽）作为抗冻蛋白的具体用途。

本发明是这样实现的，一种大豆抗冻蛋白的制备方法，包括以下步骤：
将含有所述抗冻蛋白表达序列的质粒转化至大肠杆菌中，进行蛋白表达；
用亲和层析法对蛋白进行纯化；

纯化后用凝血酶切除 His 标签，获得所述抗冻蛋白；所述抗冻蛋白为 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽。

进一步地，所述亲和层析法中所用层析柱参数如下：填料：Chelating Sepharose Fast Flow 4BTM，流速为 3mL/min。

本发明还提供了 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽在制备转基因抗冻或抗寒植物方面的应用。

本发明还提供了 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽用于制备生物类制品的冻存保护剂的应用。

进一步地，所述生物类制品包括蛋白及酶制剂。

进一步地，所述生物类制品包括细胞、胚胎、组织或器官。

进一步地，所述生物类制品为兔红细胞。

进一步地，所述冻存保护剂中还含有甘油。

进一步地，所述冻存保护剂中还含有海藻糖。

进一步地，所述 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽为重组蛋白。

本发明的有益效果在于：本发明提供的 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽的制备方法，制备过程简单，获得的蛋白纯度高，便于大规模发酵生产。本发明通过研究提供了 PM1 蛋白和 PM1-N 短肽的功能，将所述 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽用于制备转基因抗冻或抗寒植物；将所述 PM1 蛋白用于制备生物类制品的冻存保护剂，所述生物类制品包括细胞、胚胎、组织或器官，以及蛋白及酶制剂。本发明所提供的 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽的应用，不仅为 PM1 蛋白的应用拓展了新的空间，为 PM1 蛋白的应用指明了方向，更加速了 PM1 蛋白相关研究的进

展。

附图说明

图 1 是本发明实施例提供的 PM1 蛋白及其短肽 PM1-N 的序列及电泳图；

图 2 是本发明实施例 1 提供的经冻融处理后的脂质体的浊度检测结果示意图；

图 3 是本发明实施例 1 提供的经冻融处理后的脂质体的粒径测定结果示意图；

图 4 是本发明实施例 1 提供的冻融处理前后的样品的显微镜显示图，其中图 4a 为未加 PM1、PM1-N 短肽组，图 4b 为加 PM1 蛋白组、图 4c 为加 PM1-N 短肽组；

图 5 是本发明实施例 2 提供的 PM1 蛋白对兔红细胞的保护作用的测定结果示意图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

PM1 蛋白在 NCBI（美国国立生物技术信息中心）上的氨基酸序列为：
MQGGKKAGESIKETATNIGASAKAGMEKTKATVQEKAERMTARDPVQKEL
ATQKKEAKMNQAELDKQAARQHNTAAKQSATTAGHMGHGHHTTGTGTGT
ATYSTTGEYGQPMGAHQTSAMPGHGTGQPTGHVTEGVVGSHPIGTNRGPG
GTATAHNTRAGGKPNDYGYGTGGT(SEQ ID NO: 1),

（可从 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001238562.1 网页中获取）。

PM1-N 短肽是 PM1 的 N 端短肽，其氨基酸序列为：MQGGKKAGESIKETAT
NIGASAKAGMEKTKATVQEKAERMTARDPVQKELATQKKEAKMNQAELD
KQAARQHNTAAKQSATTAG(SEQ ID NO: 2)。

按照本发明的技术方案制备 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽，过程如下：

将 pET28a/PM1 质粒、pET28a/PM1-N 质粒转化至大肠杆菌 BL21 Star 中，进行蛋白表达；

用亲和层析法对蛋白进行纯化；

纯化后，用凝血酶切除 His 标签，分别获得 PM1 蛋白、PM1-N 短肽。

具体地，所述亲和层析法中所用层析柱参数如下：柱长：20cm；直径：16mm，填料：Chelating Sepharose Fast Flow 4BTM，填料体积：10mL；厂家：Amersham Biosciences，流速为 3mL/min。

所制得的 PM1 蛋白、PM1-N 短肽的电泳图如图 1 中所示，从图中可以看出 PM1 蛋白的分子量约为 20-22kDa，PM1-N 短肽的分子量约为 11kDa。

PM1 蛋白、PM1-N 短肽为固有无序蛋白，在天然溶液中它们呈无序结构状态，对被保护对象没有明显的选择性。以下通过具体的实施例对所制得的 PM1 蛋白、PM1-N 短肽的功能进行测试，以探索其应用。

实施例 1 人工脂质体的制备及 PM1 蛋白、PM1-N 短肽对经冻融处理后脂质体的稳定作用

细胞膜的化学成分主要是由磷脂、少量蛋白质和多糖组成。我们选用 POPC（油酰磷脂酰胆碱）制备人工脂质体。称取 40mg 的 POPC，用 500 μ l 的氯仿将 POPC 完全溶解，用氮气缓慢除去氯仿后将 POPC 置于真空环境中 1h，随后用 1ml 的磷酸缓冲液（pH 7.4）重新溶解 POPC，溶解的 POPC 用挤压机反复挤压，使其通过 100nm 的聚碳酸脂膜形成直径约为 100nm 的脂质体。制备好的脂质体用磷脂定量试剂盒定量后稀释至 20mg/ml，取两组 100 μ l 的脂质体分别加入等体积的磷酸缓冲液（未加 PM1 蛋白的对照组）、0.8mg/ml 的 PM1 蛋白、0.8mg/ml 的 PM1-N 短肽（加 PM1 蛋白、PM1-N 短肽组）。28℃孵育 30min 后，置于-80℃冻 30min，28℃溶解 30min，反复 3 次。

（一）经冻融处理后的脂质体的浊度检测：

浊度是一种光学效应，可以反映射入光线与溶液中悬浮颗粒的相互作用，

表征光线透过水层时受到阻碍的程度。用测量浊度反映样品透射光的量或散射光的量，即溶液的透射光强度越小或散射光强度越大，表征水溶液的浊度越大。取冻融处理前后的样品各 20 μ l 用缓冲液稀释至 200 μ l，用紫外分光光度计测定其 OD₄₀₀ 值，如图 2 所示。未加 PM1 蛋白及 PM1-N 短肽组的脂质体的 OD₄₀₀ 值较低；经冻融处理后，其溶液浊度明显上升，表明经冻融处理后的脂质体发生了改变，意味着脂质体受到破坏。而添加 PM1 蛋白、PM1-N 短肽的脂质体样品，其浊度未发生改变、或略有所上升，这一结果表明 PM1 蛋白和 PM1-N 短肽对冻融后的脂质体起很好的稳定作用。

（二）经冻融处理后脂质体的粒径测定：

当光线通过不均匀介质时，会发生光散射现象，散射光中包含有颗粒大小、形状、结构以及成分、组成和浓度等信息。粒度仪，就是利用光散射技术测量溶液中颗粒的尺寸分布，确定溶液中颗粒的直径大小。取新鲜制备的脂质体 80 μ l 用磷酸缓冲液稀释至 4ml，用粒度仪测定其粒径，如图 3 所示。制备好的脂质体粒径大小为 100-200nm；经反复冻融处理后，73%的脂质体粒径未发生改变，同时出现了 27%的较大粒径脂质体（约为 1000-3000 nm），表明经冻融处理后的部分脂质体粒径明显增大，即冻融处理会引起脂质体破裂继而发生融合，形成较大粒径的脂质体。在脂质体溶液中添加 PM1 蛋白的样品，经过冻融处理后，100%的脂质体粒径未发生明显改变；添加 PM1-N 短肽的脂质体溶液经冻融后，95%脂质体粒径范围为 100-200nm。上述结果表明，PM1 蛋白和 PM1-N 短肽可维持、或较好的维持脂质体在冻融处理后的稳定。

（三）经冻融处理后脂质体的显微镜下观察：

采用显微镜术可直观地反映经冻融处理后脂质体的形态学变化。取制备好脂质体样品 5 μ l 置于相差显微镜下观察，所观察视野中为均质状态（图 4a 左）；经冻融处理后，视野中出现了明显聚集、呈块状的脂质体聚集物（图 4a 右）。在脂质体溶液中添加 PM1 蛋白、PM1-N 短肽的样品，在冻融处理后，样品中仅出现少量的脂质体聚集物（图 4b，图 4c）。

综合以上研究结果，可以看出冻融处理可使脂质体的体积发生改变，即冻融可破坏脂质体，而破坏的脂质体也可发生再融合，这是冻融导致脂质体粒径变大的主要原因。此外，也存在另一种可能性，即冻融可导致脂质体粘度增大，使得它们聚集形成脂质体聚集物。在脂质体溶液中加入 PM1 蛋白、PM1-N 短肽后，可阻止冻融引起的脂质体破坏及再融合、也可阻止脂质体发生彼此间聚集。

实施例 2 PM1 蛋白对兔红细胞的保护作用测定

制备 50 μ l 的 0.2%的新鲜兔血红细胞与等体积的柠檬酸缓冲液的混合液。再在含兔血红细胞的溶液中分别加入 PM1（终浓度为 5mg/ml）、甘油（终浓度为 5%）、PM1+甘油。溶液在 4℃孵育 30min 后，用细胞计数器统计兔血细胞数量。再将上述溶液置于-20℃冻 30min，室温融解 30min，反复三次处理后，进行细胞计数。

结果如图 5 所示，经冻融处理后的兔红细胞数明显减少，细胞剩余量仅为 54%；在兔红细胞中加入 PM1 蛋白后再经冻融处理，剩余细胞数为 72%，显著高于经冻融处理、未添加 PM1 蛋白的兔红细胞剩余量。若在兔红细胞溶液中加入 5%甘油，经冻融后的兔红细胞数剩余量约 58%，结果表明 5%甘油未对经冻融的兔红细胞有保护作用；若在兔红细胞溶液中同时加入 PM1 蛋白和 5%甘油，剩余细胞量提高至 87%，表明它们对经冻融处理的兔红细胞保护作用更加明显，可见 PM1 蛋白与甘油对兔红细胞的有显著的协同保护作用。

由以上结果可知，在兔红细胞中添加 PM1 蛋白和甘油，可显著提高细胞在冻融处理后的稳定性。这一结果与 PM1 对脂质体的冻融下的保护作用是一致的。

实施例 3 PM1 蛋白+海藻糖对兔红细胞的保护作用

将 0.2%的兔血红细胞分别与 PM1（浓度 5mg/mL）、海藻糖（终浓度 0.75mg/mL）、PM1+海藻糖混合。在 4℃孵育 30min。用细胞计数器计算兔血细胞数量。再将上述混合液加入 PM1 蛋白后，将样品置于-20℃冻 30min，室

温融解 30min。反复三次处理后，在经细胞计数。计算冻融后剩余细胞数量与未冻融血红细胞数量的比例并进行比较。

结果如图 5 所示，在兔红细胞溶液中加入 0.75mg/ml 的海藻糖，经冻融的剩余的兔红细胞量为 61%，即海藻糖的添加未显示出对经冻融处理的兔红细胞的保护及稳定作用；若在兔红细胞溶液中加入 PM1 和 0.75mg/mL 海藻糖后，经冻融的兔血红细胞剩余量为 89%，可见 PM1 和 0.75mg/mL 对兔血红细胞具有显著的、协同的保护性效果。由此可知，在兔红细胞中添加 PM1 蛋白和海藻糖，可显著提高细胞在冻融处理后的稳定性。这一结果与 PM1 对脂质体的冻融下的保护作用是一致的。

综合以上实施例可知，大豆 PM1 蛋白及 PM1-N 短肽可以作为植物抗冻蛋白，用于制备转基因抗冻植物的生产；也可以将 PM1 蛋白用于生物类制品的冻存保存剂，如蛋白（酶制剂）、细胞（如卵细胞、红细胞）、胚胎、组织、器官（如捐赠的器官）；还可以用于食品的冷冻、储藏、运输、解冻等方面。此外，大豆 PM1 蛋白及 PM1-N 短肽与甘油或海藻糖组合，可以起到增强保护作用的效果。

由于 PM1 蛋白及 PM1-N 短肽为无序蛋白，呈无序结构状态，对被保护对象没有明显的选择性。因此，有着更加广阔的应用前景。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

- 1、一种大豆抗冻蛋白的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
将含有所述抗冻蛋白表达序列的质粒转化至大肠杆菌中，进行蛋白表达；
用亲和层析法对蛋白进行纯化；
纯化后用凝血酶切除 His 标签，获得所述抗冻蛋白；所述抗冻蛋白为 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽。
- 2、如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述亲和层析法中所用层析柱参数如下：填料：Chelating Sepharose Fast Flow 4BTM，流速为 3mL/min。
- 3、PM1 蛋白或 PM1-N 短肽在制备转基因抗冻或抗寒植物方面的应用。
- 4、PM1 蛋白或 PM1-N 短肽用于制备生物类制品的冻存保护剂的应用。
- 5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述生物类制品包括蛋白及酶制剂。
- 6、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述生物类制品包括细胞、胚胎、组织或器官。
- 7、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述生物类制品为兔红细胞。
- 8、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述冻存保护剂中还含有甘油。
- 9、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述冻存保护剂中还含有海藻糖。
- 10、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述 PM1 蛋白或 PM1-N 短肽为重组蛋白。

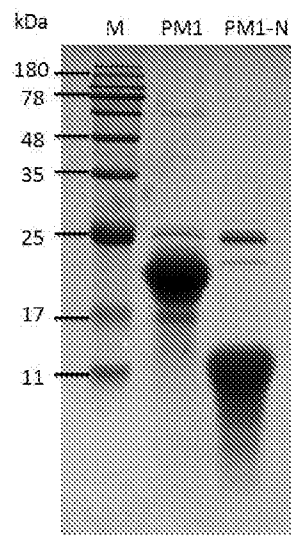


图 1

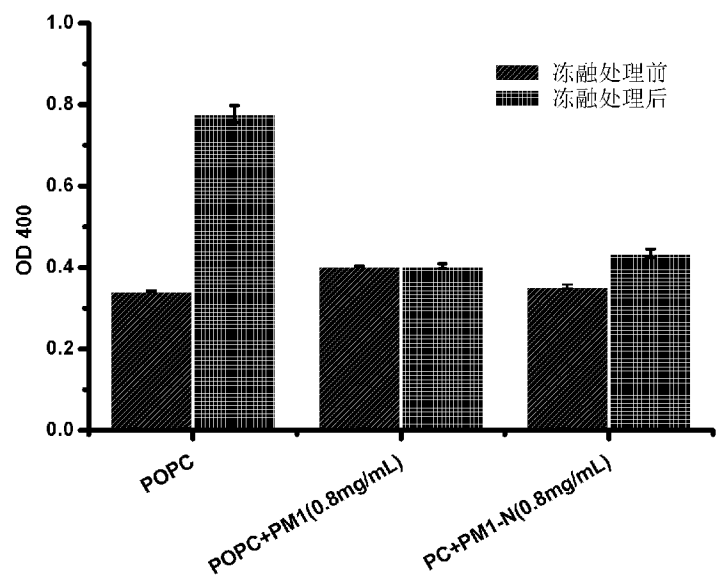


图 2

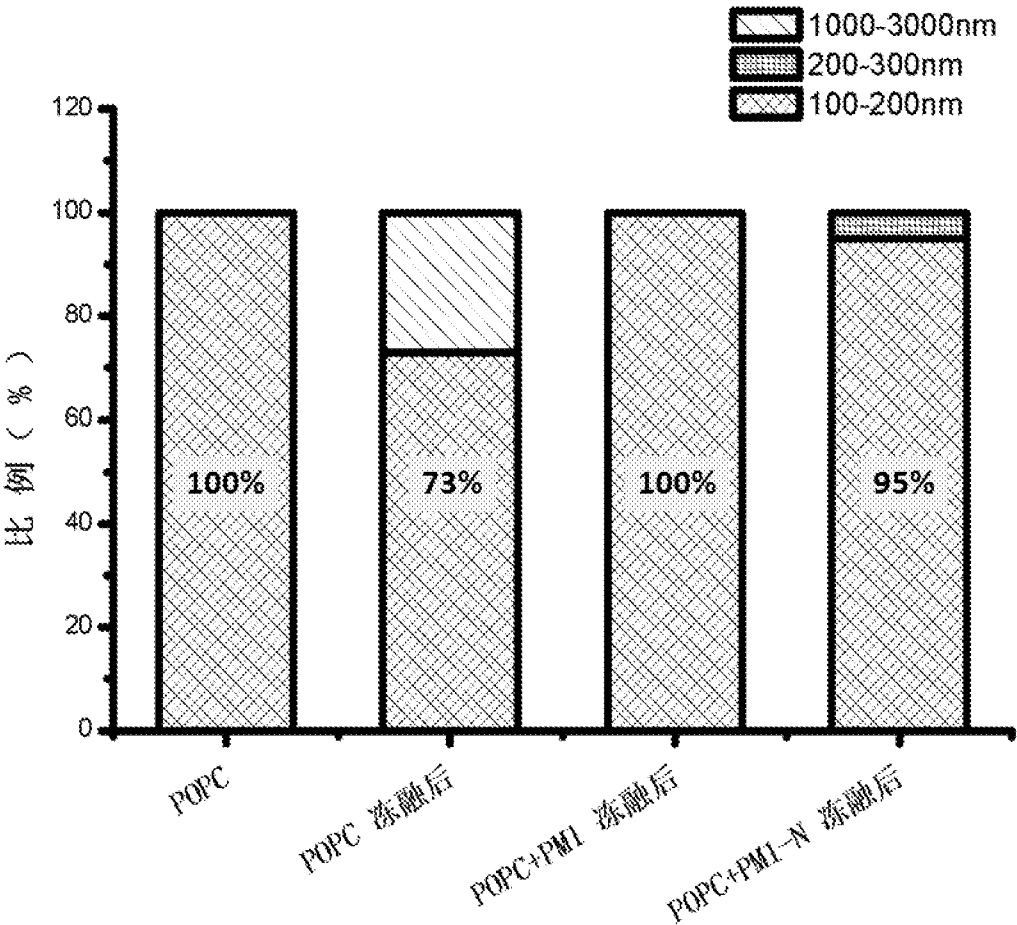


图 3

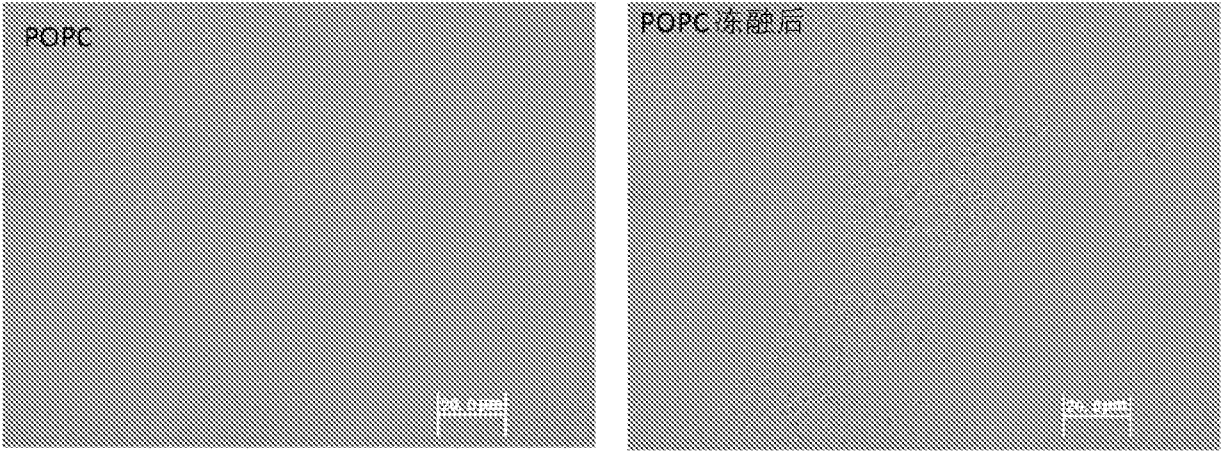


图 4a

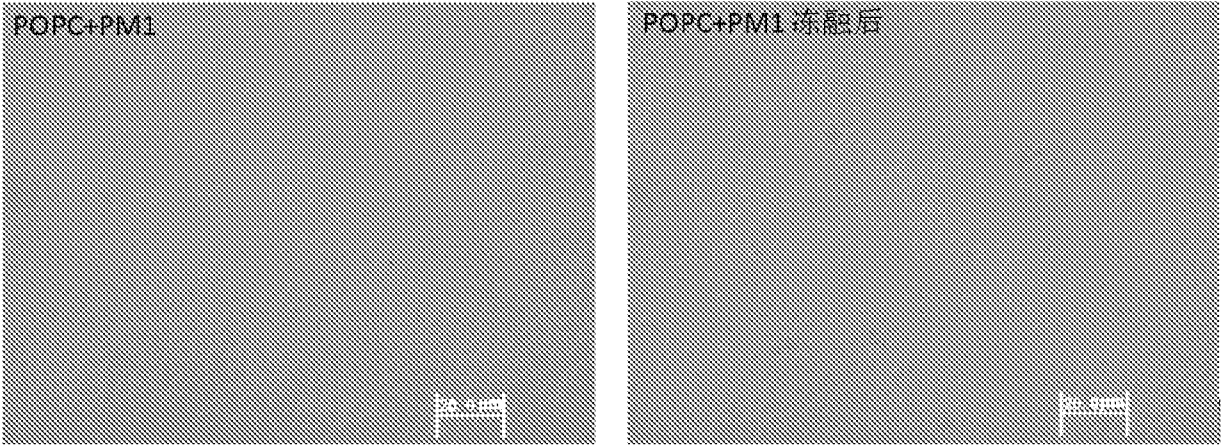


图 4b

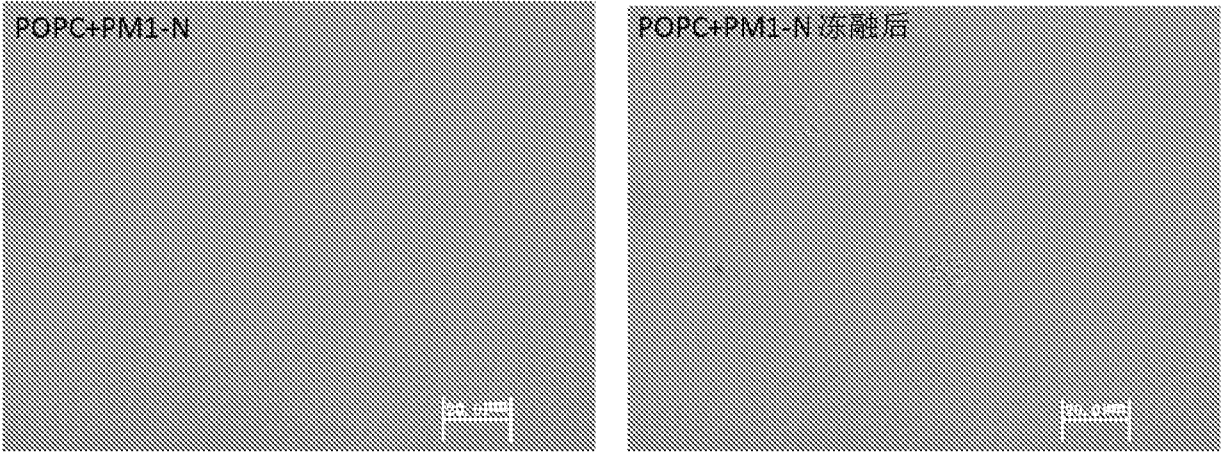


图 4c

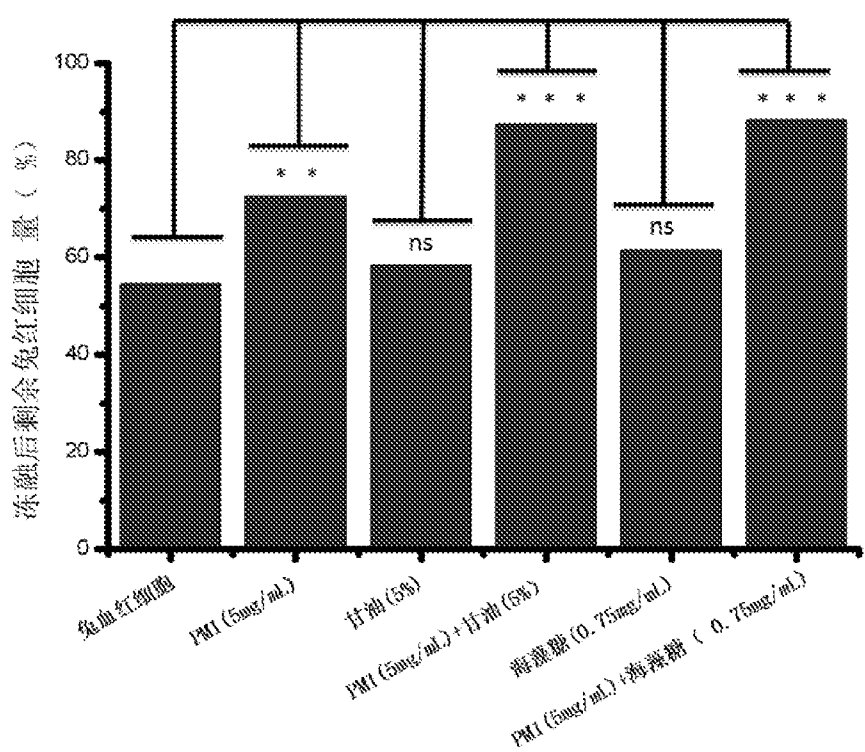


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/22 (2006.01) i; C12P 21/04 (2006.01) i; C12N 15/70 (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)

C07K; C12P; C12N

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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED AND SEARCH TERMS: antifreeze, PM1, PM1-N, LEA, Glycine max L., soybean, cold resistant, cold tolerance, late embryogenesis abundant protein, preparation, purification, affinity chromatography etc.;

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL AND SEARCH SEQUENCE: SEQ ID NOs:1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO, Yang; "Expression of soybean GmPM1 and GmPM9 proteins enhances resistance to copper stress in plant", CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, no. 12, 31 December 2015 (31.12.2015), see page 39, paragraph 2 and page 41, section 3.3.3	1-2
X	SHIH, M.D. et al., "Characterization of two soybean (Glycine max L.) LEA IV proteins by circular dichroism and fourier transform infrared spectrometry", PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 3, no. 51, 31 December 2010 (31.12.2010), see abstract	3
Y	GAO, Yang; "Expression of soybean GmPM1 and GmPM9 proteins enhances resistance to copper stress in plant", CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, no. 12, 31 December 2015 (31.12.2015), see page 39, paragraph 2 and page 41, section 3.3.3	4-10
Y	CN 103415533 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND.), 27 November 2013 (27.11.2013) see description, page 7, paragraph [0077]	4-10
PX	CN 105969788 A (SHENZHEN UNIVERSITY), 28 September 2016 (28.09.2016), see the whole document	1-10

☒ 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 07 September 2017 (07.09.2017)	Date of mailing of the international search report 27 September 2017 (27.09.2017)
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 WANG, Ying Telephone No.: (86-10) 62412197

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089103

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CHEN, Liyi et al., "Protection effect of soybean PM1 protein on liposome and the rabbit red blood cells", JOURNAL OF SHENZHEN UNIVERSITY (SCIENCE & ENGINEERING), vol. 5, no. 33, 30 September 2016 (30.09.2016), see the whole document	3-10
A	CN 102010869 A (JILIN UNIVERSITY), 13 April 2011 (13.04.2011), see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/089103

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103415533 A	27 November 2013	JP WO2012121172 A1	17 July 2014
		EP 2682402 A1	08 January 2014
		EP 2682402 A4	03 September 2014
		WO 2012121172 A1	13 September 2012
CN 105969788 A	28 September 2016	None	
CN 102010869 A	13 April 2011	CN 102010869 B	30 May 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089103

A. 主题的分类 C07K 1/22(2006.01)i; C12P 21/04(2006.01)i; C12N 15/70(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) C07K; C12P; C12N 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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 大豆, 抗冻, 抗寒, 耐寒, 耐冻, PM1, PM1-N, 胚胎晚期富集蛋白, LEA, 制备, 纯化, 亲和层析, 亲和色谱, Glycine max L., soybean, cold resistant, cold tolerance, late embryogenesis abundant protein, preparation, purification, affinity chromatography等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-2。																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Shih M D等. "Characterization of two soybean (Glycine max L.) LEA IV proteins by circular dichroism and fourier transform infrared spectrometry" Plant and Cell Physiology, 第3卷, 第51期, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 见摘要</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节</td> <td>4-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103415533 A (株式会社钟化) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 见说明书第7页第【0077】段</td> <td>4-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105969788 A (深圳大学) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节	1-2	X	Shih M D等. "Characterization of two soybean (Glycine max L.) LEA IV proteins by circular dichroism and fourier transform infrared spectrometry" Plant and Cell Physiology, 第3卷, 第51期, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 见摘要	3	Y	高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节	4-10	Y	CN 103415533 A (株式会社钟化) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 见说明书第7页第【0077】段	4-10	PX	CN 105969788 A (深圳大学) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 见全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节	1-2																		
X	Shih M D等. "Characterization of two soybean (Glycine max L.) LEA IV proteins by circular dichroism and fourier transform infrared spectrometry" Plant and Cell Physiology, 第3卷, 第51期, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 见摘要	3																		
Y	高阳. "大豆GmPM1和GmPM9蛋白的耐Cu2+胁迫分子机理研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 第12期, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 见第39页第2段, 第41页第3.3.3节	4-10																		
Y	CN 103415533 A (株式会社钟化) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 见说明书第7页第【0077】段	4-10																		
PX	CN 105969788 A (深圳大学) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 见全文	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 "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																		
2017年 9月 7日		2017年 9月 27日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
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		王颖 电话号码 (86-10)62412197																		

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	陈丽伊等. “大豆PM1蛋白对脂质体及兔红细胞的稳定作用” 深圳大学学报理工版，第5卷，第33期，2016年 9月 30日（2016 - 09 - 30）， 见全文	3-10
A	CN 102010869 A（吉林大学）2011年 4月 13日（2011 - 04 - 13） 见全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/089103

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)
CN	103415533	A	2013年 11月 27日	JP	W02012121172	A1	2014年 7月 17日
				EP	2682402	A1	2014年 1月 8日
				EP	2682402	A4	2014年 9月 3日
				WO	2012121172	A1	2012年 9月 13日
CN	105969788	A	2016年 9月 28日	无			
CN	102010869	A	2011年 4月 13日	CN	102010869	B	2012年 5月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)