

(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 23 日 (23.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/015657 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 21/02 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/113398

(22) 国际申请日: 2023 年 8 月 16 日 (16.08.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310894436.9 2023年7月20日 (20.07.2023) CN

(71) 申请人: 凯莱英生命科学技术(天津)有限公司(ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(72) 发明人: 洪浩(HONG, Hao); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。詹姆斯·盖吉(JAMES, Gage); 美国北卡罗莱纳州莫里斯威尔机场大道600号, North Carolina 27560 (US)。张娜(ZHANG, Na); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。焦学成(JIAO, Xuecheng); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大

街71号, Tianjin 300457 (CN)。马玉磊(MA, Yulei); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。张海彬(ZHANG, Haibin); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。齐奕珂(QI, Yike); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。马天娇(MA, Tianjiao); 中国天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号, Tianjin 300457 (CN)。

(74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司(KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层, Beijing 100098 (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, 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,

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR L-AMINO ACID LIGASE AND USE THEREOF IN DIPEPTIDE SYNTHESIS

(54) 发明名称: L-氨基酸连接酶的制备方法及其在二肽合成上的应用

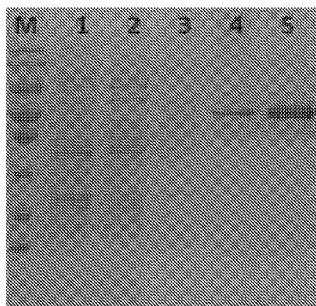


图 2

(57) Abstract: A preparation method for an L-amino acid ligase and a use thereof in dipeptide synthesis. A dipeptide synthesis method comprises: using an L-amino acid ligase of an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1 to perform dipeptide synthesis reaction to obtain a dipeptide. The L-amino acid ligase can be used for synthesis of a plurality of functional dipeptides, has a wide substrate spectrum and high synthesis efficiency, can be well applied to industrial amplification, has low costs and high yield, and realizes real green chemistry.

(57) 摘要: 一种L-氨基酸连接酶的制备方法及其在二肽合成上的应用。其中, 二肽合成方法包括利用如SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列的L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应, 得到二肽。利用所述L-氨基酸连接酶, 能够进行多种功能二肽的合成, 底物谱较广, 且合成效率较高, 能够较好地用于工业放大, 成本低, 收率高, 实现了真正的绿色化学。



WO 2025/015657 A1

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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

L-氨基酸连接酶的制备方法及其在二肽合成上的应用

本申请是以 CN 申请号为 202310894436.9, 申请日为 2023 年 7 月 20 日的中国申请为基础, 并主张其优先权, 该 CN 申请的公开内容作为整体引入本申请中。

技术领域

本发明涉及酶技术领域, 具体而言, 涉及一种 L-氨基酸连接酶的制备方法及其在二肽合成上的应用。

背景技术

二肽是最简单的肽, 由一分子氨基酸的 α -羧基和另一分子氨基酸的 α -氨基脱水缩合形成的酰胺键组成。尽管二肽的结构简单, 但它具有广泛的生物活性, 能够对生物体的生理代谢等生命活动起到调节作用。以抗生素、抗病毒、抗癌、激素及免疫调节作用为基础的肽需求量逐年增加, 并广泛应用于医药、食品、保健品、化妆品等领域。比如肌肽 (Carnosine, β -alanine-His) 具有抗氧化、抗炎、抗糖化的作用; 双甘氨酸 (Gly-Gly) 在医药上用作血液保存和蛋白质药物细胞色素 C 水针剂的稳定剂; 丙谷二肽 (Ala-Gln) 作为手术病人的重要营养补充剂; 阿斯巴甜 (Asp-Phe methyl ester) 是广泛使用的一种甜味剂; Ala-Phe, Ile-Phe, Pro-Gly 二肽是咸味增强剂; Ile-Tyr, Lys-Trp, Val-Tyr, Ile-Trp 是降压肽, Arg-Trp 具有镇痛作用的, Lys-Glu 具有抗肿瘤活性等等。

目前二肽合成主要是化学合成, 该过程涉及到保护和去保护相关操作的过程, 且产物会发生消旋, 而且合成成本较高, 甚至需要有毒试剂等问题。而采用生物法合成则具有很好的立体选择性, 不产生消旋产物。L-氨基酸连接酶可以在 ATP 参与下将两个游离氨基酸连接合成二肽。现有的 L-氨基酸连接酶 (Lal) 底物谱较窄, 且在合成二肽的反应中底物浓度较低, 底物浓度提高以后, 酶的活性不足, 这严重限制了 Lal 在合成多种功能二肽上的广泛应用。因而, 开发具有广泛底物谱的 L-氨基酸连接酶对二肽合成具有着非常重要的意义。

发明内容

本发明的主要目的在于提供一种 L-氨基酸连接酶在二肽合成上的应用、及其制备方法, 以解决现有技术中 L-氨基酸连接酶底物谱较窄的问题。

为了实现上述目的, 根据本发明的第一个方面, 提供了一种制备二肽的方法, 方法包括利用如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应, 得到二肽。

进一步地, 二肽合成反应的底物为氨基酸; 优选地, 氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸或酪氨酸中的一种或两种。

进一步地，二肽包括 Gly-Gln、Gly-Tyr、Gly-Gly 或 Ala-Gln。

进一步地，二肽合成反应的反应体系包括：pH 值为 8.5-9.0 的如下缓冲液：0.1-0.2M Tris-HCl、0.1-0.2M ATP 及 0.1-0.2M MgCl₂。

进一步地，二肽合成反应的反应温度为 20-25℃。

进一步地，二肽合成反应的反应时间为 15-17h。

进一步地，进行二肽合成反应的 L-氨基酸连接酶在反应体系中的质量浓度为 0.05-1mg/mL。

进一步地，进行二肽合成反应的底物在反应体系中的浓度为 10-200 mM。

为了实现上述目的，根据本发明的第二个方面，提供了一种 L-氨基酸连接酶的制备方法，其特征在于，将编码 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 L-氨基酸连接酶的基因克隆至表达载体中，得到重组载体；将重组载体导入大肠杆菌中，得到重组菌株；培养重组菌株，诱导 L-氨基酸连接酶的表达，得到培养液；将培养液进行超声破碎后离心，得到 L-氨基酸连接酶。

进一步地，表达载体包括 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pEZ Z18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19；优选地，宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选地，原核细胞为大肠杆菌和枯草芽孢杆菌；更优选地，大肠杆菌的菌种为 BL21；优选地，真核细胞为酿酒酵母和毕赤酵母。

应用本发明的技术方案，利用本申请的 L-氨基酸连接酶，能够进行多种功能二肽的合成，底物谱较广，且合成效率较高，能够较好地用于工业放大，成本低，收率高，实现了真正的绿色化学。

附图说明

构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 示出了实施例 1 中的重组 L-氨基酸连接酶在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 结果图；

图 2 示出了实施例 2 中利用大肠杆菌纯化 Blal 蛋白的 SDS-PAGE 结果图。

具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

如背景技术所提到的，现有技术中的 L-氨基酸连接酶在二肽合成反应中底物谱普遍较窄。不同的 L-氨基酸连接酶表现出不同的底物特异性，有些酶不能利用酸性或碱性氨基酸作为底物；有些能合成 N 端氨基酸较大，而 C 端氨基酸较小的二肽，有些则相反；还有一些酶表现出高度受限的底物特异性，如 N 端只接受 L-蛋氨酸和 L-亮氨酸，C 端底物仅限于小残基等。

此外，现有技术中的 L-氨基酸连接酶能够催化底物的浓度较低，通常只有几十 mM 的水平，且活力不足，不能用于多种功能二肽合成，这制约着 L-氨基酸连接酶在合成多种二肽产品上的广泛应用。因此，开发具有广泛底物谱的 L-氨基酸连接酶有着非常重要的意义。在本申请中发明人尝试通过筛选及密码子优化的方法对 L-氨基酸连接酶进行改造，进而提高酶的各种性质，扩宽酶的底物谱，提高 L-氨基酸连接酶的酶活力，使其可以广泛用于生产功能二肽的技术方案中，因而提出了本申请的一系列保护方案。

本发明的第一种典型的实施方式中，提供了一种制备二肽的方法，方法包括利用如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应，得到二肽。

上述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，是将来源于 *Bacillus sp. Root920* 的 L-氨基酸连接酶 Blal 经密码子优化后的 DNA 序列经转录翻译得到的氨基酸序列。根据大肠杆菌中偏好，将来源于 *Bacillus sp. Root920* 的 L-氨基酸连接酶 Blal 的 DNA 序列进行密码子优化。

已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见，例如，Brummell 等人，*Biochem .32:1180-1187(1993)*；Kobayashi 等人 *Protein Eng .12(10):879-884(1999)*；和 Burks 等人 *Proc .Nat Acad .Set USA 94:412-417(1997)*)。

SEQ ID NO: 1:

MSKKTVLVIADLGGCPPHMFYVESVAASYHIVSYIPRPFAITKGHAELIEKYSIAVIKDRDY
FETHPSFEHPDSIYWAHDDYLYKSEEEVVDDLVRVASFFKADAITTNELFIAPMAKAAERLG
LRGAGVKAEEKARDKSKMRAAFNAAGVKAVKTQPVTTLADFQQAIEHIGTPLILKPTYLAS
SIGVTLFHDRASSDDLFLNVQSYLQTIPVNAVTYEAPFVAETYLEGAYKDWYQEDGYSYD
VSVEGLVVEGEYIPFVIHDKTPQIGFTETAHITPSILDNEAQQIIIEAAKKANEGLGLENCATHT
EIKLMKNRETGLIESAARFAGWNMIPNIKKVFGVDMAKLLIDVLVDGKKAELPKELLSGHT

HYIADCHLYPQHFKESGHIPAEATHITIDHIHIPQDALVGD TVIVSKSVPSKGT FVDLSLFEAFN
GIVSLELKGSSSQDVAVSIRNLQKQAAIHLMDDELVKG。

SEQ ID NO: 2: (经密码子优化后的源于 *Bacillus sp.* Root920 的 L-氨基酸连接酶 Blal 的 DNA 序列)

ATGTCAAAAAAGACAGTTCTAGTAATAGCTGATTTGGGTGGCTGCCACCGCACATG
TTTTATGAAAGCGTTGCGGCATCCTACCATATTGTGAGCTACATACCGCGTCCGTTTCGCAA
TCACTAAAGGCCACGCAGAGCTGATTGAAAAATACAGCATCGCGGTCATCAAGGACCGT
GACTACTTCGAAACCCACCCGTCTTTTGAACATCCGGATAGCATTACTGGGCACACGAT
GACTACCTGAAGAGCGAAGAAGAGGTGGTGGACGACCTGGTGC GCGCTCGCCTCTTTTTT
CAAAGCGGACGCAATCACCACCAATAACGAGCTGTTCATCGCCCCGATGGCGAAAGCGG
CGGAACGTCTGGGCCTGCGTGGTGC GGGCGTGAAGGCTGCGGAAAAGGCTCGCGATAA
GTCCCAAATGAGAGCTGCGTTTAAACGCCG CAGGTGTTAAAGCTGTGAAGACCCAGCCGG
TTACCACTCTGGCGGATTTCCAGCAAGCAATCGAGCACATCGGTACGCCGCTGATCCTGA
AGCCGACCTACTTGGCTTCCTCTATCGGCGTG ACCCTGTTTCATGACCGCGCCGGTTCCG
ACGATTTGTTCTGAATGTT CAGAGCTACCTGCAAACCATTCCGGTGCCGAACGCGGTTA
CGTACGAGGCGCCTTTTCGTGGCTGAAACGTACCTTGAGGGCGCTTATAAAGACTGGTATC
AAGAAGATGGTTATAGCGATTATGTTAGCGTCGAGGGTCTCGTAGTTGAGGGCGAATATAT
TCCGTTTCGTCATTCACGATAAAACCCCGCAGATCGGCTTTACTGAAACCGCGCATATTACC
CCGAGCATCCTGGATAATGAGGCGCAGCAAATTATTATCGAAGCGGCGAAAAAGGCGAA
CGAGGGTCTGGGTTTGGAGAACTGCGCTACCCATACCGAAATCAAGCTGATGAAAAACC
GTGAAACCGGTTTGATCGAGAGCGCAGCGCGT TTTG CAGGCTGGAATATGATTCCCAACA
TCAAGAAAGTTTTTCGGTGTTGACATGGCCAAGCTGCTGATTGACGTGCTGGTTGACGGG
AAAAAGGCGGAGCTTCCAAAAGAATTACTGAGCGGTCACACCCACTATATTGCGGACTG
TCATCTATATCCGCAACATTTTAAAGAGTCTGGTCACATCCCTGCAGAGGCCACCCACATC
ACGATTGATCATATTCACATCCCGCAGGACGCGCTGGTGGGTGATACCGTTATCGTGTCTGA
AGAGCGTACCGAGCAAAGGCACGTTTGTGACCTGAGTCTTTTCGAGGGCCTTCAACGGT
ATTGTGAGCTTAGAGTTGAAGGGCTCATCGTCCCAGGACGTTGCTGTTTCGATCCGTAAT
CTGCAGAAACAGGCAGCCATCCACCTGATGGATGAATTGGTGAAGGGC。

本申请的 L-氨基酸连接酶能够利用多种氨基酸作为底物进行二肽合成。因而，任何 L-氨基酸连接酶能够作用的氨基酸均适用于本申请，在一种优选的实施例中，二肽合成反应的底物为氨基酸；在一种优选的实施例中，氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸或酪氨酸中的一种或两种。本申请的 L-氨基酸连接酶能够利用上述 20 种氨基酸作为底物，在底物浓度提高后，仍能保持一定的活性进行二肽的合成。

任何能够利用 L-氨基酸连接酶合成得到的二肽均适用于本申请，在一种优选的实施例中，二肽包括 Gly-Gln、Gly-Tyr、Gly-Gly 或 Ala-Gln。特别是利用 L-氨基酸连接酶合成得到一些重要的功能二肽。其中，二肽是由一分子氨基酸的 α -羧基和另一分子氨基酸的 α -氨基脱水缩合形成的酰胺键组成，广泛应用于医药、食品、保健品、化妆品等领域。如甘氨酰谷氨酰胺

(Gly-Gln)可替代谷氨酰胺作为细胞培养的营养物质，提高细胞的产量；甘酪二肽(Gly-Tyr)是一种降压肽；双甘氨酸(Gly-Gly)在医药上用作血液保存和蛋白质药物细胞色素 C 水针剂的稳定剂；丙谷二肽(Ala-Gln)作为手术病人的重要营养补充剂。

本申请的二肽合成反应于碱性环境下，消耗 ATP 将两个游离的氨基酸连接合成为二肽，任何能够利用 L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应的反应体系均适用于本申请，在一种优选的实施例中，二肽合成反应的反应体系包括：0.1-0.2M Tris-HCl、0.1-0.2M ATP 及 0.1-0.2M MgCl₂；Tris-HCl 的 pH 值为 8.5-9.0。

任何能够完成二肽合成反应的反应条件均适用于本申请，从二肽的反应效率及消耗的能耗角度考虑，在一种优选的实施例中，二肽合成反应的反应温度为 20-25℃；反应时间为 15-17h。

任何利用 L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应的酶的质量及底物的浓度均适用于本申请，从提高二肽合成的反应效率的角度来看，在一种优选的实施例中，二肽合成反应的 L-氨基酸连接酶在反应体系中的质量浓度为 0.05-1mg/mL；二肽合成反应的底物在反应体系中的浓度为 10-200 mM。

本发明的第二种典型的实施方式中，提供了一种 L-氨基酸连接酶的制备方法，将上述 L-氨基酸连接酶的基因克隆至表达载体中，得到重组载体；将重组载体导入大肠杆菌中，得到重组菌株；培养重组菌株，诱导 L-氨基酸连接酶的表达，得到培养液；将培养液进行超声破碎后离心，得到 L-氨基酸连接酶。通过常规的原核表达蛋白的方法完成对 L-氨基酸连接酶的表达生产。

除非特别指明，本申请中所使用的分子生物学实验方法，基本上参照 J.Sam brook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F.M.Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley&Sons, Inc.，1995 中的方法进行；限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件下。本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本申请，且不意欲限制本申请所要求保护的范畴。

任何能够正常表达 L-氨基酸连接酶的重组载体均适用于本申请，在一种优选的实施例中，表达载体包括 pET-22a (+)、pET-22b (+)、pET-3a (+)、pET-3d (+)、pET-11a (+)、pET-12a (+)、pET-14b (+)、pET-15b (+)、pET-16b (+)、pET-17b (+)、pET-19b (+)、pET-20b (+)、pET-21a (+)、pET-23a (+)、pET-23b (+)、pET-24a (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28a (+)、pET-29a (+)、pET-30a (+)、pET-31b (+)、pET-32a (+)、pET-35b (+)、pET-38b (+)、pET-39b (+)、pET-40b (+)、pET-41a (+)、pET-41b (+)、pET-42a (+)、pET-43a (+)、pET-43b (+)、pET-44a (+)、pET-49b (+)、pQE2、pQE9、pQE30、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pEZZ18、pKK232-18、pUC-18 或 pUC-19。

任何能够正常诱导表达 L-氨基酸连接酶的宿主细胞均适用于本申请，在一种优选的实施例中，宿主细胞包括包括原核细胞或真核细胞；原核细胞为大肠杆菌和枯草芽孢杆菌；更优

选地，大肠杆菌的菌种为 BL21；真核细胞为酿酒酵母和毕赤酵母。pET-28a(+). 大肠杆菌菌种包括 BL21。

以下结合具体实施例对本申请作进一步详细描述，这些实施例不能理解为限制本申请所要求保护的范围。

实施例 1 L-氨基酸连接酶 Blal 基因的筛选、表达

以报道的具有 L-氨基酸连接酶活性的酶的序列为探针，在数据库中进行同源性搜索，初步得到的 10 条酶，属于 ATP-grasp 超家族（ATP 依赖性羧酸-胺连接酶），经过判断是合成短寡肽的良好候选者。对这 10 个酶进行进一步的序列分析，选择来源于 *Bacillus sp.* Root920 的 L-氨基酸连接酶 Blal 进行下一步表达和功能研究。

对来源于 *Bacillus sp.* Root920 的 L-氨基酸连接酶 Blal 进行密码子优化，并在基因合成公司进行优化后基因片段的合成，在 5'端引入内切酶位点 NdeI 和 3'端引入内切酶位点 XhoI，基因合成于 pUC19，获得 pUC19-Blal。将表达载体 pET-28a(+)进行双酶切（NdeI+XhoI），同时 L-氨基酸连接酶的基因 pUC19-Blal 双酶切（NdeI+XhoI），切出编码 Blal 基因片段与表达载体 pET-28a(+)连接，获得含有 L-氨基酸连接酶 Blal 的大肠杆菌重组质粒 pET-28a(+)-Blal，转化至大肠杆菌 BL21(DE3)，获得重组大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/ Blal。

取含有重组质粒的 BL21(DE3)菌株 4 ml，接种于含 400 mL LB 培养基 2L 三角瓶，37℃ 200 rpm 振荡培养 2-3h 后，OD600 为 0.6-0.8 时，加入终浓度为 0.2 mM IPTG，25℃ 诱导 20h，诱导结束，4℃ 离心收集菌体。通过超声破碎，离心，收集上清和沉淀，12%分离胶 SDS-PAGE 结果表明，重组 L-氨基酸连接酶在大肠杆菌中得到了表达，如图 1 所示。其中，M 为蛋白 marker，泳道 1 为 L-氨基酸连接酶大肠杆菌菌株表达细胞破碎液上清，泳道 2 为 L-氨基酸连接酶大肠杆菌菌株表达细胞破碎液沉淀。该酶基因编码 473 个氨基酸，理论分子量为 52 kDa。

注：实施例中所用的试验材料和试剂描述如下：

- 1、菌株及载体：大肠杆菌表达载体 pET-28a(+)及菌株 BL21 (DE3)
- 2、培养基：大肠杆菌培养基 LB (10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，10 g/L NaCl，pH 7.0)。

实施例 2 大肠杆菌表达 Blal 蛋白的纯化

表达的 Blal 菌泥以 10%菌浓重悬，超声破碎（2 s 超声，6 s 间隔，25%功率），12000 rpm 离心 30 min，重复离心两次后，过 0.45 μm 滤膜。采用亲和层析进行纯化，具体流程是：样品以 2 ml/min 流速上样，然后采用缓冲液 A（20 mM Tris-HCl，200 mM NaCl，pH 8.0）冲洗直至未结合蛋白完全洗脱，接着采用线性梯度咪唑洗脱杂蛋白 5 个柱体积（咪唑浓度由 0 mM 提高到 30 mM），然后在 200 mM 洗脱目标蛋白。亲和纯化的蛋白进一步采用超滤管进行离心换液，去除咪唑和盐，加入终浓度为 20%的甘油，放-20℃备用。蛋白浓度采用 Brad

ford 方法测定，浓度为 80 mg/mL。12%分离胶 SDS-PAGE 进行分析，结果如图 2。其中 M 为蛋白 marker，泳道 1-3 为洗脱的未结合蛋白，泳道 4 为 30 mM 咪唑洗脱蛋白，泳道 5 为 200 mM 咪唑洗脱目标蛋白。

实施例 3 L-氨基酸连接酶 Blal 的底物谱测定

对 Blal 合成不同二肽的活性进行考察，反应体系如下 (0.5 mL)：以 10 mM 两种相同或者不同氨基酸为底物，ATP 15 mM，MgCl₂ 10 mM，Blal 纯酶 50μg/mL，0.1M Tris-HCl (pH 9.0)，25℃反应 16 h。反应结束后加入 0.5 mL 的甲醇，离心后进行 LC-MS 分析，反应结果统计如下 (表 1)：

表 1

	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Ser	Thr	Cys	Met	Asn	Glu	Asp	Gln	Lys	Arg	His	Phe	Tyr	Pro	Tyr
Tyr	***	*	*	**	*	***	*	**	***	*	***	***	***	***	***	*	**	***	*	***
Pro	*	***	*	*	**	***	*	***	*	*	*	*	*	***	***	*	***	*	*	*
Tyr	*	*	**	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	***	*	**	**	*	*	*
Phe	*	**	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	***	*	**	**	*	*	*
His	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	***	*	*	*	*	*	*
Arg	**	**	*	***	**	**	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lys	***	**	*	***	*	***	*	*	***	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Glu	*	***	**	*	*	***	*	***	*	***	*	*	*	***	*	*	*	*	*	*
Asp	***	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gln	***	***	*	***	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Asn	***	**	*	*	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Met	***	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cys	*	*	*	*	**	*	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Thr	**	**	**	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ser	*	**	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ile	**	*	**	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Leu	**	*	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Val	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ala	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gly	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

注：此表为 Blal 的反应结果，第一行和第一列为所示的底物氨基酸。*代表 0≤摩尔转化率<1%，**代表摩尔转化率大于等于 1%且小于 10%，***代表摩尔转化率大于 10%。其中摩尔转化率为反应后体系中的二肽的摩尔浓度/(单一氨基酸摩尔浓度+二肽的摩尔浓度)×100%

从表 1 中可以说明本发明的 L-氨基酸连接酶 Blal 具有广泛的底物谱，可以用于合成同型和异型功能二肽。

实施例 4 L-氨基酸连接酶 Blal 用于 Gly-Tyr 合成

对 Blal 合成高浓度的 Gly-Tyr 反应进行考察，反应体系如下 (100 mL)：甘氨酸和酪氨酸各 200 mM，ATP 200 mM，MgCl₂ 200 mM，Blal 纯酶 1 mg/mL，0.1M Tris-HCl (pH 9.0)，25℃反应 16 h。反应结束后加入 100 mL 的甲醇，离心后进行 HPLC 分析，通过测定不同浓度 Gly-Tyr 标准品的紫外吸收面积，绘制外标曲线。产品 Gly-Tyr 浓度通过外标计算，最终测定反应后 Gly-Tyr 的浓度为 130 Mm，摩尔转化率 65%，产量约 31 g/L。

实施例 5 L-氨基酸连接酶 Blal 用于 Gly-Gly 合成

对 Blal 合成高浓度的 Gly-Gly 反应进行考察，反应体系如下（100 mL）：甘氨酸 400 mM，ATP 200 mM，MgCl₂ 200 mM，Blal 纯酶 1 mg/mL，0.1M Tris-HCl（pH 9.0），25℃反应 16 h。反应结束后加入 100 mL 的甲醇，离心后进行 HPLC 分析，通过测定不同浓度 Gly-Gly 标准品的紫外吸收面积，绘制外标曲线。产品 Gly-Gly 浓度通过外标计算，最终测定反应后 Gly-Gly 的浓度为 140 Mm，摩尔转化率 70%，产量约 18.5 g/L。

实施例 6 L-氨基酸连接酶 Blal 用于 Gly-Gln 合成

对 Blal 合成高浓度的 Gly-Gln 反应进行考察，反应体系如下（100 mL）甘氨酸和谷氨酰胺各 200 mM，ATP 200 mM，MgCl₂ 200 mM，Blal 纯酶 1 mg/mL，0.1M Tris-HCl（pH 9.0），25℃反应 16 h。反应结束后加入 100 mL 的甲醇，离心后进行 HPLC 分析，通过测定不同浓度 Gly-Gln 标准品的紫外吸收面积，绘制外标曲线。产品 Gly-Gln 浓度通过外标计算，最终测定反应后 Gly-Gln 的浓度为 120 Mm，摩尔转化率 60%，产量约 24.4 g/L。

实施例 7 L-氨基酸连接酶 Blal 用于 Ala-Gln 合成

对 Blal 合成高浓度的 Ala-Gln 反应进行考察，反应体系如下（100 mL）丙氨酸和谷氨酰胺各 200 mM，ATP 200 mM，MgCl₂ 200 mM，Blal 纯酶 1 mg/mL，0.1M Tris-HCl（pH 9.0），25℃反应 16 h。反应结束后加入 100 mL 的甲醇，离心后进行 HPLC 分析，通过测定不同浓度 Ala-Gln 标准品的紫外吸收面积，绘制外标曲线。产品 Ala-Gln 浓度通过外标计算，最终测定反应后 Ala-Gln 的浓度为 180 mM，摩尔转化率 90%，产量约 39.1 g/L。

对比例 1 Blal 与现有 L-氨基酸连接酶对比

将本发明中的 Blal 与现有文献中报道的 L-氨基酸连接酶进行对比，可以看出：（1）本发明中的 Blal 在相同底物浓度下的活性显著高于目前已报道的酶，且在高浓度的底物下，活性依然保持较高水平。（2）本发明中的酶可利用的底物范围更广，可合成的二肽数量更多。（3）本发明中的酶已经实现部分二肽 g 级制备，证明了相比于较文献报道的酶，更有工业应用潜力和价值。

表 2:

来源	底物浓度/活性*	可利用的底物范围	可合成二肽数量	是否实现 g 级规模的二肽制备
<i>Bacillus subtilis</i> 168	30 mM/69%	产品 N 端偏好小体积氨基酸, C 端偏好大体积氨基酸; 不能以带电荷氨基酸为底物。	确认能合成 44 种二肽	否
<i>Ralstonia solanacearum</i>	12.5 mM/72%	产品 C 端偏好小体积氨基酸, N 端偏好大体积氨基酸	确认能合成 96 种二肽	否
<i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200	N/A	产品 N 端只接受 L-蛋氨酸和 L-亮氨酸 C 端只接收小底物	不超过 40 种	否
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3134	N/A	产品 N 端只接受 L-精氨酸	不超过 20 种	否
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	12.5 mM/4.8%	产品 N 端接受丝氨酸、苏氨酸和甘氨酸, 不能接受蛋氨酸	只能合成部分异型二肽	否
<i>P. luminescens</i> subspecies <i>laumondii</i> TT0	12.5 mM/62%	偏好以 L-天冬酰胺作为底物, 合成同型二肽	不超过 20 种	否
本发明	30 mM/98% 200 mM/90%	底物谱广泛, 没有严格的底物限制	确认能合成的二肽数量大于 150 种	是

*上表中的活性数据, 以产品对底物的摩尔转化率表示。*P. luminescens* subspecies *laumondii* TT0 的反应底物为 Asn 和 Ala, 除此之外, 反应底物均为 Ala 和 Gln。

从以上的描述中, 可以看出, 本发明上述的实施例实现了如下技术效果: (1) 本发明中的 L-氨基酸连接酶 Blal 具有广泛的底物谱, 可以用于合成同型和异型功能二肽。

(2) 本发明中的 L-氨基酸连接酶 Blal 活性高, 在 200 mM 的底物反应中仍然可以达到较高的摩尔转化率, 合成高浓度的 Gly-Tyr、Gly-Gln、Gly-Gly 和 Ala-Gln。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种制备二肽的方法，其特征在于，所述方法包括利用如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 L-氨基酸连接酶进行二肽合成反应，得到所述二肽。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二肽合成反应的底物为氨基酸。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸或酪氨酸中的一种或两种。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二肽包括 Gly-Gln、Gly-Tyr、Gly-Gly 或 Ala-Gln。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二肽合成反应的反应体系包括：pH 值为 8.5-9.0 的如下缓冲液：0.1-0.2M Tris-HCl、0.1-0.2M ATP 及 0.1-0.2M MgCl₂。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二肽合成反应的反应温度为 20-25℃。
7. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二肽合成反应的反应时间为 15-17h。
8. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进行所述二肽合成反应的所述 L-氨基酸连接酶在反应体系中的质量浓度为 0.05-1mg/mL。
9. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进行所述二肽合成反应的底物在反应体系中的浓度为 10-200 mM。
10. 一种 L-氨基酸连接酶的制备方法，其特征在于，将编码 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 L-氨基酸连接酶的基因克隆至表达载体中，得到重组载体；
将所述重组载体导入宿主细胞中，得到重组菌株；
培养所述重组菌株，诱导所述 L-氨基酸连接酶的表达，得到培养液；
将所述培养液进行超声破碎后离心，得到所述 L-氨基酸连接酶。

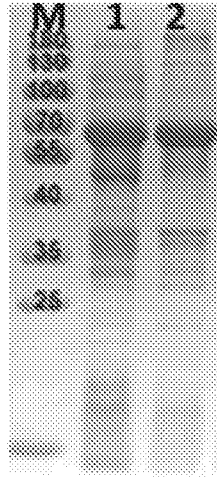


图 1

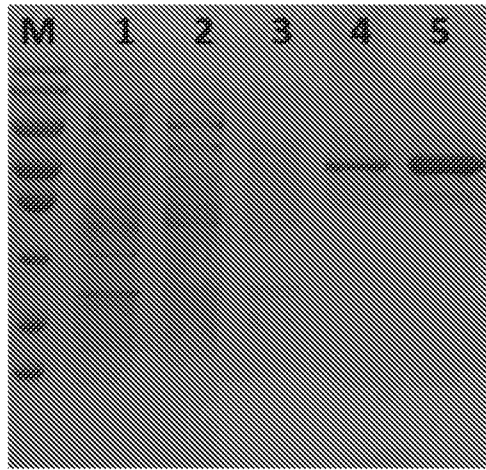


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/113398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12P21/02(2006.01)i; C07K5/06(2006.01)i; C12N9/00(2006.01)i; C12N15/70(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)		
IPC:C12P,C07K,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)		
EPTXT; VCN; USTXT; WOTXT; CNABS; GOOGLE SCHOLAR; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE; CNKI; 万方, WANFANG; GENBANK; STN: L-氨基酸连接酶, L-amino acid ligase, 芽孢杆菌, Bacillus, 二肽, 合成, 制备, dipeptide, synthesis, preparation, SEQ ID NOs: 1-2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103642882 A (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 19 March 2014 (2014-03-19) description, paragraphs 313-357, and embodiments 8-10	1-10
Y	ACCESSION NO.: WP_056765488. "ATP-grasp Domain-containing Protein [Bacillus sp. Root920]" NCBI, 26 July 2021 (2021-07-26), ORIGIN parts	1-10
Y	CN 112175916 A (JINING MEDICAL UNIVERSITY) 05 January 2021 (2021-01-05) abstract, and claims 1-7	1-10
A	WO 2021261564 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 30 December 2021 (2021-12-30) entire document	1-10
A	US 2021292717 A1 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD.) 23 September 2021 (2021-09-23) entire document	1-10
A	US 2005148048 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 07 July 2005 (2005-07-07) entire document	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
14 December 2023		20 December 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王维法等 (WANG, Weifa et al.). "L-氨基酸连接酶偶联乙酸激酶催化合成丙谷二肽 (Enzymatic Production of L-alanyl-L-glutamine by L-amino Acid Ligase Coupled with Acetate Kinase)" 发酵科技通讯 (<i>Bulletin of Fermentation Science and Technology</i>), Vol. 49, No. 4, 31 December 2020 (2020-12-31), pages 224-229	1-10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/113398

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103642882	A	19 March 2014	US	2009269806	A1	29 October 2009
				US	7939302	B2	10 May 2011
				ES	2347875	T3	22 November 2010
				ATE	474847	T1	15 August 2010
				DE	602005022387	D1	02 September 2010
				HK	1083345	A1	30 June 2006
				EP	1627884	A1	22 February 2006
				EP	1627884	B1	21 July 2010
				EP	1627884	B9	20 October 2010
				WO	2006001379	A1	05 January 2006
				US	2005287626	A1	29 December 2005
				US	7514243	B2	07 April 2009
				JPWO	2006001379	A1	17 April 2008
				JP	4796495	B2	19 October 2011

CN	112175916	A	05 January 2021	None			

WO	2021261564	A1	30 December 2021	EP	4166565	A1	19 April 2023
				JPWO	2021261564	A1	30 December 2021

US	2021292717	A1	23 September 2021	US	11603521	B2	14 March 2023
				EP	3839045	A1	23 June 2021
				EP	3839045	A4	16 March 2022
				JP	2021528956	A	28 October 2021
				JP	7083408	B2	10 June 2022
				WO	2020034209	A1	20 February 2020

US	2005148048	A1	07 July 2005	JPWO	2005052153	A1	21 June 2007
				JP	4731327	B2	20 July 2011
				WO	2005052153	A1	09 June 2005
				EP	1548122	A1	29 June 2005
				EP	1548122	B1	15 August 2007
				DE	602004008201	D1	27 September 2007
				DE	602004008201	T2	03 April 2008
				ATE	370242	T1	15 September 2007

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12P21/02(2006.01)i; C07K5/06(2006.01)i; C12N9/00(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C12P,C07K,C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>EPTXT;VCN;USTXT;WOTXT;CNABS;GOOGLE SCHOLAR;PUBMED;ISI WEB OF SCIENCE;CNKI;万方;GEN-BANK;STN:L-氨基酸连接酶, L-amino acid ligase, 芽孢杆菌, Bacillus, 二肽, 合成, 制备, dipeptide, synthesis, preparation, SEQ ID NOs:1-2</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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>Y</td> <td>CN 103642882 A (协和发酵生化株式会社) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 说明书第313-357段, 实施例8-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ACCESSION NO.: WP_056765488. "ATP-grasp domain-containing protein [Bacillus sp. Root920]" NCBI, 2021年7月26日 (2021 - 07 - 26), ORIGIN 部分</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112175916 A (济宁医学院) 2021年1月5日 (2021 - 01 - 05) 摘要, 权利要求1-7</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021261564 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 2021年12月30日 (2021 - 12 - 30) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2021292717 A1 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 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	Y	CN 103642882 A (协和发酵生化株式会社) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 说明书第313-357段, 实施例8-10	1-10	Y	ACCESSION NO.: WP_056765488. "ATP-grasp domain-containing protein [Bacillus sp. Root920]" NCBI, 2021年7月26日 (2021 - 07 - 26), ORIGIN 部分	1-10	Y	CN 112175916 A (济宁医学院) 2021年1月5日 (2021 - 01 - 05) 摘要, 权利要求1-7	1-10	A	WO 2021261564 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 2021年12月30日 (2021 - 12 - 30) 全文	1-10	A	US 2021292717 A1 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 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																		
Y	CN 103642882 A (协和发酵生化株式会社) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 说明书第313-357段, 实施例8-10	1-10																		
Y	ACCESSION NO.: WP_056765488. "ATP-grasp domain-containing protein [Bacillus sp. Root920]" NCBI, 2021年7月26日 (2021 - 07 - 26), ORIGIN 部分	1-10																		
Y	CN 112175916 A (济宁医学院) 2021年1月5日 (2021 - 01 - 05) 摘要, 权利要求1-7	1-10																		
A	WO 2021261564 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 2021年12月30日 (2021 - 12 - 30) 全文	1-10																		
A	US 2021292717 A1 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 全文	1-10																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年12月14日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年12月20日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p>		<p>授权官员</p> <p>李恩</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961874</p>																		

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
A	US 2005148048 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 2005年7月7日 (2005 - 07 - 07) 全文	1-10
A	王维法等. "L-氨基酸连接酶偶联乙酸激酶催化合成丙谷二肽" 发酵科技通讯, 第49卷, 第4期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第224-229页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/113398

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	103642882	A	2014年3月19日	US	2009269806	A1	2009年10月29日
				US	7939302	B2	2011年5月10日
				ES	2347875	T3	2010年11月22日
				ATE	474847	T1	2010年8月15日
				DE	602005022387	D1	2010年9月2日
				HK	1083345	A1	2006年6月30日
				EP	1627884	A1	2006年2月22日
				EP	1627884	B1	2010年7月21日
				EP	1627884	B9	2010年10月20日
				WO	2006001379	A1	2006年1月5日
				US	2005287626	A1	2005年12月29日
				US	7514243	B2	2009年4月7日
				JPWO	2006001379	A1	2008年4月17日
				JP	4796495	B2	2011年10月19日
CN	112175916	A	2021年1月5日	无			
WO	2021261564	A1	2021年12月30日	EP	4166565	A1	2023年4月19日
				JPWO	2021261564	A1	2021年12月30日
US	2021292717	A1	2021年9月23日	US	11603521	B2	2023年3月14日
				EP	3839045	A1	2021年6月23日
				EP	3839045	A4	2022年3月16日
				JP	2021528956	A	2021年10月28日
				JP	7083408	B2	2022年6月10日
				WO	2020034209	A1	2020年2月20日
US	2005148048	A1	2005年7月7日	JPWO	2005052153	A1	2007年6月21日
				JP	4731327	B2	2011年7月20日
				WO	2005052153	A1	2005年6月9日
				EP	1548122	A1	2005年6月29日
				EP	1548122	B1	2007年8月15日
				DE	602004008201	D1	2007年9月27日
				DE	602004008201	T2	2008年4月3日
				ATE	370242	T1	2007年9月15日