

REIVINDICACIONES

1. Un método para expresar proteínas altamente recombinantes de bacterias diseñadas por ingeniería, en donde el extremo con hidrofiliidad de la proteína recombinante es polipéptido de colicina y el otro extremo con naturaleza hidrófoba es el polipéptido del grupo funcional objetivo que es capaz de unir el objetivo, el método comprende:

- (1) transfectar el plásmido recombinante para expresar la proteína recombinante en bacterias *E. coli* diseñadas por ingeniería con sistema pET para obtener colonias monoclonales positivas,
- (2) producir solución de bacterias semilla de las colonias monoclonales positivas, e inducir expresión de proteína y cultivo de expansión de la solución de bacterias semilla; el sobrenadante de la solución cultivada para expansión contiene proteína recombinante expresada,
- (3) extraer y purificar la proteína recombinante del sobrenadante, en donde la bacterias *E. coli* diseñada por ingeniería con sistema pET es *E.coli*B834 (DE3),

en donde dicho plásmido recombinante para expresar la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE, pBHC-PA y pBHC-PorA1;

dicha proteína recombinante es PMC-SA1, PMC-SA2, PMC-SA3, PMC-SA4, PMC-SE, PMC-PA o PMC-AM;

en donde dicho medio de cultivo de expansión utilizado para dicho cultivo de expansión de la solución de bacterias semilla tiene agua como disolvente y comprende los siguientes componentes: NaCl 6.0~6.7 g/L, peptona 25.0 g/L, polvo de levadura 7.5 g/L, glucosa 0.6~2.0 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.8~18.3 g/L, KH_2PO_4 3.0~4.3 g/L, NH_4Cl 1.0~1.4 g/L, MgSO_4 0.2~0.4 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, metionina 0~40 mg/L.

2. De acuerdo con el método de la reivindicación 2, el medio de cultivo de expansión tiene agua como disolvente y comprende los siguientes componentes: NaCl 6.0 g/L, peptona 25.0 g/L, polvo de levadura 7.5 g/L, glucosa 2.0 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.8 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, metionina 0~40 mg/L.

3. De acuerdo con cualquier método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho cultivo de expansión de la solución de bacterias semilla comprende las siguientes etapas: el líquido de bacteria semilla se agrega en un contenedor y se inicia crecimiento durante 2 a 3 horas a 30°C, cuando el valor OD alcanza 0.4 a 0.6, la solución de bacterias semilla se somete a choque térmico a 42°C durante 30 minutos, y luego se enfría hasta 37°C y se mantiene crecimiento durante 1.5 a 2 horas antes de ser recolectado.
4. De acuerdo con el método de la reivindicación 3, en la conducción de choque térmico, se agrega IPTG con concentración final 0.5 mmol/L en dicho medio de cultivo de expansión.
5. De acuerdo con el método de la reivindicación 1, dicha extracción y purificación de la proteína recombinante desde el sobrenadante es mediante columna de intercambio iónico CM, y la cantidad de carga de las muestras de sobrenadante depende del valor de relación que es 2.5 mg/ml entre el peso de la proteína recombinante en el sobrenadante y el volumen de partículas de Gel utilizadas en la columna de intercambio iónico CM.
6. De acuerdo con el método de la reivindicación 6, la solución de eluente utilizada para dicha extracción y purificación en columna de intercambio iónico CM es solución de regulador de ácido bórico con 0.2 mol/L de NaCl.
7. Un medio utilizado para bacterias *E. coli* diseñadas por ingeniería con sistema pET, el medio tiene agua como disolvente y comprende los siguientes componentes: NaCl 6.0~6.7 g/L, peptona 25.0 g/L, polvo de levadura 7.5 g/L, glucosa 0.6~2.0 g/L, Na₂HPO₄·7H₂O 6.8~18.3 g/L, KH₂PO₄ 3.0~4.3 g/L, NH₄Cl 1.0~1.4 g/L, MgSO₄ 0.2~0.4 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L, metionina 0~40 mg/L.
8. De acuerdo con el medio de la reivindicación 7, en donde dichas bacterias *E. coli* diseñadas por ingeniería con sistema pET son *E. coli* B834 (DE3), y el medio tiene agua como disolvente y comprende los siguientes componentes: NaCl 6.0 g/L,

peptona 25.0 g/L, polvo de levadura 7.5 g/L, glucosa 2.0 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.8 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, metionina 0~40 mg/L.

SGD\SGD\ID-456234\WPC21271