

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Un método para expresar proteínas recombinantes de bacterias recombinantes, en donde el extremo hidrofílico de la proteína recombinante es polipéptido de colicina y el otro extremo con naturaleza hidrofóbica es el polipéptido del grupo funcional objetivo que es capaz de unir el objetivo, el método comprende:
 - (1) transfectar el plásmido recombinante capaz de expresar la proteína recombinante en bacterias *E. coli* recombinantes con sistema pET para obtener colonias bacterianas monoclonales positivas que comprenden el plásmido recombinante,
 - (2) cultivar las colonias bacterianas monoclonales positivas en un medio de cultivo para producir un cultivo de bacterias semilla de las colonias bacterianas monoclonales positivas,
 - (3) cultivar el cultivo de bacterias semilla en un medio de crecimiento para expandir el cultivo de bacterias,
 - (4) agregar un inductor no presente en el medio de crecimiento para inducir la bacteria para que exprese la proteína recombinante,
 - (5) recolectar y romper la bacteria para obtener un sobrenadante que contiene la proteína recombinante expresada, y
 - (6) extraer y purificar la proteína recombinante del sobrenadante,en donde las bacterias *E. coli* recombinantes con sistema pET es *E. coli* B834 (DE3), en donde dicho plásmido recombinante que expresa 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; en donde dicha proteína recombinante es PMC-SA1, PMC-SA2, PMC-SA3, PMC-SA4, PMC-SE, PMC-PA o PMC-AM; y 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, 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, y metionina 0-40 mg/L.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo de expansión tiene agua como solvente 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. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el paso (3) comprende las siguientes etapas:
cultivar el cultivo de bacterias semilla durante 2 a 3 horas a 30°C, cuando el valor OD alcanza 0.4 a 0.6,
someter a choque térmico el cultivo de bacterias expandido a 42°C durante 30 minutos, en donde el cultivo de bacterias sometido a choque térmico se enfría hasta 37°C y se cultiva durante 1.5 a 2 horas antes de ser recolectado.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el inductor es IPTG, y se agrega el IPTG con concentración final de 0.5 mmol/L en el cultivo de bacterias expandido en el paso de choque térmico.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los pasos de extracción y purificación de la proteína recombinante comprende cargar una muestra del sobrenadante sobre una columna de intercambio iónico CM, en el que la relación entre el peso de la proteína recombinante en la muestra cargada del sobrenadante y el volumen de partículas de gel usadas en la columna de intercambio iónico CM es 2.5 mg/ml.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el paso de extracción y purificación además comprende una solución eluyente en columna de intercambio iónico CM, que es una solución de regulador de ácido bórico con 0.2 mol/L de NaCl.
7. Un medio para cultivar bacterias *E. coli* recombinantes que contiene un sistema pET, en donde el medio tiene agua como solvente 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, y metionina 0-40 mg/L.

8. El medio de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dichas bacterias *E. coli* recombinantes con sistema pET son *E. coli* B834 (DE3), y el medio tiene agua como solvente 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.