(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
2013 年 5 月 30 日 (30.05.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/075660 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/67* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/085182

(22) 国际申请日: 2012 年 11 月 23 日 (23.11.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110380864.7 2011 年 11 月 25 日 (25.11.2011) CN

(71) 申请人: **畿晋庆三联（北京）生物技术有限公司 (PROTEIN DESIGN LAB, LTD.)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。

(72) 发明人: **丘小庆 (QIU, Xiaoqing)**; 中国北京市海淀区苏家坨镇前沙涧村东 1000 米, Beijing 100095 (CN)。

(74) 代理人: **北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 (HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL PROPERTY & PARTNERS)**; 中国北京市海淀区海淀南路 21 号中关村知识产权大厦 B 座 9 层, Beijing 100080 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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,

[见续页]

(54) **Title**: METHOD FOR HIGHLY EXPRESSING RECOMBINANT PROTEIN OF ENGINEERING BACTERIA AND USE THEREOF

(54) **发明名称** : 一种高效表达工程菌重组蛋白的方法及应用

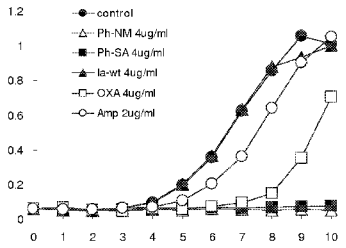


图 3 / **Fig. 3**

(57) **Abstract**: Provided are a method for highly expressing a recombinant protein of engineering bacteria and the use thereof. The method comprises the following steps: (1) engineering bacteria of *Escherichia coli* with pET system are transfected with recombinant mutated plasmid to obtain positive monoclonal colonies; (2) the positive monoclonal colonies are enriched to obtain a seed bacteria solution, and the seed bacteria solution is induced to enrichment and growth in a large amount; and (3) the bacteria supernatant containing the recombinant protein as the expression target is separated, and then the recombinant protein in the bacteria supernatant is extracted and purified. The method is characterized in that the engineering bacteria of *Escherichia coli* with pET system are *E.coli*B834 (DE3). The components of the mass enrichment medium and the protein purification steps are also optimized such that a significant improvement in the yield and purity of the protein is achieved and the method is suitable for applying to the large-scale production of recombinant protein expressed by the engineering bacteria of *Escherichia coli*.

(57) **摘要**:

[见续页]

WO 2013/075660 A1

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于发明人身份(细则 4.17(i))

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

提供了一种高效表达工程菌重组蛋白的方法及其应用。该方法包括如下步骤：（1）重组突变质粒转染大肠杆菌 pET 系统工程菌中得到阳性单克隆菌落，（2）对阳性单克隆菌落进行增菌得到种子菌液，诱导所述种子菌液大量增菌生长，（3）分离含有表达目的的重组蛋白的菌体上清液，提纯菌体上清液中的重组蛋白，其特征在于：所述大肠杆菌 pET 系统工程菌指 *E.coli*B834（DE3）。还对大量增菌培养基的成分及蛋白质纯化步骤进行了优化，在蛋白质产量和纯度上都得到了明显的提高，适合于应用在大肠杆菌工程菌表达重组蛋白的规模化生产中。