

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成25年3月14日 (2013.3.14)

【公表番号】特表2012-519489(P2012-519489A)

【公表日】平成24年8月30日 (2012.8.30)

【年通号数】公開・登録公報2012-034

【出願番号】特願2011-553101(P2011-553101)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/12

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成25年1月28日 (2013.1.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 4】

これらの知見に促されて、本発明者らは、いくつかのグループIIイントロンRTを、ベクターpMal-c2tにおいて剛性リンカーを介してそのタンパク質のN末端に融合されたMalEタグとともに発現するプラスミドを構築した。試験されたRTには、上記プラスミドアッセイを用いてレトロホーミングを支持する能力を予め試験していたいくつかのT. elongatusグループIIイントロンRT、および以前に高収率かつ高活性で精製することが困難だったグループIIイントロンRTに関係する2つのG. steaerothermophilusグループIIイントロンRT(Vellorera、Appl. Environ. Microbiol. 70, 7140-7147, 2004; Ngら、Gene 393, 137-144, 2007)が含まれた。いくつかの構築物において、本発明者らは、精製において全長タンパク質について濃縮するために、さらにC末端His6-タグを付加した。このMalE-RF-RT融合タンパク質を大腸菌において発現させ、核酸のPEI沈殿の後のアミロースアフィニティークロマトグラフィおよびヘパリンSepharoseクロマトグラフィを含む手順によって精製した。C末端His6タグを有する構築物については、さらにNiカラムクロマトグラフィ工程を含めた。それらのタンパク質を、50%グリセロールを含む精製緩衝液に対して透析し、急速冷凍し、-80℃で保存した。最終的なタンパク質調製物は、>95%純粋、0.5~2.2mg/1の収率で、RT活性は、少なくとも6ヶ月間の貯蔵後に低下しなかった。