

等温核酸増幅反応における増幅子の同定と性能評価

(日大院総合基) ○久保 千尋・藤田 博仁・栗原 正靖

Identification and performance evaluation of amplifier elements in isothermal nucleic acid amplification reactions (*Graduate School of Integrated Basic Science, Nihon University*)

○Chihiro Kubo, Hiroto Fujita, Masayasu Kuwahara

Nucleic acid amplification reactions such as polymerase chain reaction (PCR) generally require oligodeoxyribonucleotide (ODN) strands as primer and template, which give an amplification product specific for those sequences. However, prokaryotic DNA polymerases such as *Tli* DNA polymerase and *Tth* DNA polymerase produce long linear double-stranded DNA as amplification products by *Ab initio* DNA synthesis in the absence of such ODN strands^{1,2}. The DNA sequences generated by this *Ab initio* DNA synthesis are known to include repetitive sequences and palindromic sequences. Furthermore, amplification efficiencies are known to be enhanced greatly by the addition of restriction endonuclease or nicking endonuclease. However, the reaction mechanism has not yet been fully elucidated³.

In this study, we have enriched and isolated the DNA sequences (amplicons) from isothermal nucleic acid amplification reactions involving nicking endonucleases. The amplicons were sequenced and their amplification efficiency was verified, resulting in sequences of about 150 mer with high amplification efficiency. In this presentation, we will present in detail the correlation between the primary and secondary structures and the amplification efficiencies.

Keywords : *Amplifier element, Isothermal nucleic acid amplification reaction, Sequencing*

一般に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の核酸増幅反応は、プライマーやテンプレートとなるオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 鎖が必要であり、それらの配列に対して特異的な増幅産物を与える。しかし、*Tli* DNA ポリメラーゼや *Tth* DNA ポリメラーゼなど原核生物由来の DNA ポリメラーゼは、そういった ODN 鎖がなくても、*Ab initio* DNA 合成により、長い直鎖状二本鎖 DNA を増幅産物として生成する^{1,2}。この *Ab initio* DNA 合成によって生成した DNA の配列中には、反復配列や回文配列が含まれている等の規則性があることが知られている。また、その増幅効率は、制限エンドヌクレアーゼやニッキングエンドヌクレアーゼを添加すると非常に高まるが、その反応機構はまだ十分に解明されていない³。

本研究では、ニッキングエンドヌクレアーゼを含む等温核酸増幅反応より、増幅のもととなる DNA 配列 (増幅子) を濃縮・単離した。さらに、それらの配列の同定を行うと共に核酸増幅能についても検証したところ、増幅効率の高い 150mer 程度の配列を得た。本発表では、実験によって得られた配列の一次構造ならびに二次構造と増幅能等との相関についても詳述する予定である。

1) Ogata N, Miura T. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4652–4656.

2) Ogata N, Miura T. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4657–4661.

3) Zyrina NV, Antipova VN, Zheleznya LA. *FEMS Microbiol Lett.* **2014**, 351, 1–6.