

## PCR を介した菌相解析に誤りをもたらす

## heteroduplex の生成と解消

の だなおひろ しらまさゆうこ かながわたかひろ

野田尚宏、○白政優子、金川貴博

産総研・生物機能工学

【目的】PCR に基づいた菌相解析には偏りや誤りがしばしば生じることが知られている。その誤りの原因として、ポリメラーゼの取り込みエラー、キメラの生成、heteroduplex の生成などが指摘されている。heteroduplex は、相補的でないDNA が2本鎖を形成したもので、PCR 後期に多く生じる。相補的なDNA による2本鎖 (homoduplex) とは、電気泳動での移動度が異なるため、解析で余分なバンドやピークを生じる原因になる。制限酵素で切断できなくなることもある。本研究では、PCR サイクル数と heteroduplex 生成率の関係を調べ、heteroduplex の解消方法として、Reconditioning cycle (RC)を提案する。RC は、heteroduplex が homoduplex よりも  $T_m$  値が少し低いことを利用して、heteroduplex だけを解離させて homoduplex の再生をねらったものである。

【方法】*Thiothrix eikelboomii* AP-3 および *T. flexilis* EJ2M-B のゲノムDNA を等量混合し、16S rDNA の一部をPCR で増幅した。プライマーの一方には5'末端を蛍光物質BODIPY FL で修飾したものをを用い、PCR 後に産物を制限酵素 *Bst*UI で切断し、断片長を調べて、heteroduplex の生成割合を算出した。PCR 条件は  $95^{\circ}\text{C}$ , 130sec  $\rightarrow$   $\{95^{\circ}\text{C}$ , 20sec +  $55^{\circ}\text{C}$ , 10sec +  $72^{\circ}\text{C}$ , 45sec $\}$   $\times$  25-55 サイクルとした。RC として、PCR (35 サイクル) の後に熱変性ステップ  $\{80 - 88^{\circ}\text{C}$ , 60sec $\}$  と再会合ステップ  $\{74^{\circ}\text{C}$ , 15sec $\}$  を繰り返した。

【結果】PCR のサイクル数が増加するとともに heteroduplex の生成量が増加し、35cycle においてはPCR 産物の約25%が heteroduplex であった。RC では、熱変性温度が  $84^{\circ}\text{C}$  のときに最も効率的に heteroduplex を解消することができた。また RC のサイクル数が多ければ多いほど heteroduplex が減少するが、5 Cycle 程度で95%以上の heteroduplex を解消できた。熱変性の時間や、再会合の温度や時間を変えてもあまり効果がなかった。以上の結果より、PCR 終了後に5 cycle 程度のRC を行うことで、heteroduplex の大部分を解消することが可能ながわかった。

<連絡先> 金川 貴博 E-mail; kanagawa-taka@aist.go.jp