

# 短尾猴陈旧粪便中 DNA 的提取

赵健元<sup>1,2</sup> 李进华<sup>1,2</sup> \* 柳 杨<sup>1,2</sup> 尹华宝<sup>1,2</sup>

(1 安徽大学生命科学学院, 合肥, 230039) (2 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 合肥, 230039)

关键词: 陈旧粪便; 保存; DNA 提取; PCR 扩增

中图分类号: Q954.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2005) 04-0410-04

## Research on DNA Extraction from Old Faeces of *Macaca thibetana*

ZHAO Jianyuan<sup>1,2</sup> LI Jinhua<sup>1,2</sup> \* LIU Yang<sup>1,2</sup> YIN Huabao<sup>1,2</sup>

(1 School of Life Science, Anhui University, Hefei, 230039, China) (2 Anhui Key Laboratory of Ecological Engineering and Biotechnology, Hefei, 230039, China)

**Abstract:** Extracting DNA from faecal sample is a newly developed technology of recent years. Although several methods to extract DNA from faeces have been developed home and abroad, they addressed fresh samples and it is still blank in extracting DNA from old faeces yet. Extracting old faeces' DNA can make the full use of transfers out or the death animal's genetic information and expanding the application scope of Molecular Scatology. In this experiment two groups of faeces were launched into DNA extracting. One group had been preserved by absolute ethanol for 3 years and the other group had been preserved by absolute ethanol for half past 4 years. Aiming at the old faecal's characteristic of small number of cells and high degrading of DNA, several repetitions (4 tubes) were carried out at the same time in this experiment. Then 4 different DNA extracting methods (Preprocess-phenol/chloroform extraction method, Guanidine thiocyanate method, CTAB method, QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen) were followed. From these parallel methods and their corresponding results, we could get the best method while the possibility of extracting DNA from old faecal was studied. After DNA was dissolved in TE we got the original DNA. Finally we collected the original DNA from the 4 repetitions then purified and concentrated it by using DNA purification kit. In the end, the results of PCR amplification shows that only Preprocess-phenol/chloroform extraction method can extract enough DNA for PCR from two groups of faeces. In our study, we extracted DNA from old faeces successfully and got some genetic information from mtDNA. This result confirms the possibility of putting old faecal into molecular scatology study.

**Key words:** DNA extracting; Old faecal; PCR amplification; Preservation

分子粪便学 (Molecular scatology) 是一门将传统粪便分析方法与分子生物学技术相结合, 以动物粪便为实验材料进行多领域研究的学科 (魏辅文等, 2001)。虽然该方法已在野生濒危动物保护遗传学和分子生态学研究发挥了很大作用 (Kohn and Wayne, 1997), 但目前大多数分子粪便学研究中使用的材料是新鲜粪便, 从保存时间很长的陈旧粪便中很难提取到高质量的 DNA 用于 PCR 扩增以及序列分析, 严重制约了分子粪便学的广泛应用 (Wasser *et al.*, 1997; Constable *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002)。

本文所指的陈旧粪便是保存超过 2 年以上的粪便样品。研究陈旧粪便 DNA 提取的意义在于: 在

进行种群遗传结构、遗传多样性、亲权关系鉴定等研究中, 常常因动物个体或群体的迁徙、换群或死亡而无法再获得所需个体的粪便样品, 因此, 对长期保存的原有粪便样品的再利用就成为获得所需个体遗传信息的重要来源。为了探索从常规保存的陈旧粪便中提取 DNA 的技术方法, 作者对保存了 3 年和 4.5 年的两组陈旧粪便分别进行了 DNA 提取的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

试验所用样品为 6 份保存了 3 年 (采集于 2001 年 9 月) 和 5 份保存了 4.5 年 (采集于 2000 年 3

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370209, 39970709, 30570237); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (2005KJ021ZD); 教育部骨干教师资助计划 (18557); 安徽省优秀青年基金资助项目 (04043070); 安徽大学 211 工程学术创新团队资助项目

作者简介: 赵健元 (1980 - ), 男, 硕士研究生, 主要从事动物分子生物学研究。

收稿日期: 2005-01-31; 修回日期: 2005-07-23

\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: jhli@ahu.edu.cn

月)的短尾猴陈旧粪便样品,所有样品自采集后均用无水乙醇常温保存至实验开始(2004年9月)。

1.2 提取方法

作者采用过硫氰酸胍(GuSCN)裂解法(Reed *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1999)、预处理-酚/氯仿抽提法(钟华等, 2003; 张保卫等, 2004)和粪便DNA提取专业试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen)对陈旧粪便进行DNA提取,但DNA产物由于浓度底、杂质多等问题,均无法成功进行

PCR扩增。本研究针对陈旧粪便中细胞数量少、DNA降解严重的特点,用多管重复提取-合并纯化的方法进行DNA提取:每2 ml离心管中收集约200 mg粪便,并做3次重复,在提取结束后用纯化试剂盒纯化合并4管产物以增大产物浓度。实验中采用4种方法进行DNA抽提,以便在研究陈旧粪便DNA提取可行性的同时探索提取的最佳方法,各种处理步骤及提取样品见表1。具体方法如下:

表1 不同提取方法在不同陈旧程度粪便中的应用  
Table 1 The different methods of extracting DNA from faecal samples had been used in different old samples

使用方法 Methods of extraction	对保存3年样品处理次数(样本数) Times of extraction for 3 years preserved sample (No. of samples)	对保存4.5年样品处理次数(样本数) Times of extraction for half past 4 years preserved sample (No. of samples)
预处理-有机溶剂抽提法 Preprocess-organicsolvent extraction method	8 (6)	8 (5)
硫氰酸胍法 GuSCN-SiO <sub>2</sub> method	4 (4)	5 (5)
十六烷基三甲基溴化铵法 CTAB method	6 (4)	2 (2)
专用试剂盒 QIAamp DNA Stool Mini Kit	4 (4)	3 (2)

1.2.1 预处理-有机溶剂抽提法

向粪便中加入1 ml预冷的无水乙醇,混匀后振荡30 s,离心后倾去上清液;重复此步骤3~5次直至上清液无色;依次再用预冷的无菌水洗涤沉淀至上清液无色;将处理过的粪便沉淀悬浮于500 μl裂解液(1.0% SDS, 1.3% TritonX-100)中,同时加入2%体积比的β-巯基乙醇,55℃水浴10 min,离心弃残渣后向上清中加入消化液(30 μl EDTA (0.5 M)、30 μl Tris-HCl (1 M, pH8.0)、20 μl蛋白酶K (20 mg/ml)) 55℃消化2 h;消化后依次用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提、等体积氯仿抽提、无水乙醇沉淀、乙醇洗液(10 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA和50%乙醇)洗涤2次;最后用50 μl TE溶解DNA。

1.2.2 硫氰酸胍(GuSCN)法

参照Reed (1997)的硫氰酸胍法,最后加入50 μl TE (pH8.0)洗脱DNA。

1.2.3 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法

参照Constable (1995)的方法,最后用50 μl TE溶解DNA。

1.2.4 粪便DNA提取专用试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen)

参见说明书中方法“Protocol for Isolation of DNA Stool for Human DNA Analysis”,最后用50 μl TE洗脱DNA。

在提取完成后分别合并各提取方法中4管重复抽提的DNA,得到200 μl DNA溶液,用纯化试剂盒(E.Z.N.A Cycle Pure Kit, Omega)纯化后用50 μl TE洗脱,取5 μl进行电泳检测,剩余部分置于-20℃保存。在整个提取过程中设置阴性对照。

通过对线粒体控制区基因片段扩增来检验提取的DNA质量。引物L1: 5'-tca aag ctt aca cca gtc ttg taa acc-3', H540: 5'-tgc ttg tgc ggg ata ttg at-3'。PCR反应体系体积为50 μl,其中包括1× Buffer, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 μg/μl BSA(小牛血清白蛋白), 200 μM dNTPs, 0.2 μM引物, 3U Taq酶(华美生物公司), 1~5 μl左右的DNA模板。反应条件为: 94℃预变性8 min, 94℃变性45 s, 60℃退火45 s, 72℃延伸50 s, 3个循环后分别在58℃、56℃退火3个循环, 54℃退火23个循环, 最终72℃再延伸10 min。对扩增产物进行电泳检测,扩增效果较好的样品经凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit, V-Gene)回收后送上海博亚生物技术公司进行测序。

2 结果

2.1 3年期样品DNA提取及PCR扩增

预处理－有机溶剂抽提法在这组粪便 DNA 提取和扩增中的效果最好（表 2），该方法和试剂盒提取的产物均可在琼脂糖凝胶电泳中鉴定出来，但试剂盒提取出的模板 DNA 无法成功扩增。相反 GuSCN－SiO<sub>2</sub> 法提取的产物虽然只有 1 份能在电泳中检测到，但均能进行扩增。

2.2 4.5 年期样品 DNA 提取及 PCR 扩增

在该组粪便的实验中，仅预处理－有机溶剂抽提法能提取出 DNA 并进行 PCR 扩增（表 2）。用该方法进行的 8 次提取中有 3 次提取的产物可以在电泳中检测出，但 8 份产物 DNA 中有 7 份可以成功

地进行 PCR 扩增，虽然 PCR 产物的浓度比 3 年期样品的 PCR 产物浓度低（图 1），但用凝胶回收试剂盒回收后可成功测序。

2.3 测序

对 4.5 年期样品 PCR 产物中效果较好的 2 份产物进行凝胶回收测序，测序峰图中均无基线过高、套峰、杂峰等异常情况出现，二者序列完全相同。测序结果与我们先期短尾猴肌肉 DNA 线粒体控制区测序结果（Genebank：AY623042）完全相同，从而证明了从粪便中提取出的 DNA 及其扩增产物属于短尾猴。

表 2 提取陈旧粪便 DNA 的结果及其应用于 PCR 的扩增效率  
Table 2 The results of extracting DNA from old faeces that preserved for 3－4.5 years and the efficiency of PCR amplifications

提取方法 Methods of extraction	保存 3 年样品 3 years old samples		保存 4.5 年样品 4.5 years old samples	
	电泳可见率* Visible in Electrophoresis	PCR 成功率 Rates of successful PCR amplification	电泳可见率* Visible in Electrophoresis	PCR 成功率 Rates of successful PCR amplification
预处理－有机溶剂抽提法 Preprocess－organicsolvent Extraction method	100%	100%	37.5%	87.5%
硫氰酸胍法 GuSCN－SiO <sub>2</sub> method	25%	100%	0%	0%
十六烷基三甲溴化铵法 CTAB method	0%	0%	0%	0%
专用试剂盒 QIAamp DNA Stool Mini Kit	100%	0%	0%	0%

\*：提取的粪便 DNA 能否在琼脂糖电泳中被观测到。\* Whether the faecal DNA could be observed in agarose gel.

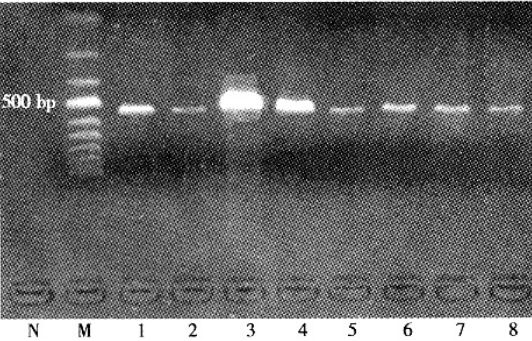


图 1 短尾猴陈旧粪便线粒体 D－Loop 基因扩增结果电泳图  
泳道 1～4 为 3 年期粪便 DNA 扩增的 540 bp 大小的产物；泳道 5～8 为 4.5 年期粪便 DNA 扩增产物，特异性较强但浓度较小。M 为 100 bp 的 DNA ladder，N 为阴性对照。

Fig.1 Amplification of mitochondrial DNA D-Loop gene of *Macaca thibetana* DNA from old faeces. Lane 1－4 amplified by the 3 years old fecal templates. Lane 5－9 amplified by the 4.5 years old fecal templates. The production of PCR had a good lane about 540 bp, but the concentration was very low. M = 100 bp DNA ladder. N = Negative control.

3 讨论

3.1 陈旧粪便 DNA 提取的困难

陈旧粪便 DNA 提取的主要困难有：1) 取样困难：粪便在样品管中大多已结成硬块，故无法通过刮取粪便表面黏液层（Kohn *et al.*, 1999; Piggott and Taylor, 2003）、缓冲液洗脱表面细胞（Flagstad *et al.*, 1999; Piggott and Taylor, 2003）等方法来收集粪便表面的肠道上皮细胞，只能将粪便捣碎混匀后使其均质化，从中吸取少量样品（Wasser *et al.*, 1997; Goossens *et al.*, 2000）进行提取。这种取样方法收集到的细胞很少，且会将大量杂质带入到提取过程中，常常导致无效提取（Flagstad *et al.*, 1999; Piggott and Taylor, 2003）。2) 降解严重：虽然各种保存方法均可不同程度地抑制细胞内核酸酶的活性，但其中种类繁多的细菌、病毒所产生的多种酶，依然会消化脱落在粪便中的细胞组织并降解 DNA，残存的微量 DNA 与大量杂质混合，使得 DNA 提取、分离和 PCR 难度加大。作者同意粪便

DNA 不易扩增并不完全因为抑制物干扰的观点 (Fernando *et al.*, 2003), 通过目前的粪便 DNA 提取技术已经可以得到高纯度的 DNA, 因此在陈旧粪便 DNA 的 PCR 扩增中, 其主要困难并不是抑制物质 (胆盐、多糖等) 对 Taq 酶活性的影响, 而是低浓度的模板 DNA 导致了 PCR 扩增的失败。虽然在理论上, 只要有 1 个模板分子就可以进行 PCR 反应 (Frantzen *et al.*, 1998), 但实际上有效扩增需要一定浓度的模板才可顺利进行 (Taberlet *et al.*, 1996; Morin *et al.*, 2001; Piggott and Taylor, 2003; Vidyaand Sukumar, 2005)。3) PCR 扩增困难: 在长期的保存过程中, 氧化、辐射等作用会改变 DNA 的亚硝酸基和分子骨架; 去氨基、脱嘌呤和其它水解过程会导致 DNA 分子的不稳定和断裂, 这些因素都会影响 PCR 扩增和测序的顺利进行。当模板浓度低的时候, 该问题对实验的影响尤为明显。

### 3.2 陈旧粪便 DNA 提取的关键技术

在 4 种提取方案中, 预处理 - 有机溶剂抽提法的效果最好。钟华 (2003) 和张保卫 (2004) 也曾报道过用于粪便 DNA 提取的预处理 - 酚/氯仿抽提法, 但并不适用于陈旧粪便 DNA 的提取。相对于钟华 (2003) 和张保卫 (2004) 的方法, 本研究将多管法引入到陈旧粪便 DNA 提取, 较好地解决了在陈旧粪便 DNA 提取中取样难、DNA 降解严重等难题, 有效地增大了产物的浓度, 同时也降低了模板质量不高对 PCR 扩增和测序造成的影响, 提高了提取和扩增的成功率, 是本实验的一个创新。

有效增加产物浓度, 并不代表可以任意增加单管提取的粪便样品量。当单管样品量过多时原反应体系提取和纯化效果会大幅度下降, 样品不仅难以裂解和消化, 杂质在裂解液和消化液的作用下也会产生大量抑制剂混入 DNA 产物; 同时过多的样品会大大延长 DNA 提取所需的时间, 加速 DNA 在提取过程中的降解。多管法可以有效地解决上述问题, 在保证每管 DNA 提取效率的同时, 将各重复管产物进行合并纯化后可得到具有一定浓度和纯度的 DNA 供 PCR。由于这种合并纯化的方法不受动物食性、保存方法和时间的影响, 因此可以广泛用于其他物种陈旧粪便的 DNA 提取。

该方法的效果明显优于实验中其他 3 种方法, 原因可能是在裂解前进行预处理可以避免释放出的微量 DNA 与杂质结合而难以除去, 同时避免了因多次纯化操作而对 DNA 造成的损失 (钟华等, 2003)。

### 3.3 结论

本研究通过多管收集 - 预处理 - 有机溶剂抽提的方法, 从无水乙醇常温保存 3 ~ 4.5 年的陈旧粪便中提取到 DNA 并成功地进行了 PCR 扩增和测序。它不仅证明了陈旧粪便 DNA 提取及应用的可行性, 同时也解决了因动物的迁出或死亡而无法再获得这些动物的分子遗传信息的困难, 拓宽了分子粪便学的应用范围, 因此, 本研究具有较大的实际应用价值。

### 参考文献:

- Constable J L, Packer C, Collins D A, Pusey A E. 1995. Nuclear DNA from primate dung. *Nature*, **373**: 393.
- Constable J L, Ashley M V, Goodall J, Pusey A E. 2001. Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. *Molecular Ecology*, **10**: 1279 - 1300.
- Fernando R, Vidya T N C, Dangolla A, Melnick D J. 2003. Reliable non-invasive genotyping: fantasy or reality? *Journal of Heredity*, **94** (2): 115 - 123.
- Flagstad Ø, Røed K, Stacy J E, Jakobsen K S. 1999. Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology*, **8**: 879 - 883.
- Frantzen M A J, Silk J B, Ferguson J W H, Wayne R K, Kohn M H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, **7**: 1423 - 1428.
- Goossens B, Chikhi L, Utami S S, Ruiter J, Bruford M W. 2000. A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an aboreal ape. *Conservation Genetics*, **1**: 157 - 162.
- Kohn M H, Wayne R K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, **12** (6): 223 - 227.
- Kohn M H, York E C, Kamradt D A, Haught G, Sauvajot R M, Wayne R K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London*, **266**: 657 - 663.
- Morin P A, Chambers K E, Boesch C, Vigilant L. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, **10**: 1835 - 1844.
- Murphy M A, Waits L P, Kendall K C, Wasser S K, Higbee J A, Bogden R. 2002. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation genetics*, **3**: 435 - 440.
- Parsons K M, Dallas J F, Claridge D E, Durban J W, Balcomb K C, Thompson P M, Noble L R. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology*, **8**: 1753 - 1768.
- Piggott M P, Taylor A C. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology*, **51**: 341 - 355.
- Reed J Z, Tollit D J, Thompson P M, Amos W. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology*, **6**: 225 - 234.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits L P, Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3189 - 3194.
- Vidya T N C, Sukumar R. 2005. Amplification success and feasibility of using microsatellite loci amplified from dung to population genetic studies of the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Current Science*, **88** (3): 489 - 492.
- Wasser S K, Houston C S, Koehler G M, Cadd G G, Fain S R. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, **6**: 1091 - 1097.
- 魏辅文, 饶刚, 李明, 方盛国, 冯祚建. 2001. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望. *兽类学报*, **21** (2): 143 - 149.
- 张保卫, 魏辅文, 李明, 吕晓平. 2004. 大熊猫和小熊猫粪便 DNA 提取的简易方法. *动物学报*, **50** (3): 452 - 458.
- 钟华, 赖旭龙, 魏荣平, 刘中来. 2003. 一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的改进方法. *动物学报*, **49** (5): 670 - 674.