

一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的改进方法^{*}

钟 华 赖旭龙 魏荣平 刘中来^{**}

(华中师范大学生命科学院, 武汉 430079)

(中国地质大学地球科学学院, 武汉 430074) (中国保护大熊猫研究中心, 四川卧龙 623006)

摘 要 本研究描述一个改进的方法, 使从大熊猫粪便中提取 DNA 用于 PCR 扩增变得更加容易。在粪便 DNA 的提取过程中采用一个新的预处理方法, 将粪便用预冷的丙酮洗 2~3 次, 除去粪便中含有的大量 PCR 抑制物, 然后用蛋白酶 K 裂解、酚-氯仿抽提, 能提取到纯度很高的 DNA 供 PCR 扩增。本实验 PCR 扩增了大熊猫脑源性神经营养因子 (BDNF) 基因和线粒体细胞色素 *b* 基因片段, 并进行测序分析, 证实了提取的可靠性。对比本方法和未经丙酮预处理的方法提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 前者的扩增结果明显优于后者 [动物学报 49 (5): 670~674, 2003]。

关键词 大熊猫 粪便 DNA 丙酮 DNA 抽提 非损伤性取样

An improved protocol for DNA extraction from the faeces of the giant panda^{*}

ZHONG Hua LAI Xu-Long WEI Rong-Ping LIU Zhong-Lai^{**}

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

(Faculty of Earth Sciences, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China)

(China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Wolong 623006, Sichuan, China)

Abstract An improved method that facilitates the extraction of PCR-compatible faecal DNA from giant panda's faeces is described. The method involved a novel preprocessing step in DNA extraction. The faeces was washed two or three times with precooled acetone, which removed numerous potential PCR inhibitors, and then digested with proteinase K. The DNA was purified with phenol/chloroform. The faecal DNA obtained was sufficiently pure to support reliable amplification, and was applied as template DNA to amplify a portion of the giant panda brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene and mitochondrial cytochrome *b* gene. The sequenced results of PCR products confirmed that the extracted DNA was from the giant panda. Comparison with the PCR products demonstrated that the faecal DNA extracted by the improved protocol was better than the faecal DNA extracted without acetone preprocessing. [Acta Zoologica Sinica 49 (5): 670 - 674, 2003].

Key words Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), Faecal DNA, Acetone, DNA extraction, Noninvasive sampling

在大熊猫的遗传多样性、种群数量调查、进化和分类、亲子鉴定等研究中, DNA 分析是重要的研究手段。但对于濒危动物大熊猫而言, 传统的损伤性取样是危险的。因此, 寻找简便安全的 DNA 提取途径显得极为重要。到目前为止, 出现了许多非损伤性取样法, 如收集脱落的毛发、粪便、尿液、食物残渣、鱼鳞和卵壳等不同形式的样品进行遗传分析。Höss *et al.* (1992) 发表了第一篇关于

从棕熊的粪便中获得 DNA 的文章, 实验用硅粒沉淀 DNA 取代了酚-氯仿抽提来纯化 DNA, 成功测定了其 mtDNA 的部分序列, 表明粪便可用来对稀有物种进行分子遗传研究。但由于粪便中含有大量 *Taq* 聚合酶的抑制物质, 很多方法提取的 DNA 其扩增效果不佳, 如 Höss 在 PCR 反应中就加了牛血清蛋白来克服抑制剂对 *Taq* 聚合酶的抑制作用。目前采取的方法有多种, 作者将其大致分两类:

2003-02-27 收稿, 2003-06-20 修回

^{*} 国家自然科学基金 (40172005) 资助 [This research was funded by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 40172005)]

^{**} 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: zhonglailiu@yahoo.com.cn

第一作者简介 钟华, 男, 25 岁, 硕士。研究方向: 分子遗传学。E-mail: zhongqihua@163.com

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

(1) 粪便裂解后纯化 DNA, 如 Ernest *et al.* (2000) 在粪便经蛋白酶 K 处理后, 用酚 - 氯仿多次抽提, 然后, DNA 溶液经聚丙烯酰胺葡聚糖柱子洗脱来纯化 DNA; Taberlet *et al.* (1996)、Reed *et al.* (1997) 和 Parsons *et al.* (1999) 用硫氰酸胍处理粪便, 直接用硅粒沉淀 DNA 而使之与杂质分离达到纯化的目的; Constable *et al.* (1995) 和 Savill *et al.* (2001) 在用蛋白酶 K 裂解粪便的同时另外加入了十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammoniumbromide, CTAB) 消化 PCR 反应抑制物, 再经多次酚 - 氯仿抽提纯化 DNA; Ding *et al.* (1998) 将 DNA 抽提试剂盒 (XTRAXTM DNA Extraction Kit, BIODSIGN International) 应用于大熊猫的粪便 DNA 提取, Tengel *et al.* (2001) 介绍了提取粪便 DNA 的试剂盒 (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Germany) 清除 PCR 抑制物; Reed *et al.* (1997) 将碱性多价金属离子螯合树脂 Chelex-100 应用于清除抑制物 (Reed 在自己的文章中已证明该方法并非理想)。这些方法或操作繁琐, 花费高, 或结果不十分理想, 或缺乏实验室通用性。(2) 粪便预处理, 如 Deuter *et al.* (1995) 先将粪便于 - 80 °C 冷冻, 再匀浆, 经两次差速离心除去了残渣, 但经过柱洗脱才得到了纯度高的 DNA; Lantz *et al.* (1997) 利用聚乙二醇和葡聚糖 40 组成的二相系统对粪便进行预处理, 很理想地除去了 PCR 抑制物, 但花费较高, 缺乏通用性; Machiels *et al.* (2000) 用磷酸缓冲盐溶液和酚 - 氯仿 - 异戊醇组成的二相系统对粪便预处理, 但其后的处理过程十分繁琐。

我们介绍一种在细胞裂解前经丙酮预处理的抽提方法。丙酮是一种优良的有机溶剂, 在 DNA 的提取过程中曾被用来消除抑制物, 有很好的效果 (Schneiderbauer *et al.*, 1991; Udy *et al.*, 1994; 施苏华等, 1996; Purohit *et al.*, 2003)。本实验预处理中丙酮能很好地将粪便中的色素、多糖及一些有机盐等 PCR 抑制物除去, 最后得到的 DNA 可用于 PCR 扩增, 并用于进一步的遗传分析。

1 材料与方 法

1.1 材料

大熊猫月月血液样品、粪便样品、毛发样品, 由卧龙自然保护区提供。大熊猫健健 (来自卧龙) 新鲜粪便样品、毛发样品由武汉动物园提供。

1.2 试剂

蛋白酶 K 和 pGEM-T vector System 产自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 DNA Extraction Kit 购自晶美公司 (产自 MBI, Fermentas 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取

(1) 取 2.5 g 粪便于灭菌的烧杯中, 加适量 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解, 搅拌充分, 静置 2 min。

(2) 取上清 1.0 ml 于 1.5 ml Eppendorf 管中, 做 10 管左右, 4 °C, 300 r/min 离心 5 min;

(3) 上清转入另一离心管中, 4 °C, 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞。

(4) 加 0.5 ml 丙酮 (- 20 °C 预冷) 混匀洗沉淀 1 min, 4 °C, 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞。此步重复 2~3 次, 倾去丙酮。

(5) 加 600 μ l TE, 40 μ l 溶菌酶 (50 mg/ml), 37 °C 放置 30 min。

(6) 4 °C, 1 500 r/min 离心 5 min, 取沉淀。

(7) 加 500 μ l 裂解液 (200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2.0% SDS, 50 mmol/L EDTA, 1.0% Triton X-100), 12.5 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 55 °C 温浴 3 h 或过夜。

(8) 加 1.25 μ l RNase (10 mg/ml), 37 °C 保温 30 min。

(9) 加等体积酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1) 混匀置 2 min, 4 °C, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (400 μ l) 至另一干净 Eppendorf 管中。

(10) 加入等体积异丙醇或两倍乙醇混匀, - 20 °C 放置 30 min 或过夜, 4 °C, 14 000 r/min 离心 15 min。

(11) 500 μ l 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C, 14 000 r/min 离心 2 min, 倾去上清液, 沉淀自然干燥后加 20 μ l TE 溶解。

血液 DNA 的提取参照 Wang *et al.* (1994) 的方案, 毛发 DNA 的提取参照 Higuchi *et al.* (1988) 的方案。为防止交叉污染, 3 种样品 DNA 的提取于不同时间地点进行。

1.3.2 PCR 扩增

根据在 NCBI 上已发表的大熊猫脑源性神经营养因子 (BDNF) 基因的序列 (U56638), 采用软件 GENERUNR 设计引物: 上游引物 (起始位 38) 5' TCGGTTGCATGAAGGC 3'; 下游引物 (末位 668) 5' TTGCTATCCATGGTAAGGG 3'。扩增在

PTC-100 型 PCR 仪上进行, 采用 25 μ l 反应体积: 10 \times 缓冲液 2.5 μ l, 1.5 μ l MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ l dNTP (10 mmol/L), 引物 (50 μ mol/L) 各取 0.5 μ l, 0.2 μ l *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l), 3 μ l 模板总 DNA。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 60 s, 56 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 36 个循环后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 8 min。细胞色素 *b* 基因 (X94918) 设计引物: 上游引物 (起始位 423) 5' AGGAGCAACCGTCATCAC 3'; 下游引物 (末位 946) 5' TCATGCTTCGTTGTTTGG 3'。反应条件中退火温度改为 53 $^{\circ}$ C, 延伸时间改为 60 s, 其余同上。

1.3.3 DNA 扩增片段的测序

PCR 产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 采用 DNA Extraction Kit (MBI) 回收提纯目的片段。使用 T-Vector 试剂盒克隆片段, 由中科开瑞测序组和上海博雅测序公司完成测序。

2 结 果

2.1 粪便 DNA 的检测

该方法提取的 DNA 溶液经 BioPhotometer (Eppendorf) 初步检测, 其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。经 PCR 检测, 我们从新鲜的健健粪便中所提的 DNA 中成功得到了 BDNF 基因 631 bp 的扩增片段 (图 1), 从月月 and 健健的粪便 DNA 中均得到了细胞色素 *b* 基因 524 bp 的扩增片段 (图 2)。将月月的血样 DNA 和毛发 DNA、健健的毛发 DNA 作为对照, 粪便 DNA 的扩增结果与对照一致 (图 1 和 2)。比较实验表明, 不经丙酮处理最终所得的 DNA 溶液呈现淡黄色, 按照上述扩增体系不

能得到扩增产物; 硅粒沉淀 DNA 的提取方法所得的 DNA 溶液也略显黄色, 较难得到扩增产物, 在结合酚-氯仿抽提时才有扩增产物 (图 2)。PCR 产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳, Gel-PRO ANALYZER 凝胶成像系统 (America) 照相。

2.2 PCR 产物测序结果

为进一步证实本实验所扩增的 DNA, 我们将粪便 DNA 的 PCR 产物和相应个体的血样、毛发 DNA 的 PCR 产物都进行 T 载体克隆, 双向测序, 同一个体不同样品 DNA 的 PCR 产物测序结果一致, 有力地证明了我们从粪便 DNA 中的扩增是可靠的。月月 and 健健 BDNF 基因扩增片段的序列与发表在 NCBI 上的序列 (U56638) 相比较, 552 位上发生了碱基颠换, 由 G 变为 C; 细胞色素 *b* 基因扩增片段与发表在 NCBI 上的序列 (X94918) 相比较, 490 和 498 位发生了碱基转换, 由 A 变为 G, 852 位发生碱基转换, 由 C 变为 T。

3 讨 论

粪便是非损伤性取样的一个丰富资源。由于粪便中所含杂质太多, 如细菌、病毒、*Taq* DNA 聚合酶抑制剂物质 (如色素、多糖和纤维素) 等, 因此, 各种方法都围绕怎样除去这些杂质而得到高纯度的目的基因组而展开。在除细菌、病毒方面本文沿用了前人的溶菌酶处理方案 (方盛国等, 1996), 而在消除抑制剂方面则是本研究的一个改进。采用在细胞裂解前先经过差速离心除去大部分杂质后, 将收获的细胞用丙酮洗涤 2 或 3 次以除去抑制物, 再进行 DNA 提取, 只需一次酚-氯仿抽提即可。与现有的许多方法相比, 该方法经济简便, 具有实

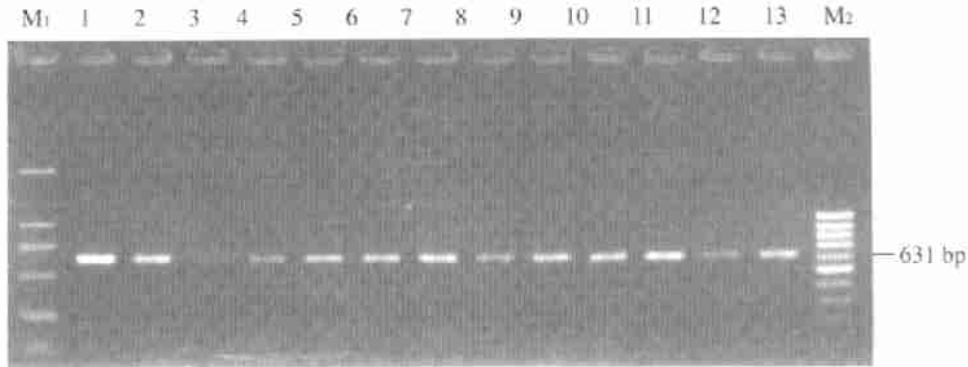


图 1 大熊猫脑源性神经营养因子基因的扩增结果

Fig. 1 Efficient amplification of the giant panda BDNF (brain derived neurotrophic factor) gene

M₁: DL-2000 M₂: Ladder-100 泳道 1 (Lane 1): 月月血样 DNA (DNA from Yueyue's blood) 泳道 2 (Lane 2): 月月毛发 DNA (DNA from Yueyue's hair roots) 泳道 3 (Lane 3): 健健毛发 DNA (DNA from Jianjian's hair roots) 泳道 4~13 (Lane 4~13): 健健新鲜粪便 DNA (Jianjian's fresh faeces, DNA was extracted with the improved protocol)

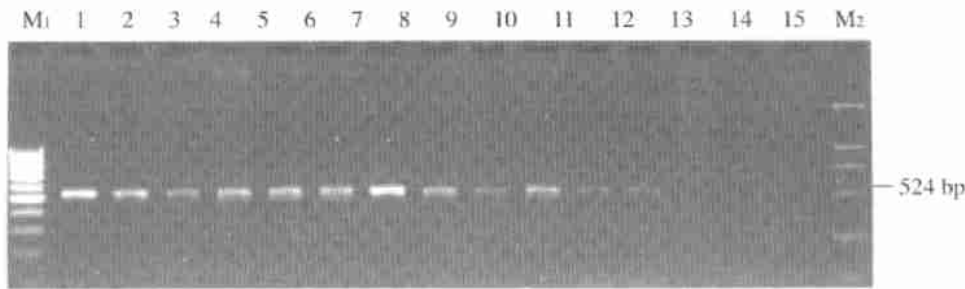


图 2 大熊猫线粒体细胞色素 b 基因的扩增结果

Fig. 2 Efficient amplification of the giant panda mitochondrial cytochrome b gene

M₁: Ladder-100 M₂: DL-2000 泳道 1 (Lane 1): 月月血样 DNA (DNA from Yueyue's blood) 泳道 2 (Lane 2): 月月毛发 DNA (DNA from Yueyue's hair roots) 泳道 3~7 (Lane 3~7): 月月粪便 DNA (Yueyue's faeces, DNA was extracted with the improved protocol) 泳道 8 (Lane 8): 硅法提取的月月粪便 DNA (Yueyue's faeces, DNA was extracted by the silica method) 泳道 9 (Lane 9): 健健毛发 DNA (DNA from Jianjian's hair roots) 泳道 10~12 (Lane 10~12): 健健新鲜粪便 DNA (Jianjian's fresh faeces, DNA was extracted by the improved protocol) 泳道 13~15 (Lane 13~15): 未经丙酮处理的健健新鲜粪便 DNA (Jianjian's fresh faeces, DNA was extracted without preprocessing the faeces with acetone)

实验室通用性。

本方案所提取的粪便 DNA，按一般 PCR 反应体系即可进行，无需另加 BSA 或加高性能的 *Taq* 酶，扩增效果好。如图 1 显示，我们从新鲜粪便所提的 DNA 中成功扩增出了核 BDNF 基因 631 bp 的较长片段，而一般认为粪便 DNA 降解严重，很难扩增出达到 600 bp 的片段 (李明等, 2001)。经多次重复实验，月月粪便 DNA 都没有得到 BDNF 基因片段的扩增，可能是由于取材原因，没有很好地保存月月的粪便以及存放时间较长 (自然条件下存放了 1 星期，-20℃ 保存了约 4 个月)。但在本研究方案所提的粪便 DNA 样中均得到了细胞色素 b 基因 524 bp 的扩增片段 (图 2)，说明只要粪便还含有目的 DNA，对于陈旧的粪便，本方案提取 DNA 用于 PCR 扩增也是有效可行的。作者赞同在裂解细胞前预处理粪便，然后再提取 DNA 的方法，原因在于这样避免了许多对提取 DNA 不利的因素：(1) 在细胞裂解释放出 DNA 后，DNA 易与多糖、色素等物质结合，抑制物很难除去；(2) DNA 释放后，因多次的纯化处理易损失原本就很微量的 DNA，并且易造成 DNA 的损伤。

致 谢 卧龙自然保护区的吴虹林、武汉动物园的杜有训、陈军等同志为本研究在取样上提供了许多帮助，谨此一并致谢。

参考文献 (References)

Constable, J. J., C. Packer, D. A. Collins and A. E. Pusey 1995 Nucleic DNA from primate dung. *Nature* **373**: 393.

- Deuter, R., S. Pietsch, S. Hertel and O. Müller 1995 A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Research* **23**: 3 800~3 801.
- Ding, B., Y. P. Zhang and O. A. Ryder 1998 Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from scent mark and feces in the giant panda. *Zoo Biology* **17**: 499~504.
- Ernest, H. B., M. C. Penedo, B. P. May, M. Syvanen and W. M. Boyce 2000 Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* **9**: 433~441.
- Fang, S. G., C. W. Ding, W. H. Feng, A. J. Zhang, G. H. Li, S. C. Li, J. Q. Yu and X. B. Li 1996 A preliminary study on the material resource of DNA in the DNA fingerprinting analysis of giant pandas. *Acta Theriologica Sinica* **16** (3): 166~170. [方盛国, 丁朝武, 冯文和, 张安局, 李光汉, 李绍昌, 余建秋, 李学兵 1996 大熊猫 DNA 指纹分析材料的初步研究. 兽类学报 **16** (3): 166~170.]
- Higuchi, R., C. H. Beroldingen, G. F. Sensabaugh and H. A. Erlich 1988 DNA typing from single hairs. *Nature* **322**: 543~546.
- Höss, M., M. Kohn and S. Pääbo 1992 Excrement analysis by PCR. *Nature* **359**: 199.
- Lantz, P. G., M. Matsson, T. Wadström and P. Rådström 1997 Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* **28**: 159~167.
- Li, M., F. W. Wei, G. Rao, S. G. Fang and Z. J. Feng 2001 Application of noninvasive sampling in conservation genetics. *Acta Zoologica Sinica* **47** (3): 338~342. [李明, 魏辅文, 饶刚, 方盛国, 冯祚建 2001 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. 动物学报 **47** (3): 338~342.]
- Machiels, B. M., T. Ruers, M. Lindhout, K. Hardy, T. Hlavaty, D. D. Bang, V. A. M. C. Somers, C. Baeten, M. von Meyenfekdt and F. B. J. M. Thunnissen 2000 New protocol

- for DNA extraction of stool. *BioTechniques* **28**: 286 ~ 290.
- Parsons, K. M., J. F. Dallas, D. E. Claridge, J. W. Durban, K. C. Balcomb, P. M. Thompson and L. R. Noble 1999 Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology* **8**: 1 753 ~ 1 768.
- Purohit, H. J., A. Kapley, A. A. Moharikar and G. Narde 2003 A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 315 ~ 323.
- Reed, J. Z., D. J. Tollit, P. M. Thompson and W. Amos 1997 Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* **6**: 225 ~ 234.
- Savill, M. G., S. R. Murray, P. Scholes, E. W. Maas, R. E. McCormick, E. B. Moore and B. J. Gilpin 2001 Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan™ PCR techniques to the detection and identification of *Phodococcus coprophilus* in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* **47**: 355 ~ 368.
- Schneiderbauer, A., H. Sanderman and D. Ernst 1991 Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Analytical Biochemistry* **197**: 91 ~ 95.
- Shi, S. H., Q. Zhang, Y. Q. Chen, S. Q. Tang and L. H. Qu 1996 A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* **35** (2): 103 ~ 105. [施苏华, 章群, 陈月琴, 唐绍清, 屈良鸽 1996 一种简易的植物核酸提取方法——从干叶和新鲜叶中快速提取 RNA 和 DNA. 中山大学学报 (自然科学版) **35** (2): 103 ~ 105.]
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits and J. Bouvet 1996 Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**: 3 189 ~ 3 194.
- Tengel, C., P. Schüller, E. Setzke, J. Balles and M. Sprenger-Hauels 2001 PCR-Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *BioTechniques* **31**: 426 ~ 429.
- Udy, G. B. and M. J. Evans 1994 Microplate DNA preparation, PCR screening and cell freezing for gene targeting in embryonic stem cells. *BioTechniques* **17**: 887 ~ 894.
- Wang, L., K. Hirayasu, M. Ishizawa and Y. Kobayashi 1994 Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Research* **22**: 1 774 ~ 1 775.