

粪便 DNA 分析技术在动物生态学中的应用*

王戎疆

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 粪便 DNA 分析是一项新发展起来的从粪便中获取动物 DNA 并用于相关研究的技术, 该技术有助于分子生态学研究所遇到的取样难题。通过对粪便 DNA 分析的研究方法、研究内容以及研究进展情况的介绍, 提供了该技术不仅能用于分子生态学的许多研究领域, 而且还能够提供诸如种群数量估计、领域边界划定等生态学信息, 这是对分子生态学的重要补充。

关键词 粪便 DNA 分析技术 分子生态学 非损伤性取样 种群数量估计

近年来, 随着分子生物学技术的日益发展, 分子生物学研究也和越来越多的学科相结合, 从而扩展了原有的研究范围。粪便 DNA 分析技术以动物粪便为实验材料, 应用分子生物学手段研究动物的 DNA, 从而获得动物有关的遗传信息, 这是一项新发展起来的分子生态学技术。该技术还能提供诸如瞬时种群数量估计、领域边界划定等有价值的生态学资料。这就使得分子生态学现有的研究范围得以扩展。粪便 DNA 分析技术已成为生态学的一个研究热点 (李明等, 2001)。

1 粪便 DNA 分析技术的建立

分子生物学在生态学研究中的广泛应用, 使得原来的种群、群落和生态系统的宏观生态学深入到生物的遗传结构及基因多样性等微观领域, 即分子生态学 (molecular ecology)。在动物分子生态学研究中, 获取实验材料一直是困扰着研究者的一大难题。比较常用的方法是捕获或麻醉动物, 然后采集血液或组织。但是, 这一方法存在诸多问题, 使其应用受到极大的限制。首先, 由于野生动物对人类是相当警觉的, 或者由于其出没地区人类难以到达, 猎捕动物也就具有一定的难度。其次, 在捕获或麻醉过程中, 有可能会使动物受伤, 严重时甚至导致死亡。另外, 捕获和麻醉都有可能干扰动物的正常生理过程, 还有可能刺激动物改变其行为, 如更换栖息地等。这些负面影响有时会很严重, 直接

影响到野外采集数据的准确性。如果研究对象是濒危动物, 对个体的伤害则有可能影响到整个种群, 甚至整个物种的安危。因此, 人们尝试各种方法最大可能地减少对动物的干扰及伤害, 即非损伤性取样 (non-invasive sampling), 例如采集动物的毛发作为实验材料 (Taberlet *et al.*, 1992)。

动物体时时刻刻都在进行着新陈代谢, 生成许多新细胞来替代老细胞, 这些被替代的细胞或是被分解, 或是脱落, 最终被重新吸收或排出体外。在粪便经过肠道的过程中, 肠道会有一些脱落细胞混在其中, 一同排出体外。研究表明, 每克人新鲜粪便中会含有 10^5 个肠道细胞, 而且大部分是活细胞 (Albaugh *et al.*, 1992), 这就意味着我们可以从粪便中获取粪便产生者的 DNA, 进行遗传分析。在野外搜集粪便的难度远比捕获动物或是收集毛发要小很多, 而且无需见到生活个体。这样就几乎完全不干扰野生动物的正常活动, 基本解决了分子生态学研究所遇到的取样难题。Höss 等 (1992) 发表了第一篇关于从熊的粪便中获得 DNA 的文章, 这标志着粪便 DNA 分析技术的建立, 并开始为生态学研究提供有价值的资料。

2 研究方法

2.1 粪便的保存

在野外研究中, 获取新鲜粪便是十分困难的, 而更常见的是在野外自然条件下经历了一段时间的

2000-01-31 收稿, 2001-06-15 修回

* 芬兰国际交流中心 (CIMO) 资助

作者简介 王戎疆, 男, 31 岁, 讲师。研究方向: 种群生态学和分子生态学。E-mail: rjwang@bio.pku.edu.cn

粪便。研究表明,即使是从野外自然条件下保存较长时间(数月或更长)的粪便中也能提取出 DNA (Constable *et al.*, 1995; Tikel *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1998), 尽管其质量不如从新鲜样品中得来的, 却基本可以满足研究的要求, 这就意味着可以获得更多的实验材料。此外, 不同的保存方法(冷冻、干燥、乙醇固定等)对 DNA 提取的影响有所不同, 其中以冷冻和干燥手段最为有效, 但总的差别并不大 (Wasser *et al.*, 1997; Frantzen *et al.*, 1998)。因此, 搜集粪便时并不需要特别的保存手段, 这对野外工作是很有实际意义的, 即无需携带沉重的装备(如液氮罐), 只需一些轻便的物品(如小口袋、干燥剂等)即可。

2.2 粪便中 DNA 的提取

粪便中的细胞必然会有一定的裂解, 而 DNA 也会不同程度的降解, 并且这些 DNA 会与蛋白质有一定程度的交联。如何尽可能地避免 DNA 的进一步降解, 以及尽可能打开这些交联是 DNA 提取的关键。目前在分子粪便学的研究中主要有下述三类提取方法, 但由于不同动物的食性不同, 在野外的保存环境也不同, 影响 DNA 提取的因素也就因动物的不同而有所差异。因此, 针对不同的动物应选取不同的提取程序, 并加以适当改进。

2.2.1 酚-氯仿抽提法 一般用常规的 DNA 提取方法即可从粪便中获得 DNA, 即先用蛋白酶 K、SDS 等处理粪便, 然后用酚-氯仿抽提, 最后用乙醇沉淀 (Paxinos *et al.*, 1997)。根据动物食性的不同可做不同的变化, 例如对于一些取食植物的灵长类动物, 由于其粪便中含有大量的植物残渣, 一般采用提取植物 DNA 的 CTAB 法 (Constable *et al.*, 1995)。

用这些方法从粪便中提取的粗 DNA 中通常含有一些抑制 *Taq* 聚合酶的物质, 这些物质可以完全抑制 PCR 反应的进行。甚至, 只要将很少的这种 DNA 加入到可进行扩增的反应体系中, PCR 反应就会被彻底抑制。目前, 还不清楚这些物质究竟是什么, 而且, 这些物质不能通过酚抽提和乙醇沉淀而除去。现在, 一般利用硅质颗粒 (silica beads) 或玻璃奶 (glass milk) 进行纯化, 纯化后的 DNA 便可用于 PCR 扩增 (Wasser *et al.*, 1997; Kohn *et al.*, 1995)。

2.2.2 Chelex-100 煮沸法 Chelex-100 是一种碱性多价金属离子螯合树脂, 它可以和大量金属离子如镁、锰等这些 DNase 维持活性所必需的离子相

结合, 从而有效地抑制其活性, 以保护 DNA 不再降解。Chelex-100 还可以提供一个很强的碱性环境, 在煮沸条件下裂解细胞并沉淀蛋白质, 以分离 DNA (Walsh *et al.*, 1991)。用 Chelex-100 煮沸法提取 DNA 简便易行, 由于不需要多次转管, 也大大降低了其它 DNA 污染的可能性。但用该方法得到的 DNA 中也含有 *Taq* 聚合酶抑制剂, 仍需用硅质颗粒或玻璃奶予以纯化。

2.2.3 硫氰酸胍裂解法 目前, 用高浓度的硫氰酸胍 (guanidium thiocyanate) 结合硅质颗粒共同处理粪便被认为是一种十分有效的提取手段 (Reed *et al.*, 1997)。硫氰酸胍是一种很强的蛋白变性剂, 可以使细胞裂解, 并使核酸水解酶失活, 而且在高浓度的硫氰酸胍存在下, DNA 能够和硅质颗粒结合而和其它物质分离 (Boom *et al.*, 1990)。由于该方法用硅质颗粒直接从粪便裂解液中将 DNA 纯化出来, 不仅节约了许多提取步骤, 避免污染的可能性, 而且提取出来的 DNA 可以直接用于 PCR 扩增。

2.3 PCR 扩增及结果分析

从粪便中获得的 DNA 是多种 DNA 的混合物, 包括粪便产生者的 DNA、食物中的 DNA 以及各种微生物的 DNA 等。只要使用特异的引物, 利用 PCR 技术即可扩增某一特异片段并进行分析。

3 研究内容

从粪便中提取出 DNA 后, 即可进行有关分子生态学研究, 例如种群亲缘关系的判断、母系的认定和父权的排除等。由于采集粪便时不能确定粪便的产生者, 因此还需进行物种的鉴别和个体的识别。除此之外, 粪便 DNA 分析技术还可进行种群数量估计和领域划定等项研究, 这是分子生态学难以实现的, 但对于野外生态学研究却是很重要的。

3.1 物种的鉴别

在野外搜集粪便时, 一般是通过粪便的形状、气味、内容物等来初步判断动物种类。准确鉴定动物的种类, 一般是扩增线粒体 DNA 中的某一片段, 再用限制性内切酶处理, 根据是否能扩增、扩增片段的大小、酶切位点的数目, 以及酶切的位置等将不同的物种区分开 (Foran *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1999)。Kohn 等 (1999) 在调查美国 Santa Monica 山区郊狼 (*Canis latrans*) 的种群状况时, 就利用线粒体 DNA 控制区域的 *Mva* 限制性酶切位点的特异性将郊狼的粪便与狗、灰狐

等的区分开,对扩增出的片段用 *Mva* 处理,郊狼没有 *Mva* 的酶切位点,而在狗和灰狐中则分别有一个和两个酶切位点。

3.2 个体的识别

若要进行个体的识别,则必须有足够多的遗传标记以资利用,一般是选用微卫星 DNA 作为遗传标记。微卫星 DNA 广泛存在于真核生物的基因组中,一般是 2~6 个碱基多次重复的串联结构,重复数一般为 2~20 个。微卫星 DNA 等位基因之间的差异主要是重复数的不同,对于某一微卫星 DNA 来说,一般会有十几个等位基因 (Tautz, 1989)。因此,微卫星 DNA 标记具有很高的多态性。此外,一个基因组中存在相当多的微卫星 DNA,多座位及每一座位的多态性使得微卫星 DNA 完全可用于个体的识别。Reed 等 (1997) 用 4~5 个微卫星座位的扩增结果判定,其 82 个海豹的粪便样品至少来自 67 个个体。

3.3 动物性别的鉴定

鉴定动物的雌雄对于动物生态学研究是很重要的,而且也有助于动物的个体识别。使用雄性 Y 染色体所特有的 SR Y 基因作为鉴定指标,即可判断动物的性别。由于雌性个体中没有 SR Y 基因,为避免与没有 DNA 相区别,通常同时扩增其它片段做对照 (Wasser *et al.*, 1997; Kohn *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1997)。

3.4 种群亲缘关系的鉴定

了解种群的亲缘关系和遗传结构是分子生态学研究中的必不可少的内容之一。在意大利北部 Brenta 地区的棕熊 (*Ursus arctos*) 已接近于灭绝,为了保存这一地区的棕熊种群,计划引种以恢复该地区的种群数量。Kohn 等 (1995) 从该地区的棕熊粪便中获取了 DNA,扩增并测定了线粒体 DNA 控制区域 (control region) 的一部分序列,通过与欧洲其它地区多个棕熊种群相比较,确定了欧洲棕熊各种群之间的亲缘关系,并建议可优先考虑从与 Brenta 种群亲缘关系最近的 Slovenia 种群引种。

3.5 母系的鉴定

在动物体内,线粒体 DNA 是母系遗传的,所以对线粒体 DNA 的基因片段,进行序列分析,或进行 RFLP 分析,可以鉴定野生动物的母系 (Kohn *et al.*, 1997)。

3.6 父权的认定

动物的交配时间一般都较短,几乎无法观察到,因此很难通过观察交配活动来确定幼仔的父

亲。若是多配的动物,则就是完全不可能的。而在一些哺乳动物中,雄性个体在交配之后便离开雌性个体,并不承担育幼任务。只有通过分子生物学技术进行亲子鉴定,才能确认其真正的父亲。只要比较仔兽和母兽及可能父亲的微卫星 DNA 的基因型即可进行排除及认定 (Kohn *et al.*, 1997)。

3.7 种群数量的估计

种群数量的估计是建立在个体识别的基础之上的。搜集整个研究区域内的粪便,或对其进行断面或路线调查,分析粪便中的微卫星 DNA 标记,根据微卫星 DNA 基因型的不同,识别个体,从而可估计出种群的数量。进一步结合时间动态,则可获得有关种群出生、死亡、迁入、迁出等多个数据,这是野外生态学研究中有价值的资料。Kohn 等 (1999) 在调查美国 Santa Monica 山区郊狼 (*Canis latrans*) 的种群数量时,用了 2 周时间搜集了 15 km² 内的 600 余份粪便样品。他们使用了 3 个特异的微卫星引物进行扩增,以确定粪便中 DNA 的基因型,最后根据实验结果估计该研究区域内有 40 只左右的郊狼,这一结果与同期进行的标记重捕法所估数量相差不大,但与这期间历时 21 个月野外的捕捉调查结果有较大的出入。据分析,这是由于两个调查方法在时间跨度上的差异造成的,粪便研究提供的是近乎瞬时的种群数量,而捕捉调查则历时较长,而在此期间,动物会有死亡、迁移等动态变化。由此可见,粪便 DNA 分析所能提供的瞬时的种群数量是其它研究方法难以比拟的。

3.8 巢域 (home range) 及领地 (territory) 范围的估计

动物都有一定的领地或巢域,许多动物还有用粪便来标记其领地边界的习性,所以通过粪便做个体识别,然后将同一个体的粪便分布范围圈出来,就可以初步划定动物的巢域或领地了 (Kohn *et al.*, 1997)。

4 研究的局限

首先,动物细胞在粪便中的分布是不均匀的 (Kohn *et al.*, 1995),可能有时在一些粪便中无法获得 DNA。但由于可以从野外获得许多粪便样品,所以可以通过分析多个样品来解决。其次,由于粪便中的动物细胞本身就有不同程度的降解,加之在野外自然条件下经历了一段时间,因而从粪便中获得的 DNA 数量,尤其是核 DNA,可能很少,而且

会有一些程度的降解, 在应用微卫星 DNA 进行个体识别时就有可能出现一些偏差, 例如, 在取样进行 PCR 扩增时, 由于 DNA 浓度过低, 使得只取到两个等位基因中的一个的概率变高, 对于纯合体没有问题, 而对于杂合体则有较大可能只扩增出一个片段, 这样就会被误认为是纯合体。为了避免这一问题, 重复取样及重复扩增在粪便 DNA 分析中是十分必要的 (Taberlet *et al.*, 1996)。值得一提的是, 分子生物学的花费是较大的, 从前述的研究内容可以看出, 分析大量样品及重复分析是必需的, 这不仅加大了工作量, 而且所需的经费也是很大的。这就极大地制约了粪便 DNA 分析技术的应用范围。最后, 如果研究对象有残杀同类或猎食近缘种的习性, 则会严重影响分子粪便学研究的准确性。

5 研究进展与展望

自 1992 年起, 粪便 DNA 分析逐步开展起来, 研究对象主要集中于种群数量较少的动物类群上, 如猫科 (Foran *et al.*, 1997; Paxino *et al.*, 1997;

Kohn *et al.*, 1999)、熊科 (Höss *et al.*, 1992; Kohn *et al.*, 1995; Wasser *et al.*, 1997)、猩猩类 (Constable *et al.*, 1995; Gerloff *et al.*, 1995; Frantzen *et al.*, 1998) 及水生哺乳类 (Tikel *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1997) 等。绝大部分工作还属于基础性工作, 即论证该技术的可行性等。而真正将该技术应用于生态学研究中的是 Kohn 等 (1999) 对美国郊狼的研究工作。尽管粪便 DNA 分析还受到不少因素的制约, 但其非损伤性取样、瞬时种群数量估计等都是其优势之所在。可以预料, 粪便 DNA 分析技术将在动物生态学的研究中发挥重要的作用。

致谢 本文是我于 1999 年 1 月至 7 月间在芬兰赫尔辛基大学系统及生态学系进修期间的研究所得。在此期间, Ilkka Hanski 教授和 Jodie Painter 博士给予了极大的热忱和帮助, 使我受益不浅。我还得到芬兰国际交流中心 (CIMO) 的资助。本文初稿承蒙我院环境生物学及生态学系多位老师审阅, 并提出很多很好的建议。特此一并致谢!

参 考 文 献 (References)

- Albaugh, G. P., V. Iyengar, A. Lohani, M. Malayeri, S. Bala and P. P. Nair 1992 Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, noninvasive approach to the study of cellular markers. *Int. J. Cancer* **52**: 347 ~ 350.
- Boom, R., C. J. A. Sol and M. M. M. Salimans 1990 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clinical Microbiology* **28**: 495 ~ 503.
- Constable, J. J., C. Packer, D. A. Collins and A. E. Pusey 1995 Nuclear DNA from primate dung. *Nature* **373**: 393.
- Ding, B., Y. 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.
- Foran, D. R., K. R. Crooks and S. C. Minta 1997 Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin* **25** (4): 835 ~ 839.
- Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. K. Wayne and M. H. Kohn 1998 Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* **7**: 1 423 ~ 1 428.
- Gerloff, G., C. Schlötterer, K. Rassmann, I. Rambold, G. Hohmann, B. Fruth and D. Tautz 1995 Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology* **4**: 515 ~ 518.
- Hansen, M. M. and L. Jacobsen 1999 Identification of mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*), by analysis of DNA from faecal samples. *J. Zool. Lond.* **247**: 177 ~ 181.
- Höss, M., M. Kohn, S. Pääbo, F. Knauer and W. Schröder 1992 Excrement analysis by PCR. *Nature* **359**: 199.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder and S. Pääbo 1995 Conservation genetics of the European brown bear — a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology* **4**: 95 ~ 103.
- Kohn, M. H. and R. K. Wayne 1997 Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* **12** (6): 223 ~ 227.
- Kohn, M. H., E. C. York, D. A. Kamradt, G. Haught, R. M. Sauvajot and R. K. Wayne 1999 Estimating population size by genotyping faeces. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**: 657 ~ 663.
- LI, M., F. W. Wei, G. Rao, S. G. Fang and Z. J. Feng 2001 Application of noninvasive sampling in conservation genetics. *Acta Zool. Sin.* **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.]
- Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls and R. Fleischer 1997 A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* **6**: 483 ~ 486.

- 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.
- Taberlet, P. and J. Bouvet 1992 Bear conservation genetics. *Nature* **358**: 197.
- 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** (16): 3 189 ~ 3 194.
- Tautz, D. 1989 Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**: 6 463 ~ 6 471.
- Tikel, D., D. Blair and H. D. Marsh 1996 Marine mammal faeces as a source of DNA. *Molecular Ecology* **5**: 456 ~ 457.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi 1991 Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio. Techniques* **10**: 506 ~ 513.
- Wasser, S. K., C. S. Houston, G. M. Koehler, G. G. Cadd and S. R. Fain 1997 Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of ursids. *Molecular Ecology* **6**: 1 091 ~ 1 097.

外 文 摘 要 (Abstract)

APPLICATION OF MOLECULAR SCATOLOGY TO ANIMAL ECOLOGY *

WANG Rong-Jiang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Fecal DNA analysis is a new technique, by which animal DNA is extracted from the feces for involved researches. It is helpful for sampling problem in molecular ecology. In this paper, the methods, subjects, and advances of fecal DNA analysis were involved. Fecal DNA analysis is not only used in many areas of molecular ecology, but also might provide some ecological information, such as estimating population size and confirming the boundary of territory. Hence, fecal DNA analysis is an important complement of molecular ecology.

Key words Fecal DNA analysis, Molecular ecology, Non-invasive sampling, Estimating population size

* This work was supported by Center of International Mobile (CIMO) in Finland