

东方白鹳粪便总 DNA 五种提取方法的比较

武芳婷 吴弘* 赵大鹏*

天津师范大学生命科学院 天津 300387

摘要: 本研究比较东方白鹳 (*Ciconia boyciana*) 粪便总 DNA 的 5 种提取方法, 旨在为后续物种性别鉴定和 DNA 条形码鉴定提供合适的方法。采用十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB 法)、十二烷基磺酸钠裂解法 (SDS 法)、Tiangen 试剂盒法、Qiagen 试剂盒法和异硫氰酸胍法 (GuSCN 法) 对取自天津动物园的东方白鹳新鲜粪便进行基因组 DNA 的提取, 比较 5 种提取方法在不同水浴 (破壁) 时间条件下提取获得的 DNA 浓度和 DNA 纯度 (A_{260}/A_{280} 值), 以及用于 PCR 扩增的稳定性。5 种提取方法均可以从粪便中提取出基因组 DNA, 但会受到水浴 (破壁) 时间的影响, 所提取的 DNA 质量是不同的。其中, GuSCN 法提取效果最佳, SDS 法提取效果较差。利用 GuSCN 法在水浴 (破壁) 时间 1 h 下提取的 DNA 可以成功地进行 PCR 扩增和物种鉴定。综上所述, GuSCN 法是东方白鹳粪便总 DNA 提取方法中相对最为简便、高效、可靠且成本较低的提取方法。

关键词: 东方白鹳; 非损伤取样; DNA 提取

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 02-300-10

Methodological Comparison for Extracting Total DNA from Faeces of the Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*)

WU Fang-Ting WU Hong* ZHAO Da-Peng*

College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: [Objectives] The total DNA from fecal samples of endangered Oriental White Storks (*Ciconia boyciana*) was extracted in the present study by five methods (cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method, sodium dodecyl sulfonate (SDS) method, Tiangen kit method, Qiagen kit method, and guanidine isothiocyanate (GuSCN) method) in order to provide the suitable reference for both gender identification and DNA barcoding identification of this endangered species. **[Methods]** We compared the DNA concentration and purity (i.e. A_{260}/A_{280} values) obtained by five extraction methods under the influence of variations in temperature which were controlled by water bath (wall breaking). Then, the mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop sequencing which was widely used to identify and distinguish species, was selected as the target fragment for PCR amplification to test whether the obtained sequence belonged to the Oriental White Stork.

基金项目 中央财政林业补助资金项目—野生动物监测专项, 国家自然科学基金项目 (No. 31772468);

* 通讯作者, E-mail: skywuhong@tjnu.edu.cn, skyzdp@tjnu.edu.cn;

第一作者介绍 武芳婷, 女, 硕士研究生; 研究方向: 野生动物资源保护; E-mail: 1041183695@qq.com。

收稿日期: 2021-05-06, 修回日期: 2021-11-24 DOI: 10.13859/j.cjz.202202015

The sequences were aligned by Clustal X and then used to construct a phylogenetic tree performed by Neighborhood-Joining method in MEGA 7.0, in order to identify whether the measured sequence belonged to the Oriental White Stork and analyze its evolutionary relationship with other birds. **[Results]** Genomic DNA could be extracted from fecal samples via each method. The DNA concentration and A_{260}/A_{280} value were quite different due to the influence of water bath (wall breaking) time (Table 2). The total fecal DNA extracted by the five methods showed no obvious DNA bands in the gel electrophoresis test (Fig. 1). By comparing the DNA concentration values though Nano Drop 2000, it proved that the GuSCN method was the most efficient with the highest DNA yields reaching 90 mg/L and the purity of about 1.8 (Table 3). However, DNA yields obtained with the SDS was the lowest one. PCR analysis was performed to evaluate the quality of the extracted DNA using GuSCN method under water bath (wall breaking) time of 1 h, and the obtained specific PCR products, using D-loop primers confirmed the existence of Oriental White Storks DNA in fecal samples (Fig. 2). The sequence belonged to the Oriental White Stork from the same family gathered together from the evolutionary tree (Fig. 3), and could be distinguished from species of the same family by sequence alignment analysis (Fig. 4). **[Conclusion]** On the whole, the GuSCN method was proved to be the most effective one for DNA extraction from fecal samples due to its simplicity, reliability, and affordability.

Key words: *Ciconia boyciana*; Noninvasive sampling; DNA extraction

在动物遗传分子的相关研究方面，尤其是野生濒危物种，使用非损伤性取样方法采集包括粪便、羽毛、尿液、毛发、鱼鳞、卵壳等样品 (Broquet et al. 2007, Russello et al. 2015)，可以避免对动物造成直接伤害，降低因捕获或麻醉所产生的潜在风险 (Fasoli et al. 2020)。非损伤性取样方法目前广泛应用在多个研究领域，例如开展物种鉴定 (Romolo et al. 2014)、建立物种谱系关系 (Liberg et al. 2005)、监测物种激素水平 (李静宇等 2021) 等。

相比于其他组织，粪便所含杂质较多，除了肠道微生物和各种抑制物、污染源外，粪便中还携带有动物直肠壁脱落的细胞 (Reed et al. 2003)，从中提取可扩增的 DNA 是项具有一定挑战性的工作 (Idaghdour et al. 2003)。目前关于从动物粪便样品中提取 DNA 的实验方法较多，主要包括酚-氯仿抽提法 (Tsai et al. 2019)、十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法 (Tang et al. 2008)、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate, SDS) 裂解法、溶酶菌法 (Han et al. 2018)、煮沸法 (李龙显等 2018)、异硫

氰酸胍 (guanidine isothiocyanate, GuSCN) 法 (Idaghdour et al. 2003)，以及多种商业性 DNA 提取试剂盒 (Eriksson et al. 2017)。研究发现动物粪便总 DNA 质量受物种食性的影响 (赵健元等 2008, 李龙显等 2018)，不同实验方法在不同物种粪便样品 DNA 提取中的适用度存在差异 (李霞等 2015)，例如异硫氰酸胍法和 SDS 裂解法分别最适于小鼠 (*Mus musculus*) (吴敏娜等 2015) 和藏山羊 (*Capra hircus*) (郭政宏等 2016) 粪便样品 DNA 提取。因此，有针对性地围绕某一物种，特别是珍稀濒危物种，开展粪便样品 DNA 提取方法的比较研究，将有助于对该物种开展保护生物学工作 (Quinn et al. 2019, Storer et al. 2019)。

东方白鹳 (*Ciconia boyciana*) 是大型涉禽，主要分布在中国、俄罗斯、日本、朝鲜和韩国，是中国的国家 I 级重点保护野生动物，在世界自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 物种红色名录中的保护级别被列为濒危级 (BirdLife International 2018)。本研究基于非损伤性取样方法采集东方白鹳新鲜粪便，选择 CTAB 法、

SDS 法、Tiagen 试剂盒法、Qiagen 试剂盒法和 GuSCN 法 5 种 DNA 提取方法, 比较不同水浴(破壁)时间下所提取 DNA 的浓度和纯度, 以期得出提取东方白鹳粪便基因组 DNA 的快速、高效方法, 为后续东方白鹳的性别鉴定和 DNA 条形码鉴定提供基础方法, 同时为东方白鹳的繁育保护工作奠定研究基础。

1 材料与方方法

本实验粪便样品取自天津动物园笼养环境下的东方白鹳, 观察到东方白鹳排便后, 使用一次性无菌棉签, 迅速将粪便收集入灭菌的 EP 管中, 放入冰盒, 及时运输回实验室, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下保存, 以备 DNA 提取使用。

1.1 DNA 提取方法

CTAB 法: 参考 Arseneau 等 (2017) 的研究方法, 设置 4 组不同水浴(破壁)时间 (1 h、2 h、4 h、6 h), 每组称取 400 mg 粪便样品, 加 1 ml CTAB 缓冲液 [2% CTAB, 0.1 mol/L Tris (pH 8.0)、20 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 1.4 mol/L NaCl], 混匀后水浴, 12 000 r/min 离心 2 次取上清, 分别加等体积 Tris-饱和酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 和等体积氯仿异戊醇 (24:1), 离心 5 min 取上清, 加 2.5 倍预冷的无水乙醇, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min, 离心 5 min 去上清, 加 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀 2 次, 离心 3 min 去上清, 室温干燥 15 min, 加 50 μl TE 缓冲液 (Solarbio, 中国), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

SDS 法: 参考 Xia 等 (2019) 的研究方法, 设置 4 组不同水浴(破壁)时间 (1 h、2 h、4 h、6 h), 每组称取 400 mg 粪便样品, 加 500 μl SDS 裂解液 [1% SDS、0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mol/L EDTA (pH 8.0) 和 0.1 mol/L NaCl] 和 500 μl 磷酸钠缓冲液 (0.3 mol/L, pH 8.0) 及 20 μl (20 g/L) 蛋白酶 K (Solarbio, 中国), 混匀后水浴, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 加 0.6 倍量 4 mol/L 醋酸钠 (pH 8.3), 室温放置 5 min, 离心 5 min 取上清, 加 0.8 倍量异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 离心 5 min 去上清,

加 1 ml 70%乙醇, 离心 3 min, 无水乙醇重复操作, 离心 3 min 去上清, 室温干燥 15 min, 加 50 μl TE 缓冲液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

Tiagen 试剂盒 (TIANamp Stool DNA Kit, DP328-02, 中国) 法: 设置 4 组不同水浴(破壁)时间 (0.5 h、1 h、2 h、4 h), 每组称取 400 mg 粪便样品, 按照说明书进行操作, 提取后溶解的体积是 50 μl , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

Qiagen 试剂盒 (QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, 51604, 德国) 法: 设置 4 组不同水浴(破壁)时间 (0.08 h、0.5 h、1 h、3 h), 每组称取 400 mg 粪便样品, 按照说明书进行操作, 提取后溶解的体积是 50 μl , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

GuSCN 法: 参考 Boom 等 (1990) 和 Reed 等 (1997) 的研究方法, 设置 3 组不同水浴(破壁)时间 (0.25 h、1 h、6 h), 每组称取 400 mg 粪便样品, 加 1.5 ml 无菌 PBS 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.4) (Solarbio, 中国), 充分振荡后 3 000 r/min 离心 5 min 取上清, 12 000 r/min 离心 10 min 留沉淀, 加 1 ml 灭菌水悬置, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。加 200 μl PBS 缓冲液和 1 ml 裂解液 [1% SDS、20 mmol/L EDTA (pH 8.0)、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.1 mol/L NaCl], 混合后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器摇动破壁, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 600 μl 转移到离心柱中, 加 800 μl 提取液 [5 mol/L GuSCN、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 6.4)、20 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 1.3% Triton X-100] 培养摇动 10 min, 离心 2 min, 弃废液, 向柱中加 40 μl SiO_2 悬液 (8.3 mol/L) 和 200 μl 8 mol/L KI 溶液, 混匀并静置 20 min, 离心 1 min, 分别加 500 μl 洗涤液 1 [5 mol/L GuSCN、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 6.4), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0)] 和洗涤液 2 [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 75%乙醇] 洗脱 3 次, 每次离心 2 min, 弃废液, 室温下干燥 20 min, 将离心柱置于新的 EP 管中, 滴加 50 μl

TE 缓冲液, 离心 1 min, 收集 DNA 溶液; -20 °C 保存备用。

1.2 DNA 质量分析

分别从以上 5 种方法提取的 DNA 中取 5 μ l 上样在 1% 的琼脂糖凝胶中, 通过电泳结果判断 DNA 完整性。每次取 2 μ l 的 DNA 产物, 用 Nano Drop 2000 分光光度计 (Thermo, 美国) 测定总 DNA 的浓度 (mg/L) 及纯度 A_{260}/A_{280} 值。样品吸光值(A)计算公式为 $A = -\log(I_s/I_b)$, 式中, I_s 表示样品的透过光强度, I_b 表示空白对照的透过光强度。以上 2 种光强度在测定时均由仪器自动检测、记录并保存。 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 时表示 DNA 较纯, 若高于 2.0, 表明产物中 RNA 没有去除干净, 若低于 1.8, 表明产物中含有酚或蛋白质 (Xia et al. 2019)。每份样品重复测定 3 次, 每次 3 个平行样。

1.3 分子鉴定分析

为了验证效果最佳的方法所提取东方白鹳粪便总 DNA 的高效性和完整性, 首先, 使用该方法提取天津动物园的 7 只东方白鹳粪便总 DNA, 所有提取和测定的步骤不变; 然后, 选择线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 控制区基因作为目标片段, 进行 PCR 扩增, 检验所得序列是否属于东方白鹳 mtDNA 控制区序列。应用引物 mtDNA355F 和 mtDNA355R (表 1), 序列目标长度是 383 bp, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。PCR 扩增反应体系为 20 μ l, 模板 DNA 2 μ l, Ex Taq (5 U/ μ l, TaKaRa, 日本) 0.1 μ l, 10 \times Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) (20 mmol/L) 2 μ l, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1.6 μ l, 引物各 0.5 μ l (20 μ mol/L), ddH₂O 13.3 μ l。反应条件, 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。

为了进一步检验所提取东方白鹳粪便总 DNA 的扩增效果, 选择同一只个体的粪便 DNA 作为模板, 进行 100~200~300~383 bp 的长度梯度扩增。使用的引物分别是 100 bp-F 和 100 bp-R、200 bp-F 和 200 bp-R、300 bp-F

和 300 bp-R、383 bp-F 和 383 bp-R (表 1), 引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。以上 PCR 扩增反应体系和条件均与引物 mtDNA355F/R 操作一致。

表 1 实验中使用的引物

Table 1 Primers used in the experiments

引物名称 Primer code	引物序列 (5'-3') Primer sequence
mtDNA355F	GGATAGGCTCTGTAATGGTAGGTGG
mtDNA355R	TAGGGTGTAGGGGGAAAGAATGAT
100 bp-F	AGGGATGTAATGGCTGTAGGGTTAGG
100 bp-R	CGTATCCGTACCCTCAGTACTATCTCC
200 bp-F	GGAGTAGGGATGTAATGGCTGTAGG
200 bp-R	ACTCCGATTAATAGATAACCTGGTCCCTTCAG
300 bp-F	ACAGTTAGGGGATGGCTAAGGGT
300 bp-R	ACACCGGGTTGCTGATTTTAC
383 bp-F	GGATAGGCTCTGTAATGGTAGGTGGA
383 bp-R	AGGGTGTAGGGGGAAAGAATGATCC

PCR 产物经 1% 凝胶电泳检测, 测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。序列经 BLAST 比对, 并从 GenBank 中下载鹳科的东方白鹳、白鹳 (*C. ciconia*) 和黑鹳 (*C. anigra*), 鹤科的白头鹤 (*Grus monacha*) 和丹顶鹤 (*G. japonensis*) 以及鸮科的白琵鹭 (*Platalea leucorodia*) 和朱鹮 (*Nipponia nippon*) 共 7 个物种的 mtDNA 控制区序列, 用于构建系统进化树, 验证所测序列是否属于东方白鹳, 分析其与其他鸟类的进化关系远近。将所得样本的序列分别用 DNAMAN 6.0 和 MEGA 7.0 软件进行多序列比对分析和人工校正。利用 MEGA 7.0 软件, 选择邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统进化树, 使用 Bootstrap 进行检验, 重复数是 1 000。使用 Clustal X 软件对各物种的 mtDNA 序列进行相似性比对分析。

2 结果

2.1 5 种方法提取东方白鹳粪便 DNA 的比较

CTAB 法提取的 DNA 浓度值区间范围为 18.29~28.95 mg/L。不同水浴 (破壁) 时间提

取的 DNA 纯度 (A_{260}/A_{280} 值) 均低于 1.8, 最优水浴 (破壁) 时间为 1 h, 其 DNA 浓度最高, 随后依次是水浴 2 h、4 h、6 h (表 2)。

SDS 法提取的 DNA 浓度值区间范围为 13.74 ~ 16.89 mg/L。不同水浴时间 (破壁) 提取的 DNA, 1 h 时 DNA 浓度最高, 随后从高到低依次是 6 h、4 h、2 h (表 2)。在水浴 (破壁) 4 h 条件下, 虽然 DNA 浓度较低, 但纯度 (A_{260}/A_{280} 值) 最纯, 是 SDS 法的最优水浴 (破壁) 时间。

Tiagen 试剂盒法提取 DNA 浓度值区间范围为 20.18 ~ 78.92 mg/L。不同水浴 (破壁) 时间提取的 DNA, 4 h 时虽 DNA 浓度最高, 但 A_{260}/A_{280} 值较低, 而水浴 (破壁) 0.5 h 时 A_{260}/A_{280} 值最接近 1.8, 且 DNA 浓度是 27.01 mg/L, 后者是该方法的最优水浴 (破壁) 时间 (表 2)。

Qiagen 试剂盒法提取的 DNA 浓度值区间范围为 18.12 ~ 57.06 mg/L。不同水浴 (破壁) 时间提取 DNA, 1 h 时 DNA 浓度最高, 但其 A_{260}/A_{280} 值最低, 而在水浴 (破壁) 0.5 h 时, A_{260}/A_{280} 值达 1.83, 所得 DNA 较纯, 因此水浴 (破壁) 0.5 h 是最优水浴 (破壁) 时间 (表 2)。

GuSCN 法提取的 DNA 浓度值区间范围为 49.44 ~ 115.01 mg/L。不同水浴 (破壁) 时间提取的 DNA, 最优水浴 (破壁) 时间是 1 h (表 2), 此时的 DNA 浓度和纯度 (A_{260}/A_{280} 值) 达到最高, 其次是 6 h, 最后是 0.25 h。

5 种方法提取的粪便总 DNA, 凝胶电泳检测结果中均未出现明显的 DNA 条带 (图 1)。CTAB 法水浴 (破壁) 6 h 时提取的 DNA 电泳条带出现少量弥散现象, 碎片化较严重, 其余泳道均未出现条带 (图 1a)。其他 4 种方法提取的 DNA 电泳图均未出现明显的、具有一定大小的条带, 粪便总 DNA 发生了严重降解, DNA 完整性较差 (图 1b ~ e)。

在 DNA 提取效率方面, 2 种试剂盒法在不同的水浴 (破壁) 时间下提取的粪便总 DNA 并没有表现出明显的优势, 且考虑到商业化试剂盒价格高昂, 所以 Tiagen 试剂盒法和 Qiagen

表 2 5 种方法所得基因组 DNA 的浓度 (mg/L) 和纯度 (A_{260}/A_{280})

Table 2 Concentration (mg/L) and purity (A_{260}/A_{280}) of genomic DNA obtained by five methods

方法 Methods	水浴 (破壁) 时 间 Water bath (wall breaking) time (h)	DNA 浓度 (mg/L) DNA concentration	A_{260}/A_{280} 值 A_{260}/A_{280} value
CTAB	1	28.95 ± 0.95	1.32 ± 0.03
	2	23.85 ± 4.45	1.30 ± 0.02
	4	19.29 ± 2.53	1.29 ± 0.01
SDS	6	18.29 ± 0.78	1.52 ± 0.02
	1	16.89 ± 3.14	1.53 ± 0.17
	2	13.74 ± 1.92	1.36 ± 0.05
	4	14.27 ± 3.42	1.92 ± 0.05
Tiagen	6	15.72 ± 2.35	0.88 ± 0.11
	0.5	27.01 ± 5.57	1.68 ± 0.01
	1	22.59 ± 0.89	1.61 ± 0.17
Qiagen	2	20.18 ± 1.67	0.96 ± 0.02
	4	78.92 ± 2.07	1.44 ± 0.01
	0.08	18.12 ± 1.01	1.61 ± 0.01
	0.5	21.36 ± 0.39	1.83 ± 0.18
GuSCN	1	57.06 ± 5.58	1.50 ± 0.08
	3	28.49 ± 3.98	1.59 ± 0.09
	0.25	49.44 ± 2.06	1.27 ± 0.01
	1	115.01 ± 3.99	1.82 ± 0.19
	6	101.66 ± 2.26	1.81 ± 0.01

试剂盒法不是提取东方白鹳粪便基因组 DNA 的最佳方法。比较 3 种实验成本较低的试剂方法提取的 DNA 浓度和纯度, GuSCN 法提取的 DNA 浓度显著高于另外 2 种方法且纯度较纯。CTAB 和 SDS 方法提取的粪便总 DNA 浓度较低, 同时 2 种方法受水浴 (破壁) 时间的影响较小。因此综合 DNA 的提取效率, 初步认为 GuSCN 法得率较高, 比较适于研究使用。

2.2 利用 GuSCN 法提取 7 只东方白鹳的 DNA

为了进一步验证 GuSCN 法提取东方白鹳粪便总 DNA 的效率, 取 7 只东方白鹳 (WFT-1 至 WFT-7) 粪便提取总 DNA (表 3)。

所提取的 7 只东方白鹳的粪便 DNA 浓度都超过了 90 mg/L, 而且 DNA 的纯度 (A_{260}/A_{280}

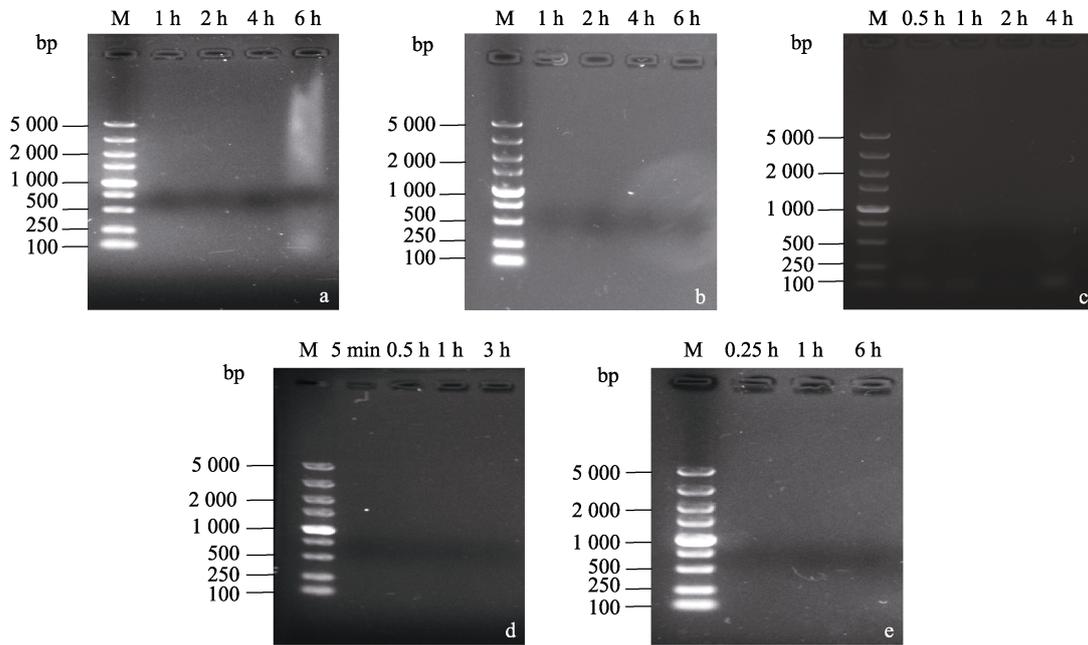


图 1 利用 5 种方法所提取基因组 DNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic results of genomic DNA amplified by five extraction methods

a. 不同水浴(破壁)时间 CTAB 法提取总 DNA 电泳图; b. 不同水浴(破壁)时间 SDS 法提取总 DNA 电泳图; c. 不同水浴(破壁)时间 Tiangen 试剂盒法提取总 DNA 电泳图; d. 不同水浴(破壁)时间 Qiagen 试剂盒法提取总 DNA 电泳图; e. 不同水浴(破壁)时间 GuSCN 法提取总 DNA 电泳图。

a. Total DNA electrophoresis was extracted by CTAB method with different water bath (wall breaking) time; b. Total DNA electrophoresis was extracted by SDS method with different water bath (wall breaking) time; c. Total DNA electrophoresis was extracted by Tiangen kit method with different water bath (wall breaking) time; d. Total DNA electrophoresis was extracted by Qiagen kit method with different water bath (wall breaking) time; e. Total DNA electrophoresis was extracted by GuSCN method with different water bath (wall breaking) time.

表 3 GuSCN 法提取粪便基因组 DNA 的浓度和 A_{260}/A_{280}

Table 3 DNA concentration and A_{260}/A_{280} of fecal genome extracted by GuSCN method

东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	DNA 浓度 (mg/L) DNA concentration	A_{260}/A_{280} 值 A_{260}/A_{280} value
WFT-1	118.12 ± 4.59	1.87 ± 0.06
WFT-2	91.83 ± 4.84	2.01 ± 0.05
WFT-3	110.96 ± 6.35	1.90 ± 0.05
WFT-4	91.11 ± 5.50	1.98 ± 0.09
WFT-5	122.18 ± 7.05	1.99 ± 0.14
WFT-6	160.52 ± 5.58	1.88 ± 0.06
WFT-7	146.95 ± 11.15	2.10 ± 0.17

值)较高(1.8 左右)。即利用 GuSCN 法成功从 7 只东方白鹳的粪便中提取了基因组 DNA, 且其浓度和纯度符合一般分子研究的基本要求, 也符合建库研究的质量要求。

2.3 利用 PCR 进行东方白鹳的分子鉴定

PCR 产物的凝胶电泳检测结果显示, 从 7 只东方白鹳(WFT-1 至 WFT-7)粪便中提取的 DNA 扩增 mtDNA 控制区序列均大约在 300 ~ 500 bp 处(图 2a), 经测序后得到 383 bp 的序列, BLAST 比对证实了 7 条序列均属于东方白鹳 mtDNA 控制区。100 ~ 200 ~ 300 ~ 383 bp 的长度梯度扩增, 除 100 bp 处未见条带, 其余 3 个泳道均有明显的条带(图 2b)。GuSCN 法提

取的东方白鹤粪便总 DNA 的完整性较好, 能够进行物种鉴定。

通过 DNAMAN 6.0 软件, 将测得的 7 只东方白鹤的 mtDNA 控制区序列进行比对, 发现这些个体的序列一致性达 96.78%, 从中选择一只个体 WFT 与在 GenBank 中下载的 7 个物种的 mtDNA 控制区序列构建系统进化树。WFT

与东方白鹤聚在一起, 确定其是东方白鹤, 且与白鹤的亲缘关系相较黑鹤更近。相比鸛科, 鹤科与鹤科的亲缘关系更近 (图 3)。使用 Clustal X 软件对本研究样本 WFT 与以上同科的物种进行序列比对分析后的结果再次证明, GuSCN 法提取东方白鹤粪便总 DNA 能够进行物种特异性鉴定 (图 4)。

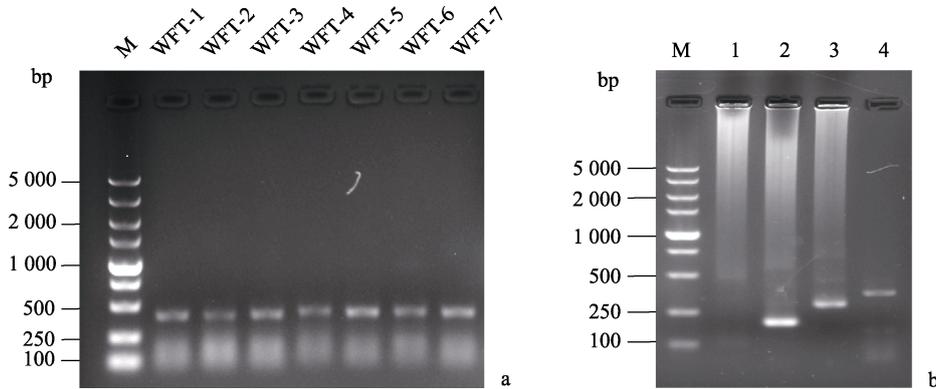


图 2 利用 GuSCN 法提取的 DNA 进行 PCR 扩增的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis diagram of PCR amplification of DNA extracted by GuSCN method

a. M 表示 Marker, WFT-1 至 WFT-7 表示 7 只东方白鹤 mtDNA 控制区序列的扩增条带; b. M 表示 Marker, 1 至 4 泳道分别代表扩增的目的片段长度为 100 bp、200 bp、300 bp、383 bp。

a. M represents marker, and WFT-1 to WFT-7 represent the amplified bands of mtDNA D-loop region sequence of 7 Oriental White Storks; b. M represents marker, lanes 1 to 4 represent the amplified target fragments with lengths of 100 bp, 200 bp, 300 bp and 383 bp respectively.

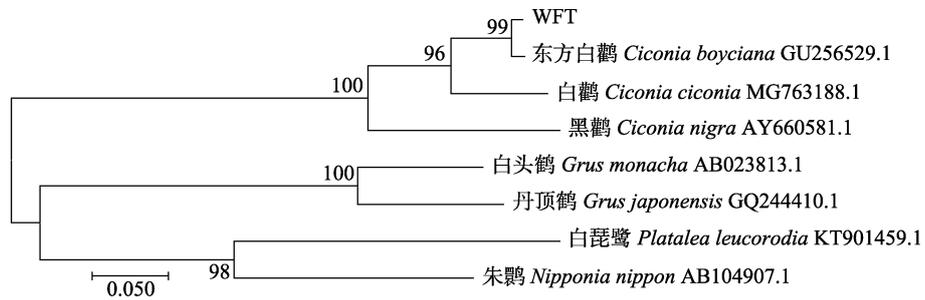


图 3 基于 mtDNA 控制区 383 bp 序列使用邻接法构建的东方白鹤与鸛科、鹤科和鸛科部分物种的系统进化树

Fig. 3 Based on the 383 bp sequence of mtDNA D-loop, the phylogenetic tree of both the Oriental White Stork and some species of Ciconiidae, Gruidae, and Threskiorothidae was constructed by neighbor joining

WFT 表示本研究物种。WFT represents our study species.

WFT	TAGGCTCTGT AATGGTAGGT GGATAGTACA GTTAGGGGAT GGCTAAGGTT ATAGCCTGTA
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	TAGGCTCTGT AATGGTAGGT GGATAGTACA GTTAGGGGAT GGCTAAGGTT ATAGCCTGTA
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	TAGGATCTGT AATGGTAGGT GGATAATACA CCTAGGGGAG GACTGGAGAT ATAATGTGTA
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	TAGTA-CTGT AATGATATAG GCCTAG-AGA TCTAGGGGAT GGTTAGAGTC ATTTTCTTGA
Clustal Consensus	*** **** ***** ** * ** * * ***** * * * ** * *
WFT	GTAGTAGGGT ATTGGATCTT TCAA-GGTCG GGCTCTCCAA AGGAGTAGGG ATGTAATGGC
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	GTAGTAGGGT ATTGGACCTT TCAG-GGTCG GGCTCTCCAA AGGAGTAGGG ATGTAATGGC
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	GTAGTAGGGT ACTGAGCCTC TTAG-GATCA GGCTCTCCAA GGGGATAGGG ATGCTATGGT
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	GGGAGAGGGT ATTTAAAGTC TTGGTAAGCG GTTATCCAN AGGATTGGGA ATGTCATGAG
Clustal Consensus	* ***** *
WFT	TGTAGGGTTA GGTACTAAGT AACTAGGGCT AAACCCATTC TATGGTTTGG GTCTGTACAG
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	TGTAGGGTTA GGTACTAAGT AACTAGGGCT AAACCCATTC TATGGTTTGG GTCTGTACAG
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	TGAAGGGTTA AGTACTAAGT AACTAGGACT AGGCCCATTC TATGGTTTGG GTCTGTACAG
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	-GAGGGGATA GG-GCTGAAA GGTAGGACT AAACCCATGA TA-GGCTTGG GTCTGTACAG
Clustal Consensus	* *** *
WFT	GAGATAGTAC TGAGGGTACG GATACGCTTG GGGG-TTAGA TCTGAATGGT AGCTGGCCAT
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	GAGATAGTAC TGAGGGTACG GATACGCTTG GGGG-TTAGG TCTGAATGGT AGCTGGCCAT
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	GAAGTAGTAG AGAGGGTACG GATACGCTTG GGGG-TAAGA TCTGAATGGT AGCTGGCCAT
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	AAGTTGTTAG TAAGA-TACG GCTATTCTTG GGGGGTAGAA TTTGAATGGT AGCTGGATAT
Clustal Consensus	* *
WFT	GGTATCTCAG TTCCTGCTCG GCGGGCCGGT AGCTGAAGGA CCAGGTATC TATTAATCGG
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	GGTATCTCAG TTCCTGCTCG ACGGGCCGGT AGCTGAAGGA CCAGGTATC TATTAATCGG
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	GGTATCTCAG TTCCTGCTCG GCGGGCCGGT AGCTGAAGGA CCAGGTATC TATTAATCGG
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	GAAATCTCAN TTCCTGCTCG TAGGGCCGGN AGCTGACNGA CCAGGTATC TATTAATCGG
Clustal Consensus	* ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *****
WFT	AGTTCTCACG TGAAATCAGC AACCCGGTGT CTGGAAGATC CGGTGTGACT AGCGTCAGGA
东方白鹳 <i>Ciconia boyciana</i>	AGTTCTCACG TGAAATCAGC AACCCGGTGT CTGG----- -----
白鹳 <i>Ciconia ciconia</i>	AGTTCTCACG TGAAATCAGC AACCCGGTGT CTGTAAGATC CGGTGTGACT AGCGTCAGGA
黑鹳 <i>Ciconia nigra</i>	AGTTCTCACG TGAAATCAGC AACCCGGTGT CTGGAAGATC CGATGTGACT AGCGTCAGGA
Clustal Consensus	***** ***** ***** ***** **

图 4 东方白鹳与同科物种 mtDNA 控制区序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of mtDNA D-loop between the Oriental White Stork and species of the same family

WFT 为本研究物种；* 为保守位点，- 表示序列空缺。

WFT is the research species. "*" means the similar site, "-" indicates a sequence vacancy.

3 讨论

与哺乳动物粪样相比较，水鸟粪样相对较稀，其遗传信息提取难度相对较高（代艳丽等 2011）。Eriksson 等（2017）以巴布亚企鹅（*Pygoscelis papua*）、阿德利企鹅（*P. adeliae*）和帽带企鹅（*P. antarctica*）为研究对象，比较了 6 种商业试剂盒提取的 DNA 产量，除了 Qiagen 病原体提取试剂盒（QIAamp cadof Pathogen kit），其余试剂盒均无法从粪便中提

取到足量的 DNA。本研究在应用 5 种方法提取东方白鹳的粪便总 DNA 过程中，存在酚类物质或者蛋白质去除不彻底现象，所提取获得的 DNA 普遍纯度偏低，且电泳图均未检出明显的 DNA 条带，这可能与样品本身所含基因量少或核酸降解有关。

CTAB 法广泛应用于植物 DNA 的提取和动物粪便的 DNA 提取（Minas et al. 2011, Arseneau et al. 2017, Aboul-Maaty et al. 2019）。但 CTAB 试剂具有黏性，可能在沉淀 DNA 的

时候形成复合物, 从而影响 DNA 的质量 (杨重晖等 2020)。SDS 法的提取效率可能与裂解液的成分和用于分离或沉淀 DNA 的有机溶剂有关 (Xia et al. 2019)。这两种方法因具有成本较低、试剂组分构成简单的优势被广泛使用, 缺点是操作步骤繁琐、时间耗费较大 (余巨全等 2020)。本研究从不同水浴 (破壁) 时间条件下 DNA 浓度和纯度角度分析认为, CTAB 和 SDS 法难以获得较高质量的东方白鹳粪便 DNA, 此结果与部分相关研究的结果保持一致, 例如李龙显等 (2018) 研究发现 CTAB 法和 SDS 法均不是提取华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*) 粪便总 DNA 的最佳方法。由于存在物种差异及粪便特征差异, 也有一些相关研究与本研究结果不一致, 例如郭政宏等 (2016) 使用 SDS 法提取藏山羊粪便总 DNA 的效率较高。

与传统的试剂方法相比, 商业化试剂盒优点是操作简便、时间消耗少, 而其缺点是成本相对较高 (吴敏娜等 2015)。王浩伊等 (2020) 研究发现, 在提取鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 肠道总 DNA 方面, Qiagen 试剂盒法的提取效果要优于氧化锆珠破壁法。李霞等 (2015) 研究发现, 在提取山羊 (*Capra hircus*) 粪便总 DNA 时, Tiangen 试剂盒法的提取效果优于 CTAB 法。本研究使用的 Tiangen 试剂盒法和 Qiagen 试剂盒法与 CTAB 和 SDS 法相比较, A_{260}/A_{280} 值有所增加, 说明试剂盒去除蛋白质或酚类物质的能力比传统方法更有效, 但由于成本昂贵且 DNA 提取效率相对较低, 这两种方法不是提取东方白鹳粪便基因组 DNA 的最佳方法。

GuSCN 法中用到的有机溶剂较少, 其中硫氰酸胍是一种强蛋白变性剂, 能使各种核酸酶失活, 二氧化硅可强有力地吸附 DNA, 进一步提高 DNA 产量 (赵健元等 2008, Hosomi et al. 2017, 程浩等 2020)。本研究发现, GuSCN 法提取东方白鹳粪便总 DNA 效果相对最为理想, 其 DNA 浓度、纯度和完整性均优于其他方法, 这与其他相关研究结果一致, 例如代艳丽等 (2011) 和张漫慧等 (2020) 先后应用相同方

法在白头鹤和朱鹳粪便中成功提取到了总 DNA。

综上所述, 本研究发现 GuSCN 法是东方白鹳粪便总 DNA 提取方法中相对最为简便、高效、可靠且成本较低的提取方法, 同时本研究为利用东方白鹳粪便进行性别鉴定提供方法基础。考虑到本次实验中水浴 (破壁) 时间梯度较大, 一定程度可能影响实验结果的准确性, 建议今后相关研究通过增加多个时间梯度, 比较粪便总 DNA 质量, 进一步比较分析最佳提取条件。

参 考 文 献

- Aboul-Maaty N A F, Oraby H A S. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1): 25.
- Arseneau J R, Steeves R, Laflamme M. 2017. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Molecular Ecology Resources*, 17(4): 686–693.
- BirdLife International. 2018. *Ciconia boyciana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22697695A131942061. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22697695A131942061.en>. Downloaded on 01 August 2021.
- Boom R, Sol C J, Salimans M M, et al. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3): 495–503.
- Broquet T, Berset-Braendli L, Emaresi G, et al. 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8(2): 509–511.
- Eriksson P, Mourkas E, González-Acuna D, et al. 2017. Evaluation and optimization of microbial DNA extraction from fecal samples of wild Antarctic bird species. *Infection Ecology and Epidemiology*, 7(1): 1386536.
- Fasoli S, Ferlizza E, Andreani G, et al. 2020. Noninvasive sampling method for urinalysis and urine protein profile in captive giraffes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(1): 25–34.
- Han Z R, Sun J F, Lv A J, et al. 2018. A modified method for genomic DNA extraction from the fish intestinal microflora. *AMB Express*,

- 8(1): 52.
- Hosomi K, Ohno H, Murakami H, et al. 2017. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Scientific Reports*, 7(1): 4339.
- Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetics*, 4(6): 789–792.
- Liberg O, Andrén H, Pedersen H C, et al. 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf *Canis lupus* population. *Biology Letters*, 1(1): 17–20.
- Minas K, McEwan N R, Newbold C J, et al. 2011. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 325(2): 162–169.
- Quinn C B, Alden P B, Sacks B N. 2019. Noninvasive sampling reveals short-term genetic rescue in an insular red fox population. *Journal of Heredity*, 110(5): 559–576.
- Reed J Z, Tollit D J, Thompson P M, et al. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology*, 6(3): 225–234.
- Romolo C, Elena F, Marco G, et al. 2014. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of Mammalogy*, 95(1): 41–59.
- Russello M A, Waterhouse M D, Etter P D, et al. 2015. From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. *PeerJ*, 3: e1106.
- Storer C, Daniels J, Xiao L, et al. 2019. Using noninvasive genetic sampling to survey rare butterfly populations. *Insects*, 10(10): 311.
- Tang J N, Zeng Z G, Wang H N, et al. 2008. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 75(3): 432–436.
- Tsai W L E, Schedl M E, Maley J M, et al. 2019. More than skin and bones: comparing extraction methods and alternative sources of DNA from avian museum specimens. *Molecular Ecology Resources*, 20(5): 1220–1227.
- Xia Y M, Chen F S, Du Y, et al. 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience Reports*, 39(2): BSR20182271.
- 程浩, 查勇, 高丹丹, 等. 2020. 不同动物肌肉组织中 DNA 提取方法研究. *西北民族大学学报: 自然科学版*, 41(2): 73–79.
- 代艳丽, 周立志. 2011. 一种改进的方法提取白头鹤粪便 DNA. *野生动物*, 32(4): 203–207, 223.
- 郭政宏, 舒邦杰, 严亨秀. 2016. 藏山羊粪便总 DNA 不同提取方法的比较. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(7): 93–96.
- 李静宇, 张启信, 黄明竟, 等. 2021. 短尾猴粪便雌二醇和孕酮处理与提取方法比较. *动物学杂志*, 56(2): 247–254.
- 李龙显, 陈茂金, 林敏, 等. 2018. 圈养华南虎粪便细菌总 DNA 提取方法比较. *江西畜牧兽医杂志*, 2018(4): 21–24.
- 李霞, 陈新诺, 王蕾, 等. 2015. 山羊粪便总 DNA 提取方法的比较. *四川畜牧兽医*, 42(1): 38–40.
- 王浩伊, 江博赉, 孙敬锋, 等. 2020. 不同 DNA 提取方法引起鲤鱼肠道菌群多样性分析结果的偏差. *基因组学与应用生物学*, 39(8): 3461–3467.
- 吴敏娜, 武亚琦, 屈艳, 等. 2015. 四种小鼠肠道微生物 DNA 提取方法比较. *生态学杂志*, 34(4): 1183–1188.
- 杨重晖, 赵大庆, 宋文博, 等. 2020. 鹿茸基因组 DNA 提取方法的比较研究. *中国农学通报*, 36(11): 26–32.
- 余巨全, 巩建华, 柯尊伟. 2020. 对中国黄牛毛囊 DNA 六种提取方法的研究. *基因组学与应用生物学*, 39(4): 1540–1548.
- 张漫慧, 赵泓淙, 王彩霞, 等. 2020. 应用于 PCR 性别鉴定的朱鹮粪便基因组提取方法的建立. *湖北畜牧兽医*, 41(8): 5–7, 14.
- 赵健元, 李进华. 2008. 一种高效的哺乳动物粪便 DNA 提取通用方法. *激光生物学报*, (5): 695–700, 646.