

# 从粪便样品中提取高纯度的DNA

## 简介

随着分子生物学的发展，粪便——一种新的非损伤性的样品来源被广泛的运用于动物分子遗传学、种群生态学、行为生态学和一些肠道疾病诊断的研究中。粪便样品含有许多有意思的遗传样品，包括有肠道微生物 DNA，食品残留样品 DNA，以及消化道脱落细胞 DNA。粪便于于分子生物学的研究，遇到的首要问题是粪便中消化道脱落细胞含量少且遗传物质发生一定程度的降解；在以 PCR 为基础的分子粪便学研究中，另一个关键性问题是粪便中存在大量的抑制剂会影响 Taq 酶的活性，导致下游的检测失活。这些抑制包括有多聚糖、植物多糖、胆酸、胆盐、胆色素、消化液、粘液等。因此选择合适的提取方法以得到优质的 DNA 是粪便 DNA 成功进行下游检测的关键。目前，实验室使用的预处理-酚/氯仿抽提法、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)裂解法、异硫氰酸胍裂解法等在不同物种中的应用缺乏通用性，且提取的 DNA 用于 PCR 扩增的成功率也很低。Magen 公司提供的 HiPure Stool DNA Kit 为粪便样品开辟了一条通用性好、性价比高、得率和纯化高的 DNA 提取新途径。试剂盒采用独特的溶液体系和抑制因子吸附剂(HTR Reagent)，可高效地去除粪便样品中的各种杂质，纯化的 DNA 可直接用于 PCR，定量 PCR 等应用。

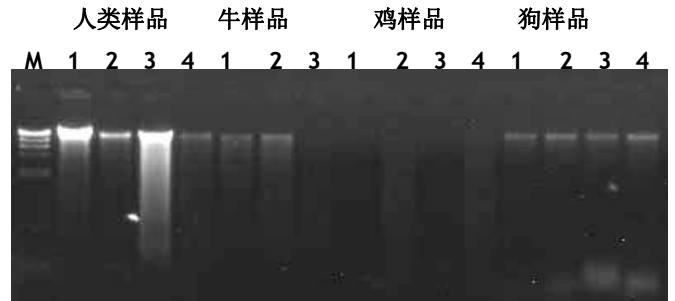
## 1. DNA 的产量和纯度

用健康人的粪便样品(4份)，牛粪便(3份)，鸡粪便(4份)，狗粪便(4份)，按 HiPure Stool DNA Kit 进行抽提。得到的 DNA 于 NanoDraw 2000 测量 OD260, OD280, OD230, 列表如下。测量结果表明，得到的 DNA，OD260/OD280 约为 1.7-1.9 之间，OD260/OD230 约 1.8-2.2 之间，OD320 读数很低，均表明纯化得到的 DNA 纯度高。

样品	OD260	OD280	OD230	纯度	产量(ug)
人1	1.7970	0.9800	1.4150	1.83	8.98
人2	0.5650	0.3540	0.9741	1.6	2.83
人3	2.9330	1.5860	1.6571	1.85	14.66
人4	0.4130	0.2520	0.6164	1.64	2.07
牛1	0.3420	0.2320	0.6980	1.47	1.71
牛2	0.5920	0.3660	1.1170	1.62	2.96
牛3	0.1800	0.0990	0.3913	1.82	0.9
鸡1	0.1420	0.0830	0.1919	1.7	0.71
鸡2	0.7500	0.4010	0.4870	1.87	3.75
鸡3	0.2470	0.1370	0.2714	1.8	1.24
鸡4	0.8320	0.4280	0.5073	1.95	4.16
狗1	1.1810	0.5790	0.6906	2.04	5.9
狗2	1.1510	0.5610	0.7061	2.05	5.76
狗3	1.4500	0.7020	0.8101	2.07	7.25
狗4	1.3400	0.6460	0.7053	2.08	6.7

## 2. 电泳分析基因组 DNA

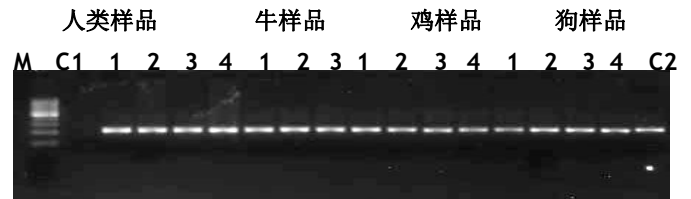
取 10ul 纯化的 DNA 点样于 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析结果。由图可以看出，使用该试剂盒可以取得比较完整的基因组 DNA。鸡粪便产量很低，有可能是因为取样时，样品已经贮存较长时间所致。



## 3. PCR 检测

### 3.1 细菌的检测

取 5ul 纯化的 DNA 为 PCR 模板，以细菌 16S 的通用引物(Wu et al, 2002), U1: 5'-TGAAATTGTTGAAAGGGAA-3' and U2: 5'-GACTCCTTGGTCCGTGTT-3', 35 循环扩增 200bp 的片段。取 3ul PCR 产物电泳结果。结果表明，使用该试剂盒纯化得到的 DNA 都可以直接用于细菌 DNA 的检测。

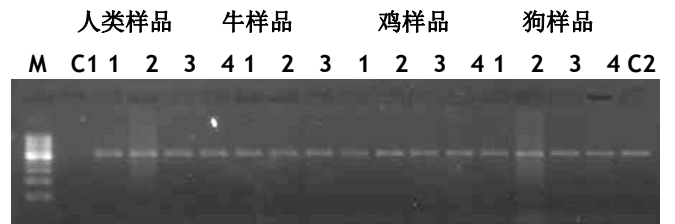


M: 100bp DNA Marker

C1: 阴性对照

C2: 阳性对照

**3.2 外加人类基因组 (20ng) 检测:** 取 5ul 纯化的 DNA，并加入 20ng 人类基因组 DNA 为 PCR 模板，以人类引物，35 循环扩增 200bp 的片段。取 3ul PCR 产物电泳结果。结果表明，在人类基因组 DNA 非常微量的情况下(20ng)，第一轮 PCR 就可以得到清楚的 PCR 扩增带，表明抑制因子去除的效果理想。



M: 100bp DNA Marker

C1: 阴性对照

C2: 阳性对照

## 相关问答

### 1、粪便样品提取的 DNA 都是动物本身的 DNA 吗？

答：粪便样品中仅含有一小部分脱落的消化道细胞，消化脱落细胞的基因组 DNA，约占总 DNA 的 0.01%。大部分 DNA 为细菌 DNA 和食物源 DNA。

### 2、如何保存粪便样品，可尽量避免遗传物质的降解？

答：目前较好的保存方法是粪便与干燥硅豆混合保存，或是在 DMSO / EDTA / Tris 盐溶液中保存，可以有效减缓 DNA 的降解。

### 3、粪便样品的 DNA 的产量如何？

答：粪便样品中大部分的 DNA 来自于细菌和食物。粪便中细菌的含量差别很大，因此，粪便 DNA 的含量差别非常大，一般为 200ng-20ug 不等。

### 4、粪便样品中存在的 PCR 等抑制因子有何组分？

答：粪便样品中含有多种微生物，其多聚糖、植物多糖、胆酸、胆盐、胆色素、消化液、粘液等均会对 Taq 酶等的活性产生影响，而影响到粪便 DNA 的下游检测。

### 5、如何减少粪便样品的污染？

答：由于粪便会不同程度的暴露在环境中，因而易于受到外源遗传物质的污染，在粪便 DNA 的提取以及 PCR 扩增过程中，污染已经成为影响研究结果的重要因素。因而在 DNA 提取及 PCR 扩增过程中，所有步骤进行空白对照实验是必要的，另外，在粪便样品收集、保存以及提取过程中，采用严格的消毒措施也可以有效减少污染的机会。

### 6、粪便 DNA 下游 PCR 检测无法扩增出特异性片段是否均为抑制剂的影响？

答：由于粪便样品中含有大量的 PCR 等抑制因子，如果纯化过程没有将其去除掉，会影响到特异性片段的扩增。但是模板添加量也是个关键性问题，虽说 PCR 检测对其模板是非常灵敏的，但也是有其正常的检测域，一般要在 100ng 以上，而粪便样品含有的核 DNA 非常少，在纯化过程中产量不高的话，会由于模板添加量在其正常检测域之外而导致无法扩增出特异性片段。

### 7、本试剂盒适用范围如何？

答：本试剂盒的通用性很好，可用于不同食性的动物粪便 DNA 的提取。该试剂盒已经测试过人类粪便，猪粪便，狗粪便，鸡粪便，牛粪便，马粪便等。

### 8. 用于细菌 DNA 检测和宿主 DNA 检测时，为什么提取流程不一样？

答：由于细菌带来细胞壁，裂解时给比较难，裂解时于 70°C 水浴 10 分钟，有利于细菌 DNA 的释放。检测某些革兰氏阳性细菌时，水浴温度需要提升至 95°C。由于粪便样品中绝大部分是细菌 DNA，若提取的 DNA 是用于宿主的 DNA 检测时，减少细菌 DNA 污染有利提高检测信号。裂解时去除加热过程有利于减少细菌 DNA 污染。

### 9. PCR 检测结果都为阴性，怎么办？

答：由于粪便样品富含抑制因子，某些抑制因子可能去除不够彻底而抑制 PCR。建议在 PCR 反应液中加入终浓度为 0.1ug/ul BSA，以提高 PCR 的灵敏度。