

幼龄反刍动物粪便 DNA 提取及注意事项

DNA Extraction from the Faeces of Young Ruminants

王佳堃*, 杨斌, 陈宏伟

奶业科学研究所, 动物科学学院, 浙江大学, 杭州, 浙江

*通讯作者邮箱: jiakunwang@zju.edu.cn

摘要: 幼龄反刍动物的粪便粘度大, 蛋白质含量高, 采用普通粪便或消化道内容物 DNA 的提取方法难以获得高质量、高纯度的 DNA。本实验方法基于机械破碎裂解细胞, 再通过酚氯仿溶液反复抽提样本中的核酸, 采用 RNase A 溶液消化样本中的 RNA, 进一步利用商品化的吸附柱纯化核酸样品, 从而得到高纯度的 DNA。该方法提取的幼龄反刍动物粪便 DNA 能够满足微生物多样性分析等测定要求。

关键词: 幼龄反刍动物, 粪便, DNA, 提取

背景

幼龄反刍动物的胎粪水分含量低, 粘稠度高, 不利于 DNA 的提取。动物出生后数天内, 体内的胎粪尚未完全排出, 胎粪与消化后的奶进一步混合, 使得粪便的成分更加复杂, 从而加大了后续 DNA 提取的难度。采用普通粪便或消化道内容物 DNA 的提取方法难以获得高质量、高纯度的粪便 DNA 样品, 无法满足后续微生物多样性等分析的要求。为此, 本文提供一种幼龄反刍动物粪便 DNA 的提取方法, 旨在为幼龄反刍动物粪便微生物等后续分析提供便利。

材料与试剂

1. 无菌枪头
2. 2 ml 研磨管 (研磨仪配套或其他适配研磨仪离心管均可)
3. 1.5 ml、2 ml 离心管 (浙江同力信息科技有限公司, catalog number: 68800012)
4. 0.1 mm、0.5 mm 和 2 mm 氧化锆球磨珠
5. Tris 饱和酚溶液 (生工生物工程股份有限公司, catalog number: A504193)
6. 氯仿-异戊醇, 24:1 (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 25668)
7. 酚氯仿, 25:24:1 (Merck, Sigma-Aldrich, catalog number: 77617)

8. RNase A, 10 mg/ml (生工生物工程股份有限公司, catalog number: B500474)
9. 乙醇 95% (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 10009128)
10. 乙醇 70%
11. 核酸纯化吸附柱 (生工生物工程股份有限公司, catalog number: B615005)
12. 灭菌超纯水
13. Tris (生工生物工程股份有限公司, catalog number: A100826)
14. 乙二胺四乙酸二钠盐二水 (EDTA, 生工生物工程股份有限公司, catalog number: A500838)
15. NaAc·3H₂O (生工生物工程股份有限公司, catalog number: A610481)
16. 冰醋酸 (生工生物工程股份有限公司, catalog number: A501931)
17. 3 M 醋酸钠, pH 5.2 (见溶液配方)
18. TE 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 研磨仪 (上海净信实业发展有限公司, catalog number: JXFSTPRP-24)
2. 离心机 (赛默飞世尔科技有限公司, catalog number: SL40)
3. 超净台 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司, catalog number: VS-840-1)
4. 涡旋仪 (大龙兴创实验仪器股份公司, catalog number: MX-S)
5. -20 °C 冰箱

实验步骤

1. 称取约 0.2 g 粪便样品至 2 ml 研磨管, 加入 1 ml TE 缓冲液, 0.1 mm 和 0.5 mm 氧化锆球磨珠各 0.15 g, 2 mm 氧化锆球磨珠 2 颗。
2. 向研磨管中继续加入 200 µl 饱和酚溶液, 使用研磨仪物理破碎, 65 Hz 运行 30 s, 停顿 10 s, 重复三次。
3. 加入 200 µl 氯仿-异戊醇, 在涡旋仪上充分震荡混匀, 4 °C、18,500 × g 离心 15~30 min。
4. 吸取上清液至新的 2 ml 离心管, 加入 450 µl 酚氯仿, 在涡旋仪上充分震荡混匀, 4 °C、18,500 × g 离心 15~30 min。

5. 重复步骤 4 至中间蛋白层澄清。
6. 吸取上清液至新的 2 ml 离心管，加入 450 μ l 氯仿-异戊醇，在涡旋仪上充分震荡混匀，4 $^{\circ}$ C、18,500 $\times g$ 离心 15~30 min。
7. 吸取上清液至新的 2 ml 离心管，加入 RNase A 溶液至终浓度为 0.04 mg/ml，37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。
8. 加入 1/10 倍体积 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积 95%乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷)，上下颠倒混匀，-20 $^{\circ}$ C 30 min 以上。
9. 次日，将混合液转移到吸附柱中，4 $^{\circ}$ C、15,700 $\times g$ 离心 3 min，弃掉滤液。重复该过程直至混合液全部转移完毕。
10. 加入 500 μ l 70%乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷)，4 $^{\circ}$ C、15,700 $\times g$ 离心 3 min，弃掉滤液。重复该操作一次。
11. 弃掉滤液，在 4 $^{\circ}$ C、15,700 $\times g$ 离心 5 min，将吸附柱转移到新的 1.5 ml 离心管中，在超净台内干燥 90 s。
12. 加 70 μ l 灭菌超纯水或 TE 缓冲液，室温下静置 2 min。4 $^{\circ}$ C、15,700 $\times g$ 离心 2 min。
13. 将滤液重新加入吸附柱，4 $^{\circ}$ C、15,700 $\times g$ 离心 2 min，获得 DNA 样品。

结果

采用本方法提取了 1-78 日龄的犊牛粪便 DNA，获得的 DNA 浓度为 100-1300 ng/ μ l，A260/280 为 1.62-1.95，A260/230 为 1.51-2.06，DNA 样本能够满足微生物多样性分析的要求。

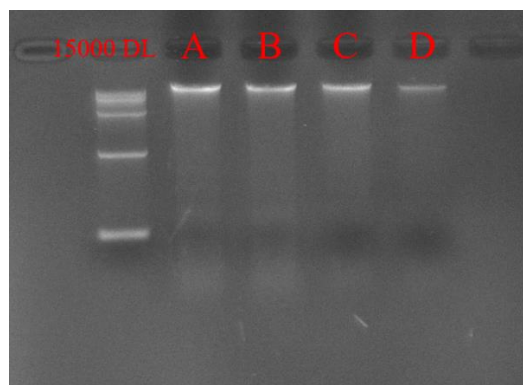


图 1. 采用本方法提取的犊牛粪便 DNA 琼脂糖电泳图

溶液配方

1. TE 缓冲液

1) 1 M Tris-HCl 溶液

准确称取 121.14 g Tris，溶于 800 ml 超纯水中，用 HCl 调节 pH 至 7.6，用超纯水定容至 1 L

2) 0.5 M EDTA 溶液

准确称取 18.61 g EDTA，溶于 80 ml 超纯水中，用 NaOH 调节 pH 至 8.0，用超纯水定容至 100 ml

注：溶液 pH 小于 8.0 时，EDTA 难以完全溶解。

3) 将配制好的 1 M Tris-HCl 溶液和 0.5 M EDTA 溶液混合，Tris-HCl 和 EDTA 的终浓度分别为 10 mM 和 1 mM。121 °C 灭菌 15 min。

2. 3 M 醋酸钠，pH 5.2

准确称取 408.1 g NaAc·3H₂O 溶解于 800 ml 超纯水中，用冰醋酸调节 pH 至 5.2，用超纯水定容至 1 L。121 °C 灭菌 15 min。

致谢

本实验方法改编自 Zoetendal 等 (2006) 人类消化道微生物 DNA 的提取方法，感谢 Zoetendal 等的研究工作。

参考文献

- Zoetendal, E. G., Heilig, H. G., Klaassens, E. S., Booiijink, C. C., Kleerebezem, M., Smidt, H. and de Vos, W. M. (2006). [Isolation of dna from bacterial samples of the human gastrointestinal tract.](#) *Nature Protocol* 1(2): 870-3.