

· 生物技术与方法 ·

不同粪便 DNA 提取方法比较分析

史志远^{1,2}, 陈璐萍¹, 李博星¹, 朱宝利¹, 律娜¹

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学 存济医学院, 北京 100049

史志远, 陈璐萍, 李博星, 朱宝利, 律娜. 不同粪便 DNA 提取方法比较分析. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3542-3550.
SHI ZY, CHEN LP, LI BX, ZHU BL, LYU N. Comparative analysis of different fecal DNA extraction methods. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3542-3550.

摘要: 肠道微生物群落结构和多样性与人体疾病密切相关。然而, 相关群落结构分析结果可能受到 DNA 提取质量等实验因素影响。因此, 评估不同 DNA 提取方法对肠道特定种属的提取效果, 对于全面、准确获取人体肠道微生物谱, 深入探究肠道微生物群落结构具有指导意义。本研究旨在借助实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT qPCR) 技术, 以 DNA 提取纯度、浓度, 以及对肠道中特定种属微生物基因组 DNA 的提取丰度为指标, 对 5 种 DNA 提取方法进行比较分析。结果表明, 试剂盒 Q 的提取效果最佳, 特别是对乳杆菌属和双歧杆菌属等革兰氏阳性菌的提取效果较好。N 试剂盒的平均 DNA 提取浓度较 Q 试剂盒低, 但在纯度方面, 二者无显著性差异。与其他 3 种商用试剂盒 (M、PSP、TG) 相比, N 方法对肠道内指定微生物基因组的提取效果仅次于 Q 试剂盒, 位居第二。相比之下, M 试剂盒提取所得 DNA, 质量较高, 但浓度偏低, 对于肠道内革兰氏阳性菌的提取效果不很理想。TG 试剂盒和 PSP 试剂盒提取所得 DNA 在浓度、质量以及细菌丰度方面均不及其他验证的试剂盒。综上, Q 试剂盒可作为肠道微生态研究相关实验中获取高质量基因组 DNA 的提取方法。本研究结果为肠道微生态研究相关实验中基因组 DNA 提取方法的选择提供参考依据。

关键词: 基因组 DNA; 肠道微生物; 粪便; 定量 PCR

Received: January 31, 2022; Accepted: April 29, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFA1301002); National Natural Science Foundation of China (32170068); Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z201100005520041)

Corresponding author: LYU Na. E-mail: lvna@im.ac.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFA1301002); 国家自然科学基金 (32170068); 北京市科技计划项目 (Z201100005520041)

Comparative analysis of different fecal DNA extraction methods

SHI Zhiyuan^{1,2}, CHEN Luping¹, LI Boxing¹, ZHU Baoli¹, LYU Na¹

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The community structure and diversity of the gut microbiota are associated with human diseases. However, the analysis of different community structure might be influenced by experimental approaches such as the quality of DNA extraction. Therefore, evaluating the efficiency of different DNA extraction methods for specific intestinal species is a guideline for obtaining a comprehensive human gut microbial profile, which may assist the in-depth investigation into the structure of the gut microbial community. The aim of this study was to perform a comparative analysis of five different DNA extraction methods. With the aid of qPCR, the efficiency of five DNA extraction kits was evaluated in terms of the purity of the extracted DNA, the DNA concentration, and the abundance of genomic DNA extracted from specific intestinal species. The results showed that the kit Q gave the best extraction results, especially for Gram-positive bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. The average DNA concentration of the N kit was lower than that of the Q kit, but there was no significant difference between the two in terms of the purity. Compared to the other three commercial kits (M, PSP, TG), the efficiency of the N kit in extracting the genomic DNA of the specified microorganisms were the least different from those of the Q kit. In contrast, the DNA extracted by the M kit was of higher quality but of lower concentration, and was not very efficient for Gram-positive bacteria. The DNA extracted by the TG and PSP kits was inferior to the other validated kits in terms of the concentration, quality and bacterial abundance. These results provide a basis for the selection of genomic DNA extraction methods in microecological research experiments.

Keywords: genomic DNA; gut microbiota; feces; quantified PCR

随着现代分子技术不断发展, 测序成本下降, 越来越多研究聚焦于人体肠道微生物与疾病的关系。大量研究表明, 不同个体的肠道菌群结构、肠道微生物多样性, 与炎症性肠病^[1-4]以及肥胖等代谢性疾病的发生、发展密切相关^[5-8]。因此, 揭示肠道微生物群落结构与宿主健康间的关系, 有助于为相关疾病的治疗提供思路^[9-11]。目前, 肠道菌群的研究主要依赖于测序技术, 与传统培养方法相比, 该方法更便捷

和高效。但测序技术所依赖的实验过程, 例如: 样本采集后的保存、DNA 提取、文库构建等过程, 均有可能对最终群落结构的分析结果产生影响^[12-14]。其中, DNA 提取是关键环节之一, 该过程所得微生物基因组 DNA 的纯度以及对原始肠道菌群组成比例的还原能力, 将直接影响下游测序数据质量和肠道群落结构多样性结果^[15-16]。因此, 评估不同 DNA 提取方法对肠道特定种属的提取效果, 对于全面、准确地获取

人体肠道微生物谱, 深入探究肠道微生物群落结构具有指导意义。

本研究旨在对 5 种基于离心柱法提取 DNA 的试剂盒进行比较, 借助 qPCR 技术, 以 DNA 提取纯度、浓度, 以及对肠道中特定种属微生物基因组 DNA 的提取丰度为指标, 综合评估 5 种 DNA 提取方法的效果, 推测不同 DNA 提取方法对肠道微生物谱分析的影响, 以期后续相关实验中 DNA 提取方法的选择提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 粪便样本

健康个体的粪便样本。

1.1.2 仪器和试剂

组织研磨仪、涡旋振荡器、金属浴恒温器、低温高速离心机、Qubit 荧光定量仪、ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪和 Bio Tek Epoch 全波长酶标仪。其中, 实验过程中 DNA 提取所用试剂盒信息如表 1 所示。

1.2 实验方法

1.2.1 实验样本的采集及 DNA 提取

如图 1 所示, 本研究利用粪便采集管, 收集 5 名健康个体的粪便样本, 分装后及时保存

表 1 5 种不同 DNA 提取试剂盒信息

Table 1 Information of 5 different DNA extraction kits

Kit name	Abbreviation	Manufacturer
TIANamp Stool DNA Kit	TG	TIANGEN BIOTECH
QIAamp PowerFecal [®] Pro DNA Kit	Q	QIAGEN
QIAamp [®] Fast DNA Stool Mini Kit	M	QIAGEN
PSP [®] Spin Stool DNA Plus Kit	PSP	STRATEC Molecular
In-house Common Kit	N	SELF-DEVELOPED

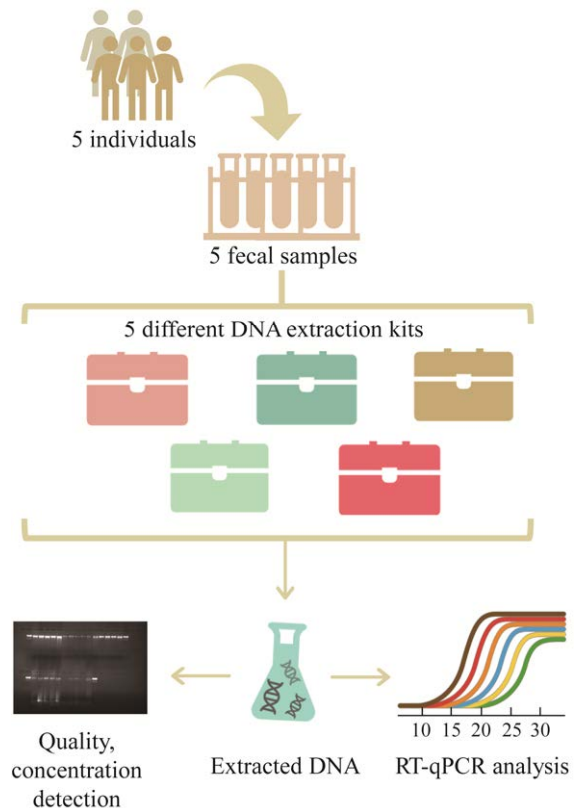


图 1 实验方案流程图

Figure 1 Schematic diagram of experimental design. Five samples were used for DNA extraction with five different extraction protocols.

于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。取健康志愿者的粪便样本 250 mg, 分别利用表 1 所示的 5 种 DNA 提取方法, 对志愿者肠道微生物基因组进行提取。提取细胞内 DNA 的基本原理是利用 DNA 分子与细胞内其他组分 (如: 蛋白质、脂质、多糖等) 理化性质的差异, 通过特定的物理或化学方法使不同组分得以分离。主要包括细胞裂解和纯化两大基本过程, 即利用裂解液, 使蛋白质变性, 破坏细胞结构, 再经过一系列纯化步骤, 提取 DNA, 去除其他成分。根据纯化方式的不同, 可将 DNA 提取方法分为多种类型, 如目前常见的酚氯仿抽提法、盐析法、离心柱法和磁珠法等^[17-19]。本研究旨在对 5 种基于离心柱法提取 DNA 的试剂盒进行比较, 具体 DNA 提取操作

步骤详见试剂盒说明书。

1.2.2 DNA 质量、浓度检测

吸取 2 μL 提取所得 DNA, 用 Bio Tek Epoch 全波长酶标仪测定不同试剂盒提取所得基因组 DNA 的浓度和 A_{260}/A_{280} , 初步检测不同 DNA 提取方法的效果。随后用 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 和 Qubit 荧光定量仪对提取得到的 DNA 浓度进行精准定量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测

将 DNA 样本与所需试剂置于冰上融化并混匀, 按表 2 所示比例进行混合, 将适当体积的主混合物、DNA 模板和引物加入到 qPCR 板的每个反应孔中, 短暂离心, 放入 ABI 7 500 实时荧光定量 PCR 仪中进行定量检测。实时荧光定量 PCR 主要通过向扩增体系中加入特异性的荧光基团, 根据特定阶段荧光阈值与起始 DNA 模板拷贝数的线性关系, 借助标准曲线, 实现对起始 DNA 丰度的准确定量^[20-21]。本研究中拟杆菌门微生物的定量检测使用染料法, 其余微生物物种的定量均使用 Taqman 探针法, 具体引物信息请见表 3。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量检测

应用 5 种 DNA 提取试剂盒分别对 5 名健康个体的粪便样本进行 DNA 提取, 所得 DNA 的完整性结果如图 2 所示, Q 试剂盒和 N 试剂盒

提取所得 DNA 的电泳条带单一、明亮, 降解程度小, 质量较高。PSP 试剂盒提取所得 DNA 电泳条带弥散并伴有 RNA 污染。相比之下, M 试剂盒和 TG 试剂盒提取所得 DNA 的电泳条带较暗, DNA 浓度较低。

此外, 以 A_{260}/A_{280} 比值为 DNA 纯度指标^[22], 评估不同方法的提取效果。纯 DNA 样本 A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8, 通常情况下, DNA A_{260}/A_{280} 比值在 1.8–2.0 之间为佳。若比值低于 1.6, 表明提取所得 DNA 有蛋白质等污染, 高于 2.2 则表明有较多 RNA 残留。如图 3B 所示, 试剂盒 PSP、TG 提取所得 DNA A_{260}/A_{280} 比值整体高于 1.9, 平均值分别为 1.97 和 1.92, 表明通过这两种试剂盒提取得到的 DNA 可能有 RNA 残留。而其余 3 种试剂盒 Q、N 和 M 提取所得 DNA A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8 左右, 平均值分别为 1.83、1.84 和 1.82, 表明该 3 种方法所得 DNA 纯度较高。

2.2 特异性 Qubit 荧光法测定 DNA 浓度

与传统紫外分光光度计测定 DNA 浓度相比, 利用特异性和高灵敏度的荧光探针能够实现 DNA 分子的准确定量。图 3A 为 5 种方法提取所得 DNA 经 Qubit 荧光定量仪测定后的提取浓度。经克鲁斯卡尔-沃利斯检验 (Kruskal-Wallis test) 可知, 不同提取方法所得 DNA 浓度差异显著 ($P < 0.05$)。其中, Q 试剂盒提取所得 DNA 浓度最高, 平均为 134.62 ng/ μL 。N 试剂盒次之,

表 2 qPCR 反应体系配比

Table 2 Ingredients of qPCR reaction mixture

Reagents	Volume (μL)	Final concentration
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	10.0	1 \times
10 $\mu\text{mol/L}$ Forward Primer	0.4	100–400 nmol/L
10 $\mu\text{mol/L}$ Reverse Primer	0.4	100–400 nmol/L
10 $\mu\text{mol/L}$ Probe	0.8	100–500 nmol/L
Template DNA	2.0	<250 ng
50 \times ROX Low	0.4	1 \times
Aseptic water	6.0	–

表 3 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 3 qPCR primer information

Primer name		Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
Total	Forward	CGTCAGCTCGTGYCGTGAG	19
	Reverse	CGTCRTCCCRCTTCC	17
	Probe	FAM-TTAAGTCCCRYAACGAGCGCAACCC-TAMRA	25
<i>Bifidobacterium</i>	Forward	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC	22
	Reverse	CACCCGTTTCCAGGAGCTATT	21
	Probe	FAM-TCACGCATTACTCACCCGTTTCGCC-TAMRA	24
<i>Lactobacillus</i>	Forward	TGGATGCCTTGGCACTAGGA	20
	Reverse	AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT	26
	Probe	FAM-TATTAGTTCGTCCTTCATC	20
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Forward	CCCGGCATCGGGTAGAG	17
	Reverse	GGACGCGAGGCCATCTC	17
	Probe	FAM-AAAAGGAGCAATCCGCT	17
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Forward	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	20
	Reverse	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	20
	Probe	FAM-CCCCACCTTCCTCCAGTTGAT	22
<i>Bacteroidetes</i>	Forward	CRAACAGGATTAGATACCCT	20
	Reverse	GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT	19
<i>Candida albicans</i>	Forward	TTGATAACCCTGAAGATTTGA	22
	Reverse	ACCCATAATCAACTTCATCAGA	22
	Probe	FAM-TGGGATACTGCTGCTGCCAA	20
<i>Escherichia coli</i>	Forward	CAACGAACTGAACTGGCAGA	20
	Reverse	CATTACGCTGCGATGGAT	18
	Probe	FAM-CCCGCCGGGAATGGTGATTAC	21

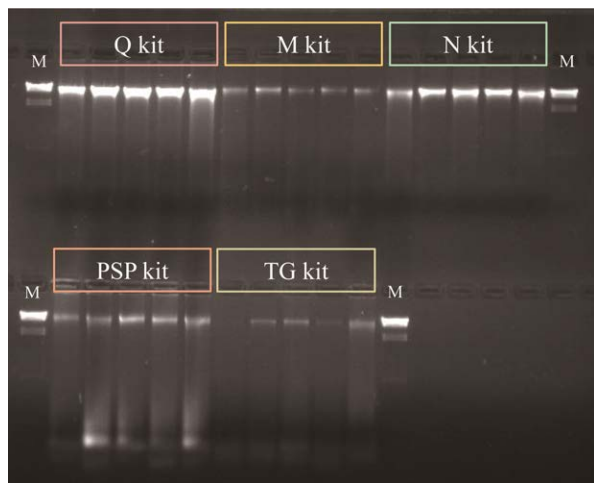


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Figure 2 Result of agarose gel electrophoresis. Letter M indicates the marker, and different extraction methods are indicated within boxes.

平均浓度为 56 ng/μL。PSP 试剂盒提取所得 DNA 平均浓度位居第三，为 53.78 ng/μL，但由于其存在一定的 RNA 残留 (图 3B)，因此该结果可能高于实际浓度。与其他 3 种试剂盒相比，M 和 TG 试剂盒提取所得 DNA 浓度最低，平均浓度分别为 13.76 ng/μL 和 9.89 ng/μL，与图 2 较暗的电泳条带结果一致。

2.3 5 种提取方法所得细菌丰度的绝对定量

对于特定肠道微生物基因组的提取，不同试剂盒的提取效果存在差异。本研究选取了 7 种常见人体肠道微生物，分别为双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)、阿克曼氏菌 (*Akkermansia muciniphila*)、拟杆菌门

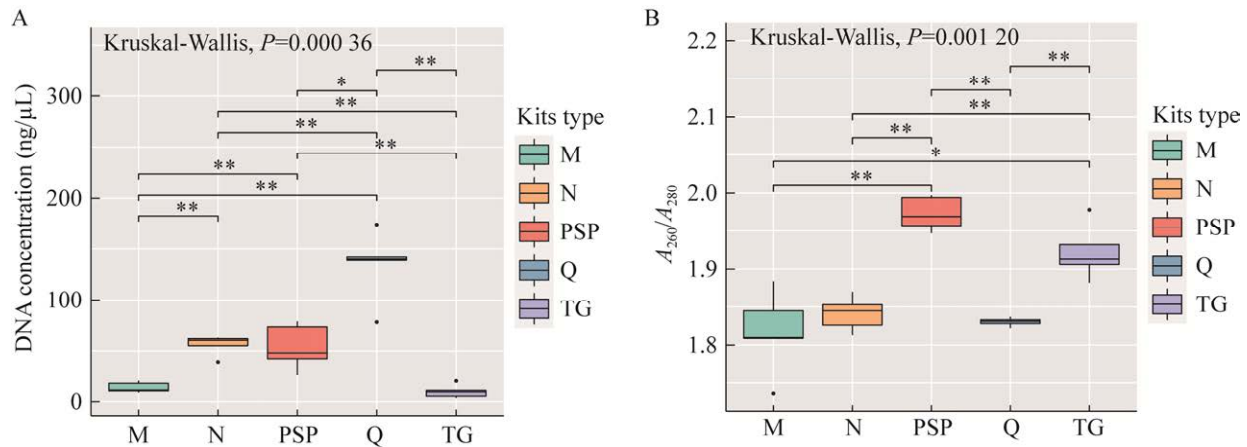


图3 DNA提取浓度和纯度比较

Figure 3 DNA yield (A) and purity (B) of different extraction methods. P -value <0.05 , Kruskal-Wallis test.

(Bacteroidetes)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 利用实时荧光定量 PCR 技术, 通过设计种属特异性的探针来准确定量提取所得指定微生物的丰度, 评估不同试剂盒, 对指定肠道微生物基因组的提取效果, 以推测不同 DNA 提取方法对肠道群落结构分析的影响。如图 4 所示, 是不同提取方法对 5 名健康个体指定肠道微生物提取平均丰度的比较结果。纵轴代表 1 μL 提取所得 DNA 中指定微生物 16S rRNA 基因的拷贝数 (为了方便展示, 为原始数据取对数后的数值)。

对于粪便样本中总 16S rRNA 基因即总菌 (total) 的提取效果, 如图 4A 所示, Q 试剂盒提取所得丰度最高, 平均为 1.70×10^9 copies/ μL 。N 试剂盒提取所得总菌丰度位居第二, 为 1.02×10^9 copies/ μL 。而其他 3 种试剂盒提取所得总菌丰度相对较低, M 试剂盒: 4.22×10^8 copies/ μL 、PSP 试剂盒: 3.08×10^8 copies/ μL 、TG 试剂盒: 1.64×10^8 copies/ μL 。

相比之下, 对于双歧杆菌属、乳杆菌属等革兰氏阳性菌基因组的提取, 试剂盒 Q 具有更好的提取效果, N 试剂盒次之 (图 4B, 4C)。以

双歧杆菌为例, Q 试剂盒提取所得平均拷贝数为 1.15×10^7 copies/ μL , N 试剂盒的提取丰度平均为 1.20×10^6 copies/ μL 。而试剂盒 PSP、TG 和 M, 提取所得平均丰度较低, 分别为 1.35×10^5 copies/ μL 、 1.15×10^5 copies/ μL 和 2.58×10^4 copies/ μL 。

对于拟杆菌门微生物基因组的提取 (图 4F), M、N、Q 试剂盒提取所得拷贝数, 显著高于 PSP、TG 试剂盒。同时, 对于肠道白色念珠菌的提取 (图 4G), PSP、TG 试剂盒所得拷贝数也显著低于其他 3 种方法。值得注意的是, 就肠道普拉梭菌、阿克曼氏菌和大肠杆菌的提取丰度而言, 不同方法间差异不显著 ($P>0.05$)。

3 结论与讨论

对于肠道内特定微生物, 如普拉梭菌、阿克曼氏菌和大肠杆菌的提取, 不同方法间差异不显著。但对于具有特殊细胞壁结构的革兰氏阳性菌而言, 不同方法的提取效果差异显著。提取过程中的裂解步骤可能是导致这种差异的主要原因之一。除裂解液组分的影响外, 机械振荡研磨有助于获得更多样的微生物群落结构^[23]。同时, Santiago 等^[24]研究发现, 研磨珠机械振

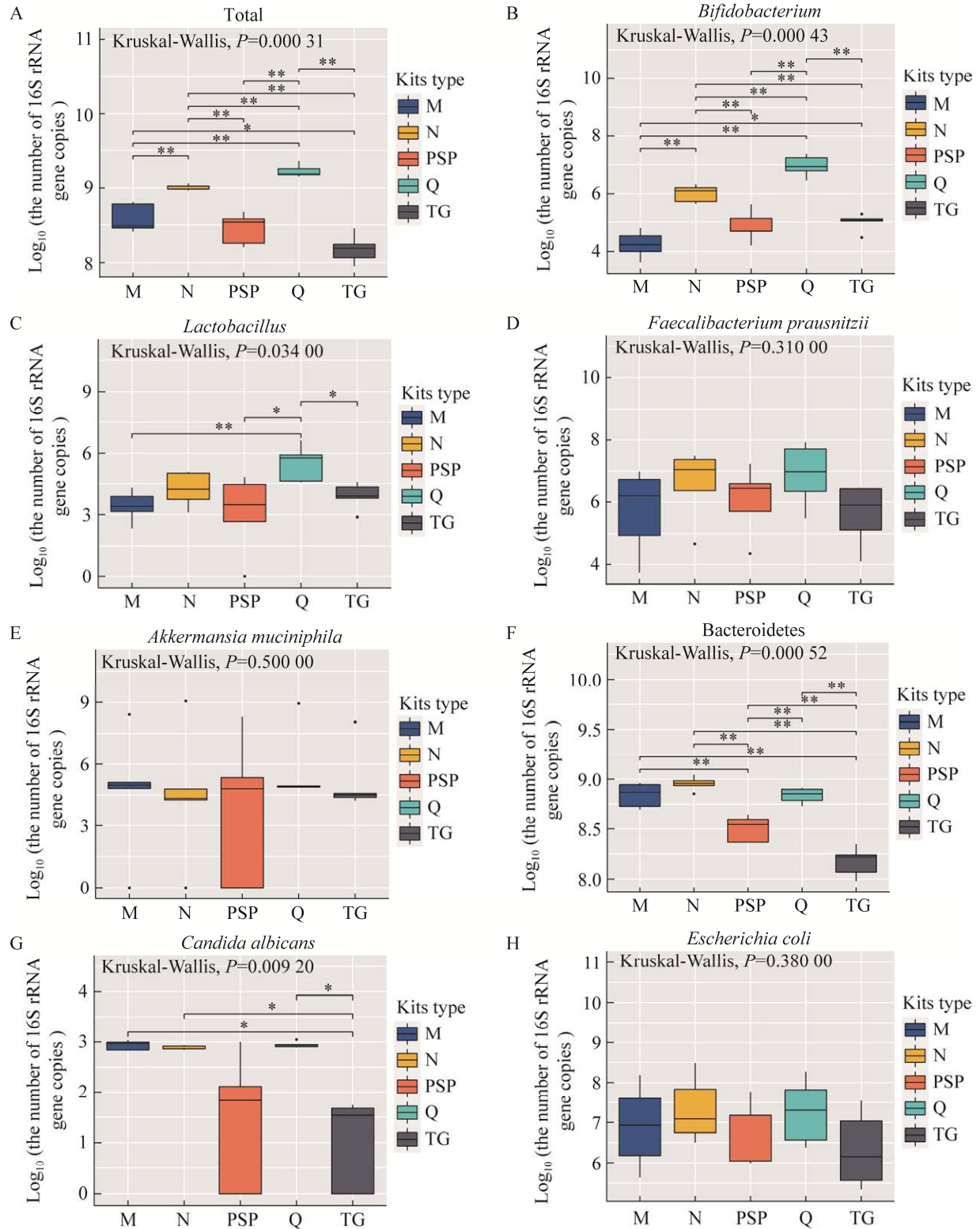


图4 5种方法提取所得特定微生物的绝对丰度

Figure 4 Absolute abundance of specific bacteria extracted by 5 different DNA extraction kits.

荡可提高群落中 *Blautia*、*Bifidobacterium* 等革兰氏阳性菌的丰度, 与未经研磨珠机械振荡的对照组相比, 二者间的群落结构存在明显差异。因此, 不同 DNA 提取方法对肠道中特定菌种提取效果的差异, 是影响肠道微生物谱分析结果的重要原因之一。

本研究比较了 5 种 DNA 提取方法在提取质量、DNA 浓度以及所得细菌丰度方面的差别。其中, 应用较为广泛的 Q 试剂盒, 其提取效果最佳, 平均浓度为 134.62 ng/ μ L, 所得 DNA 纯度较高, A_{260}/A_{280} 比值平均为 1.83。与 Lim 等^[14]、吴仲文等^[25]的研究结果一致, Q 方法对革兰氏阳性菌如双歧杆菌有较好的提取效果, 是获取高质量基因组 DNA 的有效方法。N 试剂盒成本较低, 其平均 DNA 提取浓度较 Q 试剂盒低, 但在纯度方面, 二者无显著性差异。与其他 3 种商用试剂盒 (M、PSP、TG) 相比, N 方法对肠道内指定微生物基因组的提取效果仅次于 Q 试剂盒, 位居第二。相比之下, M 试剂盒提取所得 DNA, 质量较高, 但浓度偏低, 对于肠道内革兰氏阳性菌的提取效果不很理想。而试剂盒 TG 和 PSP 提取所得 DNA, 在浓度、质量以及细菌丰度方面均不及其他验证的试剂盒。此外, 在 Lim 等^[23]的研究中, Q 试剂盒提取所得肠道微生物群落的 α 多样性显著高于 M 试剂盒。

综上所述, Q 试剂盒可作为肠道微生态研究相关实验中获取高质量基因组 DNA 的方法, 但根据不同的实验要求与目的, 可选择不同的提取方法。

REFERENCES

- [1] Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*, 2019, 569(7758): 655-662.
- [2] Manichanh C, Borruel N, Casellas F, et al. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(10): 599-608.
- [3] Simrén M, Barbara G, Flint HJ, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*, 2013, 62(1): 159-176.
- [4] Lee M, Chang EB. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome-searching the crime scene for clues. *Gastroenterology*, 2021, 160(2): 524-537.
- [5] Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, et al. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2(10): 747-756.
- [6] Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, 2018, 9(4): 308-325.
- [7] Zhou WY, Sailani MR, Contrepois K, et al. Longitudinal multi-omics of host-microbe dynamics in prediabetes. *Nature*, 2019, 569(7758): 663-671.
- [8] Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, et al. Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br J Nutr*, 2020, 123(10): 1127-1137.
- [9] König J, Brummer RJ. Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes*, 2014, 5(3): 247-261.
- [10] Quigley EMM. Therapies aimed at the gut microbiota and inflammation: antibiotics, prebiotics, probiotics, synbiotics, anti-inflammatory therapies. *Gastroenterol Clin North Am*, 2011, 40(1): 207-222.
- [11] Albillos A, De Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558-577.
- [12] Liang YL, Dong TY, Chen MJ, et al. Systematic analysis of impact of sampling regions and storage methods on fecal gut microbiome and metabolome profiles. *mSphere*, 2020, 5(1): e00763-19.
- [13] Hallmaier-Wacker LK, Lueert S, Roos C, et al. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6292.
- [14] Lim MY, Park YS, Kim JH, et al. Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 212.
- [15] Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(11): 1069-1076.

- [16] Tourlousse DM, Narita K, Miura T, et al. Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements. *Microbiome*, 2021, 9(1): 95.
- [17] 姜海霞. 对苯酚氯仿法和盐析法提取 DNA 的归纳. *中学生物学*, 2014, 30(5): 53-54.
Jiang HX. Generalization of the phenol-chloroform and salting methods for DNA extraction. *Middle Sch Biol*, 2014, 30(5): 53-54 (in Chinese).
- [18] 陈思媛, 郭明璋, 贺晓云, 等. 用于分子生物学检测的粪便 DNA 的提取方法优化. *农业生物技术学报*, 2013, 21(12): 1509-1517.
Chen SY, Guo MZ, He XY, et al. Optimization of DNA extraction from faeces for molecular biology detection. *J Agric Biotechnol*, 2013, 21(12): 1509-1517 (in Chinese).
- [19] 张翠真, 袁小龙, 陈志和, 等. 基于磁珠的核酸快速提取和纯化. *生物学杂志*, 2019, 36(4): 97-101.
Zhang CZ, Yuan XL, Chen ZH, et al. Rapid extraction and purification of nucleic acid based on magnetic beads. *J Biol*, 2019, 36(4): 97-101 (in Chinese).
- [20] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展. *现代农业科技*, 2020(6): 1-3, 8.
Liang ZY, Liu F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application. *Mod Agric Sci Technol*, 2020(6): 1-3, 8 (in Chinese).
- [21] Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative real-time PCR: recent advances. *Methods Mol Biol*, 2016, 1392: 161-176.
- [22] Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques*, 1995, 19(2): 208-210.
- [23] Lim MY, Song EJ, Kim SH, et al. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Syst Appl Microbiol*, 2018, 41(2): 151-157.
- [24] Santiago A, Panda S, Mengels G, et al. Processing faecal samples: a step forward for standards in microbial community analysis. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 112.
- [25] 吴仲文, 韩樱, 鲁海峰, 等. 粪便 DNA 抽提方法的比较研究. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(1): 67-71.
Wu ZW, Han Y, Lu HF, et al. A comparison of four methods for extraction of human fecal DNA by using real-time PCR. *Chin J Lab Med*, 2007, 30(1): 67-71 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)