

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.009

不同保存方法对川金丝猴粪便 DNA 提取效果的影响 *

周芸芸^{1,2} 张宇² 杨万吉³ 蒋军³ 余辉亮³ 李迪强² 张于光^{2Δ}

(1 湖南人文科技学院 湖南 娄底 417000; 2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林生态环境重点实验室 北京 100091; 3 神农架国家公园, 湖北神农架金丝猴保育生物学湖北省重点实验室 湖北 神农架 442411)

摘要 目的:川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)是我国特有珍稀物种,其粪便作为一种非损伤性样品,为珍稀濒危动物的种群数量调查、遗传多样性评价、亲缘关系、系统进化等研究带来了很大便利,本研究试图建立高效、简便的粪便样品保存方法。**方法:**在现有珍稀濒危动物粪便样品保存方法的基础上,分别使用干燥法、冷冻法和干燥-冷冻法保存川金丝猴的粪便样品,比较了不同保存方法的 DNA 提取效果,以及对 mtDNA 控制区片段的 PCR 扩增成功率和微卫星基因的 PCR 扩增效率。**结果:**干燥法、冷冻法和干燥-冷冻法三种不同保存方法保存粪便 1 周时间后,提取的粪便 DNA 样本扩增 mtDNA 片段的成功率均为 92%,微卫星基因的扩增成功率分别为 79%、78%、80%;保存 2 个月后,mtDNA 片段扩增成功率分别为 80%、76%和 80%,微卫星基因扩增成功率分别为 65%、61%、67%;保存 6 个月后,mtDNA 片段扩增成功率分别为 56%、52%和 64%,微卫星基因扩增成功率分别为 40%、34%、46%。因此,随着保存时间的增长,三种方法的保存效率都将明显降低,但干燥-冷冻法得到的 DNA 样本扩增成功率相对较高。**结论:**粪便样品能够为川金丝猴的遗传多样性评价等相关研究提供有效信息,干燥-冷冻法保存能够更为有效的保证 DNA 的提取和基因扩增效率。

关键词:非损伤性技术;粪便样本;保存方法;线粒体 DNA;微卫星标记

中图分类号:Q95-3;Q959.848 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-43-05

Effect of Different Preservation Methods on the Fecal DNA Extracted Quality of Sichuan Snub-nosed Monkey*

ZHOU Yun-yun^{1,2}, ZHANG Yu², YANG Wan-ji³, JIANG Jun³, YU Hui-liang³, LI Di-qiang², ZHANG Yu-guang^{2Δ}

(1 Science and Technology, Hunan University of Humanities, Loudi, Hunan, 417000, China; 2 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, and the Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, China; 3 Shennongjia National Park, Key Lab of Conservation Biology for Shennongjia Golden Monkey, Shennongjia Forest District, Hubei, 442411, China)

ABSTRACT Objective: Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*), an endemic rare species in China and to be list to a national first class protected animal species, has characteristic of natural alert and arboreal life. Fecal, as a non-invasive sample, gives great convenience to researches on population survey, genetic diversity, genetic relationship, phylogeny. However, appropriate sampling and preservation methods are the premise to get useful DNA for the researches of endangered animals with non-invasive fecal sample. This study attempts to establish a high efficient, convenient method. **Methods:** Combined the reported preservation methods of the endangered animal fecal samples with the actual fact, three methods included drying, freezing and drying-freezing are used. Taking blood samples and hair samples as a reference, it is to analyze the effects of different fecal samples preservation methods on the efficiency of DNA extraction and the success rate of mtDNA and microsatellite DNA loci gene amplification, which included drying, freezing and drying-freezing in 1 week, 2 months and 6 months storage time respectively. **Results:** The amplification success rate of mtDNA gene is 92% with the three preservation methods and microsatellite loci amplification success rate of drying, freezing and drying-freezing was 79%, 78%, 80% respectively after a week. For the mtDNA gene amplification success rate with drying method, freezing method and drying-freezing method, it is 80%, 76%, 80% respectively after two months, and 56%, 52% and 64% respectively after six months. For microsatellite loci success rate with three methods, it is 65%, 61% and 67% respectively after two months, 40%, 34% and 46% respectively after six months. It showed that DNA amplification success decreases with the increasing of the storage time. Compared with two other methods, the samples with drying-freezing method can get better DNA extracted quality and high amplification success rate of mtDNA gene and microsatellite loci. **Conclusion:** The fecal of Sichuan snub-nosed monkey can be the research sample for providing effective information on some genetics study such as the evaluation of genetic diversity. Compared with other two methods, the

* 基金项目:国家“十二五”科技支撑计划课题(2012BAD03B02)

作者简介:周芸芸(1986-),博士,主要从事分子生态学研究, E-mail: zyycici@163.com

Δ 通讯作者:张于光,博士,主要从事分子生态学和生物多样性保护研究, E-mail: yugzhang@sina.com.cn

(收稿日期:2017-08-30 接受日期:2017-09-23)

drying-freezing method for fecal preservation with long-way transportation is a better way to get quality DNA extracted and high efficiency of gene amplification.

Key words: Non-invasive techniques; Fecal sample; Preservation methods; mtDNA; SSR (Simple Sequence Repeats)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q959.848 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-43-05

前言

利用粪便样品提取动物 DNA 已成为野生动物保护研究中常用的非损伤性取样法,该方法对于研究大型、珍稀且难以见到的濒危动物十分有用^[1-5],并已解决了诸如珍稀濒危野生动物的个体识别、遗传多样性、遗传结构、性比结构、亲缘关系、系统进化等分子生态学和种群遗传学问题,以及与经典生态学方法相结合解决物种的种群数量调查、监测、保护建设等濒危物种的保护相关问题^[6-12]。

正确的粪便样品采样及保存方法是粪便样品能否为珍稀濒危动物研究提供足够遗传信息的重要决定因素之一^[13]。从动物粪便中分离动物组织 DNA 是由于粪便表面通常含有脱落的动物消化道细胞,但脱落细胞含量较少,在自然环境中易降解,且粪便中常含有一定的杂质 DNA 和 PCR 抑制物等,因此,不恰当的粪便样品的保存方法,可能会造成样品 DNA 样本的快速降解,增加样品 DNA 的提取和基因扩增难度,甚至增加基因分型的错误率等^[14]。目前,常用的动物粪便样品保存方法有用乙醇保存、用 DETs 缓冲液保存、直接低温保存、干燥保存等^[6,13,15],保存效果因物种、样品暴露的气候条件、暴露的时间等不同而变化,例如降雨能显著地增加粪便样品 DNA 的降解^[16]。由于不同研究对象所处的环境条件、研究对象的食物特征、个体差异等,不同物种所采用的粪便样品保存方法和保存时间等还存在差异^[17-22]。

1 材料与方法

1.1 川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)

川金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)是我国特有珍稀物种,国家一级重点保护野生动物,且为典型树栖动物,生性警觉,迁移速度快,难以通过常规的组织样品开展遗传保护相关研究,因此,利用其粪便样品进行种群数量调查和遗传多样性评价等研究是一种有效的手段。本研究以湖北省神农架川金丝猴种群为研究对象,试图建立高效、简便、适合于长距离运输的川金丝猴粪便样品的保存方法和保存时间,为全面开展川金丝猴的保护研究提供技术支撑,也为基于粪便材料的医学实验提供参考。

1.2 样品采集及保存

本研究所采用的粪便样品、毛发样品和血液样品均采集于湖北神农架国家级自然保护区,采集时间为 2013 年 7 月-8 月。共采集粪便样本 25 份,同时采集血液样本 2 份和毛发样本 6 份用作对照(表 1)。

采集粪便样品时戴一次性无菌塑料手套,来避免交叉污染,收集粪便表层装于自封袋或含硅胶的收集管中;血液样品采集时以后肢静脉采血的方法,将样本保存于含有抗凝剂的收集管中,上下颠倒摇匀,编号,记录采集样品名称、日期、体征等;毛发样品采用胶布粘贴法,将带有毛囊的毛发样品收集存放于信封中,并记录样品详情。血液样品及毛发样品收集后,于 -20℃ 冷冻保存,采集的粪便样本每份均分为 3 份,分别使用干燥法、冷冻法和干燥-冷冻法保存,其中干燥法是将粪便样本采集后置于灭菌后的过滤纸上,于 60℃ 烘箱中烘干(6-8 h),然后收集在 15 mL 收集管中(收集管内含有 1/2-2/3 的硅胶)室温保存;冷冻法是将样本收集后放入自封袋中,直接保存在 -20℃ 冰箱中;干燥-冷冻法是将粪便样本置于 15 mL 收集管(收集管内含有 1/2-2/3 的硅胶)保存,然后在 -20℃ 冰箱保存。

表 1 川金丝猴样品信息表

Table 1 Samples information of Sichuan golden monkey

Number	Code of samples	Type of samples	Number	Code of samples	Type of samples
1	gm1(-1)	fecal	14	gm14(-1, 2)	fecal, hair
2	gm2(-1, -2)	fecal; hair	15	gm15(-1)	fecal
3	gm3(-1, -2, -3)	fecal; hair; blood	16	gm16(-1)	fecal
4	gm4(-1)	fecal	17	gm17(-1)	fecal
5	gm5(-1)	fecal	18	gm18(-1)	fecal
6	gm6(-1)	fecal	19	gm19(-1)	fecal
7	gm7(-1, -2)	fecal;hair	20	gm20(-1)	fecal
8	gm8(-1)	fecal	21	gm21(-1, -2)	fecal; hair
9	gm9(-1, -2)	Fecal; hair	22	gm22(-1)	fecal
10	gm10(-1)	fecal	23	gm23(-1)	fecal
11	gm11(-1)	fecal	24	gm24(-1)	fecal
12	gm12(-1)	fecal	25	gm25(-1)	fecal
13	gm13(-1)	fecal	26	gm26(-3)	blood

Note: -1, -2, -3 that annotate in the column named Code of samples represent fecal sample, hair sample and blood sample of the same monkey in turn.

1.3 粪便样品 DNA 的提取

血液、毛发、粪便样本 DNA 的提取分别采用 QIAamp Blood DNA Mini Kit (Qiagen)、QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen)、QIAamp DNA Stool Kit(Qiagen)试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书。粪便样本分别在第 1 周(7 天)、2 个月(2× 30 天)、6 个月(6× 30 天)提取 DNA。

1.4 mtDNA 片段和微卫星基因的 PCR 扩增

研究选用核外、核内两种分子标记方法对粪便 DNA 进行扩增,核外分子标记选用线粒体 mtDNA 控制区片段,引物序列为:GH (5'-AACTGGCATTCTATTTAACTAC-3')、GL (5'-ATTGATTTCACG GAGGATGGT-3'),PCR 产物大小为 401 bp^[23]。20 μ L 的 PCR 扩增体系包括 2 μ L 的 10× PCR buffer (含 $MgCl_2$),0.4 μ L 的 10 mmol/L dNTPs,上下引物各 1 μ L(10 μ mol/L),1 μ L BSA,0.4 μ L 的 5 U/ μ L HotMaster™ 聚合酶和 1 μ L 的基因组 DNA 模板,无菌水 13.2 μ L。PCR 扩增条件为:94 °C 热启动 5 mins;94 °C 变性 15 s、退火温度 54 °C 延伸 30 s、72 °C 延伸 45 s(35 个循环);最后 72 °C 延伸 10 mins;反应结束后保存在 4 °C。每次扩增过程中设定阴性对照,利用血液样品设立阳性对照。PCR 产物用 1.2 % 琼脂糖电泳检测,每个样品扩增 3 次。

核内分子标记选取灵长类动物研究中多态性较高的 4 个微卫星基因位点(D1S1656、D6S493、D3S1766、D17S1290)^[7,24-25],每一对微卫星基因位点的单侧 5' 端分别用 FAM(D1S1656、D3S1766、D17S1290)或 HEX 标记(D6S493)。扩增的体系参照线粒体控制区片段扩增的体系。PCR 扩增条件为:94 °C 热启动 5 mins;94 °C 变性 15 s、退火温度 50~60 °C,30 s、72 °C 延伸 45 s(35 个循环);最后 72 °C 延伸 10 mins;反应结束后保存在 4 °C。每次扩增过程中设定阴性对照,毛发或血液 DNA 样本作为阳性对照,每个样本扩增 3 次。

将微卫星基因位点的 PCR 扩增产物用 ABI3730XL 遗传分析仪上进行等位基因分型。每个泳道以 LIZ500 作为分子量内标,由 GeneMapper4.0 (Applied Biosystems)分析软件输出分型结果。辅以人工核对和校正后,根据微卫星序列长度变异范围和相应峰型特征确定每个样本的等位基因。采用 Bellemain 等^[26]微卫星基因分型的标准,判定纯合子和杂合子。粪便 DNA 样品重复扩增 3 次后,仅出现 1 个等位基因的,认为是纯合子;总是出现 2 个不同的等位基因时判定为杂合子;3 次扩增中,若每次扩增都能得到同一个等位基因,但另一个等位基因不是每次出现,则再增加一次扩增来确定,若待定的等位基因出现 2 次及以上,则判定为杂合子,若待定等位基因只出现 1 次,判定为纯合子,若 4 次扩增之后,仍得不能确定,则表示该样品的扩增失败。

1.5 数据分析

以 PCR 扩增成功率分析不同粪便样品保存方法和保存时间对粪便样品 DNA 质量的影响,将扩增成功率转化为等级数据类型,比较 3 种不同保存方法及保存时间的差异显著性,数据整理和分析在 SPSS17.0 完成。

2 结果

2.1 粪便样品的 mtDNA 扩增效果

将粪便、血液、毛发样品的 DNA 模板扩增出的线粒体控制区片段的目的条带(图 1)测序,将得到的序列与 NCBI 数据库进行比对,确定均为川金丝猴控制区序列。

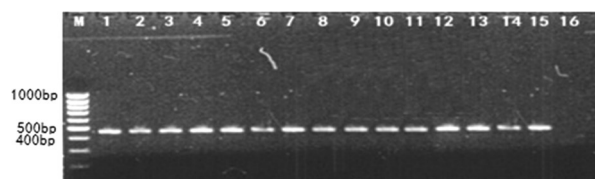


图 1 川金丝猴粪便样品的 mtDNA 控制区 PCR 扩增产物结果

Fig. 1 PCR amplification results of mtDNA control region from fecal DNA of Sichuan golden monkey

Note: Lane M is marker, lane 1-11 are PCR products of fecal DNA, lane 12/13 are PCR products of blood DNA, lane 14/15 are PCR products of hair DNA, and lane 16 is negative control).

血液样品和毛发样品在 1 周、2 个月和 6 个月在线粒体控制区均扩增出了目的基因条带(401 bp)。川金丝猴粪便样品保存一周后,三种方法保存的粪便样本提取的 DNA 扩增成功率均为 92%;保存两个月时,干燥法、冷冻法和干燥-冷冻法三种保存方法的样本 mtDNA 基因片段扩增成功率分别为 80%、76%和 80%;保存六个月后,三种方法扩增的成功率分别为 56%、52%和 64%(图 2)。随着保存时间的延长,3 种不同保存方法在 mtDNA 基因片段的扩增成功率均降低,保存 2 个月和 6 个月后,冷冻法扩增成功率均下降最快,而干燥-冷冻法扩增成功率降低最少。干燥-冷冻法在 3 次重复扩增中成功数量一致,且成功扩增者为同一样品。

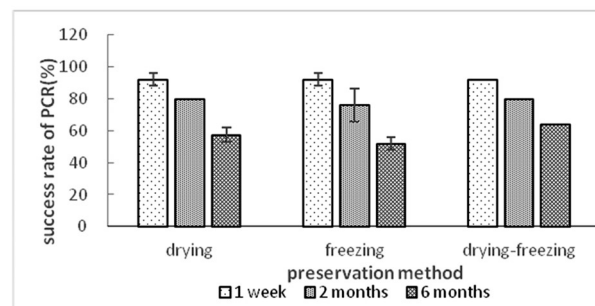


图 2 川金丝猴粪便 DNA 的线粒体控制区片段扩增的成功率(n=25)

Fig. 2 Amplification success rate of mtDNA control region from fecal DNA of Sichuan golden monkey (n=25).

2.2 粪便 DNA 的微卫星基因扩增效果

三种保存方法保存 1 周时,粪便样本在 4 个微卫星位点的扩增成功率大致相同(表 2)。随着保存时间的延长,2 个月和 6 个月后,3 种保存方法的微卫星位点扩增成功率均下降,与保存 1 周时的扩增成功率相比,冷冻法保存的样本扩增成功率下降了 17%;保存了 6 个月后,干燥法保存的样本的扩增成功率下降了 39%、冷冻法保存样本扩增成功率下降了 44%、干燥-冷冻法保存样本扩增成功率下降了 34%。但是三种保存方法提取的 DNA 在 mtDNA 控制区片段及微卫星基因位点扩增的成功率无显著差异,而从保存时间增加后扩增成功率的下降程度来看,以干燥-冷冻法略优于其他两种方法。

表 2 不同粪便样本保存方法和时间的微卫星基因位点扩增成功率(n=25)
Table 2 SSR amplification success rate of different fecal preservation methods and time (n=25)

Preservation methods	Preservation time	The rate of success on SSR locus(%)				
		D1S1656	D6S493	D3S1766	D17S1290	Mean(± SD)
Drying	one week	80	88	72	76	79± 7
	two months	72	72	56	60	65± 8
	six months	44	44	36	36	40± 5
Freezing	one week	80	84	68	80	78± 7
	two months	64	64	56	60	61± 4
	six months	36	36	32	32	34± 4
Drying- Freezing	one week	80	88	72	80	80± 7
	two months	72	72	60	64	67± 6
	six months	48	48	44	44	46± 6

3 讨论

物种的遗传参数在保护生物学、系统进化等方面具有重要意义,由于珍稀濒危动物种群生存状况脆弱,加上其生性警戒、活动隐蔽、活动范围大等特点,动物粪便样本是较常见的、有效的非损伤性 DNA 研究样本。使用粪便样品的非损伤性取样对于珍稀濒危野生动物的保护和管理具有十分重要的现实意义,因此,正确的粪便样品采样及保存方法是粪便样品能否为物种提供足够有效遗传信息的重要因素^[13,31]。

干、冷的外界环境条件因素对动物粪便样品 DNA 降解起到一定的抑制作用。有研究显示,在冬季采集的粪便样本,模板 DNA 的质量要高于其他季节^[27];干冷地区采集的样本比潮湿地区采集的样本保存时间长^[28]。干燥的环境不易使样本霉变、产生更多的微生物降解 DNA;低温的环境可一定程度上抑制酶的活性。在已有的研究中,有粪便样品采用了自然干燥、低温或者两者相集合的保存方法,但是这样的环境只能使样品短时间有效保存^[6,8,15]。在南方湿热地区,要使粪便彻底的干燥,可能需要两周甚至更长的时间,这个期间是无法避免粪便中 DNA 的降解。直接 60℃烘干,再装入收集管内进行保存,本研究中以此干燥的方法保存的样品基因分型中扩增失败的原因其中有扩增条带不稳定、峰图不规则等,此方法虽然简易实验室可以满足这一要求,但是其操作难度较大,需要将采回的样本取出,烘干,再分别装入收集管中进行保存,取出-烘干-再装入的这个过程可能增加了样品污染概率,且有将样品破坏的风险。本研究中介绍的干燥-冷冻的方法中干燥的处理为硅胶干燥,通过定期更换硅胶,能将粪便样品保存在一个持续干燥的环境中,这种方法可操作性较强,且方便长途运输。低温的环境可一定程度上抑制酶的活性,使用冷冻法保存的样本,一般来说需要存放在-20℃或-80℃保存,结合生物冰袋和保温箱的运输,基本可达到低温保存的效果。与直接低温保存相比,干燥-低温保存的方法有更高的 mtDNA 基因片段扩增成功率及微卫星基因位点扩增成功率。

本研究中所用的干燥、低温环境保存,在短时间内(1周内)均能获得 90%以上的 mtDNA 基因片段扩增成功及微卫星基因位点扩增成功,完全能够满足后续研究,即使在保存时间 2 个月以后,也仍然能够具有相对较高的扩增成功率。但是,随

着保存时间的延长,DNA 的扩增效率会明显的降低,保存了 6 个月后,mtDNA 片段的扩增成功率降低到 50%-60%;微卫星基因扩增成功率仅有 30%-40%。在样品长期的保存过程中,去氨基、脱嘌呤和相关的水解、酶解过程可能会改变 DNA 的分子骨架及亚硝基等,导致 DNA 分子断裂和不稳定^[15],因此,样品 DNA 的提取、分离和后期 PCR 扩增的难度均会大大增加。

有研究显示用乙醇法保存粪便样品保存时间长(长者可长达 5 年及以上),能得到降解较少的高质量 DNA 的优点^[15,29]。Wultsch 等^[13]研究以 DETs 溶液保存、乙醇保存法在野外收集粪便样本,长期保存,比较粪便 DNA 的扩增成功率及基因分型准确率时,得到的结论是 DETs 溶液保存法更优。DETs 溶液为高浓度缓冲液,能降低核酸内切酶活性。乙醇溶液作为一种常用的固定剂,乙醇能快速渗入细胞,可凝固降解 DNA 相关的酶,而不损伤 DNA,从而达到较好的保存效果^[30]。然而有研究显示 DETs 和乙醇能破坏和影响蛋白酶 K 的结构或作用,对 DNA 提取及扩增不利^[31]。在对粪便中 DNA 的提取研究中,发现用于乙醇保存的粪便样品若直接提取,所得到的 DNA 很少,因此尝试在提取 DNA 前做相关预处理^[15]。在长距离运输中,乙醇在长途运输中属于违禁品,且携带液体不方便。因此,当短时间内不能处理好样品时,将样品以干燥-冷冻法保存回到实验室后,可以考虑将样品存放于 DETs 溶液或 95%/100% 乙醇溶液中保存以备后续实验使用。

综上所述,川金丝猴粪便样品为一种有效的非损伤性 DNA 研究样本,采取合适的样本保存方式,能够为物种遗传多样性评价等相关研究提供遗传信息。在保存野外样品时,通过干燥-冷冻法保存的粪便样品能够更为有效的保证样品 DNA 的提取质量和基因扩增效率;但为了降低样品 DNA 质量的影响,应尽可能缩短粪便样品的保存时间。

参 考 文 献(References)

- [1] 李明,魏辅文,饶刚,等.非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用[J].动物学报,2001,47(3): 338-342
Li Ming, Wei Fu-wen, Rao Gang, et al. Application of noninvasive sampling in conservation genetics[J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47 (3): 338-342
- [2] Morin D J, Kelly M J, Waits L P. Monitoring coyote population dynamics with fecal DNA and spatial capture-recapture [J]. Journal of Wildlife Management, 2016, 80(5): 824-836

- [3] Oka T, Takenaka O. Wild gibbons' parentage tested by non-invasive DNA sampling and PCR-amplified polymorphic microsatellites [J]. *Primates*, 2001, 42(1): 67-73
- [4] Rodgers T W, Janečka J E. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation[J]. *European Journal of Wildlife Research*, 2013, 59(1): 1-16
- [5] Woodruff S P, Lukacs P M, Christianson D, et al. Estimating Sonoran pronghorn abundance and survival with fecal DNA and capture-recapture methods [J]. *Conservation Biology the Journal of the Society for Conservation Biology*, 2016, 30(5): 1102-1111
- [6] 张于光, 何丽, 朵海瑞, 等. 基于粪便 DNA 的青海雪豹种群遗传结构初步研究[J]. *兽类学报*, 2009, 29(3): 310-315
Zhang Yu-guang, He Li, Duo Hai-rui, et al. A preliminary study on the population genetic structure of snow leopard in Qinghai province utilizing fecal DNA [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2009, 29 (3): 310-315
- [7] Chang Z F, Luo M F, Liu Z J, et al. Human influence on the population decline and loss of genetic diversity in a small and isolated population of Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. *Genetica*, 2012a, 140(140): 105-114
- [8] Chang Z F, Liu Z J, Yang J Y, et al. Noninvasive genetic assessment of the population trend and sex ratio of the Shennongjia population of Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012b, 57(10): 1135-1141
- [9] Malcolm K D, McShea W J, Garshelis D L, et al. Increased stress in Asiatic black bears relates to food limitation, crop raiding, and foraging beyond nature reserve boundaries in China [J]. *Global Ecology and Conservation*, 2014, 2: 267-276
- [10] 周芸芸, 张于光, 卢慧, 等. 西藏金丝野牦牛的遗传分类地位初步分析[J]. *兽类学报*, 2015, 35(1): 48-54
Zhou Yun-yun, Zhang Yu-guang, Lu Hui, et al. Preliminary analysis on taxonomic status of golden wild yak in Tibet [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2015, 35(1): 48-54
- [11] Bowlby H D, Fleming I A, Gibson A J F. Applying landscape genetics to evaluate threats affecting endangered Atlantic salmon populations [J]. *Conservation Genetics*, 2016, 17(4): 1-16
- [12] Ahmad K, Kumar V P, Joshi B D, et al. Genetic diversity of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) population of Ladakh, India, its relationship with other populations and conservation implications [J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9(1): 477
- [13] Wultsch C, Waits L P, Hallerman E M, et al. Optimizing collection methods for noninvasive genetic sampling of neotropical felids [J]. *Wildlife Society Bulletin*, 2015, 39(2): 403-412
- [14] Piggott M P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA [J]. *Wildlife Research*, 2005, 31(5): 485-493
- [15] 李娜, 李迪强, 王秀磊, 等. 粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响[J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(5): 341-345
Li Na, Li Di-qiang, Wang Xiu-lei, et al. The effect of different preservation methods of faeces on genomic DNA extraction from animal [J]. *International Journal of Genetics*, 2006, 29(5): 341-345
- [16] Brinkman T J, Schwartz M K, Person D K, et al. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets [J]. *Conservation Genetics*, 2010, 11(4): 1547-1552
- [17] Nsubuga A M, Robbins M M, Roeder A D, et al. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method [J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13(7): 2089-2094
- [18] Soto-Calderón I D, Ntse S, Mickala P, et al. Effects of storage type and time on DNA amplification success in tropical ungulate faeces [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(2): 471-479
- [19] Pakpour S, Milani A S, Chénier M R. A multi-criteria decision-making approach for comparing sample preservation and DNA extraction methods from swine feces [J]. *American Journal of Molecular Biology*, 2012, 2(2): 159-169
- [20] Liu G, Zang S, Li L, et al. Evaluation of fecal DNA preservation and extraction methods in Przewalski's horse [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2014, 6(3): 511-513
- [21] Mathay C, Hamot G, Henry E, et al. Method optimization for fecal sample collection and fecal DNA extraction [J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2015, 13(2): 79-93
- [22] Panasci M, Ballard W B, Breck S, et al. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success [J]. *Journal of Wildlife Management*, 2016, 75 (7): 1616-1624
- [23] 何丽, 张于光, 李迪强, 等. 川金丝猴 mtDNA D-loop 序列遗传多态性分析[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(1): 70-76
He Li, Zhang Yu-guang, Li Di-qiang, et al. Analysis on mitochondrial DNA D-loop sequences genetic polymorphism of *Rhinopithecus roxellana* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(1): 70-76
- [24] Chambers K E, Reichard U H, Möller A, et al. Cross-species amplification of human microsatellite markers using noninvasive samples from white-handed gibbons (*Hylobates lar*) [J]. *American Journal of Primatology*, 2004, 64(1): 19-27
- [25] Pan D, Li Y, Hu H, et al. Microsatellite polymorphisms of Sichuan golden monkeys [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50 (24): 2850-2855
- [26] Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D, et al. Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter-Collected Feces: Four Methods for Brown Bears [J]. *Conservation Biology*, 2005, 19 (1): 150-161
- [27] Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, et al. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(5): 857-868
- [28] Bayes M K, Smith K L, Alberts S C, et al. Testing the reliability of microsatellite typing from faecal DNA in the savannah baboon [J]. *Conservation Genetics*, 2000, 1(2): 173-176
- [29] Murphy M A, Waits L P, Kendall K C, et al. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples [J]. *Conservation Genetics*, 2002, 3(4): 435-440
- [30] Whittier C A, Dhar A K, Stem C, et al. Comparison of DNA extraction methods for PCR amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (COII) DNA from primate fecal samples [J]. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13(11): 771-779
- [31] 赵健元, 李进华. 对影响哺乳动物粪便 DNA 提取相关因素的探讨 [J]. *生物学杂志*, 2008, 25(3): 5-8
Zhao Jian-yuan, Li Jin-hua. Analysis of factors affecting extracting from mammalian faecal samples [J]. *Journal of Biology*, 2008, 25(3): 5-8