松墨天牛成虫标本保存及其 DNA 提取质量比较*

曲良建[1**] 王丽娟[2] 王青华[1] 王玉珠[1] 张永安[1***]

（1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 北京 100091；2. 中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091）

摘 要 **【目的】** 探讨适合 DNA 提取的天牛成虫标本保存方法。**【方法】** 采用 SDS-蛋白酶 K 消化法对液氮中冷冻保存、无水乙醇－20℃冷冻保存、无水乙醇室温保存和干标本室温保存且保存时间在 2 年以上的松墨天牛 *Monochamus alternates* Hope 成虫标本基因组 DNA 进行提取，并对不同保存方式提取的 DNA 样本进行了质量比较和分析。**【结果】** 在上述常见的松墨天牛成虫标本 4 种保存方式中，以液氮中冷冻保存效果最佳，其次为无水乙醇－20℃冷冻保存，插针干标本室温保藏效果最差。利用昆虫线粒体基因 CO Ⅰ和 CO Ⅱ的通用引物从上述 DNA 中均能够成功扩增出目的片段，测序结果证实扩增片段符合预期。**【结论】** 液氮和无水乙醇－20℃冷冻保存适合松墨天牛成虫标本长期保存，且不影响后续的 PCR 扩增和测序。

关键词 松墨天牛，天牛成虫，DNA 提取，保存方式

Comparison of the quality of genomic DNA extracted from adult specimens of *Monochamus alternatus* preserved by different methods

QU Liang-Jian[1**] WANG Li-Juan[2] WANG Qing-Hua[1] WANG Yu-Zhu[1] ZHANG Yong-An[1***]

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;
2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract **[Objectives]** To find which method of preserving *Monochamus alternatus* specimens produced the best quality genomic DNA. **[Methods]** Genomic DNA from *Monochamus alternatus* adults that had been preserved using different methods (liquid nitrogen, 100% ethanol at –20℃, 100% ethanol at room temperature and museum specimens) for more than 2 years, was extracted using the SDS-proteinase K method and the quality of the extracted genomic DNA compared. **[Results]** The best

* 资助项目：国家自然科学基金项目（30972378）；863 课题（2012AA101503）

**E-mail: qulj2001@caf.ac.cn

***通讯作者，E-mail: zhangyab@caf.ac.cn

收稿日期：2013-11-11，接受日期：2013-12-29

quality genomic DNA was obtained from specimens that had been stored in liquid nitrogen, and the next best from those that had been preserved in 100% ethanol at −20℃. **[Conclusion]** The best quality DNA was extracted from specimens that had been frozen in liquid nitrogen or preserved in 100% ethanol at −20℃. The DNA samples obtained from such specimens are suitable for PCR amplification and sequencing.

Key words *Monochamus alternates*, longicorn adult, DNA extraction, preservation methods

松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope，曾用名为松褐天牛，属鞘翅目 Coleoptera，天牛科 Cerambycidae，沟胫天牛亚科 Lamiinae，墨天牛属 *Monochamus*，是我国松树上的重要蛀干害虫（萧刚柔，1992；孙飞等，2010）。松墨天牛除通过直接取食为害导致松树衰弱甚至死亡外，同时又是松树毁灭性病害松材线虫病（Pine wilt disease，PWD）的主要媒介昆虫，能有效传播松材线虫病的致病原松材线虫 *Bursaphelenchu xylophilus*（Steiner and Buhrer 1934）（Nickle 1970）而导致松树的大面积死亡（Kobayashi *et al.*，1984；Mamiya，1988；杨宝君等，2003；Akbulut *et al.*，2012；柳建定等，2012），已成为我国为害最严重的生物灾害之一，给林业造成重大的生态灾难和巨大经济损失。

有效控制松墨天牛种群数量，切断松材线虫、媒介昆虫和松树三者之间侵染循环已成为当前防治松材线虫病的主要策略（王四宝等，2003；宁眺等，2004；Togashi，2008；Akbulut and Stamps，2012；杨忠岐等，2012）。随着对松墨天牛研究的深入，从 DNA 水平上研究松墨天牛的系统发育和遗传进化，以及开展重要基因的功能研究等逐渐成为研究中的新热点（Kawai *et al.*，2006；Shoda-Kagaya，2007；Song *et al.*，2008）。然而，如何妥善保存野外采集到的松墨天牛样本，提取高质量的基因组 DNA 是开展上述工作的基础，基因组 DNA 提取质量的优劣与下游实验的成功与否密切相关。目前对松墨天牛标本的保存研究主要集中在幼虫，松墨天牛成虫体壁坚硬，透水和透气性较差，其室内保存和 DNA 提取相对较为困难，目前有关这方面的研究鲜有报道。本文通过对松墨天牛成虫室内常见的几种保存方式及其对 DNA 提取质量的影响进行比较研究，以期为今后深入开展松墨天牛的分子系统学及其他分子生物学研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及处理

松墨天牛成虫为 2008 年 7 月采集于浙江省杭州市余杭区（表 1），活体带回实验室后分别按以下 4 种方式进行保存：①液氮冷冻保存；②无水乙醇－20℃冷冻保存；③无水乙醇室温保存；④插针干标本保存。

在提取松墨天牛成虫基因组 DNA 时，先按照下述方式对标本进行预处理：①液氮冷冻保存、无水乙醇－20℃保存和无水乙醇室温保存的松墨天牛成虫标本先用双蒸水漂洗，然后用双蒸水侵泡 24 h 后冲洗晾干；②插针干标本保存的松墨天牛放在 STE 缓冲液(0.1 mol/ L NaCl，10 mmol/ L Tris-Cl pH 8.0，1 mmol/ L EDTA pH 8.0)中侵泡 24 h 后用双蒸水冲洗后晾干。

1.2 样本基因组 DNA 提取

松墨天牛成虫标本基因组 DNA 提取方法在参照 Wheeler 等（1993）的基础上略有改进，每种保存方式的样本重复提取 5 次，具体操作方法如下：①用灭菌剪刀剖开预处理后的松墨天牛成虫胸部，用镊子取胸部肌肉置于提前遇冷的研钵

表 1 松墨天牛成虫标本采集与保存

Table 1 The situation of *Monochamus alternatus* adult samples

保存方式 Preservation methods	保存虫态 Insects development	采集地点 Locality site	采集时间 Collection date	DNA 提取时间 Extraction date
液氮冷冻保存	成虫	浙江杭州	2010.7	2012.9
Liquid nitrogen	Adult	Hangzhou, Zhejiang		
无水乙醇－20℃保存	成虫	浙江杭州	2010.7	2012.9
100% ethanol at－20℃	Adult	Hangzhou, Zhejiang		
无水乙醇室温保存	成虫	浙江杭州	2010.7	2012.9
100% ethanol at room temperature	Adult	Hangzhou, Zhejiang		
干标本室温保存	成虫	浙江杭州	2010.7	2012.9
Museum specimens at room temperature	Adult	Hangzhou, Zhejiang		

中，加入液氮后研磨至粉末状。②快速称取研磨后的样品 100 mg 于 1.5 mL 离心管中，然后加入 1 mL SDS 消化液(20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4；20 mmol/L EDTA，pH 8.0；0.5% SDS) 在漩涡振荡器上充分震荡，再加入 30 μL 浓度为 20 mg/mL 的蛋白酶 K，充分摇匀后将混合液置于 65℃的水浴锅中消化 12 h。③12 000 r/ m 离心 10 min，取上清，加入酚和氯仿/异戊醇（24∶1）各 0.5 mL，充分混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，并重复此步骤 2 次。④加入 1 mL 氯仿/异戊醇（24∶1)，充分混匀后 12 000 r/m 离心 10 min，取上清；加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/ L 的醋酸钠（pH 5.2)充分混匀后置于 –20℃冰箱中 2 h。⑤12 000 r/m 离心 10 min，弃水相，70%乙醇洗涤沉淀 2 次，倒掉乙醇后风干，将沉淀物溶于 20 μL TE 中（pH 8.0)，并加入 RNaseA 进行消化，然后放入－20℃冰箱中保存备用。

1.3　基因组 DNA 纯度及质量浓度检测

每个样品取 2 μL DNA 溶解液在 NanoDrop2000 超微量分光光度计（Thermo Fisher Scientific 公司，美国）测定波长 260 和 280 nm 的光吸收值（*OD*)，并自动计算 OD_{260}/OD_{280} 的比值以及相应的质量浓度值，比较不同保存条件下提取样品 DNA 的浓度和纯度。一般情况下，OD_{260}/OD_{280} 比值低于 1.6 时，认为提取的样品中存在蛋白质或酚污染；其比值若高于 1.9，则认为样品中存在有 RNA 污染。

1.4　基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

取 5 μL DNA 溶解液于 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳，用凝胶成像系统（Syngene G:BOX，英国）拍照并保存试验结果。

1.5　目标 DNA 扩增及测序

利用文献报道的通用引物扩增松墨天牛的线粒体 DNA 细胞色素 c 氧化酶亚基Ⅰ基因和Ⅱ基因（mtDNA COⅠ和 mtDNA COⅡ)，扩增 COⅠ基因的上游引物为 J-1718：5′-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3′，下游引物为 N-2191：5′-CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3′，扩增片段大小为 504 bp 左右；扩增 COⅡ基因的上游引物为 0-tleu：5′-TAGTGCAATGGATITAAACC-3′，下游引物 0-tlys：5′-GTTTAAGAGACCAGTACTTC-3′（Wheeler *et al.*，1993；Kim *et al.*，1999)，扩增片段大小为 750 bp 左右。PCR 反应总体积为 50 μL，包含 2×Taq MasterMix 25 μL，正反引物各 2 μL，ddH_2O 19 μL，DNA 模板 2 μL。PCR 扩增程序为：95℃预变性 5 min，然后进行 35 个循环，94℃ 30 s，

CO Ⅰ基因退火温度 53℃ 1 min，CO Ⅱ基因退火温度 48℃ 1 min，72℃ 延伸 90 s。循环结束后 72℃ 延伸 7 min。所有扩增引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成，2×Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司，PCR 扩增产物测序由北京三博远志生物技术有限公司完成，测序结果与网上比对以确定扩增结果是否为目标片段。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度比较

利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测每个提取样本基因组 DNA 的 OD_{260} 和 OD_{280}，并统计相应的 OD_{260}/OD_{280} 的比值以及其质量浓度值（表 2）。实验结果表明，在松墨天牛成虫 4 种常见的保存方式中，以液氮中冷冻保存标本提取的基因组 DNA 浓度最高（331 μg/mL），其次为无水乙醇－20℃保存（260 μg/mL）和无水乙醇室温保存（123 μg/mL），插针干标本室温保存方式提取的 DNA 浓度最低（43 μg/mL），4 种不同保存方式提取的基因组 DNA 浓度经 Duncan 氏多重比较后差异均极显著（$P<0.01$）。此外，松墨天牛成虫 4 种保存方式中提取的基因组 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.6～1.9 之间，DNA 纯度达到要求，属于高质量的 DNA。

表 2 不同保存方式下样品基因组 DNA 纯度与浓度检测

Table 2 The purity and concentration of DNA samples obtained with different preservation methods

标本保存方式 Preservation methods of samples	OD_{260} Absorbance with 260 nm	OD_{280} Absorbance with 280 nm	OD_{260}/OD_{280} Ration of absorbance	DNA 浓度（μg/mL） Concentration
液氮冷冻保存 Liquid nitrogen	6.62 ± 0.45	3.62 ± 0.06	1.85 ± 0.07	331 ± 11.91 d
无水乙醇－20℃保存 100% ethanol at－20℃	5.20 ± 0.14	2.83 ± 0.04	1.83 ± 0.06	260 ± 7.98 c
无水乙醇室温保存 100% ethanol at room temperature	2.46 ± 0.15	1.34 ± 0.06	1.83 ± 0.08	123 ± 8.33 b
插针干标本室温保存 Museum specimens at room temperature	0.86 ± 0.20	0.50 ± 0.03	1.69 ± 0.04	43 ± 9.91 a

表中数据为 5 次重复的平均值±标准差(mean ± SD)，样品浓度列数据后不同字母表示各处理经 Duncan's 新复极差法进行多重比较后，在 $P<0.01$ 水平上差异显著。

Values in the table are mean of five observations ± standard deviation, and values within concentration column followed by different letters are significantly different at 0.01 by Duncan's multiple range test.

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

松墨天牛成虫 4 种不同保存方式提取的基因组 DNA 经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。结果显示，所有保存方式的样品均可获得一定量的基因组 DNA，但不同保存方式提取的 DNA 质量存在较大差异。从图 1 可以看出，其质量顺序依次为：液氮冷冻保存>无水乙醇–20℃保存>无水乙醇室温保存>插针干标本室温保存。在 4 种保存方式中，插针干标本室温保存的样品 DNA 降解严重，电泳条带微弱且扩散现象较为明显。

2.3 目标基因扩增与测序

分别以提取 4 种保存方式松墨天牛成虫基

因组 DNA 为模板，利用合成的通用引物对松墨天牛线粒 DNA 的 CO Ⅰ和 CO Ⅱ基因的保守区域进行 PCR 扩增，扩增预期片段大小依次为 504 bp 和 750 bp。PCR 扩增结果经琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 2 和图 3，在 500 bp 和 750 bp 处各有一条明显的目标亮带，片段大小符合预期。为进一步验证扩增结果是否为目标片段，对松墨天牛线粒 DNA 的 CO Ⅰ和 CO Ⅱ基因的 PCR 扩增结果直接送交北京三博远志生物技术有限公司进行 DNA 测序，测序结果经 GenBank 比对证实扩增片段为目标片段。

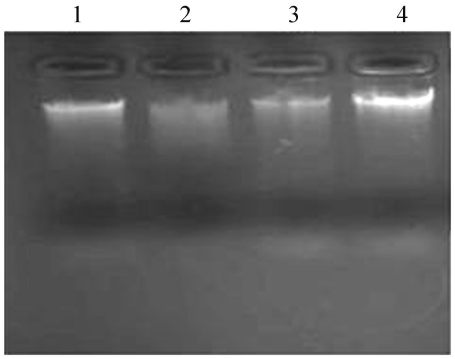

图 1　不同方法保存的松墨天牛成虫基因组 DNA 的电泳图谱

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis pattern of genomic DNA from longicorn adults in different preservation methods

1：无水乙醇－20 ℃保存 Samples preserved in 100% ethanol under －20 ℃; 2：插针干标本保存 Museum specimen longicorn beetles; 3：无水乙醇室温保存 Samples preserved in 100% ethanol under room temperature; 4：液氮冷冻保存 Samples preserved in liquid nitrogen.

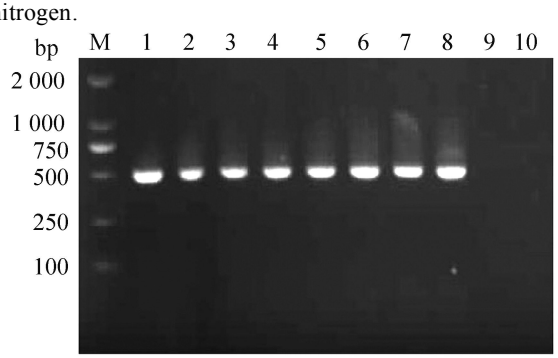

图 2　不同方法保存松褐天牛成虫 CO Ⅰ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 2　PCR amplification of CO Ⅰ gene in *Monochamus alternatus* samples under different preservation methods

M: DNA marker; 1-2: 无水乙醇－20 ℃保存 Samples preserved in 100% ethanol under －20 ℃; 3-4: 插针干标本保存 Museum specimen longicorn beetles; 5-6: 无水乙醇室温保存 Samples preserved in 100% ethanol under room temperature; 7-8: 液氮冷冻保存 Samples preserved in liquid nitrogen; 9-10: 无模板对照 No template control.

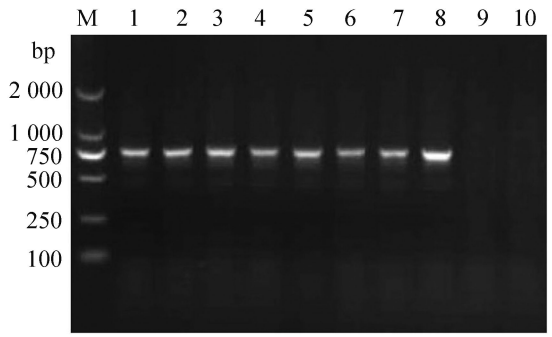

图 3　不同方法保存松褐天牛成虫 CO Ⅱ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 3　PCR amplification of CO Ⅱ gene in *Monochamus alternatus* samples under different preservation methods

M: DNA marker; 1-2: 无水乙醇－20 ℃保存 Samples preserved in 100% ethanol under －20 ℃; 3-4: 插针干标本保存 Museum specimen longicorn beetles; 5-6: 无水乙醇室温保存 Samples preserved in 100% ethanol under room temperature; 7-8: 液氮冷冻保存 Samples preserved in liquid nitrogen; 9-10: 无模板对照 No template control.

3　讨　论

DNA 作为生物体重要的遗传资源，包含着丰富的生物学信息，是生物进化史的重要记录者，获取高质量的基因组 DNA 是开展任何 DNA 下游工作的前提和基础。在活体细胞中，因 DNA 存在完善的修复机制能够确保 DNA 的完整性。当机体死亡后，DNA 因缺乏修复机制易通过水解或氧化作用等而自发地降解（庞峻峰和张亚平，2001）。因此，研究昆虫标本的妥善保存方法，以及基因组 DNA 提取方法，阻止或延缓其基因组 DNA 的降解，对深入开展其分子生物学研究具有重要意义。

液氮保存（–196℃）是一种能使保存的活细胞物质代谢和生长几乎完全停止的超低温冷冻保存方式，其保存效果虽明显优于其他 3 种保存方法，但因液氮不便于携带且具有挥发性，长时间保存昆虫标本需要专门的设备和大量资金，保存成本较高，从而极大限制其在昆虫标本保存中的应用。乙醇能够迅速渗透进入昆虫组织细胞使蛋白质凝固，致使多种水解酶失活而不损伤 DNA，从而达到保存 DNA 的目的（闫华超等，2011）。此外，乙醇保存具有成本低，简单方便，便于携带且保存效果较好等优点，特别适用于野外长时间采集标本和室内保存（张德华等，2004）。本研究通过试验证实松墨天牛成虫标本在无水乙醇中室温和 –20℃保存 2 年以上均可提取到高质量的 DNA，且低温保藏效果优于室温保存，该实验结论与前人研究结果吻合（张迎春等，2002；谭亮魁和王文凯，2008；闫华超等，2011；郑斯竹等，2012）。在本文中提及的松墨天牛成虫 4 种保存方式中，以插针干标本室温保存效果最差，虽然其经 STE 缓冲液浸泡 24 h 预处理，但最终提取的基因组 DNA 浓度仅为 43 μg/mL，远低于在液氮中（331 μg/mL）和无水乙醇（260 μg/mL 和 123 μg/mL）中的保存结果。造成这种结果的原因除与标本采集后的处理方式和标本保存条件等因素有关外，干标本基因组 DNA 提取方法的优化、改进和完善也是今后急需加强研究的重要科学问题。

为从昆虫干标本中提取高质量 DNA 用于后续研究，在标本处理和保存过程中应重视下述问题：（1）尽快处死采集到的昆虫标本。熊平等（2010）通过研究证实人体组织细胞中 DNA 含量随死亡时间延长呈下降趋势，两者之间存在线性关系；谭亮魁和王文凯（2008）亦通过试验证实天牛死亡时间的长短与其基因组 DNA 提取成功与否密切相关。因此，昆虫样本采集后应尽快将其处死，以尽可能减少其对 DNA 的不利影响。（2）选择合适的固定剂。为较好地保存标本外形和内部分子结构，常用固定剂对野外采集的昆虫标本进行固定处理。目前常用的固定剂主要是甲醛和乙醇（宋伦等，2006；闫华超等，2011）。甲醛虽具有渗透力强、固定速度快、防腐杀菌、对标本的形态结构固定得较好等优点，但易使保存标本的 DNA 受损。研究证实甲醛在低浓度时对 DNA 的损伤主要表现为断裂，高浓度时则以交联作用为主，并且存在 DNA-DNA 交联和 DNA-蛋白质交联两种形式，而且甲醛因其羰基亲电性和较小的空间位阻，使其易于与核酸及蛋白质发生交联-加合反应，从而影响蛋白酶 K 对蛋白质消化的效率，进而影响样本的 DNA 提取质量（Kaufman *et al.*，2000；袭著革等，2004；闫华超等，2011）。同时，甲醛还可对 DNA 的碱基进行甲基化等化学修饰，从而潜在影响后续的 PCR 扩增和测序等（Masuda *et al.*，1999）。此外，甲醛因空气中易氧化成甲酸而对 DNA 有较强的降解作用，会对保存标本的 DNA 分子造成严重的破坏（徐来祥等，2002；杜世章和陈立侨，2004；季清娥等，2005；黄为等，2008；闫华超等，2011）。因此，若保存的昆虫样本是用于 DNA 提取和开展分子生物学研究，应谨慎使用甲醛作为标本固定剂。乙醇作为昆虫标本的固定剂已在昆虫标本保存中广泛应用，王义权等（1999）和季清娥等（2005）认为用含乙二胺四乙酸的乙醇更有利于保存标本的 DNA。黄为等（2008）通过试验证实聚乙二醇作为标本固定剂对标本 DNA 的保存效果优于乙醇，并认为其可作为一种安全便利的、可替代乙醇且有良好发展前景的固定剂应用于生物标本的保存。（3）标本的干燥方式。Pääbo（1989）认为，从动物死亡到标本完全干燥时间的长短是决定该标本能够保留多大 DNA 分子最关键的因素，而与标本保存年代无关。从生物化学角度分析，酶活动对 DNA 的保存十分不利，动物死亡后因其体内代谢停止，导致细胞内酶系统失去调控而开始自身降解，但酶这种自身降解作用会随着细胞内水分的丧失逐渐减少直至停止。因此，水分存在与否、存在时间的长短与 DNA 的保存密切相关。国内学者在对瓢虫干标本基因组提取研究中亦证实基因组 DNA 提取效果与标本的保存年代无直接关系，并通过试验进一步证实烘干标本在 DNA 提取效果方面明显优于自然干燥标本（张迎春和郑

哲民，1999；张迎春等，2002)。本研究中松墨天牛成虫插针标本采取室内自然条件阴干保存的方法，因松墨天牛体壁坚硬，透气和透水性差，其在室内阴干的时间较长，从而导致其 DNA 部分降解，这可能是导致该标本 DNA 提取效果较差的关键因素。(4) 标本的保存方式。昆虫标本的保存方式与其最终 DNA 的提取效果亦密切相关，在标本保存过程中应尽可能避免高温、氧化和化学修饰等不利因素对标本 DNA 的影响，采用干燥、低温、密封等不利于标本 DNA 降解的保存方式，同时还需注意防霉与防虫。

改进和优化提取方法是提高昆虫干制标本 DNA 质量的另一重要因素。目前对于昆虫干标本 DNA 的提取尚缺乏成熟的技术，试验中主要采用蛋白酶 K 消化后用酚、氯仿去除蛋白质的抽提方法，大部分报道过的标本提取法均属于这种或对此法稍加修改（庞峻峰和张亚平，2001)。昆虫干制标本因体内细胞长期失水易导致 DNA 与蛋白质高度交联，而目前昆虫标本 DNA 提取过程中使用的蛋白酶 K 因不能水解 DNA-蛋白质交联体致使大部分 DNA 在随后的抽提过程中随蛋白质一起被去除（Kaufman *et al*.，2000；庞峻峰和张亚平，2001)。因此，寻求针对 DNA-蛋白质交联体的裂解酶是提高干制标本 DNA 提取质量的关键因素。在尚未研发出针对干制标本中 DNA-蛋白质交联体的高效裂解酶前，可通过对已有提取方法优化而提高干制标本的 DNA 提取质量。(1) 干制标本的预处理。在干制标本 DNA 提取前，需要提前掌握该标本保存前的处理和干燥等信息情况并采取相应的预处理措施。朴美花等（2002）认为，在提取干标本 DNA 前让其在 STE 缓冲液中浸渍数小时后再用冲洗缓冲液冲洗是从干标本中提取基因组 DNA 的重要环节，可大大减少基因组 DNA 提取过程中造成的机械断裂及其他阻断剂，有利于保护干标本基因组 DNA 和减轻或排除对 PCR 扩增反应的影响。此外，研发更加高效的干制标本浸渍缓冲液，并研究其适宜浸渍时间可能是今后改进干制标本 DNA 提取质量的有效措施之一。(2) 干制标本的提取过程。在干制标本 DNA 提取过程中，增加裂解液体积和蛋白酶 K 浓度、延长裂解时间、增加苯酚抽提次数等措施能够提高 DNA 样品的纯度和产量(Kösel and Graeber，1994；Díaz-Cano and Brady，1997；张国彦和翟保平，2009)，在消化过程中加入还原剂（巯基乙醇或二硫苏糖醇)亦可提高 DNA 的得率(Pääbo，1989)。张国彦和翟保平（2009）研究证实利用溴化十六烷三甲基铵法（CTAB）和传统 SDS-蛋白酶 K 消化法提取样本 DNA 效果显著高于传统的 SDS-蛋白酶 K 抽提方法。此外，标本的取样部位和取样总量亦影响最终 DNA 的提取效果。(3) 干制标本 DNA 性质的研究。目前对昆虫干制标本 DNA 性质的了解还远远不够，加强该方面的研究是改进和完善其基因组 DNA 提取方法的前提。相信在不久的将来，随着对干制标本 DNA 性质研究的不断深入及各学科的密切合作，最终会在干制标本基因组 DNA 提取方法上取得新的突破。

参考文献 (References)

Akbulut S, Stamps WT, 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: a review of the biology and ecology of *Monochamus* species. *Forest Pathol*., 42(2): 89–99.

Díaz-Cano SJ, Brady SP, 1997. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn. Mol. Pathol.*, 6(6): 342–346.

Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow RA, 2000. In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *P. Natl. Acad. Sci.*, 97(14): 7772–7777.

Kawai M, Shoda-Kagaya E, Maehara T, Zhou ZH, Lian CL, Iwata R, Yamane A, Hogetsu T, 2006. Genetic structure of pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) populations in Northeast Asia: consequences of the spread of pine wilt disease. *Environ. Entomol.*, 35(2): 569–579.

Kim CG, Hoshizaki S, Huang YP, Tatsuki S, Ishikawa Y, 1999. Usefulness of mitochondrial COII gene sequences in examining phylogenetic relationships in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacali*s, and allied species (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Entomol. Zool*., 34(4): 405–412.

Kobayashi F, Yamane A, Ikeda T, 1984. The Japanese pine sawyer

beetle as the vector of pine wilt disease. *Annu. Rev Entomol.*, 29(1): 115–135.

Kösel S, Graeber MB, 1994. Use of neuropathological tissue for molecular genetic studies: parameters affecting DNA extraction and polymerase chain reaction. *Acta Neuropathol.*, 88(1): 19–25.

Mamiya Y, 1988. History of pine wilt disease in Japan. *J. Nematol.*, 20(2): 219.

Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K, 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.*, 27(22): 4436–4443.

Pääbo S, 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *P. Natl. Acad. Sci.*, 86(6): 1939–1943.

Shoda-Kagaya E, 2007. Genetic differentiation of the pine wilt disease vector *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) over a mountain range-revealed from microsatellite DNA markers. *B. Entomol. Res.*, 97(2): 167–174.

Song L, Liu XX, Zhang YA, Zhang QW, Zhao ZW, 2008. The cloning and expression of α-tubulin in *Monochamus alternatus*. *Insect Mol. Biol.*, 17(5): 495–504.

Togashi K, 2008. Vector-nematode Relationships and Epidemiology in Pine Wilt Disease. Pine Wilt Disease. Tokyo: Springer Japan. 162–183.

Wheeler WC, Cartwright P, Hayashi CY, 1993. Arthropod phylogeny: a combined approach. *Cladistics*, 9(1): 1–39.

杜世章, 陈立侨, 2004. 从动物固定标本中提取 DNA 方法研究. 四川大学学报, 41(4): 893－895. [DU SZ, CHEN LJ, 2004. Studies on the extraction of DNA from formal-fixed specimans. *Journal of Sichuan University,* 41(4): 893–895.]

黄为, 赵元蒨, 唐安科, 2008. 3 种不同方法对标本基因组 DNA 固定和抽提效果研究. 重庆师范大学学报, 25(2): 20－24. [HUANG W, ZHAO YJ, TANG AK, 2008. Studies of the influential factors of extraction of DNA from fixed samples preserved with three different kinds of methods. *Journal of Chongqing Normal University,* 25(2): 20–24.]

季清娥, 杨建全, 吕宝乾, 李芳, 黄居昌, 陈家骅, 2005. 不同保存条件下茧蜂标本基因组 DNA 的降解. 华东昆虫学报, 14(2): 115－117. [JI QE, YANG JQ, LV BQ, LI F, HUANG JC, CHEN JH, 2005. Degradation of Braconidae specimen genomic DNA under different preservation conditions, 2005. *Entomological Journal of East China,* 14(2): 115–117.]

柳建定, 李百万, 王菊英, 赵宝安, 舒金平, 2012. 浙江省余姚地区松褐天牛的生活世代. 应用昆虫学报, 49(5): 1282－1286. [LIU JD, LI BW, WANG JY, ZHAO BA, SHU JP, 2012. Life history of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) in Yuyao city，Zhejiang Province, 2012. *Chinese Journal of Applied Entomology,* 49(5): 1282–1286.]

宁眺, 方宇凌, 汤坚, 孙江华, 2004. 松材线虫及其关键传媒墨天牛的研究进展. 昆虫知识, 41(2): 97–104. [NING T, FANG YL, TANG J, SUN JH, 2004. Advances in research on *Bursaphelenchus xylophilus* and its key vector *Monochamus* spp. *Entomological Knowledge*, 41(2): 97–104.]

庞峻峰, 张亚平, 2001. 标本 DNA 研究进展. 动物学研究, 22(6): 490–496. [PANG JF, ZHANG YP, 2001. Progress of Old Sample DNA Study. *Zoological Research,* 22(6): 490–496.]

朴美花, 陈学新, 何俊华, 2002. 膜翅目昆虫干标本的基因组 DNA 提取. 动物分类学报, 27(4): 672－676. [PIAO MH, CHEN XX, HE JH, 2002. Extraction of genome DNA from dried specimens of Hymenopteran insects (insecta), 2002. *Actazootaxonomica Sinica*, 27(4): 672–676.]

宋伦, 周遵春, 王年斌, 董颖, 2006. 海洋微藻活体及乙醇固定状态下基因组 DNA 的微量提取方法. 应用与环境生物学报, 12(5): 710－714．[SONG L, ZHOU ZC, WANG NB, DONG Y, 2006. Genome DNA extraction from living and alcohol-fixed marine micro-algae. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 12(5): 710–714.]

孙飞, 李祥瑞, 刘小侠, 张青文, 2010. 松褐天牛六种类型的触角感器的超微结构. 昆虫知识, 47(2): 347–354. [SUN F, LI XR, LIU XX, ZHANG QW, 2010. Ultrastructure of six types of antennal sensilla in *Monochamus alternatus*. *Entomological Knowledge,* 47(2): 347–354.]

谭亮魁, 王文凯, 2008. 天牛基因组 DNA 提取方法和标本保存方式的比较研究. 安徽农业科学, 36(12): 4869–4871. [TAN LK, WANG WK, 2008. [Comparative study on different extracting methods of genomic DNA from Cerambycidae and different samples preservation modes, 2008. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(12): 4869–4871.]

王四宝, 樊美珍, 李增智, 黄勇平, 2003. 松褐天牛天敌微生物的研究进展. 昆虫知识, 40(4): 303–307. [Advances in research on natural microbial enemies of *Monochamus alternatus*, 2003. *Entomological Knowledge,* 40(4): 303–307.]

王义权, 周开亚, 徐珞珊, 徐国钧, 1999. 不同固定剂保存动物组织标本对 RAPD 反应的影响. 动物学杂志, 34(1): 33－37. [WANG YQ, ZHOU KY, XV GS, XV GJ, 1999. The analusis of RAPD reaction affected by the DNA template extracted from samples fixed in different fixatives, 1999. *Chinese Journal of Zoolog y*, 34(1): 33–37]

袭著革, 晁福寰, 杨丹凤, 孙咏梅, 李官贤, 张华山, 张伟, 杨玉花, 刘焕亮, 2004. 甲醛致核酸损伤作用的实验研究. 环境科学学报, 24(4): 719−722. [XI ZG, CHAO FH, YANG DF, SUN YM, LI GX, ZHANG HS, ZHANG W, YANG YH, LIU HL, 2004. Experimental study of the DNA damage induced by formaldehyde. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 24(4): 719−722.]

萧刚柔, 1992. 中国森林昆虫. 北京: 中国林业出版社. 483−485. [Xiao GR, 1992. Forest Insects of China. China Forestry Press, Beijing, 483-485.]

熊平, 郭萍, 张静, 2010. 组织细胞 DNA 降解与死亡时间的相关性的显微拉曼光谱分析. 光谱学与光谱分析, 30(6): 1511−1515. [XIONG P, GUO P, ZHANG J, 2010. Raman micro spectroscopic analysis of relationship between DNA degradation in tissue cells and postmortem interval. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 30(6): 1511−1515.]

徐来祥, 张知彬, 宋铭晶, 曹小平, 王福生, 张春光, 2002. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法. 动物学报, 48(2): 264−269. [XV LX, ZHANG ZB, SONG MJ, CAO XP, WANG FS, ZHANG CG, 2002. A method of extracting genomic DNA from animal specimen preserved in formalin. *Acta Zoologica Sinica*, 48(2): 264−269.]

闫华超, 贾少波, 王雪梅, 2011. 不同方法保存的蜜蜂基因组 DNA 提取的比较. 生物技术通讯, 21(5): 726−732. [YAN HC, JIA SB, WANG XM, 2011. Genomic DNA extraction from *Apis cerana cerana* preserved by different methods. *Letters in Biotechnology*, 21(5): 726−732.]

杨宝君， 潘宏阳，汤坚，王玉嬿, 汪来发, 2003. 松材线虫病. 北京：中国林业出版社. 48−56. [YANG BJ, PANG HY,TANG J, WANG LF, 2003. Pine Wilt Disease, *Bursaphelenchus xylophilus*. China Forestry Press, Beijing, 48-56.]

杨忠岐, 王小艺, 张翌楠, 司徒春南, 王健, 付甫永, 2012. 释放花绒寄甲和设置诱木防治松墨天牛对松材线虫病的控制作用研究. 中国生物防治学报, 28(4): 490−495. [YANG ZQ, WANG XY, ZHANG YN, SITU CN, WANG J, FU FY, 2012. Control effect of the pine wood nematode disease transmitted by *Monochamus alternatus* through releasing parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire) and using bait-trees. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(4): 490−495.]

张德华, 周开亚, 孙红英, 2004. 乙醇保存的动物标本基因组 DNA 提取方法的比较. 生物学杂志, 21(6): 46−48. [ZHANG DH, ZHOU KY, SUN HY, 2004. Comparison of analytical methods for extracting genomic DNA from ethanol-preserved animal specimens. Journal of Biology, 21(6): 46−48.]

张国彦, 翟保平, 2009. 鳞翅目成虫乙醇保存标本基因组 DNA 的提取及在微卫星研究中的应用. 昆虫学报, 52(3): 345−352. [ZHANG GY, ZHAI BP, 2009. High-quality genomic DNA extraction from ethanol-preserved lepidopteran adults and its application in microsatellite research. *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 345−352.]

张迎春, 刘波, 郑哲民, 李力, 2002. 不同保藏处理的昆虫标本 DNA 提取及其随机扩增多态 DNA 反应. 昆虫学报, 45(5): 693−695. [ZHANG YC, LIU B, ZHENG ZM, LI L, 2002. DNA extraction and RAPD-PCR of insect specimens preserved with different methods. *Acta Entomologica Sinica,* 45(5): 693−695.]

张迎春, 郑哲民, 1999. 瓢虫干标本基因组 DNA 的提取剂 RAPD 分析. 西北大学学报, 29(6): 581−583. [ZHANG YC, ZHENG ZM, 1999. RAPD analysis of genomic DNA specimens of dry coccinellid specimens. *Journal of Northwest University*, 29(6): 581−583.]

郑斯竹, 安榆林, 徐梅, 杨晓军, 常虹, 嵇保中, 2012. 天牛幼虫保存与 DNA 提取方法比较研究. 中南林业科技大学学报, 32(5): 144 − 148. [ZHENG SZ, AN YL, XV M, YANG XJ, CHANG H, JI BZ, 2012. Comparative studies on DNA extraction and preservation of *Monochamus alternatus* larva specimens. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 32(5): 144−148.]