粉蚧标本保存与 DNA 提取方法的比较*

魏亦寒[1, 2**] 郑斯竹[2] 蔡 平[1***] 詹国辉[2] 高 渊[2]

（1. 苏州大学金螳螂建筑与城市环境学院，苏州 215123；2. 苏州出入境检验检疫局，苏州 215000）

摘 要 **【目的】** 探讨适合粉蚧的标本保存及 DNA 提取方法。**【方法】** 采用改良 CTAB 法、改良 SDS 法、GenMagBio 动物细胞组织/细胞基因组磁珠法以及 GeneJET Genomic DNA 纯化试剂盒法 4 种方法分别对新鲜活体 4℃、无水乙醇－20℃和无水乙醇 4℃ 3 种保存方式且保存一年以上的扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 成虫进行 DNA 提取，并对不同提取方法所获取的 DNA 纯度与质量浓度进行分析比较验证。**【结果】** 3 种保存方式中，新鲜活体效果最好，其次为无水乙醇-20℃。无水乙醇 4℃效果和无水乙醇－20℃无明显区别，均存在一定程度的降解。对于新鲜活体标本，以 CTAB 法提取的 DNA 质量最高，其次为 GenMagBio 磁珠法和 SDS 法，GeneJET 试剂盒法最差；对于无水乙醇－20℃和 4℃保存时间较长的标本，磁珠法提取的 DNA 质量明显优于其余 3 种方法。**【结论】** 无水乙醇－20℃可用于粉蚧长期保存，可满足后续分子研究需要；改良 CTAB 法对新鲜粉蚧成虫 DNA 提取效果较好，磁珠法对长时间保存 DNA 存在一定程度降解的粉蚧成虫效果较好。

关键词 扶桑绵粉蚧，保存方式，DNA 提取，CTAB 法，磁珠法

Comparison of methods for extracting and preserving the DNA of adult Pseudococcidae specimens

WEI Yi-Han[1, 2**] ZHENG Si-Zhu[2] CAI Ping[1***] ZHAN Guo-Hui[2] GAO Yuan[2]

(1. Gold Mantis School of Architecture and Urban Environment of Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Suzhou Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau，Suzhou 215000, China)

Abstract **[Objectives]** To find which method of extracting and preserving the DNA of adult Pseudococcidae specimens produced the best quality genomic DNA. **[Methods]** Genomic *Phenacoccus solenopsis* DNA from either fresh living adult specimens, or those that had been preserved for over 1 year in 100% ethanol at－20℃, or 100% ethanol at 4℃, was extracted using four methods; CTAB, SDS, GenMagBio kit and GeneJET kit, and the quality and purity of the extracted genomic DNA compared. **[Results]** The best quality genomic DNA was obtained from fresh living specimens. Samples that had been stored in 100% ethanol at －20℃ or 100% ethanol at 4℃ showed evidence of DNA degradation, there was no significant difference in the quality of the DNA obtained from these two storage methods. For fresh samples, the CTAB method produced the best quality DNA, the GenMagBio kit and SDS were produced the next best, and the GeneJET kit produced the worst. However, for samples that had been preserved in 100% ethanol, the GenMagBio kit was the best extraction method. **[Conclusion]** Storage in 100% ethanol at －20℃ is suitable for the long term preservation of adult Pseudococcidae specimens and DNA samples obtained from such specimens are suitable for PCR amplification and sequencing. The CTAB method is best for fresh adult specimens but the GenMagBio kit is the best extraction method for specimens that have been stored in ethanol for a long period, especially if there has been serious DNA degradation.

Key words *Phenacoccus solenopsis*, preservation, DNA extraction, CTAB method, magnetic beads method

---

* 资助项目 Supported projects：国家“十二五”科技支撑计划课题(2012BAK11B03)；国家质检总局科技项目(2014IK023)和苏州市地方科技项目(SNG201430)

**第一作者 First author，E-mail：weiyihan0726@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：caip@suda.edu.cn

收稿日期 Received：2015-06-23，接受日期 Accepted：2015-06-30

粉蚧隶属半翅目 Hemiptera 粉蚧科 Pseudococcidae，是一类严重为害棉花、蔬菜和观赏植物等农林植物的害虫。目前，对此类昆虫生物生态学特性、天敌防治、化学防治和风险分析等方面的研究较多（Vennila *et al.*，2010；Prishanthini and Vinobaba，2014），在分子水平上利用生物大分子如核酸、蛋白质的差异来研究其系统发育和遗传分化正在成为新的研究领域。粉蚧该类昆虫虫体较小，表面覆盖白粉，不当的标本保存及 DNA 提取方式会造成标本 DNA 降解，PCR 污染率高等问题，影响后续的分子生物学实验结果。另外，在粉蚧标本采集与处理的标准化研究中，标本保存方式及环境条件、标本保存时间对检测结果的影响、标本是否需要取出肠道等内含物，均尚未有明确的答案（王敏强等，2009；刘倩颖和孙立新，2014；曲良建等，2014）。

基因组 DNA 是分子研究的必备材料，采集后的处理方式、后期储存条件等因素对 DNA 质量有较大的影响，许多研究者对基因组 DNA 提取方法中所采用的材料基本上是以石蜡包埋、甲醛浸泡、乙醇固定、福尔马林固定和超低温冷冻保存等为主（Sato *et al.*，2001；Drobinskaya，2005）。当野外样本大量采集时，从经济和简便性来说，100%乙醇的保存方法是最佳的选择，但其 DNA 提取时需经过 75%乙醇溶液多次清洗，再使用无菌水浸泡等前期处理才能提取 DNA，否则残留的乙醇和福尔马林等会影响后期 PCR 扩增。对于蝗虫等大型昆虫，材料获取方便，运用常规提取方法如 SDS 法及其改进的方法便可获得目的基因片段（乔玮娜等，2012），虽然 SDS 提取法因其较好的蛋白去除效果受到众多学者的普遍采用，但其抽提过程繁琐，且药品均为易挥发的有毒物质。对于蚧虫等小型昆虫，活动器官严重退化，DNA 获取难度较大，多采用高效快速的试剂盒法（Edwards *et al.*，2008）。陈哲等（2012）利用 DNA 抽提试剂盒法成功获取扶桑绵粉蚧线粒体 CO Ⅰ基因，证实了其存在 2 个进化支系；何衍彪等（2011）采用试剂盒法获得 12 种粉蚧的 rDNA18S、28S 序列，探讨了菠萝洁粉蚧 *Dysmicoccus brevipes*、康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki*、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 等的亲缘关系。CTAB 法因具有 DNA 得率较大、蛋白消化能力较强的优势也常被用于粉蚧的 DNA 提取（李惠萍等，2014）。近几年伴随着纳米技术的兴起，磁珠法的出现推进了 DNA 的快速提取技术的发展，纳米磁珠根据核酸带电性质，制备表面分布正电荷的磁性纳米材料，通过静电作用富集细胞或组织裂解液中的核酸，还可以通过高盐环境屏蔽核酸与磁性纳米材料的静电斥力，提取分离核酸（李松等，2009；郑斯竹等，2012；常虹等，2013）。本研究旨在寻找粉蚧新鲜标本和陈年标本最优的保存方法及基因组 DNA 提取方法，为野外标本的采集、运输及后续处理提供依据，为馆藏粉蚧标本的保存方式提供参考，也为粉蚧的分子分类学及群体遗传学研究提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与处理方式

本研究材料扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 雌成虫由苏州市出入境检验检疫局外来有害生物防控技术中心实验室提供，均采自江苏省苏州市。采集日期与保存方式见表 1。

1.2 样本预处理

挑取单头扶桑绵粉蚧虫体，用无水乙醇清洗至虫体表面干净，再用蒸馏水浸泡清洗 4~5 次，每次浸泡 5 min，灭菌滤纸吸干；将清洗好的样品材料放入 2.0EP 管中，置于 MM400 球磨仪中震荡研磨（30 次/s）20～30 s，12 000 r/min 离心 10 min。

1.3 DNA 提取

上述 3 种保存方式保存的扶桑绵粉蚧雌成虫标本，每种样品取 3 份，采用 2×CTAB 法、SDS 法、GenMagBio 动物细胞组织/细胞基因组磁珠法以及 GeneJET Genomic DNA 纯化试剂盒法（离心柱式）4 种方法进行 DNA 提取。

表 1　扶桑绵粉蚧标本采集日期与保存方法
Table 1　The situation of the *Phenacoccus solenopsis* adult samples

保存方式 Preservation	保存虫态 Insects development	采集时间 Collection date	采集地点 Locality site	保存时间（d） Preservation time
新鲜活体 4℃ Fresh living at 4℃	成虫 Adult	2014.12	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	0
无水乙醇 - 20℃ 100% ethanol at - 20℃	成虫 Adult	2013.05	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	570
无水乙醇 4℃ 100% ethanol at 4℃	成虫 Adult	2013.05	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	570

2×CTAB 法：参照 Boycecy 等（1989）的方法并加以改进：向预处理好的样品中对应加入 600 μL 的裂解缓冲液（0.1 mol/L Tris-HCL，0.02 mol/L EDTA，1.4 mol/L NaCL，0.05 mol/L CTAB，0.2% β-巯基乙醇，pH8.0）和 30 μL 的蛋白酶 K，65℃下孵育 1.5 h；②在样品中分别加入 500 μL 的酚-氯仿-异戊醇（25∶24∶1）混合液上下缓慢颠倒混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液；③重复步骤②反复抽提 2～3 次；④在上清液中加入 500 μL 的氯仿-异戊醇（24∶1）混合液颠倒混匀，12 000 r/min 离心 10 min；⑤取上清液，加入 2 倍体积 - 20℃预冷的无水乙醇沉淀 DNA，冰箱内放置 1 h，12 000 r/min 离心 10 min，倾去上清液；⑥将留有沉淀的离心管中加入 1 mL - 20℃预冷的 70%乙醇洗涤 DNA，12 000 r/min 离心 10 min，倾去上清液；⑦将离心管倒置于无菌滤纸上，放置桌面上自然风干 30 min；⑧加入 50 μL 超纯水，充分溶解后 - 20℃储存备用。

SDS 法：参照 Phillips and Simon（1995）的方法加以改进，向预处理好的样品中对应加入 600 μL 裂解液（0.1 mol/L Tris-HCI，0.5 mol/L EDTA，10 mol/L NaCL，0.5% SDS，0.2% 巯基乙醇）和 30 μL 的蛋白酶 K，65℃水中温浴 2 h，1 200 r/min 离心 10 min；其余步骤按照参照 Phillips and Simon（1995）方法进行，最后加入 30 μL 超纯水溶解，- 20℃保存备用。

GenMagBio 磁珠法：选用动物细胞组织/细胞基因组 DNA 磁珠提取试剂盒（北京，GenMagBio）。向预处理好的样品中加入 180 μL Lysis Buffer、20 μL Proteinase K，震荡混匀，常温过夜，55℃震荡温浴 1~3 h。其余操作步骤按产品说明进行，最后以 30 μL 的 Elution Buffer 洗脱基因组 DNA（郑斯竹，2012）。

GeneJET 试剂盒法（离心柱法）：选用 GeneJET Genomic DNA 纯化试剂盒 K0729（上海，Thermo Fisher），向预处理好的样品中加入 180 μL 消化液和 20 μL 蛋白酶 K 通过漩涡或者移液器获得均质悬浮液，56℃孵育 3 h；其余操作步骤按产品说明进行。最后向纯化柱内加入 30 μL 的洗脱缓冲液洗脱基因组 DNA，室温放置 2 min 后，以 8 000 r/min 的速度离心 1 min，弃掉纯化柱，- 20℃保存备用。

1.4　DNA 纯度与质量浓度检测方法

取 1 μLDNA，在 Nanophotometer TM Peal 超微量紫外可见分光光度计（Thermo Fisher Scientific 公司，美国）下测定波长 260 nm、280 nm 的光吸收值（OD）和相应的质量浓度值，根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值判断 DNA 的纯度。当 OD_{260}/OD_{280} 的值低于 1.6 时，说明样品中有蛋白质或酚的污染；高于 1.9 则说明样品中有 RNA 污染。

1.5　PCR 扩增、电泳检测及 COⅠ序列测定

选用蚧虫 COⅠ基因扩增通用引物对所提取的 DNA 模板进行扩增，上游引物为 PcoF1-5′-CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG-3′（Park *et al.*，2010），下游引物为 LepR1-5′-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAAT

CA-3′（Hebert *et al.*，2003a），由苏州金唯智生物科技有限公司合成，目标片段约 650 bp。

PCR 反应体系：其中模板 DNA 2 μL，10×Buffer 2.5 μL（含 Mg^{2+}），dNTPs 2 μL （0.2 mmol/L），上游引物和下游引物各 1 μL（5 pmol/L），Taq DNA 聚合酶 0.2 μL（1.0 U），无菌水补至 25 μL。反应条件：95℃预变性 4 min；35 个循环：94℃变形 1 min，48℃退火 1 min，72℃延伸 90 s；最后 72℃延伸 4 min，4℃保存。

取 6 μL PCR 扩增产物，加 2 μL Loading Buffer 上样缓冲液，以 DNA2000Marker 为参照，在含有 EB 染色剂的 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离（电泳液为 1×TBE），120 V 电泳 35 min 后，凝胶成像系统分析结果。将电泳检测合格的 PCR 产物直接送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。测序结果经 Blast 比对，查看是否为目标片段，即线粒体 CO Ⅰ基因 DNA 的扩增片段。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度

由表 2 可以看出，在 DNA 浓度上，对于新鲜活体样品，以 CTAB 法最高，达 177.200 ng/μL；SDS 法次之，142.640 ng/μL；其次是 GenMagBio 磁珠法，64.420 ng/μL；GeneJET 试剂盒法最低，只有 46.820 ng/μL。对于无水乙醇 - 20℃长时间保存的样品，DNA 浓度仍是 CTAB 法最高，SDS 法稍低于 CTAB 法，磁珠法居于前两者之下，离心柱最低。对于无水乙醇 4℃保存的样品，DNA 浓度高低顺序与无水乙醇 - 20℃相同。

在 DNA 纯度上，磁珠法可获得较高纯度的 DNA；在不同的保存方式下，其 OD 值分别为 1.883、1.786 和 1.652，均在 1.6~1.9 之间，其余 3 种方法提取的 DNA 其 OD 值皆低于 1.6，说明有蛋白质或酚类物质污染。

2.2 粉蚧 DNA 的电泳检测

用 4 种方法分别提取 3 种保存方式的扶桑绵粉蚧雌成虫标本的 DNA，对所得 DNA CO Ⅰ保守区域进行 PCR 扩增，扩增片段大小为 650 bp，扩增结果如图所示。

对于新鲜活体标本，4 种方法提取出的 DNA 均能扩增出条带，其中 CTAB 法 3 条带全部扩出，DNA 质量最好（图 1，1~3）；GenMagBio 磁珠法扩增出 2 条带且较亮（图 2，1~3），SDS 法扩增出 2 条带有弥散现象（图 3，1~3），离心柱法仅能扩增出 1 条带（图 4，1~3）。对于无水乙醇 - 20℃保存的标本，4 种方法提取的 DNA 扩增出的条带均颜色暗淡；其中，以 GenMagBio 磁珠法提取的 DNA 质量最高，可扩增出 3 条带，

表 2 不同保存时间和 DNA 提取方法样品的 DNA 浓度与纯度

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

	CTAB 法 CTAB method		SDS 法 SDS method		GenMagBio 磁珠法 GenMagBio kit		GeneJET 试剂盒法 GeneJET kit	
	DNA 浓度 (ng/μL) Concentration	OD_{260}/OD_{280} Ration absorbance	DNA 浓度 (ng/μL) Concentration	OD_{260}/OD_{280} Ration absorbance	DNA 浓度 (ng/μL) Concentration	OD_{260}/OD_{280} Ration absorbance	DNA 浓度 (ng/μL) Concentration	OD_{260}/OD_{280} Ration absorbance
新鲜活体 4℃ Fresh living at 4℃	177.200	1.587	142.640	1.571	64.420	1.883	46.820	1.412
无水乙醇 - 20℃ 100% ethanol at - 20℃	96.224	1.542	72.430	1.455	30.867	1.786	20.250	1.500
无水乙醇 4℃ 100% ethanol at 4℃	94.164	1.467	73.140	1.389	28.590	1.652	15.360	1.389

表中数据为 3 次重复平均值。

Values in the table are mean of three observations.

且都均一、清晰、明亮（图 2，4~6）；CTAB 法扩增出 1 条带，颜色暗淡（图 1，4~6）；SDS 法扩增出 1 条带，弥散和拖尾现象严重（图 3，4~6），结合表 2 的 OD_{260}/OD_{280} 分析，提取的 DNA 中可能含有多糖或其它次生代谢物质等杂质，影响了目标 DNA 的表达；GeneJET 试剂盒法未能扩增出条带（图 4，4~6）。对于无水乙醇 4℃保存的标本，磁珠法 3 条带全部跑出（图 2，7~9），CTAB 法仅扩增出 1 条带（图 1，7~9），SDS 法依然存在拖尾现象（图 3，7~9），GeneJET 试剂盒法未能扩增出条带（图 4，7~9）。之后对 PCR 产物纯化测序，经 GENBANK 上比对，验证其为预期的线粒体 CO Ⅰ基因的扩增结果。

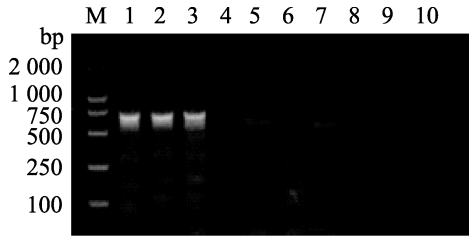

图 1　CTAB 法 3 种保存方式扶桑绵粉蚧成虫 CO Ⅰ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 1　PCR amplification of CO Ⅰ gene in *Phenacoccus solenopsis* samples under three different preservation methods by CTAB method

M: DNA marker；1~3: 新鲜活体；4~6: 无水乙醇 - 20℃保存；7~9: 无水乙醇 4℃保存；10: 无模板对照。下图同。

M: DNA marker; 1-3: Fresh samples; 4-6: Samples preserved in 100% ethanol under - 20℃; 7-9: Samples preserved in 100% ethanol under 4℃;10: No template control. The same below.

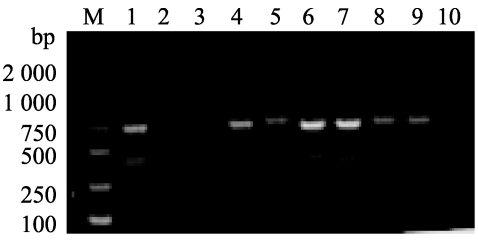

图 2　磁珠法 3 种保存方式扶桑绵粉蚧成虫 CO Ⅰ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 2　PCR amplification of CO Ⅰ gene in *Phenacoccus solenopsis* samples under three different preservation methods by magnetic beads method

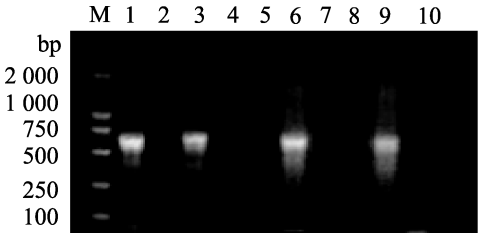

图 3　SDS 法 3 种保存方式扶桑绵粉蚧成虫 CO Ⅰ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 3　PCR amplification of CO Ⅰ gene in *Phenacoccus solenopsis* samples under three different preservation methods by SDS method

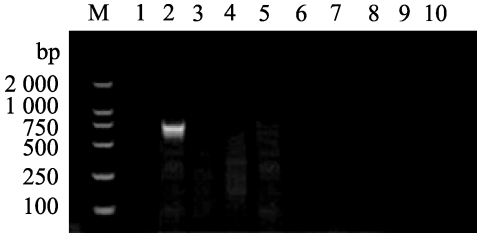

图 4　GeneJET Genomic DNA 纯化试剂盒法 3 种保存方式扶桑绵粉蚧成虫 CO Ⅰ基因 PCR 扩增电泳检测图谱

Fig. 4　PCR amplification of CO Ⅰ gene in *Phenacoccus solenopsis* samples under three different preservation methods by GeneJET Genomic DNA puritation kit method

3　结论与讨论

获取高质量的 DNA 是任何分子生物学下游研究的前提和基础，高质量的 DNA 应具有高分子量，无明显降解现象，尽量保持核酸分子完整性，尽量去除酚类、糖类等严重干扰酶作用的杂质和高获取效率等特点。作为整个试验的起始，对样本的保存处理通常会想到 DNA 的提取质量，成为研究的瓶颈，不同的试验材料需配合不同的 DNA 提取物方法。

本研究采用目前通行的 4 种 DNA 提取方法对 3 种保存方式的粉蚧进行 DNA 提取，结果表明：对于新鲜活体标本，其提取的 DNA 质量顺序为：CTAB 法>GenMagBio 磁珠法>SDS 法>GeneJET 试剂盒法，以 CTAB 法提取效果最好，浓度高达 177.200 ng/μL；对于无水乙醇 - 20℃保存的标本，其质量顺序为：GenMagBio 磁珠

法>SDS 法>CTAB 法>GeneJET 试剂盒法，以磁珠法提取效果最好；对于无水乙醇 4℃保存的标本，其质量顺序为：GenMagBio 磁珠法>SDS 法>CTAB 法>GeneJET 试剂盒法，磁珠法提取效果最好。说明不同 DNA 提取方法提取到的 DNA 纯度和产率均不同，不同保存方式提取的 DNA 质量也不同。相比新鲜活体样品，无水乙醇保存样品基因组 DNA 的浓度整体呈下降趋势，得率和纯度也有所下降，无水乙醇－20℃比无水乙醇 4℃保存方式的 DNA 质量稍高，但差别不大，且都能满足后续试验需求。对于新鲜活体标本，适合采用 CTAB 法；对于无水乙醇长时间保存的标本，因 DNA 降解严重，适合采用磁珠法。

对于浸渍标本，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。已有研究证明 70%乙醇固定的标本和部分干标本提取的总 DNA 得率较低，而无水乙醇浸泡标本提取的总带型整齐，说明无水乙醇－20℃保存适合标本长期保存（曲良建等，2014）。本研究的结果同样证明无水乙醇保存方式虽然存在一定程度的 DNA 降解，但仍是可取的保存方法。目前研究多集中在比较无水乙醇固定与其他浸泡液固定、干标本以及冷冻标本等几种处理方式下 DNA 提取质量的高低，而在用乙醇处理标本时，保存温度是否影响 DNA 提取则研究较少。本研究无水乙醇 4℃和－20℃的处理发现，－20℃处理获取的 DNA 质量稍高，但无明显区别，乙醇低温固定保存的必要性有待进一步查证。

针对不同的虫体和保存方式，DNA 提取方法的选择和优化起到关键性的作用。新鲜粉蚧 DNA 提取时，改良 CTAB 法凸显了其优势，这与以往结论吻合（李惠萍等，2014），其用 β-巯基乙醇强变性剂和氯仿、异戊醇反复抽提，蛋白去除效果较好，但本研究发现其 OD 值均低于 1.6，可能是因为扶桑绵粉蚧壳体壁有颜色，该方法对色素去除效果较差，导致提取的 DNA 样品含该类杂质。近几年，基于功能化膜和微球的基因组 DNA 分离技术得到了快速发展，新兴的磁珠法因其费时较短，无污染，对微量检材或陈旧标本的高提取效率在法医学领域备受青睐，部分实验室已出现磁珠 DNA 自动提取系统。本研究发现长时间保存、DNA 含量极少的粉蚧样品适合采用磁珠法提取，而对新鲜标本效果远不如传统的 CTAB 法，可能是因为新鲜蚧虫体内内含物较多，尤其是脂肪会造成磁珠粘连，降低磁珠对 DNA 的吸附，而无水乙醇会破坏脂肪结构，采用无水乙醇长时间保存后，磁珠法只吸附 DNA 的优势便得以显现，效果好于 CTAB 法。

磁珠法提取的 DNA 浓度在 28.590~64.420 ng/μL 之间波动，而 CTAB 法则在 94.164~177.200 ng/μL 之间波动，说明磁珠法提取的 DNA 浓度较 CTAB 法而言整体偏少，由于单个磁珠表面吸附的量比较恒定，导致 DNA 得率远不如 CTAB 法，可能是由于磁珠吸附能力的限制，可以通过增加标本量、适当调整磁珠量、增加裂解液及洗脱液的用量来增加 DNA 得率，但磁珠量不足时无法完全吸附，过量则可能超过磁棒对磁珠的吸附能力，导致大量磁珠残留，影响 DNA 提取效果，从经济角度考虑会造成不必要的浪费。也有报道用修饰过的磁性细菌粒子提取 DNA：将磁性细菌产生的磁性粒子主要成分（Fe_3O_4），用富含氨基基团的硅烷混合物包被，DNA 与这种修饰过的磁性粒子的结合率远远高于单纯的磁性粒子，达 14 倍左右（Yoza *et al.*，2013）。在采用磁珠法提取昆虫基因组 DNA 时，可参考国内外学者对免疫磁珠的研究，对磁珠表面进行修饰，调节磁性粒子与其它材料的相容性和反应性。在 DNA 提取最优条件的选择上，综合考虑标本量、裂解时间、磁珠量和乙醇浓度 4 个因素的交互作用（凌洁等，2012），以此达到较理想的磁珠吸附效果。

综上所述，摸索适合粉蚧的标本保存条件与优化其 DNA 提取方法是获取高质量 DNA 所必需。此外，PCR 程序优化方面也是不能忽视的，如引物的选择，对 DNA 样品浓度稀释和加入少量牛血清蛋白等降低抑制剂，采用二次 PCR、巢式 PCR、热启动 PCR、TouchDown PCR、常规降落 PCR 和不规则降落等不同 PCR 扩增程序对

靶标 DNA 扩增，后续工作可探讨如何去除假基因的干扰问题，以期达到高效扩增高质量的 DNA 的目的。

参考文献 (References)

Boyce TM, Zwick ME, Aquado CF, 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils:size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123(4): 825–836.

Chang H, Hao DJ, Yang XJ, Xiao RT, Liu Y, Qian L, An YL, 2013. Comparison of four genomic DNA extraction methods with Scolytidae beetles. *Journal of Beijing Forestry University*, 35(2): 75–79. [常虹, 郝德君, 杨晓军, 肖荣堂, 刘勇, 钱路, 安榆林, 2013. 小蠹科昆虫基因组 DNA 提取方法的比较研究. 北京林业大学学报, 35(2): 75–79.]

Chen Z, Zhang J, Fu HF, Xu ZZ, Deng KZ, Zhang JY, 2012. On the validity of the species *Phenacoccus solenopsis* based on morphological and mitochondrial COI data, with the description of a new body color variety. *Biodiversity Science*, 20(4): 443–450. [陈哲, 张姜, 傅杭飞, 许争争, 邓坤正, 张加勇, 2012. 基于形态特征和线粒体 COI 基因探讨扶桑绵粉蚧物种的有效性并记述一体色变异型扶桑绵粉蚧. 生物多样性, 20(4): 443–450.]

Drobinskaya I, Gabbert HE, Moeslein G, Mueller W, 2005. A new method for optimizing multiplex DNA microsatellite analysis in low quality archival specimens. *Anticancer Res.*, 25(5): 3251–3258.

Edwards R, Carraher C, Poulton J, Sandanayaka M, Todd JH, Dobson S, Mauchline N, Hill G, McKenna C, Newcomb RD, 2008. DNA Diagnostics of three armored scale species on kiwifruit in new zealand. *Joural of Economic Entomology*, 101(6): 1944–1949.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, *Series B*, 1512 (270): 313–321.

Li HP, Wang JH, Zhang LX, Liu HF, Liu XL, 2014. An isolation method of genomic DNA from coccini scale insects. *Journal of Environmental Entomology*, 36(2): 182–187.[李惠萍, 王静慧, 张龙霞, 刘海峰, 刘晓琳, 2014. 一种球蚧类蚧虫基因组 DNA 的提取方法. 环境昆虫学报, 36(2): 182–187.]

Ling J, Wang J, Zhang DD, Lai MS, Zhu YM, 2012. Optimization of genomic DNA extraction with magnetic bead-based semiautomatic system. *Journal of Zhejiang University* (*Medical Sciences*), 41(3): 320–326. [凌洁, 王昊, 张帅, 张丹丹, 来茂德, 朱益民, 2012. 磁珠法半自动提取全血基因组 DNA 条件的优化. 浙江大学学报(医学版), 41(3): 320–326.]

Liu LY, Sun LX, 2014. Genomic DNA extraction from stale samples. *Chinese Journal of Microecology*, 26(10):1230–1235.[刘倩颖, 孙立新, 2014. 陈旧标本 DNA 提取方法. 中国微生态学杂志, 26(10): 1230–1235.]

Li S, Liu HN, He NY, 2009. Functionalization of magnetic nanoparticles and their application in DNA extraction. *Chemical Industry Times,* 23(7): 13–15.[李松, 刘洪娜, 何农跃, 2009. 磁性纳米颗粒的功能化及其在 DNA 提取中的应用. 化工时刊, 23(7): 13–15.]

He YB, Wan XW, Zhan RL, Sun GM, Liu YH, Xu ZF, Zhao YL, 2011. Genetic relationship of 12 species of mealybugs (Hemiptera:Pseudococcidae)based on DNA sequences. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(12): 2324–2330. [何衍彪, 万宣伍, 詹儒林, 孙光明, 刘映红, 许再福, 赵艳龙, 2011. 基于 DNA 序列的 12 种粉蚧亲缘关系分析. 热带作物学报, 32(12): 2324–2330.]

Phillips AJ, Simon C, 1995. Simple, effect and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. *Entomological Society of America*, 88(3): 28–30.

Park DS, Suh SJ, Oh HW, Hebert PDN, 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 11(1): 423–425.

Prishanthini M, Vinobaba M, 2014. Efficacy of some selected botanical extracts against the cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Scientific and Research Publications*, 4(3): 1–5.

Qu JL,Wang LJ, Wang QH, Wang YZ, Zhang YA, 2014. Comparison of the quality of genomic DNA extracted from adult specimens of *Monochamus alternatus* preserved by different methods. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(3): 741–748.[曲良建, 王丽娟, 王青华, 王玉珠, 张永安, 2014. 松墨天牛成虫标本保存及其 DNA 提取质量比较. 应用昆虫学报, 51(3): 741–748.]

Qiao WN, Wan FH, Zhang AB, Min L, 2012. Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 344–356. [乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 闵亮, 张桂芬, 2012. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用.

昆虫学报, 55(3): 344−356.]

Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K, 2001. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification fromforma-lin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*, 10(4): 265−271.

Vennila S, Deshmukh AJ, Pinjarkar D, Agarwal M, Ramamurthy VV, Joshi S, Kranthi KR, Bambawale OM, 2010. Biology of the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* on cotton in the laboratory. *Journal of Insect Science*, 10(2): 115.

Wang MQ, Wang B, Liu XL, 2009. Influences of storage time and temperature on the quality of dna extracted from preserved animal tissues. *Jounaral of Anhui Agricultural Sciences*, 37(33): 16407−16409.[王敏强, 王斌, 刘晓玲, 2009. 保存温度与时间对动物组织 DNA 提取质量的影响. 安徽农业科学, 37(33): 16407−16409.]

Yoza B, Arakaki A, Matsunaga T, 2003. DNA extraction using bacterial, magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine den-drimer. *J. Biotechnol.* , 101(3): 219−228.

Zheng SZ, An YL, Xu 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. [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.]