

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.01068

福尔马林固定鱼类标本 DNA 提取方法的优化

孔啸兰^{1,2}, 陈作志¹, 林琳¹, 李纯厚¹, 梁沛文¹

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 气候变化和人类活动胁迫致使许多海洋鱼类种群结构发生了显著变化。为了摸清鱼类种群结构对气候变化和人类胁迫活动的响应机理, 利用福尔马林固定标本研究较早年代海洋鱼类 DNA 是一种有效的途径。为了解决福尔马林固定鱼类样本 DNA 提取质量差的难题, 以福尔马林固定近 50 年的金线鱼(*Nemipterus virgatus*)标本为例, 研究 DNA 提取过程中多个因素对 DNA 提取产量的影响。以取样部位、除甲醛处理、消化时间、抽提方法为考察因素, 以 DNA 提取浓度为评价指标, 通过 SPSS 软件设计 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交实验。结果, 得到的最优处理组为: 肌肉组织样品经 GTE 缓冲液浸泡与酒精梯度处理后, 90℃水浴 30 min, 真空干燥处理, 加入裂解液与蛋白酶 K, 55℃水浴消化 3 h, 试剂盒法提取 DNA。除甲醛处理是提高 DNA 产量的关键, 处理步骤越多效果越好。90℃水浴后再消化能够显著提高 DNA 提取效率。通过对比标本 DNA 与新鲜样品 DNA, PCR 扩增的结果, 证明使用优化方法提取的 DNA 能够满足后续研究的需求。

关键词: 福尔马林; 金线鱼; DNA 提取; 正交设计

中图分类号: Q173

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-1068-06

近几十年来, 由于气候变化和人类活动加剧, 许多海洋鱼类的种群结构发生了显著的变化^[1-3]。目前对于产生这种变化的机理我们了解的很少。馆藏海洋鱼类标本中保留着这个变化过程中的大量信息, 尤其是标本中的 DNA 所包含的遗传信息, 为我们更好的理解海洋鱼类种群结构的变化提供了宝贵的线索。

馆藏鱼类标本多为福尔马林浸制。研究人员发现从福尔马林固定标本中提取出的 DNA 普遍存在浓度低, 片段短, 难以进行 PCR 扩增等缺点^[4-6]。这些缺点可能主要是由福尔马林中的甲醛造成的。首先, 甲醛容易使 DNA 与蛋白质之间形成交联, DNA-蛋白质交联体会抑制蛋白酶 K 的水解作用, 使 DNA 难以有效释放^[7]; 其次, 甲醛与空气

接触容易被氧化成甲酸, 甲酸对 DNA 有降解作用, 造成 DNA 片段化; 第三, 甲醛对 DNA 的某些化学修饰作用可能会阻碍 PCR 扩增或限制扩增长度^[8]。除甲醛的原因外, 标本 DNA 的提取质量也与标本保存部位、时间、温度等有关。因而在提取福尔马林固定鱼类样本 DNA 的过程中要考虑多方面的因素。

已有学者对如何提高福尔马林固定鱼类标本 DNA 提取质量进行了研究, 提出了一些改进的方法^[9-13], 但是尚未有一整套完整的方案能够得到学术界的普遍认同^[14]。针对这一状况, 本研究以 1962 年福尔马林固定的金线鱼为例, 在总结前人研究的基础上, 应用正交设计法研究 DNA 提取过程中多种因素对福尔马林固定海洋鱼类标本

收稿日期: 2012-01-23; 修订日期: 2012-04-25.

基金项目: 广东省重大科技计划项目(2009B030600002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2010ZD01, 2011YD03); 广东省科技计划项目(2011B031100001); 广东省自然科学基金资助项目(9451030002002475).

作者简介: 孔啸兰(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 渔业生态保护. E-mail: weilankong.2005@163.com

通信作者: 李纯厚, 研究员. E-mail: scslch@vip.163.com

DNA 提取产量的影响,以期能够了解各优化处理对提高 DNA 产量的效果并得到高质量的 DNA,为海洋鱼类种群结构变化等研究提供帮助。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国水产科学研究院南海水产研究所标本馆提供金线鱼标本 10 尾。此标本于 1962 年采自北部湾,整条浸于 10%福尔马林。

1.2 正交实验设计

以取样部位、除甲醛处理、消化时间、抽提方法为考察因素,以提取的 DNA 浓度平均值为考察指标,选用 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交表进行 DNA 优化提取的正交实验设计(表 1、表 2)。

1.2.1 取样部位(B) 选择金线鱼标本肌肉和尾鳍组织为取样部位(水平数为 2)。

1.2.2 除甲醛处理(A) 分别使用 4 种方式进行 4 组除甲醛处理(水平数为 4)。第 1 组为负对照,用灭菌双蒸水冲洗组织数遍后备用;第 2 组为缓冲

液浸泡处理,离心管中加入 GTE 缓冲液(500 mmol/L Tris, 200 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Gly, 10 mmol/L NaCl, pH 9.0), 4℃放置 48 h, 其间每 8 h 更换一次缓冲液^[15-16], 并进行颠倒混匀;第 3 组是酒精梯度处理^[9,17], 按照 50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%乙醇浓度的顺序, 分别浸泡 8 h, 每 4 h 换乙醇一次, 之后按相反乙醇浓度复水, 分别浸泡 20 min, 之后再将此过程重复一次;第 4 组采用缓冲液浸泡后再进行酒精梯度处理, 具体步骤如上所述。

1.2.3 消化时间(C) 在之前的研究中我们发现,样品经 90℃高温水浴后很容易被蛋白酶 K 消化, 仅需 3 h 即可消化完全。相反, 未经 90℃高温处理的样品难以消化, 需要过夜甚至更长时间才能消化完全。因此, 将上一步处理后的样品分为两组(水平数为 2)。其中一组经 90℃水浴 30 min 后, 真空干燥, 加入对应裂解液后用剪刀剪碎样品, 之后加入 10 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL), 55℃水浴消化 3 h。另一组样品不经 90℃水浴加热处理, 直

表 1 正交实验的各因素和水平
Tab.1 The factors and levers in orthogonal experiment

水平 level	因素 factor			
	除甲醛处理(A)anti-formaldehyde treatments	取样部位(B) sampling part	消化时间(C) digestive time	提取方法(D) extraction method
1	双蒸水冲洗 control	肌肉 muscle	90℃处理后消化 3 h 3 h digestion after 90℃ waterbath	试剂盒法 Kit method
2	缓冲液浸泡 buffer wash	尾鳍 caudal fin	不经 90℃处理消化 24 h 24 h digestion without 90℃ waterbath	酚-氯仿法 phenol-chloroform method
3	酒精梯度浸泡 alcohol gradient wash			
4	缓冲液加酒精梯度浸 buffer and alcohol gradient wash			

表 2 正交实验设计
Tab.2 Orthogonal experiment design

实验组 experimental group							DNA/(μg·μL ⁻¹)
	A	B	C	D	E(空白 blank)		
1	1	1	1	1	1		4.160
2	1	2	2	2	2		3.330
3	2	1	1	2	2		13.380
4	2	2	2	1	1		18.110
5	3	1	2	1	2		18.720
6	3	2	1	2	1		14.500
7	4	1	2	2	1		26.840
8	4	2	1	1	2		20.730

接进行 55℃ 水浴消化 24 h, 并在 12 h 时补加 1 次蛋白酶 K。

1.2.4 DNA 抽提(D) 分别选用试剂盒法与酚-氯仿法抽提标本 DNA(水平数为 2)。试剂盒选用 QIAamp DNA FFPE Tissue kit(QIAGEN)。依照说明书进行抽提, 最后加 50 μ L 灭菌双蒸水溶解 DNA。酚-氯仿法参照 Sambrook^[18]的方法, 消化结束后, 用“酚-氯仿-异戊醇混合液”抽提 2 次, 再用氯仿抽提 1 次, 然后用 70%乙醇洗涤 DNA, 100%乙醇沉淀 DNA, 干燥后加 50 μ L 灭菌双蒸水溶解 DNA。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果, 之后使用 NanoDrop 2000/2000C 分光光度计(Thermo Scientific)检测标本 DNA 浓度, 最后使用统计软件 SPSS 对实验结果进行统计分析。

1.3 金线鱼标本 DNA 质量验证

为验证标本 DNA 的质量能否满足后续研究的需求, 选择线粒体 D-loop 区通用引物 dl-s(5'-CCACCACTAACTCCCAAAGC-3')和 dl-r(5'-CTG GAAAGAACGCCGCGCATG-3')^[19]和微卫星引物 NV4(F: ACCAGATTATAGTTACAAGCG; R: TGT CCCTCACAGGTAGATAG)(本实验室开发, 未发表, 目的片段长度为 291bp)对金线鱼标本 DNA 进行 PCR 扩增。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系包括 10 $\times$ Buffer 5 μ L, Taq 酶(5U/ μ L) 0.2 μ L(Takara), dNTP Mix(2.5 μ mol/L) 4 μ L, 引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模版 5 μ L, 加双蒸水至 50 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共进行 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增结束后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。纯化线粒体 DNA 目的片段并与载体 pMD-18T(Takara)连接, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 克隆目的片段后测序。

2 结果与分析

2.1 标本 DNA 提取结果的琼脂糖凝胶电泳

使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测获得的标本 DNA(图 1)。结果, 使用未优化方案提取的 DNA, 在凝胶图像上看不到任何信号, 说明 DNA 浓度

甚低。使用优化方案提取的 DNA, 在电泳图像上呈涂抹状, 这说明获得的标本 DNA 已严重降解。

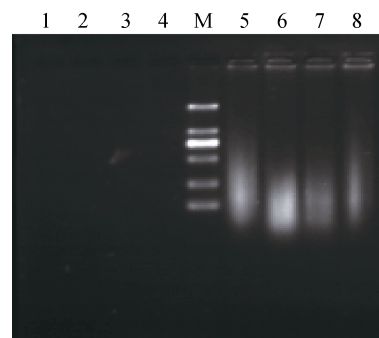


图 1 福尔马林固定金线鱼 DNA 提取结果

1-4, 对照组肌肉组织基因组 DNA; M, maker 2000(Takara); 5-8, 最优处理肌肉组织基因组 DNA。

Fig.1 Genomic DNA extracted from formalin-fixed *N.virgatus*. Lanes 1-4, control group of muscle genomic DNA; M, maker 2000(Takara); Lanes 5-8, optimized experimental group of muscle genomic DNA.

2.2 正交实验

由正交实验数据的方差分析结果可知, “消化时间”与“抽提方法”的 F 值均小于 1, 说明差异不显著。为了提高假设检验的灵敏度, 将这两项与误差项进行了合并(表 3)。由表 3 可知, “除甲醛处理”的各水平差异极显著; “提取部位”的各水平差异显著。对除甲醛处理各水平进行成对比较, 相邻组 $P < 0.05$, 差异显著; 不相邻组 $P < 0.01$, 差异极显著(表 4)。

因此, “肌肉组织”较“鳍条组织”得到更高产量的 DNA; “除甲醛处理”中“缓冲液浸泡”与“酒精处理”均能显著提高 DNA 产量, 联合使用效果最好; “消化时间”与“抽提方法”虽然差异不显著, 但从节省时间与简化步骤方面考虑, 我们认为“90℃ 热处理后消化 3 h”与“试剂盒法”为最佳选择。综上所述, 最佳的处理组为肌肉组织样品经 GTE 缓冲液浸泡与酒精梯度处理后, 90℃ 水浴 30 min, 真空干燥处理, 加入裂解液与蛋白酶 K, 55℃ 水浴消化 3 h, 试剂盒法提取 DNA。

2.3 金线鱼标本 DNA 提取质量验证

对提取成功的标本 DNA 分别进行了线粒体 D-loop 区和微卫星位点 NV4 的 PCR 扩增。使用

表 3 正交实验结果的方差分析检验
Tab. 3 Variance analysis effects of orthogonal design result

源 source	偏差平方和 Tape III sum of square	自由度 df	均方 mean square	F	显著性 Sig.
校正模型 corrected mode	469.758 ^a	4	117.440	43.723	0.005
截距 intercept	1506.182	1	1506.182	560.750	0.000
A	436.015	3	145.338	54.109	0.004 [*]
B	33.743	1	33.743	12.563	0.038 [*]
误差 error	8.058	3	2.686		
总计 total	1983.998	8			
校正的总计 corrected total	477.816	7			

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (表 2,3 同).a. $R^2=0.983$ (调整 $R^2=0.961$).
Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (as table 2,3). a. $R^2=0.983$ (Adjusted $R^2=0.961$).

表 4 A 因素配对比较
Tab. 4 A factor Paired comparison

I(A)	J(A)	均数差(I-J) mean difference(I-J)	显著性 Sig.
1	2	-7.000	0.024 [*]
	3	-12.865	0.004 ^{**}
	4	-20.040	0.001 ^{**}
2	1	7.000	0.024 [*]
	3	-5.865	0.037 [*]
	4	-13.040	0.004 ^{**}
3	1	12.865	0.004 ^{**}
	2	5.865	0.037 [*]
	4	-7.175	0.022 [*]
4	1	20.040	0.001 ^{**}
	2	13.040	0.004 ^{**}
	3	6.175	0.022 [*]

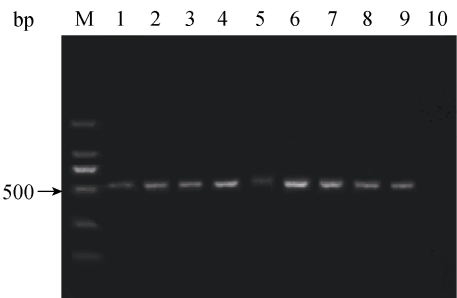


图 2 福尔马林固定金线鱼线粒体 D-Loop 区 PCR 扩增产物
M, maker 2000(Takara); 1-10, 最优处理样品组样品。
Fig.2 The mtDNA D-Loop fragment amplification products
from formalin-fixed *N.virgatus*
M , maker 2000(Takara); Lanes 1-10, optimized experimental
group samples.

1%琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行了检测(图 2、图 3)。结果, 两个位点的扩增都获得了高特异性的扩增产物条带。之后, 使用 MEGE4.0 软件对所

得标本 DNA 的 D-loop 序列与新鲜金线鱼样本的 D-loop 序列(本实验室测)进行比对, 结果显示两者的相似度 $\geq 99\%$ 。上述结果证明, 使用本研究获得的优化方法提取的 DNA 能够满足后续研究的需求。

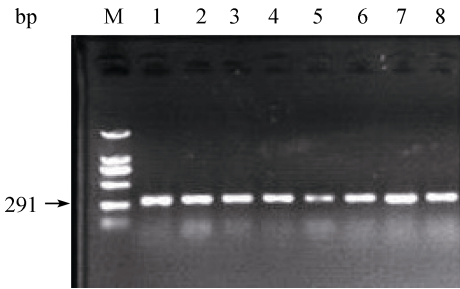


图 3 福尔马林固定金线鱼微卫星位点 NV4 的 PCR 扩增产物
M, maker 2000(Takara); 1-8, 最优处理样品组样品
Fig.3 SSR amplification products from formalin-fixed *N.virgatus*
M , maker 2000(Takara); Lanes 1-10, optimized experimental
group samples.

3 讨论

除甲醛处理的主要目的是要尽量除去标本中的甲醛, 减弱其对 DNA 提取的影响。甲醛溶于水可以生成水合甲醛, 因此可以用水冲洗标本, 以除去标本中的甲醛。本研究为防止标本大量吸水破坏细胞结构, 改用 GTE 缓冲液代替水处理标本。肖武汉等^[15]认为, 高浓度高 pH 的 TE9.0(500 mmol /L Tris, 200 mmol /L EDTA, 10 mmol/L NaCl)缓冲液对 DNA 有保护作用,有利于 DNA 的提取。本研究中所用 GTE 缓冲液是在 TE9.0 缓冲液中加

入甲醛结合剂甘氨酸^[16]配制而成,因而更有利于甲醛的置换。使用酒精梯度置换法除去甲醛的原理是利用乙醇与甲醛之间反应生成半缩醛或缩醛,通过设置梯度乙醇浓度替换液,不断置换出甲醛。之后复水的过程主要是为了保护细胞结构的完整。另外,高温加热步骤以及真空干燥处理^[20]也有利于甲醛的置换与挥发。正交实验结果表明,上述方法的使用对提高 DNA 产量有显著的效果,是标本 DNA 提取方法优化的关键。

福尔马林对蛋白酶 K 有抑制作用,因此通常在提取标本 DNA 时会添加较高量的蛋白酶 K 并且延长消化时间。有报道的最长的消化时间为 7 d^[21]。在本研究中我们发现,经过 90℃ 高温处理的样品可以在很短的时间内被少量的蛋白酶 K 完全消化,其结果与长时间、大量蛋白酶 K 处理的结果相比没有明显差异。因此 90℃ 水浴后再消化对于标本 DNA 的提取是一种高效经济的手段,既避免了长时间消化对 DNA 的影响,又节省了蛋白酶 K 的用量。

从图 1 可见,经优化处理获得的 DNA 虽较未优化时在产量上有很大的提升,但从琼脂糖电泳图像上看, DNA 仍呈涂抹状,说明 DNA 已经严重降解。引起标本 DNA 降解的主要原因可能是延搁时间过长和标本瓶密封不够严密。从死亡到进行福尔马林处理之间,生物体在空气中暴露的时间被称为延搁时间。夏颖哲等^[11]的研究表明,延搁时间越长, DNA 降解就会越严重。本研究所用标本的延搁时间已无从考证,所以标本 DNA 是否因此原因而降解,我们也已无法证明;另外,还有研究表明福尔马林保存标本中基因组 DNA 的降解程度主要与保存液是否暴露于空气中而被氧化有关^[9,22]。本研究所用标本使用玻璃标本瓶保存,瓶口密封不严,且保存液长期未更换,甚至部分组织已暴露于空气中。保存液里的甲醛很可能已大量被氧化成了甲酸,从而导致了 DNA 的降解。

Handt 等^[23]指出,标本 DNA 最好采用“PCR 产物直接测序法”以避免将 PCR 的错配误认为是 DNA 序列上的点突变。但是本研究选择将 PCR

产物克隆后再测序,因为对于质量较差的标本 DNA 来说克隆后测序更有利于提高测序的成功率。另外,可以通过筛选多个克隆子进行多次测序的方法避免 PCR 错配被误认为点突变。

如果由于保存方式的原因,标本 DNA 本身已遭严重破坏,我们无论对提取方案进行何种优化,都将很难提取到高质量的 DNA。因此,在寻找更为有效的 DNA 提取方法的同时,也应寻找既能保持标本良好外观形态又能有效保护基因组 DNA 的标本浸液,使馆藏标本能更好的为科研服务。

参考文献:

- [1] Hutchings J A, Reynolds J D. Marine fish population collapses: consequences for recovery and extinction risk [J]. *Bioscience*, 2004, 54: 297–309.
- [2] Tonn W M. Climate change and fish communities: a conceptual framework [J]. *Trans American Fish Soc*, 1990, 119: 337–352.
- [3] Jennings S, Greenstreet S P R, Reynolds J D. Structural change in an exploited fish community: a consequence of differential fishing effects on species with contrasting life histories [J]. *J Anim Ecol*, 1999, 68: 617–627.
- [4] 庞峻峰, 张亚平. 标本 DNA 研究进展[J]. *动物学研究*, 2001, 22(6): 490–496.
- [5] Orlando V, Paro R. Mapping polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin[J]. *Cell*, 1993, 75: 1187–1198.
- [6] Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, et al. In organelle formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 7772–7777.
- [7] Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent [J]. *Cell*, 1978, 15: 945–954.
- [8] Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA[J]. *Nature*, 1985, 314: 644–645.
- [9] 徐来祥, 张知彬, 宋铭晶, 等. 福尔马林保存的动物标本基因组 DNA 的提取方法[J]. *动物学报*, 2002, 48(2): 264–269.
- [10] Arrighi F E, Bergendahl J, Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues [J]. *Exper Cell Res*, 1968, 50: 47–53.
- [11] 夏颖哲, 张春光, 陈宜瑜, 等. 福尔马林保存鱼类标本中

- 大片段 DNA 的提取[J].水生生物学报, 2007, 31(4): 485–491.
- [12] 王丹, 谭德清, 童金苟. 福尔马林固定铜鱼基因组 DNA 的提取与扩增[J]. 生态学杂志, 2009, 28(3): 572–576.
- [13] Shiozawa D K, Kudo J, Evans R P, et al. DNA extraction from preserved trout tissue [J]. Great Basin Naturalist, 1992, 52(1): 81–87.
- [14] Gilbert M T, Haselkorn T, Bunce M, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e537.
- [15] 肖武汉, 吴春花, 宿兵, 等. 福尔马林固定云南鲃 DNA 提取及其细胞色素 b 基因序列分析[J]. 动物学研究, 1997, 18(3): 252–258.
- [16] Bentzen P, Shedlock A, Haygood M, et al. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from museum specimens [J]. Biotechniques, 1997, 22(3): 394–400.
- [17] Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. Formalin removal from archival tissue by critical point drying[J]. Biotechniques, 2002, 33: 604, 606, 608–610.
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: E3–E7.
- [19] Shui BN, Han ZQ, Gao TX et al. Mitochondrial DNA variation in the East China Sea and Yellow Sea populations of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*[J]. Fish Sci, 2009, 75: 593–600.
- [20] Wu L, Patten N, Yamas H C, et al. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002, 10: 269–274.
- [21] Warford A, Pringle J H, Hay J, et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formal-saline fixed and paraffin wax-embedded tissue[J]. J Pathol, 1988, 154(4): 313–320.
- [22] Banerjee S K, Makdisi W F, Weston A P, et al. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue[J]. Biotechniques, 1995, 18: 768–773.
- [23] Handt O, Hoss M, Krings M, et al. Ancient DNA: methodological challenges[J]. Cell Mol Life Sci, 1994, 50(6): 524–529.

Optimization of genomic DNA extraction from formalin-fixed fish specimens

KONG Xiaolan^{1,2}, CHEN Zuozhi¹, LIN Lin¹, LI Chunhou¹, LIANG Peiwen¹

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In recent decades, the population structure of many marine fish has dramatically changed under the influence of anthropogenic activities and climate change. To better understand the change mechanism, DNA extracted from formalin-fixed marine fish specimens is required. However, obtaining high quality DNA from formalin-fixed specimens is difficult. To obtain knowledge for improving the quantity of DNA extracted from marine fish specimens, ten *Nemipterus bathybius* specimens that were fixed in 1962 were used as samples, and an orthogonal experiment was designed following the $L_8 (4 \times 2^4)$ table. The DNA concentration was taken as the evaluation index. The tissue types, anti-formaldehyde treatments, digestive times and extraction methods were taken as selection factors. The best group was determined to be as follows: muscle samples wash for an extended time in buffer GTE and an alcohol gradient, 90°C annealing for 30 min and drying in a vacuum centrifuge, 3 h of digestion with Proteinase K within a waterbath of 55°C, and DNA extraction by kit. Anti-formaldehyde treatments significantly improved the production of DNA and the use of various anti-formaldehyde methods obtained the best effect. Digestion after a 90°C waterbath was efficient. The quality of specimen DNA was assessed by PCR amplification and sequencing. The sequences between specimens and fresh tissue were compared, which validated that the methods were reliable.

Key words: Formalin; *Nemipterus virgatus*; DNA extraction; orthogonal design

Corresponding author: LI Chunhou. E-mail: scslch@vip.163.com